



**SELÜLAZ ENZİM KOMPLEKSİNİN
MANYETİK PARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU**

Hilal DAL

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI

ŞUBAT-2018

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SELÜLAZ ENZİM KOMPLEKSİNİN
MANYETİK PARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal DAL

(141132112)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 16 Ocak 2018

Tezin Savunulduğu Tarih : 16 Şubat 2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI (Fırat Ü.)

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Veyis SELEN (Fırat Ü.)

Yrd. Doç. Dr. Yavuz DEMİRCİ (Adıyaman Ü.)

ŞUBAT-2018

ÖNSÖZ

Deneyisel çalışmalar FÜBAP M.F.16.25 nolu proje ile yürütülmüştür.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca, bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, laboratuvarlarda tüm imkanlardan yararlanmamı sağlayan ve her konuda desteklerini esirgemeyen danışman hocam saygıdeğer Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım boyunca yanımda olan arkadaşlarım Sıdar AY ve Sude AY'a, bölümümüz öğretim üyeleri, araştırma görevlisi ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Hilal DAL
ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Selülaz	2
1.3. Enzim İmmobilizasyonu.....	3
1.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	4
1.4.1. Kimyasal Yöntemler.....	4
1.4.2. Fiziksel Yöntemler	6
1.5. Nanoteknoloji.....	7
1.5.1. Manyetik nanopartiküller	8
1.5.2. Demir Oksit Nanopartiküllerin Manyetik Özellikleri	9
1.5.3. Nanopartikül Sentez Yöntemleri.....	11
1.5.4. Manyetik Nanopartiküllerde Yüzey Modifikasyon Yöntemleri	13
1.5.5. Nanopartiküllerin Destek Materyali Olarak Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması.....	14
1.6. Lignoselülozik Kaynaklar.....	15
1.7. Lignoselülozik Biyokütle İçin Ön İşlem Yöntemleri	16
1.7.1. Fiziksel Ön İşlemler	17
1.7.2. Kimyasal Ön İşlemler.....	17
1.8. Enzimatik Hidroliz	18
1.9. Literatür Özeti.....	19
2. MATERYAL VE METOT.....	24
2.1. Materyal.....	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	24

2.1.2.	Kullanılan Cihazlar	24
2.2.	Metot	24
2.2.1.	Manyetik Nanopartikül Sentezi	24
2.2.2.	APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) İle MNP Yüzeyinin Silisyum Kaplama İşlemi	25
2.2.3.	Gluteraldehit İle MNP'nin Aktifleştirilmesi	25
2.2.4.	G-MNP'lere Enzim İmmobilizasyonu Aşaması	26
2.2.5.	Protein Tayini	26
2.2.6.	Toplam Aktivite Tayini	27
2.2.7.	Karboksimetil Selülaz (CMC) Aktivite Tayini	27
2.2.8.	İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyon Çalışmaları	28
2.2.9.	İmmobilize ve Serbest Enzim Optimizasyon Çalışmaları	28
2.2.10.	Sıcaklık Stabilitesi Çalışmaları	29
2.2.11.	Substrat Değişimi Etkisi Çalışmaları	29
2.2.12.	İmmobilize ve Serbest Enzim Depolama Stabilitesi Çalışmaları	30
2.2.13.	İmmobilize Enzim İçin Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması	30
2.2.14.	Manyetik Nanopartikül Karakterizasyonu	31
2.2.15.	Atık Kağıt Hidroliz Çalışmaları	31
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1.	APTES ve Gluteraldehit miktarının etkisi	33
3.2.	İmmobilize ve Serbest Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi	35
3.3.	Sıcaklık Stabilitesi Çalışmalarına Ait Bulgular	37
3.4.	Substrat Değişimi Etkisi Çalışmalarına Ait Bulgular	38
3.5.	İmmobilize ve Serbest Enzim Depolama Stabilitesi Çalışmaları İle İlgili Bulgular	41
3.6.	İmmobilize Enzim İçin Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması İle İlgili Bulgular	42
3.7.	Manyetik Nanopartikül Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular	43
3.8.	Atık Kağıt Hidroliz Çalışmaları İle İlgili Bulgular	49
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	54
	KAYNAKLAR.....	56
	EKLER	63
	EK.1. DeneySEL Verilere Ait Sayısal Değerler	63
	ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

Son yıllarda manyetik nanopartiküllerin enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılmasına olan ilgi giderek artmaktadır. Bu çalışmada destek materyali olarak birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenen manyetit (Fe_3O_4) kullanılarak, selüloz enzim kompleksinin kovalent olarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin üzeri silisyum ile kaplanarak manyetik nanopartiküllerin stabilizasyonu sağlanmıştır (A-MNP). Yüzey modifikasyonu APTES ile yapılan manyetik nanopartiküller glutraldehit ile aktifleştirilmiş (G-MNP) ve ardından selüloz enzimi immobilize edilmiştir (E-MNP). MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'nin karakterizasyonu için SEM, EDX, FTIR analizleri yapılmıştır. Sentezlenen MNP'lerin ortalama boyutunun 200 nm olduğu bulunmuştur. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 70 °C ve optimum pH değerleri serbest enzim için 5 ve immobilize enzim için 4,8 olarak belirlenmiştir. Enzim sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, serbest ve immobilize selüloz enziminin 60 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca yürütülen sıcaklık stabilite çalışmaları sonucunda serbest ve immobilize selüloz enziminin sırasıyla % 29,9 ve % 38 oranında aktivitesini korunduğu belirlenmiştir. Farklı substrat derişimlerinde ölçülen aktiviteler sonucu serbest selüloz enzimi için K_m , V_{max} değerleri sırasıyla 155,25 mg/ml, 2500 $\mu\text{mol/ml.dk}$, immobilize selüloz enzimi için ise 23,64 mg/ml , 108,69 $\mu\text{mol/ml.dk}$ olarak CMC aktivite ölçümü ile 4. döngünün sonunda enzim aktivitesinin % 20 oranında korunduğu belirlenmiştir. Depolama stabilitesi çalışmaları sonucunda kalan % bağlı aktivite oranları serbest ve immobilize selüloz enzimi için sırasıyla % 73.3 ve % 91.2 olarak belirlenmiştir. Fiziksel ve kimyasal ön işlem gören atık gazete kağıtlarının serbest ve immobilize selüloz enzimi ile 48 saat boyunca süren enzimatik hidroliz işlemi sonucunda elde edilen % şeker verimleri, serbest selüloz enziminde, 0,25 g atık gazete kağıdı için % 10,2 ve 0,5 g atık gazete kağıdı için % 8,19, immobilize selüloz enziminde ise 0,25 g atık gazete kağıdı için % 3,87 ve 0,5 g atık gazete kağıdı için % 3,27 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Selüloz, Manyetik Nanopartiküller, İmmobilizasyon, APTES, Glutraldehit.

SUMMARY

Immobilization of Cellulase Enzyme Complex to Magnetic Particles

In recent years there has been an increasing interest in the use of magnetic nanoparticles as support material in enzyme immobilization. In this study, covalent immobilization of cellulase enzyme complex was carried out by using magnetite (Fe_3O_4) synthesized by co-precipitation method as support material. The synthesized magnetic nanoparticles were coated with silane to stabilize the magnetic nanoparticles (A-MNP). Surface modification The magnetic particles coated with APTES were activated with glutaraldehyde (G-MNP) followed by cellulase enzyme immobilization (E-MNP). SEM, EDX, FTIR analyzes were used for the characterization of MNP, A-MNP, G-MNP and E-MNP. The approximate size of MNPs was found to be 200 nm. Maximum activity of free and immobilized cellulase enzymes was determined at 70 °C. The optimum pH values were 5 and 4,8 for immobilized enzyme, free enzyme, respectively. Residual enzyme activity was determined as 29,9 % and 38 % for free and immobilized cellulase enzymes, respectively, after 5 hours at 60 °C. The cellulase activities measured at different substrate concentrations. K_m , V_{max} values were calculated as 155,25 mg/ml, 2500 $\mu\text{mol/ml.dk}$ and 23,64 mg/ml, 108,69 $\mu\text{mol/ml.dk}$ for free and immobilized cellulase enzyme, respectively. To investigate the reusability of the immobilized cellulase enzyme, the CMC method was used and it was determined that enzyme activity was maintained at 20% at the end of the 4th loop. The stability of free and immobilized cellulase enzymes was determined to be 73.3 % and 91.2 %, respectively, at the end of 20 days at 4 °C. The sugar yields obtained by the enzymatic hydrolysis of the physically and chemically pretreated waste papers with the free and immobilized cellulase enzyme for 48 hours. Glucose yields were found as 10,2 % for 0,25 g waste newspaper and 8,19 % for 0,5 g waste newspaper for free enzyme. Glucose yields were found as 3,87 % for 0,25 g waste newspaper and 3,27 % for 0,5 g waste newspaper in the immobilized cellulase enzyme.

Keywords: Cellulase, Magnetic Nanoparticles, Immobilization, APTES, Glutaraldehyde.

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri	4
Tablo 1.2. Enzim ve destek materyali arasındaki kovalent bağlanma modelleri.....	5
Tablo 1.3. Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemlerinin Kıyaslanması	13
Tablo 3.1. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin kinetik parametreleri.....	40
Tablo 3.2. MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'ye ait elementlerin ağırlıkça % oranları.....	47
Tablo 3.3. Ofis kağıdı enzimatik hidroliz deneyinde incelenen bağımsız değişkenler ve incelenen aralıklar.....	50
Tablo 3.4. CCD göre Enzimatik hidroliz deney tasarımı ve sonuçları.....	51
Tablo 3.5. Enzimatik hidroliz modeli için ANOVA test sonuçları	52
Tablo E1.1. Glikoz standart eğrisi.....	63
Tablo E1.2. Protein standart eğrisi	63
Tablo E1.3. Şekil 3.1'e ait deney sonuçları	64
Tablo E1.4. Şekil 3.2'ye ait deney sonuçları	64
Tablo E1.5. Şekil 3.4'e ait deney sonuçları	64
Tablo E1.6. Şekil 3.5'e ait deney sonuçları	64
Tablo E1.7. Şekil 3.6'ya ait deney sonuçları	65
Tablo E1.8. Şekil 3.7'ye ait deney sonuçları	65
Tablo E1.9. Şekil 3.8'e ait deney sonuçları	65
Tablo E1.10. Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'a ait deney sonuçları	66
Tablo E1.11. Şekil 3.11'e ait deney sonuçları.....	66
Tablo E1.12. Şekil 3.12'ye ait deney sonuçları	66
Tablo E 1.13. Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'e ait deney sonuçları	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Selülozun hidrolizi esnasında selülozların davranışları	2
Şekil 1.2. Kovalent bağlanma yönteminin şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.3. Hapsetme yöntemi ile immobilizasyonun şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.4. Mikrokapsül ile immobilizasyonun şematik gösterimi	7
Şekil 1.5. Manyetik dipollerin farklı yönelimleri: (a) paramanyetik, (b) ferromanyetik, (c) antiferromanyetik ve (d) ferrimanyetik.....	10
Şekil 1.6. Lignoselülozik kaynaklara ait bileşenlerin şematik gösterimi	16
Şekil 2.1. MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'nin oluşumunda izlenilen yol	26
Şekil 3.1. MNP yüzey kaplama işleminde kullanılan APTES miktarı ve immobilize edilen enzim miktarıyla bağlanma kapasitesinin değişimi.....	33
Şekil 3.2. Gluteraldehit ve immobilize edilen enzim miktarıyla bağlanma kapasitesinin değişimi	34
Şekil 3.3. MNP'nin mıknatısla ayrılmadan önce ve ayrıldıktan sonraki görüntüsü.....	35
Şekil 3.4. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin farklı sıcaklıklardaki % Bağlı Aktivite değerleri	35
Şekil 3.5. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin farklı pH değerlerindeki % bağlı aktivite değerleri	36
Şekil 3.6. Serbest selüloz enziminin farklı sıcaklıklardaki stabilitesinin % bağlı aktivite olarak değişimi.....	37
Şekil 3.7. İmmobilize selüloz enziminin farklı sıcaklıklardaki stabilitesinin % Bağlı Aktivite olarak değişimi	38
Şekil 3.8. Serbest ve immobilize selüloz enzimi için Michaelis-Menten eğrisi.....	39
Şekil 3.9. Serbest selüloz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği	39
Şekil 3.10. İmmobilize edilen selüloz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği	40
Şekil 3.11. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin depolama stabilitesinin % bağlı aktivite olarak değişimi	41
Şekil 3.12. İmmobilize edilen selüloz enziminin tekrar kullanılabilirliğinin gösterimi	42
Şekil 3.13. Manyetik nanopartiküllerin A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri	43
Şekil 3.14. Sentezlenen MNP'nin EDX spektrumu	44

Şekil 3.15. APTES ile silinizasyon yapılan MNP'lerin (A-MNP) A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri	44
Şekil 3.16. APTES ile silinizasyon yapılan MNP (A-MNP)'nin EDX spektrumu	45
Şekil 3.17. Gluteraldehit ile çapraz bağlanmış A-MNP'lerin (G-MNP) A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri	45
Şekil 3.18. Gluteraldehit ile çapraz bağlanmış A-MNP (G-MNP)'nin EDX spektrumu	46
Şekil 3.19. Selüloz enzimi bağlı G-MNP'lerin (E-MNP) A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri	46
Şekil 3.20. Selüloz enzimi bağlı G-MNP (E-MNP)'nin EDX spektrumu	47
Şekil 3.21. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu; A: MNP, B: A-MNP, C: G-MNP, D: E-MNP	48
Şekil 3.22. Serbest selüloz enzimiyle gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin zamana göre % şeker verimi.....	49
Şekil 3.23. İmmobilize edilen selüloz enzimle gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin zamana göre % şeker verimi	50
Şekil 3.24. Bağımsız değişkenlerin glikoz konsantrasyonuna etkisi.....	53

KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltma	Açıklama
A-MNP	: APTES bağlı nanopartikül
BSA	: Sığır serum albümin
CMC	: Karboksimetilselüloz
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EDX	: Enerji yayımlı x ışını analizi
E-MNP	: Enzim bağlı G-MNP
FPU	: Filtre kağıdı ünitesi
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi
G-MNP	: Gluteraldehit bağlı A-MNP
MNP	: Manyetik nanopartikül
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
% v/v	: Hacimce yüzde
% w/w	: Ağırlıkça yüzde

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, kimyasal veya biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilen protein yapısındaki biyomoleküllerdir. Enzimlerin seçiciliğini ve aktivitesini, protein yapısındaki aminoasit dizilimi belirler. Enzimler ortam koşullarındaki (sıcaklık veya pH gibi) değişiklikler durumunda denatüre olarak protein yapısı değişebilir. Bu durumda katalitik özelliklerini de kaybederler (Verger, 1997; Aptiş, 2012).

Enzimlerin bir kısmı yalnızca proteinden oluşurken bazıları ise protein olmayan kısımları da içerir. Bu enzimlerde protein kısmı “apoenzim”, protein olmayan kısmı, enzimden ayrılabilirse “koenzim” ya da “kofaktör”, sıkıca bağlıysa “prostetik grup” olarak adlandırılır. Koenzimler inorganik metal anyon veya katyonlar, organik moleküller ve vitamin türevlerinden oluşur. Tek başına apoenzim katalitik aktiviteye sahip değildir. Enzimin katalitik aktivite gösterme özelliğini kazandıran koenzim, asıl enzime göre daha düşük aktiviteye sahiptir (Malkoç, 2011).

Enzimlerin sayısal gösterimine dayalı sistematik liste (EC numarası), Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından belirlenmiştir. Enzimlerin sistematik adlandırması iki kısımdan oluşur: Birinci kısım substratları ve ikinci kısım ise katalize edilen reaksiyon türünü tanımlar. Bu yaklaşıma göre, tüm enzimler altı reaksiyon türünün birini katalize eder. Enzimlerin sınıflandırılması kimyasal tepkime doğasına göre altı ana kategoriye ayrılmıştır (Carr ve ark., 1980; Yıldız, 2007):

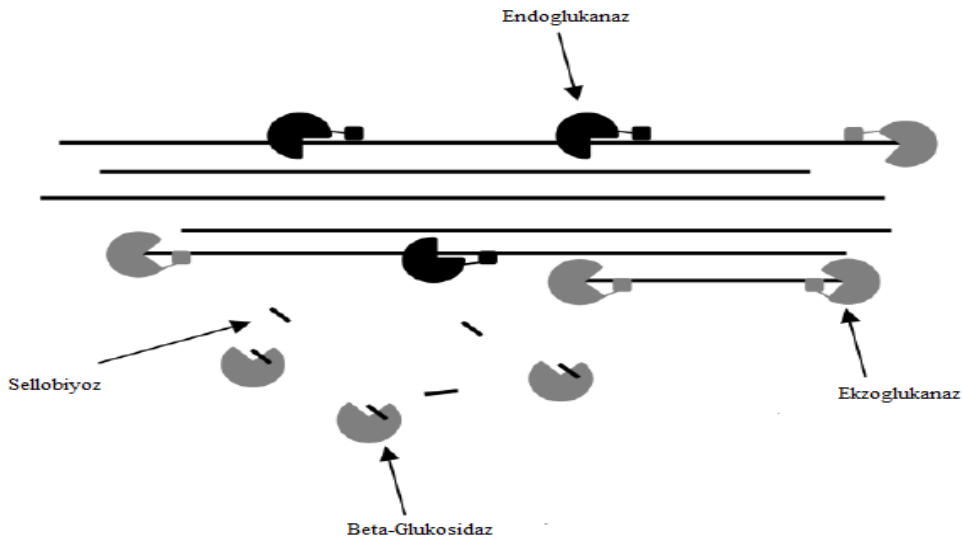
1. Oksidoredüktazlar, substrat oksidasyonunu veya indirgenmesini katalize ederler.
2. Transferazlar, katalizör grubu transferini sağlarlar.
3. Hidrolazlar, su ilavesi ile bağ kırılmasını katalize ederler.
4. Liyazlar, aktif grupların substratlarından ayrılmasını sağlarlar.
5. İzomerazlar, intramoleküler yeniden düzenlemeleri katalize ederler.
6. Ligazlar, kimyasal bağ yaparak, iki molekülün birleşmesini sağlarlar.

1.2. Selülaz

Selülazlar, selülozdaki β -1,4 bağlarını hidroliz ederek, sello-oligosakkarit, sellobiyoz ve glikoz oluşturan enzimlerdir. Selülaz enzimleri mantarlar, bakteriler, protozoalar, bitkiler ve hayvanlardan elde edilirler. Aminoasit dizileri ve kristal yapıları nedeniyle selülazların katalitik modülleri çeşitlilik göstermektedir (X. Z. Zhang ve ark., 2013).

Selülaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar; bazı anaerobik bakteriler (örn; *Clostridium thermocellum*), aerobik bakteriler ve mantarlar (*Trichoderma reesei*, *Aspergillum niger*)'dir. Genellikle endüstriyel selülaz enzimlerinin üretimi için, *Trichoderma reesei* kullanılmıştır. *Trichoderma reesei* tarafından üretilen toplam selülazın yaklaşık %92'sinin endoglukanazlar ve sellobiyohidrolazlardan oluştuğunu belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2004; Yavaş, 2010).

Selülaz enzimleri, endo- β -1,4-glukanaz (EC 3.2.1.4), β -glukozidaz (EC 3.2.1.21) ve sellobiyohidrolazlar (ekzoglukanaz) (EC 3.2.1.91) olmak üzere üç grupta incelenirler. Endoglukanazların selülozu rastgele parçalaması sonucunda oligosakkaritler oluşurken, sellobiyohidrolazların selülozda bulunan β -1,4-D-glikozidik bağlarını kırması sonucu, sellobiyoz oluşmaktadır. β -glukozidazlar ise sellobiyozları glikoza yıkarak selüloz hidrolizini gerçekleştirirler (Haliskaranfil, 2012).



Şekil 1.1. Selülozun hidrolizi esnasında selülazların davranışları (Alftrén ve ark., 2013)

Sellobiyohidrolazlar selülozun kristal ve amorf kısımlarını hidroliz edebilirken, endoglukanazlar ise sadece amorf selülozu hidroliz ederler (Laser ve ark., 2002; Yavaş, 2010).

Hemiselülazlar (ksilanaz EC 3.2.1.8) ise, (α -l-arabinofuranosidaz EC 3.2.1.55, α -glukoronidaz EC 3.2) gibi hem β -1,4-ksilan hem de çeşitli yan zincirleri parçalayan enzimleri içerirler (Shallom ve ark., 2003; Golan, 2011).

1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Serbest hareket eden enzimlerin çözücü içinde sabit hale getirilmesi kavramı 1916 yılında ortaya çıkmıştır. Invertaz, 1916 yılının sonlarında kömür ve alüminyum hidroksit gibi matrikslere immobilize edilen ilk enzimdir. İmmobilize invertaz, serbest hali ile benzer bir aktivite göstermiş ve bu bulgu mevcut enzim immobilizasyon tekniklerinin temelini oluşturmuştur. (Fersht, 1999; Powers ve ark., 2006).

İmmobilizasyon, tekrar kullanabilmeleri amacıyla enzimlerin, kimyasal ya da fiziksel olarak bir destek maddesine tutturulmasıdır. Bu işlem sonrasında enzimlerin katalitik aktifliklerini kaybetmemesi istenir

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri arasında ; filtrasyon, santrifüjleme gibi işlemlerle kolaylıkla ortamdan uzaklaştırılabilmesi, tekrar ve uzun süre kullanılabilmesi, sıcaklık ve pH gibi çevresel koşullara daha dayanıklı olmaları, serbest enzime oranla kararlılıklarının daha yüksek olması, sürekli prosesler için uygun olması gibi özellikler sayılabilir (Aksoy ve ark., 2003; Doğan, 2008).

Ayrıca, immobilize enzimlerin immobilizasyon esnasında enzim aktivitesinin azalması ve enzim destek materyallerinin maliyetinin yüksek olması ve difüzyon sınırlamaları gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Durante ve ark., 2004; Doğan, 2008).

İmmobilizasyon işleminde taşıyıcı destek maddeyelinin fiziksel ve kimyasal özellikleri çok önemlidir. İmmobilize enzim proses tasarımı destek materyali uygun seçilmelidir. Günümüzde immobilizasyon işlemi için kullanılan bazı destek maddeleri Tablo 1.1’de gösterilmiştir (Luckarift ve ark., 2004; Aptiş, 2012).

Tablo 1.1. İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri (Aptiş, 2012)

Organik Destekler				İnorganik Destekler
Doğal Polimerler		Sentetik Polimerler		Doğal Mineraller
Polisakkaritler	Proteinler	Polistiren	Diğer Polimerler	
Selüloz	Kollajen		Poliakrilat	Bentonit
Dekstran	Albumin		Polimetakrilat	Silika
Agar			Poliakrilamid	İşlenmiş Materyaller
Agaroz			Vinil	Cam (nonporöz ve kontrollü gözenekli)
Kitin				Metaller
Aljinat				Gözenekli metaloksitler

1.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

1.4.1. Kimyasal Yöntemler

Taşıyıcı bağlama yöntemi, enzimler için en eski immobilizasyon tekniğidir. Bu yöntemde, taşıyıcıya bağlanan enzim miktarı ve sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır. Taşıyıcı seçiminde, parçacık boyutu, yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara olan molar oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi önemlidir.

Genel olarak, immobilize enzimdeki hidrofilik grupların oranındaki artış enzimin yüksek aktivite göstermesine neden olmaktadır. Enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanıma sahip taşıyıcılar; polisakkarit türevleri, selüloz, dekstran, agaroz ve poliakrilamid jeldir (Çetin, 2007).

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri; kovalent bağlanma, iyonik bağlanma ve çapraz bağlanma olarak üç grupta incelenebilir.

Kovalent Bağlama

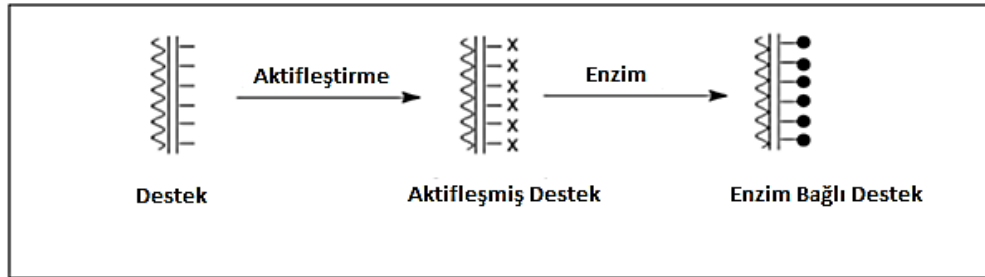
Kovalent bağlanma yöntemi, yüzeydeki fonksiyonel gruplar ile enzimlere ait olan aminoasitlerin fonksiyonel grupları arasında kovalent bağ oluşumuna dayanır.

Lizin amino grupları (NH_2), aspartik asidin veya glutamik asidin karboksil grubu (CO_2H), serin veya treoninin hidroksil grubu (OH) ve sisteinin sülfidril grubu (SH), kovalent bağ oluşumunda rol oynamaktadır ve genellikle reaksiyon, amino ve karboksil grupları arasında gerçekleşmektedir. Kovalent bağlanma koşulları, enzimlerin kararlılığıyla uyumlu olarak belirlenmelidir (Bickerstaff, 1997; Çınar, 2009).

Tablo 1.2. Enzim ve destek materyali arasındaki kovalent bağlanma modelleri (Çetin, 2007)

Amid bağı form	DESTEK--CO-NH—ENZİM
Diazotizasyon	DESTEK --N=N—ENZİM
Alkilasyon ve Arilasyon	DESTEK --CH ₂ -NH- ENZİM DESTEK --CH ₂ -S—ENZİM
Amidasyon Reaksiyonu	DESTEK --CNH-NH— ENZİM
Bifonksiyonel Ajanlara Taşıyıcı Bağlanması	DESTEK -O(CH ₂) ₂ N=CH(CH ₂) ₃ CH=N-ENZİM
Tiyol-Disülfid Değişimi	DESTEK --S-S— ENZİM
Schiff Bazı Reaksiyonu	DESTEK --CH=N— ENZİM

Kovalent bağlanma prosedürlerinin çoğu, destek materyalinin aktifleştirilmesinin ardından enzimin bağlanması ile iki aşamada gerçekleşmektedir. Aktifleştirilmiş desteklerin kararsız ve reaktif fonksiyonel gruplara sahip olması nedeniyle destek aktifleştirme işleminden sonra enzim derhal immobilize edilmelidir (Bickerstaff, 1997; Çınar, 2009). Aktifleştirme işlemini gerçekleştirmek için, glutaraldehit, siyanürik klorür, epiklorohidrin, karbodiimit gibi aktifleyici ajanlar kullanılmaktadır.



Şekil 1.2. Kovalent bağlanma yönteminin şematik gösterimi (Doğan, 2008)

İyonik Bağlanma

İyonik bağlanma yöntemi, enzim proteinlerinin suda çözünmeyen taşıyıcılara iyonik bağlanmasına dayanır. Polisakkaritler ve iyon değişim merkezlerine sahip sentetik polimerler genellikle destek materyali olarak kullanılırlar. Bir enzimin iyonik bağlanma yöntemiyle destek materyaline bağlanması kovalent bağlanma yöntemine göre daha ılımlı koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, iyonik bağlanma yöntemi enzimin konformasyonunda ve enzimin aktif bölgesinde daha az değişikliklere neden olmaktadır. Böylelikle bu yöntemde, immobilize enzimler daha yüksek aktivite gösterirler.

İyonik bağlanmada yüksek iyonik şiddete sahip substrat solüsyonlarında veya pH değişimine bağlı olarak taşıyıcıdan enzim sızıntısı ortaya çıkabilir. Bunun nedeni, enzim

proteinleri ve taşıyıcılar arasındaki bağın kovalent bağlamaya göre daha zayıf olmasıdır (Çetin, 2007).

Çapraz Bağlama

Enzim proteinlerinin, çözünmez bir destek matrisi üzerinde protein moleküllerine ya da fonksiyonel gruplara çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Çapraz bağlanma yönteminde taşıyıcı destek materyali kullanılmamaktadır.

Çapraz bağlama reaksiyonları sert koşullar altında yürütülür. Bu koşullar enzimin aktif merkezinin konformasyonunu değiştirebilir ve bu nedenle enzim için aktivite kaybına yol açabilir. Ayrıca bu yöntem pahalı ve yüksek immobilizasyon verimi için yetersizdir (Çetin, 2007). Çapraz bağlanmayı gerçekleştiren bifonksiyonel ajanlar, gluteraldehit, dinitrobenzen ve diazobenzidin gibi maddelerdir (Çınar, 2009).

1.4.2. Fiziksel Yöntemler

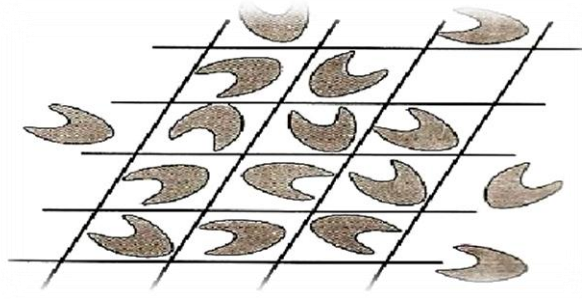
Adsorpsiyon

En basit immobilizasyon yöntemi olan adsorpsiyonda, enzim ve destek materyali arasındaki etkileşimler geri dönüşümlüdür. Geri dönüşümlü etkileşimler çoğunlukla Van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlanma, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir (Bickerstaff, 1997; Çınar, 2009). Bu yöntem, ucuz olmasının yanı sıra hızlı gerçekleşen bir immobilizasyon tekniğidir. Enzimin aktif bölgesi bozulmadan kalır ve enzim daha yüksek aktivite gösterir. Bununla birlikte, yöntemin en önemli dezavantajı destekten enzim sızıntısıdır. Destek ile substratın, ürünün veya kirletici kalıntıların etkileşimi sebebiyle spesifik olmayan bağlanma söz konusu olabilmektedir.

Hapsetme

Bu yöntem, enzimin bir polimer kafes içerisinde tutulmasına dayanır. Diğer immobilizasyon yöntemlerinden farklı olarak, hapsetme yönteminde polimer matriks ile enzimin aktif bölgesi arasında doğrudan bir bağlantı oluşturulmaz.

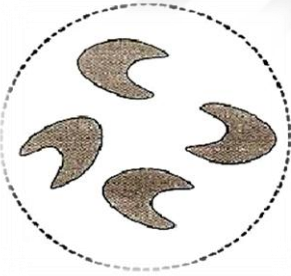
Suda çözünmeyen bir enzim konjugatı üretmek için az miktarda enzime ihtiyaç duyulmaktadır ve ayrıca bu yöntemde enzim kimyasal modifikasyona uğramaz. Hapsetme metodunun temel dezavantajı ise difüzyon sınırlamalarıdır (Çınar, 2009).



Şekil 1.3. Hapsetme yöntemi ile immobilizasyonun şematik gösterimi (Çınar, 2009)

Etkili bir bariyer olması için, matriksin gözenekli yapıda olması gerekmektedir. Bu gözeneklerin boyutu, enzim kaçışını engelleyecek aynı zamanda substrat ve ürün difüzyonunu engellemeyecek büyüklükte olmalıdır (Zaborsky ve ark., 1973; Yıldız, 2007).

Mikrokapsül ile hapsetme yönteminde, enzim moleküllerinin boyutu kapsüllerin gözenek boyutundan daha büyüktür. Küçük substrat ve ürün molekülleri kapsül içine dağılabilirler (Zaborsky ve ark., 1973; Yıldız, 2007).



Şekil 1.4. Mikrokapsül ile immobilizasyonun şematik gösterimi (Çınar, 2009)

Klasik hapsetme yöntemiyle karşılaştırıldığında, birim enzim başına yüksek yüzey alanı oluşumu büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca enzimin özelliklerinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır ve enzim molekülleri mikrokapsül içindeki solüsyonda serbest halde bulunmaktadır (Yıldız, 2007).

1.5. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, mühendislik, atomik ve moleküler seviyede bilimin birleştirilmesiyle elde edilen multidisipliner bir alan olarak tanımlanır. Nano seviyedeki maddelerin parçacık boyutu 1-100 nm arasındadır. Nanoteknoloji, mühendislik, kimya, fizik bilimleri, eczacılık

ve teknoloji alanında kullanılmaktadır ve önümüzdeki yıllarda yaşamımıza önemli katkılar sağlayacaktır (Drexler, 1992; Konyala, 2015).

1.5.1. Manyetik nanopartiküller

Demir oksitler

Demir oksit nanopartiküllerin boyutları yaklaşık olarak 0.1 μm (100 nm) ile 0.001 μm (1 nm) arasında değişmektedir (<http://www.astm.org/>, 2009; Özgen, 2009). Geniş yüzey alanları göze çarpan özelliklerindendir. Biyolojik uygulamalarda, özellikle in vivo uygulamalar için, biyoyumlu demir oksit manyetik nanopartiküller (MNP) tercih edilmektedir. Ayrıca, in vitro uygulamalarda, biyoyumluluklarının yanı sıra, dokular, hücreler veya proteinler gibi biyomoleküllerin özelliklerini korumaya yardımcı olabilirler.

Parçacık boyutunun azalmasıyla birlikte, MNP'lerin yüzey alanı / hacim oranı büyük ölçüde artmakta ve böylelikle nanopartiküllerin işlevselliği de artmaktadır. Aynı maddenin 100 μm çapında ve 100 nm boyutları karşılaştırıldığında, 100 nm nanopartiküllerin 10^6 kat daha fazla yüzey alanına sahip olduğu görülmektedir (Wen, 2011).

Oksitler, hidroksitler ve oksihidroksitler de dahil olmak üzere 16 demir oksit türü vardır. Ancak bunların arasında en önemlileri hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)'dir (Cornell ve ark., 2003; Baltacı, 2010).

Hematit

Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), demir oksitler arasında termodinamik olarak en kararlı olanıdır ve kırmızı bir renge sahip bilinen en eski demir oksit türüdür. Hematit, altıgen birim hücresine sahiptir, ancak rhombohedral sistemde de sınıflandırılabilir. Ayrıca hematit, antiferromanyetik bir malzemedir (Cornell ve ark., 2003; Baltacı, 2010).

Manyetit

Manyetit (Fe_3O_4), siyah renkli en yaygın demir oksit malzemedir ve yüksek mıknatıslanma gösterir. Ters spinel tipi yapıya sahiptir. Yüzey merkezli kübik birim hücre pozisyonlarında 32 Oksijen iyonu vardır. Manyetitin yapısı diğer demir oksitlerden oldukça farklıdır. Formülünde iki değerli (Fe^{+2}) ve üç değerli (Fe^{+3}) demir bulunur (Srivastava ve ark., 2009; Baltacı, 2010).

Manyetit ferrimanyetik bir malzemedir ve Curie sıcaklığı 850 K civarındadır. Manyetitte, elektronlar bir yöne yöneldiğinde metal gibi ve diğer yönde yönlendirdiklerinde yalıtkan gibi davranmaktadır. Bu manyetitin yarı metalik davranışıdır. Bu özelliğinden dolayı manyetik direnç cihazları için kullanılması istenen bir malzemedir. Yarı metalik özelliğinin yanı sıra, yüksek polarite bir diğer önemli özelliğidir ve bu nedenle, ultra yüksek yoğunluklu manyetik depolama ortamı gerektiren işlemlerde kullanılabilirler. Manyetit aynı zamanda siyah demir oksit, manyetik demir cevheri, yük taşı, demir ferrit veya herkül taşı olarak bilinen manyetik demir oksit nanopartiküldür. Geçiş metali oksitleri arasında en güçlü manyetizmaya sahiptir (Zhang ve ark., 2005; Baltacı, 2010).

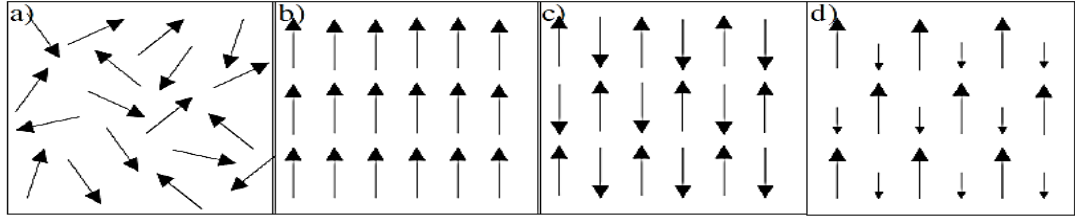
Manyetit, manyetik ve elektriksel özelliklerinden dolayı, endüstriyel proseslerde, çevresel uygulamalarda (metal iyonu uzaklaştırma ve manyetik filtrasyon için) ve ayrıca tıbbi uygulamalar için yaygın olarak kullanılan bir üründür (Cabrera ve ark., 2008; Özgen, 2009).

Maghemit

Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), kırmızı kahverengi renge sahip bir diğer önemli demir oksit türüdür. Maghemit oda sıcaklığında ferromanyetik bir malzemedir, ancak partiküllerin boyutu ~ 10 nm'den daha düşük olduğunda süperparamanyetik özellik gösterir. Maghemit, 370-600 °C sıcaklık aralığında daha kararlı hematit fazına dönüşür. Maghemit nanopartiküllerin manyetik özellikleri, yüzey ara yüz etkilerinden etkilenir. Parçacıkların yüzey alanı azaldığında mıknatıslanma değeri de düşer. Boyut, iç yapı bozukluğu, maghemitin manyetik özelliklerini etkiler. Maghemit nanopartikülleri, ilaç hedefleme, moleküler biyoloji, DNA saflaştırması, hücre ayırıştırma, hipertermi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Cornell ve ark., 2003; Baltacı, 2010).

1.5.2. Demir Oksit Nanopartiküllerin Manyetik Özellikleri

Demir atomu güçlü bir manyetik momente sahiptir. Bunun nedeni, orbitallerinde bulunan eşleşmeyen dört elektrondan kaynaklanmaktadır. Demir oksit manyetizma koşullarının ayrıntıları Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Manyetik dipollerin farklı yönelimleri: (a) paramanyetik, (b) ferromanyetik, (c) antiferromanyetik ve (d) ferrimanyetik (Özgen, 2009)

Paramanyetizma

Paramanyetik partiküllerin kalıcı dipol momentleri vardır. Eğer böyle bir malzemeye bir manyetik alan uygulanırsa, dipol momentlerin bazıları hizalanmaktadır. Manyetik alana sahip olmalarına karşın, rastgele ısı hareketi nedeniyle dipol momentlerin tamamının hizalanması önlenmektedir (Sugimoto, 2001; Li, 2007).

Ferromanyetizma

Ferromanyetik partiküllerdeki eşleşmeyen elektronların aynı anda spontan olarak hizalanmasıyla oluşurlar. Bu maddeler, manyetik alan olmaksızın mıknatıslanma sergilemektedir. Ferromanyetik partiküller alandan çıkarılınca, mıknatıslama özelliği kalıcı olmaktadır (Li, 2007).

Ferrimanyetizma

Ferrimanyetizma genellikle seramik malzemelerde görülür ve ferromanyetizma ile benzerdir ancak net momentlerin kaynağı farklıdır. Tıpkı antiferromanyetik malzemeler gibi, ferrimanyetik malzemeler de aynı antiparalel manyetik moment hizalanmasına sahiptir, ancak manyetik momentlerin büyüklüğü eşit değildir (Song, 2005; Baltacı, 2010).

Antiferromanyetizma

Antiparalel manyetik momentler aynı büyüklükte ise, partikül antiferromanyetik olarak adlandırılır ve net manyetik moment göstermez. Komşu atomların veya iyonların spin momentleri karşıt olarak hizalandığında antiferromanyetizma oluşur. Bu malzemelerde antiparalel bir hizalanma vardır. Manyetik momentler birbirini iptal eder ve net olarak sıfır mıknatıslanma ile sonuçlanır (Vidal ve ark., 2006; Özgen, 2009).

Süperparamanyetizma

Süperparamanyetik bir materyal, tek alanlı manyetik bir materyaldir. 20 nm'den küçük boyutu olan demir oksit nanopartikülleri genellikle oda sıcaklığında süperparamanyetik davranış gösterirler (Cornell ve ark., 2003; Özgen, 2009).

Süperparamanyetik nanopartiküller, manyetik uygulamalar için çok önemlidir. Bu partiküller düşük manyetik alana sahip mıknatıslara iyi derecede yanıt vermektedir. Paramanyetik malzemeler Curie sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda süperparamanyetizma sergiler. Süperparamanyetik malzemeler 10 nm'nin altındaki çok küçük kristallerden oluşur. Kristalit boyutu çok küçük olduğundan, termal enerji bağlanma kuvvetlerini aşmakta ve mıknatıslanma yönünü değiştirmektedir. Mıknatıslanma yönünde dalgalanmalar olduğunda, ortalama manyetik alan sıfıra düşer. Bu davranış, paramanyetik materyallerde de görülmektedir, ancak süperparamanyetik partiküllerde bütün kristaller, her bir atomun bağımsız davranışından dolayı uygulanan manyetik alan ile hizalanmaktadır (Cornell ve ark., 2003; Li, 2007).

1.5.3. Nanopartikül Sentez Yöntemleri

Birlikte Çöktürme

Birlikte çöktürme, kolay işlem prosedürü, kısa reaksiyon süresi ve ılımlı reaksiyon koşulları nedeniyle demir oksit MNP'lerin sentezi için basit bir yöntemdir. Genel olarak, Fe^{+3} ve Fe^{+2} iyonları reaktöre ilave edilir ve ardından tepkime için OH grubu sağlayabilecek bir baz eklenir. Demir oksitin doygunluğa ulaşması, kimyasal reaksiyona bağlı olarak gerçekleşir. Surfaktan veya diğer partikül stabilizörünün eklenmesiyle, partiküllerin boyutu büyümeden nano aralıkta kontrol edilebilir (Schwertmann ve ark., 2003; Wen, 2011).

Bununla birlikte, sistemde oksijen varlığında Fe_3O_4 , $Fe(OH)_3$ 'e oksitlenir. Genel olarak, reaksiyon sisteminde azot veya argon gazı ile inert ortamı sağlanarak Fe_3O_4 'ün daha fazla oksidasyonu önlenmiş olur. Ayrıca, nanopartikül boyutunun inert olmayan sistemle karşılaştırıldığında daha küçük olur (Gupta ve ark., 2004; Wen, 2011).

Termal Bozunma

Termal bozunma, kontrollü büyüklükte MNP sentezinde iyi performans göstermektedir. Reaksiyon başlatıcı maddeler, genellikle organometalik bileşiklerdir. Bu

maddeler, yüzey aktif maddeler içeren yüksek kaynama noktalı organik çözücülere ilave edilmektedir (Redl ve ark., 2004; Wen, 2011). Manyetik nanopartiküllerin oluşumu, yüksek reaksiyon sıcaklığında ayrışma ile eş zamanlı gerçekleşir ve bu işlem, reaksiyon süresi, sıcaklık ve surfaktan molekülünün karakteristik uzunluğundan etkilenmektedir.

Mikroemülsiyon Yöntemi

Mikroemülsiyon yöntemi üzerine araştırmalar son yıllarda dikkat çekmektedir. Mikroemülsiyonlar, yağ içinde su şeklinde tanımlanırlar. Yağ içinde su emülsiyonunda, nanopartiküller surfaktanlarla (yüzey aktif madde) çöktürülmektedir.

Yöntemin avantajları; küçük boyutlu ve düzgün partiküllerin oluşmasıdır. İstenen reaktifleri içeren iki özdeş yağ içinde su mikroemülsiyonu karıştırdığında, mikro damlacıklar sürekli olarak çarpışır, birleşir ve tekrar ayrılır. Sonuç olarak misellerde bir çökelti oluşur. Son olarak, aseton veya etanol gibi bir solvent ilave edilerek mikroemülsiyondaki yeni oluşan çökelti, karışımdan süzülerek veya santrifüj edilerek ayrılır (Gupta ve ark., 2004; Wen, 2011).

Son zamanlarda mikroemülsiyon ile misel terimi birbirinin yerine kullanılmaktadır. Aradaki fark misel agregatlarının boyutları 1-10 nm çapında, mikroemülsiyonlar ise 10-100 nm çapında olmasıdır.

Hidrotermal sentez

Sıvı-katı çözelti reaksiyonu ile nanopartikül sentezi için hidrotermal yöntem kullanılır. Hidrotermal reaksiyonlarda nanopartiküllerin boyutu ve morfolojisi, zaman ve sıcaklık kontrol edilebilir. Partikül boyutu yaklaşık 9-12 nm arasında değişmektedir (Makovec ve ark.,1999; Sağlam, 2014).

Sol-jel Yöntemi

Sol-jel yöntemi, diğer yöntemlere kıyasla birçok avantaja sahiptir. Yüksek saflık ve iyi derece homojenlik en belirgin iki özelliğidir. Bu yöntemde genellikle, demir oksit metalorganik reaksiyon başlatıcıları kullanılır. Ancak bu yöntemde, MNP sentezi karmaşık bir prosedürle gerçekleşir. Ayrıca, pahalı, toksik reaktifler kullanılmaktadır ve bu yöntem büyük ölçekli üretimde uygulanamamaktadır. (Xu ve ark., 2007; Wen, 2011).

Tablo 1.3’de reaksiyon parametrelerine, boyut dağılımına, şekil kontrolüne ve mıknatıslanma değerine göre farklı yöntemlerin karşılaştırılması gösterilmektedir.

Tablo 1.3. Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemlerinin Kıyaslanması (Gupta ve ark., 2005; Wen, 2011)

Yöntem	Birlikte Çöktürme	Termal Bozunma	Mikroemülsiyon	Hidrotermal Sentez	Sol-jel yöntemi
Basınç	Normal	Normal	Normal	Yüksek	Normal
Sıcaklık (°C)	20-90	100-320	20-50	160-300	40-400
Reaksiyon Süresi	Dakikalar	Saatler-Günler	Saatler	Saatler	Saatler
Boyut Dağılımı	Büyük	Çok Küçük	Küçük	Çok Küçük	Büyük
Şekil Kontrolü	Kötü	Çok İyi	İyi	Çok İyi	Çok İyi
Magnetizasyon (emu/g)	20-50	20-60	>30	10-30	10-40
Tamamlama	Çok Kolay	Karmaşık	Karmaşık	Kolay	Kolay
Verim	Yüksek	Yüksek	Düşük	Orta	Orta

*(emu/g= manyetik şiddet.manyetik alan/g)

Yukarıdaki tablodan da görülebileceği gibi, kovalent çöktürme yöntemi, boyut dağılımı ve şekil kontrolü olmadığı durumlarda yüksek verimle demir oksit manyetik nanopartikülleri sentezlemenin en kolay yoludur. Mikroemülsiyon yönteminin ise genel performans olarak umut verici bir yöntem olabildiği görülmektedir.

1.5.4. Manyetik Nanopartiküllerde Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Demir oksit MNP'lerin stabilizasyon prosedürü MNP sentezi sonrasında önemli bir aşamadır. Demir oksidin yüzeyi hidrofobiktir ve yüzey modifiye edilmediğinde, nanopartiküller kolayca agregatlaşacak veya oksijen ve diğer reaktiflerce okside olacaktır. Uygun kaplama yöntemiyle demir oksit manyetik nanopartiküllerin yüzeyi modifiye edilir ve stabilizasyonu sağlanmış olur (Wen, 2011).

Organik Maddelerle Kaplama Yöntemi

Organik kaplama, demir oksit MNP'leri stabilize etmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İyi biyouyumluluk ve kararlılık gösterir. Yüzey aktif maddeler veya polimerler, MNP yüzeyinde fiziksel olarak adsorbe edilebilir veya kimyasal olarak bağlanabilirler.

Böylece çözelti içindeki nanopartiküllerin dengelenmesi için sterik itici güçler üreten tek veya çift katmanlar oluşturulur (Shen ve ark., 1999; Wen, 2011).

Polimer Kaplama

Demir oksit manyetik nanopartiküllerin stabilizasyonu veya fonksiyonelleştirilmesi için birçok polimer kullanılabilir. Jelatin, dekstran, kitosan ve pullulan gibi doğal polimerler bu partiküller için kararlı bir yapı gösterirler. Ayrıca, demir oksit MNP'lerin yüzey modifikasyonu için PEG, PVP, PVA gibi sentetik polimerler de kullanılmaktadır (A. K. Gupta ve ark., 2004; Wen, 2011). Yüzey modifikasyonu polimer ile yapılan partiküller, genellikle diğer kaplama malzemeleriyle modifiye edilen partiküller ile karşılaştırıldığında daha iyi biyoyumluluk gösterirler. Yöntemin dezavantajı ise; polimer kaplamasıyla, demir oksit MNP'lerin manyetizma değerinin düşmesine neden olabilmesidir.

Anorganik Kaplama Yöntemi

Silika Kaplama

Silika, demir oksit manyetik nanopartiküllerin stabilizasyonu için iyi performansa sahip bir maddedir. İlk olarak, manyetik çekirdek ile sıvı ortam arasındaki direk teması önleyerek istenmeyen etkileşimi önler. İkinci olarak, maghemit partiküllerinin sentezinde, termal dönüşüme karşı maghemit parçacıklarını 1000 °C sıcaklığa kadar stabilize edebilen bir anti-sinterleme ajanı olarak işlev görebilir. Silika kabuklar üzerindeki negatif yüklerden dolayı, silika kaplanmış manyetik nanopartiküller diğer yüzey aktif maddelere gerek olmadan su içerisinde tekrar dağılabilir özelliktedir (Chanéac ve ark., 1996; Wen, 2011).

1.5.5. Nanopartiküllerin Destek Materyali Olarak Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması

Manyetik nanopartiküller ile enzim arasındaki biyoyumluluk, enzim immobilizasyonunun ön şartıdır. Geleneksel desteklerle karşılaştırıldığında, manyetik nanopartiküllerin yüksek yüzey alanları, enzim bağlanma kapasitesinin sınırlı olması problemini ortadan kaldırmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin fonksiyonelliği, enzimlerin çok yönlü bağlanmasını sağlamaktadır. Küçük boyutlu partiküllerin dağılımının yüksek olması nedeniyle substratların ve ürünlerin kütle transferi kısıtlamaları en aza

indirilmektedir. Ayrıca, MNP'ler ile harici manyetik alan uygulanarak immobilize enzimlerin kolaylıkla ayrılmasını sağlayabilmektedirler (Wen, 2011).

1.6. Lignoselülozik Kaynaklar

Lignoselülozik doğal kaynakların temel bileşenleri selüloz, hemiselülozlar, ligninler, özütlenebilir maddeler ve inorganiklerdir. Doğada selüloz; çeşitli nişasta, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Hemiselülozlar ise galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve diğer şekerlerle; üronik asitlerin polimerleri ve heteropolimerlerini içerirler (Yang ve ark., 2008; Haykır, 2013).

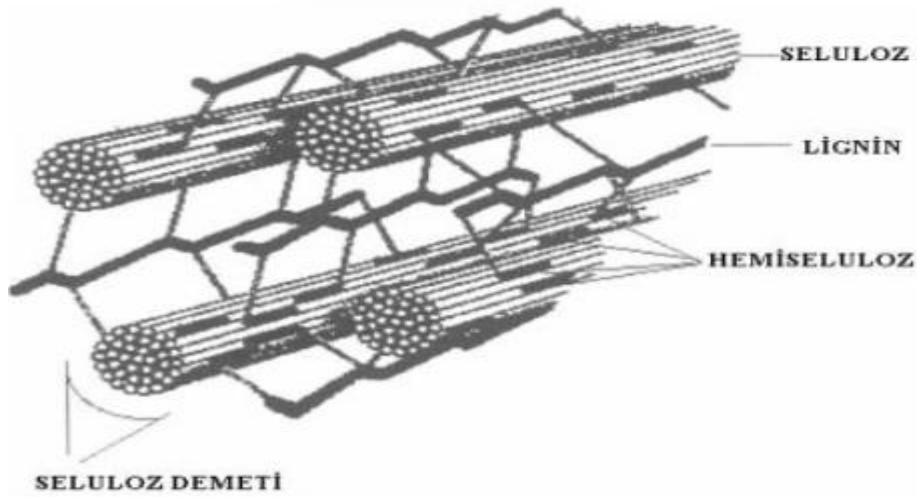
Selüloz, yeryüzünde en bol bulunan organik polimerdir. Birbirlerine β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanan glikoz monomerlerinden oluşmaktadır (Yang ve ark., 2008; Haykır, 2013).

Hemiselüloz, selülozun yapısını oluşturan glikoz alt birimlerine kıyasla farklı alt birimlerden ve dallanmış zincirlerden oluşur. Selüloz ve hemiselüloz arasındaki bir diğer önemli yapısal fark hemiselülozun tamamen amorf bir polimer olmasıdır. Glikoz, mannoz, galaktoz ve altı karbonlu şekerlere sahip olmakla birlikte ksiloz ve arabinozda dahil olmak üzere beş karbonlu şekerlerden oluşur.

Ksilan degradasyonu esas olarak sırasıyla ksiloligosakkaritler ve ksilobioz uçlarından ksilozu parçalayan endoksilanaz ve β -ksilosidaz tarafından sağlanır. Amorf yapısından dolayı hemiselülozun ayrışması selüloza kıyasla daha kolaydır (Hendriks ve ark., 2009; Haykır, 2013).

Selüloz ve hemiselülozla karşılaştırıldığında lignin tamamen farklı bir yapıya sahiptir. Birkaç ana karbon-karbon ve eter bağından oluşan fenilpropanoid birimlerden oluşan üç boyutlu ve karmaşık bir polimerdir.

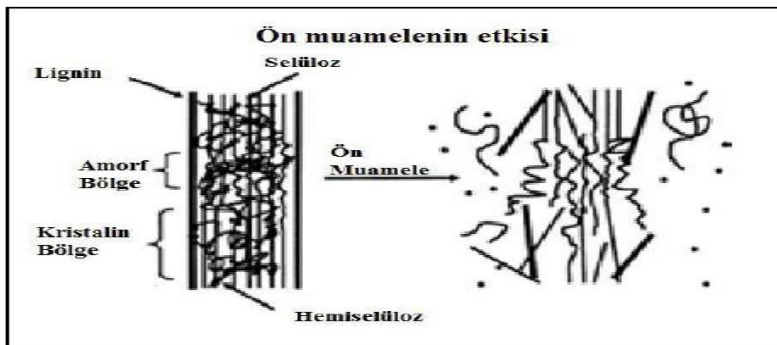
Amorf olmasına rağmen hemiselüloz gibi kolayca parçalanmaz. Selüloz-hemiselüloz matrisinin içine yerleştirilen lignin sağlamlığı sağlayarak biyokütle yapısında önemli bir rol oynamaktadır. Biyokütlenin enzimatik erişilebilirliğini sınırlar ve böylece lignoselülozik biyokütlenin hidrolizinin yetersiz şeker verimi ile sonuçlanmasına neden olur. Parçalanması, özellikle alkali ajanlar varlığında çeşitli ön muamele koşulları altında mümkündür (Yavaş, 2010). Şekil 1.6.'da lignoselülozik kaynaklara ait bileşenlerin şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 1.6. Lignoselülozik kaynaklara ait bileşenlerin şematik gösterimi (Kütük, 2015)

1.7. Lignoselülozik Biyokütle İçin Ön İşlem Yöntemleri

Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizden önce enzimlere karşı daha duyarlı hale getirmek için ön işlem yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Ön işlem yöntemleri yardımıyla, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi ana bileşenlerin çözünürleştirilmesi veya ayrılması sağlanır. Selüloz hidrolizinde, ligninin ve hemiselülozun uzaklaştırılması, hidroliz etkinliğini arttırmak için çok önemlidir. İdeal ön işlem yöntemi selüloz-hemiselüloz matrisini başarıyla çözmeli, selülozun kristal yapısını azaltarak amorf selüloz miktarını arttırmalı, lignoselüloz yapıdan lignini uzaklaştırmalı ve enzim erişilebilirliğini sağlamak için biyokütlenin gözenekliliğini arttırmalıdır. Ayrıca, ön muamele sırasında hidroksimetilfurfural (HMF) gibi inhibitörlerin oluşumu önlemelidir (Menon ve ark., 2012; Koçan, 2015). Şekil 1.7.'de ön işlemin biyokütle bileşenleri üzerindeki etkisi gösterilmektedir.



Şekil 1.7. Ön işlemin biyokütle bileşenleri üzerindeki etkisi (Kütük, 2015)

1.7.1. Fiziksel Ön İşlemler

Partikül boyutunu düşürme, fiziksel bir ön işlem yöntemi olarak sınıflandırılabilir. Lignoselülozik biyokütleyi değerli ürünlere dönüştürmek için önemli bir adımdır. Lignoselülozik biyokütlenin büyük bir kısmı öğütme gibi mekanik boyut redüksiyonu gerektirir. Parçacık boyutundaki azalma, kristalinite derecesini düşürdüğü ve kütle transferini artırdığı için hidroliz etkinliğini de artırır. Ayrıca, selüloz ve enzimler arasındaki afinite, parçacık boyutunun düşürülmesi yardımıyla geliştirilebilir (Yeh ve ark., 2010; Koçan, 2015).

1.7.2. Kimyasal Ön İşlemler

Kimyasal ön işlem yöntemleri, lignoselülozik biyokütlenin değerli ürünlere dönüştürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kimyasal ön işlem yöntemlerinin ana amacı, lignin ve/veya hemiselülozun uzaklaştırılması ve selülozun kristalleşme derecesinin düşürülmesidir. En iyi bilinen kimyasal ön işlem yöntemleri asit ve alkali ön işlem yöntemleridir. Asidik ön işlem seyreltik asit veya konsantre asit kullanılarak yapılabilir.

Alkali ön işlem, seyreltik veya konsantre baz kullanılarak yapılabilir. Sodyum hidroksit ve kalsiyum hidroksit alkali ön işlemlerde kullanılan yaygın bazlardır. Sodyum hidroksidin lignoselülozik biyoküttele lignin yapısını bozabildiği, hemiselüloz ve selüloza enzimlerin erişilebilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (Menon ve ark., 2012; Koçan, 2015).

Asidik Ön İşlem

Asidik ön işlem, endüstride lignoselülozik biyokütlenin ön işlemi için en yaygın kullanılan yöntem olarak bilinmektedir. Potansiyel inhibitörlerin oluşumunu en aza indirmek için sülfürik asit, hidroklorik asit ve nitrik asit gibi seyreltik asitler kullanılmaktadır. 100-200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ve kısa sürede biyokütlenin seyreltik asitlerle etkileşmesiyle gerçekleştirilir. Fermente edilebilir şeker oluşumu için olumlu olmasına rağmen seyreltik asit ön işleminin lignin üzerinde daha az etkili olduğu, bunun sadece ligninin dağıtılmasıyla sonuçlandığı belirtilmektedir (Sanchez ve ark., 2008; Haykır, 2013).

Asidik ön işlemde amaç, hemiselülozun çözünür hale getirilmesi, böylece selülozun daha erişilebilir olmasını sağlamaktır. Çözünür hemiselülozlar (oligomerler), asitli

ortamlarda monomerler, furfural, HMF ve diğer (uçucu) ürünleri üreten hidrolitik reaksiyonlara tabi tutulabilir. Asidik ön işlem sırasında nitrik asit (HNO_3) ilavesinin gazetede ligninin çözünürlüğü üzerinde muazzam bir etkisi olduğu belirtilmektedir (Fengel ve ark., 1983; Tozluoğlu, 2012).

Alkali Ön İşlem

Biyokütle üzerinde alkali ön işlemin başlıca etkisi ligninin uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla, sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit (Sönmüş kireç) ve hidrojen peroksit gibi çeşitli alkali ajanlar kullanılmıştır (Sanchez ve ark., 2008). Ayrıca alkali reaktiflerin yüksek konsantrasyonlarda kullanılması durumunda selülozun kristal yapısını azalttığı gösterilmiştir.

Seyreltik asit ön işleminin aksine alkali ön işlemde daha az korozif etki gözlemlenmiştir. Bununla birlikte ön işlemi takiben ön işleme tabi tutulan biyokütlenin nötralizasyonu veya yıkanması önemlidir, çünkü biyokütle ön işlem esnasında önemli miktarda alkali tüketir (Hendriks ve ark., 2009). Bu işlem nedeniyle proses maliyetleri artmakta ve yüksek miktarlarda atık su üretilebilmektedir.

Düşük sıcaklıkta alkali ön işlemiyle (25-50 °C) lignin giderilmesinin en az % 60 oranında sağlandığı belirtilmiştir. Düşük sıcaklıktaki alkali ön işlem, yüksek sıcaklıktaki alkali ön işlemine kıyasla çok daha yüksek sodyum hidroksit konsantrasyonlarında (0.5-5 M) ve daha uzun süre (24 saate kadar) yürütülmüştür. Selülozun kristal yapısının bozulması için yaklaşık 5 M değerinde sodyum hidroksit konsantrasyonlarının kullanılması yararlı olmuştur. 2 saat boyunca 50 °C sıcaklıkta 2.5 M NaOH ile alkali ön işlemine maruz bırakılan tatlı sorgum küspesinin enzimatik hidrolizinden 24 saat içinde neredeyse %100 glikoz verimi elde edilmiştir. Sönmüş kireç (kalsiyum hidroksit) ön işlemi, NaOH ön muamelesinden daha ucuz ve daha güvenilir olma avantajına sahiptir. Ek olarak, kalsiyum karbonat formundaki kalsiyumun ön işlemin sonunda geri kazanılması işlemin diğer bir avantajıdır (Hendriks ve ark., 2009; Tozluoğlu, 2012).

1.8. Enzimatik Hidroliz

Lignoselülozik biyokütle için gerekli ön işlem yöntemlerini uyguladıktan sonra, daha sonraki fermentasyon basamağı için monomer şekerlerin serbest bırakılması amacıyla

hidroliz gerçekleştirilir. Bu nedenle spesifik hidrolitik enzimler, polimeri monomerlerine indirmek için kullanılır.

Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizini etkileyen başlıca faktörler, substrat miktarı, enzim miktarı, sıcaklık, pH gibi operasyonel koşullardır. Substrat miktarı, enzimatik hidrolizle açığa çıkan şeker miktarını belirler. Substrat miktarı ne kadar yüksek olursa, fermente edilebilir şekerlerin konsantrasyonu o kadar yüksek olur. Bununla birlikte, yüksek substrat kullanımı, enzimatik hidroliz sırasında kütle transferi sınırlamaları ve yüksek son ürün inhibitör konsantrasyonunun varlığına neden olabilmektedir (Haykır, 2013; Kristensen ve ark., 2009).

Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizi sırasında düşük enzim miktarı kullanarak enzimatik hidroliz yürütülmek istenmektedir. Biyokütle yapısındaki yüksek lignin varlığı selülozların selüloza rahat ulaşamamaları nedeniyle yüksek enzim kullanımını gerektirir (Yavaş, 2010).

1.9. Literatür Özeti

Enzim immobilizasyonunda manyetik nanopartikül kullanımı yüksek spesifik alan nedeniyle daha fazla enzim immobilizasyonu sağlar. İstenilen biyomoleküllerin seçimli olarak hedeflenmesi, manyetik alan nedeniyle reaksiyon ortamından kolayca ayrıştırılabilmesi ayrıca saflaştırma işlemlerindeki filtrasyon ve santrifüjleme gibi adımların olmaması diğer önemli avantajlarından. Bu üstünlükleri nedeniyle manyetik nanopartiküller birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Literatürde farklı materyallerin hidrolizi için enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak manyetik nanopartiküllerin kullanımına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Fakat bir lignoselülozik atık olan, atık kağıt hidrolizine yönelik manyetik nanopartiküllere bağlı selüloz enziminin kullanımı üzerine yapılan çalışma sayısı çok azdır. Manyetik nanopartiküllere enzim immobilizasyonu ve atık kağıt hidrolizine yönelik yapılan çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir;

Aspergillus niger kaynaklı, katı hal fermantasyonu (SSF) yoluyla elde edilen amiloglukosidaz (AMG) enziminin manyetik nanopartiküller üzerine çapraz bağlı enzim agregatları tekniği ile immobilize edildiği çalışmada; AMG, tek tabakalı olacak şekilde manyetik nanopartikül (MNP) ile kovalent olarak bağlanmıştır. Optimize edilen koşullarda, MNP-AMG enzim bağlanmasında gerekli taşıyıcı miktarı açısından (% 92.8) oranla

geleneksel yöntemle göre 14 kat daha az taşıyıcı kullanıldığı belirtilmiştir. MNP-AMG, yüksek oranda substrat, termal kararlılık, depolama kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik özellikleri göstermiştir (Gupta ve ark., 2013).

Bir başka çalışmada selüloz enzim kompleksinin karbodiimid yoluyla manyetik (Fe_3O_4) nanopartiküllere kovalent olarak bağlanması incelenmiştir. TEM sonuçlarına göre; partikül boyutu 13.3 nm ve manyetik partiküllere enzim kompleksinin bağlanması sonucunda partikül boyutunda bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir. FTIR ve XPS sonuçlarına göre; düşük enzim yüklemelerinde (1-2 mg/mg partikül), maksimum bağlanma oranının (~% 90) olduğu görülmüştür. Nanopartiküllerin termal ölçümleri daha geniş bir sıcaklık aralığında artan stabiliteye sahip olduğu, 50 °C sıcaklıkta enzim aktivitesinin maksimum olduğu ve enzim ile destek yüzeyi arasındaki iyonik kuvvetlerin optimum pH aralığının 4.0 ile 5.0 arasında olmasına neden olduğu belirtilmiştir (Jordan ve ark., 2011).

Manyetik demir oksit nanopartiküllerin 3-aminopropiltrietoksilsilan (APTES) ile silinizasyonunun araştırıldığı çalışmada; silinizasyon kinetiği, su, su / etanol (1/1), toluen / metanol (1/1) ile farklı APTES yükleme oranlarında ve farklı reaksiyon sıcaklıklarında gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta silinizasyon çok hızlı gerçekleştiği ancak doygunluğa doğru ilerlemenin yavaşladığı, silinizasyon mekanizmasının adsorpsiyon, kimyasal adsorpsiyon ve kimyasal difüzyon yoluyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2013).

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için; manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin (MNP) yüzeyi önce APTES ile silinizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve daha sonra PEG ile kaplanarak yüzey fonksiyonlu biyoyumlu MNP'ler oluşturulmuştur. MNP'lerin ortalama boyutu 20 nm ve MNP'ler oda sıcaklığında süperparamanyetizma ve yüksek mıknatıslanma özelliği sergilemiştir. Buna ek olarak, canlı tavşanlarda, VX2 malign tümörü MR görüntüleme deneylerinde kullanılan PEG-6000 diasit kaplı Fe_3O_4 nanopartiküller ile elde edilen sonuçlar, bu nanopartiküllerin MRI için umut verici bir araç olduğunu göstermiştir (Feng ve ark., 2008).

Glutaraldehit bağlanması yoluyla manyetik parçacıklar üzerinde selüloz immobilizasyon yöntemleri incelenen çalışmada; TEM analizi sonuçlarına göre; MNP'lerin ve selüloz enziminin immobilize edildiği MNP'lerin ortalama çapının 11.5 nm olduğu, enzim immobilizasyonunun partikül boyutunda ve yapısında belirgin değişiklikler yapmadığı görülmüştür. FTIR analizi sonucunda; selülozun manyetik nanopartiküllere immobilizasyonunun, selülozun amin gruplarının Fe_3O_4 nanopartikülleri üzerindeki

bağlanmamış amin gruplarıyla kovalent bağ yaparak gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. VSM analizi, MNP'lerin ve selüloz enziminin immobilize edildiği MNP'lerin süperparamanyetik özellikte olduğu ve immobilize selülazın serbest enzim ile karşılaştırıldığında daha geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterdiği ve depolama kararlılığının yüksek olduğu görülmüştür. İmmobilize selülazın buhar patlatma ön işlemi uygulanan mısır saplarının hidrolizinde daha iyi performans gösterdiği rapor edilmiştir (Xu ve ark., 2011).

Fermente edilebilir şekerlerin üretim sürecinin maliyetini ekonomik hale getirmek amaçlı yapılan bir çalışmada serbest ve immobilize enzimler kullanılarak, mikrokristalin selüloz ve doğal sellülozik substrat kullanılarak enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. *Trichoderma reesei* kaynaklı selülaz manyetik nanopartiküllere immobilize edilerek, serbest ve immobilize enzimin aktivitesi, termostabilite ve tekrar kullanılabilirlik deneyleri yapılmıştır. FTIR sonuçlarına göre, nanopartiküller üzerine selülazın immobilizasyonu işleminde % 94 oranında bağlanma sağlandığı belirtilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin sırasıyla 50 °C ve 60 °C sıcaklıkta farklı optimum sıcaklıklarına sahip olduğu, optimum pH değerinin 4.0 olduğu belirtilmiştir. Serbest ve immobilize enzimler için Km değerleri sırasıyla 0.87 mg/ml ve 2.6 mg/ml olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin, aktivitesinin beş döngü sonunda % 50 oranında devam ettiği, serbest enziminkine oranla 80 °C'de daha yüksek termostabiliteye sahip olduğu görülmüştür. Serbest ve immobilize enzimlerin 48 saat sonundaki optimum hidroliz verimleri karboksimetil selüloz (CMC) için sırasıyla; % 88 ve % 81, doğal selülozik substrat için % 89 ve % 93 oranıyla sonuçlanmıştır. Ayrıca çalışmada, enzimatik hidroliz için enzim kullanım miktarının azaltılması ve fermente edilebilir şekerlerin üretim prosesinin ekonomik ve uygulanabilir şekilde yapılabilmesi için immobilizasyonun uygun bir yöntem olduğu, immobilizasyon sonucunda; selülaz aktivitesinin arttığı, enzimin yüksek sıcaklıklarda daha yüksek kararlılığa sahip olduğunu, tekrar kullanılabilirlik ve daha uzun depolama kararlılığı özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir (Abraham ve ark., 2014).

Ticari süperparamanyetik nanopartiküllere selülaz enzimi fiziksel adsorpsiyon yoluyla bağlandığı çalışmada; FTIR spektroskopisi selülazın (endoglukanaz) partikül üzerine başarılı bir şekilde bağlandığını teyit etmiştir. Bağlanma yüzdesi Bradford yöntemi kullanılarak % 95 olarak belirlenmiştir. Substrat olarak CMC kullanıldığında maksimum enzim aktivitesi 0.1 birim (mol/dk.ml) olarak belirlenmiştir. Selülazın adsorpsiyon kapasitesi 31 mg/g nanopartikül olduğu ve immobilize enzimin kararlılığı, serbest enzimle

karşılaştırıldığında arttığı gözlenmiştir. Genel olarak, çalışmada, selülozun stabilitesi ve aktivitesinin manyetik nanopartiküllere fiziksel adsorpsiyon yoluyla güçlendirildiği, immobilize enzimlerin daha geniş sıcaklık ve pH aralıklarında çalışabildiği, tekrar kullanım ve ürün saflaştırılması imkanı sağlaması, uzun süreli depolamayı kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Khoshnevisan ve ark., 2011).

Cellic CTec2 selüloz enzim kompleksinin tekrar kullanımının incelenmesi için yapılan çalışmada; Cellic CTec2 selüloz enzim kompleksi, siyanürik klorürle aktive olan manyetik parçacıklar üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Mikrokrystalin selüloz, substrat olarak kullanıldığında immobilize selüloz enzim kompleksi ile (2.8 mg indirgen şeker/(g partikül.dakika)) oranında şeker verimi elde edilmiştir. Endoglukanaz, sellobiohidrolaz ve β -Glikozidaz enzimlerinin özgül aktivitesi Cellic CTec2'nin immobilizasyonundan sonra (U/mg protein) azaldığı görülmüştür. Hidroliz verimi üzerine surfaktan etkisi (Tween 80, PEG 6000 veya sığır serum albümin (BSA) kullanılarak) serbest ve immobilize Cellic CTec2 için incelenmiştir. BSA ilavesinin Tween 80 ve PEG 6000'in etkisini tamamen inhibe ettiği ve manyetik partikül-lignin etkileşimini azalttığı gözlemlenmiştir. Ön işlem görmüş buğday samanının hidrolizi için serbest ve immobilize Cellic CTec2 kullanılarak iki ardışık döngüde hidroliz gerçekleştirilmiş ve sonuçlar lignoselülozik substratın hidrolize edilmesi ve enzimin tekrar kullanılmasına olanak sağladığı belirtilmiştir (Alfrén ve ark., 2013).

Lignoselülozik materyallerin hidrolizi için β -glukosidaz enziminin manyetik nanopartiküllere immobilizasyonunun incelendiği çalışmada; siyanürik klorür ve poliglutaraldehyt ile aktive olan partiküller p-nitrofenil- β -D-glikopiranozid substrat olarak kullanıldığında yüksek immobilize enzim aktivitesini vermiştir (104.7 ve 82.2 U/g partikül). Ayrıca, Megazyme marka kompleks enzimden saflaştırılmış β -glukosidaz ve Novozym 188 kompleks enzimlerinde β -glukosidaz enzim aktiviteleri (79.0 ve 9.8 U/g partikül) bulunmuştur. 65 °C sıcaklıkta 5 saat sonunda, immobilize edilmiş enzimde serbest enzime kıyasla; % 36 aktivite gözlemlenmiştir. Bu sonuç termal stabilitenin immobilizasyonla arttığını göstermiştir. Ön işlem görmüş ladinin enzimatik hidrolizinde immobilize ve serbest β -glukosidaz enzimi kullanılmıştır. Immobilize β -glukozidaz enziminden (16 U/g kuru madde) ve serbest kompleks (8 FPU/g kuru madde) eklenmesiyle ön işleme tabi tutulan ladinin hidroliz verimi, % 44 ile % 65 oranındadır. Ek olarak, ladinde immobilize β -glukosidazın tekrar kullanılabilirlik çalışması dört döngüde gerçekleştirilmiştir (Alfrén ve ark., 2013).

İmmobilizasyon yoluyla bir termostabil- β -glukosidaz enziminin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmada; nanopartiküller üzerine *Aspergillus niger* kaynaklı β -glukosidaz (BGL) kovalent bağlama ile immobilize edilmiştir. İmmobilizasyonla % 93 bağlanma görülmüştür. İmmobilize ve serbest BGL'nin optimum pH değerlerinin 6.0 ve 4.0 olmasına karşın, 60 °C sıcaklıkta, aynı sıcaklık optimizasyonu gösterdikleri belirtilmiştir. Michaelis-Menten sabiti (K_m) serbest BGL için 3.5 ve immobilize BGL için 4.3 mM bulunmuş ve İmmobilize enzimin termal stabilitesi 70 °C sıcaklıkta ölçülmüştür. İmmobilize nanopartikül-enzim konjugatı, 16. döngüye kadar % 50 oranında enzim aktivitesini muhafaza etmiştir. Sellobiyoz hidrolizinde maksimum glikoz verimine, immobilize BGL ile 16 saat sonunda ulaşılmıştır (Verma ve ark., 2013).

İki çeşit atık kağıt malzemesinin (gazete ve beyaz kağıt) kullanıldığı enzimatik hidrolizle fermente edilebilir şekerlerin elde edilmesine yönelik çalışmada; dört faktörün (hidroliz zamanı, enzim yüklemesi, yüzey aktif madde ilavesi ve fosforik asit ön-muamelesi) şeker verimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan istatistiksel deneysel tasarım, yaygın olarak kullanılan cevap yüzey yöntemidir. Gazete kağıdının hidrolizinde, açığa çıkan şeker miktarı, hidroliz zamanı ile orantılı olarak artış göstermiştir ancak enzim miktarının artırılması ve asit ön işlem parametrelerinin değiştirilmesiyle açığa çıkan şeker miktarından etkilenmemiştir. Beyaz kağıt için, dört faktörden üçü (hidroliz zamanı, enzim yükleme ve asit ön-muamelesi) açığa çıkan şeker miktarı üzerinde olumlu etkiler göstermiştir. Optimum koşullarda, beyaz kağıttan maksimum şeker verimi, 0.82 g indirgen şeker/g beyaz kağıt olarak ve bu oran gazete kağıdı için yaklaşık olarak 4,8 kat daha düşük bulunmuştur (Chu ve ark., 2013).

Enzimatik hidroliz işlemi için substrat olarak gazete kağıdının kullanıldığı çalışmada; yüksek lignin seviyesine sahip kağıt materyallerin enzimatik hidroliz yoluyla indirgen şekerlere dönüştürülmesinin zor olduğu bulunmuştur. Bu sorunu çözmek için, enzimatik hidroliz öncesi birkaç ön işlem yöntemi uygulanmıştır. İşlenmemiş gazeteye kıyasla, iyonik olmayan yüzey aktif madde (Tween 80) 2 ile 8 FPU enzim/g substrat ile % 10-16 oranında şeker dönüşümünü artırmıştır. 2, 4, 8 FPU enzim/g substrat şeker dönüşümü % 46.3, % 56.7 ve % 64.1 ile sonuçlanmıştır. Oksidatif (100 °C sıcaklıkta oksijen), alkali (160 °C sıcaklıkta NaOH) ve 160 °C sıcaklıkta Na_2CO_3 ve Na_2S ön işlemlerin şeker dönüşümüne etkisinin olmadığı ve şeker dönüşümünü azalttığı gözlemlenmiştir (Chen, 2014).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Panreac Applichem), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), HCl (Sigma Aldrich), NaOH (Merck, 1.06498), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) (AFG Scientific), metanol (Tekkim), gluteraldehit (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), NaH_2PO_4 (Merck), ticari enzim (Cellic® CTec3, Novozymes), glikoz (Merck), sitrik asit (Fisher Scientific), trisodyum sitrat (Scharlau), dinitrosalisilik asit (Sigma Aldrich), potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (Merck), Whatman No:1 filtre kağıdı, karboksimetil selüloz (Alfa Aesar), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Panreac Applichem), % 95'lik etanol (Sigma Aldrich), %85'lik fosforik asit (Tekkim), sığır serum albümin (BSA) (Sigma Aldrich), sülfürik asit (Merck), NaOH (Merck), 0.125 mikrometre kalitatif filtre kağıdı (S & H Labware).

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific), vakumlu kurutucu (Nüve EV 018), blender (Waring Commercial), analitik terazi (Radwag AS220.R2), santrifüj (Nüve NF 800), pH metre (Thermo Scintific), su banyoları (WiseBath ve Nüve ST 402), çalkalayıcı inkübatörler (Termal ve GFL).

Sentezlenen MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP karakterizasyonunu gerçekleştirmek için XRD, FTIR, Zeta Potansiyeli, EDX analizleri ve SEM görüntülerinin çekimi hizmet alımı yolu ile Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Manyetik Nanopartikül Sentezi

Manyetik nanopartikül sentezi (Gupta ve ark., 2013)'nın uygulamış olduğu analitik metotlardan faydalanılarak yapılmıştır.

Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller (MNP) Fe⁺³ ve Fe⁺² 2:1 molar derişimde kimyasal birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. 1 M FeCl₃.6H₂O ve 0,5 M FeSO₄.7H₂O tartılarak, 9 ml 0.4 M HCl içerisinde demir çözeltisi hazırlanmıştır.

90 mL 0,5 M NaOH çözeltisi, 80 °C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde azot ortamı ve etkin karıştırma eşliğinde 10 dakika bekletildikten sonra, demir çözeltisi damla damla eklenmiştir. 30 dakika boyunca etkin karıştırma işlemi devam ettirilmiştir (Gupta ve ark., 2013).

Sentezlenen Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller, mıknatıs yardımıyla ayrılmış ve pH 7 olana kadar distile su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkanan Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller 50 ml %95'lik etanol ile tamamlanmıştır. Sentezlenen MNP'nin demir derişimi stokiometrik olarak yaklaşık 30 mg/ml'dir.

2.2.2. APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) İle MNP Yüzeyinin Silisyum Kaplama İşlemi

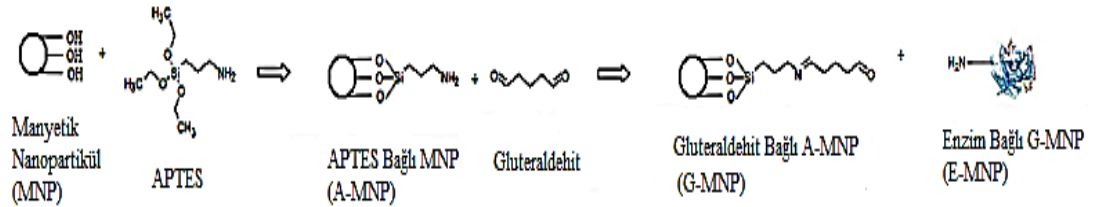
50 ml MNP çözeltisinin üzerini silisyum kaplamak için, 500 ml'lik erlen içerisine 90 ml metanol ve farklı konsantrasyonlarda APTES eklenip, hazırlanan karışım, çalkalamalı inkübatörde 50 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında 12 saat boyunca tutulmuştur. Elde edilen APTES bağlı MNP'ler (A-MNP) mıknatıs yardımıyla ayrılarak sıvı kısmı uzaklaştırılmış ve 2 kez distile su ile yıkanmıştır (Gupta ve ark., 2013).

2.2.3. Gluteraldehit İle MNP'nin Aktifleştirilmesi

(A-MNP) çözeltisi 5 mM pH 7 fosfat tamponuyla 50 ml'ye tamamlanıp, üzerine farklı konsantrasyonlarda gluteraldehit eklenerek 37 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında 4 saat boyunca tutulmuştur. Gluteraldehit bağlanan (A-MNP)'ler (G-MNP) mıknatıs yardımıyla ayrılarak, süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve ardından 8 kez distile su ile yıkanmıştır. 5 mM pH 7 fosfat tamponuyla 50 ml'ye tamamlanarak G-MNP'ler hazırlanmıştır (Gupta ve ark., 2013).

2.2.4. G-MNP'lere Enzim İmmobilizasyonu Aşaması

250 ml'lik erlen içerisinde, 50 ml G-MNP'ye 25 ml 5 mM pH 4,8 sitrat tamponu ile 100 kat seyreltilmiş selüloz enzim kompleksi eklenerek, 5 mM pH 4,8 sitrat tamponuyla toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan enzim çözeltisi, 4 °C sıcaklık ve 400 rpm karıştırma hızında 15 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. 15 saat sonunda, enzim bağlı nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ayrılarak, süpernatant kısmı bağlanmayan enzim miktarının belirlenmesi için protein tayininde kullanılmıştır. Daha sonra 2 kez 5 mM pH 4,8 sitrat tamponuyla yıkanarak, son hacim 50 ml'ye 5 mM pH 4,8 sitrat tamponu ile tamamlanıp, enzim bağlı MNP'ler (E-MNP) elde edilmiştir. Şekil 2.1'de MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'nin oluşumunda izlenen yol gösterilmiştir.



Şekil 2.1. MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'nin oluşumunda izlenen yol (Gupta ve ark., 2013).

2.2.5. Protein Tayini

Protein miktarlarının tayini (Bradford, 1976) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılarak, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturması esas alınmaktadır.

Bradford Reaktifi; 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml % 95'lik etanolde çözülerek, çözeltiye 55 ml % 85'lik fosforik asit eklenmiş ve hacmi distile suyla 1 litreye tamamlanmıştır.

Standart Protein Eğrisi; sığır serum albümin (BSA) ve distile su kullanılarak 1 mg/ml'lik stok protein çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok protein çözeltisinden 0,02, 0,05, 0,08, 0,11, 0,14, 0,17, 0,2 mg/ml'lik protein standart çözeltileri hazırlanmış ve her bir protein standart çözeltisinden 0,2 ml alınarak üzerlerine 2 ml Bradford reaktifi eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 20 dakika bekletilmesinin ardından 595 nm'de

spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbens değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturulmuştur.

Bağlanmayan enzim miktarının belirlenmesinde, enzim bağlanma aşaması sonunda ayrılan süpernatant ile protein tayini yapılarak bağlanan enzim miktarı hesaplanmıştır.

2.2.6. Toplam Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin toplam aktivite tayini için filtre kağıdı aktivite ölçüm yöntemi (Ghose, 1987) kullanılmıştır. Enzim örneklerinin aktivite tayini için, 50 mg Whatman no:1 filtre kağıdı eşit büyüklükte parçalara ayrılarak cam tüp içerisine eklenmiş ve üzerleri 1 ml 5 mM pH: 4,8 sitrat tamponu ile tamamlanmıştır. Enzim kontrol gruplarına da 1 ml 5 mM pH: 4,8 sitrat tamponu eklenerek 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra 0,5 ml serbest ve immobilize enzim, içerisinde filtre kağıdı bulunan cam tüpler ve enzim kontrol gruplarına eklenmiştir. Tüm tüpler ve kör olarak kullanılacak olan 1.5 ml 5 mM ph: 4.8 sitrat tamponu, 50 °C'deki su banyosunda 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası serbest enzimlere, immobilize enzimlerin mıknatısla ayrıldıktan sonra kalan reaksiyon sıvılarına, enzim kontrol gruplarına ve köre 1.5 ml DNS (Dinitrosalisilik asit) eklenerek enzim aktivitesi durdurulmuştur. Tüm örnekler ve kör 5 dakika kaynatıldıktan sonra buza alınmıştır. Daha sonra 540 nm'de köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Ghose, 1987).

2.2.7. Karboksimetil Selüloz (CMC) Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin aktivite ölçümleri için karboksimetil Selüloz (CMC) aktivite ölçüm yöntemi (Ghose, 1987) kullanılmıştır. Enzim örneklerinin CMC aktivite tayini için, 5 mM ph: 4,8 sitrat tamponu ile % 2'lik (w/v) CMC çözeltisi hazırlanarak, 37°C sıcaklıkta, 150 rpm karıştırma hızında 12 saat boyunca karıştırılarak CMC tam olarak çözölmüştür. Enzim örnekleri için cam tüplerin içerisine 0,5 ml CMC çözeltisi eklenerek ve 5 dk 70 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Enzim örneklerine ve enzim örneklerinin körlerine 0,5 ml serbest ve immobilize enzimler eklenmiştir. Tüm tüpler ve genel kör olarak kullanılacak olan 1 ml 5 mM ph: 4,8 sitrat tamponu, 30 dk inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası, enzim örneklerinin körlerine 0,5 ml CMC çözeltisi eklenmiştir. Serbest enzimlere, immobilize enzimlerin mıknatısla ayrıldıktan sonra kalan reaksiyon

sıvılarına, enzim örneklerinin körlerine 1,5 ml DNS (Dinitrosalisilik asit) eklenerek enzim aktivitesi durdurulmuştur. Tüm örnekler ve körler 5 dk kaynatıldıktan sonra buza alınmıştır. Daha sonra 540 nm’de köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri glikoz standart eğrisinden faydalanılarak glikoz değerlerine dönüştürülmüştür.

2.2.8. İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyon Çalışmaları

APTES, gluteraldehit ve immobilize edilecek enzim miktarı optimizasyonu için 34, 67, 111, 167 mg/ml gluteraldehit kullanılarak, bağlanan ve kontrol grubu olarak gluteraldehit bağlanmayan manyetik nanopartiküllere selüloz enzimi immobilize edilmiş ve optimum gluteraldehit miktarında, 0,141, 0,283, 0,567, 0,851, 1,419 mg/ml APTES kullanılarak silisyum kaplanan ve kontrol grubu olarak APTES ile silisyum kaplanmayan manyetik nanopartiküllere 0,026, 0,053, 0,079 mg/ml protein olacak şekilde selüloz enzim kompleksi immobilize edilerek optimum APTES miktarı ve immobilize edilmesi gereken enzim miktarı belirlenmiştir.

2.2.9. İmmobilize ve Serbest Enzim Optimizasyon Çalışmaları

Sıcaklık Optimizasyonu Çalışmaları

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için, serbest ve immobilize selüloz enzimleri, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta inkübe edilerek aktivite ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir. Selüloz enzimine ait ünite değerleri aşağıdaki Denklem 2.1 ile hesaplanmaktadır ((Khoshnevisan ve ark., 2011).

$$\text{Ünite (U)} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml.dk}} \quad (2.1)$$

Ünite değerleri hesaplanan örneklere ait % Bağlı Aktivite değerleri aşağıdaki Denklem 2.2 ile hesaplanmaktadır.

$$\% \text{ Bağlı Aktivite} = \frac{\text{Örneklerin ünite değerleri}}{\text{Örneklere ait en yüksek ünite değeri}} \cdot 100 \quad (2.2)$$

pH Optimizasyonu Çalışmaları

Optimum pH değerinin belirlenmesi için, serbest ve immobilize selüloz enzimleri, 4, 4,5, 4,8 ve 5 pH değerindeki sitrat tamponu, 5,5, 6 ve 7 pH değerindeki sodyum-fosfat tamponlarıyla hazırlanan % 2'lik (w/v) CMC çözeltileriyle ve yine bu tamponların kör olarak kullanılmasıyla optimum sıcaklık değerinde aktivite ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.10. Sıcaklık Stabilitesi Çalışmaları

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için, serbest ve immobilize selüloz enzimleri 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her saat örnek alınarak aktivite ölçümü yapılmış ve 5 saatin sonunda kalan enzim aktivitesi değerleri belirlenmiştir.

2.2.11. Substrat Derişimi Etkisi Çalışmaları

Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin kinetik parametrelerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesi için farklı substrat derişimlerdeki aktivitelerinin ölçülmesi ile gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 5 mM ph:4,8 sitrat tamponu kullanılarak, 2,5-15 mg/ml arasındaki farklı konsantrasyonlarda CMC çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler kullanılarak aktivite ölçümü gerçekleştirilerek kinetik parametreler belirlenmiştir.

Enzim aktivitesi düzenlenebilir, yani enzimler ürün oluşum hızı ve hücrenin ihtiyacını karşılayacak şekilde aktive veya inhibe edilebilirler. 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, bir model geliştirdiler. Bu modelde, enzim substratıyla geri dönüşümlü olarak bağlanarak sonradan enzimi serbest olarak bırakarak ürüne yıkılan bir ES kompleksi meydana getirir. Bir substrat molekülünü kapsayan model aşağıdaki Denklem 2.3'de gösterilmiştir (Güller, 2014).



E: Enzim, S: Substrat, ES: Enzim-Substrat kompleksi, P: Ürün, k_1 , k_2 , k_3 : hız sabitleri.

Aşağıda Denklem 2.4'de gösterilen Michaelis-Menten denklemi reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuyla nasıl değiştiğini göstermektedir (Güller, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.4)$$

V_0 = ilk hız, V_{max} = maksimum hız, K_m = Michealis-Menten sabiti, $(k_2+k_3)/k_1$, $[S]$ = substrat konsantrasyonu.

Enzimlerin K_m değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. K_m değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_m değeri vardır. Yüksek K_m zayıf bağlanmayı, düşük bir K_m kuvvetli bağlanmayı ifade eder (Güller, 2014).

V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. V_{max} teriminin birimi, ürüne çevrilen substratın mol sayısı/birim zaman'dır. Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Aynı zamanda substratların yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler. Michealis-Menten denkleminin lineerleştirilmesi sonucu, $1/V$ 'ye $1/[S]$ grafiğinin çizilmesiyle Lineweaver-Burk grafiği elde edilir. Lineweaver-Burk grafiğinde eğim değeri K_m/V_{max} 'ı, kayma değeri ise $1/V_{max}$ değerini belirtir. (Güller, 2014).

2.2.12. İmmobilize ve Serbest Enzim Depolama Stabilitesi Çalışmaları

Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin depolama stabilitesi ölçümü için, 5 mM pH:4,8 sitrat tamponu ile 2000 kat seyreltilmiş serbest enzim ve 400 kat seyreltilmiş immobilize enzim 4°C sıcaklıkta 20 gün boyunca bekletilmiş ve belirli zaman aralıklarında aktivite ölçümü gerçekleştirilerek enzim stabilitesindeki değişim belirlenmiştir.

2.2.13. İmmobilize Enzim İçin Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması

E-MNP'nin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi amacıyla % 2'lik (w/v) CMC çözeltisi substrat olarak kullanılarak aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Döngü süresi 30 dakika olarak belirlenmiş ve her döngü sonrası E-MNP'ler 2 kez 1 ml 5 mM pH: 4,8 sitrat tamponu ile yıkanarak açığa çıkan glikoz uzaklaştırılmıştır.

2.2.14. Manyetik Nanopartikül Karakterizasyonu

SEM ve EDX Analizi

Sentezlenen MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'lerin SEM fotoğraflarının çekilebilmesi ve X-ışını analizinin yapılabilmesi için partiküller 40°C sıcaklıkta vakumlu kurutucuda 2 saat boyunca kurutulup ardından havanda öğütülmüştür. Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yüzey şekil ve yapısını değerlendirmek amacıyla Zeiss EVO MA10 SEM cihazı kullanılarak fotoğrafları çekilmiş ve EDX analizleri yapılmıştır.

FTIR Analizi

Sentezlenen MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'lerin FTIR spektrumu, Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda Thermo Scientific Nicolet iS5 FTIR spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler, KBr ile homojen olarak karıştırılarak pellet haline getirilip, FTIR spektrumları alınmıştır.

Tanecik Boyutu Analizi

Sentezlenen MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'lerin tanecik boyutu analizleri Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda Particle Sizing Systems, Inc. Santa Barbara, Calif., USA ZPW 388 tanecik boyut analizi cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

2.2.15. Atık Kağıt Hidroliz Çalışmaları

Fiziksel Ön işlemler

Atık gazete kağıtlarının enzimatik hidrolizi öncesi serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin kağıdın yapısında bulunan selüloza rahat ulaşım hidroliz edebilmeleri amacıyla bazı ön işlem yöntemleri uygulanmıştır.

Kimyasal ön işlemler öncesi atık gazete kağıtlarının yüzey alanının artırılması amacıyla % 15 (v/w) oranında distile su ile ıslatılarak blenderda öğütülmüştür.

Kimyasal Ön İşlemler

Asidik Ön İşlemler

Kağıt yapısında bulunan hemiselülozun uzaklaştırılması amacıyla, fiziksel ön işlem görmüş atık gazete kağıdı 200 ml % 0,25'lik (v/v) fosforik asit çözeltisi ile tamamlanmış ve 70 °C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızında çalkalayıcı inkübatörde karıştırılarak, 2 saat boyunca asidik ön işlem uygulanmıştır. Bu süre sonunda ön işlem gören atık kağıtlar kalitatif filtre kağıdıyla filtre edilmiştir (Brummer ve ark., 2014).

Alkali Ön İşlemler

Lignoselülozik bir materyal olan kağıdın yapısının esnetilmesi amacıyla asidik ön işlem görmüş atık gazete kağıdı 200 ml % 2'lik (v/v) NaOH çözeltisi ile tamamlanmış ve 70°C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızında çalkalayıcı inkübatörde karıştırılarak 1 saat boyunca alkali ön işlem uygulanmıştır. Bu süre sonunda ön işlemi tamamlanan atık kağıtlar kalitatif filtre kağıdıyla filtre edilmiş ve 5 mM ph: 4,8 sitrat tamponu ile nötr pH elde edilene kadar yıkama işlemi yapılmıştır. 80°C sıcaklıkta 1 saat boyunca kurutulduktan sonra belenderle öğütme işlemi yapılmıştır (Brummer ve ark., 2014).

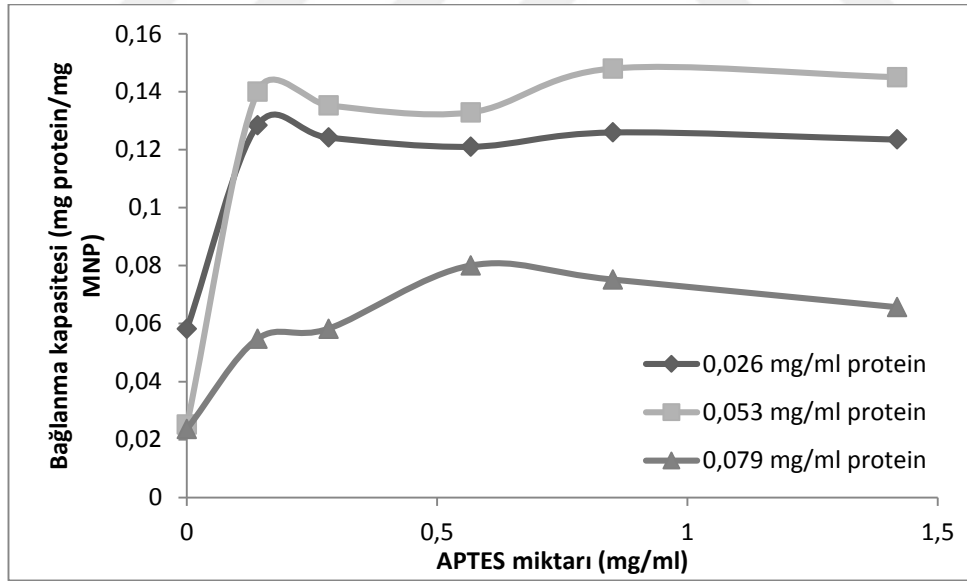
Enzimatik Hidroliz

Fiziksel ve kimyasal ön işlem gören atık gazete kağıtlarından 0,25 g ve 0,5 g tartılarak erlen içerisine alınmış ve üzerine 10 FPU serbest ve immobilize selüloz enzimi eklenerek son hacim 5 mM ph: 4,8 sitrat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 72 saat boyunca enzimatik hidroliz işlemi devam ettirilmiş ve belirli zaman aralıklarında numune alınarak DNS yöntemiyle toplam indirgen şeker tayini gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. APTES ve Gluteraldehit miktarının etkisi

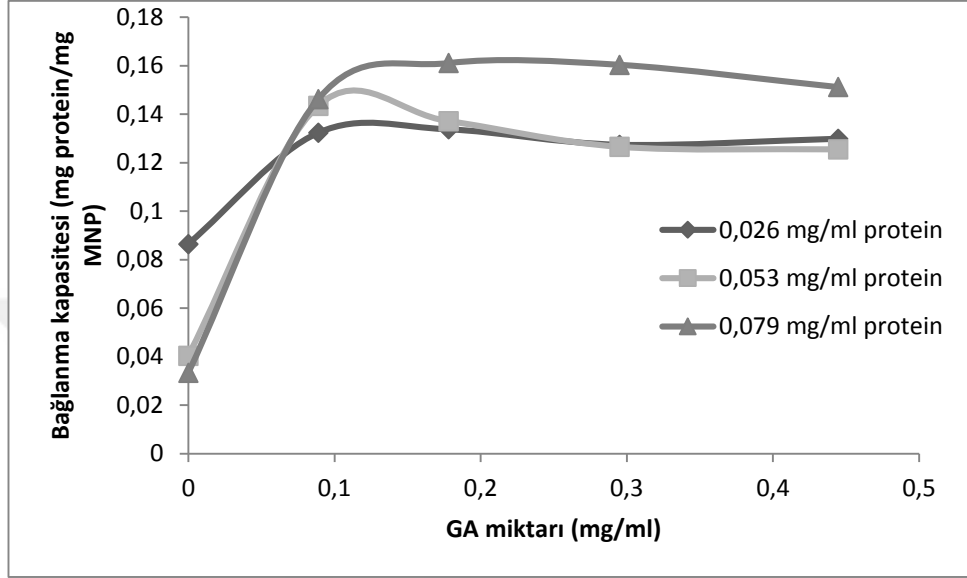
Birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenen manyetik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu amacıyla APTES ve yüzey aktifleştirme amacıyla gluteraldehitle muamele edilmiştir. Bu amaçla sentezlenen MNP'ler ilk olarak farklı konsantrasyonlarda APTES ile muamele edilmiştir. Protein bağlama kapasitesine APTES miktarının etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda protein içeren enzim çözeltisi ile 15 saat süreyle immobilize edilmiştir. Şekil 3.1'de APTES miktarının enzim bağlanmasına etkisi görülmektedir. 0,053 mg/ml protein içeren ortamda en yüksek bağlanma oranı gelde edilmiştir. Tüm protein konsantrasyonlarında yapılan denemelerde APTES miktarının 0,141 mg/ml değerinden sonra önemli bir değişim olmadığı görülmektedir. Daha sonraki modifikasyon işlemlerinde APTES miktarı 0,141 mg/ml olarak seçilmiştir.



Şekil 3.1. MNP yüzey kaplama işleminde kullanılan APTES miktarı ve immobilize edilen enzim miktarıyla bağlanma kapasitesinin değişimi (0,178 mg/ml gluteraldehit, İnkübasyon sıcaklığı: 4 °C, İnkübasyon süresi:15 saat)

APTES'in manyetik nanopartiküllerin yüzey oksidasyonu ve ortamdaki pH değişimlerinden koruyup, magnetitin maghemit formuna dönüşmesini engelleme gibi özellikleri bulunmaktadır (Gupta ve ark., 2013).

APTES ile kaplanmış MNP (A-MNP) yüzeyine enzimin kovalent bağlanmasını sağlamak amacıyla gluteraldehit ile muamele edilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda gluteraldehit miktarı ve enzim konsantrasyonlarının enzim bağlanma kapasitesine etkisi Şekil 3.2’de görülmektedir.

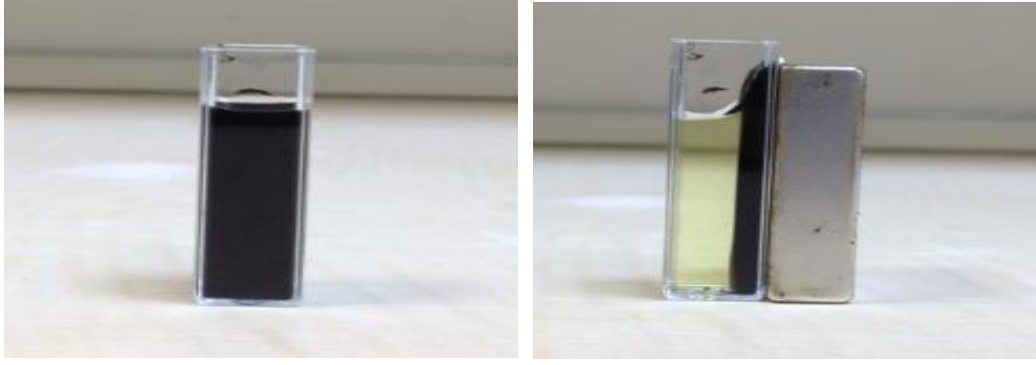


Şekil 3.2. Gluteraldehit ve immobilize edilen enzim miktarıyla bağlanma kapasitesinin değişimi (0,141 mg/ml APTES, İnkübasyon sıcaklığı: 4 °C, İnkübasyon süresi: 15 saat)

APTES’nin enzim bağlanmasına etkisine benzer olarak gluteraldehit miktarında da en yüksek enzim bağlanma 0,053 mg/ml protein içeren enzim kompleksi ortamında elde edilmiştir. 0,178 mg/ml gluteraldehit içeren ortamda gluteraldehi içermeyen ortama göre bağlanma oranında önemli bir artış görülmekle birlikte bu değerden sonra önemli bir değişim görülmemektedir.

50 mg MNP için farklı konsantrasyonlarda karbodiimid ile aktifleştirilme işlemi yapılan çalışmada, 0-18 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda protein içeren selüloz enzim kompleksi immobilizasyonu incelenen çalışma sonucunda, bağlanma oranlarının artan protein miktarıyla azaldığı ifade edilmektedir (Jordan ve ark., 2011).

Modifiye edilen E-MNP’nin mıknatısla ayrıldıktan sonraki görüntüsü Şekil 3.3’de gösterilmiştir. İşlem sonrasında manyetik yapının korunduğu ve reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilirdiği görülmektedir.

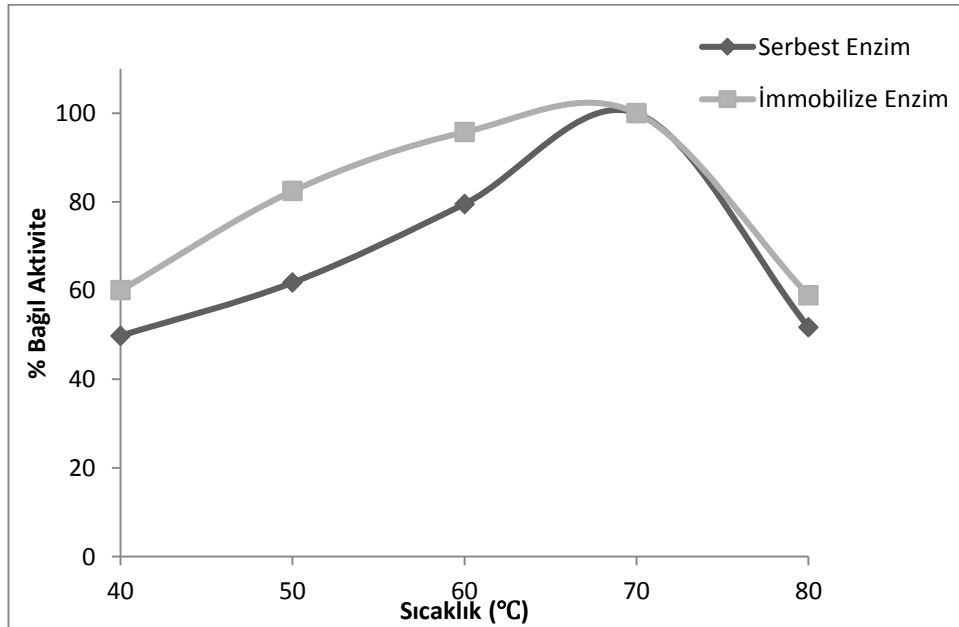


Şekil 3.3. MNP'nin mıknatısla ayrılmadan önce ve ayrıldıktan sonraki görüntüsü

3.2. İmmobilize ve Serbest Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize selüloz enzimleri, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta aktivite ölçümleri yapılarak en yüksek aktivite gösteren sıcaklık değeri belirlenmiştir. Hem serbest hem de immobilize selüloz enzimleri için optimum aktivitenin olduğu sıcaklık 70 °C olarak belirlenmiştir. Şekil 3.4'de serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin farklı sıcaklıklardaki % Bağlı Aktivite değerleri gösterilmiştir.



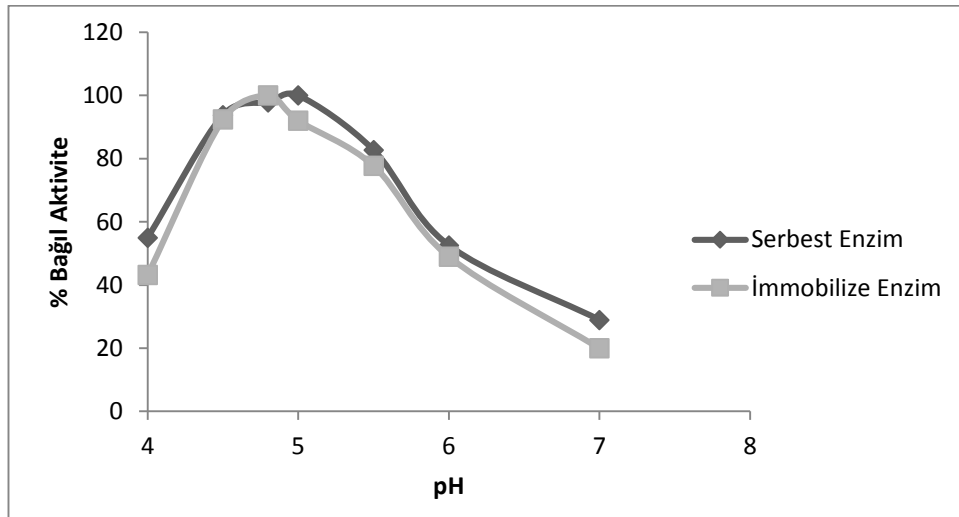
Şekil 3.4. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin farklı sıcaklıklardaki % Bağlı Aktivite değerleri (İnkübasyon süresi: 30 dakika, Substrat konsantrasyonu: pH: 4,8 sitrat tamponu ile hazırlanan % 2 (w/v) CMC çözeltisi)

Aynı miktarda serbest ve immobilize β -glukozidaz enzimleri ile 40-70 °C arasında değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilen sıcaklık optimizasyonu çalışmasında 60 °C serbest ve immobilize selülaz enzimleri için optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık olarak belirlenmiştir (Werma ve ark., 2013).

Sıcaklık artışıyla enzime ait proteinlerin denatürasyon hızında artış ve proteinlerde fiziksel modifikasyonlar meydana gelmektedir. Enzim immobilizasyonu ile enzimlerin termal özelliklerinde değişiklikler olabilmektedir. Ancak bu çalışmada serbest ve immobilize selülaz enzimlerinin sıcaklık stabilizasyonunda önemli bir farklılık belirlenmemiştir.

Optimum pH değerinin belirlenmesi alışmaları

Optimum pH değerinin belirlenmesi için, serbest ve immobilize edilen selülaz enzimleri, 4, 4,5, 4,8, 5, 5,5, 6 ve 7 pH değerindeki farklı tamponlarla ve optimum sıcaklık değerinde yapılan aktivite ölçüm işlemleri sonucunda serbest selülaz enzimi için optimum pH değeri 5, immobilize selülaz enzimi için ise 4,8 olarak belirlenmiştir. şekil 3.5’de serbest ve immobilize selülaz enzimlerinin farklı pH değerlerindeki % Bağıl Aktivite değerleri gösterilmiştir.



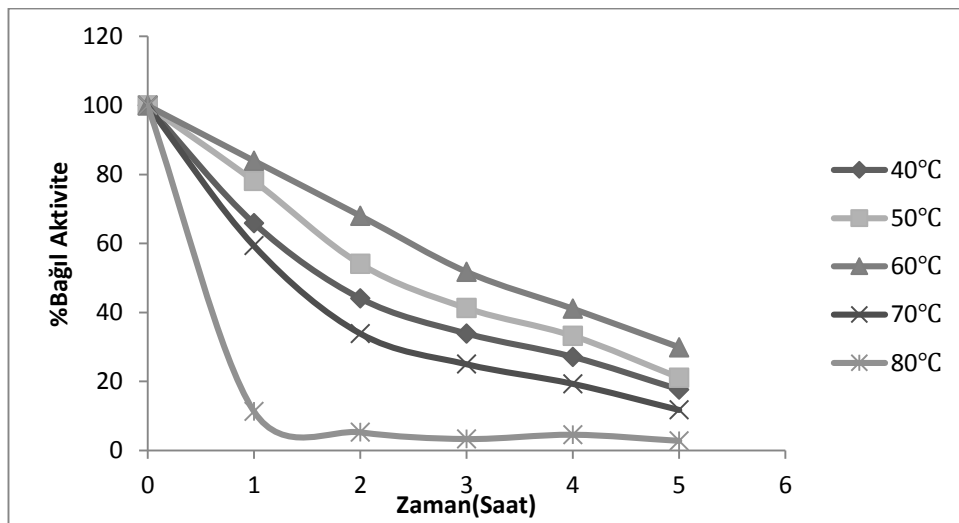
şekil 3.5. Serbest ve immobilize selülaz enzimlerinin farklı pH değerlerindeki % bağıl aktivite değerleri (İnkübasyon sıcaklığı: 70 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika, Substrat konsantrasyonu: pH: 4-7 aralığında değişen tampon çözeltilerle hazırlanan % 2 (w/v) CMC özeltilisi)

Aynı miktarda serbest ve immobilize selüloz enzimleri ile 4-8 arasında değişen pH değerlerinde ve 50 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen pH optimizasyonu çalışmasında, serbest selüloz enzimi için pH: 5 ve immobilize selüloz enzimi için ise pH: 4, optimum aktivite gösterdiği pH değeri olarak belirlenmiştir (Jordan ve ark., 2011).

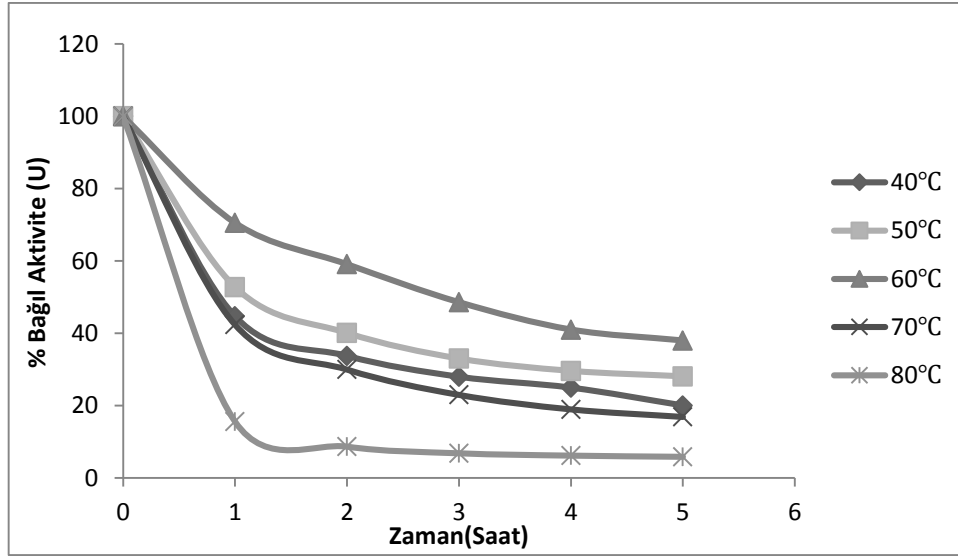
Serbest ve immobilize edilen selüloz enzimleri için bulunan optimum pH değerlerinin birbirine yakın olması sonucunda enzimin immobilize edilmesiyle enzimin karakterinde değişimin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bulunan değerler, literatürde yapılan çalışmalarda bulunan sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

3.3. Sıcaklık Stabilitesi Çalışmalarına Ait Bulgular

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için, serbest ve immobilize edilen selüloz enzimleri 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her saat örnek alınıp aktivite ölçümü yapılması sonucunda 5 saatin sonunda kalan enzim aktivitesi değerleri belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre serbest selüloz enziminin kalan aktivite değeri en yüksek 60 °C sıcaklıkta % 29,9, immobilize selüloz enziminin kalan aktivite değeri ise yine 60 °C sıcaklıkta % 38 olarak belirlenmiştir. Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin sıcaklık stabilitelerinin % Bağlı Aktivite olarak değişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Serbest selüloz enziminin farklı sıcaklıklardaki stabilitesinin % bağlı aktivite olarak değişimi



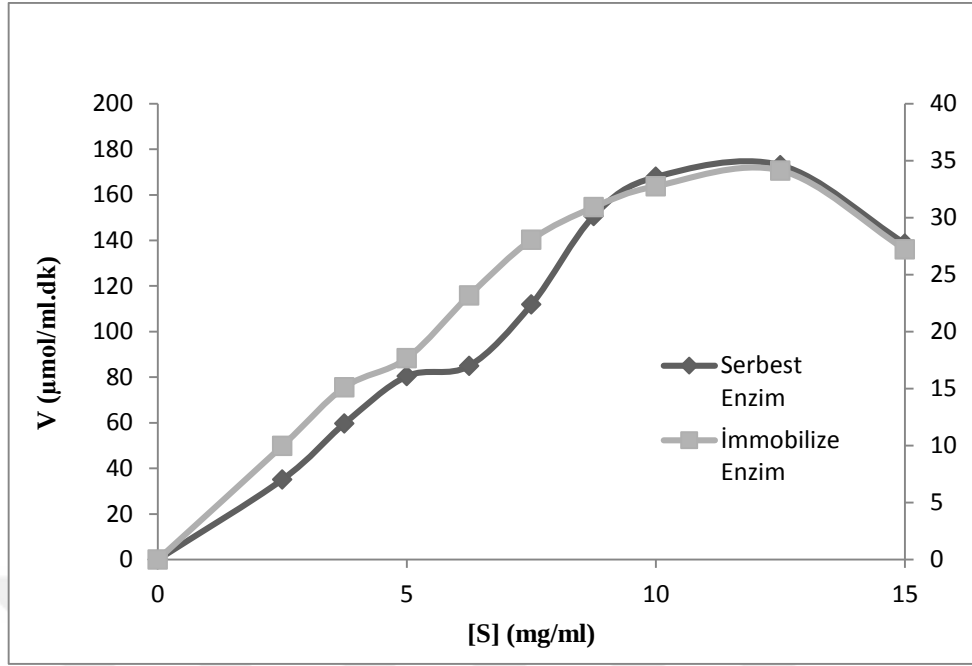
Şekil 3.7. İmmobilize selüloz enziminin farklı sıcaklıklardaki stabilitesinin % Bağlı Aktivite olarak değişimi

Serbest enzimlerde zayıf intramoleküler güçlerin ve protein zincirinin bozulması termal deaktivasyon ile meydana gelmektedir. İmmobilizasyon ile zayıf iyonik bağları ve hidrojen bağlarının stabilize olması sağlanarak termal kararlılık artırılabilir (Jordan ve ark., 2011).

Serbest ve immobilize lipazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisinin incelendiği çalışmada, 40 ve 60 °C’de 24 saat süre boyunca ısıyla muamele edildikten sonra serbest lipaz enziminin başlangıç aktivitesinin 24 saat inkübasyon süresi sonunda 40 ve 60°C’de başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 49 ve % 39’unu koruduğu ve immobilize lipaz enziminin 40 ve 60°C’de başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 50 ve % 67’sini koruduğu belirlenmiştir (Şengül, 2013). İmmobilize selüloz enziminin termal kararlılığını serbestte göre daha fazla koruduğu bu çalışmada da görülmektedir.

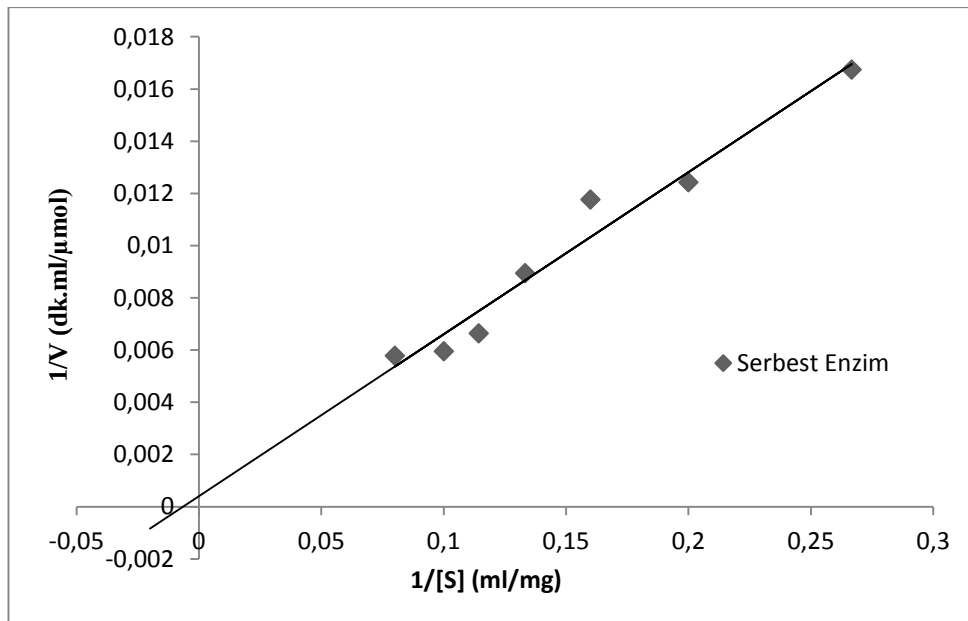
3.4. Substrat Değişimi Etkisi Çalışmalarına Ait Bulgular

Serbest ve immobilize edilen selüloz enzimlerinin kinetik parametrelerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesi için farklı substrat değişimlerdeki aktivitelerinin ölçüm sonuçlarına göre Şekil 3.8’de serbest ve immobilize edilen selüloz enzimi için Michaelis-Menten eğrisi, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’da sırasıyla serbest ve immobilize edilen selüloz enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri gösterilmiştir.

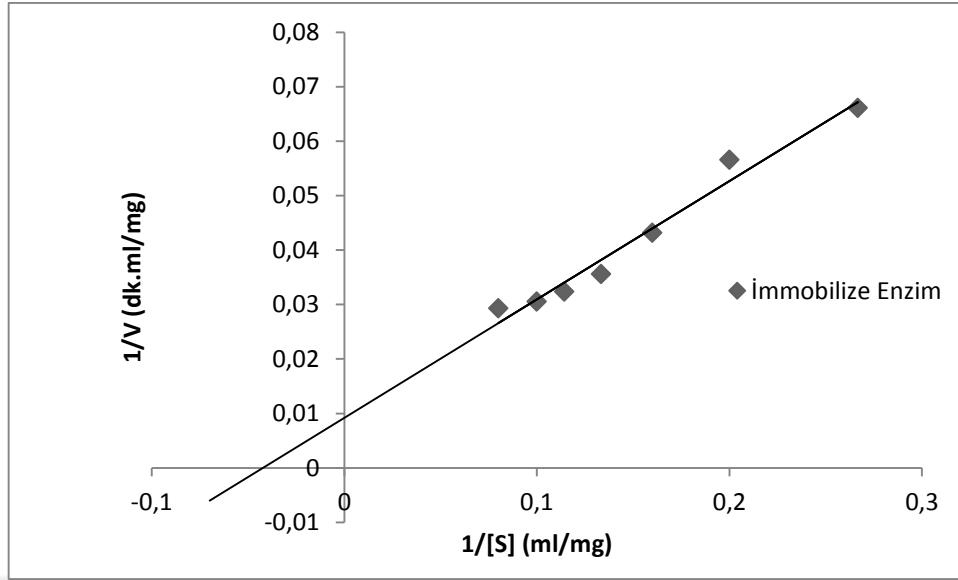


Şekil 3.8. Serbest ve immobilize selüloz enzimi için Michaelis-Menten eğrisi (İnkübasyon sıcaklığı: 70 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika)

Serbest ve immobilize selüloz enzimi için çizilen Michaelis-Menten eğrisi verilerine göre 12,5 mg/ml substrat konsantrasyonundan daha yüksek değerlerde inhibisyon meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 3.9. Serbest selüloz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği (İnkübasyon sıcaklığı: 70 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika)



Şekil 3.10. İmmobilize edilen selülag enzimi için Lineweaver-Burk grafiği (İnkübasyon sıcaklığı: 70 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika)

V_{max} , enzimin substratına doyduğu andaki en yüksek hız olarak tanımlanmaktadır. K_m sabiti, enzimin substrata olan ilgisini gösterir ve immobilizasyon sonrasında K_m 'de bir artış görülmesi beklenmektedir (Alpay, 2014).

Bu çalışmada serbest ve immobilize selülag enzimi için K_m değerleri sırasıyla 155,25 mg/ml ve 23,64 mg/ml, V_{max} değerleri ise sırasıyla 2500 $\mu\text{mol/ml.dk}$ ve 108,69 $\mu\text{mol/ml.dk}$ olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin K_m ve V_{max} değerinde düşme olduğu görülmektedir. Tablo 3.1'de serbest ve immobilize selülag enzimlerine ait kinetik parametreler tablo halinde gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Serbest ve immobilize selülag enzimlerinin kinetik parametreleri

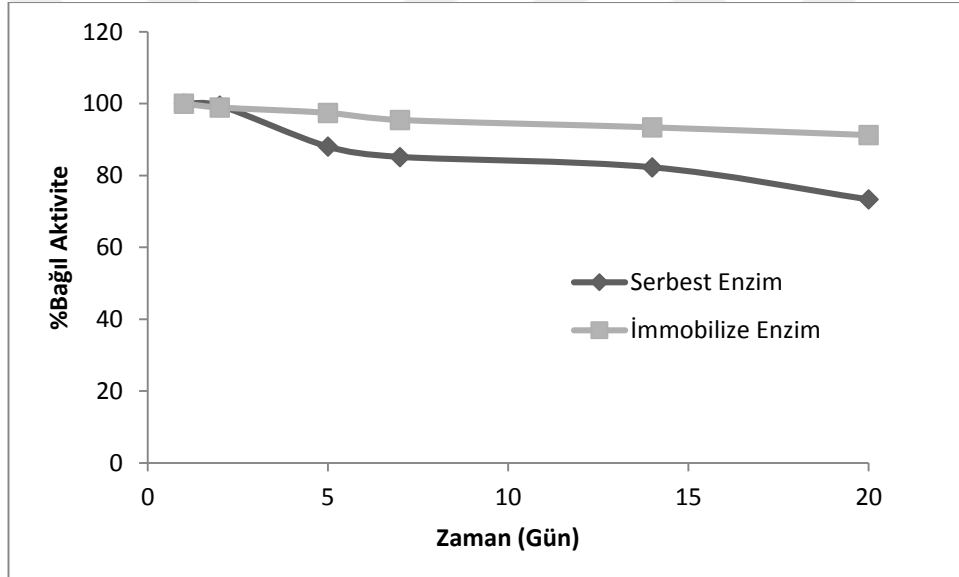
	K_m (mg/ml)	V_{max} ($\mu\text{mol/ml.dk}$)
Serbest selülag enzimi	155,25	2500
İmmobilize selülag enzimi	23,64	108,69

Serbest ve immobilize papain enziminin K_m değerleri sırasıyla 4,815 mg/ml ve 3,425 mg/ml, V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,046 $\mu\text{mol/ml.dk}$ ve 0,037 $\mu\text{mol/ml.dk}$ olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin K_m ve V_{max} değerindeki düşme olduğu belirlenmiştir (Alpay, 2014).

İmmobilizasyon sonrasında K_m 'de bir artış görülmesi beklenilmesine rağmen, azalma meydana gelmesi immobilize selüloz enziminin substrata olan ilgisinin arttığını göstermektedir.

3.5. İmmobilize ve Serbest Enzim Depolama Stabilitesi Çalışmaları İle İlgili Bulgular

Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin depolama stabilitesi 4°C sıcaklıkta 20 gün boyunca takip edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında aktivite ölçümleri sonucunda enzim stabilitesindeki değişim, Şekil 3.11'de görülmektedir.



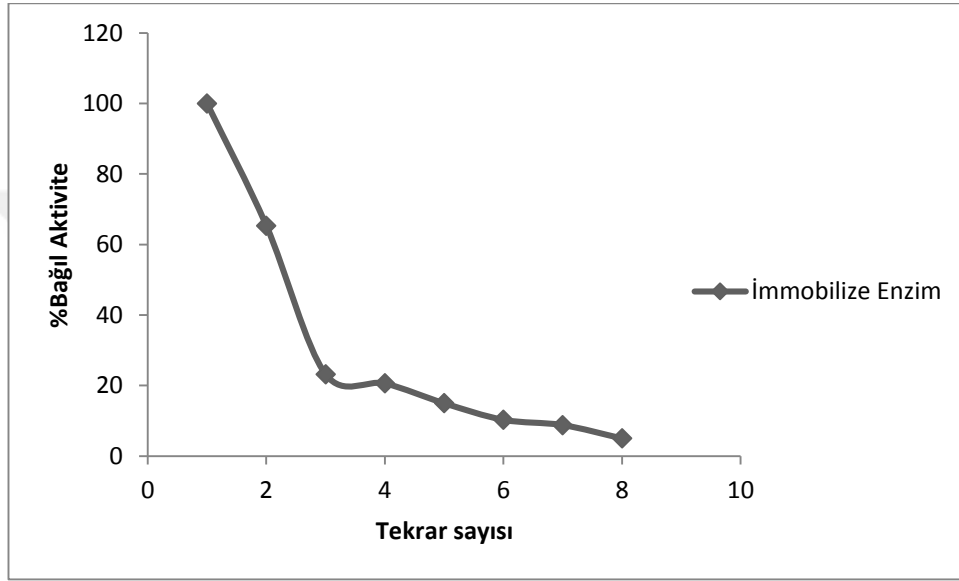
Şekil 3.11. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin depolama stabilitelerinin % bağıl aktivite olarak değişimi (İnkübasyon sıcaklığı: 70 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika, Substrat konsantrasyonu: pH: 4,8 sitrat tamponu ile hazırlanan % 2 (w/v) CMC çözeltisi)

20 günün sonunda serbest enzimin aktivitesini % 73.3 oranında koruduğu görülürken, İmmobilize selüloz enziminin ise % 91.2 oranında aktivitesini koruduğu görülmüştür. Bu sonuçlar immobilize enzimin kararlılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Literatürde yapılmış olan bir çalışmada, serbest ve immobilize selüloz enzim kompleksinin depo kararlılığı 21 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak gözlemlenmiş ve 21 gün sonunda immobilize selüloz enziminin serbest selüloz enzimine kıyasla zamana bağlı olarak kararlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür (Xu ve ark., 2011).

3.6. İmmobilize Enzim İçin Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması İle İlgili Bulgular

İmmobilize selüloz enziminin (E-MNP) tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi amacıyla 8 döngü boyunca optimum şartlarda aktivite ölçümü yapılmış ve deney sonucu Şekil 3.12’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi ilk döngü sonunda % 65,36 oranında ve 8. döngü itibariyle % 5,02 enzimin aktivitesini koruduğu görülmüştür.



Şekil 3.12. İmmobilize edilen selüloz enziminin tekrar kullanılabilirliğinin gösterimi (İnkübasyon sıcaklığı: 70 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika, Substrat konsantrasyonu: pH: 4-7 aralığında değişen tampon çözeltilerle hazırlanan % 2 (w/v) CMC çözeltisi)

İmmobilize selüloz enziminin tekrar kullanılabilirliğinin 6 döngü boyunca incelendiği çalışmada, ilk döngü sonrasında % 47,5 oranında aktivite kaybının meydana geldiği ve 6. döngü sonunda %10 oranında aktivitenin korunduğu belirtilenmiştir. Enzim aktivitesindeki düşmenin sebebi olarak protein denatürasyonu, son ürün inhibisyonu ve selüloz enzim kompleksine ait birden fazla bileşenin kaybı gösterilmektedir. Olası bir başka sebebin ise destek materyalinin karbodiimid ile aktivasyonu ile bağlanan enzimlerin modifikasyonunda oluşabilecek değişiklikler olabileceği belirtilmektedir (Jordan ve ark., 2011).

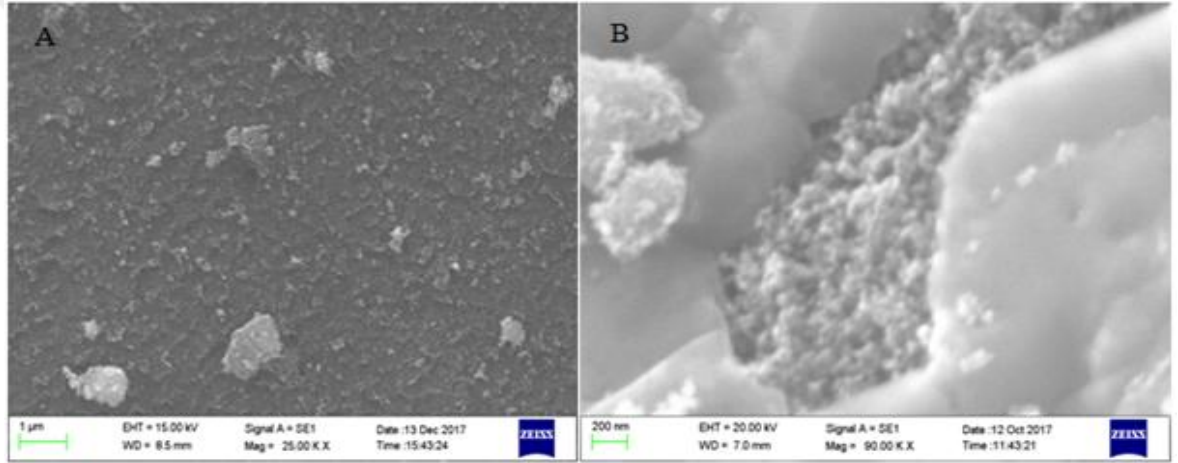
Bu çalışmada, yukarıda belirtilen bu sebeplere ilave olarak, inkübasyon sıcaklığının 70 °C gibi yüksek bir sıcaklık olması nedeniyle protein denatürasyonunun hızlı olduğu ve bunun sonucunda tekrar kullanım sayısının ve döngüler sonunda kalan aktivite oranının az olduğu söylenebilir.

3.7. Manyetik Nanopartikül Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

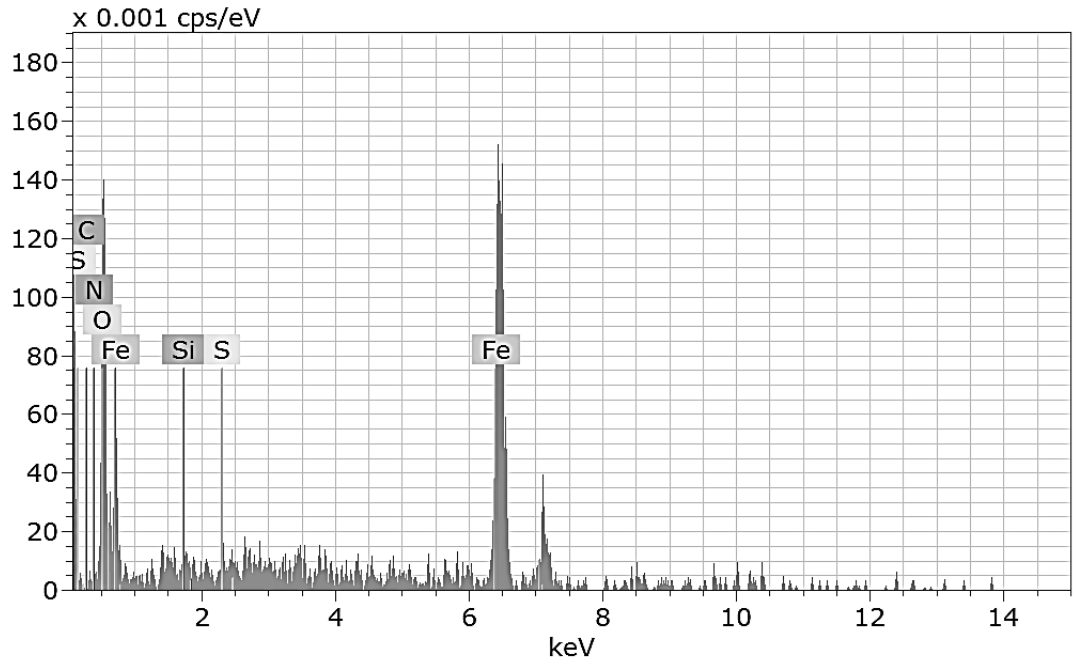
SEM ve EDX Analizi

MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'lerin 25000 ve 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri aşağıda Şekil 3.13, Şekil 3.15, Şekil 3.17 ve Şekil 3.19'da yer almaktadır. SEM görüntülerine göre tanecik şekli, tanecik boyutu ve yüzey morfolojisi; EDX analizine göre ise elementel analize yönelik bilgi edinilmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinde kullanılan cihazdan kaynaklı olarak net bir görüntü elde edilememiştir.

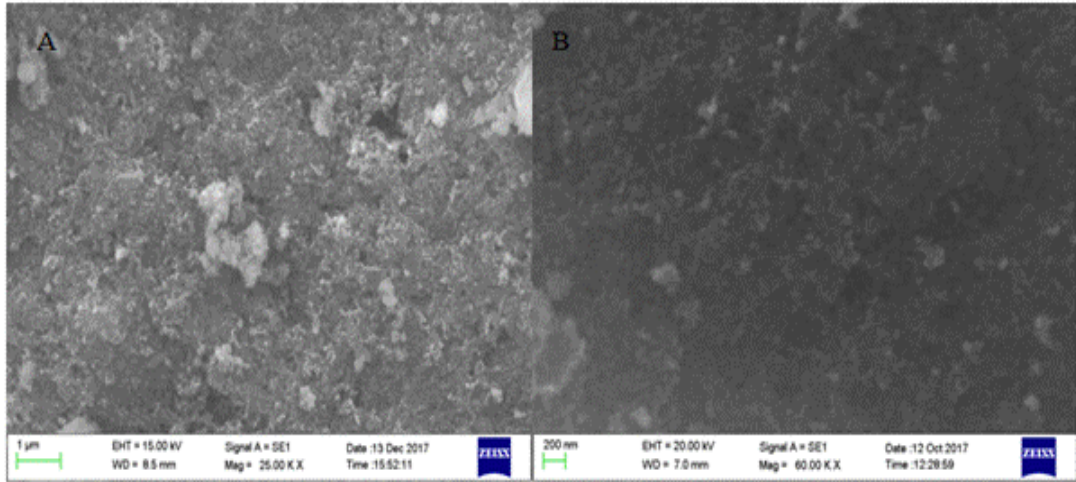
MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'lerin EDX analiz sonuçları ise Şekil 3.14, Şekil 3.16, Şekil 3.18 ve Şekil 3.20'de yer almaktadır.



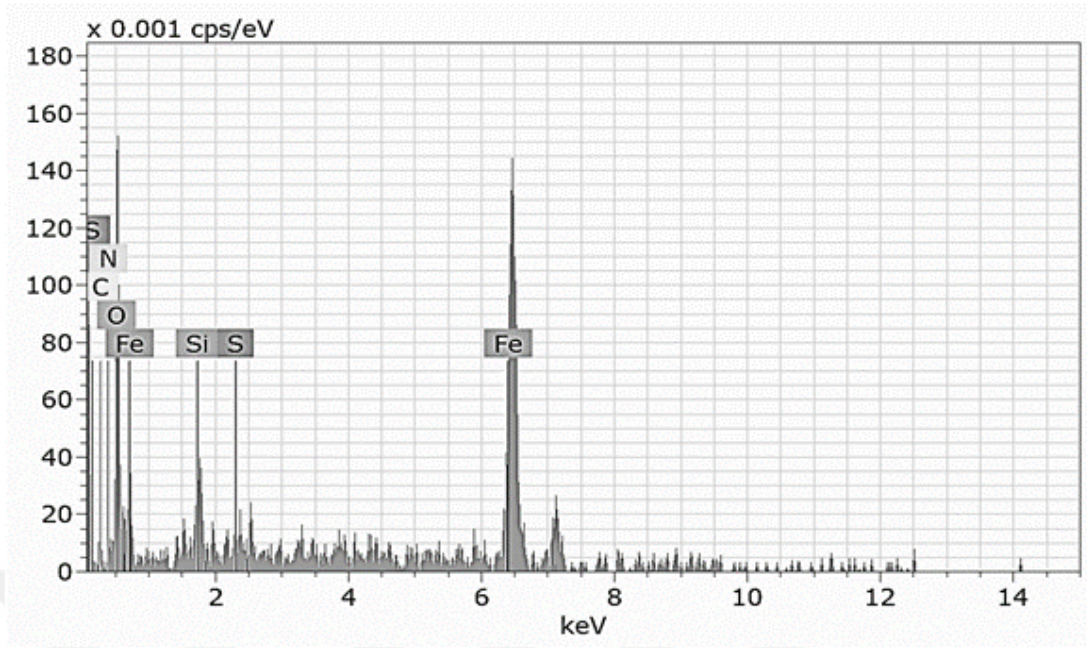
Şekil 3.13. Manyetik nanopartiküllerin A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri



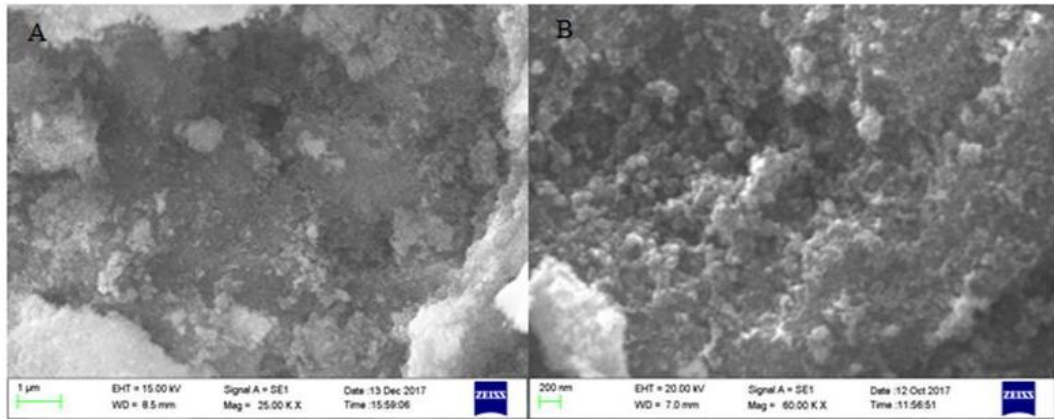
Şekil 3.14. Sentezlenen MNP'nin EDX spektrumu



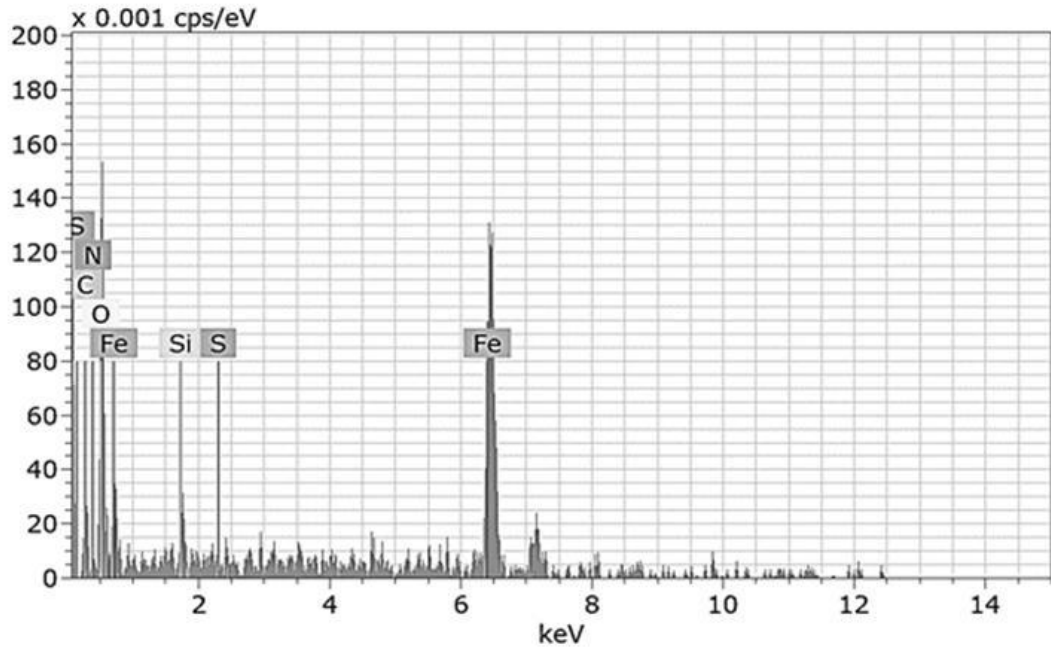
Şekil 3.15. APTES ile silinizasyon yapılan MNP'lerin (A-MNP) A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri



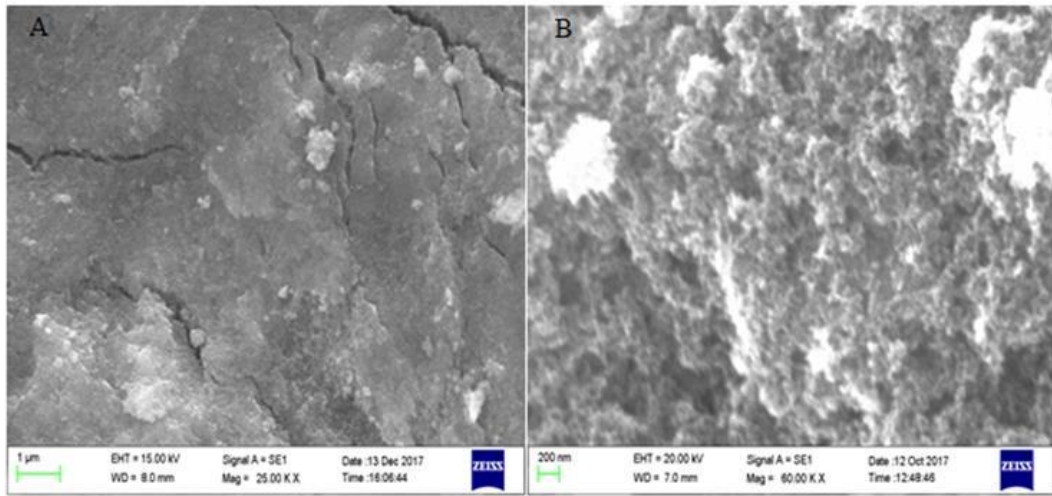
Şekil 3.16. APTES ile silinizasyon yapılan MNP (A-MNP)'nin EDX spektrumu



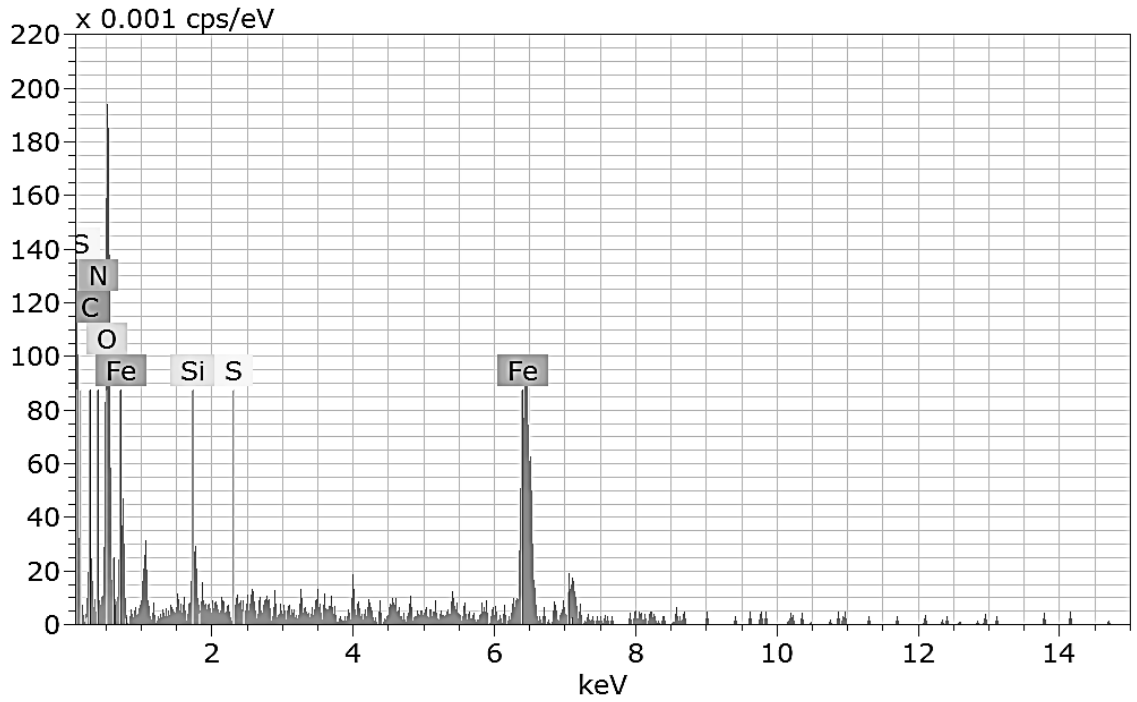
Şekil 3.17. Gluteraldehit ile çapraz bağlanmış A-MNP'lerin (G-MNP) A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri



Şekil 3.18. Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış A-MNP (G-MNP)'nin EDX spektrumu



Şekil 3.19. Selüloz enzimi bağlı G-MNP'lerin (E-MNP) A: 25000 kat büyütmede, B: 90000 kat büyütmedeki SEM görüntüleri



Şekil 3.20. Selüloz enzimi bağlı G-MNP (E-MNP)'nin EDX spektrumu

MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'nin SEM görüntülerine göre partiküllerin küresel yapıda olduğu görülmektedir.

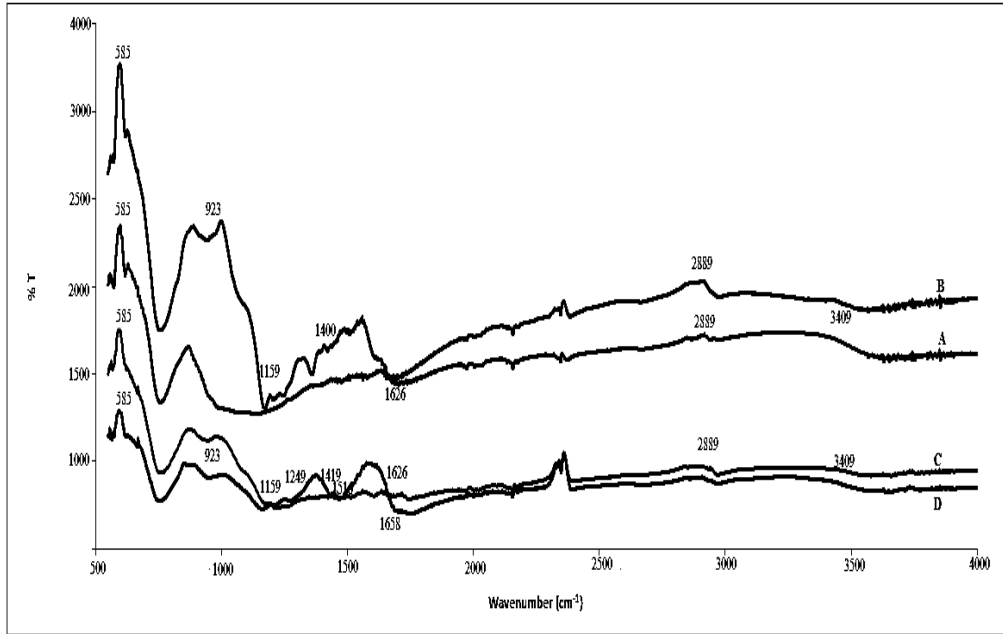
EDX analizlerinin sonuçları incelendiğinde % ağırlıkça en yüksek orana sahip olan Fe elementi görülmüştür. Fe ve O oranının fazla olması demir oksit yapısının oluştuğunu göstermektedir. Sonuçlarda görülen Si elementi APTES kaynaklı olduğu ve A-MNP'den G-MNP'ye geçildiğinde yıkamalar nedeniyle Si oranı azaldığı anlaşılmaktadır. Ayrıca C ve O elementlerinin E-MNP'de fazla miktarda olduğu belirlenmiştir. Tablo 3.2'de MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'de var olan elementlerin ağırlıkça % oranları gösterilmiştir.

Tablo 3.2. MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'ye ait elementlerin ağırlıkça % oranları

Element	MNP %Wt	A-MNP %Wt	G-MNP %Wt	E-MNP %Wt
Fe	77.12	69.86	73.19	60.08
O	20.05	21.57	20.86	29.92
N	2.08	0.46	0.33	0.00
Si	0.44	3.04	1.10	2.12
S	0.31	0.40	0.00	0.00
C	0.00	4.68	4.51	8.35

FTIR Analizi

Sentezlenen MNP, A-MNP, G-MNP ve E-MNP'ye ait FTIR spektrumu şekil 3.21'de gösterilmiştir. Spektrum incelendiğinde MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'ye ait 585 cm^{-1} deki piklerin örneklerde var olan Fe-O gruplarına ait olduğu (Cao ve ark., 2009). APTES bağlanma sonrasında (A-MNP, G-MNP, E-MNP) elde edilen numunelerde Si-O-H ve Si-O-Si gruplarına ait 923 ve 1159 cm^{-1} arasındaki piklerin bulunduğu görülmektedir (Kanmukhla, 2007). C-H grupları ise 1400 cm^{-1} ve 2899 cm^{-1} civarında (Cao ve ark., 2009) ve 1249, 1419, 1516 ve 1658 cm^{-1} arasındaki titreşim geriliminin E-MNP'de bulunan selüloz enzimine ait gruplar nedeniyle oluştuğu ifade edilmektedir (Khoshnevisan ve ark., 2011; Xu ve ark., 2011). E-MNP'de silisyum ve organik bileşiklere ait pikler spektrumlarından gözlenmiştir.



Şekil 3.21. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu; A: MNP, B: A-MNP, C: G-MNP, D: E-MNP

Tanecik Boyutu Analizi

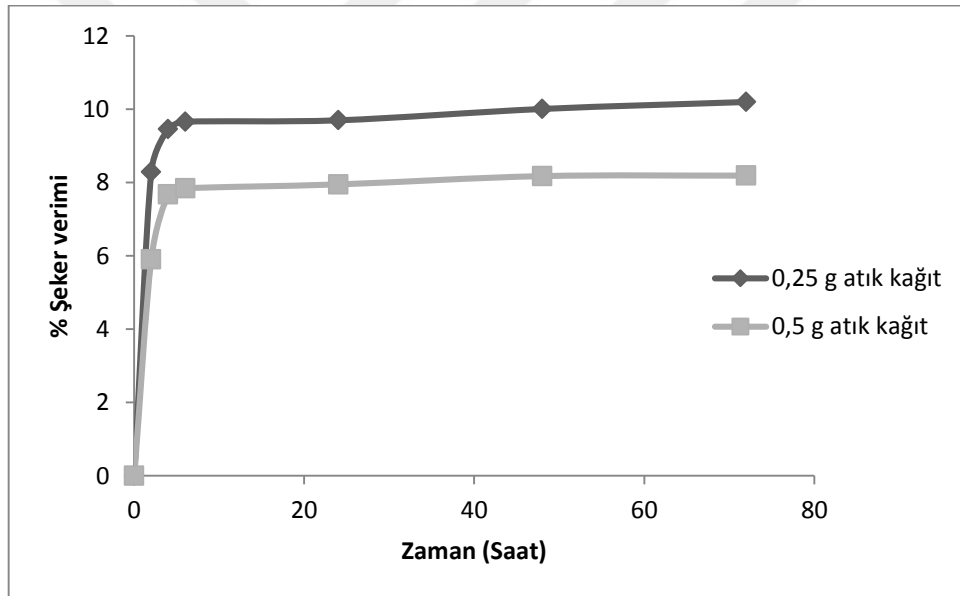
MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'nin tanecik boyutu analizlerine göre, sırasıyla 201,4 nm, 225,2 nm, 635 nm, 245,4 nm ve sentezlenen manyetik nanopartiküllerin ortalama boyutunun 200 nm boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde yapılmış çalışmalarda, sentezlenen manyetik nanopartiküller küresel yapıda ve ortalama 200 nm

boyutuna sahip olduğu (Alpay, 2014), başka bir çalışmada ise hazırlanan nano yapıların ortalama boyutunun 158,2 nm olduğu bulunmuştur (Şengül, 2013).

3.8. Atık Kağıt Hidroliz Çalışmaları İle İlgili Bulgular

Serbest ve immobilize selüloz enziminin FPU yöntemiyle elde edilen aktivite değerleri sırasıyla (2000 kat seyreltme oranında) 132 FPU/ml ve (400 kat seyreltme oranında) 0,612 FPU/ml olarak bulunmuştur.

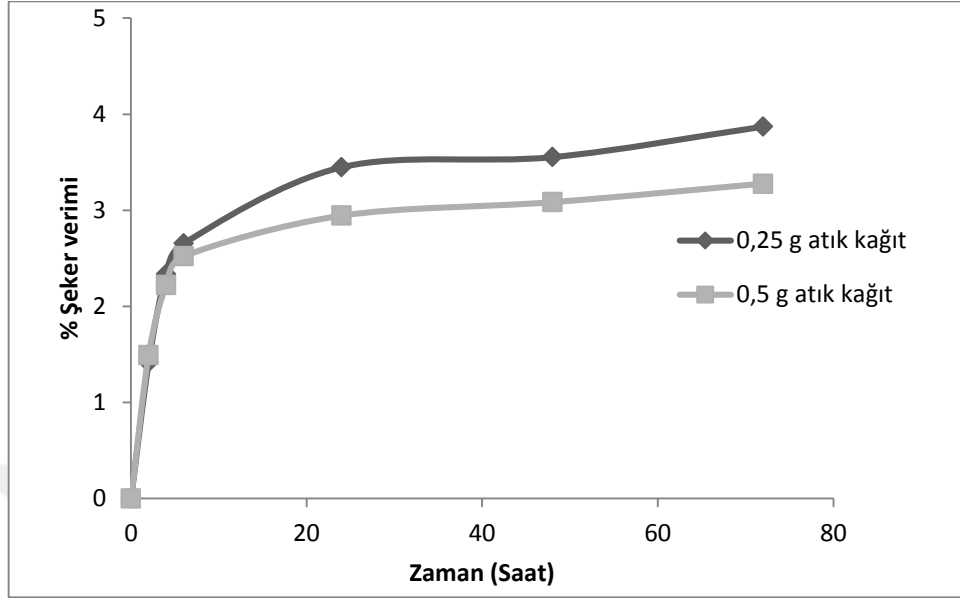
Fiziksel ve kimyasal ön işlem gören atık gazete kağıtlarının 10 FPU serbest ve immobilize selüloz enzimi ile 72 saat boyunca süren enzimatik hidroliz işlemi sonucunda elde edilen % şeker verimi Şekil 3.22 ve Şekil 3.23’de gösterilmiştir.



Şekil 3.22. Serbest selüloz enzimiyle gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin zamana göre % şeker verimi (İnkübasyon sıcaklığı: 50 °C, İnkübasyon süresi: 72 saat, Karıştırma hızı: 200 rpm)

Serbest selüloz enzimiyle gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin 48 saat sonundaki şeker verimi, 0,25 g atık gazete kağıdı için % 10,2 ve 0,5 g atık gazete kağıdı için % 8,19, immobilize selüloz enzimiyle gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin 48 saat sonundaki şeker verimi ise 0,25 g atık gazete kağıdı için % 3,87 ve 0,5 g atık gazete kağıdı için % 3,27 olarak belirlenmiştir. Gazete kağıdında bulunan yüksek lignin içeriği immobilize enzim yüzeyini kapladığı görülmüş ve hidroliz verimi çok düşük kalmıştır. Ortamdan E-MNP

ayrımı gerçekleştirlemediği için gazete kadğıdı ile hidroliz işlemi ayrıntılı olarak incelenmemiştir.



Şekil 3.23. İmmobilize edilen selüloz enzimle gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin zamana göre % şeker verimi (İnkübasyon sıcaklığı: 50 °C, İnkübasyon süresi: 72 saat, Karıştırma hızı: 200 rpm)

Çok daha düşük lignin içeriğine sahip ofis kağıtlarıyla yapılan çalışmada deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Enzimatik hidrolizde kullanılan bağımsız değişkenler ve incelenen aralıkları Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Ofis kağıdı enzimatik hidroliz deneyinde incelenen bağımsız değişkenler ve incelenen aralıklar

Değişken	-□	-1	0	+1	+□
Hidroliz süresi, s	2	7,5	13	18,	24
E-MNP , ml/l	2	6,5	11	15,5	20
Tween 80, g/L	0	1,5	2,75	6	8
Kağıt miktarı	0,25	1,5	2,75	4	5,25

Az sayıda deneylerle değişkenler arasındaki etkileşimleri de içeren ayrıntılı incelemeyi sağlayan cevap yüzey yöntemi kullanılarak hazırlanan deneyselle matris ve bu noktalarda yapılan hidroliz sonucunda elde edilen glikoz konsantrasyonlarını içeren veriler Tablo 3.4’de verilmiştir. Deneysel matriste altısı merkez noktada tekrar dan oluşan toplam 30 deney yapılmıştır.

Tablo 3.4. CCD göre Enzimatik hidroliz deney tasarımı ve sonuçları

Deney no	Süre	E-MNP	Tween 80	Kâğıt miktarı	Glikoz kons, g/L
1	7,5	6,5	2	1,5	0,342
2	18,5	6,5	2	1,5	0,394
3	7,5	15,5	2	1,5	0,460
4	18,5	15,5	2	1,5	0,489
5	7,5	6,5	6	1,5	0,392
6	18,5	6,5	6	1,5	0,337
7	7,5	15,5	6	1,5	0,352
8	18,5	15,5	6	1,5	0,437
9	7,5	6,5	2	4	0,746
10	18,5	6,5	2	4	1,118
11	7,5	15,5	2	4	0,989
12	18,5	15,5	2	4	1,552
13	7,5	6,5	6	4	0,705
14	18,5	6,5	6	4	0,855
15	7,5	15,5	6	4	1,070
16	18,5	15,5	6	4	1,654
17	2	11	4	2,75	0,527
18	24	11	4	2,75	0,730
19	13	2	4	2,75	0,303
20	13	20	4	2,75	1,539
21	13	11	0	2,75	1,052
22	13	11	8	2,75	0,955
23	13	11	4	0,25	0,227
24	13	11	4	5,25	1,727
25	13	11	4	2,75	0,942
26	13	11	4	2,75	0,997
27	13	11	4	2,75	1,131
28	13	11	4	2,75	1,118
29	13	11	4	2,75	1,095
30	13	11	4	2,75	0,980

 $R^2:0,92$; $\text{adj}R^2: ,88$; $CV:17,56$

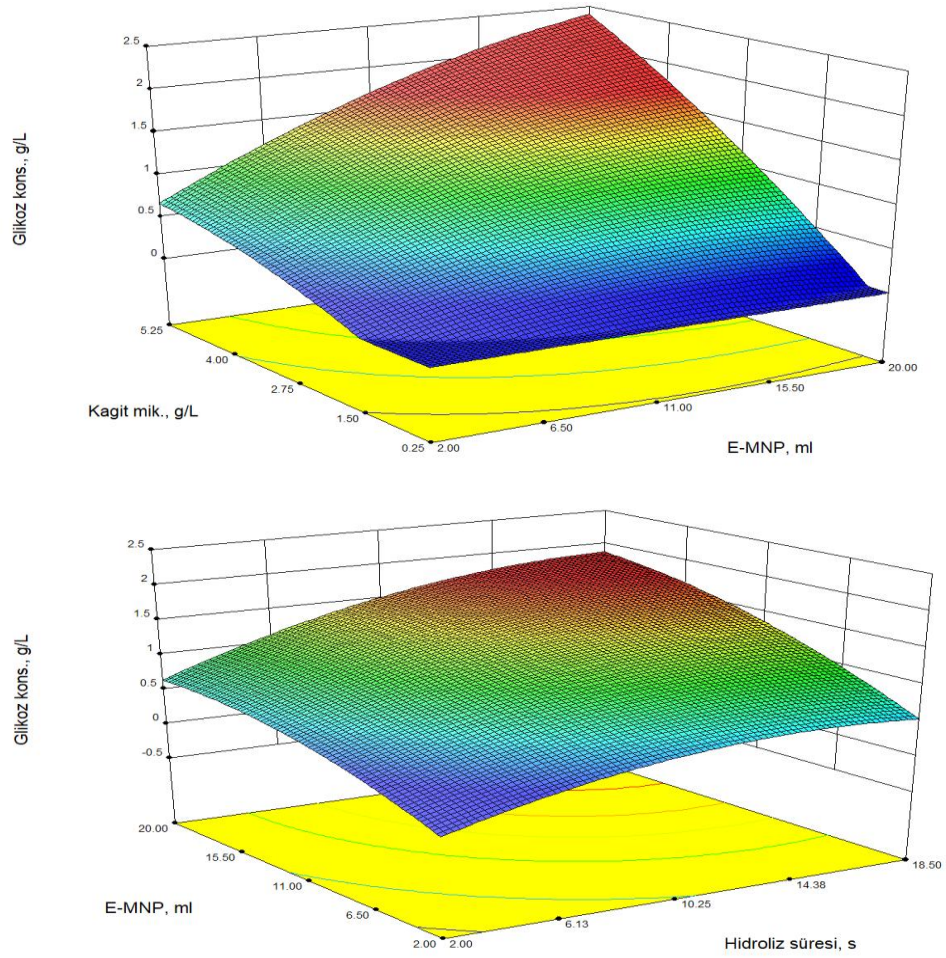
Deneysel matrisin tasarımı ve sonuçların istatistiksel analizi Design expert 8.0 (State Ease) yazılımı yardımıyla yapılmıştır. Deneysel sonuçların aşağıda verilen indirgenmiş kuadratik modelle % 92 oranında ($R^2: 0,92$) bağımsız değişkenlerle açıklanabileceği önerilmiştir.

Glikoz	=
-0,43326	
0,066189	* hidroliz suresi
0,028819	* enzim miktarı
0,056461	* tween 80
0,047666	* kâğıt miktarı
0,001872	* hidroliz suresi * enzim miktarı
0,014159	* hidroliz suresi * kâğıt miktarı
0,01741	* enzim miktarı* kâğıt miktarı
-0,0042	* hidroliz suresi ^2
-0,00266	* enzim miktarı^2
-0,00831	* tween 80 ^2
-0,02554	* kâğıt miktarı ^2

Model denkleminin ANOVA sonuçları Tablo 3.5’de verilmiştir. p-değeri 0,05’ten küçük model terimlerinin glikoz oluşumu için önemlidir. ANOVA sonuçlarına göre immobilize selüloz kompleksiyle ofis kâğıdının hidrolizinde incelenen aralıklarda hidroliz süresi, EMNP miktarı ve kâğıt miktarı değişkenlerinin lineer etkileri önemlidir. Hidroliz süresinin üssel etkisinin önemli olduğu bu değişkende meydana gelecek değişimin glikoz miktarını etkilemektedir. Ayrıca incelenen değişkenler arasında hidroliz süresi ile enzim miktarı ve enzim miktarı ile kâğıt miktarı arasındaki etkileşimin önemli olduğu ANOVA sonuçlarından görülmektedir. Bu etkileşimlerin sonuç üzerine etkisi 3 boyutlu grafiklerde görülmektedir.

Tablo 3.5. Enzimatik hidroliz modeli için ANOVA test sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	Kaynak
Model	4,911	11	0,4465	20,484	< 0.0001 significant
A-hidroliz suresi, s	0,199	1	0,1992	9,1384	0.0073
B-enzim miktarı, ml	0,876	1	0,8761	40,192	< 0.0001
C-tween 80, g/L	0,009	1	0,0097	0,4452	0.5131
D- kâğıt miktarı, g/L	2,998	1	2,9984	137,55	< 0.0001
AB	0,034	1	0,0343	1,5761	0.2254
AD	0,151	1	0,1516	6,9551	0.0167
BD	0,153	1	0,1534	7,0397	0.0162
A^2	0,442	1	0,4423	20,294	0.0003
B^2	0,079	1	0,0797	3,6581	0.0718
C^2	0,030	1	0,0303	1,3917	0.2535
D^2	0,043	1	0,0436	2,0039	0.1740



Şekil 3.24. Bağımsız değişkenlerin glüköz konsantrasyonuna etkisi

Grafiklerden görüldüğü gibi enzim miktarı ve ön işlem görmüş kağıt miktarındaki artışla glüköz miktarında artış görülmektedir. Düşük kağıt miktarı ve enzim miktarında beklendiği gibi glüköz konsantrasyonu sınırlı kalmaktadır. Hidroliz süresiyle glüköz miktarındaki artış gözlenmektedir. Bu artışın yüksek enzim konsantrasyonunda daha belirgin olduğu grafikten görülmektedir. Önerilen model denklemin maksimum glüköz konsantrasyonu için sayısal çözümü program yardımıyla yapılmıştır. Optimizasyon sonucunda enzim miktarı ve kağıt konsantrasyonunun üst noktalarında (20, 5,25 g/l) glüköz miktarının maksimum olacağı bulunmuştur. Tween 80 konsantrasyonunun 3,41 g/l ve hidroliz süresinin 21.2 saat sonunda model denkleminin önerdiği glüköz konsantrasyonu 2,43 g/l olarak bulunmuştur. Optimizasyon sonucunda yapılan doğrulama deneyi ile % 72 oranında model sonucuna ulaşılmıştır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Selülaaz enziminin manyetik nanopartiküllere kovalent olarak immobilizasyonu ve atık kağıtların enzimatik hidrolizinde kullanılması incelenmiştir.

1. MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'lerin SEM fotoğrafları ile sentezlenen manyetik nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin düzgün ve küresel yapıda olduğu görülmüştür. Partiküllerin ortalama boyutunun 200 nm olduğu belirlenmiştir. Ayrıca görüntülerin çekildiği SEM cihazıyla nano seviyede net görüntü elde edilememiştir.
2. MNP, A-MNP, G-MNP, E-MNP'lerin FTIR spektrumları çekilmiş ve fonksiyonel grupların varlığı incelenmiştir. Optimum sentez ve immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra serbest enzim ve manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklar 70 °C olarak belirlenmiştir.
3. Optimum sıcaklık değerinde yapılan ölçümlerde serbest selülaaz enziminin maksimum aktiviteye sahip olduğu pH 5 ve manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz enzimi için ise pH 4,8 olarak belirlenmiştir.
4. Serbest enzim ve manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60, 70, 80 °C) inkübe edilmiş ve 5 saat sonundaki kalan % bağıl aktiviteleri serbest enzim için sırasıyla (17,65, 21,07, 29,9, 11,73, 2,79) ve manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz enzimi için ise sırasıyla (20,07, 28,11, 38,00, 16,91, 5,88)'dir.
5. Serbest enzim ve manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz enzimlerinin aktivitesi farklı substrat konsantrasyonlarında ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanılarak K_m , V_{max} değerleri belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri serbest enzim için sırasıyla 155,25 mg/ml ve 2500 μ mol/ml.dk, manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz enzimi için ise sırasıyla 23,64 mg/ml ve 108,69 μ mol/ml.dk olarak bulunmuştur.
6. 4 °C'de 20 gün boyunca bekletilen serbest ve manyetik nanopartiküllere immobilize edilen selülaaz enziminin depolama kararlılıkları kıyaslandığında, immobilize selülaaz enzimlerinin serbest selülaaz enzimine göre daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği belirlenmiştir.

7. İmmobilize edilen enzimin 8 döngü boyunca yürütülen tekrar kullanılabilirlik çalışmasında, 4. döngü itibariyle % 20 oranında enzimin aktivitesini koruduğu görülmüştür.
8. Serbest ve immobilize selüloz enziminin kullanılabilirliğinin bir ölçüsü olarak atık gazete kağıtlarının enzimatik hidrolizi 72 saat boyunca yürütülmüştür. Serbest selüloz enzim için şeker verimi, 0,25 g atık gazete kağıdı için % 10,2 ve 0,5 g atık gazete kağıdı için % 8,19, immobilize selüloz enziminde ise 0,25 g atık gazete kağıdı için % 3,87 ve 0,5 g atık gazete kağıdı için % 3,27 olarak belirlenmiştir.
9. Ofis kağıdının immobilize selüloz ile hidrolizinde optimizasyon sonucunda ağırlıkça % 32 glikoz dönüşümü elde edilmiştir. Elde edilen model denkleminin istatistiksel olarak bağımsız değişkenlerden kaynaklanan değişimi % 92 oranında açıklayabildiği belirlenmiştir.
10. Endüstriyel önemi olan enzimlerin manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu ile enzimlerin tekrar kullanımı sağlanarak enzim maliyeti düşürülmüş olur ve manyetik nanopartiküller ile süzme, filtrasyon gibi işlemlere ihtiyaç olmadan enzimler reaksiyondan kolaylıkla ayrılabilirler. Lignin gibi enzimatik hidroliz olmayan bileşenlerin çokluğunda manyetik partiküllerin ayrılması sorun oluşturmaktadır.
11. Enzimatik hidroliz veriminin artırılması için ön işlem parametreleri ve hidroliz koşulları iyileştirilebilir. Özellikle immobilize enzimin salınımı görülmüştür. Farklı yüzey modifikasyon yöntemleriyle denenmesiyle daha yüksek selüloz immobilizasyonu gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, R. E., Verma, M. L., Barrow, C. J. ve Puri, M. (2014). Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 90.
- Aksoy, C. ve Yanardağ, R. (2003). Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul*, 1-68.
- Alfrén, J. ve Hobley, T. J. (2013). *Immobilization of cellulases on magnetic particles to enable enzyme recycling during hydrolysis of lignocellulose*. Technical University of Denmark Danmarks Tekniske Universitet, Department of Systems Biology Institut for Systembiologi,
- Alpay, P. (2014). *Manyetik Nanopartiküllere Papain Enziminin Immobilizasyonu ve Proteinlerin Enzimatik Hidrolizinde Kullanımı*.
- Aptiş, H. (2012). *Süperkritik Akışkan Ortamda Lipazların Taşıyıcısız Enzim Immobilizasyonu*. (Master of Science Thesis).
- Baltacı, Ö. A. (2010). *Production and Characterization of Maghemite Nanoparticles*
- Bickerstaff, G. F. (1997). *Immobilization of enzymes and cells*: Humana press.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brummer, V., Jurena, T., Hlavacek, V., Omelkova, J., Bebar, L., Gabriel, P., ve Stehlik, P. (2014). Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper—Source of raw material for production of liquid biofuels. *Bioresource technology*, 152, 543-547.
- Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M., ve Herrasti, P. (2008). Magnetite nanoparticles: electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*, 53(8), 3436-3441.
- Cao, H., He, J., Deng, L. ve Gao, X. (2009). Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄/amino-silane core-shell

- nanoparticles via layer-by-layer method. *Applied Surface Science*, 255(18), 7974-7980.
- Carr, P. W. ve Bowers, L. D. (1980). *Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry*: Wiley.
- Chanéac, C., Tronc, E. ve Jolivet, J. P. (1996). Magnetic iron oxide–silica nanocomposites. Synthesis and characterization. *Journal of Materials Chemistry*, 6(12), 1905-1911.
- Chen, H. (2014). *Process Development and Fundamental Study on Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass to Fermentable Sugars for Ethanol Production*: North Carolina State University.
- Chin, A. B. ve Yaacob, I. I. (2007). Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *Journal of Materials Processing Technology*, 191(1), 235-237.
- Chu, K. H. ve Feng, X. (2013). Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. *Process Safety and Environmental Protection*, 91(1), 123-130.
- Cornell, R. M. ve Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*: John Wiley & Sons.
- Çetin, F. B. E. (2007). *Preparation and Characterization Of Magnetic Polymeric Carriers For Enzyme Immobilization*.
- Çınar, M. (2009). *Enzyme Immobilization On Titania-silica-gold Thin Films For Biosensor Applications and Photocatalytic Enzyme Removal For Surface Patterning*
- Doğan, G. (2008). *Yeni Nesil Polimerik Nanoyapıların Hazırlanması ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması*
- Drexler, K. E. (1992). *Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation*: John Wiley & Sons, Inc.
- Dunlop, D. (1990). Developments in rock magnetism. *Reports on Progress in Physics*, 53(6), 707.
- Durante, D., Casadio, R., Martelli, L., Tasco, G., Portaccio, M., De Luca, P., Grano, V. (2004). Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised

- laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 27(4), 191-206.
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme Immobilization : Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*
- Feng, B., Hong, R., Wang, L., Guo, L., Li, H., Ding, J., Wei, D. (2008). Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 328(1), 52-59.
- Fengel, D. ve Wegener, G. (1983). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*: Walter de Gruyter.
- Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*: Macmillan.
- Ghose, T. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Golan, A. E. (2011). *Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses*.
- Gupta, A. K. ve Curtis, A. S. (2004). Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*, 25(15), 3029-3040.
- Gupta, A. K. ve Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.
- Gupta, A. K. ve Wells, S. (2004). Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE transactions on nanobioscience*, 3(1), 66-73.
- Gupta, K., Jana, A. K., Kumar, S., & Maiti, M. (2013). Immobilization of amyloglucosidase from SSF of *Aspergillus niger* by crosslinked enzyme aggregate onto magnetic nanoparticles using minimum amount of carrier and characterizations. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 98, 30-36.
- Güller, U. (2014). *Mitokondrial Glutamat Dehidrogenaz Enziminin Koyun Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi*
- Haliskaranfil, S. (2012). *Termoalkalifilik Amilaz ve Selülaz Enzim (Multi Enzim) Üreticisi Bacillus sp. İzolasyonu Enzimlerin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği*

- Haykır, N. I. (2013). *Pretreatment of Cotton Stalks With Ionic Liquids For Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and ethanol Production*.
- Hendriks, A. ve Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- <http://www.astm.org/>. (2009). International American Society for Testing and Materials (ASTM), Standard Terminology Relating to Nanotechnology.
- Jordan, J., Kumar, C. S. ve Theegala, C. (2011). Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 139-146.
- Kanmukhla, V. K. (2007). *Synthesis, characterization and applications of magnetite nanoparticles*: University of Missouri-Rolla.
- Khoshnevisan, K., Bordbar, A.-K., Zare, D., Davoodi, D., Noruzi, M., Barkhi, M., & Tabatabaei, M. (2011). Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chemical Engineering Journal*, 171(2), 669-673.
- Koçan, P. (2015). *Enzymatic Hydrolysis of Fruit Peels and Other Lignocellulosic Biomass As a Source Of Sugar For Fermentation.*,
- Konyala, D. (2015). *Synthesis, characterization and application of iron (II, III) oxide (Fe₃O₄) magnetic nanoparticles in mimic of wound healing model*. Texas A&M University-Kingsville,
- Kristensen, J. B., Felby, C. ve Jørgensen, H. (2009). Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 11.
- Kütük, S. (2015). *Buhar Patlatma Uygulanmış Ayçiçeği Saplarından Enzimatik Hidroliz Yöntemiyle Fermente Şeker Üretimi*
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J. ve Lynd, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource technology*, 81(1), 33-44.
- Li, G. (2007). *Syntheses and functionalizations of magnetic iron oxide nanoparticles for applications in organic chemistry*: Southern Illinois University at Carbondale.

- Liu, Y., Li, Y., Li, X.-M. ve He, T. (2013). Kinetics of (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*, 29(49), 15275-15282.
- Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R. ve Stone, M. O. (2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature biotechnology*, 22(2), 211-213.
- Makovec, D., Drofenik, M. ve Žnidaršič, A. (1999). Hydrothermal synthesis of manganese zinc ferrite powders from oxides. *Journal of the American Ceramic Society*, 82(5), 1113-1120.
- Malkoç, A. (2011). *Polimer Modifiyeli Silika Nanopartiküllerin Enzim İmmobilizasyonunda Kullanımı*.
- Massia, S. P., Stark, J. ve Letbetter, D. S. (2000). Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*, 21(22), 2253-2261.
- Menon, V. ve Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550.
- Mi, W., Shen, J., Jiang, E. ve Bai, H. (2007). Microstructure, magnetic and magneto-transport properties of polycrystalline Fe₃O₄ films. *Acta materialia*, 55(6), 1919-1926.
- Mohammadi, Z. (2008). *In situ synthesis of iron oxide within polyvinylamine nanoparticles*: University of Kansas.
- Özgen, C. (2009). *Preparation and Characterization of Magnetic Nanoparticles*.
- Powers, R., Copeland, J. C., Germer, K., Mercier, K. A., Ramanathan, V. ve Revesz, P. (2006). Comparison of protein active site structures for functional annotation of proteins and drug design. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(1), 124-135.
- Redl, F. X., Black, C. T., Papaefthymiou, G. C., Sandstrom, R. L., Yin, M., Zeng, H., O'Brien, S. P. (2004). Magnetic, electronic, and structural characterization of nonstoichiometric iron oxides at the nanoscale. *Journal of the American Chemical Society*, 126(44), 14583-14599.
- Sağlam, G. (2014). *Synthesis and Charecterization of Chitosan Based Magnetite Nanoparticles*.

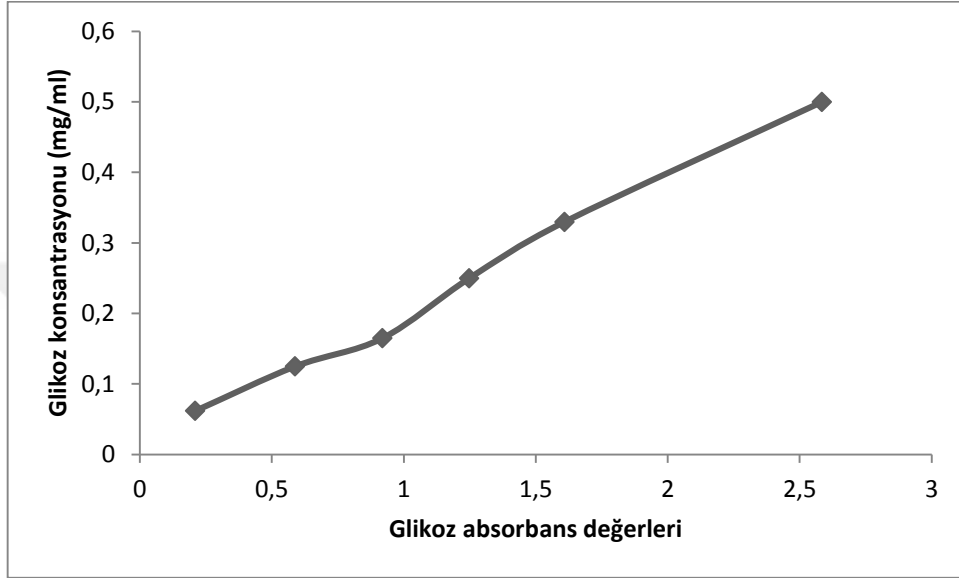
- Sanchez, O. J. ve Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270-5295.
- Schwertmann, U. ve Cornell, R. Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization; VCH: New York, 1991.
- Shallom, D. ve Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 219-228.
- Shen, L., Laibinis, P. E. ve Hatton, T. A. (1999). Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: synthesis and interactions at interfaces. *Langmuir*, 15(2), 447-453.
- Song, Q. (2005). *Size and Shape Controlled Synthesis and Superparamagnetic Properties of Spinel Ferrites Nanocrystals*. Georgia Institute of Technology,
- Srivastava, M., Chaubey, S. ve Ojha, A. K. (2009). Investigation on size dependent structural and magnetic behavior of nickel ferrite nanoparticles prepared by sol-gel and hydrothermal methods. *Materials Chemistry and Physics*, 118(1), 174-180.
- Sugimoto, T. (2001). *Monodispersed particles*: Elsevier.
- Sun, S., Zeng, H., Robinson, D. B., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X. ve Li, G. (2004). Monodisperse $m\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($m = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Mn}$) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(1), 273-279.
- Şengül, M (2013). *Lipaz enziminin magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve karakterizasyonu*.
- Tozluoğlu, A. (2012). *Bioethanol Production Via Enzymatic Hydrolysis Of Lignocellulosic Biomass: Wheat Straw, Corn Stalks and Hazelnut Husks*.
- Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 32-38.
- Verma, M. L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C. J., ve Puri, M. (2013). Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource technology*, 135, 2-6.
- Vidal-Vidal, J., Rivas, J. ve López-Quintela, M. (2006). Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288(1), 44-51.

- Wen, W. (2011). *Immobilization of enzymes on functionalized magnetic nanoparticles for efficient biocatalysis*.
- Wilson, M., Kannangara, K., Smith, G., Simmons, M. ve Raguse, B. (2002). *Nanotechnology: basic science and emerging technologies*: CRC Press.
- Xu, J., Huo, S., Yuan, Z., Zhang, Y., Xu, H., Guo, Y., Zhuang, X. (2011). Characterization of direct cellulase immobilization with superparamagnetic nanoparticles. *Biocatalysis and biotransformation*, 29(2-3), 71-76.
- Xu, J., Yang, H., Fu, W., Du, K., Sui, Y., Chen, J., Zou, G. (2007). Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 309(2), 307-311.
- Yang, B. ve Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 26-40.
- Yavaş, S. (2010). Conversion Of Lignocellulosic Biomass Into Nanofiber By Microfluidization And Its Effect On The Enzymatic Hydrolysis.
- Yeh, A.-I., Huang, Y.-C. ve Chen, S. H. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 192-199.
- Yıldız, H. B. (2007). *Synthesis and Characterization of Conducting Copolymers Of Thiophene Ended Poly(Ethylene Oxide): Their Electrochromic Properties and Use In Enzyme Immobilization.*,
- Zaborsky, O. R. ve Co, C. R. (1973). *Immobilized enzymes* (Vol. 18901): CRC press Cleveland.
- Zhang, G., Fan, C., Pan, L., Wang, F., Wu, P., Qiu, H., Zhang, Y. (2005). Magnetic and transport properties of magnetite thin films. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 293(2), 737-745.
- Zhang, X. Z. ve Zhang, Y. H. P. (2013). Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, 131-146.
- Zhang, Y. H. P. ve Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), 797-824.

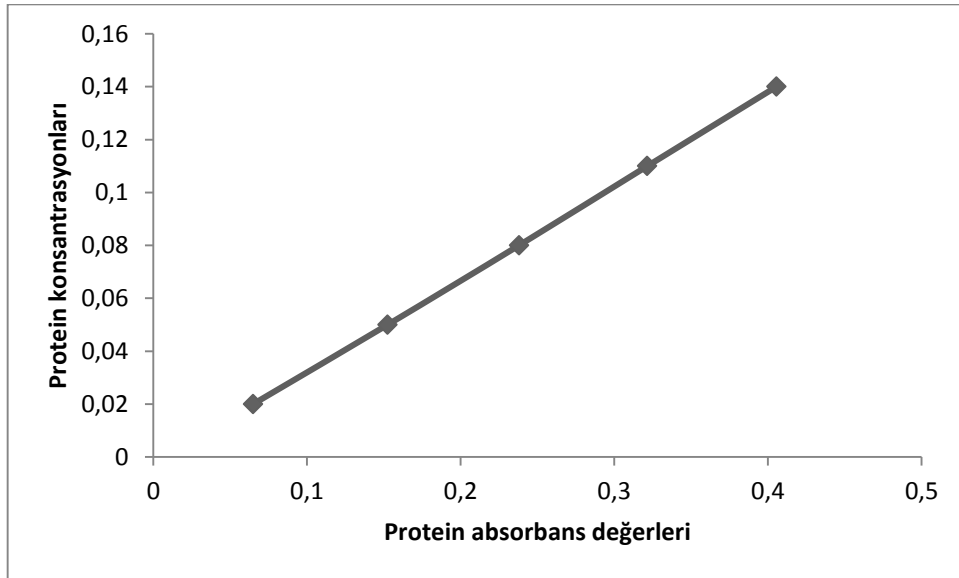
EKLER

EK.1. Deneyisel Verilere Ait Sayısal Değerler

Tablo E1.1. Glikoz standart eğrisi



Tablo E1.2. Protein standart eğrisi



Tablo E1.3. Şekil 3.1'e ait deney sonuçları (Bağlanma kapasitesi)

Gluteraldehit miktarı (mg/ml)	0,026 mg/ml protein	0,053 mg/ml protein	0,079 mg/ml protein
0	0,086	0,0404	0,033
0,089	0,132	0,143	0,146
0,178	0,133	0,137	0,161
0,295	0,127	0,126	0,160
0,445	0,125	0,125	0,151

Tablo E1.4. Şekil 3.2'ye ait deney sonuçları (Bağlanma kapasitesi)

APTES miktarı (mg/ml)	0,026 mg/ml protein	0,053 mg/ml protein	0,079 mg/ml protein
0	0,058	0,033	0,023
0,141	0,136	0,203	0,054
0,283	0,140	0,180	0,058
0,567	0,143	0,177	0,107
0,851	0,125	0,175	0,075
1,419	0,123	0,167	0,065

Tablo E1.5. Şekil 3.4'e ait deney sonuçları (Sıcaklık optimizasyonu çalışmaları)

Serbest Enzim (Bağıl aktivite %)	49,77	61,77	79,51	100	51,71
İmmobilize Enzim (Bağıl aktivite %)	60,03	82,42	95,70	100	58,90

Tablo E1.6. Şekil 3.5'e ait deney sonuçları (pH optimizasyonu çalışmaları)

pH	4	4,5	4,8	5	5,5	6	7
Serbest Enzim (Bağıl aktivite %)	54,92	93,78	97,81	100	82,71	52,54	28,96
İmmobilize Enzim (Bağıl aktivite %)	43,17	92,43	100	86,95	43,24	10,17	5,68

Tablo E1.7. Şekil 3.6'ya ait deney sonuçları (Sıcaklık stabilitesi çalışmaları)

Sıcaklık	Başlangıç	1.saat	2.saat	3.saat	4.saat	5.saat
40°C (Bağıl Aktivite %)	100	65,90	44,08	33,9	27,11	17,65
50°C (Bağıl Aktivite %)	100	78,12	54,04	41,23	33,17	21,07
60°C (Bağıl Aktivite %)	100	83,98	68,03	51,77	41,06	29,9
70°C (Bağıl Aktivite %)	100	59,35	33,9	25,00	19,31	11,73
80°C (Bağıl Aktivite %)	100	11,35	5,27	3,31	4,56	2,79

Tablo E1.8. Şekil 3.7'ye ait deney sonuçları (Sıcaklık stabilitesi çalışmaları)

Sıcaklık	Başlangıç	1.saat	2.saat	3.saat	4.saat	5.saat
40°C (Bağıl Aktivite %)	100	44,72	33,78	28,01	25	20,07
50°C (Bağıl Aktivite %)	100	52,81	40,13	33,03	29,63	28,11
60°C (Bağıl Aktivite %)	100	70,54	59,11	48,59	41,03	38,00
70°C (Bağıl Aktivite %)	100	42,4	30	23	19	16,91
80°C (Bağıl Aktivite %)	100	15,60	8,69	6,85	6,20	5,88

Tablo E1.9. Şekil 3.8'e ait deney sonuçları (Michaelis-Menten eğrisi)

S (mg/ml)	15	12,5	10	8,75	7,5	6,25	5	3,75	0,4
V (µmol/ ml.dk) Serbest Enzim	138,66	173,01	167,86	150,72	111,86	84,99	80,45	59,74	35,11
V (µmol/ ml.dk) İmmobilize Enzim	27,20	34,13	32,75	30,90	28,06	23,16	17,66	15,11	9,97

Tablo E1.10. Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'a ait deney sonuçları (Substrat derişimi etkisi çalışmaları)

1/S (ml/mg)	0,066	0,08	0,1	0,114	0,133	0,16	0,2	0,26	0,4
1/V (ml.dk/µmol) Serbest Enzim	0,0057	0,0059	0,0066	0,0089	0,0117	0,0124	0,0167	0,0284	0,0057
1/V (ml.dk/µmol) İmmobilize Enzim	0,0292	0,0305	0,0323	0,0356	0,0431	0,0566	0,0661	0,1002	0,0292

Tablo E1.11. Şekil 3.11'e ait deney sonuçları (Depolama stabilitesi çalışmaları)

Zaman (Gün)	1	2	5	7	14	20
Serbest Enzim (Bağıl aktivite %)	100	98,99	97,45	95,46	93,42	91,26
İmmobilize Enzim (Bağıl aktivite %)	100	99,47	88,05	85,20	82,30	73,36

Tablo E1.12. Şekil 3.12'ye ait deney sonuçları (Tekrar kullanılabilirlik çalışması)

Döngü Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8
İmmobilize Enzim (Bağıl aktivite %)	100	65,36	23,22	20,62	15,00	10,30	8,80	5,02

Tablo E 1.13. Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'e ait deney sonuçları (Enzimatik hidroliz çalışması)

Zaman (Saat)	2	4	6	24	48	72
0,25 g 10 FPU Serbest Enzim (Şeker verimi %)	8,29	9,46	9,65	9,7	10,01	10,2
0,5 g 10 FPU Serbest Enzim (Şeker verimi %)	5,90	7,67	7,84	7,95	8,17	8,19
0,25 g 10 FPU İmmobilize Enzim (Şeker verimi %)	1,41	2,33	2,65	3,44	3,55	3,87
0,5 g 10 FPU İmmobilize Enzim (Şeker verimi %)	1,49	2,22	2,52	2,94	3,084	3,27

ÖZGEÇMİŞ

Hilal DAL

C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı

Doğum tarihi: 01.07.1990

Doğum yeri: Elazığ

E-posta: hilaldal90@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

- ❖ 2014-2018 : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı
 - Tez Konusu: Atık Kağıtların Hidrolizinde Manyetik Nanopartiküle İmmobilize Selüloz Enzim Kompleksinin Kullanımı
 - Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI
- ❖ 2010-2014: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
- ❖ 2004-2008: Özel Bilgem Lisesi