

ÖZ

Bu çalışmada, destek materyali olarak poli(2-hidroksietil metakrilat-metakriolil amidofenilalanin [P(HEMA-MAPA)] nanopartikülleri kullanıldı. MAPA komonomeri, ligand olarak yapısına girdiği P(HEMA) nanopartiküllerine hidrofobik özellik kazandırdı ve metakroil klorür ile fenilalaninin uygun koşullarda tepkimeye girmeleri sonucu elde edildi. P(HEMA) ise temel taşıyıcı katı destek olarak seçildi. 158 nm boyutundaki P(HEMA-MAPA) nanopartikülleri; HEMA ve MAPA monomerlerinin emülsiyon polimerizasyonu ile üretildi. Nanopartiküllerin 1874.5 m²/g spesifik yüzey alanına sahip olduğu bulundu ve elementel analiz ve Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), yöntemleri ile karakterize edildi. Sentezlenip karakterize edilen bu nanopartiküller lipaz immobilizasyonu için kullanıldı. Adsorpsiyon deneyleri, farklı ortam koşullarında (pH, başlangıç derişimi, sıcaklık gibi) kesikli deney sisteminde incelendi. Nano-P(HEMA) ve P(HEMA-MAPA) nano yapılarının lipaz adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 1.2 mg/g ve 329.9 mg/g bulundu. Bunlara ek olarak immobilizasyon şartlarının optimizasyonu çalışmaları da (optum pH, sıcaklık, ısı kararlılık, depo kararlılığı gibi) gerçekleştirildi. İmmobilize enzimin kinetik parametreleri (V_{max} , K_m) tespit edilerek, serbest enziminkiyle karşılaştırıldı. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlandı ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmeden lipaz adsorpsiyonunda kullanılabilir olduğu bulundu.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nanobiyoteknoloji, Nanopartiküller, Lipaz, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, İmmobilizasyon

ABSTRACT

In this study, poly(2-hydroxyethyl methacrylate) P(HEMA) nanoparticles carrying methacryloylamidophenylalanine (MAPA) ligand, as a comonomer, providing hydrophobic functionality to the adsorbent were prepared. MAPA was synthesized by reacting methacryloyl chloride with phenylalanine. We selected P(HEMA) as the basic solid matrix. Nanospheres with an average size of 158 nm were obtained by emulsion polymerization of P(HEMA) and MAPA. The nanoparticles had a specific surface area of 1874.5 m²/g, and were characterized by elemental analysis and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Nanospheres which synthesized and characterized were used for the lipase immobilization. Adsorption experiments were investigated under different medium conditions (i.e., medium pH, initial concentration, temperature) in a batch system. Lipase adsorption capacity of P(HEMA) and P(HEMA-MAPA) beads

were 1.2 mg/g and 329.9 mg/g respectively. In addition to these, studies of optimization of the immobilization conditions were obtained. Kinetic parameters (V_{max} , K_m) of the immobilized enzyme are determined and compared to the kinetic parameters that of free enzyme. It was observed that lipase after 5 adsorption-desorption cycle, P(HEMA-MAPA) nanoparticles can be used without significant loss in lipase adsorption capacity.

KEY WORDS: Nanobiotechnology, Nanoparticles, Lipase, Hydrophobic Interaction Chromatography, Immobilization.

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1. Biyolojik ve tıbbi alanlarda kullanılmak üzere nanomateyalleri geliştiren şirketler.....	10
Çizelge 1.2. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri.....	18
Çizelge 1.3. İmmobilizasyon yönteminin karşılaştırılması.....	20
Çizelge 1.4. İmmobilizasyon yöntemi, taşıyıcı ve reaktör seçimini etkileyen faktörler.....	20
Çizelge 1.5. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	22
Çizelge 1.6. Protein zincirinde bulunan reaktif gruplar.....	23
Çizelge 1.7. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	33
Çizelge 1.8. Afinite Kromatografisindeki Biyolojik İlişkilere Örnekler	37
Çizelge 1.9. Afinite Kromatografisinin Alt Dalları.....	45
Çizelge 1.10. Aminoasitler için hidrofobisite ölçeği.....	48
Çizelge 1.11. Çeşitli tuzların molal yüzey tansiyon (σ) değerleri	52
Çizelge 3.1. 158 nm (Polidispersite: 0.17) boyutundaki nanoyapıların hazırlanma reçetesi ve polimerizasyon koşulları.....	64
Çizelge 4.1. İmmobilize ve serbest Lipaz için kinetik parametreler.....	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Nanoölçek	1
Şekil 1.2. Tıbbi ve biyolojik problemlerde nanobiyomateryallerden yararlanılan uygulamalar.....	6
Şekil 1.3. Enzimlerin kovalent bağlandığı 130 nm çapındaki polistiren nanofiberleri.....	13
Şekil 1.4. Tek enzim nanopartikül (SEN) yaklaşımının enzim enkapsülasyonu ve modifikasyonu yaklaşımları ile şematik olarak karşılaştırılması.....	15
Şekil 1.5. SEN-CT'nin TEM görüntüleri.....	16
Şekil 1.6. SEN'lerin nanogözenekli silikaya immobilizasyonu	16
Şekil 1.7. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	18
Şekil 1.8. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi.....	21
Şekil 1.9. Çapraz bağlı poliakrilamid matriksinde enzim tutuklanması.....	25
Şekil 1.10. Çapraz bağlı poliakrilamid matriksinde enzim tutuklanması.....	26
Şekil 1.11. Sürfaktan moleküllerinden oluşan miseller.....	28
Şekil 1.12. Şişmiş misel yapısı	29
Şekil 1.13. Persülfat iyonlarının iki sülfat serbest radikale dönüşümü.....	29
Şekil 1.14. Oligomer oluşturmak üzere sülfat serbest radikallerinin monomer molekülleriyle tepkimesi.....	30
Şekil 1.15. İki serbest radikalın etkileşmesiyle gerçekleşen polimerizasyon.....	30
Şekil 1.16. Eş boyutlu polimer partikülleri.....	31
Şekil 1.17. Afinite kromatografisindeki temel basamakların şematik gösterimi.....	38
Şekil 1.18. Ligandların aktive edilmiş taşıyıcılara immobilizasyonları.....	44

Şekil 1.19. HIC için bazı ligandların yapılarının şematik olarak gösterilmesi.....	51
Şekil 3.1. P(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan emülsiyon polimerizasyonun şematik gösterimi.....	63
Şekil 4.1. Nanopartiküllerin standart kütle-hacim grafiği.....	71
Şekil 4.2. P(HEMA-MAPA) nanoyapılarının olası molekül formülü.....	73
Şekil 4.3. P(HEMA-MAPA) nanoyapılarının FTIR spektrumu.....	74
Şekil 4.4. P(HEMA) nanoyapılarının FTIR spektrumu.....	74
Şekil 4.5. P(HEMA-MAPA) nanoyapılarının zeta-boyut analizi.....	75
Şekil 4.6. Lipaz adsorpsiyonuna lipaz başlangıç derişiminin etkisi.....	77
Şekil 4.7. Lipaz adsorpsiyonuna pH etkisi.....	78
Şekil 4.8. Sıcaklığın adsorplanan lipaz miktarına etkisi.....	80
Şekil 4.9. pH'ın serbest ve immobilize lipaz üzerine etkisi.....	81
Şekil 4.10. Sıcaklığın serbest ve immobilize lipaz üzerine etkisi.....	82
Şekil 4.11. İmmobilize ve serbest lipaz için Lineweaver-Burk garfiği.....	84
Şekil 4.12. 50°C'de zamanla serbest ve immobilize lipazın aktivitesindeki değişim.....	85
Şekil 4.13. 60°C'de zamanla serbest ve immobilize lipazın aktivitesindeki değişim.....	86
Şekil 4.14. Serbest ve immobilize lipazın depo kararlılığı grafiği.....	87
Şekil 4.15. Lipaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	88
Şekil 4.16. Lipaz enziminin adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği	90

KISALTMALAR VE SİMGELER

AMP	Adenozin-mono-fosfat
CLEAs	Çapraz bağlı enzim kümeleri
CLECs	Çapraz bağlı enzim kristalleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDA	Etilen diamin
EGDMA	Etilenglikoldimetakrilat
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
GFP	Gren fluorescent protein
GMA	Glisidil metakrilat
GTP	Guanosin tri fosfat
HEMA	Hidroksietil metakrilat
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
IU	Uluslararası ünite
K_m	Michaelis sabiti
KPS	Potasyum per sülfat
MAPA	Metakriloamidofenilalanin
NMI	NonMaskable Interrupt
P(HEMA)	Poli(hidroksietil metakrilat)
P(HEMA-MAPA)	Poli(hidroksietilmetakrilat-metakriloamidofenilalanin)
PET	Positron Emission Tomography
PVAL	Polivinil alkol
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SEN	Tek enzim nanopartikülü
TEM	Transmission elektron mikroskobu
TEOS	Tetraetilortosilikat
TMOS	Tetrametilortosilikat
V_{max}	Maksimum tepkime hızı
σ	Molal yüzey tansiyon değeri

İÇİNDEKİLER

ÖZ, ABSTRACT.....	I
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
Nanoteknoloji.....	1
1.1.1. Nanoölçek Nedir?.....	1
1.1.2. Nanoteknolojide Yeni Gelişmeler.....	2
1.1.3. İn Vivo Nanoprolar.....	3
1.1.4. Nanosistemler.....	3
1.1.5. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	4
1.2. Nanobiyoteknoloji.....	4
1.2.1. Nanobiyoteknolojinin Tanımı.....	4
1.2.2. Nanobiyoteknolojinin Uygulama Alanları.....	5
1.2.3. Doku Mühendisliği.....	7
1.2.4. Kanser Tedavisi.....	8
1.2.5. Biyolojik analizlerde çok renkli optik kodlama.....	8
1.2.6. Hücre ve biyomoleküllerin işlenmesi.....	8
1.2.7. Protein analizi.....	9
1.2.8. Ticari uygulamalar.....	10
1.3. Nanoyapıların Enzim Çalışmalarında Kullanılması.....	11
1.3.1. Nanopartiküller.....	12
1.3.2. Nanofiberler.....	13
1.3.3. Enzim enkapsülasyonunda kullanılan nanoyapılar.....	14

VIII

1.3.4.	Tek enzim nanopartikülleri (SEN).....	14
1.4.	İmmobilize Enzimler.....	17
1.4.1.	Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	18
1.4.2.	Enzim İmmobilizasyon Yöntemi ve Taşıyıcı Seçimi.....	19
1.4.3.	Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri	21
1.5.	Polimerizasyon ve polimerizasyon yöntemleri.....	27
1.5.1.	Emülsiyon polimerizasyonu.....	27
1.5.2.	Süspansiyon Polimerizasyonu.....	31
1.6.	Kromatografik teknikler.....	32
1.6.1.	Kromatografinin Tanımı.....	32
1.6.2.	Adsorpsiyon kromatografisi.....	33
1.6.3.	Kolon kromatografisi.....	33
1.6.4.	İnce Tabaka Kromatografisi.....	34
1.6.5.	Kağıt Kromatografisi.....	34
1.6.6.	Jel filtrasyon kromatografisi.....	35
1.6.7.	Sıvı-sıvı dağılım kromatografisi.....	35
1.6.8.	İyon değişim kromatografisi.....	36
1.6.9.	Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC).....	36
1.6.10.	Gaz kromatografisi.....	37
1.7.	Afinite kromatografisi.....	37
1.7.1.	Afinite kromatografi süreci.....	39
1.7.2.	Afinite ilişkileri.....	39
1.7.3.	Matriks seçimi.....	40
1.7.4.	Ligandların sınıflandırılması.....	41
1.7.5.	Ligand seçimi.....	41

1.7.6. Uzatici kol secimi.....	42
1.7.7. Ligandin destek matrigisine baglanmasi.....	43
1.7.8. Afinite kromatografisinin alt dallari.....	45
1.8. Hidrofobik etkilesim kromatografisi.....	46
1.8.1. Protein hidrofobisitesi ve hidrofobik etkilesimler.....	46
1.8.2. Hidrofobik etkilesim kromatografisini etkileyen faktörler.....	49
1.8.3. Bazı seçilmiş çalışmalar.....	54
2. FARKLI DESTEK MATERYALLERİNE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	56
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	61
3.1. Kimyasal maddeler.....	61
3.2. Deneysel çalışmalar.....	61
3.2.1. Metakriloilamidofenilalanin monomerinin sentezi.....	61
3.2.2. P(HEMA-MAPA) nanoyapilarinin hazirlanmasi.....	62
3.2.3. Nanoyapilarin çöktürülmesi.....	64
3.2.4. P(HEMA-MAPA) nanoyapilarin karakterizasyonu.....	64
3.2.4.1 Yüzey alanı.....	64
3.2.4.2 Elementel analiz.....	65
3.2.4.3 FTIR çalışmaları.....	65
3.2.4.4 Nanoyapilarin boyut analizi.....	65
3.2.4.5 Zeta potansiyel analizi.....	66
3.2.5. Lipaz adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları	66
3.2.6. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik.....	66
3.2.7. Serbest ve immobilize enzimin aktivite ölçüm yöntemi.....	67

3.2.8. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması.....	67
3.2.9. Isıl Kararlılık Denemeleri.....	67
3.2.10. Depo Kararlılığı Denemeleri.....	68
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	68
4.1. P(HEMA-MAPA) nanoyapılarının karakterizasyonu.....	70
4.1.1. Yüzey alanı ölçümleri.....	70
4.1.2. Yüzey morfolojisi.....	72
4.1.3. Elementel analiz.....	72
4.1.4. FTIR çalışmaları.....	72
4.1.5. Polimerik nanoyapıların boyut analizi.....	74
4.1.6. Zeta potansiyel analizi.....	75
4.2. Sulu çözeltiden lipaz adsorpsiyon çalışmaları.....	76
4.2.1. Lipaz başlangıç derişiminin etkisi.....	76
4.2.2. pH etkisi.....	78
4.2.3. Sıcaklık etkisi.....	79
4.2.4. Katalitik aktivite üzerine pH ve sıcaklığın etkisi.....	80
4.2.5. Kinetik sabitler.....	82
4.2.6. Isıl kararlılık.....	84
4.2.7. Depo Kararlılığı.....	86
4.2.8. Adsorpsiyon izotermi.....	87
4.2.9. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
ÖZET.....	94
SUMMARY.....	96
TEŞEKKÜR.....	98

KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	114