

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2012-YL-007**

**MANYETİK BOYA-LİGAND AFİNİTE
NANOYAPILARINI KULLANARAK
Saccharomyces cerevisiae'den ALKOL DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

Nazife KAYA

**Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Nazife KAYA tarafından hazırlanan “Manyetik Boya-Ligand Afinite Nanoyapılarını Kullanarak *Saccharomyces cerevisiae*'den Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması” başlıklı tez, 16.03.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye	: Doç. Dr. Sinan AKGÖL	EGE ÜNİV.
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../2012

Nazife KAYA

ÖZET

MANYETİK BOYA-LİGAND AFİNİTE NANOYAPILARINI KULLANARAK *Saccharomyces cerevisiae*'den ALKOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Nazife KAYA

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN
2012, 71 sayfa

Reaktif boyalar, enzimlerin substratlarının ve koenzimlerinin yapısını taklit ederek aktif merkezleriyle etkileşebildiğinden proteinlerin saflaştırılmasında ligand olarak kullanılabilirler. Bu tezde koenzim olarak NAD^{+} 'e gereksinim duyan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması için boya ligand afinite kromatografisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla poli[2-hidroksietil metakrilat (HEMA)] nanoyapıları sentezlenmiş ve bu nanoyapılara ligand olarak Reaktif Green 19 boyası nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile kovalent olarak bağlanmıştır. Hazırlanan nanoyapıların karakterizasyonu FTIR, ESR, SEM, AFM ve EDX ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerden sentezlenen nanoyapıların yaklaşık 70 nm boyutunda, küresel ve manyetik özellikte olduğu bulunmuştur. Sentezlenen boya-ligand nanoyapılarına alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiş ve adsorpsiyona pH, alkol dehidrogenaz derişimi, sıcaklık ve iyonik şiddetin etkisi incelenmiştir. Boya bağlı nanoyapıların maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyon kapasitesi 0,5 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde pH 7,0 fosfat tamponunda 176,09 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Nanoyapılara adsorplanan alkol dehidrogenazın desorpsiyonu 1,0 M NaCl çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve desorpsiyon oranı % 98,4 olarak hesaplanmıştır. Enzimin sulu çözeltilerde adsorpsiyon ve desorpsiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra sentezlenen nanoyapılar *S. cerevisiae*'den alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Alkol dehidrogenaz enzimi tek bir kromatografik adımda % 71,26 aktivite verimi ile 45,63 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen enzimin saflığı gümüşle boyanmış SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Alkol dehidrogenaz, enzim saflaştırma, boya-ligand, manyetik nanoyapılar.

ABSTRACT

PURIFICATION OF ALCOHOL DEHYDROGENASE FROM *Saccharomyces cerevisiae* USING MAGNETIC DYE-LIGAND AFFINITY NANOSTRUCTURES

Nazife KAYA

M.Sc. Thesis, Department of Chemistry
Supervisor: Asist. Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN
2012, 71 pages

Reactive dyes are used as affinity ligands for protein purification since they may interact with the active sites by mimicking the structure of the substrates and coenzymes of enzymes. In this thesis, dye ligand affinity chromatography was used for purification of alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) which uses NAD⁺ as coenzyme. For this purpose poly(2-hydroxyethyl methacrylate) [poly(HEMA)] nanostructures were synthesized and Reactive Green 19 was covalently attached to nanostructures as dye ligand by nucleophilic substitution reaction. Characterization of these nanostructures was performed using FTIR, ESR, SEM, AFM and EDX analysis. Particles synthesized were found to be spherical in shape with approximately 70 nm diameter and magnetic. Adsorption of alcohol dehydrogenase on the dye attached nanostructures was performed in batch system and the effects of pH, alcohol dehydrogenase concentration, temperature and ionic strength on adsorption were investigated. Maximum alcohol dehydrogenase adsorption on dye attached nanostructures was measured to be 176,09 mg/g polymer at 0,5 mg/mL of alcohol dehydrogenase concentration and phosphate buffer at pH 7,0. Desorption of adsorbed alcohol dehydrogenase on the nanostructures was carried out by 1,0 M NaCl solution and desorption rate was calculated to be 98,4 %. Synthesized nanostructures were used for purification of alcohol dehydrogenase from *S. cerevisiae* following optimization of adsorption and desorption conditions of alcohol dehydrogenase from aqueous solutions. At the end of purification process, alcohol dehydrogenase was purified with 71,26 % recovery and 45,63 fold purification with a single step. Purity of enzyme was demonstrated with silver stained SDS-PAGE.

Key Words: Alcohol dehydrogenase, enzyme purification, dye-ligand, magnetic nanostructures.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada manyetik boya-ligand afinite nanoyapıları kullanılarak *Saccharomyces cerevisiae*'den alkol dehidrogenaz enzimi saflaştırılmıştır. Bunun için sentezlenen destek materyaline boya ligandı bağlanarak endüstriyel önemi olan alkol dehidrogenaz enziminin immobilizasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, maddi ve manevi destekleri ve ilgilerini esirgemeyen sevgili danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım süresince gerek bilimsel gerekse manevi katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e; laboratuvar çalışmalarım ve tezimin yazılması sırasında sabır ve anlayış göstererek benden yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümü Arş. Gör. Murat UYGUN'a, FTIR ölçümlerindeki yardımlarından dolayı Kimya Bölümü Arş. Gör. Hakan Can SÖYLEYİCİ'ye ve sevgili arkadaşım Kimya Bölümü Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda sentezlediğim polimerin ESR ölçümlerini gerçekleştiren Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Lokman UZUN'a teşekkür ederim.

Laboratuvarlarından yararlanma şansını bana sundukları için Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kubilay METİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı arkadaşlarım Fatma ÇETİNYÜREK ve Yusuf GÖKCEN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım, eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, maddi ve manevi yardımları ile destek olan aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Nazife KAYA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ	1
1.1. Alkol Dehidrogenaz Enziminin Önemi.....	1
1.1.1. Alkol Dehidrogenaz Enziminin Yapısı ve Substrat Özgüllüğü.....	1
1.2. Afinite Kromatografisi	5
1.3. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi	6
1.3.1. Afinite Ligand Olarak Boyalar.....	6
1.3.2. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinin Tarihçesi.	6
1.3.3. Boya-Ligandların Kimyasal Yapısı.....	7
1.3.4. Boya-Ligandları ve Proteinler Arasındaki Etkileşimler	9
1.3.5. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinde Kullanılan Destekler	9
1.3.6. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinde Ligand İmmobilizasyonu	10
1.3.7. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinde Adsorpsiyon	12
1.3.8. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinde Desorpsiyon	13
1.4. Enzim İmmobilizasyonu	13
1.4.1. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri	15
1.4.1.1. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu yöntemleri.....	15
1.4.1.2. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyonu yöntemleri	16

1.5. Manyetik Polimerler ve Nanoyapılar	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal.....	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinin Sentezlenmesi	28
3.2.2. Mag-Nano-p(HEMA) Polimerine Reaktif Green 19 Boyasının Bağlanması	28
3.3. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinin Karakterizasyonu	29
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	29
3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri	29
3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	29
3.3.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi	30
3.3.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri	30
3.4. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerine Alkol Dehidrogenaz Enziminin Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	30
3.4.1. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	30
3.4.2. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	31
3.4.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	31
3.4.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi	31
3.4.5. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinden Alkol Dehidrogenazın Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	32
3.5. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Tayini.....	32

3.5.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi	33
3.5.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	34
3.5.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	34
3.5.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	35
3.5.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi.....	35
3.5.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi	35
3.6. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması.....	35
3.6.1. Protein Tayini.....	36
3.6.2. SDS-PAGE Elektforezinin Uygulanması	36
3.6.2.1. Gümüş boyama.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinin Karakterizasyonu	39
4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	39
4.1.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri	40
4.1.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	42
4.1.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi	43
4.1.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri.....	43
4.2. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerine Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi ...	45
4.2.1. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi	45
4.2.2. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	46

4.2.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	47
4.2.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi	48
4.2.5. Adsorpsiyon İzotermleri	49
4.2.6. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinden Alkol Dehidrogenaz Enziminin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	52
4.3. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Ölçümü	52
4.3.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi	52
4.3.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	53
4.3.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	54
4.3.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi	56
4.3.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi	58
4.3.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi	58
4.4. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması	59
5. SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Arg	Arjinin
Asp	Aspartik asit
BSA	Sığır serum albumin
CD	Circular dichroism
DTT	Dithiothreitol
Cys	Sistein
<i>E. coli</i>	<i>Esherichia coli</i>
EGDMA	Etilenglikol dimetakrilat
ESR	Elektron spin rezonans spektrometrisi
Hematit	α -Fe ₃ O ₄
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit
HMG-KoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA
FTIR	Fourier transform infrared spektrofotometresi
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
His	Histidin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IgG	Immunoglobulin G
IMP	İnozin monofosfat
KPS	Potasyum persülfat
Leu	Lösin
Mag-nano-p(HEMA)	Manyetik-nano-poli(2-hidroksietil metakrilat)
Maghemit	γ -Fe ₃ O ₄
Magnetit	Fe ₃ O ₄
MES	2-(N-morfolino) etan sülfonik asit
Met	Metionin
MOPS	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit (redükte)
NADHP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte)
Nano-p(HEMA)	Nano-poli(2-hidroksietil metakrilat)
NDMA	<i>p</i> -nitrozo-N-N-dimetilanilin
NMR	Nükleer manyetik rezonans

Phe	Fenilalanin
P(HEMA)	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
PVA	Poli(vinil alkol)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
Ser	Serin
TEMED	N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin
Thr	Threonin
Tris	2-amino-2-hidroksietil-propan-1,3-diol
Trp	Triptofan
U	Ünite
Vustit	Fe _x O

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Maya alkol dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinin moleküler grafiklenmesi	3
Şekil 1.2. <i>S. cerevisiae</i> alkol dehidrogenaz katalizli NAD ⁺ 'nın NADH'a indirgenmesi	4
Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin prensibinin şematik gösterimi	5
Şekil 1.4. Bazı reaktif boya moleküllerinin yapısı	8
Şekil 1.5. Ligandların desteğe bağlanma şekilleri.....	11
Şekil 1.6. Geri dönüşsüz enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	15
Şekil 1.7. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	16
Şekil 3.1. <i>S. cerevisiae</i> alkol dehidrogenaz katalizli fenilglioksilik asitin (R)-mandelik asite indirgenmesi.....	33
Şekil 4.1. Mag-nano-p(HEMA) polimerinin kimyasal formülü.....	39
Şekil 4.2. Reaktif Green 19 boyasının kimyasal formülü	39
Şekil 4.3. A) Mag-nano-p(HEMA) B) Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerlerinin FTIR spektrumu	40
Şekil 4.4. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin ESR spektrumu	41
Şekil 4.5. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin SEM fotoğrafı	42
Şekil 4.6. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin EDX spektrumu	43
Şekil 4.7. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin AFM fotoğrafı	44
Şekil 4.8. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin üç boyutlu AFM fotoğrafı.....	44

Şekil 4.9. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	46
Şekil 4.10. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna alkol dehidrogenaz derişiminin etkisi..	47
Şekil 4.11. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	48
Şekil 4.12. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	49
Şekil 4.13. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermini.....	50
Şekil 4.14. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermini	51
Şekil 4.15. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu için tekrar kullanılabilirliği	52
Şekil 4.16. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'ın etkisi	53
Şekil 4.17. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklığın etkisi..	54
Şekil 4.18. Serbest alkol dehidrogenaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiğı	55
Şekil 4.19. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiğı.....	56
Şekil 4.20. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesinin 35 °C'de zamana bağlı olarak değışimi	57
Şekil 4.21. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesinin 45 °C'de zamana bağlı olarak değışimi	57
Şekil 4.22. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin depo kararlılığı	58
Şekil 4.23. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz enziminin işlemsel kararlılığı.....	59

Şekil 4.24. Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin gümüşle boyanmış SDS-PAGE analizi.....	61
---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize alkol dehidrogenaz için kinetik sabitler.....	56
Çizelge 4.2. Maya alkol dehidrogenaz enziminin Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) ile saflaştırılması.....	61

1.GİRİŞ

1.1. Alkol Dehidrogenaz Enziminin Önemi

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), insanlar tarafından kullanılan, ticari olarak en önemli mikroorganizmadır. Eski çağlardan beri bira, şarap ve ekmek yapımında kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* ve onunla yakından ilgili türler dışındaki diğer mikroorganizmalar, insanlığın gelişimi ve refahı için bu kadar önemli olmamıştır. *S. cerevisiae*'nin insanlığın gelişimindeki katkısı, karbohidratlı rezervlerin etanolik fermentasyonunu gerçekleştirmesidir. *S. cerevisiae*'nin enerji metabolizmasının iki önemli yolu glikolizis ve aerobik solunumdur. Etanol, enerji metabolizmasındaki önemli bir moleküldür. Etanol, aerobik solunumda bir karbon substratı olarak kullanılırken glikolizis ve alkolik fermentasyonda bir son üründür ve alkol dehidrogenaz enzimleri ile asetaldehit ve etanolün karşılıklı dönüşümü katalizlenir.

Alkol dehidrogenaz enzimleri, molekül yapıları, kataliz çeşitlilikleri ve özellikle *S. cerevisiae*'deki fizyolojik önemleri nedeniyle sıkça araştırılmaktadır. Bu son yüzyılda maya alkol dehidrogenazlarının biyokimyasal analizleri ile ilgili çalışmalar maya hücrelerinin kolay bulunuşu nedeniyle oldukça artmıştır. Fizyolojik olarak *S. cerevisiae* ve ilgili türlerdeki alkol dehidrogenaz reaksiyonu, şeker metabolizmasında iki yönlü ve oldukça kritik bir role sahiptir. Karbohidratların neredeyse tamamı, oksijen olmaksızın fermentasyona uğrayabilir ve spesifik bir alkol dehidrogenaz izoenzimi glikolitik NAD^{+} 'nin yeniden üretimini gerçekleştirir ve böylece asetaldehitin etanole indirgenmesiyle redoks dengesi kurulur. Aerobik koşullar altında toplanan etanolün kullanımı, alkol dehidrogenaz izoenzimleriyle fermente edilebilir şeker tüketildikten sonra gerçekleşir. Böylece *S. cerevisiae*'deki alkol dehidrogenaz reaksiyonu optimum şeker karbonunun kullanımına izin veren fermentatif ve respirasyon karbon metabolizmasını sağlar (De Smidt vd., 2008).

1.1.1. Alkol Dehidrogenaz Enziminin Yapısı ve Substrat Özgüllüğü

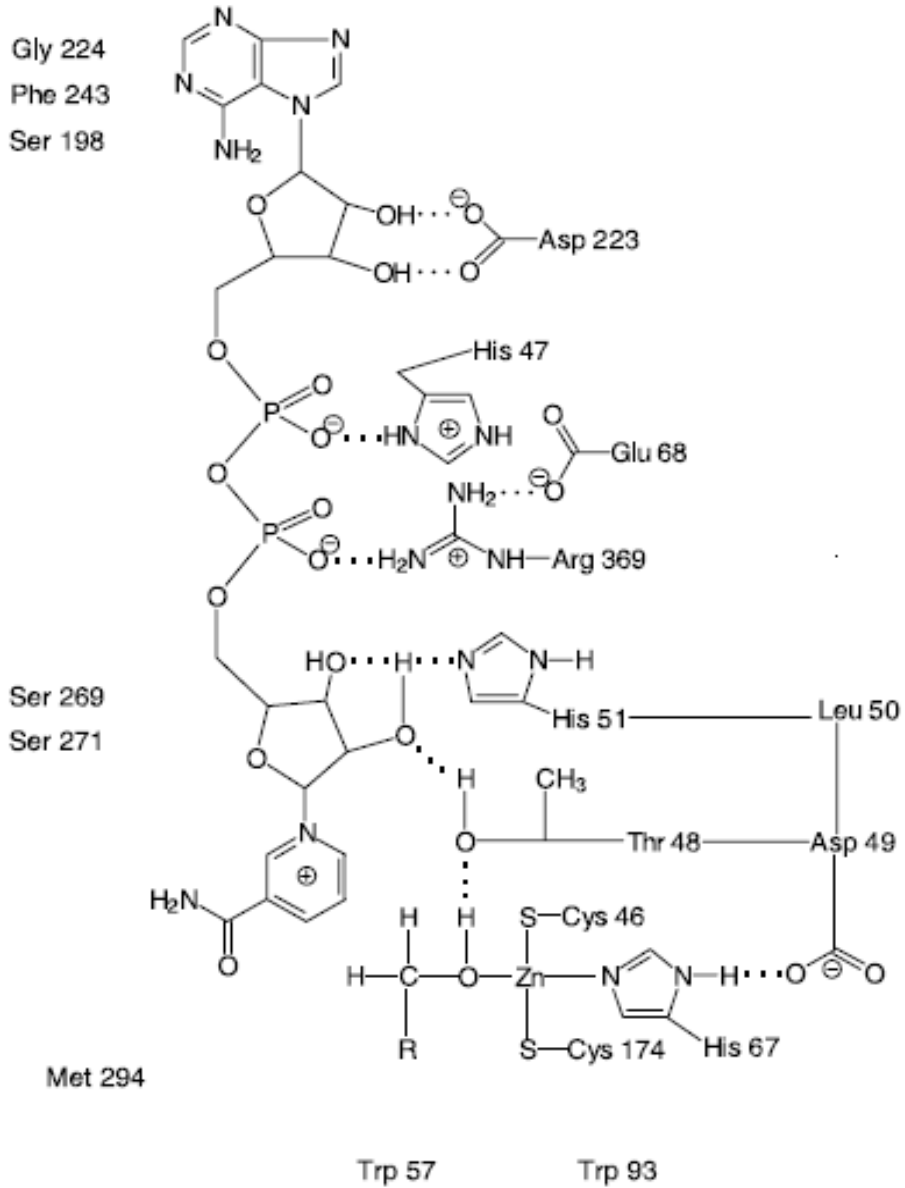
Alkol dehidrogenaz, mikroorganizmalarda ve hayvanların karaciğerinde bol miktarda bulunan bir enzimdir. Alkol metabolizmasını içeren çeşitli fizyolojik olaylarda önemli bir role sahiptir. Alkol dehidrogenaz enzimleri alkollerin yükseltgenmesini, aldehit ve ketonlar gibi bileşiklerin indirgenmesini katalizler.

S. cerevisiae, alkol dehidrogenaz enzimi için iyi bir kaynaktır. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enzimi (EC 1.1.1.1) AD1, AD2 ve AD3 olarak adlandırılan 3 izoenzime sahiptir.

AD1 fermentasyon sırasında baskın olan temel form, AD2 glukoz tarafından repress edilen sitoplazmik form, AD3 mitokondride bulunan formdur. AD1, ekmek mayasının gelişiminde alkol dehidrogenaz aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludur.

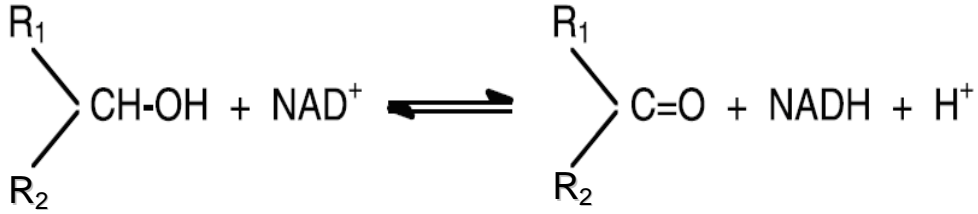
Maya alkol dehidrogenaz 1 (AD1) izoenzimi, her biri 347 amino asit içeren ve 36 kDa molekül kütleli 4 özdeş alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt birim, kataliz için gerekli olan bir koenzim bağlanma bölgesine ve sıkıca bağlı bir çinko atomuna sahiptir. Katalitik bölge (Cys-46, His-67 ve Cys-174), bu çinko atomuna ligandlar sağlar. İkinci bir çinko atomu, 97, 100, 103 ve 111 numaralı sistein birimlerinin kükürt atomlarıyla tetrahedral düzende koordinasyona katılmıştır. Bu çinko atomu sadece yapısal role sahiptir.

Maya alkol dehidrogenazının alt üniteleri katalitik ve koenzim bağlama bölgesi olmak üzere iki kısma sahiptir. Bu iki bölge farklı büyüklükte olup katalitik kısım tüm amino asitlerin 3/5'ini, koenzim bağlama kısmı 2/5'ini içerir. Bu kısımlar substrat ve koenzimin nikotinamid ucunu tutan derin bir cebi içeren bir yarıkla ayrılır. Bir bölgeye koenzim bağlanır ve diğer bölge substrat özgüllüğünü kontrol eden grupların çoğunu içerdiği gibi katalitik çinkoya ligandlar sağlar. Maya alkol dehidrogenazının aktif bölgesi Plapp vd. (1990) tarafından moleküler grafikleme ile şematik olarak çizilmiştir ve bu Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Katalizin gerçekleşmesi için enzimin aktif bölgesine bir substrat ve koenzim molekülünü üreten bir madde bağlanması ve bunların arasında bir hidrür transfer reaksiyonunun gerçekleşmesi gerekir. Adenozin bağlama bölgesine çözültiden kolayca ulaşılabilirken nikotin bağlama bölgesi proteinin içine gömülü olarak merkezde bulunur. Enzimin primer yapısındaki çeşitli amino asitler, substratın ve koenzimin bağlanmasından ve katalizinden sorumludur.



Şekil 1.1. Maya alkol dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinin moleküler grafiklenmesi (Plapp vd., 1990)

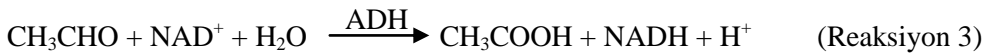
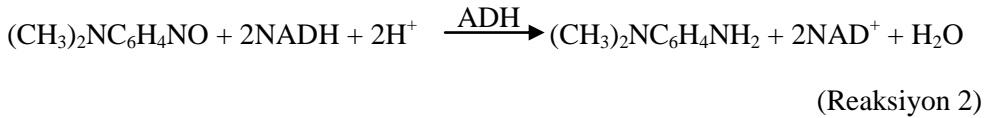
Maya alkol dehidrogenaz enzimi Şekil 1.2'deki geri dönüşümlü redoks reaksiyonunu katalizler. Alkol dehidrogenaz ile katalizlenen bu temel reaksiyon prensipte çok basittir. Bir alkol grubu, hidroksil grubundan bir protonun uzaklaştırılmasıyla oksitlenir ve hidroksil grubuna komşu karbon atomundan bir hidrür iyonu NAD^{+} 'e transfer edilir (Leskovac vd., 2002).



Şekil 1.2. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz katalizli NAD^+ 'nın NADH 'a indirgenmesi

Şekil 1.2'de gösterilen reaksiyon dengesi nötral pH'da sola doğru kayar. Maya alkol dehidrogenaz enziminin substrat özgülüğü, birincil dallanmamış alifatik alkollerle sınırlıdır ve yan zincirdeki herhangi bir dallanma enzimin aktivitesini azaltır. İlaveten bu metanol aktivitesi, benzer koşullardaki etanol aktivitesinin yalnızca % 0,07'si kadardır. Bu enzim NAD^+ 'yı kullanarak metanolü formaldehit ve NADH 'a oksitleyebilir fakat bu enzimatik reaksiyon, birçok yan reaksiyonun karışması nedeniyle oldukça komplekstir.

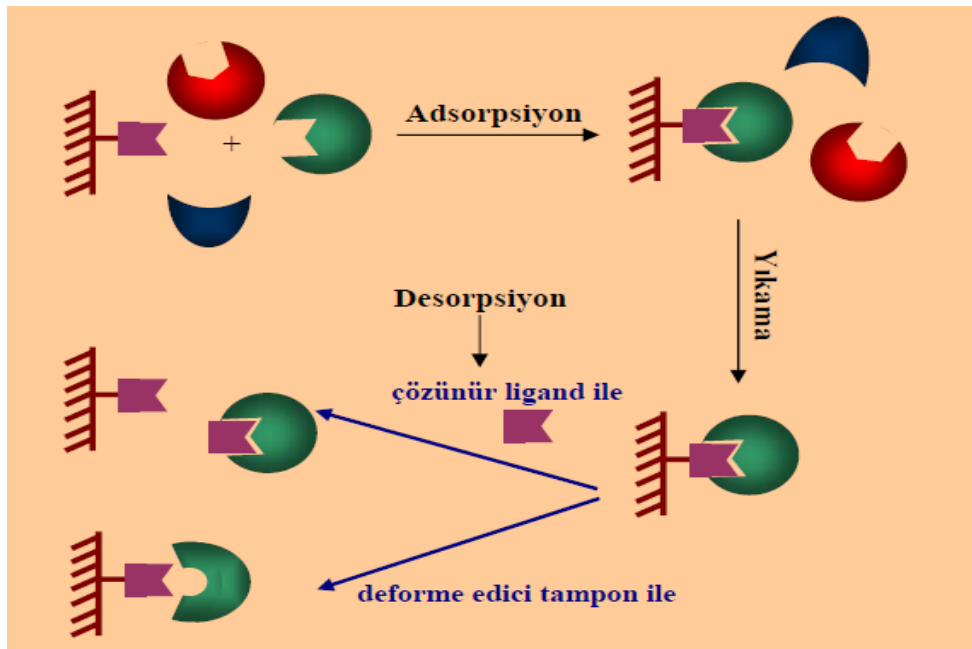
Maya alkol dehidrogenaz enzimi esasen 3 geri dönüşümsüz kimyasal reaksiyonu katalizleyebilir (Leskovac vd., 2002). Bu reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Kloroasetaldehit, maya alkol dehidrogenaz enziminin mükemmel bir substratı olup, 2-kloroetanol NAD^+ ile oksitlenmez ve bu reaksiyon 1'i geri dönüşümsüz yapar. *p*-nitrozo-N-N-dimetilanilin (NDMA), maya alkol dehidrogenaz enziminin varlığında NADH ile kolayca *p*-hidroksilamin-N-N-dimetilaniline indirgenir. Bu molekülün bir mol su kaybetmesiyle kinondiimin oluşur. Kinondiimin enzimatik olmayan yollarla NADH ile *p*-amino-N-N-dimetilaniline indirgenir (Reaksiyon 2). Maya alkol dehidrogenaz enzimi zayıf bir aldehit dehidrogenaz aktivitesine sahiptir ve NAD^+ ile asetaldehitin asetik asite geri dönüşümsüz oksidasyonunu katalizleyebilir (Reaksiyon 3).

1.2. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi makromoleküllerin ayrılması, saflaştırılması ve tayini için kullanılan bir yöntemdir ve yüksek oranda spesifik olarak belirli molekülleri tanımaya dayanır. Şekil 1.3’de gösterildiği gibi bu yöntemde, spesifik tanıma kapasitesine sahip bir molekül (ligand ya da bağlayıcı) genellikle küre veya membran şeklindeki suda çözünmeyen polimerik bir desteğe (matriks veya taşıyıcı) immobilize edilir. Ayrılması istenen molekül (analit veya hedef) komplementer ligandın immobilize edildiği desteği içeren uygun koşullardaki kolondan geçirilerek seçici olarak adsorplanır. Hedef moleküller, spesifik çözücüler ya da yarışmalı serbest ligandlar kullanılarak, pH, iyonik şiddet ya da sıcaklığın ayarlanması ile uygun desorpsiyon koşullarını sağlayan yıkama çözeltileri ile desorbe edilir. Böylece ligand ve hedef arasındaki etkileşimler bozulur ve hedef moleküller saflaştırılmış formda elde edilir. Cuatrecasas vd. (1968) tarafından afinite kromatografisi ilk kez tanımlanmış ve günümüze kadar binlerce farklı molekül (enzimler, antikorlar, hormonlar, vitaminler, reseptörler, pek çok çeşitli diğer proteinler ve glikoproteinler, RNA, DNA, vb.), bakteriler, virüsler ve hücreler de afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.



Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin prensibinin şematik gösterimi

1.3. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi

1.3.1. Afinite Ligand Olarak Boyalar

Enzimler, koenzimler, kofaktörler, antikorlar, amino asitler, oligopeptidler, proteinler, nükleik asitler ve oligonükleotidler gibi çeşitli fonksiyonel moleküller, yeni desteklerin tasarımında ligand olarak kullanılabilirler. Bu ligandlar çoğu durumda oldukça spesifiklerdir. Ancak, üretimlerinin yüksek maliyetli olması ve/veya kapsamlı saflaştırma adımları nedeniyle bu fonksiyonel moleküller oldukça pahalıdır. Spesifik desteklerin hazırlanma işlemlerinde, bir ligandın biyolojik aktivitesini koruyarak desteğe immobilize edilmesi oldukça zordur. Ayrıca bunların kullanımlarında ve saklanmalarında bazı önlemlerin dikkatlice uygulanması zorunludur.

Boya-ligandları spesifik afinite kromatografisi için doğal eşleniklerinin önemli alternatiflerindedir ve yukarıda belirtilen pek çok dezavantajları göstermezler. Boya-ligandları bazı durumlarda son derece spesifik bir şekilde bir çok proteine ve özellikle enzimlere bağlanma yeteneğine sahiptir. Boya-ligandları ticari olarak temin edilebilir ve ucuzdur. Ayrıca bu ligandlar, özellikle hidroksil grupları taşıyan desteklere kolayca immobilize edilebilir. Boyalar sentetik olmalarına rağmen, proteinlerin substratlarının, kofaktörlerinin ya da bağlanan ajanlarının yapılarını taklit ederek pek çok proteinin aktif bölgesi ile etkileşebildiğinden afinite ligandları olarak sınıflandırılırlar (Denizli ve Pişkin, 2001).

1.3.2. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinin Tarihçesi

Boya-ligand afinite kromatografisi Blue Dextran ve bazı kinazlar arasında beklenmeyen etkileşimlerin gözlenmesi ile başlamıştır. Yapılan ilk çalışmalarda, çeşitli proteinler (örneğin, eritrosit piruvat kinazı, fosfofruktokinaz, glutatyon redüktaz ve çeşitli pıhtılaşma faktörleri) Blue Dextran kullanılarak boyut eleme kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu çalışmalar, bir reaktif boya olan Cibacron Blue F3GA'nın proteinlerin bağlanmasından sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Roschlau ve Hess (1972) ilk kez doğrudan Sephadex G-200 üzerine kovalent olarak Cibacron Blue'yu immobilize etmişler ve bu afinite desteği ile mayadan piruvat kinaz enzimini saflaştırmışlardır. Daha sonra, bu mavi ligandı taşıyan farklı desteklerle çeşitli proteinler saflaştırılmıştır.

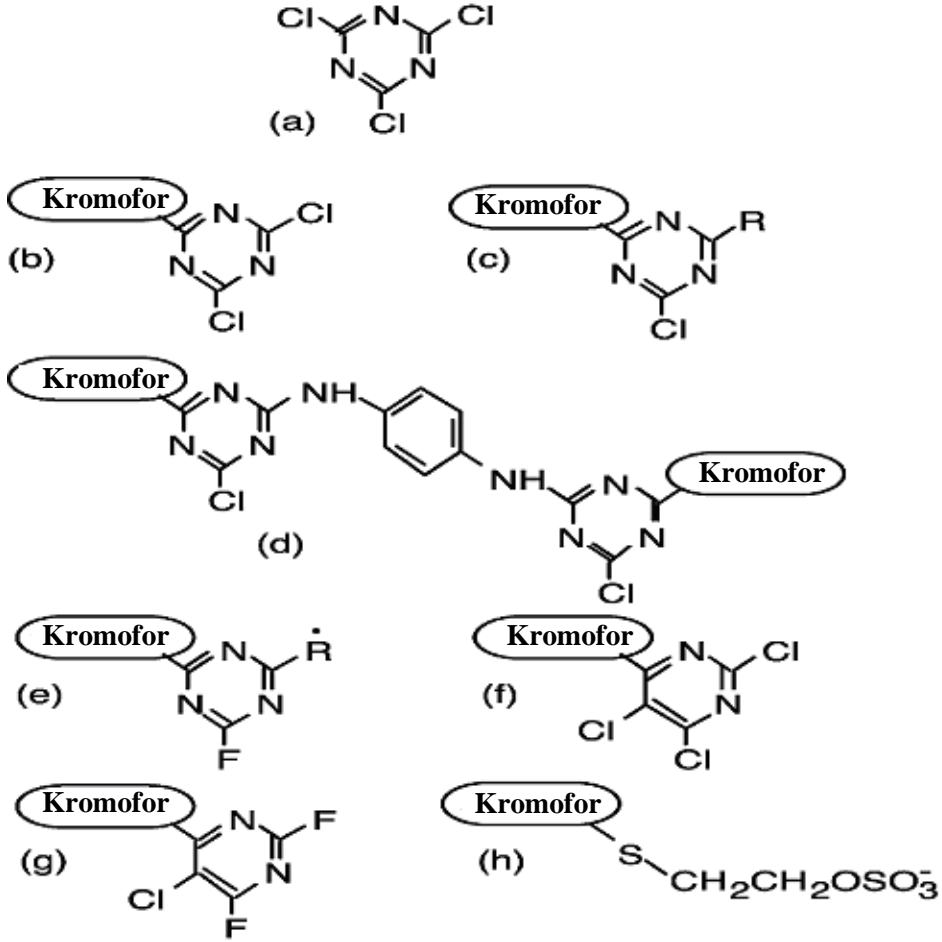
1.3.3. Boya-Ligandların Kimyasal Yapısı

Reaktif boyalar olarak bilinen tekstil boyalarının çoğu seçici ve geri dönüşümlü bir şekilde proteinlere bağlanabildiğinden boya-ligand afinite sistemlerinde proteinlerin saflaştırılması için sıkça kullanılmaktadırlar. Boya afinite sistemlerinde kullanılan reaktif boyaların çoğu reaktif bir gruba (çoğunlukla mono veya diklorotriazin halkası) bağlı bir kromofordan (azo boyaları, antrokinon veya fitalosiyenin) oluşur. Bu boyaların sahip olduğu sülfonik asit grupları sulu ortamda molekülün çözünürlüğünü sağlar. Bu gruplar tüm pH değerlerinde negatif yüklüdürler. Bazı boyalar karboksil, amino, klorür ya da metal kompleksleştirici grupları içerirler.

Günümüzde triazinil esaslı reaktif boyalar protein saflaştırmada çok yaygın olarak kullanılır. Siyanürik klorür (1,3,5-trikloro-sym-triazin) bu boyaların sentezinde kullanılan temel bir maddedir (Şekil 1.4a). Elektronegatif atomların varlığı üç karbon atomunu oldukça pozitif yapar ve bu nedenle nükleofilik saldırılara çok elverişlidirler. Kromofor molekülleri, diklorotriazinil boyalarını oluşturmak için bu moleküle kolayca bağlanır. Procion MX serisi (Imperial Chemical Industries) bu tip boyaların tipik bir örneğidir (Şekil 1.4b). Diğer nükleofilik substituentlerle (örneğin anilin veya sülfanilatlar gibi) bu moleküllerin daha ileri reaksiyonlarıyla monoklorotriazinil boyaları sentezlenir. Şekil 1.4c Cibacron (Ciba-Geigy) ve Procion H (ICI) monoklorotriazinil boyalarının temel yapısını göstermektedir. Cibacron ve Procion H serisi arasındaki tek fark anilin halkasındaki sülfonat grubunun Cibacron serisinde *orto*-pozisyonunda, Procion H serisinde ise *meta*-veya *para*-pozisyonunda olmasıdır.

Bifonksiyonel triazinil boyaları oluşturmak için iki monoklorotriazinil molekülü bir bifonksiyonel moleküle (örneğin, diaminobenzen) bağlanabilir. Şekil 1.4d'de gösterilen Procion H-E (ICI) yapısı buna bir örnektir. Triazinil boyaların diğer örnekleri Şekil 1.4e-g'de gösterildiği gibi sırasıyla monoflorotriazinil (Cibacron, Ciba-Geigy), trikloroprimidinil (Drimarene, Sandoz) ve diflorokloropirimidinil (Lavafix, Bayer ve Drimarene, Sandoz). Triazinil halkasındaki klor atomları diğer gruplarla yer değiştirdiği zaman boya reaktivitesi önemli ölçüde azalır. Daha fazla klorür (veya florür) atomlarına sahip olan boya molekülleri, ligand immobilizasyon basamağında destekteki nükleofilik gruplarla kolayca reaksiyona girebilir. İlginç bir boya sınıfı, triazinil esaslı olmayan ve vinil sülfon aktif grupları

ile desteğe bağlanan Remazol serisi (Hoechst) boyalarıdır. Bu boyalar protein saflaştırmada boya ligandları olarak kullanım bulmuşlardır (Şekil 1.4h).



Şekil 1.4. Bazı reaktif boya moleküllerinin yapısı: (a) Siyanürik klorür (b) Procion MX serileri (ICI) (c) Cibacron (Ciba-Geigy) ve Procion H (ICI) (d) Procion H-E (ICI) (e) Monoflorotriazinil, Cibacron, Ciba-Geigy (f) Trikloroprimidinil, Drimarene, Sandoz (g) Diflorokloroprimidinil, Levafix, Bayer ve Drimarene, Sandoz (h) Sülfatetil sülfon, Remazol, Hoechst.

Hedef proteinler için tekstil boyalarının spesifikliğini artırmada boya yapısını ısmarlamak veya yeniden tasarlamak önemli bir stratejidir. Bu yeni tip ligandlara biyomimetik boyalar denir. Bu boyalar yüksek spesifiklik içeren esas boyaların tüm avantajlarını taşır. Bu kavram 1980'li yılların başlarında ilk kez Lowe vd.

tarafından uygulanmış ve daha sonra diğer araştırmacılar tarafından da başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Denizli ve Pişkin, 2001).

1.3.4. Boya-Ligandları ve Proteinler Arasındaki Etkileşimler

Bir proteindeki bağlanma bölgesi onun üç boyutlu yapısındaki iyonik, polar ve hidrofobik grupların eşsiz stereokimyasal düzenlemesi ile oluşur ve bu polipeptit zincirleri olası en yüksek esnekliği sergilerler. Boya-ligand molekülleri proteinlere sıkı ve spesifik olarak bağlanmak için onlarla non-kovalent etkileşimler yaparlar.

Yapılan birçok kinetik çalışma, triazinil boyalarının redükte nikotinamid adenin dinükleotit (NADH), redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP⁺), guanozin trifosfat (GTP), inozin monofosfat (IMP), adenozin trifosfat (ATP), 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HMG-KoA), folat gibi doğal biyolojik ligandları enzimlerin bağlanma bölgeleri (substrat veya koenzim bağlanma bölgesi) ile etkileştiğini ve bu durumda doğal ligandların enzime bağlanmadığını göstermiştir. Bu etkileşimlerde yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibisyonu içeren birçok inhibisyon tipi gözlenmiştir.

Yarışmalı ligandlar ve desorbe edici ajanların varlığında boya-protein etkileşimlerini anlamak için ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis), fourier transform infrared spektrofotometresi (FTIR), nükleer manyetik rezonans (NMR), elektron spin rezonans spektrometrisi (ESR) ve circular dichroism (CD)'i içeren bazı spektrofotometrik teknikler kullanılmıştır. Bu çalışmalar hem boya hem de enzimin konformasyonlarının önemli olduğunu ve bu etkileşimlerin elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin bir karışımı olarak rastgele bölgelerden ziyade belli bölgelerde gerçekleştiğini açığa çıkarmıştır (Denizli ve Pişkin, 2001).

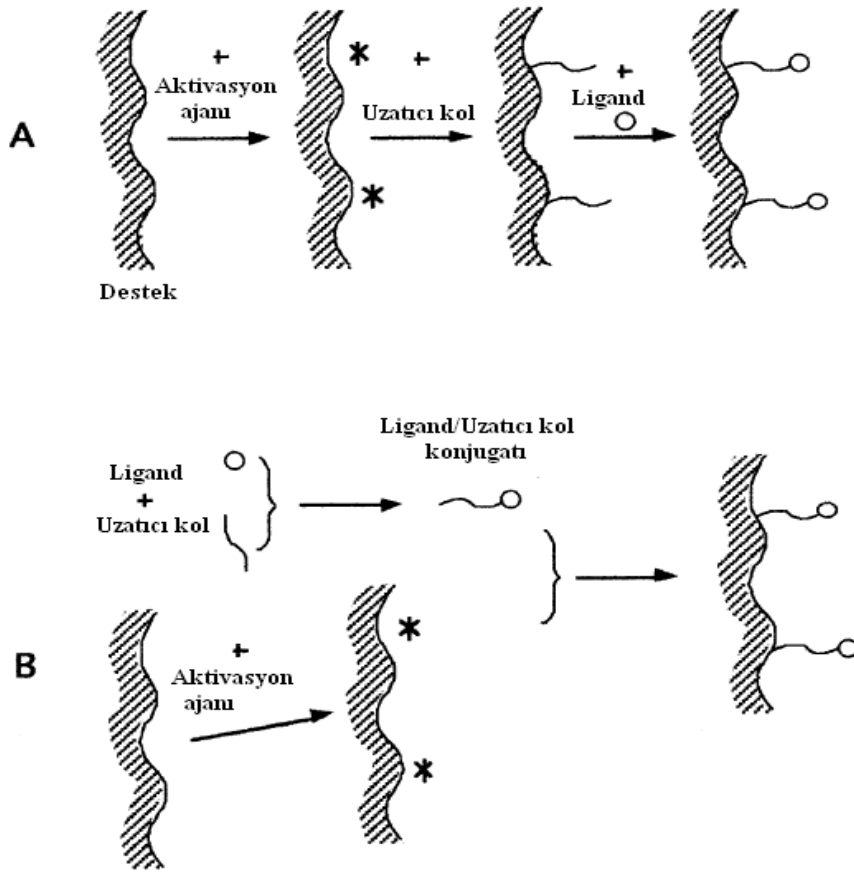
1.3.5. Boya Ligand Afinitite Kromatografisinde Kullanılan Destekler

Destegin seçimi afinitite sistemlerindeki en önemli adımdır. Destek, afinitite ayırımına katkıda bulunan yüklü ve hidrofobik grupları taşımanın yanında, düşük spesifik olmayan adsorpsiyon göstermelidir. Afinitite ayırımının etkinliği adsorpsiyon ortamındaki immobilize ligand ve hedef moleküller arasındaki spesifik etkileşimlerin gücüne dayandığından yukarıda bahsedilen özellikler önemlidir.

Destek materyali ligandların türevlendirilmesi ve immobilizasyonu için yüzeyinde fonksiyonel gruplar (hidroksil, karboksil, amid, vb) taşımaktadır. Fazla miktarda ligandın immobilize olabilmesi için desteğin yüksek oranda gözenekli olması gerekir ve bu, desteğin birim kütlesi veya hacmi başına spesifik olarak bağlanan moleküllerin miktarı olarak tanımlanan adsorpsiyon kapasitesinin yeterince yüksek olmasını sağlar. Bununla birlikte, desteğin fazla miktarda ligand içermesi her zaman daha fazla adsorpsiyon kapasitesine sahip olacağı anlamına gelmez. Gözenekler geniş olmalıdır çünkü çoğu durumda ligand ve/veya hedef büyük molekül kütlesine sahip proteinlerdir. Bu gözenekli yapı, ayırma adımları sırasında hedef moleküllerin içeriye ve dışarıya kolayca difüzyonuna izin verir ve bu adsorpsiyon ve desorpsiyonun hızlı gerçekleşeceği anlamına gelir. Destek sıcaklık, pH, organik çözümler, deterjanlar ve desorbe edici çözümlerin etkilerine karşı fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Destek materyali tercihen hidrofilik olmalıdır, bu sadece istenmeyen non-spesifik adsorpsiyonu azaltmaz aynı zamanda sulu ortamda desteğin şişmesine ve kuru durumdakine göre daha geniş gözenekleri olan gevşek bir yapının oluşumuna sebep olur (Denizli ve Pişkin, 2001).

1.3.6. Boya-Ligand Afinité Kromatografisinde Ligand İmmobilizasyonu

Desteğe ligand moleküllerinin immobilizasyonu için birçok metod vardır ve bunlar genellikle birkaç ara adımı içerirler. Başarılı bir ligand immobilizasyonu için hem destek hem de liganda bağlı olarak uygun bağlama metodunun ve koşullarının doğru seçilmesi gerekir. Tüm ligand immobilizasyonu işlemlerinde ligandın aktif merkez gibi önemli bölgelerin dışındaki yerlerden desteğe immobilize edilmesi gerekir. Aksi halde hedef moleküller ve ligand arasındaki spesifik etkileşimler engellenmiş olur. Kimyasallar ve deney koşulları, aktivasyon ve bağlanma adımlarında liganda zarar vermemeli ve dikkatlice seçilmelidir. Biyolojik moleküllerin aktif bölgeleri genellikle molekülün üç boyutlu yapısı içinde yer aldığından, bu komplementer ligand ve hedef moleküller arasında önemli sterik engellere sebep olabilir. Bazı durumlarda uzatıcı kol olarak kısa alkil zincirleri, destek ve ligand arasına konarak hedef moleküle ulaşılabilirlik kolaylaştırılır. İki alternatif işlem Şekil 1.5’de şematik olarak gösterilmiştir. Bu işlemlerden birinde destek bir aktivasyon ajanıyla aktive edilir ve uzatıcı kol aktif noktalardan desteğe kovalent olarak bağlanır. Daha sonra ligand uzatıcı moleküllerin diğer ucuyla reaksiyona girer. Diğer bir işlemde önce uzatıcı kol-ligand konjugatı sentezlenir ve sonraki adımda desteğe bağlanır. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemlerinde destek ve ligand arasındaki bağlanmanın kararlı olması gerekir.



Şekil 1.5. Ligandların desteğe bağlanma şekilleri: (A) Uzatici kol yardımıyla bağlanma (B) Uzatici kol-ligand konjugatları yardımıyla bağlanma

Reaktif boyaların çoğu, destek üzerindeki reaktif gruplarla (temel olarak hidroksil grubu), boya moleküllerinin triazinil grupları üzerindeki grupların (Cl veya F) doğrudan reaksiyonuyla desteğe bağlanır. Hidroksil grupları taşıyan desteklere reaktif triazinil boyalarının doğrudan bağlanması basit, ucuz ve güvenli bir metottur. Bağlanma alkali koşullar altında, desteğin hidroksil grupları ile boya moleküllerinin reaktif klor atomları arasında nükleofilik yer değiştirme ile gerçekleşir. Nükleofiller yüksek pH'da oluşur ve desteğin hidroksil gruplarının iyonlaşmasını teşvik eder. Yüksek pH (pH 12'nin üstü) sulu ortamdaki klorotriazinlerin hidrolizine sebep olabilir, bu sebeple çok yüksek pH değerlerinden kaçınılmalıdır. Desteğin hidroksil gruplarına reaktif boyaların bağlanması için destek, pH 10-11'deki (0,1 M NaHCO₃ çözeltisi, %1'lik Na₂CO₃ çözeltisi veya 0,1 M NaOH çözeltisi ile ayarlanmış) % 0,2'lik boya içeren sulu

çözeltide bekletilmelidir. % 2'lik NaCl çözeltisi gibi bir tuz çözeltisi de inkübasyon ortamında olabilir ve bu destek yüzeyinde boya moleküllerinin adsorplanmasına sebep olur. Bağlanma monoklorotriazinil boyaları (Cibacron ve Procion H serileri) ile oda sıcaklığında (20-30 °C) ve pH 10-12 arasında yaklaşık 2-3 günde gerçekleşir. Bununla birlikte diklorotriazinil boyalarında (Procion MX-serileri) yüksek reaktiviteye sahip olmaları nedeniyle bağlanma aynı koşullarda 1-2 saat içinde gerçekleşir. Benzer bir yer değiştirmeye, daha yüksek sıcaklıklarda (80-90 °C gibi) monoklorotriazinil boyaları ile de ulaşılabilir. Boyanın bağlanmasından sonra, kovalent olarak bağlanmayan boyaların uzaklaştırılması için desteklerin önce suyla daha sonra ise 1,0-2,0 M'lık NaCl, 0,5 M NaOH çözeltisindeki etanol gibi çözügenlerden biri ile yıkanması gerekir. Boya immobilize edilmiş desteklerin, pH 8-9 civarındaki seyreltik bir tamponda saklanması ve bu tamponun bakteri önleyici bir ajan (% 25 etanol, % 0,02 sodyum azid gibi) içermesi gerekir (Denizli ve Pişkin, 2001).

1.3.7. Boya-Ligand Afinité Kromatografisinde Adsorpsiyon

Adsorpsiyon işlemlerinde kullanılan dengeleyici tampon, maksimum protein bağlanmasını sağlamak üzere hedef proteini içeren çözelti ile aynı pH ve iyonik şiddet değerlerine sahip olmalıdır. Tamponların bileşimi her özel durum için doğru seçilmelidir. Fosfat tamponları spesifik olmayan protein-boya ligand etkileşimlerini azalttığı için sıkça kullanılır. İyonik şiddet, tampona sodyum veya potasyum içeren tuzlar eklenerek ayarlanabilir. Düşük iletkenliğe sahip tamponlar gerektiğinde 3-(N-morfolino) propan sülfonik asit (MOPS), 2-(N-morfolino) etan sülfonik asit (MES), 2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit (HEPES) veya 2-Amino-2-hidroksietil-propan-1,3-diol (Tris) sıkça seçilir.

Metal iyonları (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} gibi) sulu ortamdaki protein moleküllerini kararlı kılmak ve/veya hedef protein ile boya-ligandının afinitesini arttırmak için tamponlara eklenebilir. Bununla birlikte metal iyonlarının çökmesi pH'a bağlı olduğundan bazı problemlere yol açabilir ve bu sebeple uygun önlemlerin alınması gerekir.

İmmobilize boya-ligandlar ve hedef proteinler arasındaki afinite etkileşimi sıcaklıktan etkilenir. Bu sebeple adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları uygun sıcaklıklarda gerçekleştirilmelidir. Adsorpsiyon işlemlerini optimize etmedeki bir diğer önemli parametre adsorbanın partikül boyutudur. Daha küçük partiküller,

hacme oranla daha geniş yüzey alanına sahiptir ve bu nedenle daha yüksek ve hızlı adsorpsiyon kapasitesi sergilerler (Denizli ve Pişkin, 2001).

1.3.8. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinde Desorpsiyon

Hedef molekülleri desorbe etmeden önce non-spesifik olarak bağlanmış kirliliklerin bir yıkama adımı ile uzaklaştırılması gerekir. Yıkama tamponunun bileşimi, hacmi ve akış hızı optimize edilmelidir. Desorpsiyon yüksek verimde ve tercihen küçük hacimlerde gerçekleştirilmelidir. Boya-ligandları ve proteinler arasındaki etkileşimler hidrofobik, elektrostatik ve hidrojen bağı olabilir. Bir desorpsiyon işleminde, desorpsiyon tamponunun pH'ı, iyonik şiddeti veya polaritesi değiştirilir. Bu metodlar tek bir adımda veya gradient olarak uygulanabilir. Adsorpsiyon işlemlerinde elektrostatik etkileşimler baskın ise bağlı proteini desorbe etmek için pH'ın yükseltilmesi yeterli olabilir. Katyon değişimi önemli ise iyonik şiddetteki keskin bir değişim desorpsiyonu sağlayabilir. Eğer hidrofobik etkileşimler baskın ise desorpsiyon tamponunun polaritesi etilen glikol veya gliserol kullanılarak azaltılabilir ve desorpsiyon teşvik edilebilir (Denizli ve Pişkin, 2001).

1.4. Enzim İmmobilizasyonu

Bir canlı hücreden enzim izolasyonu ve saflaştırılması oldukça pahalı proseslerle yapılmaktadır. Bu nedenle enzimler genellikle pahalı olmalarının yanı sıra endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılmaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler ise serbest enzim tarafından kirletilen reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru olarak eklenir. Reaksiyon ortamındaki bu kirlilik unsurlarının uzaklaştırılmaya çalışılması maliyeti artırmaktadır. Bunun yanı sıra serbest enzimler sürekli üretim işlemlerinde de tercih edilmezler. Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir

desteğe fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir destek veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Alagöz, 2007).

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımları sentetik rasemik D- ve L-amino asitlerin ayrılması için *Aspergillus oryzae* aminoaçilazının immobilizasyonunu geliştiren Tosa vd. (1966) tarafından rapor edilmiştir. İmmobilize enzimlerin diğer temel uygulamaları ise şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel uygulamalarıdır. Bunun yanında bazı endüstriyel işlemlerde, istenilen enzimi içeren tam mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak kullanılabilir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

Enzim immobilizasyonu endüstriyel uygulamalarının yanı sıra biyosensörler, biyoafinite kromatografisi ve tıbbi ilaçların üretimi gibi pekçok biyoteknolojik çalışmaya temel oluşturmaktadır (Tischer vd., 1999).

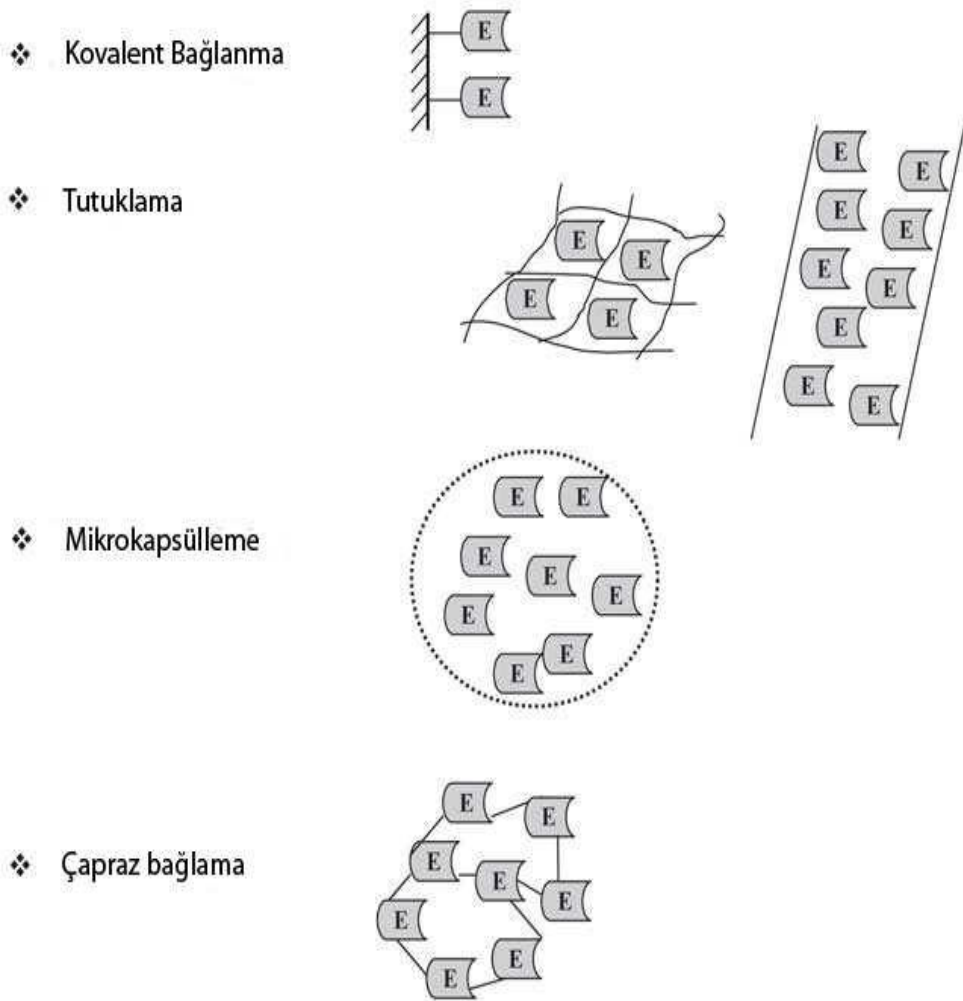
İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime göre üstünlükleri:

- ❖ Tepkime sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşmaz.
- ❖ Çevre şartlarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır.
- ❖ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- ❖ Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- ❖ Doğal enzime göre daha kararlıdır.
- ❖ Ürün oluşumu kontrol altına alınabilir.
- ❖ Birbirini izleyen çok adımlı tepkimeler için uygundur.
- ❖ Bazı durumlarda serbest enzime göre daha yüksek bir aktive gösterebilir.
- ❖ Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azdır.
- ❖ Mekanistik çalışmalar için uygundur (Keçili, 2006).

1.4.1. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

1.4.1.1. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu yöntemleri

Geride dönüşümsüz immobilizasyon kavramı, bir biyokatalizörün bir desteğe bağlandıktan sonra enzimin veya desteğin biyolojik aktivitesini kaybetmeden ayrılmayacağı anlamına gelir. Geride dönüşümsüz enzim immobilizasyonunun en yaygın uygulamaları kovalent bağlama, tutuklama, mikrokapsülleme ve çapraz bağlamadır. Bu yöntemlerin şematik gösterimi Şekil 1.6'daki gibidir (Uygun, 2008).

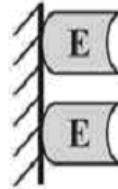


Şekil 1.6. Geride dönüşümsüz enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

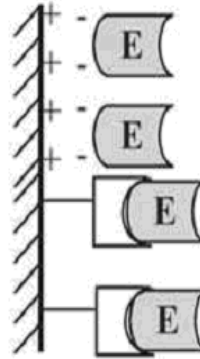
1.4.1.2. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyonu yöntemleri

Enzim-substrat bağlanmasının özelliği nedeniyle geri dönüşümlü immobilize enzimler ılımlı koşullar altında destekten ayrılabilir. Enzim immobilizasyonunda geri dönüşümlü metodların kullanımı ekonomik sebepler nedeniyle önemlidir; çünkü destek yeniden kullanılabilir ve taze enzimle yüklenebilir. Gerçekten de desteğin maliyeti, immobilize katalizörlerin tamamının maliyetinde genellikle temel faktördür. Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonu, kararsız enzimlerin immobilizasyonu ve biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalar için oldukça önemlidir. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.7'de şematik olarak gösterildiği gibidir (Uygun, 2008).

❖ Adsorpsiyon



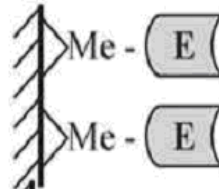
❖ İyonik Bağlanma



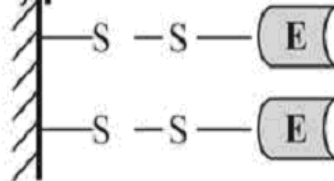
❖ Affinite bağlanma



❖ Metal Bağlama



❖ Disülfid Bağı



Şekil 1.7. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

1.5. Manyetik Polimerler ve Nanoyapılar

Manyetik polimerler birkaç nanometreden milimetre boyutuna kadar değişik çap ve boy dağılımlarında, gözenekli veya gözeneksiz farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen yapılardır.

Manyetik polimerler birçok ayırma işlemlerinde az kirlilik, iyi kütle aktarımı ve az aşınma göstermesi gibi avantajları yanında basınç düşmesi, substrat dönüşümü ve enzim kararlılığı için daha iyi bir performans göstermeleri nedeniyle akışkan yatak reaktörlerde kullanılmaktadırlar. Diğer ayırma işlemlerinde yer alan santrifüjleme ve filtrasyon süreçleri enzimin ve/veya proteinin üçüncül yapısını bozarak aktivitesinde düşüşe neden olurken, bu tür problemler manyetik yapıların kullanımı ile ortadan kalkmakta ve işletme maliyeti azalmaktadır. Manyetik yapıların kullanıldığı akışkan yatak reaktörler atık suların arıtımında, enzim tutuklanmasında ve afinite ayırımında önemli rol oynamaktadır. İnsanoğlunun kullandığı ilk manyetik maddenin doğal magnetit olması nedeniyle uygulamalarda demir oksitlerin önemi büyüktür. Bu demir oksitlerin en önemlileri: Fe_xO (vustit), Fe_3O_4 (magnetit), $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemit), $\alpha-Fe_2O_3$ (hematit)'tir. Fe_3O_4 kullanımı en yaygın olan manyetik materyallerden biridir. Biyoteknoloji ve tıptaki uygulamalarında güçlü manyetik özelliklerinden dolayı oldukça önem kazanmıştır. Enzimler, proteinler, antikolar ve antikanser ajanları gibi birçok biyoaktif madde Fe_3O_4 'e bağlanmıştır (Mandal vd., 2005).

Son yıllarda nanometre boyutlu manyetik nanoyapılar oldukça küçük boyutlarda ve geniş yüzey alanları ile eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikler sunmaları nedeniyle oldukça dikkat çekmiştir. Manyetik nanoyapılar veri depolama aygıtları ve cilt bakım ürünleri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca manyetik nanoyapılar medikal ve biyolojik alanlarda, ilaç salınımı, biyosensörler, su saflaştırma sistemleri ve biyomoleküler ayırma/saflaştırma uygulamalarında güçlü manyetik ve toksik olmayan özellikleri nedeniyle geniş uygulama alanına sahiptir. Manyetik nanoyapılar küçük bir örnek hacmi ve diğer süspanse katıların varlığında bile istenen hedef biyomolekülün ayrılmasında basit ve hızlı bir araç olarak kullanılabilir. Manyetik nanoyapıların hazırlanmasında sıkça Fe_3O_4 (magnetit)'ten yararlanılır.

Proteinler ve peptitler gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında ve immobilizasyonunda Fe_3O_4 içeren manyetik nanoyapılar şu avantajları sunar:

- ❖ Yüksek spesifik alanları nedeniyle daha fazla protein yüklemesi.
- ❖ İstenen biyomolekülün seçimli hedeflenmesi ve manyetik alan yardımıyla reaksiyon karışımından kolayca ayrılması.
- ❖ Saflaştırma işlemlerindeki santrifüjleme ve filtrasyon gibi adımların elimine edilmesi (Okoli vd., 2011).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Boya afinite kromatografisi hem laboratuvar hem de geniş ölçekli uygulamalardaki protein saflaştırmasında uygun maliyeti, güvenliği ve adsorpsiyon kapasitesi yanında tek bir kromatografik adımda daha yüksek özgüllük, saflık ve verim sağlaması nedeniyle oldukça önem kazanmıştır (Yavuz vd., 2006). Boyaların doğası tamamen sentetik olmasına rağmen substratların, kofaktörlerin ve bağlayıcı ajanların yapısını taklit ederek birçok protein ve enzimin aktif bölgesiyle etkileşebildiklerinden yüksek afiniteli ligandlar olarak sınıflandırılırlar. Boya-ligand afinite kromatografisi kullanılarak birçok enzim ve proteinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Farklı proteinlerin saflaştırılmasında en çok kullanılan boya ligandı Cibacron Blue F3GA olmuştur.

Fisichella vd. (2002) bazı buğday unu çeşitlerindeki yüksek molekül kütleli glutenin proteininin alt birimlerini Sepharoz CL6B'ye bağlı Cibacron Blue F3GA'yı kullanarak ayırmışlardır. Yüksek molekül kütleli glutenin proteininin alt birimleri, Cibacron Blue F3GA ile güçlü bir etkileşime girmiş ve elüsyon ajanı olarak sodyum dedosil sülfat kullanılarak yüksek verim ile elde edilmiştir. Deneysel bulgular ve yüksek molekül kütleli glutenin proteininin amino asit sekansı, bu proteinin alt birimleri ile Cibacron Blue F3GA boyası arasında etkili elektrostatik etkileşimler olduğunu göstermiştir.

Iannucci vd. (2003), nötral proteazların ticari bir preparatı olan Flavourzyme'den proteazların saflaştırılması için 20 farklı triazin boyasını ligand olarak kullanmışlardır. Onlar bu boyaları, Sepharoz 4B'ye immobilize etmişler ve protein adsorpsiyon kapasitelerini araştırmışlardır. Seçiciliği arttırmak için pH 5,0'e ayarlandığında sadece Cibacron Blue F3GA, Red HE-3B ve Yellow HE-4B % 80'in üzerinde adsorpsiyon kapasitesi göstermiştir ve deneylere bu boya ligandları ile devam edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda Flavourzyme'den nötral proteaz, Cibacron Blue F3GA ligandı ile elektroforetik olarak tek bantla gösterilen bir saflıkta, % 96 verimle ve 850'den 3650 U/mg'a artan bir spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır.

Yavuz vd. (2003), boya ligandı olarak Cibacron Blue F3GA'yı kullanmışlar ve bu boya ligandını 100-150 µm çapındaki poli(metil metakrilat) kürelere kovalent olarak bağlamışlardır. Boya bağlı mikrokürelere, hem sulu çözeltiden hem de insan plazmasından albumin adsorpsiyonunda kullanılmış ve pH 5,0'de maksimum

adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 26,0 mg/g ve 64,3 mg/g olarak bulunmuştur. Albumin desorpsiyonu 0,5 M KSCN çözeltisi kullanılarak yüksek oranda (% 98'e kadar) gerçekleştirilmiş ve Cibacron Blue F3GA bağlı küreler adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma olmaksızın defalarca kullanılmıştır.

Arıca vd. (2004), iki farklı boya ligandını [Procion Brown MX-5BR (RB-10) ve Procion Green H-4G (RG-5)] poli(2-hidroksietil metakrilat) membranlara immobilize etmişler ve bu afinite desteklerini sulu çözeltiden ve yumurta akından lizozim ayırmasında kullanmışlardır. Ayrılan lizozim örneklerinin saflığı HPLC ile belirlenmiş ve RG-5 bağlı membranlarla elde edilen lizozimin daha yüksek saflıkta olduğu bulunmuştur.

Arıca ve Bayramoğlu (2005), UV başlatıcılı fotopolimerizasyon yöntemi ile p(HEMA)/kitosan kompozit membranlarını sentezlemişler ve bu membranlara Reaktif Blue 4'ü ve Reaktif Red 120'yi immobilize etmişlerdir. Bu boya ligand desteklerini yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanmışlardır. Yumurta akından Reaktif Red 120 bağlı membranlar ile daha yüksek saflıkta ve verimle lizozim elde etmişlerdir. Saflaştırılan lizozimin aktivitesini *Micrococcus lysodeikticus* substratını kullanarak belirlemişler ve spesifik aktivitesini 44250 U/mg olarak bulmuşlardır.

Madoery ve Minchiotti (2006), bir monoklorotriazin antrokinon boyası olan Cibacron Blue'yu, oksiran grupları içeren akrilik yapıdaki bir polimerik destek olan Eupergit C'ye kovalent olarak bağlamışlardır. Bu hazırlanan afinite desteğini soya fasulyesi tohumundan fosfolipaz A₂'nin saflaştırmasında kullanmışlardır. Hazırlanan desteğin kolon uygulaması ile fosfolipaz A₂ enzimini, % 13,4 verimle 23 kat saflaştırmışlardır. Araştırmacılar bu yaklaşımla enzim saflaştırmanın, biyoteknolojik işlemlere uygulanabileceğini vurgulamışlardır.

Yavuz vd. (2006), 150-200 µm büyüklüğündeki poli(hidroksipropil metakrilat) kürelerini süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlemiş ve şişme çalışmalarını, yüzey alanı ölçümlerini, SEM ve elementel analiz ile karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra bu mikrokürelere kovalent olarak Reaktif Green HE 4BD (Reaktif Green 19) bağlanmış ve bu küreler IgG'nin alt sınıflarının ayrılmasında kullanılmıştır. Albumini ayrılmış insan plazmasından 6,4 mg/g IgG₁, 67,8 mg/g IgG₂, 5,2 mg/g IgG₃ ve 8,6 mg/g IgG₄ elde edilmiştir.

Wang vd. (2006), alkalın fosfotaz enziminin saflaştırılması için bir seri “biyomimetik” boya ligandını sentezlemişler ve bu boyaları Sepharoz CL-6B’ye immobilize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar sentezlenen bu boyaların alkalın fosfataz afinitesine sahip olduğunu fakat bu afinitenin boya ligandlarının farklı moleküler yapılarına göre değiştiğini göstermiştir. Bu çalışmada özellikle 5 numara ile tanımlanan boyanın alkalın fosfataz için daha yüksek afiniteye sahip olduğu görülmüştür. Sepharoz CL-6B’ye immobilize edilmiş 5 nolu boyadan alkalın fosfataz 0,1 M NaCl ve 30 mM Na₂HPO₄ çözeltileri ile elüe edilmiş ve % 84 oranında yüksek bir verimle tek bir adımda enzim 65 kat saflaştırılabilmektedir.

Ma vd. (2006), gözeneksiz manyetik poli(stiren-divinilbenzen-glisidil metakrilat) mikrokürelere süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlamışlar ve bu kürelere Cibacron Blue F3GA’yı kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Taramalı elektron mikroskobu ve manyetik ölçümler ile sentezlenen manyetik mikrokürelere 6 µm boyutta ve 7,3 emu/g manyetik doygunlukta olduğu bulunmuştur. Sentezlenen boya bağlı manyetik mikrokürelere sığır serum albumin proteininin (BSA) adsorpsiyonunda kullanılmış ve adsorpsiyon kapasitesi 80,2 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyona pH, iyonik şiddet ve BSA proteininin başlangıç derişiminin etkisi incelenmiştir. BSA proteininin desorpsiyonu 1,0 M NaSCN çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir.

Demiryas vd. (2007), monomerlerin sulu çözeltilerini bir cam kolon içinde dondurarak kütle polimerizasyonu ile poli(akrilamid-allil glisidil eter) monolitik kriyojelini hazırlamışlar ve bu kriyojelle Cibacron Blue F3GA’yı immobilize etmişlerdir. Hazırlanan boya bağlı kriyojeller sulu çözeltiden ve insan plazmasından albumin ayrılmasında kullanılmıştır. Sulu çözeltiden ve insan plazmasından sırasıyla 27 mg/g polimer ve 72 mg/g polimer albumin adsorpsiyonu elde edilmiştir. Albumin desorpsiyonu için 0,5 M NaCl çözeltisi içeren 0,1 M Tris/HCl tamponu kullanılmış ve insan plazmasından % 92 saflıkta albumin ayrılması gerçekleştirilmiştir.

Wolman vd. (2007), polisülfan membranlara glisidil metakrilat/dimetil akrilamid kopolimerlerini aşilayarak hollow fiber yapılarını sentezlemişler ve bu membranlara Red HE-3B boyasını bağlamışlardır. Bu araştırmacılar sentezlenen bu boya bağlı membranlar ile sığır peynir altı suyunun ve kolostridiumundan laktoferrinin saflaştırılmasını araştırmışlardır. Sığır kolostridiumundan laktoferrinin saflaştırılmasında boya bağlı membran yapılarının, boya bağlı

Sepharoz 4B'den daha iyi kromatografik performans gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Bayramoğlu vd. (2007), fotopolimerizasyonla sentezledikleri poli(HEMA) membranlarına boya ligandı olarak Reaktif Green 5'i immobilize etmişler ve insan serumundan IgG adsorpsiyonunda kullanmışlardır. HPLC ile yapılan analizlere göre insan serumundan % 81 saflıkta ve % 67 verimle IgG izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Ouyang vd. (2007), Çin hamster yumurtalık hücre kültürü ve *Aspergillus niger* fermentasyonu ile üretilen alkalın fosfataz ve glukoamilaz enzimlerini tek adımda saflaştırmak için boya ligand afinite kromatografisi ile bir ayırma metodu geliştirmişlerdir. Bu amaçla destek olarak Sepharoz 6B'yi ve farklı boya ligandlarını kullanmışlardır. Bu araştırmacılar reaktif boya olarak Procion Green H-E4BD (Reaktif Green 19)'nin alkalın fosfataz için iyi bir bağlama kapasitesi gösterdiğini ve Procion Blue H-ERD'nin glukoamilaz için en iyi boya ligandı olduğunu rapor etmişlerdir.

Garcia-Diego ve Cuellar (2008) tarafından yapılan bir çalışmada farklı gözenek özelliklerine sahip poli(stiren-ko-divinilbenzen) mikropartikülleri sentezlenmiş ve öncelikle non-spesifik protein adsorpsiyonunu önlemek için hidrofobik polimer yüzeyi poli(vinil alkol) ile kaplanmıştır. Daha sonra poli(vinil alkol) tabakası, kararlılığının artması için gluteraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Ardından spesifik protein adsorpsiyonunu elde etmek için Cibacron Blue F3GA boya ligandı olarak seçilmiş ve mikropartiküllere immobilize edilmiştir. Bu boya ligand afinite desteklerine lizozim adsorpsiyonu koşulları araştırılmış ve maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi, gram kuru destek başına 100,8 mg/g olarak bulunmuştur. 1,0 M NaCl çözeltisi (pH 7,3) ile adsorplanan lizozimin % 73'den daha fazlası desorbe edilebilmiştir.

Etanol yıkımındaki temel metabolik yol, etanolün asetaldehite dönüşümünü katalizleyen alkol dehidrogenaz enziminin varlığını gerektirir. Eksojen etanol metabolizmasına ilaveten, alkol dehidrogenazın bağırsaklarda fermentasyon ile üretilen küçük miktarlardaki endojen alkolü de yıktığı bilinir. Alkol dehidrogenaz steroidlerin dehidrogenasyonu, mevalonat metabolizmasının paralelindeki yolların ara ürünü olan alkollerin oksidasyonu ve yağ asitlerinin ω -oksidasyonunu içeren geniş bir substrat özgülüğüne sahiptir (Negoro ve Wakabayashi, 2004). Alkol

dehidrogenaz enzimleri yüksek duyarlılık gösteren ancak kararlılığı düşük enzimlerdir. Alkol dehidrogenazların işlemsel kararlılığının düşük olması, yaygın endüstriyel uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu nedenlerle alkol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması ve immobilizasyonu birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır.

van Iersel vd. (1997), anaerobik koşullarda büyüyen *S. cerevisiae* var. *uvarum* W34'den NADP⁺ bağımlı uzun ve dallanmış substrat özgülüğü gösteren bir alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu çalışmada bu enzimin monomerik ve molekül ağırlığının 37 kDa olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan bu NADP⁺ bağımlı enzimin alkolik fermentasyon sırasındaki tat oluşumundan sorumlu olduğu rapor edilmiştir.

Negoro ve Wakabayashi (2004), fare karaciğerinin sitozolik fraksiyonunu amonyum sülfat ile çöktürmüşlerdir. Daha sonra *p*-hidroksi asetofenon Sepharoz afinite kromatografisini ve ardından iyon değişim kromatografisini kullanarak alkol dehidrogenaz (sınıf I) enzimini saflaştırmışlardır. Enzim % 57 verimle elde edilmiş ve saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Ayrıca saflaştırılan enzimin kinetik parametreleri de incelenmiştir.

Hirano vd. (2005), bir toprak bakterisi olan *Brevibacterium* sp. KU 1309'dan 2-feniletanol substratına özgül bir alkol dehidrogenaz enzimini çeşitli kromatografik yöntemler kullanarak saflaştırmışlardır. Enzimin 39 kDa molekül ağırlığına ve çeşitli primer alkollerin aldehitlere geri dönüşümlü oksidasyonunu katalizleyen geniş bir substrat özgülüğüne sahip olduğu bulunmuştur. İlaveten enzimin kofaktör olarak NAD⁺'e gereksinim duyduğu rapor edilmiştir.

Madhusudhan vd. (2008), *S. cerevisiae*'den alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması için sulu ikili faz ekstrasyonunun etkinliğini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, sulu ikili faz sistemini hazırlamak için farklı tuz tiplerini (sodyum fosfat, sodyum sülfat, magnezyum sülfat, potasyum fosfat ve amonyum sülfat) ve farklı molekül kütesine sahip polietilen glikol polimerlerini kullanmışlardır. Bu araştırmacılar, sulu ikili faz ekstrasyonuna ilave olarak amonyum sülfat ve polietilen glikol çöktürmesini içeren 2 farklı işlemi de yaparak enzimin daha yüksek verimle elde edilmesini sağlamışlardır.

Raghava ve Gupta (2010), *Thermus thermophilus*'dan NAD^+ bağımlı ve çinko içeren alkol dehidrogenaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve butil Sepharoz hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır. Enzim tek bir kromatografik adımda % 68 verimle ve 25 kat saf olarak elde edilmiş ve enzimin özdeş alt üniteleri içeren tetramerik bir yapısının olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu enzimin kısa zincirli primer ve sekonder alkollere kıyasla gliserole karşı oldukça yüksek afinite gösterdiği rapor edilmiştir.

Enzimlerin göreceli olarak kararsız olmaları, saflaştırma maliyetlerinin oldukça yüksek olması ve kullanımlarından sonra reaksiyon karışımından aktif enzimi geri kazanmanın teknik olarak zor olması immobilizasyona olan ilgiyi oldukça arttırmış ve farklı destekler üzerine alkol dehidrogenaz immobilizasyonu çoğu araştırmacının çalışmalarına konu olmuştur. Trivedi vd. (2005), çeşitli gözeneksiz cam küreler üzerine farklı kaynaklardan elde edilen alkol dehidrogenaz enzimlerini adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişler ve enzimlerin kaynağına bağlı olarak immobilizasyon etkinliğinin değiştiğini gözlemişlerdir.

Xu vd. (2006), alginat-silika nanotüp kompozitlerini, alginat jel içine silika nanotüplerin inkorporasyonunu gerçekleştirerek hazırlamışlar ve bu nanotüp kompozitlerini maya alkol dehidrogenaz enziminin enkapsülasyonunda kullanmışlardır. Bu araştırmacılar, bu nanotüp kompozitlerine immobilize edilen maya alkol dehidrogenaz enziminin optimum reaksiyon koşullarını, katalitik aktivitesini ve kinetik parametrelerini incelemişlerdir.

Bolivar vd. (2006), at karaciğeri alkol dehidrogenaz enzimini gliksil agaroz desteğine kovalent olarak immobilize etmişler ve enzimin pH'a, sıcaklığa ve organik çözümlere karşı kararlılığının arttığını rapor etmişlerdir.

Liu ve Cai (2007) tarafından yapılan bir çalışmada negatif yüklü alkol dehidrogenaz enzimi (pH 8,7'de) tek duvarlı karbon nanotüplerin yüzeyine yayılmış ve pozitif yüklü polielektrolit poli(dimetil diallilamonyum klorür) ile negatif-pozitif yük etkileşimini oluşturarak kaplanmıştır. Bu kaplanma ile elde edilen alkol dehidrogenaz içeren nanokompozitler, bağlayıcı olarak Nafyonun kullanılmasıyla camsı karbon elektrolit yüzeyine immobilize edilmiş ve etanol analizi için kullanılabilir bir biyosensör geliştirilmiştir.

Enzimlerin immobilizasyonunda destek materyali olarak manyetik nanoyapıların kullanımı son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Manyetik nanoyapılar destek materyal olarak iyi kütle transfer özellikleri ile geniş spesifik yüzey alanı gibi birçok avantaj sunarlar (Kuroiwa vd. 2008). Literatürde maya alkol dehidrogenaz enziminin manyetik nanoyapılara immobilizasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Li vd. (2008), Fe₃O₄ nanoyapılarını kitosan ile kaplayarak onlara glüteraldehit yardımıyla *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enzimini kovalent olarak bağlamışlardır. Araştırmacılar, immobilizasyondan sonra enzimin başlangıç aktivitesinin % 48,8'ini koruduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca immobilizasyonla enzimin termal ve işlemsel kararlılığının da arttığını göstermişlerdir. Li vd. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada Fe₃O₄ nanoyapılarına α -ketoglutarik asit bağlı kitosan, karbodimid aktivasyonu ile bağlanmış ve *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin kovalent immobilizasyonunda kullanılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklık, optimum pH ve ısıl kararlılıkları karşılaştırılmıştır.

Hidayat vd. (2003), agaroz ile kaplanmış alumina desteğini hazırlamışlar ve bu desteğe iminodiasetik asit ve Cibacron Blue 3GA boyasını immobilize etmişlerdir. Araştırmacılar, hazırlanan bu destek ile mayadan alkol dehidrogenaz enzimini % 76,8 verim ile 8,4 kat saflaştırmışlardır.

Mondal vd. (2003), κ -karragenan polimerini hazırlayarak bu polimere Cibacron Blue 3GA boyasını siyonojen bromür aktivasyonu ile kovalent olarak bağlamışlar ve *S. cerevisiae* homojenatından alkol dehidrogenaz enzimini % 58 verimle 13,6 kat saflaştırmışlardır.

Shibusawa vd. (2004), Procion Red boyasını içeren bir afinite desteği ile sığır karaciğeri homojenatından alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmışlardır. Araştırmacılar bu saflaştırma işlemini, enzimatik aktivitede önemli bir kayıp olmadan 6 saat içinde tamamlamışlardır.

Yapılan bu tez çalışmasında afinite ligandı olarak Reaktif Green 19 boyası kullanılmış ve *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması ve geri dönüşümlü immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatürde afinite ligandı olarak boyaların kullanılmasıyla alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların temeli alkol dehidrogenaz

enzimlerinin NAD^+ gibi bir kofaktöre ihtiyaç duymasına ve boyanın bu kofaktörü taklit ederek enzime bağlanma yeteneğine sahip olmasına dayanmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Alkol dehidrogenaz (ADH), poli(vinil alkol) [PVA], 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), potasyum persülfat (KPS), N,N'-metilenbisakrilamid, akrilamid, TEMED, gliserol, dithiothreitol (DTT), NADH, Tris-baz, Reaktif Green 19, amonyum persülfat, brom fenol mavisi, formaldehit ve gümüş nitrat Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve magnetit (Fe_3O_4) Aldrich (Milwaukee, WI, ABD)'den; etil alkol, metil alkol, NaOH, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, fosforik asit, NH_4Cl , NaCl, sodyum asetat ve sodyum karbonat Riedel-de Haen (Seelze, Almanya)'dan; HCl, sodyum dodesil sülfat (SDS), Tris-HCl, glutaraldehit, KBr, glisin ve potasyum hidrojen fosfat Merck (Dramstadt, Almanya)'dan; fenilglioksilik asit ve Commassie Brilliant Blue G-250 Fluka (Buchs/Switzerland)'dan; asetik asit ve potasyum dihidrojen fosfat Carlo Erba (Rodano, İtalya)'dan; β -merkaptolanol AppliChem (Darmstadt, Almanya)'dan; sitrik asit Panreac (İspanya)'dan temin edildi.

Deneylerde Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, Velp (Multistirrer 15) çoklu magnetik karıştırıcı, Vestel (White FR 540) buzdolabı, Hettich (Universal 32R) santrifüj, Hereaus (Function Line) etüv, Ohaus-Pioneer (PA214C) 0,0001 g duyarlılıkta terazi, Hanna (pH 211) pH metre, Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu, VWR (1180S) sirkülatörlü su banyosu, soğutmali su banyosu (Nüve B5 402), santrifüj (Sigma 3K30, Almanya), homojenizatör (Bandelin Sonapuls, Almanya), Bandelin Sonorex (RK255H) ultrasonik banyo, Heidolph (Reax Top) vorteks, Brand (Transferpette) otomatik pipetler, GFL (2001/4) saf su cihazı, Milipore (Simplicity UV, 18,2 m Ω cm) ultra saf su cihazı, Bio-Rad (Mini-Protean 3) elektroforez, UVP güç kaynağı kullanıldı.

Sentezlenen polimerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan FTIR spektrofotometresi (Shimadzu 60X), Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümünde bulunan Varian E-L X Band (Almanya) Elektron Spin Rezonans Spektrometresi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü-Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (Phillips XL-30S FEG) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV), İnönü

Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezinde bulunan Enerji Dağılımlı X-ışını analiz cihazı (LEO, EVO 40, Carl Zeiss NTS, Peabody, Massachusetts) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinin Sentezlenmesi

Manyetik-nano-poli(2-hidroksietil metakrilat) [mag-nano-p(HEMA)] polimeri, emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak sentezlendi. Mag-nano-p(HEMA) polimerinin hazırlanması için 100 mL hacimli laboratuvar tipi bir cam reaktör kullanıldı. Polimerin hazırlanması için 0,5 g polivinil alkol (PVA, d:1,269 g/mL) tartılarak 45 mL saf suda 60 °C'de ultrasonik banyo yardımıyla çözüldü. Reaktöre, hazırlanan PVA çözeltisinden 25 mL alınarak üzerine 0,6 mL 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, d:1,074 g/mL) monomeri ve 0,3 mL etilenglikol dimetakrilat (EGDMA, d:1,051 g/mL) çapraz bağlayıcısı ilave edildi ve 30 saniye mekanik olarak çalkalandı. Daha sonra bu reaktöre, polimerin manyetik özellik kazanması için 0,5 g magnetit (Fe_3O_4) ilave edilerek yine 30 saniye çalkalandı. 0,0198 g potasyum persülfat (KPS, 1,6 mM) tartılarak 45 mL saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak (130 rpm) çözüldü ve tamamı reaktöre ilave edildi. Reaktör 70 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 200 rpm'lik bir hızda çalkalandı ve 4 saat sonunda polimerizasyonun gerçekleştiği renk takibi ile gözlemlendi. Reaktör soğutulduktan sonra 20 dakika santrifüj yardımıyla polimerizasyona katılmayan magnetitler ayrıldı. Daha sonra süpernatant alınıp manyetik nanoyapılar 18000 g'de 20 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöken manyetik nanoyapılar önce etanol (% 99) ile daha sonra sırasıyla etanol/su (1:1) karışımı ve su ile yıkanarak polimerizasyona katılmayan maddelerden arındırıldı. Yıkama işleminin ardından nanoyapılara polimerizasyon hacmi kadar (yaklaşık 71 mL) saf su ilave edilerek emülsiyon oluşturmaları sağlandı. Üretilen nano-polimerler, buzdolabında saklandı (Uygun vd., 2009).

3.2.2. Mag-Nano-p(HEMA) Polimerine Reaktif Green 19 Boyasının Bağlanması

Reaktif Green 19'un triazin halkasının klorürü ile mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarının hidroksil grubu arasında, alkali koşullar altında NaCl'ün eliminasyonu ile nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu gerçekleştirildi ve boyanın

manyetik nanoyapılara bağlanması sağlandı. Bu amaçla Reaktif Green 19'un 0,1 mg/mL derişiminde 100 mL çözeltisi hazırlandı ve 100 mL sudaki 0,1 g mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarına ilave edildi. Bu karışıma 4,0 g NaOH ilave edilerek 80 °C'de 4 saat karıştırıldı ve 4 saatin sonunda reaksiyona girmemiş boya moleküllerini uzaklaştırmak için yıkama işlemi uygulandı. Yıkama işlemi sırasıyla saf su, metanol ve saf su ile gerçekleştirilerek manyetik nanoyapılar saf suda disperse edildi. Daha sonra manyetik nanoyapılara bağlı Reaktif Green 19'un diklorotriazinil grubunun reaktif klor atomları, pH'ı 8,5 olan 2,0 M 100 mL NH₄Cl çözeltisi ile oda sıcaklığında 4 saat muamele edildi ve klor atomlarının amino gruplarıyla yer değiştirmesi sağlandı. Bu işlemden sonra boya bağlı manyetik nanoyapılar saf su ile yıkandı ve tekrar saf suda disperse edilerek buzdolabında saklandı.

3.3. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinin Karakterizasyonu

3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Mag-nano-p(HEMA) ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerlerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Shimadzu 60X) kullanılarak elde edildi. Örnekler (0,1 g) KBr ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirildi ve FTIR spektrumu çekildi.

3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri

Nanoyapıların manyetik özellikleri elektron spin rezonans spektrometresi (ESR, Varian E-L X Band spectrometer, Almanya) kullanılarak belirlendi. Vakum etüvünde kurutulmuş olan örneklerin 1000-5000 G'luk bir manyetik alanda oda sıcaklığında ESR spektrumları çekildi. ESR spektrumları mikrodalga frekansı 9,3 GHz'de sabit tutulup manyetik alan değiştirilerek soğurma eğrisinin birincil türevi olarak çizildi.

3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen nanoyapıların yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelendi. SEM fotoğraflarının çekilmesi ile nanoyapıların şekli ve büyüklüğü ile ilgili bilgi edinildi. Toz halindeki polimerin SEM ölçümlerinde Phillips XL-30S FEG marka taramalı elektron mikroskobu kullanıldı.

3.3.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

Sentezlenen boya bağlı nanoyapıların elementel analizi SEM’nda X-ışını analizi (EDX) cihazı (LEO, EVO 40, Carl Zeiss NTS, Peabody, Massachusetts) kullanılarak gerçekleştirildi. Nanoyapıların boya içeriği kükürt stokiyometrisinden yararlanılarak hesaplandı.

3.3.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen polimerin yüzey özellikleri ve boyutu hakkında bilgi edinmek için AFM ölçümleri Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerine Alkol Dehidrogenaz Enziminin Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde incelendi. Bunun için polimerik yapılar, alkol dehidrogenaz çözeltisi ile denge süresi boyunca (2 saat) 130 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Adsorpsiyona pH’ın, alkol dehidrogenaz başlangıç derişiminin, sıcaklığın ve iyonik şiddetin etkisi incelendi.

Nanoyapıların tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için, alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyonu işlemleri gerçekleştirildi. Alkol dehidrogenaz enziminin desorpsiyonu 1,0 M NaCl çözeltisi kullanılarak incelendi. Alkol dehidrogenaz enziminin nanoyapılara adsorpsiyonu-desorpsiyonu çalışmaları 5 döngü boyunca tekrar edildi.

3.4.1. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH’ın Etkisinin İncelenmesi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH’ın etkisinin incelenmesi için farklı pH çözeltilerinde (pH 4,0-5,0 asetat tamponu; pH 6,0-8,0 fosfat tamponu; pH 9,0 karbonat tamponu; 100 mM) derişimi 0,5 mg/mL olan 5’er mL alkol dehidrogenaz enzimi çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 1’er mL alınarak spektrofotometrede 280 nm’de absorbansları okundu. Kalan 4’er mL’lik çözeltilere sentezlenen Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinden 2’şer mL ilave edildi ve 2 saat süre ile 130 rpm hızda manyetik karıştırıcıda

karıştırıldı. Birinci ve ikinci saatin sonunda 6'şar mL'lik örneklerden 1'er mL alındı ve 18000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alınarak 280 nm'de absorbansları okundu. pH değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesinin hangi pH değerinde olduğu bulundu. Aynı işlemler, boya içermeyen mag-nano-p(HEMA) polimeri için de gerçekleştirilerek elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi.

3.4.2. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Enzim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna enzim başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi için 25 °C'de 5'er mL'lik pH 7,0 fosfat tamponu ile 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/mL derişimlerinde alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi her bir derişim örneği için adsorpsiyon işlemleri gerçekleştirildi ve adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları hesaplandı. Alkol dehidrogenaz derişimine karşı, adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı grafiği çizildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulundu. Aynı işlemler, boya içermeyen mag-nano-p(HEMA) polimeri için de gerçekleştirilerek adsorpsiyon kapasiteleri benzer şekilde bulundu. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimeri için alkol dehidrogenaz derişimine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı verilerinden yararlanarak Langmuir ve Freundlich izotermeleri çizildi ve değerlendirildi.

3.4.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi için 4; 15; 25; 35; 45; 50 °C'deki sıcaklıklarda enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 5'er mL'lik pH 7,0 fosfat tamponu ile alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi her bir sıcaklıkta adsorpsiyon gerçekleştirildi. Sıcaklık değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirildi.

3.4.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için derişimleri 0; 0,01; 0,05; 0,1 M olan NaCl çözeltileri ile enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan

0,5 mg/mL derişimindeki alkol dehidrogenaz çözeltilerine farklı miktarlarda NaCl ilave edildi ve Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi. İyonik şiddet değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirildi.

3.4.5. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinden Alkol Dehidrogenazın Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak 1,0 M NaCl çözeltisi kullanıldı. 25 °C'de pH 7,0 fosfat tamponunda 0,5 mg/mL derişimindeki alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyonu Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Daha sonra enzim bağlı polimerik nanoyapılar santrifüj yardımıyla adsorpsiyon ortamından ayrılarak desorpsiyon işlemlerinde kullanıldı. Bu amaçla adsorplanmış polimerik nanoyapılar 6,0 mL 1,0 M NaCl çözeltisi ile 25 °C'de 130 rpm hızda, 2 saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. 6 mL'lik örnekten 1,0 mL alınarak 18000 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. Okunan absorbans değerlerinden ve Eşitlik 3.1'den yararlanarak alkol dehidrogenazın % desorpsiyon oranı hesaplandı.

% desorpsiyon = [desorpsiyon ortamına salınan alkol dehidrogenaz miktarı (mg)/adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı (mg)] x 100 Eşitlik 3.1

Desorpsiyon işleminden sonra Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimeri 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ile yıkanarak tekrar alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu için kullanıldı. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri 5 kez tekrar edilerek adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı, döngü sayısına karşı grafiğe geçirildi.

3.5. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Tayini

Alkol dehidrogenaz aktivitesi, Vallee ve Hoch (1955) tarafından önerilen spektrofotometrik metoda göre tayin edildi. Bu metodun temeli NADH'in NAD⁺ya yükseltgenmesi sonucu 340 nm'deki absorbansın azalmasına dayanmaktadır.



Şekil 3.1. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz katalizli fenilglioksilik asitin (R)-mandelik asite indirgenmesi (Li vd., 2008)

Bu amaçla 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 0,25 mL 0,1 M fenilglioksilik asit ve 1,25 mL 0,05 M pH 7,0 Tris-HCl tamponu kör küvetine, 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 0,25 mL 0,1 M fenilglioksilik asit, 1,0 mL 0,05 M pH 7,0 Tris-HCl tamponu ve 0,25 mL 0,1 mg/mL alkol dehidrogenaz enzimi örnek küvetine konarak NADH'in NAD⁺'ya yükseltgenmesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de 3 dakika boyunca izlendi ve gerçekleşen reaksiyon Şekil 3.1'de gösterildi. Bir ünite alkol dehidrogenaz, 25 °C'de ve pH 7,0'de, dakikada 1 µmol NADH'ın yükseltgenmesi için kullanılan enzim miktarı olarak tanımlandı ve ünite hesabı Eşitlik 3.2'deki formüle göre yapıldı.

$$U = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t} \times sf \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

Burada V, spektrofotometrik küvetteki son hacim (mL); ϵ , NADH'in molar absorptans katsayısı (6,220 mL/µmol.cm); d, ışık yolu (1,0 cm); sf, seyreltme faktörüdür.

Protein miktarı tayini için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın aktivitesine pH'ın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelendi. İlâveten serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın ısıl ve depo kararlılıkları ve immobilize alkol dehidrogenazın işlemsel kararlılığı belirlendi.

3.5.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 4,0-5,0 asetat tamponu; pH 6,0-8,0 fosfat tamponu;

pH 9,0 karbonat tamponu; 0,1 M) derişimi 0,5 mg/mL olan 5'er mL alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Aktivite ölçümleri Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için Eşitlik 3.2 kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için optimum pH değerleri belirlendi.

3.5.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için farklı sıcaklık değerlerinde (4; 15; 25; 35; 45 ve 50 °C) ve 0,1 M'lık pH 7,0 fosfat tamponunda derişimi 0,5 mg/mL olan 5'er mL alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitesinin ölçümünde spektrofotometreye bağlanan bir sirkülatörlü su banyosundan yararlandı. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için Eşitlik 3.2 kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. Sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.5.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine substrat derişiminin etkisinin incelenmesi için pH 7,0 fosfat tamponunda farklı substrat (fenilglioksilik asit) derişiminde çözeltiler hazırlandı. Farklı derişimdeki bu substrat çözeltileri (0,01; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10 mol/L) kullanılarak serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimleri ile aktivite ölçümleri yapıldı. Bunun için 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 1,25 mL 0,05 M Tris-HCl tamponu ve 0,1 mg/mL derişiminde 0,25 mL alkol dehidrogenaz enzimi kör küvetine, 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 1,0 mL 0,05 M Tris-HCl tamponu, 0,25 mL farklı derişimlerdeki fenilglioksilik asit ve 0,1 mg/mL derişimde 0,25 mL alkol dehidrogenaz enzimi örnek küvetine konarak enzimin hızı NADH'in yükseltgenmesine bağlı olarak spektrofotometrede 340 nm'de 3 dakika boyunca izlendi. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimleri için hız değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk

grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.5.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın ısıl kararlılığının incelenmesi için 35 ve 45 °C'deki sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz 35 ve 45 °C'deki su banyosunda 240 dakika tutuldu ve belirli aralıklarla aktivite ölçümleri Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için bu sıcaklıklarda zamana karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

3.5.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın depo kararlılığının incelenmesi için belli aralıklarla 30 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Bu süre içinde serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz buzdolabında +4 °C'de saklandı. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için yapılan aktivite ölçümlerinden zamana karşı % aktivite grafikleri çizildi.

3.5.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize alkol dehidrogenazın işlemsel kararlılığının incelenmesi için immobilize enzim ile ard arda 10 kez aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir aktivite ölçümünden sonra immobilize alkol dehidrogenaz pH 7,0 fosfat tamponu ile yıkandı ve tekrar aktivite ölçümü için kullanıldı. İmmobilize alkol dehidrogenaz için döngü sayısına karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

3.6. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması için 1,0 g kuru maya (*S. cerevisiae*) 10,0 mL pH 7,5 fosfat tamponunda 1 saat manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı. Daha sonra maya hücreleri 1000 rpm'de 5 dakika homojenizatör yardımıyla parçalandı ve 10000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek maya homojenatı ayrıldı. Homojenatta protein tayini ve aktivite ölçümleri yapıldı.

Elde edilen maya homojenatından alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması için homojenat 10 kat seyreltildi. Seyreltik homojenattan 1,0 mL alınarak üzerine 4,0 mL pH 7,0 fosfat tamponu ilave edildi. Toplam hacmi 5,0 mL olan tampondaki homojenat çözeltisinden aktivite ve protein tayinleri için 1,0 mL ayrıldı. Kalan 4,0 mL çözelti üzerine 2,0 mL Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimeri ilave edilerek 130 rpm'de 2 saat karıştırıldı. İki saatin sonunda 1,0 mL örnek alınarak 10 dakika 18000 g'de santrifüjlendi ve protein tayini yapılarak bağlanan protein miktarı hesaplandı. İmmobilize alkol dehidrogenaz enziminin polimerden desorpsiyonu için immobilize alkol dehidrogenaz 6,0 mL 1,0 M NaCl çözeltisi ile 2 saat karıştırıldı. Desorpsiyon işlemi sonunda elde edilen örnekte protein tayini ve aktivite ölçümleri gerçekleştirildi ve örnek elektroforeze uygulandı.

3.6.1. Protein Tayini

Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması işleminde protein tayini için Bradford yöntemi (1976) kullanıldı. Commassie Brilliant Blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki pozitif yüklü gruplara seçimli olarak bağlanan bir boyadır. Boya kırmızı ($A_{\max} = 465 \text{ nm}$) ve mavi ($A_{\max} = 595 \text{ nm}$) formlarda bulunur. Kırmızı form çözeltideki haldir ve boya proteine bağlandığında mavi renk oluşur. Reaksiyon oldukça tekrarlanabilir ve hızlıdır. İki dakika içinde renk oluşur ve bir saat kadar kararlı kalır (Robty ve White, 1987).

Bradford yöntemi ile protein tayini için Bradford boya çözeltisi hazırlandı. Bunun için Commassie Brilliant Blue G-250'nin 100 mg'ı 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL % 85'lik fosforik asit ilave edildi. Çözelti filtre kağıdı ile süzülerek saf su ile 1,0 L'ye tamamlandı. 2,5 mL Bradford çözeltisi ve 50 µL saf su kör küvetine, 2,5 mL Bradford çözeltisi ve 50 µL protein çözeltisi örnek küvetine konularak 5 dakika bekletildi. Daha sonra 595 nm'de absorbans okundu.

3.6.2. SDS-PAGE Elektroforezinin Uygulanması

Mayadan elde edilen alkol dehidrogenaz enziminin saflığı Laemmli (1970) yöntemine göre SDS-PAGE kullanılarak belirlendi. SDS-PAGE jel hazırlığı ve elektroforeze uygulama işlemleri Arat (2007)'ye göre uygulandı. Elektroforez camları % 70'lik etanolla iyice yıkandı. % 10'luk ayırma jeli için 2,55 mL saf su,

1,66 mL pH 8,8 ayırma tamponu ($2,8 \times 10^{-3}$ M SDS içeren 3,0 M Tris-baz tamponu), 2,2 mL % 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid çözeltisi, 6 µL TEMED ve 43 µL % 10'luk amonyum persülfat karıştırıldı. Hazırlanan jel mikropipet kullanılarak elektroforez camları arasına dikkatlice döküldü. Jelin havayla temasını kesmek için % 70'lik etanolle jelin üzeri kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat beklendi. Bir saatin sonunda jelin üzerindeki etanol kurutma kağıdı ile jele temas etmeden dikkatlice alındı. Daha sonra ayırma jelinin üzerine % 5'lik yoğunlaştırma jeli döküldü. Yoğunlaştırma jeli için 965 µL saf su, 416 µL yoğunlaştırma tamponu ($3,5 \times 10^{-4}$ M SDS içeren 0,5 M Tris-baz tamponu), 278 µL % 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid çözeltisi, 1,7 µL TEMED ve 17 µL % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi karıştırıldı ve elektroforeze döküldü. Tarak, jelde hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için 1 gece beklendi.

Jele uygulanacak örnek ve standart, pH 8,5 örnek tamponuyla (12,5 mL 1,0 M pH 6,8 Tris-baz, 40 mL % 10'luk SDS, 20 mL gliserol, 2 mL % 2'lik brom fenol mavisi, 5 mL % 5'lik β-merkaptolanol) uygun oranlarda seyreltildikten sonra kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi. Tarak jele zarar vermeden çıkarıldı ve kuyucuklara yaklaşık 15 µL'lik saflaştırmak istenen örnekler yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi. Kuyucuklar içinde kalacak şekilde pH 8,5 yürütme tamponu ($2,5 \times 10^{-2}$ M Tris-baz, 0,2 M glisin, $3,5 \times 10^{-3}$ M SDS) ile dolduruldu. Güç kaynağı ile üst jele 100 V 20 mA, alt jele 200 V 40 mA elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi 120 dakikada tamamlandı.

Elektroforetik yürütme tamamlandıktan sonra cam plakalar arasından çıkarılan jel Commasie Brilliant Blue G-250 çözeltisi içine alınarak bir gece bekletildi. Jel boya çözeltisinden alınarak önce birinci yıkama çözeltisinde (400 mL metanol, 70 mL asetik asit, 530 mL saf su) ve daha sonra ikinci yıkama çözeltisinde (50 mL metanol, 70 mL asetik asit, 880 mL saf su) 3'er saat bekletildi.

3.6.2.1. Gümüş boyama

Gümüş boyama ile elektroforez sonrası belirgin olmayan protein bantları 100 kat daha belirgin hale getirilip izlenebilir. Bunun için elektroforez jeline aşağıdaki işlemler uygulandı.

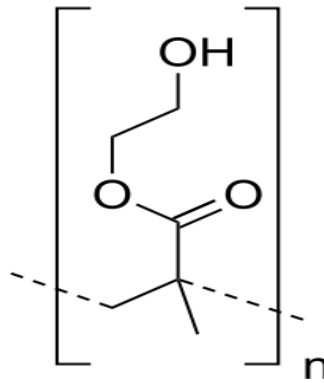
Elektroforez jeli, A çözeltisinde (50 mL metanol, 10 mL asetik asit, 40 mL saf su) çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra B çözeltisinde (5 mL metanol, 7 mL asetik asit, 88 mL saf su) ve C çözeltisinde (% 10'luk glutaraldehit) 15'er dakika bekletildi. Ardından jel, cam bir kap içinde saf suda 2 saat kadar bekletilerek durulandı. Durulamadan sonra mL'sinde 5,0 µg (DTT) dithiothreitol olacak şekilde saf suda hazırlanmış çözeltide 15 dakika bekletildi. Daha sonra % 1'lik AgNO₃ çözeltisinden, taze olarak % 0,1'lik AgNO₃ çözeltisi hazırlandı ve jel bu çözeltide 15 dakika çalkalandı. Ardından jel 10 mL hacmindeki saf su ile iki kez durulandı ve bir müddet geliştirme çözeltisinde (% 3'lük sodyum karbonat çözeltisine % 37'lik 25 mL formaldehit eklenmesiyle hazırlanan) bekletildi. Jel dikkatlice izlendi ve bantlar istenilen koyuluğa ulaştığında ortama durdurma çözeltisi (2,3 M sitrik asit) eklendi. Jel su içinde saklandı ve fotoğrafı çekildi (Walker, 2002).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

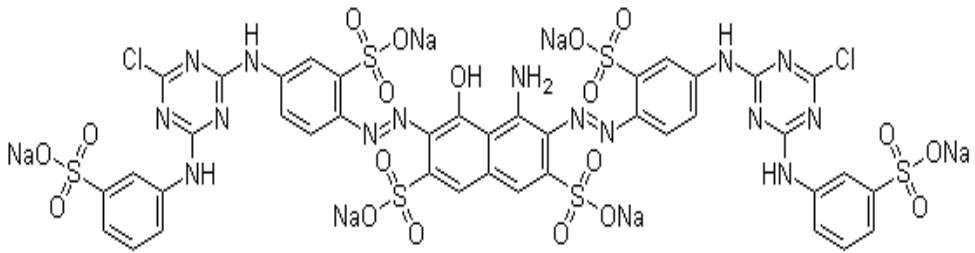
4.1. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinin Karakterizasyonu

4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Sentezlenen mag-nano-p(HEMA) polimerinin kimyasal yapısı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



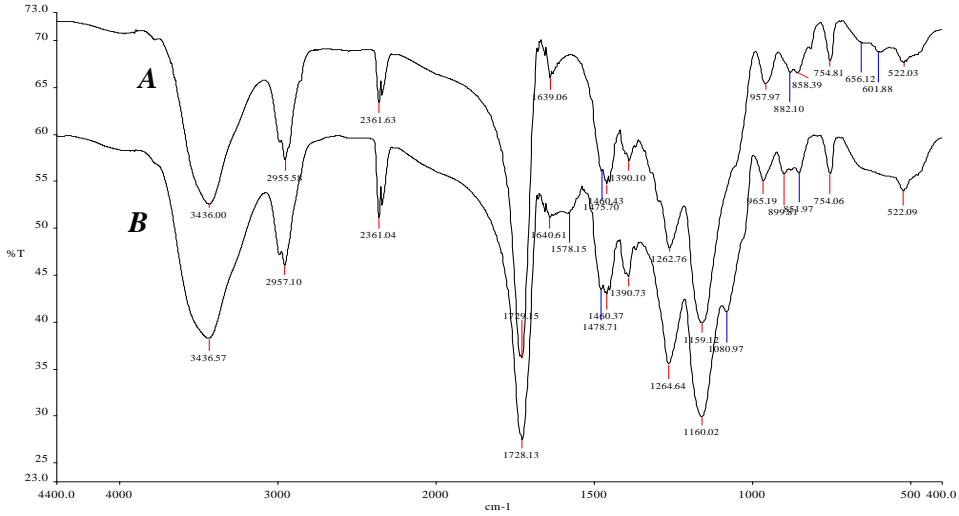
Şekil 4.1. Mag-nano-p(HEMA) polimerinin kimyasal formülü



Şekil 4.2. Reaktif Green 19 boyasının kimyasal formülü

Şekil 4.2’de gösterildiği gibi Reaktif Green 19, bir diklorotriazin boyasıdır ve 6 adet sülfonik asit grubu ve 5 adet birincil ve ikincil amino grupları içerir. Bu çalışmada Reaktif Green 19’un triazin halkasının klorürü ile mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarının hidroksil grubu arasında, alkali koşullar altında NaCl’ün eliminasyonu gerçekleştirilmiş ve Reaktif Green 19 boyası manyetik nanoyapılara

bağlanmıştır. Reaktif Green 19'un mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarına bağlanması, nanoyapıların renk değişimiyle (yeşil renk oluşumu) gözlemlendiği gibi FTIR spektrumları ile de gösterilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. A) Mag-nano-p(HEMA); B) Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerlerinin FTIR spektrumu

Mag-nano-p(HEMA) ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) nanoyapıların -OH gruplarının gerilme titreşimleri 3500 cm⁻¹ civarında, -C=O gruplarının gerilme titreşimleri ise 1700 cm⁻¹ civarında görülmektedir. Boya bağlı nanoyapıların FTIR spektrumunda 1080 cm⁻¹ ve 1160 cm⁻¹'de görülen bantlar Reaktif Green 19'da bulunan S=O bağının simetrik gerilmesi ve S=O bağının asimetrik gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1578 cm⁻¹'de görülen bant ise boya molekülündeki aromatik halkardan dolayıdır.

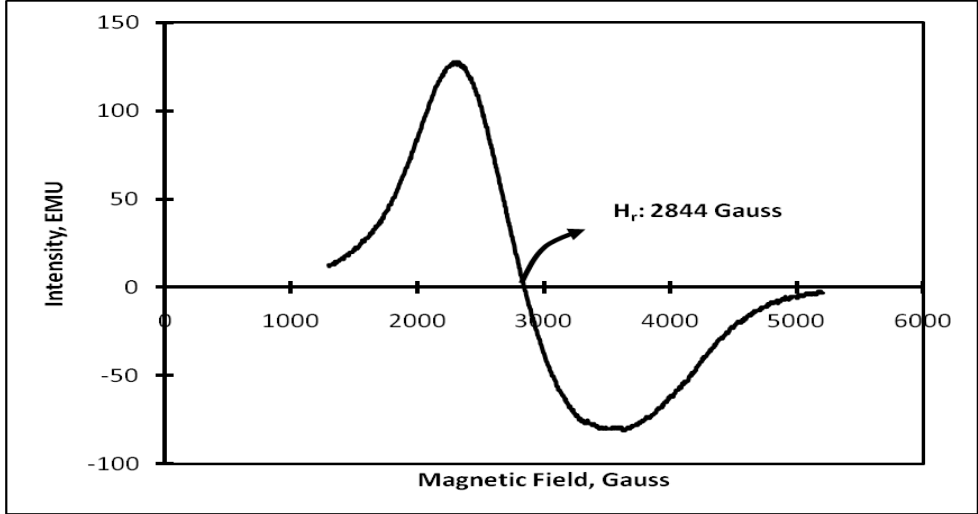
4.1.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri

Nanoyapılarının manyetik özellikleri ESR spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir. Nanoyapılara manyetik özellik kazandıran bileşenin (magnetit, Fe₃O₄) varlığı ESR ile incelenmiş ve polimerin yapısına girdiğini gösteren ESR spektrumları Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Örneğe bir dış manyetik alan uygulanması örnekte, dış manyetik alandan çıkarılacak veya dış manyetik alanla toplanacak bir iç manyetik alan (H_{yerel}) oluşumuna neden olabilir. Elektronik manyetik alan

tarafından oluşturulan yerel manyetik alan, etkin manyetik alanı (H_{etkin}) vermek üzere dış manyetik alanla ($H_{\text{dış}}$) vektörel olarak toplanır:

$$H_{\text{etkin}} = H_{\text{dış}} + H_{\text{yerel}}$$

Eşitlik 4.1



Şekil 4.4. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin ESR spektrumu

Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi manyetik nanoyapılara uygulanan dış manyetik alanın şiddeti arttıkça nanoyapıların mıknatıslanmasından kaynaklanan yerel manyetik alan şiddeti artmaktadır. Dış manyetik alan şiddetindeki artışın devam ettirilmesi durumunda ise; yerel manyetik alan şiddeti azalma eğilimi göstermekte (vektörel olarak ters yönde gerçekleşmekte) ve rezonans manyetik alan değeri (H_r) olarak adlandırılan bir değerde sifira düşmektedir. Dış manyetik alan şiddetinin artmasıyla birlikte, yerel manyetik alan şiddeti tekrar artmaya başlamakta ve sinüs eğrilerine benzer bir etkin manyetik davranış gözlenmektedir. Manyetik polimerlerde H_r değeri, polimerik malzemelerdeki manyetik bileşenlerin uyarılması için birim polimer kütlesi başına gerekli olan dış manyetik alanı ifade etmektedir. Bu değer, 2844 G olarak bulunmuştur. Çalışma kapsamında hazırlanan nanoyapılar için g faktörü değeri 2,299 olarak hesaplanmıştır. Bu değer sentezlenen nanoyapıların manyetik özellik kazandığını göstermektedir. Bu sonuca göre hazırlanan nanoyapıların manyetik özellikte olduğu söylenebilir.

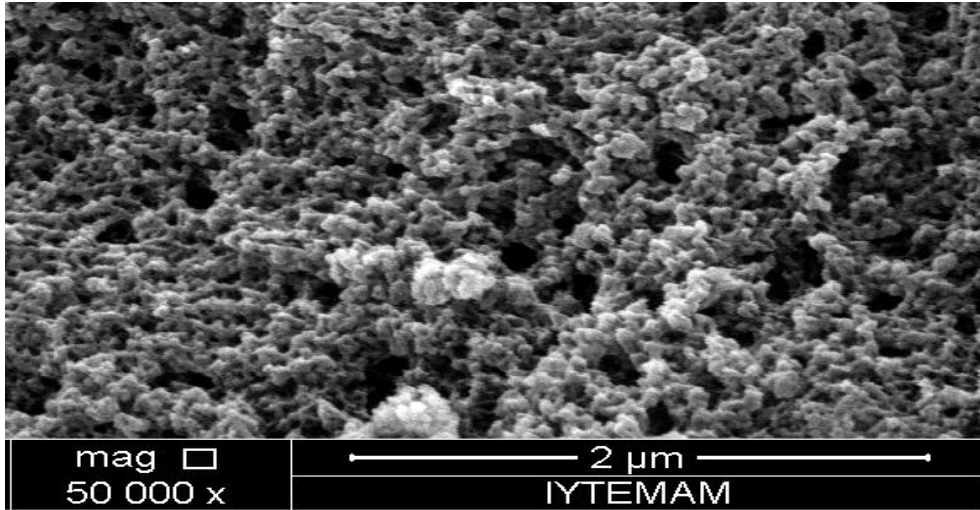
Manyetik polimerlerin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer parametre de, moleküllerin kantitatif karakterlerini gösteren g faktörü değerleridir. Bilinmeyen bir sinyal için g faktörünün hesaplanması sinyalin kaynağını belirleme bakımından önemlidir. Literatürde Fe^{3+} için (düşük ve yüksek spin kompleksleri) g faktörü değerleri sırasıyla 1,4-3,1 ve 2,0-9,7 aralıklarında rapor edilmiştir (Sarı vd., 2006). Manyetik malzemelerin g faktörlerinin hesaplanması için aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır:

$$g = h.v / \beta.H_r \quad \text{Eşitlik 4.2}$$

Bu eşitlikte, h: Planck sabiti ($6,626 \times 10^{-27}$ erg/s); β : evrensel sabit ($9,274 \times 10^{-21}$ erg/G); v: frekans ($9,707 \times 10^9$ Hz) ve H_r : manyetik alan rezonansıdır (G).

4.1.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

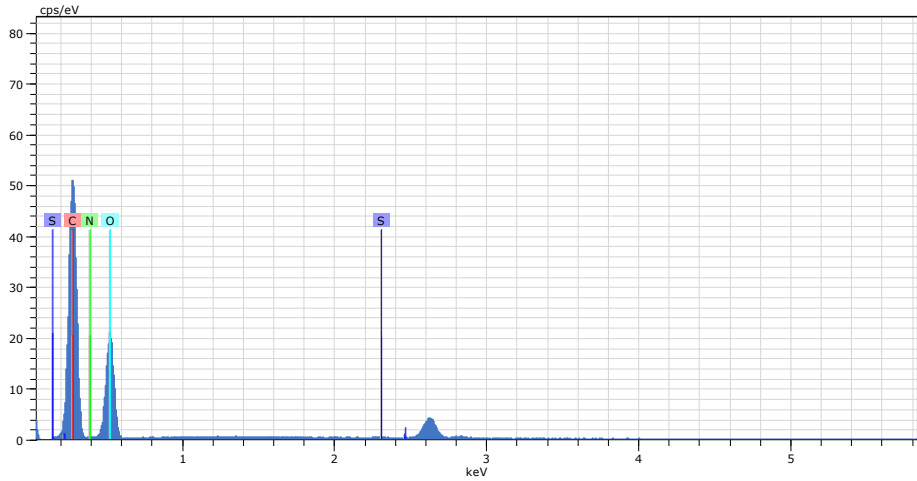
SEM ile sentezlenen boya bağlı nanoyapıların yüzey morfolojisi incelenmiştir. Şekil 4.5’de gösterilen SEM fotoğrafından, sentezlenen yapıların küresel yapıda ve benzer boyutlarda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin SEM fotoğrafı

4.1.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

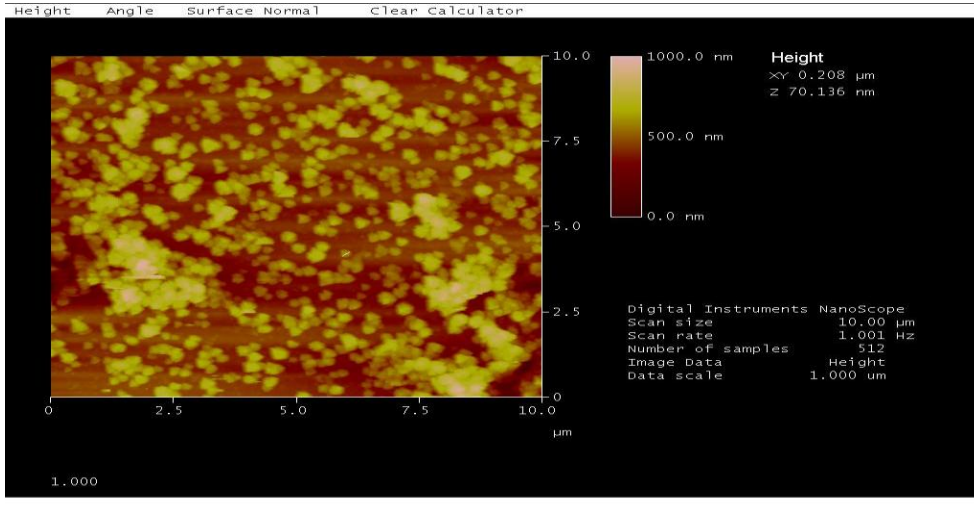
Boya bağlı nanoyapıların elementel analizi, SEM’nda EDX analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen EDX spektrumları Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Polimerik yapıya boyanın katıldığı EDX spektrumunda kükürt atomunun varlığı ile görülmüştür. Bu analizde aletten okunan % kükürt değerinden yararlanarak polimerdeki boyanın miktarı stokiyometrik olarak hesaplanmış ve polimerin boya içeriği 63,5 $\mu\text{mol/g}$ olarak bulunmuştur.



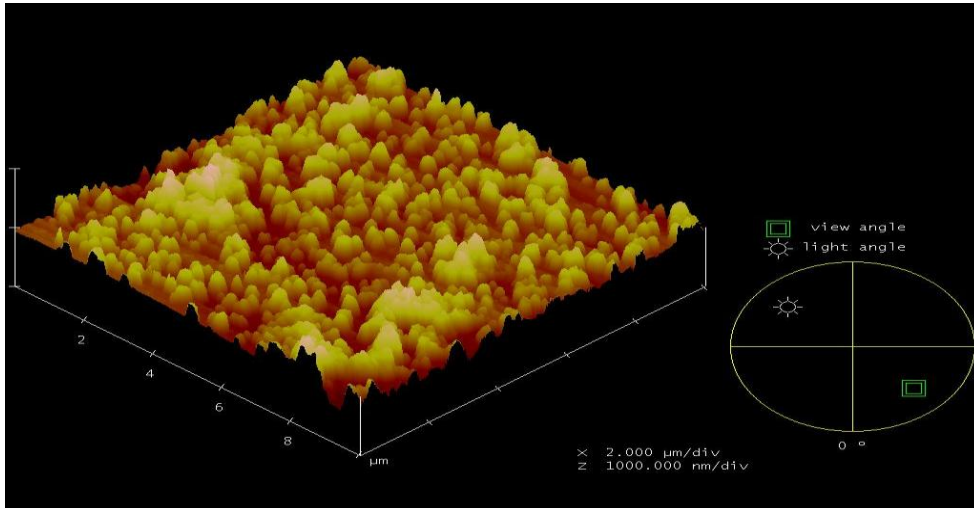
Şekil 4.6. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin EDX spektrumu

4.1.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

Nano boyuttaki yapıların boyut ve yüzey özelliklerinin incelenmesinde SEM’nun yanı sıra AFM’nun kullanılması daha yaygındır. Sentezlenen nanoyapıların AFM fotoğrafları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Bu fotoğraflardan sentezlenen yapıların nano boyutta (yaklaşık 70 nm), küresel ve eş boyutlarda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin AFM fotoğrafı



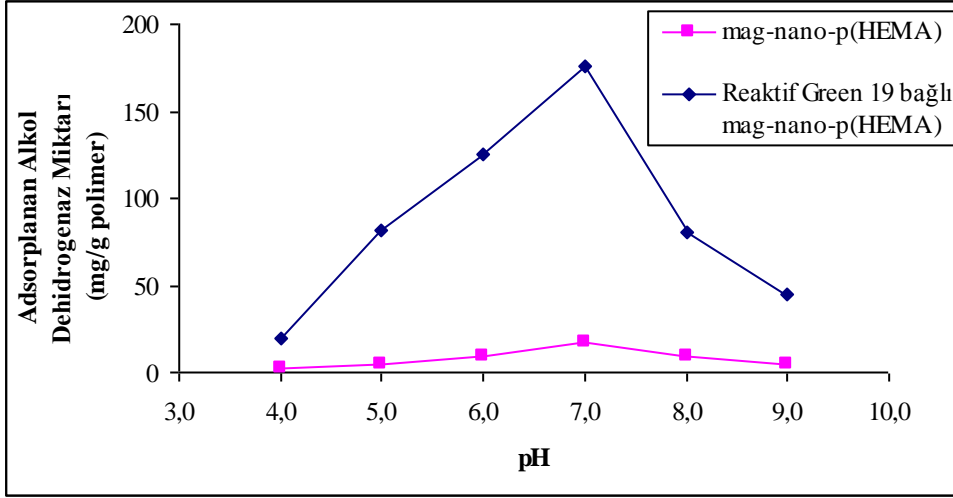
Şekil 4.8. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin üç boyutlu AFM fotoğrafı

4.2. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerine Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

4.2.1. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.9'da alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi gösterilmiştir. Şekilden asidik ve bazik pH'larda adsorpsiyonun önemli miktarda azaldığı görülmektedir. Bu sonuç ortam pH'ının alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunda önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Alkol dehidrogenaz enziminin Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarına farklı pH'lardaki adsorplanma kapasitesi, enzimin iyonlaşma durumuyla ve enzim ile nanoyapılar arasındaki itici elektrostatik kuvvetlerle ilişkilendirilebilir. Birbirine yakın olarak adsorplanmış alkol dehidrogenaz molekülleri arasındaki lateral elektrostatik itmelerdeki artış nanoyapıların adsorpsiyon etkinliğini azaltabilir. Alkol dehidrogenazın izoelektrik pH'ı 5,4'tür (Zhang vd., 2000) ve bu pH'da alkol dehidrogenazın net yükü sıfırdır. Sulu çözeltilerdeki maksimum adsorpsiyon genellikle o enzimin izoelektrik pH'ında gözlenir. Ancak bu çalışmada maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu pH 7,0'de gözlenmiştir. İzoelektrik noktanın üzerindeki bu noktada enzim negatif yüklüdür. İlâveten bu pH'da Reaktif Green 19 boyası da taşıdığı sülfonat gruplarından dolayı negatif yüklüdür. pH 7,0'de maksimum adsorpsiyonun gözlenmesi, bağlanmadaki baskın güçlerin elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra hidrofobik etkileşimler olduğunu göstermektedir (Shentu vd., 2005).

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi pH 7,0'de mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 17,29 mg/g polimer iken Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 176,09 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Boya bağlaması ile adsorpsiyonda önemli bir artış gözlenmiştir.



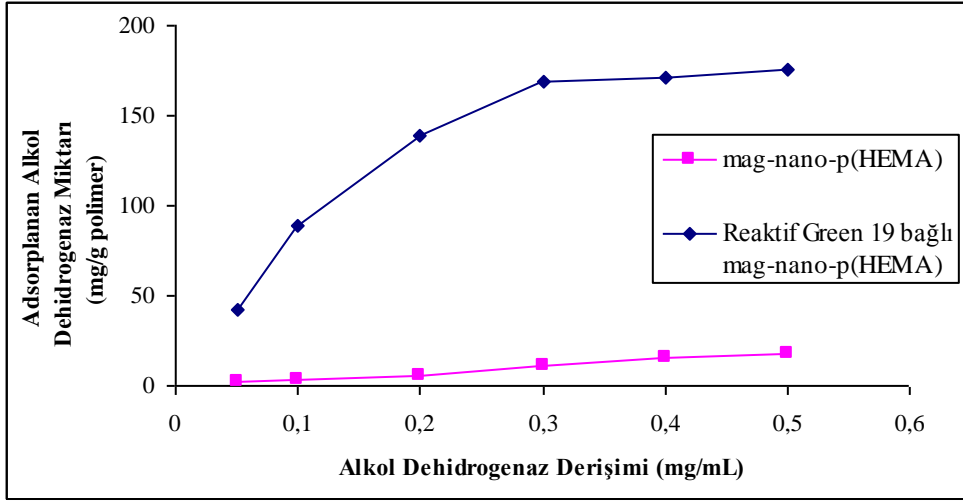
Şekil 4.9. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi. Başlangıç alkol dehidrogenaz derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

4.2.2. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.10'da Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarına alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna, alkol dehidrogenaz başlangıç derişiminin etkisi görülmektedir. Adsorpsiyon alkol dehidrogenaz derişimine bağlı olarak artmakta ve maksimum adsorpsiyon 0,5 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde gözlenmektedir. Boya taşımayan mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarına spesifik olmayan alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu ise ihmal edilebilir düzeyde düşük bulunmuştur.

Enzim taşıyıcı materyallerin boyutlarındaki küçülme genelde immobilize enzimlerin etkinliğini arttırabilir. Yüzeğe bağlanma durumunda, daha küçük partiküller enzimlerin bağlanması için daha geniş yüzey alanı sunar ve partiküllerin birim kütlesi başına daha fazla enzim yüklenmesi mümkün olur (Kim vd., 2006). Maya alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonuna ilişkin literatürde sunulmuş çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Trivedi vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada maya alkol dehidrogenaz enzimi, milimetre boyutunda ve gözeneksiz Celite 545, Celite 503 ve poliamid gibi cam kürelere adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiş ve

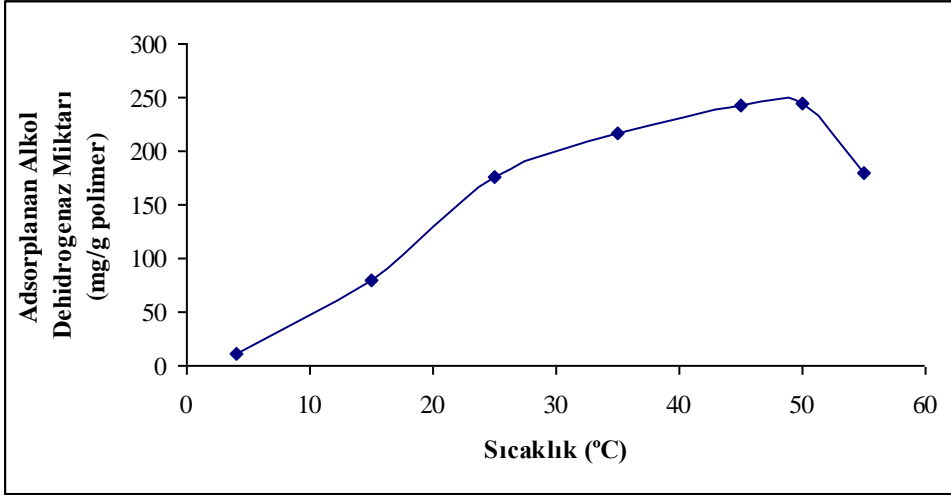
maksimum alkol dehidrogenaz yüklemesi 0,0055 mg protein/mg destek olarak bulunmuştur. Bu çalışmada manyetik nanoyapılar kullanılarak maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 0,5 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde 176,09 mg/g polimer olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna alkol dehidrogenaz derişiminin etkisi. pH: 7,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

4.2.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

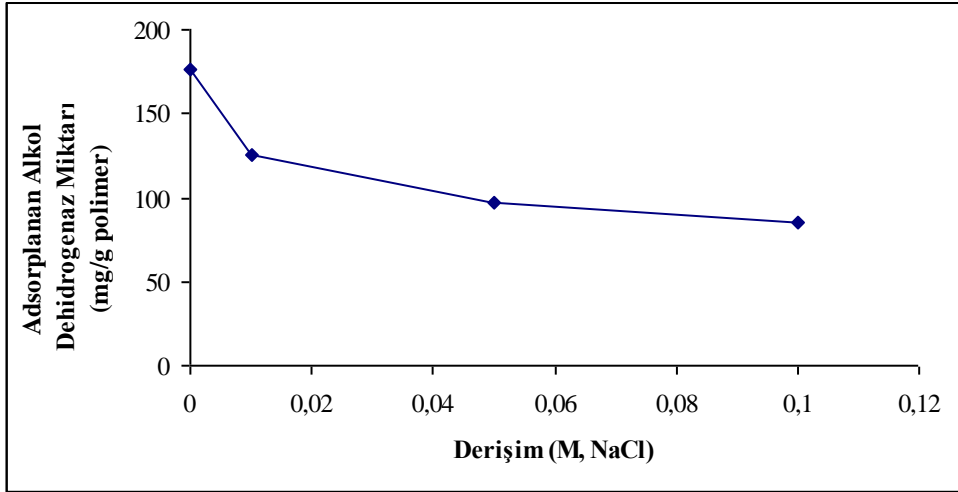
Protein ligand etkileşimlerinde sıcaklığın etkisi oldukça önemlidir. Şekil 4.11’de alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi görülmektedir. Sıcaklığın artmasıyla gram polimer başına adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı artmaktadır. 25 °C’de adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı 176,09 mg/g polimer iken 50 °C’de adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı 244,15 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Sıcaklığa bağlı olarak adsorpsiyonda görülen bu artış proteinde gömülü olarak bulunan amino asit birimlerinin açığa çıkması ve ligand protein etkileşimlerinin artmasından kaynaklanabilir. Boyaların ligand olarak kullanıldığı benzer birçok çalışmada sıcaklığa bağlı olarak protein adsorpsiyonunun arttığı görülmüştür. Örneğin, Bayramoğlu ve Arıca (2002) tarafından yapılan bir çalışmada ligand olarak Procion Green H-4G (Reaktif Green 5) kullanılmış ve sıcaklığa bağlı olarak lizozim adsorpsiyonunun arttığı rapor edilmiştir.



Şekil 4.11. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç alkol dehidrogenaz derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 7,0; inkübasyon süresi: 2 saat

4.2.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.12’de alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi gösterilmiştir. Şekilden iyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı görülmektedir. İyonik şiddet 0,01’den 0,1’e arttırıldığında manyetik nanoyapıların adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık % 32 oranında azalmıştır. Bu azalma boya bağlı manyetik nanoyapılar ve enzim molekülleri arasındaki itici elektrostatik etkileşimler nedeniyle olabilir. Tuz derişimi arttığında, tuzun sodyum iyonları ile boyanın deprotonlanmış sülfonik asit gruplarının nötralizasyonu gerçekleşir ve bu da düşük protein adsorpsiyonuna sebep olur. Benzer bir etki Zhang vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu araştırmacılar Cibacron Blue F3GA bağlı kitosan mikrokürelere sığır serum albumin proteininin adsorpsiyonunu gerçekleştirmişler ve iyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyonun azaldığını rapor etmişlerdir.



Şekil 4.12. Reaktif Green 19 bağı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Başlangıç alkol dehidrogenaz derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 7,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

4.2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorban ve adsorplanan arasındaki denge ilişkileri, genellikle sabit sıcaklıktaki denge durumunda, adsorplanan miktar ile çözeltide kalan arasındaki oramı veren adsorpsiyon izotermi ile tanımlanır. Langmuir ve Freundlich izotermi sıklıkla kullanılan izotermilerdir.

Langmuir izoterm modeli, eşit ulaşılabilir adsorpsiyon bölgeleri, tek tabakalı yüzey kaplama ve adsorplanan türler arasında etkileşim olmaması gibi homojenite varsayımı temeline dayanmaktadır (Mohann vd., 2006). Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$q_{eq} = q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + b \cdot C_{eq}) \quad \text{Eşitlik 4.3}$$

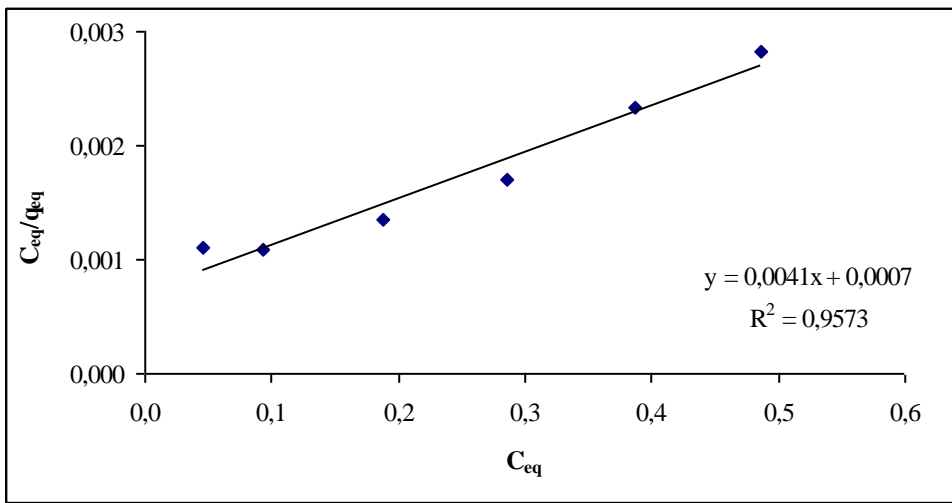
Burada q_{eq} , denge anında adsorbana bağlı alkol dehidrogenaz derişimi (mg/g); C_{eq} , çözeltideki denge alkol dehidrogenaz derişimi (mg/mL); b , Langmuir sabiti (mL/mg, adsorpsiyon serbest enerjisi veya net entalpisi ile ilgili bir sabittir) ve q_{max} , maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g). Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir:

$$C_{eq}/q_{eq} = 1/q_{max} \cdot b + C_{eq}/q_{max}$$

Eşitlik 4.4

C_{eq} 'a karşı C_{eq}/q_{eq} grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun kesimi $1/q_{max} \cdot b$ 'yi, eğimi $1/q_{max}$ 'ı verir.

Şekil 4.13'te Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğimi ve kesiminden maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyon kapasitesi (q_{max}) 243,90 mg/g, Langmuir sabiti (b) 5,86 mL/mg olarak bulunmuştur.



Şekil 4.13. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi. pH: 7,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

Freundlich izoterm modeli, genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanır. Adsorplanan maddenin miktarı, tüm bölgelerdeki adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izotermi geri dönüşümlü adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabakanın oluşumu ile sınırlanır (Proctor ve Toro-Vazquez, 1996).

$$q_{eq} = K_f \cdot (C_{eq})^{1/n}$$

Eşitlik 4.5

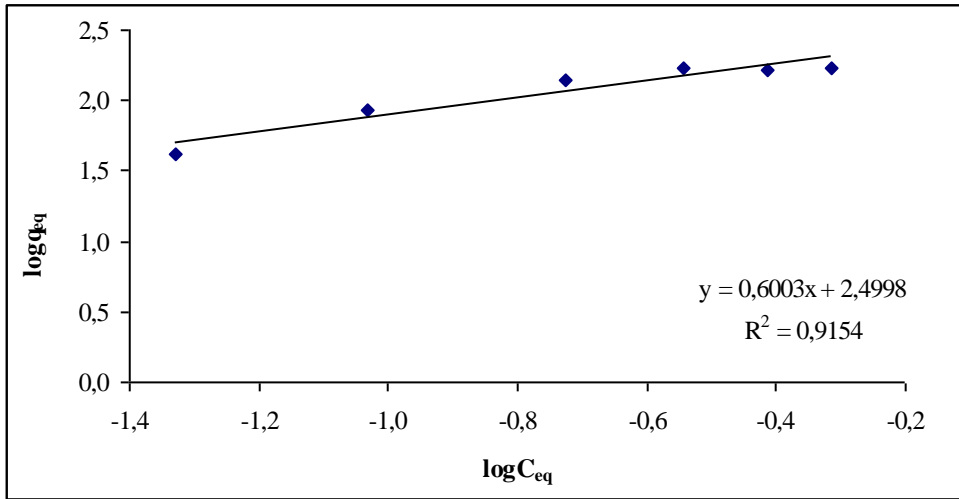
Burada q_{eq} , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı (mg/g); C_{eq} , çözültideki alkol dehidrogenazın denge

derişimi (mg/mL); K_f , adsorbanın bağılı adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g); $1/n$, adsorpsiyon şiddeti sabitidir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir:

$$\log q_{eq} = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{eq} \quad \text{Eşitlik 4.6}$$

$\log C_{eq}$ 'e karşı $\log q_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun eğimi $1/n$ 'i, kesimi $\log K_f$ 'yi verir (Uygun, 2008).

Şekil 4.14'de Reaktif Green 19 bağılı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğiminden $1/n$ değeri 0,6003 ve kesiminden ise K_f değeri 316,08 mg/g olarak bulunmuştur. $1/n$ değerinin 1'den küçük olması adsorpsiyonun istemliliğini göstermektedir.

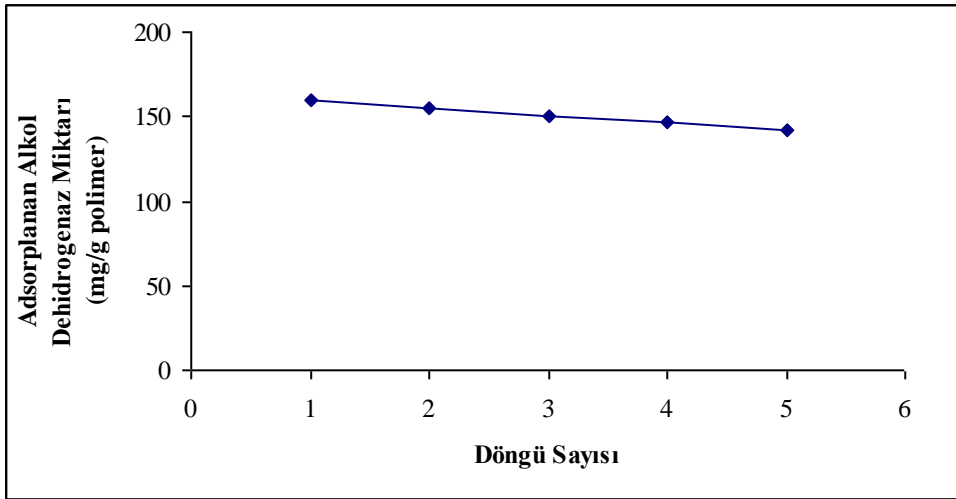


Şekil 4.14. Reaktif Green 19 bağılı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi. pH: 7,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'deki adsorpsiyon izotermi grafiklerinin korelasyon katsayıları (0,9573; 0,9154) karşılaştırıldığında deneysel verilerin Langmuir adsorpsiyon izotermine uygunluğu görülmektedir.

4.2.6. Reaktif Green 19 Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinden Alkol Dehidrogenaz Enziminin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Destek materyali seçiminde dikkat edilecek önemli hususlardan birisi desteğin defalarca kullanılabilir olmasıdır. Bu çalışmada sentezlenen desteğin tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için alkol dehidrogenaz enziminin Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarına adsorpsiyon ve ardından desorpsiyon işlemleri 5 döngü boyunca tekrar edilmiştir. Desorpsiyon oranı % 98,4 olarak bulunmuştur. Şekil 4.15’de görüldüğü gibi 5 döngü boyunca adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.



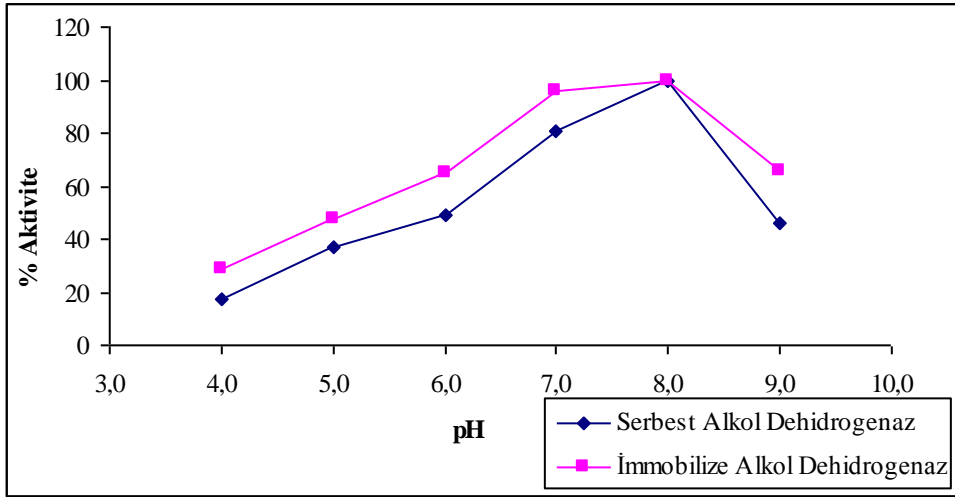
Şekil 4.15. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu için tekrar kullanılabilirliği. pH: 7,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

4.3. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Ölçümü

4.3.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine pH’ın etkisi pH 4,0-9,0 aralığında incelenmiştir. Aktivite ölçümleri fenilglioksilik asit substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alkol dehidrogenaz enzimleri kaynağına ve aktivite ölçümlerinde kullanılan substrata bağlı olarak farklı optimum pH değerleri

gösterir. Zhou vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada fenilglioksilik asit substratı kullanılarak *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin optimum pH'ı 6,8 olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada ise hem serbest hem de immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin optimum pH'ı 8,0 olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonla enzimin optimum pH'ı değişmezken, immobilize enzimin pH 7,0-8,0 aralığında serbest enzime göre daha kararlı bir yapı gösterdiği bulunmuştur.

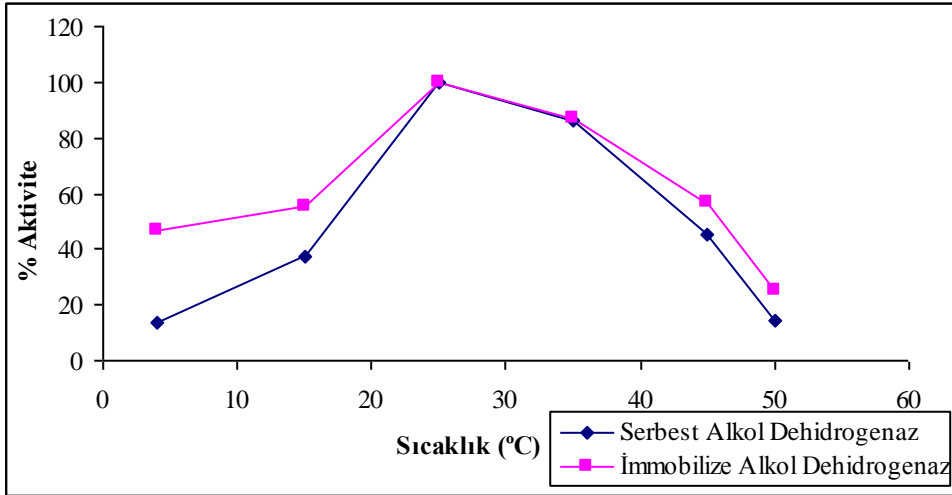


Şekil 4.16. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'ın etkisi

4.3.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi 4-50 °C arasında 6 farklı sıcaklıkta incelenmiştir. Şekil 4.17'den immobilize enzimin serbest enzime göre düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivitesinin biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Hem serbest hem de immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin sıcaklığı 25 °C bulunmuştur. Enzimler bir desteğe immobilize edildiklerinde genellikle optimum sıcaklık değeri yükselir ve bu endüstriyel olarak bazı avantajlar sunar. Ancak bu çalışmada immobilizasyonla optimum sıcaklık değişmemiştir. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enzimi için yakın bir optimum sıcaklık değeri Li vd. (2010) tarafından rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar hem

serbest hem de immobilize alkol dehidrogenaz için optimum sıcaklık değerini 30 °C olarak rapor etmişlerdir.



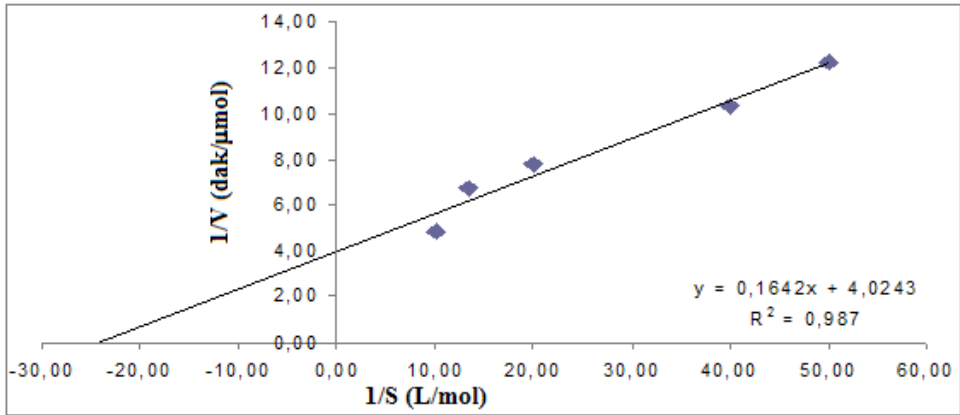
Şekil 4.17. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.3.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

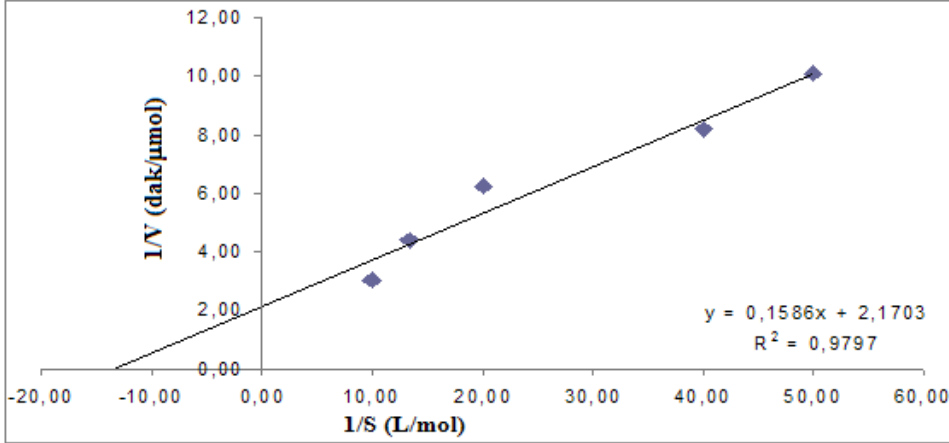
Enzim katalizinde bir enzimin kinetik parametrelerini belirlemek o enzimin etkinliğinin ifadesi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin kinetik sabitleri olan Michaelis sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) fenilglioksilik asit substratı kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.18'de ve Şekil 4.19'da serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri, Çizelge 4.1'de ise bu grafikler kullanılarak tespit edilen kinetik sabitler görülmektedir.

Enzimler bir desteğe immobilize edildiklerinde desteğin tabiatı, sistemin heterojenliği ve substratın enzime ulaşılabilirliği gibi faktörlerden dolayı kinetiği farklıdır. Yapılan bu çalışmada serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin K_m değerleri sırasıyla 0,040 ve 0,073 mol/L olarak bulunmuştur. K_m değeri bir enzimin substratına olan ilgisi olarak bilinir (Park vd., 2005) ve immobilizasyondan sonra genellikle K_m 'de bir artış beklenir. Bu çalışmada da benzer bir durum yani K_m değerinde bir artış yani immobilize alkol dehidrogenaz

enziminin substrata ilgisinin azalması görülmektedir. V_{max} , enzimin tümü substratına doygun olduğundaki olası en yüksek hızdır ve bu parametre immobilize enzimin gerçek özelliklerini yansıtır, fakat difüzyonel sınırlamalardan etkilenir (Reshmi vd., 2007). Bu çalışmada immobilize alkol dehidrogenazın V_{max} değeri (0,460 $\mu\text{mol/dak}$), serbest alkol dehidrogenazın V_{max} değerinden (0,249 $\mu\text{mol/dak}$) daha yüksek bulunmuştur. İmmobilizasyonla enzimlerin maksimum hızlarının artabileceği Pahujani vd. (2008) tarafından yapılan bir lipaz immobilizasyonu çalışması ile de gösterilmiştir. Ancak bir enzimin immobilizasyonla davranışını tahmin etmede k_{cat} değeri (turnover sayısı), V_{max} ve K_m değerlerinden daha yararlıdır. Bu çalışmada elde edilen k_{cat} değerleri serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için incelendiğinde serbest alkol dehidrogenaz enziminin k_{cat} değeri 1402 dak^{-1} iken immobilize alkol dehidrogenaz enziminin k_{cat} değeri 736 dak^{-1} olarak hesaplanmıştır. k_{cat} değerindeki bu düşüş, enzimin birim zamanda ürüne çevirdiği molekül sayısında azalma olduğunu göstermektedir. Bu durum immobilize enzimler için genellikle beklenen bir durumdur.



Şekil 4.18. Serbest alkol dehidrogenaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

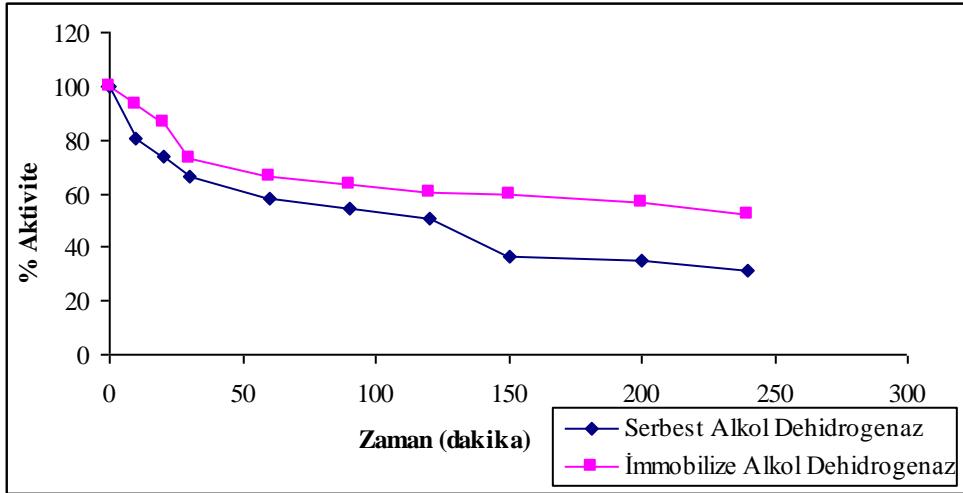
Çizelge 4.1. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize alkol dehidrogenaz için kinetik sabitler

Enzim	K_m (mol/L)	V_{max} (μmol/dak)	k_{cat} (dak ⁻¹)
Serbest alkol dehidrogenaz	0,040	0,249	1402
İmmobilize alkol dehidrogenaz	0,073	0,460	736

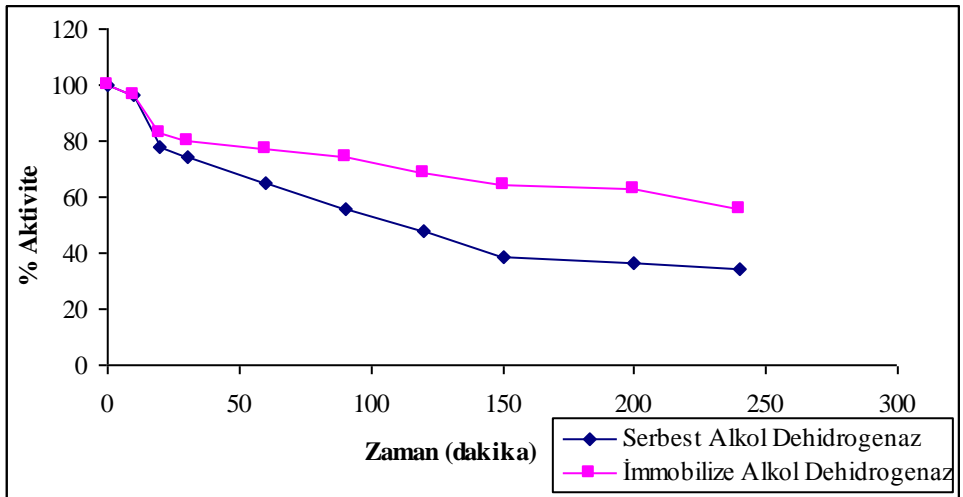
4.3.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de görülmektedir. 35 °C’de 240 dakika boyunca ısıyla muamele edildikten sonra serbest alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 31’ini korurken, immobilize alkol dehidrogenaz % 52’sini korumuştur. 45 °C’de ise serbest alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 34’ini korurken, immobilize alkol dehidrogenaz % 56’sini korumuştur. Bu sonuçlar immobilize alkol dehidrogenazın serbest alkol dehidrogenaza göre ısıl kararlılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin immobilizasyonla ısıl kararlılığının arttığı Zhou vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir. Endüstride işlemlerin çoğu oda sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Genellikle immobilizasyon yüksek

sıcaklıklarda enzimin kararlılığını artırır ve bu immobilize enzimleri endüstriyel olarak daha yararlı ve ekonomik kılar.



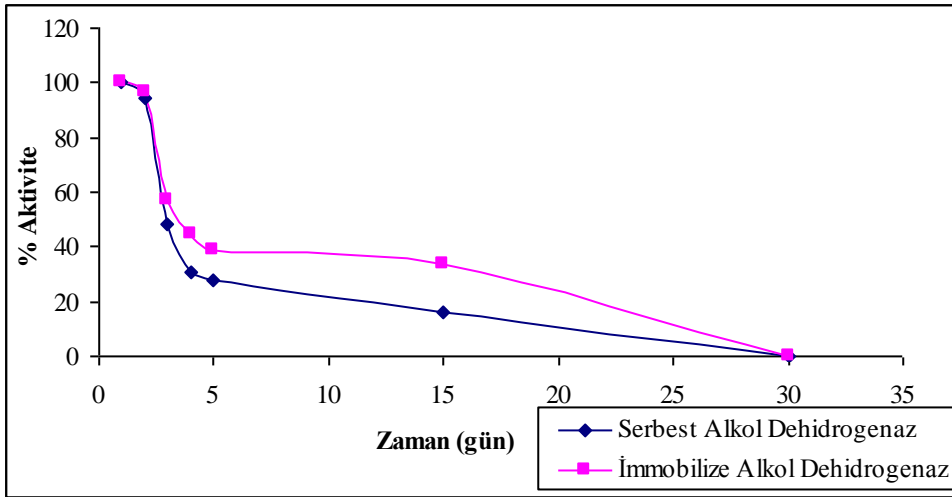
Şekil 4.20. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesinin 35 °C'de zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 4.21. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz aktivitesinin 45 °C'de zamana bağlı olarak değişimi

4.3.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin 4 °C'de 30 gün boyunca saklanmış ve aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelenmiştir. Serbest alkol dehidrogenaz 15. günün sonunda aktivitesinin % 16'sını korurken immobilize alkol dehidrogenaz % 34'ünü korumuştur (Şekil 4.22). Boya bağlı nanoyapılara immobilize edilmiş *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin serbest enzime göre zamana bağlı olarak aktivitesindeki azalma daha yavaştır. Bu sonuçlardan immobilize enzimin serbest enzime göre daha iyi depo kararlılığına sahip olduğu söylenebilir.

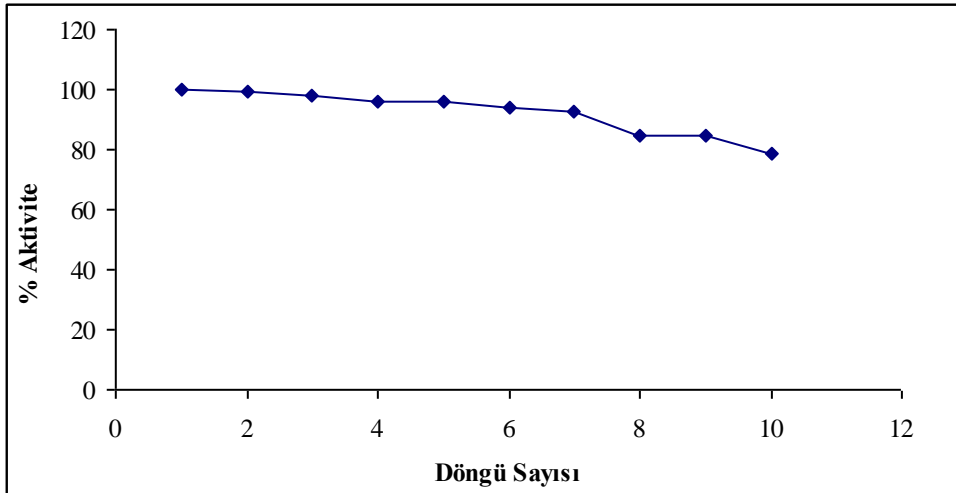


Şekil 4.22. Serbest ve Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz enzimlerinin depo kararlılığı. Sıcaklık 4 °C

4.3.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize enzimlerin işlemsel kararlılığı, seçilen taşıyıcının ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Bu çalışmada immobilize alkol dehidrogenaz enziminin 25 °C'de ard arda aktivite ölçümü yapılarak işlemsel kararlılığı incelenmiştir. İmmobilize alkol dehidrogenaz enzimi 10 döngüden sonra aktivitesinin % 79'unu korumuştur (Şekil 4.23). Aktivitedeki bu hafif düşüş, kullanımlar sırasında meydana gelen alkol dehidrogenaz inaktivasyonundan

kaynaklanabilir. 10 döngü sonunda elde edilen sonuç immobilize alkol dehidrogenazın işlemsel kararlılığının yüksek olduğunu göstermiştir. Zhou vd. (2010) tarafından manyetik nanoyapılara *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada immobilize alkol dehidrogenaz enziminin 6 kullanım sonundaki aktivitesi % 39 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.23. Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz enziminin işlemsel kararlılığı

4.4. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

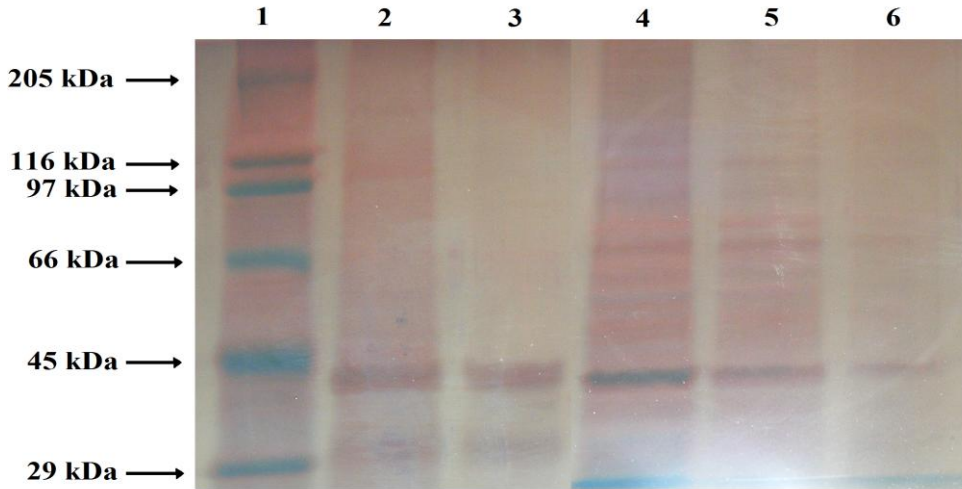
Bu çalışmada öncelikle alkol dehidrogenaz enziminin boya bağlı manyetik nanoyapılara adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşulları araştırılmıştır. Daha sonra boya bağlı manyetik nanoyapılar kullanılarak *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan saflaştırma işlemleri sonunda 1/10'luk seyreltme ile hazırlanan maya örneğinden alkol dehidrogenaz enzimi % 71,26 aktivite verimi ile 45,63 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.2). Enzimin saflığını göstermek için SDS-PAGE gerçekleştirilmiş ve ardından jel gümüş ile boyanmıştır. Gümüş boyama ile maya örneğinden elde edilen alkol dehidrogenaz enziminin varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.24). Maya kaynaklı alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. van Iersel vd. (1997), *S. cerevisiae* var. *uvarum* W34'ten NADP⁺ bağımlı uzun ve dallanmış substrat özgülüğü gösteren alkol dehidrogenaz enzimini Q-Sepharoz, fenil Sepharoz ve Red Agaroz desteklerini kullanarak

saflaştırmışlardır. Bu araştırmacılar Q-Sepharoz ile alkol dehidrogenaz enziminin % 62 verim ile 43 kat saflaştırıldığını rapor etmişlerdir. Willoughby vd. (1999) maya alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmak için immobilize metal afinite kromatografisini kullanmışlardır. Onlar farklı elüsyon tamponlarını kullanmışlar ve alkol dehidrogenaz enzimini % 78 verimle 8 kat saflaştırmışlardır. Zhang vd. (2000) tarafından maya alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, katyonik surfaktanlarla oluşturulmuş ters misel yapıları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar saflaştırma işlemleri sonucunda alkol dehidrogenaz enzimini % 90'ın üzerinde aktivite verimi ile 3 kat saflaştırılmış olarak elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Hidayat vd. (2003), boya-metal afinite ayırımı ile mayadan alkol dehidrogenaz enzimini % 76 verim ile 8 kat saflaştırmışlardır. Mondal vd. (2003), Cibacron Blue 3GA-κ-karragenan konjugatı ile mayadan alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmışlardır. Elde edilen enzimin % 58 verim ile 13 kat saflaştırıldığını ifade etmişlerdir. Madhusudhan vd. (2008) sulu ikili faz ekstraksiyonu yöntemiyle mayadan alkol dehidrogenaz enzimini % 93 aktivite verimi ile 6,6 kat saflaştırabilmişlerdir.

Yukarıda tartışması yapılan literatür sonuçları da dikkate alındığında bu tezde hazırlanan Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) nanoyapılarının, *S. cerevisiae*'den alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmada oldukça iyi bir destek materyali olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Maya alkol dehidrogenaz enziminin Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) ile saflaştırılması

Saflaştırma Adımı	Total Protein (mg)	Aktivite (Unite)	Spesifik Aktivite (Unite/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
1/10 oranında seyreltilmiş maya	1,47	0,268	0,182	100	1
Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) ile saflaştırılan alkol dehidrogenaz	0,023	0,191	8,304	71,26	45,63



Şekil 4.24. Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin gümüşle boyanmış SDS-PAGE analizi. 1: standartlar; 2 ve 3: ticari alkol dehidrogenaz; 4 ve 5: 1/10 oranında seyreltilmiş maya; 6: *S. cerevisiae*'den saflaştırılmış alkol dehidrogenaz

5. SONUÇ

- ❖ Bu çalışmada, alkol dehidrogenaz enziminin immobilizasyonu ve saflaştırılması için yeni bir destek materyali olarak Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimeri emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir.
- ❖ Reaktif Green 19 boyasının mag-nano-p(HEMA) polimerik yapısına katıldığı FTIR spektrumları alınarak gösterilmiştir.
- ❖ Sentezlenen nanoyapıların manyetik özellik kazandığı ESR ölçümleri ile saptanmıştır.
- ❖ SEM ve AFM fotoğrafları ile sentezlenen yapıların küresel yapıda, 70 nm çapında ve eş boyutlarda olduğu gözlenmiştir.
- ❖ Sentezlenen polimerik yapıya katılan Reaktif Green 19 boyasının miktarı SEM'da EDX analizi ile değerlendirilmiş ve 63,5 µmol/g polimer olarak hesaplanmıştır.
- ❖ Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu farklı pH çözeltilerinde (pH 4,0-5,0 asetat tamponu; 6,0-8,0 fosfat tamponu; 9,0 karbonat tamponu; 100 mM) incelenmiş ve maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 0,5 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde ve pH 7,0 fosfat tamponunda 176,09 mg/g polimer olarak bulunmuştur.
- ❖ Mag-nano-p(HEMA) polimerine non-spesifik alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 17,29 mg/g polimer olarak belirlenmiştir.
- ❖ Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-50 °C aralığında incelenmiş ve sıcaklık artışı ile adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarının da arttığı görülmüştür. 25 °C'de adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı 176,09 mg/g polimer iken 50 °C'de bu değer 244,15 mg/g polimer olarak bulunmuştur.
- ❖ Reaktif Green 19 bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi farklı derişimlerdeki NaCl çözeltileri

kullanılarak incelenmiş ve tuz derişiminin artmasıyla adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarının azaldığı gözlenmiştir.

- ❖ Reaktif Green 19 bağı mag-nano-p(HEMA) polimerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelendiğinde, Langmuir adsorpsiyon izoterminin bu boya afinite adsorpsiyon sistemine uygun olduğu görülmüştür.
- ❖ Reaktif Green 19 bağı mag-nano-p(HEMA) polimerinden alkol dehidrogenazın desorpsiyonu, desorpsiyon ajanı olarak 1,0 M'lık NaCl çözeltisi kullanılarak araştırılmıştır. Desorpsiyon oranı % 98,4 olarak bulunmuş ve 5 adsorpsiyon-desorpsiyon adımından sonra adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.
- ❖ Gerçekleştirilen bu tez çalışması Reaktif Green 19 bağı mag-nano-p(HEMA) polimeri kullanılarak alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin bir çalışma olmakla birlikte aynı zamanda bir immobilizasyon çalışmasıdır. Bu sebeple serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerine ortam koşullarının etkisi incelenmiştir.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'ın etkisi incelenerek hem serbest hem de immobilize alkol dehidrogenaz için optimum pH 8,0 olarak tespit edilmiştir.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 4-50 °C aralığında araştırılmıştır. Hem serbest hem de immobilize alkol dehidrogenaz için optimum sıcaklık 25 °C olarak bulunmuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine substrat derişiminin etkisi incelenerek kinetik sabitler saptanmıştır. Immobilize alkol dehidrogenazın V_{max} değeri (0,460 $\mu\text{mol/dak}$), serbest alkol dehidrogenazın V_{max} değerinden (0,249 $\mu\text{mol/dak}$) daha yüksek bulunmuştur. Immobilize alkol dehidrogenazın K_m değeri (0,073 mol/L) serbest alkol dehidrogenazın K_m değerinden (0,040 mol/L) daha yüksek bulunmuştur. Serbest alkol dehidrogenaz enziminin k_{cat} değeri 1402 dak^{-1} iken immobilize alkol dehidrogenaz enziminin k_{cat} değeri 736 dak^{-1} olarak hesaplanmıştır.

- ❖ Reaktif Green 19 bağı mag-nano-p(HEMA) polimerine immobilize alkol dehidrogenazın sıcaklıkla aktivitesindeki azalma oranının serbest alkol dehidrogenaza göre daha düşük olduğu bulunmuştur. 35 °C’de 240 dakika sonunda serbest alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 31’ini korurken immobilize alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 52’sini korumuştur. 45 °C’de 240 dakika sonunda serbest alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 34’ini korurken immobilize alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 56’sini korumuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin depo kararlılıkları 15 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak değerlendirilmiştir. Serbest alkol dehidrogenaz enzimi 15 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 16’sını korurken immobilize alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 34’ünü korumuştur.
- ❖ İmmobilize alkol dehidrogenaz enziminin işlemsel kararlılığı 10 döngü boyunca aktivite ölçümleri ile incelenmiştir. İmmobilize alkol dehidrogenaz enzimi 10 döngüden sonra başlangıç aktivitesinin % 79’ünü korumuştur.
- ❖ Sentezlenen polimer *S. cerevisiae*’den alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Saflaştırma işlemlerinin sonunda alkol dehidrogenaz enziminin aktivite geri kazanımı % 71,26 ve saflaştırma katsayısı 45,63 olarak bulunmuştur. Enzimin saflığı SDS-PAGE ve ardından gümüş boyama işlemi ile gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında endüstriyel önemi olan alkol dehidrogenaz enziminin boya ligand afinite kromatografisi ile *S. cerevisiae*’den saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Boya ligandı olarak Reaktif Green 19 ve destek materyali olarak manyetik nanoyapılar kullanılmıştır. Boya ligandları ucuz, kararlı ve proteine spesifik olarak bağlanabilen yapılardır. Manyetik nanoyapılar ise yüksek spesifik alanları nedeniyle proteinlerin saflaştırılmasında son derece önemli destek materyalleridir. Bu tez çalışmasında *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında Reaktif Green 19 boyasının iyi bir afinite ligandı ve sentezlenen manyetik nanoyapıların iyi bir destek materyali olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın geniş skalalı işlemlere de uygulanabileceği ve literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alagöz, D. 2007. β -Galaktozidaz ve glukoz izomerazın Eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin laktöz hidrolizi ve glukoz izomerizasyonunda kullanılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Arat, Ö. 2007. *Aspergillus flavus* HBF34'ün glucoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Arıca, M.Y., Bayramoğlu, G. 2005. Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. **Process Biochemistry**, 40: 1433-1442.
- Arıca, M.Y., Yılmaz, M., Yalçın, E., Bayramoğlu, G. 2004. Affinity membrane chromatography: relationship of dye-ligand type to surface polarity and their effect on lysozyme separation and purification. **Journal of Chromatography B**, 805: 315-323.
- Bayramoğlu, G., Oktem, H.A., Arıca, M.Y. 2007. A dye-ligand immobilized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membrane used for adsorption and isolation of immunoglobulin G. **Biochemical Engineering Journal**, 34: 147-155.
- Bayramoğlu, G., Arıca, M.Y. 2002. Procion Green H-4G immobilized on a new IPN hydrogel membrane composed of poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/chitosan: preparation and its application to the adsorption of lysozyme. **Colloids and Surfaces A**, 202: 41-52.
- Bolivar, J.M., Wilson, L., Ferrarotti, S.A., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C. 2006. Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose. **Journal of Biotechnology**, 125: 85-94.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-251.
- Brena, B.M., Batista-Viera, F. 2006. Immobilization of enzymes. In: Immobilization of enzymes and cells (Guisan, J.M., Eds.), Humana Pres Inc., pp. 15-30, Totowa, New Jersey.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B. 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 61: 636-643.

- De Smidt, O., Du Preez, J.C., Albertyn, J. 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. **FEMS Yeast Research**, 8: 967-978.
- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A. 2007. Poly(acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. **Journal of Applied Polymer Science**, 105: 1808-1816.
- Denizli, A., Pişkin, E. 2001. Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 49: 391-416.
- Fisichella, S., Alberghina, G., Amato, M.E., Fichera, M., Palermo, A., Pogna, N.E., Savarino, A. 2002. Purification of wheat flour high-M_r glutenin subunits by dye-ligand chromatography. **Journal of Cereal Science**, 36: 103-113.
- Garcia-Diego, C., Cuellar, J. 2008. Preparation and characterization of a dye-ligand adsorbent for lysozyme adsorption. **Chemical Engineering Journal**, 143: 337-348.
- Hidayat, C., Nakajima, M., Takagi, M., Yoshida, T. 2003. Development of new dye-metal agarose-coated alumina matrix and elution strategy for purification of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95: 133-138.
- Hirano, J-I., Miyamoto, K., Ohta, H. 2005. Purification and characterization of the alcohol dehydrogenase with a broad substrate specificity originated from 2-phenylethanol-assimilating *Brevibacterium* sp. KU 1309. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 100: 318-322.
- Iannucci, N.B., Del Cañizo, A.A.N., Cascone, O. 2003. Purification of neutral protease by dye affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 104: 173-183.
- Keçili, R. 2006. Antipirin bazlı monolitik kolon geliştirilmesi ve penisilin amidohidrolaz enzimi ayrılmasında kullanımı. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Kim, J., Grate, J.W., Wang, P. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, 61: 1017-1026.
- Kuroiwa, T., Noguchi, Y., Nakajima, M., Sato, S., Mukataka, S., Ichikawa, S. 2008. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylase-coated magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry**, 43: 62-69.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 277: 680-685.
- Leskovac, V., Trivić, S., Peričin, D. 2002. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 2: 481-494.
- Li, G.Y., Huang, K.L., Jiang, Y.R., Yang, D.L., Ding, P. 2008. Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 42: 405-412.
- Li, G-Y., Zhou, Z-D., Li, Y-J., Huang, K-L., Zhong, M. 2010. Surface functionalization of chitosan-coated magnetic nanoparticles for covalent immobilization of yeast alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 322: 3862-3868.
- Liu, S., Cai, C. 2007. Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 602: 103-114.
- Lowe, C.R., Hans, M., Spibey, N., Drabble, W.T. 1980. The purification of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* by affinity chromatography on immobilized Procion dyes. **Analytical Biochemistry**, 104: 23-28.
- Ma, Z-Y., Guan, Y-P., Liu, H-Z. 2006. Affinity adsorption of albumin on Cibacron Blue F3GA-coupled non-porous micrometer-sized magnetic polymer microspheres. **Reactive & Functional Polymers**, 66: 618-624.
- Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., Nene, S. 2008. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction. **Biochemical Engineering Journal**, 38: 414-420.
- Madoery, R., Minchiotti, M. 2006. Cibacron Blue-Eupergit, an affinity matrix for soybean (*Glycine max*) phospholipase A₂ purification. **Enzyme and Microbial Technology**, 38: 869-872.
- Mandal, M., Kundu, S., Ghosh, S.K., Panigrahi, S., Sau, T.K., Yusuf, S.M., Pal, T. 2005. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell. **Journal of Colloid and Interface Science**, 286: 187-194.

- Mohann, D., Pittman, C.U. Jr., Steele, P.H. 2006. Single, binary and multi-component adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin-a biosorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, 297: 489-504.
- Mondal, K., Roy, I., Gupta, M.N. 2003. κ -Carrageenan as a carrier in affinity precipitation of yeast alcohol dehydrogenase. **Protein Expression & Purification**, 32: 151-160.
- Negoro, M., Wakabayashi, I. 2004. New simple method for purification of class I alcohol dehydrogenase. **Alcohol & Alcoholism**, 39: 178-182.
- Okoli, C., Boutonnet, M., Mariey, L., Järås, S., Rajarao, G. 2011. Application of magnetic iron oxide nanoparticles prepared from microemulsions for protein purification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 86: 1386-1393.
- Ouyang, A., Bennett, P., Zhang, A., Yang, S-T. 2007. Affinity chromatographic separation of secreted alkaline phosphatase and glucoamylase using reactive dyes. **Process Biochemistry**, 42: 561-569.
- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R. 2008. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. **Bioresource Technology**, 99: 2566-2570.
- Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I.S., Kim, W.S. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. **Process Biochemistry**, 40: 53-61.
- Plapp, B.V., Ganzhorn, A.J., Gould, R.M., Green, D.W., Jacobi, T., Warth, E., Kratzer, D.A. 1990. Catalysis by yeast alcohol dehydrogenase. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 3* (Weiner, H., Wermuth, B. and Crabb, D.V., Eds.), Plenum Pres, pp. 241-251, New York.
- Proctor, A., Toro-Vazquez, I.F. 1996. The Freundlich isotherm in studying adsorption in oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 73: 1627-1633.
- Raghava, S., Gupta, M.N. 2010. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase with an unusual specificity towards glycerol from *Thermus thermophilus*. **Bioresource Technology**, 101: 2554-2557.

- Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S. 2007. Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. **Catalysis Communications**, 8: 393-399.
- Robty, J.F., White, B.J. 1987. Electrophoretic techniques. In: Biochemical techniques: theory and practice. Waveland Pres Inc., pp 131-157.
- Roschlau, P., Hess, B. 1972. Affinity chromatography of yeast pyruvate kinase with Cibacron blue bound to Sephadex G-200. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, 353: 441-443.
- Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M., Denizli, A. 2006. Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 45: 3036-3043.
- Shentu, J., Wu, J., Song, W., Jia, Z. 2005. Chitosan microspheres as immobilized dye affinity support for catalase adsorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, 37: 42-46.
- Shibusawa, Y., Fujiwara, T., Shindo, H., Ito, Y. 2004. Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye-ligand affinity counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, 799: 239-244.
- Tischer, W., Kasche, V. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers. **Trends in Biotechnology**, 17: 326-335.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I. 1966. Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. **Enzymologia**, 31: 214-224.
- Trivedi, A., Heinemann, M., Spiess, A.C., Dausmann, T., Büchs, J. 2005. Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 99: 340-347.
- Uygun, D.A. 2008. Protein saflaştırılması için magnetik nano yapıların hazırlanması ve karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Uygun, D.A., Karagözler, A.A., Akgöl, S., Denizli, A. 2009. Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation. **Materials Science and Engineering: C**, 29: 2165-2173.
- Vallee, B.L., Hoch, F.L. 1955. Zinc: A component of yeast alcohol dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 41: 327-338.

- van Iersel, M.F.M., Eppink, M.H.M., van Berkel, W.J.H., Rombouts, F.M., Abee, T. 1997. Purification and characterization of a novel NADP-dependent branched-chain alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 4079-4082.
- Walker, J.M. 2002. Quantification of radiolabeled proteins in polyacrylamide gels. In: *The Protein Protocols Handbook* (Springer, W.R., Eds.), Humana Press Inc., pp. 231-235, Totowa, New Jersey.
- Wang, J., Peng, X., Liu, D., Bao, Y., An, L. 2006. Synthesis of new 'biomimetic' dye-ligands and their application in the purification of alkaline phosphatase. **Separation and Purification Technology**, 50: 141-146.
- Willoughby, N.A., Kirschner, T., Smith, M.P., Hjorth, R., Titchener-Hooker, N.J. 1999. Immobilised metal ion affinity chromatography for purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast using an expanded bed adsorption system. **Journal of Chromatography A**, 840: 195-204.
- Wolman, F.J., Maglio, D.G., Grasselli, M., Cascone, O. 2007. One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography. **Journal of Membrane Science**, 288: 132-138.
- Xu, S., Lu, Y., Jiang, Z., Wu, H. 2006. Silica nanotubes-doped alginate gel for yeast alcohol dehydrogenase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 43: 68-73.
- Yavuz, H., Akgöl, S., Say, R., Denizli, A. 2006. Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, 39: 303-309.
- Yavuz, H., Duru, E., Genç, Ö., Denizli, A. 2003. Cibacron Blue F3GA incorporated poly(methyl methacrylate) beads for albumin adsorption in batch system. **Colloids and Surfaces A**, 223: 185-193.
- Zhang, J., Zhang, Z., Song, Y., Cai, H. 2006. Bovine serum albumin (BSA) adsorption with Cibacron Blue F3GA attached chitosan microspheres. **Reactive and Functional Polymers**, 66: 916-923.
- Zhang, T-X., Liu, H-Z., Chen, J-Y. 2000. Extraction of yeast alcohol dehydrogenase using reversed micelles formed with CTAB. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 75: 798-802.
- Zhou, Z-D., Li, G-Y., Li, Y-J. 2010. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, 47: 21-26.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nazife KAYA
Doğum Yeri ve Tarihi : MUĞLA/1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Makaleler
-SCI
-Diğer
- b) Bildiriler
-Uluslar arası

1. Karadağ, E., Kaya, N., Kundakçı, S., Üzüm, Ö. B. 2011. Investigation of sorption/swelling characteristics of highly swollen AAm/AMPS/PEG composite hydrogels as biopotential sorbent. In: **Second International Symposium: Frontiers in Polymer Science** (29-31 Mayıs 2011), Lyon, Fransa.

c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : -

İLETİŞİM

E-posta Adresi : nazfe_kaya48@hotmail.com
Tarih : 01.03.2012