

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**  
**2014-YL-005**

**MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE PAPAİN**  
**ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE PROTEİNLERİN**  
**ENZİMATİK HİDROLİZİNDE KULLANIMI**

**Pelin ALPAY**

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

**AYDIN**



**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Pelin ALPAY tarafından hazırlanan “Manyetik Nanopartiküllere Papain Enziminin İmmobilizasyonu ve Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanımı” başlıklı tez, 20.01.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ	.....
Üye: Prof. Dr. Sinan AKGÖL	EGE Üniv.	.....
Üye: 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.

İmza

Pelin ALPAY



## ÖZET

# MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE PAPAIN ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE PROTEİNLERİN ENZİMATİK HİDROLİZİNDE KULLANIMI

Pelin ALPAY

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

*2014, 60 sayfa*

Bu tezde manyetik poli(HEMA-GMA) nanopartikülleri emülsiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanmış ve bu manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA kovalent olarak bağlanmıştır. Sentezlenen manyetik nanopartiküller FTIR, ESR, SEM, AFM ve SEM-EDX analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özellikte, yaklaşık 200 nm çapında ve küresel olduğunu göstermiştir. Manyetik poli(HEMA-GMA) nanopartiküllerine bağlanan Cibacron Blue F3GA miktarı 173.96  $\mu\text{mol/g}$  olarak bulunmuştur. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere papain adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiş ve papain adsorpsiyonuna pH'nın, başlangıç papain derişiminin, ortam sıcaklığının ve iyonik şiddetin etkisi de araştırılmıştır. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere adsorplanan maksimum papain miktarı pH 7.0 HEPES tamponunda hazırlanmış 1.0 mg/mL papain derişiminde 764.0 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Adsorpsiyonun etkinliği Freundlich isotermine uygunluğu ile gösterilmiştir. Aynı zamanda serbest ve immobilize enzimin aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar immobilize papainin pH, termal, işlemsel ve depo kararlılığının serbest papaininkinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca serbest ve immobilize papainin kinetik sabitleri belirlenmiştir. Bu çalışmada immobilize papainin farklı proteinler (kazein, BSA, IgG ve sitokrom C) üzerindeki katalitik etkinliği araştırılmış ve en yüksek katalitik aktivite IgG ile görülmüştür. Bu özellikler boya ligandı olarak Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik afinite nanopartiküllerini papain immobilizasyonu için iyi bir aday yapmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Papain, manyetik nanopartikül, immobilizasyon, Cibacron Blue F3GA





## ABSTRACT

### IMMOBILIZATION OF PAPAİN ONTO MAGNETIC NANOPARTICLES AND USAGE FOR ENZYMATİC HYDROLYSİS OF PROTEİNS

Pelin ALPAY

M.Sc. Thesis, Department of Chemistry  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN  
2014, 60 pages

In this thesis, magnetic poly(HEMA-GMA) nanoparticles were prepared by emulsion polymerization technique and Cibacron Blue F3GA was covalently attached to these magnetic nanoparticles. Synthesized magnetic nanoparticles were characterized by using FTIR, ESR, SEM, AFM and SEM-EDX analysis. It was shown that, synthesized nanoparticles demonstrated magnetic behavior and have spherical shape with approximately 200 nm diameter. Cibacron Blue F3GA loading onto magnetic poly(HEMA-GMA) nanoparticles was calculated to be 173.96  $\mu\text{mol/g}$  polymer. Papain adsorption studies onto dye attached magnetic nanoparticles were performed in a batch system and effects of pH, initial papain concentration, medium temperature and ionic strength on the papain adsorption were also investigated. Maximum adsorbed amount of papain onto dye attached magnetic nanoparticles was found to be 764.0 mg/g polymer by using 1.0 mg/mL of papain concentration in pH 7.0 HEPES buffer. The effectiveness of adsorption was demonstrated by Freundlich isotherm proficiency. Effects of pH and temperature on free and immobilized enzyme activities were also investigated. The results showed that pH, thermal, operational and storage stabilities of the immobilized papain were higher than those of the soluble papain. Additionally kinetic constants of soluble and immobilized papain were determined. In this work, the catalytic efficiency on different proteins (casein, BSA, IgG and cytochrome C) of immobilized papain was investigated and the highest catalytic efficiency was achieved with IgG. These features make the dye-ligand Cibacron Blue F3GA attached magnetic affinity nanoparticles a good candidate for immobilization of papain.

**Key Words:** Papain, magnetic nanoparticle, immobilization, Cibacron Blue F3GA



## ÖNSÖZ

Bu çalışmada papain enziminin manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu ve proteinlerin enzimatik hidrolizinde kullanımı incelenmiştir. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Başta 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 Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım süresince manevi ve bilimsel katkılarından dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e teşekkürü borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım ve tez yazımım sırasında büyük bir sabırla benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Koçarlı Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Dr. Murat UYGUN'a ve FTIR ölçümlerindeki yardımlarından dolayı Kimya Bölümü Arş. Gör. Rukiye GÜMÜŞADA FIRINCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuarlarından yararlanma şansını bana sundukları için Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kubilay METİN'e teşekkür ederim.

Laboratuvarda yardımlarımı benden esirgemeyen hocam Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER, arkadaşlarım Doktora Öğrencisi Çağdaş SUNNA'ya, Yüksek Lisans Öğrencileri Tuğba MERT, Begüm AKDUMAN ve Merve TÜNEK'e ve Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü Doktora Öğrencisi Emir ÖZÇALIŞKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak çalışmalarım, eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca her zaman moralimi yüksek tutup her konuda bana güvenen, maddi, manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Pelin ALPAY



## 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.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim İmmobilizasyonu.....	1
1.1.1. İmmobilizasyon için Kullanılan Farklı Teknikler.....	1
1.2. Boya Ligand Afinite Kromatografisi.....	4
1.2.1. Afinite Ligandı Olarak Boyalar.....	4
1.2.2. Boya Ligandları ve Proteinler Arasındaki Etkileşimler.....	5
1.2.3. Boya-Ligand Afinite Kromatografisinde Adsorpsiyon.....	5
1.3. Manyetik Nanopartiküller.....	6
1.3.1. Enzim İmmobilizasyonunda Manyetik Nanopartiküller.....	7
1.4. Proteazlar.....	8
1.5. Papain.....	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinin Sentezlenmesi.....	21
3.2.2. Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerine Cibacron Blue F3GA Boyasının Bağlanması.....	21
3.3. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinin Karakterizasyonu.....	22
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri.....	22
3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri.....	22
3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri.....	22
3.3.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi.....	22
3.3.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri.....	23

3.4. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerine Papain Enziminin Adsorpsiyonu .....	23
3.4.1. Papain Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	23
3.4.2. Papain Adsorpsiyonuna Enzim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	24
3.4.3. Papain Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	24
3.4.4. Papain Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi.....	24
3.4.5. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinden Papain Desorpsiyonu ve Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi .....	24
3.5. Papain Aktivitesi Tayini .....	25
3.5.1. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	26
3.5.2. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi .....	26
3.5.3. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi .....	26
3.5.4. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	27
3.5.5. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi .....	27
3.5.6. İmmobilize Papain Enziminin Isıl Kararlılığı.....	27
3.5.7. İmmobilize Papainin Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması .....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Cibacron Blue F3GA Bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) Polimerinin Karakterizasyonu .....	28
4.1.1. FTIR ( FourierTransformInfraredSpektrofotometre) Ölçümleri.....	30
4.1.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri .....	30
4.1.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri .....	31
4.1.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi.....	32
4.1.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri.....	33
4.2. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerine Papain Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi.....	34
4.2.1. Papain Adsorpsiyonuna pH ve Farklı Tampon Çözeltilerinin Etkisinin İncelenmesi .....	34

4.2.2. Papain Adsorpsiyonuna Papain Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi .....	35
4.2.3. Papain Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	36
4.2.4. Papain Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi .....	37
4.2.5. Adsorpsiyon İzotermi.....	38
4.2.6. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinden Papain Enziminin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi .....	41
4.3. Papain Aktivitesi Ölçümü.....	42
4.3.1. Serbest ve İmmobilize Papain Enziminin Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi.....	42
4.3.2. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	44
4.3.3. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	45
4.3.4. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	47
4.3.5. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi.....	48
4.3.6. İmmobilize Papain Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi.....	48
4.4. İmmobilize Papainin Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması.....	49
5. SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59





**SİMGELER DİZİNİ**

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
BSA	Sığır serum albumini
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını analizi
EGDMA	Etilenglikol dimetakrilat
ESR	Elektron spin rezonans
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FTIR	Fourier transform infrared spektrofotometresi
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetit
GMA	Glisidil metakrilat
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1- piperazin-1-etan sülfonik asit
IgG	Immunoglobulin G
KPS	Potasyum persülfat
MES	2-(N-morfolino) etan sülfonik asit
MOPS	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
P(HEMA)	Poli(hidroksietil metakrilat)
PVA	Poli(vinil alkol)
TCA	Trikloroasetik asit



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Carica papaya meyvesi ve lateksi .....	11
Şekil 1.2. Papainin amino asit bileşiminin grafiksel gösterimi.. .....	12
Şekil.1.3. Papainin üç boyutlu yapısı .....	13
Şekil 4.1. poli (HEMA-GMA) ve Cibacron Blue F3GA'nın kimyasal yapısı (a ve b).....	28
Şekil 4.2. Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik poli (HEMA-GMA) partiküllerinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 4.3. Mag-nano-p (HEMA-GMA) ve Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerlerinin FTIR spektrumu .....	30
Şekil 4.4. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin ESR spektrumu .....	31
Şekil 4.5. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin SEM fotoğrafı .....	32
Şekil 4.6. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin EDX spektrumu .....	33
Şekil 4.7. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin AFM fotoğrafı.....	34
Şekil 4.8. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna pH'ın ve farklı tamponların etkisi .....	35
Şekil 4.9. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna papain derişiminin etkisi .....	36
Şekil 4.10. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi .....	37
Şekil 4.11. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi .....	38
Şekil 4.12. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere papain adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermini.....	40
Şekil 4.13. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere papain adsorpsiyonunun Freundlich izotermini.....	40

Şekil 4.14. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	42
Şekil 4.15. Serbest papain aktivitesine pH'ın etkisi .....	43
Şekil 4.16. İmmobilize papain aktivitesine pH'ın etkisi.....	43
Şekil 4.17. Serbest papain aktivitesine sıcaklığın etkisi... ..	44
Şekil 4.18. İmmobilize papain aktivitesine sıcaklığın etkisi .....	45
Şekil 4.19. Serbest papain için Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 4.20. İmmobilize papain için Lineweaver-Burk grafiği .....	46
Şekil 4.21. Serbest ve immobilize edilmiş papain aktivitesinin 75 °C'de zamana bağlı olarak değişimi.....	47
Şekil 4.22. Serbest ve immobilize papain enzimlerinin depo kararlılığı .....	48
Şekil 4.23. İmmobilize papain enziminin işlemsel kararlılığı .....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Manyetik Nanopartiküllere İmmobilize Edilmiş Enzimler ve Biyoteknolojik Uygulamaları.....	8
Çizelge 1.2. Proteazların 4 Tipinin Karakteristik Özellikleri .....	10
Çizelge 4.1. Langmuir ve Freundlich İzotermelerinin Kinetik Sabitleri.....	41
Çizelge 4.2. Serbest ve İmmobilize Papainin Kinetik Sabitleri.....	47
Çizelge 4.3. İmmobilize Papainin Etkinliğinin İncelenmesi .....	49



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler veya biyokatalizörler, biyoproses teknolojisi alanındaki en değerli keşiflerden biridir. Biyokataliz, üretim kolaylığı, substrat özgüllüğü ve yeşil kimya nedeniyle çeşitli sektörlerde çok yaygın olarak kabul görmüştür. Ancak bu biyolojik türevli katalizörlerin geniş oranda ticarileşmesi, bu biyokatalizörlerin ekonomik olmama kusurlarından dolayı tekrar kullanılabilirliklerinin zorunluluk haline gelmesine neden olmuştur. Onların biyokimyasal reaksiyonlar sırasında yapısal kararlılıklarını korumaları çok ilgi çekicidir. Sonuç olarak fonksiyonel etkinlikleri ve artan tekrar kullanılabilirlikleri ile immobilize enzimler, enzimlerin pahalılıklarına rağmen alternatifleri olarak kullanılırlar. İmmobilize biyokatalizörler enzimler veya tam hücreler olabilir. Enzim immobilizasyonu substrat ve ürünlerden farklı olarak bir faz (matriks/destek) içinde enzimi hapsedmektedir. İnert polimerler veya inorganik maddeler genellikle taşıyıcı materyaller olarak kullanılırlar. Ekonomik olmanın dışında ideal bir destek inertlik, fiziksel güç, kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, enzim özgüllüğü/aktivitesini artırma yeteneği gibi özellikleri taşımaları ve ürün inhibisyonunu, nonspesifik adsorpsiyonu ve mikrobiyal kontaminasyonu azaltmalıdır.

İmmobilizasyon sürekli ekonomik işlemler, otomasyon, yüksek yatırım/kapasite oranı ve daha yüksek saflıkta ürün geri kazanımını sağlar. Çeşitli metodlar immobilizasyon için kullanılmıştır ve farklı faktörler immobilize enzimlerin performansını etkiler (Datta vd., 2013).

### 1.1.1. İmmobilizasyon İçin Kullanılan Farklı Teknikler

#### 1.1.1.1. Adsorpsiyon

Hidrofobik etkileşimler ve tuz köprüleri ile oluşan enzim adsorpsiyonu ya desteğin fiziksel adsorpsiyon için enzimle temas halinde bulunması ya da enzimin elektrod yüzeyinde kurutulması ile gerçekleşir. Adsorbe enzimler agregasyon, proteoliz ve hidrofobik ara yüzeyle etkileşimden korunur. Araştırmacılar iyi su tutma kapasitesi ve yüksek katyon değişim özelliklerine sahip olan Hindistan cevizi liflerini, geri dönüşümsüz bağlama kapasitesine sahip olan mikrokristal selulozu, kimyasal

asetilasyonda yüksek enzim aktivitesini koruması nedeniyle kaolini ve indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları için ideal uygunlukta geniş yüzey alanı ve fonksiyonel tiol gruplarına sahip olan mikro/mezogözenekli materyaller gibi çevre dostu destekleri kullanmışlardır. Silanize moleküler elekler, hidrojen bağlarıyla enzim immobilizasyonunu kolaylaştıran por duvarları üzerindeki silonollerin varlığı nedeniyle enzim adsorpsiyonu için destek olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Halen kullanılan desteklerin çeşitli kimyasal modifikasyonları kuşkusuz daha iyi bir immobilizasyon sağlamak içindir. Polipropilen bazlı hidrofobik granüller / Accurel EP-100 kullanarak adsorbe edilen lipazın su aktivite profilleri rapor edilmiştir (Persson vd., 2000). Sabbani vd. (2006) daha küçük partikül boyutuna sahip olan Accurel'in biyokatalizleme sırasında reaksiyon hızını ve enantiyometrik oranları arttırdığını rapor etmiştir. Daha iyi işlem kontrolü ve ekonomik üretim için *Yarrowia lipolytica* lipazı fiziksel adsorpsiyon yoluyla oktil agaroz ve oktadesil-sepabeadler üzerine immobilize edilmiş ve serbest lipazdan daha yüksek verim ve daha yüksek kararlılık elde edilmiştir. Enzim ve destek arasındaki artan afinite oktadesil-sepabeadlerin hidrofobisitesi ile açıklanmıştır. Biyobozunur poli(3-hidroksibütirat-kohidroksi-valerat) üzerine immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazı 50 °C'de 4 saat bekletildiğinde % 94 aktivite verimi ve 12 kez tekrar kullanılabilirlik sergilemiştir. Bu destekler polihidroksibütirattan daha az katı ve kristal yapıda oldukları için tercih edilmişlerdir. 1,4-butendiol diglisidil eter ile aktive edilmiş ince kumaş ipliklerin kuruma koşulları altında enzim aktivitesinin % 50'sini koruyabildiği ve pH stabilitesini arttırabildiğinden üreaz için uygun bir destek olmuştur. Son zamanlarda biyoyumlu mezogözenekli silika nanopartikül destekleri uzun süre dayanıklı ve etkin olmaları nedeniyle enerji uygulamalarında biyokataliz için kullanılmaktadır (Datta vd., 2013).

### 1.1.1.2. Kovalent bağlanma

Desteklere enzimlerin kovalent bağlanması enzimlerin arjinin, aspartik asit, histidin gibi amino asit yan zincirleri ve imidazol, indol, fenolik hidroksil gibi farklı fonksiyonel gruplardan kaynaklanan reaktivite derecesi nedeniyle gerçekleşir. Peptid modifiye yüzeyler enzim bağlanması için kullanıldığında kontrollü protein yönlenmesi ile daha yüksek spesifik aktivite ve stabilite gözlenir. Bir karbohidrat birimi ve uzatıcı kol olarak glutraldehit içeren CNBr –Agaroz ve CNBr ile aktive edilmiş Sepharoz, enzimlerin kovalent bağlanmasında termal stabilite göstermiştir.



Yüksek kararlılıkta ve hiperaktivitedeki biyokatalizörler, serbest aldehit gruplarının eliminasyonu ile silanize edilerek modifiye silika jel taşıyıcılara ve Si-F birimleri ile kaplanmış kafes benzeri porlar içeren SBA-15 desteklerine enzimlerin kovalent bağlanması ile hazırlanmıştır. Enzimlerin yarı ömür ve termal stabiliteilerini artırma mezagözenekli silika, kitosan gibi farklı desteklere enzimleri kovalent bağlamayla başarılmıştır. Elektrosinlenmiş nanoliflere enzimlerin çapraz bağlanması artan yüzey alanı ve gözeneklilikten dolayı daha yüksek aktivite veriminin elde edilmesini sağlamıştır. Böylesi nanoboyutlu desteklerin kullanımı biyokatalizör immobilizasyonunda bir dönüm noktası olmuştur. Atapüljit (hidrate magnezyum silikat) nanoliflere alkol dehidrogenazın kovalent bağlanması termal kararlılığı ve değişken nano boyutları nedeni ile tercih edilmektedir. Biyokatalitik membranlar silikon kaplı enzimlerle etkili kovalent etkileşimlerin oluşmasında kullanılmıştır. Organik çözenler veya iyonik polimerlerin eklenmesi ile sulu çözeltiden enzim çöktürülmesiyle üretilen çapraz bağlı enzim agregatları rapor edilmiştir. Kovalent bağlar ile elde edilen magnetik nanoküreler üzerine immobilize enzimlerin farklı yönelimleri, artan uzun ömür, işlemsel dayanıklılık ve tekrar kullanılabilirlik nedeniyle farmösitik endüstrisinde uygulamalar bulmuştur. İmmobilizasyon sırasında enzimlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini koruma, çapraz bağlama ajanı kullanılarak yapılan temel kurallardan biridir. Böylesi bir ajan bifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehitir ve onun sıkça tercih edilmesi sulu çözeltilerde çözünmesi ve kararlı ara ve iç alt kovalent bağları oluşturabilmesi nedeniyledir (Datta vd., 2013).

### **1.1.1.3. Afinite immobilizasyonu**

Afinite immobilizasyonu, farklı fizyolojik koşullar altında enzimin desteğe olan ilgisine dayanır. Bu iki şekilde başarılabilir: ya destek hedef enzim için bir ligand ile ön işleme sokulur ya da enzim desteğe afinite oluşturan bir bileşik ile konjuge edilir. Afinite adsorbanları aynı zamanda enzimlerin saflaştırılması için de kullanılır. Alkali kararlı kitosan kaplı poroz silika küreler ve çok tabakalı Konkonavalin A bağlı agaroz artan stabilite ve etkinlik oluşturarak daha fazla miktarda enzimin immobilizasyonuna izin vermiştir (Datta vd., 2013).

Coulomb etkileşimi, hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri gibi kovalent olmayan etkileşimlerin varlığından dolayı biyoafinite kaplaması enzim bağlama

kapasitesi ve tekrar kullanılabilirliğini önemli oranda arttıran bu tekniğin en gelişmiş uygulamasıdır (Datta vd., 2013).

#### **1.1.1.4. Tutuklama**

Tutuklama jel veya lifler içinde kovalent veya non-kovalent bağlarla enzimlerin hapsedilmesidir. Etkili enkapsülasyona enzim kaçışını önleyici ve mekanik kararlılığın artmasını sağlayan aljinat-jelatin kalsiyum hibrid taşıyıcılarla ulaşılmıştır. Elektro spinlenmiş nanolifler ve saf materyaller gibi nanoyapılı desteklere tutuklama kimya, biyotıp, biyosensörler ve biyoyakıtlar gibi alanlarda geniş uygulamalar bulmuştur. *Candida rugosa* lipazının kitosana tutuklanması ile ufalanma ve süzülmenin önlediği ve tutuklanma etkinliğinin ve enzim aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Bu desteğin non-toksik, biyoyumlu ve kimyasal modifikasyona uygun olduğu ve hidrofilik doğası nedeniyle proteinlere yüksek afiniteli olduğu rapor edilmiştir. Mezogözenekli silikaya tutuklama onun yüksek yüzey alanı, homojen gözenek dağılımı, ayarlanabilir gözenek boyutu ve yüksek adsorpsiyon kapasitesi nedeniyledir (Datta vd., 2013).

## **1.2. Boya Ligand Afinite Kromatografisi**

### **1.2.1. Afinite Ligandı 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 edilebilirdir 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; Kaya, 2012).

### **1.2.2. 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<sup>+</sup>), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP<sup>+</sup>), guanozin trifosfat (GTP), inozin monofosfat (IMP), adenozin trifosfat (ATP), 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HMG-KoA), folat gibi doğal biyolojik ligandların 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; Kaya, 2012).

### **1.2.3. 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), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-1-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; Kaya, 2012).

### 1.3. Manyetik Nanopartiküller

Nanoteknoloji gelecekteki medikal teşhis ve tedaviler için önemli potansiyeller sunmaktadır. Nanopartiküllerin çeşitli tipleri sayısız biyokimyasal ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmıştır. Nanopartiküller inorganik veya organik (polimerler gibi) maddelerden yapılmış mikronaltı boyutlardaki parçalardır. Klasik nanopartikül tanımında partikül boyutu 1-100 nm aralığında olmasına karşılık literatürde birkaç yüz nanometre boyutundaki partiküller için de bu tanım kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin önemi, aynı bileşimdeki kütle materyallerinden farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyledir. Bu özellikler onların azalmış boyutlarına bağlı olarak oluşan yüzey etkileri, manyetik ve elektronik davranışlarını içerir (Huang ve Juan, 2011).

Birçok biyomedikal uygulamada genellikle yüksek doyumlukta magnetizasyon içeren metaller (Fe, Co, Ni gibi) veya metal oksitlerini içeren materyaller tercih edilir. Saf metaller yüksek doyumlukta magnetizasyona sahip olmasına rağmen bu metaller oldukça toksiktir ve oksidasyona duyarlıdır. Bu sebeple bu metal

nanopartiküller biyomedikal uygulamalara uygun değildirler. Aksine demir oksitler oksidasyona daha az duyarlıdır ve bu sebeple daha kararlı manyetik cevap verirler. Demir oksit manyetik nanopartiküller çok kristalli yapıya sahiptir ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit) ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit) sıkça kullanılır (Huang ve Juan, 2011).

Manyetik nanopartiküller bir manyetik alana cevapta eşsiz özellikler sunarlar. Farklı materyaller ve demir oksitlerin kombine olmasıyla hazırlanan nanomateryaller, multifonksiyonel manyetik nanopartiküller olarak içeriklerindeki farklı materyallerden dolayı yüksek özgülük, spesifik yüzey kimyası, özel optik özellikler ve manyetik özellikler sunarlar ve bu özellik onların yaygın kullanım alanları bulmasını sağlamıştır. Bu alanlar protein saflaştırma, enzim immobilizasyonu, kirlilik giderme, ilaç salımı, fototermal terapi ve manyetik rezonans görüntülemedir.

### **1.3.1. Enzim İmmobilizasyonunda Manyetik Nanopartiküller**

Son yıllarda biyoteknolojide manyetik nanopartiküllerin kullanımı oldukça popülerdir. İmmobilize enzim desteği olarak manyetik nanopartikülleri kullanmak bazı avantajlar sunmaktadır. Bunlar: 1) Daha fazla miktarda enzimin bağlanmasına izin veren yüksek spesifik alan 2) Daha düşük kütle transfer direnci ve daha az kirlenme 3) Bir manyetik alan uygulayarak reaksiyon karışımından immobilize enzimin seçimli ayrılmasıdır (Huang ve Juan, 2011). Çizelge 1.1'de manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş çeşitli enzimler ve biyoteknolojideki uygulamalarına örnekler verilmiştir.

Çizelge 1.1. Manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş enzimler ve biyoteknolojik uygulamaları (Ansari ve Husain, 2012).

Enzim	Nanopartikül	Uygulamaları
Kolesterol oksidaz	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartikülleri	Serumdaki total kolesterol analizi
Haloalkan dehalogenaz	Silikon kaplı demir oksit nanopartiküller	Dehalogenaz sekanslarını içeren füzyon proteinlerinin üretimi
Lakkaz	Kitosan manyetik nanopartikülleri	Çevresel kirliliklerin biyosağaltımı
Keratinaz	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartikülleri	Keratin sentezi
$\alpha$ -amilaz	Selüloz kaplı manyetik nanopartiküller	Nişastanın parçalanması
$\beta$ -Galaktosidaz	ConA kaplanmış ZnO nanopartiküller	Laktoz hidrolizi
Lipaz	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartikülleri	pNPP hidrolizi

#### 1.4. Proteazlar

Proteazlar, en önemli endüstriyel enzimler arasındadırlar. Bu proteolitik biyokatalizörler, birçok yüzyılda ve başlangıçta süt endüstrisinde peynir üretiminde süt pıhtılaştırıcı ajan olarak kullanılmıştır. Proteazlar, protein

moleküllerinin peptid ve amino asitlere parçalanmasını sağlayan hidrolitik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Preoteazlar substrat özgüllüğü, aktif bölge ve katalitik mekanizma, optimum pH, optimum sıcaklık ve kararlılık gibi özellikleri farklı olan enzimlerin çok geniş ve kompleks gruplarından oluşur. Proteolitik enzimlerin özgüllüğü, hidrolizlenecek bağa yakın amino asit ve diğer fonksiyonel grupların (aromatik veya alifatik veya kükürt içeren) doğasıyla yönetilir. Proteazlar tüm yaşayan canlılarda bulunur ve çeşitli metabolik reaksiyonları katalizleyerek normal ve anormal fizyolojik koşullarda önemli bir rol oynar. Proteazlar yalnızca proteolitik reaksiyonları yönettikleri için değil aynı zamanda sonuçta yağlar ve karbohidratların parçalanmasını içeren metabolik reaksiyonların nedeni olan çeşitli basamakları regüle ettikleri için de önemlidir (Sumantha vd., 2006).

Proteazlar, Enzim Komisyonunun (EC) sınıflandırmasına göre 3. grup (hidrolaz) ve 4. alt gruba (peptid bağlarını koparan) aittir. Proteazlar peptid bağlarını N veya C terminal uçlarından (ekzopeptidazlar) veya iç peptid bağlarını (endopeptidazlar) koparma yeteneklerine göre iki temel gruba ayrılabilir. Aminopeptidazlar N-terminal bağlarını koparıırken, karboksipeptidazlar C-terminal peptid bağlarını koparır. Ekzopeptidazlar ticari uygulamalar bulurken, endopeptidazlar endüstriyel olarak ekzopeptidazlardan daha önemlidir. Proteazlar aynı zamanda hassas bağlarla ilgili pozisyonlardaki yüklü grupların varlığı ve yokluğuna göre de tanımlanabilir ve optimum pH'a göre (asidik, nötral veya bazik gibi), substrat özgüllüğüne (kollagenaz, kreatinaz, elastaz gibi) veya tripsin, pepsin gibi iyi tanımlanmış proteinler için homolojilerine göre birçok şekilde tanımlanabilir. Hartley endopeptidazları aktif bölgeleri ve çeşitli inhibitörlere duyarlılıklarına göre 4 gruba ayırmıştır ve bu sınıflandırma Çizelge 1'de görülmektedir (Sumantha vd., 2006).

Çizelge 1.2. Proteazların 4 tipinin karakteristik özellikleri (Sumantha vd., 2006)

Özellikleri	Molekül kütlesi /kDa	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	Metal iyon gereksinimi	Aktif bölge amino asitleri	İnhibitörleri	Kaynakları
Aspartik veya karboksil proteazlar	30-45	3-5	40-55	Ca <sup>2+</sup>	Aspartat veya sistein	Pepstatin	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , hayvansal doku (mide)
Sistein veya thiol proteazlar	34-35	2-3	40-55	-	Aspartat veya sistein	Indoasetamid, p-CMB	<i>Aspergillus</i> , <i>Ananas comorus</i> , <i>Ficus sp.</i> , <i>Carica papaya</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>
Metallo proteazlar	19-37	5-7	65-85	Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Fenil-alanin veya lösin	EDTA, EGTA gibi şelatlayıcı ajanlar	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Serin proteazlar	18-35	6-11	50-70	Ca <sup>2+</sup>	Serin, histidin ve aspartat	PMSF, DIFP, EDTA, soya tripsin inhibitörü, fosfat tamponları, indol, fenol, triamino asetik asit	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Tritirachium album</i> (ısılkararlı)



## 1.5. Papain

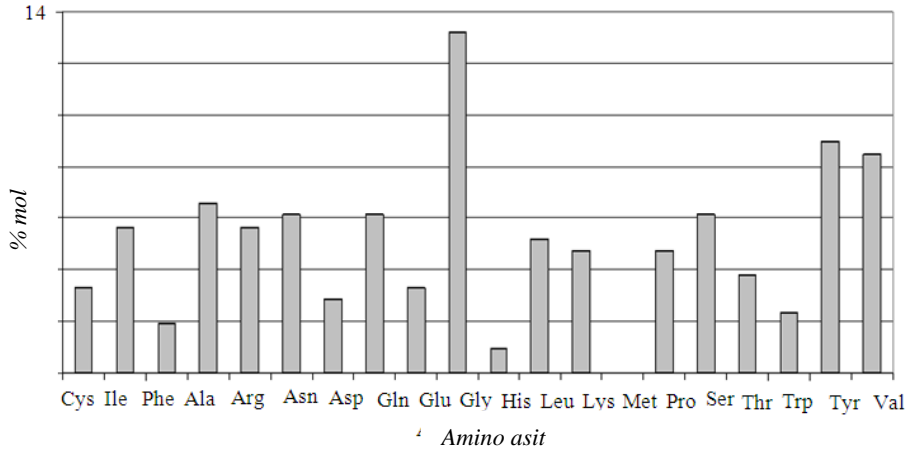
Papain (EC 3.4.22.2), papaya (*Carica papaya*) lateksinden izole edilen endolitik, bitki sistein proteaz enzimidir. Papain, olgunlaşmamış papayanın kabuğunun kesilip, akan lateksin toplanıp kurutulmasıyla elde edilir (Şekil 1.1). Daha yeşil meyvede, papain daha boldur.



Şekil 1.1. *Carica papaya* meyvesi ve lateksi

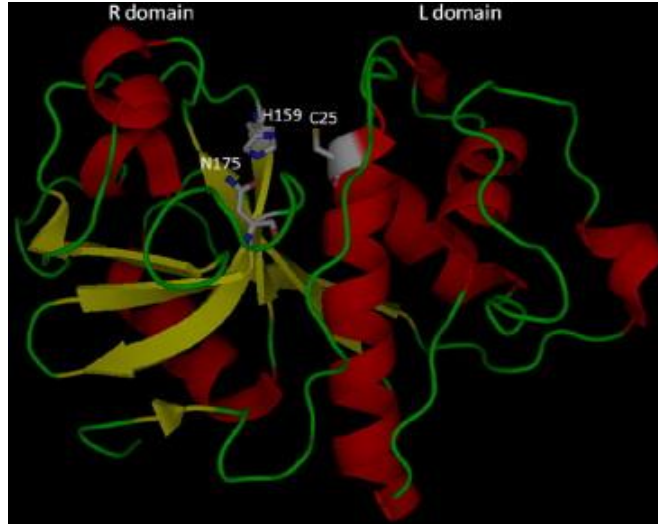
Papain enzimi, proteolitik bir enzim olarak papain süper ailesine aittir ve tüm canlı organizmalarda birçok hayati biyolojik işlemde önemi bulunmaktadır (Tsuge vd., 1999). Papain proteinler, kısa zincirli peptidler, amino asit esterleri ve amid bağlarına karşı geniş bir proteolitik aktivite gösterir ve gıda ve tıp alanlarında yaygın olarak kullanılır. Papain tercihen özellikle arjinin ve lizin gibi bazik aminoasitleri içeren peptid bağlarını ve fenilalanini izleyen birimleri parçalar (Menard vd., 1990; Amri ve Mamboya, 2012).

Globuler bir protein olan papainin molekül ağırlığı 23406 Da'dur ve 4 disülfid bağı içeren 212 amino asitten oluşur. Papainin katalitik aktivitesinde Gln 19, Cys 25, His 158 ve His 159 önemli rol oynar. Papainin amino asit bileşiminin grafiksel temsili Şekil 1.2'de görülmektedir.



Şekil 1.2. Papainin amino asit bileşiminin grafiksel gösterimi

Papain, farklı koşullarda bile kararlılığını ve aktivitesini koruyabilen bir sistein hidrolazdır. Yüksek sıcaklıklarda bile çok kararlıdır. Papain denatüre edici ajanlar olan 8M üre veya % 70'lik etil alkol gibi organik çözümlerin yüksek konsantrasyonlarında bile kararlılığını koruyan bir enzimdir. Papain aktivitesi için optimum pH farklı substratlara bağlı olarak 3.0-9.0 aralığındadır. Papain, genellikle iki iyi tanımlanmış bölge içerir. Bu protein 3 disülfid köprüsüyle stabilize edilmiştir ve molekül, yan zincirlerdeki güçlü etkileşimlerin oluşmasıyla bu köprüler boyunca katlanmıştır (Amri ve Mamboya, 2012). Papainin üç boyutlu yapısı, aktif bölgeyi içeren bir yarıkla ayrılan iki farklı yapısal kısımdan oluşur. Bunlardan biri  $\alpha$ -heliks bakımından zengin kısım (L kısmı) diğeri ise  $\beta$ -fiçli modeli bakımından zengin kısımdır (R kısmı) (Salas vd., 2008). Aktif bölgede sistein, histidin ve arjinin bulunmaktadır.



Şekil 1.3. Papainin üç boyutlu yapısı (Salas vd., 2008)

Papain enziminin anti-inflamatuar, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri bulunmaktadır ve geniş cilt lezyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Vasconcellos vd., 2011). Papain gıda endüstrisinde et ve ilgili türevlerinin yumuşatılmasında, mayalı içecek üretiminde içeceklerin ve özellikle biranın berraklaştırılmasında, süt endüstrisinde peynir üretiminde, fırıncılıkta glutenin transformasyonunda sıkça kullanılır (Homaei vd., 2010). Papain hücre izolasyonunda ve geniş ölçekli endüstri proseslerinde biyomoleküllerin ayrılmasında kullanılır. Ayrıca papain deri, kozmetik, tekstil, deterjan, gıda ve farmosötik endüstrisinde de önemli uygulamalar bulmuştur (Chen vd., 2009).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Enzim immobilizasyonunda manyetik ve nanoboyutta desteklerinin kullanımı yüksek spesifik alanları nedeniyle daha fazla enzim yüklemesini sağlar. İstenen biyomolekülün seçimli hedeflenmesi ve manyetik alan yardımıyla reaksiyon karışımından kolayca ayrılması ve saflaştırma işlemlerindeki santrifüjleme ve filtrasyon gibi adımların elimine edilmesi diğer önemli avantajlarından (Okoli vd. 2011). Bu önemli üstünlükleri nedeniyle manyetik nano destekler birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır.

Xiao vd. (2006), lakkaz enzimini bakır tetraaminoftalosiyenin- $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküllere iki adımlı bir reaksiyon yoluyla ve gluteraldehit ile çapraz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Birinci adımda gluteraldehitin optimum pH'ı, kantasyonu, derişimi ve reaksiyon süresi çalışılırken ikinci adımda lakkazın optimum pH'ı reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi incelenmiştir. Araştırmacılar immobilize lakkazın küçük partikül boyutuna, geniş yüzey alanına ve eşsiz manyetik özelliklere sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Yusdy vd. (2009), silika kaplı manyetik nanokürelere laktat dehidrogenaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla hazırlanan manyetik nanokümelere TEM fotoğrafları çekilmiş ve kümelerin boyutu yaklaşık 500 nm olarak bulunmuştur. Silika kaplı manyetik nanokümelere gluteraldehit ile fonksiyonelleştirilmiş ve laktat dehidrogenaz immobilizasyonunda kullanılmıştır. İmmobilizasyon farklı pH'lardaki tampon çözeltilerde ve iyonik şiddetlerde aktivite ölçümleri yapılarak incelenmiş ve immobilizasyon sırasında sodyum klorür ilavesinin laktat dehidrogenaz aktivitesini % 50'den % 75'e çıkardığı görülmüştür.

Xie ve Ma (2010), lipaz enzimini aktivasyon ajanı olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDAC) kullanarak manyetik  $Fe_3O_4$  nanopartiküller üzerine immobilize etmişler ve yağ asidi metil esterlerini üretmek için metanol ile bitkisel yağların transesterifikasyonunu katalizlemede kullanmışlardır. Manyetik nanopartiküllere lipazın bağlandığı enzim aktivitesi, TEM ve FTIR ölçümleri ile doğrulanmıştır. İmmobilize lipaz, serbest lipaz ile karşılaştırıldığında daha iyi sıcaklık ve pH stabilitesi göstermiştir. İmmobilize lipaz kullanıldığında metil esterlerine dönüşüm % 94 oranında gerçekleşmiştir.

Zhao vd. (2011), dendrimerlerle fonksiyonelleştirilmiş manyetik karbon nanotüplere glukoamilaz enzimini immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemleri olarak adsorpsiyon, kovalent bağlama ve metal iyonu afinite etkileşimleri kullanılmış ve metal iyonu afinite etkileşimlerinin glukoamilaz için etkili bir immobilizasyon yöntemi olduğu rapor edilmiştir. İmmobilize glukoamilazın 10 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 84.2 olduğu, hem serbest hem de immobilize glukoamilazın optimum pH'ının 3.5 ve optimum sıcaklığının 55 °C olduğu bildirilmiştir. Ayrıca immobilize glukoamilaz daha yüksek termal stabilite göstermiştir.

Zhou vd. (2012), etoksil grupları içeren fonksiyonel iyonik sıvıları sentezlemişler ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sentezi ve ardından silika kabukla kaplama ile hazırlanan manyetik silika nanopartiküller üzerine immobilize etmişlerdir. Hazırlanan manyetik nanopartiküller FTIR, SEM, TEM ve VSM ile karakterize edilmiştir. Daha sonra iyonik sıvılarla desteklenmiş nanopartiküller penisilin G açılazın immobilizasyonunda kullanılmıştır. Maksimum enzim yüklemesi 209 mg/g ve maksimum enzim aktivitesi 261 U/g olarak bulunmuştur. On kez ard arda kullanılan immobilize penisilin G açılaz başlangıç aktivitesinin % 62'sini korumuştur.

Bahrami ve Hejazi (2013), dokusat sodyum tuzu ile negatif yüklenmiş manyetik nanopartiküllere pektinaz enzimini immobilize etmişlerdir. Dokusat sodyum tuzu biyoyumlu anyonik bir surfaktandır ve manyetik nanopartikülleri stabilize eder. İmmobilizasyon işlemi pozitif yüklü enzim ile negatif yüklü manyetik nanopartiküller arasında elektrostatik adsorpsiyon yoluyla gerçekleşmiştir. Manyetik nanopartiküllere immobilize edilen enzim bir manyetik alan altında kolayca ayrılabilmiştir. Pektinaz immobilizasyonuna başlangıç derişiminin, ortam pH'ının ve dokusat sodyum tuzu derişiminin etkileri incelenmiştir. İmmobilize pektinazın maksimum spesifik aktivitesi 1.98 U/mg enzim ve maksimum enzim yüklemesi 610.5 mg enzim/g destek olarak rapor edilmiştir. Altı kez kullanımdan sonra immobilize enzim başlangıç aktivitesinin % 85-95'ini korumuştur. Ayrıca pH ve sıcaklık stabiliteleri incelendiğinde immobilizasyonla enzim yapısının etkilenmediği görülmüştür.

Verma vd. (2013), β-glukozidaz enzimini fonksiyonel manyetik nanopartiküllere immobilize etmişler ve biyoyakıt üretimindeki potansiyelini araştırmışlardır. İmmobilizasyon kovalent bağlanma yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve

immobilizasyon verimi % 93 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesi, termal stabilitesi ve işlemsel kararlılığı sellobiyoz hidrolizi ile araştırılmıştır. Serbest ve immobilize glukozidazın optimum pH'ı sırasıyla 4.0 ve 6.0 ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur. Immobilize glukozidaz 16 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesinin % 50'den fazlasını korumuştur. Bu sonuçlar manyetik nanopartiküllere glukozidaz immobilizasyonunun, lignoselülozik biyokütlelerden fermente edilebilir şeker eldesi için kullanılabileceğini göstermiştir.

Papain enzimi kinetik ve yapısal olarak oldukça iyi karakterize edilmiş ve geniş proteolitik aktivite gösteren bir enzimdir. Özellikle proteinler, kısa zincirli peptidler, amino asit esterleri ve amid bağlarına karşı yüksek aktivite gösterir. Papain enzimi deri, kozmetik, tekstil, deterjan, gıda, tıp ve farmosotik alanlarında önemli uygulamalar bulmuştur. Ancak *Carica papaya* lateksinin bulunabilirliğindeki zorluk bu enzimin temin edilebilirliğini sınırlamaktadır ve papain enziminin immobilizasyonu bu sorunun çözümünde ideal bir yöntemdir. Papain immobilizasyonu ile ilgili literatürde yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır ve bunlara örnekler aşağıda verilmiştir.

D'Souza ve Lali (1999), papain saflaştırması için IMAC desteği olarak karboksimetilselülozü kullanmışlardır. Bu amaçla öncelikle karboksimetil selüloz çapraz bağlanmış ve epiklorhidrin kullanılarak aktive edilmiş ve iminodiasetik asit (IDA) kovalent olarak bağlanmıştır. Daha sonra şelatlayıcı CM-selüloz desteği çeşitli metal iyonları ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$ ) ile selatlaştırılmış ve papain adsorpsiyonunda kullanılmıştır. CM-selüloz- $\text{Cu}^{2+}$  desteği ile papaya lateksinden papain saflaştırılmış ve 4.2'lik saflaştırma katsayısı elde edilmiştir.

Lei vd. (2004), karboksil grupları içeren manyetik kompozit mikroküreleri tioniklorür ile aktive etmişler ve papain enziminin amino gruplarından kovalent olarak immobilizasyonunda kullanmışlardır. Immobilize papainin pH, sıcaklık ve depo kararlılığının serbest papainden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca serbest ve immobilize papainin Michaelis-Menten sabiti olan  $K_m$  değerlerini karşılaştırmışlardır.

Roy vd. (2005), *Carica papaya* lateksinden izole edilmiş papain enzimini süksinik anhidrid ile kimyasal olarak modifiye etmişlerdir. Bu kimyasal enzimdeki lizin birimlerinin amino grubu ile reaksiyona girerek net yükü pozitiften negatife

kaydırmıştır. Modifiye papainin optimum pH'ı 6.0'dan 8.0'e kaymış, optimum sıcaklığı değişmemiştir. Modifiye papainin spesifik aktivitesinin serbest enzimden daha yüksek olduğu görülmüş ve bu modifiye papain alginat/nişasta kürelere tutuklanarak stabilitesi arttırılmıştır. Bu enzimin biyotransformasyonda başarılı bir şekilde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Solis vd. (2006), papain enzimini mezogözenekli silika üzerine 4°C'de ve pH 3-11 arasında adsorbe etmişler adsorpsiyon kinetiklerini araştırmışlardır. İmmobilize papainin pH 5.0'de önemli derecede stabilite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Li vd. (2007), sol jel tekniği ile pamuklu kumaş üzerine papain enzimini immobilize etmişlerdir. Pamuklu kumaş üzerindeki immobilize papaini SEM, EDS ve Bradford metodu ile karakterize etmişler ve serbest ve immobilize papainin bağıl enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Sol jel tekniği ile pamuklu kumaş üzerine papain immobilizasyonunda 6 kullanımdan sonra bile orijinal enzim aktivitesinin % 30'undan fazlasının görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Nie ve Zhu (2007), aktive naylon membrana kitosanı kovalent olarak bağlamışlar ve ligand olarak Cibacron Blue F3GA'yı kitosan kaplı membranlara kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Daha sonra bu Cibacron Blue F3GA bağıl membranları papain adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Bu afinite membranlarının papain adsorpsiyon kapasitesini 235.3 mg/g olarak rapor etmişlerdir. Adsorbe papainin desorpsiyonunu pH 9.0'daki 1 M NaSCN ile gerçekleştirmişlerdir.

Su vd. (2009), kitosan kaplanmış naylon kompozit membranlar hazırlamışlar ve Reaktif Blue 4 boyasını kovalent olarak bağlamışlardır. Bu boya bağıl naylon kompozit membranların karakterizasyonunu gerçekleştirmişler ve papain adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Optimum koşullarda boya bağıl membranların adsorpsiyon kapasitesini 27.85 mg/g olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar hazırladıkları boya ligand desteğini hızlı protein sıvı kromatografi kolonunda kullanarak papain saflaştırılması gerçekleştirmişler ve 34.6 kat saflıkta protein elde etmişlerdir.

Homaei vd. (2010), farklı sistein derişimlerinde Sepharoz 6B'ye papain immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve sistein derişimine bağıl olarak enzim aktivitesini araştırmışlardır. Maksimum spesifik aktiviteyi papaini 200 mM sistein ile immobilize ettiklerinde görmüşlerdir. Enzimin immobilizasyonla stabilitesinin

arttığı rapor edilmiş ve bunun endüstriyel uygulamalarda önemli olduğu belirtilmiştir.

Bayramoglu vd. (2011), süspansiyon polimerizasyonu ile poli (HEMA-EGDMA) küreleri hazırlamışlar ve bu kürelere poli (GMA) liflerini yüzey başlatıcılı-atom transfer radikal polimerizasyonu ile aşlamışlardır. Daha sonra bu kürelerin epoksi gruplarını papainin kovalent immobilizasyonu için kullanılmışlardır. İmmobilize papainin farklı proteinlerin (kazein ve sitokrom C) hidrolizinde oldukça etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Bian vd. (2012), mezogözenekli silika SBA-15 üzerine oda sıcaklığında iyonik sıvı halinde olan bir kimyasal aşlamışlar ve papain enziminin immobilizasyonunda kullanmışlardır. Negatif yüklü papain enzimi (pH 9.0'da) bu sıvıdan gelen (+) yüklü gruplara elektrostatik olarak bağlanmıştır. İmmobilize papainin kazein hidrolizinde serbest enzimden daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Sahoo vd. (2013), manyetik nanopartikülleri 3-(merkaptopropil) trimetoksi silan ile modifiye etmişler ve tiyol grupları üzerinden altın nanopartiküllerin bağlanmasını sağlamışlardır. Bu manyetik altın nanokompozitlere papain enziminin immobilizasyonunu, hem elektrostatik hemde çoklu non-kovalent etkileşimlerle gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize enzimin endüstride uygulama potansiyeli bulacağını rapor etmişlerdir.

Liya vd. (2013), biomimetik silikifikasyon işlemi ile papain enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Silika başlatıcı çözeltisinde papain bekletilerek hızlıca papain-silika kompozitleri oluşmuş ve papain enkapsüle edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği ve aktivite verimi sırasıyla % 82.6 ve % 83.09 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca enkapsüle edilen papainin termal, pH ve depo kararlılığının arttığı rapor edilmiştir.

Mosafa vd. (2013), papain immobilizasyonu için silika kaplı manyetik nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulamasını rapor etmişlerdir. Papain 3-kloropropil trimetoksisilan ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlanmıştır. Serbest papain ile karşılaştırıldığında immobilize papainin artan enzim aktivitesi ve pH ve sıcaklık



değişimlerine daha iyi tolerans gösterdiği görülmüştür. Ayrıca immobilize papain nar suyu bulanıklığının giderilmesinde etkili bir şekilde kullanılmıştır.

Mahmoud vd. (2013), selüloz nanokristaller üzerine birlikte gömülmüş manyetik nanopartiküller ve altın nanopartiküller papain enziminin kovalent konjugasyonu için kullanmışlardır. Maksimum enzim yüklemesi 186 mg/g protein olarak hesaplanmıştır. İmmobilize papainin katalitik etkinliğinin belirlenmesinde elektrokimyasal dedeksiyon kullanılmıştır. İmmobilize enzim 4 °C'de 35 gün saklandığında başlangıç aktivitesinin % 95'ini korurken, serbest enzim başlangıç aktivitesinin % 41'ini korumuştur.

Bu çalışmada manyetik nano-poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) [mag-nano-poli (HEMA-GMA)] yapıları emülsiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlenecek ve bu manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA kovalent olarak bağlanacaktır. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere papain enziminin immobilizasyonu adsorpsiyon yoluyla gerçekleştirilecektir. İmmobilizasyon verimine pH, papain derişimi, sıcaklık ve iyonik şiddetin etkisi incelenecektir. Ayrıca immobilize papain aktivitesine pH, sıcaklık ve substrat derişiminin etkileri araştırılacak ve immobilize papainin ısı, depo ve işlemsel kararlılığı belirlenecektir. Papain enziminin immobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra immobilize papainin farklı proteinler (kazein, BSA, IgG ve sitokrom C) üzerindeki katalitik etkinliği değerlendirilecektir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

*Carica papaya* lateksinden saflaştırılmış papain, poli (vinil alkol) [PVA], 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), potasyum persülfat (KPS) ve glisidil metakrilat (GMA), Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; Tris-HCl, etil alkol, metil alkol, NaOH, sodyum bikarbonat, Cibacron Blue F3GA, kazein, sitokrom c, sığır serum albumini (BSA), trikloroasetik asit (TCA), magnetit ( $Fe_3O_4$ ) ve etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) Aldrich (USA)'den temin edildi.

Deneyleerde 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, (Nüve B5 402) soğutmalı su banyosu, 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 $\Omega$  cm) ultra saf su cihazı kullanıldı.

Sentezlenen polimerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde 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-GMA) Polimerinin Sentezlenmesi

Manyetik-nano-poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) [mag-nano-p(HEMA-GMA)] polimeri, emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak sentezlendi. Mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin hazırlanması için 100 mL hacimli laboratuvar tipi bir cam reaktör kullanıldı. Polimerin hazırlanması için stabilizatör olarak 0.5 g polivinil alkol (PVA,  $d=1.269$  g/mL) tartılıp 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, 0.3 mL etilenglikoldimetakrilat (EGDMA,  $d:1.051$  g/mL) çapraz bağlayıcısı ve 50 µL glisidil metakrilat (GMA) monomeri ilave edildi ve 30 saniye mekanik olarak çalkalandı. Daha sonra reaktöre, polimerin manyetik özellik kazanmasını sağlamak amacıyla 0.2 g magnetit ( $Fe_3O_4$ ) ilave edilerek tekrar 30 saniye çalkalandı. 0.0198 g potasyum persülfat (KPS, 1,6 mM) tartılarak 45 mL saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla 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 magnetit yapıları ayrıldı. Daha sonra süpernatant alınıp manyetik nanopartiküller 18000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöken manyetik nanopartiküller sırasıyla etanol (% 99.8), etanol/su (1:1) karışımı ve su ile yıkanarak polimerizasyona katılmayan maddelerden arındırıldı. Yıkama işleminin ardından nanopartiküllere polimerizasyon hacmi kadar (yaklaşık 71 mL) saf su ilave edilerek emülsiyon oluşturmaları sağlandı. Sentezlenen nanopartiküller, kullanılmadıkları zaman mikrobiyal büyümenin olmaması için % 0.02  $NaN_3$  çözeltisi içerisinde buzdolabında saklandı (Uygun vd., 2008).

### 3.2.2. Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerine Cibacron Blue F3GA Boyasının Bağlanması

Cibacron Blue F3GA, nanopartiküllere kovalent olarak bağlandı. Bu amaçla Cibacron Blue F3GA'nın 5.0 mg/mL derişiminde 100 mL çözeltisi hazırlandı ve çözeltiliye 4 g NaOH ilave edildi. Daha sonra bu çözelti 100 mL sudaki 0.1 g nano-poli(HEMA-GMA) nanopartiküller ile karıştırıldı. Karışım 80 °C'de 4 saat karıştırıldı. Dört saat sonunda reaksiyona girmemiş ve nonspesifik olarak

bağlanmış boya moleküllerini uzaklaştırmak için yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkma işlemi sırasıyla saf su, metanol ve tekrar saf su ile gerçekleştirilerek nanopartiküller saf suda disperse edildi ve 4 °C'de % 0.02'lik  $\text{NaN}_3$  çözeltisi içerisinde buzdolabında saklandı.

### **3.3. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinin Karakterizasyonu**

#### **3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri**

Mag-nano-p(HEMA-GMA) ve Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerlerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, ADB) kullanılarak elde edildi. Örnekler (0.1 g), KBr (0.1g) ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirildi ve FTIR spektrumu çekildi.

#### **3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri**

Nanopartiküllerin manyetik özellikleri elektron spin rezonans spektrometresi (ESR, Varian E-L X Band spectrometer, Almanya) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla kurutulmuş örneğin oda sıcaklığındaki ESR spektrumları çekildi.

#### **3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri**

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey morfoloji ve yapısını değerlendirmek amacıyla Phillips XL-305 FEG cihazı kullanılarak SEM fotoğrafları çekildi.

#### **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. Nanopartiküllerin boya içeriği kükürt stokiyometrisinden yararlanılarak hesaplandı.

### **3.3.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri**

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve boyutu hakkında bilgi edinmek için Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV atomik kuvvet mikroskobu kullanıldı.

### **3.4. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerine Papain Enziminin Adsorpsiyonu**

Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) partiküllerine papain enziminin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonu kesikli sistemde gerçekleştirildi. Bunun için manyetik nanopartiküller papain çözeltisi ile 2 saat boyunca 100 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve adsorpsiyon çeşitli parametrelerin (pH, papain başlangıç derişimi, sıcaklık ve iyonik şiddet) etkisi aşağıdaki şekilde incelendi.

#### **3.4.1. Papain Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi**

Papain adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH çözeltilerinde (pH 4.0-5.0 asetat tamponu; pH 6.0-7.0 fosfat tamponu; pH 6.0-7.0 MOPS tamponu; pH 6.0-6.5 MES tamponu; pH 7.0-8.0 HEPES tamponu; pH 7.0-8.0 Tris-HCl tamponu), derişimi 1 mg/mL olan 5'er mL papain enzimi çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 1'er mL alınarak spektrofotometrede 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan 4'er mL'lik çözeltilere sentezlenen Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinden 2'şer mL ilave edildi ve 2 saat süre ile 100 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. İkinci saatin sonunda karışımlardan 1'er mL alınıp 18000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. pH değerlerine karşı adsorplanan papain miktarları grafiğe geçirildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesinin hangi pH değerinde olduğu bulundu. Aynı işlemler, boya içermeyen mag-nano-p(HEMA-GMA) polimeri için de gerçekleştirilerek elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi.

### **3.4.2. Papain Adsorpsiyonuna Enzim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi**

Papain adsorpsiyonuna enzim başlangıç derişiminin etkisi 25 °C'de 5'er mL'lik pH 7.0 HEPES tamponu ile 0.1; 0.2; 0.4; 0.5; 0.75; 1.0; 1.5 mg/mL derişimlerinde papain çözeltileri hazırlanarak incelendi. Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi farklı derişimdeki her bir örnek için adsorpsiyon işlemleri gerçekleştirildi ve adsorplanan papain miktarları hesaplandı. Papain derişimine karşı, adsorplanan papain miktarı grafiğı çizildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulundu. Aynı işlemler, boya içermeyen mag-nano-p(HEMA-GMA) polimeri için de gerçekleştirilerek adsorpsiyon kapasiteleri benzer şekilde hesaplandı.

### **3.4.3. Papain Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi**

Papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi için 4; 15; 25; 35; 45; 55; 65; 75; 85 °C'deki sıcaklıklarda enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 5'er mL'lik pH 7.0 HEPES tamponu ile papain çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi her bir sıcaklıkta adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Sıcaklık değerlerine karşı adsorplanan papain miktarları hesaplandı.

### **3.4.4. Papain Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi**

Papain adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için iyonik şiddetleri 0; 0.001; 0.01; 0.1; 0.25 M olan NaCl çözeltileri ile enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla pH 7.0 HEPES tamponunda hazırlanan 1 mg/mL derişimindeki papain çözeltilerine hesaplanan miktarlarda NaCl ilave edildi ve Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi. İyonik şiddet değerlerine karşı adsorplanan papain miktarları grafiğı geçirildi.

### **3.4.5. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinden Papain Desorpsiyonu ve Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**

Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için papain adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak pH 4.0 asetat

tamponunda hazırlanan 1.0 M NaCl çözeltisi kullanıldı. 25 °C’de pH 7.0 HEPES tamponunda 1 mg/mL derişimindeki papain enziminin adsorpsiyonu Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Daha sonra enzim bağı nanopartiküller santrifüj yardımıyla adsorpsiyon ortamından ayrılarak desorpsiyon işlemlerinde kullanıldı. Bu amaçla adsorplanmış nanopartiküller pH 4,0 asetat tamponu ile hazırlanan 1,0 M NaCl çözeltisi ile 25 °C’de 100 rpm hızda, 2 saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Altı mL’lik örnekten 1.0 mL alınarak 18000 g’de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatanın 280 nm’de absorbansı okundu. Okunan absorbans değerlerinden papain derişimleri hesaplanarak % desorpsiyon oranı bulundu.

Desorpsiyon işleminden sonra Cibacron Blue F3GA bağı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimeri  $50 \times 10^{-3}$  M pH 7.0 HEPES tamponu ile yıkanarak tekrar papain adsorpsiyonu için kullanıldı. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri 5 kez tekrar edilerek adsorplanan papain miktarı, döngü sayısına karşı grafiğe geçirildi.

### 3.5. Papain Aktivitesi Tayini

Papain aktivitesi tayini, Kembhavi vd. (1993) tarafından önerilen metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Bu metodun temeli substrat olarak kullanılan kazeinin hidrolizine bağı olarak ortaya çıkan tirozin miktarının ölçülmesine dayanmaktadır.

Bu amaçla 50 µL serbest papain enzimi, 350 µL pH 7.0 HEPES tamponu ve 400 µL % 1’lik kazein 10 dakika 25 °C’de bekletildi. On dakika sonunda ortama % 10’luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi ve 30 dakika bekletildi. Daha sonra 1.0 mL alınarak 12000 g’de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatanın 280 nm’de absorbansı okundu (Homaei vd., 2010). Ünite hesabı Eşitlik 3.1 kullanılarak yapıldı.

$$U = \frac{\text{Serbestlenen tirozin } (\mu\text{mol})}{\text{zaman (dak)}} \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

Serbest ve immobilize papain aktivitesine pH, sıcaklık ve substrat derişiminin etkisi incelendi. İlaveten immobilize papainin ısı, depo ve işlemsel kararlılıkları belirlendi.

### **3.5.1. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize papain aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 4.0-5.0 asetat tamponu; pH 6.0 fosfat tamponu; pH 6.0-7.0 MOPS tamponu; pH 6.0-6.5 MES tamponu; pH 7.0 HEPES tamponu; pH 8.0 tris-HCl tamponu) derişimi 1 mg/mL olan 5'er mL papain çözeltileri hazırlandı. Aktivite ölçümleri Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize papain için Eşitlik 3.1 kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize papain için optimum pH değerleri belirlendi.

### **3.5.2. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize papain aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için farklı sıcaklık değerlerinde (4; 15; 25; 35; 45; 55; 65; 75; 85 °C) ve  $50 \times 10^{-3}$  M'lık pH 7.0 HEPES tamponunda derişimi 1 mg/mL olan 5'er mL papain çözeltileri hazırlandı. Serbest ve immobilize papain için Eşitlik 3.1 kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. Sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize papain için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

### **3.5.3. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize papain aktivitesine substrat derişiminin etkisi, pH 7.0 HEPES tamponunda farklı derişimindeki substrat (kazein) çözeltiler hazırlanarak incelendi. Bu farklı derişimdeki substrat çözeltileri (0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 7.5; 10.0 mg/mL) kullanılarak serbest ve immobilize papain enzimleri ile aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize papain enzimleri için hız değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak serbest ve immobilize papain için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.



### **3.5.4. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize papainin ısıl kararlılığının incelenmesi için 75 °C’de aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize papain 75 °C’deki su banyosunda 300 dakika tutuldu ve belirli aralıklarla aktivite ölçümleri Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize papain için bu sıcaklıklarda zamana karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

### **3.5.5. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize papain depo kararlılığının incelenmesi için belli aralıklarla 15 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Bu süre içinde serbest ve immobilize papain buzdolabında +4 °C’de saklandı. Serbest ve immobilize papain için yapılan aktivite ölçümlerinden zamana karşı % aktivite grafikleri çizildi.

### **3.5.6. İmmobilize Papain Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi**

İmmobilize papain işlemsel kararlılığının incelenmesi için immobilize enzim ile ard arda 10 kez aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir aktivite ölçümünden sonra immobilize papain pH 7.0 HEPES tamponu ile yıkandı ve tekrar aktivite ölçümü için kullanıldı. İmmobilize papain için döngü sayısına karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

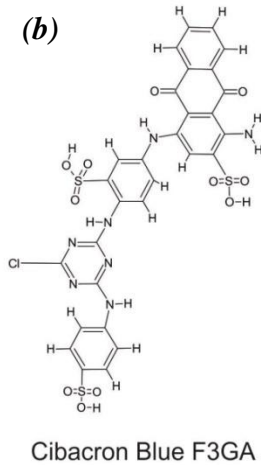
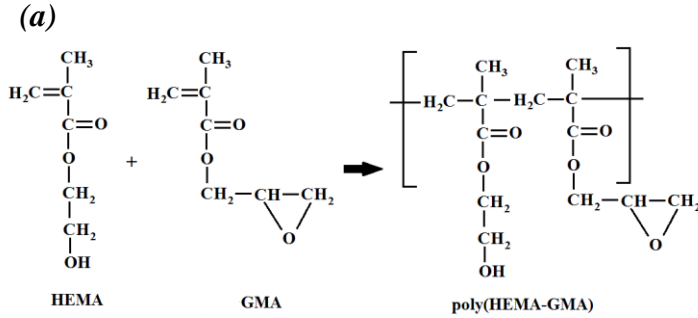
### **3.5.7 İmmobilize Papainin Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

İmmobilize papainin kullanılabilirliğinin bir ölçüsü olarak farklı proteinlerin (sığır serum albumin, sitokrom C ve IgG) enzimatik hidrolizi gerçekleştirildi ve immobilize enzimin etkinliği serbest enzimle karşılaştırıldı.

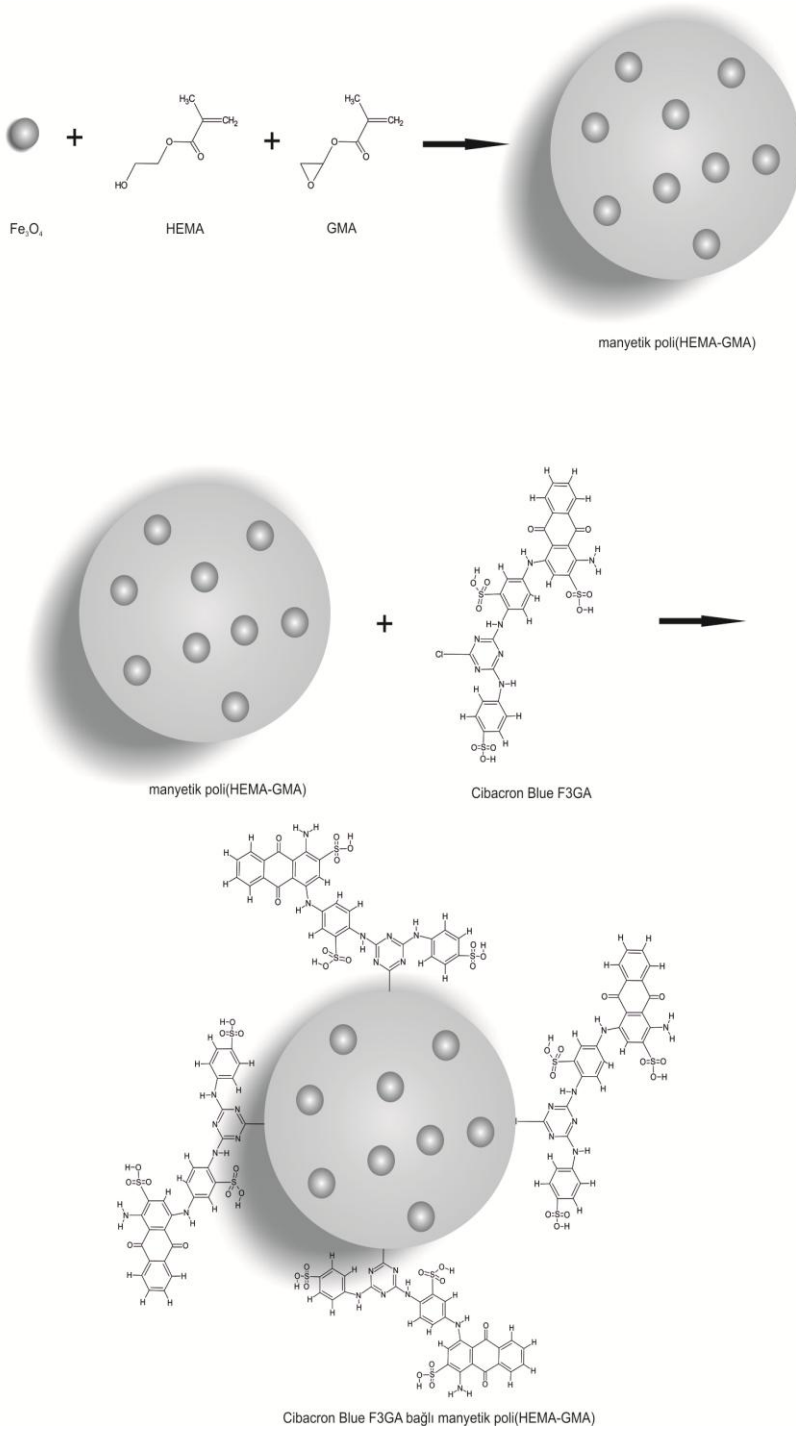
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Cibacron Blue F3GA Bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) Polimerinin Karakterizasyonu

Bu tezde HEMA, GMA monomerleri ve  $Fe_3O_4$  varlığında manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve bu manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA kovalent olarak bağlanmıştır. Şekil 4.1.a poli(HEMA-GMA) polimerinin yapısını, 4.1.b Cibacron Blue F3GA boyasının yapısını göstermektedir. Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA-GMA) yapısındaki HEMA monomerinin -OH grupları ve GMA monomerinin oksiran gruplarından nanopartiküllere bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın şematik gösterimi 4.2’de görülmektedir.



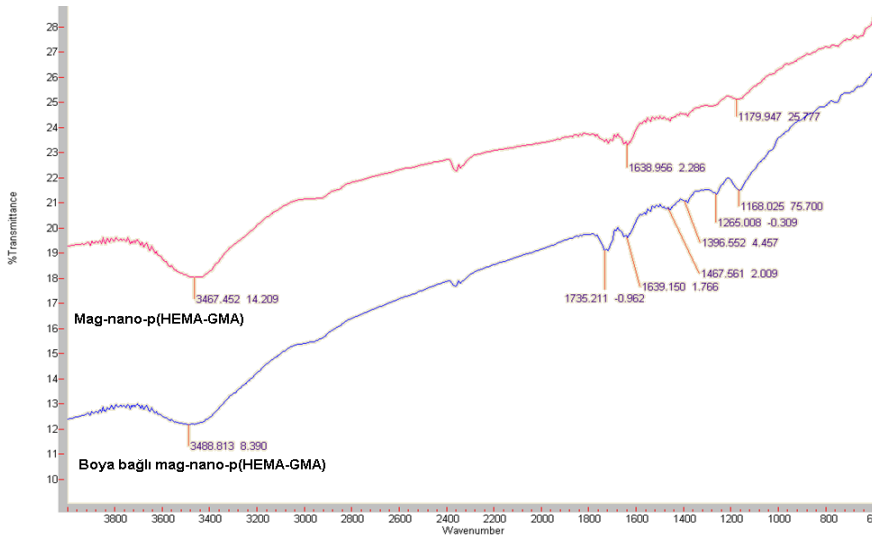
Şekil 4.1. Poli(HEMA-GMA) ve Cibacron Blue F3GA'nın kimyasal yapısı (a ve b).



Şekil 4.2. Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik poli(HEMA-GMA) partiküllerinin şematik gösterimi.

#### 4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Şekil 4.3'de poli(HEMA-GMA) ve Cibacron Blue F3GA bağlı poli(HEMA-GMA) polimerlerine ait FTIR spektrumları gösterilmiştir. Polimerik yapıdaki -OH gruplarının gerilme titreşimleri  $3500\text{ cm}^{-1}$  civarında, C=O gruplarının gerilme titreşimleri ise  $1700\text{ cm}^{-1}$  civarında görülmektedir. Boya bağlı poli(HEMA-GMA) polimerine ait spektrumdaki  $1168$ ,  $1265$  ve  $3400\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar sırasıyla S=O bağının simetrik gerilmesi, S=O bağının asimetrik gerilmesi ve aromatik C-N titreşimi nedeniyledir. Ayrıca bu FTIR spektrumunda  $1600$ - $1450\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen bantlar boyadan gelen benzen halkasına özgüdür.



Şekil 4.3. Mag-nano-p (HEMA-GMA) ve Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p (HEMA-GMA) polimerlerinin FTIR spektrumu.

#### 4.1.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri

Nanopartiküllerin yapısına  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 'ün katıldığı ESR ile gösterilmiştir. Manyetik alana (Gauss) karşı manyetik pik yoğunluğu grafiği bu bakımdan oldukça karakteristiktir. Şekil 4.4'de sentezlenen nanopartiküller için çekilmiş olan ESR spektrumu görülmektedir. g faktörü, eşleşmemiş elektronları olan moleküllerin nicel özelliğinin ortaya konmasında kullanılır ve Eşitlik 4.1 ile hesaplanır.

$$g = h.v / \beta.H_r$$

(Eşitlik 4.1)

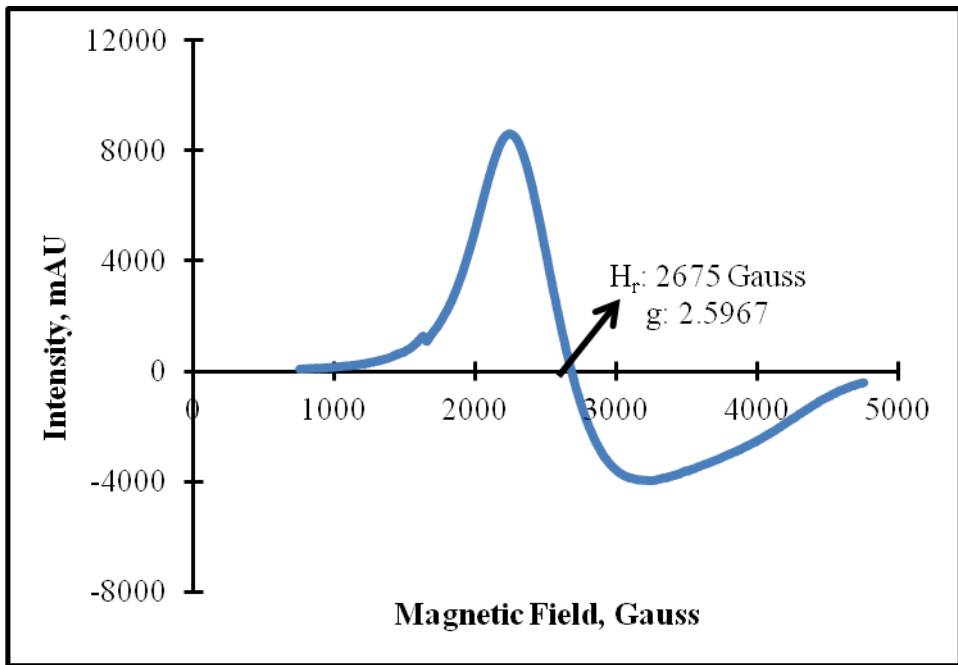
$h$ : Planck sabiti ( $6,626 \cdot 10^{-27}$  erg/s)

$\beta$ : evrensel sabit ( $9,274 \cdot 10^{-21}$  erg/G)

$\nu$ : frekans (Hz)

$H_r$ : magnetik alanın rezonansı (G)

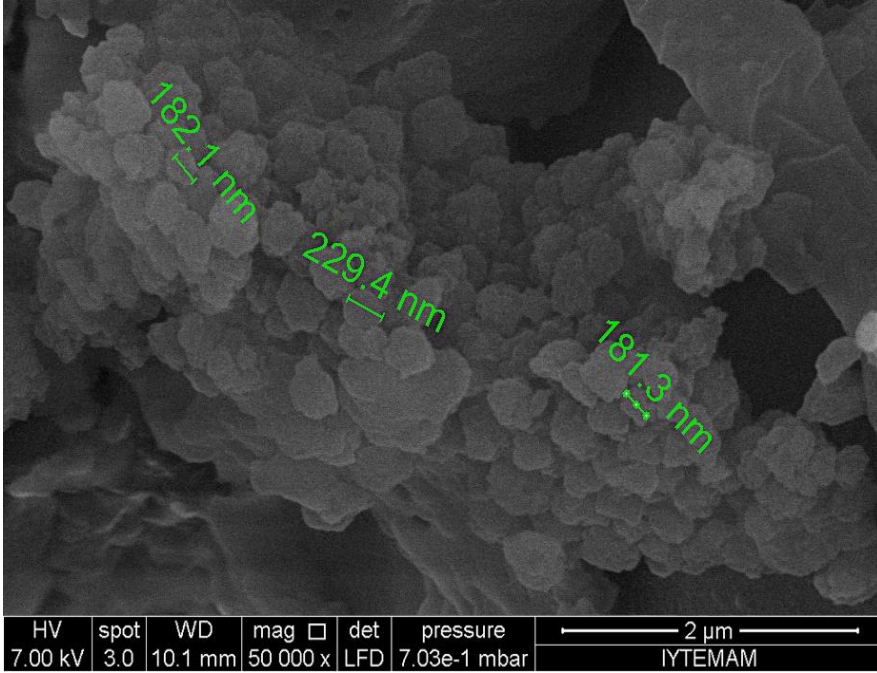
Bu çalışmada sentezlenen nanopartiküllerin  $g$  faktörü değeri 2.5967 olarak hesaplanmıştır. Bu değer sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özellik kazandığını göstermektedir.



Şekil 4.4. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin ESR spektrumu.

#### 4.1.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

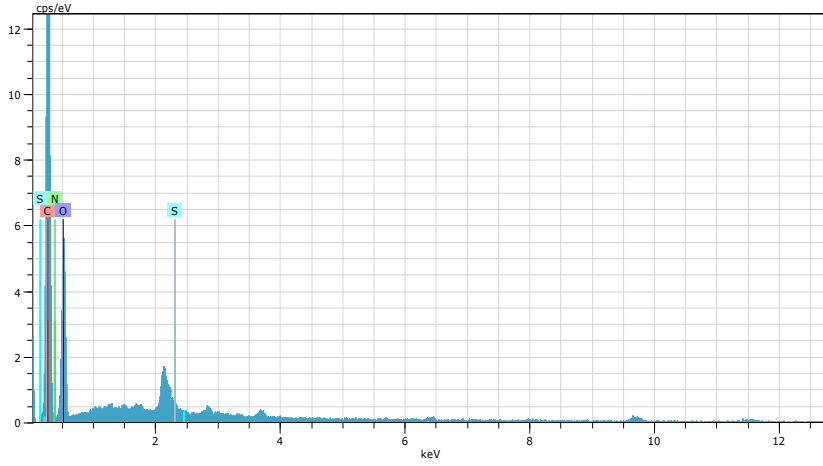
Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik poli(HEMA-GMA) nanopartiküllerinin SEM fotoğrafı Şekil 4.5’de görülmektedir. Sentezlenen manyetik nanopartiküller küresel yapıda ve nonporöz olup yaklaşık 200 nm boyutuna sahiptir.



Şekil 4.5. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin SEM fotoğrafı.

#### 4.1.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

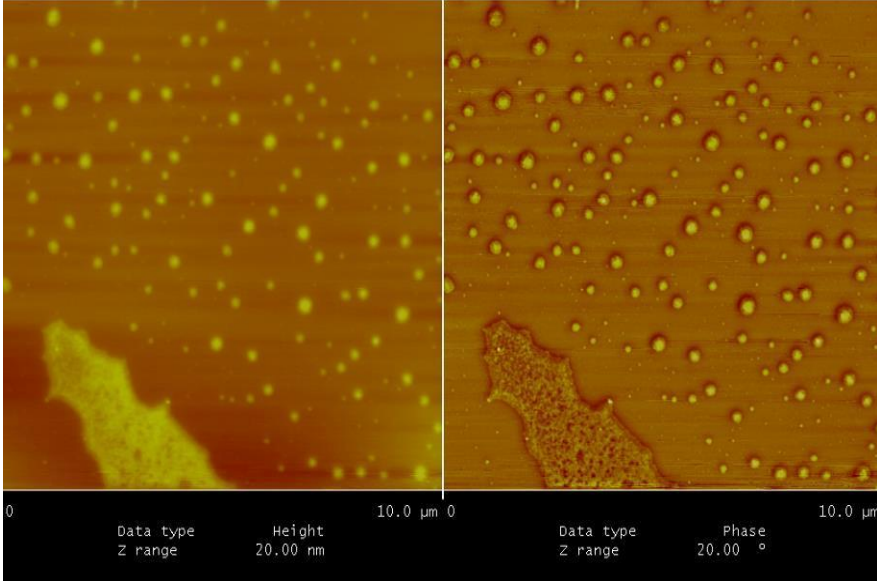
Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ilişkin EDX analiz grafiği Şekil 4.6'de gösterilmiştir. Polimerik yapıya Cibacron Blue F3GA'nın katıldığı S ve N varlığı ile görülmüş ve yapıya katılan Cibacron Blue F3GA miktarı S sitokiyometrisi kullanılarak hesaplanmış ve 173.96 µmol/g olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin EDX spektrumu.

#### 4.1.5. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

Yüksek çözünürlüklü atomik kuvvet mikroskopisi ile nanopartiküllerin boyut ve yüzey özelliklerinin incelenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımı Şekil 4.7’de görülmektedir. AFM fotoğraflarından partiküllerin küresel yapıda ve nano boyutlarda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin AFM fotoğrafı.

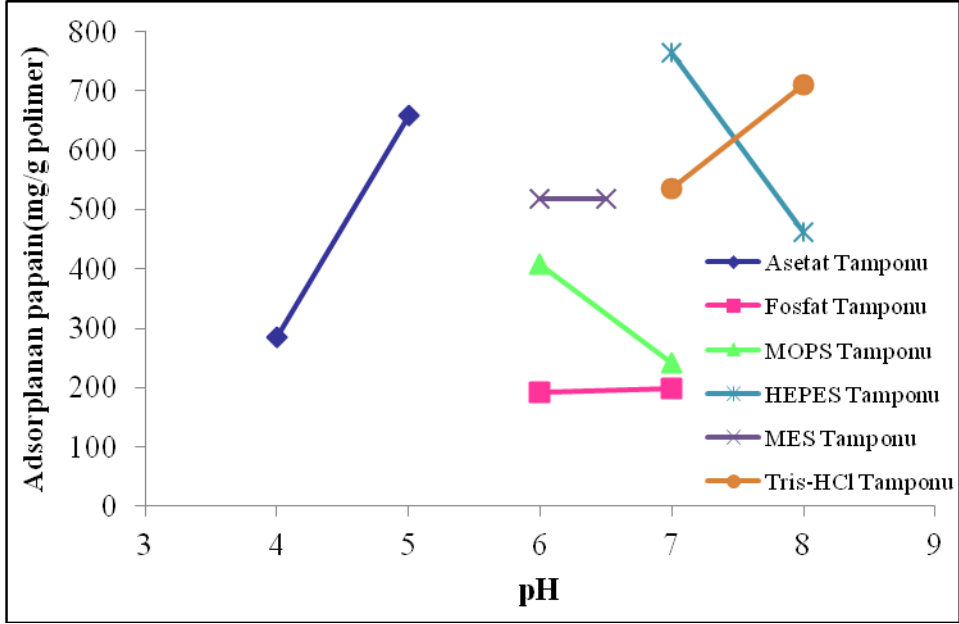
## 4.2. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerine Papain Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

### 4.2.1. Papain Adsorpsiyonuna pH ve Farklı Tampon Çözeltilerin Etkisinin İncelenmesi

Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) partiküllerine papain adsorpsiyonuna pH'nın etkisi farklı tampon çözeltiler (pH 4.0-5.0 asetat, pH 6.0-7.0 fosfat, pH 6.0-7.0 MOPS, pH 7.0-8.0 HEPES, pH 6.0- MES, pH 7.0-8.0 Tris-HCl) kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi pH 7.0 HEPES tamponunda elde edilmiş ve 764.0 mg/g olarak hesaplanmıştır. *Carica papaya* lateksinden izole edilmiş papain enziminin izoelektrik noktası 8.75'dir (Ghosh, 2005) ve bu pH'ın altında papain enzimi pozitif yüklüdür. Cibacron Blue F3GA molekülü 3 asidik sulfonat grubuna, 4 bazik primer ve sekonder amino gruplarına sahiptir (Martins vd., 2003). Cibacron Blue F3GA molekülünün sulfonat gruplarının pK<sub>a</sub> değeri yaklaşık 0.8'dir ve bu boya ligandı bu pH'da negatif yüklüdür. pH 7.0'de pozitif yüklü olan papain ve negatif yüklü olan boya ligandı elektrostatik etkileşimlerde bulunabilir. Ayrıca çeşitli papain türlerinin güçlü kation değiştiricilerle izole edildiği de bilinmektedir



(Llerena-Suster vd., 2011; Monti vd., 2000). Papain ve Cibacron Blue F3GA arasında pH 7.0'de oluşan etkileşimler (hidrofobik, elektrostatik ve hidrojen bağı) hem boya molekülündeki çeşitli grupların (sulfonat, sekonder amin ve hidrofobik gruplar) hem de papain proteinin amino asit zincirlerinin iyonlaşması nedeni ile gerçekleşebilir (Uygun vd., 2012).

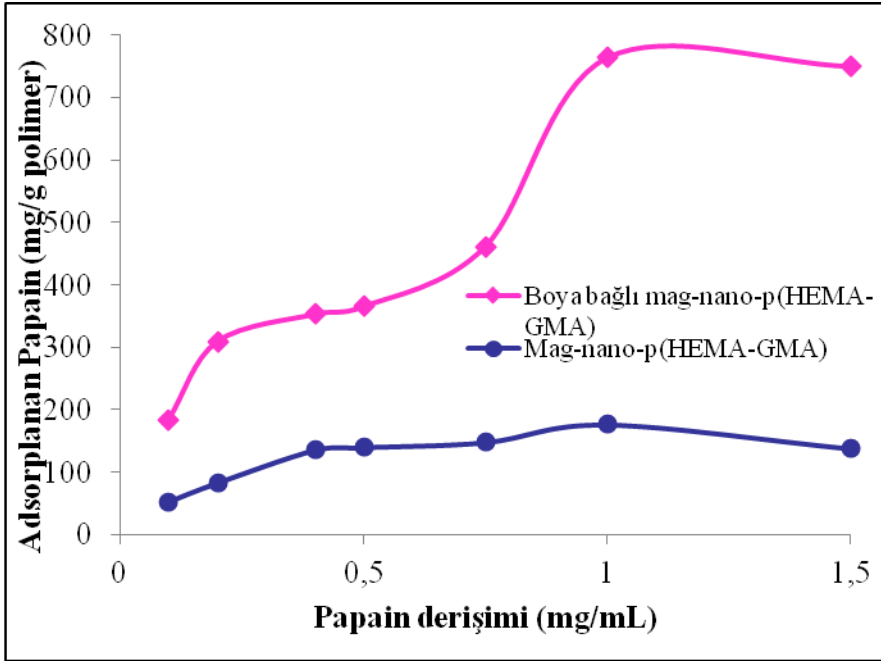


Şekil 4.8. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna pH'n ve farklı tamponların etkisi. Başlangıç papain derişimi: 1.0 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

#### 4.2.2. Papain Adsorpsiyonuna Papain Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.9'de Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) nanoyapılarına papain adsorpsiyonuna, papain başlangıç derişiminin etkisi görülmektedir. Adsorpsiyon, papain derişimine bağlı olarak artmakta ve 1.0 mg/mL papain derişiminde bir plato düzeyine ulaşmaktadır. Adsorpsiyon izoterminin başlangıç kısmının eğimi, papain ve boya ligandı arasındaki yüksek afiniteyi göstermektedir. Maksimum papain adsorpsiyonu 1 mg/mL papain başlangıç derişiminde 764.0 mg/g polimer olarak hesaplanmıştır. Bu papain derişimindeki non-spesifik adsorpsiyon ise 176.5 mg/g gibi yüksek bir değer

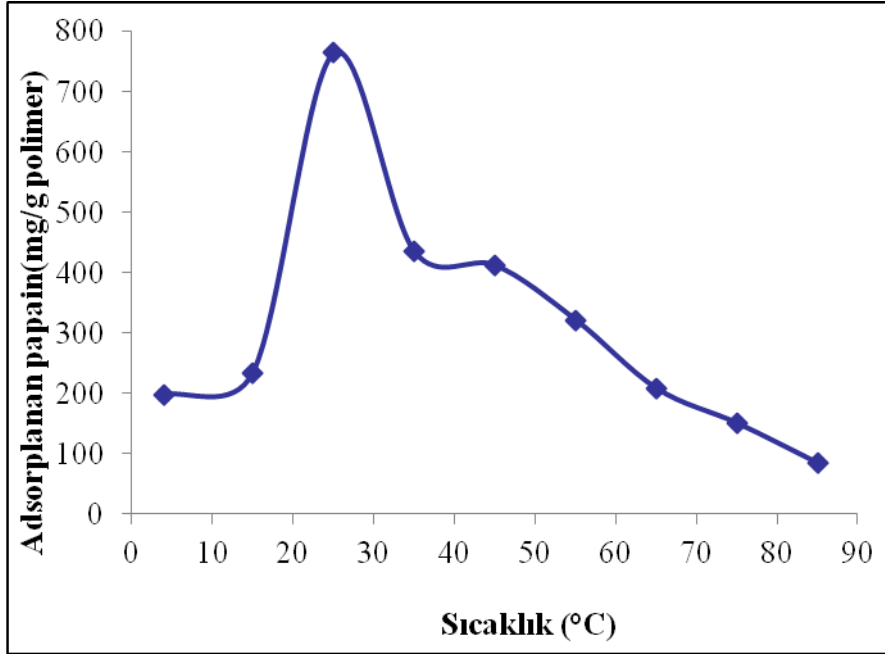
bulunmuştur. Bu değer mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerindeki GMA monomerinden gelen reaktif oksiran gruplarından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.9. Cibacron Blue F3GA bağı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna papain derişiminin etkisi. pH: 7.0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

#### 4.2.3. Papain Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

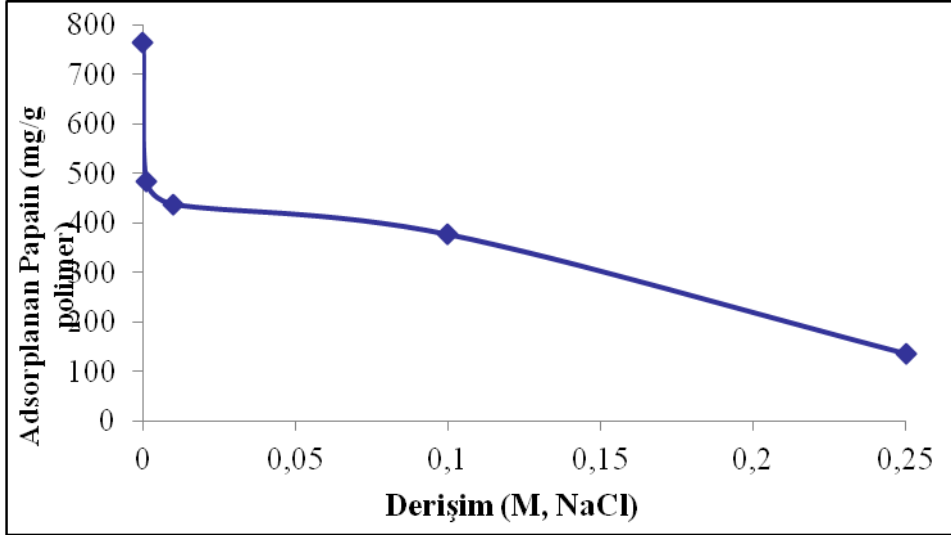
Şekil 4.10 Cibacron Blue F3GA bağı mag-nano-p(HEMA-GMA) partiküllerinin papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini göstermektedir. Şekil 4.10'a bakıldığında sıcaklık artışına bağı olarak adsorplanan papain miktarı artmış ve 25 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda papain adsorpsiyon kapasitesi azalmıştır. Bu azalma yüksek sıcaklıklarda proteinin üç boyutlu yapısındaki değışmeler ve nanopartiküller ve boya molekülleri arasındaki etkileşimleri bozabilecek termodinamik etkilerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.10. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç papain derişimi: 1.0 mg/mL; pH: 7.0; inkübasyon süresi: 2 saat

#### 4.2.4. Papain Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.11’de papain adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi gösterilmiştir. Şekilden iyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı görülmektedir. pH 7.0 HEPES tamponunda iyonik şiddetin 0.001’den 0.25’e artması ile boya bağlı manyetik nanopartiküllerin adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık % 72 oranında azalmıştır. İyonik şiddetin artışı hidrofobik etkileşimlerin artışı teşvik eden bir parametre olarak değerlendirildiğinde iyonik şiddet artışına bağlı olarak papain adsorpsiyon kapasitesinin azalmasının gözlenmesi boya ligandı ve enzim etkileşiminde elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna iyonik Şiddetin etkisi. Bařlangıĉ papain derişimi: 1.0 mg/mL; pH: 7.0; inkubasyon suresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

#### 4.2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Langmuir izoterm modeli, eşit ulaşılabilir adsorpsiyon bۆlgeleri, tek tabakalı yۆzey kaplama ve adsorplanan tۆrler arasında etkileşim olmaması gibi homojenite varsayımı temelinde dayanmaktadır (Mohan vd., 2006; Uygun, 2008). Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$q_{eq} = q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + b \cdot C_{eq}) \quad \text{Eşitlik 4.2}$$

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

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

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

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 sınırlanmaz (Proctor ve Toro-Vazquez, 1996).

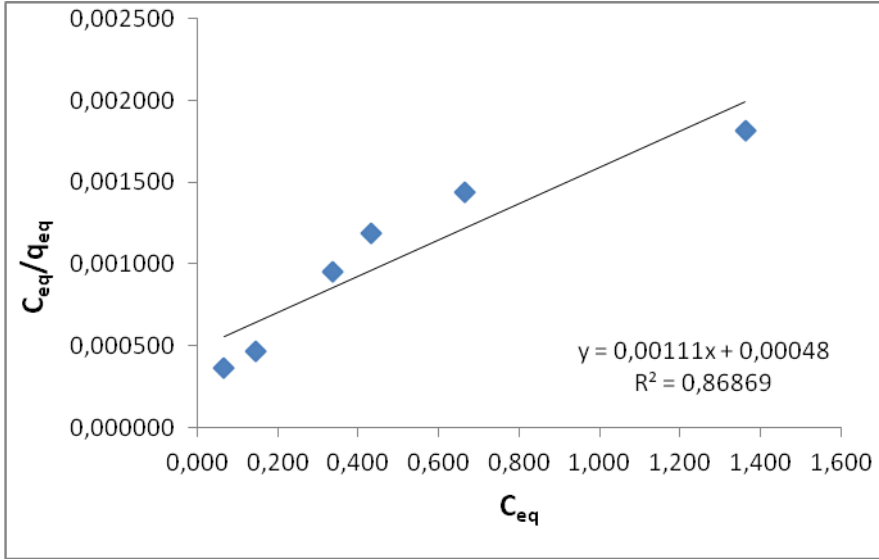
$$q_{eq} = K_f \cdot (C_{eq})^{1/n} \quad \text{Eşitlik 4.4}$$

Burada  $q_{eq}$ , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan papain miktarı (mg/g);  $C_{eq}$ , çözeltideki papain denge derişimi (mg/mL);  $K_f$ , adsorbanın bağıl adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g);  $1/n$ , adsorpsiyon şiddeti sabitidir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir:

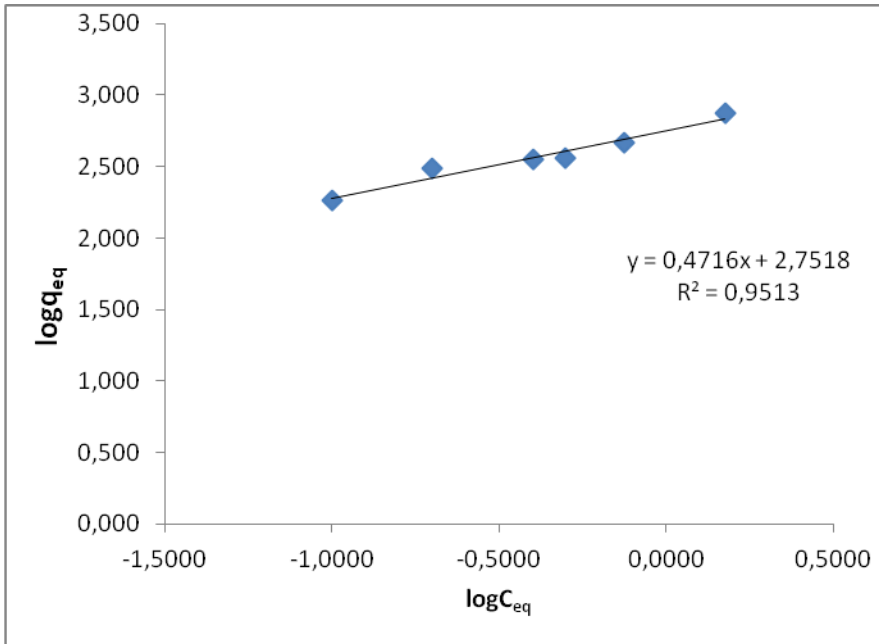
$$\log q_{eq} = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{eq} \quad \text{Eşitlik 4.5}$$

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

Boya bağılı manyetik nanopartiküllere papain adsorpsiyonun özelliklerini değerlendirmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi çizilmiş ve Şekil 4.12 ve 4.13'de gösterilmiştir. Çizelge 4.1'de bu izotermilerden elde edilen kinetik sabitler görülmektedir.



Şekil 4.12. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere papain adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi. pH: 7.0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C



Şekil 4.13. Boya bağlı manyetik nanopartiküllere papain adsorpsiyonunun Freundlich izotermi. pH: 7.0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

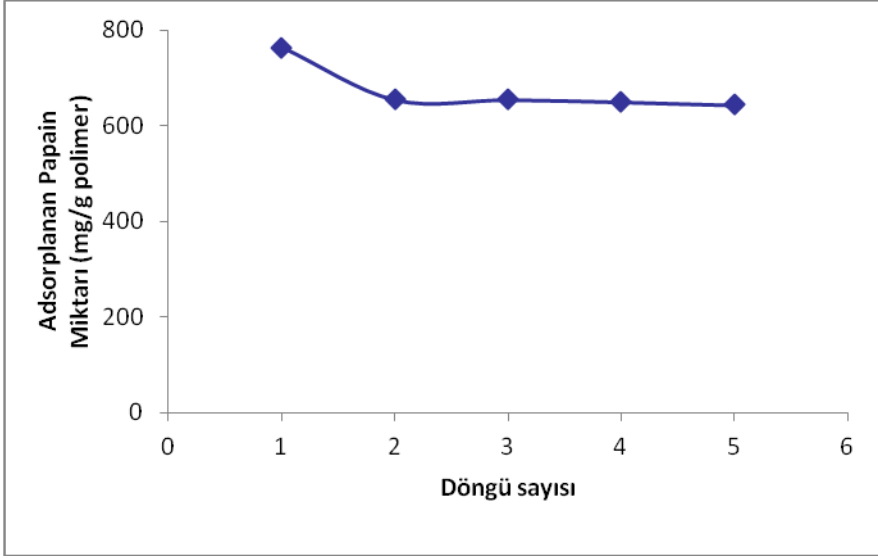
Çizelge 4.1. Langmuir ve Freundlich izotermelerinin kinetik sabitleri

Langmuir			Freundlich		
$q_{\max}$ (mg/g)	b (mL/mg)	$R^2$	$K_f$ (mg/mL)	1/n	$R^2$
900.90	2.3127	0.8687	564.677	0.4716	0.950

Şekil 4.12 ve 4.13'deki adsorpsiyon izotermi grafiklerinin korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında deneysel verilerin Freundlich izotermine uygun olduğu görülmektedir. Freundlich izotermi genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanır ve çok tabakalı bağlanmayı ifade eder.

#### 4.2.6. Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA-GMA) Polimerinden Papain 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 papain enziminin Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) nanoyapılarına adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyonu işlemleri 5 döngü boyunca tekrar edilmiştir. Desorpsiyon oranı % 83.0 olarak bulunmuştur. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi 5 döngü boyunca adsorplanan papain miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir. Bu sonuçlar hazırlanan boya ligand desteğinin bir afinite adsorbantı olarak kararlılığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



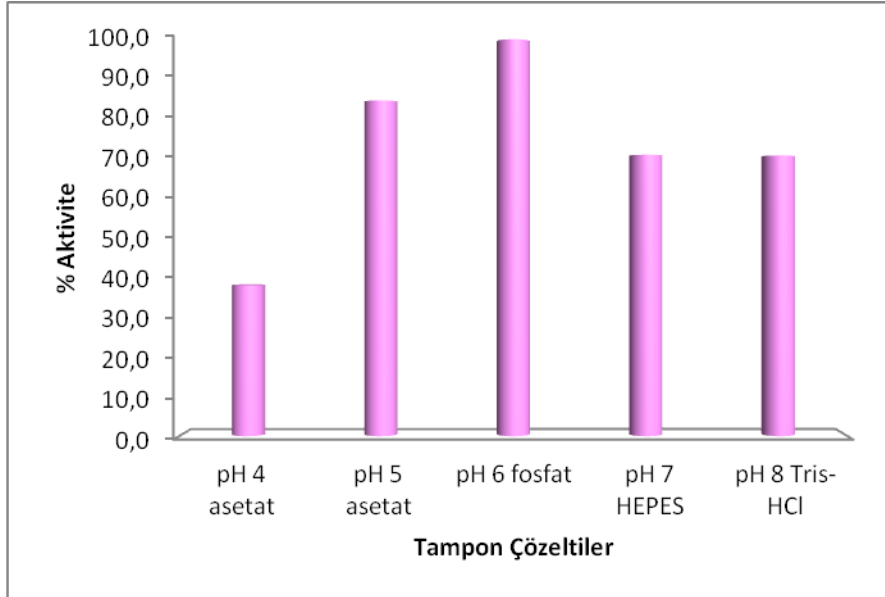
Şekil 4.14. Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerinin papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç papain derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; inkübasyon süresi: 2 saat

### 4.3. Papain Aktivitesi Ölçümü

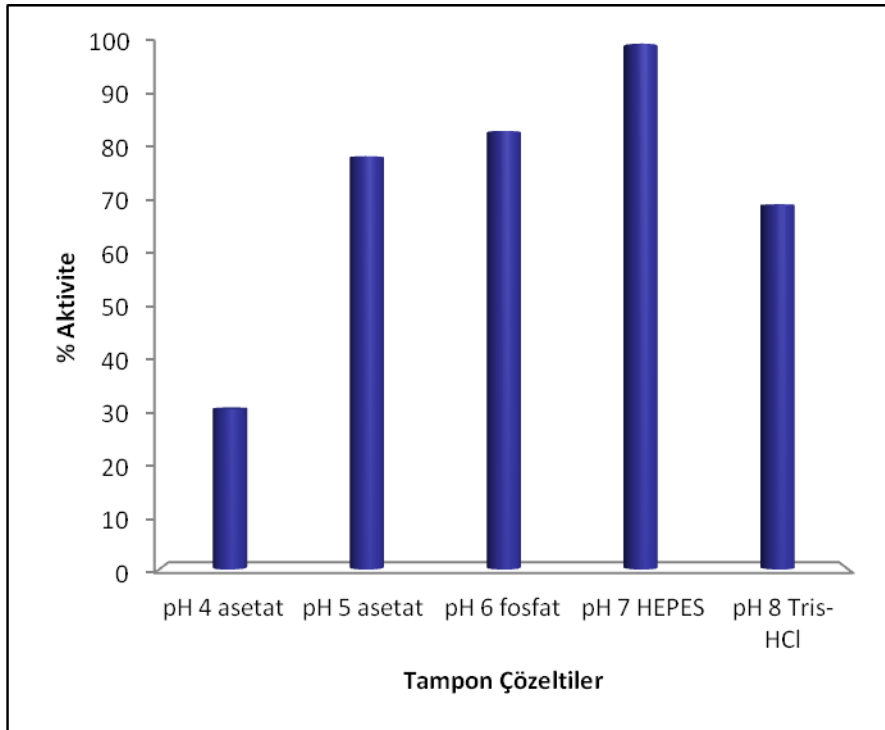
#### 4.3.1. Serbest ve İmmobilize Papain Enziminin Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize papain aktivitesine pH'ın etkisi asetat (pH 4.0-5.0), fosfat (pH 6.0), HEPES (pH 7.0) ve Tris-HCl (pH 8.0) tamponları ile incelenmiştir. Bu amaçla kazein substratı kullanılmış ve 25 °C'de papain aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pH grafikleri Şekil 4.15 ve 4.16'da gösterilmiştir. Grafikler incelendiğinde serbest papain için optimum pH'a pH 6.0 fosfat tamponu ile ulaşılırken, immobilize papain için optimum pH'a pH 7.0 HEPES tamponu ile ulaşılmaktadır.





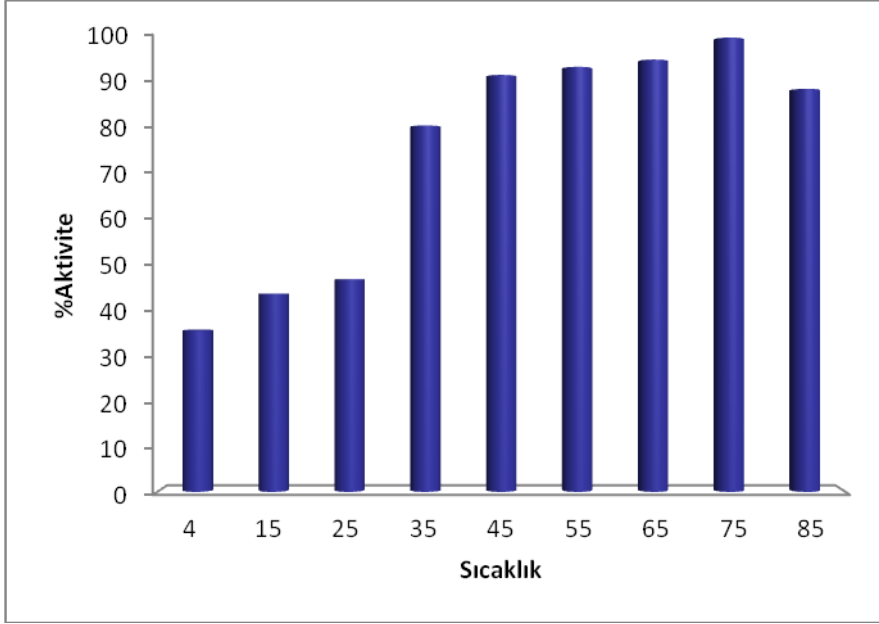
Şekil 4.15. Serbest papain aktivitesine pH'ın etkisi



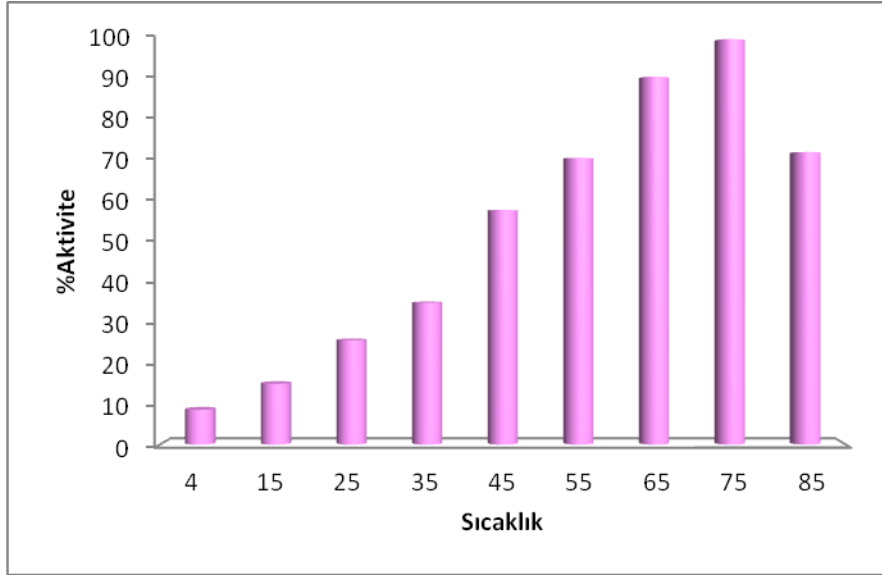
Şekil 4.16. İmmobilize papain aktivitesine pH'ın etkisi

### 4.3.2. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize papain enzimlerinin aktivitesi 4-85 °C arasında 9 farklı sıcaklıkta incelenmiştir. Şekil 4.17 ve 4.18 sırasıyla serbest ve immobilize papain aktivitesine sıcaklığın etkisini göstermektedir. Grafikler incelendiğinde serbest ve immobilize papain için optimum sıcaklık 75 °C olarak bulunmuştur.



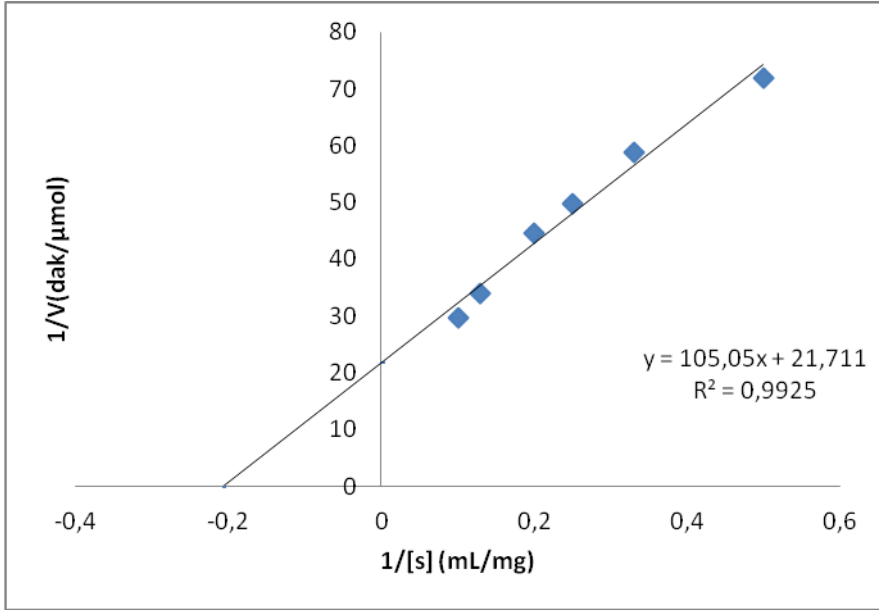
Şekil 4.17. Serbest papain aktivitesine sıcaklığın etkisi



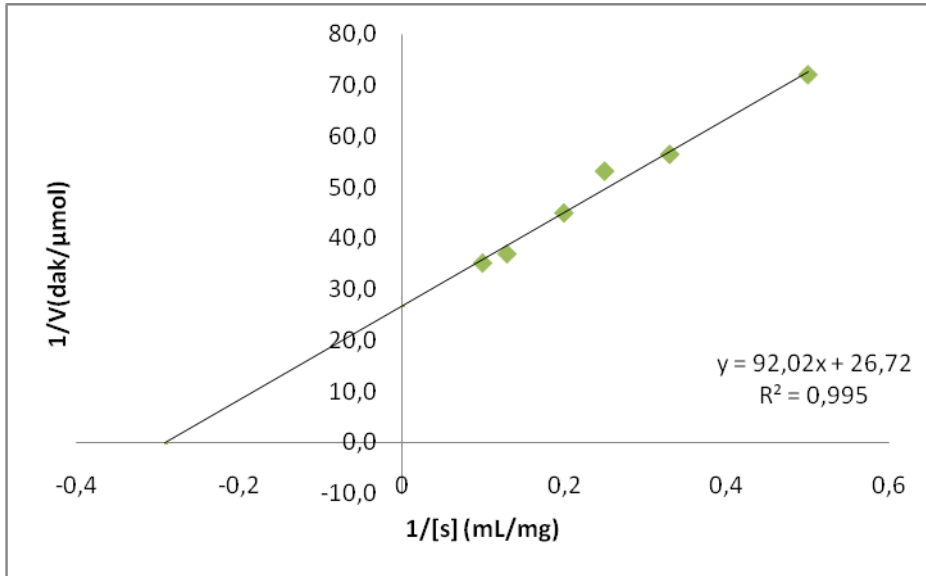
Şekil 4.18. İmmobilize papain aktivitesine sıcaklığın etkisi

#### 4.3.3. Serbest ve İmmobilize Papain Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Enzim immobilizasyon etkinliğinin belirlenmesinde serbest ve immobilize enzimin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması oldukça yararlıdır. Bu çalışmada serbest ve immobilize papain enzimlerinin kinetik parametreleri olan Michaelis sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) kazein substratı kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.19 ve 4.20’de sırasıyla serbest ve immobilize papain için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri ve Çizelge 4.2’de ise bu veriler kullanılarak belirlenen kinetik sabitler görülmektedir.  $K_m$  bir enzimin substrata olan ilgisi olarak bilinir (Park vd., 2005) ve immobilizasyondan sonra genellikle  $K_m$ ’de bir artış beklenir. Bu çalışmada zıt bir durum yani  $K_m$ ’de azalma görülmektedir.  $V_{max}$ , enzimin tümü substratına doymuş olduğundaki olası en yüksek hızdır ve bu parametre immobilize enzimin gerçek özelliklerini yansıtır (Reshmi vd., 2007). Bu çalışmada  $V_{max}$ ’ın düştüğü görülmektedir.  $k_{cat}$ , turnover sayısı olarak bilinir ve bir enzimin immobilizasyonla olan davranışını değerlendirmede yararlıdır. Bu çalışmada serbest papain için  $k_{cat}$  değeri  $21.5 \text{ dak}^{-1}$  bulunurken immobilize papain için  $1.1 \text{ dak}^{-1}$  bulunmuştur.



Şekil 4.19. Serbest papain için Lineweaver-Burk grafiği



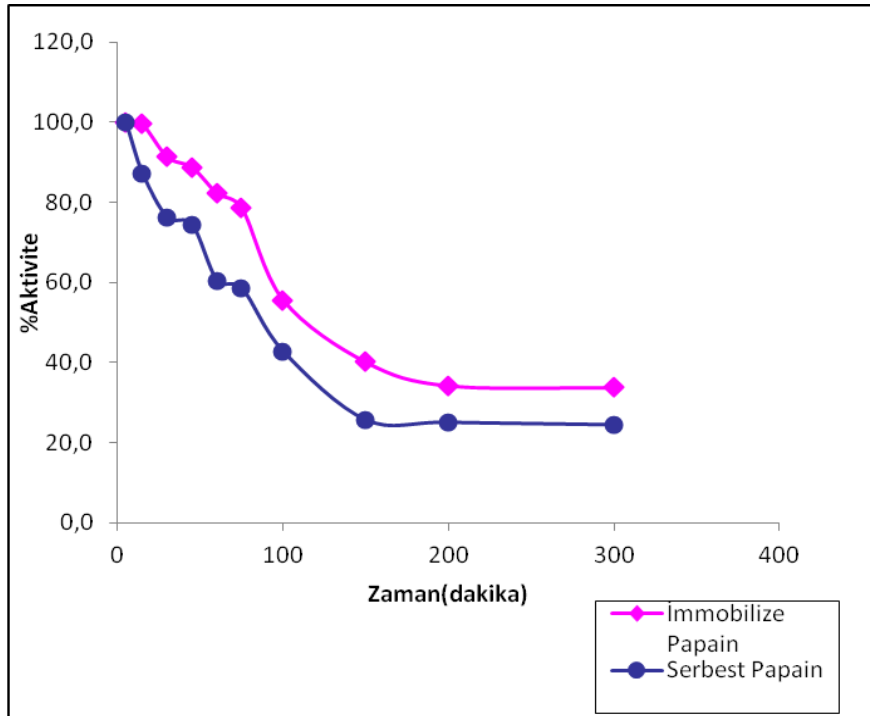
Şekil 4.20. İmmobilize papain için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize papainin kinetik sabitleri

	$K_m$ (mg/mL)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dak}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{dak}^{-1}$ )
Serbest enzim	4.815	0.046	21.5
İmmobilize enzim	3.425	0.037	1.1

#### 4.3.4. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

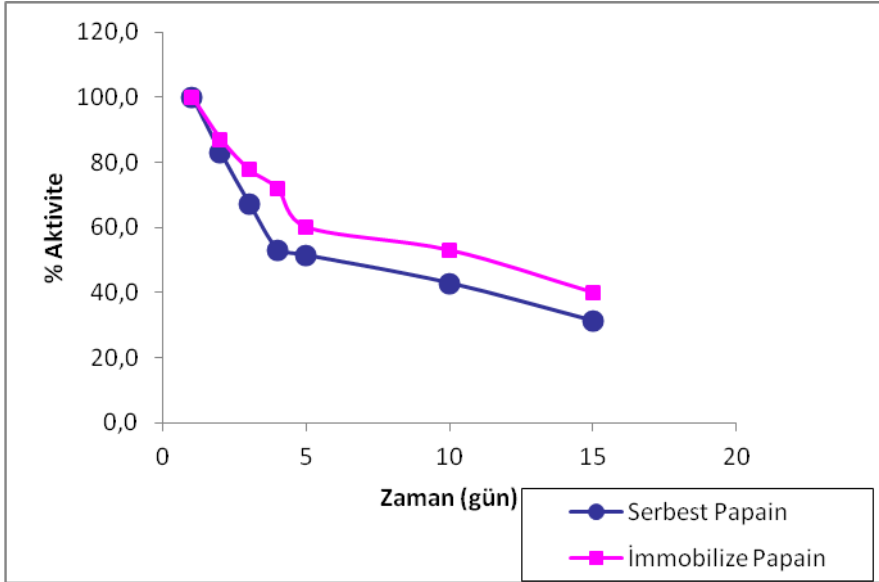
Serbest ve immobilize papainin kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.21’de gösterilmiştir. 75 °C’de 300 dakika boyunca ısıyla muamele edildikten sonra serbest papain başlangıç aktivitesinin % 24.4’ünü korurken, immobilize papain % 33.7’sini korumuştur. Bu grafikten immobilize papainin 75 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta bile kararlılığını koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.21. Serbest ve immobilize edilmiş papain aktivitesinin 75 °C’de zamana bağlı olarak değişimi

#### 4.3.5. Serbest ve İmmobilize Papain Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi

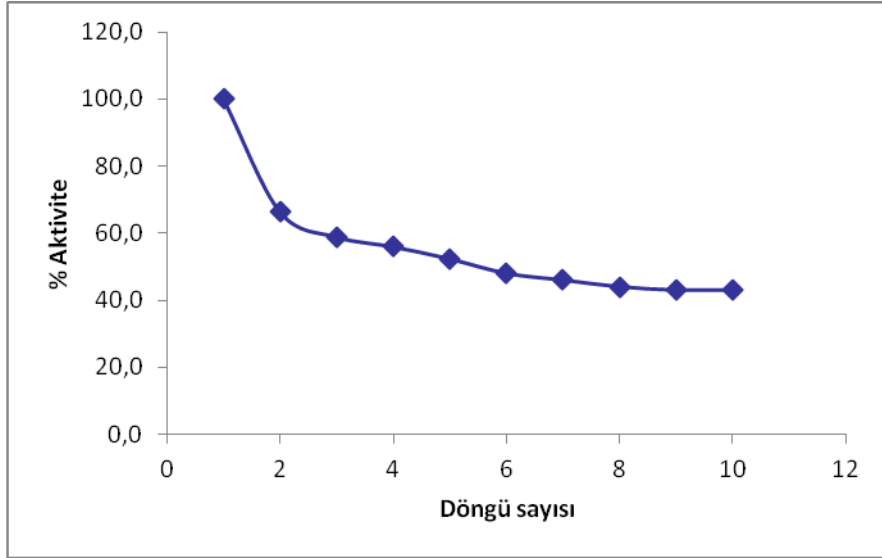
Serbest ve immobilize papain enzimleri 4 °C'de 15 gün boyunca saklanmış ve aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelenmiştir. Şekil 4.22 incelendiğinde immobilize papainin serbest papaine kıyasla zamana bağlı olarak kararlılığının daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.22. Serbest ve immobilize papain enzimlerinin depo kararlılığı. Sıcaklık: 4 °C

#### 4.3.6. İmmobilize Papain Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize enzimlerin işlemsel kararlılığı, seçilen taşıyıcının ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Bu çalışmada immobilize papain enziminin 25 °C'de ard arda aktivite ölçümü yapılarak işlemsel kararlılığı incelenmiştir. İmmobilize papain enzimi 10 döngüden sonra aktivitesinin % 43'ünü korumuştur (Şekil 4.23). Bu sonuç immobilize papainin defalarca kullanılabilirliğini göstermektedir.



Şekil 4.23. İmmobilize papain enziminin işlemsel kararlılığı

#### 4.4. İmmobilize Papainin Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması

İmmobilize papainin kullanılabilirliğinin bir ölçüsü olarak farklı proteinlerin (kazein, BSA, IgG ve sitokrom C) enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiş ve immobilize papainin etkinliği serbest papainle karşılaştırılmış ve Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Çizelge 4.3 incelendiğinde immobilize papainin en yüksek katalitik aktiviteyi IgG proteini üzerinde gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.3. İmmobilize papainin etkinliğinin incelenmesi

Protein	Serbest papain etkinliği	İmmobilize papain etkinliği
<b>Kazein</b>	100	64.1
<b>BSA</b>	100	73.9
<b>IgG</b>	100	78.9
<b>Sitokrom C</b>	100	76.0

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada, papain enziminin manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu ve proteinlerin enzimatik hidrolizinde kullanımı incelenmiştir.

Cibacron Blue F3GA boyasının mag-nano-p(HEMA-GMA) polimerik yapısına katıldığı FTIR ve SEM-EDX sonuçları ile görülmüştür. Sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özellik kazandığı ESR ölçümleri ile saptanmıştır. SEM ve AFM fotoğrafları ile sentezlenen manyetik nanopartiküllerin küresel yapıda ve nonporöz olup yaklaşık 200 nm boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllere katılan Cibacron Blue F3GA boyasının miktarı SEM'da EDX analizi ile değerlendirilmiş ve 173.96  $\mu\text{mol/g}$  polimer olarak hesaplanmıştır.

Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) nanopartiküllerine papain adsorpsiyonu farklı tampon çözeltilerinde (pH 4.0-5.0 asetat, pH 6.0-7.0 fosfat, pH 6.0-7.0 MOPS, pH 7.0-8.0 HEPES, pH 6.0- MES, pH 7.0-8.0 Tris-HCl) incelenmiş ve maksimum papain adsorpsiyonu pH 7.0 HEPES tamponunda 764.0 g/mg polimer olarak bulunmuştur.

Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) nanopartiküllerine papain adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-85 °C aralığında incelenmiş ve adsorplanan papain miktarının 25 °C'ye kadar arttığı, 25 °C'den yüksek sıcaklıklarda azaldığı gözlenmiştir.

İyonik şiddetin etkisi, farklı derişimlerdeki NaCl çözeltileri kullanılarak incelenmiş ve tuz derişiminin artmasıyla adsorplanan papain miktarının azaldığı gözlenmiştir.

Cibaron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) nanopartiküllerine papain adsorpsiyonuna ilişkin izotermeler (Langmuir ve Freundlich) değerlendirildiğinde, Freundlich adsorpsiyon izotermine uygunluğu görülmüştür.

Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA-GMA) nanopartiküllerinden papain enziminin desorpsiyonu pH 4.0 asetat tamponunda hazırlanan 1,0 M NaCl ile gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon oranı % 83.0 olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri 5 döngü boyunca tekrarlanılarak adsorplanan papain miktarında önemli bir azalma olmadığı gözlenmiştir.



Serbest ve immobilize papain aktivitesine pH'ın etkisi asetat (pH 4.0-5.0), fosfat (pH 6.0), HEPES (pH 7.0) ve Tris-HCl (pH 8.0) tamponları ile incelenmiştir. Serbest papain için optimum pH'a pH 6.0 fosfat tamponu ile ulaşılrken, immobilize papain için optimum pH'a pH 7.0 HEPES tamponu ile ulaşılmıştır.

Serbest ve immobilize papain aktivitesine sıcaklığın etkisi 4-85 °C arasında incelenmiştir. Serbest ve immobilize papainin optimum sıcaklığı 75 °C olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize papain için  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 21.5  $dak^{-1}$  ve 1.1  $dak^{-1}$  olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize papainin ısı kararlılıkları 75 °C'de 300 dakika boyunca izlenmiştir. İmmobilize papainin ısı kararlılığının serbest papaininkinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Serbest ve immobilize papainin depo kararlılığı 15 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak gözlemlenmiştir. Onbeş gün sonunda immobilize papainin serbest papaine kıyasla zamana bağlı olarak kararlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür. İmmobilize papainin işlemsel kararlılığı 10 döngü boyunca aktivite ölçümleri yapılarak incelenmiştir. İmmobilize papain enzimi 10 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 43'ünü korumuştur.

İmmobilize papainin kullanılabilirliğinin bir ölçüsü olarak farklı proteinlerin (kazein, BSA, IgG ve sitokrom C) enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiş ve papainin en yüksek katalitik aktiviteyi IgG proteini üzerinde gösterdiği gözlenmiştir.

Manyetik nanopartiküller yüksek spesifik yüzey alanları nedeniyle daha fazla enzim bağlanmasına izin verirler ve bir manyetik alan altında reaksiyon ortamından ayrılabilirler. Enzim immobilizasyon desteği olarak manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı bu çalışmanın biyoteknolojik açıdan literatüre önemli yararlar sağlaması beklenmektedir. Bu çalışmada hazırlanan immobilize papain gıda, deri, kozmetik, tekstil, deterjan ve farmosötik endüstrilerinde rahatlıkla kullanılabilir ve ekonomik açıdan büyük yararlar sağlanabilir. Ayrıca gerçekleştirilen immobilizasyon yönteminin geri dönüşümlü olması *Carica papaya* lateksi gibi bir kaynaktan papain saflaştırılmasına olanak vermektedir. Böylece endüstriyel önemi olan bir enzim, ucuz olarak hazırlanan bir destek ile kolayca saflaştırılabilir ve kullanılabilir.



## KAYNAKLAR

- Amri, E., Mamboya, F. 2012. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 8: 99-104.
- Ansari, S.A., Husain, Q. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. **Biotechnology Advances**, 30: 512-523.
- Bahrami, A., Hejazi, P. 2013. Electrostatic immobilization of pectinase on negatively charged AOT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 93: 1-7.
- Bayramoglu, G., Senkal, B.F., Yilmaz, M., Arica, M.Y. 2011. Immobilization and stabilization of papain on poly(hydroxyethyl methacrylate-ethylenglycol dimethacrylate) beads grafted with epoxy functional polymer chains via surface-initiated-atom transfer radical polymerization (SI-ATRP). **Bioresource Technology**, 102: 9833-9837.
- Bian, W., Yan, B., Shi, N., Qiu, F., Lou, L.L., Qi, B., Liu, S. 2012. Room temperature ionic liquid (RTIL)-decorated mesoporous silica SBA-15 for papain immobilization: RTIL increased the amount and activity of immobilized enzyme. **Materials Science and Engineering C**, 32: 364-368.
- Chen, T-X., Nie, H-L., Li, S-B., Branford-White, C., Su, S-N., Zhu, L-M. 2009. Comparison: adsorption of papain using immobilized dye ligands on affinity membranes. **Colloids and Surfaces B**, 72: 25-31.
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotechnology**, 3: 1-9.
- Denizli, A., Pişkin, E. 2001. Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 49: 391-416.
- D'Souza, F., Lali, A. 1999. Purification of papain by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) on chelating carboxymethyl cellulose. **Biotechnology Techniques**, 13: 59-63.

- Ghosh, S. 2005. Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium. **Colloids and Surfaces A**, 264: 6-16.
- Homaei, A.A., Sajedi, R.H., Sariri, R., Seyfzadeh, S., Stevanato, R. 2010. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. **Amino Acids**, 38: 937-942.
- Huang, S-H., Juang, R-S. 2011. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. **Journal of Nanoparticle Research**, 13: 4411-4430.
- Kaya, N. 2012. Manyetik Boya-Ligand Afinite Nanoyapılarını Kullanarak *Saccharomyces cerevisiae*'den Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Kembhavi, A.A., Kulkarni, A., Pant, A. 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 38: 83-92.
- Lei, H., Wang, W., Chen, L-L., Li, X-C., Yi, B., Deng, L. 2004. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 15-21.
- Li, F-Y., Xing, Y-J., Ding, X. 2007. Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method. **Enzyme and Microbial Technology**, 40: 1692-1697.
- Liya, Z., Cui, W., Yanjun, J., Jing, G. 2013. Immobilization of papain in biosilica matrix and its catalytic property. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 21: 670-675.
- Llerena-Suster, C.R., Priolo, N.S., Morcelle, S.R. 2011. Sodium tetrathionate effect on papain purification from different *Carica papaya* latex crude extracts. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 41: 107-121.

- Mahmoud, K.A., Lam, E., Hrapovic, S., Luong, J.H.T. 2013. Preparation of well-dispersed gold/magnetite nanoparticles embedded on cellulose nanocrystals for efficient immobilization of papain enzyme. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 5: 4978-4985.
- Martins, M.C.L., Naeemi, E., Ratner, B.D., Barbosa, M.A. 2003. Albumin adsorption on Cibacron Blue F3GA immobilized onto oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 14: 945-954.
- Menard, R., Khouri, H.E., Plouffe, C., Dupras, R., Ripoll, D., Vernet, T., Tessier, D.C., Laliberte, F., Thomas, D.Y., Storer, A.C. 1990. A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. **Biochemistry**, 29: 6706-6713.
- Mohan, D., Pittman, C.U.Jr., Steele, P.H. 2006. Single, binary and multicomponent adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin-a biosorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, 115: 489-504.
- Monti, R., Basilio, C.A., Trevisan, H.C., Contiero, J. 2000. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 43: 501-507.
- Mosafa, L., Moghadam, M., Shahedi, M. 2013. Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: preparation, characterization and application in the fruit juice clarification. **Chinese Journal of Catalysis**, 34: 1897-1904.
- Nie, H-L., Zhu., L-M. 2007. Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 40: 261-267.
- 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.

- 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.
- Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P. 2000. Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum. **Biotechnology Letters**, 22: 1571-1575.
- Proctor, A., Toro-Vaquez, I.F. 1996. The Freundlich isotherm in studying adsorption in oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 73: 1627-1633.
- Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S. 2007. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on zirconia: a heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. **Catalysis Communications**, 8: 393-399.
- Roy, J.J., Sumi, S., Sangeetha, K., Abraham, T.E. 2005. Chemical modification and immobilization of papain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 80: 184-188.
- Sabbani, S., Hedenström, E., Nordin, O. 2006. The enantioselectivity of *Candida rugosa* is influenced by the particle size of the immobilizing support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 42: 1-9.
- Sahoo, B., Sahu, S.K., Bhattacharya, D., Dhara, D., Pramanik, P. 2013. A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 101: 280-289.
- Salas, C.E., Gomes, M.T.R., Hernandez, M., Lopes, M.T.P. 2008. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, 69: 2263-2269.
- Solis, S., Paniagua, J., Martinez, J.C., Asomoza, M. 2006. Immobilization of papain on mesoporous silica: pH effect. **Journal of Sol-Gel Science Technology**, 37: 125-127.

- Su, S-N., Nie, H-L., Zhu, L-M., Chen T-X. 2009. Optimization of adsorption conditions of papain on dye affinity membrane using response surface methodology. **Bioresource Technology**, 100: 2336-2340.
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology Biotechnology**, 44: 211-220.
- Tsuge, H., Nishimura, T., Tada, Y., Asao, T., Turk, D., Turk, V., Katunuma, N. 1999. Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 266: 411-416.
- Uygun, D.A. 2008. Protein Saflaştırılması İçin Magnetik Nano Yapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Uygun, D.A., Akduman, B., Uygun, M., Akgöl, S., Denizli, A. 2012. Purification of papain using Reactive Green 5 attached supermacroporous monolithic cryogel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 167: 552-63.
- Vasconcellos, F.C., Goulart, G.A.S., Beppu, M.M. 2011. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, 205: 65-70.
- Verma, M.L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C.J., Puri, M. 2013. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis. **Biosource Technology**, 135: 2-6.
- Xiao, H-Y., Huang, J., Lui, C., Jiang, D-S. 2006. Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, 16: 414-418.
- Xie, W., Ma, N. 2010. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass and Bioenergy**, 34: 890-896.

- Yusdy, Patel, S.R., Yap, M.G.S., Wang, D.I.C. 2009. Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. **Biochemical Engineering Journal**, 48: 13-21.
- Zhao, G., Li, Y., Wang, J., Zhu, H. 2011. Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic carbon nanotubes functionalized with dendrimer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 91: 591-601.
- Zhou, H., Li, W., Shou, Q., Gao, H., Xu, P., Deng, F., Liu, H. 2012. Immobilization of Penicillin G Acylase on magnetic nanoparticles modified by ionic liquids. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 20: 146-151.



## **ÖZGEÇMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı: Pelin ALPAY

Doğum Yeri ve Tarihi: İZMİR/1989

### **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) Yayınlar:**

-SCI

-Diğer

#### **b) Bildiriler:**

-Ulusal

1. Alpay, P., Sunna, Ç., Yavaşer, R., Karagözler, A.A. Salatalık özütlerinde antioksidan aktivite araştırması. Kozmetik Kongresi 2013, Antalya, 15-17 Şubat 2013 (Poster).

2. Alpay, P., Karagözler, A.A. Doğal polimerlerin ilaç salım sistemleri olarak kullanımının değerlendirilmesi. İlaç Kongresi 2013, Antalya, 29-31 Mart 2013 (Poster).

3. Alpay, P., Uygun, D.A., Akgöl, S., Denizli, A. Manyetik nanopartiküllere papain immobilizasyonu. 1. Ege Nanoteknoloji Günleri, İzmir, 18-19 Nisan 2013 (Poster).

#### **-Uluslararası**

#### **c) Katıldığı Projeler:**

1. “Manyetik Nanopartiküllere Papain Enziminin Immobilizasyonu ve Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanımı”. ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-13019. Proje araştırmacısı.

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : SunExpress 2013

## **İLETİŞİM**

E-posta Adresi : [pelinalpay1@gmail.com](mailto:pelinalpay1@gmail.com)

Tarih : 20.01.2014