

**HİDROFOBİK KARAKTERLİ POLİMER
KÜRECİKLERİ ÜZERİNE
ENZİM İMMOBİLİZASYONU VE
KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz Burçak BORUCU
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Ekim 2012

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1104F078**



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Deniz Burçak BORUCU'nun “Hidrofobik Karakterli Polimer Kürecikleri Üzerine Enzim İmmobilizasyonu ve Kinetiğinin Araştırılması” başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 14.08.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Turgay TAY

.....

Üye : Prof. Dr. Hayrettin TÜRK

.....

Üye : Doç. Dr. Necmettin CANER

.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HİDROFOBİK KARAKTERLİ POLİMER KÜRECİKLERİ ÜZERİNE ENZİM İMMOBİLİZASYONU VE KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DENİZ BURÇAK BORUCU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Turgay TAY

2012, 76 sayfa

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren hidrofobik karakterli polimer kürecikler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu hidrofobik polimerik kürecikler üzerine lignin peroksidaz enzimi (E.C 1.11.1.14) immobilizasyonu incelenmiştir. LİP enzim immobilizasyon üzerine farklı ortam koşulları (pH, enzim başlangıç derişimi, sıcaklık ve temas süresi) kesikli sistemde incelenmiştir. İmmobilizasyon için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermmlerinin uygunluğu araştırılmış. Kinetik verilerin değerlendirilmesi için Lagergren-birinci-derece ve yalancı-ikinci-derece-kinetik modellere uygunluğu incelenmiştir. 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren polimerlerin karakterizasyonunda yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Enzim immobilizasyonu, Lignin peroksidaz, Porfirin

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IMMOBILIZATION OF AN ENZYME ONTO HYDROPHOBIC POLYMERIC BEADS AND INVESTIGATION OF IMMOBILIZATION KINETICS

DENİZ BURÇAK BORUCU

**Anadolu University
Graduate School of Science
Chemistry Program**

Supervisor: Assoc. Prof. Turgay TAY

2012, 76 pages

In this study, hydrophobic polymer beads containing 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin were synthesized. Lignin peroxidase (E.C 1.11.1.14) immobilization onto these synthesized polymer beads was investigated. Different LIP immobilization conditions (i.e. pH, lignin peroxidase enzyme initial concentration, temperature and contact time) were investigated in batch system. The suitabilities of Langmuir and Freundlich isotherms for the immobilization were searched. Lagergren-first-order and pseudo-second-order kinetic models were investigated to evaluate the kinetic data. In characterization of polymers containing 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin, the surface morphology measurement were investigated using Scanning Electron Microscope (SEM).

Keywords: Enzyme immobilization, Lignin peroxidase, Porphyrin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her türlü duruma karşı büyük sabır gösteren, her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Turgay TAY'a,

Tez savunma jürimde bulunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hayrettin TÜRK'e ve Sayın Doç. Dr. Necmettin CANER'e,

Tez çalışmam sırasında Fen Fakültesi ve Kimya Bölümü olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a ve Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Adnan ÖZCAN'a,

Laboratuar çalışmalarında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Ender KÖSE'ye,

Bu süreçte her zaman yanımda olan ve iyiki tanıştığım dediğim çok sevgili arkadaşlarım Ayşe ÇETİN, Şenay DEMİRLİ, Burcu ÇELİK, Tuğçe GÜNAY ve Tuğçe ŞENER'e,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım AİLEM'e teşekkür ederim.

Deniz Burçak BORUCU

Ekim 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x

1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimlerin Özellikler	2
1.1.1. Enzimatik reaksiyonlar üzerine pH etkisi	2
1.1.2. Enzimatik reaksiyonlar üzerine enzim derişiminin etkisi.....	3
1.1.3. Enzimatik reaksiyon üzerine sıcaklığın etkisi.....	3
1.1.4. Enzimatik reaksiyon üzerine substrat derişiminin etkisi	4
1.1.5. Enzim miktarını belirleme yöntemleri.....	5
1.1.5.1. Biüret metodu.....	5
1.1.5.2. Lowry metodu	6
1.1.5.3. Bradford (coomassie blue) yöntemi	6
1.1.6. Lignin peroksidaz enziminin yapısı ve özellikleri	7
1.2. Lignin	9
1.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	13
1.3.1. Adsorpsiyon	15
1.3.2. Kovalent bağlama.....	17
1.3.3. Çapraz bağlama	18
1.3.4. Enzim tutuklanması	18
1.3.5. Enzim kapsülleme	19
1.3.6. Adsorpsiyon izotermi.....	20
1.3.6.1. Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	20
1.3.6.2. Freundlich adsorpsiyon izotermi	22

1.4. Destek ve İmmobilizasyon Metodu Seçimi	23
1.5. Polimerler	24
1.5.1. Polimerizasyon yöntemleri	25
1.5.1.1. Kütle (bulk) polimerizasyonu	25
1.5.1.2. Çözelti polimerizasyonu	26
1.5.1.3. Dispersiyon polimerizasyonu	27
1.5.1.4. Emülsiyon polimerizasyonu	28
1.5.1.5. Süspansiyon polimerizasyonu	30
1.6. Porfirin	32
1.6.1. Porfirin sentezi	36
1.6.1.1. Sübstitüe olmayan porfirin sentezi	36
1.6.1.2. β -Sübstitüe porfirinler	37
2. MATERYAL VE YÖNTEM	39
2.1. Kimyasal Maddeler ve Reaktifler	39
2.2. Analizler ve Aletli Analizler	39
2.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenil Porfirin Sentezi	40
2.3.1. 5,10,15,20-Tetrafenil porfirin sentezi	40
2.3.2. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenil porfirin sentezi	40
2.3.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin sentezi	41
2.4. Tetrafenilporfirin Ligandı Bağlanmış Polimer Sentezi	42
2.4.1. Vinilbenzil klorür içeren polimer sentezi	42
2.4.2. Vinilbenzil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)- 10,15,20-trifenilporfirin bağlanması	43
2.4.3. Metakriloil klorür içeren polimer sentezi	43
2.4.4. Metakriloil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)- 10,15,20-trifenilporfirin bağlanması	44
2.4.5. Stiren içeren polimer sentezi	44
2.4.6. Divinilbenzen içeren polimer sentezi	45

2.5. Polimer Kürecikleri Üzerine Lignin Peroksidaz Enzim Adsorpsiyon Koşullarının İncelenmesi.....	45
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
3.1. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin Sentezi	47
3.1.1. 5,10,15,20-Tetrafenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu.....	47
3.1.2. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenil porfirin sentezi ve karakterizasyonu	50
3.1.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu	54
3.2. Polimerik Kürelerin Sentezi.....	58
3.2.1. Vinilbenzil klorür içeren polimer sentezi ve karakterizasyonu ..	58
3.2.2. Vinilbenzil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin bağlanması	59
3.2.3. Metakriloil klorür içeren polimer sentezi ve karakterizasyonu ..	61
3.2.4. Metakriloil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin bağlanması.....	61
3.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin İçeren Polimer Küreciklere Lignin Peroksidaz İmmobilizasyonun	63
3.3.1. LİP immobilizasyonuna pH'ın etkisi	63
3.3.2. LİP immobilizasyonuna sıcaklığın etkisi	65
3.3.3. LİP enzimi başlangıç derişiminin immobilizasyona etkisi.....	65
3.3.4. Adsorpsiyon izotermi	66
3.3.5. Adsorpsiyon kinetiğı	68
3.4. Sonuçlar	72
KAYNAKLAR	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

1.1.	Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	3
1.2.	Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	4
1.3.	Coomasie Brilliant Blue G-250 yapısı	6
1.4.	Lignin peroksidaz kristal yapısı.	7
1.5.	Veratril alkol oksidasyon mekanizması.....	8
1.6.	Lignin peroksidaz enziminin katalitik döngüsü	9
1.7.	Bitkilerdeki p-hidroksisinnamil alkolden lignin sentezi.....	10
1.8.	Lignin model yapısı.....	11
1.9.	Lignin yapısında bulunan fenilpropan üniteleri	12
1.10.	Lignin model bileşikleri.....	12
1.11.	Enzim immobilizasyon yöntemleri	14
1.12.	Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	14
1.13.	Enzimlerin taşıyıcıya bağlanmasının kovalent olmayan adsorpsiyon yöntemleri	16
1.14.	Taşıyıcıya enzimin kovalent immobilizasyonu	17
1.15.	Biyokatalizörlerin hapsedilmesi.....	19
1.16.	Yarı geçirgen zarlı membranda fiziksel sınırlı kapsüllenmiş enzim.....	20
1.17.	Langmuir adsorpsiyon izotermi	22
1.18.	Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	23
1.19.	Polimer sentezleme teknikleri.....	25
1.20.	Dispersiyon polimerizasyonu süreci	27
1.21.	Emülsiyon polimerizasyonu süreci	28
1.22.	Süspansiyon polimerizasyonu süreci.....	30
1.23.	Porfinin yapısı.....	32
1.24.	Pirol halkası	32
1.25.	Porfirin izomerleri.....	33
1.26.	Porfirin sentezi(I)	36
1.27.	Porfirin sentezi(II).....	36
1.28.	Porfirin sentezi(III).....	37

1.29.	Porfirin sentezi(IV)	37
1.30.	β -Süstitüe porfirin sentezi(I)	38
1.31.	β -Süstitüe porfirin sentezi(II).....	38
2.1.	Bradford assay yöntemine göre çizilmiş LİP proteinin kalibrasyon eğrisi	46
3.1.	Adler yöntemine göre 5,10,15,20-tetrafenilporfirin (H_2TPP) sentezi.....	47
3.2.	5,10,15,20-Tetrafenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu.....	48
3.3.	5,10,15,20-Tetrafenilporfirinin FTIR spektrumu.....	49
3.4.	5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi.....	51
3.5.	5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu	52
3.6.	5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu	53
3.7.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi	55
3.8.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu.....	56
3.9.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu	57
3.10.	Vinilbenzil klorür içeren polimer sentezi	58
3.11.	Porfirin bağlı vinilbenzil klorür polimerinin SEM fotoğrafları	60
3.12.	Metakriloil klorür içeren polimer sentezi	61
3.13.	Porfirin bağlı metakriloil klorür polimerinin SEM fotoğrafları.....	62
3.14.	Vinilbenzil klorür ve metakriloil klorür içeren polimerik yapılara 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin bağlanmasının gösterimi.....	63
3.15.	Lignin peroksidaz enzim immobilizasyonuna pH etkisi	65
3.16.	Lignin peroksidaz enziminin başlangıç derişiminin immobilizasyona etkisi	66
3.17.	Langmuir adsorpsiyon izotermi	67
3.18.	Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	68
3.19.	Enzim immobilizasyonuna temas süresinin etkisi	69
3.20.	Lagergren-birinci-dereceden kinetik modelin incelenmesi.	70
3.21.	Yalancı-ikinci-dereceden kinetik modelin incelenmesi.	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

1.1.	Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri	24
1.2.	Emülsiyon ve süspansiyon polimerizasyonlarda kullanılan sulu ve organik faz türleri	31
1.3.	Porfirin sınıflarının doğada bulunan halleri.....	34
2.1.	Bradford metoduyla kalibrasyon eğrisi prosedürü.....	46
3.1.	Farklı destek maddeleri üzerine immobilize edilmiş LİP miktarları	64
3.2.	Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi verileri.....	68
3.3.	Polimer üzerine LİP enzimi adsorpsiyonun kinetik verileri.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LİP	: Lignin peroksidaz enzimi
H ₂ TPP	: 5,10,15,20-tetrafenilporfirin
PVA	: Poli(vinil) alkol
VBC	: Vinilbenzil klorür
MaCl	: Metakriloil klorür
Hem	: Heme
AIBN	: 2,2-azobisisobütironitril
EGDMA	: Etilenglikol dimetakrilat
DEAE-C	: Dietilaminoetil-selüloz
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
UV	: Ultraviyole
kDa	: Kilodalton
k _a	: Adsorpsiyon hız sabiti
k _d	: Desorpsiyon hız sabiti
Q	: Yüzeyin kaplanan kesri
C _e	: Denge durumundaki çözeltikonsantrasyonu(mg/ml)
K	: Denge sabiti
q _e	: Denge durumunda yüzeye adsorplanan miktar (mg/g)

q_m	: Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)
K_F	: Freundlich sabiti
n	: Freundlich sabiti
S	: Substrat derişimi (mg/L)
K_m	: Michaelis-Menten sabiti (mg)
V_{mak}	: Maksimum hız (mg/dak)
V	: Başlangıç hızı ($\mu\text{mol/dak}$)

1. GİRİŞ

Günümüz insanoğlunun modern toplumunun en önemli problem ve endişelerinden biri sürekli büyüyen çevresel kirliliktir. Üretim sonucunda, çevrede oluşan atık maddelerin uygunsuz imhası sonucu oluşan toksik maddeler havayı, toprağı ve suyu kirletmektedir. Son yıllarda çevresel iyileştirme metotlarının popülerliği artmakta ve kalıcı çevresel kirliliklerin giderilmesinde etkili olmaktadır. Bu metotlar, çevre dostu ve tehlikeli atık merkezlerinin arındırılmasında etkili ve ekonomiktir (Mayer 1997).

Enzimler biyolojik sistemlerdeki reaksiyonları katalizleyen, çoğu protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Doğal olarak sadece canlılar tarafından sentezlenirler. Uygun koşullar sağlandığında etkilerini doğal ortamları dışında da gösterebiliyor olmaları enzimlerin pek çok alanda kullanılmalarına olanak sağlamaktadır. Enzimler endüstriyel, analitiksel, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarım amaçlı geniş uygulama alanında kullanılmaktadır (Wiseman 1986). Enzim üretiminde hammadde mikrobiyal kaynaklar ile sağlanmaktadır. Fakat mikrobiyal kaynaklardan enzim saflaştırmak zahmetli ve masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılan enzim, suda çözündüğünden ortamdan geri kazanılması oldukça zordur. Reaksiyonun kontrolü sağlanamamakta ve enzim aktif bir şekilde tekrar elde edilememektedir. Bu durum enzimlerin spesifiklikleri yanında o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti arttıran önemli bir etmendir.

Önceleri sanayi uygulamalarında çözülebilir enzimlerde sadece ucuz olanları kullanılıyordu. Daha sonra geliştirilen uygulamalar sayesinde geri kazanılması çok zor olan enzimlerin bile büyük miktarının elde edilmesi sağlandı. Bu gibi zorlukların üstesinden gelmek için yapılan uygulamalardan en önemlisi immobilizasyon yöntemidir. Immobilizasyon katı bir destek üzerine enzimin tutuklanması olarak açıklanabilir. Çözünemez formda bir katı destek üzerine immobilize edilen enzim, yeniden kullanılabilir ve daha sonra geri kazanılabilir özellikte olmuştur. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda

çözünmeyen mikro kapsüllerde tutuklanmasıyla immobilize edilirler (Klibanov 1983). Serbest enzimlere göre immobilize enzimin, enzim kararlılığına ek olarak birçok avantajı vardır. Immobilize enzim reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilir ve tekrar kullanılabilir. Deneylerde immobilize enzim kullanılarak daha hızlı gerçekleştirilebilir. Ayrıca enzimatik reaksiyonlarda, immobilize enzimin basit bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması ile reaksiyon sonlandırılabilir ve bu sayede birçok reaksiyonun kontrolüne olanak sağlanır (Mayer 1997). Bu avantajlardan dolayı bu çalışmada lignin peroksidaz enziminin farklı şartlarda immobilizasyonu ele alınmış, immobilize ve serbest enzimin özellikleri karşılaştırılmıştır.

1.1. Enzimlerin Özellikleri

Enzimler, kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri olan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler protein yapısında olan ve yalnız canlılar tarafından sentezlenebilen maddelerdir. Enzimlerin katalitik etkinlikleri çok yüksektir ve değişkenlikleri sebebiyle ortam koşullarına uyum sağlarlar. Enzimler etkinliklerinin maksimum olabilmesi için ortam koşullarının (pH, sıcaklık, iyon şiddeti vb.) optimum olması gereklidir. Enzimler kimyasal katalizörlerin aksine kimyasal reaksiyonlarda yan ürün meydana getirmezler ve etki ettikleri maddelere substrat denir. Enzimler substratın %100'ünü ürüne dönüştürür ve çok spesifiktir. Biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirdikleri için her maddenin kendine özgü bir enzimi, her enziminde bir aktif merkezi vardır. Reaksiyonlar aktif merkeze substrat bağlanmasıyla gerçekleşir.

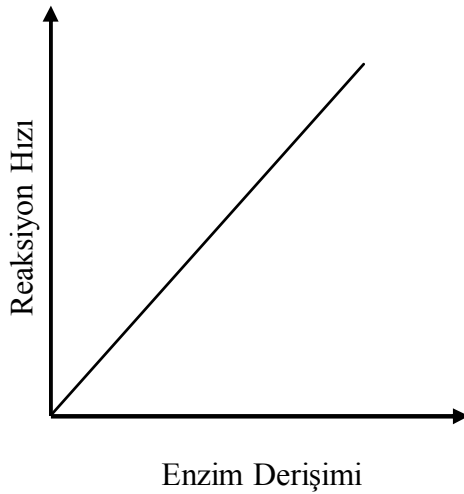
1.1.1. Enzimatik reaksiyonlar üzerine pH etkisi

Enzimlerin aktiviteleri pH değişimlerinden etkilenir. Çünkü, enzimlerin ve substratların aktif yerleri asidik ve bazik gruplar içerir. pH değişimi, enzimin aktif merkezinin iyonizasyonunu bozar ya da substrat molekülünün çözünürlüğünü değiştirerek enzim-substrat etkileşimini değiştirir. Ayrıca katalitik olarak aktif olan enzimin aminoasit zincirindeki iyonik karakter değiştiği için enzim denatüre

olarak katalitik aktivitesini kaybedebilir. Enzimatik reaksiyon hızının maksimum olduğu ve her enzim için değişik olan bir optimum pH değeri bulunmaktadır (Altınışık 1999).

1.1.2. Enzimatik reaksiyonlar üzerine enzim derişiminin etkisi

Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim derişimiyle orantılı olarak tüm substrat derişimleriyle değişir. Reaksiyon ortamında yeterli miktarda substrat derişimi bulunması halinde reaksiyon hızı, enzim derişimi ile artmaktadır (Şekil 1.1). Enzimler hıza etki etmekle birlikte hız sabitlerini ve denge sabitlerini değiştirmezler. Denge halinde enzim derişiminin denge sabiti üzerine etkisi yoktur (Altınışık 1999).



Şekil 1.1. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi

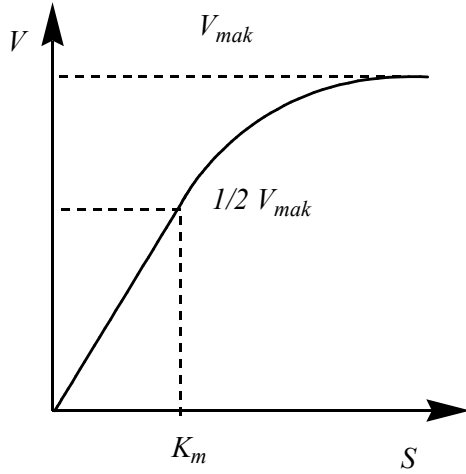
1.1.3. Enzimatik reaksiyonlar üzerine sıcaklığın etkisi

Enzimatik reaksiyonların hızı, sıcaklık değişmelerinden etkilenir. Genel olarak sıcaklıkta her 1°C artış %10 daha yüksek bir enzim aktivitesi sağlar. Sıcaklık artışıyla enzimatik reaksiyonun hızındaki artış sıcaklık belli bir değere yükselinceye kadar devam eder. Maksimum hıza ulaşıldığındaki sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Daha yüksek sıcaklıklarda enzim protein yapısında

olduğundan denatüre olarak aktivitesini kaybeder ve reaksiyon hızı azalır (Altınışık 1999).

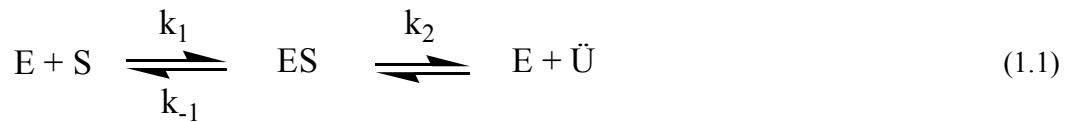
1.1.4. Enzimatik reaksiyonlar üzerine substrat derişiminin etkisi

Enzim derişimi ve diğ er b ut un Şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik reaksiyon hızı, substrat derişiminin artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir V_{mak} düzeyinde sabit kalır. Substrat derişimi artsa bile reaksiyon hızı değişmez (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

Enzim-substrat (ES) kompleksine ait reaksiyon,



Bu eşitlikte; E= enzim, S= substrat, ES= enzim-substrat kompleksi, $\ddot{U}$ = ürünü gösterir.

Enzimin reaksiyon hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir:

$$V = \frac{V_{mak} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.2)$$

Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (1.3)$$

Bu eşitlikte; V = başlangıç hızı, V_{mak} = maksimum hız, K_m = Michaelis sabiti, S = substrat derişimi olarak belirtilir. Eşitlik 1.3’de $1/V$ ile $1/[S]$ arasında grafik çizildiğinde elde edilen doğrunun eğim ve kesim noktasından V_{mak} ve K_m değerleri hesaplanabilir (Karaca 2006).

1.1.6. Enzim miktarını belirleme yöntemleri

Bir protein çözeltisindeki protein miktarının belirlenmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılanı protein çözeltisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi yada proteinin bir boya ile etkileşimi sonucu oluşan renkli bileşiğin UV-görünür bölgedeki absorpsiyonunun ölçülmesi sonucunda belirlenebilir. Ayrıca bu yöntemler dışında proteindeki azot miktarının tespitine dayalı Kjeldahl yöntemi, türbidimetri, fluorimetri gibi yöntemler ile doğrudan protein miktarı belirlenebilir.

Protein miktarının belirlenmesine yönelik bazı yöntemler aşağıda verilmektedir:

1.1.6.1. Biüret metodu

Bu yöntem pratikliği nedeniyle yaygın kullanılmasına rağmen duyarlılığı düşüktür. Proteinleri oluşturan aminoasitlerin arasındaki peptid bağlarındaki azot ile alkali çözeltide Cu^{+2} iyonları arasındaki reaksiyon sonucu oluşan renkli çözeltinin kolorimetrik ölçümüne dayanır. Spektrofotometrik olarak 540-560

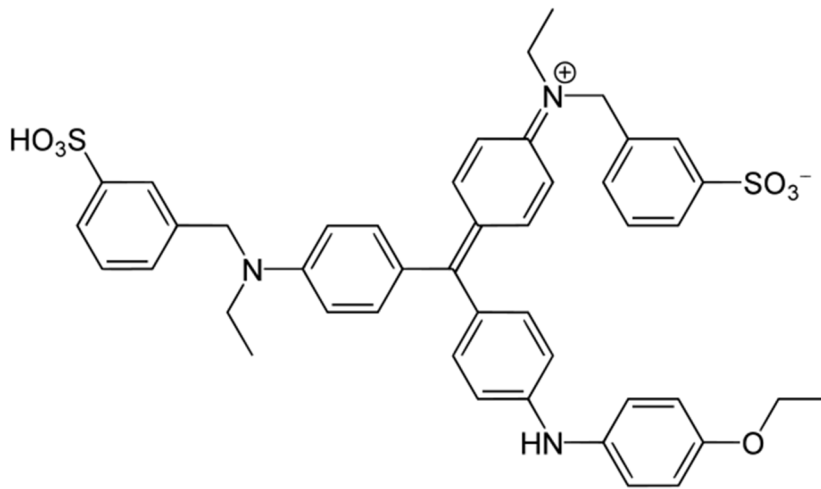
nm'deki absorpsiyon ölçümleriyle belirlenir. Duyarlılığının düşük olması (1-10 mg/ml) en büyük dezavantajdır.

1.1.6.2. Lowry metodu

En yaygın kullanılan protein tayin metotlarından biridir. Proteinlerdeki fenolik aminoasitlerle fosfomolibdik / fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Yöntem duyarlı olmasına (0,1-1 mg protein/ml) karşın pH'a bağımlıdır. Koyu mavi renk oluşumu belirleyicidir. Spektrofotometrik ölçümler 500-750 nm'de yapılır.

1.1.6.3. Bradford (coomassie blue) yöntemi

Proteinlerin asidik ve bazik gruplarının organik boyalarla uygun koşullarda etkileşerek renkli bileşik oluşturması prensibine dayanır. Farklı derişimdeki protein çözeltiğinde farklı şiddette renk oluşumu gözlenir. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılır (Şekil 1.3). Bu boya sulu ortamda kırmızı (A) ve mavi (B) olarak bulunur. Asidik ortamda kırmızı renkte ve 470 nm'de absorpsiyon gözlenir. Bazik ortamda ise mavi rengi, 595 nm'de oluşturur. Yöntem oldukça duyarlıdır (5-100 µg protein/ml).



Şekil 1.3. Coomassie Brilliant Blue G-250 yapısı

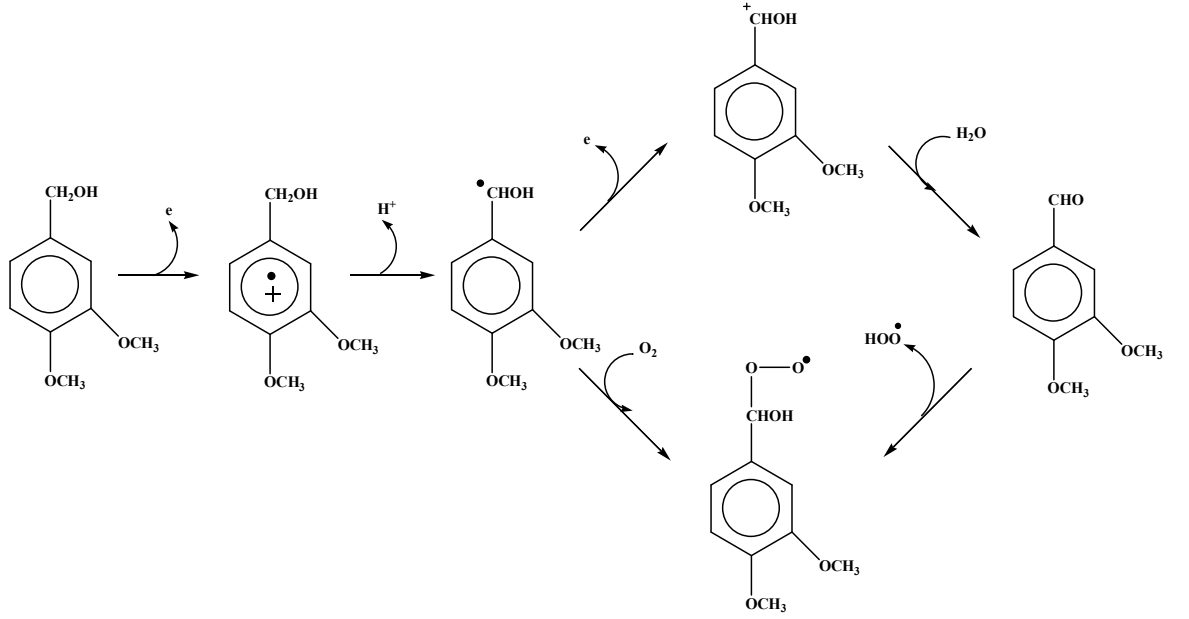
1.1.7. Lignin peroksidaz enziminin yapısı ve özellikleri

Peroksidazlar hem (heme) grubu içeren enzimlerdir. Lignin peroksidaz (E.C. 1.11.1.14), ilk kez 1983 yılında *Phanerochaete chrysosporium*'un kültür sıvısında keşfedilmiştir (Karam ve Nicell 1997). Lignin peroksidaz (LİP), genel olarak beyaz çürükçül funguslar tarafından, hücre zarının dışında mikroorganizmaların sekonder metabolizmaları sırasında sentezlenir (Şekil 1.4). LİP yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığında, asidik izoelektrik nokta ve optimum pH değerine sahip bir enzimdir. Enzimin optimum pH'ı (~2,5) olmasından dolayı elektron yönünden zengin fenol içermeyen aromatik lignin modellenli substratları okside edebilir (Schoemaker ve Piontek 1996).



Şekil 1.4. Lignin peroksidazın kristal yapısı (Pdb data bank)

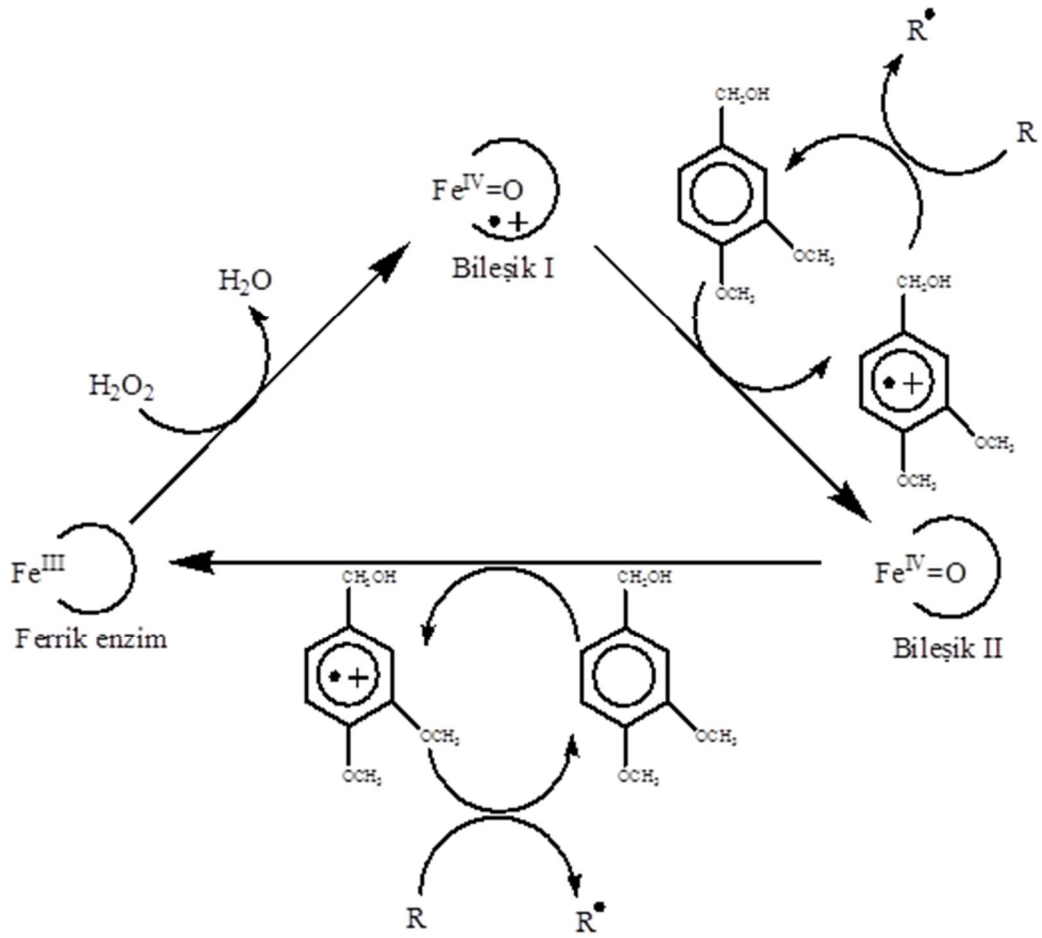
Lignin peroksidaz, oksidasyon, hidroksilasyon ve aromatik halkadaki bağların koparılması gibi reaksiyonları katalizler. Bütün bu reaksiyonlar, lignin bileşeninin enzim tarafından H_2O_2 aracılığı ile tek elektron oksidasyonu yoluyla oksitlenmesi ile gerçekleşmektedir (Karam ve Nicell 1997). Ligninazın aktivite tayinlerinde, model bileşik olarak veratril alkol kullanılır (Şekil 1.4). Veratril alkol bir sekonder metabolittir ve ligninaz tarafından veratril aldehite dönüştürülür (Leisola ve ark. 1987). LİP enziminin yüksek redoks potansiyeline sahip olması nedeniyle poliaromatik hidrokarbonlar için iyi bir yükseltgendir.



Şekil 1.5. Veratril alkol oksidasyon mekanizması (Schmidt ve ark. 1998)

Lignin peroksidaz (LiP), lignin ve benzeri bileşikleri oksitleyebilmek için hidrojen peroksit (H_2O_2) ihtiyaç duyar.

Doğal enzimde (ferri formu) bulunan porfirin halkasındaki Fe öncelikle H_2O_2 'in $2e^-$ vermesiyle oksitlenir, bu şekilde enzimin oksidasyon bölgesinde $2e^-$ oluşur. Enzimdeki prostetik grubun H_2O_2 ile oksidasyonu ile Fe^{3+} ve porfirin halkasından $1e^-$ ayrılarak, Fe^{4+} ile porfirin katyon radikal oluşur. Bileşik I uygun indirgen substrat varlığında Fe^{4+} ara ürünü (Bileşik II) aracılığıyla iki basamakta tekrar doğal enzime indirgenir (Dizge 2007) (Şekil 1.6.). LiP enziminin katalitik döngüsündeki ilk iki reaksiyon hızlı gerçekleşirken Bileşik II'nin reaksiyonu daha yavaştır.



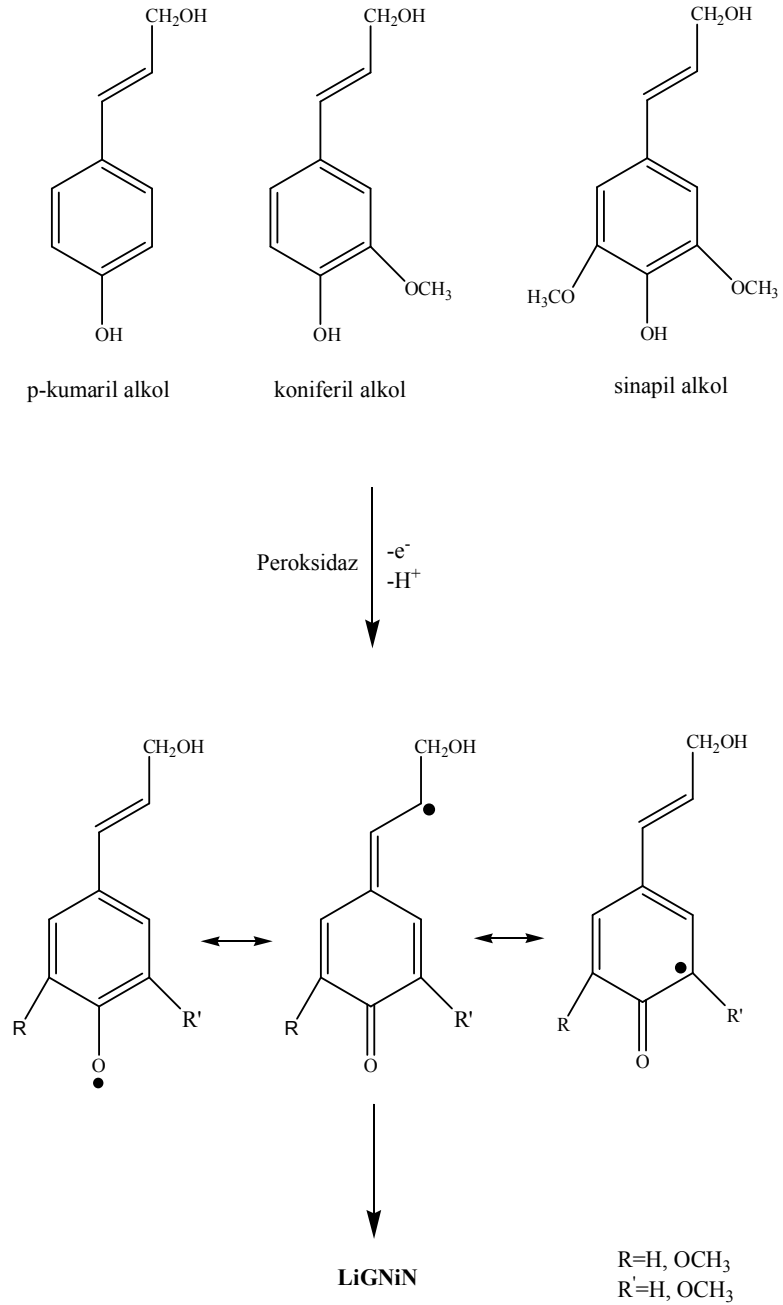
Şekil 1.6. Lignin peroksidaz enziminin katalitik döngüsü

1.2. Lignin

Lignin çoğu bitkide selülozdan sonra en bol bulunan aromatik biopolimerdir. Odunların genellikle %20-30'unda bulunur ve öncelikli olarak bitki hücreleri ve duvarları arasında lokalleşmiştir. Ligninin hücre duvarlarına yapısal dayanıklılık verdiği ve selülozu mikrobik saldırıdan koruduğuna inanılır. Bu nedenle lignin bozulma prosesleri, çevresel karbon döngüsünün hız sınırlayıcı basamağıdır. Ligninin bozunması hücre dışındaki çevrede beyaz kök mantardaki peroksidazlar ve hidrojen peroksitin mantar tarafından serbest radikal oksidasyonu ile gerçekleşir böylece lignin depolimerizasyonu olur. Beyaz kök mantarın lignin bozunmasındaki serbest radikal oksidasyon mekanizması, tehlikeli çevresel kirliliklerin bozunmasında gerçekleştirir (Mayer 1997). Bu yenilenebilir

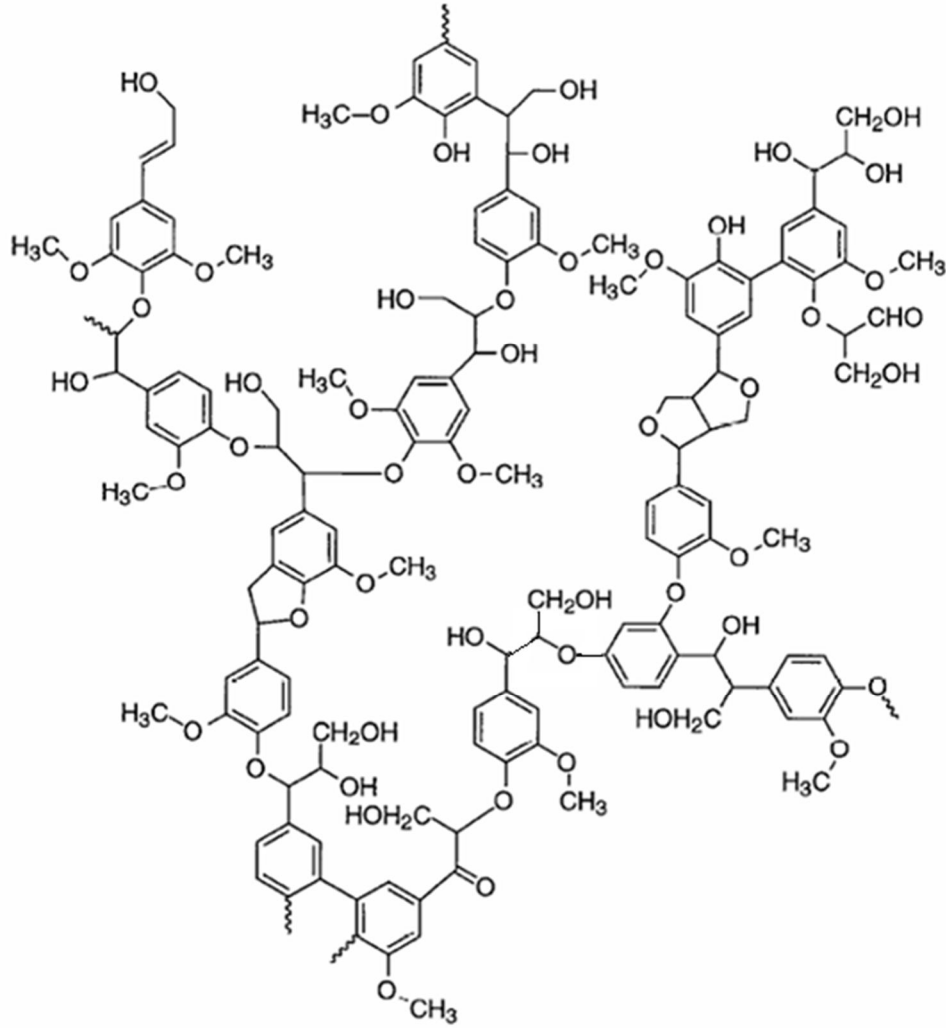
biopolimerin bolluğundan ve doğal inertliğinden dolayı biobozunma ve bioteknolojik alanda yararlanılmaktadır.

Lignin bitkilerde p-hidroksisinnamil alkol öncülerinden p-kumaril alkol, sinapil alkol ve en önemlisi koniferil alkolün peroksidaz-başlatıcılı radikal polimerizasyonu ile sentezlenir (Şekil 1.7) (Sheng 1997).



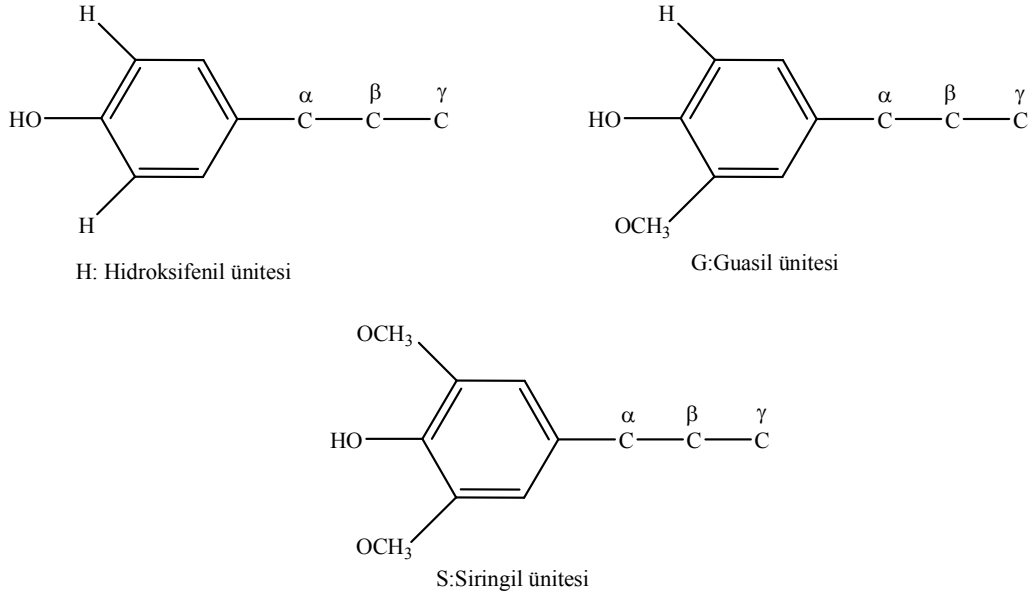
Şekil 1.7. Bitkilerdeki p-hidroksisinnamil alkolden lignin sentezi

Her monomerin ilgili miktarı bitki türleri ile çeşitlilik göstermektedir. Ligninin altyapısı farkından dolayı son ürün kimyasal olarak eşsizdir. Lignin stereodüzensiz bir yapıdadır (Şekil 1.8). Oldukça çoklu dağılımlı ve fenilpropan birimleri bulunduran kısmen çapraz bağlı ve bununla bağlantılı çeşitli karbon-karbon ve eter bağları içeren bir polimerdir (Sheng 1997).



Şekil 1.8. Lignin model yapısı (Adler 1977)

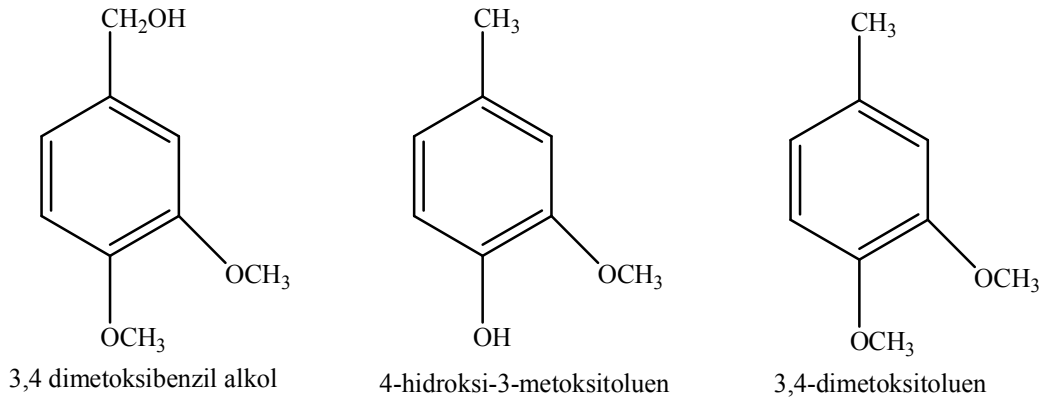
Fenilpropan bağları arasında 10'dan fazla zincir tipi vardır. Ana zincir tipi 1,2; 4,5; 6,7; 7,8; 9,10 birimleri arasında bulunan β -O-4 zincir tipidir. Şekil 1.9'da görüldüğü üzere lignin yapısında hem fenolik hem de okside etmesi zor nonfenolik yapı birimleri bulunmaktadır (Sheng 1997).



Şekil 1.9. Lignin yapısında bulunan fenilpropan üniteleri (α , β ve γ C konumlarına aromatik gruplar bağlanabilir)

Lignin ayrıştırılmasında birçok enzim denenmesine rağmen 1980'lerin öncesinde sadece lakkaz karakterize edilebilmiştir. 1980'nin başında iki önemli peroksidaz olan lignin peroksidaz (LİPs, 1983) ve mangan peroksidazın (MnPs, 1984) keşfinden sonra bir dizi enzim mantardan izole edilmiş ve uygulanmıştır (Kirk ve Farrell 1987).

Ligninin yapısı, bazı model bileşikler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Lignin model bileşikleri Şekil 1.10'da verilmiş ve bunlar 3,4-dimetoksibenzil alkol (veratril alkol), 4-hidroksi 3-metoksitoluen, 3,4-dimetoksitoluendir.

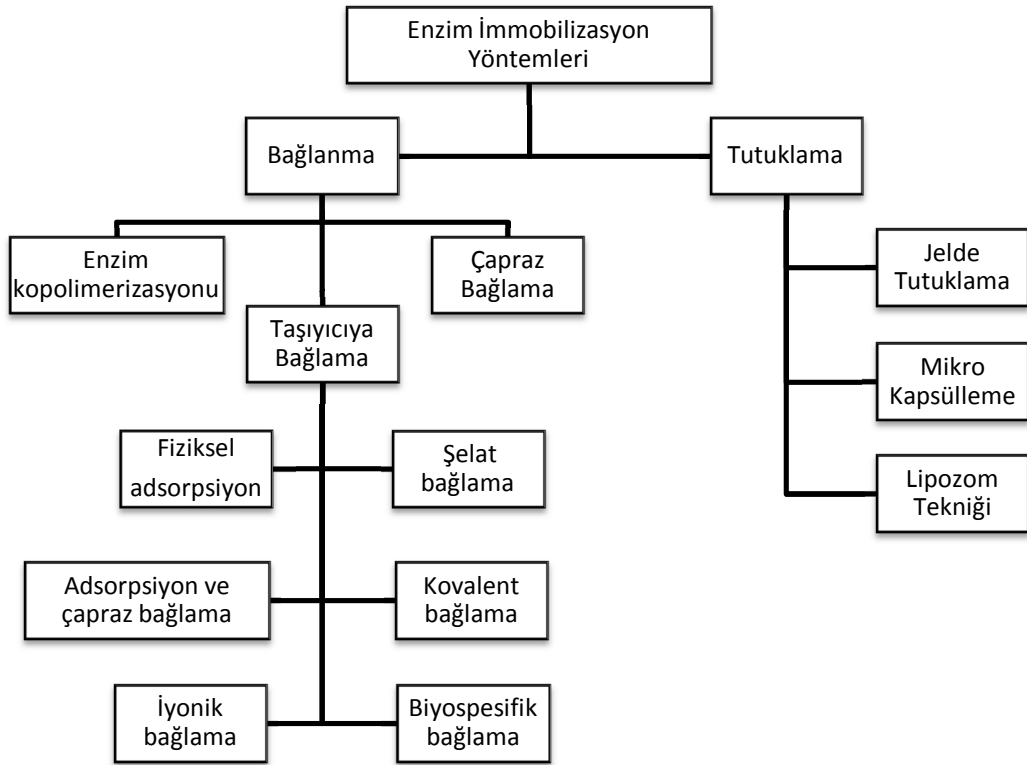


Şekil 1.10. Lignin model bileşikleri

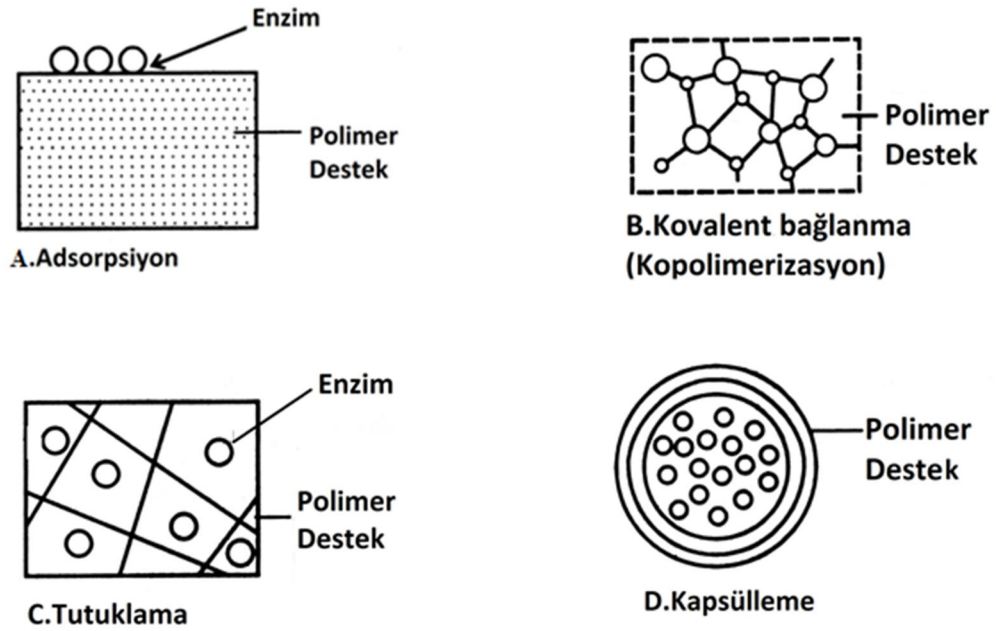
Peroksidazların lignin bozunmasında büyük rol oynadıkları bilinmesine rağmen, canlı dışı çalışmalarda saf enzimlerin kullanılmasıyla fenolik bileşiklerin polimerizasyonun gerçekleştiği ve birçok kimyasalın mantar ile bozunmasının imkansız hale geldiği görülmüştür. Buna ek olarak LİP enzimi, yüksek pH'da etkisiz olmasına karşın pH azaldıkça aktivitesi artmaktadır. Diğer dezavantajları LİP enziminin yüksek sıcaklıkta, düşük veya yüksek pH'da, hidrojen peroksitin aşırısında veya organik çözücünün derişimi arttırıldığında denatüre olmaktadır. LİP enziminin fiziksel sınırlamalarına ek olarak çözünür enzim kullanımı uygun maliyette değildir. Bu gibi dezavantajlar çözünür LİP enziminin atık su arındırılması gibi potansiyel uygulamalarda kullanımını sınırlandırmıştır (Mayer 1997).

1.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda, fiziksel ve kimyasal bağlanma olmak üzere iki çeşit bağlanma yöntemi gözlenir. Kimyasal yöntemde, enzim ve destek arasında kovalent bağlar oluşurken, fiziksel yöntemde enzimin desteğe daha zayıf bağlarla bağlandığı (hidrojen bağı vb.) görülür. Şekil 1.11 ve 1.12'de enzim immobilizasyon yöntemleri tablo ve şematik olarak verilmiştir.



Şekil 1.11. Enzim immobilizasyon yöntemleri



Şekil 1.12. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

1.3.1. Adsorpsiyon

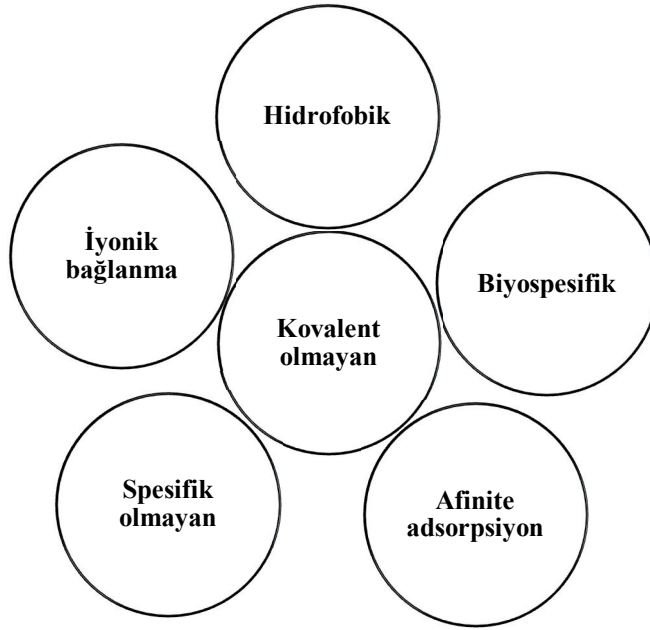
Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonu, enzim immobilizasyon metotları arasında ilk sırada yer alır. Adsorpsiyon bir katının veya sıvının sınır yüzeyindeki derişiminin değışmesi olayıdır. Derişim artmasına pozitif adsorpsiyon azalmasına ise negatif adsorpsiyon denir. Adsorpsiyon metoduyla immobilize edilen ilk enzim Nillson ve Griffin tarafından 1916 yılında rapor edilmiştir. Bu çalışmada odun kömürüne immobilize edilmiş invertazın katalitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Endüstride immobilize enzimin ilk kullanımı aminoasit amidaz 'ın DEAE-selüloz üzerine adsorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir .

Son yıllarda, özgün avantajlarından dolayı adsorbe enzim immobilizasyon teknikleriyle yoğun olarak çalışılmaktadır.

- Tersinirlik, hem proteinlerin saflaştırılmasına, hem de destek maddenin tekrar kullanımına olanak sağlar.
- Basitlik, ılımlı koşullarda enzim immobilizasyonunu mümkün kılar.
- Kimyasal bir değışiklik olmadığı için kovalent immobilizasyona göre kalan aktivite yüksektir.

Genellikle adsorpsiyon ile hazırlanan immobilize enzimler taşıyıcı zayıf bağlanma eğilimindedirler, bu enzim ile taşıyıcı arasındaki zayıf etkileşimden dolayıdır. Bu sorun desorpsiyon kuvvetleri (yüksek iyonik şiddet, pH vb.) ile ortadan kaldırılabilir. Bazen de enzim uygun taşıyıcıya çok güçlü adsorbe olabilir veya adsorpsiyon uygulanan koşullarda yeterli uygunlukda gerçekleşir.

Kimyasal değışimler olmadan taşıyıcıya enzim adsorpsiyonu ilk geliştirilen yöntemdir. Buna rağmen bu tip enzim immobilizasyonu birçok alt sınıfı içinde barındırır. Kovalent olmayan bağlanma yoluyla birçok enzim immobilizasyonu sınıflandırılabilir, örneğin spesifik olmayan fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlanma, koordinasyon (metal şelatlaşma) ve affinite adsorpsiyon. Non-kovalent taşıyıcı-bağlı enzim immobilizasyonu metotsal şemayla Şekil 1.13'de verildiği şekilde gösterilebilir:



Şekil 1.13. Enzimlerin taşıyıcıya bağlanmasında kovalent olmayan adsorpsiyon yöntemleri

- **Non-spesifik fiziksel adsorpsiyon:** Non-spesifik kuvvetlerin etkisiyle enzim adsorbe olur (Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve hidrofilik etkileşim).
- **Bio-spesifik adsorpsiyon:** Enzim adsorpsiyonu için genellikle immobilize ligandlar kullanılır böylece biyospesifik olur.
- **Afinite adsorpsiyon:** Immobilize boyalar veya immobilize metaller içindir.
- **Elektrostatik etkileşimler (iyonik bağlanma):** Taşıyıcı ve enzim arasında yük-yük etkileşimine dayanır.
- **Hidrofobik etkileşim:** Enzim ve taşıyıcının hidrofobik bölgeleri etkileşimine dayanır.

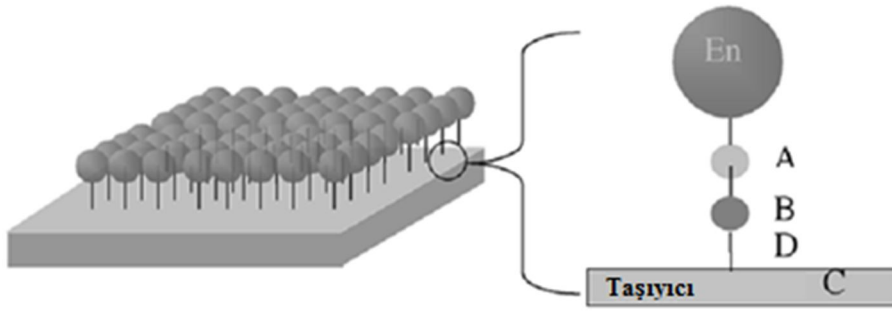
Temel olarak, her çeşit taşıyıcı (sentetik, doğal oluşan veya çözünmez organik veya inorganik) enzim adsorpsiyonu non-spesifik bağlanmada (fiziksel adsorpsiyon) kullanılabilir. Non-spesifik fiziksel adsorpsiyondan başka adsorpsiyon için bağlanma özelliği, örneğin iyonik adsorpsiyon için yüklü

gruplar, hidrofobik etkileşim için hidrofobik uçlar, affinite adsorpsiyonu için immobilize ligandlar vb. taşıyıcıda bulunmalıdır (Cao 2005).

1.3.2. Kovalent bağlama

Uygun bir desteğe kovalent bağlı enzim sistemleri enzim immobilizasyonu için geliştirilen ikinci metottur. 1950'lerden beri kovalent enzim immobilizasyonu gelişmekte ve günümüzde büyük önem kazanmaktadır. Çünkü kovalent bağlar, enzim ve destek arasında diğer metotlarla kıyaslandığında çok güçlü bir bağlanma sağlar. Böylece enzimin matrisinden sızma ihtimali kovalent bağlı immobilize enzimlerde minimuma iner.

Genel olarak taşıyıcıya enzimlerin kovalent bağlanması enzim yüzeyinde lokalleşmiş aktif amino asit kalıntıları (A) ve taşıyıcı yüzeyine saldırmış aktif fonksiyoneller (B) arasındaki kimyasal reaksiyona dayanır. Etkili bir bağlanma için taşıyıcı ve/veya bağlanılacak enzimler kullanılmadan önce fonksiyonları aktifleştirilir (Şekil 1.14). Bu işlem genelde taşıyıcıya uygulanır (Cao 2005).



Şekil 1.14. Taşıyıcıya enzimin kovalent immobilizasyonu: (A) aktif aminoasit kalıntıları; (B) taşıyıcının bağlanma özelliği olan kısmı; (C) taşıyıcı; (D) boşluk (Cao 2005)

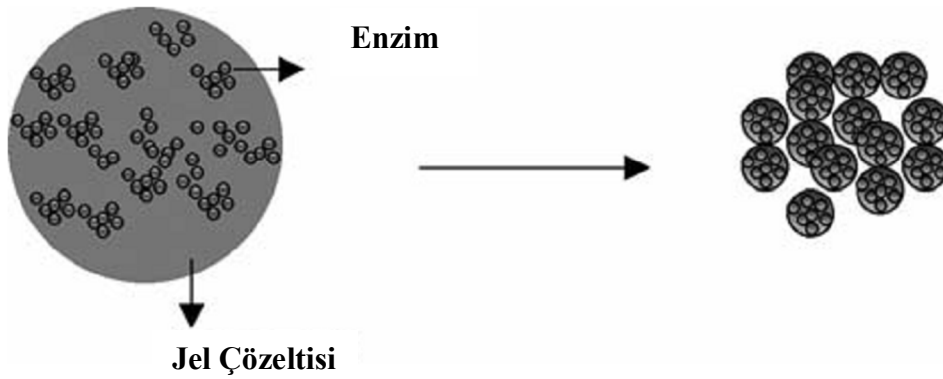
1.3.3. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama işleminde, enzimler arasında küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler kullanılır. Bu şekilde suda çözünmeyen kompleksler oluşturulur. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyon yöntemi basitliğine rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların bağlayıcı olarak kullanılması için gereken şartların seçimi ve oluşumu bakımından zordur (Sanjay ve Sugunan 2006). Bu yöntemin en önemli avantajı tek bir işlemde enzim immobilizasyonu için çok fonksiyonlu reaktiflerin kullanılabilmesi, dezavantajı ise oluşan reaksiyonların kontrolünün zorluğudur.

Enzim immobilizasyonunda; 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, diazobenzidin, glutaraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları, epiklorhidrinler, heksametilen diizosiyanat, 2,4- diizotiyosiyano-toluen gibi çok fonksiyonlu maddeler çapraz bağlayıcı olarak kullanılırlar (Gürsel ve ark. 2003).

1.3.4. Enzim tutuklanması

Adsorpsiyon ve kovalent immobilizasyon yönteminden sonra geliştirilen üçüncü yöntem tutuklama ile immobilizasyondur. Tutuklama tekniği bütün enzim immobilizasyon yöntemlerinden ve hücre temelli immobilize enzimlerden en basitidir. Bu metot ayrıca eş zamanlı birden fazla enzim immobilizasyonunun karakterizasyonuna olanak sağlar (Cao 2005).



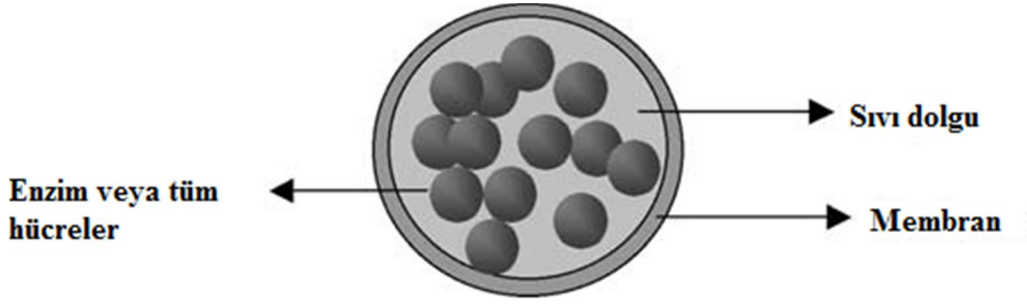
Şekil 1.15. Biyokatalizörlerin hapsedilmesi (Cao 2005)

1.3.5. Enzim kapsülleme

Enzim kapsülleme, enzim preparatının fiziksel bir bariyer gibi membran tarafından sarılmasıdır. Tutuklamanın kapsüllemeden farkı, immobilize enzimlerin küresel membran ile sınırlandırılmasıdır. Diğer kapsülleme teknikler, sol-jel prosesi gibi tutuklamaya dahil edilir çünkü enzim membran değil bir matriks içinde sınırlandırılmaktadır (Şekil 1.16). Buna rağmen oluşan sol-jel matriksindeki enzimin mikroskobik yapısına bakıldığında kapsüllenmiş enzime benzemektedir. Enzim kapsülleme metotları genellikle şu şekilde kategorize edilmiştir:

- Enzim sıvı damlacıklarının etrafındaki katı kabukların oluşumunun arayüzey proseslerine,
- Hazırlama için faz inversiyon metotlarına,
- Kalıp süzmesine,
- Hızlı yükleme kapsüllemesine göredir.

Diğer enzim immobilizasyon teknikleri ile karşılaştırıldığında, kapsülleme tekniğinin özellikleri birden çok enzimin eşzamanlı olarak immobilize edilebilmesi ve genelde ılımlı koşullar kullanılmasıdır.



Şekil 1.16. Yarı geçirgen zarlı membranda fiziksel sınırlı kapsüllenmiş enzim

Mikro-kapsülleme çözünmüş, liyofilize veya tam-hücre katalizörler enzim preparatların fiziksel veya kimyasal olarak 1-100 μm çaplı küre yarı-geçirgen polimer membranlarda sınırlandırılma proseslerin de tercih edilir.

Kapsül içindeki enzimler kimyasal olarak değiştirilmemesine rağmen enzim moleküllerinin sızıntısını önlemek için çözünmez hale getirilmek istenir (Cao 2005).

1.3.6. Adsorpsiyon izotermi

Adsorbentle temas ettirilen çözeltide hem çözücü hem de çözünen adsorpsiyonu gerçekleştiğinden toplam adsorpsiyon ölçülemez. Çözünenin bağlı veya görünen adsorpsiyonu tayin edilir. Adsorbente adsorplanan madde miktarı, sıcaklığa ve adsorplanan maddenin derişimine göre değişir. Sabit sıcaklıkta adsorplanan madde miktarı derişimin fonksiyonu olarak hesaplanır (Özyılmaz 2007). Sabit sıcaklıkta ve denge durumunda adsorplanan miktar ile çözeltide adsorplanmadan kalan arasındaki oran adsorpsiyon izotermi ile belirlenir. Literatürde kullanılan birçok adsorpsiyon izotermi vardır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan izotermi Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermidir.

1.3.6.1. Langmuir adsorpsiyon izotermi

Bu izoterm 1916'da Irving Langmuir tarafından geliştirilen ve tek tabaka adsorpsiyonun matematiksel olarak ifade eden bir modeldir. Langmuir, yüzey

kimyası alanındaki keşifleri ve araştırmalarıyla 1932 yılında Nobel ödülünü kazanmıştır. Langmuir izotermi bazı varsayımlar ile açıklanmıştır.

1. Adsorbanın yüzeyi, yüzeye güçlü ilgisi olan adsorplanacak maddeyi içeren bir çözelti ile temas etmektedir.
2. Katı yüzeyi çözücü moleküllerinin adsorbe edilebileceği, belirli sayıda adsorpsiyon bölgesi içerir. Homojen yüzeye sahip olduğu için bütün adsorpsiyon yüzeyleri aynı aktiviteyi gösterir.
3. Adsorpsiyon tek tabaka halinde oluşur (Sime 1990).

Langmuir adsorpsiyon izotermi adsorpsiyonu tanımlayan izotermeler içinde en iyi bilinen izotermidir ve genellikle aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir:

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1.4)$$

q_e : Çözünen maddenin denge derişimindeki adsorpsiyon yoğunluğu (mg adsorplanan madde / g adsorbent)

C_e : Çözeltideki adsorplanan maddenin derişimi (mg/L)

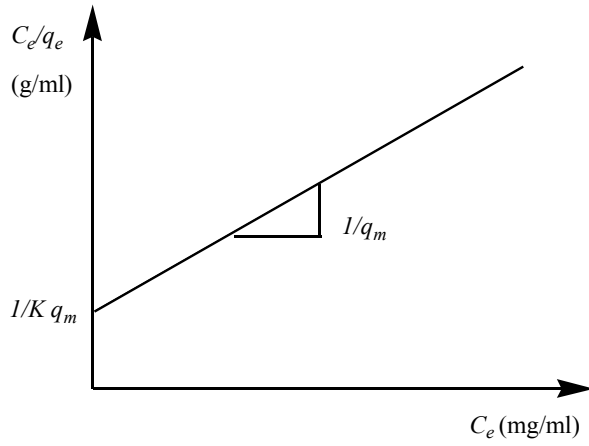
q_m : Tek tabakalı tam kaplamaya ilişkin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg adsorplanan madde / g adsorbent)

K_L : Adsorpsiyon enerjisi ile ilgili Langmuir sabitidir (mg adsorplanan madde/ litre adsorbent).

Eşitlik (1.4) aşağıdaki gibi lineerleştirilirse;

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad (1.5)$$

Y eksenindeki C_e 'ye karşı C_e / q_e grafiğinin çizilmesi ile elde edilen doğrunun eğiminden q_m ve kesiminden Langmuir izoterm sabiti K_L bulunabilir (Şekil 1.17)(Muhammad ve ark. 1998).



Şekil 1.17. Langmuir adsorpsiyon izotermi

1.3.6.2. Freundlich adsorpsiyon izotermi

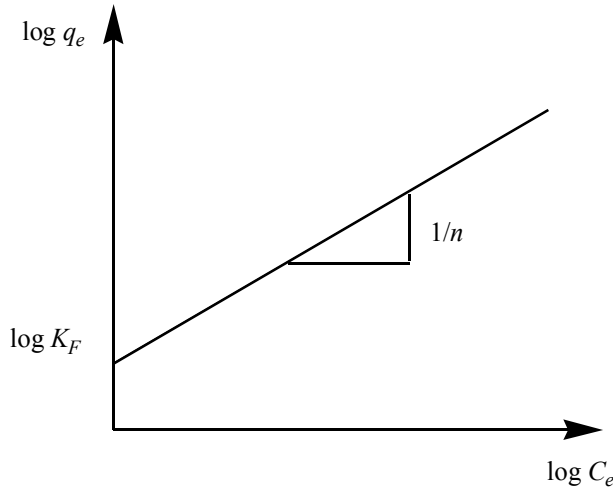
Freundlich adsorpsiyon izotermi heterojen yüzey yapısına sahip adsorbentler için geçerli bir izotermdir. Dengede adsorbentin gramı başına adsorplanan adsorbanın miktarı q_e ve adsorbanın derişimi C_e ile verilirse Freundlich eşitliği aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (1.6)$$

Burada K_F ve n Freundlich sabitleridir. Eşitlik (1.6)'da her iki tarafının logaritmasının alınması ile eşitlik lineerleştirilebilir ve bu sabitler tayin edilebilir.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (1.7)$$

$\log q_e$ 'nin $\log C_e$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde, eğimi $1/n$ ve y eksenini kesim noktası $\log K_F$ olan düz bir doğru verecektir (Şekil 1.18) (Demirbaş 2006).



Şekil 1.18. Freundlich adsorpsiyon izotermi

1.4. Destek ve İmmobilizasyon Metodu Seçimi

Çözünebilir enzim molekülleri çözeltide çözülerek dağılmış diğer moleküller gibi serbest harekette davranır. Enzim immobilizasyonu enzimin serbest hareketini sınırlamak için geliştirilen bir tekniktir. Çoğu hücre doğal olarak genelde bir yüzeye tutunur, immobilizasyon bunun için hücrelere fiziksel taşıyıcı sağlar. Öncelikle karar verilmesi gereken destek maddesi için kullanıma ve uygulamaya yönelik immobilizasyon metodu seçmektir. Destek malzemenin seçimi immobilize enzimin performansını önemli ölçüde etkilediğinden dolayı çok önemlidir. Her madde için aynı destek kullanılmamasına rağmen destek malzemelerinde aranılan bazı ortak özellikler vardır (Bickerstaff 1997).

Destek adsorbentlerde aranan bazı ortak özellikler:

- Fonksiyonel gruplar
- Gözenekli yapı ve yüzey alanı ($>100 \text{ m}^2/\text{g}$)
- Hidrofobisite
- Çözünmezlik
- Mekanik kararlılık ve sertlik (rigitlik)
- Desteğin şekli ve partikül büyüklüğü
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Yenilenebilirlik

- Ucuzluk
- Zehirsizliktir (Tischer ve Wedekind 1999).

Çizelge 1.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri (Kaetsu ve ark. 1979)

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimer	Kil
Nişasta	Akrilamit esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Metal oksitler
İpek		Bentonit

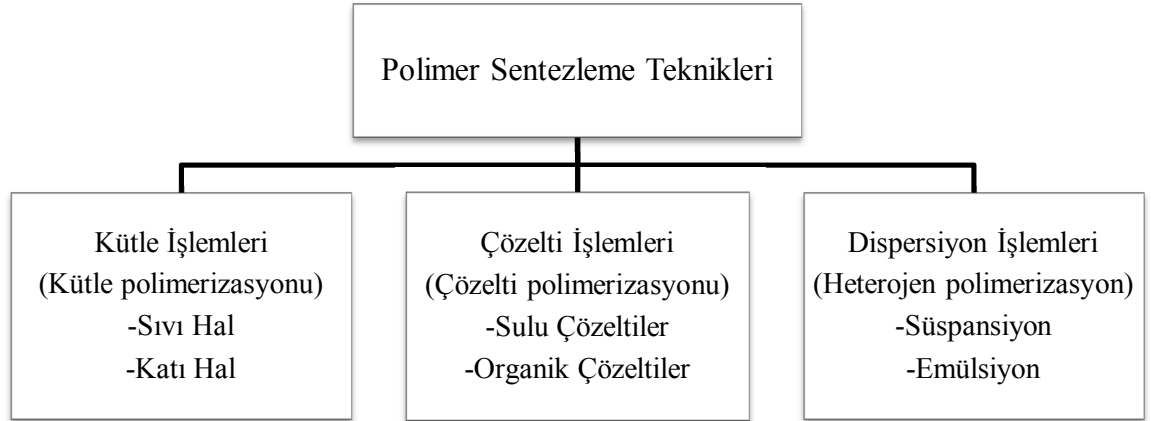
1.5. Polimerler

Polimerler, çok sayıda aynı ya da farklı molekülün kimyasal bağlarla az ya da çok düzenli bir şekilde bağlanarak oluşturdukları uzun zincirli, yüksek molekül kütleli bileşiklerdir. Polimer moleküllerini oluşturmak üzere birbirleriyle kimyasal bağlarla bağlanan küçük moleküllere ‘monomer’ denir. Monomer birimlerinden başlayarak polimer moleküllerinin elde edilmesine yol açan reaksiyonlara ise polimerizasyon reaksiyonları denir. Bir polimer molekülünde yapı birimlerinden binlerce veya daha fazlası birbirine bağlanır. Monomer maddeler genel olarak yapılarında çift bağ, üçlü bağ, iki veya daha fazla fonksiyonel grup bulundurlar (Basan 2001, Tay 2004).

Polimerler; hafif, ucuz, mekanik özellikleri çoğu kez yeterli, kolay şekillendirilebilen, değişik amaçlarda kullanıma uygun, kimyasal açıdan inert ve korozyona uğramayan maddelerdir. Bu üstün özelliklerinden dolayı polimerler makine, kimya, tekstil, endüstri, ve fizik mühendisliği gibi alanlarda da çalışanların ilgisini çekmektedir (Saçak 2008).

1.5.1. Polimerizasyon yöntemleri

Polimer üretim teknikleri Şekil 1.19 'daki gibi üç farklı kategoriye ayrılabilir.



Şekil 1.19. Polimer sentezleme teknikleri (Braun ve ark. 2005)

Kütle ve çözelti polimerizasyonları homojen işlemlerken, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları heterojen işlemlerdir (Oadian 2004).

1.5.1.1. Kütle (bulk) polimerizasyonu

Kütle polimerizasyonunda çözücüler ve süspansiyon yapan sıvılar yerine sadece monomer bulunur. Polimerizasyon başlatıcısı monomerde çözünür. Bu proses, sadece monomer polimerizasyonuna dayandığı için oldukça saf polimerler elde edilmesi en önemli özelliğidir. Polimerizasyondan sonra oluşan ürün ayırma, saflaştırma gibi proseslere gerek duyulmadan doğrudan kullanıma sunulabilir.

Kütle polimerizasyonunda polimer derişimi ve molekül ağırlığı arttıkça ortamın viskozitesi artar. Bu yüzden karıştırma verimi ve ısı transfer hızı azalmaktadır. Böylece yüksek molekül kütleli polimerler oluşturulmamakta, viskozitesi düşük polimerler kolaylıkla karıştırılmaktadır. Özellikle kondenzasyon

polimerizasyonuna uygundur. Bu gibi sorunlar monomerin reaksiyon ortamına girmeyen kısmını geri dönüşümü ve ortamdan ayrılmasıyla ve düşük dönüşümlü polimerizasyon yaparak giderilebilir (Oğian 2004).

1.5.1.2. Çözelti polimerizasyonu

Çözelti polimerizasyonu endüstriyel polimerizasyon metodudur. Bu prosedürde, monomer reaktif olmayan ve içinde katalizör bulunduran çözücü içinde çözünmüştür. Reaksiyon sonunda oluşan polimer seçilen çözücüde çözülebilir özelliktedir. Reaksiyonda oluşan ısı çözücü tarafından emilir ve böylece reaksiyon hızı azalır. Bu duruma ek olarak reaksiyon karışımının viskozitesi azalır, yüksek monomer derişimlerinde hızlanmaya izin vermez. Tek seferde maksimum veya istenilen dönüşüme ulaşıldığında, çözücünün aşırısı saf polimer elde etmek için kaldırılmalıdır. Bu yüzden çözelti polimerizasyonu, çözücü istenilen uygulamalarda kullanılır. Bu metotla elde edilen ürünlere yapışkanlar ve parlaticılar örnek olarak gösterilebilir. Kuru polimerlerin üretiminde, tüm çözeltinin ortamdan uzaklaştırılması zorlaştıracığından dolayı çözelti polimerizasyonu tercih edilmez. Bu proses tek kullanımlık bezdeki süper emici polimer sodyum poliakrilat üretiminde kullanılan işlemlerden biridir. Ayrıca önemli polimerlerden poliakrilonitril (PAN) ve poliakrilikasit (PAA) çözelti polimerizasyonu ile üretilir (Smith ve Hashemi 2003).

Çözelti polimerizasyonun avantajları:

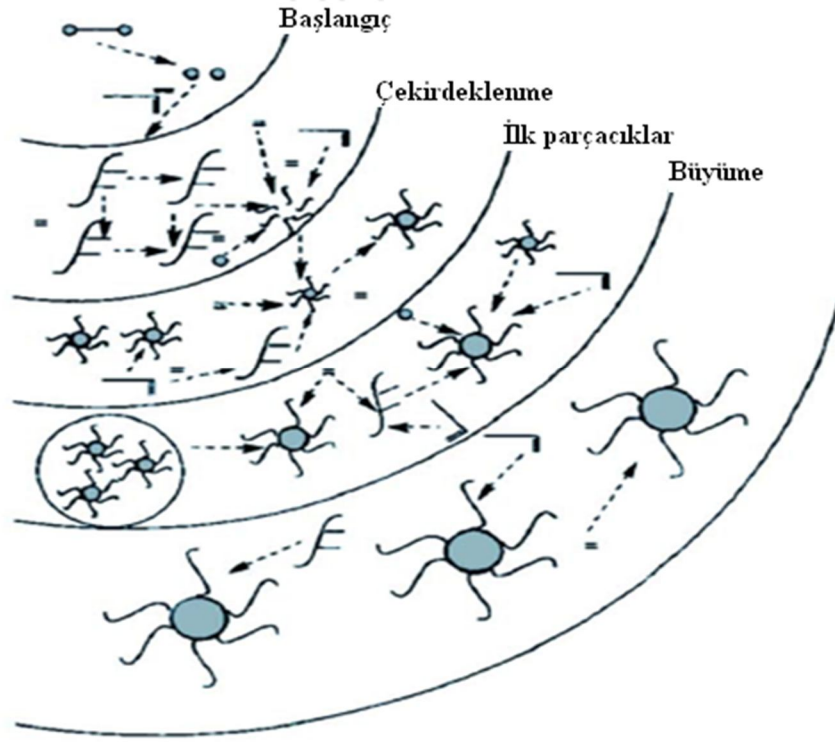
- Çözücü inceltici olarak davranır ve polimerizasyon ısısının uzaklaştırılmasına yardımcı olur.
- Çözücü viskoziteyi azaltır, prosesi kolaylaştırır.
- Sıcaklık kontrolü kütle (bulk) polimerizasyonundan daha kolaydır.

Çözelti polimerizasyonun dezavantajları:

- Çözücüde oluşan zincir transferleri düşük molekül kütlelerine yol açar.
- Son halinden çözücüü uzaklaştırmak zordur, bu kütle özelliklerinde bozunmaya sebep olur.
- Çözücü salınımından dolayı çevresel kirliliğe neden olur (Frank 2001).

1.5.1.3. Dispersiyon polimerizasyonu

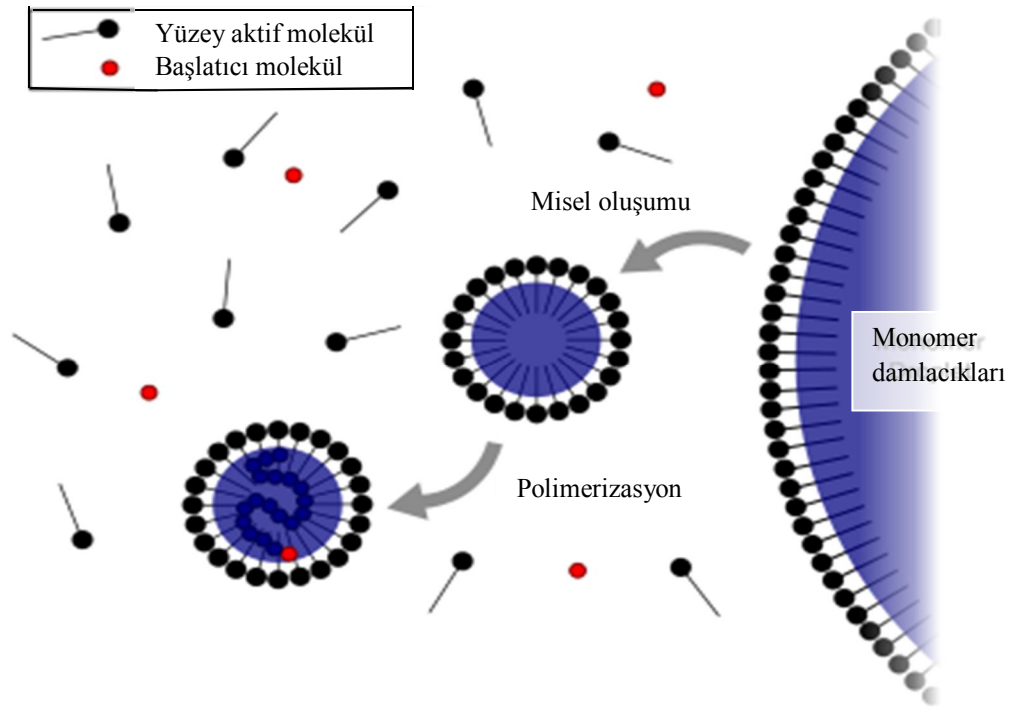
Çoğu polimer reaksiyonları, özellikle zincir polimerizasyonu heterojen koşullarda gerçekleşir. Burada sıvı monomer küçük damlacıklar halinde dağılmış durumda çözünmez ve polimerize olurlar. Reaksiyon sırasında, makro moleküller katılırken dağılmış faz yığınınında değişiklikler oluşur (Şekil 1.20). Böylece, orjinal sıvı/sıvı dispersiyon (emülsiyon), katı/sıvı dispersiyon (süspansiyon) halini alır. Eğer polimer monomerde çözünmezse, poliakrilonitrilde olduğu gibi reaksiyonda değişim erken meydana gelir. Bir başka açıdan eğer monomerde çözünür veya monomer tarafından sarılırsa, polistirende olduğu gibi emülsiyondaki değişim hali sadece yüksek dönüşümde olur. Bu gibi benzerlikler dışında iki prosesdeki farklılıklar, oluşan polimer parçacıklarının boyutu ve reaksiyon kinetiğidir (Braun ve ark. 2005).



Şekil 1.20. Dispersiyon polimerizasyonu süreci (Kim 2007)

1.5.1.4. Emülsiyon polimerizasyonu

Radikal polimerizasyonun bir tipi olan emülsiyon polimerizasyonu genellikle su, monomer ve yüzey aktif maddenin birleşmesiyle oluşan emülsiyondur. Emülsiyon polimerizasyonun en sık kullanılan tipi olan su içinde yağ emülsiyonudur. Bu tipte monomer damlacıkları (yağ), sürekli su fazında yüzey aktif madde ile emülsiyonlaştırılmıştır. Suda çözünen polimerlerden, belirli polivinilalkoller veya hidroksietil selülozlar emülsiyonlaştırıcı (stabilizör) olarak da kullanılabilir. Polimerizasyon, emülsiyon damlacıklarında oluşması yerine, işlemin ilk dakikalarında kendiliğinden lateks parçacıklarında meydana gelir. Bu lateks parçacıkları genellikle 100nm boyutta ve özgün polimer zincirlerinden yapılıdır (Şekil 1.21). Bu parçacıklar birbirleriyle topaklaşarak dururlar çünkü her parçacık yüzey aktif madde ile çevrilidir ve yüzey aktif madde üzerindeki yük diğer parçacıkları elektrostatik olarak iter (Oadian 2004).



Şekil 1.21. Emülsiyon polimerizasyonu süreci (Kim 2007)

Emülsiyon polimerizasyonu ticari açıdan önemli polimerlerin üretiminde kullanılır. Bu polimerlerin çoğu katı malzemelerde kullanılır ve polimerizasyondan sonra sulu dispersiyondan izole edilmelidir. Aksi takdirde kendini dispersiyon etmesiyle son ürün oluşur. Emülsiyon polimerizasyonu ile sonuçlanan dispersiyona lateks veya emülsiyon denir. Bu emülsiyonlar yapışkanlar, boyamalar, kağıt kaplama ve tekstil kaplamalarda kullanılır. Bunlar bazı uygulamalarda çözücü bazlı ürünler için tercih edilir. Çünkü içinde uçucu organik bileşikler bulundurmamaları için çevre dostu özelliktedirler. Emülsiyon polimerizasyonu kesikli, yarı-kesikli, ve sürekli işlemlerde kullanılır. İşlemin seçimi istenilen son polimerin özelliklerine veya dispersiyonuna ve ürünün ekonomisine bağlıdır. Modern proses kontrol şeması, kompleks reaksiyonun prosesinin içerdiği başlatıcı, monomer, yüzey aktif maddenin eklenmesinin reaksiyonun başında, oluşumunda veya sonunda geliştirilmesiyle olur (O'dian 2004).

Emülsiyon polimerizasyonun avantajları:

- Sıcaklık kontrolü kolaydır.
- Polimer uygun, kolay işlenebilir, ve genellikle direkt kullanılabilir türde elde edilir.
- Polimer yüksek molekül kütleli şekilde elde edilebilir.
- Küçük parçacıklar toplaşmaya dirençli şekilde oluşurlar. Böylece yapışkan polimer hazırlanmasına izin verilir.
- Ters fazlı (yağ içinde su) emülsiyonu oluşabilir.

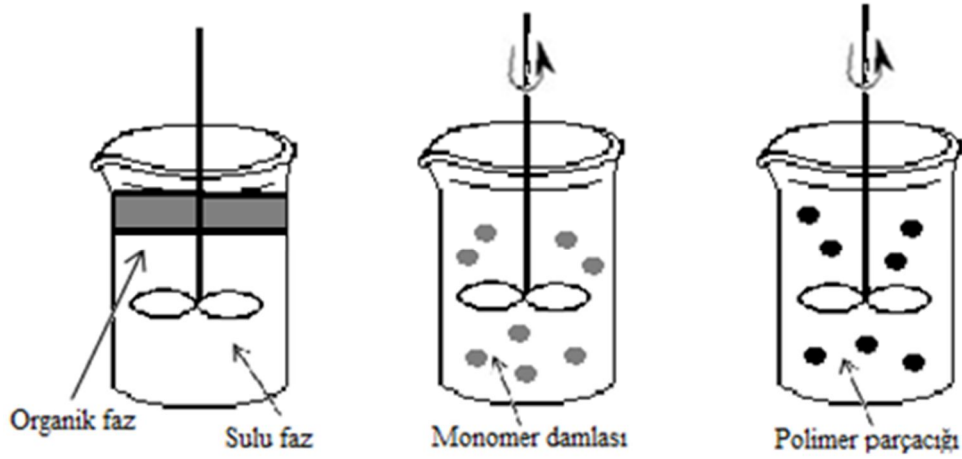
Emülsiyon polimerizasyonun dezavantajları;

- Reaktör hacmi başına düşük verim elde edilir.
- Parçacık yüzeyine adsorbe olmuş, askıda tutan maddelerdeki atıkların olması kaçınılmaz olduğundan kütle polimerizasyonundan biraz daha az saf polimer elde edilir.
- İşlemin sürekliliğini sürdürmek zordur.
- Kondenzasyon polimerizasyonu veya iyonik polimerizasyon için kullanılmazlar (Rzepa 2003).

1.5.1.5. Süspansiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyon heterojen radikal polimerizasyon işlemidir. Sıvı ortamda (genellikle su) monomer çözünmez halde bulunur. İçinde çözünmemiş süspansiyon aracı bulunan sıvı veya çözünmemiş monomerler suda asılı halde bulunurlar. Polimerizasyon işleminde çözünür başlatıcılar kullanılır ve polimerizasyon sıcaklıkla başlatılır (Gruber ve ark. 2012).

Polimer damlacıkları, polimerizasyon koşullarına bağlı olarak 1µm-100µm arasında değişen boyutta gözenekli ya da gözeneksiz partiküller halinde elde edilir. Polimerizasyon süresi uzundur (10 saatten fazla). Monomeri veya sulu fazdaki monomer karışımını polimerize etmek ve polimeri küresel elde etmek için mekanik karıştırıcı kullanılır (Şekil 1.22).



Şekil 1.22. Süspansiyon polimerizasyonu süreci

Bu yöntem polivinilklorür (PVC) içeren birçok ticari reçineler, yaygın olarak kullanılan plastikler, stiren içeren polistiren reçineler, genişlemiş polistiren ve yüksek çarpma dirençli polistiren, poli(stiren-akrilonitril) ve poli(metil metakrilat) üretiminde kullanılır (Vivaldo-Lima ve ark. 1997).

Reaksiyon karışımı sulu karışım ve monomer damlacıklarından oluşan iki fazdan oluşmaktadır. Monomer ve başlatıcı sulu fazda çözünmez haldedir, böylece sulu matriksde damlalar oluştururlar. Süspansiyon ajanı monomer damlacıklarını dengelemek için eklenir ve monomer damlacıklarını bir araya

gelmelerini engeller. Reaksiyon karışımında monomerin sulu faza hacimsel oranı 0,1/0,5 şeklindedir. Sulu faz ısı transfer aracı olarak davranır böylece polimerizasyon çözeltisindeki küçük sıcaklık değişimlerinde bile yüksek oranda polimerizasyon sağlar (Arshady 1992).

Süspansiyon polimerizasyonun avantajları:

- Sıcaklık kontrolü kolaydır.
- Polimer uygun, kolay işlenebilir, ve genellikle direkt kullanılabilir türde elde edilir.

Süspansiyon polimerizasyonun dezavantajları:

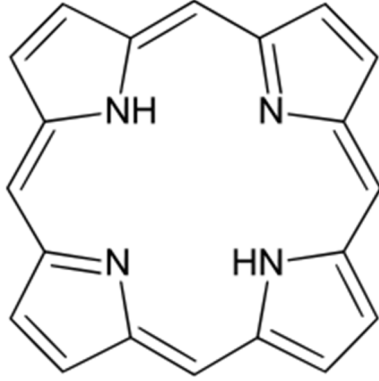
- Az sayıda polimer suda çözünebilir niteliktedir (Rzepa 2003).

Çizelge 1.2. Emülsiyon ve süspansiyon polimerizasyonunda kullanılan sulu ve organik faz türleri

	Sulu faz	Organik faz
Emülsiyon polimerizasyonu	Su Yüzey aktif madde Başlatıcı	Monomer Yüzey aktif madde
Süspansiyon polimerizasyonu	Su Koruyucu kolloid	Monomer Koruyucu kolloid Başlatıcı

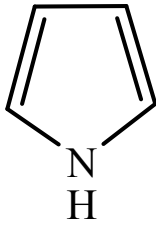
1.6. Porfirin

Porfirinler birbirlerine dört metiliden (-CH=) köprüsüyle bağlı dört pirol halkasından oluşan, porfin halka sistemine sahip renkli moleküllerdir (Şekil 1.23).



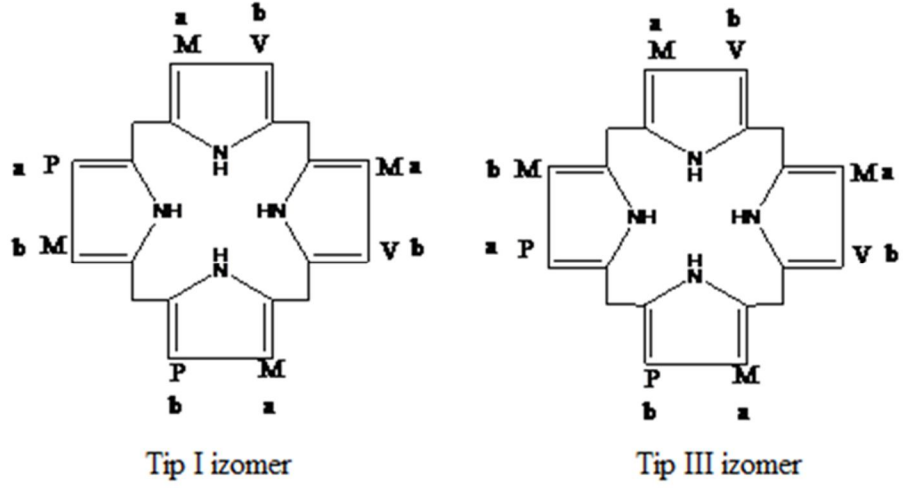
Şekil 1.23. Porfinin yapısı

Porfirinlerin en küçük birimi piroldur (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Piroldur

Porfirinler doğada porfin çekirdeğindeki hidrojenlerin yerine farklı yan grup dizilimlerine göre çeşitli tiplerde bulunurlar. Bunlar; yan gruplar simetrikse Tip I, asimetrikse Tip III şeklindedir. En çok bulunan hali Tip III izomeridir (Şekil 1.25). Simetrik olmayan porfirinler polar çözücülerde simetrik olanlara göre daha fazla çözünürler ve saflaştırılmaları daha kolaydır (Sun ve ark. 1986).



Şekil 1.25. Porphirin izomerleri

Asetil (A) ve metil (M) küçük takılar; propiyonil (P), vinil (V), etil (E) ve oksietil (EOH) büyük takılar olarak adlandırılırlar.

M : Metil -CH₃

E : Etıl -C₂H₅

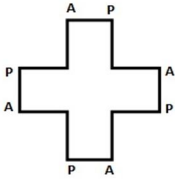
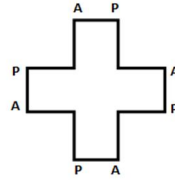
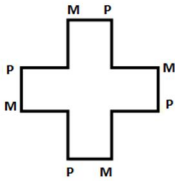
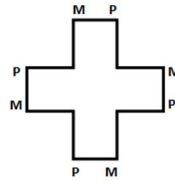
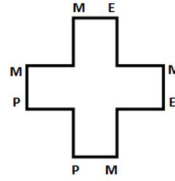
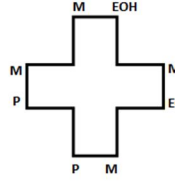
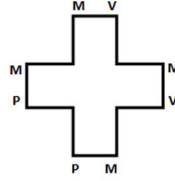
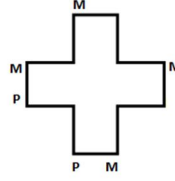
E-OH : Hidroksi etil- CHOH-CH₃

V : Vinil -CH=CH₂

A : Asetik asit -CH₂-COOH

P : Propiyonik asit -CH₂-CH₂-COOH

Çizelge 1.3. Porfirin sınıflarının doğada bulunan halleri

Porfirin sınıfı	Doğada bulunan örnekler	
Uroporfinler	 Uroporphirin I	 Uroporphirin III
Koproporfinler	 Koproporphirin I	 Koproporphirin III
Mezoporfinler		 Mezoporfin IX
Hematoporphirinler		 Hematoporphirin IX
Protoporphirinler		 Protoporphirin IX
Döteroporphirin		 Döteroporphirin IX

Üroporfirin I, III, koproporfirin I, III, protoporfirin IX, mezoporfirin IX ve hematoporfirin IX doğada bulunan başlıca porfirinlerdir. Üroporfirin I, III idrarda, mezoporfirin dışkıda, koproporfirin I, III dışkıda, idrarda, safrada, eritrositlerde, maya ve bakterilerde bulunan porfirinlerdir.

Porfirinler, yapılarında içerdikleri çift bağlardan dolayı görünür bölgede ışığı absorplarlar ve 400 nm’de, absorpsiyon bandı oluştururlar. UV etkisi altında pembe kırmızımsı renk verirler bu durum porfirinlerin vücut sıvılarında ölçülmesini sağlayan en önemli özelliğidir. Bazı porfirin türevlerinin tümör ve hızlı gelişen dokularda biriktiği ve kanserli hastalarda kanserli dokunun belirlenmesinde floresans indikatör olarak kullanılabilirliği bulunmuştur (Badger ve ark. 1964).

Porfirin halka sistemindeki pirol halkalarının N atomlarına Fe, Mg, Co, Zn, Ni, Cu gibi metallerin iyonlarının bağlanmasıyla metalloporfirinler olarak adlandırılan porfirinler oluşur. Metalloporfirinlerdeki metal iyonları, porfirin halka sisteminin iki pirol halkasındaki disosiye olabilen H atomlarının yerini alır ve ayrıca diğer iki pirol halkasının tersiyer azot atomlarına koordinasyon bağları ile bağlanır.

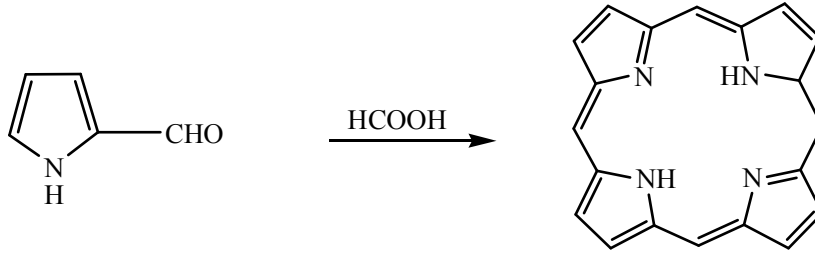
En yaygın olarak bulunan biyolojik metalloporfirinler demir ve magnezyum içerenlerdir. Demir içeren metalloporfirinler, ya hem ya da hemin şeklinde olurlar. Hem, ferro şeklinde demir (Fe^{+2}) içerir; hemin, ferri şeklinde demir (Fe^{+3}) içerir. Örneğin kanın kırmızı rengini veren hemoglobin, kasların kırmızı rengini veren miyoglobin, sitokromlar, sitokrom oksidaz, katalaz ve peroksidaz, demir-porfirin bileşikleridirler; bitkilerin yeşil rengini veren klorofil ise magnezyum-porfirin bileşiğidir.

Canlı doğasında bir çok mekanizmada önemli görevleri bulunan metaloporfirinlerin en önemlileri, fotosentezde görev alan klorofil, oksijen taşınmasında birebir etkili olan hemoglobin-miyoglobin ve elektron taşınmasında görev alan sitokromlardır. Porfirinlerin canlı hayattaki önemi, biyoorganik açıdan incelenmesine önemli bir basamak oluşturmuştur (Tuncer 1999).

1.6.1. Porfirin sentezi

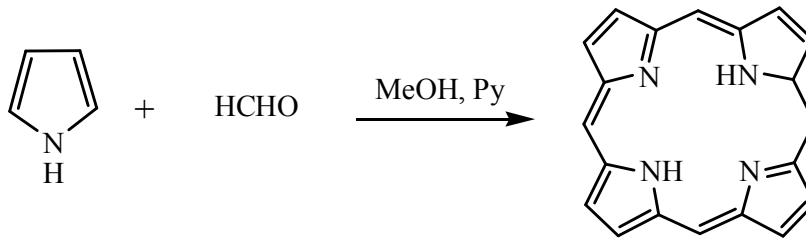
1.6.1.1. Sübstitüe olmayan porfirin sentezi

Porfirin ilk olarak Şekil 1.26’da gösterildiği gibi pirol ve aldehitin formik asitli ortamda kondenzasyonundan elde edilmiştir (Fisher ve Gleim 1935).



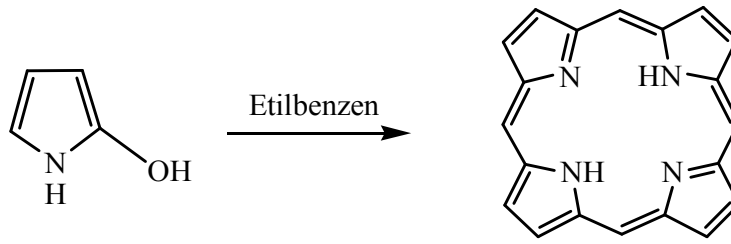
Şekil 1.26. Porfirin sentezi (I) (Fisher ve Gleim 1935)

Ayrıca Rothemund tarafından Şekil 1.27’de gösterildiği gibi pirol ve formaldehitin yüksek sıcaklık ve basınç altındaki reaksiyonundan düşük verimle sentezlenmiştir (Rothemund 1936).



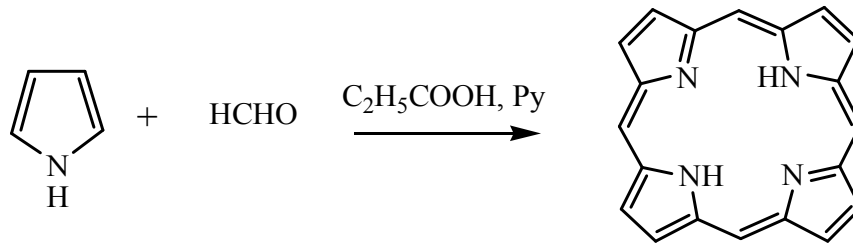
Şekil 1.27. Porfirin sentezi (II) (Rothemund 1936)

Daha sonra 2-hidroksimetilpirolden asetik asit ortamında % 5 verimle porfirin elde edilmiştir (Şekil 1.28)(Krol 1959). Ayrıca çözücü olarak etilbenzen kullanılarak ve aynı çıkış maddesi ile 100°C ‘ta 10 gün süreyle kaynatılarak % 8-10 verimle porfirin sentezlenmiştir (Longo ve ark. 1975).



Şekil 1.28. Porphirin sentezi (III) (Longo ve ark. 1975)

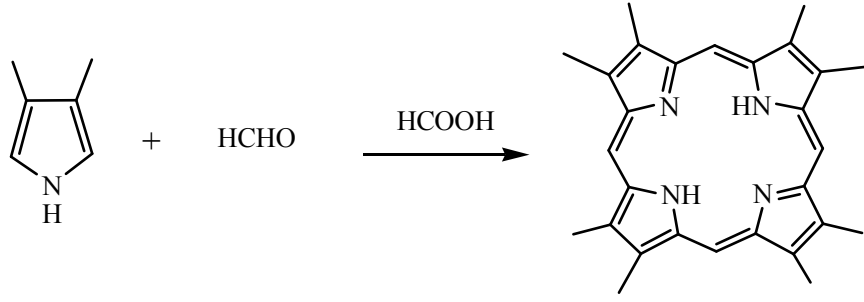
Porfirin sentezinde uygun bir diğer yöntem olarak propiyonik asit ortamında piridin ilavesi ile formaldehit ve pirolden porfirin sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.29). Bu sentezin verimi düşük olmasına rağmen, uygulanması ve ayırma, saflaştırma işlemlerinin kolay olması sebebiyle diğer yöntemlere üstünlüğü vardır (Neya ve ark. 1993).



Şekil 1.29. Porphirin sentezi (IV) (Neya ve ark. 1993)

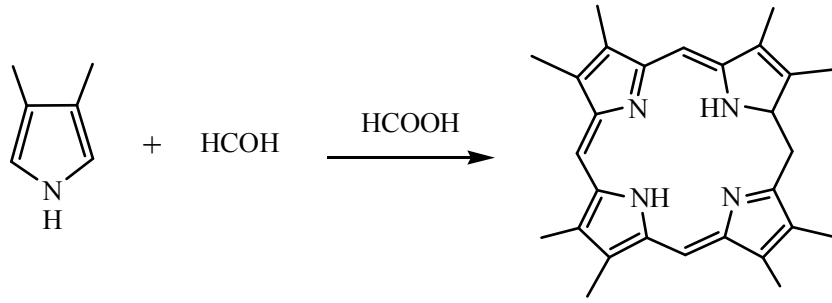
1.6.1.2. β -Süstitüe porfirinler

Porfirin sentezlenmesinde uygulanan yöntemlerden birçoğu β -süstitüe porfirinlerin sentezi için de uygundur. Bu bileşiklerin sentezlenmesinde β -süstitüe piroller kullanılır. Şekil 1.30'da gösterildiği gibi 2,3,7,8,12,13,17,18-oktametilporfirin (OMP) 3,4-dimetilpirol ve formik asitten elde edilmiştir (Fischer 1926).



Şekil 1.30. β -Süstitüe porfirin sentezi (I) (Fischer ve Gleim 1935)

Bundan başka Şekil 1.31’de gösterildiği gibi 3,4 dimetilpirol ve formaldehitten yüksek verimle OMP oluştuğu belirtilmiştir (Treibs ve Haeberle 1968).



Şekil 1.31. β -Süstitüe porfirin sentezi (II) (Treibs ve Haeberle 1968)

Çeşitli β -süstitüe porfirinler formaldehit ve β -süstitüe pirolden çıkılarak sentezlenebilir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler ve Reaktifler

Benzaldehit (Merck), pirol (Merck), NaNO_2 (Carlo Erba), metakriloil klorür (Merck), etilen glikoldimetakrilat (EGDMA, Merck), vinilbenzil klorür (Aldrich), divinilbenzen (Aldrich), polivinilalkol (PVA, Alfa Aesar), Lignin peroksidaz (Sigma), 3,4 dimetoksibenzil alkol (veratril alkol, Aldrich), hidrojen peroksit (%35'lik, Merck), 2,2-azobisisobütironitril (AIBN, Fluka), Bradford reaktifi (Merck), kalay klorür dihidrat (Merck), propiyonik asit (Riedel), piridin (Merck), HCl (%37'lik, Riedel), kloroform (Aldrich), metanol (Aldrich), etil alkol (Pancreac), diklorometan (Sigma-Aldrich), akrilamid (Merck), NaOH (Riedel), sodyum bikarbonat (Riedel) ve diğer çözücülerle kimyasallar analitik saflıkta olup deneylerde kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünlerin saflaştırılması için ince tabaka ve kolon kromatografisi kullanılmıştır.

2.2. Analizler ve Aletli Analizler

Sentezlenen monomerlerin ve veratril alkolün oksidasyonu sonucu oluşan veratril aldehit miktarlarının belirlenmesi için UV-görünür bölge spektrumları Shimadzu (UV-2450) UV-görünür bölge taramalı spektrometre cihazı ile elde edilmiştir. Hazırlanan tetrafenilporfirin içeren polimerik yapıların fonksiyonel grup karakterizasyonu için Perkin Elmer spektrum 100-FT-IR spektrofotometre cihazı ile spektrumları alınmıştır. Polimerik kürelerin pH'a bağlı yüzey zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano cihazı ile belirlenmiştir. Yüzey alanları ölçümleri Quantachrome Nova 2200e cihazı ile bulunmuştur. Polimerik kürelerin yüzey görüntüleri için Carl Zeiss marka Ultra Plus model taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. pH ölçümleri Orion 420 A model pH ion metre ile yapılmıştır. Reaksiyonlar manyetik ısıtıcı karıştırıcı Ikamag (Rct) kullanılarak yürütülmüştür. Adsorpsiyon işlemleri Edmund Bühler GmbH (KS-15 Control) platform çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Tartım işlemleri ise Ohaus

marka Analytical Plus model $\pm 0,0001$ hassasiyette analitik terazi ile yapılmıştır. Deneylerde ayrıca laboratuarda bulunan araç ve gereçler kullanılmıştır.

2.3. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi

2.3.1. 5,10,15,20-tetrafenilporfirin sentezi

Tetrafenil porfirin literatürde verilen Adler yöntemi izlenerek sentezlenmiştir. Bu yöntemde göre iki boyunlu dibi yuvarlak 250 mL'lik bir deney balonuna 100 mL propiyonik asit konulmuş ve daha sonra balona benzaldehit (2,10 g, 20,0 mmol) ilave edilmiştir. Azot gazı basıncı altında reaksiyon balonu kuş yuvası yardımıyla ısıtılmaya başlanmış ve karışım refluks edilmiştir. Ardından reaksiyon balonuna 10 mL propiyonik asit içinde çözülmüş pirol (1,34 g, 20,0 mmol) damla damla ilave edilmiştir. Karışım 3 saat refluks edildikten sonra reaksiyon balonu bir gece kendi halinde bırakılmıştır. Daha sonra karışımdan alınan örneğin ince tabaka kromatografisi ile yapılan kontrolünde 5,10,15,20-tetrafenilporfirinin oluştuğu görülmüştür. Reaksiyon karışımındaki çözücü kloroform rotary evaporatörde uçurulduktan sonra geriye kalan katı madde az miktarda metanolde çözülerek 4 numaralı Gooch krozesinden süzümüştür. Krozede kalan madde sıcak su ile üç kez yıkanmış, tekrar kloroformda çözülerek Gooch krozesinden alınmıştır. Bu şekilde metanol ve kloroformda çözünmeyen safsızlıklar ürün porfirinlerden ayrılmıştır. Kolon kromatografisi kullanılarak saf 5,10,15,20-tetrafenilporfirinler elde edilmiştir.

2.3.2. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi

Kısım 2.3.1'de elde edilen yeterli miktardaki H_2TPP 'nin Luguya ve arkadaşlarının (2004) yöntemlerine benzer şekilde nitrolanması sonucu 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre iki boyunlu dibi yuvarlak 250 mL'lik bir deney balonuna azot gazı basıncı altında çözücü olarak trifloroasetik asit (15 ml) konulduktan sonra reaksiyon balonuna sırayla H_2TPP (1,088 g, 1,77 mmol) ve sodyum nitrit ($NaNO_2$, 260 mg, 3,77 mmol) ilave edildikten sonra reaksiyon oda sıcaklığında 3 dakika karıştırılmış ve

reaksiyon sonlandırılmıştır. Karışım 250 mL saf su içine konulduktan sonra nötrleştirilmiş ve ardından kloroform ile porfirin karışımı ortamdan ekstre edilmiştir. Daha sonra çözeltideki kloroform rotary evaporatörde uçurulmuş ve geriye kalan katı madde az miktarda uygun çözücüde çözünmüş ve ardından kolon kromatografisi ile 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin saflaştırılmıştır. R_f değeri (silikajel, $CHCl_3$) 0,8, UV (λ_{max} , $CHCl_3$) 422nm, 514nm, 553nm, 592nm ve 649nm; IR (KBr, cm^{-1}) 3423 (NH gerilme), 3037-2921 (aromatik CH), 1720-1579 (NO_2 asimetric gerilme); 1471- 1328 (NO_2 simetric gerilme); 1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm) -2,7 (s, 2H, pirol NH), 7,8 (m, 9H, m/p-fenil), 8,26 (d, 6H, o-fenil), 8,42 (d, 2H, nitrofenil), 8,66 (d, 2H, nitrofenil), 8,76 (d, 2H, β pirol, 3 ve 7 CH), 8,80 (s, 4H, β pirol, 12, 13, 17 ve 18 CH), 8,95 (d, 2H, β pirol, 2 ve 8 CH).

2.3.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi

5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi için kısım 2.3.2.'de sentezlenen 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (100 mg, 0,152 mmol) iki boyunlu 100 mL'lik bir deney balonuna konulmuş ve ardından oda sıcaklığında HCl (%20 lik, 25 mL) konulmuştur. Daha sonra reaksiyon balonuna $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,5 g) ilave edilmiş ve karışım sıcaklığı su banyosunda $65^\circ C$ 'ye çıkarılmış ve reaksiyon karışımı 25 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulana karışıma 100 mL saf su ilave edilmiş ve ardından seyreltik amonyak çözeltisi ile n  tralleştirilmiştir. İndirgenmiş porfirin sulu ortamdan kloroform ile ekstre edilmiş ve ekstraksiyon işlemi birkaç kez tekrar edilmiştir. Ekstratın   z  c  s   olan kloroform rotary evaporatörde uçurulduktan sonra geriye kalan katı seyreltik NH_4OH ve su ile birkaç kez yıkanmıştır. 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin saflaştırılması kolon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin tartılmış ve 80 mg geldiği bulunmuştur. Yeteri kadar 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin elde etmek için indirgenme reaksiyonu birkaç kez tekrar edilmiştir. R_f değeri (silikajel, $CHCl_3$) 0,45; UV (λ_{max} , $CHCl_3$) 421nm, 516nm, 553nm, 591nm, 644nm; IR (KBr, cm^{-1}) 3453 (NH gerilme, pirol), 3369, 3315 (NH_2 gerilmesi), 3035, 2915 (aromatik CH gerilme), 1602 (NH_2 bükülme); 1H NMR

(CDCl₃ δ ppm) -2,7 (s, 2H, pirol NH), 4,0 (s, 2H, NH₂), 6,9 (d, 2H, aminofenil), 7,78 (m, 9H, m/p-fenil), 8,0 (m, 2H, aminofenil), 8,24 (d, 6H, o-fenil), 8,7 (m, 6H, β pirol) ve 8,85 (m, 2H, β pirol).

2.4. Tetrafenilporfirin Ligandı Bağlanmış Polimer Sentezi

Tetrafenilporfirin içeren polimerik yapı sentezi birkaç farklı yöntem ile yapılabilir. Bunlar; tetrafenilporfirin ligandı polimere polimerizasyon sonrası kovalent olarak bağlanabilir, polimerleşebilen yapıya sahip tetrafenilporfirin (monomer) sentezlenip ve polimerleşme reaksiyonu sırasında ortama konulabilir ve tetrafenilporfirin ligandı polimerik yapıya iyonik olarak bağlanabilir. Bu çalışmada tetrafenilporfirin içeren polimer sentezi için polimer kürecikler üzerine tetrafenilporfirinin kovalent bağlanması yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.4.1. Vinilbenzil klorür içeren polimer sentezi

250 mL'lik iki boyunlu balona 200 mg PVA (poli(vinil)alkol) ve 50 mL saf su konulmuş balon, sıcaklığı 60°C'ye çıkarılmış ardından oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Reaksiyon balonuna azot gazı basıncı altında 2,7 mL vinilbenzil klorür (VBC, 0,02 mol), 5 mL çapraz bağlayıcı divinilbenzen (0,035 mol), 10 mL toluen konulmuş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya başlanmıştır. Ardından balona 0,015 g başlatıcı olarak benzoil peroksit ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Kopolimerleşme reaksiyonu için sıcaklık su banyosunda 60°C'ye ayarlanarak 3 saat karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından reaksiyon sıcaklığı 90°C'ye çıkartılmış ve karıştırma 4 saat daha sürdürülmüştür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama metanol ve kloroform ilave edilerek polimer ortamdan ayrıştırılmış, sıcak su ile birkaç defa yıkanarak 60°C'da kurutulmuştur.

2.4.2. Vinilbenzil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin bağlanması

Polimer kürecikleri üzerine porfirin ligandını bağlamak için 100 mL’lik dibi yuvarlak iki boyunlu bir deney balonuna çözücü olarak 40 mL trietilamin ilave edilmiş, ardından ortama 40 mg 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin eklenmiş ve azot gazı basıncı altında karıştırılmıştır. Daha sonra balona 3 g polimerik kürecik ilave edilmiş ve reaksiyon ortamı su banyosunda 60°C’de 4 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamının rengi zamanla açılmış ve 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin polimerik kürelere bağlandığı görülmüştür. Reaksiyon sonlandıktan sonra polimerler süzgeç kağıdıyla süzölmüştür. Tetrafenilporfirin bağlanmış polimer kürecikleri sırasıyla kloroform, metanol ve su ile yıkanmış süzöntüye porfirin geçmediği görülmüştür. Polimerik kürecikler vakum etüvünde 60°C sıcaklıkta kurutulmuştur.

2.4.3. Metakriloil klorür içeren polimer sentezi

Metakriloil klorür monomeri içeren polimer sentezi emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. 500 mL’lik dibi yuvarlak iki boyunlu bir deney balonuna 40 mL saf su içerisinden çözülmüş 600 mg PVA konulmuş ve azot gazı basıncı altında karıştırılmaya başlanmıştır. Ardından reaksiyon ortamına çapraz bağlayıcı olarak 1 mL etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ilave edilmiş ve reaksiyon hacmi 300 mL’ye tamamlanmıştır. Daha sonra reaksiyon ortamına 4,1 mL metakriloil klorür monomeri (0,04 mol) ilave edilmiştir. Deney balonu su banyosunda 40°C sıcaklıkta 1 saat karıştırılmış ve ardından başlatıcı olarak 2,2-azobisisobütironitril (AIBN, 0,1 g) ilave edilerek polimerleşme reaksiyonu başlatılmıştır. Bu sıcaklıkta deney balonu 2 saat karıştırma işlemine devam edilmiş ve ardından sıcaklık 90°C’ye yükseltilerek 3 saat devam edilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan polimerik kürecikler süzölmüş ve sırasıyla sıcak su ve metanol ile yıkanmıştır. Vakum etüvünde 60°C’de kurutulmuştur.

2.4.4. Metakriloil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin bağlanması

Kısım 2.4.3’de verilmiş yönteme benzer şekilde metakriloil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 100 ml’lik dibi yuvarlak iki boyunlu bir deney balonuna çözücü olarak 40 ml trietilamin ilave edilmiş, ardından ortama 40 mg 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin eklenmiş ve azot gazı basıncı altında karıştırılmıştır. Daha sonra balona 3 g metakriloil klorür içeren polimerik kürecik ilave edilmiş ve reaksiyon ortamı su banyosunda 60°C’de 4 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamının renginin zamanla açılmasıyla polimerik kürelerin porfirine bağlandığı belirlenmiştir. Reaksiyon sonlandıktan sonra polimerler süzgeç kağıdıyla süzölmüştür. Tetrafenilporfirin bağlanmış polimer kürecikleri sırasıyla kloroform, metanol ve su ile yıkanmış süzöntüye porfirin geçmediği görölmüştür. Polimerik kürecikler vakum etüvünde 60°C sıcaklıkta kurutulmuştur.

2.4.5. Stiren içeren polimer sentezi

250 mL’lik boyunlu balonda 200 mg PVA, 50mL 60°C’de ısıtılmış distile suda çözölerek oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Stirenden polimerleşmeden kalan monomerleri engellemek için %5’lik NaOH ile ekstrakte edildikten sonra reaksiyonda kullanılmıştır. 2,7 mL stiren, 5 mL divinilbenzen ve 10 mL toluen ilave edilmiş ve karışım karıştırılmaya başlamıştır. Ardından balona 0,015 g başlatıcı olarak benzoil peroksit ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Kopolimerleşme reaksiyonu için sıcaklık su banyosunda 60°C’ye ayarlanarak 3 saat karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından reaksiyon sıcaklığı 90°C’ye çıkartılmış ve karıştırma 4 saat daha sürdürölmüştür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama metanol ve kloroform ilave edilerek polimer ortamdan ayrıştırılmış, sıcak su ile birkaç defa yıkanarak 60°C’da kurutulmuştur.

2.4.6. Divinilbenzen içeren polimer sentezi

250 mL'lik boyunlu bir deney balonuna 200 mg PVA, 50 mL 60°C'de ısıtılmış distile suda çözülerek oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. 5 mL divinilbenzen ve 10 mL toluen ilave edilmiş ve karışım karıştırılmaya başlamıştır. Ardından balona 0,015 g başlatıcı olarak benzoil peroksit ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Kopolimerleşme reaksiyonu için sıcaklık su banyosunda 60°C'ye ayarlanarak 3 saat karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından reaksiyon sıcaklığı 90°C'ye çıkartılmış ve karıştırma 4 saat daha sürdürülmüştür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama metanol ve kloroform ilave edilerek polimer ortamdan ayrıştırılmış, sıcak su ile birkaç defa yıkanarak 60°C'da kurutulmuştur.

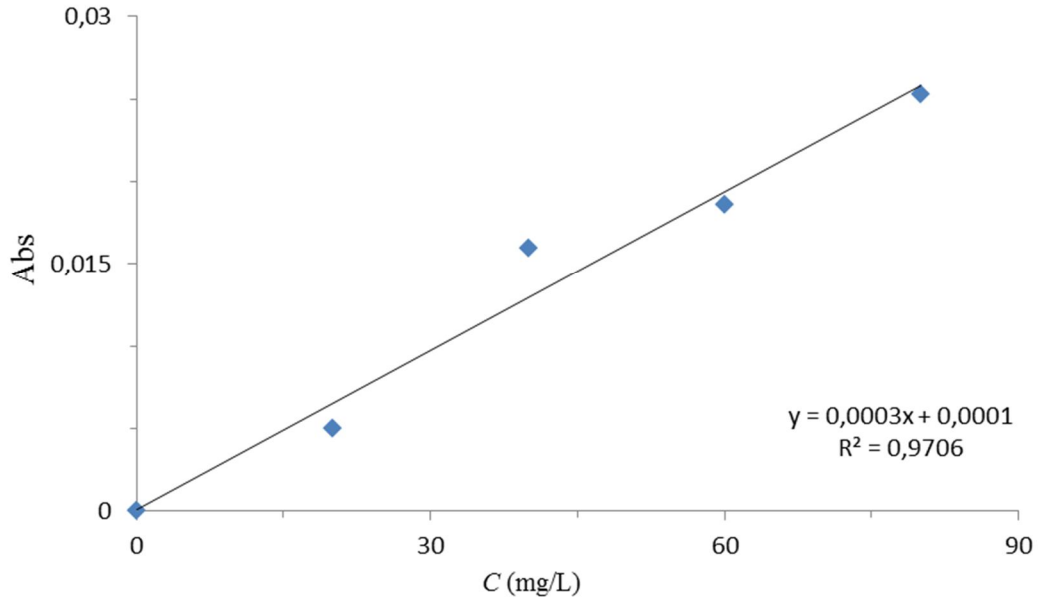
2.5. Polimer Kürecikleri Üzerine Lignin Peroksidaz Enzim Adsorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

Adsorpsiyon deneyleri için model enzim olarak lignin peroksidaz enzimi (LİP) seçilmiştir. Polimerik kürecikler üzerine enzim adsorpsiyon deneyleri için pH, sıcaklık, LİP başlangıç derişim ve adsorpsiyon süresinin etkisi incelenmiştir. Tüm deneyler deney tüpünde ve 5 mg adsorbent kullanılmıştır. Karışım platform çalkalayıcıda 2 saat sürekli karıştırılmıştır. Karıştırma sonunda deney tüpü santrifüj edilerek adsorbent çöktürülmüş ve adsorbente bağlanmamış enzim miktarı Bradford yöntemine göre Sigma (St. Louis, Mo., USA)'dan temin edilmiş Bradford çözeltisi kullanılarak tayin edilmiştir. Standart kalibrasyon eğrileri lignin peroksidaz enzimi kullanılarak yapılmıştır. Protein miktarı üç ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Adsorplanan enzim miktarını bulmak için başlangıç enzim derişiminden kalan enzim derişimi çıkarılarak bulunmuştur.

Protein tayini Bradford yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemde Coomassie brilliant blue G-250 boyasının proteine bağlanabilme özelliğinden yararlanılmıştır. Boyanın farklı derişimdeki proteinlere farklı absorbands şiddetinde mavi renkli çözeltiler oluşturması yöntemi kullanılmıştır. Ortamdaki protein boyaya bağlandığında 595 nm 'de maksimum absorbsiyon vermesiyle absorbsiyon şiddetinden bağlanan protein miktarı bulunmuştur (Şekil 2.1).

Çizelge 2.1. Bradford metoduyla kalibrasyon eğrisi prosedürü

Bileşikler	1	2	3	4	5
1mg/ml LİP (µL)	-	20	40	60	80
H ₂ O(µL)	100	80	60	40	20
%0,9 NaCl(mL)	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
Bradford çözeltisi(mL)	1	1	1	1	1
Toplam Hacim(mL)	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0



Şekil 2.1. Bradford assay yöntemine göre çizilmiş LİP proteinin kalibrasyon eğrisi

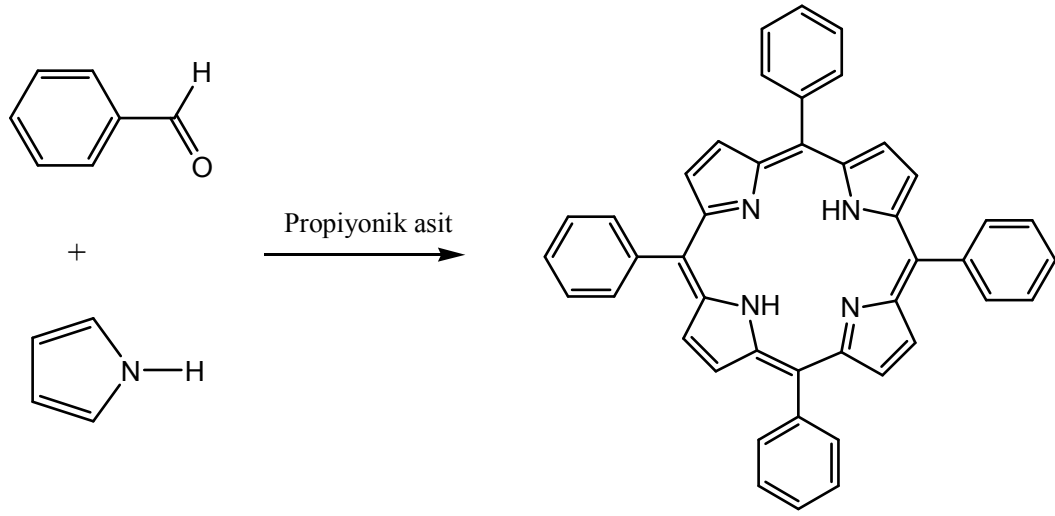
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada lignin peroksidaz enzim immobilizasyonu için hidrofobik karakterli 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin ligandı içeren polimerler sentezlenmiştir.

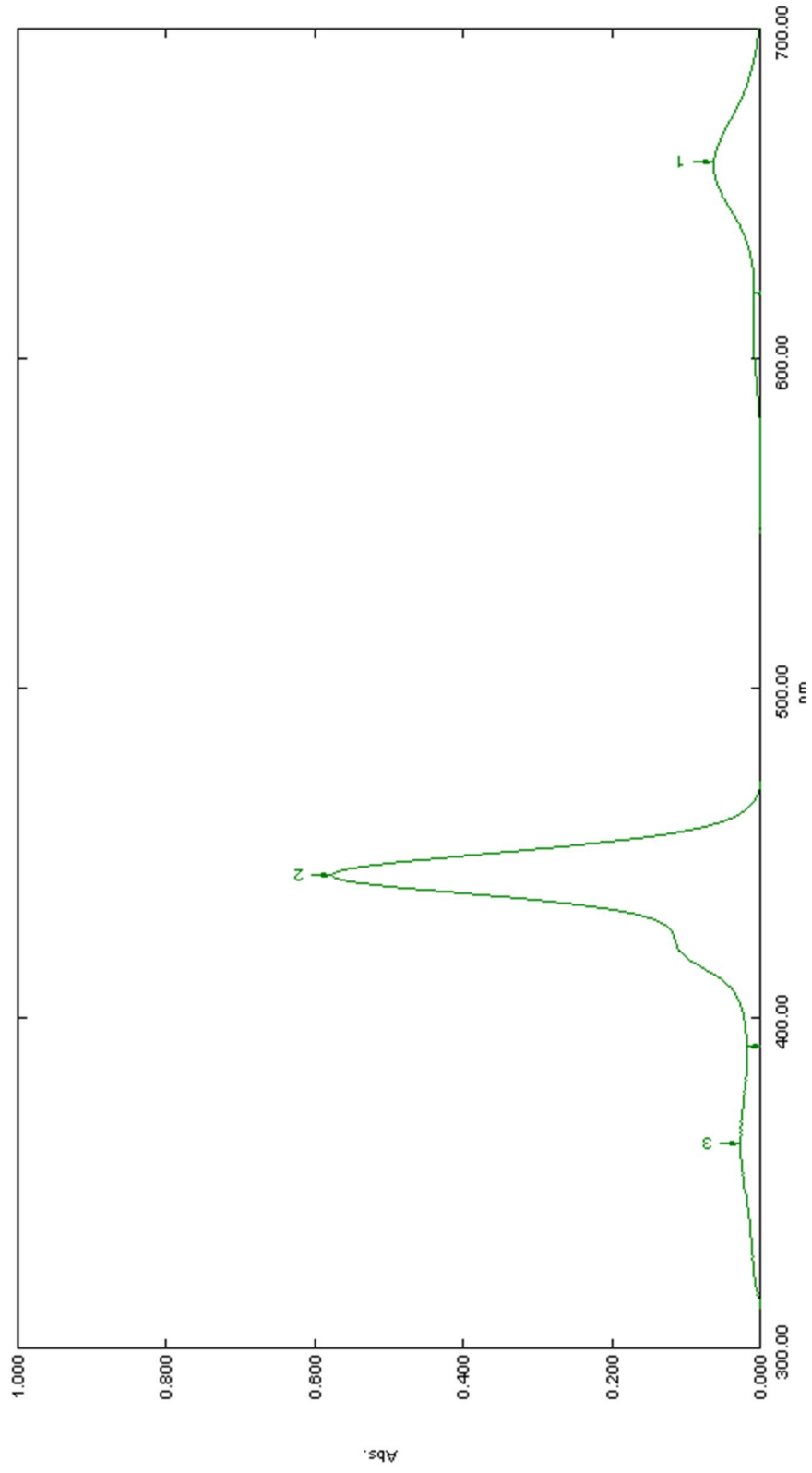
3.1. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin Sentezi

3.1.1. 5,10,15,20-Tetrafenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu

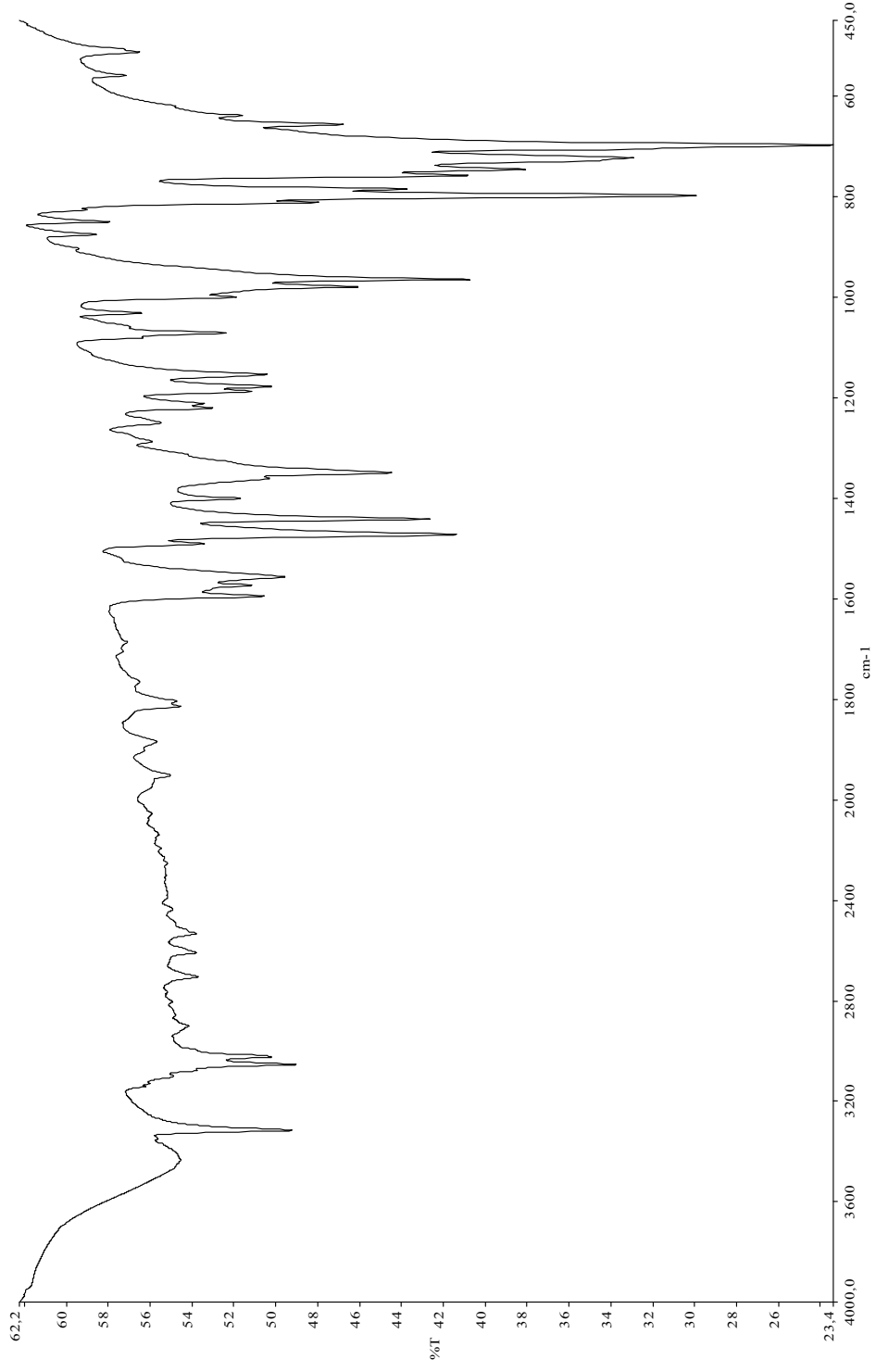
5,10,15,20-tetrafenilporfirin (H_2TPP) sentezi Adler yöntemi izlenerek yapılmıştır. Karışımdan alınan örneğin ince tabaka kromatografisi ile yapılan kontrolünde 5,10,15,20-tetrafenilporfirinin oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Adler yöntemine göre 5,10,15,20-tetrafenilporfirin (H_2TPP) sentezi



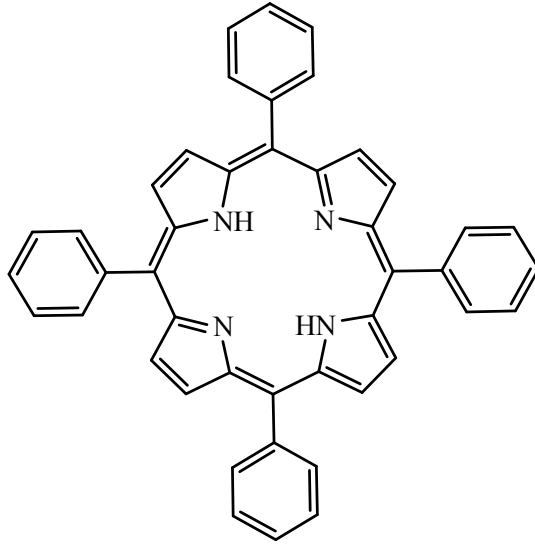
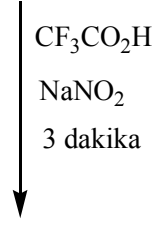
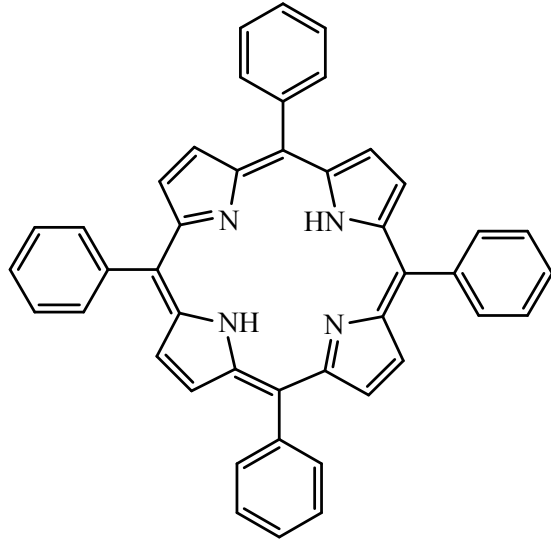
Şekil 3.2. 5,10,15,20-Tetrafenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu



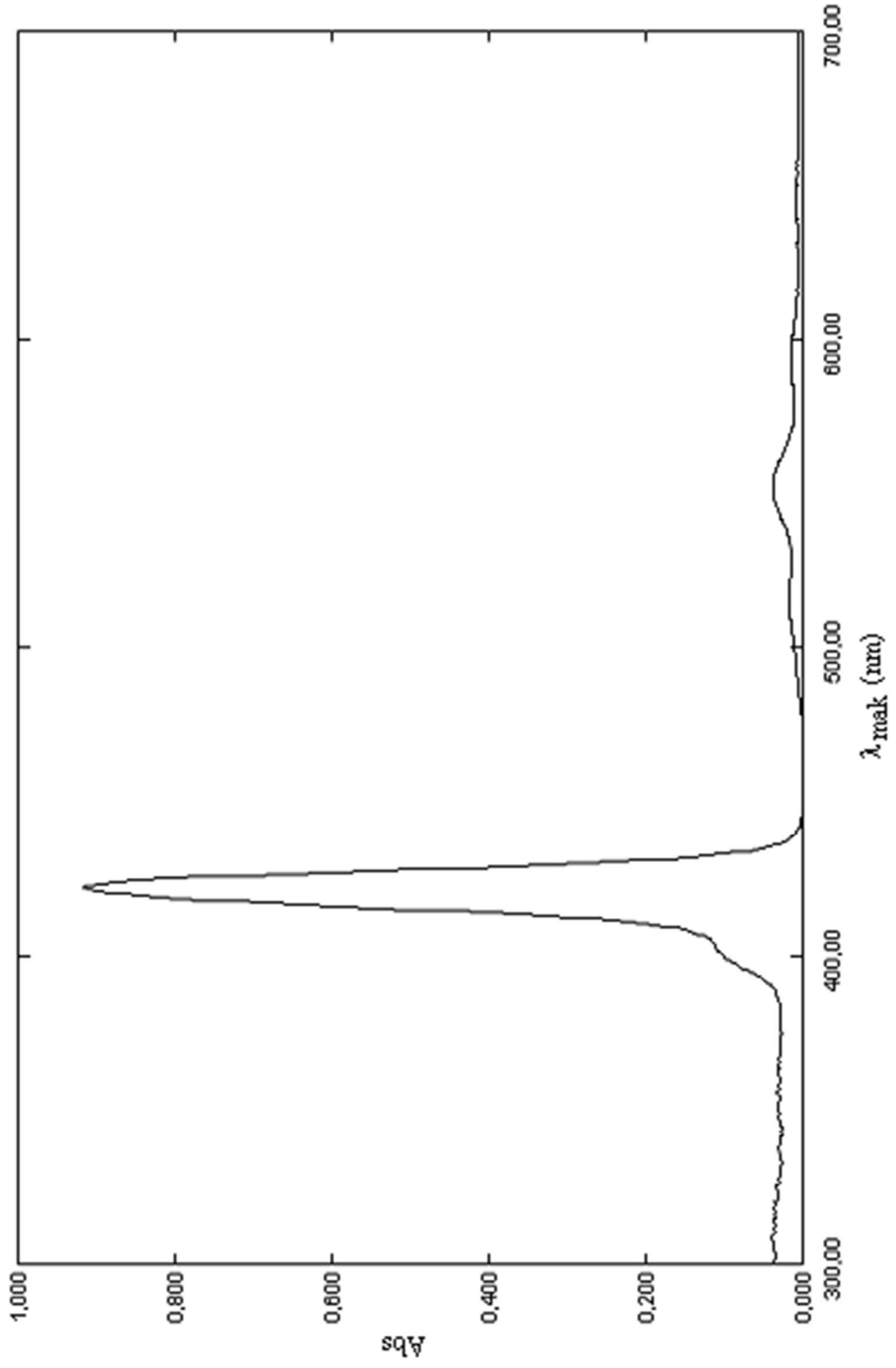
Şekil 3.3. 5,10,15,20-Tetrafenilporfirinin FTIR spektrumu

3.1.2. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu

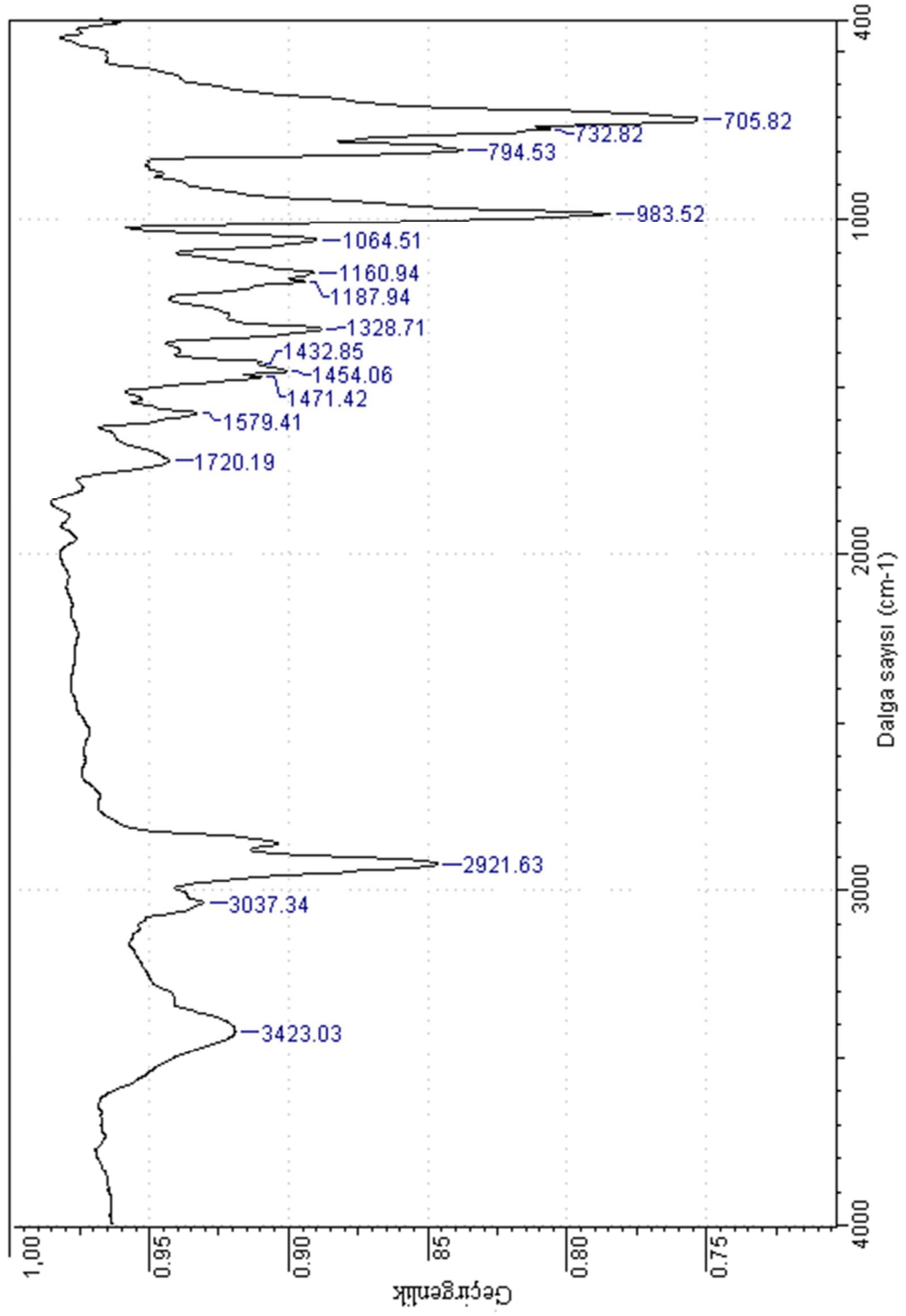
Luguya ve arkadaşlarının (2004) sentezlediği yönteme benzer şekilde 5,10,15,20-tetrafenilporfirinin nitrolanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra çözeltideki kloroform rotary evaporatörde uçurulmuş ve geriye kalan katı madde az miktarda uygun çözücüde çözünmüş ince tabaka kromatografisi kullanılarak reaksiyon sonunda 5,10,15,20-tetrafenilporfirin yoğun olarak 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin olarak sentezlendiği, ancak bunun yanında 5,10-(4-dinitrofenil)-15,20-difenilporfirin, 5,15-(4-dinitrofenil)-15,20-difenilporfirin ve 5,10,15-(4-trinitrofenil)-20-fenilporfirinler oluşmuştur. Bu porfirinleri birbirinden ayırmak için kolon kromatografisi kullanılmış ve 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin saflaştırılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi



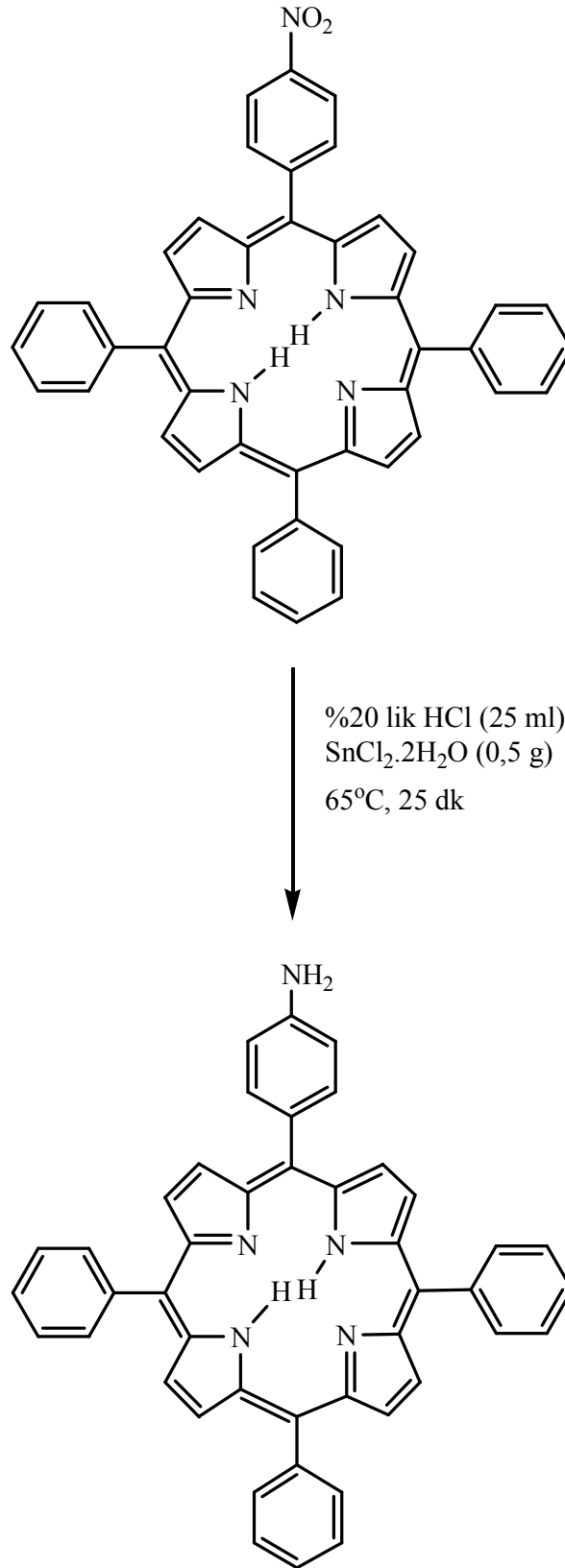
Şekil 3.5. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu



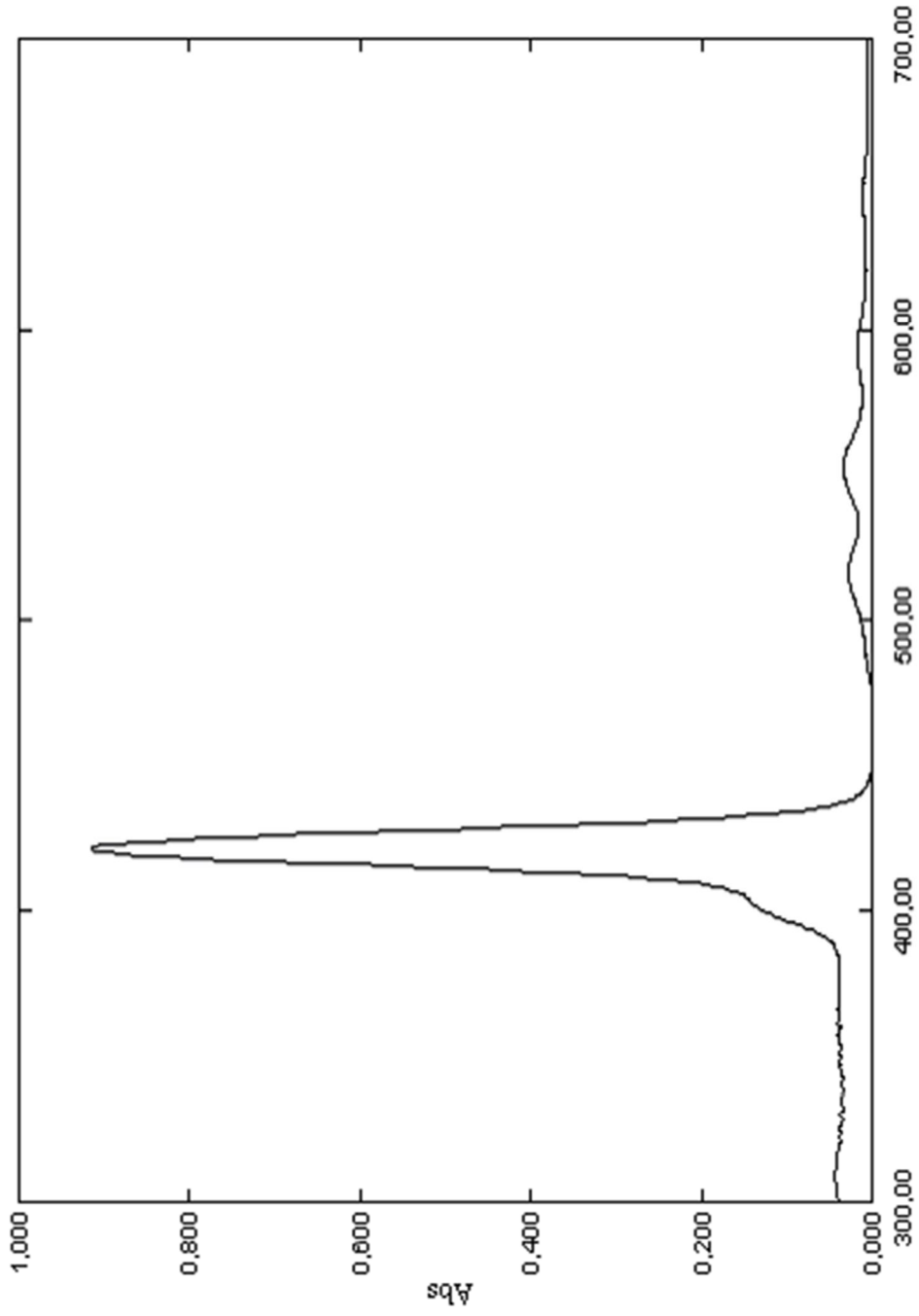
Şekil 3.6. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu

3.1.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu

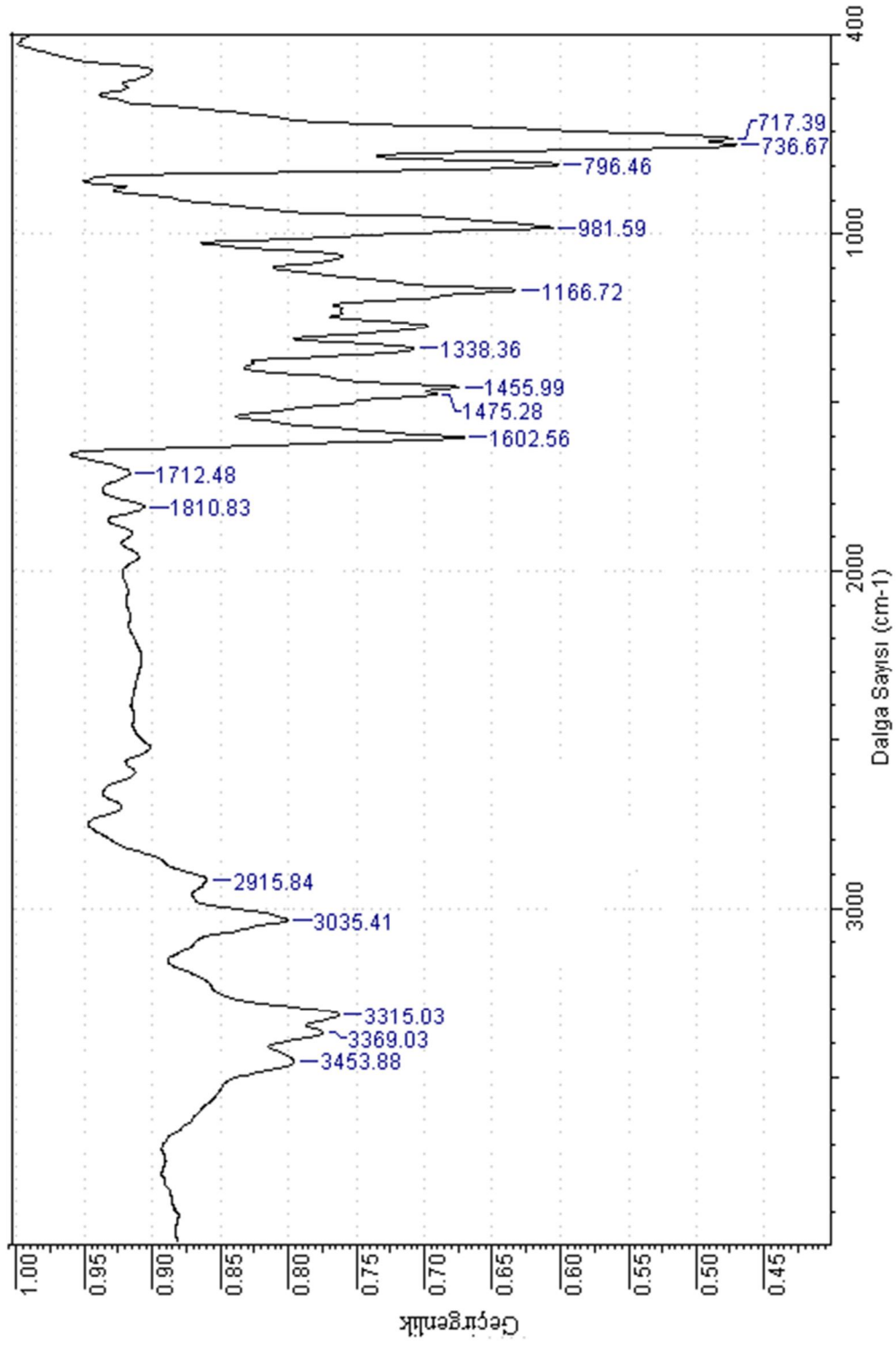
Literatürde verilen yönteme benzer şekilde 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin indirgenme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin saflaştırılması kolon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil. 3.7. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi



Şekil 3.8. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu

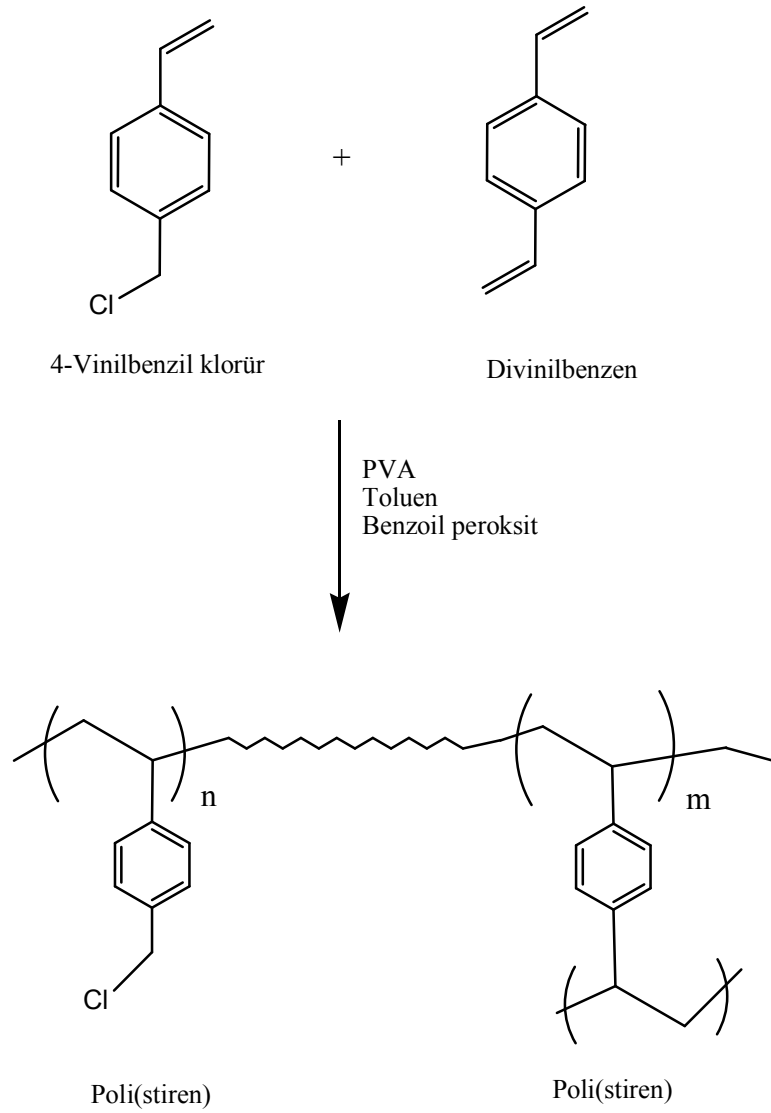


Şekil 3.9. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin FTIR spektrumu

3.2. Polimerik Kürelerin Sentezi

3.2.1. Vinilbenzil klorür içeren polimer sentezi ve karakterizasyonu

Vinilbenzil klorür içeren polimer sentezinde reaksiyon Şekil 3.10'daki gibi gerçekleştirilmiş ve reaksiyon sonunda yeteri kadar polimer elde edilmiştir.

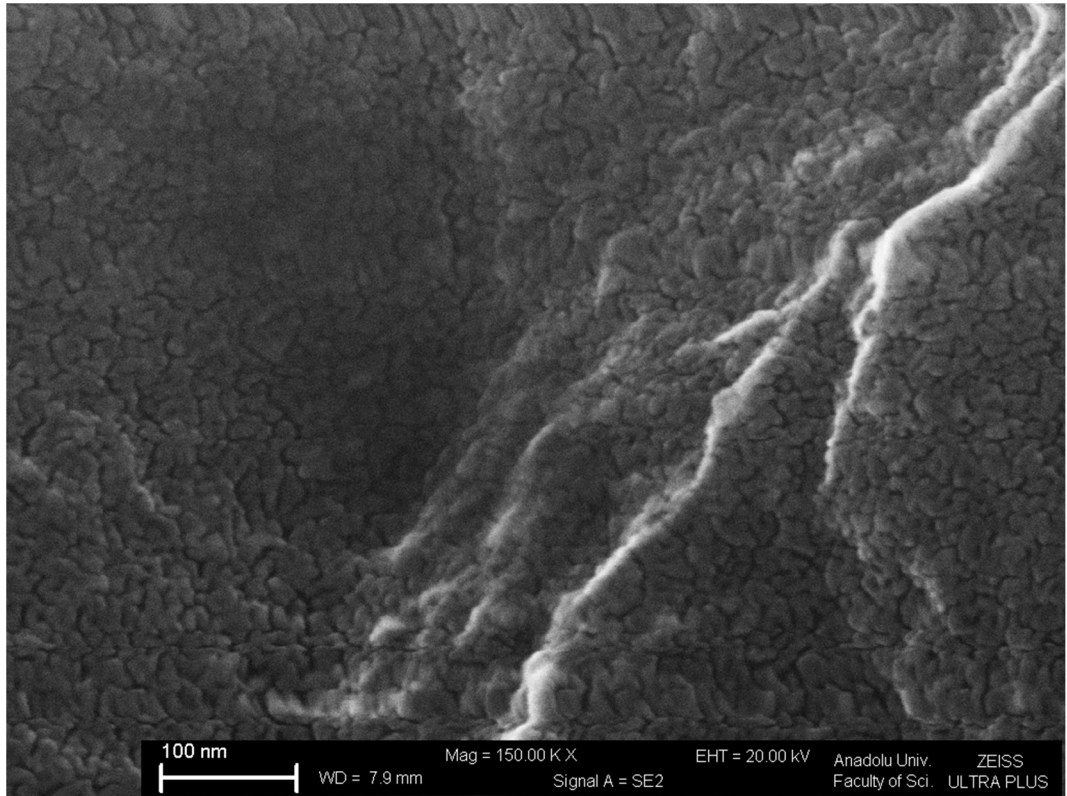
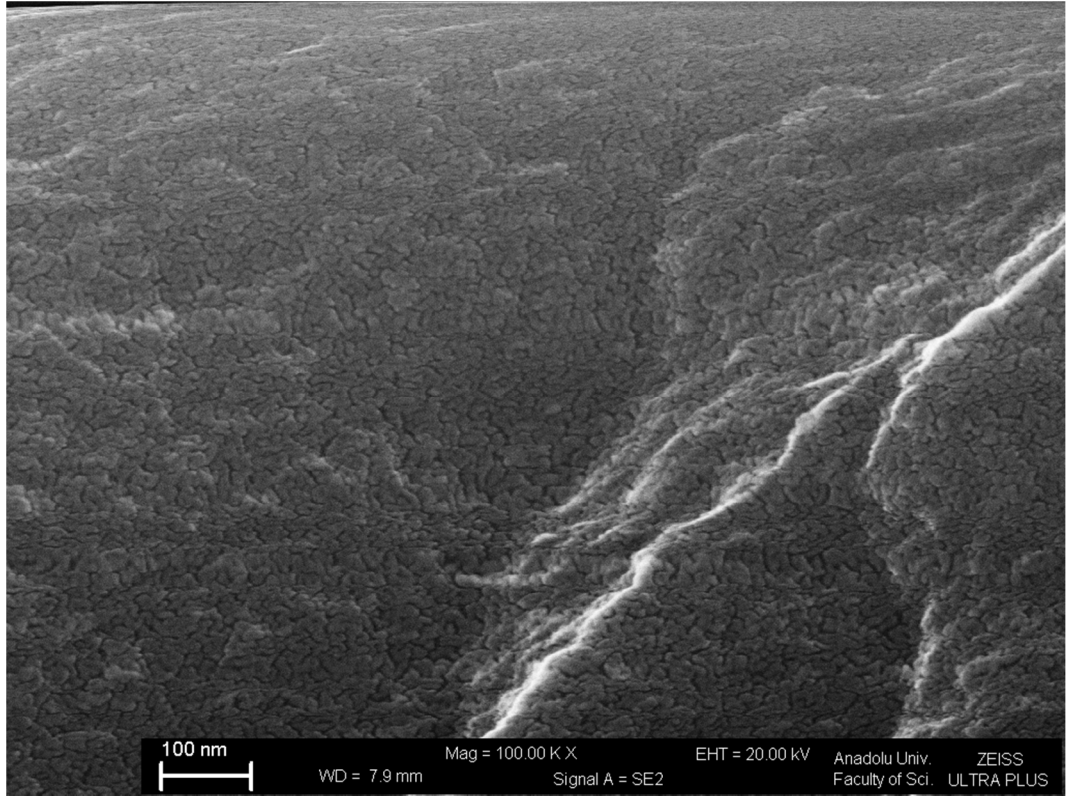


Şekil 3.10. Vinilbenzil klorür polimerinin sentezi

3.2.2. Vinilbenzil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin bağlanması

Porfirin içeren polimerik kürecik sentezi birkaç yoldan yapılabilir. İlk olarak polimer sentezi sırasında ortama porfirin içeren monomer ilavesiyle yapılabilir. İkinci olarak polimer yüzeyine porfirin fiziksel ve kimyasal olarak bağlanabilir.

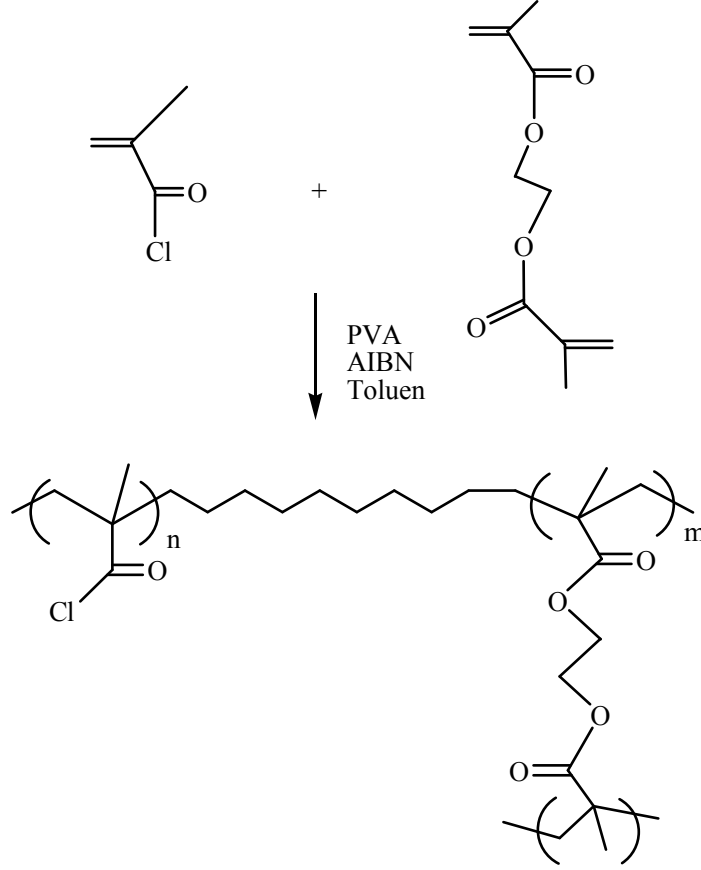
Vinilbenzil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4aminofenil)-10,15,20-trifenil bağlanması kısım 2.4.3'deki şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortamının rengi zamanla açılmış ve polimerik kürelerin porfirine bağlandığı görülmüştür. Reaksiyon sonlandıktan sonra polimerler süzgeç kağıdıyla süzölmüş ve reaksiyona girmeyen porfirinlerin miktarını bulmak için çözeltinin çözücüsü uçurulmuş kalan kısmın 13 mg geldiği hesaplanmıştır (Şekil 3.14). Sentezlenen, porfirin bağı polimerik küreciklerin SEM görüntöleri alınmıştır. (Şekil 3.11)



Şekil 3.11. Porfirin bağlı vinilbenzil klorür polimerinin SEM fotoğrafları

3.2.3. Metakriloil klorür içeren polimer sentezi ve karakterizasyonu

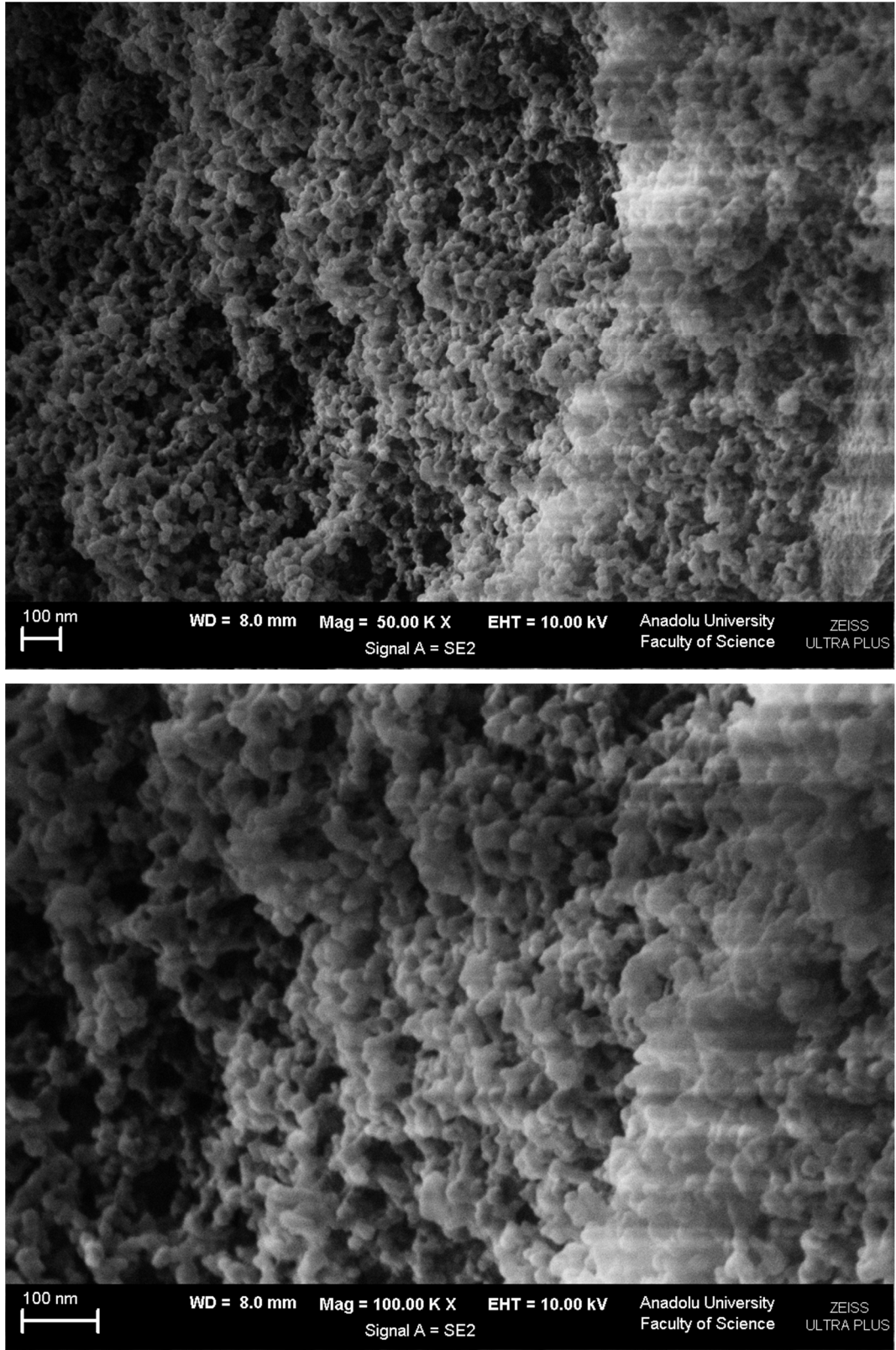
Metakriloil klorür monomerinin kopolimerizasyon reaksiyonu Şekil 3.12’deki gibi gerçekleştirilmiştir.



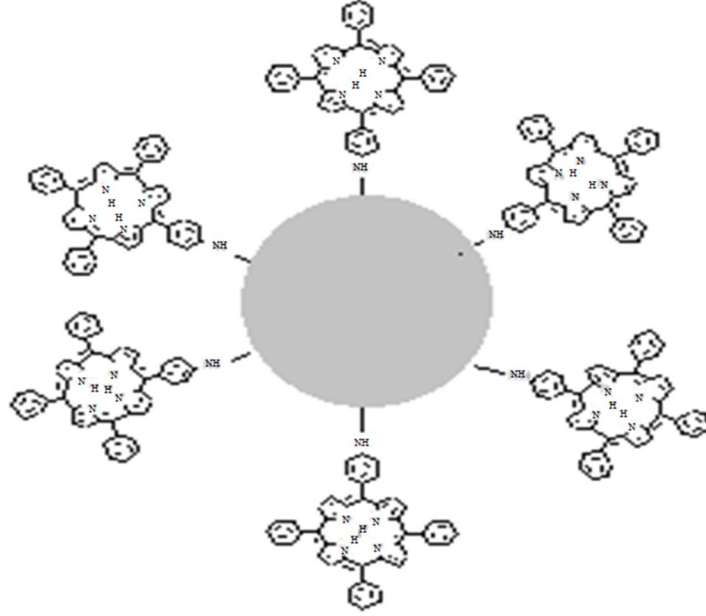
Şekil 3.12. Metakriloil klorür polimerinin sentezi

3.2.4. Metakriloil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin bağlanması

Bir önceki bölümde yapılan işlemlerin aynısı metakriloil klorür içeren polimerik küreciklere 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin bağlanması içinde tekrarlanmıştır. Reaksiyon ortamının renginin zamanla açılmasıyla polimerik kürelerin porfirine bağlandığı belirlenmiştir. Reaksiyona girmeyen porfirinlerin miktarını bulmak için çözeltinin çözücüsü uçurulmuş kalan kısmın 10 mg geldiği bulunmuştur (Şekil 3.14). Oluşan porfirin bağlı polimerik küreciklerin SEM görüntüleri alınmıştır. (Şekil 3.13)



Şekil 3.13. Porfirin bağlı metakriloil klorür polimerinin SEM fotoğrafları



Şekil 3.14. Vinilbenzil klorür ve metakriloil klorür içeren polimerik yapılara 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin bağlanmasının gösterimi

3.3. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin İçeren Polimer Küreciklere Lignin Peroksidaz İmmobilizasyonun İncelenmesi

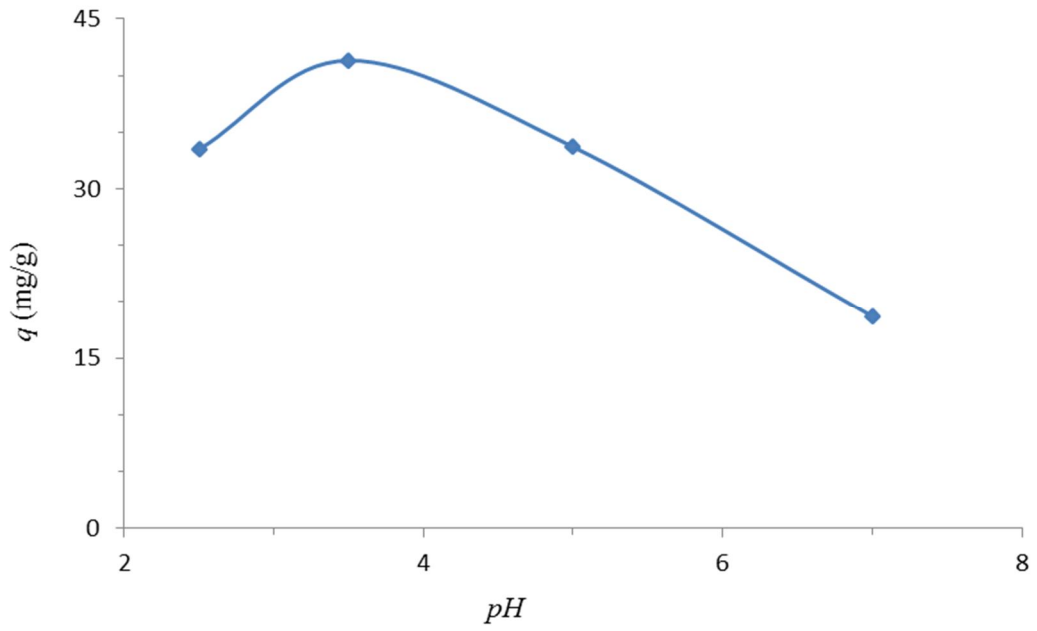
Bu tez çalışmasında hidrofobik karakterli polimerik yapıların sentezlenmesi için öncelikle destek matriksler sentezlenmiş ve ardından bu matrikslerin uygun şartlar ve ortamda 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin polimer matriksleri kovalent bağlanması ile hidrofobik karakterli matriksler elde edilmiştir. Matriks üzerine enzim immobilizasyonu için model bileşik olarak lignin peroksidaz enzimi kullanılmıştır. İmmobilizasyon üzerine ortam koşulları ve destek matriksin etkisi fazla olduğundan ortam koşullarını değiştirerek immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. İmmobilizasyon için pH, sıcaklık, enzim başlangıç derişimi ve temas süresi etkisine bakılmıştır. Diğer parametrelerin enzim immobilizasyonuna etkisini minimuma düşürmek için sabit tutulmuştur. Çizelge 3.2’de farklı adsorbentler üzerine LİP enzimi immobilizasyon sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlar kapsamında immobilizasyon çalışmalarında kısım 3.2.3’de elde edilmiş polimerik kürecikler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı destek maddeleri üzerine immobilize edilmiş LİP miktarları

Destek malzemesi	İmmobilize LİP (mg/g polimer)
Metakriloil klorür içeren polimer	1,70
Vinilbenzil klorür içeren polimer	0,04
Porfirin içeren Vinilbenzil klorür polimer	8,33
Porfirin içeren Metakriloil klorür polimer	5,36

3.3.1. LİP immobilizasyonuna pH'ın etkisi

Enzim immobilizasyona pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH aralıkları çalışılmıştır. Enzim immobilizasyon çalışmalarında literatürde verildiği gibi pH'ın etkisi bulunmaktadır. İmmobilizasyon çalışmasında pH değeri, enzim ve destek malzemenin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların protonlanması veya deprotonlanması sonucunda immobilize miktarlarını etkilemektedir. Destek malzemesi hidrofobik karakterli porfirin halkasına sahip olduğundan dolayı hidrofobik etkileşimin maksimum olduğu pH değeri araştırılmıştır. pH değerleri 2,5–7,0 arasında çalışılmıştır. Lignin peroksidaz enziminin izoelektrik noktası olan pH 3,5 değerinde immobilizasyon miktarının en yüksek değerde çıktığı görülmüştür (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Lignin peroksidaz enzim immobilizasyonuna pH etkisi. Temas süresi: 2 saat, Adsorban =5 mg, $V=0,5$ mL, Sıcaklık: $+4^{\circ}\text{C}$, $C_0=0,4$ mg/mL

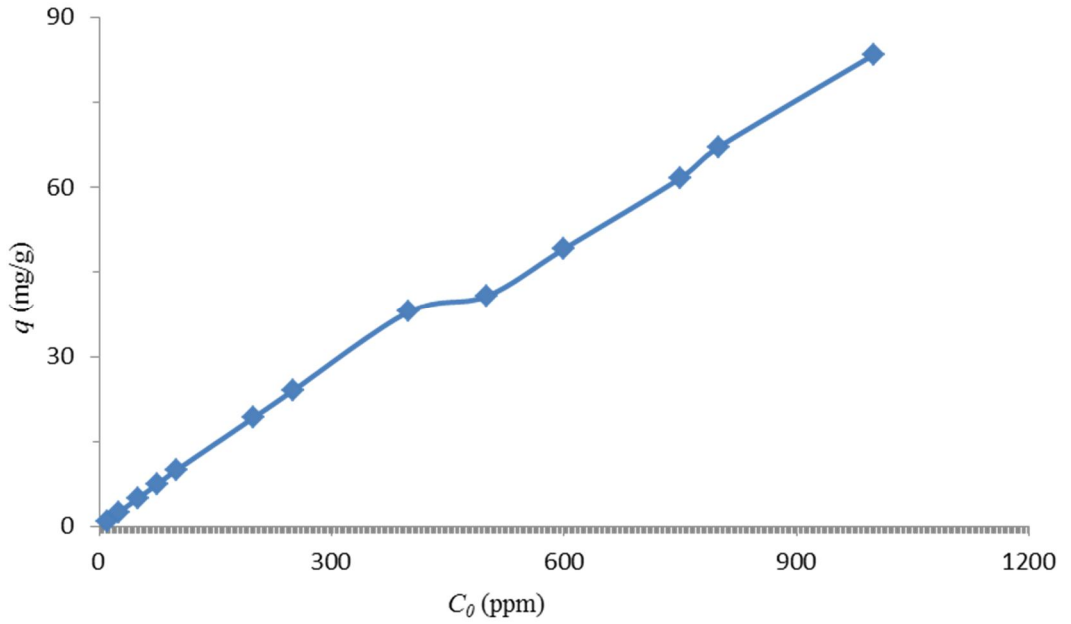
3.3.2. LİP immobilizasyonuna sıcaklığın etkisi

Polimer kürelere LİP adsorpsiyonu, 4 ve 25°C 'deki sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. 4°C için buz banyosu diğer sıcaklık için su banyosu kullanılmıştır. pH 3,5 sitrat tamponunda ve lignin peroksidaz enzimi belirtilen sıcaklıklarda polimer çözeltisi ile 2 saat boyunca platform çalkayıcıda muamele edilerek adsorplanan LİP miktarları hesaplanmış ve en iyi sıcaklığın $+4^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir.

3.3.3. LİP enzimi başlangıç derişiminin immobilizasyona etkisi

Başlangıç LİP derişiminin porfirin içeren destek malzemesi üzerine immobilizasyon etkisi pH 3,5 ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de incelenmiştir. Immobilizasyon çalışmaları için 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0; mg/mL derişimlerinde LİP çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir derişimde adsorplanan LİP miktarı hesaplanarak LİP derişimine karşı, adsorplanan LİP miktarı grafiği çizilmiş ve polimerin

maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulunmuştur. Başlangıç LİP derişiminin artmasıyla belirli bir derişime kadar immobilizasyon miktarlarında artma görölmüş ve sonradan derişimin artmasıyla sabit kalmış ve tekrardan artma olmuştur. Şekil 3.16'da lignin peroksidaz başlangıç derişiminin adsorpsiyona olan etkisi gösterilmiştir. Çözeltideki lignin peroksidaz derişimi arttıkça gram polimer başına adsorplanan lignin peroksidaz miktarı artmaktadır. En uygun enzim derişimi 4°C'de 0,4mg olarak belirlenmiştir.

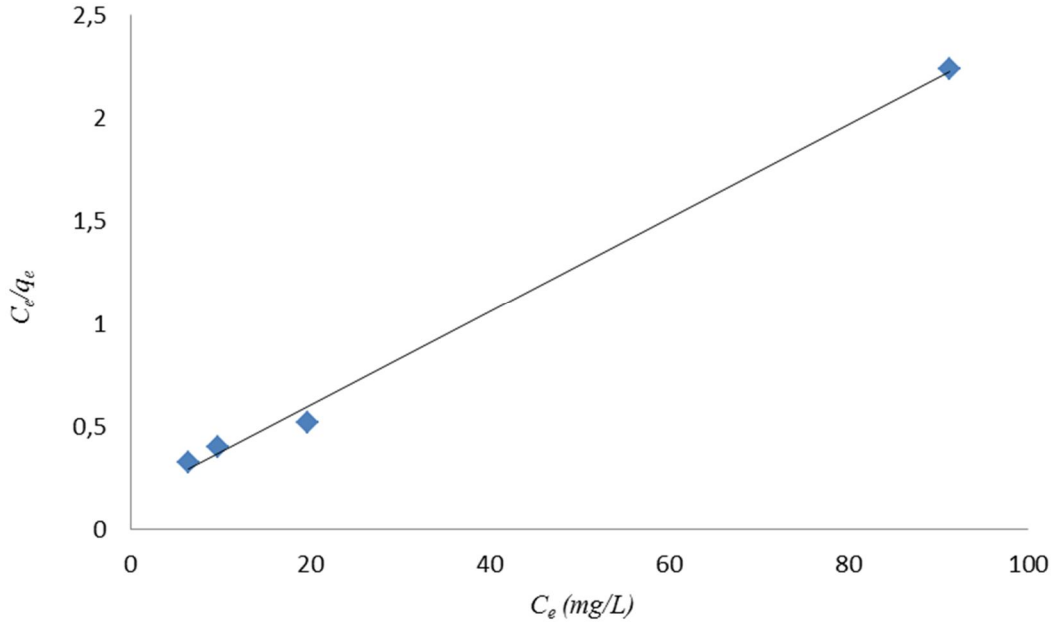


Şekil 3.16. Lignin peroksidaz enziminin başlangıç derişiminin immobilizasyona etkisi. Temas süresi:2 saat, Adsorban =5 mg, $V=0,5$ mL, pH=3,5, Sıcaklık: +4°C

3.3.4. Adsorpsiyon izotermi

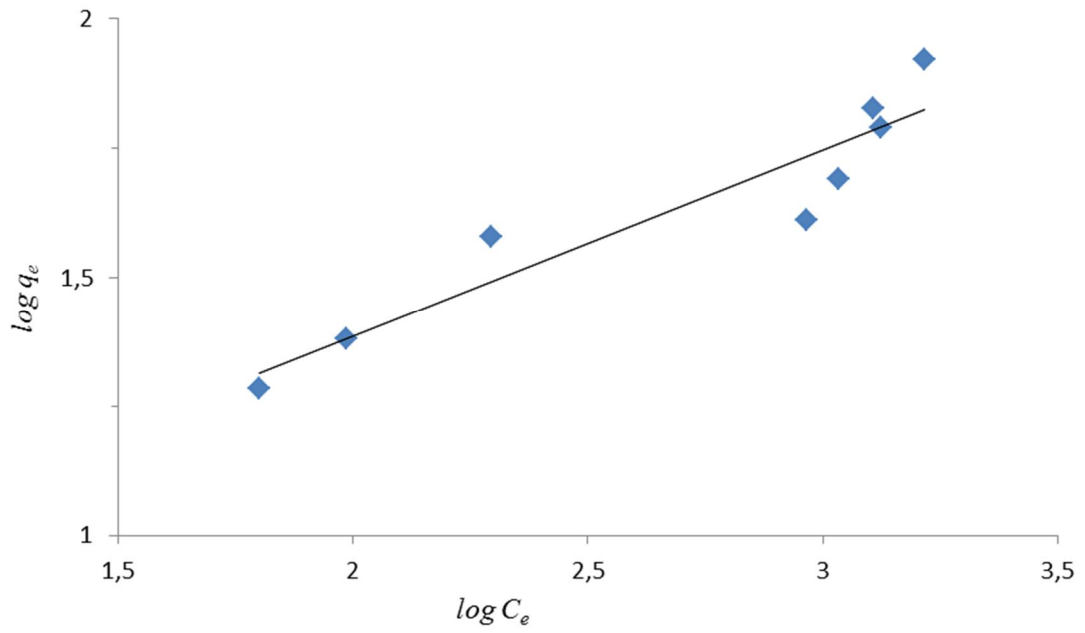
Adsorpsiyon izotermi Langmuir izotermi bir yüzeydeki tek tabaka adsorpsiyonu için tanımlanmıştır. Deneysel verilerin Langmuir izotermine uygun olması yüzeyin homojen olduğunu gösterir. Freundlich izoterminde ise heterojen sistemler sıklıkla görülür. Freundlich izotermindeki “ n ” sabiti yüzeyin heterojenliğinin bir ölçüsü olmakla birlikte $1/n$ olarak sıfıra yaklaştıkça heterojenlik artmaktadır.

Şekil 3.17’de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren polimerik kürelere lignin peroksidaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi gösterilmiştir. Grafiğin eğim ve kesiminden maksimum lignin peroksidaz kapasitesi (q_{max}) 43,86 (mg/g), Langmuir sabiti 0,1526 (ml/mg) olarak belirlenmiştir



Şekil 3.17. Langmuir adsorpsiyon izotermi. Temas süresi: 2 saat, pH=3,5, sıcaklık: +4°C

Şekil 3.18’de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenil porfirin içeren polimer kürelere lignin peroksidaz adsorpsiyonunun Freundlich izotermi gösterilmiştir. Grafiğin eğiminden $1/n$ değeri 0,3615 ve kesiminden K_F değeri 4,6057 (mg/g) olarak bulunmuştur.



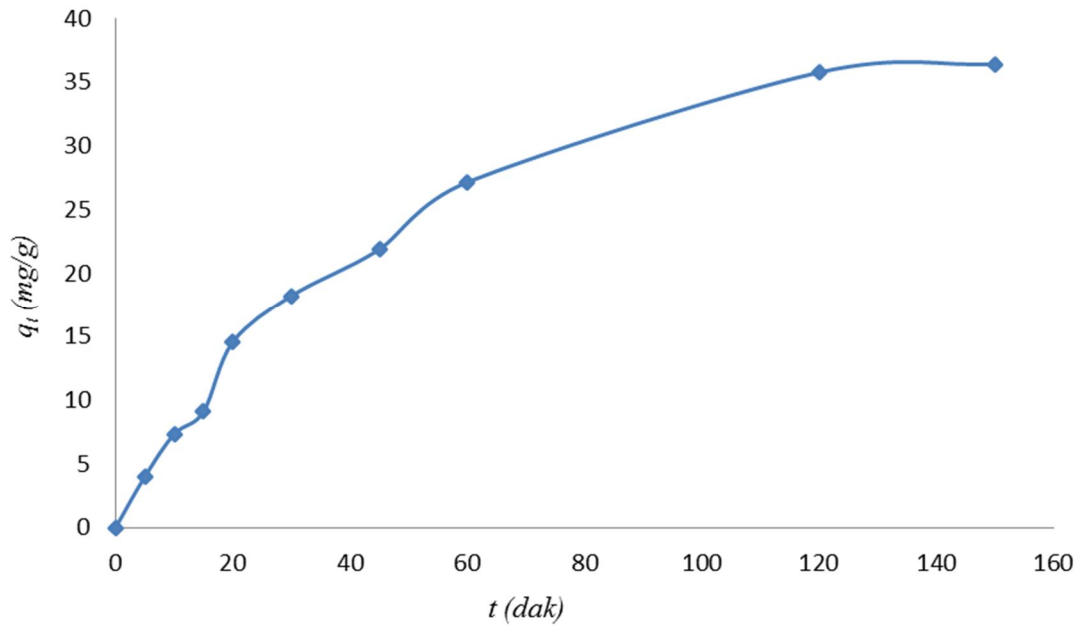
Şekil 3.18. Freundlich adsorpsiyon izotermi. Temas süresi: 2 saat, pH=3,5, sıcaklık: 4°C

Çizelge 3.2. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi verileri

Langmuir izoterm sabitleri		Freundlich izoterm sabitleri	
$q_{max}(mg/g)$	43,86	n	2,77
$K_L(ml/mg)$	0,1526	$K_F(mg/g)$	4,61
R^2	0,99	R^2	0,88

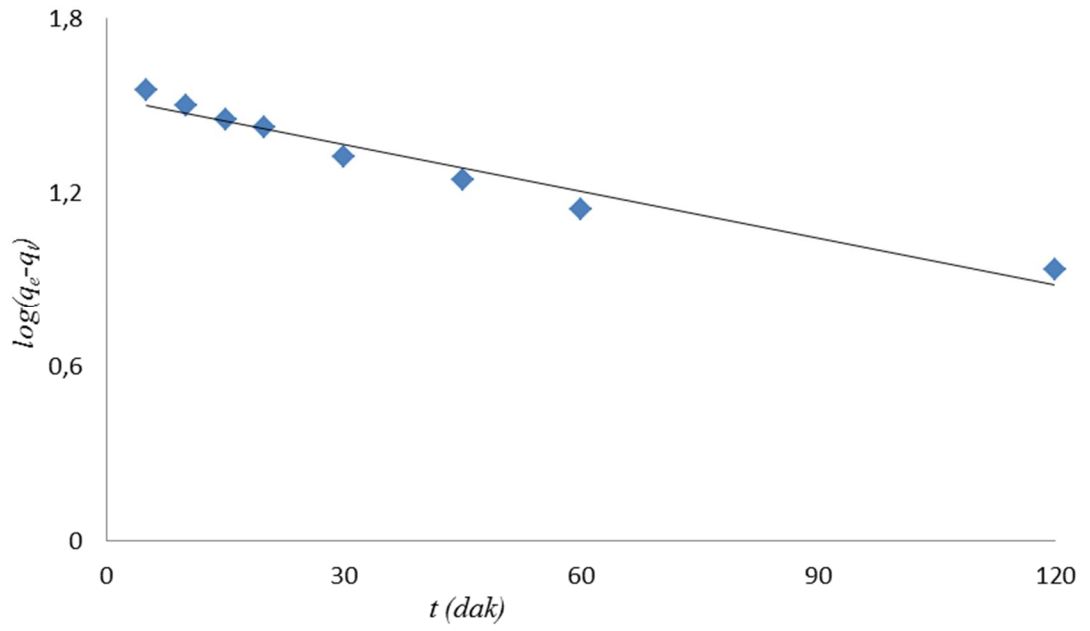
3.3.5. Adsorpsiyon kinetiği

Hidrofobik polimer kürecikleri üzerine LİP enzimi immobilizasyonuna ilişkin temas süresi etkisi Şekil 3.19’da verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi adsorpsiyon kapasitesi, zamana bağlı olarak artmış, 120. dakikanın sonunda doygunluğa ulaşmıştır.

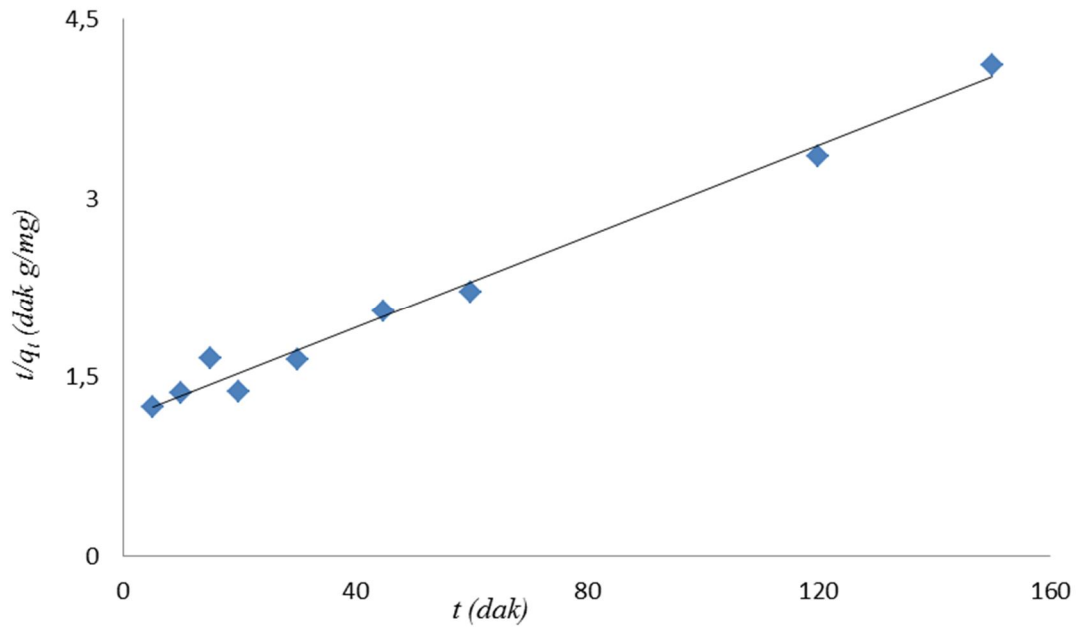


Şekil 3.19. Enzim immobilizasyonuna temas süresinin etkisi. LİP derişimi: 0,4mg/ml, pH=3,5, sıcaklık: 4°C

Şekil 3.20 ve 3.21’de hidrofobik polimer küreleri üzerine lignin peroksidaz enziminin adsorpsiyon hızını belirlemek için Lagergren-birinci-dereceden ve yalancı-ikinci-dereceden kinetik modellerine ait grafikler görülmektedir.



Şekil 3.20. Lagergren-birinci-dereceden kinetik modelin incelenmesi



Şekil 3.21. Yalancı-ikinci-dereceden kinetik modelin incelenmesi

Çizelge 3.4’de görüldüğü üzere yalancı-ikinci-dereceden kinetik model için belirlenen korelasyon katsayısının, Lagergren-birinci-dereceden kinetik model için bulunan korelasyon katsayısından daha yüksek olduğu görülmektedir.

Bu durum 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren polimer kürelerine lignin peroksidaz enzim adsorpsiyonun yalancı-ikinci-dereceden kinetik modele uygun olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.3. Polimer üzerine LİP enzimi adsorpsiyonun kinetik verileri

Lagergren-birinci-dereceden		Yalancı-ikinci-dereceden	
k_1 (1/dk)	0,01243	k_2 (g/mgdk)	0,000318
q_1 (mg/g)	33,66	q_2 (mg/g)	52,35
R^2	0,955	R^2	0,987

3.4. Sonuçlar

Bu yüksek lisans tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

- Bu çalışmada, lignin peroksidaz enziminin immobilizasyonu için destek maddesi olarak 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren polimer küreleri emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi üç aşamada gerçekleşmiş ve elde edilen tetrafenilporfirin emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen polimerik küreciklere kovalent bağla bağlanmıştır.
- Metakriloilklorür içeren porfirin yapı polimerin SEM görüntüleri incelendiğinde polimerlerin küresel ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.
- 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren polimere lignin peroksidaz adsorpsiyonu farklı pH çözeltilerinde (pH 2,5-7) incelenmiş ve maksimum LİP enzim immobilizasyonu enzimin izoelektrik noktası olan pH 3,5 değerinde gerçekleştiği bulunmuştur. Bu pH değerinde maksimum immobilizasyon miktarı 43,86 mg/g polimer olarak bulunmuştur.
- Polimer kürecikler üzerine LİP enzim immobilizasyonuna sıcaklığın etkisi incelenmiş immobilizasyon için en uygun sıcaklığın +4°C olduğu belirlenmiştir.
- 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin içeren polimere lignin peroksidaz adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi olan Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri incelendiğinde, Langmuir adsorpsiyon izotermi için lineer bir doğru verdiği görülmüştür ve bu doğrunun korelasyon sabiti (R^2) 0,99 olarak hesaplanmıştır.
- Sentezlenen polimer üzerine enzim immobilizasyon çalışmalarında yaklaşık 120 dakika sonunda dengeye ulaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlar yalancı-ikinci-dereceden kinetik modele uyduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Adler, E. (1977), "Lignin chemistry - past, present, and future," Wood Sei. Technol., 11, 169-218.
- Altınışik, M. (1999), *Enzimler*, Tıp fakültesi 1.sınıf organik kimya ve biyokimya ders notları. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>
- Arshady, R. (1992), "Suspension, Emulsion and dispersion polymerization: a methodological survey," Colloid. Polym. Sci., 270, 717-732.
- Badger, G.M., Jones R.A. ve Laslett R.L. (1964), "Porphyrins," Aust. J. Chem., 1028-1035.
- Basan, S. (2001), *Polimer Kimyası*, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, 28-36, Sivas.
- Bickerstaff, G.F. (1997), "Some Practical Considerations," *Immobilization enzyme and cells*, Humana Press Inc, New Jersey, 2-3.
- Braun, D., Cherdron, H., Rehahn, M., Ritter, H. ve Voit, B. (2005), *Polymer synthesis: theory and practice. fundamentals, methods, experiments*. Springer, Germany.
- Cao, L. (2005), *Carrier-bound Immobilized Enzyme*, Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Demirbaş, Ö. (2006), *Kil mineralleri yüzeyine bazı biyomoleküllerin immobilizasyonu ve elektrokinetik özellikleri*, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Fisher, V. H. ve Gleim W. (1935), *Synthese des porphyrins just*, Liebigs Ann. Der Chem., 521, 157-160.
- Frank, C. (2001), *Polimer science and engineering*, Stanford University CA. <http://www.stanford.edu/class/cheme160/lectures/lecture13.pdf>
- Gruber, H., Knaus, S. ve Liska, R. (2012), Division macromolecular chemistry, Institute of applied synthetic chemistry, Vienna University of Technology. http://otech7.tuwien.ac.at/susppoly_sk_e.html
- Dizge, M.G. (2007), *Trametes versicolor beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi*, Yüksek lisans tezi,

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü,
Gebze.

- Gürsel, A., Alkan, S., Toppare, L. ve Yagci, Y. (2003), “Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers”, *React. Funct. Polym.*, 57: 57-65.
- Kaetsu, I., Kamura, M. ve Yoshida, M. (1979), “Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature,” *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 847-849.
- Karaca, N. (2006) *Poli(n,n-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve poli(n izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/κ-karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karam, J. ve Nicell, J. A. (1997), “Potential applications of enzymes in waste treatment,” *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 69, 141-153.
- Kim, J. W. (2007), *Techniques for synthesizing polymer particles*, Harvard school of engineering and applied sciences, A. B. D.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L. (1987), *Enzymatic “combustion”; The microbial degradation of lignin*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 465-505.
- Klibanov, A.M. (1983), “Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts,” *Science*, **219**, 722-727.
- Krol, S. (1959). *A new Synthesis of Porphyrin*. *J. Org. Chem.*, **24**, 2065-2067.
- Leisola, M. S., Kozulic, B. ve Meussdoerffer, F. (1987), “Homology among multiple extracellular peroxidases from *P. chrysosporium*,” *J. Biol. Chem.* 262, 419-424.
- Longo, F.R., Thorne, E.J., Adler, A.D. ve Dym, S. (1975), *J. Heterocyclic Chem.*, 12, 1305.
- Luguya, R., Jaquinod, L., Fronczek, F.R., Vicente, M.G.H. ve Smith, K.M. (2004), “Synthesis and reactions of meso-(p-nitrophenyl)porphyrins” *Tetrahedron*, **60**, 2757–2763.

- Mayer, M.J. (1997), *Oriented Immobilization of Lignin Peroxidase From Phanerochaete Chrysosporium*, Master of science, Utah State University, Utah.
- Muhammad, N., Parr, J., Smith, M.D. ve Weatley, D. (1998), "Adsorption of heavy metals in slow sand filters," In Proceeding of the 24th WEDC Conference, 346-349, Islamabad.
- Neya, S., Yodo, H. ve Funasaki, N. (1993), "Convenient Sythesis of Porphine," *J. Heterocyclic Chem.*, **30**, 549-550.
- Odian, G. (2004), *Principles of polymerization*, Wiley-Blackwell, NewYork.
- Özyılmaz, A. (2007), *Hidrofobik organik bileşiklerden (HOCs) ultrasonik işlem uygulanmış pirofilit minerali üzerine adsorpsiyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Pdb data bank, <http://www.wwpdb.org/>
- Rothemund, P. (1936), "A new porphyrin synthesis, the synthesis of porphin," *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 625-627.
- Rzepa, H.S. (2003), *Structure porperty relationships*.
<http://www.ch.ic.ac.uk/local/organic/tutorial/steinke/StructurePorpertyRelationships2003.pdf>
- Saçak, M. (2008), *Polimer Kimyası*, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Sanjay, G. ve Sugunan, S. (2006), "Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10," *Food Chem.*, **94**, 573-579.
- Schoemaker, H. E. ve Piontek, K. (1996) "On the Interaction of Lignin Peroxidase with Lignin" *Pure & Appl. Chem.*, **68**: 2089-2096.
- Sheng, D. (1997), *Veratryl alcohol: mechanism of oxidation by lignin peroxidase and role in lignin degradation*.
- Sime, R.J. (1990), *Physical Chemistry: Methods, Techniques and Experiments*, Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Smith, W.F. ve Hashemi, J. (2003), *Foundations of materials science and engineering*, Mcgraw.Hill international edition.
- Sun, Y., Martell, A.E. ve Tsutsui, M. (1986), "The synthesis and proton nuclear magnetic resonance study of some nitro- and aminounsymmetrically meta-substitued tetraphenylporphyrins," *J. Heterocyclic Chem.*, **23**, 561-565.

- Tay, T. (2004), *Tetrafenilporfirin Bazlı Hidrofobik Adsorban Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Tischer, W. ve Wedekind, F. (1999), *Immobilized Enzymes: Methods and Applications*, Topics in Current Chemistry, Vol 200.
- Treibs A. ve Haeberle N. (1968), *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **718**, 183.
- Tuncer, S. (1999), *Yeni tip porfirazinlerin Sentezi ve Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Vivaldo-Lima, E., Wood, P. ve Hamielec. A. (1997), “An updated review on suspension polymerization,” *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 939-965.
- Wiseman, A. (1986), *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Edit., John Wiley& Sons, Chichester, England.