

Kitosan nano-parçacıklar ile rekombinant esteraz enziminin immobilizasyonu

Proje No: 210T154

Yrd.Doç.Dr. Gülřah şanlı-Mohamed
Taylan Turan
Ayça Zeybek

řubat 2012
İZMİR

ÖNSÖZ

Enzimlerin immobilizasyonu, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda hem enzimlerin defalarca kullanılabilmelerini sağlamakta hem de kararlılıklarını uzun vadede arttırmaktadır. Bu nedenle, enzimler çeşitli alanlarında kullanılmak üzere immobilize edilmelidirler. Enzimler arasında önemli bir yeri olan esteraz enzimi, deterjan, gıda ve tekstil sanayi başta olmak üzere endüstrinin pek çok alanında biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Bu enzim rekombinant DNA teknolojisi ile izole edilebilmekte, mikroorganizmalar sayesinde üretilmekte ve karakterize edildikten sonra uygun bir katı yüzeye immobilize edilerek kullanılabilir hale getirilebilmektedir.

Çalışmalarımız çerçevesinde, rekombinat olarak kendi laboratuvarımızda üretip saflaştırdığımız esteraz enzimini, kitosan nano-parçacıkların üzerine immobilize etmeyi ve immobilize olmuş bu enzimi çeşitli biyoteknolojik çalışmalarda kullanmak üzere karakterize etmeyi amaçladık. Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılabilmesine rağmen, kitosanın sahip olduğu mikroorganizmalara karşı dirençlilik, zehirsizlik, mekanik kararlılık, biyoyumluluk, hidrofilik karakter ve kolayca elde edilebilirlik özellikleri sebebiyle projemizde taşıyıcı/dayanak maddesi olarak kullanılması amaçlandı.

Bu proje planındaki hedeflerimizden bir diğeri ise, yıllardır üzerinde çalışmalar yapılan enzim immobilizasyonu konusunu, son zamanların en önemli teknolojik gelişmelerinin başında gelen ve en popüler alanlarından biri olan nanoteknoloji ile bir araya getirerek disiplinlerarası bir çalışmaya katkıda bulunmaktır. Bu sayede hem enzim immobilizasyonu konusuna farklı bir açıdan bakılmış, hem de büyük boyutlu enzim taşıyıcılarıyla kıyaslandığında, nano-parçacıklarda yüzey alanlarının genişlemesiyle birlikte daha fazla enzimin immobilize edilebileceği gösterilmiş olduk.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	
GEREÇ VE YÖNTEM	
ARAŞTIRMA BULGULARI ve	
SONUÇLAR.....	
KAYNAKLAR	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. a) Kitin b) Kitosan yapıları.....	
Şekil 2. Immobilizasyon yöntemi.....	
Şekil 3. (A) kitin, (B) kitosan, (C) kitosan nano-parçacık, (D) esteraz immobilize edilmiş kitosan nano-parçacık için FT-IR spektrumları.....	
Şekil 4. DLS ile yapılmış kitosan nano-parçacık büyüklük dağılımı.....	
Şekil 5. (A) kitin, (B) kitosan, (C) kitosan nano-parçacık, (D) esteraz immobilize edilmiş kitosan nano-parçacık için taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri.....	
Şekil 6. Esteraz immobilize edilmiş kitosan nano-parçacıklara ait atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüsü.....	
Şekil 7. Kitosan nano-parçacık miktarının immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.....	
Şekil 8. Esteraz enzimi konsantrasyonunun immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.....	
Şekil 9. Sıcaklık faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.....	
Şekil 10. Zaman faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.....	
Şekil 11. pH faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi...	
Şekil 12. Karıştırma hızı faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.....	
Şekil 13. Immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisi.....	
Şekil 14. Immobilize enzimin pH kararlılığı.....	
Şekil 15. Immobilize enzim üzerine sıcaklığın etkisi.....	
Şekil 16. Immobilize enzimin sıcaklık kararlılığı.....	
Şekil 17. Çeşitli metal iyonların immobilize enzim üzerine etkileri.....	
Şekil 18. Çeşitli organik çözücülerin immobilize enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	
Şekil 19. Çeşitli kimyasal ajanların immobilize enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	
Şekil 20. Immobilize esteraz enzimine ait Line-weaver Burk grafiği.....	
Şekil 21. Immobilize enzimin tekrar kullanabilirliği.....	
Şekil 22. Immobilize enzimin depo kararlılığı.....	

ÖZET

İmmobilize enzimlerin serbest haldeki enzimlere göre üründen kolay ayrılabilirmeleri, tekrar tekrar kullanılabilirmeleri, yüksek hacimsel verimlilik elde edilebilmesi, proses kontrolünün daha kolay olması ve kontaminasyona daha az duyarlı olmaları gibi bazı üstünlükleri vardır. Bu avantajlarından dolayı enzimlerin biyoteknolojik alanlarda kullanılabilirliğinin artırılması için son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır ve halen bu konu üzerinde araştırmalar devam etmektedir.

Nanoteknolojinin gelişimi ile birlikte, nano boyuttaki malzemelerin manyetizma ve geniş yüzey alanına sahip olma gibi özelliklerinden dolayı immobilizasyonda kullanılabilecekleri son zamanda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

İmmobilizasyon işleminde taşıyıcı madde olarak en çok kullanılan biyo-polimerlerden birisi olan kitosan, biyouyumluluk, antibakteriyal olma, zararsız ürünlere dönüştürülebilme, ağır metal iyonlarıyla şelat oluşturma, jel oluşturma ve hidrofobiklik gibi birtakım biyolojik ve kimyasal özelliklere sahip olmasının yanı sıra, proteinlere olan ilgisi ile de dikkat çekmektedir.

Bakteriyel esteraz enzimi çok önemli biyokatalizatörler olarak endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadırlar. Çok geniş substrat seçiciliği olduklarından dolayı değişik reaksiyonlarda kullanım potansiyelleri de yüksektir. Özellikle deterjan, gıda, tekstil sanayi ve bir çok endüstriyel alanlarda kullanılan bu enzimler son yıllarda rekombinant mikroorganizmalar sayesinde üretilmekte ve enzimlerin özellikleri protein mühendisliği teknikleri ile yapılan değişikliklerle daha kullanılabilir hale getirilmektedir.

Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisiyle kendi laboratuvar bünyemizde üretilen ve saflaştırılan termofilik rekombinant esteraz enziminin, manyetizma ve geniş yüzey alanı gibi birtakım çekici özelliklere sahip olan kitosan nano-parçacıkların üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmada kitosan kitinden sentelenip karakterize edildikten sonra iyonik jelleşme metoduna göre nano parçacıklar oluşturulup çeşitli metodlar ile karakterize edilmiştir. Laboratuvarımızda yüksek saflıkta elde ettiğimiz esteraz enzimi nano-parçacık üzerine immobilize edilip, enzim konsantrasyonu, nano-parçacık miktarı, sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve süre gibi farklı koşulların enzim immobilizasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. En iyi koşullarda immobilize olan enzimin aktivitesine, sıcaklık, pH, termal kararlılık, pH kararlılığı, tekrar kullanılabilirlik, çeşitli kimyasallar ve metal iyonların etkileri, depolanma kararlılığı ve kinetik sabitler gibi parametrelerin etkileri belirlenerek immobilize enzim karakterize edilmiştir.

Projemiz kapsamında yapılan deneysel çalışmaların tümü grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş ve projenin kabulünü takiben 10 ay sonunda planlandığı şekilde tamamlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, nano-parçacık, immobilizasyon, esteraz, termofilik enzim

ABSTRACT

Immobilized enzymes offers some advantages over free enzymes such as relative ease of product separation, reuse of biocatalysts, high volumetric productivity, improved process control and reduced susceptibility of enzymes to contamination. Therefore, in order to increase the usability of enzymes in biotechnological studies, recently many researches have been performed and still on going.

By the help of development in nanotechnology, researchers have indicated that nano-sized materials can be used for immobilization of enzymes due to attractive characteristics of nano-materials such as magnetism and large surface area.

One of the most used biopolymer as immobilization carriers, chitosan has many significant biological and chemical properties due to a unique set of characteristics that include biocompatibility, biodegradability to harmless products, nontoxicity, physiological inertness, antibacterial properties, heavy metal ions chelation, gel forming properties, hydrophilicity and remarkable affinity to proteins.

Bacterial esterase enzymes are used as important biocatalysts in very diverse area of industry. They can be utilized potentially in many and variety reactions due to great substrate specificity. Lately production of these enzymes especially in the are of detergent, food, textile, medical medicine, agricultural medicine and cosmetic industry can be performed by recombinant way and modifications of enzymes for better utilization in industry can be achieved by protein engineering techniques.

In that project, we immobilized recombinant thermophilic esterase enzyme which has been produced and purified in our laboratuaries, on chitosan nano particles due to magnetism and large surface area properties. In the experimental part, chitosan synthesized from chitin and nano-particles prepared based on the ionic gelation method. The produced and purified esterase enzyme in our laboratuaries immobilized on chitosan nano-particles and several parameters such as temperature, pH, time, speed, chitosan nano-particle amount and enzyme concentration on immobilization efficiency tested. The immobilized enzyme then characterized as change in activity in terms of temperature, pH, thermal stability, pH stability, the effect of various chemicals and metal ions, reuse and storage stability and kinetic parameters.

All the experiments that should be done in our project were conducted by our group and we finished the project in 10 months after the acceptance.

Keywords: Chitosan, nano-particle, immobilization, esterase, thermophilic enzyme

GENEL BİLGİLER

Biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden reaksiyon ortamından geri kazanılması çok zordur, dolayısıyla bu enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu durum, enzimatik reaksiyonların gerçekleştiği ortamlarda, hem enzim kaybına hem de reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca, serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığı için reaksiyonun kontrolü de oldukça zordur. Serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilişkin ortaya çıkan, kısmen kararsız olmaları, mekanik dayanıksızlıkları ve ürün oluşumunun kontrolünün zorluğu gibi pek çok problemi çözüme kavuşturma amacı, bilim adamlarını, bu molekülleri daha kullanışlı hale getirme olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Bu sebeple gerek uzun süre ve tekrar kullanılabilirliği, gerekse de istenildiği anda reaksiyon ortamından uzaklaştırabilmesi, yani genel anlamda kullanım olanaklarının artırılması amacıyla enzimler immobilize edilmektedir. Kovalent bağlama/yüzeye tutturma, tutuklama gibi birçok farklı yöntem geliştirilerek gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu sonucu elde edilen, kararlı enzimlerin kullanıldığı araştırmaların sayısı günden güne artış göstermektedir.

İmmobilizasyon neticesinde enzimin aktivitesi, optimum pH ve sıcaklığı, substrata ilgisi ve stabilitesi değişmektedir. Genellikle, enzimin aktivitesi ve substrata olan ilgisi immobilizasyondan olumsuz etkilenirken, yüksek sıcaklığa dayanıklılığı ve kararlılığı olumlu yönde etkilenmektedir. Enzimdeki bu değişiklikler enzimin yapısına, taşıyıcı olarak kullanılan maddenin türüne ve immobilizasyon şartlarına göre değişmektedir.

Yapılan bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisiyle kendi laboratuvar bünyemizde üretilen ve saflaştırılan termofilik rekombinant esteraz enziminin, manyetizma ve geniş yüzey alanı gibi birtakım çekici özelliklere sahip olan kitosan nano-parçacıkların üzerine immobilizasyonu tasarlanmıştır. Antibakteriyel, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahip olan kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen esteraz enzimi, özellikle ilaç, kozmetik ve gıda sektörü başta olmak üzere tekstil, tarım, kağıt vb. uygulamalarda kullanılabilecek yeni bir malzeme olarak önerilmektedir. Çalışmamızda kitosan nano-parçacıkların, kitosandan iyonik jelleşme yöntemi ile sentezi yapılmıştır. Bu yöntem kullanılarak kitosandan boyutları nano düzeyden makro düzeye uzanan aralıkta jel partiküller elde edilebilmektedir. Kitinin yapısındaki asetil gruplarının uzaklaştırılmasıyla elde edilebilen kitosan, doğada en fazla bulunan biyopolimerlerden birisi olarak göze çarpmaktadır. Katyonik bir polisakkarit olan kitosan β -(1,4)-2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeridir.

Geliştirilen yeni metot ile elde edilen immobilize esteraz enzimi karakterize edilmiş ve serbest enzim ile immobilize olmuş enzimin özellikleri kıyaslanmıştır.

Proje kapsamında yapılan çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

- Enzim çalışmaları
Termofilik rekombinant esteraz enzimi üretimi ve enzim saflaştırılması.
- Kitosan nano-parçacık çalışmaları
Kitinden kitosan sentezi, kitosanın karakterizasyonu, kitosan nano-parçacık üretimi, nano-parçacık karakterizasyonu.
- İmmobilizasyon çalışmaları
Enzimin nano-parçacıklar üzerine immobilizasyonu, immobilizasyon optimizasyonu, immobilize enzimin karakterizasyonu.

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Son zamanlarda, mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin pek çoğu geniş bir kullanım alanına sahiptir ve bu enzimlerin biyoloji ve kimya endüstrisinin çeşitli dallarında uygulamaları dünyada günden güne artmaktadır (Miller, J. A. ve Nagarajan, V., 2000). Özellikle, termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, ki bu enzimler volkanların yada jeotermal kaynakların bulunduğu bölgelerin sıcak su ve toprağında yaşarlar (Stetter K. O., 1996). yüksek sıcaklıklara dayanıklılık ve bu sıcaklıklarda kararlılıklarını koruyabildikleri için endüstriyel uygulamalarda kullanıcılara avantajlar sağlamaktadırlar (Aguilar A. ve arkadaşları, 1998; Haki G. D., Rakshit S. K., 2003; Kristjansson J. K., 1989; Maugeri T. L. ve arkadaşları, 2001). Yüksek sıcaklıklarda kullanılmalarının en büyük avantajları; mikrobiyal kirlilik riskini azaltmaları, substratın çözünürlüğünü ise arttırmalarıdır (Bruins M. E. ve arkadaşları, 2001).

Hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan ve hidrolaz ailesi kategorisine giren estera enzimleri, karboksilik ester bağlarını parçalarlar (Bornscheuer U. T. ve Kazlauskas R. J., 2005). Doğal ve doğal olmayan geniş bir substrat seçiciliği olduğu için, farklı tür reaksiyonlarda kullanım potansiyelleri de çok yüksektir. Kofaktör kullanımı gerektirmezler, organik solventlerde çok kararlıdır ve ürün oluşumunda seçicilik gösterirler (Faber K., 1997; Jaeger K. E. ve arkadaşları, 1999). Bu enzim, sahip oldukları yararlı özelliklerinden dolayı, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda özel bir öneme sahiptir (Faber K., 1997; Quax W. J. ve Broekhuizen C. P., 1994; Panda T. ve Gowrishankar B. S., 2005).

Enzimlerin immobilizasyonu, enzimlerin sadece tekrar tekrar değil, aynı zamanda daha verimli kullanılabilmesine olanak sağladığı için oldukça önemlidir. Serbest haldeki enzimle kıyaslandığında immobilize enzim, çevresel değişikliklere daha dayanıklıdır (Guisan M. J., 2006; Kennedy J. F. ve White C. A., 1985) ve bazı durumlarda, enzim aktivite kaybına uğramasına rağmen uzun süreçte değerlendirildiğinde, kararlılığını daha fazla muhafaza edebilmektedir (Tang Z. X. ve arkadaşları, 2006; Biró E. ve arkadaşları, 2008). Bu yüzden, farklı metotlar kullanılarak çeşitli taşıyıcı maddeler üzerine pek çok immobilizasyon tekniği geliştirilmiştir (Morales A. ve arkadaşları, 2000; Coradin T. ve Livage J., 2003; Chen X. ve arkadaşları, 2002; Bellezza F. ve arkadaşları, 2003; Gole A. ve arkadaşları, 2000; Rosevear A., 1984). Bilim adamları, nanoteknolojinin gelişimi ile birlikte, nano boyuttaki malzemelerin manyetizma ve geniş yüzey alanına sahip olma gibi özelliklerinden dolayı immobilizasyonda kullanılabileceklerini göstermişlerdir (Li J. ve arkadaşları, 2003).

İmmobilizasyon işleminde taşıyıcı madde olarak en çok kullanılan biyo-polimerlerden birisi olan kitosan, kitinin asetil gruplarının kısmi olarak uzaklaştırılmasıyla elde edilen bir poli-N-asetil glikozamindir (Juang R. S. ve arkadaşları, 2001). Kitosan, biyoyumumluluk, antibakteriyal olma, zararsız ürünlere dönüştürülebilme, ağır metal iyonlarıyla şelat oluşturma, jel oluşturma ve hidrofobiklik gibi birtakım biyolojik ve kimyasal özelliklere sahip olmasının yanı sıra, proteinlere olan ilgisi ile de dikkat çekmektedir (Lee M. K. ve arkadaşları, 2005; Shu X. Z. ve Zhu K. J., 2002; Krajewska B., 2004).

Günümüze kadar, kitosandan nano-parçacık elde edilmesinde, farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi de iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak kitosan nano-parçacık hazırlanmasıdır (Jiayin Z. ve Jianmin W., 2006; Tang Z. X. ve arkadaşları, 2007). Hazırlanan nano-parçacıkların, ilaç taşıyıcı özellikleri (Berthold A. ve arkadaşları, 1996; Tian X. X. ve Groves M. J., 1999), laboratuvar ortamında çeşitli organizmalara karşı antimikrobiyal etkileri ve kurşun tutma kapasiteleri (Qi L. ve arkadaşları, 2004a; Qi L. ve Xu Z., 2004b), asit boyar maddesi olan Asit Yeşili 27'yi tutma kapasitesi (Hu Z.G. ve arkadaşları, 2006), çeşitli

fonksiyonel gruplarla yeniden düzenlenmesi (Lee D. W. ve arkadaşları, 2004), çevresel parametrelerin parçacık boyutuna etkilerinin incelenmesi (Zhang H. ve arkadaşları, 2004; Grenha A. ve arkadaşları, 2005), elektrokinetik özellikleri ve kolloidal kararlılığı gibi bazı fiziksel özellikleri (Leon T. L. ve arkadaşları, 2005), oligonükleotit taşıma özellikleri (Katas H. ve Alpar O., 2006) ve DNA ile oluşturdukları nano boyuttaki kürecikler, DNA' yı serbest bırakma özellikleri ve kitosan-DNA nano-parçacıkların biyolojik uygulamalarını (Masotti A. ve arkadaşları, 2007; Masotti A. ve arkadaşları 2008) incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler üç kategoride özetlenebilir.

1. Kitosan nano-parçacık hazırlanması

- Kitosan sentezi
- Kitosan karakterizasyonu
- Kitosan nano-parçacık elde edilmesi
- Kitosan nano-parçacık karakterizasyonu

2. Esteraz enziminin elde edilmesi,

- E.coli de ifadelenmesi
- Enzim saflaştırılması
- Aktivite ölçümleri
- Konsatrasyon ölçümleri

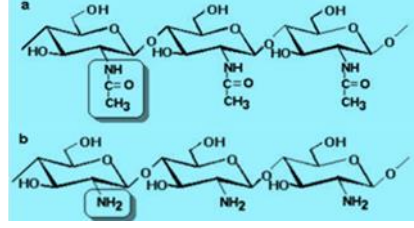
3. Esteraz enziminin kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu,

- Immobilizasyon optimizasyonu
 - Enzim konsantrasyonu
 - Nano-parçacık miktarı
 - Sıcaklık
 - pH
 - Karıştırma hızı
 - Zaman
- İmmobilize enzimin karakterizasyonu
 - Optimum pH
 - Optimum sıcaklık
 - Kinetik sabitler; K_m , V_{max} ve k_{cat}
 - pH kararlılığı
 - Termal kararlılık
 - Tekrar kullanılabilirlik
 - Çeşitli kimyasalların ve metal iyonlarının etkileri
 - Depolanma kararlılığı

Bu üç kategorideki deneysel çalışmalar aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

1. Kitosan nano-parçacık yapımı

- Kitosan sentezi:** Kitosan, kitinin asetil gruplarının elimine edilmesi prensibi ile Boyacı ve arkadaşları (2010) tarafından modifiye edilmiş Rigby and Wolfrom metoduna göre sentezlenmiştir. Deney prosedüründe 15.0 g kitin 720.0 ml 40.0% (w/w) lık NaOH çözeltisi içinde 115°C de 6 saat azot gazı altında geri soğutucu varlığında kaynatılmış ve elde edilen kitosan deiyonize su ile pH 'ı 7.0 olana kadar yıkanmış ve de sonraki aşamalarda kullanmadan önce 60°C de kurutulmuştur.



Şekil 1. a) Kitin b) Kitosan yapıları

- b. Kitosan karakterizasyonu:** Kitosan, sentezlendikten sonra çeşitli cihazlar kullanılarak karakterize edilmiştir. Kitosanın, yapısındaki fonksiyonel gruplar, FT-IR (Fourier Transform-Infrared) (Perkin Elmer Spectrum 100) cihazı ile; elementel kompozisyonu, elementel analiz (LECO-CHNS-932, Mönchengladbach, Germany) cihazı ile belirlenmiştir. Elementel analiz sonuçları kullanılarak asetil gruplarının uzaklaştırılma derecesi hesaplanmıştır. Kitinin ve kitosanın fiziksel ve morfolojik yapılarının tayini, taramalı electron mikroskobu-SEM (Scanning Electron Microscopy) (Philips XL-30S FEG, Eindhoven, The Netherlands) cihazı ile yapılmıştır.
- c. Kitosan nano-parçacık elde edilmesi:** Kitosan nano-parçacıkları, Jiayin ve Jianmin tarafından belirlenen iyonik jelleşme metodu modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bu metoda göre; 0.5 g kitosan 100 ml asetik asit 1.0% (v/v) ile çözölmüş ve ortamın pH 'ı NaOH ile 4.7'ye ayarlanmıştır. Nano-parçacıklar, 1.0 ml tripolifosfatın 0.25% (w/v) hazırlanan kitosan çözöltisine, oda şartlarında otomatik pipet ile manyetik karıştırıcı varlığında damla damla ilave edilmesi sonucunda elde edilmiştir. Bu çözöltiye, bir saat inkübasyon sonrasında, 13,500 devirde (rpm) 30 dakikalık çöktürme işlemi uygulanmış ve kitosan nano-parçacıklarından oluşan şeffaf jel çökelek halinde elde edilmiştir. Bu jel dondurup-kurutma yöntemi ile karakterizasyon öncesi kuru hale getirilmiştir.
- d. Kitosan nano-parçacık karakterizasyonu:** Elde edilen nano-parçacıkların, yüzey morfolojisi ve fiziksel yapısı, taramalı electron mikroskobu-SEM cihazı ile; boyut dağılımı, dinamik ışık saçma-DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Zetasizer, 3000 HSA) cihazı ile belirlenmiştir. Nano-parçacık oluşumu sırasında, kitosanın yapısında meydana gelen fonksiyonel grup değişiklikleri ise, FT-IR cihazı kullanılarak yapılmıştır.

2. Esteraz enziminin elde edilmesi

a. Esteraz Enziminin *E.coli* de İfadelemesi

Esteraz enziminin laboratuvarlarımızda üretimi, bu enzimin *E.coli* de ifadenmesi (ekspirasyon) çalışmaları ile yapılmıştır. Daha önceki projemiz kapsamında yapılan çalışmalarımız sonucu elde edilen pET protein ifadeleme sistemine özel olarak yerleştirilmiş esteraz geni, bu projemizde de kullanılmıştır. pET vektörü içinde bulunan esteraz enzimi, IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) ilavesi ile yüksek miktarda ifadelenabilmektedir. Çalışmalarımızda taze olarak ekilen *E.coli* hücreleri (içerisinde esteraz enzimini kodlayan genin bulunduğu pET vektörü aktarılmış), önce

100.0 ml LB besi ortamında (içerisinde Kanamisin antibiyotiği bulunan) gece boyunca çalkalamalı inkubatörde 37°C 'de bekletilmiş ve ertesi günü hücre kültürü 1:10 oranında seyreltilip taze 1000.0 ml LB besi ortamına (içerisinde Kanamisin antibiyotiği bulunan) ilave edilip ve çalkalamalı inkubatörde 37°C 'de, optik yoğunluk yaklaşık 0.8 oluncaya kadar büyütme işlemine devam edilmiştir. Bu aşamada büyümekte olan hücre kültürüne, 1000.0 ml, 0.1 M IPTG, ilave edilerek, hücreler yaklaşık 4 saat daha 37°C 'de çalkalamalı inkubatörde bekletilerek esteraz enziminin ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra işlem durdurulup hücreler 7000 devirde (rpm) 10 dakika çöktürme işlemi yapılmış ve elde edilen çökelek -20°C 'de bir sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklanmıştır. Enzim ifadenmesi miktarı, %10 'luk SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) analizi ile değerlendirilmiştir.

b. Esteraz Enziminin Saflaştırılması

Yüksek miktarda ifadelenen esteraz enzimi, immobilizasyon çalışmalarından önce çeşitli basamaklardan geçirilerek saflaştırılmıştır. Bu basamaklardan en etkili ve en önemlisi afinite kromatografisidir. Çünkü, ifadenme için kullanılan vektör bünyesinde hem N-ucunda (N-terminal) hem de C-ucunda (C-terminal) 'His tag' adı verilen altı adet Histidin amino asidinden oluşan özel bir bölge vardır ve bu bölgeye ait çeşitli ticari reçineler saflaştırma amaçlı hazır olarak satılmaktadır. Çalışmalarımızda bu tür bir reçine kullanarak düşük basınç kolon kromatografisi ile saflaştırma yapılmıştır. -20°C 'den alınan çökelek 50.0 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ile çözülüp, sonikasyon işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 13,000 devirde (rpm) 30 dakika çöktürme işlemi yapıldıktan sonra sıvı kısım 2.5 cm x 10.0 cm His-tag Nikel Afinite (Sigma) kolonuna yüklenmiştir. Kolon 0.3 M sodyum klorür içeren 50.0 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ile yıkandıktan sonra, proteinler 250.0 mM imidazol ve 0.1 M sodyum klorür içeren 50.0 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ile kolondan alınmıştır. Kolondan çıkan proteinler fosfat tampon çözeltisine karşı gece boyunca diyaliz yapıp konsantre edildikten sonra immobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere küçük hacimlere ayrılıp -20°C 'de saklanmıştır. Enzimlerin saflığı %10 'luk SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

c. Esteraz Enzimi Aktivite Ölçümleri

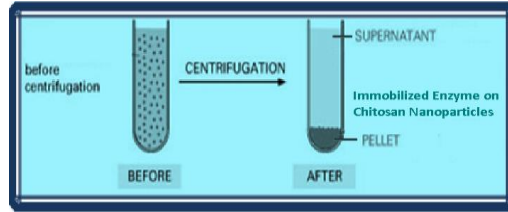
Esteraz enziminin karakterizasyonu, immobilizasyon öncesi ve sonrası çeşitli aşamalarda aktivite ölçümleri ile yapılmıştır. Enzim ait aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak p-nitro fenil asetat (*p*-nitrophenyl acetate) substratı kullanılarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi, 1.0 ml sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde 0.5 mM substrat ve 0.1 mM saflaştırılmış enzim kullanılarak 400 nm 'de oluşan absorbans değişimlerinden hesaplanmıştır. Bir unite enzim aktivitesi, enzimin dakikada, pH 7.2 ve 55°C 'de parçaladığı substrattan 1.0 mikromol p-nitrofenol açığa çıkarabilmesi için gerekli olan miktar olarak tanımlanmıştır. Esteraz enzimine ait Michaelis-Menten eşitliği kullanılarak enzim kinetiği parametreleri (K_m , V_{max} ve k_{cat}) hesaplanmıştır.

d. Esteraz Enzimi Konsantrasyonu Ölçümleri

Enzime ait konsantrasyon belirlemeleri renk değişimine dayalı bir metot olan Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile, Bovine Serum Albumin proteini standart madde olarak kullanılarak yapılmıştır.

3. Esteraz enziminin kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilizasyonu

Kitosan nano-parçacıkları, saflaştırılmış enzim ile inkübe edilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Immobilizasyon yöntemi

a. Immobilizasyon optimizasyonu

Enzim konsantrasyonu: Enzimin kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilme etkinliği değişen enzim konsantrasyonu ile test edilerek optimize edilmiştir. Bu amaçla kullanılan enzim konsantrasyonları şöyledir; 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml.

Nano-parçacık miktarı: Nano-parçacık miktarı, değişik miktarlarda nano parçacığın sabit enzim konsantrasyonu ile test edilerek optimize edilmiştir. Bu deneyde nano-parçacık miktarları 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 mg olarak kullanılmıştır.

Sıcaklık: Enzim immobilizasyonu sırasında, sıcaklığın etkisini belirlemek için, sabit miktarda enzim, sabit miktarda nano-parçacık üzerine immobilize edilmiştir. Uygulanan sıcaklıklar: 15, 25, 37, 50 ve 60°C olarak denenmiştir.

pH: pH 'ın enzim immobilizasyonuna etkisi, değişen pH ortamında enzimin kitosan nano-parçacıklarına immobilize edilme etkinliği test edilerek belirlenmiştir. pH 4, 6, 7, 8, 10, 12 gibi önce geniş aralık, daha sonra ise pH aralığı daraltılarak en iyi immobilizasyon koşulunun belirlenmesi sağlanmıştır.

Karıştırma hızı: Immobilizasyon sırasında uygulanan karıştırma hızının, immobilizasyona etkisi 50, 100, 200, 300 ve 400 devir (rpm) değerleri test edilerek belirlenmiştir.

Zaman: Immobilizasyon zamanı optimizasyonu için, enzim ve nano-parçacık inkübasyonu 0.5, 1, 2 ve 3 saat gibi değişen zaman aralıklarında test edilerek en iyi immobilizasyon süresi belirlenmiştir.

b. İmmobilize enzimin karakterizasyonu

Optimum sıcaklık: Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin

aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek için, enzim aktivite ölçümleri, standart deney koşullarında 25-75°C arası değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tampon çözeltisi deney öncesi gerekli olan sıcaklığa ayarlanarak deneyler yapılmıştır.

Optimum pH: Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesine pH 'ın etkisini incelemek için, belirlenen optimum sıcaklıkta, değişik pH değerlerine sahip olan ortamlarda enzim aktivitesi ölçülerek optimum pH değeri belirlenmiştir. Kullanılan tampon çözeltisi ile pH aralıkları şu şekilde ayarlanmıştır: 4.0-6.0 (50.0 mM sodyum asetat), 6.0-7.5 (50.0 mM sodyum fosfat), 7.0-10.0 (50.0 mM Tris-HCl) ve 9.0-11.0 (Tris-glisin).

Kinetik sabitler: Immobilize edilen enzimin kinetik sabitleri, değişen *p*-nitrofenil asetat substratı konsantrasyonlarında, aktivite ölçümleri yapılmıştır. Lineweaver-Burk diyagramından K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

pH kararlılığı: Immobilize edilen enzim, pH değerleri değişik olan ortamlarda (pH 5, 7, 9, 11) 4 saat bekletilmiştir. Her saat başı alınan örneklerde aktivite tayinleri yapılarak, her bir ortamdaki % bağıl aktivite değeri hesaplanarak serbest enzim aktivite değerleri ile kıyaslanmıştır. Böylelikle immobilize enzimin pH kararlılığı bulunmuştur.

Termal kararlılık: Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzim, değişen sıcaklıklarda dört saat bekletilmiş ve her saat başı aktivite değerleri tayin edilmiş ve % bağıl aktiviteleri (25, 50, 65, 75°C 'de) hesaplanmıştır. Daha sonra da, serbest esteraz enzimi için termal kararlılık denemeleri ile kıyaslanmıştır.

Tekrar kullanılabilirlik: Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin tekrar kullanılabilirliği, belirli aralıklarla, immobilize edilmiş enzimin aktivite tayinleri optimum koşullarda gerçekleştirilerek belirlenmiştir.

Çeşitli kimyasalların ve metal iyonlarının etkileri: Immobilizasyon işleminden sonra esteraz enzimi aktivitesini etkileyen faktörlerin araştırılmasında, enzim, çeşitli iyonlarla (MgCl₂, NaCl, KCl ve CaCl₂ gibi), çeşitli inhibitörler ve deterjanlarla (ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS) ve Triton X-100 gibi) ve çeşitli organik çözücülerle (isopropanol, ethanol, acetone, chloroform) reaksiyona sokularak, bu kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Depolanma kararlılığı: Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin depolanma kararlılığını belirlemek için, nano-parçacıklar, oda şartlarında 1-30 gün aralığında saklanarak ve bu zaman aralığında örnekler alınarak optimum koşullarda aktiviteleri belirlenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve SONUÇLAR

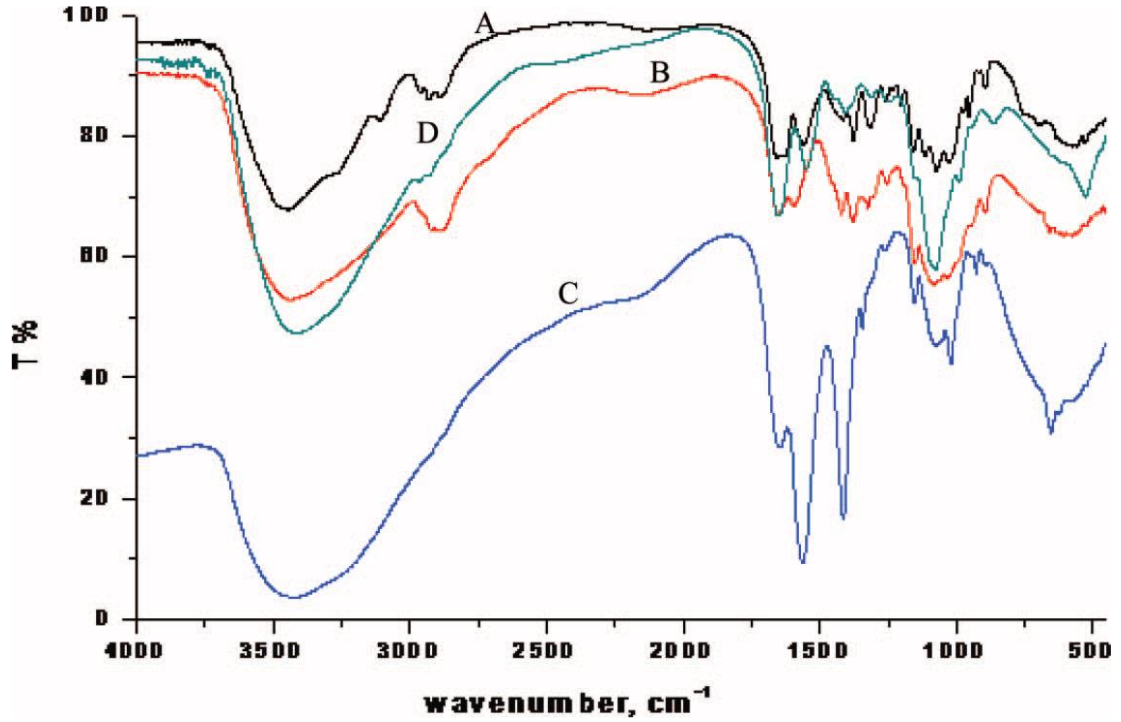
Kitosan sentezi ve karakterizasyonu

Kitosan deasetilasyon işlemine göre kitinden elementel analiz sonuçlarına göre %89 oranında asetillenerek sentezlenmiştir. Asetilasyon değeri hesabında C/N değerleri şu formüle göre hesaplanmıştır.

$$D.D = \left(1 - \frac{C/N - 5.145}{6.816 - 5.145} \right) \times 100$$

Formüldeki 5.145 C/N N-deasetillenmiş kitosana, 6.816 ise N-asetillenmiş kitine aittir ve asetillenme derecesi literatürdeki bilgiler ile uyum içindedir.

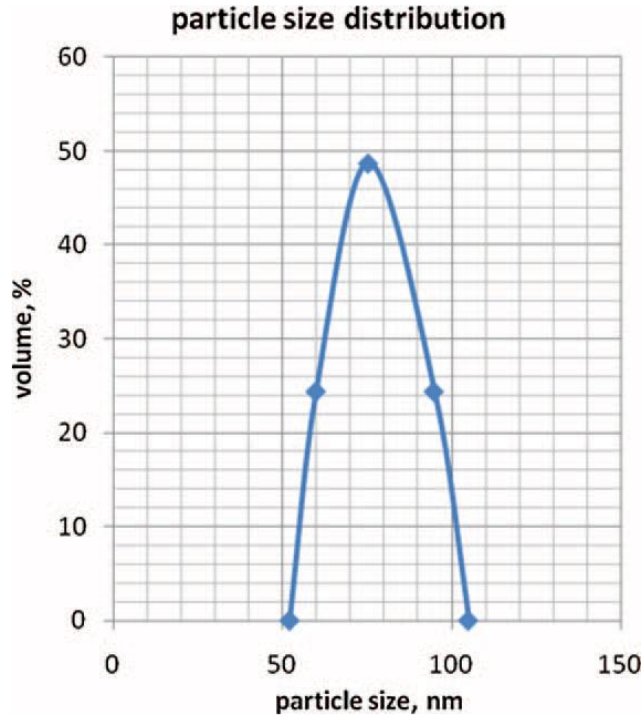
Şekil 3 de A)kitin, B)kitosan a ait FT-IR spektrumları görülmektedir ve literatürde var olan spektrumlar ile uyum içinde olup 1595 ve 1650 cm⁻¹ de görülen absorpsiyon bandları kitosandaki primer amin ve amid I bantlarıdır.



Şekil 3. (A) kitin, (B) kitosan, (C) kitosan nano-parçacık, (D) esteraz immobilize edilmiş kitosan nano-parçacık için FT-IR spektrumları.

Kitosan nano-paracık sentezi ve karakterizasyonu

Kitosan nano-parçacıklar iyonik jelleşme yöntemine göre artı yüklü polimer ile eksi yüklü TPP arasındaki reaksiyona göre elde edilmiştir. Oluşan nano-parçacıkların büyüklükleri dinamik ışık saçılımı ile ölçülmüş ve parçacık büyüklük dağılımı hesaplanmıştır (Şekil 4). Sonuçlar dar büyüklük dağılımı göstermiş olup ortalama büyüklük 75.3 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. DLS ile yapılmış kitosan nano-parçacık büyüklük dağılımı

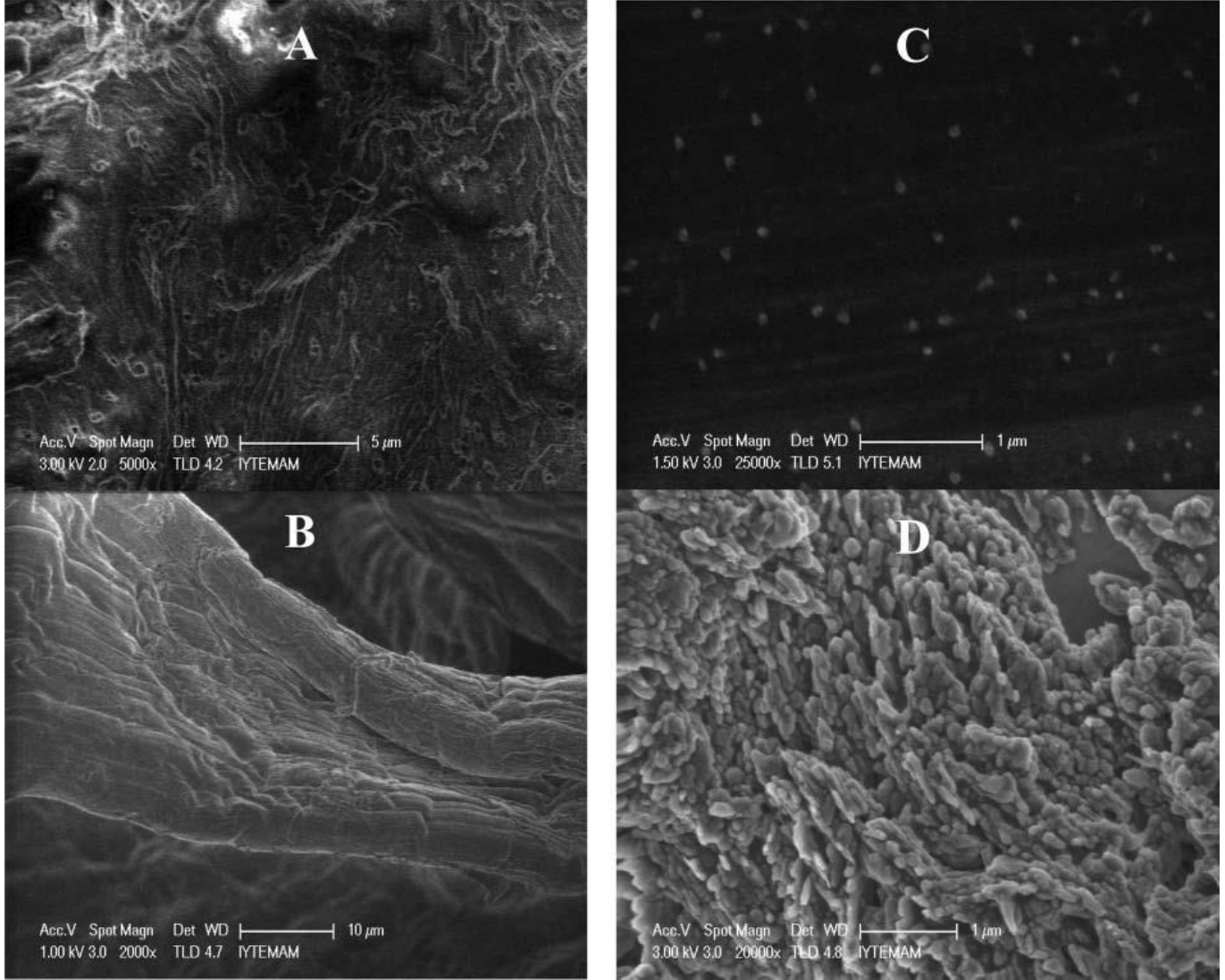
Kitosan nano-parçacıklar taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş ve morfolojik incelemeleri sonucu parçacıkların yuvarlak ve iyi dispers oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 5C).

Kitosan nano-parçacıklarında meydana gelen fonksiyonel gruplara ait değişimler FT-IR ile incelenmiş olup spektrumlarında 1595 cm⁻¹ deki bandın kaybolup yerine 1562 cm⁻¹ de yeni keskin bir band oluşumu gözlenmiştir. Bu değişimlerin fosforik ve amonyum iyonları arası oluşan bağlardan olduğu literatürdeki diğer yayınlar tarafından desteklenmiştir (Xu et al., 2003 ve Knaul et al., 1999).

Rekombinant esteraz enziminin elde edilmesi, kitosan nano-parçacık üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu

Esteraz enzimi E.coli içinde yüksek miktarda üretildiği laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalar ile gösterildiği gibi elde edilmiştir. (Tekedar ve Şanlı-Mohamed, 2011). Enzim homojen olarak saflaştırılmış ve 30-50 mg saf arası enzim olarak sağlanmıştır. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile saf enzim elde edilen kitosan nano-parçacıklar üzerine

tutturulmuştur. Immobilize enzim çeşitli yöntemler ile karakterize edilmiştir. Yüzey morfolojilerine taramalı elektron mikroskobu ile bakılmış (Şekil 5D) ve enzim immobilizasyonu ile nanoparçacık yüzeyinde bazı engeller oluştuğu gözlenmiştir. Enzim



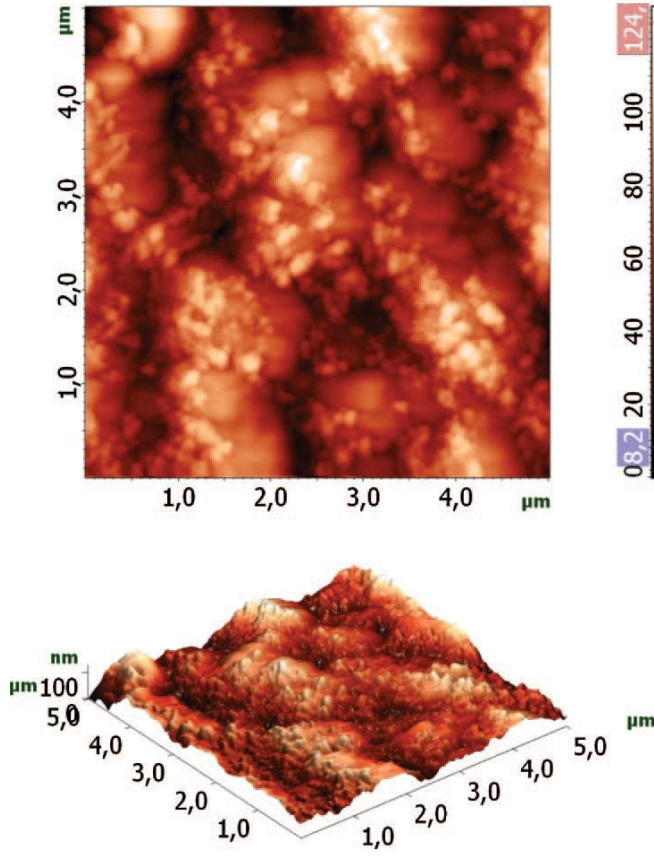
Şekil 5. (A) kitin, (B) kitosan, (C) kitosan nano-parçacık, (D) esteraz immobilize edilmiş kitosan nano-parçacık için taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri.

konsantrasyonun artması ile de yüzeyde poroz görüntülerin olduğu görülüp yuvarlak daha düzgün şekilde olan nano-parçacıkların enzim ile daha düzensiz bir yapıya büründüğü gözlemlenmiştir.

Şekil 6 de görüldüğü üzere, kitosan nanoparçacık üzerine immobilize edilmiş esteraz enzimi atomik kuvvet mikroskobu ile incelenmiş ve nanoparçacık ile enzim birleşmesi sonucu oluşan şekillerinin SEM görüntüleri ile uyum içinde oldukları gözlemlenmiştir.

Esteraz enziminin nanoparçacık üzerine immobilizasyonu, FTIR çalışmaları yapılmış ve enzimin kitosan nanoparçacık üzerine immobilizasyonu sonucunda meydana gelen fonksiyonel gruplar incelenmiştir (Şekil 3D). Kitosan nanoparçacık ise kıyaslandığında, 1650

cm-1 deki pikin şiddetinin azaldığı ve 1560 cm-1 ve 1550 cm-1 de ki iki pikin sırasıyla 1413 cm-1 ve 1407 cm-1 e kaydığı ve pik şiddetlerinin dramatik olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Bu değişikliklere enzim immobilizasyonunun sebep olduğu sonucu düşünülmüştür.



Şekil 6. Esteraz immobilize edilmiş kitosan nano-parçacıklara ait atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüsü

Kitosan nanoparçacık üzerine enzim immobilizasyonun optimizasyonu

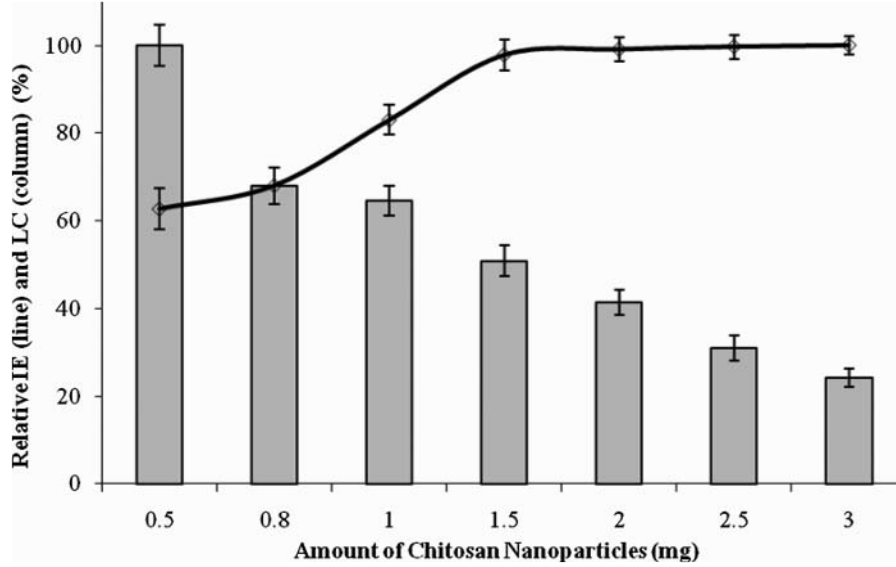
Immobilizasyon parametrelerinden, sıcaklık, pH, immobilizasyon süresi, zamanı, karıştırma hızı, enzim konsantrasyonu ve kitosan miktarı detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Her bir durum için immobilizasyon etkisi ve nanoparçacık üzerine enzim yükleme kapasitesi Formül 1 ve 2 ile hesaplanmıştır.

$$IE = \frac{(\text{Total Esterase} - \text{Free Esterase})}{\text{Total Esterase}} \times 100 \quad (1)$$

$$LC = \frac{(\text{Total Esterase} - \text{Free Esterase})}{\text{Nanoparticles weight}} \times 100 \quad (2)$$

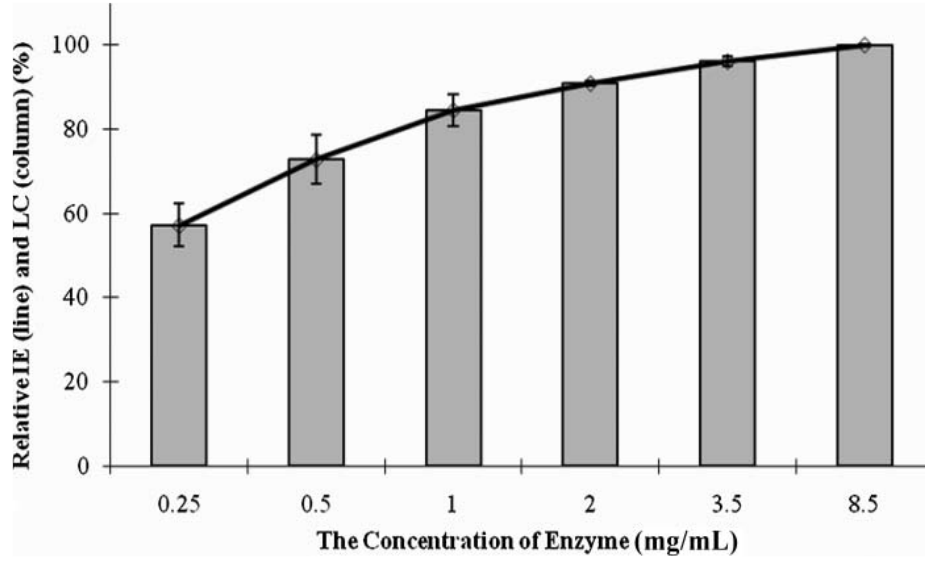
İlk olarak kitosan nano-parçacık miktarının enzim immobilizasyonuna etkisi incelenmiştir (Şekil 7). Bulunan sonuçlara göre immobilizasyon prosesi kitosan nano-parçacık

miktarına bağılı olarak immobilizasyon etkisini ve nanoparçacık üzerine enzim yükleme kapasitesini değiştirmektedir. Sabit enzim konsantrasyonunda, esteraz immobilizasyonu tipik bir doygunluk grafiği vermektedir (Şekil 7). Nano-parçacık miktarı 0.5 mg dan 1.5 mg a kadar artan bir immobilizasyon etkisi göstermiş ve %88 gibi bir değer bulunmuştur. Fakat kitosan nano-parçacık miktarının 1.5 mg dan 3.0 mg a çıkarılması ile immobilizasyon etkisi üzerinde

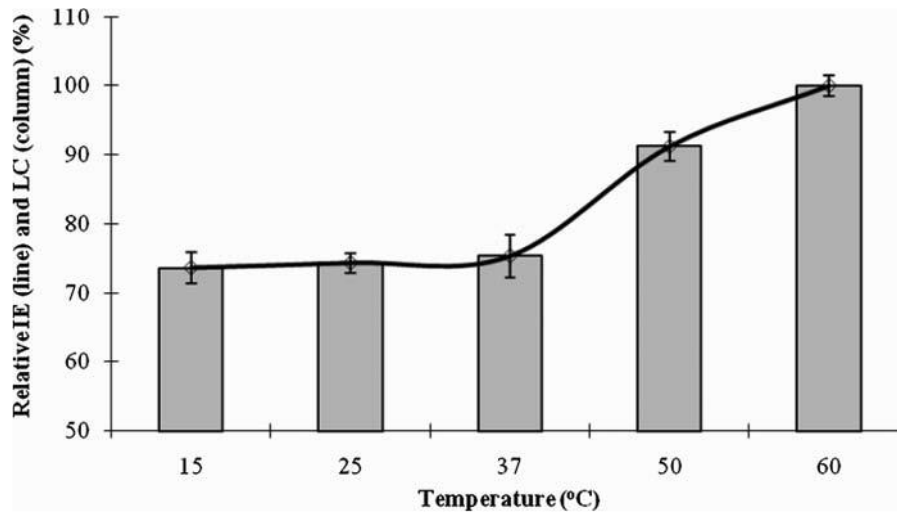


Şekil 7. Kitosan nano-parçacık miktarının immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi

çok bir değişikliğe neden olmamıştır. Değer %88 den %90 a çıkmıştır. Bu sonuçlara göre immobilizasyon işleminde enzim konsantrasyonu 1 mg/ml olduğu zaman kullanılacak kitosan miktarı 1.5 mg olması tüm enzimin nanoparçacık üzerinde tutulmasından dolayı en uygundur koşuldur. Diğer yandan sabit enzim konsantrasyonunda nano-parçacık üzerine enzim yükleme kapasitesi artan kitosan nano-parçacık miktarı ile bir düşüş göstermektedir (Şekil 7). Kitosan nanoparçacık miktarının 0.5 mg dan 3 mg a çıkarılması ile 1.0 mg/ml enzim üzerinde tutulması yaklaşık dört kat düşüş göstermektedir. Bu çalışma nano-parçacıklar üzerindeki yüzey alanının esterazın tutulması için geniş olduğunu göstermektedir.

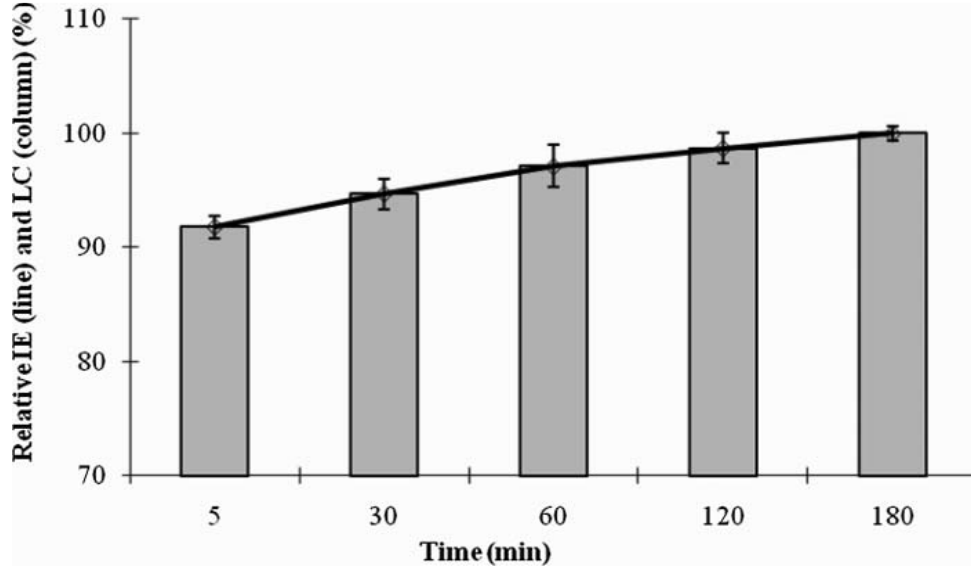


Şekil 8. Esteraz enzimi konsantrasyonunun immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi

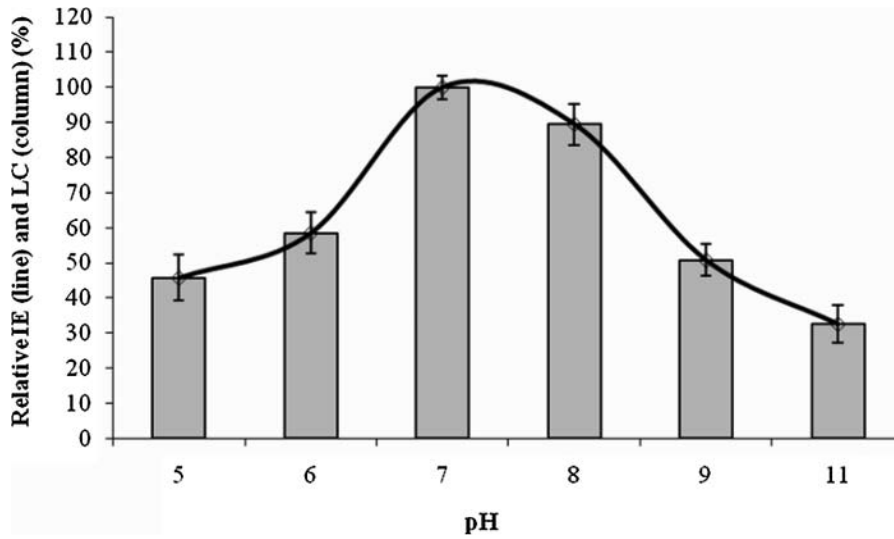


Şekil 9. Sıcaklık faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.

Uygun immobilizasyon koşulunun bulunması için esteraz enziminin konsantrasyonunda değişiklikler yapılmıştır (Şekil 8). Bu amaçla sabit kitosan miktarı ile yapılan çalışmalar sonucu hem enzim immobilizasyon etkisi hem de nano-parçacık üzerine enzim yükleme kapasitesi araştırılmıştır. Şekil 8 den de görüldüğü üzere esteraz konsantrasyonu 0.25 mg/ ml den 1.0 mg/ml ye çıkarılması lineer bir şekilde artan immobilizasyon etkisi ve nano-parçacık üzerine enzim yükleme kapasitesi göstermektedir. Fakat esteraz konsantrasyonu 1.0 mg/ml den 8.5 mg/ml ye çıkartılması ile bu etkilerin çok hızlı bir şekilde artmadığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre esteraz enziminin 1.0 mg/ml olarak kullanılmasına karar verilmiş ve çalışmalar bu miktar üzerinden devam etmiştir.



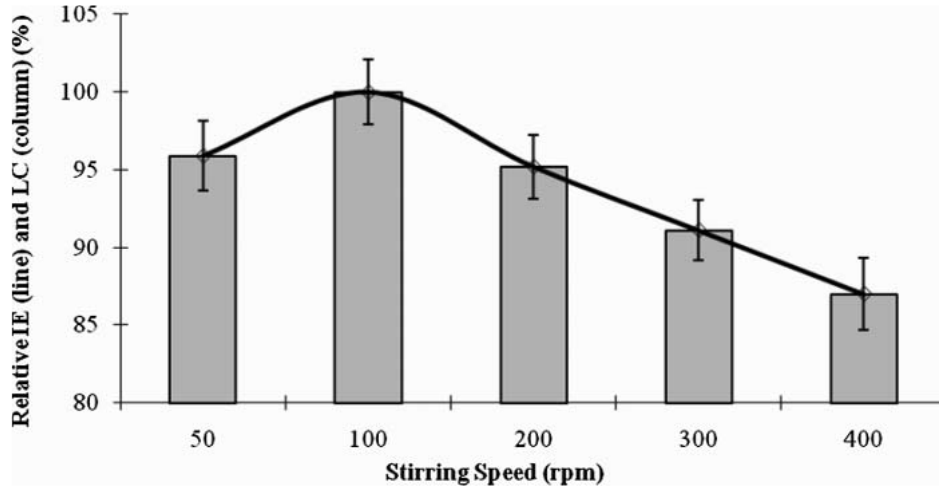
Şekil 10. Zaman faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.



Şekil 11. pH faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi.

Immobilizasyon koşullarından diğer önemli iki parametre sıcaklık ve pH dir. 60 C ye kadar artan sıcaklık, 10 ve 40 C aralığına göre, immobilizasyon etkisini ve nano-parçacık üzerine enzim yükleme kapasitesini olumlu yönde arttıran bir etki yapmıştır (Şekil 9). Bu sonuç bize yüksek sıcaklıkta enzim ve kitosan nano-parçacıklarının etkileşiminin daha iyi olabileceği yönünde bilgi vermektedir. Bu etkileşimin, enzimin bu sıcaklıklarda ya daha flexible bir yapıda olduğundan yada yüzeyde bulunan bağlanma yapabilen fonksiyonel grupların daha etkili olabilmesi ile mümkün olabileceğini göstermektedir.

Immobilizasyon koşullarında pH ın önemine bakıldığında düşük ve yüksek pH ların immobilizasyon etkisini ve nano-parçacık üzerine enzim yükleme kapasitesini olumsuz etkilediği görülmektedir (Şekil 10). pH 7 nin bu çalışmalar için en uygun pH koşulu olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiş ve adsorpsiyon prosesinin pH ile değişebileceği belirlenmiştir.



Şekil 12. Karıştırma hızı faktörünün immobilizasyon üzerine ve enzim yükleme kapasitesi üzerine etkisi

Immobilizasyon koşullarından biri olan immobilizasyon zamanının immobilizasyon etkisi ve nano-parçacık üzerine enzim yükleme kapasitesi değerlerine bakılarak sürenin önemi gösterilmeye çalışılmıştır (Şekil 11). 5 dakika sonunda %92 gibi bir değer elde edilmiş ve immobilizasyon sırasında adsorpsiyon süresinin çok kısa bir süre gerektirdiği sonucuna varılmıştır. Bu süre 3 saat gibi bir zamana uzatıldığında bu değerlerde bir artış olsa bile kayde değer bir değişme olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak immobilizasyon süresine 30 dakika olarak karar verilmiş ve immobilizasyon metodunda bu değer kullanılmıştır.

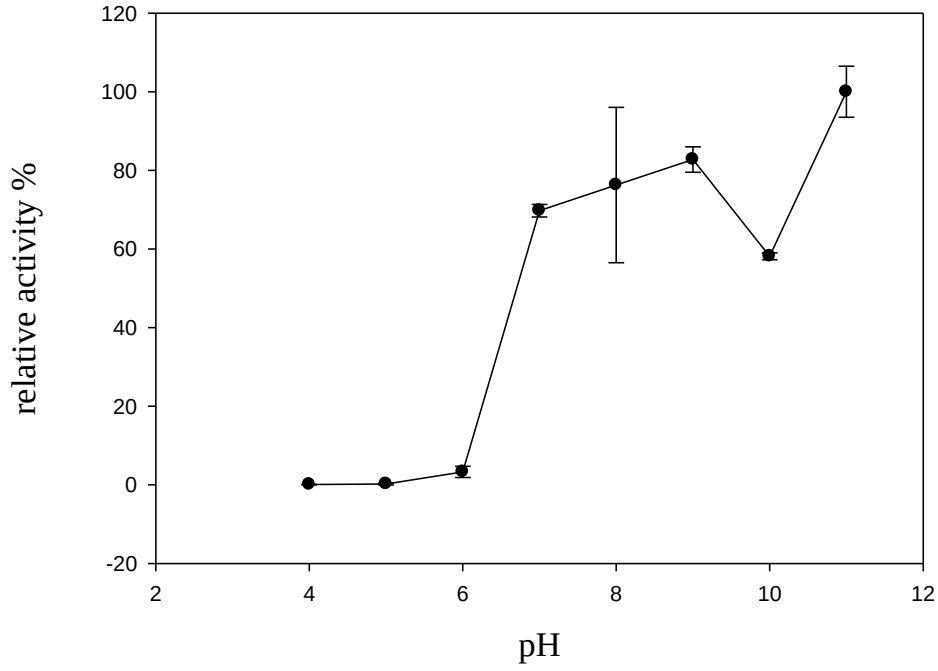
Immobilizasyon sırasında uygulanan yöntemde reaksiyon karıştırma hızının etkisi incelenmiş ve en iyi karıştırma hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir (Şekil 12). Bu sonuçlara göre immobilizasyon sırasında uygulanan hız 100 rpm den küçük olduğunda etkili bir tutulma olmadığı, 100 rpm den fazla olduğunda ise adsorpsiyon prosedürünün hızdan etkilendiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak deneylerimizde kullanılmak üzere kitosan nanoparçacık üzerine enzim immobilizasyonun optimizasyonu parametreleri şu şekildedir. 0.5 mM fosfat tamponunda (pH 7.0) bulunan 1.0 mg/ml esteraz enzimi, 1.5 mg kitosan nano-parçacık ile 30 dakika 60 C de 100 rpm karıştırma hızı ile inkübe edilerek immobilizasyon işlemi en iyi şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında immobilize termofilik esteraz enzimi serbest enzime kıyasla %88.5 aktivite göstermektedir.

İmmobilize enzimin karakterizasyonu

Optimum pH

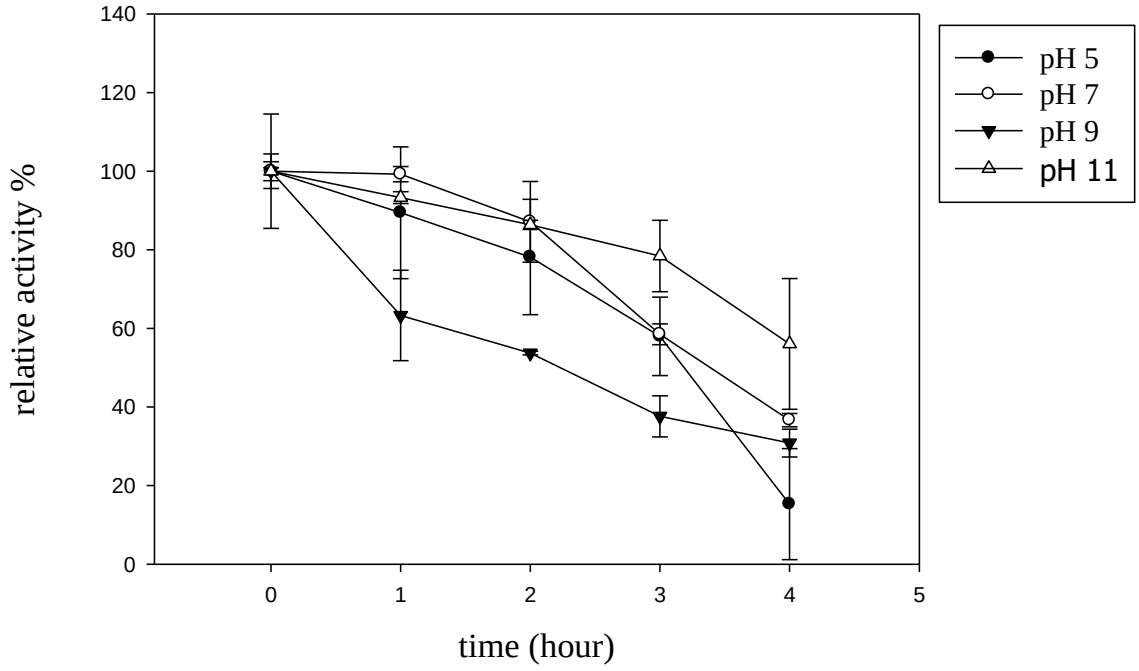
pH değeri enzim aktivitesi üzerine etki eden önemli faktörlerden biridir. Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesine pH 'ın etkisini incelemek için, belirlenen optimum sıcaklıkta, değişik pH değerlerine sahip olan ortamlarda enzim aktivitesi ölçülerek optimum pH değeri belirlenmiştir (Şekil 13). Bu sonuçlara göre enzim pH 6 ya kadar hiç aktivite göstermez iken, en yüksek aktiviteyi pH 11 de göstermiştir.



Şekil 13. Immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisi.

pH kararlılığı

İmmobilize edilen enzim, pH değerleri değişik olan ortamlarda (pH 5, 7, 9, 11) 4 saat süre ile bekletilmiştir. Her saat başı alınan örneklerde aktivite tayinleri yapılarak, her bir ortamdaki % bağıl aktivite değeri hesaplanmıştır (Şekil 14). Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite gösteren pH 11 de enzim dört saat boyunca en kararlı şekilde davranmış ve bu süre sonunda aktivitesinin yaklaşık %40 kadarını kaybetmiştir.



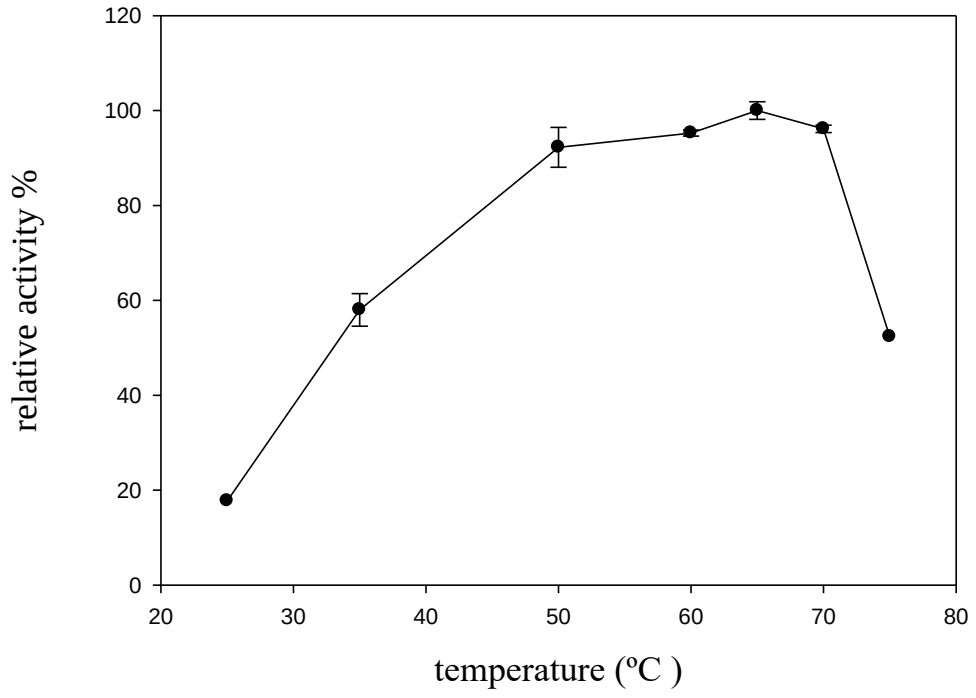
Şekil 14. Immobilize enzimin pH kararlılığı

Optimum sıcaklık

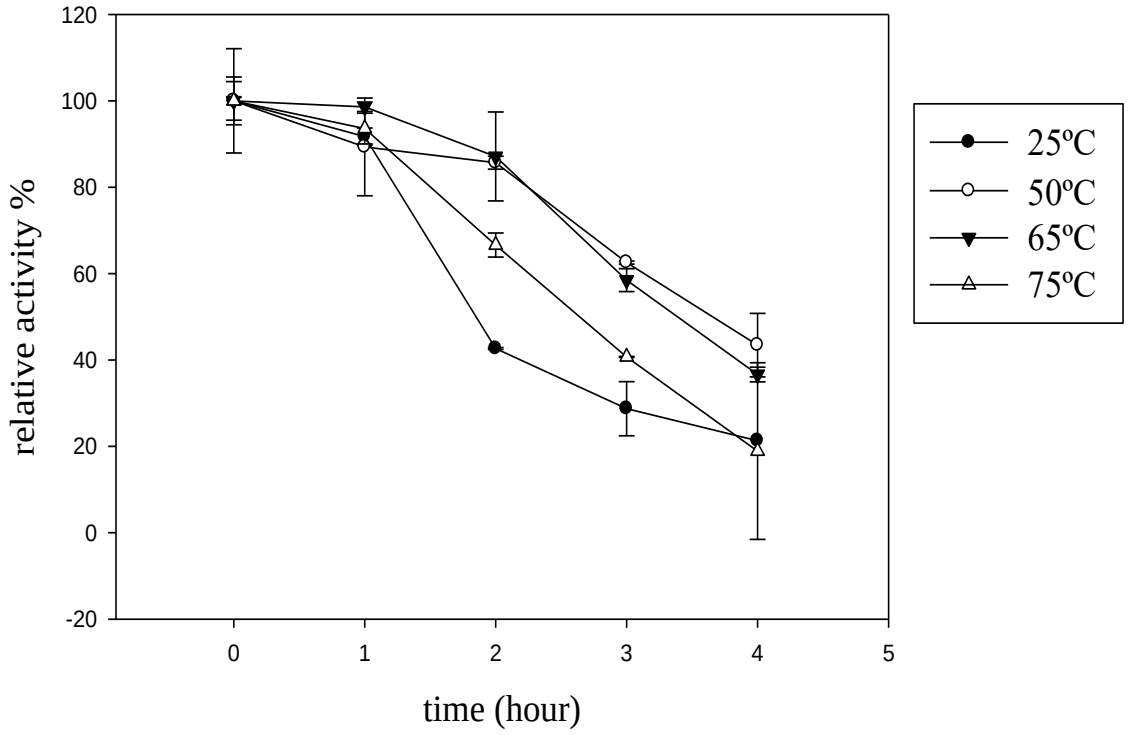
Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek için, enzim aktivite ölçümleri, standart deney koşullarında 25-75°C arası değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 15). Şekilden görüldüğü gibi en yüksek aktivite 65 °C elde edilmiştir.

Termal kararlılık

Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzim, değişen sıcaklıklarda dört saat bekletilmiş ve her saat başı aktivite değerleri tayin edilmiş ve % bağıl aktivite (25, 50, 65, 75°C 'de) hesaplanmıştır (Şekil 16). Bu sonuçlara göre dört saat sonunda immobilize enzim 50°C de aktivitesinin yaklaşık %50 sini koruyabilmiştir. Aynı süre sonunda en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklıkta enzim %60 aktivitesini kaybetmiş ve sadece %40 aktivitesini koruyabilmiştir.



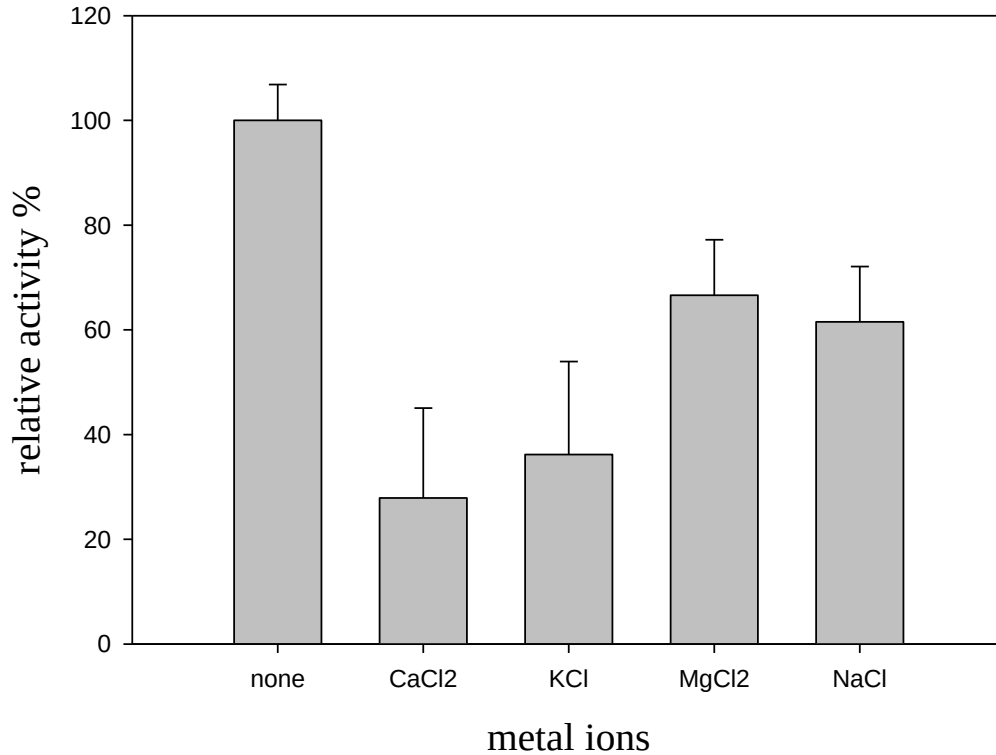
Şekil 15. Immobilize enzim üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 16. Immobilize enzimin sıcaklık kararlılığı

Çeşitli kimyasalların ve metal iyonlarının etkileri

İmmobilizasyon işleminden sonra esteraz enzimi aktivitesini etkileyen faktörlerin araştırılmasında, enzim, çeşitli iyonlarla ($MgCl_2$, $NaCl$, KCl ve $CaCl_2$ gibi) reaksiyona sokularak, bu kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 17). İyon konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde immobilize enzim reaksiyona sokulurken, hiç bir iyon konmamış immobilize enzim aynı süredeki inkübasyonu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Deney sonuçlarına göre, immobilize enzim aktivitesine en etkili iyon Ca^{+2} olmuş ve enzim aktivitesini %70 den fazla düşürmüştür. K^{+1} , Mg^{+2} ve Na^{+1} iyonlarında immobilize esterazın aktivitesini yaklaşık, sırasıyla %70, %35 ve %40 kadar düşürmüştür (Şekil 17).

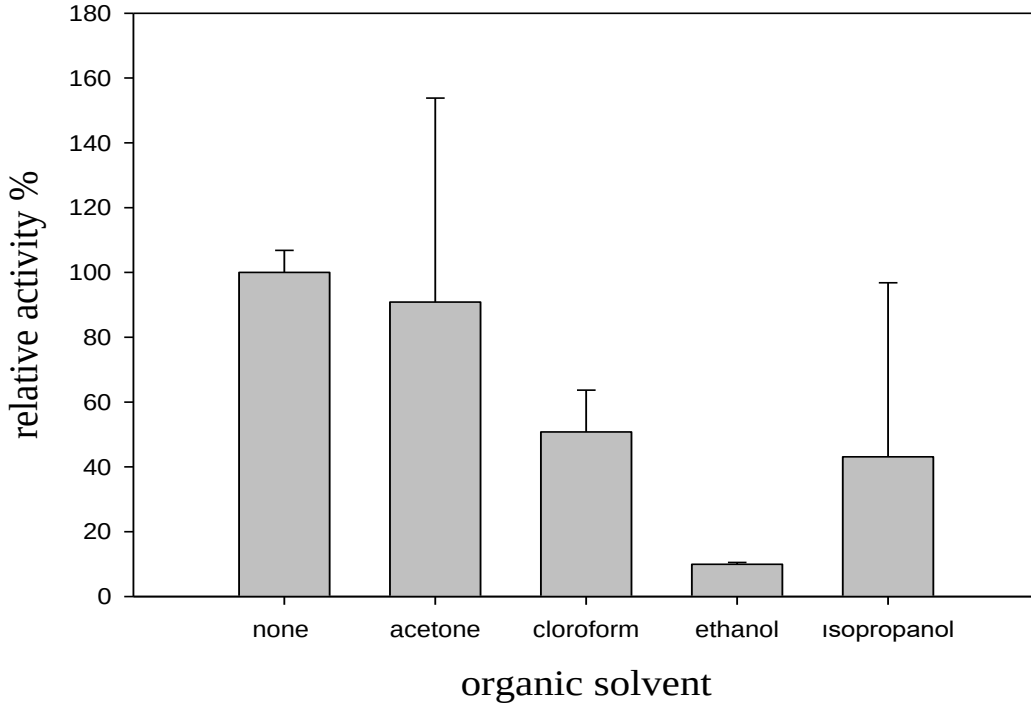


Şekil 17. Çeşitli metal iyonların immobilize enzim üzerine etkileri

Çeşitli organik çözücülerin etkileri

İmmobilizasyon işleminden sonra esteraz enzimi aktivitesini etkileyen faktörlerin araştırılmasında, enzim, çeşitli organik çözücülerle (isopropanol, ethanol, acetone,

chloroform) reaksiyona sokularak, bu kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 18). Organik çözücülerin konsantrasyonları %10 (v/v) olacak şekilde immobilize enzim reaksiyona sokulurken, hiç bir organik çözücü konmamış immobilize enzim aynı süredeki inkübasyonu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Deney sonuçlarına göre, immobilize enzim aktivitesine en etkili organik çözücü etanol olmuş ve enzim aktivitesini %90 den fazla düşürmüştür. İsoopropanol, acetone ve chloroform çözücüleri de immobilize esterazın aktivitesinde inhibitor etkisi yapmış ve yaklaşık, sırasıyla %54, %10 ve %58 kadar düşürmüştür (Şekil 18).

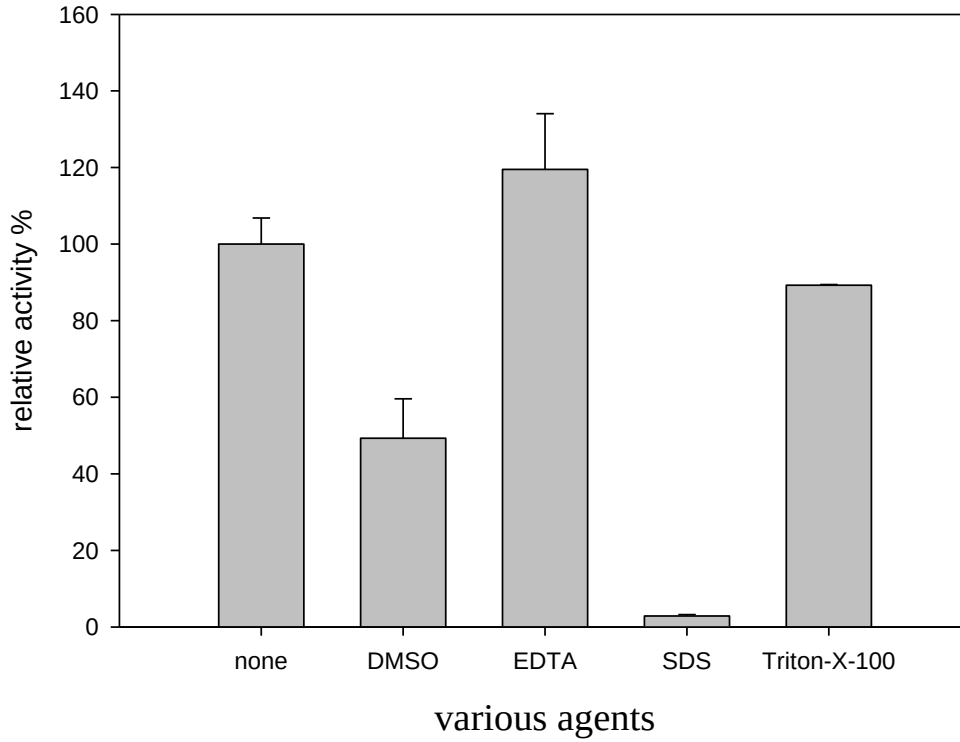


Şekil 18. Çeşitli organik çözücülerin immobilize enzim aktivitesi üzerine etkileri

Çeşitli kimyasal ajanların etkileri

İmmobilizasyon işleminden sonra esteraz enzimi aktivitesini etkileyen faktörlerin araştırılmasında, çeşitli inhibitörler ve deterjanlar (ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS) ve Triton X-100 gibi) reaksiyona sokularak, bu kimyasal ajanların enzim aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 19). Kimyasal ajanların konsantrasyonları %10 (v/v) olacak şekilde immobilize enzim reaksiyona sokulurken, hiç bir kimyasal ajan konmamış immobilize enzim aynı süredeki inkübasyonu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Deney sonuçlarına göre, immobilize enzim aktivitesine en etkili kimyasal ajan inhibitor etkisi gösteren SDS olmuş ve enzim aktivitesini %95 den fazla düşürmüştür. EDTA immobilize enzim aktivitesini activator olarak etkilemiş ve enzim aktivitesi %120 ye kadar çıkmıştır. DMSO ve Triton X-100 kimyasal ajanları da

immobilize esterazın aktivitesinde inhibitör etkisi yapmış ve yaklaşık, sırasıyla %55 ve %15 kadar düşürmüştür (Şekil 19).



Şekil 19. Çeşitli kimyasal ajanların immobilize enzim aktivitesi üzerine etkileri

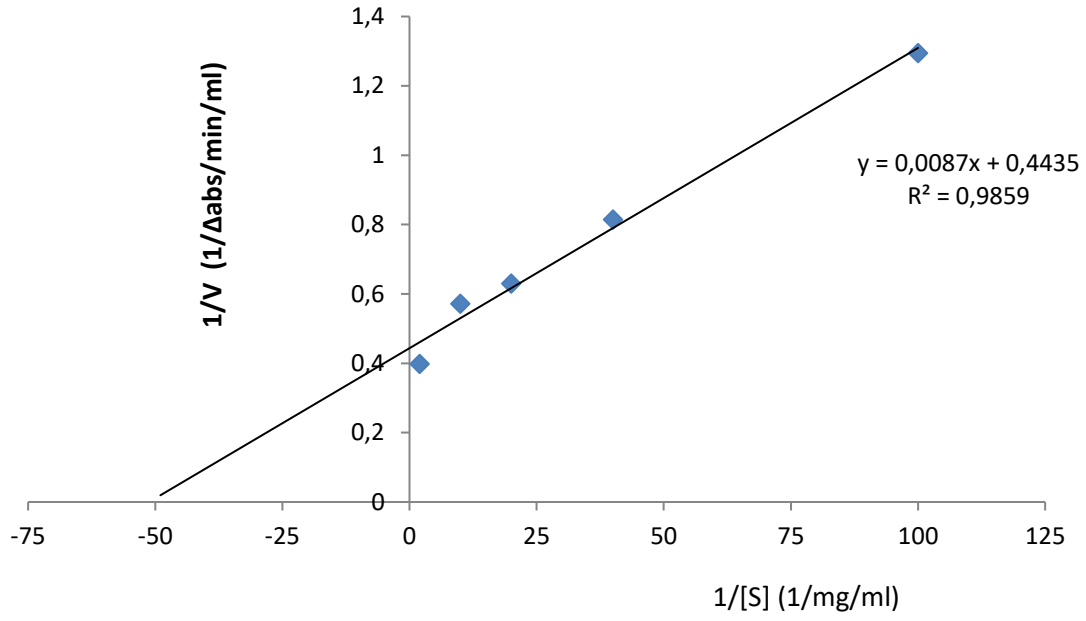
Kinetik sabitler

İmmobilize edilen esteraz enzimin kinetik sabitlerini bulmak için, 0.01 ve 0.5 mM aralığında değişen *p*-nitrofenil asetat substratı konsantrasyonlarında, aktivite ölçümleri yapılmıştır (Şekil 20). Lineweaver-Burk diyagramından K_m değeri 0.02 mM ve V_{max} değeri 2.25 Δabs/min/ml olarak bulunmuştur.

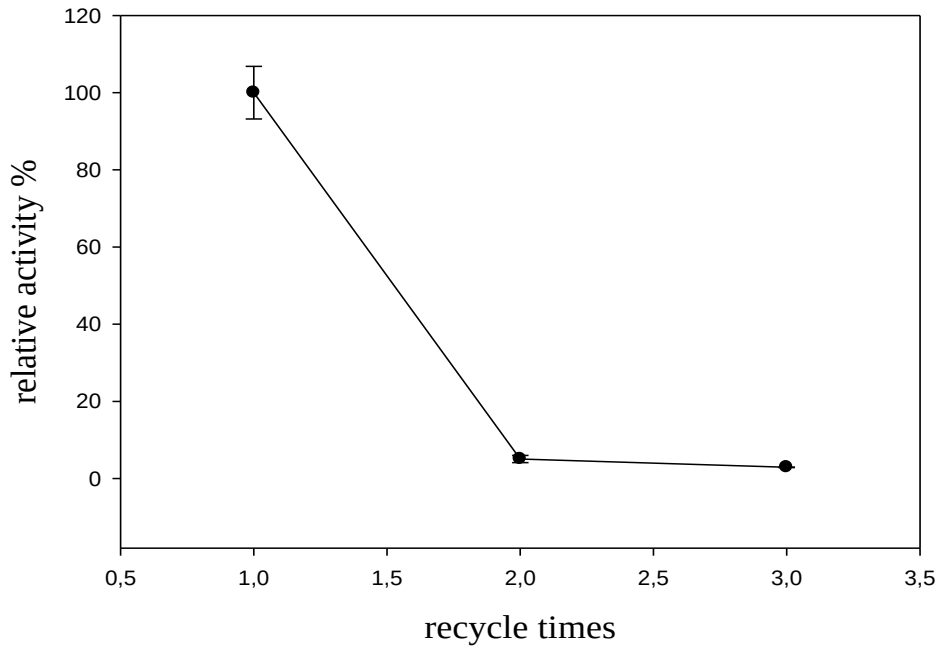
Tekrar kullanılabilirlik

Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin tekrar kullanılabilirliği, belirli aralıklarla, immobilize edilmiş enzimin aktivite tayinleri optimum koşullarda gerçekleştirilerek belirlenmiştir (Şekil 21). Bu sonuçlara göre immobilize esteraz enzimi aktivite kaybı olmadan ikinci kez kullanılabilir. Fakat ikinci kullanım sonunda çok etkin bir aktivite kaybı gözlenmektedir ve üçüncü kullanım sonunda ise kalan aktivite ilk kullanıma

göre %3 dır. Genel sonuç olarak esteraz enzimi immobilizasyon ile tekrar kullanımı sadece ilk kullanım sonrası için uygun olup defalarca kullanımı çok iyi değildir.



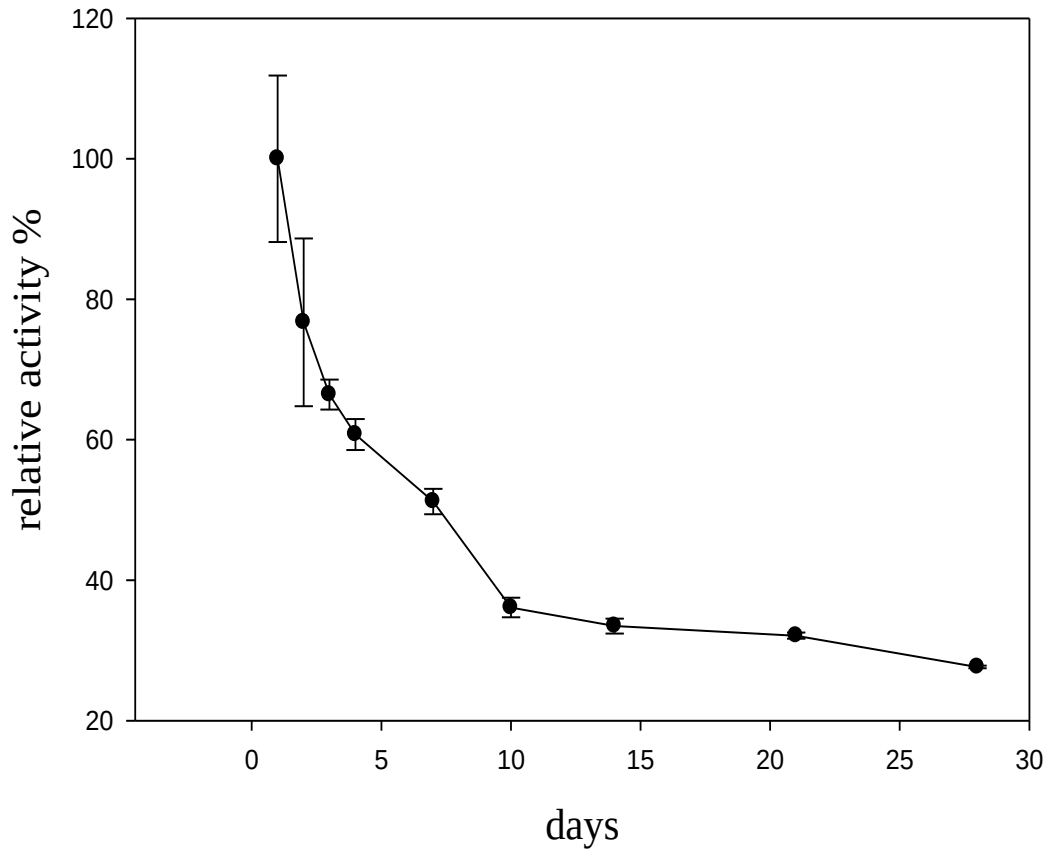
Şekil 20. Immobilize esteraz enzimine ait Line-weaver Burk grafiği



Şekil 21. Immobilize enzimin tekrar kullanabilirliği

Depolanma kararlılığı

Kitosan nano-parçacıklar üzerine immobilize edilen enzimin depolanma kararlılığını belirlemek için, nano-parçacıklar, oda şartlarında 1-30 gün aralığında saklanarak ve bu zaman aralığında örnekler alınarak optimum koşullarda aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 22). Bu sonuçlara göre immobilize enzim 30 gün sonunda yaklaşık %30 aktivitesini koruyabilmektedir.



Şekil 22. Immobilize enzimin depo kararlılığı

KAYNAKLAR

1. Zhang, Y.F., Wu, H., and Li, J. (2008) *Chem Mater*, 20, 1041–1048.
2. Kennedy, J.F., and White, C.A. Principles of immobilization of enzymes. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Halsted Press: Chichester, New York. 1985.
3. Morales, A., C'espedes, F., and Alegret, S. (2000) *Mater. Sci. Eng. C*, 7, 99–104.
4. Coradin, T., and Livage, J. (2007) *Acc. Chem. Res.*, 40, 819–826.
5. Chen, X., Hu, Y. and Wilson, G.S. (2002) *Biosens. Bioelectron.*, 17, 1005–1013.
6. Bellezza, F., Cipiciani, A., and Costantino, U.J. (2003) *Mol. Catal. B: Enzyme*, 26, 47–56.
7. Gole, A., Dash, C., Mandale, A.B., Rao, M., and Sastry, M. (2000) *Anal. Chem.*, 72, 4301–4309.
8. Tang, Z., Qian, J., and Shi, L. (2007) *Materials Letters*, 61, 37–40.
9. Juang, R.S., Wu, F.C., and Tseng, R.L. (2001) *Bioresour. Technol.*, 80, 187–193.
10. Lee, M.K., Chun, S.K., Choi, W.J., Kim, J.K., Choi, S.H., Kim, A., Oungbho, A.K., Park, J.S., Ahn, W.S., and Kim, C.K. (2005) *Biomaterials*, 26, 2147–2156.
11. Shu, X.Z., and Zhu, K. (2002) *J. Int. J. Pharm.*, 233, 217–225.
12. Krajewska, B. (2004) *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126–139.
13. Berthold, A., Cremer, K., and Kreuter, J. (1996) *J. Control Release*, 39, 17–25.
14. Tian, X.X., and Groves, M.J. (1999) *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 151–157.
15. Faber K. (1997) *Pure Appl. Chem.*, 69, 1613–1633.
16. Quax, W.J., and Broekhuizen, C.P. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 425–431.
17. Panda, T., and Gowrishankar, B.S. (2005) *App. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 160–169.
18. Tekedar, H.C., and Sanlı-Mohamed, G. (2010) *Extremophiles*, DOI 10.1007/s00792-010-0344-1.
19. Boyacı, E., Eroglu, A.E., and Shahwana, T. (2010) *Talanta*, 80, 1452–1460.
20. Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M., and Vottero, P. (2000) *Polymer*, 41, 2463–2469.
21. Jiayin, Z., and Jianmin, W. (2006) *Chin. J. Anal. Chem.*, 34, 1555–1559.
22. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
23. Kasaai, M.R., Arul, J., and Charlet, G.J. (2000) *Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 38, 2591–2598.
24. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., and Rinaudo, M. (2001) *Polymer*, 42, 3569–3580.

25. Parize, A.L., Heller, M., F'avere, V.T., Laranjeira, M.C.M., Brighente, I.M.C., Micke, G.A., and Souza, T.C.R. (2009) *Latin American Journal of Pharmacy*, 28, 19–26.
26. Xu, Y., and Du, Y. (2003) *Int. J. Pharm.*, 250, 215–226.
27. Knaul, J.Z., Hudson, S.M. and Creber, K.A.M. (1999) *J. Appl. Polym. Sci.*, 72, 1721–1731.
28. Bosley, J.A., and Peilow, A.D. (1997) *JAOCs*, 74, 107–111.
29. Tang, Z.X., Qian, J.Q., and Shi, L.E. (2007) *Applied Biochem. and Biotech.*, 136, 77–96.
30. 26. Xu, Y., and Du, Y. (2003) *Int. J. Pharm.*, 250, 215–226.
31. Knaul, J.Z., Hudson, S.M. and Creber, K.A.M. (1999) *J. Appl. Polym. Sci.*, 72, 1721–1731.