



FERROSEN KÜPELİ ÇİTOSANIN ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Fatma HAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2020

Fatma HAN tarafından hazırlanan “FERROSEN KÜPELİ ÇİTOSANIN ENZİM İMMOBİLİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nurşen SARI

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan: Prof. Dr. Ayla BALABAN GÜNDÜZALP

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye: Doç. Dr. Dilek NARTOP

Polimer Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Düzce Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 11/06/2020

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

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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



Fatma HAN

11/06/2020

FERROSEN KÜPELİ ÇİTOSANIN ENZİM İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma HAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2020

ÖZET

Bu çalışmada; doğal bir polimer olan çitosan ile ferrosenkarboksaldehit arasındaki katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda Schiff bazı oluşarak, ferrosenkarboksaldehit çitosana bağlanmıştır (CS-Fc-ald). Sentezlenen ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosanın yapısı FT-IR, katı ¹³C-NMR, elementel analizi (C,H,N), SEM/EDX ve TGA ile aydınlatılmıştır. Ayrıca zeta potansiyel ölçüm cihazı ile parçacık boyut analizi, dört nokta iletkenlik ölçüm tekniği ile katı hal iletkenlik ölçüm değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, sentezlenen (CS-Fc-ald)'e lipaz ve pepsin enzimlerinin immobilize edilmesi ile (CS-Fc-ald-Lip, CS-Fc-ald-Pep) hazırlanan immobilize desteklerin ayrı ayrı ve bir aradayken oluşan çift enzim (CS-Fc-ald-Lip+CS-Fc-ald-Pep)'lerin optimum pH, optimum sıcaklık, tekrar kullanım sayısı, depolama kararlılığı ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. Immobilize lipaz ve immobilize pepsinin optimum pH'ları sırasıyla; 9 ve 4, optimum sıcaklıkları sırasıyla; 50°C ve 60°C olarak bulunmuştur. Çift enzim immobilizasyon çalışmasında optimum pH ve sıcaklıklarda değişiklikler gözlenmemiştir. Serbest lipaz ve serbest pepsin enzimlerinin K_m/V_{max} oranları sırasıyla; 0,0071 ve 0,1129 iken, çift enzim immobilizasyonundaki lipazın ve pepsinin K_m/V_{max} oranları sırasıyla; 0,0847 ve 0,4666 olarak belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20103
Anahtar Kelimeler : Çitosan, Ferrosen, Pepsin, Lipaz, Çift enzim immobilizasyonu
Sayfa Adedi : 64
Danışman : Prof. Dr. Nurşen SARI

INVESTIGATION OF ENZYME IMMOBILIZATION OF FERROCENE ATTACHED CHITOSAN

(M. Sc. Thesis)

Fatma HAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2020

ABSTRACT

In this study; as a result of the condensation reaction between chitosan, which is a natural polymer, and ferrocenecarboxaldehyde, Schiff base has been formed and ferrocenecarboxaldehyde is attached to chitosan (CS-Fc-ald). Ferrocene attached chitosan is characterized by means of FT-IR, solid ^{13}C -NMR, elemental analysis (C, H, N), SEM / EDX, TGA. Furthermore, the particle size and size distribution are determined by ZetaSizer. Solid state conductivity measurement values were determined with four point conductivity measurement technique. Later, lipase and pepsin enzymes were immobilized to the synthesized (CS-Fc-ald). The optimum pH, optimum temperature, reuse number, storage stability and kinetic parameters of the immobilized enzymes were determined both separately (CS-Fc-ald-Lip, CS-Fc-ald-Pep) and together (CS-Fc-ald-Lip+CS-Fc-ald-Pep). The optimum pH values of immobilized lipase and immobilized pepsin are; 9 and 4, and optimum temperatures; it was found as 50 °C and 60 °C. Changes in optimum pH and temperatures in the double enzyme immobilization study were not observed. $K_m/V_{\max}$ ratios of free lipase and free pepsin enzymes are; While 0.0071 and 0.1129, the $K_m/V_{\max}$ ratios of lipase and pepsin in double enzyme immobilization, respectively; It has been determined as 0.0847 and 0.4666.

Science Code : 20103

Key Words : Chitosan, Ferrocene, Pepsin, Lipase, Double enzyme immobilization

Page Number : 64

Supervisor : Prof. Dr. Nurşen SARI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her konuda desteğini, bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen sevgili hocam sayın Prof. Dr. Nurşen SARI'ya, fizikokimya araştırma laboratuvarının kapılarını açıp destek veren sayın Prof. Dr. Bekir SARI ve Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL hocalarıma, biyokimya çalışmalarımda güçlü yorumları ile beni aydınlatan sevgili Prof. Dr. Fatma ARSLAN hocama, bana güvendiğini söyleyip analitik kimya araştırma laboratuvarının anahtarını vererek laboratuvar imkanlarını sunan Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN'a, Öğr. Gör. Dr. Elvan HASANOĞLU ÖZKAN'a, Kimya Bölümünde çalışmalarına ve disiplinine inanıp, güvenip destek veren tüm değerli hocalarıma, arkadaşlarıma ve hayatımın her aşamasında yanımda olan canım aileme özellikle baş tacım sevgili anneciğim Türkan HAN'a sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Bilim yolunda ilerleyeceğime söz verdiğim günden itibaren yüksek lisans çalışmalarım kapsamında ve sonrasındaki aşamalarımda tüm dürüstlük ve titizliğimle saygıdan, çalışmaktan asla vazgeçmeyecek bir Fatma HAN olduğum için kendime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Çitosan (CS) ve Özellikleri	3
2.1.1. Çitosan (CS) üzerine uygulamalar	4
2.2. Ferrosen (Fc) ve Özellikleri.....	7
2.2.1. Ferrosen (Fc) ile modifiye edilmiş çalışmalar	9
2.2.2. Ferrosen-çitosan-enzim üzerine yapılmış çalışmalar	10
2.3. Enzimler.....	10
2.4. Enzim İmmobilizasyonu	11
2.5. Enzim Kinetiği	12
2.6. Çift Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Yapılmış Çalışmalar	14
2.7. Pepsin Enzimi.....	14
2.8. Lipaz Enzimi	14
2.9. Pepsin ve Lipaz Enzimleri İle Yapılmış Çalışmalar	15

Sayfa

3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	17
3.1.1. Kimyasal maddeler	17
3.1.2. Cihazlar	18
3.2. Hazırlanan Çözeltiler	20
3.3. Ferrosenkarboksaldehit Takılı Çitosanın (CS-Fc-ald) Hazırlanması.....	21
3.3.1. CS-Fc-ald'in hazırlanması.....	21
3.4. CS-Fc-ald'e Pepsin ve Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Optimizasyonu.....	22
3.4.1. İmmobilize pepsin ve serbest pepsin enziminin aktifliğine pH etkisi	22
3.4.2. İmmobilize pepsin ve serbest pepsin enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi	22
3.4.3. İmmobilize pepsin enziminin depolama kararlılığı	23
3.4.4. İmmobilize lipaz ve serbest lipaz enziminin aktifliğine pH etkisi	23
3.4.5. İmmobilize lipaz ve serbest lipaz enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi.....	24
3.4.6. İmmobilize lipaz enziminin depolama kararlılığı	24
3.5. CS-Fc-ald'e Çift Enzimin (Pepsin ve Lipaz) İmmobilizasyonu, Optimizasyonu	25
3.5.1. Çift enzim aktifliğine pH etkisi	25
3.5.2. Çift enzim aktifliğine sıcaklık etkisi	26
3.5.3. Çift enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi	26
3.5.4. Çift enzimin tekrar kullanılabilirliği	27
3.5.5. Çift enzimin depolama kararlılığı	28
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
4.1. Fiziksel, Kimyasal ve Spektral Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	29
4.2. Serbest ve İmmobilize Pepsin ve Lipaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar	43

	Sayfa
4.2.1. Serbest ve immobilize pepsinin aktifliğine pH etkisi.....	43
4.2.2. Serbest ve immobilize pepsinin aktifliğine sıcaklık etkisi.....	44
4.2.3. İmmobilize pepsinin depolama kararlılığı.....	45
4.2.4. Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine pH etkisi.....	46
4.2.5. Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine sıcaklık etkisi.....	46
4.2.6. İmmobilize lipazın depolama kararlılığı	47
4.3. Çift Enzimin (Pepsin ve Lipaz) İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar	48
4.3.1. Çift enzim aktifliğine pH'nın etkisi	48
4.3.2. Çift enzim aktifliğine sıcaklığın etkisi	48
4.3.3. Çift enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	49
4.3.4. Çift enzimin tekrar kullanılabilirliği.....	51
4.3.5. Çift enzimin depolama kararlılığı	51
4.4. Sonuçların Değerlendirilmesi	52
4.5. Öneriler	54
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	59
EK-1. Bilimsel Uluslararası Kongrede Basılan Bildiri.....	60
EK-2. Bilimsel Uluslararası Kongrede Kabul Alan Bildiri	62
ÖZGEÇMİŞ	64

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kimyasal listesi.....	17
Çizelge 4.1. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'in M_w ve element analiz yüzdeleri	30
Çizelge 4.2. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald maddelerinin katı hal iletkenlik ölçüm değerleri ve pelletlerin görüntüleri.....	31
Çizelge 4.3. CS ve CS-Fc-ald'in Zetasizer analizlerine göre boyut karşılaştırması	32
Çizelge 4.4. CS, Fc-ald, CS-Fc-ald, CS-Fc-ald-Lip ve CS-Fc-ald-Pep'in FT-IR spektrumları	34
Çizelge 4.5. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'e ait katı ^{13}C -NMR spektrumları	37
Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize edilen pepsin için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri	45
Çizelge 4.7. Serbest ve immobilize edilen lipaz için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri	47
Çizelge 4.8. Serbest ve çift immobilize edilmiş ortamlardaki kinetik parametreler.....	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kitin ve Çitosanın kimyasal yapısı : a) Kitin b) Çitosan	3
Şekil 2.2. Çitosanın <i>Pto</i> DC3000 'e karşı domates fidelerinde bakteriyel yerleşmesi ...	5
Şekil 2.3. Ferrosen (Fc) bazlı çitosanın sentezi	9
Şekil 2.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.5. Enzimatik bir reaksiyonun şematik gösterimi	12
Şekil 2.6. Michaelis-Menten grafiği	13
Şekil 2.7. Lineweaver-Burk grafiği	13
Şekil 2.8. Çitosan ile aşılannmış polianilin kriyojeli	14
Şekil 2.9. Poli(metilmetakrilat) mikrokürelerini akrilaldehit ile modifiye ettikten sonra pepsin enziminin immobilizasyonu reaksiyonun şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.10. Pepsin enzimi ile immobilize olan PGM-CHO monolitinin hazırlanışı.....	16
Şekil 4.1. Hazırlanan standartlar (Fe^{2+}) ve (CS-Fc-ald) örneğindeki demir iyonunun kalibrasyon grafiği	30
Şekil 4.2. Element analiz sonuçlarına göre öngörülen yapı: çitosan (A) ve ferrosenkarboksaldehit takılı çitosan (B)	31
Şekil 4.3. CS ve CS-Fc-ald boyutu - saçılan ışık yoğunluğu (%) grafikleri.....	32
Şekil 4.4. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'e ait FT-IR spektrumları.....	33
Şekil 4.5. Pep ve CS-Fc-ald-Pep'e ait FT-IR spektrumları	34
Şekil 4.6. Lip ve CS-Fc-ald-Lip'e ait FT-IR spektrumları	35
Şekil 4.7. Katı ^{13}C -NMR spektrumlarının görüntüleri : CS (a) , Fc-ald (b) ve CS-Fc-ald (c).....	37
Şekil 4.8. CS ve CS-Fc-ald'e ait TGA eğrileri: CS (a), CS-Fc-ald (b).....	38
Şekil 4.9. CS (a) ve Fc-ald'nin (b) EDX spektrumları	42
Şekil 4.10. CS-Fc-ald'in EDX spektrumu	42

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. CS-Fc-ald-Pep (a) ve CS-Fc-ald-Lip'in (b) EDX spektrumları	43
Şekil 4.12. Enzim aktifliğine pH etkisi: Serbest pepsin (a), CS-Fc-ald'e immobilize edilen pepsin (b).....	44
Şekil 4.13. Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Serbest pepsin (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen pepsin	44
Şekil 4.14. İmmobilize pepsinin zamana bağlı gösterdiği bağlı aktiflik: CS-Fc-ald'e immobilize pepsin.....	45
Şekil 4.15. Enzim aktifliğine pH etkisi: Serbest lipaz (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen lipaz	46
Şekil 4.16. Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Serbest lipaz (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen lipaz.....	46
Şekil 4.17. İmmobilize lipazın zamana bağlı gösterdiği bağlı aktiflik: CS-Fc-ald'e immobilize lipaz.....	47
Şekil 4.18. Çift enzim aktifliğine pH etkisi: çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+ (CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin (a), çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+ (CS-Fc-ald-Lip) varlığında lipaz (b).....	48
Şekil 4.19. Çift enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+ (CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin (a), çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+ (CS-Fc-ald-Lip) varlığında lipaz (b)	49
Şekil 4.20. Çift enzim varlığında enzimlerin aktifliğine substrat derişiminin etkisi: çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin (a), çift enzim (CS-Fc-ald- Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında lipaz (b)	50
Şekil 4.21. Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsinin (a) ve lipazın (b) tekrar kullanılabilirliği.....	51
Şekil 4.22. Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsinin (a) ve lipazın (b) zamana bağlı gösterdiği bağlı aktiflik	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. CS çalışmasında bakterilerin yapısal değişikliğini gösteren TEM görüntüsü : a : <i>Staphylococcus aureus</i> ; b : <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; ve c : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Resim 2.2. a) Kaplanmamış kağıt , b) % 12 Kazein kaplı Kağıt, c) % 12 Kazein/CS kaplı kağıdın SEM görüntüsü	7
Resim 3.1. Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi cihazının, hazırlanan standartların ve örneklerin görüntüsü	19
Resim 3.2. Deneysel süreçte hazırlanan tüm tampon çözeltilerin görüntüleri.....	21
Resim 4.1. Çalışılan çitosan (CS) ve ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosanın (CS-Fc-ald) görüntüleri	29
Resim 4.2. CS (a) ve CS-Fc-ald'in (b) SEM (1000 ve 2500 büyütme) görüntüleri.....	39
Resim 4.3. CS (a) ve CS-Fc-ald'in (b ve c) SEM (2500 ve 10000 büyütme) görüntüleri	40
Resim 4.4. CS-Fc-ald-Pep (a) ve CS-Fc-ald-Lip'in (b) SEM (1000 ve 2500 büyütme) görüntüleri	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

°C	Derece santigrat
λ	Dalga boyu
K_m	<i>Michaelis-Menten</i> sabiti
μL	Mikrolitre
mM	Milimolar
M_A	Molekül ağırlığı
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonun eksi logaritması
V_{mak}	Maksimum hız
T	Sıcaklık

Kısaltmalar

Açıklamalar

CS	Çitosan
CS-Fc-ald	Ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosan
CS-Fc-ald-Lip	Ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosana lipaz enzimi
CS-Fc-ald-Pep	Ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosana pepsin enzimi
ÇEnİmLip	Çift enzim immobilizasyonundaki lipaz
ÇEnİmPep	Çift enzim immobilizasyonundaki pepsin
EDX	Enerji dağılım X-ışını kırınımı
Fc	Ferrosen
Fc-ald	Ferrosenkarboksaldehit
FT-IR	Fourier transform infrared spektroskopisi
IR	Kızılötesi spektroskopisi
Lip	Lipaz
Pep	Pepsin
p-NPp	p-Nitrofenil palmitat

Kısaltmalar**Açıklamalar****SEM**

Taramalı elektron mikroskobu

Slip

Serbest lipaz enzimi

Spep

Serbest pepsin enzimi

TCA

Trikloroasetik asit

TGA

Termogravimetrik analiz

UV-GB

Ultraviyole görünür bölge spektroskopisi

1. GİRİŞ

Çitosan, β -(1-4)-D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminden oluşan lineer bir aminopolisakkarittir. Çitosan yapısında serbest amino gruplarının bulunması, onun fiziksel ve kimyasal özelliğinin temelini oluşturmaktadır. Çitosan biyo-uyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan biyopolimerdir [1]. Ayrıca antimikrobiyal ve nemlendirici madde olma özelliğine de sahiptir [2]. Çitosana doğrudan takılı metal iyonları yerine, Schiff bazı ile koordine olmuş metallerin takılı olması durumunda çitosanın daha iyi bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir [3,4]. Bu nedenle çitosana çeşitli metal iyonlarının takılarak değişik uygulama alanlarına (sağlık ve teknoloji) katkı sağladığı kaynaklarca görülmektedir.

Ferrosen ve türevlerinin değişik redoks sistemlerinde ve toksik olmayan ilaç tasarımında kullanılmaya başlanması nedeniyle son otuz yılın önemli bileşikleri arasına girmiştir. 2007 yılından itibaren ferrosen ve türevlerinin çitosana takılması sonucunda elde edilen makro moleküler yapıların katalitik, sensör, immobilizasyon ve ilaç salımı gibi araştırma alanlarında kullanıldığı görülmektedir [5-7].

Enzim immobilizasyonunun, enzimin bir desteğe fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanması sonucunda hapsedilmesi; enzimlerin çalışabilirliğinin ve tekrarlanabilirliğinin geliştirilmesinde önemli bir strateji olduğu bilinmektedir [9-12]. Çünkü enzim immobilizasyonu, serbest enzimlere göre daha büyük işlevsel kararlılık göstermektedir.

Günümüzde, çoklu enzim immobilizasyonu üzerine olan araştırmaların önem kazanmaya başladığı görülmektedir. Çünkü, birbirini takip eden enzimatik reaksiyonların daha kısa sürede oluşumunu sağlamak mümkündür. Ayrıca çoklu enzim immobilizasyonu ile, daha az atık, çözücü ve kimyasal maddelerin kullanımı söz konusu olmaktadır.

Sunulan tez, çoklu (ikili) enzim immobilizasyonunun uygulaması üzerine olup, önce ferrosen katkılı çitosan sentezlenmiştir. Ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald) katkılı çitosanın kapsamlı bir karakterizasyonundan sonra immobilize edilmiş çift enzim (lipaz ve pepsin)'in optimum şartları belirlenmiştir.

Sentezlenen ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald) katkılı çitosanın yapısı FT-IR, katı ^{13}C -NMR, elementel analizi (C,H,N), SEM/EDX ve TGA ile aydınlatılmıştır. Ayrıca dört nokta tekniği

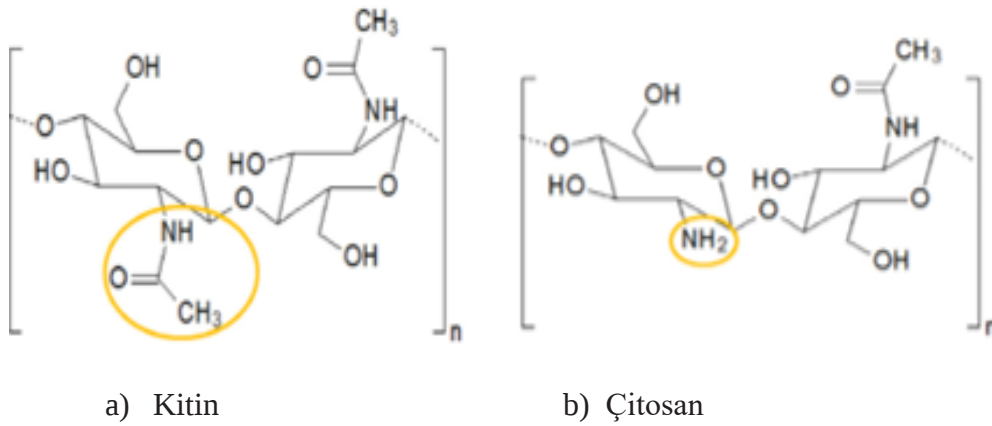
ile iletkenlik ölçümü ve iletkenlik özelliği, zeta potansiyel ölçüm cihazı ile de parçacık boyutu analizi yapılmıştır. Serbest ve çift immobilize enzimin aktifliğine etki eden pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, depolama süresi gibi parametrelerin etkisi incelenmiş olup, çift immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Çitosan ve Özellikleri

Kitin selülozdan sonra doğada en fazla bulunan ikinci polisakkarit olup, alkali deasetilasyonundan çitosan elde edilir (Şekil 2.1-a). Çitosan, selülozunkine çok benzeyen bir yapı olan rastgele dağılmış β -(1-4) bağlı D-glukozamin (deasetilatlı birim) (Şekil 2.1-b) ve N-asetil-D-glukozamin (asetilat birimi) den oluşan bir doğrusal polisakkarittir.

Çitosan, amin ve hidroksil gruplarına bağlı olarak inter-moleküler ve intra-moleküler arası hidrojen bağı oluşturur; bu nedenle sert bir kristal yapıya sahiptir. Çitosan, ana zincirindeki bol primer amino grubu nedeniyle biyoaktivite özellik gösterir. Bu nedenle, çitosan ilaç ve / veya gen dağıtımı gibi biyomedikal alanlara ve su arıtma (örneğin zararlı alg kontrolü), ağır metallerin uzaklaştırılması gibi endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [1-3].



Şekil 2.1. Kitin (a) ve çitosanın (b) kimyasal yapısı

Çitosanın antibakteriyel ve antioksidan özelliklerinden türetilen belirgin biyomedikal uygulamaların yanı sıra, demir, bakır, kadmiyum veya magnezyum iyonları için seçici şelat yapıcı özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir, bu nedenle bu özellikleri dikkate alındığında birçok başka uygulama alanlarına uygulaması geliştirilebilir.

CS çözünürlük özelliği , film oluşturma, nano lif hazırlama, hidrojel veya macun gibi birçok farklı formda hazırlanabilmesini sağlar, bununla birlikte çözünmemiş toz formundaki çitosanın bazı alanlarda kullanıldığı görülmüştür [4,5].

2.1.1. Çitosan üzerine uygulamalar

CS, biyomedikal, kozmetik, kağıt yapımı, atık su arıtımı, tarım veya ilaç uygulamaları gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Toksik olmayan ve iltihaba neden olabilecek parçalanma ürünlerini oluşturmeyen CS'ın biyouyumlu ve kontrollü biyobozunurluktan dolayı çeşitli biyomedikal uygulamalara imkan sağlar.

Ayrıca kendine özgü, antimikrobiyal özelliği ve biyolojik olarak emilebilir yapısı nedeniyle CS, kontrollü ilaç salımı, yara sargı bezi, kan pıhtılaştırıcısı, kemik yenilenmesi gibi alanlar için geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir.

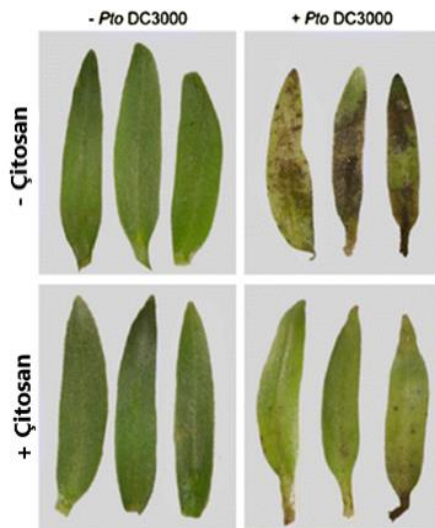
Çitosana yüklenmiş etkin maddenin kontrollü ilaç salımı veya tabletinin ağızdan alımı kısmi bozunma nedeniyle ilaçtaki etkinliğinin azalmaması ya da toksik ilaç seviyesinin oluşmaması nedeniyle önemli bir avantaj sağlar. CS'ın ilaç salınım işlevlerinde kullanılmasını ideal kılan özelliği; hidrofilik karakteri, mukoadesyon kuvveti, nüfuz etme kabiliyetidir [6,7].

Yara iyileşmesi, doku bütünlüğü bozulmuş tabakaların uzaklaştırılması ya da değiştirilmesi şeklinde olan dinamik ve karmaşık bir işlemdir. Bu süreçte yaradaki enfeksiyonun önlenmesi önemlidir. CS'ın antibakteriyel aktivitesi sayesinde yara iyileştirme için hazırlanan yara sargı bezinin kullanılması (hemostatik aktivite) yönünden uygun bir malzeme olması önemli bir avantajdır [8]. V.K.H. Bui ve arkadaşları yara iyileştirmede kullanılan ZnO, TiO₂ ve Ag nanopartiküllerini CS ile kombine ederek, bu partiküllerin antimikrobiyal özelliklerini arttırmışlardır [9].

Atıksu arıtımı konusunda çeşitli araştırmaların yapıldığı kaynaklarca görülmektedir [10]. Yüksek içerikli amino grupları sayesinde, organik ve inorganik kirleticileri adsorbe edebilen CS, biyolojik ortama uyumlu olması nedeniyle çevre dostu olan bir polisakkarittir. Endüstriyel atık sularından ağır metal iyonlarının uzaklaştırılması üzerine çalışma yapan M.A. Badawi ve arkadaşları tannik asit ile CS'ı modifiye etmişlerdir. Bu araştırmalarında ağır metaller sınıfından alüminyum ve kurşunun verimli olarak ortamdan uzaklaştırdıklarını ve bunun için en uygun pH'nın 6 olduğunu ifade etmişlerdir. Kurşunun Pb(OH)₄²⁻, alüminyumun ise [Al(OH)₄]⁻ yapısında uzaklaştırıldığını belirtmişlerdir [11].



Tarımsal üretimdeki sorunları çözmek için (biyolojik çeşitliliğe hasar, doğal ve tarımsal sistemlere verilen zarar ve halk sağlığı endişeleri gibi..), bitki koruma ürünlerinin kullanılması gerekmektedir. Çevre dostu pestisitlerin kullanılması önemlidir. Kaliteli bir üretim için kullanılan tarımsal mücadelede CS'ın kullanılmasının tavsiye edildiği görülmektedir. Örneğin, 2013 yılında A.Y. Mansilla ve arkadaşları domates yaprakları üzerine Pto DC3000 bileşiği ve CS ile dört farklı koşullarda (Şekil 2.2) muamele ederek meydana gelen değişiklikleri şekildeki gibi gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar CS'ın çevre dostu bir pestisit olabileceğini ifade etmişlerdir.



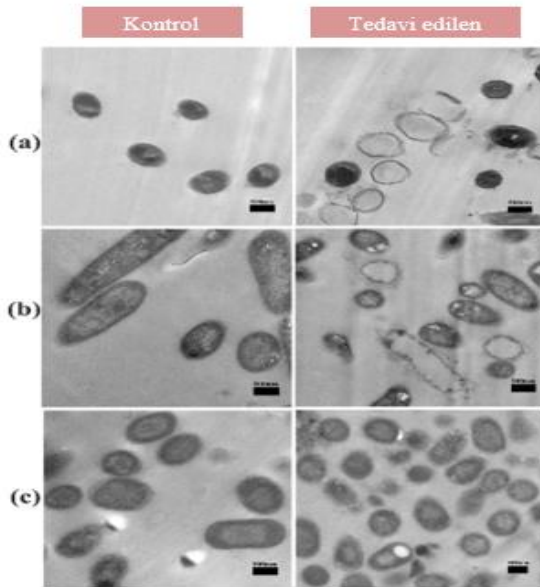
Şekil 2.2. Çitosanın *Pto* DC3000'e karşı domates fidelerinde bakteriyel yerleşmesi

Aktif gıda ambalajlama, gıdanın kalite ve güvenilirliğini sürdürmek, raf ömrünü uzatmak için geliştirilen yeni bir gıda ambalajlama yöntemidir. Bu yöntemde, genellikle antimikrobiyal, antioksidan özellikli film ve kaplamaların kullanıldığı materyaller kullanılmaktadır [12]. Aktif gıda ambalajında, ambalajlanan gıda çevresiyle pozitif etkileşime girdiğinden tazelik ve raf ömrü açısından geleneksel ambalajlamaya göre daha etkilidir [13].

I. Leceta ve arkadaşları, esnekleştirici olarak gliserolün kullanıldığı ve ağırlıkça % 1 asetik asit çözeltisi içinde çözünen % 1'lik CS hazırlayarak bebek havuçlar üzerine araştırma

yapmışlardır. Modifiye atmosfer paketlenme (gıdanın çevresindeki atmosferi değiştirmek) yöntemini kullanan araştırmacılar, CS ile kaplanan bebek havuçlarının renk, koku, tat ve görünüm açısından daha iyi korunduğunu belirtmişlerdir [14].

Deniz kökenli ve antimikrobiyal özelliği olan CS kozmetik sektörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [15]. Güneş ışınlarından zarar görmüş cilt tedavisi üzerine araştırma yapan R. Morsy ve arkadaşları, CS içerikli jel yapıda (CS-hidroksiapatit) olan polimer matriksi hazırlamışlardır. Bunun için güneş ışınından zarar görmüş 110 farklı hastadan alınan cilt örneklerini CS içerikli jelden oluşan bandaja muamele etmişlerdir. Bu bandajın birçok ilaca dirençli olan *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlere karşı iyileştirmede %64 civarında başarılı olduğunu belirtmişlerdir [16].

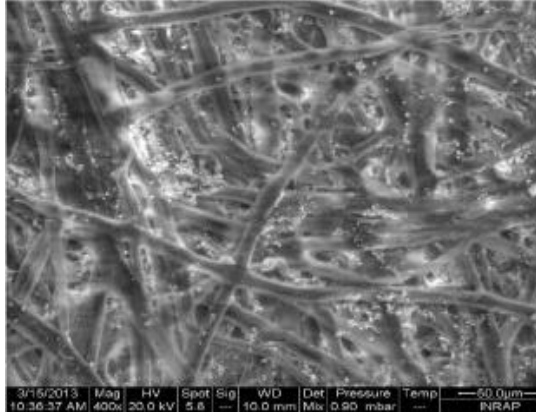


Resim 2.1. Çalışılan bakterilerin (*Staphylococcus aureus*-a; *Klebsiella pneumoniae*-b; ve *Pseudomonas aeruginosa*-c) yapısal değişikliğini gösteren TEM görüntüsü

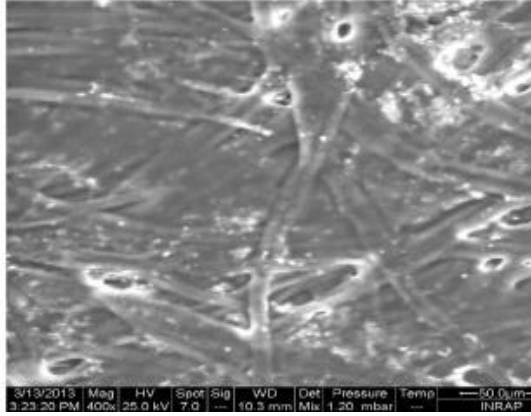
CS, kağıt endüstrisinde (kağıt yapım sürecinin ve özelliklerinin geliştirilmesi) yaygın olarak kullanılmaktadır. Gerçekten de, CS'ın selülozunkine benzer moleküler yapısı ve bu moleküller arası güçlü bağların oluşumu kağıdın mekanik gücünü artırır.

K. Khwaldia ve arkadaşları paketlenmede kullanılan kağıdın mekanik özelliğini arttırmak için CS'den faydalanmışlardır. % 12 kazein/CS kaplı kağıdın maksimum çekme mukavemeti testi sonucunda yüklere dayanma kapasitesinin arttığını ifade etmişlerdir [17].

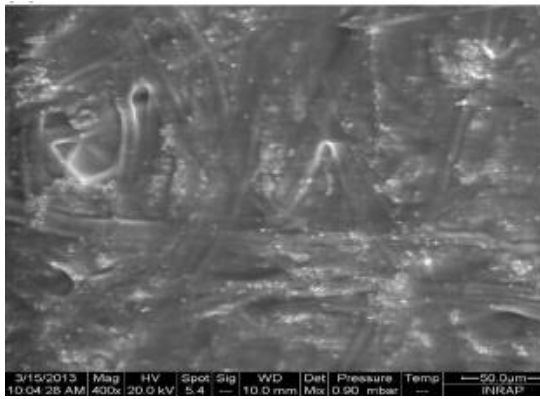
a)



b)



c)



Resim 2.2 a) Kaplanmamış kağıt, b) %12 kazein kaplı kağıt, c) %12 kazein/CS kaplı kağıdın SEM görüntüsü

Tekstil endüstrisinde kullanılan önemli ajanlardan birinin CS olduğu görülmektedir [18]. Yang ve arkadaşları, CS ile kaplı pamuklu kumaşların yıkamaya karşı olan dayanıklılığın % 9 oranında arttığını belirtmişlerdir [19].

2.2. Ferrosen ve Özellikleri

Redoks özelliğine sahip olan ferrosen (Fc), merkezdeki demir iyonunun birbirine zıt yönde bulunan iki siklopentadienil halkaları ile etkileşmiş organometalik bileşiktir. Amfifilik bir bileşik olan Fc, Fe (II) ve Fe (III) arasında oluşan dönüşüm ile hidrofobikten hidrofiliğe veya hidrofilikten hidrofobiğe doğru bir değişim gösterirler [20]. Bu nedenle Fc, hem hidrofobik hem de redoks duyarlı sistemlerin tasarlanmasında kullanılmaktadır [21]. Birçok ferrosenil türevleri, antitümör ajanlar olarak mükemmel etkilere sahip olduğundan bazı yeni türevleri halihazırda klinik deneylerde incelenmektedir [22]. Ayrıca ferrosenin, pH'ya duyarlı özelliği

nedeniyle Fc türevlerinin bulunduğu ilaç salınım sistemlerinde kullanımı için önemli bir avantaja sahiptir.

Fc'nin keşfinden günümüze kadar olan bazı belirgin çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir. 1951 yılında Kealy ve Pauson tarafından sentezlenmiş olup 1952 yılında Wilkinson, Woodward tarafından bağlanma ve aromatikliği ile sandviç yapısı keşfedilmiştir. 1969 yılında Yeary tarafından yapılan bir çalışmada Fc'nin toksik yapıda olmadığı, 1971 yılında ise klinik kullanım için ilk ferrosen içeren ferrosenon isimli ilacın onayının verildiği görülmektedir.

1973 yılında Nobel Kimya Ödülü, metalosenler üzerine öncü çalışmaları olan Fischer ve Wilkinson'a verilmiştir. Marr ve grubu 1975'te, ferrosenin bir biyoizoster (moleküler modifikasyon yöntemi) olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Brynes ve meslektaşları 1978 yılında antikanser araştırmalarında ferrosenil türevlerinin kullanımı ile ilgili ilk çalışmayı gerçekleştirmişlerdir.

1984'te Köpf-Maier ve iş arkadaşları, farelerde oluşturulmuş Ehrlich asit tümörleri üzerine ferrosenyum tuzlarını kullandıklarında başarılı bir tedavi gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmayı takiben 1990 yılında Neuse ve Kanzawa isimli araştırmacılar ilaç tasarımıyla ferrosenil türevlerini içeren bir kavram ortaya koymuşlardır.

Antikanser ilacı olan tamoksifene model olan ferrosifenin keşfi 1996 yılında olup, 1997'de Hiroshi ve Masahiro, ferrosenin sitotoksisiteyi indükleyebilecek hidroksi radikalini oluşturabildiğini göstermişlerdir. Aynı yıl, sıtma tedavisinde ve 2020 yılının başından itibaren corona virüs tedavisinde kullanılan klorokine benzer bir yapıda olan ferrokinin keşfetmişlerdir.

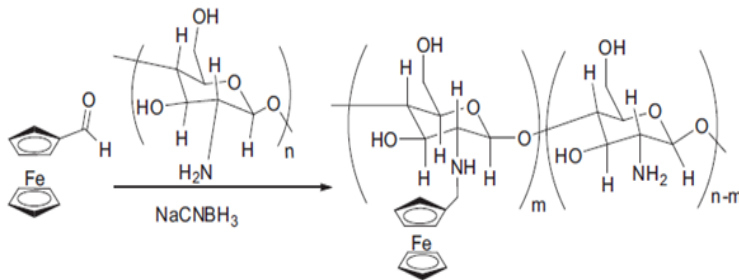
2003 yılında klinik deneylerde ferrokinin kullanılmaya başlanmıştır. 1996 yılında keşfedilmiş olan ve günümüzde antikanser ilaç olarak kullanılan ferrosifenin klinik öncesi değerlendirmelerini hızlandırmak için 2014 yılında Feroscan isimli bir araştırma şirketi kurulmuştur [23].

2.2.1. Ferrosen ile modifiye edilmiş çalışmalar

1984'den günümüze kadar altı önemli kategoride ferrosen bileşiklerinin kullanıldığı ve değerlendirildiği çalışmalar yapılmıştır. Bunlar; ferrosen tabanlı polipirol ve politiyofenler, ferrosen tabanlı siklodekstrinler, ferrosen tabanlı polietilenimin, ferrosen tabanlı dendrimerler, ferrosen tabanlı polivinilferrosen ve ferrosen tabanlı çitosan türevleri şeklindedir [24]. Polipirol ve politiyofen üzerine olan çalışmalarda, ferrosenin redoks özelliğinden faydalanılarak iletken polimerlerin elektronik iletkenliğini geliştirmek için kullanıldığı görülmektedir.

Siklodekstrinlerin çözünürlüğü zayıf olduğu için Fc'nin kullanılarak çözünürlüğe katkı sağladığı belirtilmektedir. Elektrokimya çalışmalarında kullanılan ferrosen katkılı siklodekstrinlerin (Fc-CD), özellikle sensör kullanımında elektrot yüzeyi ile Fc-CD arasında elektron transferinde önemli katkı sağladığı görülmektedir [25]. H.L. Lan ve arkadaşları, lineer polietilenimin ve dallanmış polietileniminlere ferrosenin takılmasıyla redoks polimerleri oluşturmuşlardır [26].

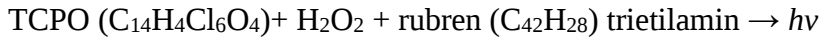
Polimerik materyallerin yeni bir sınıfı olan dendrimerler, çok dallanmış genellikle küresel ve üç boyutlu yapılardır. Son yıllarda Fc tabanlı PAMAM (Poli amidoamin) dendrimerleri üzerine yaygın araştırmaların yapıldığı görülmektedir. Bu araştırmalarda yine Fc'nin redoks özelliği önemli katkı sağlamaktadır. Fc'nin başlangıç noktası olarak kullanıldığı dendritik yapıların geniş yüzey alanına sahip olmasından dolayı çeşitli sensör ve immobilizasyon araştırmalarında kullanıldığı görülmektedir [27]. Fc'nin aldehit, çitosanın NH_2 grubu arasında olan tepkime sonucunda Schiff bazını NaCNBH_3 (sodyumsiyanoborohidrid) katalizörünü kullanarak sentezleyen (Şekil 2.3) W. Yang ve arkadaşları, Fc'nin hidrofobik yapısından faydalanarak glukozaya duyarlı elektrot tasarımı için kullanmışlardır [28].



Şekil 2.3. Ferrosen bazlı çitosanın sentezi

2.2.2. Ferrosen-çitosan-enzim üzerine yapılmış çalışmalar

D. Yao ve arkadaşları, *in vivo* olarak ürik asitin yüksek hassasiyet ve seçicilikte teşhis edilebilmesi için mikrodializ probu hazırlamışlardır. Ferrosen hapsedilmiş poliüretan ve çitosandan hazırlanan proba Streptavidin-biotinin immobilize edilmiştir. Aşağıda verilen tepkimeler zinciri oluşturularak kemilüminesans (kimyasal ışıltama) reaksiyonuna dayalı bir algılama sistemini geliştirmişler, teşhis sırasında oluşabilecek girişimleri azaltmak için de ferrosenin kullanıldığı belirtilmiştir [29].



Günümüzde amperometrik enzim bazlı biyosensörler, kimyasal ve biyomedikal analiz, kirlilik izleme, biyoteknoloji, gıda ve tarımsal ürün işleme gibi çeşitli teknoloji alanlarında kullanılan ümit verici sensörlerdir [30,31]. Bu amaçla J.D. Qui ve arkadaşları ferrosenkarboksaldehiti (Fc-ald) çok duvarlı karbon nanotüplere (MWNTs) bağlayabilmek için etilendiaminden faydalanmışlardır (MWNTs-Fc). Daha sonra (MWNTs-Fc)'ı çitosan ile kompozitini hazırlayarak yüksek hassasiyete sahip glukozaya duyarlı sensör tasarlamışlardır [32].

C. Sun ve arkadaşları 2007 yılında CS-Fc-ald hibritini hazırlarken ferrosenkarboksaldehit ile alkilendirilmiş CS'nin tepkimesinden faydalanmışlardır. Böylece yeni redoks özellikli polisakkarit oluşturdıklarını ve immobilizasyon için mükemmel bir matriksin meydana geldiğini ifade etmişlerdir. CS-Fc-ald matriksindeki Fc miktarının belirlenmesi için ¹H-NMR spektrumundan faydalanmışlardır [28].

2.3. Enzimler

Sağlık ve endüstri alanında kullanılan enzimler, optimum sıcaklık ve basınçta aktivitesi ve seçiciliği yüksek (sadece bir ürün oluşturmak gibi) olan faydalı katalizörlerdir [33]. Özellikle yeşil kimya alanında önemli olan enzimler enerji tüketimini, çözücülerin kullanımını ve yan ürünlerin oluşumunu azaltan önemli araçlardır [34]. Enzimler substratlarını oluştururken optimum özelliklere sahiptir.

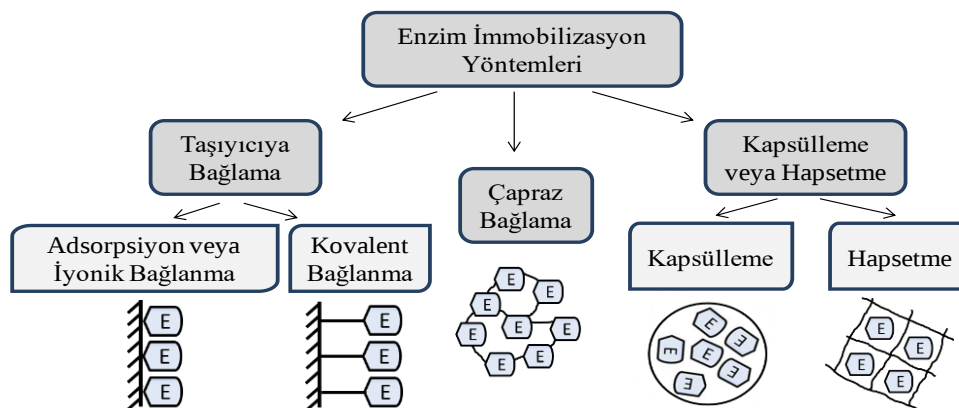
Pek çok kez, endüstriyel alana uygun bir biyokatalizörü hazırlamak için, enzimin özelliklerini hedef substratlara göre geliştirmek gerekir. Fakat çoğu endüstriyel proseste, enzimlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklık ve pH koşullarda çalışmayı gerektirebilir. Bu durum enzimin aktivitesinin kaybına neden olur.

Enzim özelliklerini geliştirmek için günümüzde mikrobiyoloji (termofilik organizmaların kullanımı, metagenomikler) [35], genetik aletler (sahaya yönelik mutajenez, yönlendirilmiş evrim) [36] ve fizikokimyasal modifikasyonlar (örn, immobilizasyon) gibi birçok farklı seçenekler vardır [37]. Bu modifikasyonlardan en yaygın olanı, enzimin yüzeyini fizikokimyasal olarak değiştirmektir. Böyle bir modifikasyonla enzimin aktifliğinin geliştirilmesi mümkün olabilir. Hatta susuz ortamlarda bile enzimin aktifliği modifikasyonlarla artırılabilir [38].

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilize enzim terimi “enzimlerin katalitik aktivitelerinin korunduğu, tekrarlı ve sürekli olarak kullanılabilirdiği belirli bir alana hapsedilmesi veya sınırlandırılması” anlamını taşımaktadır [39].

İmmobilize enzimlerin çözünür enzimlere göre kararlılığının yüksek olması ve reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilmesi enzimin kullanımına yönelik önemli bir tasarruf sağlamaktadır [40]. Enzimler, çeşitli yöntemlerle immobilize edilebilir. İmmobilizasyonda kullanılan metotlarının sınıflandırılması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.4):



Şekil 2.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

Taşıyıcıya bağlanma yöntemlerinden biri olan adsorpsiyon yöntemi, nispeten basit ve ucuz bir metot olup, enzimin yapısı kimyasal olarak değişmez. Ancak özellikle, adsorbe olan enzimin H_2O 'un olduğu çözücülerde çalışılması sırasında ayrılma eğilimi gösterdiği için bu yöntemin kullanılması sınırlıdır.

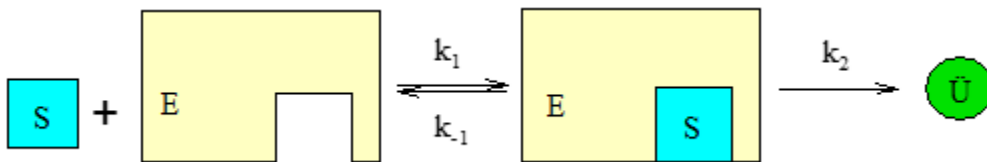
Kapsülleme veya hapsedme, enzimin bir polimer ağına hapsedilmesidir. Bunun için organik polimer, silika sol-jel, oyuk bir fiber veya mikrokapsül membran kullanılabilir. Enzimlerin bir taşıyıcıda tutulması fiziksel bağlanma, kovalent bağlanma ve iyonik bağlanma şeklindedir. Optimum şartlara göre bu bağlanma türlerinden en kuvvetlisi kovalent bağlanma olarak değerlendirilebilir [41].

Enzim immobilizasyon çalışmasında, enzimin kararlılığına ve kinetiğine etkili olması için kullanılan destek materyali önemlidir. İdeal destek materyalin, basınca karşı dirençli, hidrofilik, enzimlere karşı inert, biyolojik uyumlu, mikrobiyal saldırıya karşı dirençli ve düşük maliyetli olması tercih edilir [42].

2.5. Enzim Kinetiği

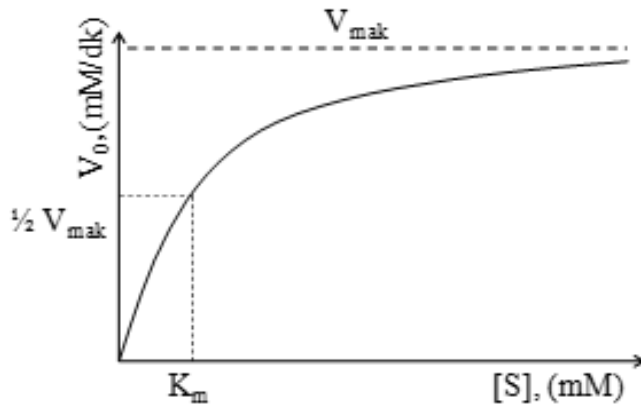
Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hız ve mekanizmasının incelendiği bilim dalı olarak ifade edilebilir.

k_1 hız sabiti k_2 ye göre çok yüksek olduğundan, enzimatik tepkimenin hızı, k_2 hız sabitine göre belirlenir.



Şekil 2.5. Enzimatik bir reaksiyonun şematik gösterimi

Enzim substrat ilişkilerinin incelendiği Michaelis-Menten ve *Lineweaver-Burk* grafikleri enzim kinetiğinin en basit ve önemli modelidir.



Şekil 2.6. Michaelis-Menten grafiği (V_{mak} : maksimum hız, K_m : Michaelis-Menten sabiti)

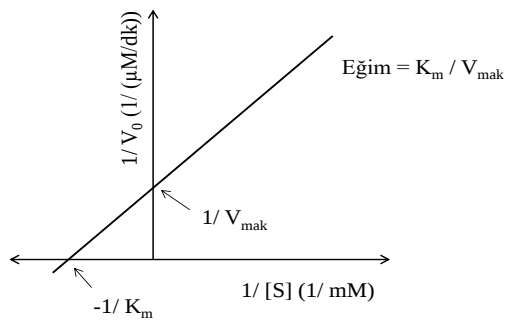
Michaelis-Menten grafiğinde, artan substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı başlangıçta doğrusal bir şekilde artarken, enzim substrata doymaya başladıkça reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna paralel olarak artışın olmadığı görülmektedir [43].

$$V_0 = \frac{V_{\text{mak}} \times [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1} \quad (2.1)$$

Michaelis-Menten eşitliği (2.1), deneysel verilerin daha kolay çizilebilmesi için eşitliğin her iki tarafı da ters çevrilerek *Lineweaver-Burk* eşitliği (2.2) elde edilir.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}} \times [S]} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad (2.2)$$

Lineweaver-Burk eşitliğinden yararlanılarak elde edilen grafik yardımıyla K_m ve V_{mak} değerleri bulunur [44].



Şekil 2.7. Lineweaver-Burk grafiği

2.6. Çift Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Y. Wang ve arkadaşları alkalaz ve tripsin enzimlerini modifiye edilmiş çitosan üzerine immobilize ederek çift enzim immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada serbest enzimler ile immobilize çift enzimlerin optimum koşullarını belirleyerek K_m ve V_{max} değerlerini karşılaştırmışlardır [45]. Bu çalışmanın devamı olarak magnetik Fe_3O_4 -çitosan desteği üzerine çift enzim immobilizasyonunu gerçekleştirerek kinetik parametreleri belirlemişlerdir [46].



Şekil 2.8. Çitosan ile aşılınmış polianilin kriyojeli

Çift enzim immobilizasyonunu yapmak için sensör tasarlayan araştırmacıların, çok karbonlu nanotüpler ve çitosandan faydalandığı görülmüştür. Bu amaçla, nanotüplerin çitosan ile aşılınmış polianilinden hazırlanan sensör ile aldolaz ve pirüvat oksidaz enzimlerinin optimum şartları araştırılmıştır [47].

2.7. Pepsin Enzimi

Pepsin midenin başlıca asit proteazı olup proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur. Proteaz enzimi peptit bağlarının hidroliz reaksiyonu ile yıkımını katalizler. 1825'te T. Schwann tarafından tanımlanmış ilk enzim olarak bilinir. Ayrıca üreazdan sonra kristalize olan ikinci enzimdir. Pepsin, mide zarı tarafından inaktif bir formda sentezlenir. Sindirim işlevi olmayan pepsinojen pepsinin öncülüdür. Pepsinojen aktif değildir. Aktif hale gelmesi için (sindirim işleminin olabilmesi için) HCl ile tepkimeye girmelidir. HCl ise gastrik mukoza hücreleri tarafından oluşturulmaktadır [48].

2.8. Lipaz Enzimi

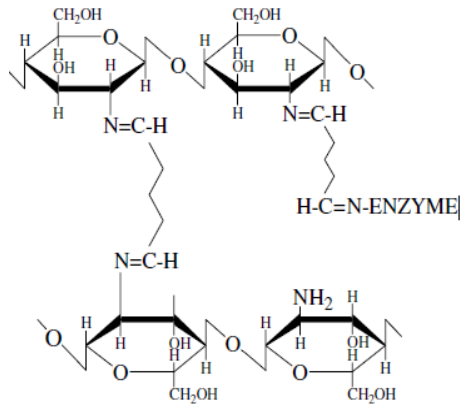
Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolaz, EC 3.1.1.3), triacilgliserolleri gliserol ve yağ asitlerine hidrolizleyen enzimlerdir.

Düşük aktivasyon enerjisine sahip olduklarından çevre dostu olarak tanımlanırlar. Lipazlar, yüksek verimde hayvan, bitki ve mikrobiyal organizmalar tarafından üretilir. Kemoseçicilik, regioseçicilik (yer seçiciliği) ve stereoseçicilik gibi özelliklerinden dolayı lipazlar, hidroliz ve sentez reaksiyonlarında biyokatalizörler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [49].

Son zamanlarda, trigliseritleri yağ asidi alkil esterlerine dönüştürerek biyodizel üretiminde katalizör olarak lipaz enziminin kullanıldığı bildirilmektedir. Ancak lipaz enziminin kararlılığının düşük olmasından dolayı yeniden kullanımı ve geri kazanımı zayıftır. Lipaz enziminin endüstriyel uygulama sırasında avantajlı hale gelmesi için immobilizasyon yönteminden faydalanılmaktadır.

2.9. Pepsin ve Lipaz Enzimleri İle Yapılmış Çalışmalar

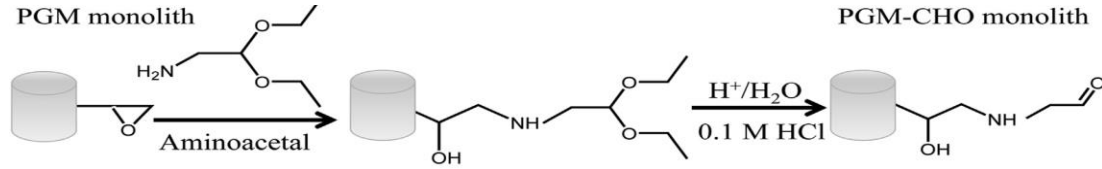
G.D. Altun ve arkadaşları çitosan üzerine pepsin enzimini immobilize ederek immobilize enzimin optimum şartlarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar enzimi immobilize ederken gluteraldehitten faydalanarak enzim ve çitosan arasında Schiff bazının meydana geldiğini FT-IR spektrumu ile belirlemişlerdir [50].



Şekil 2.9. Poli(metilmetakrilat) mikrokürelerini akrilaldehit ile modifiye ettikten sonra pepsin enziminin immobilizasyonu reaksiyonunun şematik gösterimi

S. Li ve arkadaşları poli(metilmetakrilat) mikrokürelerini akrilaldehit ile modifiye ettikten sonra pepsin enzimini immobilize etmişlerdir. Pepsin enzimini %50 oranında immobilize eden araştırmacılar, serbest enzimin optimum sıcaklığı 47°C iken, immobilize enzimin 43°C'ye kaydığını belirtmişlerdir [51]. Protein analizi için pepsin enzimini immobilize eden

W. Han ve arkadaşları destek materyali olarak aldehit ile modifiye edilmiş “poli(glisidil metakrilat-ko metilmetakrilat/PGM)” polimerini kullanmışlardır. Protein analizi yaparken LC-MS ve LC-MS/MS spektrumlarından faydalanmışlardır [52].



Şekil 2.10. Pepsin enzimi ile immobilize olan PGM-CHO monolitinin hazırlanışı

Çitosan ile modifiye edilmiş mikrokürelere poli (sitiren-ko-glisidil metakrilat) (PSt-GMA) pepsin enzimini immobilize eden G. Peng ve arkadaşları, immobilize olan enzimin aktifliğini 50 gün boyunca takip etmişler, 50. günün sonunda serbest enzime göre (%20) aktifliğinin %70 oranında korunduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedeni olarak çitosan ile modifiye edilmiş desteğin pepsin enzimi ile biyouyumlu olmasından kaynaklandığını söylemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal maddeler, enzimlerin kodları ve firma bilgilerine aşağıda yer verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kimyasal listesi

<u>Kimyasal Madde</u>	<u>Üretici Firma</u>
Hemoglobin (H2625)	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit (TCA, T6399)	
Lipaz (EC 3.1.1.3, L3126)	
p-Nitrofenil palmitat (N2752)	
Triton X-100 (T8787)	
Akasya sakızı (51198)	
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4 , 120g/mol)	
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , 142 g/mol)	
Boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 201,24 g/mol)	
Sodyumhidroksit (NaOH , 40 g/mol)	
Hidroklorik Asit	
Sodyumbikarbonat	
Glisin	
Tris-HCl tamponu (pH=10)	
Çitosan (48165)	Fluka BioChemica
Ferrosenkarboksaldehit (% 98)	Acros Organics
Potasyum klorür	AgriNova
Borat	Supelco
Nitrik Asit	Carlo Erba
Demir (II) klorür	Emir Kimya
Sitrat	Emir Kimya
2-Propanol	Merck
Etanol (46,070 g/mol, % 99.8)	Carlo Erba
Aseton	Emir Kimya

3.1.2. Cihazlar

pH metre

Jenway 3010 model pH metre cihazı, tampon çözeltilerin pH'sını ayarlama da kullanılmıştır.

Ultraviyole – görünür bölge spektrofotometresi

UV-GB spektrumları UV-1800 ENG240V, SOFT model spektrofotometre ile 700-180 nm aralığında alınmıştır.

Çalkalamalı, sıcaklık kontrollü su banyosu

Wisebath WSB-18 model su banyosu ile çalışmalarda hem sıcaklık kontrolü hem de karıştırma işlemi sağlanmıştır.

Element analizi (C,H,N)

Element analizleri LECO, CHNS-932 elementel analiz cihazı ile Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometrisi)

Sentezlenen tüm polimerlerin FT-IR spektrumları Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi'nde Mattson-1000 FT-IR model cihaz ile 4000-400 cm⁻¹ aralığında alınmıştır.

Katı ¹³C-NMR (Nükleer magnetik rezonans spektrometresi)

¹³C-NMR Spektrumları ODTÜ analiz laboratuvarındaki, Bruker-Spectrometer Avance TM 300 MHz WB'de alındı.

Atomik absorpsiyon spektrofotometresi

Ferrosen takılı çitosandaki demir (Fe) yüzdesi bölümümüzde bulunan Philips PU 9285 model alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile belirlendi. H_2SO_4 eritışı ile örnekler hazırlandı.

Metal yüzdeleri aynı yerde Perkin Elmer Analyst 400 marka atomik absorpsiyon spektrofotometrisi cihazı ile yapılmıştır.



Resim 3.1. Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi cihazının, hazırlanan standartlar ve örneklerin görüntüsü

Parçacık boyutu analizi (Zetasizer)

pH 10 Tris-HCl tamponunda çözünen CS ve CS-Fc-ald'in parçacık boyutu analizi akıllı malzeme araştırma laboratuvarında Zetasizer NS modeli ile ölçülmüştür.

Dört nokta iletkenlik ölçer (Four-Probe) ve iletkenlik ölçümü

Sıkıştırılarak pellet haline getirilen örneklerin iletkenlikleri doğru akım veya alternatif akım kullanılarak dört nokta tekniği ile ölçüldü. Van der Pauw tarafından geliştirilen dört nokta tekniğinde sıkıştırılarak pellet haline getirilen ve böylece belirli kalınlık ve alanlarda hazırlanan örnekler dört adet elektrot yerleştirildi. Böylece örneklerin katı hal iletkenliği belirlendi. Çalışılan numuneler 0,65-0,70 arasında değişen örnekler yaklaşık 5 bar basınç altında sıkıştırılarak pelletler haline getirildi. Hazırlanan örneklerin pellet kalınlığı

ölçüldükten sonra numunelerin doğru akım iletkenlikleri, prop aralığı 0,2 cm olan dört nokta aleti ile oda sıcaklığında ölçüldü.

3.2. Hazırlanan Çözeltiler

pH 1-6 ($C_2H_5NO_2/HCl$) tamponu; 0,3753 g (0,05 M) $C_2H_5NO_2$ (glisin) ve 0.05 M HCl 100 mL su içerisinde çözölmüştür. Üzerine 1 M HCl çözeltisinden pH 1 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 2 (KCl/HCl) tamponu; 0,7456 g (0,1 M) KCl (potasyum klorür) ve 0,1 M HCl 100 mL su içerisinde çözölmüştür. Üzerine 1 M HCl çözeltisinden pH 2 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 3-4 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) tamponu; 2,941 g (0,1 M) $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (sodyum sitrat dihidrat) 100 mL su içerisinde çözölmüştür. pH 3 için, çözelti üzerine 1 M HCl çözeltisinden pH 3 olana kadar damla damla eklenmiştir. pH 4 için, çözelti üzerine 1 M HCl çözeltisinden pH 4 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 6-8 (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) tamponu; 3,5814 g (0,1 M) Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (sodyum fosfat) 100 mL su içerisinde çözölmüştür. pH 6 tamponu için, çözelti üzerine 1 M HCl çözeltisinden pH 6 olana kadar damla damla eklenmiştir. pH 7 tamponu için, çözelti üzerine 1 M HCl çözeltisinden pH 7 olana kadar damla damla eklenmiştir. pH 8 tamponu için, çözelti üzerine 1 M NaOH çözeltisinden pH 8 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 9-10 ($Na_2B_4O_7/HCl$) tamponu; 2,0122 g (0,1 M) $Na_2B_4O_7$ (disodyum tetraborat) 100 mL su içerisinde çözölmüştür. pH 9 tamponu için, çözelti üzerine 1 M NaOH çözeltisinden pH 9 olana kadar damla damla eklenmiştir. pH 10 tamponu için, çözelti üzerine 1 M NaOH çözeltisinden pH 10 olana kadar damla damla eklenmiştir.

Pepsin enzim çözeltisi; 100 mg enzim 0,01 M 100 mL HCl içerisinde çözölmüştür. Hazırlanan bu çözelti buzdolabında $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edilmiştir.

Hemoglobin (substrat) stok çözeltisi; 2,5 g hemoglobin 0,01M 100 mL HCl içerisinde

çözölmüştür. Hazırlanan bu çözölti buzdolabında -20°C’de muhafaza edilmiştir.

p-Nitrofenil palmitat (p-NPp) substrat çözöltisi; 0,1 g akasya sakızı, 0,4 g Triton X-100 ve 0,0377 g p-NPp 10 mL izopropil alkolde çözölerek 100 mM fosfat tamponu (pH 7) içerisinde 100 mL’ye tamamlanmıştır.



Resim 3.2. Deneyisel süreçte hazırlanan tüm tampon çözöltülerin görüntöleri

3.3. Ferrosenkarboksaldehit Takılı Çitosanın (CS-Fc-ald) Hazırlanması

Bu çalışmada, önce katılma-ayırılma tepkimesine göre Schiff bazı içeren çitosan polimeri sentezlenmiştir.

3.3.1. CS-Fc-ald’in hazırlanması

Ferrosenkarboksaldehit içeren çitosanı sentezlemek için, ferrosenkarboksaldehitin çitosan ile katılma ayrılma tepkimesinden yararlanılmıştır. Bunun için, 60 mL etanolde çözölmüş 2.0 g çitosan Poli-(1,4-β-D-glukopranosamin), geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona konulmuştur. 70°C’de ısıtılmış geri soğutucu altında karıştırma işlemi yapılırken damlatma hunisi içerisindeki 1,0 g ferrosenkarboksaldehit (15 mL etanol içinde çözönmüş) damla damla balondaki çitosan çözöltisi üzerine ilave edilmiştir.

Aldehit çözöltisi eklendikten sonra 6 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edilmiştir. Altı saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra süzölmüştür. CS-Fc-ald etanol ile 3 defa yıkandıktan sonra 80°C’deki etüvde 1 gün boyunca kurutulmuştur.

3.4. CS-Fc-ald' e Pepsin ve Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Optimizasyonu

Schiff bazı içeren çitosan polimeri sentezlenip karakterize edildikten sonra immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. CS-Fc-ald desteğine pepsin enzim immobilizasyonu: iki boyunlu balona, çalışılan polimerden 1,0 gram alınarak 20 mL saf suda çözülmüş 2,5 mg pepsin enzimi eklenmiştir. Geri soğutucu altında 24 saat boyunca oda sıcaklığında (22°C) çalışılmıştır. Tepkime sonunda, katı maddeler süzgeç kâğıdından süzülüp safsızlık ve tutulmayan enzim uzaklaştırılması için saf su ile yıkama yapıp oda koşullarında kurutulmuştur. CS-Fc-ald desteğine lipaz enzim immobilizasyonu için de; yukarıda belirtilen immobilizasyon şartlarının aynısı lipaz enzim immobilizasyonu için de uygulanmıştır.

3.4.1. İmmobilize pepsin ve serbest pepsin enziminin aktifliğine pH etkisi

İmmobilize pepsin enziminin aktifliğine pH etkisini incelemek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği CS-Fc-ald desteğinden 5'er mg alınarak 6 (altı) adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine pH tamponlarının (pH 1-6) her birinden 2,5 mL glisin-HCl tamponu, substrat çözeltisinden (hemoglobini) 0,5 mL alınarak 37°C'de ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 mL trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 280 nm'deki maksimum absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu absorbans değerleri grafikleştirilerek optimum pH belirlenmiştir.

Serbest enzim ve immobilize enzimin optimum pH değerlerini kıyaslayabilmek için, serbest pepsinin aktifliğine pH etkisi de incelenmiştir. Bunun için, altı adet deney tüpü içerisine Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest pepsin enzim çözeltisinden 0,5 mL alınarak immobilize enzim için yapılan işlemlerin aynısı tekrarlanmıştır.

3.4.2. İmmobilize pepsin ve serbest pepsin enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi

İmmobilize pepsin enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği CS-Fc-ald desteğinden 5'er mg alınarak yedi adet

deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine optimum pH'daki tampon çözeltisinden 2,5 mL ve substrat çözeltisinden (hemoglobinin) 0,5 mL eklenerek 30 dk karıştırılmıştır. Bunu takiben çözeltiye 5 mL TCA eklenerek ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırma işlemine devam edilmiştir. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 280 nm'de maksimum absorbans değişimi izlenmiştir. Bu işlem 20-70°C sıcaklık değerleri arasında 10'ar derecelik artışlarla tekrarlanmıştır. Daha sonra bu değerler grafikleştirilerek çalışılan immobilize CS-Fc-ald desteği için optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Serbest enzim ve CS-Fc-ald'e tutturulmuş enzimin optimum sıcaklık değerlerini kıyaslayabilmek için serbest pepsinin aktifliğine sıcaklığın etkisi de incelenmiştir. Bunun için, yedi adet deney tüpü içerisine Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest pepsin enzim çözeltisinden 0,5 mL alınarak immobilize enzim için yapılan işlemler tekrarlanmıştır.

3.4.3. İmmobilize pepsin enziminin depolama kararlılığı

CS-Fc-ald-Pep'in depolama kararlılığını incelemek için CS-Fc-ald-Pep'den 5 mg alınarak tüpe konulmuştur. Üzerine 2,5 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi ve 0,5 mL hemoglobin (substrat) çözeltisinden eklenerek 30 dk karıştırılmıştır. Bunu takiben 5 mL TCA eklenerek 30 dk daha ultrasonik su banyosunda karıştırma işlemine devam edilmiştir. Deney süreci bittiğinde santrifüjleme yapılarak UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 280 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu işlem dört günde bir olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlanmıştır. Böylece iki ay sonunda immobilize enzimin aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplanmıştır.

3.4.4. İmmobilize lipaz ve serbest lipaz enziminin aktifliğine pH etkisi

İmmobilize lipaz enziminin aktifliğine pH etkisini incelemek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği CS-Fc-ald desteğinden 5'er mg alınarak 9 (dokuz) adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine pH tamponlarının (pH 2-9) her birinden 4 mL KCl-HCl (pH 2), sitrat-sitrik asit (pH 3 ve 4), fosfat (pH 6-8) ve borat-HCl (pH 9 ve 10) tamponu, substrat çözeltisinden p-Nitrofenil palmitat (p-NPp)'dan 1 mL alınarak 37°C'de ultrasonik su banyosunda 60 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 405 nm'deki absorbans değerleri

belirlenmiştir. Bu absorbans değerleri grafikleştirilerek optimum pH belirlenmiştir. Serbest enzim ve immobilize enzimin optimum pH değerlerini kıyaslayabilmek için, serbest lipazın aktifliğine pH etkisi de incelenmiştir. Bunun için, dokuz adet deney tüpü içerisine serbest lipaz enziminin 2,5 mg alınarak immobilize enzim için yapılan işlemlerin aynısı tekrarlanmıştır.

3.4.5. İmmobilize lipaz ve serbest lipaz enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi

İmmobilize lipaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği CS-Fc-ald desteğinden 5 mg alınarak yedi adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine optimum pH'daki tampon çözeltisinden 4 mL ve substrat çözeltisinden (p-NPp) 1 mL ilave edilmiştir. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 405 nm'de absorbans değişimi izlenmiştir. Bu işlem 20-70°C sıcaklık değerleri arasında 10'ar derecelik artışlarla tekrarlanmıştır. Daha sonra bu değerler grafikleştirilerek çalışılan immobilize CS-Fc-ald için optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Serbest enzim ve immobilizasyonun gerçekleştirildiği CS-Fc-ald desteğinin optimum sıcaklık değerlerini kıyaslayabilmek için serbest lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisi de incelenmiştir. Bunun için, yedi adet deney tüpü içerisine serbest lipaz enziminin 2,5 mg alınarak immobilize enzim için yapılan işlemler tekrarlanmıştır.

3.4.6. İmmobilize lipaz enziminin depolama kararlılığı

(CS-Fc-ald-Lip)'in depolama kararlılığını incelemek için (CS-Fc-ald-Lip)'den 5'er mg alınarak tüplere konulmuştur. Üzerlerine 4 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi ve 1 mL p-NPp (substrat) çözeltisinden eklenerek 60 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 405 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu işlem dört günde bir olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlanmıştır. Böylece iki ay sonunda immobilize enzimin aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplanmıştır.

3.5. Çift Enzim (Pepsin ve Lipaz) İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu

Bölüm 3.4 de belirtildiği gibi elde edilen (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip)'ten 5'er mg alınarak bir tüp içerisine konulup optimum şartlar belirlenmiştir.

3.5.1. Çift enzim aktifliğine pH etkisi

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in aktifliğine pH etkisi; (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip) desteklerinden 5'er mg alınarak 10 (on) adet deney tüpüne konulmuştur.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) çiftindeki immobilize lipazın optimum pH'sını belirlemek için uygulanan yöntem aşağıda belirtildiği gibi olmuştur.

Tüplerdeki (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in üzerine çalışılacak pH tamponlarından; [glisin-HCl /pH 1-2, sitrat-sitrik asit /pH 3-4, fosfat /pH 6-8 ve borat-HCl /pH 9 ve 10] 2,5 mL, substrat çözeltisinden (hemoglobin) 0,5 mL alınarak 37 °C' de ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 mL trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 280 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) çiftindeki immobilize pepsinin optimum pH'sını belirlemek için uygulanan yöntem aşağıda belirtildiği gibi olmuştur.

Tüplerdeki (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in üzerine çalışılacak pH tamponlarından; [glisin-HCl /pH 1-2, sitrat-sitrik asit /pH 3-4, fosfat /pH 6-8 ve borat-HCl /pH 9-10] 2,5 mL, substrat çözeltisinden p-nitrofenil palmitat (p-NPp) 1 mL alınarak 37 °C' de ultrasonik su banyosunda 60 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 405 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) için her iki ortamda belirlenen absorbans değerleri grafikleştirilerek optimum pH'lar belirlenmiştir.

3.5.2. Çift enzim aktifliğine sıcaklık etkisi

(CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip) aktifliğine sıcaklık etkisini incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip) immobilize enzimlerinden 5'er mg alınarak 6 (altı) adet deney tüpüne konulmuştur.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) çiftindeki immobilize lipazın optimum sıcaklığını belirlemek için uygulanan yöntem aşağıda belirtildiği gibi olmuştur.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in üzerine 4 mL pH 9 tamponu, substrat çözeltisinden (p-nitrofenil palmitat /p-NPp) 1 mL alınarak ultrasonik su banyosunda 60 dk karıştırılmıştır. Bu işlem 20-70°C sıcaklık değerleri arasında 10'ar derecelik artışlarla tekrarlanmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 405 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) çiftindeki immobilize pepsinin optimum sıcaklığını belirlemek için uygulanan yöntem aşağıda belirtildiği gibi olmuştur.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in üzerine 2,5 mL pH 4 (sitrat-sitrik asit) tamponu, substrat çözeltisinden (hemoglobin) 0,5 mL alınarak ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 mL trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Bu işlem 20-70°C sıcaklık değerleri arasında 10'ar derecelik artışlarla tekrarlanmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 280 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) için her iki ortamda belirlenen absorbans değerleri grafikleştirilerek optimum sıcaklıklar belirlenmiştir.

3.5.3. Çift enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in aktifliğine hemoglobin substratının etkisini incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip) immobilize enzimlerinden 5'er mg alınarak 7 (yedi) adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine 0,243 M'lık stok hemoglobin çözeltisinden değişen miktarlarda (3,00-0,25 mL) ilave edilmiştir. Tüplerdeki toplam hacim

8 mL olacak şekilde optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edilip optimum sıcaklığa getirilmiş ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Daha sonra her bir tüpe 5 mL TCA eklenip 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Altı farklı derişime (0,0911-0,0075 mM) sahip tüpler içerisindeki substrat çözeltilerinin absorbens değışimleri, karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresinde 280 nm'de izlenmiştir.

(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in aktifliğine p-NPp substratının etkisini incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip) immobilize enzimlerinden 5'er mg alınarak 9 (dokuz) adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine 1 mM'lık stok p-NPp çözeltisinden değışen miktarlarda (5,00-0,2 mL) ilave edilmiştir. Tüplerdeki toplam hacim 5 mL olacak şekilde optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edilip optimum sıcaklığa getirilmiş ultrasonik su banyosunda 60 dk karıştırılmıştır. Dokuz farklı derişime (1,00-0,04 mM) sahip tüpler içerisindeki substrat çözeltilerinin absorbens değışimleri, karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresinde 405 nm'de izlenmiştir.

Serbest enzim ve çift enzimin (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) kinetik parametrelerini kıyaslayabilmek için serbest lipaz ve serbest pepsinin aktifliğine substrat derişiminin etkisi de incelenmiştir. Bunun için, tüp içerisine yukarıda çift enzim için hazırlanan koşullar serbest enzimler içinde aynı prosedürde uygulanmıştır.

Artan substrat derişimine karşı absorbens değeri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin denkleminde (ax^2+bx+c) eğim bulunup, $v = \left(\frac{A}{t}\right) x \left(\frac{1}{Eğim}\right)$ formülü ile herbir derişim için hız değeri hesaplanmış, *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafiği çizilerek K_m ve V_{mak} değeri belirlenmiştir.

3.5.4. Çift enzimin tekrar kullanılabilirliği

Çift [(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)] enzimdeki immobilize lipazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip)'den 5'er mg alınarak bir tüp içerisine konulmuştur. Üzerine 4 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi ve 1 mL substrat çözeltisinden p-nitrofenil palmitat (p-NPp) alınarak 50°C'de ultrasonik su

banyosunda 60 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 405 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Çift [(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)] enzimdeki immobilize pepsinin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip)'den 5'er mg alınarak bir tüp içerisine konulmuştur. (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in üzerine 2,5 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi, substrat çözeltisinden (hemoglobini) 0,5 mL alınarak 60°C'de ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 mL trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 280 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) için her iki ortamda belirlenen absorbans değerleri grafikleştirilerek optimum pH'lar belirlenmiştir.

3.5.5. Çift enzimin depolama kararlılığı

Çift [(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)] enzimdeki immobilize lipazın depolama kararlılığını incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip)'den 5'er mg alınarak bir tüp içerisine konulmuştur. Üzerine 4 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi ve 1 mL substrat çözeltisinden p-nitrofenil palmitat (p-NPP) alınarak 50°C'de ultrasonik su banyosunda 60 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, santrifüjlenen çözeltinin berrak kısmı alınarak UV-GB spektrofotometresi ile 405 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu işlem dört günde bir olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlanmıştır. Böylece immobilize enzimin aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplanmıştır. Çift [(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)] enzimdeki immobilize pepsinin depolama kararlılığını incelemek için (CS-Fc-ald-Pep) ve (CS-Fc-ald-Lip)'den 5'er mg alınarak bir tüp içerisine konulmuştur. (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)'in üzerine 2,5 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi, substrat çözeltisinden (hemoglobini) 0,5 mL alınarak 60 °C'de ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 mL trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Deney süreci bittiğinde santrifüjleme yapılarak UV-GB spektrofotometresi ile 280 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu işlem dört günde bir olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlanmıştır. Böylece immobilize enzimin aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplanmıştır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, çift enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere ferrosenkarboksaldehit takılı çitosan (CS-Fc-ald) destek polimeri sentezlenmiştir. (CS-Fc-ald) polimerin element analizi, FT-IR, SEM/EDX, ^{13}C -NMR, TGA ve Four-Probe tekniği ile iletkenlikleri alınarak karakterize edilmiştir. Ayrıca zeta potansiyel ölçüm cihazı ile parçacık boyut analizi belirlenmiştir.

Daha sonra, (CS-Fc-ald) polimerine pepsin immobilize edilerek (Cs-Fc-ald-Pep) ve lipaz immobilize edilerek (Cs-Fc-ald-Lip) veriler elde edilmiştir. Her iki immobilize enzimlerin optimum pH ve sıcaklık koşulları araştırılmıştır. Daha sonra çift enzim varlığında optimum pH ve sıcaklık koşulları belirlenerek karşılaştırılmıştır.

4.1. Fiziksel, Kimyasal ve Spektral Özelliklerin Değerlendirilmesi

Resim 4.1’de çitosan (CS) ve çitosan-ferrosenkarboksaldehit (CS-Fc-ald) polimerlerine ait fotoğraflar görülmektedir.



Resim 4.1. Çalışılan CS ve CS-Fc-ald görüntüleri

Element analizleri

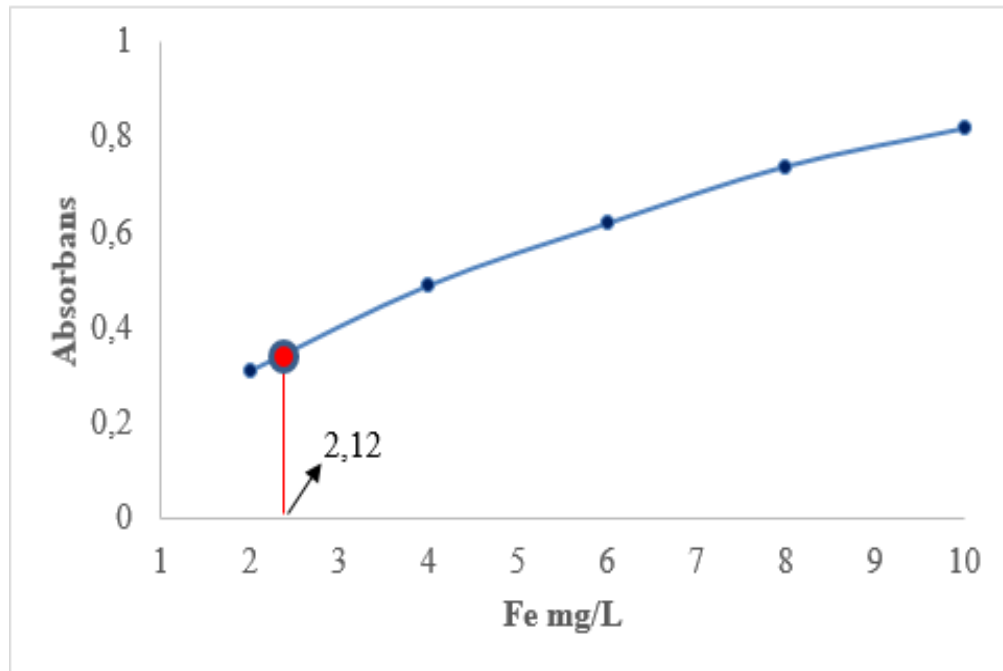
Çitosan (CS), ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald) ve ferrosenkarboksaldehit takılı çitosanın (CS-Fc-ald) element analizi ile ilgili sonuçlar Bölüm 3.1.2 de belirtildiği şekilde alınarak Çizelge 4.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'in M_w ve element analiz yüzdeleri

Bileşik (Renk)	Önerilen Birim (M_w)	% Hesaplanan (Bulunan)			
		C	H	N	Fe
Çitosan (CS) Beyaz	$C_{66}H_{123}N_{11}O_{46}$ * $M_w = 1805$	43,88 (41,22)	6,81 (6,48)	8,53 (7,72)	-
Ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald) Bordo	$C_{11}H_{10}FeO$ $M_w = 214$	61,68 (61,11)	4,67 (4,82)	- -	26,16 (24,93)
Çitosan-ferrosenkarboksaldehit (CS-Fc-ald) Turuncu	$C_{83}H_{142}N_{12}O_{50}Fe$ * $M_w = 2162$	46,04 (45,57)	6,56 (6,73)	7,77 (6,34)	(2,59) 2,12

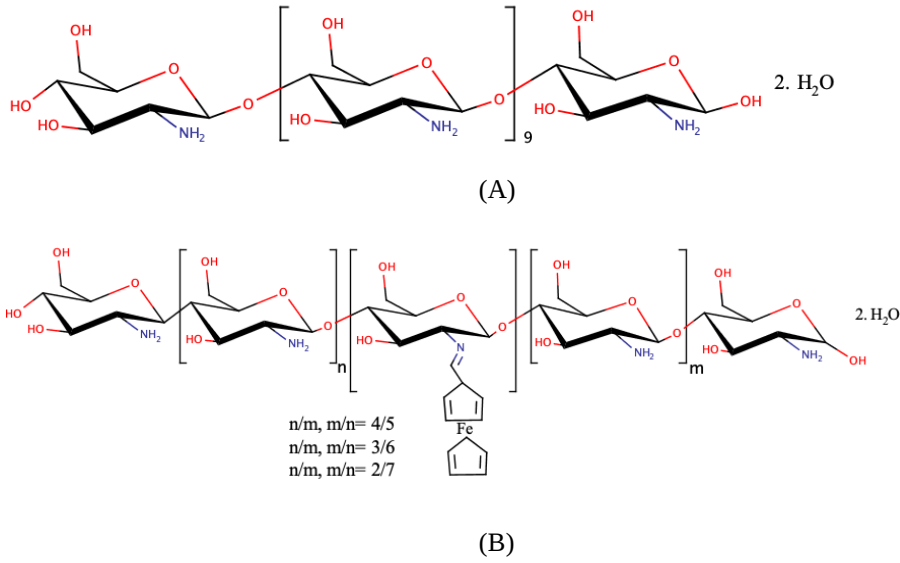
M_w^* : Ağırlıkça ortalama mol kütlesi

Demir iyonu tayini Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan Fe(II) nitratın 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm ve 10 ppm’lik standart çözeltileri hazırlanarak CS-Fc-ald yapısındaki Fe(II) iyonu miktarı Şekil 4.1’de belirtildiği gibi kalibrasyon grafiğinden bulunmuştur.



Şekil 4.1. Hazırlanan standartlar (Fe^{2+}) ve (CS-Fc-ald) örneğindeki demir iyonunun kalibrasyon grafiği

Element analiz sonuçları dikkate alındığında Şekil 4.2’deki gibi bir yapının meydana geldiği yorumu yapılabilir.



Şekil 4.2. Element analiz sonuçlarına göre öngörülen yapı: çitosan (A), ferrosenkarboksaldehit takılı çitosan (B)

Dört nokta iletkenlik ölçümü

Çizelgeden de görüldüğü gibi çalışılan maddelerin iletkenliği 10^{-7} - 100 Scm^{-1} aralığında bulunmuştur. Bu durum, çalışılan CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'in iletkenlik ile ilgili araştırmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Fc-ald'in iletkenliğinin büyük çıkması redoksça aktif bileşik olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Çitosana ferrosenin bağlanmasıyla artan iletkenlik Fe(II)/Fe(III) iyonlarının kısmi yük aktarımı sağlamasından kaynaklandığı düşünülebilir. CS ve CS-Fc-ald'lerin iletkenliğinin sırasıyla $5,45 \times 10^{-5}$ ve $5,62 \times 10^{-5}$ olduğu Çizelge 4.2'de görülmektedir. Çitosanın iletkenliğinin artması, Fc-ald'in çitosana bağlandığının bir delili olarak da değerlendirilebilir.

Çizelge 4.2. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald maddelerinin katı hal iletkenlik ölçüm değerleri ve pelletlerin görüntüleri

Çalışılan Madde	Pelletlerin		İletkenlik (Scm^{-1})
	görüntüsü	Kalınlığı (mm)	
Çitosan (CS)		0,44	$5,45 \times 10^{-5}$
Ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald)		0,28	$9,08 \times 10^{-5}$
Çitosan-ferrosenkarboksaldehit (CS-Fc-ald)		0,44	$5,62 \times 10^{-5}$

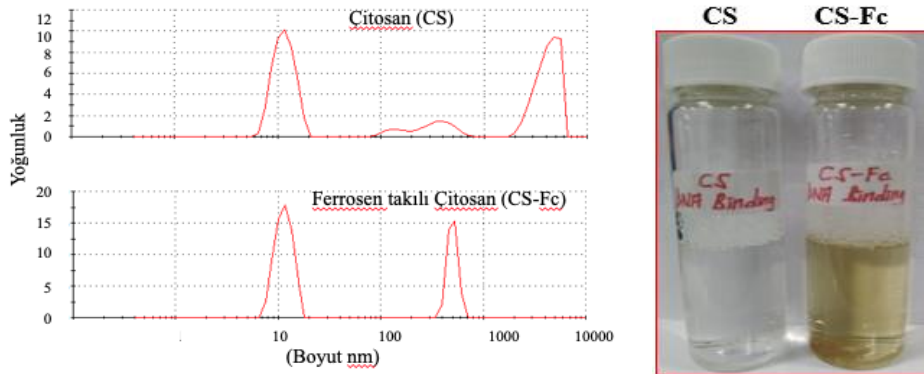
Zeta potansiyel ölçüm cihazı ile parçacık boyut analizi

Şekil 4.3’de taneciklerin saçtığı ışığın yüzdesi, Çizelge 4.3’de ise taneciklerin boyutları verilmiştir. Zetasizer analiziyle, çitosan ve ferrosenkarboksaldehit takılı çitosanların parçacık boyutu incelemeleri sonucunda nano boyutta olduğu ve CS için, 11,70 nm ile 4205 nm arasında değişen 3 farklı dağılım gösterdiği, bu büyüklüklerden en fazla olanın % 44, 2 oranı ile 11, 70 nm’nin olduğu belirlenmiştir. CS-Fc-ald için ise, 11,48 nm ve 503,4 nm arasında 2 farklı boyutun olduğu ve % 64,7 oranıyla 11,48 nm’lik boyutun yapıda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçla, ferrosenkarboksaldehitin çitosana bağlanması sonucunda büyüklük boyutunun daha az çeşitli olduğu ve polimer zincir uzunluğunun daha sadeleşerek yaklaşık 10 nm lik büyüklüklere sahip olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. CS ve CS-Fc-ald’in Zetasizer analizlerine göre boyut karşılaştırması

Numune	Pik 1		Pik 2		Pik 3	
	Boyut (nm)	Şiddeti (%)	Boyut (nm)	Şiddeti (%)	Boyut (nm)	Şiddeti (%)
CS	11,70	44,2	4205	43,8	373,9	8,8
CS-Fc	11,48	64,7	503,4	35,3	0,00	-

Şekil 4.3’de verilen CS ve CS-Fc-ald grafikleri incelendiğinde Çizelge 4.3’de verilen pikler, taneciğin saçtığı ışık yüzdelere aittir. Grafikler karşılaştırıldığında, CS-Fc-ald’e gönderilen ışık saçılımının CS’a göre daha fazla olduğu görülmektedir. CS taneciğinin saçtığı ışık yüzdesi %10 civarında iken, CS-Fc-ald taneciğinde saçılan ışık yüzdesi %15’in üzerindedir. Bu durum tanecik boyutu ile ilgilidir. CS-Fc-ald’in tanecik boyutu daha küçük olduğu için saçılan ışığın yüzdesi de artmıştır.

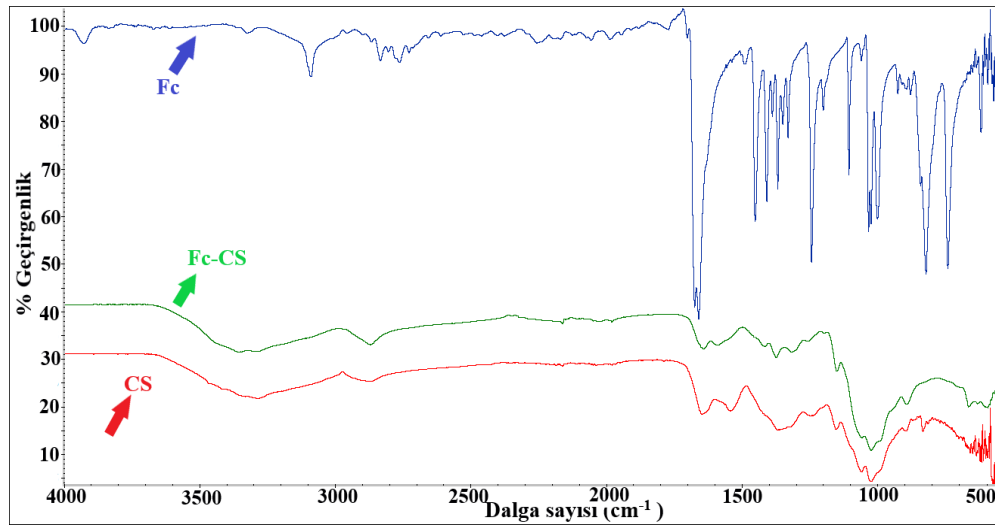


Şekil 4.3. CS ve CS-Fc-ald boyutu - saçılan ışık yoğunluğu (%) grafikleri

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumları (FT-IR)

Çitosan (CS), ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald), ferrosenkarboksaldehit takılı çitosan (CS-Fc-ald), lipaz enzimi, pepsin enzimi, (CS-Fc-ald-Lip) ve (CS-Fc-ald-Pep) için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumları incelenerek aşağıda yorumlanmıştır.

Çitosan (CS) ile ferrosenkarboksaldehitin (Fc-ald) katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan ürün olan CS-Fc-ald polimerine ait FT-IR spektrumu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4). Çitosana ait FT-IR spektrumunda, 3357 cm^{-1} ve 3286 cm^{-1} 'deki piklerin amin gruplarına, 3428 cm^{-1} deki yayvan pikin ise hidroksil grubuna ait olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.4. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'e ait FT-IR spektrumları

CS'a ait alifatik ν_{C-H} titreşimi 2870 cm^{-1} de, amit I ve amit II bantları sırasıyla 1655 ve 1591 cm^{-1} de gözlenmiştir. Fc-ald'e ait FT-IR spektrumunda, 1680 cm^{-1} de aldehit grubuna ait karakteristik karbonil piki gözlenmiş olup, 1455 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} ve 1369 cm^{-1} 'deki piklerin Fc-ald halkasına ait CH piklerine karşılık geldiği, 488 cm^{-1} ve 842 cm^{-1} deki titreşim frekanslarına karşılık gelen piklerin ise Fe (Cp)'a halkasına ait karakteristik pikler olarak gözlenmiştir.

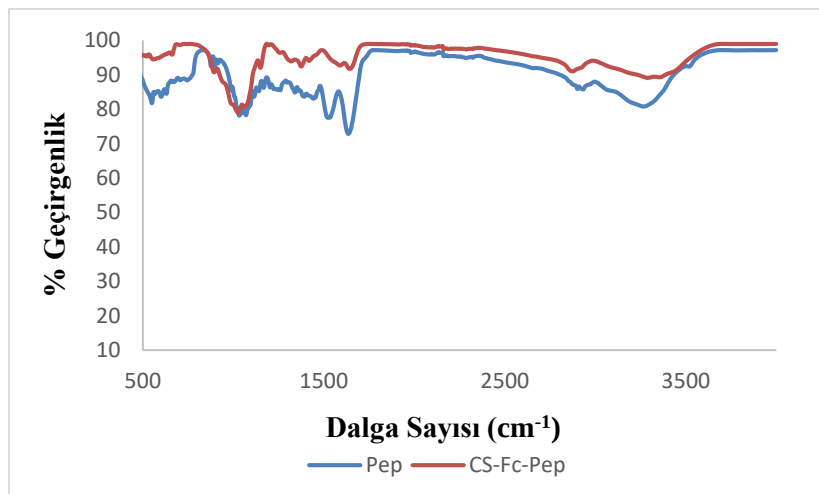
CS-Fc-ald'e ait FT-IR spektrumu incelendiğinde karboksaldehite ait titreşim frekansının 1680 cm^{-1} de görülmemesi CS ile aldehit arasında katılma tepkimesinin gerçekleştiğinin bir delili olarak bakılabilir. Ayrıca Fc-ald'e ait 1455 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} ve 1369 cm^{-1} 'deki piklerin

etkileşim sonucunda 1422 cm^{-1} , 1372 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} 'e kaydı olduğu görülmüştür. Fc-ald ve CS-Fc-ald spektrumlarında gözlenen $\delta(\text{CH})_{\text{cp}}$ 'ne ait pikler karşılaştırıldığında, Fc-ald'e ait 488 cm^{-1} ve 842 cm^{-1} 'deki piklerin kayarak 485 cm^{-1} ve 821 cm^{-1} 'de ortaya çıkması katılımın gerçekleştiğini göstermektedir. Ferrosenkarboksaldehit ve çitosan arasındaki katılma ayrılma sonucunda oluşan Schiff bazına ait imin piki, amit I/amit II bantlarıyla çakıştığı için gözlenememiştir.

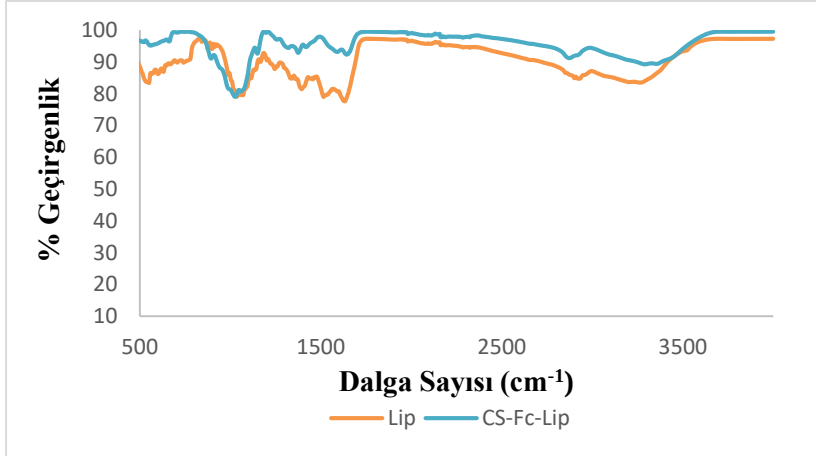
Çizelge 4.4. CS, Fc-ald, CS-Fc-ald, CS-Fc-ald-Lip ve CS-Fc-ald-Pep'in FT-IR spektrumları

Bileşiğin Sembolü	$V_{\text{OH}} / V_{\text{NH}} / V_{\text{CHO}}$	$V_{\text{(amit I/amit II)}}$	$V_{\text{C-H}}$ (alifatik)	$\delta(\text{CH})_{\text{cp}}$	$V_{\text{C-H}}$ (aromatik)
Çitosan (CS)	3428/3357, 3286/-	1655 /1591	2870	-	-
Ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald)	1680	-	-	488,842	1455, 1412,1369
Çitosan-Ferrosenkarboksaldehit (CS-Fc-ald)	-/-, 3286/-	1652/1546	2867	485,821	1422,1372, 1319
CS-Fc-ald-Lip	-	-	-	713	1257
CS-Fc-ald-Pep	-	-	-	711/654, 555	1201-1257

İmmobilize (CS-Fc-ald-Lip ve CS-Fc-ald-Pep) ve serbest (Lip ve Pep) enzimlerin FT-IR spektrumları aşağıda $3370\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$, $1650\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ve $700\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ lik bölgeleri dikkate alınarak FT-IR spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.5. Pep ve CS-Fc-ald-Pep'e ait FT-IR spektrumları



Şekil 4.6. Lip ve CS-Fc-ald-Lip'e ait FT-IR spektrumları

CS-Fc-ald-Pep ve pepsin enzimine ait FT-IR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde, pepsin enzimine ait 707 cm^{-1} , 1203 cm^{-1} ve 1260 cm^{-1} 'deki piklerin CS-Fc-ald-Pep'te 711 cm^{-1} , 1201 cm^{-1} ve 1257 cm^{-1} kaydığı gözlenmiştir. Yine pepsine ait $631\text{ cm}^{-1}/601\text{ cm}^{-1}/551\text{ cm}^{-1}$ 'deki üçlü pikin CS-Fc-ald'le etkileşimi sonucunda 634 cm^{-1} - 555 cm^{-1} arasında yayvan pik olarak gözlenmiştir. Tüm bu titreşim frekanslarının karşılaştırılması sonucunda, pepsine ait titreşim frekanslarının CS-Fc-ald-Pep'de de görünmesi pepsinin CS-Fc-ald'e bağlandığının bir delili olarak yorumlanmıştır. Genel olarak CS-Fc-ald'e ait titreşim frekanslarından 3357 cm^{-1} , 3286 cm^{-1} ve 3428 cm^{-1} deki piklerin serbest enzim ve immobilize enzimde de gözlenmesi 3428 - 3286 cm^{-1} 'e karşılık gelen bölgedeki değişiklikler hakkında bir yorum yapılmasını mümkün kılmamıştır.

CS-Fc-ald-Lip ve lipaz enzimine ait FT-IR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde, lipaz enzimine ait 709 cm^{-1} deki pikin CS-Fc-ald-Lip'te 713 cm^{-1} 'e, 1246 cm^{-1} deki pikin ise 1257 cm^{-1} 'e kaydığı görülmüştür. Daha detaylı bir değerlendirme yayvan piklerin oluşumu nedeniyle verilememiştir.

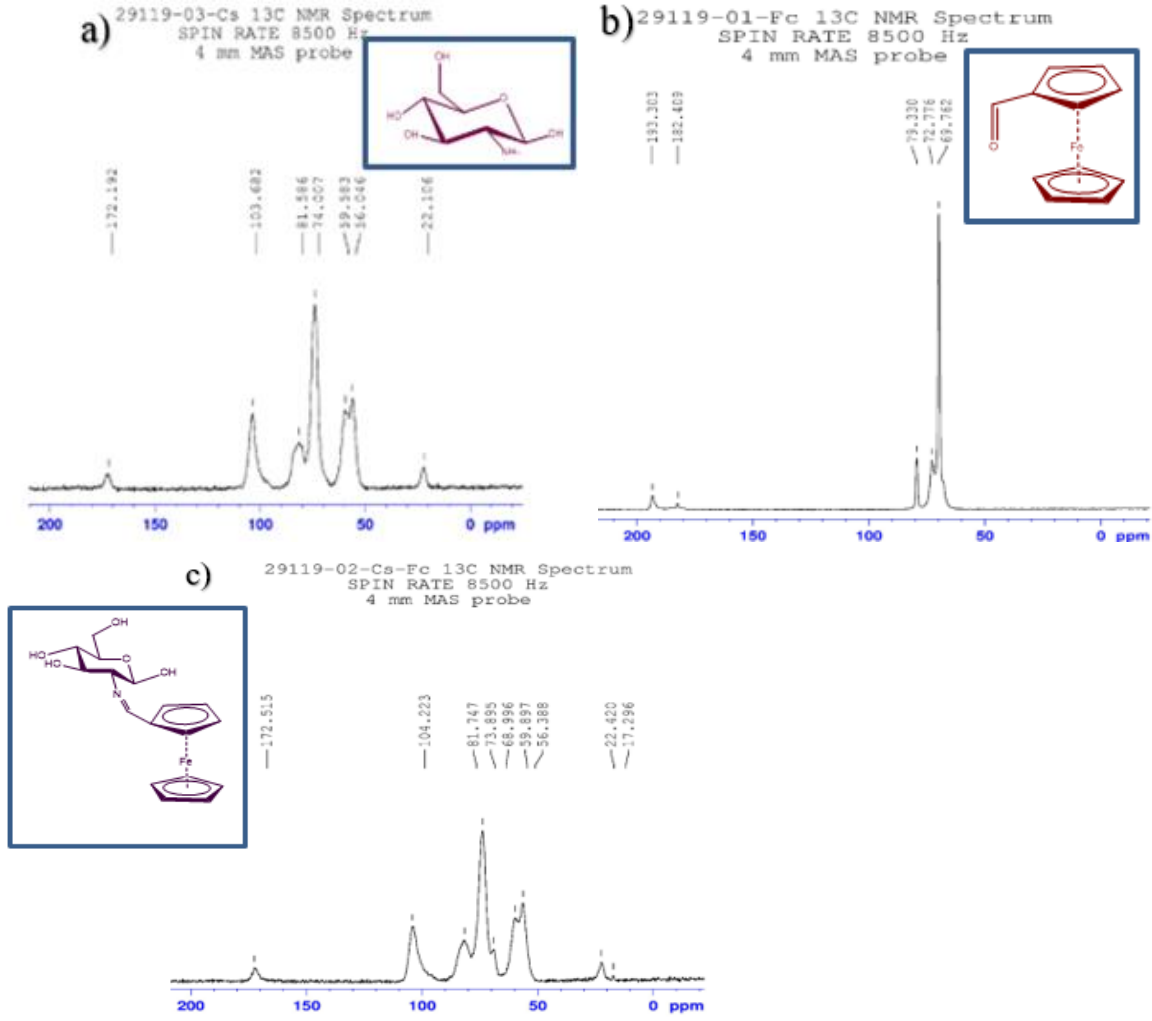
Katı ^{13}C -NMR ile çitosan (CS), ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald) ve CS-Fc-ald karakterizasyonları

CS-Fc-ald kodlu destek polimerin katı ^{13}C -NMR yorumunu yapabilmek için hem çitosanın (CS) hem de ferrosenin (Fc-ald) katı ^{13}C -NMR'ları alınıp yorumlanmıştır. Çitosan (CS), ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald), (CS-Fc-ald) kodlu çalışılan maddelerin Bölüm 3.1.2.'da

anlatıldığı şekilde alınan katı ^{13}C -NMR verileri Çizelge 4.5.'de, spektrumlar ise Şekil 4.7'de verilmiştir.

Çitosanın (CS) halka karbonlarına ait bantlar beklendiği gibi polimerik yapıdan dolayı yayvan olarak ortaya çıkmıştır. $-\text{NH}_2$ grubunun bağlandığı karbonun piki (C_2) 22,106 ppm, $-\text{CH}_2\text{OH}$ grubundaki karbon piki (C_6) ikili olarak 56,046 ve 59,583 ppm de görülmüştür. Çitosan halkasındaki $-\text{CH}-\text{CH}-\text{O}$ grubunun karbon piki (C_5) 74,007 ppm de, $\text{CH}-\text{OH}$ grubundaki karbona ait pikin (C_3) ise 103,682 ppm de görülmüştür. Çitosan polimerindeki $-\text{CH}-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}$ grubuna ait karbon piki (C_4) 81,586 ppm ve $-\text{CH}-\text{CH}(\text{O})$ grubuna ait karbon piki (C_1) ise 172,192 ppm de görülmüştür.

Ferrosenkarboksaldehitin (Fc-ald) katı ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, aldehit karbonuna ait (C_7) piki 193,303 ppm de, aldehitin bağlı olduğu pentadienil halkalarına ait karbonların pikleri sırasıyla (C_8 ve C_9) 72,736 ppm ve 79,330 ppm de ortaya çıktığı görülmüştür. Diğer pentadienil halkasındaki karbon atomlarının pikleri (C_{10}) tekli ve şiddetli olarak 69,762 ppm'de görülmüştür. Sentezlenen CS-Fc-ald'in katı ^{13}C -NMR spektrumunda, çitosanda olduğu gibi, polimerik yapıdan dolayı yayvan pikler ortaya çıkmıştır. CS-Fc-ald polimerinde Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi çitosana ferrosen takılı ve ferrosen takılı olmayan yapılar mevcuttur. Ferrosen grubunun bağlanması sonucunda (C_2) karbonun piki 22,106 ppm den 22,420 ppm'e kaydığı ve 17,296 ppm'de zayıf yeni bir pikin olduğu görülmüştür. Bu pikin (C_{11}) aldehitin katılması sonucunda oluşan $\text{Fc}-\text{C}=\text{N}/\text{Fc}-\text{C}-\text{N}$ imin bağından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çitosana ferrosenkarboksaldehitin katılması sonucunda çitosanın $-\text{CH}-\text{OH}$ grubundaki karbona ait pikin (C_3) ise 103,682 ppm'den 104,223 ppm'e, $-\text{CH}-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}$ grubuna ait karbon pikinin (C_4) 81,586 ppm den 81,747 ppm'e, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{O}$ grubunun karbon piki (C_5) ise 74,007 ppm'den 73,895 ppm'e kaydığı şeklinde yorum yapılmıştır. Ayrıca çitosanın $-\text{CH}_2\text{OH}$ grubundaki karbon piki (C_6) ikili olarak 56,046 ppm ve 59,583 ppm'den, ferrosenkarboksaldehitin katılımıyla 56,388 ppm ve 59,897 ppm'e kaydığı yorumu yapılmıştır. 68,996 ppm'de görülen yeni pikin ferrosenkarboksaldehitin katılması sonucunda pentadienil halkasındaki karbon atomlarına ait olabileceği yorumu yapılmıştır. ^{13}C -NMR spektrumlarının değerlendirilmesi sonucunda, çitosana ferrosenkarboksaldehitin katılımıyla çitosanın ^{13}C -NMR spektrumunda gözlenmeyen yeni iki pik ve kaymaların olması hedeflenen ürünün oluştuğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Katı ^{13}C -NMR spektrumlarının görüntüleri : CS (a) , Fc-ald (b) ve CS-Fc-ald (c)

Çizelge 4.5. CS, Fc-ald ve CS-Fc-ald'e ait katı ^{13}C -NMR spektrumları

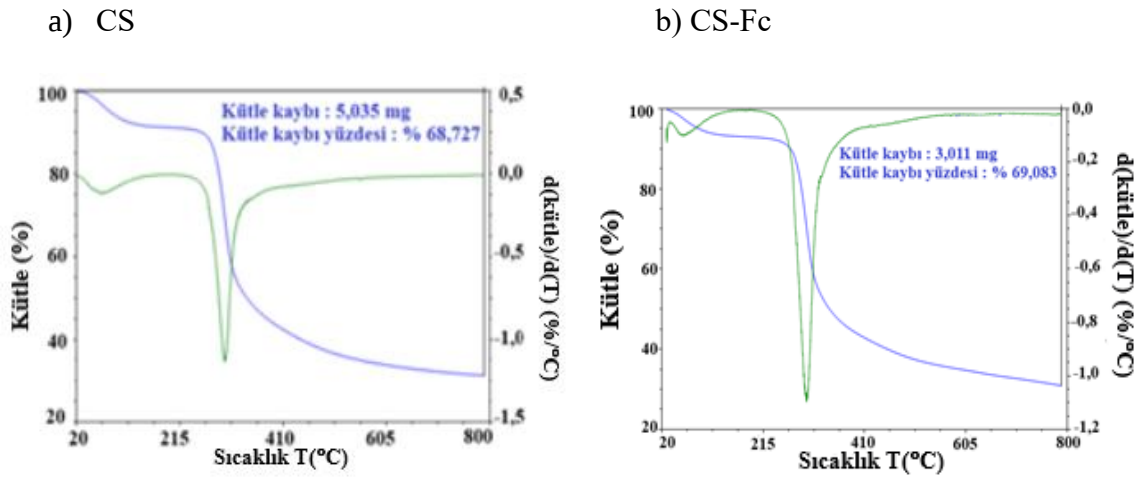
Sembol	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C _{8/9}	C ₁₀	C ₁₁
CS	172,192	22,106	103,682	81,586	74,007	56,046/ 59,583	-	-	-	-
Fc-ald	-	-	-	-	-	-	193,303	72,736/ 79,330	69,762	-
CS-Fc-ald	172,515	22,420	104,223	81,747	73,895	56,388/ 59,897	-	C ₄ ve C ₅ ile overlap	68,996	17,296

TGA analizi

Çitosan (CS) ve (CS-Fc-ald)'in Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı şekilde alınan TGA eğrilerinde gözlenen 100°C'nin altındaki kütle kayıplarının kristal suyundan ileri geldiği düşünülmüştür.

CS'ın TGA eğrisinde, 95°C'ye karşılık gelen % 6,6 lik kütle kaybının yapıdan üç mol H₂O'nun uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Tek basamakta gerçekleşen bozunma sıcaklığının 278°C'de başladığı görülmüştür. TGA eğrisine göre tek basamakta bozunmanın meydana geldiği ve 800°C'ye kadar süren ısıtma sonucunda kütle kaybının % 68,7 olduğu belirlenmiştir.

CS-Fc-ald'a ait TGA eğrisinde, 95°C'ye karşılık gelen % 5,3 lük kütle kaybının iki mol H₂O'nun uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Tek basamakta gerçekleşen bozunma sıcaklığının 272 °C de başladığı görülmüştür. TGA eğrisine göre tek basamakta bozunmanın meydana geldiği ve 800°C'ye kadar süren ısıtma sonucunda meydana gelen kütle kaybının % 69,1 olduğu belirlenmiştir.

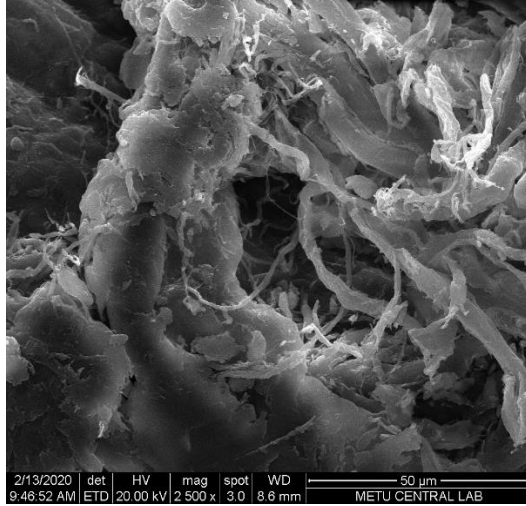


Şekil 4.8. CS ve CS-Fc-ald'e ait TGA eğrileri: CS (a), CS-Fc-ald (b).

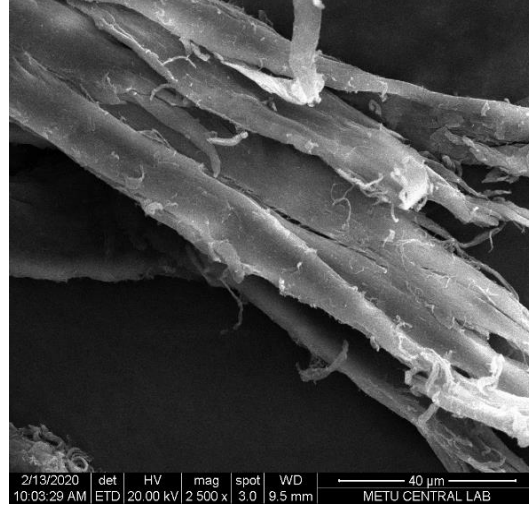
SEM analiz değerlendirilmesi

Çitosan (CS), ferrosenkarboksaldehit (Fc-ald), ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosan (CS-Fc-ald), ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosana immobilize edilen pepsin (CS-Fc-ald-Pep) ve lipaz (CS-Fc-ald-Lip) yapılarının SEM/EDX fotoğraf ve spektrumu alınarak yüzey morfolojilerindeki değişiklikler incelenmiştir. SEM fotoğraflarından, çalışılan tüm bileşiklerin yüzey morfolojilerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Çitosanın 1000 ve 2500 lük büyütmelerine karşılık gelen SEM görüntüleri CS-Fc-ald ile karşılaştırılmıştır (Resim 4.2). Her iki büyütme karşılaştırıldığında ferrosenkarboksaldehitin çitosana katılmasıyla yüzey

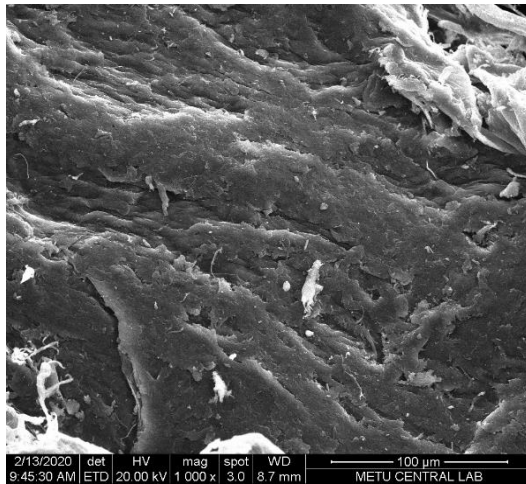
morfolojisinde büyük değişikliklerin olmadığı, çitosan yapısının korunduğu görülmüştür. Ancak EDX spektrumlarında belirgin farklılıklar görünmüştür.



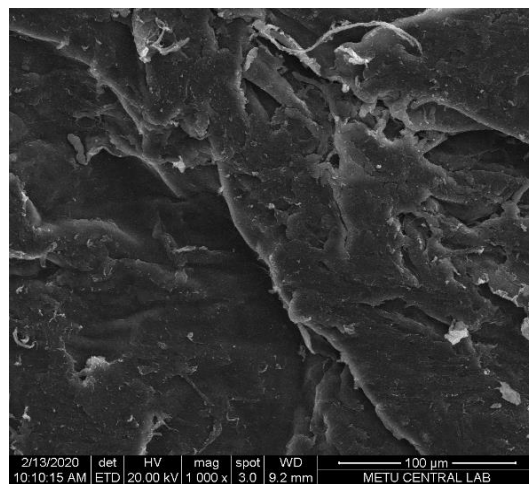
a) x2500



b) x2500



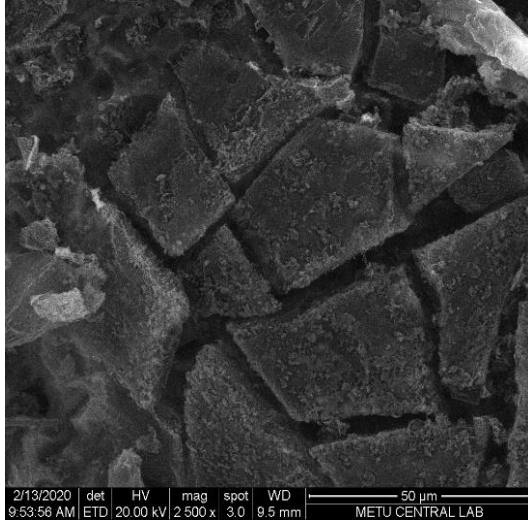
a) x1000



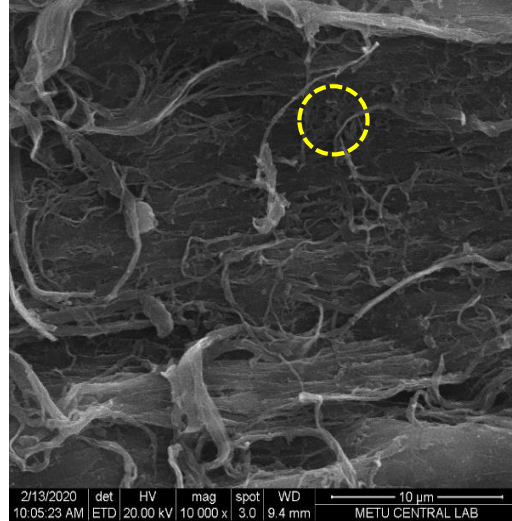
b) x1000

Resim 4.2 : CS (a) ve CS-Fc-ald'in (b) SEM (1000 ve 2500 büyütme) görüntüleri

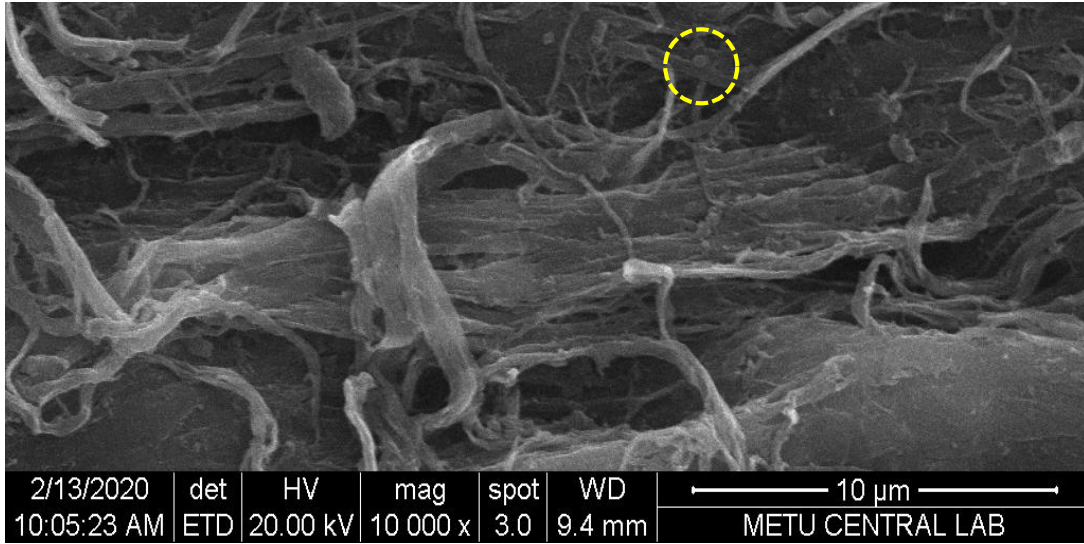
Ferrosenkarboksaldehitin (Fc-ald) SEM görüntüleri de alınmıştır. Fc-ald'in yüzey morfolojileri çitosan ve çitosan-ferrosen polimeri ile de karşılaştırıldığında farklılıklar olduğu görülmüştür. Fc-ald'in SEM görüntüleri incelendiğinde yüzey morfolojik yapının köşeli görüntüye sahip olduğu belirlenmiştir. CS-Fc-ald'in 10000'lik büyütme ile elde edilen SEM görüntülerinde Fc-ald'in takıldığını gösteren kübik yapılar belirlenebilmiştir (Resim 4.3). Ayrıca EDX spektrumlarında CS'a Fc-ald'in katılımını gösteren Fe izotoplarına ait pikler belirgin bir şekilde görülmüştür.



a) Fc-ald



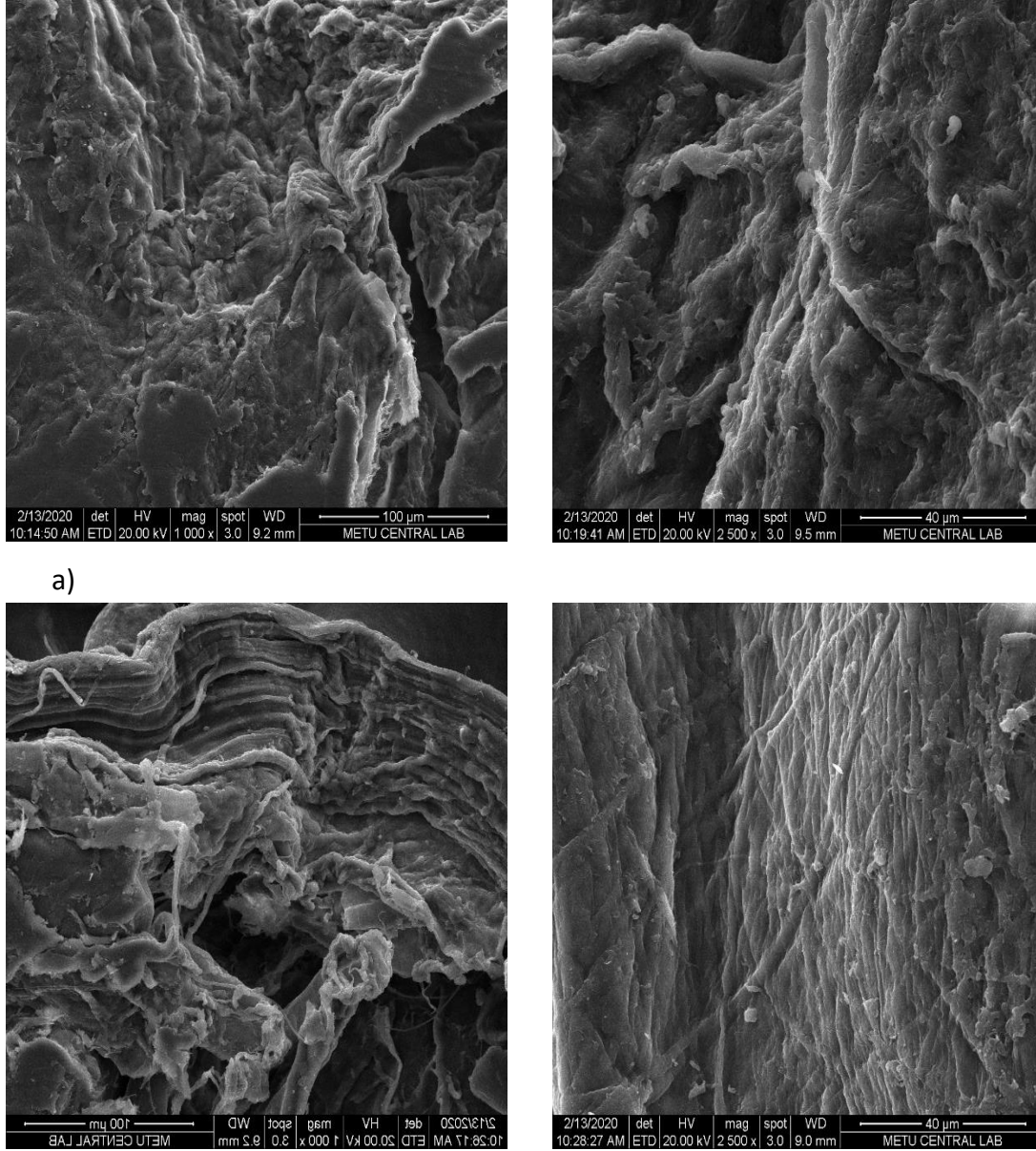
b) CS-Fc-ald



b) CS-Fc-ald

Resim 4.3. CS (a) ve CS-Fc-ald'in (b ve c) SEM (2500 ve 10000 büyütme) görüntüleri

Enzim immobilizasyonu sonucunda CS-Fc-ald'in yüzeyinde meydana gelen morfolojik değişiklikleri gözlemleyebilmek için SEM-EDX analizleri yaptırılmıştır. Hem pepsin hem de lipaz enzim immobilizasyonları sonucunda CS-Fc-ald'in yüzeyinde, enzimlerden dolayı farklılıklar belirlenmiştir. CS-Fc-ald-Pep'in morfolojik değişimi sonucunda damarimsı/köksü görüntülerine sahip olduğu, CS-Fc-ald-Lip'in ise ağimsı görüntülerine sahip olduğu görülmüştür (Resim 4.4). Ayrıca CS-Fc-ald-Pep ve CS-Fc-ald-Lip'in EDX görüntülerinde destekte Fe'in bulunduğu belirlenmiş olup immobilizasyon sonucunda ferrosen katılımının bozunmadığı yorumu yapılmıştır.

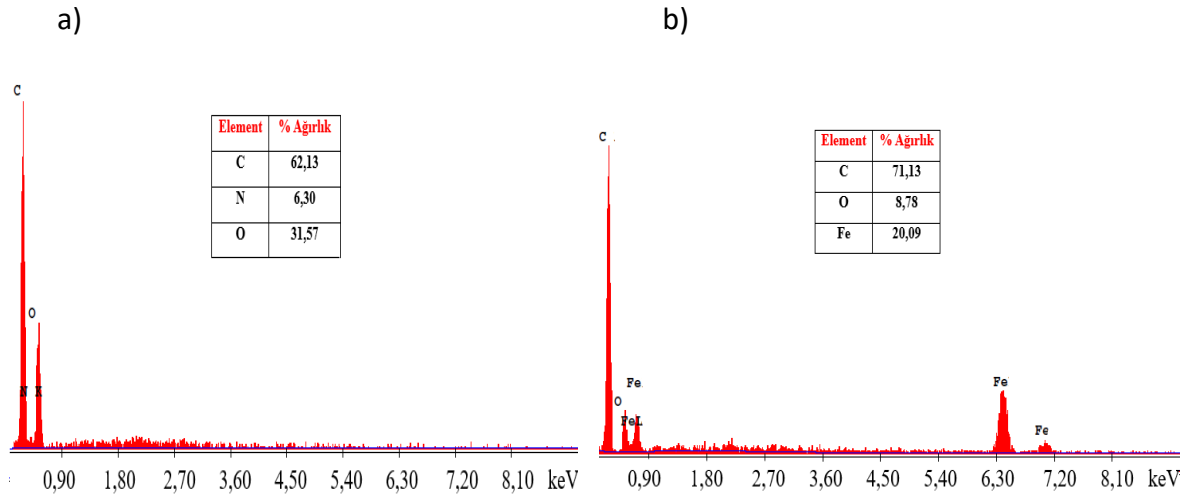


Resim 4.4. CS-Fc-ald-Pep (a) ve CS-Fc-ald-Lip'in (b) SEM (1000 ve 2500 büyütme) görüntüleri

EDX analiz değerlendirmeleri

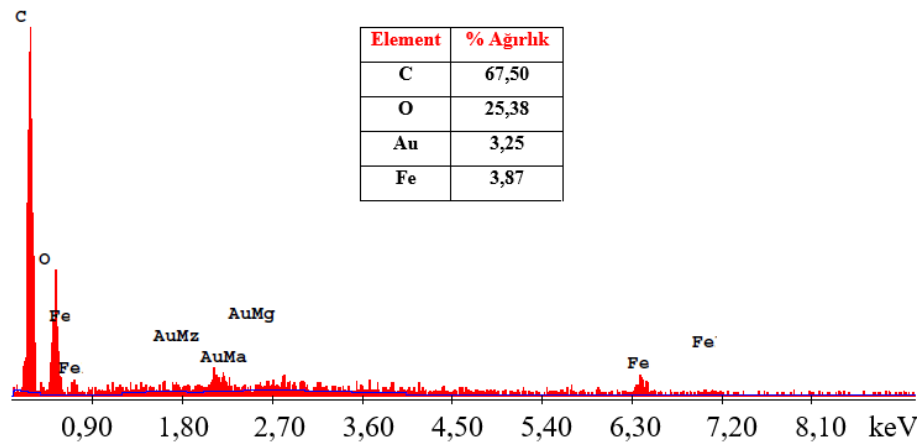
CS ve CS-Fc-ald polimerlerinin EDX spektrumlarını daha verimli karşılaştırmak için ferrosenkarboksaldehitin de EDX spektrumu alınmıştır.

Ferrosenkarboksaldehitin EDX spektrumuna göre, 6,30 keV'luk bölgede yoğun Fe izotoplarına ait pikleri, 0,45-0,9 keV'luk arasındaki bölgede ikili ve 6,75 keV'luk bölgede şiddeti düşük Fe izotoplarına ait pikler görünmüştür.



Şekil 4.9. CS (a) ve Fc-ald'in (b) EDX spektrumları

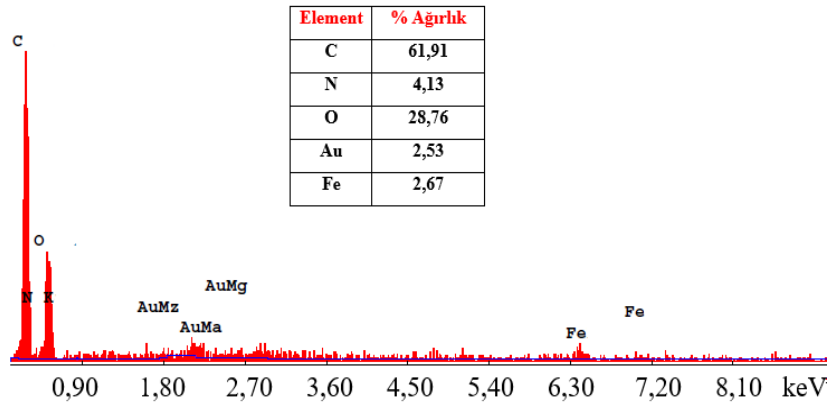
CS ve CS-Fc-ald EDX spektrumları karşılaştırıldığında ferrosenkarboksaldehite ait EDX spektrumunda Fe izotoplarına ait gözlenen pikler CS-Fc-ald EDX spektrumunda da görünmüştür. CS-Fc-ald EDX spektrumuna göre 6,30 keV'luk bölgede yine Fe izotoplarına ait pikleri, 0,45 keV'luk bölgede ve 6,30 keV'luk bölgede şiddeti düşük Fe izotoplarına ait pikler görünmüştür.



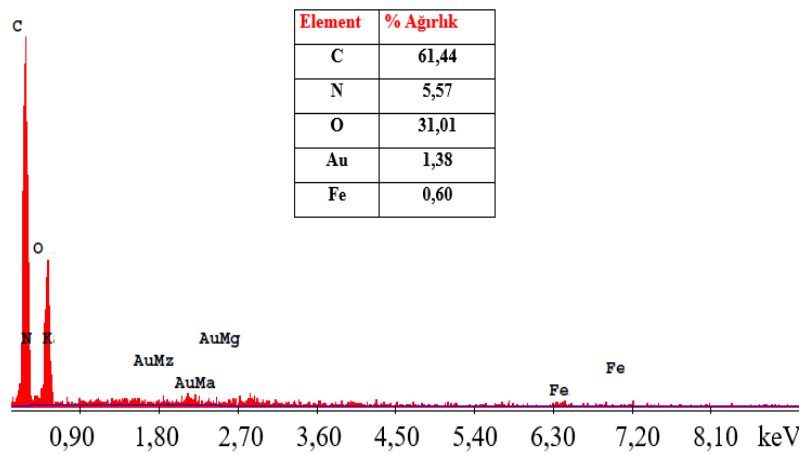
Şekil 4.10. CS-Fc-ald'in EDX spektrumu

İmmobilize desteklerin EDX spektrumları birlikte değerlendirildiğinde, çalışılan destekte bulunan ferrosene ait Fe izotoplarına ait piklerinin görünmesi immobilizasyon sonucunda ferrosenin yapıdan ayrılmadığı yorumu yapılmıştır.

a)



b)



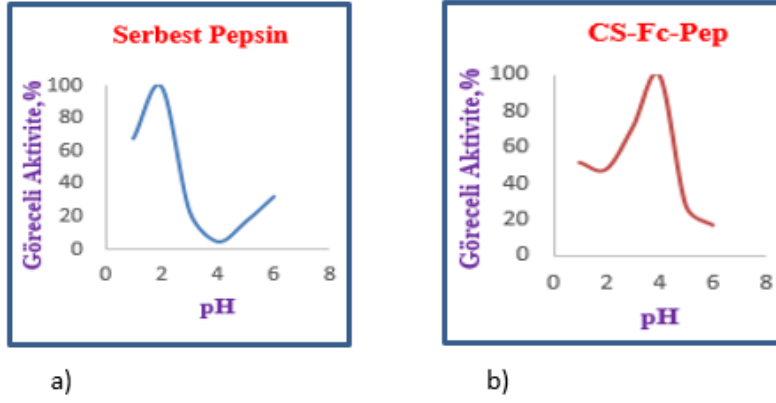
Şekil 4.11. CS-Fc-ald-Pep (a) ve CS-Fc-ald-Lip'in (b) EDX spektrumları

4.2. Serbest ve İmmobilize Pepsin ve Lipaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar

Serbest ve immobilize pepsin enziminin optimizasyon değerleri ve kinetik parametrelere ait verilere bu bölümde yer verilmiştir.

4.2.1. Serbest ve immobilize pepsinin aktifliğine pH etkisi

Serbest ve CS-Fc-ald polimerik desteğe immobilize edilen pepsin enzimi ve serbest pepsin enziminin aktifliğine pH etkisi, Bölüm 3.4.1.'de açıklanan yöntem kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.12.'deki grafikler elde edilmiştir.

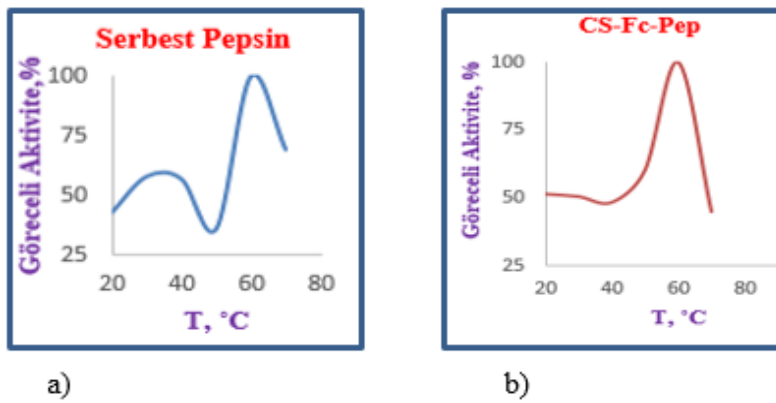


Şekil 4.12. Enzim aktifliğine pH etkisi: Serbest pepsin (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen pepsin

Serbest enzimin pH'sı 2, immobilize enzimin (CS-Fc-ald-Pep) optimum pH'sı 4 olarak bulunmuştur. Bu durumun enzimin immobilize edilmesiyle mevcut çevresinden etkilendiği yorumu yapılabilir.

4.2.2. Serbest ve immobilize pepsinin aktifliğine sıcaklık etkisi

Sentezlenen CS-Fc-ald polimerine immobilize edilen pepsin enzimi ve serbest pepsin enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi Bölüm 3.4.2'de açıklanan yöntem uygulanarak incelenmiş ve Şekil 4.13'deki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Serbest pepsin (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen pepsin

Serbest ve immobilize edilen pepsin için elde edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri Çizelge 4.6.'te verilmiştir.

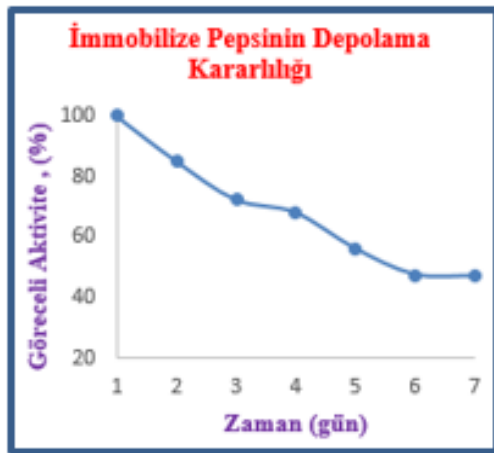
Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize edilen pepsin için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri

Ortam	Optimum Şartlar	
	pH	Sıcaklık
Serbest pepsin	2	60°C
İmmobilize pepsin	4	60°C

CS-Fc-ald'e immobilize edilen pepsinin optimum sıcaklığının serbest enzimin optimum sıcaklığıyla aynı olması immobilizasyon ile enzimin mevcut aktifliğinin etkilenmediği yorumu yapılabilir.

4.2.3. İmmobilize pepsin enziminin depolama kararlılığı

İmmobilize pepsinin oda koşullarında saklanması ve aktivitesini ne kadar süreyle devam ettirdiğini takip etmek için depolama kararlılığı deneyleri Bölüm 3.4.5.'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen UV-GB spektrumlarında 280 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınarak zamana karşı % bağıl aktivite grafikleri çizilmiştir. Dört günde bir alınan ölçümlere devam edilip elde edilen verilerden Şekil 4.14'deki grafik elde edilmiştir.

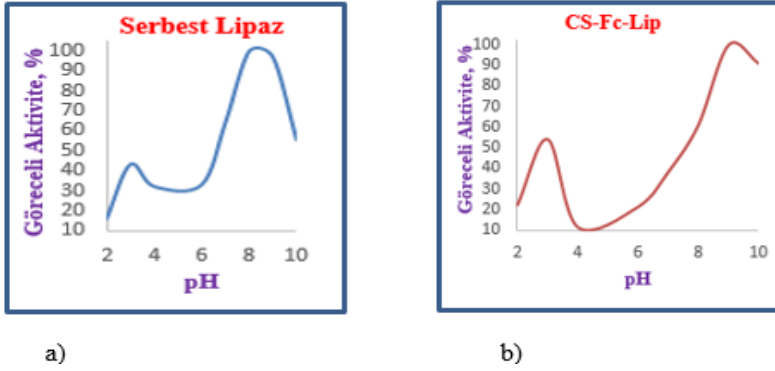


Şekil 4.14. İmmobilize pepsinin zamana bağlı gösterdiği bağıl aktiflik: CS-Fc-ald'e immobilize pepsin

CS-Fc-ald'e immobilize lipaz enziminin bağıl aktifliğinin %47,02'ini koruduğu belirlenmiştir.

4.2.4. Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine pH etkisi

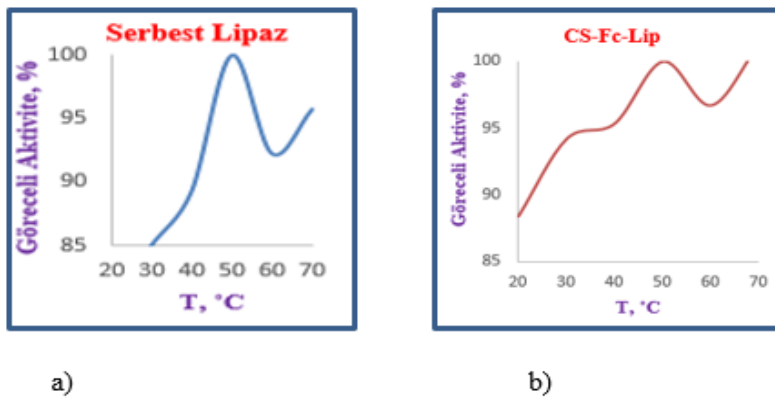
Serbest ve polimerik desteğe immobilize edilen lipaz enzimi ve serbest lipaz enziminin aktifliğine pH etkisi, Bölüm 3.4.1.'de açıklanan yöntem kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.15.'deki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.15. Enzim aktifliğine pH etkisi: Serbest lipaz (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen lipaz

4.2.5. Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine sıcaklık etkisi

Sentezlenen polimere immobilize edilen lipaz enzimi ve serbest lipaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi Bölüm 3.4.2'de açıklanan yöntem uygulanarak incelenmiş ve Şekil 4.16'daki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Serbest lipaz (a), CS-Fc-ald'e (b) immobilize edilen lipaz

Serbest ve immobilize lipaz için elde edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Serbest ve immobilize edilen lipaz için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri

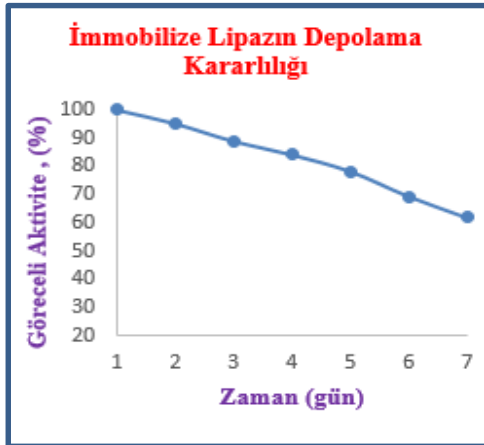
Ortam	Optimum Şartlar	
	pH	Sıcaklık
Serbest lipaz	8	50°C
İmmobilize lipaz	9	50°C

CS-Fc-ald'e immobilize edilen lipazın optimum sıcaklığının serbest enzimin optimum sıcaklığıyla aynı olması immobilizasyon ile enzimin mevcut aktifliğinin etkilenmediği yorumu yapılabilir.

4.2.6. İmmobilize lipaz enziminin depolama kararlılığı

İmmobilize lipazın oda koşullarında saklanması ve aktivitesini ne kadar süreyle devam ettirdiğini takip etmek için depolama kararlılığı deneyleri Bölüm 3.4.5.'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen UV-GB spektrumlarında 405 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınarak zamana karşı % bağıl aktivite grafikleri çizilmiştir. Dört günde bir alınan ölçümlere devam edilip elde edilen verilerden Şekil 4.17'deki grafik elde edilmiştir.



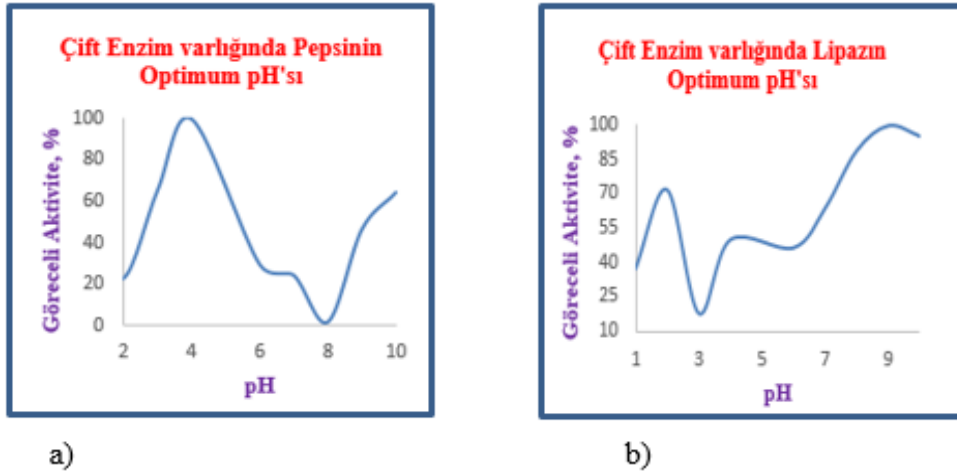
Şekil 4.17. İmmobilize lipazın zamana bağlı gösterdiği bağıl aktiflik: CS-Fc-ald'e immobilize lipaz

CS-Fc-ald'e immobilize lipaz enziminin bağıl aktifliğinin %61,81'ini koruduğu belirlenmiştir.

4.3. Çift Enzimin (Pepsin ve Lipaz) İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar

4.3.1. Çift enzim aktifliğine pH etkisi

Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin ve lipaz enzimlerinin aktifliğinde pH etkisi, Bölüm 3.4.1.'de açıklanan yöntem kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.18.'deki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.18. Çift Enzim aktifliğine pH etkisi: Çift Enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında Pepsin (a), Çift Enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında lipaz (b)

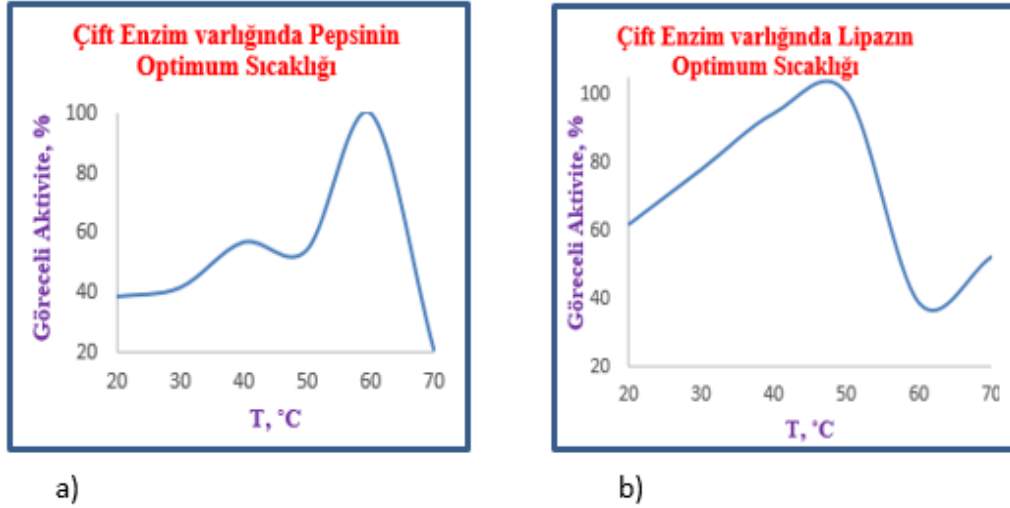
Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin enziminin optimum pH'sı 4, lipaz enziminin optimum pH'sı 9 olarak bulunmuştur. Bu durum çift enzim varlığındaki pepsinin immobilize pepsin ile kıyaslandığında değişmediği ancak çift enzim varlığındaki lipazın immobilize lipaz ile kıyaslandığında değiştiği görülmüştür.

4.3.2. Çift enzim aktifliğine sıcaklık etkisi

Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin ve lipaz enzimlerinin aktifliğinde sıcaklık etkisi, Bölüm 3.4.1.'de açıklanan yöntem kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.19.'daki grafikler elde edilmiştir.

Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin enziminin optimum sıcaklığı 60°C, lipaz enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. Bu durum çift

enzim varlığındaki hem pepsin enzimi hem de lipaz enzimi için immobilize pepsin ve immobilize lipaz ile kıyaslandığında değişmediği görülmüştür.



Şekil 4.19. Çift Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Çift Enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında Pepsin (a), Çift Enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında Lipaz (b)

4.3.3. Çift enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

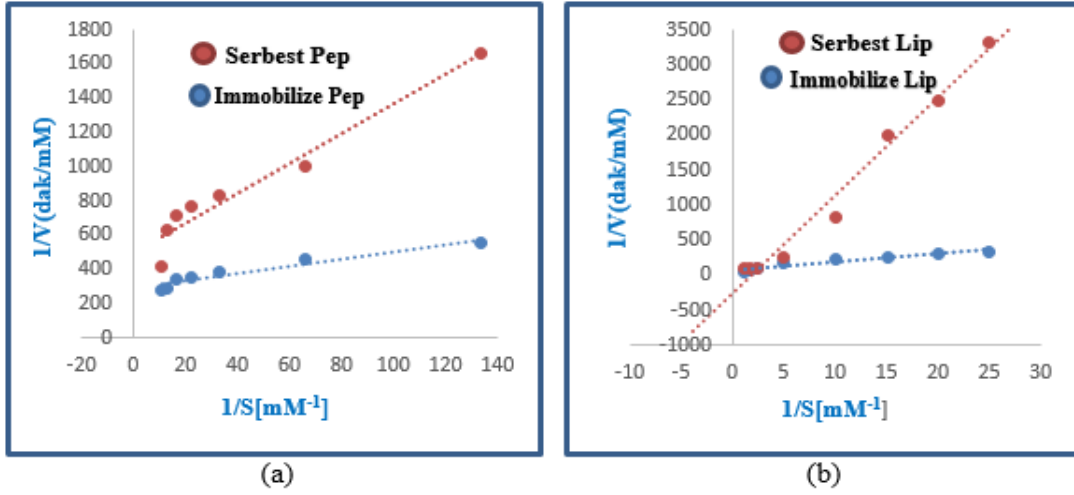
Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) üzerine; pepsinin aktifliği için substrat olarak hemoglobin ve lipaz aktifliği için substrat olarak p-NPp'nin derişiminin etkisi Bölüm 3.4.3.'de belirtilen yöntem uygulanmıştır.

Her bir grafikte serbest enzim verileri referans olarak yer almak üzere elde edilen verilerden *Lineweaver-Burk* grafikleri çizilmiştir. Grafiklerdeki verilerden yararlanarak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

Şekil 4.20'de çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin için pH 4 ve T 60°C'de, lipaz için pH 9 ve T 50 °C'de çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V-1/[S]$ grafiği çizilerek, doğrunun x eksenini kestiği noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiği noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır.

Serbest enzim ve çift immobilize enzimin K_m ve V_{mak} değerlerini kıyaslayabilmek için, serbest pepsin enziminin ve lipaz enziminin substrat etkisi de incelenmiştir. Bunun için, pepsin enziminin serbest substrat (hemoglobin) çalışması için 7 adet deney tüpü içerisine

Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 0,5 mL, lipaz enziminin serbest substrat (p-NPp) çalışması için 9 adet deney tüpü içerisine 2,5 mg lipaz enzimi alınarak çift immobilize enzim için yapılan işlemlerin aynısı tekrarlanmıştır.



Şekil 4.20. Çift enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi: çift enzim (CS-Fc-ald- Pep) +(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin (a), çift enzim (CS-Fc-ald- Pep) +(CS-Fc-ald-Lip) varlığında lipaz (b)

Çizelge 4.8. Serbest ve çift immobilize edilmiş ortamlardaki kinetik parametreler

Enzim	Ortam	Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM/dk)
Pepsin	Serbest	-	0,0177	0,0020
	Çift immobilize	(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)	0,0075	0,0035
Lipaz	Serbest	-	0,5310	0,0038
	Çift immobilize	(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)	0,1770	0,0150

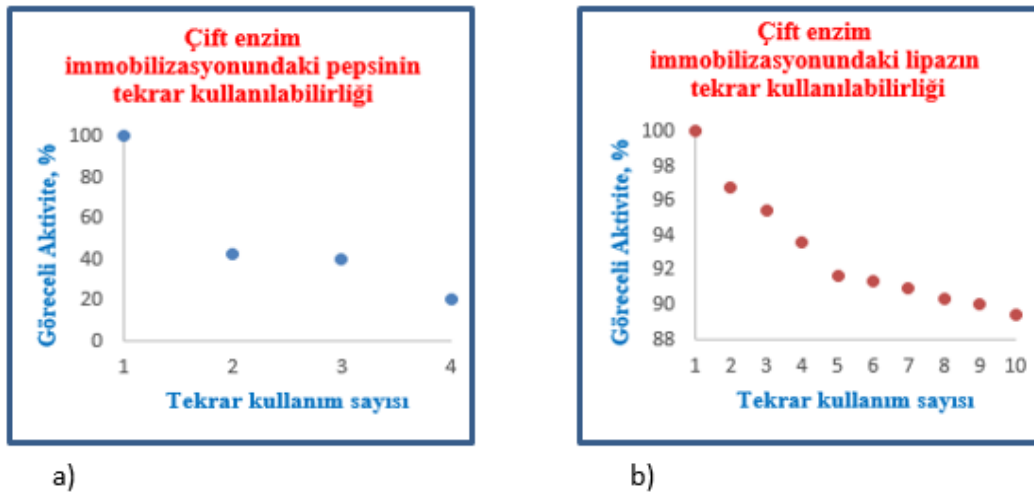
K_m , enzimin substrata olan ilgisini ifade eder. K_m ne kadar küçük olursa enzimin substrata olan ilgisinin o kadar yüksek olduğu anlaşılır. V_{mak} ise enzimin substrata doyduğu andaki katalitik hızı ifade eder.

Çift enzim immobilizasyonundaki pepsinin (ÇEnİmPep) kinetik parametresi ($K_m=0,0075$, $V_{mak}=0,0035$), serbest pepsin enzimine ait parametre ile karşılaştırıldığında ($K_m=0,0177$, $V_{mak}=0,0020$) daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuç ÇEnİmPep'deki pepsinin substrata ilgisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca $(V_{max}/K_m)_{ÇEnİmPep}$ oranı (0,4666) çift enzim immobilizasyonundaki pepsinin serbest pepsin oranından (spep) (0,1129) daha küçük değere sahip olduğu belirlenmiştir.

Çift enzim immobilizasyonundaki lipazın (ÇEnİmLip) kinetik parametresi ($K_m=0,1770$, $V_{mak}=0,0150$), serbest lipaz enzimine ait parametre ile karşılaştırıldığında ($K_m=0,5310$, $V_{mak}=0,0038$) daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuç ÇEnİmLip'deki lipazın substrata ilgisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca (V_{max}/K_m)ÇEnİmLip oranı (0,0847) çift enzim immobilizasyonundaki lipazın serbest lipazın oranından (slip) (0,0071) daha büyük değere sahip olduğu belirlenmiştir.

4.3.4. Çift enzimin tekrar kullanılabilirliği

Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) üzerine pepsin ve lipazın tekrar kullanılabilirliği Bölüm 3.4.4.'de verilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsinin (a) ve lipazın (b) tekrar kullanılabilirliği

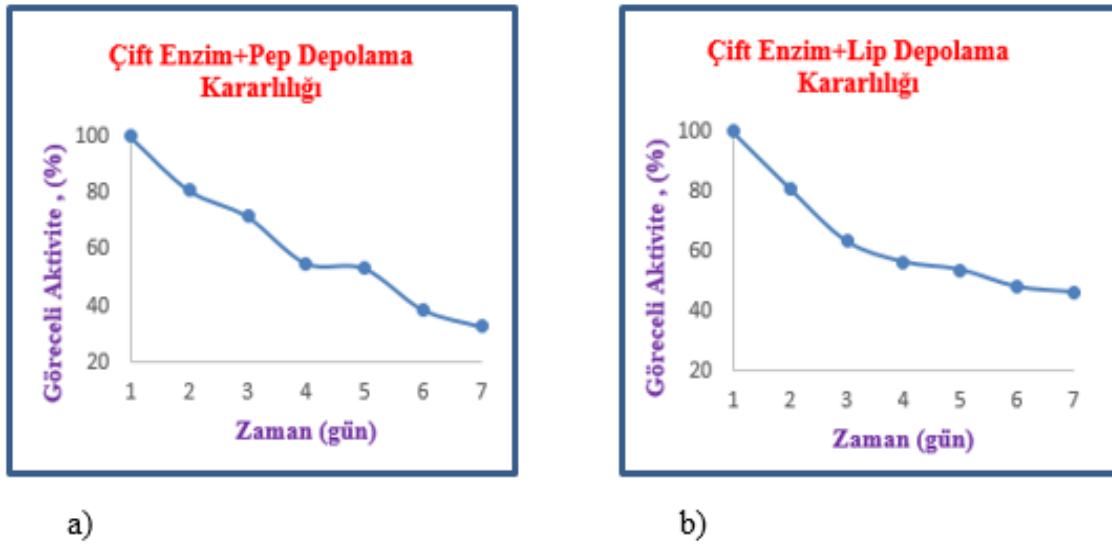
Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsin enzimi ve lipaz enziminin aktifliğinde tekrarlanabilirliği incelendiğinde; pepsin enzimi için tekrarlanabilirliğin 4 olup aktivitesinin %20,42 korunduğu, lipaz enzimi için ise tekrarlanabilirliğin 10 olduğu değerlerde aktifliğinin %89,42 korunduğu bulunmuştur.

4.3.5. Çift enzimin depolama kararlılığı

Çift immobilize desteklerin üzerine pepsin ve lipaz enzimlerinin oda koşullarında saklanması ve aktivitesini ne kadar süreyle devam ettirdiğini takip etmek için depolama

kararlılığı deneyleri Bölüm 3.4.5.'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen UV-GB spektrumlarında 280 nm ve 405 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınarak zamana karşı % bağıl aktivite grafikleri çizilmiştir.

Dört günde bir alınan ölçümlere devam edilip elde edilen verilerden Şekil 4.22'deki grafik elde edilmiştir. Çift immobilize desteklerin üzerine pepsin ve lipaz enziminin sırasıyla bağıl aktifliğinin % 32,58 ve % 46,22 'ini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Çift enzim (CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip) varlığında pepsinin (a) ve lipazın (b) zamana bağlı gösterdiği bağıl aktiflik

4.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmada önce, enzim immobilizasyonu yapılacak olan CS-Fc-ald destek materyali sentezlenip karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışılan çitosan ve ferrosen takılı çitosan polimerlerinin karakterizasyonları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışılan çitosan polimerinin önemli FT-IR pikleri literatürlerde belirtilen piklerle aynı şekilde olduğu görülmüştür. Çitosan polimerinde görülmeyen, ancak Fc-ald'e ait 488 cm^{-1} ve 842 cm^{-1} deki piklerin, CS-Fc-ald polimerinde de 485 cm^{-1} ve 821 cm^{-1} olarak görülmesi Fc-ald katılımının gerçekleştiğine dair öngörü oluşturmıştır.

Çitosana ferrosenkarboksaldehitin bağlandığına dair başka bir delil, demir yüzdesinin atomik absorpsiyon spektrometresiyle belirlenmesidir. Element analiz sonuçları dikkate

alındığında, CS-Fc-ald için; her dokuz çitosan biriminin tekrarından sonra ferrosen takılı çitosan biriminin bulunabileceği değerlendirilmesiyle ağırlıkça ortalama mol kütlesi 2162 ve kapalı formülü $C_{83}H_{142}N_{12}O_{50}Fe$ olan yapı öngörülmüştür. Ferrosenkarboksaldehit katkılı çitosan sentezi ile Schiff bazının oluştuğuna dair karar CS-Fc-ald'in katı ^{13}C -NMR spektrumundaki 17,296 ppm'de gözlenen zayıf ama yeni tekli pikin ortaya çıkışı ile olmuştur.

Çitosan (CS) ve (CS-Fc-ald) polimerlerinin FT-IR spektrumunda gözlenen $3450-3400\text{ cm}^{-1}$ deki oldukça yaygın piklerin sadece polimerlerin yapısındaki -OH gruplarından değil yapılarında nem (H_2O)'in bulunmasındanda kaynaklanabilir düşüncesiyle TGA analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda (CS) ve (CS-Fc-ald) polimerlerinde kristal suyun bulunduğu ve $100^\circ C$ 'nin altındaki kütle kayıplarının (% 5,3-6,6) CS için 2, CS-Fc-ald için 3 mol H_2O 'un uzaklaşmasından kaynaklanabileceği yorumu yapılmıştır.

Enzimlerin, CS-Fc-ald polimerine bağlanıp bağlanmadığının yorumu için FT-IR spektrumlarından faydalanılmıştır. Serbest enzimlerin ve CS-Fc-ald-Enzimlerin FT-IR spektrumları detaylı olarak karşılaştırılmıştır. CS-Fc-ald polimerinde görülmeyen ancak enzimlere ait $707-713\text{ cm}^{-1}$ ve 1260 cm^{-1} 'deki piklerin immobilize edilmesi ile $711-713\text{ cm}^{-1}$ ve 1257 cm^{-1} olarak görülmesi bizi immobilizasyonun gerçekleştiği sonucuna ulaştırmıştır. Katı hal iletkenlik ve parçacık boyut analizleri, ferrosenin çitosana takılmasıyla çitosanın özelliğinde nasıl bir farklılık gösterdiğine dair bilgi sahibi olmak için yapılmıştır. Ferrosenin bağlanmasıyla iletkenliğin 1,03 kat arttığı, zincir uzunluklarının ise hemen hemen eşitlendiği görülmüştür.

Serbest ve immobilize enzimler için optimum şartların ve kinetik özelliklerin belirlenmesinde uygulanan yöntemler, yoğun laboratuvar şartlarında çalışılarak kaynaklardan farklılık gösteren özel prosedür oluşturularak yapılmıştır.

Enzimlerin, immobilizasyonuyla optimum pH'ların arttığı, optimum sıcaklıkların ise değişmediği belirlenmiştir. Çift enzim immobilizasyon varlığında ise optimum pH'nın korunduğu, optimum sıcaklığın ise $10^\circ C$ 'lik artış yönünde farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Enzimin substrata olan ilgisini ifade eden K_m kinetik parametresi, serbest enzim [(Pep) ve (Lip) ve çift enzim immobilizasyon [(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)] ortamıyla

karşılaştırılmıştır. Çift enzim immobilizasyonu ile, pepsin enziminin substrata olan ilgisinin 0,4 kat, lipaz enziminin ise yaklaşık 0,3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çift enzim [(CS-Fc-ald-Pep)+(CS-Fc-ald-Lip)] immobilizasyon ortamındaki immobilize pepsin enzimi ve immobilize lipaz enziminin aktifliğinde tekrarlanabilirlik karşılaştırılmıştır. İmmobilize lipaz enziminin aktifliğinde tekrarlanabilirliğinin, pepsin enzimine göre 2,5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

4.5. Öneriler

Enzimlerin sabit bir destek üzerine tutturulması endüstriyel uygulamalarda giderek daha fazla tercih edilen uygulamadır. Çünkü hareketsizleştirilmiş enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılması, teknik açıdan kolay ve çevre dostudur.

Tez çalışmasında enzim immobilizasyonu için destek materyal geliştirilmiştir. Hazırlanan destek materyal, enzim için koruyucu etki göstermiş ve böylece, hareketsizleştirilmiş olan enzimin sıcaklık, pH hatta farklı ortamların önleyici etkisi gibi çevresel parametrelerin değişimlerine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Bu sonuç, çalışılan ya da çalışılacak başka enzimlerin operasyonel kararlılığının artmasına katkı sağlayabileceği önerisini sunmaktadır. Ayrıca sunulan tezde, hareketsiz çift biyokatalizör oluşturulmasıyla yeni bir fikir önerilmiştir. Çitosan polimerinin ferrosen ile kimyasal modifikasyonu sonucunda aynı uzunlukta polimer zincirinin meydana gelmesi çift biyokatalizör uygulamalarında performansın artışı yönünde katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, destek polimerlerin kullanımında, zincir uzunluklarının aynı olması yönünde tercih edilmesi bir öneri olarak değerlendirilebilir. Hazırlanan destek polimerin her türlü biyoteknolojik süreçlere uygulanabileceği, farklı enzimlerin immobilizasyon çalışmalarında kullanılabileceği hatta heterojen katalizör olarak kullanılabileceği önerisini sunmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Elieh-Ali-Komi, Daniel., Hamblin, M.R. (2016). Chitin and chitosan: Production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International Journal of Advanced Research (Indore)*, 4(3), 411–427.
2. Rangasamy, J., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar P.T, Nair, S.V., Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–37.
3. Baran, T., Menteş A., Arslan, H. (2015). Synthesis and characterization of water soluble O-carboxymethyl chitosan Schiff bases and Cu(II) complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 94–103.
4. Ahmed, S., Ikram, S. (2016). Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing, *Achieve Life Sciences*, 10(1), 27–37.
5. Ardila, N., Daigle, F., Heuzey, M.C., Ajji, A.(2017). Antibacterial activity of neat chitosan powder and flakes, *Molecules*, 22(1), 100–119.
6. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O.C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602–2663.
7. Manivasagan, P., Senthilkumar, K., Venkatesan, J., Kim, S.K. (2013). Biological applications of chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives. *Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments*, Kim, S.K. (Ed.), CRC Press, 223–242.
8. Zhao, X., Wu, H., Guo, B., Dong, R., Qiu, Y., Ma, P.X. (2017). Antibacterial antioxidant electroactive injectable hydrogel as self healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 122, 34–47.
9. Bui, V.K.H., Park, D., Lee, Y.C. (2017). Chitosan combined with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticles for antimicrobial wound healing applications: A mini review of the research trends. *Polymers*, 9(1), 21–45.
10. Oladoja, N.A., Unuabonah, E.I., Amuda, O.S., Kolawole, O.M. (2017). Polysaccharides as a green and sustainable resources for water and wastewater treatment. *Springer International Publishing*, 14, 110.
11. Badawi, M.A., Negm, N.A., Abou Kana, M.T.H., Hefni, H.H., Abdel Moneem, M.M. (2017). Adsorption of aluminum and lead from wastewater by chitosan-tannic acid modified biopolymers: isotherms, kinetics, thermodynamics and process mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 465–476.
12. Bastarrachea, L.J., Wong, D.E., Roman, M.J., Lin, Z., Goddard, J.M. (2016). Active packaging coatings. *Coatings*, 6(2), 23.
13. Han, J.H., (2014). Innovations in food packaging. Food science and technology international. *Elsevier Academic Press; second edition*, 624.

14. Leceta, I., Molinaro, S., Guerrero, P., Kerry, J.P., De La Caba, K. (2015). Quality attributes of MAP packaged ready-to-eat baby carrots by using chitosan-based coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 100(2015), 142–150.
15. Corinaldesi, C., Barone, G., Marcellini, F., Dell’Anno, A., Danovaro, R. (2017). Marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products. *Marine Drugs*, 15(4), 118–139.
16. Morsy, R., Ali, S.S., El-Shetehy, M. (2017). Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria. *Journal of Molecular Structure*, 1143, 251–258.
17. Khwaldia, K., Basta, A.H., Alouia, H., El-Saied, H. (2014). Chitosan-caseinate bilayer coatings for paper packaging materials. *Carbohydrate Polymers*, 99, 508–516.
18. Islam, S., Shahid, M., Mohammad, F. (2013). Green chemistry approaches to develop antimicrobial textiles based on sustainable biopolymers-A review. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 52, 5245–5260.
19. Yang, Z., Zeng, Z., Xiao, Z., Ji, H. (2014). Preparation and controllable release of chitosan/vanillin microcapsules and their application to cotton fabric. *Flavour Fragrance Journal*, 29(2), 114–120.
20. Zhu, L., Shangguan, Y., Sun, Y., Ji, J., Zheng, Q. (2010). Rheological properties of redox-responsive, associative ferrocene-modified branched poly(ethylene imine) and its modulation by β -cyclodextrin and hydrogen peroxide. *Soft Matter*, 6(21), 5541–5546.
21. Top, S., Vessieres, A., Cabestaing, C., Laios, I., Leclercq, G., Provot, C., Jaouen G. (2001). Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs). Dual activity in the hydroxy-ferrocifen series. *Journal of Organometallic Chemistry*, 637, 500–506.
22. Fouda, M. F. R., Abd-Elzaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007). On the medicinal chemistry of ferrocene. *Applied Organometallic Chemistry*, 21(8), 613–625.
23. Patra, M., Gasser, G. (2017). The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nature Reviews Chemistry*, 1, 0066.
24. Saleem, M., Yu, H., Wang, L., Abdin, Z., Khalid, H., Akram, M., Abbasi, N.M., Huang, J. (2015). *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, 876, 9–25.
25. Cass, A.E.G., Davis, G., Francis, G.D., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L., Turner, A.P.F. (1984). Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*, 56, 667–671.
26. Chuang, C.L., Wang, Y.J., Lan, H.L. (1997). Amperometric glucose sensors based on ferrocene-containing B-polyethylenimine and immobilized glucose oxidase, *Analytica Chimica Acta*, 353, 37–44.

27. Şenel, M., Nergiz, C., Çevik, E. (2013). Novel reagentless glucose biosensor based on ferrocene cored asymmetric PAMAM dendrimers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 299–306.
28. Yang, W., Zhou, H., Sun, C. (2007). Synthesis of ferrocene-branched chitosan derivatives: Redox polysaccharides and their application to reagentless enzyme-based biosensors. *Macromolecular Rapid Communications*, 28, 265–270.
29. Yao, D., Vlessidis, A.G., Evmiridis, N.P. (2003). Microdialysis sampling and monitoring of uric acid in vivo by a chemiluminescence reaction and an enzyme on immobilized chitosan support membrane. *Analytica Chimica Acta, Elsevier*, 478, 23–30.
30. Lopez-Avila, V., Hill, H.H. (1997). Field analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 69(12), 289–305.
31. Terry, L.A., White, S.F., Tigwell, L.J. (2005). The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1309–1316.
32. Qiu, J.D., Zhou, W., Guo, J., Wang, R., Liang, R. (2009). Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Analytical Biochemistry*, 385, 264–269.
33. Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, 409, 258–268.
34. Sheldon, R.A. (2012). Fundamentals of green chemistry: Efficiency in reaction design. *Chemical Society Reviews*, 41, 1437–1451.
35. Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218.
36. Bornscheuer, U.T., Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 137–143.
37. Davis, B.G. (2003). Chemical modification of biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 379–386.
38. Wirth, P., Soupe, J., Tritsch, D., Biellmann, J.F. (1991). Chemical modification of horseradish peroxidase with ethanal-methoxypolyethylene glycol: solubility in organic solvents, activity, and properties. *Bioorganic Chemistry*, 19, 133–142.
39. Brena, B.M, Gonzalez-Pombo P, Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes and Cells. *Springer, Humana Press, Totowa, NJ*, 15-30.
40. Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Miro, M. (2019). Immobilized enzymes. *Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition, Elsevier*, 523-529.

41. Hwang, E.T., Gu, M.B. (2013). Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 49-61.
42. Khan, A.A, Alzohairy, M.A. (2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: A review. *Research Journal of Biological Sciences*, 5(8), 565–575.
43. Bisswanger, H. (2002). Enzyme kinetics: Principles and methods. Wiley-VCH, Weinheim, 20-316.
44. Rogers, A., Gibon, Y., (2009). Enzyme Kinetics : Theory and practice. *Plant Metabolic Networks*, Springer, 71-103.
45. Wang, Y., Chen, H., Wang, J., Xing, L. (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate-chitosan beads. *Process Biochemistry*, 49, 1682–1690.
46. Chen, Z., Wang, X., Chen, Y., Xue, Z., Guo, Q., Ma, Q., Chen, H. (2018). Preparation and characterization of a novel nanocomposite with double enzymes immobilized on magnetic Fe₃O₄-chitosan-sodium tripolyphosphate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, 169, 280-288.
47. Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W., Thavarungkul, P., (2014). A conductive porous structured chitosan-grafted polyaniline cryogel for use as a sialic acid biosensor. *Electrochimica Acta*, Elsevier, 130, 296–304.
48. Cooper, J. B., Khan, G., Taylor, G., Tickle, I.J., and Blundell, T.L. (1990). X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å° resolution. *Journal of Molecular Biology*, 214(1), 199–222.
49. Romero, C.M., Pera, L.M., Loto, F., Vallejos, C., Castro, G., Baigori, M.D. (2012). Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 25–31.
50. Altun, G., Cetinus, S. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, 100, 964–971.
51. Hu, J., Li, S., Liu, B. (2006). Properties of immobilized pepsin on modified PMMA microspheres. *Biotechnology Journal*, 1, 75–79.
52. Han, W., Yamauchi, M., Hasegawa, H., Noda, M., Fukui, K., van der Vlies, A.J., Uchiyama, S., Uyama, H. (2015). Pepsin immobilization on an aldehyde modified polymethacrylate monolith and its application for protein analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(5), 505-510.

EKLER

EK-1. Bilimsel Uluslararası Kongrede Basılan Bildiri

1. **Fatma HAN**, 2019, Preparation and Characterization of a Novel Composite With Double Enzymes Immobilized on Ferrocene-Chitosan, *14th International Conference on Materials Chemistry (MC14)*, 8-11 July 2019, Birmingham, UNITED KINGDOM.

Preparation and characterization of a novel composite with double enzymes immobilized on ferrocene-chitosan

Fatma Han

Gazi University, Turkey

Enzyme immobilization has attracted attention due to its important commercial applications. We know that: Immobilized enzymes exhibit greater thermal and operational stability than free enzymes. So far, various enzymes have been immobilized onto functionalized chitosan. Chitosan is biocompatible, biodegradable and non-toxic biopolymer [1]. Also being antimicrobial and moisturizing agent [2].

Nowadays, research on multienzyme immobilization is gaining importance. Because, it is possible to ensure the formation of subsequent enzymatic reactions in a shorter time. In addition, with multi-enzyme immobilization, less waste, solvents and chemicals are used. [3,4]

In the present study, a biocompatible material was prepared for multiple enzyme (lipase and pepsin) immobilization using ferrocenecarboxaldehyde and chitosan.

The modified chitosan (CS) was prepared by reacting of chitosan (CS) (2,000 g.) in hot ethanol (20 mL) with ferrocenecarboxaldehyde (Fc) (2,000 g) in ethanol (40 mL). Aldehyde solution was slowly added by the dropwise on chitosan solutions while stirring through 30 h.

The resulting solution mixture was then cooled to room temperature under a nitrogen atmosphere for 5 hours. The resulting brown product (CS-Fc) was collected by filtration and dried in an oven and held on the anhydrous CaCl_2 with desiccant (Figure 1) Then, ferrocene modified chitosan was identified by elemental analyzes and spectral studies. In addition, the surface morphology of ferrocene-modified chitosan was determined by SEM / EDX.



Figure 1: Imaging of chitosan and chitosan attached ferrocene

CS showed characteristic peaks at around 1646 and 1563 cm^{-1} , which are assigned to the amide bands of CS in the FT-IR-ATR spectra. These peaks were also observed in the CS-Fc polymers. Due to the N-alkylation of the glucosamine unit with Fc, the intensity of the peak at 1563 cm^{-1} , for primary amine N-H bending, was decreased. In addition, another new absorption band at 814 cm^{-1} , for C-H, in the spectra also indicates that the ferrocenyls exist in the CS-Fc biopolymer.

References

1. Daniel Elieh-Ali-Komi and Michael R Hamblin, Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res* (Indore). 2018 March ; 4(3): 411–427.
2. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology advances*. 2011;29(3):322–37.
3. Tait Baran, Ayfer Mertes, Hülya Anılan, Synthesis and characterization of water soluble O-carboxymethyl chitosan Schiff bases and Cu(II) complexes. *International Journal of Biological Macromolecules* 72 (2015) 94–103.
4. J. Z. Zhong, X. Chen, R. Xing, S. Liu, L. Wang, P. Li, Preparation of 1,3,5-triazine-2-thione derivatives of chitosan and their potential antioxidant activity in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17. (2007) 4275.

P235

© The Author(s), 2019



CELEBRATING
IYPT 2019

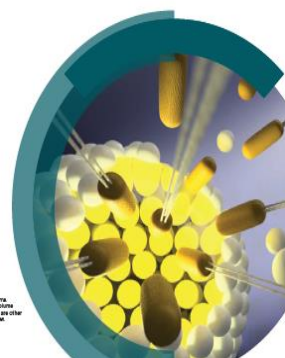
8-11 July 2019
Birmingham, UK

**14th International conference
on materials chemistry (MC14)**

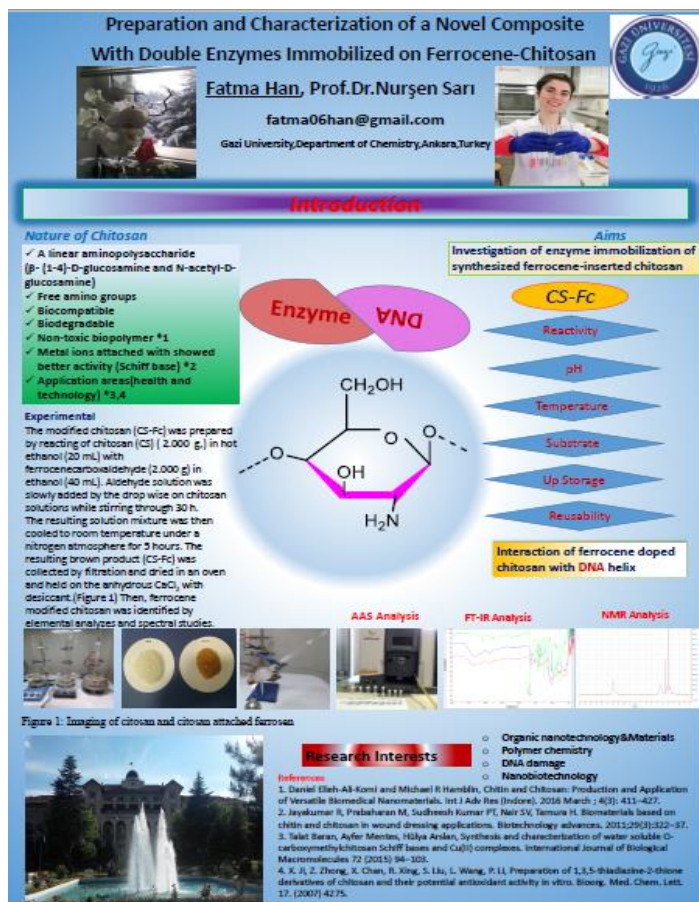
#MC14

Book of
abstracts

Copyright notice: All rights reserved for the abstracts included in this volume. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or by any information storage and retrieval system, without prior permission from the publisher. All other rights reserved.



EK-1. (devam) Bilimsel Uluslararası Kongrede Basılan Bildiri



EK-2. Bilimsel Uluslararası Kongrede Kabul Alan Bildiri (Covid-19 Pandemi Sürecine denk geldiğinden iptal edilmiştir)

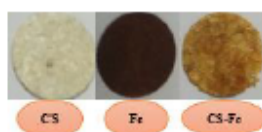
2. **Fatma HAN**, Nurşen SARI, 2020, Multiple Enzyme Immobilization on Natural Polymer, *Chemical Biology Symposium 2020*, 11 May 2020, London, UNITED KINGDOM.

Chemical Biology Symposium 2020

11 May 2020, London, United Kingdom

Fatma HAN, Nurşen SARI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, Ankara, Türkiye



Introduction

In recent years, natural materials such as chitosan have been used as supports for enzyme immobilization [1]. Chitosan, a natural cationic polysaccharide, has been widely applied in immobilized enzymes by virtue of its good biocompatibility, low toxicity, non-immunogenicity, antifungal bioactivity, remarkable affinity to enzymes, etc. [2]. Enzymes are catalytic proteins widely used in industrial bioprocesses. Double enzyme (multiple enzyme) immobilization is important due to industrial contribution. And, for the first time, the study was carried out by our group in which immobilized lipase (from porcine pancreas Type II) and pepsin (from porcine gastric mucosa) enzymes were used together [3] (Figure 1). So, chitosan involving ferrocene was synthesized by means of condensation. And then, lipase and pepsin immobilized on it. Optimization parameters of immobilized enzymes (substrate concentration, temperature (Figure 2), pH (Figure 3), reusability and storage capacity) were determined. Their K_m (mM) and V_{max} (mM.min⁻¹) values were calculated from the Michaelis-Menten equation.

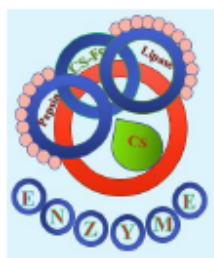


Figure 1

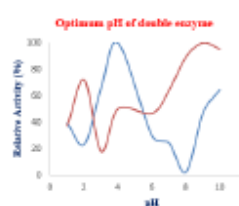


Figure 2

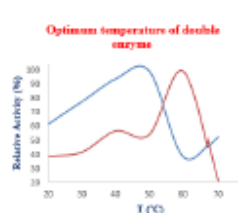


Figure 3

References:

- [1] Grigorov, A.G. Catalase immobilization—A review. *Biochem. Eng. J.* 2017, 117, 1–20.
- [2] Krajewski, B. *Enzyme Microb. Technol.*, 35 (2004), 126–139.
- [3] Y.Z. Chen, C. Wang, Z.Y. Wu, Y. Xiong, Q. Xu, S.H. Yu, H.L. Jiang. From bimetallic metal-organic framework to porous carbon: high surface area and multicomponent active dopants for excellent electrocatalysis, *Adv. Mater.* 27 (2015) 5010–5016.

Acknowledgements

This work was supported by Projects of Scientific Investigation (BAP), Gazi University, Ankara, TURKEY.

Research (Master of Science), Project code : 05/2019-05.

I thank my dear advisor Prof.Dr.Nurşen SARI for all her support and offer my respect.

EK-2. (devam) Bilimsel Uluslararası Kongrede Kabul Alan Bildiri (Covid-19 pandemi sürecine denk geldiğinden iptal edildiğine dair email çıktıları)

Abstract submission - Chemical Biology Symposium 2020 Gelen Kutusu x



events@rsc.org

5 Mar 2020 13:25



Alıcı: ben

Dear Fatma Han

Chemical Biology Symposium 2020

11/05/2020

Burlington House, London, UK

Thank you for submitting your abstract titled '*Multiple Enzyme Immobilization on Natural Polymer*' for poster presentation at the above event. I am delighted to inform you your abstract has been selected for inclusion in the poster session.

Each poster presenter will be provided with a poster board on which to display their poster. The board will be portrait and 2m high and 1m wide. This is suitable for an A0 size poster. Please ensure your printed poster will fit on this size board.

If you have not done so already please [register online](#). You must be registered in order to attend and give your presentation.

On behalf of the organising committee, we look forward to welcoming you to London.

If you have any questions please do not hesitate to [contact us](#).

Kind Regards

Events Team

Royal Society of Chemistry

Thomas Graham House, Milton Road

Science Park, Cambridge, CB4 0WF

Tel: +44 (0)1223 432509

Cancellation of Chemical Biology Symposium Gelen Kutusu x



events@rsc.org

20 Mart Cum 16:01



Alıcı: ben

Dear Miss Han

In light of developments regarding the coronavirus (COVID-19) and the latest UK Government announcements we have taken the decision to cancel this year's Chemical Biology Symposium that was due to take place in London on 11 May.

If you have already paid your registration, this will be refunded in the same method you paid.

This is to ensure that we are supporting our community to follow advice of social distancing measures. Whilst the landscape and Public Health information is changing rapidly, we wish to give certainty to our speakers and delegates and we do not wish to exclude those in our community who may need to self-isolate over this period.

The annual meeting will run again in 2021 and we hope you are able to join us for this.

Please contact us at events@rsc.org if you have any questions.

Thank you for your understanding and support.

With best wishes,

Events Team

Royal Society of Chemistry

Thomas Graham House, Milton Road

Science Park, Cambridge, CB4 0WF

Tel: +44 (0)1223 432509

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : HAN, Fatma
 Uyuğu : T.C.
 Doğum Tarihi ve Yeri : 30.08.1994, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (507) 107 06 94
 e-posta : fatma.han@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Selçuk Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2016
Lise	Niğbolu Lisesi	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019	University of Liverpool	Onursal Araştırma Görevlisi
2017-2019	Gazi Üniversitesi	Öğrenci Asistanı
2015	GATA Eczacılık Bilimleri	Stajyer
2013	Gazi Üniversitesi	Stajyer

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca, Azerbaycan Türkçesi

Yayınlar

Fatma HAN, 2019, Preparation and Characterization of a Novel Composite With Double Enzymes Immobilized on Ferrocene-Chitosan, *14th International Conference on Materials Chemistry (MC14)*, 8-11 July 2019, Birmingham, UNITED KINGDOM.

Hobiler

Halkoyunları, Keman, Spor



GAZİ GELECEKTİR..