

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**Horseradish Peroxidase-İnorganik Hibrit Nano Yapıların (Nanoflowers)
Hazırlanması, Katalitik Aktiviteleri ve Stabilitelerinin İncelenmesi**

Oya ÜSKÜP

**Danışman
Prof. Dr. Tülin AYDEMİR**



MANİSA-2019

TEZ ONAYI

Oya ÜSKÜP tarafından hazırlanan " **Horseradish Peroxidase-İnorganik Hibrit Nano Yapıların (Nanoflowers) Hazırlanması, Katalitik Aktiviteleri ve Stabilitelerinin İncelenmesi**"adlı tez çalışması **25/07/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Prof. Dr. Tülin Aydemir**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Leman Tarhan**
Dokuz Eylül Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Nurdan Pazarlıoğlu**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Yedek Jüri Üyesi **Doç. Dr. Ayşe Dinçer**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Yedek Jüri Üyesi **Prof. Dr. Raziye Öztürk Ürek**
Dokuz Eylül Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Oya ÜSKÜP

Manisa, 2019



İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| İÇİNDEKİLER..... | I |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | III |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | IV |
| TABLO DİZİNİ..... | VII |
| TEŞEKKÜR..... | VIII |
| ÖZET..... | IX |
| ABSTRACT..... | X |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Enzimlerin Tarihçesi..... | 3 |
| 2.2. Enzimlerin Kullanım Alanları..... | 4 |
| 2.3. Enzimlerin Yapısı..... | 5 |
| 2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması..... | 6 |
| 2.5. Enzim Aktivitesi..... | 7 |
| 2.6. Horseradish Peroxidase Enzimi..... | 7 |
| 2.6.1. Horseradish Peroxidase Enzimi Aktivite Ölçümü..... | 10 |
| 2.6.2. Horseradish Peroxidase Enziminin Kullanım Alanları..... | 12 |
| 2.7. Enzim İmmobilizasyonu..... | 13 |
| 2.8. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri..... | 14 |
| 2.9. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar..... | 17 |
| 2.9.1. Nano Hibrit Yapılar..... | 19 |
| 2.9.1.1. Nano Hibrit Yapıların Biyokataliz Özellikleri..... | 20 |
| 2.9.1.2. Nano Hibrit Yapıların Biyosensörlerde Kullanımı..... | 20 |
| 2.9.1.3. Nano Hibrit Yapıların Çevre Kirliliğinde Kullanımları..... | 21 |
| 2.10. Boyar Maddeler..... | 21 |
| 2.10.1. Amarant Boyar Maddesi..... | 22 |
| 2.10.2. Tartrazin Boyar Maddesi..... | 23 |
| 2.10.3. Kristal Viole Boyar Maddesi..... | 24 |
| 2.11. Fenolik Bileşikler..... | 24 |
| 2.11.1. Fenolik Bileşik Tayininde Kullanılan Yöntemler..... | 25 |
| 2.11.2. Fenolik Bileşiklerin Kullanım Alanları..... | 25 |
| 2.12. Tezin Amacı..... | 26 |
| 3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER..... | 27 |
| 3.1. Materyal..... | 27 |
| 3.2. Yöntem..... | 28 |
| 3.2.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Aktivite Ölçümleri..... | 28 |
| 3.2.2. İmmobilizasyon Verimi..... | 29 |
| 3.2.3. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi..... | 30 |
| 3.2.4. Horseradish Peroxidase Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Sentezlenmesine Farklı İyon Derişimlerinin Etkisi..... | 31 |
| 3.2.5. Horseradish Peroxidase Cu ²⁺ Hibrit Nanoçiçek Yapısının Sentezi..... | 31 |
| 3.2.6. Horseradish Peroxidase Ca ²⁺ Nanoçiçek Hibrit Yapısının Sentezi..... | 32 |
| 3.2.7. Horseradish Peroxidase Mn ²⁺ Nanoçiçek Hibrit Yapısının Sentezi..... | 32 |
| 3.2.8. Nanoçiçek Horseradish Peroxidase Hibrit Yapılarının Glutaraldehit ile Çapraz Bağlanması..... | 33 |
| 3.2.9. Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Karakterizasyonu..... | 33 |
| 3.2.9.1. SEM Analizi..... | 33 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.9.2. FT-IR Analizi | 33 |
| 3.2.9.3. XRD Analizi..... | 34 |
| 3.2.9.4. Element Analiz (EDX) | 34 |
| 3.2.10. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu | 35 |
| 3.2.10.1. Serbest Enzim Üzerine Farklı Metal İyon Değişimi Etkisi..... | 35 |
| 3.2.10.2. Optimum pH..... | 35 |
| 3.2.10.3. pH Stabilite..... | 36 |
| 3.2.10.4. Optimum Sıcaklık | 36 |
| 3.2.10.5. Termal Stabilite | 36 |
| 3.2.10.6. Enzim Kinetiği | 36 |
| 3.2.10.7. Substrat Spesifikliği | 41 |
| 3.2.10.8. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği | 41 |
| 3.2.10.9. Enzim Kaçışı | 41 |
| 3.2.11. Boya Giderimi..... | 41 |
| 3.2.12. Fenolik Bileşik Oksidasyonu | 42 |
| 3.2.13. Fitotoksosite Çalışması | 42 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA | 43 |
| 4.1. HRP-Hibrit Nano Yapılarının Karakterizasyonları | 43 |
| 4.2. İmmobilizasyon Verimleri..... | 69 |
| 4.3. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve Yükleme Etkinliği..... | 70 |
| 4.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu | 71 |
| 4.4.1. Horseradish Peroxidase Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Sentezlenmesine Farklı İyon Değişimlerinin Etkisi | 71 |
| 4.4.2. Serbest Enzim Üzerine Farklı Metal İyon Değişimi Etkisi..... | 73 |
| 4.4.3. pH ve Sıcaklık Etkilerinin Belirlenmesi..... | 74 |
| 4.4.4. Substrat Spesifikliği | 85 |
| 4.4.5. Enzim Kinetiği..... | 86 |
| 4.4.6. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği..... | 88 |
| 4.4.7. Enzim Kaçışı..... | 91 |
| 4.5. HNF Yapıları İle Boya Giderimi | 93 |
| 4.6. İmmobilize Horseradish Peroxidase Enzimleri İle Fenolik Bileşik Oksidasyonu | 99 |
| 4.7. Fitotoksosite Çalışması..... | 107 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 110 |
| KAYNAKLAR | 114 |
| ÖZGEÇMİŞ | 120 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------------------------|---|
| 4-AAP | 4-Aminoantipirin |
| ABTS | 2,2-Azino-di(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonat) |
| BSA | Sığır serum albümin |
| CaNF-HRP | HRP-Ca ²⁺ hibrit nan çiçek |
| CuNF-HRP | HRP-Cu ²⁺ hibrit nanoçiçek |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spektroskopisi |
| GA | Glutaraldehit |
| HNF | Hibrit nanoçiçek |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| K_M | Michealis-Menten sabiti |
| MnNF-HRP | HRP-Cu ²⁺ hibrit nanoçiçek |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| µL | Mikrolitre |
| PBS | Tuzlu fosfat tamponu |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu |
| TPP | Sodyum trifosfat pentabazik |
| UV | Ultraviyole |
| V_{max} | Maksimum reaksiyon hızı |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1. HRP enziminin çalışma mekanizması..... | 9 |
| Şekil 2.2. HRP mekanizması..... | 10 |
| Şekil 2.3. HRP enziminin gayakol substratı ile reaksiyonu..... | 11 |
| Şekil 2.4. HRP enziminin pirogallol ile reaksiyonu..... | 12 |
| Şekil 2.5. HRP enziminin ABTS substratı ile reaksiyonu..... | 12 |
| Şekil 2.6. Amaranth molekül yapısı..... | 23 |
| Şekil 2.7. Tartrazine molekül yapısı..... | 23 |
| Şekil 2.8. Kristal violet molekül yapısı..... | 24 |
| Şekil 3.1. Protein standart eğrisi..... | 30 |
| Şekil 3.2. HRP- Cu ²⁺ hibrit nanoçiçek yapısının sentezi..... | 32 |
| Şekil 3.3. HRP- Ca ²⁺ hibrit nanoçiçek yapısının sentezi..... | 32 |
| Şekil 3.4. HRP- Mn ²⁺ hibrit nanoçiçek yapısının sentezi..... | 33 |
| Şekil 4.1. HNF yapılarının fotoğrafları..... | 43 |
| Şekil 4.2. CuNF –HRP ve CuNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının SEM görüntüleri ((a1-a2) 15 mM-CuNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (a3-a4) 15 mM- CuNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b1-b2) 30 mM-CuNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b3-b4) 30 mM- CuNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c1-c2) 50 mM-CuNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c3-c4) 50 mM- CuNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme)..... | 46 |
| Şekil 4. 3. CaNF –HRP ve CaNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının SEM görüntüleri ((a1-a2) 15 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (a3-a4) 15 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b1-b2) 30 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b3-b4) 30 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c1-c2) 50 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c3-c4) 50 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (d1-d2) 60 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (d3-d4) 60 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme)..... | 49 |
| Şekil 4.4. MnNF –HRP ve MnNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının SEM görüntüleri ((a1-a2) 15 mM-MnNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (a3-a4) 15 mM- MnNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b1-b2) 30 mM-MnNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b3-b4) 30 mM- MnNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c1-c2) 50 mM-MnNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c3-c4) 50 mM- MnNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme)..... | 52 |
| Şekil 4.5. CuNF nanoçiçek yapısının element haritası..... | 54 |
| Şekil 4.6. CuNF nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 54 |
| Şekil 4.7. CuNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının element haritası..... | 55 |
| Şekil 4.8. CuNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 55 |
| Şekil 4.9. CuNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının element haritası..... | 56 |
| Şekil 4.10. CuNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 56 |
| Şekil 4.11. CaNF nanoçiçek yapısının element haritası..... | 57 |
| Şekil 4.12. CaNF nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 57 |
| Şekil 4.13. CaNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının element haritası..... | 58 |
| Şekil 4.14. CaNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 58 |
| Şekil 4.15. CaNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının element haritası..... | 59 |
| Şekil 4.16. CaNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 59 |
| Şekil 4.17. MnNF nanoçiçek yapısının element haritası..... | 60 |
| Şekil 4.18. MnNF nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 60 |
| Şekil 4.19. MnNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının element haritası..... | 61 |
| Şekil 4.20. MnNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.21. MnNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının element haritası | 62 |
| Şekil 4.22. MnNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu | 62 |
| Şekil 4.23. HRP, CuNF, CuNF-HRP immobilize enzimlerinin karşılaştırmalı FTIR pikleri | 64 |
| Şekil 4.24. HRP, MnNF, MnNF-HRP immobilize enzimlerinin karşılaştırmalı FTIR pikleri..... | 65 |
| Şekil 4.25. HRP, CaNF, CaNF-HRP immobilize enziminin karşılaştırmalı FTIR pikleri. 66 | |
| Şekil 4.26. Cu ²⁺ -HNF yapılarının XRD spektrumları | 67 |
| Şekil 4.27. Ca ²⁺ -HNF yapılarının XRD spektrumları | 68 |
| Şekil 4.28. Mn ²⁺ -HNF yapılarının XRD spektrumları | 69 |
| Şekil 4.29. Serbest enzim ve HNF'lerin optimum pH grafiği | 75 |
| Şekil 4.30. Serbest enzim ve HNF-GA yapılarının optimum pH grafikleri. (a: CuNF-HRP ile CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP ile CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP ile MnNF-HRP-GA) | 76 |
| Şekil 4.31. Serbest enzim ve HNF'lerin pH stabilite grafiği (a:Serbest HRP, b:CuNF-HRP, c: CaNF-HRP, d: MnNF-HRP) | 78 |
| Şekil 4.32. Serbest enzim ve HNF-GA yapılarının pH stabilite grafikleri. (a: CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP-GA) | 79 |
| Şekil 4.33. Serbest enzim ve HNF'lerin optimum sıcaklık değerleri..... | 80 |
| Şekil 4.34. Serbest ve HNF-GA immobilize enzimlerinin optimum sıcaklık grafikleri. (a: CuNF-HRP ile CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP ile CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP ile MnNF-HRP-GA)..... | 81 |
| Şekil 4. 35. Serbest enzim ve HNF'lerin termal stabilite grafiği (a:60 °C, b:70 °C)..... | 82 |
| Şekil 4.36. Serbest ve HNF-GA immobilize enzimlerinin termal stabilite grafikleri. (a: CuNF-HRP ile CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP ile CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP ile MnNF-HRP-GA)..... | 84 |
| Şekil 4.37. Serbest ve HNF horseradish peroxidase enzimlerinin gayakol substratı ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 86 |
| Şekil 4.38. CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA yapılarının Amarant boya giderimindeki tekrar kullanılabilirlikleri; [(a: CuNF-HRP, b: CuNF-HRP-GA) (İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2.5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C)]..... | 89 |
| Şekil 4.39. CaNF-HRP ve CaNF-HRP-GA yapılarının Amarant boya giderimindeki tekrar kullanılabilirlikleri; [(a: CaNF-HRP, b: CaNF-HRP-GA) (İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2.5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C)] | 90 |
| Şekil 4.40. MnNF-HRP ve MnNF-HRP-GA yapılarının Amarant boya giderimindeki tekrar kullanılabilirlikleri; [(a: MnNF-HRP, b: MnNF-HRP-GA) (İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2.5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C)] | 91 |
| Şekil 4.41. CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA yapılarının enzim kaçıışı grafiği | 92 |
| Şekil 4.42. CaNF-HRP ve CaNF-HRP- GA yapılarının enzim kaçıışı grafiği..... | 92 |
| Şekil 4.43. MnNF-HRP ve MnNF-HRP- GA yapılarının enzim kaçıışı grafiği | 93 |
| Şekil 4.44. HNF-HRP immobilize enzimlerinin Amarant boyasının gideriminde elde edilen UV-Vis spektrumları ve Amarant boyasının başlangıç, 1 saat ve 2.5 saat gideriminden sonraki görünümü [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2.5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)] | 95 |
| Şekil 4.45. HNF-HRP immobilize enzimlerinin Kristal Viole boyasının gideriminde elde edilen UV-Vis spektrumları ve Kristal Violet boyasının başlangıç, 1 saat ve 2.5 saat | |

| | |
|--|-----|
| gideriminden sonraki görünümü [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2.5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)] | 96 |
| Şekil 4.46. HNF-HRP immobilize enzimlerinin Tartrazin boyasının gideriminde elde edilen UV-Vis spektrumları ve Tartrazin boyasının başlangıç, 1 saat ve 2.5 saat gideriminden sonraki görünümü [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2.5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)] | 98 |
| Şekil 4.47. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Katekol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]..... | 100 |
| Şekil 4.48. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Pirogallol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)] | 101 |
| Şekil 4.49. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Fenol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]..... | 103 |
| Şekil 4.50. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Tirozin oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]..... | 104 |
| Şekil 4.51. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Gayakol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 °C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]..... | 106 |
| Şekil 4.52. CuNF-HRP yapısı ile artırılmış boyalarda yetiştirilen tohumların kök boyutları [(a; kontrol, b; amarant boyası giderim sonrası, c; amarant boyası), (d;kontrol, e; tartrazin boyası giderim sonrası, f; tartrazin boyası), (g; kontrol, h; kristal viole boyası giderim sonrası, i; kristal viole boyası)]..... | 107 |
| Şekil 4.53. CaNF-HRP yapısı ile artırılmış boyalarda yetiştirilen tohumların kök boyutları [(a; kontrol, b; amarant boyası giderim sonrası, c; amarant boyası), (d;kontrol, e; tartrazin boyası giderim sonrası, f; tartrazin boyası), (g; kontrol, h; kristal viole boyası giderim sonrası, i; kristal viole boyası)]..... | 108 |
| Şekil 4.54. MnNF-HRP yapısı ile artırılmış boyalarda yetiştirilen tohumların kök boyutları [(a; kontrol, b; amaranth boyası giderim sonrası, c; amarant boyası), (d;kontrol, e; tartrazine boyası giderim sonrası, f; tartrazine boyası), (g; kontrol, h; kristal viole boyası giderim sonrası, i; kristal viole boyası)] | 109 |

TABLO DİZİNİ

| | sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 2.1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları ve üretimlerinde kullanılan mikroorganizmalar..... | 5 |
| Tablo 2. 2. HRP için yaygın substratlar..... | 11 |
| Tablo 2. 3. Farklı Enzim İmmobilizasyon Tekniklerinin Temel Özellikleri..... | 14 |
| Tablo 2. 4. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması..... | 18 |
| Tablo 3.1. Aktivite ölçüm yöntemi..... | 29 |
| Tablo 4.1. Sentezlenen HNF yapılarının ışık mikroskobu görüntüleri ve boyutları | 44 |
| Tablo 4.2. HNF yapılarının SEM analizine göre boyutları | 44 |
| Tablo 4.3. HNF yapılarının immobilizasyon verimi, geri kazanılan aktivite, immobilizasyon etkinliği yüzdeleri ve mg başına U olarak aktiviteleri..... | 70 |
| Tablo 4. 4. Farklı HNF yapılarına immobilize edilen HRP enziminin protein miktarları ve yükleme etkinliği | 71 |
| Tablo 4. 5. Farklı iyon derişimlerinde sentezlenen HNF yapılarının aktivite karşılaştırması | 72 |
| Tablo 4. 6. Farklı metal iyon derişimlerinin serbest enzim üzerindeki etkisi | 73 |
| Tablo 4.7. Serbest enzim ve HNF'lerin Substrat Spesifikliği | 85 |
| Tablo 4. 8. Serbest enzim ve HNF yapılarının K_M ve V_{max} değerleri | 87 |
| Tablo 4. 9. Sentezlenen HNF-HRP yapıları ile % boya giderimi..... | 98 |
| Tablo 4.10. Sentezlenen HNF-HRP yapıları ile % fenolik bileşik oksidasyonu..... | 106 |
| Tablo 4.11. % Çimlenme indeksi | 110 |

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gosteren, kendisini tanımaktan mutluluk duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tulin Aydemir'e, kimya bolumu oğretim uyeleri Arő. Gőr. Seda Çınar'a, Arő. Gőr. Ahmet Eser'e, hayatımın tüm zorlu aőamalarında beni yüreklandiren ve desteklerini hiç eksik etmeyen, annem Binnur ÜSKÜP'e, babam Efe ÜSKÜP'e, abim Okan ÜSKÜP'e ve beni her daim cesaretlendirip motive eden tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Oya ÜSKÜP

Manisa 2019



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Horseradish Peroxidase-İnorganik Hibrit Nano Yapıların (Nanoflowers) Hazırlanması, Katalitik Aktiviteleri ve Stabilitelerinin İncelenmesi

Oya ÜSKÜP

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Enzimlerin devamlı olarak kullanılabilmesi için, aktivitelerinin, kararlılıklarının ve geri kazanımlarının artırılması gerekmektedir. Serbest enzimlerin, reaksiyon ortamından ayrılmalarının ve tekrar kullanılmalarının zor olması gibi dezavantajlarından dolayı uygulamaları sınırlıdır. Tüm bu sınırlamaları gidermek için enzim immobilizasyonu, kullanılan pek çok yöntemden biri olmuştur.

Bu çalışmada, yaban turbu peroksidaz (HRP) enzimi ile Cu^{2+} , Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları kullanılarak hibrit nanoçiçek yapıları sentezlendi. Sentezlenen hibrit nanoçiçekler glutaraldehit ile çapraz bağlandı ve tüm hibrit nanoçiçeklerin optimum pH, sıcaklık, boya gideriminde tekrar kullanılabilirlikleri, substrat spesiflikleri ve enzim kaçış oranları belirlenerek kinetik parametreleri tayin edildi.

Sentezlenen hibrit nanoçiçeklerin karakterizasyon çalışmalarında SEM, FTIR, XRD ve EDX analizleri yapıldı. SEM görüntüleri incelendiğinde; çiçek şekilli CuNF-HRP, CaNF-HRP ve MnNF-HRP hibrit nanoçiçek yapılarının oluştuğu gözlemlendi. Glutaraldehit ile çapraz bağlanan hibrit nanoçiçek yapıları incelendiğinde; normal hibrit nanoçiçek yapılarına göre boyutlarının küçüldüğü, gözeneklerinin sıkılaştığı tespit edildi. Sentezlenen hibrit nanoçiçek yapılarının immobilizasyon verimleri CuNF-HRP için %91, CaNF-HRP için %88 ve MnNF-HRP için %85 olarak bulundu. Yapılan optimizasyon çalışmalarında, serbest ve immobilize nanoçiçek yapılarının optimum sıcaklık değeri 40°C , optimum pH değeri ise 6,0 olarak bulundu. Serbest enzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 25,16 mM ve 22,27 U/mL olarak saptandı. Hibrit nanoçiçek yapılarında ise CuNF-HRP için K_M ve V_{max} değerleri 30,53 mM ve 5,63 U/mg, CaNF-HRP için K_M ve V_{max} değerleri 34,24 mM ve 5,51 U/mg, MnNF-HRP için K_M ve V_{max} değerleri 31,83 mM ve 4,95 U/mg bulundu.

Çalışmanın ikinci kısmında elde edilen hibrit nanoçiçek yapılarının katalitik performanslarını incelemek amacı ile boya giderimi ve fenolik bileşik oksidasyonu yapıldı. Boya giderim çalışmaları için Amarant, Tartrazin ve Kristal Viole model boyalar olarak kullanıldı. Fenol oksidasyonu için Katekol, Pirogallol, L-Tirozin, Fenol ve Gayakol fenolik bileşikleri kullanıldı. Sentezlenen immobilize enzimler %80-96 aralığında boya giderimi, %65-91 aralığında ise fenolik bileşik oksidasyonu sağladığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Horseradish peroxidase, nano hibrit yapı, immobilizasyon

2019, 120 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

Preparation of Horseradish Peroxidase-Inorganic Hybrid Nano Structures (Nanoflowers), Investigation of Catalytic Activities and Stability

Oya ÜSKÜP

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Tülin AYDEMİR

In order to use the enzymes continuously, their activity, stability and recovery should be increased. Their application is limited due to the disadvantages that free enzymes are difficult to separate and reuse from the reaction medium. Enzyme immobilization has been one of the many methods used to address all these limitations.

In this study, hybrid nano-flower structures were synthesized using horseradish peroxidase (HRP) enzyme using Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} ions. The synthesized hybrid nanoflowers were crosslinked with glutaraldehyde and the kinetic parameters were determined by determining the reusability, substrate specificity and enzyme escape rates of all hybrid nanoflowers at optimum pH, temperature, dye removal.

SEM, FTIR, XRD and EDX analyzes were performed in the characterization studies of synthesized hybrid nanoflowers. When SEM images were examined; flower-shaped CuNF-HRP, CaNF-HRP and MnNF-HRP hybrid nanoflower structures were observed. When hybrid nano-flower structures cross-linked with glutaraldehyde were examined; According to the normal hybrid nano-flower structures were reduced in size, pores tightened. The immobilization yields of the synthesized hybrid nanoflower structures were found to be 91% for CuNF-HRP, 88% for CaNF-HRP and 85% for MnNF-HRP. In the optimization studies, the optimum temperature value of free and immobilized nano-flower structures was found to be 40 ° C and the optimum pH value was 6.0. K_M and V_{max} of the free enzyme were 25.16 mM and 22.27 U / mL, respectively. In hybrid nanoflower structures, K_M and V_{max} values for CuNF-HRP were 30.53 mM and 5.63 U / mg, K_M and V_{max} values for CaNF-HRP were 34.24 mM and 5.51 U / mg, K_M and V_{max} for MnNF-HRP. 31.83 mM and 4.95 U / mg.

In the second part of the study, dye removal and phenolic compound oxidation were performed in order to investigate the catalytic performance of hybrid nanoflower structures. Amarant, Tartrazine and Crystal Viole model paints were used for dye removal. Catechol, Pyrogallol, L-Tyrosine, Phenol and Guaiacol phenolic compounds were used for phenol oxidation. It was determined that the immobilized enzymes produced dye removal in 80-96% and phenolic compound oxidation in 65-91%.

Keywords: Horseradish peroxidase, nano hybrid structure, immobilization

2019, 120 pages

1. GİRİŞ

Nüfus, kentleşme ve sanayileşmenin hızlı büyümesi nedeniyle su kirliliği geçen yüzyılda artan bir endişe haline gelmiştir. Su kirliliğinin başlıca nedenlerinden biri, büyük miktarlarda endüstriyel atığın yeterli atık yönetim sistemi olmadan su kütlelerine atılmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle, boyalar ve fenolik bileşikler gibi endüstriyel atıkların iyileştirilmesi, toksisiteleri, kanserojen, mutajenik özellikleri ve zayıf biyo bozunurlukları nedeniyle, bilimsel topluluktan ve toplumdan geniş çapta endişelere yol açmıştır [1]. Sentetik boyalar, tekstil, plastik, ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerindeki hızlı gelişme nedeniyle çevre kirliliğine en çok katkıda bulunanlardan biridir [2]. Oldukça renkli ve görünür olan sentetik boyalar, su nüfuzundaki azalma ve dolayısıyla besin zincirlerini etkilemesi nedeniyle sudaki fotosentetik işlevi etkileyebilmektedir. Ayrıca, boyaların karmaşık kimyasal yapıları, çevreye deşarj edildiklerinde zararlı ürünlere dönüşmelerinden sorumludur. Bu nedenle, renkli atık suyun arıtılmadan çevreye deşarjı, sucul yaşam ve ekosistemin biyolojik çeşitliliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ek olarak, sentetik boyalara maruz kalma ayrıca alerji, dermatit, cilt tahrişi, baş ağrısı, ateş ve bulantı gibi insan için riskli yan etkilere neden olabilmektedir. Tehlikeli boyalara kronik maruz kalmak organlara zarar verebilir ve bozabilir, beyin, böbrek, üreme, kas, karaciğer ve sinir sistemlerinin bozulmasına neden olabilmektedir [3].

Enzimler yaygın olarak çeşitli bilimsel ve teknik alanlarda çok yönlü araçlar olarak kullanılmaktadır. Örneğin, yüksek katalitik etkinlikleri, yüksek seçicilik, düşük toksisite ve suda çözünürlüğü nedeniyle kimya, biyokimya, tıp, eczacılık bilimi, gıda ve tekstil alanlarında geniş uygulamalara sahiptirler. Genel olarak, serbest enzimlerin çoğu, hafif deneysel koşullar altında (nötr pH, oda sıcaklığı ve atmosferik basınç) reaksiyonları spesifik olarak katalize etmektedirler. Belirli bir alt tabakaya veya fonksiyonel gruplara içsel katalitik fonksiyon gösterirler. Enzimler sadece biyolojik reaksiyon için değil, aynı zamanda endüstriyel uygulamalar için de kullanılmaktadır. Substrat spesifikliğı, düşük toksisite ve istenmeyen ürünlerin üretilmemesi, enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizörlere göre avantajları vardır. Serbest enzimlerin bu eşsiz özelliklerine rağmen, yüksek sıcaklıklarda, asidik veya bazik pH'larda ve organik çözücüler varlığında moleküler yapılarında kolay bozunma, kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Ayrıca yeniden

kullanılacak reaksiyon ortamından ayrılamazlar ve elde edilemezler. Bu sorunları gidermek için immobilizasyon teknikleri göz önünde bulundurulur [4].

Enzimlerin tekrar kullanılabilmesi için, aktivitelerinin, stabilitelerinin ve geri kazanımlarının artırılması gerekmektedir. Serbest enzimlerin etkinlik sürelerinin kısa olması, reaksiyon ortamından ayrılmasının ve tekrar kullanılmasının zor olması gibi dezavantajlarından dolayı uygulamaları sınırlıdır. Bu amaçla enzim immobilizasyonu başta olmak üzere pek çok farklı yöntem kullanılmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimlerin Tarihçesi

Enzimler, canlı sistemlerin biyokimyasal reaksiyonlarının katalizörleridir; yaşamsal faaliyetlerin vücut ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal maddelerdir.

Enzimler, besin moleküllerin parçalandığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit monomerlerden biyolojik makromoleküllerin sentezlendiği metabolik yollarda pek çok reaksiyon basamağını kataliz etmektedirler. Enzimlerle katalize edilen tepkimeye giren kimyasal bileşik veya molekül yapılarına substrat denmektedir [5].

Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandırır; substratları için yüksek afiniteye sahiptir; sulu çözeltilerde uygun pH ve sıcaklık durumlarında etki göstermektedirler.

Metabolik reaksiyonlara katılan birçok enzim düzenleyici enzimlerdir. Enzim sistemleri, düzenleyici enzimlerin etkisi vasıtasıyla, yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı metabolik aktivite arasında uyumlu bir etkileşim oluşturmak üzere ayarlanmaktadır. Düzenleyici enzimler, çeşitli metabolik sinyallere katalitik aktivitelerini gerektiği şekilde değiştirerek cevap vermektedirler.

Biyolojik kataliz, ilk kez 1800'lü yıllarda, mide salgıları sebebiyle etin sindirilmesinin, tükürük ve çeşitli bitki özütleri vasıtasıyla nişastanın şekere dönüştürülmesinin incelenmesi çalışmalarında tanınmış ve tanımlanmıştır. Louis Pasteur, 1850'lerde, şekerin maya vesilesiyle alkole fermantasyonunun "fermentler" vasıtasıyla katalizlendiği sonucuna varmıştır ve daha sonra "enzimler" olarak adlandırılan bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapısından ayrılamaz olduğunu kabul etmiştir. Pasteur'ün görüşü yıllar boyunca kabul görmüştür. Ancak 1897'de Eduard Buchner tarafından maya ekstraktlarının şekeri alkole fermente edebildiğinin keşfi, fermantasyonu sağlayan enzimlerin canlı hücre yapısından çıkarıldığında da fonksiyon görebildiğini ispat etmiştir.

Fermentasyonu sağlayan enzimlerin canlı hücre yapısından çıkarıldığında da fonksiyon görebildiğinin ispatı, biyokimyacıları birçok farklı enzimin izolasyonunu denemek ve onların katalitik özelliklerini incelemek için teşvik etmiştir. 1926’da James Sumner’in üreazı izole ve kristalize etmesi, spesifik enzimlerin özelliklerinin daha önceki incelenmeleri için bir hamle sağlamıştır. Sumner, üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu bulmuştur ve bütün enzimlerin protein olduklarını ileri sürmüştür. Bu düşünce, başka örneklerin olmaması nedeniyle bir süre için tartışmalı kalmıştır. Ancak, 1930’larda John Northrop ve meslektaşlarının pepsin ve tripsini kristalize etmeleri ve bunların protein olduklarını bulmalarından sonra Sumner’in vardığı sonuç geniş olarak kabul görmüştür. J.B.S.Haldane, bu dönemde, “enzimler” adlı bir bilimsel makale yayınlamıştır.

Bugün, yüzlerce enzim saflaştırılmıştır ve bunların pek çoğunun yapısı ve kimyasal mekanizması aydınlatılmıştır [6].

2.2. Enzimlerin Kullanım Alanları

Canlı dışında da faaliyet göstermeleri enzimlerin önemini oldukça arttırmaktadır. Günümüzde enzimler besin, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi alanlarında, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında sık olarak kullanılmaktadır. Günümüzde ticari enzim preparatlarından gıda endüstrisinin yanı sıra gıda analizlerinde de yararlanılmaktadır. Ayrıca endüstrinin atık ve artıklarının değerlendirilmesinde de yararlanılarak bu atıkların yol açabileceği çevre kirlenmesinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Tablo 2.1’de bazı enzimlerin kullanım alanı ve üretimlerinde kullanılan mikroorganizmalar verilmiştir [7].

Tablo 2.1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları ve üretimlerinde kullanılan mikroorganizmalar

| Enzim | Kullanım Alanı | Mikroorganizma |
|-------------------|---|--|
| α -Amilaz | Maltoz ve dekstrinin yıkılması Leke çıkarıcı Un zenginleştirilmesi Glikoz şurubu | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> |
| β -glucanaz | β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması | <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus subtilis</i> |
| Katalaz | İçeceklerin bozulmasının önlenmesi | <i>Aspergillus niger</i> |
| Selülaz | Deterjan katkı maddesi Atıkların değerlendirilmesi | <i>Penicillium spp.</i> |
| Glikoz izomeraz | Glukozun, früktoza dönüşümü | <i>Aspergillus spp.</i> <i>Streptomyces spp.</i> |
| Glikoz oksidaz | Biyosensör | <i>Aspergillus niger</i> |
| Laktaz | Laktozun glukoz ve galaktoza parçalanması (Peynir altı suyu) Laktozsuz gıda üretimi | <i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i> |
| Lipaz | Deterjan katkı maddesi Yağların parçalanması Peynir aramo maddesi üretimi | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| Pektinaz | Meyve suyu ekstraksiyonu yapımı Şarap ve meyve suyu berraklaştırılması | <i>Erwinia spp.</i> |
| Renin | Peynir yapımı | <i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i> <i>Mucor spp.</i> |

2.3. Enzimlerin Yapısı

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapıdadırlar. Bu sebeple enzimler, proteinlere ait tüm yapısal özellikleri göstermektedirler. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000 üzerine kadar değişen moleküler ağırlığa sahiptirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır; bir enzimin yapısı bozulursa veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi çoğunlukla kaybolur; bir enzim aminoasit komponentlerine yıkılırsa katalitik aktivitesi daima bozulmaktadır.

Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı oluşturan aminoasit kalıntılarında başka kimyasal yapı gerektirmezler.

Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılır; holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmı apoenzim olarak adlandırılmaktadır.

Holoenzimin kofaktör kısmının, bazı enzimler için Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon; bazı enzimler için ise koenzim denen bir organik veya metalloorganik kompleks bir molekül olduğu bilinmektedir. Holoenzimin kofaktör kısmı koenzim ise; koenzim enzime çok sıkı bağlanmış olabildiği gibi, koenzim enzime çok gevşek olarak bağlanmış olabilmektedir. Koenzimlerin enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılmayanları prostetik grup olarak adlandırılmaktadır; örneğin biotin, karboksilazlara sıkı bir şekilde kovalent olarak bağlı bulunur yani karboksilazların prostetik grubudur. Koenzimlerin enzim proteinine çok gevşek bir şekilde nonkovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılabilenleri kosubstrat olarak adlandırılmaktadırlar.

Bazı enzimler, fosforilasyon, glukozilasyon ve diğer bazı süreçler vasıtasıyla modifiye edilirler ki bu değişikliklerin birçoğu enzim aktivitesinin düzenlenmesinde olur ve önemlidir [8].

2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Derneğinin Enzim Komisyonunca kabul olunan esaslara göre enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılmaktadır. Bu sınıflar:

1. Oksidoredüktazlar: Bu grupta bulunan enzimler, oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
2. Transferazlar: Bu grupta bulunan enzimler, grup transferi reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar: Çifte bağlara grup ekleyen veya bunlardan grup ayıran enzimlerdir.
5. İzomerazlar: İzomerizasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.

6. Ligazlar (Sentetazlar): ATP veya diğerk fosfatlardan yararlanarak, bunlardaki pirofosfat bağının parçalanması sonucu iki molekül arasındaki yeni bağların meydana gelmesine olanak sağlayan enzimlerdir.

2.5. Enzim Aktivitesi

Bir enzimatik tepkimenin hızı, enzimin etkinliği veya enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürmektedir [9].

Enzim aktivitesini göstermek için kullanılan birimler şunlardır;

Enzim ünitesi (U) : Bir mikromol (μmol) substratı bir dakikada, optimum koşullar altında ürüne dönüştüren enzim miktarı bir ünite (IU) olarak kabul edilmektedir.

Spesifik aktivite: 1 mg protein başına enzim ünitesidir. U/mg protein şeklinde hesaplanmaktadır. Enzimin saflık derecesini göstermektedir.

Molar aktivite (turnover sayısı): Bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne çevrilen substrat molekülü sayısıdır.

Katal: Optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

2.6. Horseradish Peroxidase Enzimi

Peroksidazlar doğada, bitki ve hayvan dokularında yaygın bir şekilde bulunmakta ve kolayca izole edilebilmektedir. Literatürdeki bilgilere göre 19.yy'da biyolojik sistemlerdeki peroksidatik aktiviteyi tanımlayan ilk enzimler arasındadır. 1855 yılında Schönbein, bazı organik bileşiklerin (gayakol gibi) H_2O_2 tarafından oksidasyonunu gözlemlemiştir [10,11].

1810 yılında Planche, bir yaban turbu (horseradish) kökünün guaiacum reçinesi tentürüne batırılmasının, yoğun bir renk değişimine yol açtığını gözlemlemiştir. Bu zamandan beri HRP enzimi, biyoteknolojide çok çeşitli geniş uygulama alanlarında değerli bir araç haline gelmiştir.

Peroksidazların geniş bir izoenzim ailesi olduğu kabul edilmektedir. İzoenzimler, aynı biyokimyasal tepkimeyi katalize eden, ancak aminoasit dizilimlerindeki farklılardan kaynaklanan belirgin fiziksel, kimyasal ve kinetik özelliklere sahip, aynı enzimin farklı moleküler formlarıdır.

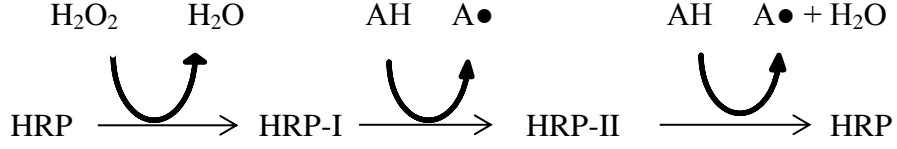
Kromatografik tekniklerin geliştirilmesinden önce, bitkilerde birden fazla HRP formunun bulunduğu bilinmektedir. Theorell iki farklı peroksidaz formunu yaban turbu köklerinden izole etmiştir. HRP I bazik özellikte ve düşük karbonhidrat içermektedir. HRP II ise nötr ve yüksek oranda glikolize edilmiştir. Bu iki HRP formu daha sonra tek bir formun modifikasyonları olarak değil, izoenzimler olarak tanınmıştır [12].

Bayır turbu (*Armoracia rusticana*), esas olarak köklerinin besin değeri sebebiyle dünyanın sıcak bölgelerinde yetiştirilen uzun ömürlü bir bitkidir. Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir [13]. *Armoracia rusticana* (bayır turbu; “horseradish” bitkisi) nin antibiyotik özellik gösteren kökü kalsiyum, magnezyum, sodyum ve vitamin C içermektedir. Yaban turpu köklerinden elde edilen peroksidaz (HRP) yeni kimyasal maddelerin sentezlenmesinde, tanıma testlerinde, biyo temizleme gibi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Horseradish (yaban turbu) peroksidaz terimi genel olarak kullanıldığı halde bitkinin kök kısımları birkaç tane farklı peroksidaz izoenzimi içermektedir. Bunlardan en yaygın olanı C izoenzimidir (HRP C) [14].

“Horseradish” Peroksidaz molekülünde ferriprotoporfirin (protohemin) içeren bir haloenzimdir [15, 16].

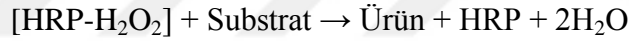
Peroksidazlar H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP'nin genel çalışma mekanizması Şekil 2.1'de verildiği gibidir.

HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II' yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir [17].



Şekil 2.1. HRP enziminin çalışma mekanizması

HRP' nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan kaynaklanmaktadır. Uygun şartlarda HRP, H₂O₂ ile birleşerek [HRP-H₂O₂] kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan kompleks çeşitli elektron vericiler ile oksitlenmektedir.

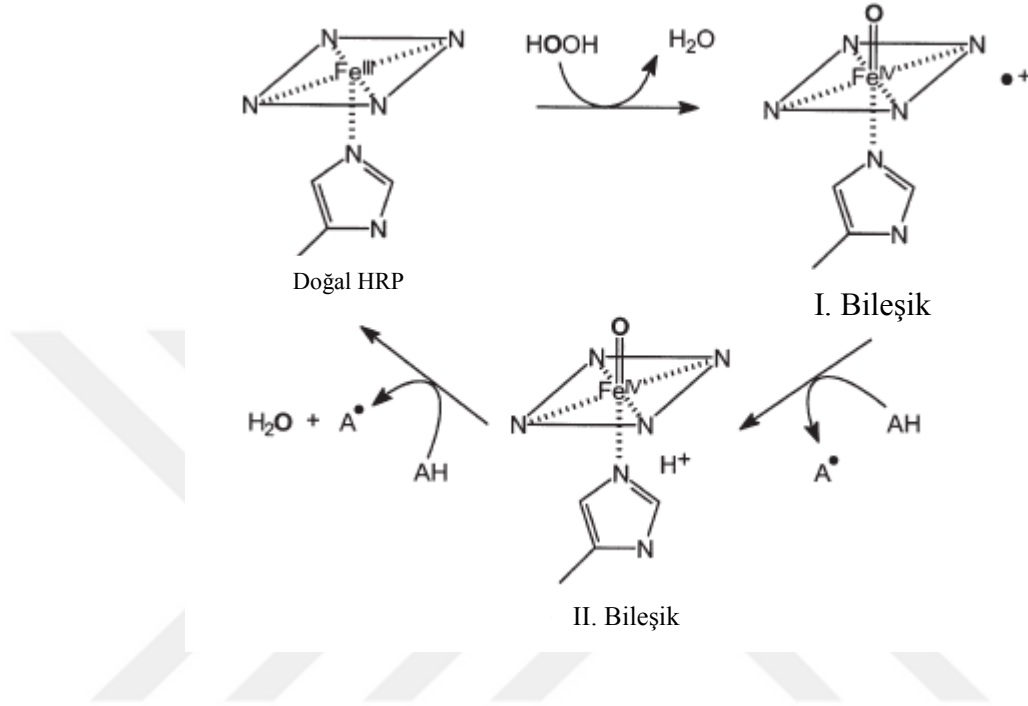


Peroksidaz reaksiyon döngüsünün birinci basamağını, saf peroksidazın (HRP) ferrihem prostatik grubunun H₂O₂ ile gerçekleşen 2 elektron oksidasyonu oluşturmaktadır. Bu basamak oksiferil demir (Fe⁺⁴=O) ve bir porfirin katyon radikali içeren HRP-I bileşiği (demirin formal oksidasyon bölgesi: V) formasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Reaksiyonun ikinci basamağında HRP-II bileşiğinin şekillenmesi gerçekleşmektedir. Bu olay HRP-I bileşiğinin elektron donörü AH ile bir elektron redüksiyonu sonucunda oluşmaktadır. (Oksidasyon bölgesi IV). Reaksiyonun son basamağında bir önceki basamakta eklenen elektron AH' dan ayrılır ve enzim tekrar reaksiyonun başlangıç bölgesine döner [18].

HRP' nin H₂O₂ ile yüksetgenmesi sonucu, enzimin aktif formu olan Bileşik I ara ürünü oluşmaktadır. Bileşik I, kromojenik substratın (örneğin; o-dianisidin) yüksetgenmesi sonucu Bileşik II formuna dönüşmektedir. Katalitik olarak enzimin

ikinci aktif formu olan Bileşik II ise, odianisidinin tekrar yükseltgenmesi sonunda enzimin doğal formunu oluşturmaktadır. Bileşik III enzimin inaktif formudur. Bu ise yavaş bir şekilde enzimin doğal formuna ya da bir elektron oksidasyonu ile Bileşik I'e dönüşebilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. HRP mekanizması

2.6.1. Horseradish Peroxidase Enzimi Aktivite Ölçümü

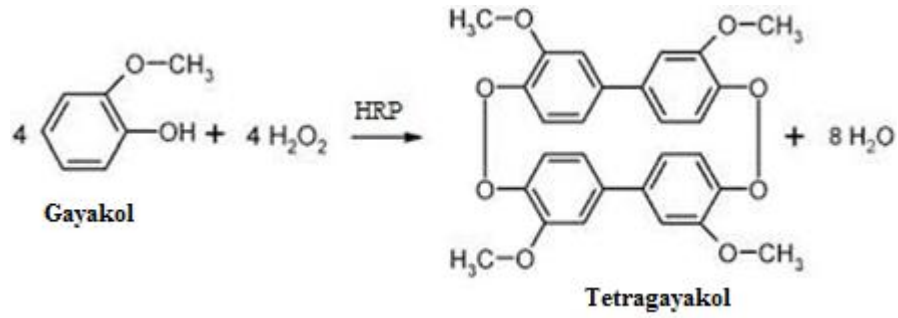
HRP aktivitesinin tespiti için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Horseradish peroxidase enzimine özgü, H₂O₂ doğal substrat olmasına rağmen, HRP aktivitesini belirlemek için kullanılan sayısız indirgeme molekülü genellikle peroksidaz substratları olarak adlandırılmaktadır. Kolorimetrik ve florimetrik deneylerde birçok kromojenik substrat kullanılabilir. Bu substratlar, oksidasyondan sonra spektrofotometrik olarak izlenebilen renkli bir ürün oluşturan hidrojen donörleridir. Tablo 2.2., HRP'nin en sık kullanılan substratlarından bazılarını listelemektedir. Hemen hemen bütün fenol ve anilin türevleri (örneğin, alkil, halo), HRP Bileşik I'i doğal enzime indirgeyebilmektedir. HRP tarafından katalizlenen diğer reaksiyonlar, ışık yayılımının meydana geldiği kemilüminesansı içermektedir. En yaygın kemilüminesan substratlar, luminol ve diğer ilgili hidrazitlerdir. p-iyodofenol ve luciferin gibi arttırıcılar, genellikle ışık emisyonunu iyileştirmek için kullanılmaktadır [19].

Tablo 2. 2. HRP için yaygın substratlar

| Substrat | Kimyasal Adı | Yöntem |
|------------|--|-------------------|
| ABTS | 2,20-Azino-di(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) | Spektrofotometrik |
| Gayakol | 2-Methoxyphenol | Spektrofotometrik |
| Pirogallol | 1,2,3-Trihidroxybenzene | Spektrofotometrik |
| Fenol | Hydroxybenzene | Spektrofotometrik |
| Katekol | 1,2- Dihidroxybenzene | Spektrofotometrik |
| 4-AAP | 4-Amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolinone | Spektrofotometrik |
| Luminol | 3-Aminophthalhydrazide | Fluorimetrik |

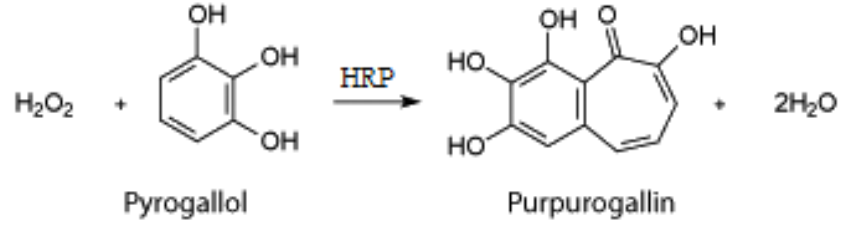
HRP, çok çeşitli fenol türevlerinin oksidatif polimerleşmesini katalize etmektedir. Örneğin, fenolün polimerizasyonu, fenilen ve oksifenilen birimlerinden oluşan bir yapıya sahip çözünür polimerler üretmektedir. HRP, hidrojen peroksit varlığında, farklı aromatik substratların serbest radikallere, tipik olarak fenol radikallerine, bir elektron oksidasyonunu katalitik olarak gerçekleştirmektedir [20].

Gayakol, HRP kataliziyle oksidasyona tabi tutulduğunda, reaksiyon karışımının rengi kırmızıya dönmektedir ve 470 nm dalga boyunda ölçülmektedir (Şekil 2.3).



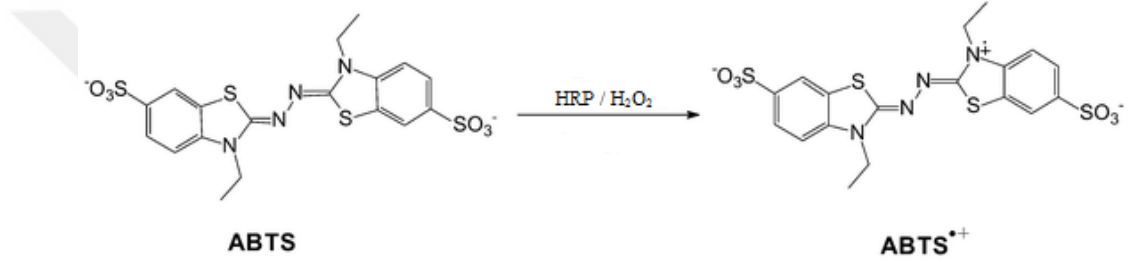
Şekil 2.3. HRP enziminin gayakol substratı ile reaksiyonu

Pirogallol, HRP enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit varlığında purprogallin bileşiği oluşturmakta ve 420 nm dalga boyunda tayin edilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. HRP enziminin pirogallol ile reaksiyonu

ABTS, HRP enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit varlığında yeşil renkli ABTS radikal bileşiği oluşturmakta ve 405 nm dalga boyunda tayin edilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HRP enziminin ABTS substratı ile reaksiyonu

2.6.2. Horseradish Peroxidase Enziminin Kullanım Alanları

Yaban turpu peroksidazı (HRP) tarafından suda ve suyla karışabilen organik çözücülerde yürütülen fenollerin ve aromatik aminlerin oksidatif polimerizasyonu, yeni tip aromatik polimerlere yol açabilmektedir. HRP'nin bölgeye yönelik mutajenezi, arilmetilsülfid oksidasyonlarının enantioselektivitesini geliştirmek için kullanılmıştır. Peroksidaz, toprak detoksifikasyon potansiyeline sahipken, HRP, soya fasulyesi ve şalgam peroksidazları fenoller, kresoller ve klorlu fenollerle kirlenmiş atık suyun biyolojik olarak arıtılması için uygulanmıştır. Peroksidaz bazlı biyosensörler, hidrojen peroksit üreten enzim ile birlikte immobilize edilirken, glikoz, alkoller, glutamat ve kolin tayini için kullanılabilirken, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin tayininde analitik sistemlerde kullanıldığını bulmuşlardır. Peroksidaz, ürik asit, glukoz, kolesterol, laktoz ve benzeri bileşiklerin miktarların analizi gibi teşhis kitlerinde pratik analitik uygulamalar için de kullanılmıştır. Peroksidaz kullanımını, enzim bağlantılı immünorbent tahlili (ELISA) testleri toksinleri, patojenleri, mesane ve prostatta kanser riskini ve diğer birçok analiti tespit

etmenin basit ve güvenilir bir yoludur. Yönlendirilmiş evrim yöntemleri, stabilite problemlerinin üstesinden gelmek ve ısı direnci arttırmak için farklı kaynaklardan bitki peroksidazlarının yeni katalizör formlarını oluşturmak için değerli bir alternatif gibi görünmektedir.

2.7. Enzim İmmobilizasyonu

Bir enzim olarak nispeten pahalı bir katalizörün kullanılması, birçok durumda, ekonomik olarak uygulanabilir olması için geri kazanılmasını ve yeniden kullanılması gerektirmektedir. Dahası, hareketsiz bir enzimin kullanılması, reaktörün tasarımını ve reaksiyonun kontrolünü büyük ölçüde basitleştirmeye izin verir: enzimin filtrelenmesi reaksiyonu durdurur. İmmobilizasyon genellikle bir enzimin endüstriyel bir biyokatalizör olarak kullanılması için bir gerekliliktir ve bu biyokatalizörlerin çözünürlük problemine en basit çözümdür. Enzimlerin serbest veya çözünebilir formda kullanılması, diğer faktörlerin yanı sıra düşük işletme kararlılığı, yüksek fiyatlar, enzimin tekrar kullanımının ve ürün geri kazanımının imkansızlığı ile ilgili problemler sunmaktadır. Bu dezavantajlar, enzimatik ürünlerin ticarileşmesini engellemektedir, ancak farklı enzim immobilizasyon teknikleri kullanıldığında bu dezavantajlar en aza indirilebilmektedir [21]. İmmobilizasyon, biyokatalizörün çözünmeyen bir katı destek içerisine hapsolmesinden oluşur ve serbest enzimlerin kullanımına kıyasla bazı avantajlar sunmaktadır [22]. Enzim immobilizasyonu ile elde edilen faydalar arasında operasyonel stabilite artışı, ürünlerin ve biyokatalizörlerin ayrılmasında kolaylık, sürekli enzimatik işlemlerin uygulanması enzimlerin geri kazanılması ve yeniden kullanılması olasılığı, operasyonel maliyetlerin azalması ve ürün akışında biyokatalizörün bulunmaması gösterilmektedir [23,24].

Çözünmeyen destek matrisleri kullanılarak yapılan enzim immobilizasyonu, kullanım kolaylığı, enzimlerin bir reaksiyon karışımından ayrılmasını kolaylaştırması, daha yüksek stabilite ve tekrar kullanılabilirliği, ara yüzlerle etkileşimlerin önlenmesi, çok noktalı kovalent bağlanma yoluyla katılma, alt birim ayrışmasının önlenmesi, geliştirilmiş etkinlik nedeniyle pratik uygulamalar için avantajlıdır. Seçicilik, özgüllük, inhibisyonlara karşı direnç ve hatta gelişmiş bir saflık kazanmaktadır.

2.8. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimin fiziksel olarak sınırlanması, biyokatalizör ile seçilen taşıyıcı arasındaki farklı etkileşimler veya kendi kendine toplanma ile geliştirilebilmektedir. Farklı immobilizasyon tekniklerinin ana avantajları ve zayıf yönleri Tablo 2.3'te gösterilmektedir.

Tablo 2. 3. Farklı Enzim İmmobilizasyon Tekniklerinin Temel Özellikleri

| Teknikler | Özellikleri |
|--------------------------------|--|
| Bağlama | Allosterik enzimler için avantajlıdır. Enzim ve türevlendirilmiş koenzim taşıyıcı yüzeyde tutulabilir. Dezavantaj: kaymaya duyarlıdır. |
| Kovalent | Artan stabilite ve enzim geri dönüşümü vardır. Sterik engelli problemler görülebilmektedir. Belirli bir sürece uyarlanabilir. |
| Kovalent Olmayan | Basit teknik ve taşıyıcının kolay kurtarılması. Yüksek immobilizasyon verimi. Dezavantajı: enzim aktivitesi çevreye bağımlıdır, zayıf enzim geri dönüşümü vardır. |
| Kapsülleme | Enzim izole edilir ve matris içindeki ortamdan korunur. Dezavantaj: substrat / ürünler için yayılım bariyerleri. |
| Mikro kapsülleme | Enzim, reaksiyonun aynı ortamında olabilir (substrat / ürünlerin fiziksel durumunda bir değişiklik olmaz). Dezavantaj: taşıyıcı bariyeri nedeniyle substrat etkileşimi zordur. |
| Tutuklama | Her bir enzim molekülü matriste dağılır. Dezavantaj: fazlar arası enzim / substratta gerçekleştirilen kataliz görülmektedir. |
| Çapraz bağlanmış enzimler | Kötü mekanik özellikler ve ciddi kütle transfer sınırlamaları. |
| Çapraz bağlı enzim kristalleri | Sert çevre koşulları altında yüksek stabilite ve aktivite. Dezavantajları: yüksek iş gücü ve teknik beceriler. |

Kovalent enzim immobilizasyonu, enzimin ve matrisin mevcut kalıntılarına spesifik olan veya spesifik olmayan çift fonksiyonlu ajanların kimyasal reaksiyonu ile gerçekleştirilmektedir [25]. Yüksek verimli enzim immobilizasyonu, biyokataliz reaksiyonunda amino asitlere çok noktadan yapışarak gerçekleştirilebilmektedir. Ek olarak, enzim ve taşıyıcı arasındaki bir ara parçanın varlığı, reaksiyon sırasında biyokatalizörün dinamik doğası nedeniyle enzimatik aktiviteyi arttırmaktadır. Bu tekniğin dezavantajları, enzim yapısının zayıf bilgisi, kalıntı ve toksik reaktifleri ortadan kaldırmak için ilave arıtma prosedürleri uygulanmasıdır.

Enzimin matris yüzeyine kovalent olmayan bağlanması, kısa vadeli (düşük enerji) etkileşimler (örneğin, van der Waals, dipol etkileşimleri, London kuvvetleri, vb.) veya yüksek enerjili (örneğin iyonik) etkileşimlerdir.

İyonik Bağlama, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur [26,27].

Biyospesifik bağlama yönteminde, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir. Lektinler spesifik karbonhidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar.

Adsorpsiyon, enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir.

Şelat Bağlama: Bu yöntemde, destek katısının yüzeyini aktifleştirmek ve enzimi destek materyaline bağlamak için geçiş elementleri Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum(IV) kullanılmaktadır.

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekânda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamamaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

Enzim kapsüllemesi, boyutlara bağlı olarak, mikro veya nano kapsülleme adı verilen küçük kapsüllere biyokatalizörün dahil edilmesini içermektedir. Kapsülleme birçok avantaja sahiptir, çünkü çoğu durumda birkaç aşama ve kapsamlı arıtma prosedürleri gerektirmez. Mikro veya nano-kapsülleme, enzimin bir depo olarak etkisiz bir materyal içine yerleştirildiği ve proteini dış ortamdan koruyan bir yapı kullanılarak geliştirilebilir. Bu teknik, ilaç endüstrisinde ilaç dağıtımı için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Polimer matrikste tutuklama yöntemi, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanmaktadır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'- metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir destekle fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir. Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalar bu yöntemin en önemli

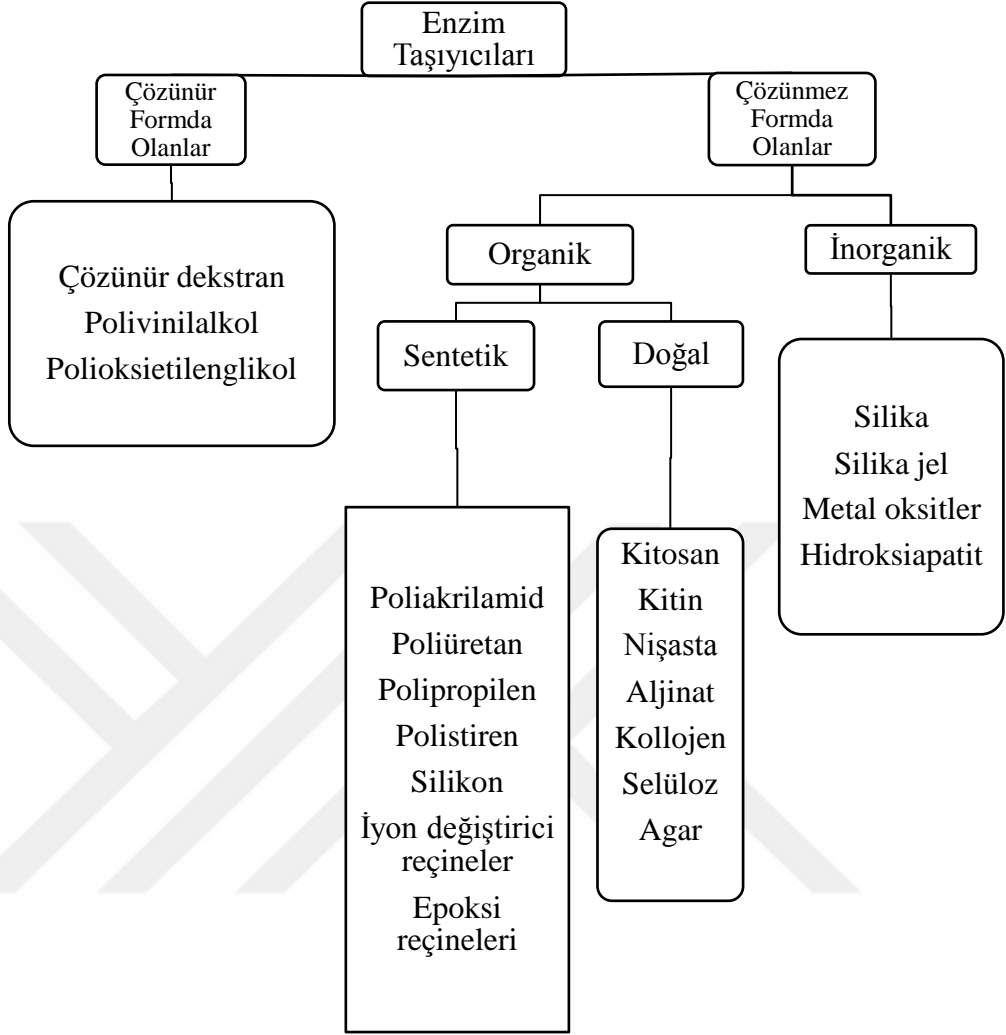
dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır.

2.9. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar

Enzimlerin taşıyıcılar üzerinde immobilizasyonu, çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Protein immobilizasyonu için önerilen birçok yöntem arasında, en önemli ve faydalı olan yöntem adsorpsiyon ile immobilizasyondur. Adsorpsiyon metodu, van der Waals kuvvetlerini, iyonik etkileşimleri ve hidrojen bağına içeren taşıyıcı ve enzim arasında oluşan fiziksel etkileşimlerden yararlanmaktadır. Bağlanma oldukça zayıf etkileşimdir ve önemli olarak enzimin doğal yapısını değiştirmemektedir.. Bu, enzimin aktif bölgelerinin inhibe edilmesini önlemekte ve enzimin aktivitesini korumasına izin vermektedir. Özellikle, enzim adsorpsiyonu için herhangi bir taşıyıcı uygulanabilir, ancak her enzim tüm taşıyıcılar üzerinde immobilize edilememektedir. Bunun nedeni, enzimin başarıyla adsorpsiyonunun gerçekleşmesi için, enzim taşıyıcı afinitesinin uyumlu olduğu koşulların sağlanmasıdır. Bu, enzim-taşıyıcı etkileşimlerinin oluşmasını sağlayan taşıyıcı üzerindeki spesifik aktif grupların varlığı ile mümkündür [28].

Enzim immobilizasyonu için uygun taşıyıcı seçim kriterleri şunlardan oluşmaktadır; spesifik koşullarda maliyet, bulunabilirlik, stabilite (veya gerekirse reaktivite) ve taşıyıcının tipidir. Dikkate alınması gereken taşıyıcının fizikokimyasal parametreleri ise şunlar oluşmaktadır: yüzey alanı, yapı büyüklüğü, gözenekli yapısı ve yüzeyde mevcut fonksiyonel grupların tipidir. Enzim adsorpsiyonu için kullanılan tipik taşıyıcıların genel bir sınıflandırması, Tablo 2.4'te gösterilmektedir.

Tablo 2. 4. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması



Enzimlerin adsorpsiyonla immobilize edilmesi için düşünülen ve çalışılan materyallerin sunumu, çeşitlerinin zengin olduğunu göstermektedir. Belirli bir biyotransformasyonun şartlarını en iyi şekilde sağlamak için farklı boyutlardaki boncuklar, membranlar, kapsüller, süngerler olarak yapılandırılabilen organik ve inorganik, doğal ve sentetik materyaller kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu yöntemlere benzer bir immobilizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem protein inorganik hibrit nano yapıları oluşturmaktadır.

2.9.1. Nano Hibrit Yapılar

Son zamanlarda, geleneksel yöntemlerin sınırlarının üstesinden gelmek için hibrit nano malzemelerin kolay ve güvenli sentezi için yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir [29]. Nano malzemeyi, metal iyon çözeltisine protein ekleyerek kolayca üretmek mümkün olduğundan, bu sentetik yöntem herhangi bir toksik element veya aşırı sert koşullar gerektirmemektedir. Bu nedenle, sentezde yer alan organik madde, immobilize edilmiş enzimin aktivitesini korumak için diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha az manipülasyona tabi tutulmaktadır.

Bu işlemle üretilen çiçek benzeri hibrit nano malzemeler “organik-inorganik hibrit nanoçiçekler” veya “hibrit nanoçiçekler” olarak adlandırılmaktadır. Sentez mekanizmaları, fiziksel özellikleri, protein aktiviteleri, stabiliteleri ve tekrar kullanılabilirlikleri yoğun bir şekilde incelenmiştir ve şu ana kadar bu türler serbest enzimlerden önemli ölçüde daha iyi özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Nanoçiçeklerin protein komplekslerinde, ilaçlarda ve serolojik çalışmalarda in vivo olarak uygulanmasının uygulanabilirliği de bir araştırma konusudur [30,31].

Hibrit organik-inorganik nanoçiçeğin sentez mekanizması üç aşamadan oluşmaktadır. İlk oluşum basamağında, fosfat metalinin $[M_3(PO_4)_2]$, (M:Cu,Ca,Mn) kristalleşmesi yapılanmaktadır. Bu basamakta, organik moleküller (protein, DNA, enzim) metal iyonları (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) ile kompleks şekilde protein temelli amid gruplar yolu ile başlıca koordinasyonu sağlamaktadır. Bu kompleksler, birincil kristallerin çekirdeklenmesi için bir konum sağlamaktadır. İkinci büyüme basamağında, metal-potein kristallerin ikinci büyüme aşamasında, metal-protein kristaller protein molekülleri ile bir araya gelerek kümelenirler ve ilk çiçek yaprağı şekillenir. Yüzey kaynaklı metal fosfat kristalinin büyümesi kinetik olarak kontrol edilir, başlangıçta görünen yapraklar çiçek şeklinin oluşumuna sebep olur bu yığılmanın nedeni Cu^{2+} ve diğer metallerin bağlanma bölgeleridir. Son aşamada ise büyüme çiçek benzeri yapının oluşumuna sebep olmaktadır. Bu büyüme esnasında, protein, yapraklar için iskelet oluşturur ve yaprakları birbirine bağlamak için yapıştırıcı bir tutkal gibi görev görmektedir. Ortamda protein olmadığı zaman büyük kristaller meydana gelir fakat nanoçiçek yapılar oluşmamaktadır [32,33].

Hibrit nanoçiçeklerin boyutu protein konsantrasyonuna bağı olarak değışmekle birlikte, varyasyon aralığı sınırlıdır (yaklaşık $\pm 3 \mu\text{m}$). Optimize edilmiş verilerin ortalama boyutuna dayanarak, nanoçiçekler 2 ila 30 μm arasında değışirler ve gözenek boyutu yaklaşık 0.1 μm 'dir. Bu sentezlenen çiçek şeklindeki hibrit yapılar mikrometre ölçekte olmalarına rağmen, bunların nano boyuttaki yapraklardan meydana gelmelerinden dolayı “nanoçiçek” olarak adlandırılmışlardır.

2.9.1.1. Nano Hibrit Yapıların Biyokataliz Özellikleri

Enzimler, ortam sıcaklıklarında kemo-, rejim- enantioselektif ve duyarlılık gibi iyi potansiyele sahip yüksek verimli biyokatalitik ajanlar olarak kabul edilmektedir. Ancak enzimlerin çoğu, düşük aktivite ve stabilite gibi birçok kısıtlılıklara sahiptir. Yetersiz katalitik özellikler, endüstriyel işlemler için minimum teknik performans, daha yüksek inhibisyon seviyesi, düşük direnç ve tekrar kullanılabilirliğin kısıtlı olması büyük bir problemdir. Tüm bu sınırlamalar arasında, enzimlerin kısıtlı stabiliteleri, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için önemli teknik zorluklardır. Enzimlerin endüstriyel kullanımını engelleyen bu tür yetersizliklere immobilizasyon teknolojisi ve ek faydalar ile biyo-kataliz için çözüm odaklı bir yaklaşım geliştirilmiştir. Çözünmeyen destek matrisleri kullanılarak yapılan enzim immobilizasyonu, kullanım kolaylığı, enzimlerin bir reaksiyon karışımından ayrılmasını kolaylaştırması, daha yüksek stabilite ve tekrar kullanılabilirliği, ara yüzeylerle etkileşimlerin önlenmesi, çok noktalı kovalent bağlanma yoluyla katılaşma, alt birim ayrışmasının önlenmesi, geliştirilmiş etkinlik nedeniyle pratik uygulamalar için avantajlıdır seçicilik, özgüllük, inhibisyonlara karşı direnç ve hatta gelişmiş bir saflık sunmaktadır.

2.9.1.2. Nano Hibrit Yapıların Biyosensörlerde Kullanımı

Enzim yapıları hibrit nanoçiçekleri alanındaki son gelişmeler, biyosensörler vb. gibi biyosensör cihazlarına uygulanan bakış açılarını ve limitlerini yeniden tanımlamak için yeni potansiyeller sunmaktadır. IUPAC'a (Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği) göre, biyosensör “izole edilmiş enzimlerin, immün sistemlerin, dokuların, organellerin veya tüm hücrelerin genellikle elektrik ile kimyasal bileşiklerin tespit edilmesinde aracılık ettiği spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanan bir cihaz” olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensör cihazında, tanıma işlemleri biyokimyasal mekanizmaların kullanılmasına dayanmaktadır.

Biyosensörler, belirli biyolojik aktiviteyi ölçülebilir bir sinyale çeviren yüksek hassasiyetli dedektör cihazlarıdır. Biyosensör uygulama bakış açısına göre, birkaç protein ve metal iyonları bazlı hibrit protein inorganik nanoçiçekler geliştirilmiştir.

2.9.1.3. Nano Hibrit Yapıların Çevre Kirliliğinde Kullanımları

Çoğu durumda, endüstriyel atık sular (tehlikeli boyalar veya atık atık içeren boyalar), su kütlelerine boşaltılmaktadır. Bu kontrol veya kontrol dışı boşaltılma, sırasıyla bitkiler, suda yaşayan hayvanlar ve insanlar dahil canlı organizmalar için ciddi problemler doğurmaktadır. Literatürdeki kanıtlara dayanarak, bu endüstriyel atıklar, sentetik kökenleri ve karmaşık aromatik moleküler yapıları nedeniyle muamele edilmesinin zor olduğu karsinojenik aromatik aminler, boyalar, organik ve inorganik maddeler içerir. Sentetik boyaların su ve atık sudan çevre üzerindeki etkilerini azaltmak ve uzaklaştırılmasını sağlamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ve üç ana kategoriye ayrılmıştır. Bunlar (1) fiziksel, (2) kimyasal ve (3) biyolojik arıtma yöntemleridir.

Her üç kategoride de mikroorganizma ve enzim sistemlerine dayalı biyolojik yöntemler çok dikkat çekmiş ve çevreye en az zararlı yöntem olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, enzim bazlı katalitik sistemler, yüksek katalitik / arıza etkinliği, çok amaçlı işlevsellik, daha az veya hiç yan etki, genel maliyetleri, koruma önlemi adımları ve en önemlisi çevre dostu çalışma koşulları sebebiyle özel ilgi görmektedir.

İmmobilize edilmiş formda enzimler, daha kolay iyileşme ve çoklu yeniden kullanım sağlayan çevresel değişikliklere karşı daha sağlam ve daha dirençlidir.

2.10. Boyar Maddeler

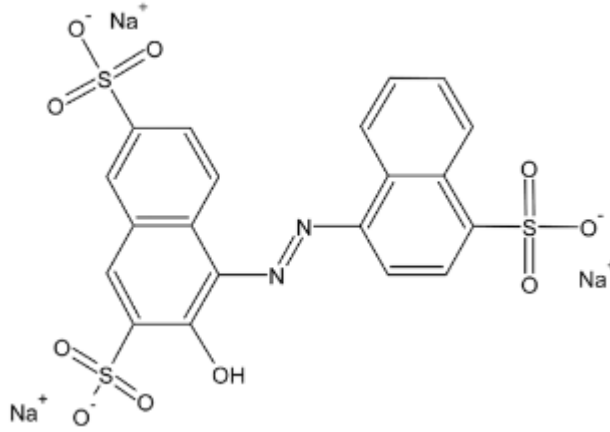
Tekstil boyaları ve diğer endüstriyel boyalar, artan çevresel tehlikeyi temsil eden en büyük organik bileşikler grubunu oluşturmaktadır. Dünya üretimindeki boya kullanımının yaklaşık %1-20'si boyama işlemi sırasında kaybolmakta ve tekstil atıklarında serbest kalmaktadır. Boyalı atık suların çevreye bırakılması, sağlıklı olmayan bir kirlilik ve ötrofikasyonun önemli bir sebebidir ve atık su fazında meydana gelen oksidasyon, hidroliz veya diğer kimyasal reaksiyonlar yoluyla tehlikeli yan ürünlerden oluşturmaktadır [34,35].

Peroksidaz enzimi, çok sayıda aromatik yapının oksidasyonunu hidrojen peroksit varlığında katalize eden bir enzimdir. Enzim tüm yüksek yapılı bitkilerde tanımlanmıştır. Bitki peroksidazları hücrede her yerde ve çeşitli izoformlarda bulunmaktadır. Hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek çok çeşitli substratların oksidasyonunu katalize etme yetenekleri vardır. Peroksidazlar, çökeltme veya diğer ürünlere dönüşüm yoluyla belirli kirletici maddeler üzerinde etkili olabilmekte ve çeşitli desteklere enzim immobilizasyonu yoluyla enzim maliyetinde bir azalma da gerçekleştirmektedir [36].

HRP' nin (EC: 1.11.1.7) H₂O₂ varlığında boyaların yanı sıra fenoller, anilinler gibi boyalar gibi geniş bir aromatik bileşikler de bozduğu bilinmektedir. Enzim, göreceli olarak yüksek termal stabiliteye ve genel dağılıma sahiptir [37]. Peroksidazlar, serbest radikal bileşiklerin üretilmesi ve ardından kendiliğinden polimerizasyonun etkisiyle hareket eder, polimerler daha sonra sulu fazdan yeniden ayrılabilir. Atık suyun arıtılması için immobilize edilmiş HRP kullanımı, uzun ömür, stabilite ve yeniden kullanılabilirlik gibi avantajlara sahiptir [38].

2.10.1 Amarant Boyar Maddesi

Sentetik bir azo boyası olan Amaranth (Şekil 2.3), alkolsüz içecekler, kek karışımları, dondurmalar, tahıllar, şaraplar, salata sosları ve kahve de dahil olmak üzere kırmızımsı veya kahverengimsi renkli yiyeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır [39]. Amaranth, insan vücudunda bazı ilaçlarla (örneğin, aspirin) temas ettiğinde hassas kişilerde alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir [40]. Dahası, azot (N=N) fonksiyonel grupları ve aromatik halka yapısını içeren, sindirilebilir sentetik azo boyaların, aromatik aminler halinde indirgenmiş bir şekilde bölündüğünü ve birçok aromatik aminin toksik, mutajenik ve karsinojenik olduğu bilinmektedir [41]. Amaranth boyası 520 nm'de max absorpsiyon piki vermektedir.

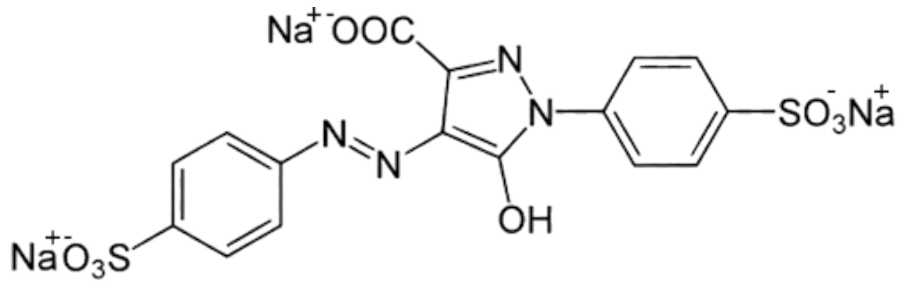


Şekil 2.6. Amaranth molekül yapısı

2.10.2. Tartrazin Boyar Maddesi

E102 veya FD&C Sarı 5 veya C.I olarak bilinen tartrazine, gıda boyası olarak kullanılan sentetik limon sarısı renginde bir azo boyadır. Kömür katranından elde edilmektedir. Suda çözünür ve esas olarak trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfonatofenil)-4-(4-sülfonatofenilazo)-H-pirazol 3-karboksilatır.

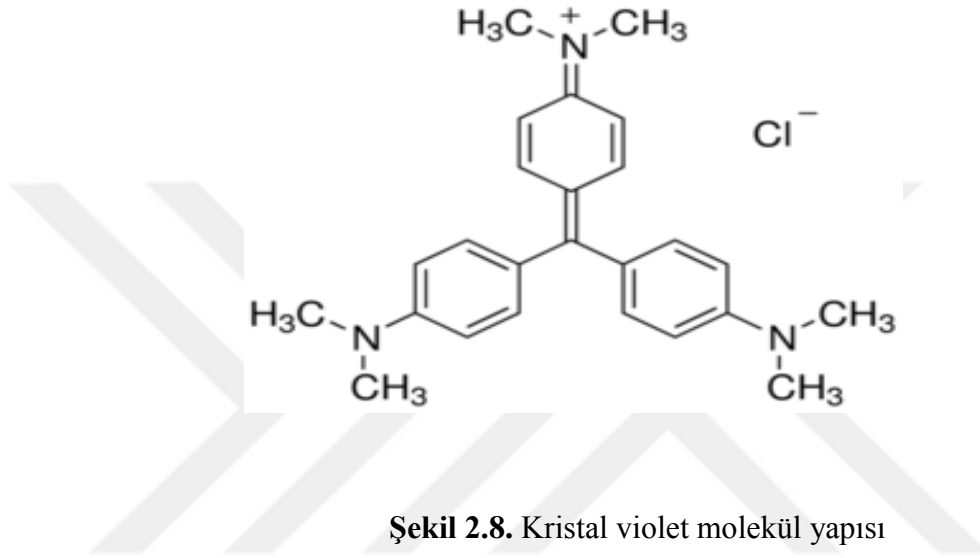
Pek çok ürün gurubunda; pamuk şekeri, alkolsüz içecekler, aromalı cipsler tahıllar (mısır gevreği, müsli vb.), kek karışımları, çorbalar, soslar, sakız, badem ezmesi, reçel ve jöle, bazı gıda ürünü olmayan ürünlerde; sabunlar, kozmetikler, şampuanlar ve diğer saç ürünleri gibi günlük hayatta sıkça kullandığımız ürünlerde tartrazin mevcuttur [42].



Şekil 2.7. Tartrazine molekül yapısı

2.10.3. Kristal Viole Boyar Maddesi

Sentetik bazik bir katyonik boya olan kristal violet sulu çözeltilerde mor menekşe rengi vermektedir. tekstil boyama endüstrisinde, biyolojik bakteri, dermatolojik ajan, veteriner hekimliği, zararlı bakterilerin çoğalmasını engellemek için kanatlı yemlerine katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılan tipik bir trifenilmetan boyadır. Kristal violet boyası; toksik, mutajen, mitotik zehirli madde ve onaylanmış güçlü kanserojendir [43].



2.11. Fenolik Bileşikler

Fenoller (C_6H_5OH), aromatik bileşikler arasında en önemli organik bileşiklerdir ve benzenin hidroksil türevleri olarak isimlendirilmektedir. Fenol endüstriyel atıksularda, doğal sularda ve içme suyu temini amacıyla kullanılan sularda bulunabilmektedir. Bu gibi suların klorlanması kokulu ve hoş olmayan tatta klorofenollerin oluşmasına neden olmaktadır.

Fenolik bileşikler, odun ve kömür damıtılmasından, yağ rafinerilerinden, kimyasal işletmelerden, insan ve hayvan atıklarından oluşmaktadır. Fenolik atık bileşikler değişen miktarlarda bir, iki yada daha fazla sayıda hidroksil grubunda bulunan fenoller, aldehytleri, ketonları, alkoller, organik asitleri, karbondioksit ve amonyak gibi gazları, siyanürleri içermektedir.

Fenol ve türevleri büyük ölçüde yükseltgenebilir olduklarından sudaki çözünmüş oksijeni alarak suyun oksijenini azaltırlar. Fenollü sular özellikle klorlandıktan sonra su canlılarına doğrudan doğruya zehirleyici olarak etki ederler ve

toksik dozların çok aşağısında dahi balıkların yenen etlerinde istenilmeyen kokuların oluşmasına neden olurlar. Sularda ve endüstriyel atıksularda fenol ve türevlerinin miktarlarının kesin olarak saptanmaları gerekmektedir.

Fenoller, aromatik hidroksil bileşikleri olup hidroksil grubu doğrudan doğruya benzen halkasına bağlıdır. Benzen halkasında yalnız bir hidroksil gurubu bulunan en basit bileşiğe ‘fenol’ denir. Karışık yapılı fenoller ya ana madde olarak fenolü içerirler (o-, m-, p- klor fenoller gibi) veya başka tip bir bileşiğin oksitürevleridir.

2.11.1. Fenolik Bileşik Tayininde Kullanılan Yöntemler

Fenol tayini için önerilen üç yöntemden ikisi 4-amino antipirin klorometrik yöntemi olup, orto ve meta bileşenli fenolleri belirlemeye yararmaktadır. 4-amino antipirin yöntemi ile alkil, aril, nitro, benzoil, nitroso veya aldehit guruplarının yer değiştirdiği para-bileşikli fenoller tayin edilememektedir. Fenol tayini için üçüncü yöntem, sulu ortamda gaz-sıvı kromatografisi tekniğidir.

4- amino antipirin yöntemi iki şekilde uygulanır. Birinci yöntem çok yüksek hassasiyete sahip olup 1mg/L den daha az fenol içeren su numunelerine uygulanmaktadır. Bu yöntemde renk gelişimi sulu olmayan çözeltide olur. Doğrudan fotometrik yöntem olarak isimlendirilen ikinci yöntemde ise renk gelişimi sulu çözeltide olur. Bir su numunesinde bulunan çeşitli fenolik bileşiklerin relatif miktarını bulmak mümkün değildir. Bu nedenle su numunesinde bulunan fenolik bileşikler ‘fenol’ olarak tanımlanır ve numunede mevcut fenolik bileşiklerin minimum konsantrasyonunu ifade eder. Gaz-sıvı kromatografisi yöntemi 1 mg/L den daha fazla konsantrasyonda fenol bileşikleri içeren numunelerde kullanılır.

2.11.2. Fenolik Bileşiklerin Kullanım Alanları

Plastiklerin en önemli bileşenlerinden olan fenoller, en çok fenolik reçine üretiminde, kauçuk işleme, izolasyon ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Fenoller ayrıca ilaç, boya ve pestisitlerde de ham madde olarak kullanılmaktadır.

Klorofenoller ise benzen halkasına bağlı bir ya da daha fazla klor içeren fenol yapısındaki renksiz, zayıf asidik ve zehirli organik bileşiklerdir. Bakteri, böcek ve zararlı ot öldürücü olarak kullanılan bu bileşiklerin büyük bir bölümü fenolün klorla tepkimeye girmesiyle bazıları da poliklorlu benzenin hidrolizi ile elde edilmektedir.

Endüstriyel atıksularda fenol ve türevlerine sıkça rastlanmaktadır. Özellikle kömür işletmelerinin kömür destilasyon ve organik sentezlerin atık akımları bol miktarda fenol ve türevlerinin kirliliğini içermektedir. Fenolik bileşikler ayrıca kağıt hamuru ve kağıt ağartma tesisleri, reçine, pestisit, boya çözücü endüstrileri atıksularında yer almaktadır.

2.12. Tezin Amacı

Son birkaç yıldır farklı bir immobilizasyon yöntemi olarak enzim-inorganik hibrit nano yapıların (nanoflowers, HNF) sentezi ile enzimlerin kararlılığının ve aktivitesinin serbest enzimlere ve diğer immobilizasyon tekniklerine göre büyük ölçüde stabil olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, organik kısım olarak yaban turbu peroksidaz (HRP) enzimi ve inorganik kısım olarak $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak CuNF-HRP , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak CaNF-HRP ve $\text{Mn(II)SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak MnNF-HRP yapılarının sentezlenmesi, bu yapıların stabilitelerini kıyaslamak için GA maddesi ile çapraz bağlanması, yüksek katalitik aktivite ve kararlılığa sahip morfolojilerinin tespit edilmesi ve özelliklerinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, asetik asit, glutaraldehit, toz formda *horseradish* (77332, ~150 U/mg. E.C: 1.11.1.7) 'den saflaştırılmış peroksidaz, %30 hidrojen peroksit (H_2O_2), dipotasyum hidrojenfosfat (K_2HPO_4), 4-metil katekol, gallik asit, fenol, potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4), [2,2'-azino-bis-3-etilbenzothiazoline-6- sülfonik asit], etanol (%99), comassie Brilliant Blue G-250, sığır serum albümin, sodyum klorür, potasyum klorür (KCl), gayakol, pirogallol, katekol, tirozin, 4-aminoantipirin, bakır sülfat penta hidrat, kalsiyum klorür dihidrat, mangan (II) sülfat monohidrat, sodyum asetat, Tris (hidroksimetil) aminometan, hidrojen klorür (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), sülfürik asit (H_2SO_4), $FeCl_2 \cdot H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$), amonyak (NH_3).

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Germany) ve Sigma-Aldrich (USA) firmalarından sağlanmıştır.

Araştırmada kullanılan araç ve gereçler; UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer), pH metre, manyetik karıştırıcı, inkübatör, analitik terazi, otomatik pipet.

Kullanılan çözeltiler:

Glutaraldehit Çözeltisi: %0,1' lük glutaraldehit çözeltisi 100 mM pH 6,0 fosfat tamponunda hazırlandı.

H_2O_2 : %30 luk hidrojen peroksitten istenilen derişimde hazırlandı.

Gayakol (45mM): Bir miktar gayakol maddesi pH 6,0 fosfat tamponu ile son hacmi 50 mL olacak şekilde hazırlandı.

Pirogallol (%5'lik): 5 gram pirogallol maddesi son hacmi 100 mL' ye denk gelecek şekilde, pH 6,0 fosfat tampon ile hazırlandı.

ABTS (9 mM): 0,05 gram ABTS, 10 mL pH 6,0 fosfat tampon içerisinde hazırlandı.

PBS tampon (pH 7,4): 8 gram NaCl, 0,2 gram KCl, 0,24 gram KH_2PO_4 ve 1,74 gram K_2HPO_4 800 mL saf suda çözüldü ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

50 mM Asetat Tamponu (pH 4,0 ve pH 5,0): 50 mM sodyum asetat ve 50 mM asetik asit çözeltileri ile ayrı pH değerlerinde hazırlandı.

50 mM Fosfat Tamponu (pH 6,0 ve pH 7,0): 50 mM KH_2PO_4 ve 50 mM K_2HPO_4 çözeltileri ile ayrı pH değerlerinde hazırlandı.

50 mM Tris-HCl Tamponu (pH 8,0 ve pH 9,0): 50 mM Tris(hidroksimetil) aminometan ve 0,1 M HCl çözeltileri ile ayrı pH değerlerinde hazırlandı.

4 mM PBS Tamponu (pH 7,4): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH_2PO_4 ve 1,74 g K_2HPO_4 tartılıp 1L hacime tamamlandı.

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta olup, Merck veya Sigma firmasından temin edildi. Tüm sulu çözeltiler, Millipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Aktivite Ölçümleri

HRP (horseradish peroxidase) enzimi ve hibrit nanoçiçek yapılarının (HNF) aktivite tayinleri substrat olarak gayakol ve hidrojen peroksit kullanılarak belirlendi. Ölçümler için, serbest HRP' nin HNF ile aynı koşullar altında etkinliği ve stabilitesi belirlendi. Standart bir yöntemle, bilinen miktarda HNF ve serbest HRP, 1 mL fosfat tamponunda (pH 6,0) ayrı ayrı çözüldürüldü. Her çözeltiliye, 1 mL 22,5 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 1 mL 45 mM gayakol eklendi ve son hacim 3 mL oldu. (Tablo 3.1). Gayakol'ün -3,3-dimetoksi-4,4-difenokinonine (tetragayakol) dönüşümünü

gösteren absorbans yoğunluğundaki değişiklikler, UV-vis spektroskopisi kullanılarak 40°C'de 470 nm'de 3 dakika boyunca kaydedildi ($\epsilon_{470 \text{ nm}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [44].

Aktivite Hesaplaması:

$$\text{Aktivite (U/mL)} = \frac{\Delta A/3}{\epsilon_{470 \text{ nm}} \times \text{Enzim miktarı (mL)}} \times SF \times 4 \quad (1)$$

ΔA : 470 nm dalga boyunda ölçülen absorbans farkı (3 dk sonundaki absorbans-başlangıç absorbansı)

$\epsilon_{470 \text{ nm}}$: $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Gayakolün 470 nm'deki molar ekstraksiyon katsayısı)

SF: Seyreltme faktörü

Tablo 3.1. Aktivite ölçüm yöntemi

| Kullanılan Çözeltiler | Kör (mL) | Numune (mL) |
|---------------------------------|----------|-------------|
| Aktivite Tamponu (0,1 M pH 6,0) | 1,0 | 0,9 |
| Gayakol (45 mM) | 1,0 | 1,0 |
| Hidrojen peroksit (22,5 mM) | 1,0 | 1,0 |
| Enzim | - | 0,1 |

Reaksiyon süresi: 3dk, reaksiyon hacmi: 3 mL, sıcaklık: 40°C, Abs: 470 nm

3.2.2. İmmobilizasyon Verimi

İmmobilize horseradish peroxidase enzimlerinin aktivitesi, mg taşıyıcı başına düşen aktivite olarak hesaplandı. Aşağıdaki formüllere göre de immobilizasyon verimi, immobilizasyon etkinliği ve geri kazanılan aktivite değerleri yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \frac{U_{\text{total}} - U_{\text{kalan}}}{U_{\text{total}}} \times 100 \quad (2)$$

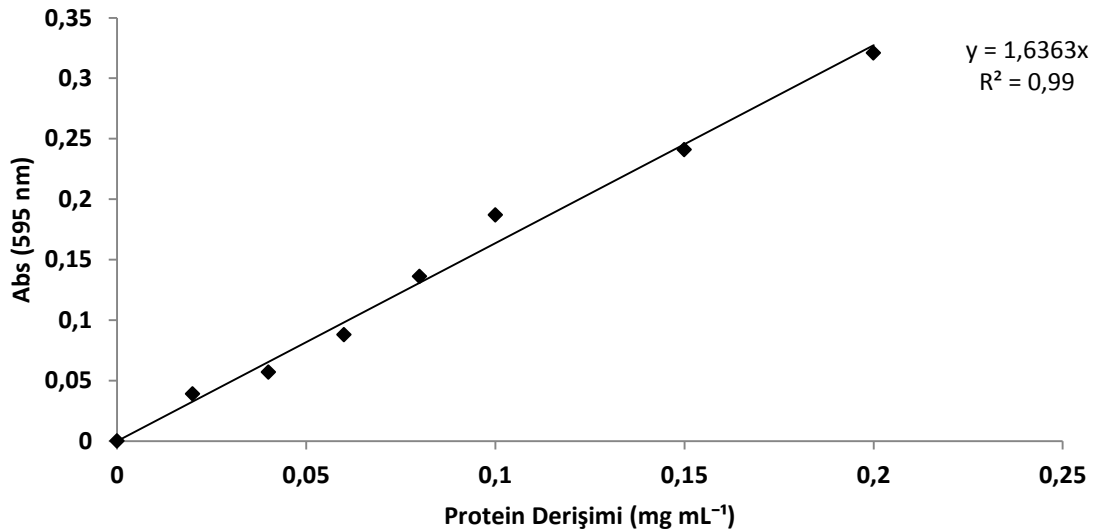
$$\text{İmmobilizasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{İmmobilize enzim aktivitesi}}{\text{Teorik immobilize enzim aktivitesi}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Geri Kazanılan Aktivite (\%)} = \frac{\text{Total immobilize enzim aktivitesi}}{\text{Serbest Enzim Aktivitesi}} \times 100 \quad (4)$$

3.2.3. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi

Serbest enzim, filtrat ve yıkama sularının protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi [45]. Yöntem; organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır. Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarını belirlemede kullanılan yöntem Bradford tarafından geliştirilen ve Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir.

Standart protein eğrisinin çizimi; 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,02-0,05-0,1-0,12-0,15-0,2 mg/ml olan ara stoklardan 0,1 ml eklendi. Tüplerin her birine 2 ml Bradford reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilip 595 nm de absorbansları ölçüldü. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilerek protein standart eğrisi oluşturuldu.(Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Protein standart eğrisi

Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarı, total protein miktarından bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak % yükleme etkinliği hesaplandı.

$$\text{Yükleme Etkinliği (\%)} = \frac{C_i.V_i - C_f.V_f}{C_i.V_i} \times 100 \quad (5)$$

C_i: Serbest enzimin protein miktarı

V_i: Ortama konan enzim çözeltisinin hacmi

C_f: Filtratta bulunan protein miktarı

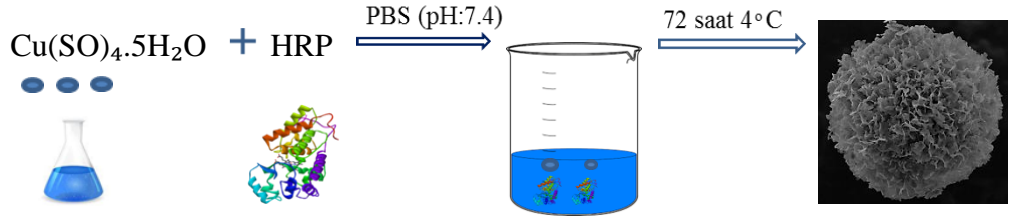
V_f: Filtrat hacmi

3.2.4. Horseradish Peroxidase Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Sentezlenmesine Farklı İyon Derişimlerinin Etkisi

10 mM pH 7,4 PBS tamponu içerisinde farklı iyon derişimleri eklenerek yapıların oluşumu üzerindeki etkileri incelendi. CuSO₄.5H₂O, CaCl₂.2H₂O ve Mn(II)SO₄.H₂O stok çözeltileri 60 mM-120 mM-200 mM ve CaCl₂.2H₂O için 240 mM da hazırlanarak immobilizasyon gerçekleştirildi. Çöktürme ortamındaki son iyon derişimleri 15 mM, 30 mM, 50 mM ve 60 mM, enzim konsantrasyonu ise 0,1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı ve hazırlanan çöktürme ortamı HNF yapılarının olgunlaşması için 72 saat +4⁰C de inkübe edildi. Aktiviteleri kıyaslanarak en iyi sonuç alınan derişimde nanoçiçek sentezi yapıldı.

3.2.5. Horseradish Peroxidase Cu²⁺ Hibrit Nanoçiçek Yapısının Sentezi

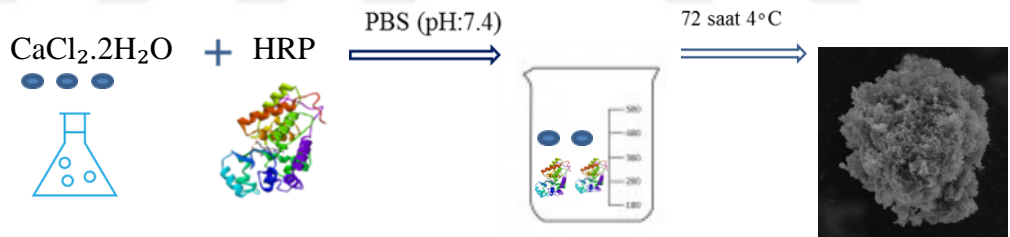
10 mM pH 7,4 PBS tamponu ve 120 mM CuSO₄.5H₂O stok çözeltisi hazırlandı. 9 mL PBS tamponuna 60 µL hacimde CuSO₄.5H₂O stok çözeltisi eklendi. Vorteks ile 30 saniye boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Enzim konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çöktürme ortamı HNF yapılarının olgunlaşması için 72 saat +4⁰C de inkübe edildi. Çöken mavi renkli HNF yapıları 6000 rpm karıştırma hızı ile +4⁰C de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez saf su ile yıkama yapılarak tekrar edildi [46]. Elde edilen HNF yapılarının karakterizasyon çalışmaları ve aktivite ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.2. HRP- Cu^{2+} hibrit nanoçiçek yapısının sentezi

3.2.6. Horseradish Peroxidase Ca^{2+} Nanoçiçek Hibrit Yapısının Sentezi

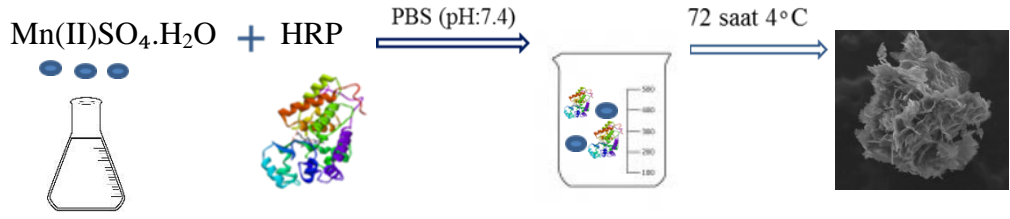
10 mM pH 7,4 PBS tamponu ve 200 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi hazırlandı. 4,5 mL PBS tamponuna 90 μL hacimde $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi eklendi. Vorteks ile 30 saniye boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Enzim konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çöktürme ortamı HNF yapılarının olgunlaşması için 72 saat $+4^\circ\text{C}$ de inkübe edildi. Çöken beyaz renkli HNF yapıları 6000 rpm karıştırma hızı ile $+4^\circ\text{C}$ de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez saf su ile yıkama yapılarak tekrar edildi [47]. Elde edilen HNF yapılarının karakterizasyon çalışmaları ve aktivite ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.3. HRP- Ca^{2+} hibrit nanoçiçek yapısının sentezi

3.2.7. Horseradish Peroxidase Mn^{2+} Nanoçiçek Hibrit Yapısının Sentezi

10 mM pH 7,4 PBS tamponu ve 120 mM $\text{Mn}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi hazırlandı. 10 mL PBS tamponuna 66 μL hacimde $\text{Mn}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi eklendi. Vorteks ile 30 saniye boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Enzim konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çöktürme ortamı HNF yapılarının olgunlaşması için 72 saat $+4^\circ\text{C}$ de inkübe edildi. Çöken beyaz renkli HNF yapıları 6000 rpm karıştırma hızı ile $+4^\circ\text{C}$ de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez saf su ile yıkama yapılarak tekrar edildi [48]. Elde edilen HNF yapılarının karakterizasyon çalışmaları ve aktivite ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.4. HRP- Mn^{2+} hibrit nanoçiçek yapısının sentezi

3.2.8. Horseradish Peroxidase Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Glutaraldehit İle Çapraz Bağlanması

Hazırlanan HRP hibrit nanoçiçek yapılarının stabilitesini arttırmak için glutaraldehit kullanıldı. HRP hibrit nanoçiçek yapılar %0,1'lik glutaraldehit çözeltisi ile 1 saat boyunca $37^\circ C$ 'de inkübe edilerek çapraz bağlama gerçekleştirildi. Glutaraldehitin fazlasını uzaklaştırmak için hibrit nanoçiçek yapıları saf su ile ardından pH 6,0 fosfat tamponu ile yıkandı ve aktivite değerleri ölçüldü [49].

3.2.9. Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Karakterizasyonu

Nanoçiçek hibrit yapılarının SEM, FT-IR, XRD ve EDX uygulanarak yapı karakterizasyonu yapıldı.

3.2.9.1. SEM Analizi

Nanoçiçek hibrit Horseradish Peroxidase enzim yapısının görüntülenmesi FEG/FEI Quanta MK2 model Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi'nde yapıldı. SEM analizi, tungsten uçtan kaynaklanan elektronların incelenen numune üzerine düşürülmesi ile oluşan etkilerin toplanıp incelenmesi esasına dayanmaktadır. Bu sayede incelenen numunenin yüzey yapısı ve şekli hakkında bilgi sahibi olundu.

3.2.9.2. FT-IR Analizi

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FT-IR) analizi için Pelkin Elmer model cihaz kullanıldı ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümü'nde analiz edildi. Kızılötesi (IR) spektroskopisi inorganik veya organik

bileşikleri karakterize etmek için kullanılmaktadır. IR spektrumu, bileşiği meydana getiren atomlar arasında oluşan bağların titreşimi ile meydana gelen frekanslar sonucu oluşan absorpsiyon pikleri ile numunenin parmak izini göstermektedir. Bu sayede numunenin yapısı hakkında bilgi sahibi olundu.

3.2.9.3. XRD Analizi

X- ışını kırınım yöntemi (XRD), her bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması prensibine dayanmaktadır. Her bir kristal faz için bu kırınım özellikleri kristalin yapısını tanımlamaktadır. XRD analizi Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde; pixel teknolojisine sahip CERN patentli XRD dedektör (PIXcel 1D) sistemi ile yapıldı.

3.2.9.4. Element Analiz (EDX)

EDX; Enerji Dispersiv Spektrum, SEM ve TEM'e eklenerek elementlerin enerjilerinden faydalanıp kantitatif kimyasal analiz yapmakta kullanılmaktadır. EDX analizi FEG/FEI Quanta MK2 model Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi'nde yapıldı.

Numunenin yüzeyine yüksek enerjili elektronlar çarptığında bu çarpışmalardan dolayı, numune yüzeyinden bazı elektronlar kopmaktadır. Eğer bu elektronlar içteki orbitallerden koparılmışlarsa atomlar kararlıklarını kaybederler. Tekrar karalı hale gelebilmek için dış orbitallerdeki elektronlar iç orbitallerdeki boşlukları doldururlar. Dış orbitallerdeki elektronların enerjileri iç orbitallerdeki elektronların enerjilerinden daha yüksek olduğu için, dış orbital elektronları iç orbitalleri doldururken belli bir miktar enerji kaybetmek zorundadırlar. Bu kaybedilen enerji X-ışını şeklinde ortaya çıkmaktadır.

Malzeme içindeki atomlar yüksek enerjili radyasyonla iyonize edildiklerinde karakteristik X ışını oluştururlar. Bir EDX sistemi yüksek enerjili bir radyasyon kaynağı (genellikle elektronlar), numune, katı hal dedektörü (Si-Li) ve sinyal işleme ünitelerinden oluşur. Dedektör tarafından algılanan X ışınları sinyal haline dönüştürülerek belirli şiddetlere sahip piklerden oluşan X ışını enerji histogramı

haline dönüştürülür. Bu X ışını histogramı ile malzemedeki her bir elementin tipi ve miktarı belirlenebilmektedir.

3.2.10. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

3.2.10.1. Serbest Enzim Üzerine Farklı Metal İyon Değişimi Etkisi

Serbest HRP enzimi üzerine çöktürme ortamında kullanılan farklı metal iyon çözeltilerinin etkisi incelendi. Aktivite ölçümünde kullanılan serbest enzim miktarı üzerine ortamdaki derişimi 15-30-50 ve 60 mM olacak şekilde Cu^{2+} , Ca^{2+} ve Mn^{2+} metal iyonları eklendi. 1 saat sonunda aktivite ölçümü alındı. Kontrol grubu olarak metal iyon eklenmeyen serbest enzim kullanıldı. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_o - A_i) / A_o] \times 100 \quad (6)$$

Bu eşitlikte, A_o ; inhibitör kullanılmadan belirlenen enzim aktivitesini ve A_i ; inhibitör varlığında enzim aktivitesini ifade eder.

3.2.10.2. Optimum pH

Enzimler, katalitik aktivitesinin maksimum olduğu belirli bir pH değerine sahiptir. Bu değer, belirli bir enzimin optimum pH'ı olarak bilinmektedir. Katalitik aktivite, protein denatürasyonundan dolayı aşırı pH değerlerinde tamamen kaybedilmektedir. Bu nedenle çalışılan enzimin optimum pH değeri bilinmelidir.

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin optimum pH değerlerini belirlemek için 0,05 M sodyum asetat (pH 4,0 ve 5,0), 0,05 M potasyum fosfat (pH 6,0 ve 7,0) ve 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0 ve 9,0) tamponları kullanıldı. Bu tamponlardan ayrı ayrı pH aralıklarında substrat çözeltileri hazırlandı. Kör ve numune ayarlandıktan sonra aktivite tayininde anlatıldığı gibi standart yöntemle göre enzim aktiviteleri ölçüldü ve yüzde değerleri hesaplandı.

3.2.10.3. pH Stabilite

Serbest ve immobilize enzimlerin pH stabilitelerini belirlemek için serbest ve immobilize enzimler 60 dakika boyunca, 0,05 M sodyum asetat (pH 4,0 ve 5,0), 0,05 M potasyum fosfat (pH 6,0 ve 7,0) ve 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0 ve 9,0) tamponlarında bekletildi. 1 saat sonunda geri kalan enzim aktivitesi standart yöntemle göre ölçüldü.

3.2.10.4. Optimum Sıcaklık

Bir enzimin sıcaklığa karşı aktivitesi incelenirken maksimum bir değer elde edene kadar sıcaklıktaki artışla birlikte enzim aktivitesi de artmaktadır. Sıcaklığın optimum sıcaklık olarak bilindiğini ve her enzim için tamamlanan koşullar altında karakterize edilen bir sıcaklık değeri vardır. Sıcaklık, optimum sıcaklığın aşağısında veya yukarısında ise enzimin etkinliği aniden düşmektedir.

Serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklıklarını belirlemek için aktiviteleri, 25°C ile 70°C arasında değişen sıcaklıklarda tayin edildi. Aktiviteleri hesaplanıp yüzde değerleri grafik olarak gösterildi.

3.2.10.5. Termal Stabilite

Sıcaklığa bağlı kararlılığını belirlemek için serbest ve immobilize enzim 25°C ile 70 °C arasında değişen sıcaklıklarda 1 saat bekletildi ve geri kalan aktivite standart koşullarda ölçüldü.

3.2.10.6. Enzim Kinetiği

Enzimin katalitik etkinliği genellikle kimyasal reaksiyon hızına yaptığı etkinin ölçülmesiyle belirlenir. Enzim katalizli reaksiyonlar ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında çalışılmıştır. 1913 yılında Michaelis ve Menten substrat konsantrasyonu değişirken, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık gibi parametreleri sabit tutarak sükröz invertaz katalizli hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızını ölçmüşlerdir. Bunun sonucunda bir enzim-substrat kompleksi oluştuğu bulunmuş ve substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızının da hiperbolik olarak maksimuma ulaştığı görülmüştür.

Enzimler substratlarıyla ve bazen de koenzimleri ile kompleksler oluşturur (ES ile gösterilir). Doygunluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES halindedir, yani;

$$[ET] = [ES] \text{ 'dir.}$$

Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu



denklemleriyle göstermişlerdir. Buna göre E serbest enzimi, S substratı, k_1 , k_2 ve k_3 hız sabitlerini, ES enzim-substrat kompleksini ve P ise oluşan ürünü ifade etmektedir. ES kompleksinin iki yolu vardır: Ya k_2 hız sabiti ile tekrar E ve S'ye ayrışacak veya k_3 hız sabiti ile ürüne (P) dönüştürülecektir. Burada ürünün tekrar ES kompleksine dönüşmeyeceği farz edilmektedir. Ürün konsantrasyonunun ihmal edilebilecek seviyede olduğu başlangıç durumunda, bu varsayım tamamen doğrudur.

Yukarıdaki reaksiyonda ürünün oluşma hızı,

$$v = \frac{dP}{dt} = k_3[ES] \quad (6)$$

eşitliği ile verilir.

Burada ES terimini enzim ve substrat konsantrasyonları gibi bilinen değerler cinsinden göstermek gerekmektedir. ES'nin oluşma ve parçalanma hızlarını,

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] \quad (7)$$

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] + k_3[ES]$$

denklemleri vermektedir. ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon boyunca nispeten sabit kaldığı yapılan spektroskopik çalışmalarda bulunmuştur. Bu da ES kompleksi oluşma hızının parçalanma hızına eşit olmasıyla mümkündür. Böylece;

$$-\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[ES]'}{dt} \text{ den} \quad (9)$$

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

eşitliği ortaya çıkmaktadır. (10) eşitliğinden [ES]' yi çekip bir düzenleme yapılırsa;

$$[ES] = \frac{[E][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1}}$$

bulunur. (11) eşitliğindeki sabitleri tek bir terimde toplamak için $K_M = (k_2 + k_3) / k_1$ olarak ifade edilmektedir. Burada K_M 'ye Michaelis sabiti adı verilir. Bu sabit (11)'de yerine konulduğunda,

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

eşitliği elde edilir.

(12) eşitliğinde pay'da bulunan [E] ve [S] terimleri incelendiğinde [S] başlangıçtaki ile aynı alınabilmektedir. Çünkü [E], [S] konsantrasyonundan daha küçük olduğundan reaksiyon boyunca [S]'nin değişmediği kabul edilir.

Fakat serbest haldeki enzim konsantrasyonu ([E]), toplam enzim konsantrasyonu ([E_T]) ile [ES] arasındaki farka eşittir. Yani,

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

bu ifade (12) eşitliğinde [E]' nin yerine konulduğunda;

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_M}$$

elde edilir.(14) denklemini [ES] için çözüldüğünde;

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

eşitliği çıkar. $v = k_3[ES]$ denkleminde [ES] yerine (15) denkleminin sağ tarafı konulursa,

$$v = k_3[E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (16)$$

elde edilir. $[E_T] = [E_S]$ doygunluk halinde reaksiyon maksimum hızıyla yürür. Bu durumda;

$$V_{\max} = k_3[E_T] \quad (17)$$

olacaktır. (17) nolu eşitliği (16) nolu eşitlikte yerine konulduğu zaman;

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M}$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğe Michealis-Menten denklemini adı verilir. Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_M \gg [S]$ olacağından , [S] ihmal edilir ve;

$$v = \frac{V_{\max}}{K_M} [S]$$

doğru denklemi elde edilir. (19) denklemindeki v -[S] ilişkisini göstermektedir. K_M [S] olduğu yüksek substrat konsantrasyonda (18)' deki K_M ihmal edilir ve $V=V_{max}$ olur. Burada bütün enzim substratla doymuş ve artan [S] ile hız değişmeyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır (V_{max}).

Hızın $V_{max} / 2$ olduğu durumda, (18) nolu denklem yeniden düzenlenirse;

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (20)$$

[S] = K_M sonucu elde edilmektedir. Buradan K_M sabiti "maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu" olarak tanımlanmaktadır. Birimi mol/L'dir.

Farklı substrat konsantrasyonlarında bir dizi başlangıç hızları llecekse Michaelis ve Menten eşitliğinin grafiksel gösterimi uygundur. Bu şekilde K_M ve V_{max} kinetik parametreleri belirlenebilir. Ancak S'ye karşı V_0 grafiği çizildiğinde dikdörtgensel bir hiperbol elde edilir ki bu hiperbolün çizim zorluğundan ve asimptotların tahmin zorluklarından dolayı istenmez. Bu nedenle kinetik parametrelerin belirlenmesi için enzim katalizli reaksiyonlarda lineer bir ilişki daha yararlı olacaktır. Lineweaver ve Burk, Michaelis-Menten eşitliğini düz bir doğru üzerinde işaretlemeye imkn tanıyan bir formda tekrar yazmışlardır.

1/S'ye karşı $1/V_0$ grafiği çizildiğinde düz bir doğru elde edilmektedir. Bu doğrunun eğimi K_M/V_{max} 'ı, y eksenindeki kesim noktası ise $1/V_{max}$ 'ı vermektedir.

Serbest ve immobilize horseradish peroxidase'ın Michealis-Menten (K_M) sabitini ve maksimum reaksiyon hızını (V_{max}) belirlemek üzere 0,1 M pH 6,0 fosfat tamponunda hazırlanan farklı gayakol konsantrasyonlarında aktivite ölümü yapıldı. Lineweaver-Burk ($1/[V] - 1/[S]$) grafiğinden K_M ve V_{max} değerleri ayrı ayrı hesaplandı.

3.2.10.7. Substrat Spesifikliği

Enzimin substrat spesifikliğini belirlemek için, standart ölçüm koşulları altında bir dizi potansiyel doğal elektron donörü kullanılmıştır. Horseradish peroksidaz enziminin ve hibrit nanoçiçek yapılarının substrat spesifikliğini belirlemek için 10 mM gayakol, pirogallol, 4- metil katekol, gallik asit, tirozin, katekol, ABTS ve 4-AAP substrat çözeltileri kullanıldı. En yüksek aktivitenin görüldüğü substrat %100 kabul edilerek substrat ilgisi sıralaması yapıldı.

3.2.10.8. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize HRP enziminin tekrar kullanılabilirliğini saptamak için hibrit nanoçiçekler tamponda hazırlanan 10 ppm Amarant boya çözeltisi ile 2,5 saat 25 °C' de inkübe edildi ve immobilize hibrit nanoçiçek yapılar reaksiyon ortamından santrifüj ile ayrılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Boyaların giderim sonrasındaki absorbans değerleri ölçüldü ve yüzde boya giderimi olarak hesaplandı. Bu işlemler 10 kez tekrar edildi ve her bir giderimden sonra HNF'ler tampon ile yıkanarak tekrar kullanıldı.

3.2.10.9. Enzim Kaçışı

İmmobilize HRP hibrit nanoçiçek yapılarından enzim kaçış miktarını belirlemek için, immobilize enzimler 30 dakika boyunca pH 6,0 fosfat tamponunda bekletildi. Süre sonunda immobilize enzimler ortamdaki ayrıldı ve süpernatanttaki enzim aktivitesi standart yöntemle göre ölçüldü. 10 kez tekrarlanan ölçümler kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplandı.

3.2.11. Boya Giderimi

HRP enziminin boya giderimindeki etkinliğini incelemek için Amarant, Kristal Viole ve Tartrazin boya ile çalışıldı. Boya giderimini belirlemek üzere absorbansları maksimum dalga boylarında UV-Vis spektrofotometresi ile ölçüldü. Yüzde boya giderimi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$\text{Boya Giderimi (\%)} = [(A_o - A_t) / A_o] \times 100 \quad (6)$$

A_o: başlangıç boya absorbansı

A_t: giderim sonrası boya absorbansı

3.2.12. Fenolik Bileşik Oksidasyonu

HRP enziminin fenolik bileşik oksidasyonundaki etkinliğini incelemek için pirogallol, katekol, gayakol, tirozin ve fenol ile çalışıldı. Fenolik bileşik oksidasyonunu belirlemek üzere 4-AAP metodu kullanıldı. Bu metoda göre 0,25 M sodyum bikarbonat çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan sodyum bikarbonat çözeltisi kullanılarak 83,4 mM potasyum ferrosiyanyür ve 20,8 mM 4-amino antipirin çözeltileri hazırlandı. Fenolik bileşik oksidasyonu tayin edilirken 2,4 mL numune üzerine 0,3 mL K₃Fe(CN)₆ ve 0,3 mL 4-AAP eklenerek absorbansı maksimum dalga boylarında UV-Vis spektrofotometresi ile ölçüldü.

3.2.13. Fitotoksisite Çalışması

Fitotoksisite çalışması için, HNF'ler ile inkübe edilmiş boya ve edilmemiş boya çözeltileri fasulye bitki tohumlarının çimlendirilmesi için kullanıldı. 1 hafta sonunda filizlenen tohumların boyutları ölçüldü. Saf suda filizlendirilen tohumların boyutları kontrol grubu olarak değerlendirildi ve bitki tohumlarının çimlenme değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$GI = GP \times (L_a / L_c) \quad (7)$$

Bu eşitlikte; GI, çimlenme indeksi; GP, kontrol grubunda çimlenen tohum sayısının yüzdesi; L_a, boya çözeltileri ile büyütülen tohumların ortalama kök uzunluğu; L_c, kontrol grubundaki tohumların ortalama kök uzunluğunu göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. HRP-Hibrit Nano Yapılarının Karakterizasyonları


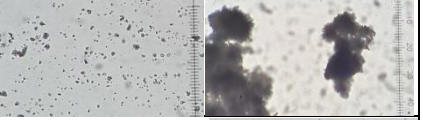
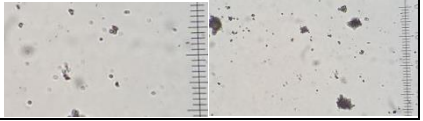
Sentezlenen HNF'ler, HRP enziminin suda çözünürlüğünü azaltan ve tekrar kullanılabilirliğini arttıran toz morfolojisi sergilemişlerdir. CuNF mavi renk toz, CaNF ve MnNF beyaz renkli toz morfolojisindedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. HNF yapılarının fotoğrafları

Işık mikroskopu ile görüntüleri çekilen CuNF-HRP, CaNF-HRP ve MnNF-HRP nanoçiçeklerinin boyutları incelendi. Mikroskopik fotoğraflardan elde edilen boyutlar Tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1. Sentezlenen HNF yapılarının ışık mikroskopu görüntüleri ve boyutları

| Sentezlenen HNF Yapıları | Mikroskopik Boyutları (μm) | Mikroskopik Görünümleri |
|--------------------------|---|---|
| CuNF-HRP | 22 \pm 3 |  |
| CaNF-HRP | 15 \pm 3 |  |
| MnNF-HRP | 15 \pm 2 |  |

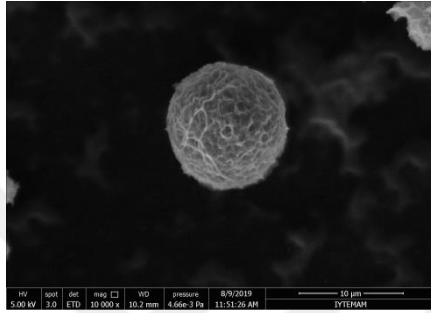
SEM görüntüleri (Şekil 4.2.-4.3.-4.4.) incelendiğinde, 72 saat inkübasyon sonunda oluşan Cu, Ca ve Mn hibrit nanoçiçek yapılarının yüzey morfolojilerinin x10,000 kat büyütmede çiçek benzeri yapısının olduğu; x 25,000 kat büyütmede ise çiçek benzeri yapısının katmanlı ve gözenekli olduğu görülmektedir. HNF yapılarının GA ile çapraz bağlandığında ise normal yapısının daha da sıklaştığı, boyutunun küçüldüğü gözlemlendi. SEM görüntüleri numunelerin büyük miktarlarda çiçek benzeri parçacıklardan oluştuğunu ortaya koymaktadır. Sentezlenen hibrit nanoçiçekler farklı metal iyon derişimleri (çözelti ortamındaki son derişimler 15 mM-30mM-50mM) ile çöktürüldü, yüzey yapıları ve boyutları hakkında bilgi sahibi olundu.

Hibrit nanoçiçek yapılarının SEM görüntülerine bakılarak boyutları hakkında bilgi sahibi olundu (Tablo 4.2). GA ile çapraz bağlanan HNF yapılarının boyutları, çapraz bağlama yapılmamış HNF yapılarına göre daha küçük ve sıkı bir morfoloji sergilediği görüldü.

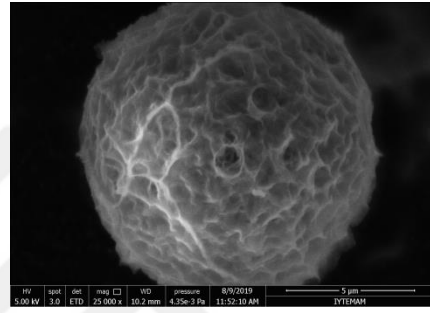
Tablo 4.2. HNF yapılarının SEM analizine göre boyutları

| HNF Yapıları | CuNF-HRP | CuNF-HRP-GA | CaNF-HRP | CaNF-HRP-GA | MnNF-HRP | MnNF-HRP-GA |
|-----------------------------|------------|--------------|--------------|-------------|------------|--------------|
| Boyutları (μm) | 22 \pm 3 | 17 \pm 2,5 | 17 \pm 2,5 | 12 \pm 2 | 17 \pm 3 | 12 \pm 2,5 |

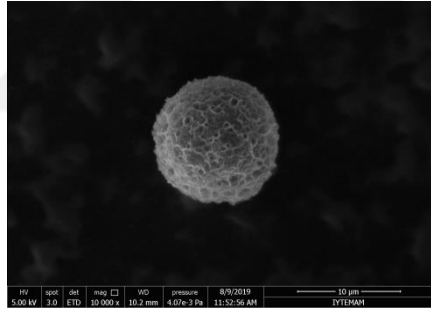
CuNF-HRP nanoçiçekleri, 60-120 ve 200 mM hazırlanan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltileri ile hazırlandı. CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA yapılarının küresel yapıda olduğu görüldü. Cu hibrit nanoçiçek yapıları, özel üç boyutlu sterik mimarisi nedeniyle daha geniş bir yüzey alanına sahiptir; bu, HRP ve substrat arasında daha büyük temas alanı ve daha az kütle transfer sınırlaması olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca, HRP'nin mekanik stabilitesini ve geri dönüştürülebilirliğini arttırabilen $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ kristallerinin immobilizasyonu nedeniyle HRP'nin aktivitesinin ve yapısının bozulması zordur.



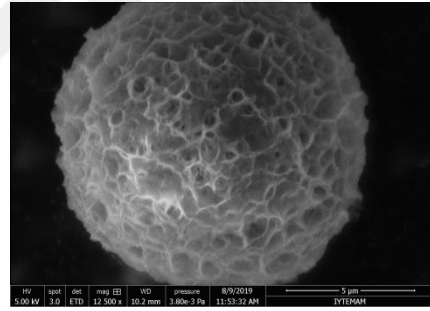
(a1)



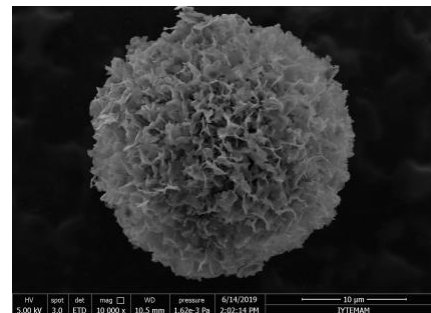
(a2)



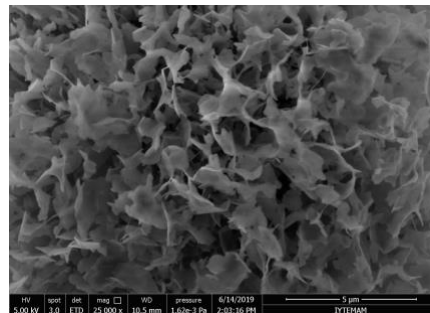
(a3)



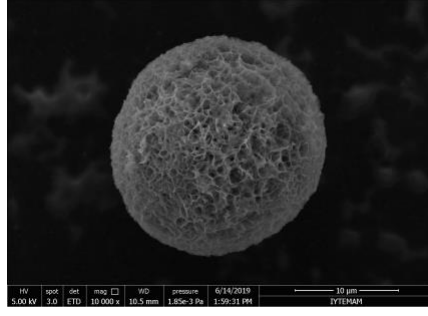
(a4)



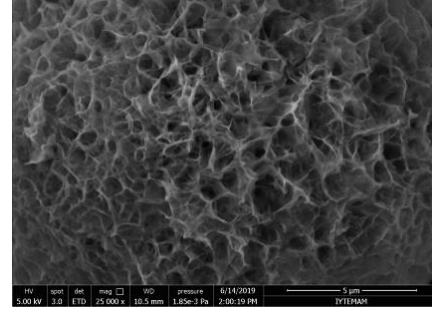
(b1)



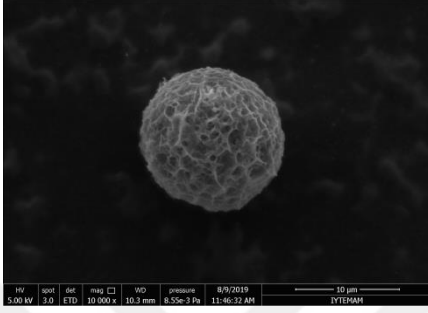
(b2)



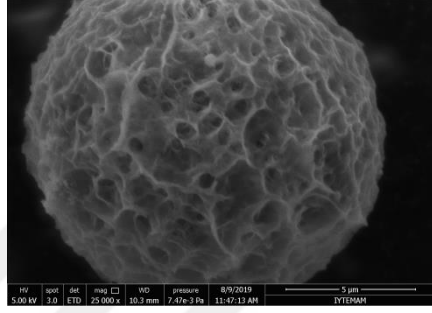
(b3)



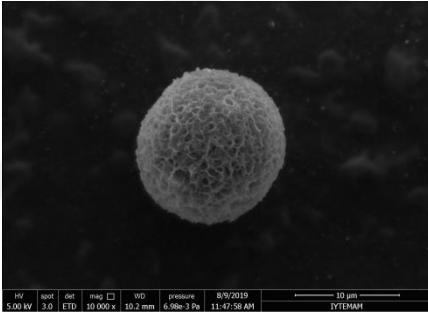
(b4)



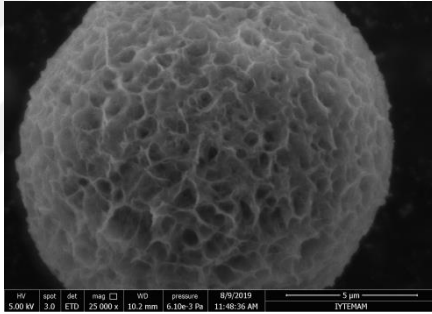
(c1)



(c2)



(c3)



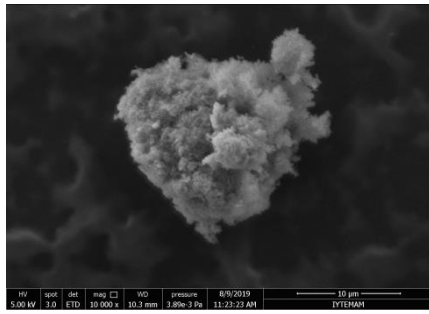
(c4)

Şekil 4.2. CuNF –HRP ve CuNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının SEM görüntüleri ((a1-a2) 15 mM-CuNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (a3-a4) 15 mM- CuNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b1-b2) 30 mM-CuNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b3-b4) 30 mM- CuNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c1-c2) 50 mM-CuNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c3-c4) 50 mM-CuNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme)

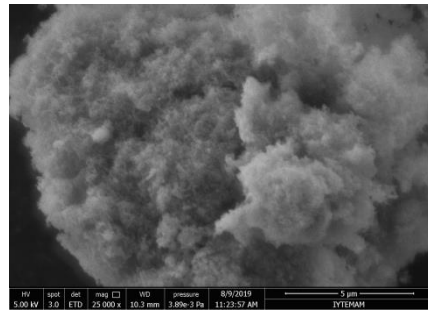
Farklı metal iyon derişimlerinde (15 mM-30 mM- 50 mM) sentezlenen CuNF yapılarının yüzey özellikleri incelendiğinde; 30 mM bakır iyon derişimi ile çöktürme işlemi yapılan nanoçiçeğin daha gözenekli, çiçek benzeri yapraklarının daha belirgin ve boyutlarının daha büyük olduğu tespit edildi.

Li ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada grafen oksit ve enzim kullanarak hibrit nanoçiçek yapıları sentezleyerek morfolojilerinin çiçek yapraklarına benzediğini belirtmişlerdir [50]. Shi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada bakır nanoçiçek yapılarını sentezlediklerinde nanoçiçek yapılarının yüzeyinin, yüzey üzerinde homojen bir şekilde dağılmış bir yaprak birikintisine benzediğini bulmuşlardır. Bu aşama sırasında, nanoçiçeklerin oluşum mekanizmasını şu şekilde tarif etmişlerdir; enzim, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ kristallerinin çekirdeklenmesini indükleyerek, yapraklar için iskeleti oluşturmuş ve yaprakları birbirine bağlamak için bir "tutkal" olarak görev yaptığını rapor etmişlerdir [51]. Zhang ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada katalaz enzimi ile bakır hibrit nanoçiçek yapılarını sentezlediklerinde bakır hibrit nanoçiçek yapılarının boyutlarının 10 μm ile 20 μm arasında olduğunu tespit etmişlerdir [52]. S. Batule ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada BSA-Cu nanoçiçek yapılarını sentezlediklerinde ortalama büyüklüğü yaklaşık 10 μm olan hiyerarşik olarak yapılandırılmış çiçek benzeri mikropartiküller, BSA'nın mevcudiyetinde oluştuklarını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada BSA'sı olmadan oluşturulan kontrol numunesinin herhangi bir çiçek benzeri yapı oluşturmadığını ve sonuçta ortaya çıkan nanomalzemelerin çiçek benzeri yapısının oluşması için protein bileşeninin gerekli olduğunu rapor etmişlerdir [53].

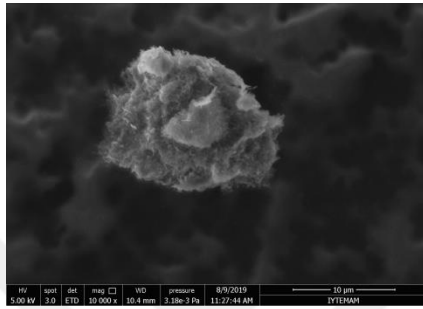
Ca hibrit nanoçiçek yapılarının yüzey morfolojisi incelendiğinde, Cu hibrit nanoçiçek yapılarına göre gözeneklerinin daha sıkı ve bitişik olduğu görülmektedir. Protein molekülleri, ağırlıklı olarak protein omurgasındaki amid gruplarının koordinasyonu aracılığıyla Ca^{2+} ile kompleksler oluşturmaktadır. Bu kompleksler, birincil kristallerin çekirdeklenmesi için bir konum sağlar ve daha sonra birincil yaprakları oluşturmak üzere büyük topaklarla birleşir, ardından çiçek benzeri bir yapı meydana gelmektedir.



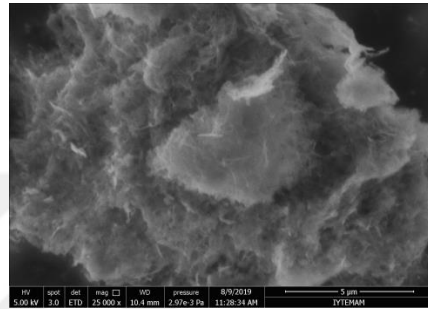
(a1)



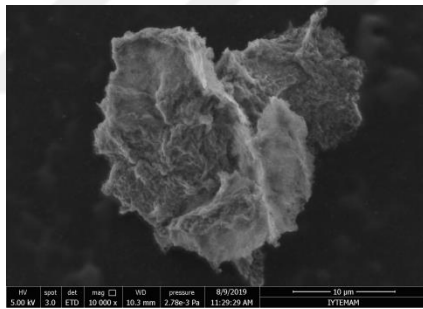
(a2)



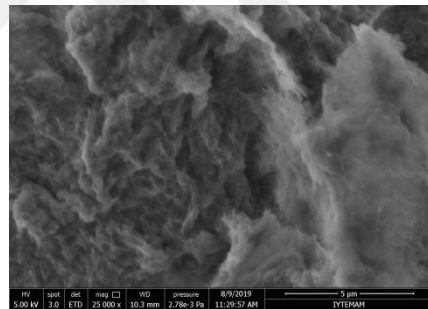
(a3)



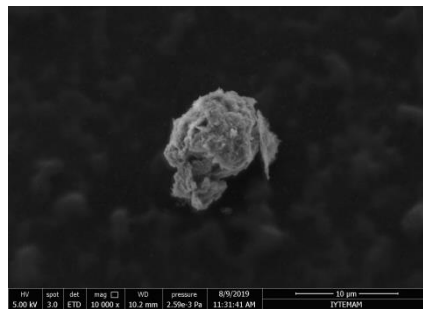
(a4)



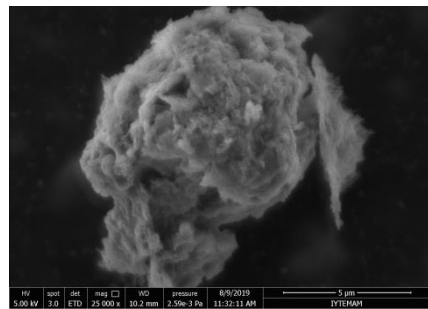
(b1)



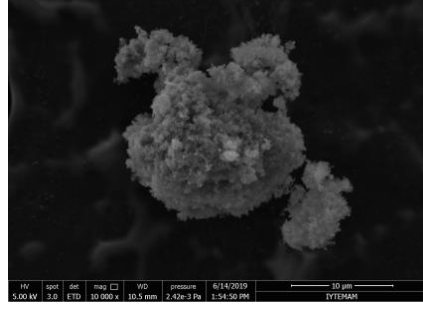
(b2)



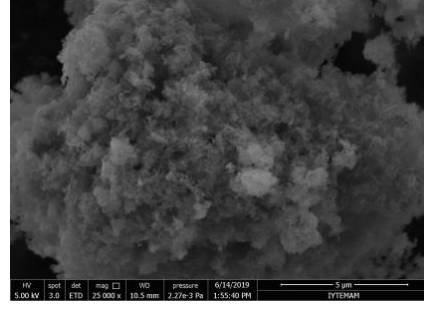
(b3)



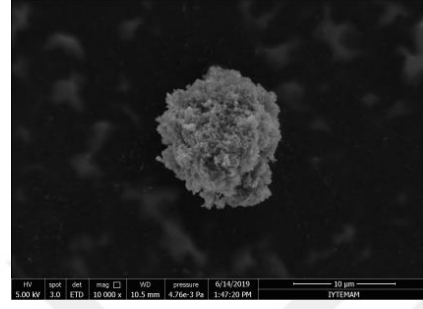
(b4)



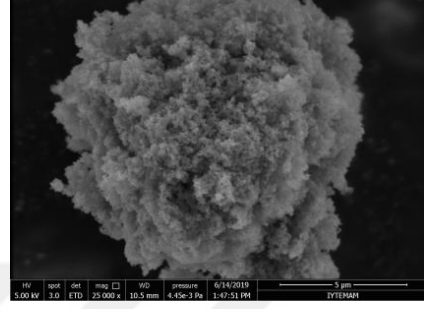
(c1)



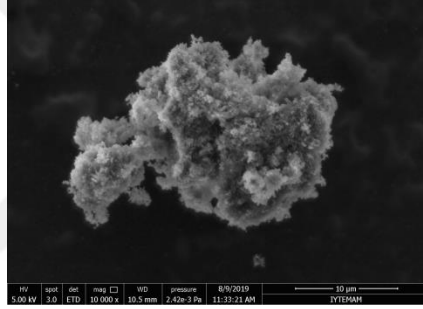
(c2)



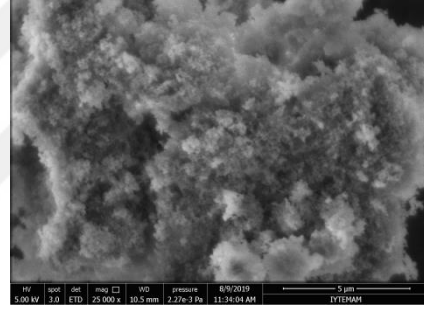
(c3)



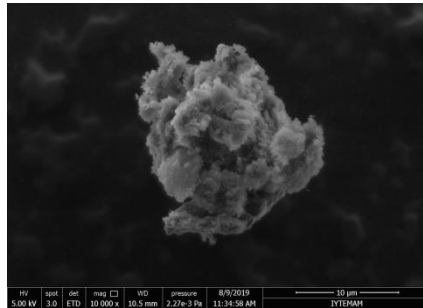
(c4)



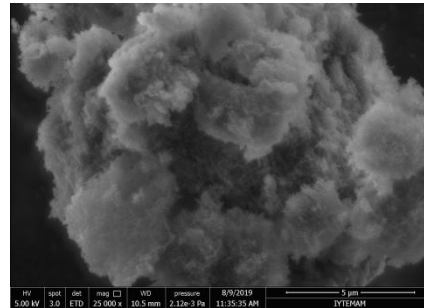
(d1)



(d2)



(d3)



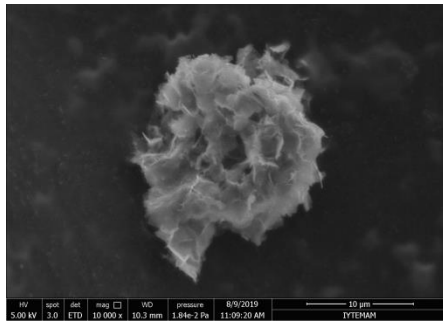
(d4)

Şekil 4.3. CaNF –HRP ve CaNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının SEM görüntüleri ((a1-a2) 15 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (a3-a4) 15 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b1-b2) 30 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b3-b4) 30 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c1-c2) 50 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c3-c4) 50 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (d1-d2) 60 mM-CaNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (d3-d4) 60 mM- CaNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme)

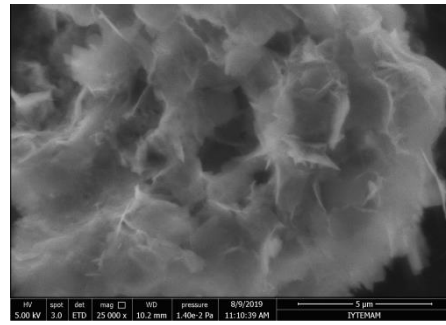
Farklı metal iyon derişimlerinde (15 mM-30 mM- 50 mM-60 mM) sentezlenen CaNF yapılarının yüzey özellikleri incelendiğinde; 50 mM kalsiyum iyon derişimi ile çöktürme işlemi yapılan nanoçiçeğin daha gözenekli, çiçek benzeri yapraklarının daha belirgin ve boyutlarının daha büyük olduğu, 15 mM ve 30 mM kalsiyum iyon derişiminde sentezlenen yapılarının çiçek benzeri şekillerinin belirgin olmadığı, 60 mM derişime çıkıldığında ise çiçek benzeri yapının bozulduğu belirlendi.

Yin ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada kalsiyum nanoçiçekleri sentezlemiş ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Elde ettikleri nanoçiçek yapılarının, gözenekli, çiçek benzeri yapılara sahip beyaz bir çökelti şeklinde tanımlamışlardır. Tek bir nanoçiçeğin ortalama çapının 20 µm olduğunu belirtmişlerdir [54]. Ma ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada titanyum yüzeyine kalsiyum nanoçiçek yapılarını kaplamışlardır. Sentezledikleri Ca hibrit nanoçiçek yapılarının boyutlarının 5 µm olduğunu ve 100 nm'de gözlenebilen nano tabakalardan oluştuklarını bildirmişlerdir. Bu hibrid kalsiyum-fosfat nanoçiçeklerinin merkezi, daha yüksek bir yüzey / hacim oranı verebilecek kadar gözeneklidir. Bu özellikler kalsiyum fosfat nanoçiçeklerinin, osteoblastların göçü ve çoğalması için uygun bir ortam yaratan ve ileriki çalışmalarda biyoaktif faktörler için bir dizi potansiyel bağlanma bölgesi sağlayan umut verici spesifik bir yüzey alanı sağlayacağını söylemişlerdir [55].

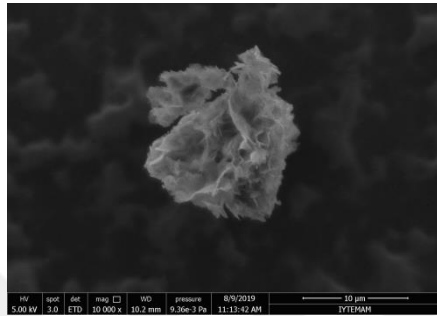
Tek bir Mn hibrit nanoçiçeğin SEM görüntüleri incelendiğinde, yaprakların açık bir hiyerarşik düzende olduğu görülmektedir.



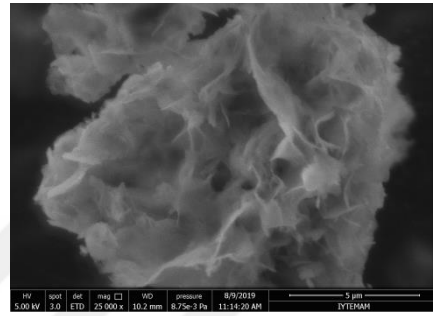
(a1)



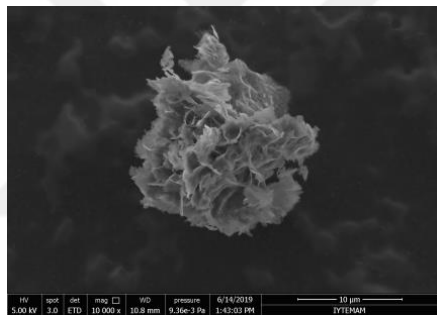
(a2)



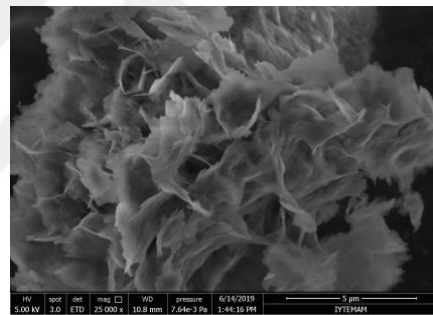
(a3)



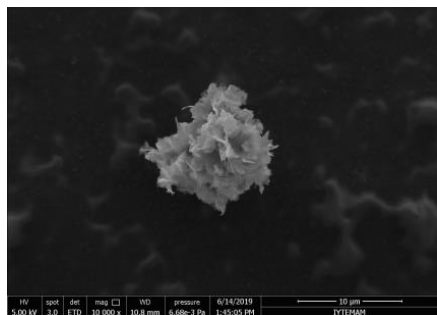
(a4)



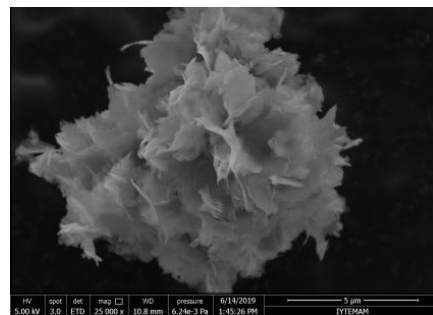
(b1)



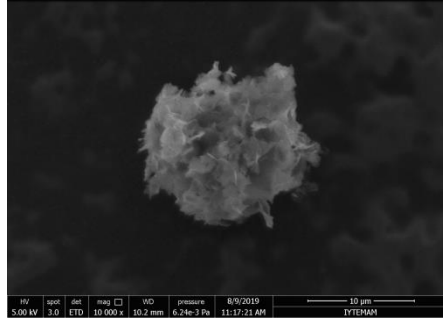
(b2)



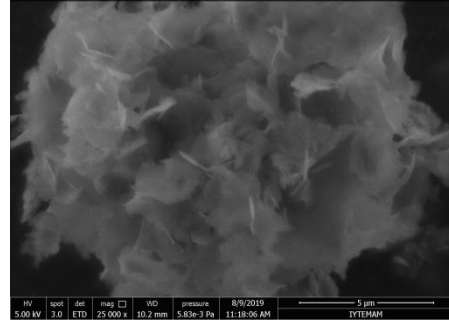
(b3)



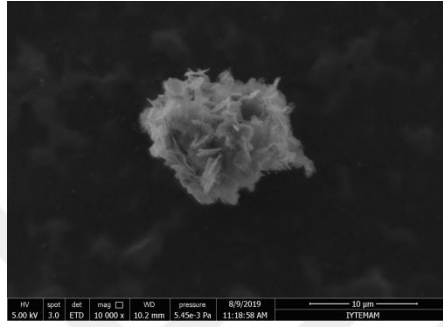
(b4)



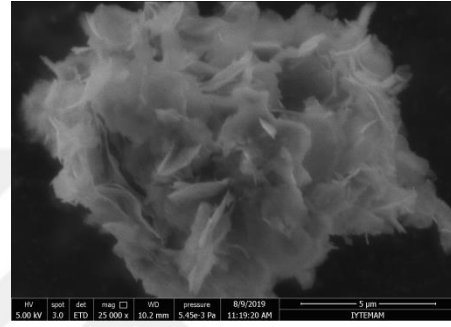
(c1)



(c2)



(c3)



(c4)

Şekil 4.4. MnNF –HRP ve MnNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının SEM görüntüleri ((a1-a2) 15 mM-MnNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (a3-a4) 15 mM- MnNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b1-b2) 30 mM-MnNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (b3-b4) 30 mM- MnNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c1-c2) 50 mM-MnNF x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme, (c3-c4) 50 mM-MnNF-GA x 10,000 ve x 25,000 kat büyütme)

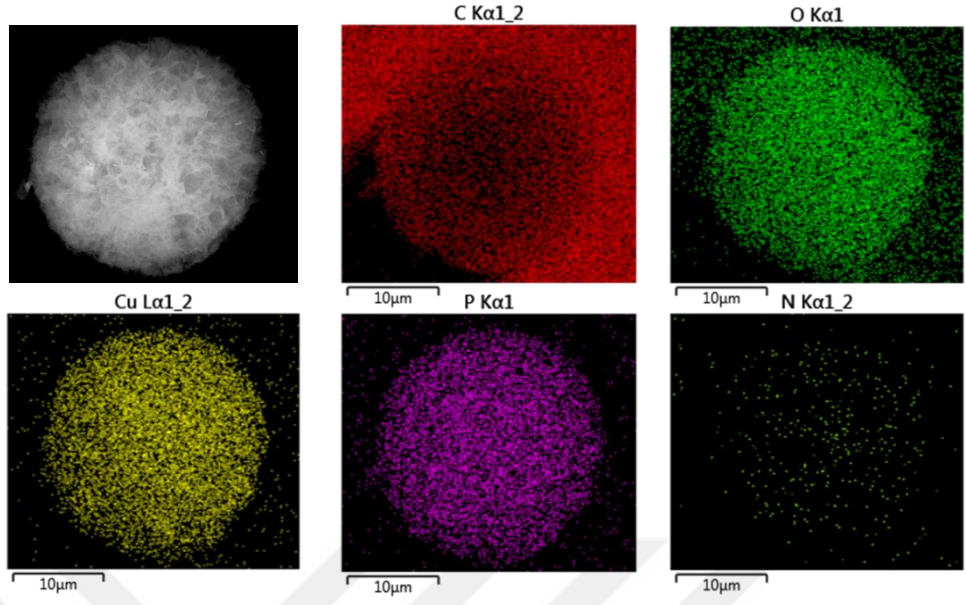
Farklı metal iyon derişimlerinde (15 mM-30 mM- 50 mM) sentezlenen MnNF yapılarının yüzey özellikleri incelendiğinde; 30 mM mangan iyon derişimi ile çöktürme işlemi yapılan nanoçiçeğin daha gözenekli, çiçek benzeri yapraklarının daha belirgin ve boyutlarının daha büyük olduğu tespit edildi.

Zhang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada $Mn_3(PO_4)_2$ nanoçiçek yapılarını sentezlemiş ve biyosensör çalışmalarında kullanmışlardır. SEM görüntüleri incelendiğinde nanoçiçek yapılarının çaplarının ortalama 20 μm olduğunu bildirmişlerdir. Nanoçiçek yapısı ile ilgili, proteinler ve Mn^{2+} arasındaki koordinasyon reaksiyonlarından oluşan agregatlar oluştuğunu ve bu agregatların

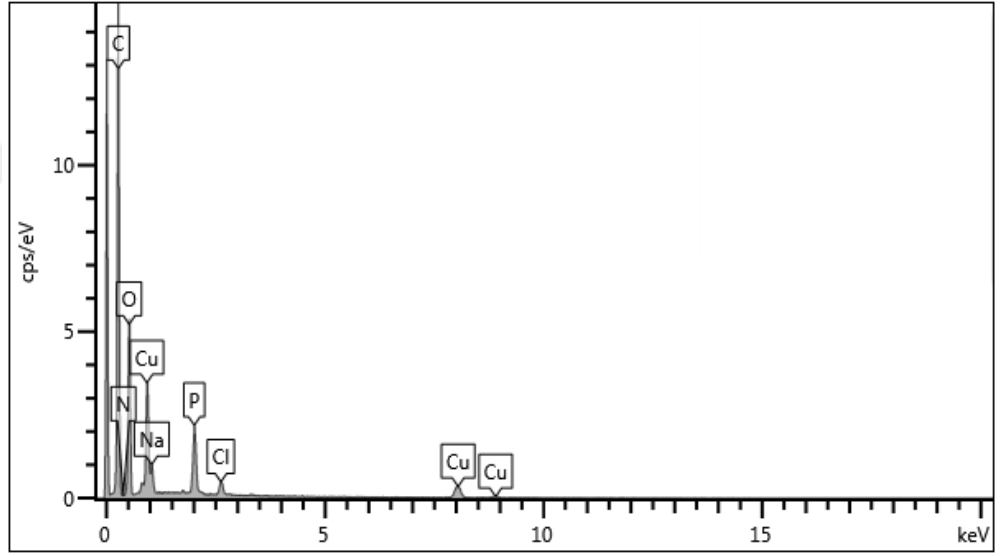
$Mn_3(PO_4)_2$ nanokristallerin çekirdeklenmesi için yarar sağladığını tespit etmişlerdir [56]. Munyemana ve ark. (2018) Mn hibrit nanoçiçeklerinin kollajen kaynaklı biomineralizasyon ile sentezi adlı çalışmalarında $Mn_3(PO_4)_2$ nanoçiçeklerinin zamana bağlı gelişim sürecini incelediklerinde küçük yaprakları olan nano partiküllerin 1 saat sonra ortaya çıkmaya başladığını ve yapraklarının 6 saat sonra daha iyi organize edildiğini belirtmişlerdir. İnkübasyon süresi 24 saate uzatıldığında, hibrit malzemeler çok katmanlı yaprakları olan iyi tanımlanmış çiçek şekilli nano yapılar oluşturmuştur. Bu sonuçların hibrit malzemelerin çok katmanlı nanoçiçekleri oluşturması için zamana bağlı aşamalı bir büyüme süreci olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir [57]. Soni ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada sonikasyon yöntemini kullanarak lipaz mangan nanoçiçek yapılarını sentezleyerek lipaz mangan nanoçiçek yapılarının oluştuğunu ve çiçek benzeri morfolojilerinin olduğunu rapor etmişlerdir [58]. Rai ve ark. (2018) mangan fosfat ve L-arabinoz izomerazdan sentezledikleri nanoçiçeklerin boyutlarının $6 \pm 2 \mu m$ olduğunu ve çiçek benzeri bir yapı sergilediğini saptamışlardır [59].

Literatür verileri ile sonuçlar kıyaslandığında; elde edilen HNF yapılarının boyutlarının veriler ile uyumlu olduğu tespit edildi. Hibrit nanoçiçeklerin boyut farklılığının enzimin ve metal iyon çözeltisinin yoğunlukları ile çöktürme tamponunun pH aralığına ve inkübasyon süresine bağlı olduğu düşünülmektedir.

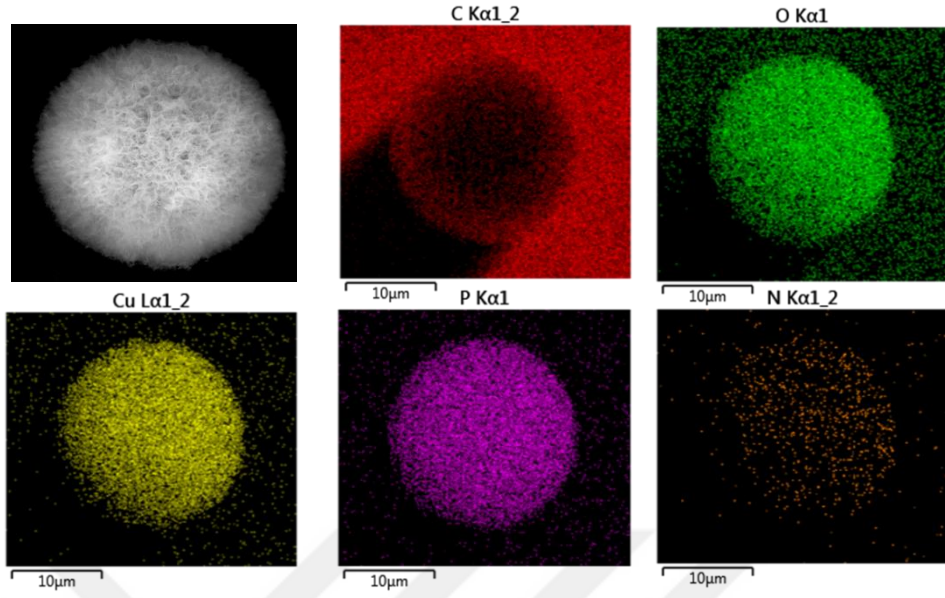
Sentezlenen HNF yapıları için EDX analizleri yapıldı (Şekil 4.5 - 4.22). Enzimsiz HNF yapılarının C ve N element oranları, enzimli HNF yapıları ile kıyaslandığında, enzimli nanoçiçek yapılarında C ve N element oranlarının arttığı görülmektedir. Bu sonuç enzimin nanoçiçek yapılarına immobilize olduğunu doğrulamaktadır.



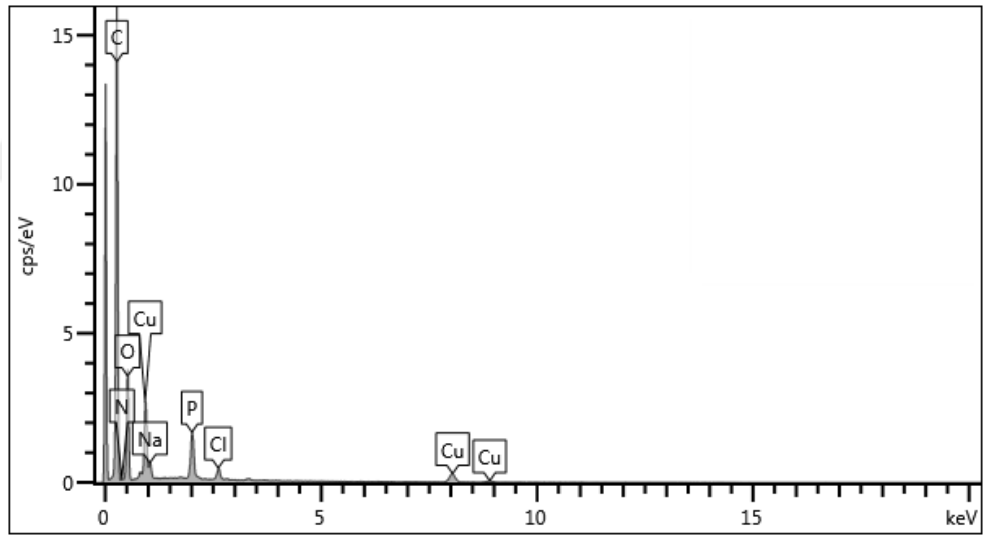
Şekil 4.5. CuNF nanoçizek yapısının element haritası



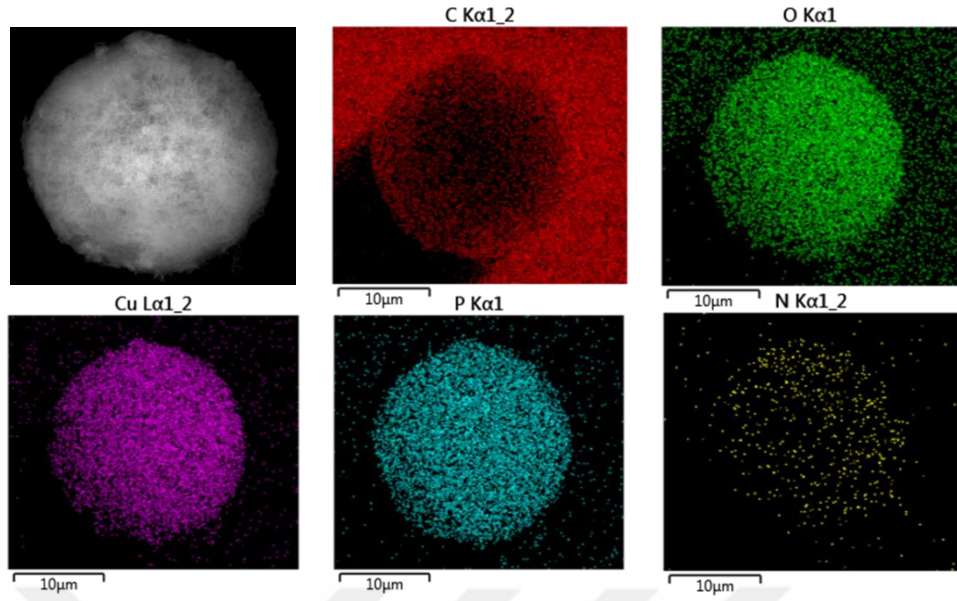
Şekil 4.6. CuNF nanoçizek yapısının EDX spektrumu



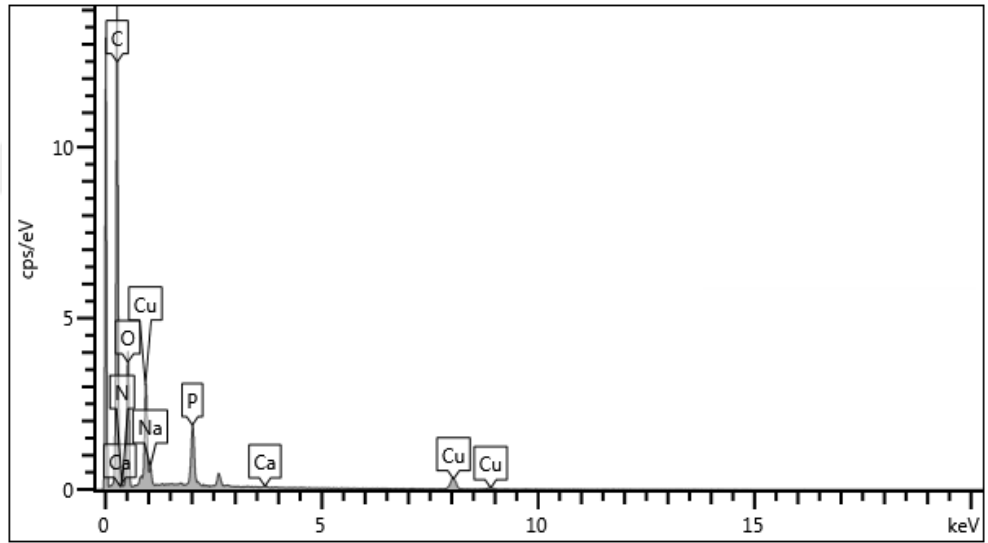
Şekil 4.7. CuNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının element haritası



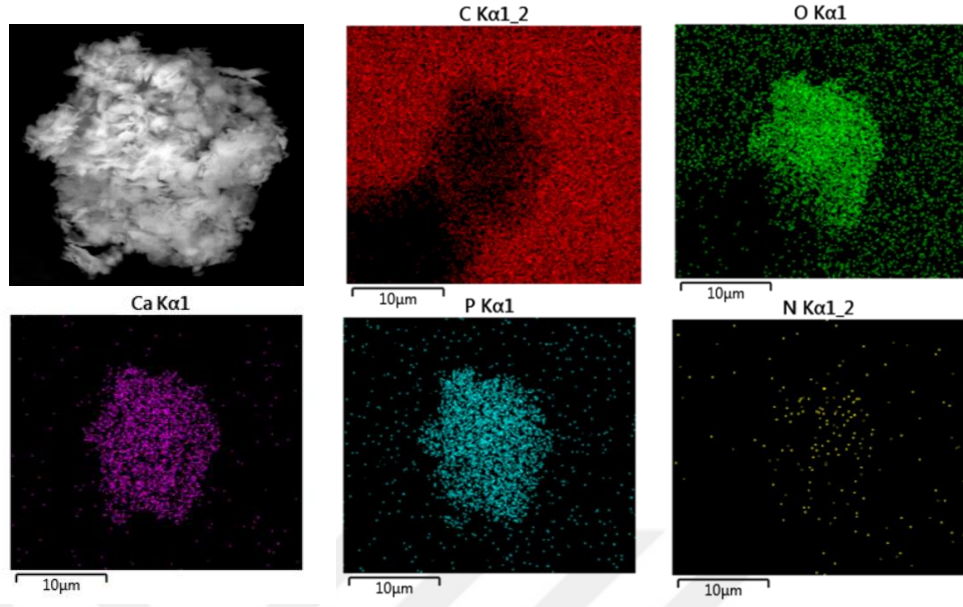
Şekil 4.8. CuNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu



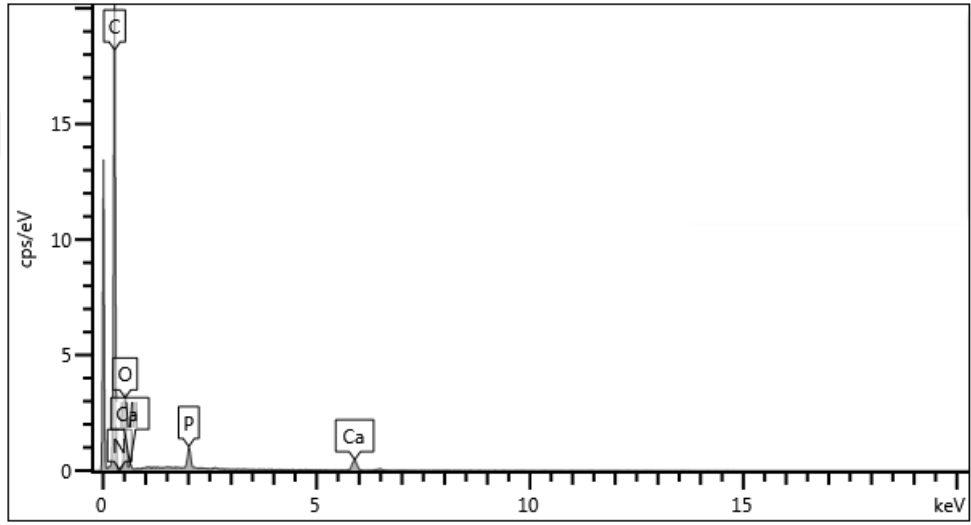
Şekil 4.9. CuNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının element haritası



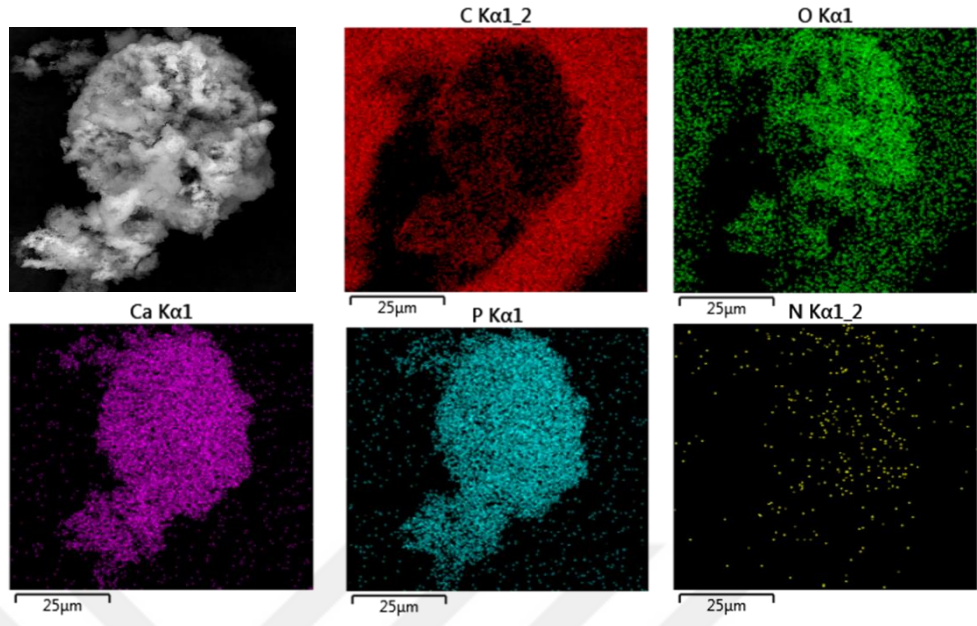
Şekil 4.10. CuNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu



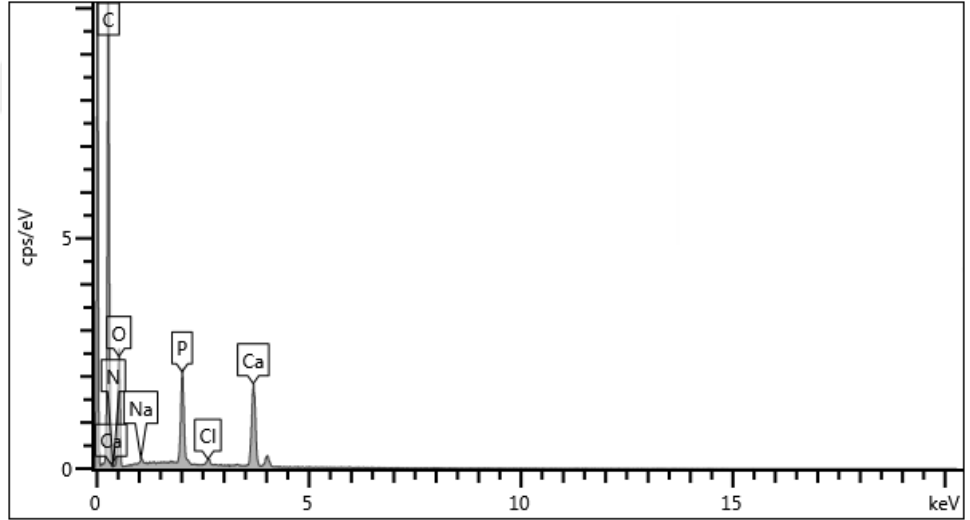
Şekil 4.11. CaNF nanoçiçek yapısının element haritası



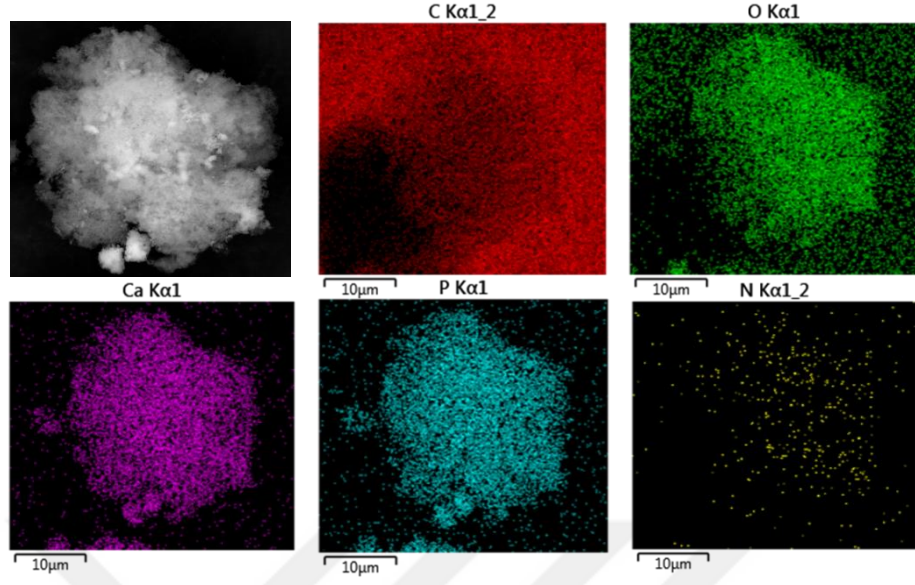
Şekil 4.12. CaNF nanoçiçek yapısının EDX spektrumu



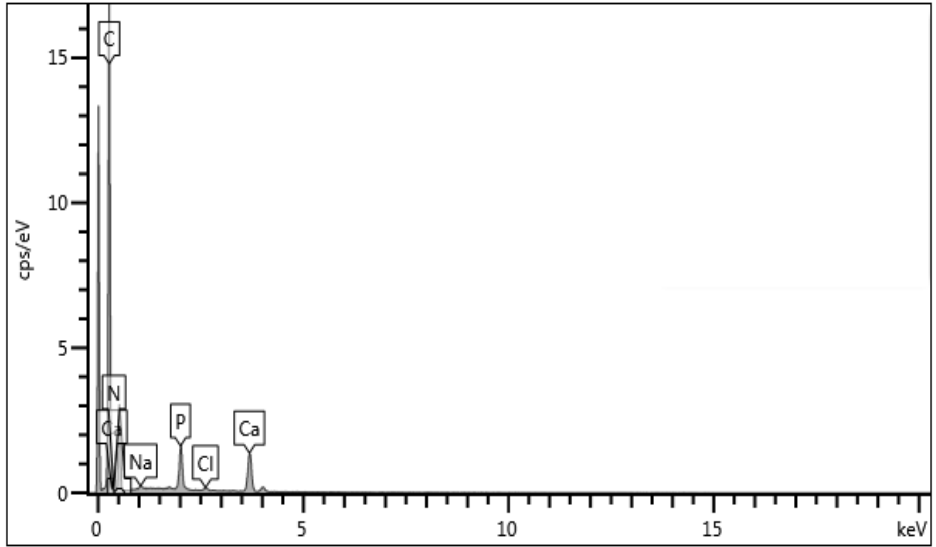
Şekil 4.13. CaNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının element haritası



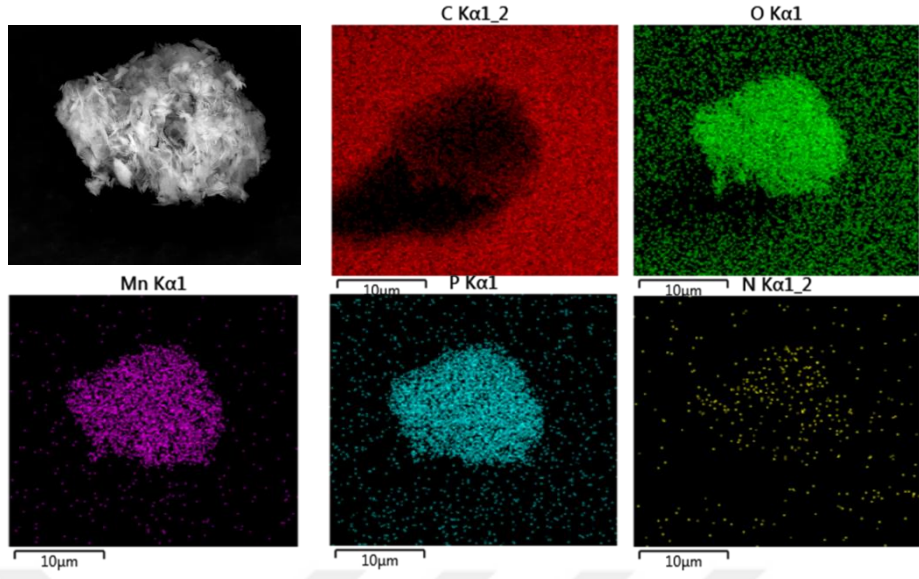
Şekil 4.14. CaNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu



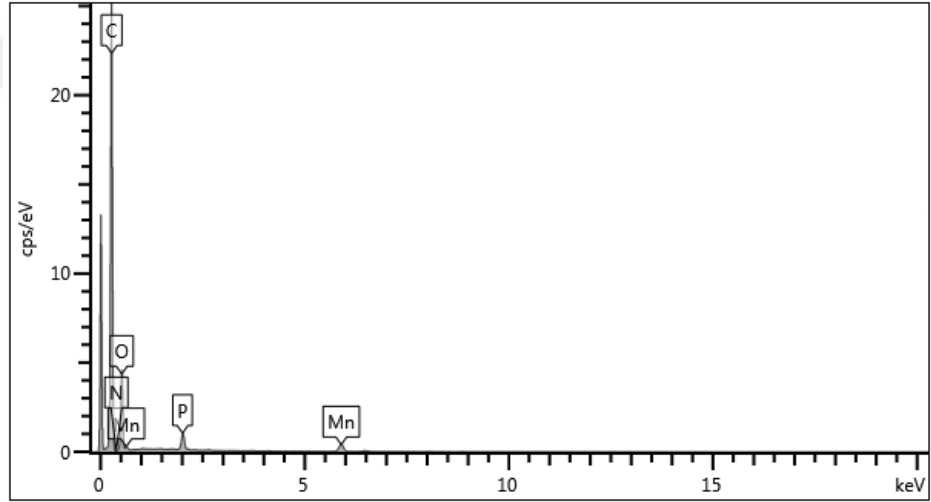
Şekil 4.15. CaNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının element haritası



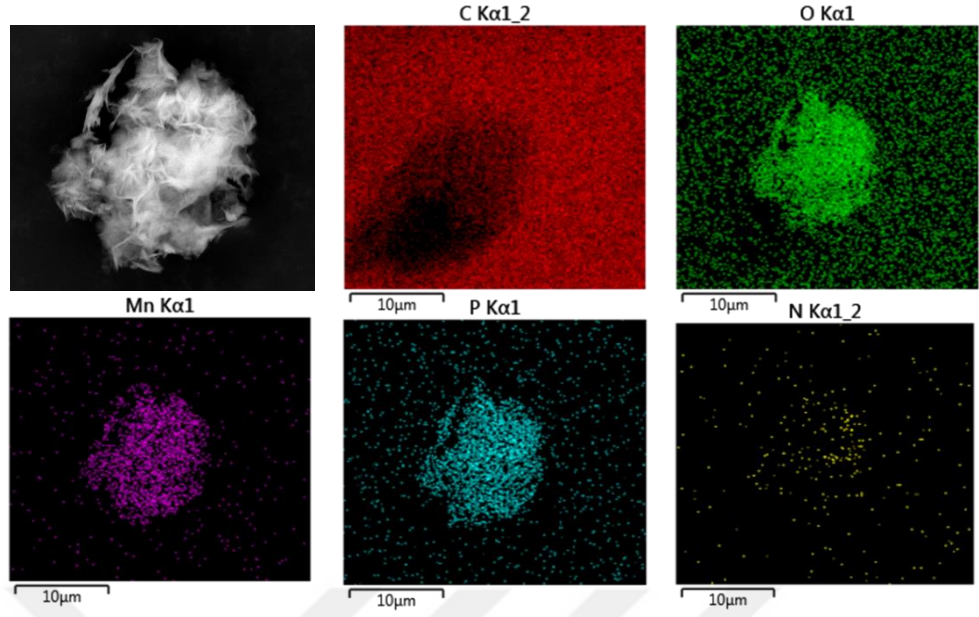
Şekil 4.16. CaNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu



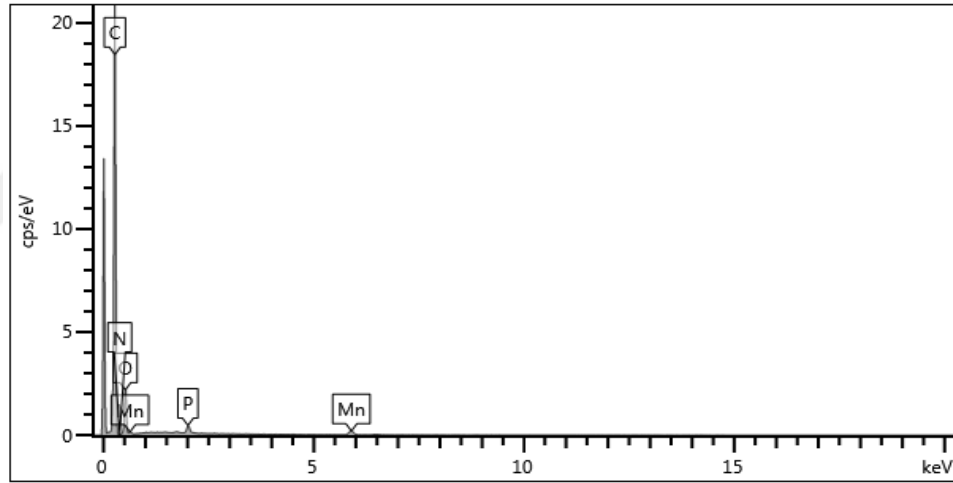
Şekil 4.17. MnNF nanoçipek yapısının element haritası



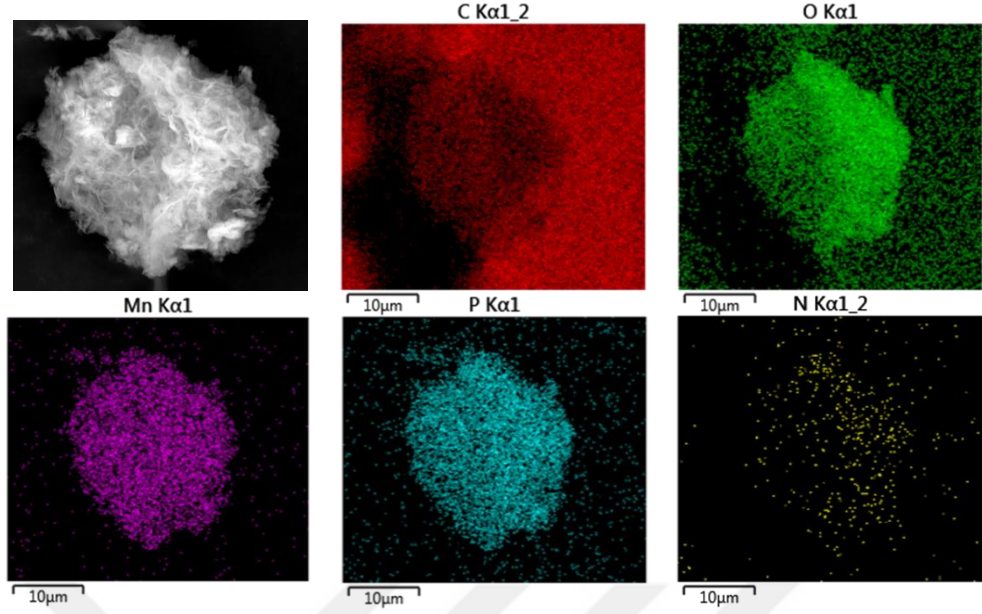
Şekil 4.18. MnNF nanoçipek yapısının EDX spektrumu



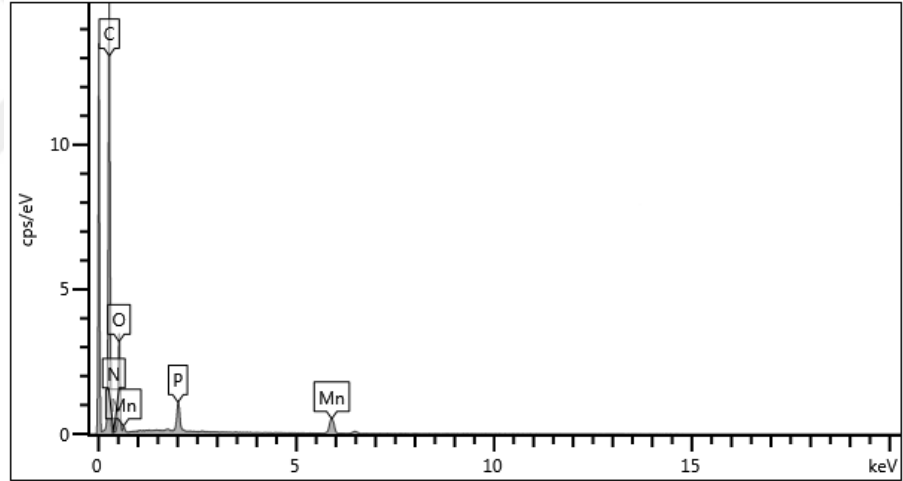
Şekil 4.19. MnNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının element haritası



Şekil 4.20. MnNF-HRP hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu



Şekil 4.21. MnNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının element haritası



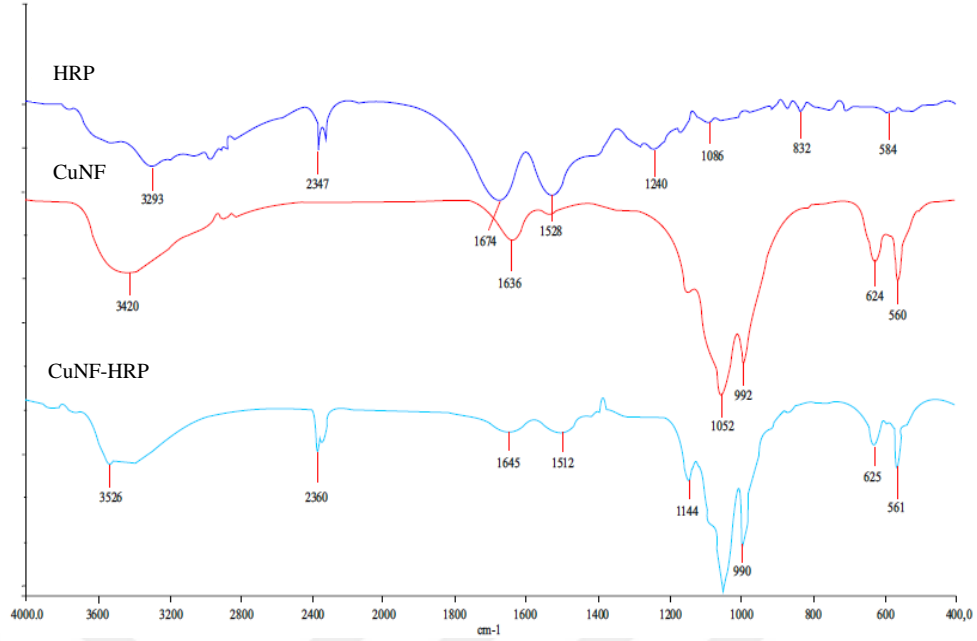
Şekil 4.22. MnNF-HRP-GA hibrit nanoçiçek yapısının EDX spektrumu

Zhang ve arkadaşları (2016) lipaz- $Zn_3(PO_4)_2$ yapıları ile yaptıkları çalışmada, enzimsiz nanoçiçek yapılarının az miktarda N ve C elementi içerdiğini, H elementinin ise sudan kaynaklı olduğunu söylemişlerdir. Enzimli nanoçiçek yapısını incelediklerinde C elementinin %6,94, N elementinin %1,011 ve H elementinin %2,498 olduğunu belirtmişlerdir [60]. Jin ve ark. (2019) organofosforlu pestisitlerin tespiti için sentezledikleri enzim hibrit nanoçiçekler için EDX analizi yapmışlardır. HNF'lerin EDX modellerinde farklı renkleri, temel bileşimi (C, P ve Cu elemanları) ve ürünün dağılımını ifade etmiş ve nanoçiçeklerin içindeki enzimlerin ve $Cu_3(PO_4)_2$

bileşenlerinin varlığını ortaya koymuşlardır [61]. Zhu ve ark. (2019) lakkaz enzimi ile sentezledikleri bakır hibrit nanoçiçek yapılarının EDX analizleri sonucunda lakkaz enziminin, hibrit nanoçiçek yapısındaki varlığını doğrulamışlardır [62]. Munyemana ve ark. (2018) mangan hibrit nanoçiçek yapılarını sentezleyerek (EDX) analizi ile hibrit nano malzemelerde C, N, O, P ve Mn öğelerinin varlığını doğrulamışlardır. Ayrıca tüm sonuçlar incelendiğinde, $CL-Mn_3(PO_4)_2$ hibrit parçacıklarının iyi tanımlanmış çiçek benzeri supramoleküler yapılar oluşturduğunu rapor etmişlerdir [57].

Yapılan EDX haritalaması sonucunda P, O, N, Cu, Ca ve Mn elementlerinin HNF yapılarının içerisinde homojen olarak dağıldığı ve immobilize edilmemiş nanoçiçek yapılarının N elementi miktarının az olduğu belirlendi. N elementi miktarındaki artış, enzimin protein yapısında bulunan amino grupları nedeniyle olduğu tespit edildi.

HRP enziminin Cu nanoçiçeğindeki varlığını doğrulamak için $400-4000\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde FTIR spektrumları ile karakterize edildi (Şekil 4.23). 1049 ve 990 cm^{-1} 'deki pikler P-O titreşimlerine, 561 ve 625 cm^{-1} 'deki bantlar fosfat gruplarının varlığını gösteren O=P-O bağlarının bükülme titreşimlerine yorumlandı. 1645 ve 1512 cm^{-1} 'deki germe titreşimi, N-H gruplarının göstergesidir. Bu pik immobilize edilmemiş HNF yapısında bulunmamaktadır. HNF spektrumu, serbest form gösteren HRP'nin immobilize edildiğini gösteren tepe kayması (1528 ve 1674 cm^{-1}) ile benzer türde adsorpsiyon tepeleri gösterdi. Bu da HRP enziminin CuNF yapısındaki varlığını doğrulamaktadır.

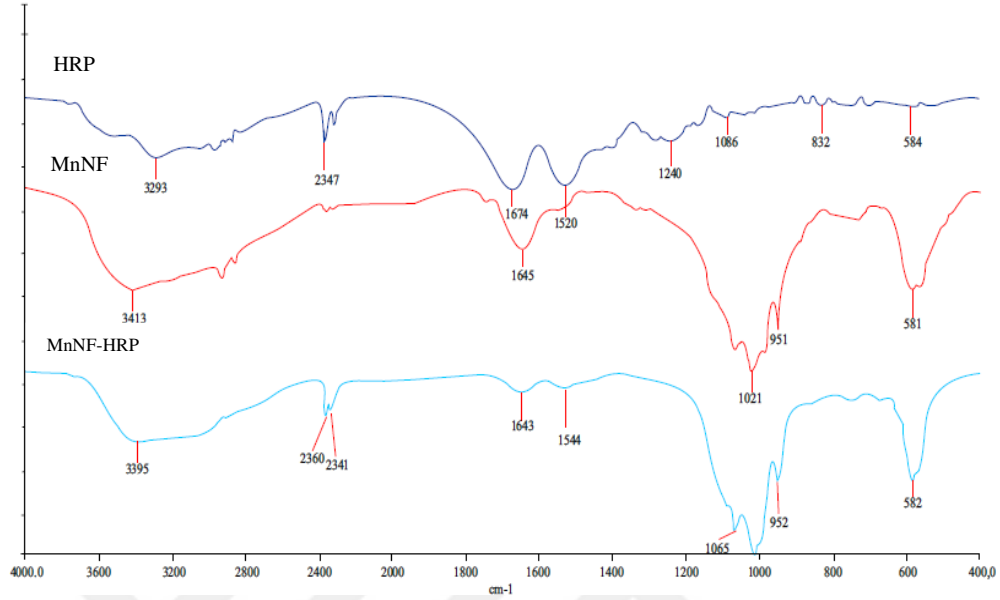


Şekil 4.23. HRP, CuNF, CuNF-HRP immobilize enzimlerinin karşılaştırmalı FTIR pikleri

Zhu ve arkadaşları (2019) yaptıkları bakır hibrit nanoçiçek yapılarında benzer pikler (950-110 cm^{-1} P-O, 530-670 cm^{-1} O=P-O, 1600-1630 cm^{-1} lakkaz enzimi) elde etmişlerdir [63]. Zhang ve ark. (2018) glukoz oksidaz ve lipaz enzimi ile beraber sentezledikleri bakır hibrit nanoçiçek yapılarında FTIR taraması yapmışlardır ve sonuç olarak PO_4^{3-} titreşim bantları 1047 cm^{-1} , 989 cm^{-1} , 628 cm^{-1} ve 559 cm^{-1} 'de görüldüğünü, lipaz veya glukoz oksidaz enziminin amid I ve II bantlarının sırasıyla 1646 cm^{-1} ve 1533 cm^{-1} 'de belirlediğini söylemişlerdir. Glukoz oksidaz / lipaz nanoçiçek spektrumlarının enzimlerin varlığının başarıyla nanoçiçeğe dahil edildiğini belirtmişlerdir [64].

HRP enziminin Mn nanoçiçeğindeki varlığını doğrulamak için 400-4000 cm^{-1} bölgesinde FTIR spektrumları ile karakterize edildi (Şekil 4.24). 3395 cm^{-1} 'deki geniş bant O-H gerilme titreşimi olarak yorumlanmaktadır. 2926 cm^{-1} değerindeki tepe piki $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ 'deki PO-H germe bandına aittir. Simetrik P-O germe bandı 1065 cm^{-1} ve 952 cm^{-1} 'de görülmektedir. Asimetrik bozulma titreşimleri (OP-O) 582 cm^{-1} 'de gözlemlendi. 1648 cm^{-1} ve 1544 cm^{-1} 'deki pikler sekonder yapıdaki protein yapılarına özgüdür ve amid I ve amid II olarak adlandırılmaktadır. HNF spektrumu, serbest form gösteren HRP'nin immobilize

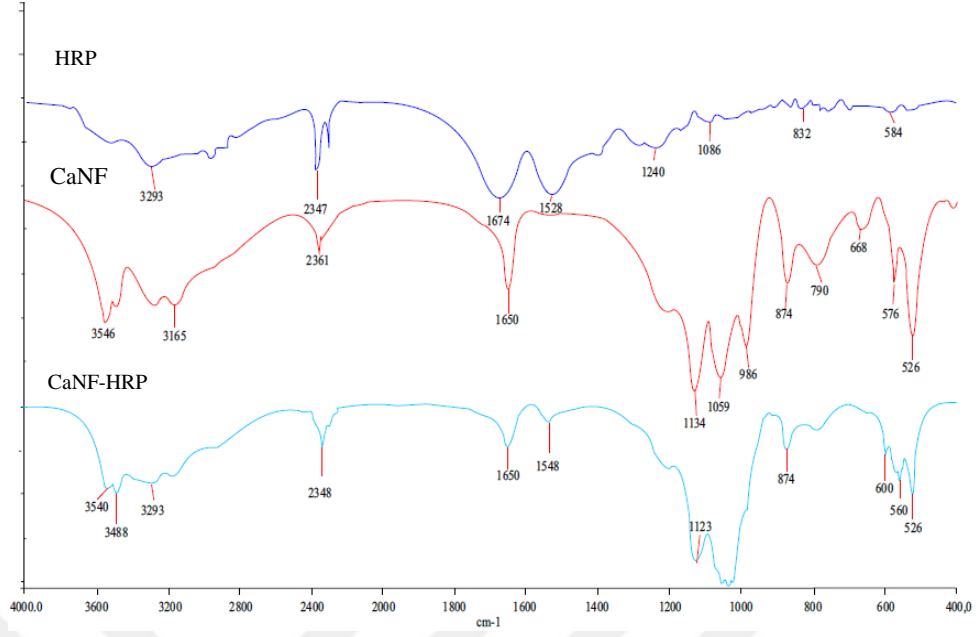
edildiğini gösteren tepe kayması (1528 ve 1674 cm^{-1}) ile benzer türde adsorpsiyon tepeleri gösterdi. Bu da HRP enziminin MnNF yapısındaki varlığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.24. HRP, MnNF, MnNF-HRP immobilize enzimlerinin karşılaştırmalı FTIR pikleri

Rai ve ark. (2018) mangan fosfat ve L-arabinoz izomerazdan sentezledikleri nanoçiçeklerin FTIR spektrumunu şu şekilde yorumlamışlardır; Asimetrik gerilme titreşimi ($\text{PO} - \text{H}$), $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ için 1065 , 1006 ve 952 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır. $-\text{CONH}$ grubu için amid I (1700 cm^{-1} ve 600 cm^{-1}) ve amid II (1600 cm^{-1} ve 500 cm^{-1}) proteinin sekonder yapı spektrum bandı, serbest L-AI için 1646 ve 1539 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır. MnNF@ L-AI'deki amid I ve amid II için serbest L-AI ile karşılaştırıldığında önemsiz pik kayması, kovalent konjugasyon yerine hibrit nanoçiçeklerde kendiliğinden montaj yoluyla immobilizasyonu göstermiştir [59].

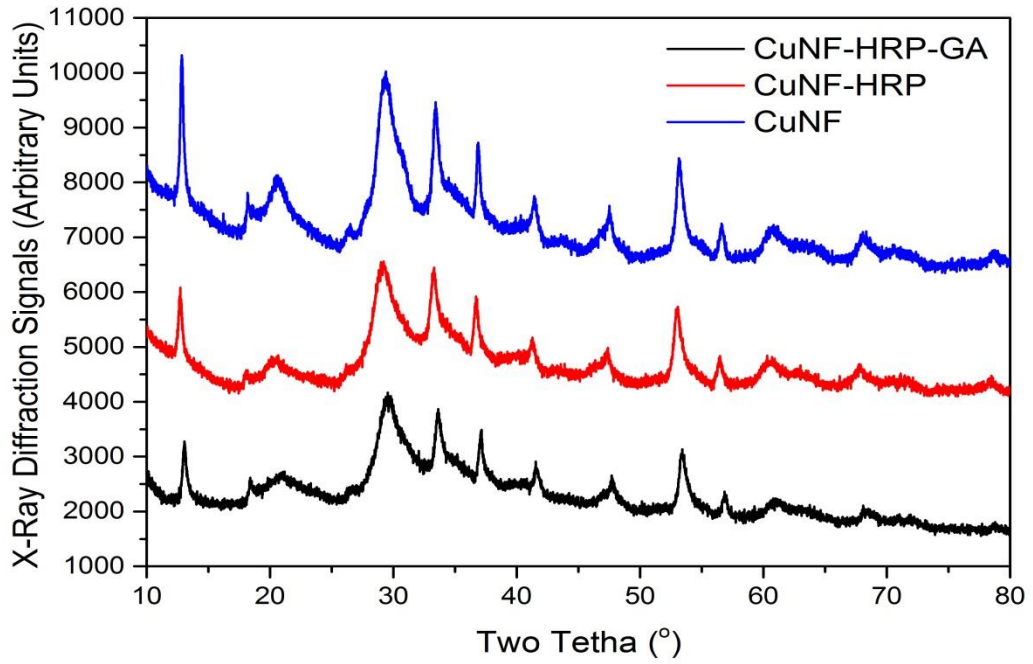
HRP enziminin Ca nanoçiçeğindeki varlığını doğrulamak için 400 - 4000 cm^{-1} bölgesinde FTIR spektrumları ile karakterize edildi (Şekil 4.25). 1123 cm^{-1} 'de P-O'nun karakteristik titreşimler ve gerginliklerini, 560 cm^{-1} ve 600 cm^{-1} , fosfat gruplarının varlığını gösteren $\text{O}=\text{P}-\text{O}$ gibi köprü fosforun bükülme titreşimlerine bağlanabilir. $-\text{NH}_2$ için 1650 ve 1548 cm^{-1} 'deki HRP' nin tipik bantları ve CH_2 ve CH_3 için 2347 - 3293 cm^{-1} 'in spektrumu gözlemlendi.



Şekil 4.25. HRP, CaNF, CaNF-HRP immobilize enziminin karşılaştırmalı FTIR pikleri

Yin ve arkadaşları (2012) yaptıkları kalsiyum hibrit nanoçiçek yapılarında benzer aralıklarda (1031 cm^{-1} P-O, 566 ve 603 cm^{-1} O=P-O, 1400 ve 1641 cm^{-1} de amin grupları) gözlemledikleri pikler ile karakterizasyon yapmışlardır [65].

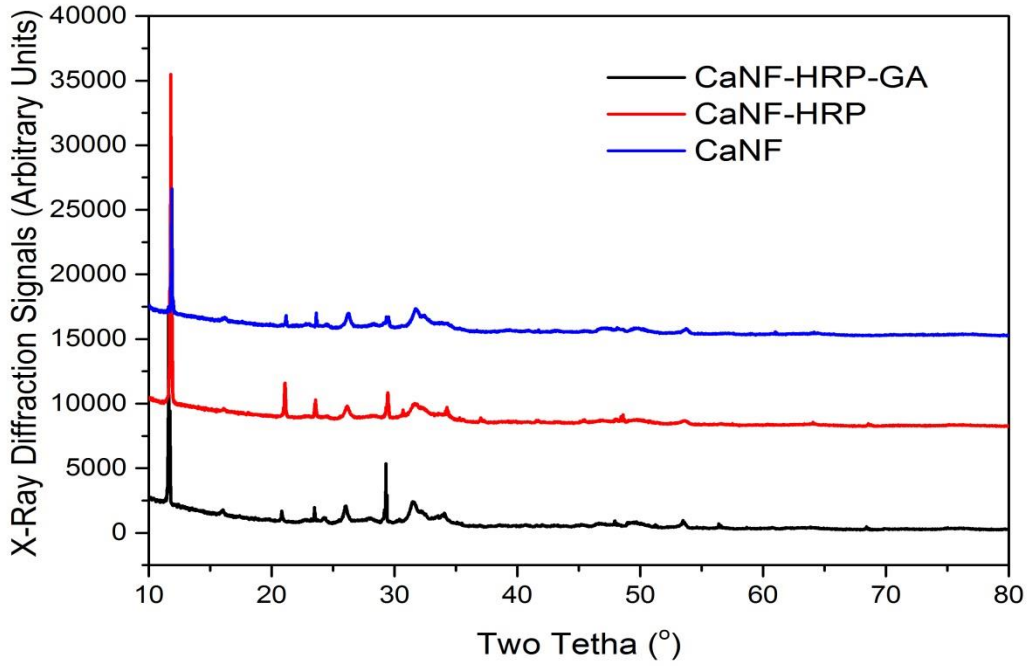
Şekil 4.26' da CuNF, CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA yapılarının XRD spektrumları verilmektedir. 2θ aralığında 10 ila 80 dereceye kadar veri alındı. Yapılan XRD analizinde CuNF yapılarının kristal bir yapı sergilediği görüldü. Bu sonuçlar, HNF'deki $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 'nin tüm kırılma tepe noktalarının, JCPDS kartındaki (00-022-0548) numaralı kod ile tutarlı olduğunu, X- ışını kırınım spektrumuyla da örtüştüğünü doğruladı.



Şekil 4.26. Cu^{2+} -HNF yapılarının XRD spektrumları

Literatürde Somturk ve ark. (2016) üreaz enzimi ile sentezledikleri hibrit nanoçiçek yapılarının XRD spektrumlarının bakır yapısı ile uyuştuğunu bildirmişlerdir [66]. Yu ve ark. (2015) nanoçiçeklerin kristalografik yapılarını ve $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'yu ortaya koymuşlardır. Kırınım piklerinin tümünün melez nanoçiçeklerin iyi kristalize olduğunu gösteren JCPDS Card No.22-0548 ile endekslenebilir ve enzimin bağlanmasından sonra yüksek kristallenme özelliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir [67].

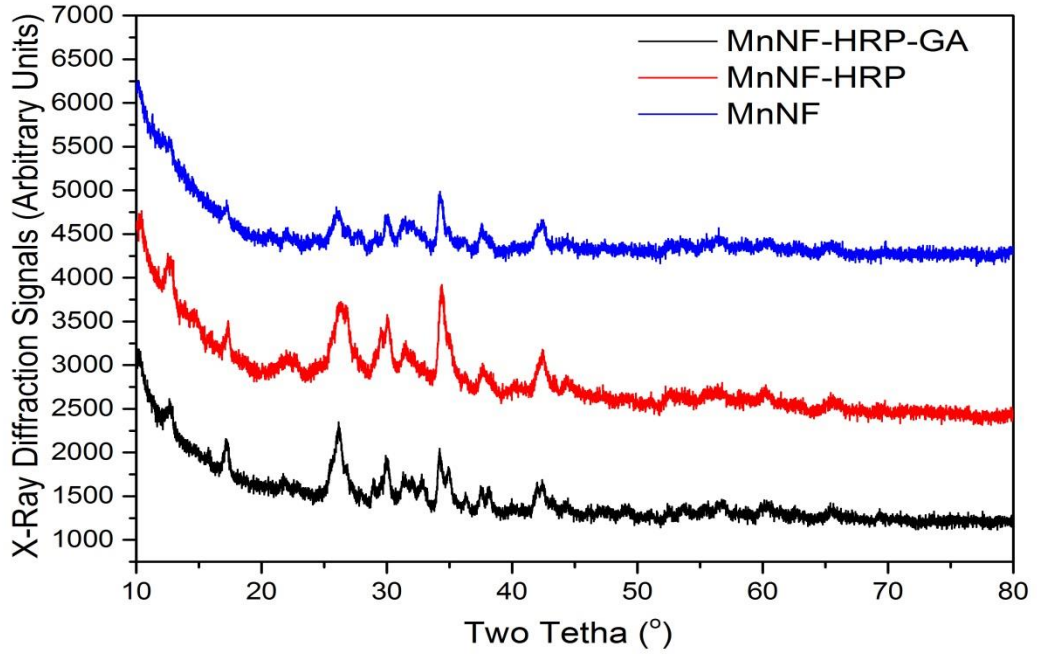
Şekil 4.27' de CaNF, CaNF-HRP ve CaNF-HRP-GA yapılarının XRD spektrumları verilmektedir. 2θ aralığında 10 ila 80 dereceye kadar veri alınmıştır. Yapılan XRD analizinde CaNF yapılarının kristal bir yapı sergilediği görülmektedir. Bu sonuçlar, HNF'deki $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nin tüm kırılma tepe noktalarının, JCPDS kartındaki (72-0713) numaralı kod ile tutarlı olduğunu, X- ışını kırınım spektrumuyla da örtüşüğünü doğruladı.



Şekil 4.27. Ca^{2+} -HNF yapılarının XRD spektrumları

Literatürde Wang ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada kalsiyum hibrit nanoçiçek yapılarını sentezlemiş ve XRD spektrumlarının kalsiyumun kristal yapısı ile uyduğunu ve tüm kırınım tepelerinin $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nin yapısıyla örtüştüğünü belirtmişlerdir [68]. X ışını kırınımı (XRD) analizindeki difraksiyon zirveleri, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS 72-0713) ile iyi bir uyum sağlayarak hibrit nano-çiçeklerde bulunan inorganik bileşeni doğruladığını belirtmişlerdir [69].

Şekil 4.28'de MnNF, MnNF-HRP ve MnNF-HRP-GA yapılarının XRD spektrumları verilmektedir. 2θ aralığında 10 ila 80 dereceye kadar veri alınmıştır. Yapılan XRD analizinde MnNF yapılarının kristal bir yapı sergilediği görülmektedir. Bu sonuçlar, HNF'deki $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ 'nin tüm kırılma tepe noktalarının, JCPDS kartındaki (3-0426) numaralı kod ile tutarlı olduğunu, X- ışını kırınım spektrumuyla da örtüştüğü görülmektedir.



Şekil 4.28. Mn^{2+} -HNF yapılarının XRD spektrumları

Literatürde Zhang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada BSA-Mn hibrit nanoçiçek yapılarını sentezlemişlerdir. XRD spektrumundaki tüm difraksiyon zirveleri, No. 3-0426'daki JCPDS X-ışını toz difraksiyonu dosyası ile indekslenebilen $Mn_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$ ile iyi uyum sağladığını belirtmişlerdir [70].

4.2. İmmobilizasyon Verimleri

Çalışmada sentezlenen HNF yapıları yaklaşık olarak 10 mg elde edildi ve hesaplamalar bu değerler üzerinden yapıldı. İmmobilize enzimin aktivitesi ölçülürken 1 mg HNF yapısı 10 mL pH 6,0 fosfat tapmonunda süspansiyon edildi ve her ölçüm için 100 μ L alınarak ölçüm alındı. Farklı metal iyonları ile sentezlenen HNF-HRP yapılarının aktiviteleri ve immobilizasyon verimleri Tablo 4.3'de verilmektedir.

Tablo 4.3. HNF yapılarının immobilizasyon verimi, geri kazanılan aktivite, immobilizasyon etkinliği yüzdeleri ve mg başına U olarak aktiviteleri

| Sentezlenen HNF'ler | İmmobilizasyon Verimi (%) | İmmobilizasyon Etkinliği (%) | Geri Kazanılan Aktivite (%) | Aktivite (U/mg taşıyıcı) |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| CuNF-HRP | 91 | 93 | 85 | 4,51±0,07 |
| CuNF-HRP-GA | 91 | 88 | 80 | 4,23±0,05 |
| CaNF-HRP | 88 | 92 | 82 | 4,31±0,04 |
| CaNF-HRP-GA | 88 | 89 | 78 | 4,11±0,06 |
| MnNF-HRP | 85 | 91 | 79 | 4,21±0,03 |
| MnNF-HRP-GA | 85 | 87 | 75 | 3,99±0,07 |

Literatürde Hao ve ark. (2019) kolesterol oksidaz enzimi ile sentezledikleri bakır nanoçiçek yapılarında 0,15 mg/mL enzim ve 1,6 mM bakır iyonundan sentezledikleri nanoçiçekler için kapsülleme oranı, stabilite ve aktivite arasında iyi bir denge olduğunu ve bu değerin %64 olduğunu belirtmişlerdir [71]. Somtürk ve ark. (2016) üreaz enzimi ile sentezledikleri bakır hibrit nanoçiçek yapılarında kapsülleme oranını %99,2 bulmuşlardır. [66]. Mohamed ve ark. (2013) kitosan boncuklar üzerine kovalent olarak immobilize ettikleri HRP enzimi için immobilizasyon verimi %60 olarak belirtmişlerdir [72].

4.3. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve Yükleme Etkinliği

HNF'ler üzerine bağlanan protein miktarının bulunması için serbest enzim ve filtratta protein tayini yapıldı. Şekil 3.1'de görülen standart protein eğrisi kullanılarak her bir HNF yapısının protein miktarları belirlendi. Tüm immobilize enzimler dikkate alındığında yükleme etkinlikleri %82- %90 aralığında bulundu. Protein miktarları Tablo 4.4'te verilmektedir.

Tablo 4. 4. Farklı HNF yapılarına immobilize edilen HRP enziminin protein miktarları ve yükleme etkinliği

| Taşıyıcılar | Başlangıç Protein Miktarı (mg) | Bağlanan Protein Miktarı (mg) | Yükleme Etkinliği (%) |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| CuNF-HRP | 0,1 | 0,090 | 90 |
| CuNF-HRP-GA | 0,1 | 0,090 | 90 |
| CaNF-HRP | 0,1 | 0,087 | 87 |
| CaNF-HRP-GA | 0,1 | 0,087 | 87 |
| MnNF-HRP | 0,1 | 0,082 | 82 |
| MnNF-HRP-GA | 0,1 | 0,082 | 82 |

Literatürde Ocsoy ve ark. (2015) Fe²⁺ iyonu ile sentezledikleri HNF-HRP yapılarında yükleme etkinliğini %97,9 olarak rapor etmişlerdir [86]. Li ve ark. (2016) lipaz ve papain enzimlerini kullanarak sentezledikleri bakır HNF yapılarının yükleme etkinliğini %96,57 bulmuşlardır [87].

4.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

Yapılan tüm deneysel çalışmaların ortalamaları alınıp, \pm standart sapma olarak verildi.

4.4.1. Horseradish Peroxidase Hibrit Nanoçiçek Yapılarının Sentezlenmesine Farklı İyon Değişimlerinin Etkisi

HNF yapıları farklı metal iyon değişimlerinde çöktürülerek immobilize edildi. Kullanılan stok çözeltiler 60-120-200 ve 240 mM, çöktürme ortamındaki son metal iyon değişimleri 15-30-50 ve 60 mM olacak şekilde ayarlanarak yapılan çöktürme ve iyon değişimi etkileri Tablo 4.5'te verilmektedir.

Tablo 4. 5. Farklı iyon derişimlerinde sentezlenen HNF yapılarının aktivite karşılaştırması

| | Gözlenen Aktivite | % Rölatif (bağıl) Aktivite | % Aktivite Kaybı |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Serbest Enzim | 16,33 U/ml | 100 | 0 |
| 15 mM Cu²⁺ | 15,56 U/mg taşıyıcı | 95,28 | 4,72 |
| 30 mM Cu²⁺ | 15,15 U/mg taşıyıcı | 92,77 | 7,23 |
| 50 mM Cu²⁺ | 11,55 U/mg taşıyıcı | 70,72 | 29,28 |
| | | | |
| Serbest Enzim | 14,55 U/ml | 100 | 0 |
| 15 mM Ca²⁺ | 14,27 U/mg taşıyıcı | 98,07 | 1,93 |
| 30 mM Ca²⁺ | 14,05 U/mg taşıyıcı | 96,57 | 3,43 |
| 50 mM Ca²⁺ | 13,32 U/mg taşıyıcı | 91,56 | 8,44 |
| 60 mM Ca²⁺ | 12,71U/mg taşıyıcı | 87,38 | 12,62 |
| | | | |
| Serbest Enzim | 15,30 U/ml | 100 | 0 |
| 15 mM Mn²⁺ | 14,05 U/mg taşıyıcı | 91,83 | 8,17 |
| 30 mM Mn²⁺ | 13,79 U/mg taşıyıcı | 90,16 | 9,84 |
| 50 mM Mn²⁺ | 12,41 U/mg taşıyıcı | 81,17 | 18,83 |

Bu sonuçlar, düşük bakır, kalsiyum ve mangan iyonları konsantrasyonlarının, kararlı bir nanoççek kompleksi oluşturabileceğini gösterir. Fakat düşük konsantrasyonlarda çöktürme yapılarak elde edilen nanoççeklerin miktarları az olmakla beraber ççek şekilli yapılarının da tam oluşmadığı tespit edildi. Aşırı Cu²⁺, Ca²⁺ ve Mn²⁺ iyonu ise daha düşük aktiviteye yol açmaktadır ve ççek benzeri yapı bozunmaya uğramaktadır.

4.4.2. Serbest Enzim Üzerine Farklı Metal İyon Değişimi Etkisi

İnhibitörler reaksiyon ortamına eklendiğinde reaksiyon hızını azaltan doğal ya da yapay kimyasal maddelerdir. Bileşiklerin inhibe edici etkileri inhibitörün saflığına, değişimine, enzimin kaynağına, substratın varlığına, pH ve sıcaklığa bağlıdır. Çöktürme ortamında kullanılan metal iyon çözeltilerinin serbest enzim üzerindeki etkilerini belirlemek için 15-30-50 ve 60 mM son değişim olacak şekilde Cu^{2+} , Ca^{2+} ve Mn^{2+} metal iyonları kullanıldı. 1 saat sonunda alınan sonuçlar Tablo 4.6.'da verildi.

Tablo 4. 6. Farklı metal iyon değişimlerinin serbest enzim üzerindeki etkisi

| | U/mL | % Rölatif (bağlı) Aktivite | % Aktivite Kaybı |
|--|-------|----------------------------|------------------|
| Serbest Enzim | 16,14 | 100 | 0 |
| 15 mM Cu^{2+} | 15,62 | 96,77 | 3,23 |
| 30 mM Cu^{2+} | 15,57 | 96,46 | 3,54 |
| 50 mM Cu^{2+} | 11,58 | 71,74 | 28,26 |
| | | | |
| 15 mM Ca^{2+} | 16,27 | 100,8 | - |
| 30 mM Ca^{2+} | 16,17 | 100,18 | - |
| 50 mM Ca^{2+} | 16,46 | 101,98 | - |
| 60 mM Ca^{2+} | 16,58 | 102,72 | - |
| | | | |
| 15 mM Mn^{2+} | 14,70 | 91,07 | 8,93 |
| 30 mM Mn^{2+} | 14,89 | 92,25 | 7,75 |
| 50 mM Mn^{2+} | 14,27 | 88,41 | 11,59 |

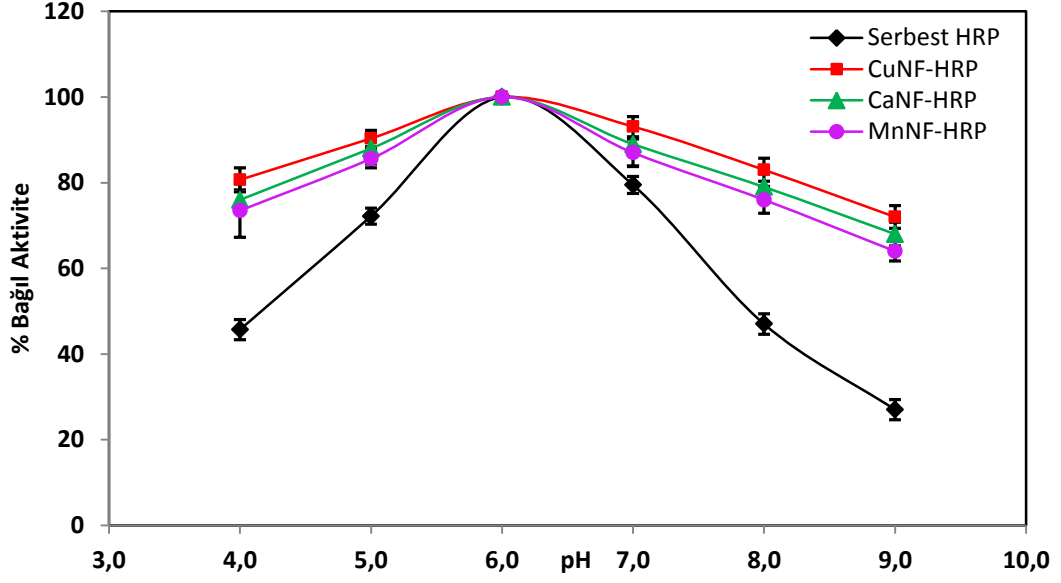
Tablo incelendiğinde, yüksek metal iyonu değişimlerinin 1 saat sonunda serbest enzim üzerine % 10-30 aralığında inhibisyona sebep olduğu görülmektedir.

4.4.3. pH ve Sıcaklık Etkilerinin Belirlenmesi

Serbest enzim ve immobilize HNF yapılarının optimum pH değerleri farklı tampon sistemleri kullanılarak pH 4-9 aralığında belirlendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.29'da gösterildi. Serbest enzim ve sentezlenen tüm HNF-HRP yapıları için pH 6,0 fosfat tamponunda maksimum aktivite görüldü ve HNF-HRP-GA yapılarının daha kararlı olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlardan pH 8,0'in üzerine çıkıldığı zaman serbest enzimde büyük bir aktivite kaybı görülürken HNF yapılarında keskin bir aktivite kaybı görülmedi (Şekil 4.29).

Genel olarak, immobilize edilmiş enzimler ya serbest enzimlerden daha geniş bir pH aralığına ya da serbest olanlarla aynı pH aralığına sahiptir. Immobilize edilmiş enzimlerin düşük pH değerlerindeki stabilitesi, amin gruplarına bağlıdır. Çünkü immobilize enzimler ortamdaki protona bağlanabilmekte, bu da enzim moleküllerinin yakınındaki var olan proton konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır.

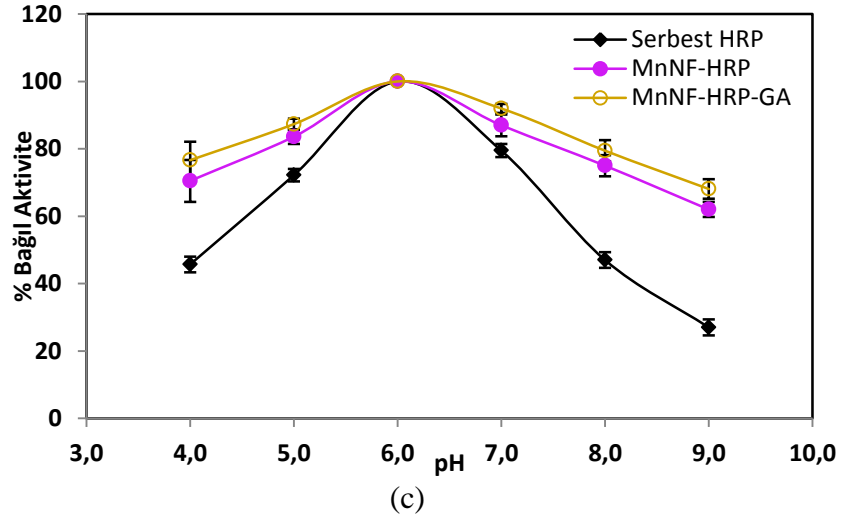
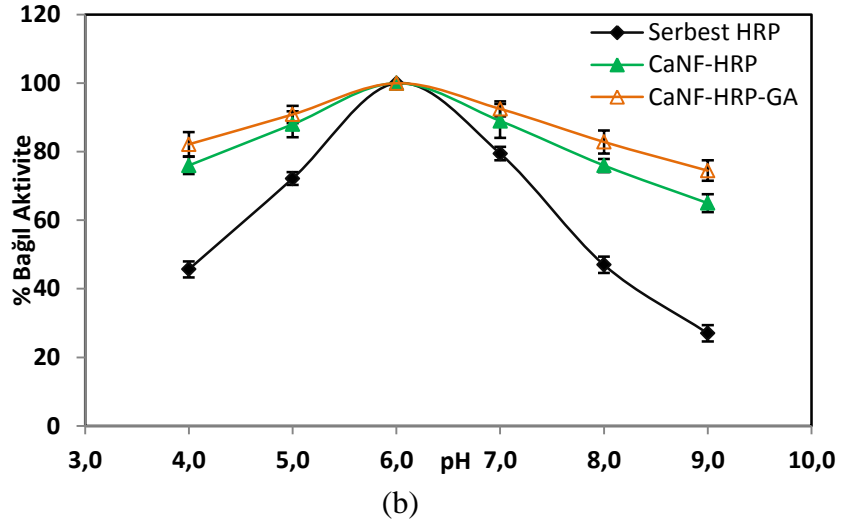
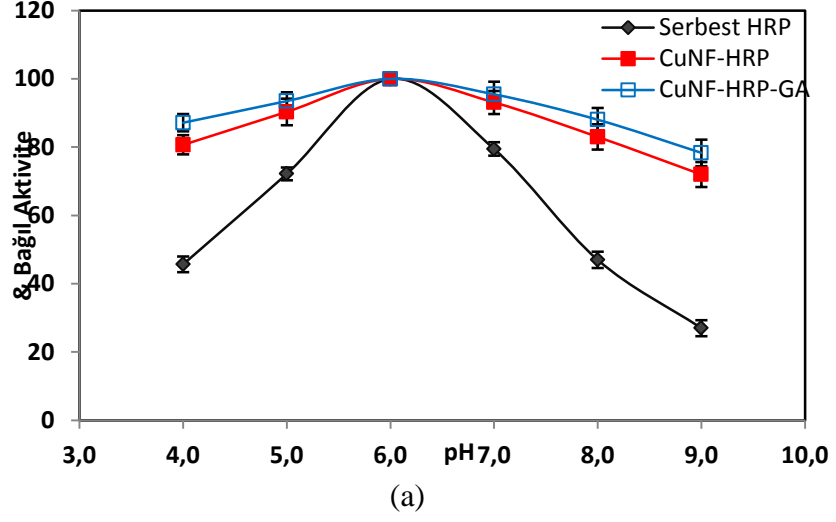
Optimum pH değeri, serbest ve immobilize enzimlerin katalitik bölgesindeki önemli proton alan veya atan grupların, istenen iyonlaşma durumlarında oldukları pH'ı yansıtır. Serbest ve immobilize hibrit nanoçiçek yapıları aynı optimum pH derecesinde bulundu. Hibrit nanoçiçek yapıları, hem düşük hem de daha yüksek pH seviyelerinde, serbest enzimden daha düşük aktivite kaybına uğradı. Çünkü bitki peroksidazı, asidik bölgede optimum aktivite göstermesinin yanı sıra, immobilize edildiğinde aktif merkezinin korunması, pH değişimlerine karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır.



Şekil 4.29. Serbest enzim ve HNF'lerin optimum pH grafiği

Literatürde Chang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada serbest ve Fe_3O_4 /grafen oksit nanokompozit üzerine immobilize HRP'nin optimum pH'sini 6,4 olarak bulmuşlardır [63]. El-Nahass ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmalarında serbest ve gözenekli silikat, SBA-16 üzerine immobilize HRP'nin optimum pH değerini 5,6 olarak rapor etmişlerdir [73]. Pandey ve ark. (2017) kitosan üzerine immobilize ettikleri peroksidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 olarak rapor etmişlerdir [75]. Lavery ve arkadaşları (2010) saflaştırılmış HRP'nin, pH 6,0-7,5 aralığında yüksek aktivite gösterdiğini ancak enzim aktivitesinde pH 8,0' da anlamlı düşüş gözlemlendiğini rapor etmişlerdir [76].

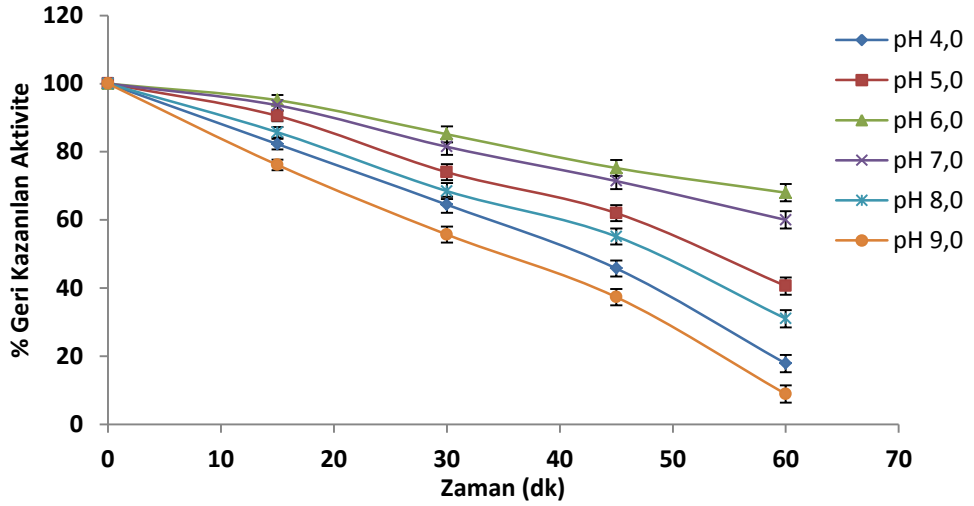
Serbest ve immobilize HNF-GA enzimlerinin aktivitelerine pH etkisinin belirlenmesinde, pH 4,0-9,0 aralığında substrat olarak gayakol çözeltisi kullanıldı. Çalışmalar sırasında 0,05 M sodyum asetat (pH 4,0 ve 5,0), 0,05 M potasyum fosfat (pH 6,0 ve 7,0) ve 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0 ve 9,0) tamponları kullanıldı. Serbest ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmış immobilize enzimlerin optimum pH değerleri 6,0 olarak bulundu. Sonuç olarak glutaraldehit ile çapraz bağlamanın HNF'lerin optimum pH değerleri üzerine etki etmediği gözlemlendi (Şekil 4.30).



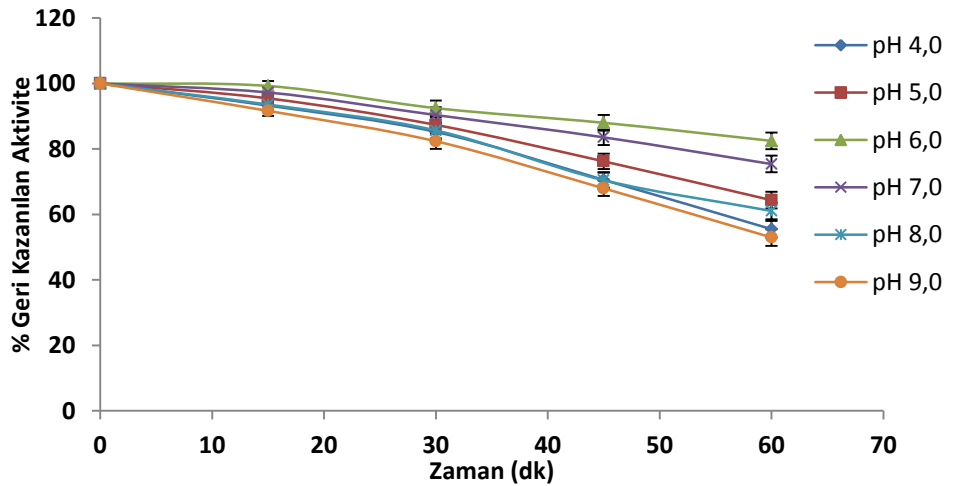
Şekil 4.30. Serbest enzim ve HNF-GA yapılarının optimum pH grafikleri. (a: CuNF-HRP ile CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP ile CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP ile MnNF-HRP-GA)

HNF ve HNF-GA yapıları karşılaştırıldığında, glutaraldehit ile çapraz bağlanmış olan HNF'lerin asidik ve bazik bölgelerde diğer HNF'lere göre daha dayanıklı olduğu, bununla birlikte optimum pH değerinin değişmediği gözlemlendi.

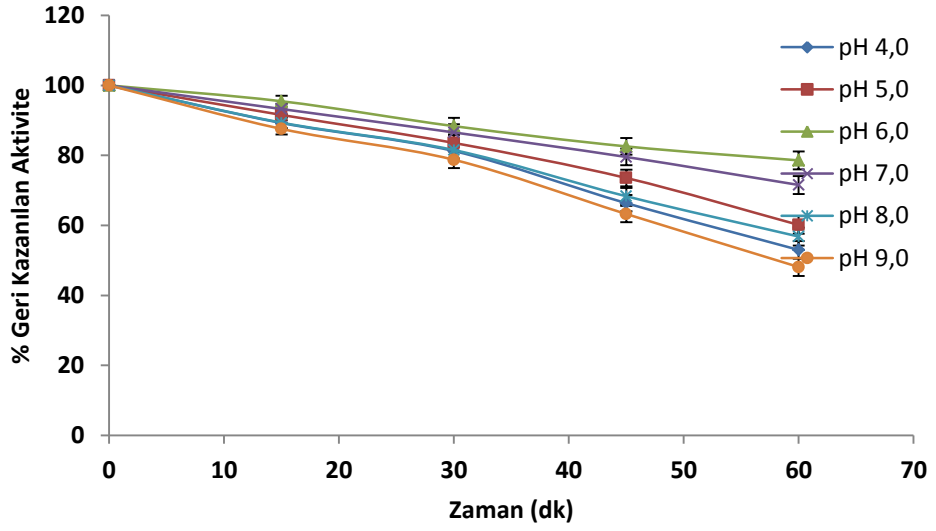
Serbest enzim ve sentezlenen immobilize HNF yapılarının pH stabilite grafiği incelendiğinde; pH değeri 5,5-6,5 civarında 1 saat inkübasyondan sonra aktivitede önemli kayıplar olmadığı görülmektedir. Glutaraldehit ile çapraz bağlanan HNF yapılarında da benzer aralıklarda 1 saat inkübasyondan sonra yüksek kayıplar olmadığı ve glutaraldehit ile çapraz bağlama yapılmamış HNF yapılarına göre daha iyi stabilite gösterdiği belirlendi. Asidik ve bazik bölgede ise sentezlenen tüm immobilize HNF ve HNF-GA yapılarının serbest enzime göre daha stabil olduğu bulundu (Şekil 4.31-4.32).



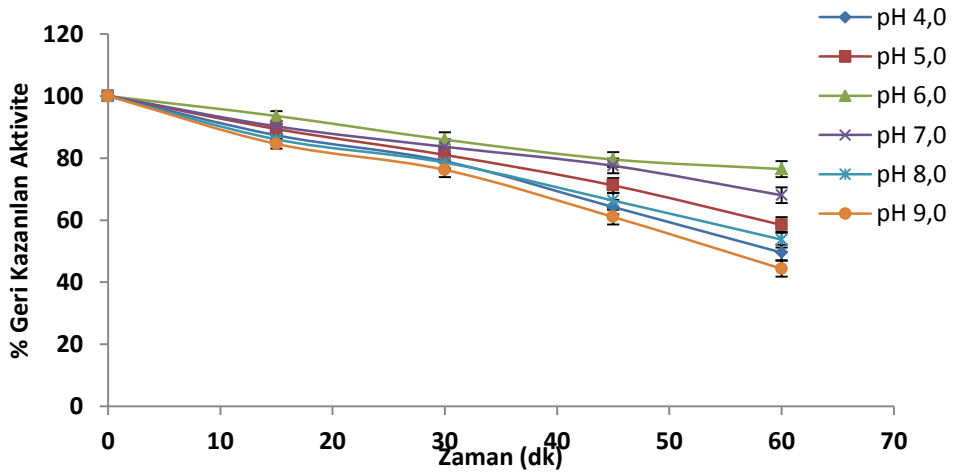
(a)



(b)



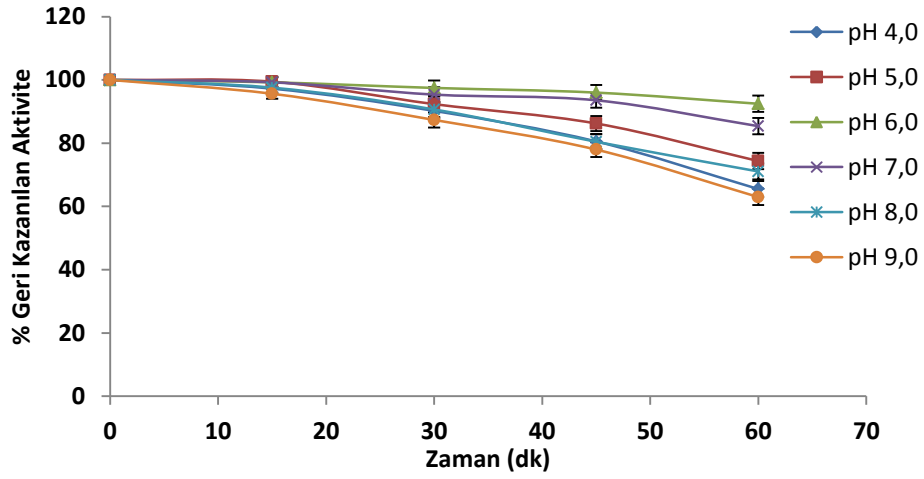
(c)



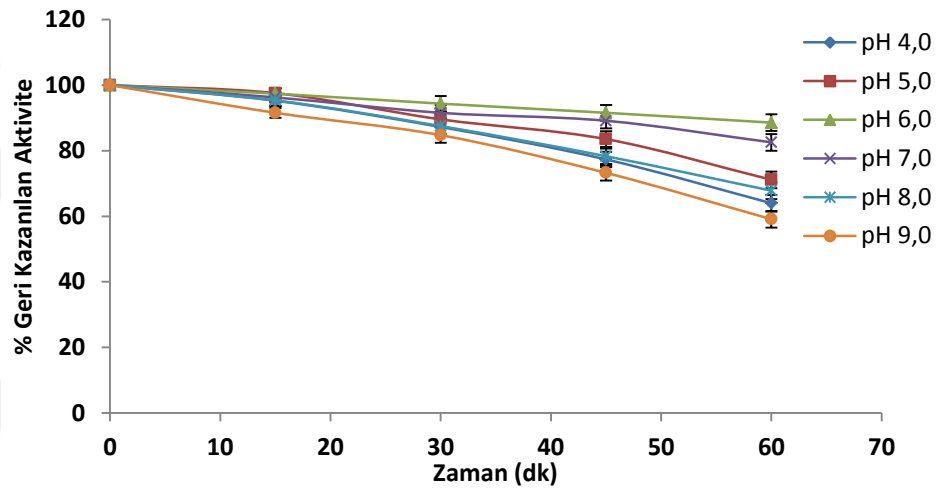
(d)

Şekil 4.31. Serbest enzim ve HNF'lerin pH stabilite grafiği (a:Serbest HRP, b:CuNF-HRP, c: CaNF-HRP, d: MnNF-HRP)

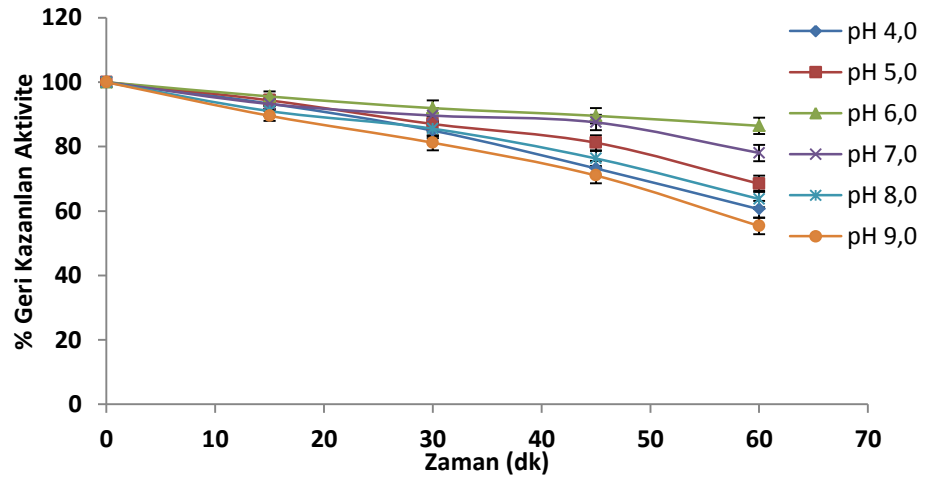
Al-Bagmi ve ark. (2019) saflaştırarak kullandıkları horseradish peroksidaz enzimi ile yaptıkları stabilite çalışmasında pH stabilite değerini pH 6,0 olarak tespit etmişlerdir [77].



(a)



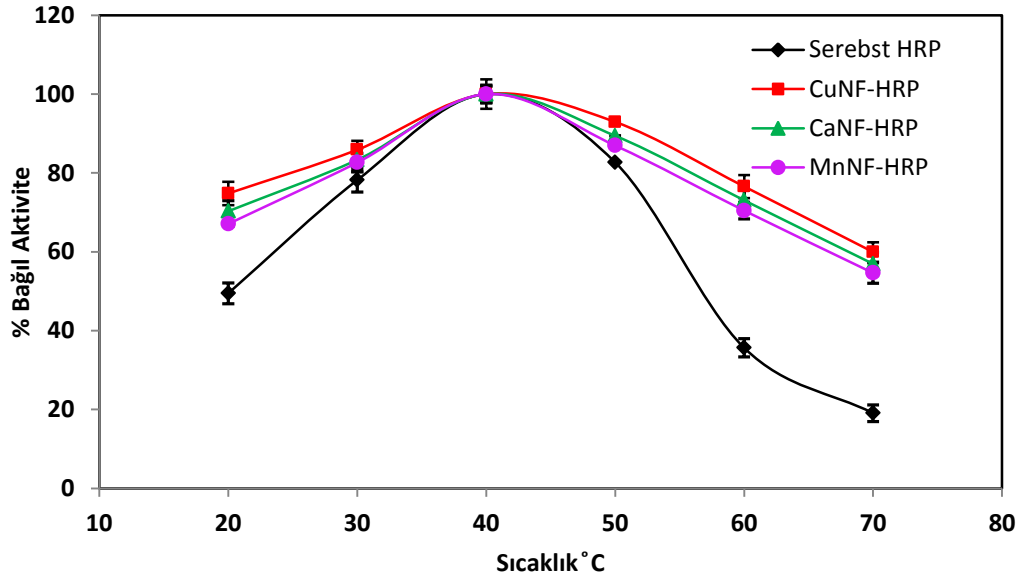
(b)



(c)

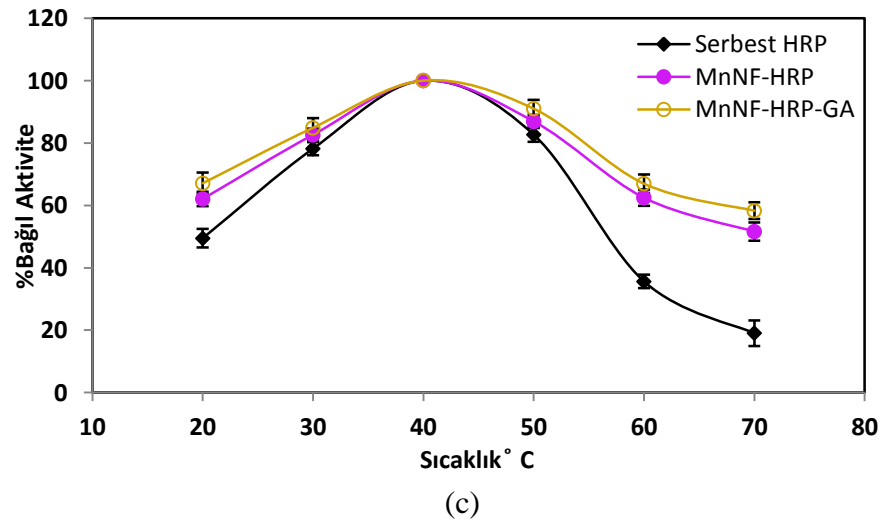
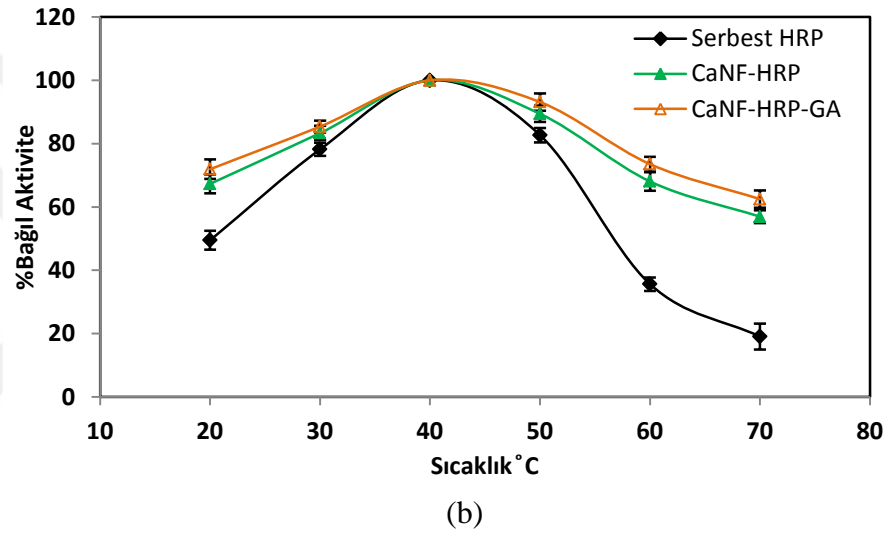
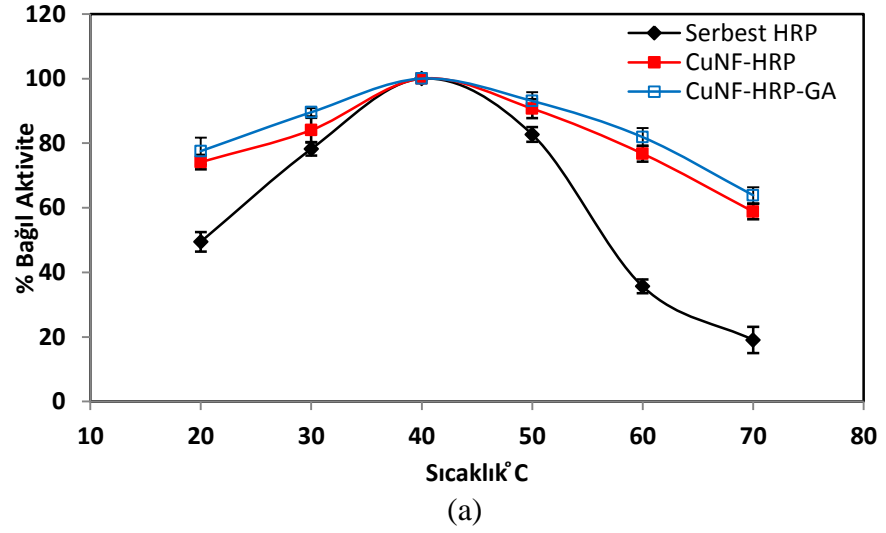
Şekil 4.32. Serbest enzim ve HNF-GA yapılarının pH stabilite grafikleri. (a: CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP-GA)

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızları sıcaklık arttıkça artabilmektedir. Bununla birlikte artan sıcaklığa bağlı olarak enzimlerin yapıları gereği aktiviteleri azalırken katalizledikleri reaksiyonların hızları da azalmaktadır. Reaksiyon hızının maksimuma ulaştığı noktadaki sıcaklığa 'optimum sıcaklık' denir. Enzimlerin çoğunun yüksek aktivite gösterdikleri optimum sıcaklık 30-40 °C'dir. Bu sıcaklığın üstüne çıkıldığı zaman enzimler, protein yapıları nedeniyle denatürasyona uğrarlar. Yapılan çalışmada serbest enzim ve sentezlenen tüm immobilize enzimler için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlendi (Şekil 4.33-4.34). Enzimler düşük veya yüksek sıcaklıklarda kararsızdırlar, çünkü çevresel sıcaklıktaki artış veya azalma; uygun küresel ve katalitik olarak aktif yapısal konformasyonlarından sorumlu olan etkileşimlerin kırılmasına neden olmaktadır. İmmobilizasyon işlemi, enzim molekülleri için daha dayanıklı bir yapı oluşturduklarından, yüksek sıcaklıklarından daha az etkilenmekte böylece stabiliteyi artmaktadır.



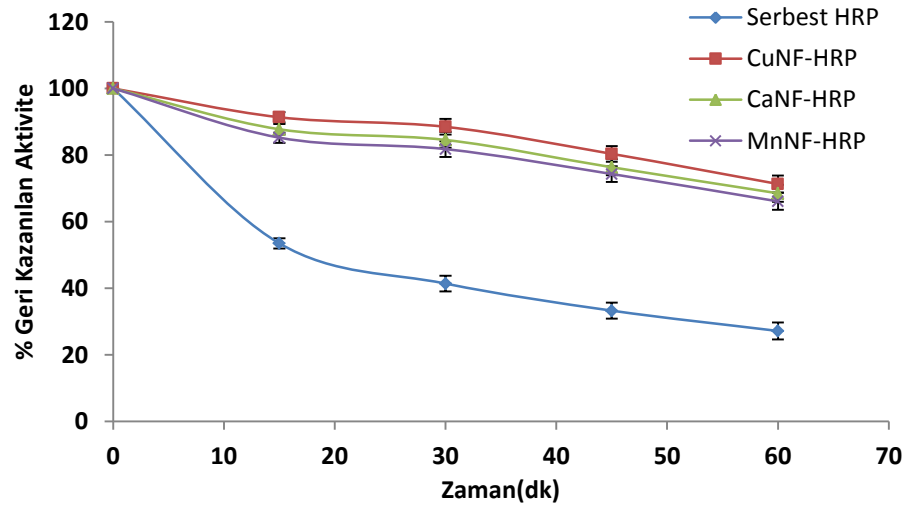
Şekil 4.33. Serbest enzim ve HNF'lerin optimum sıcaklık değerleri

El-Nahass ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada serbest ve immobilize edilmiş HRP preparatları için optimum sıcaklığı 40°C olarak tespit etmişlerdir [73].

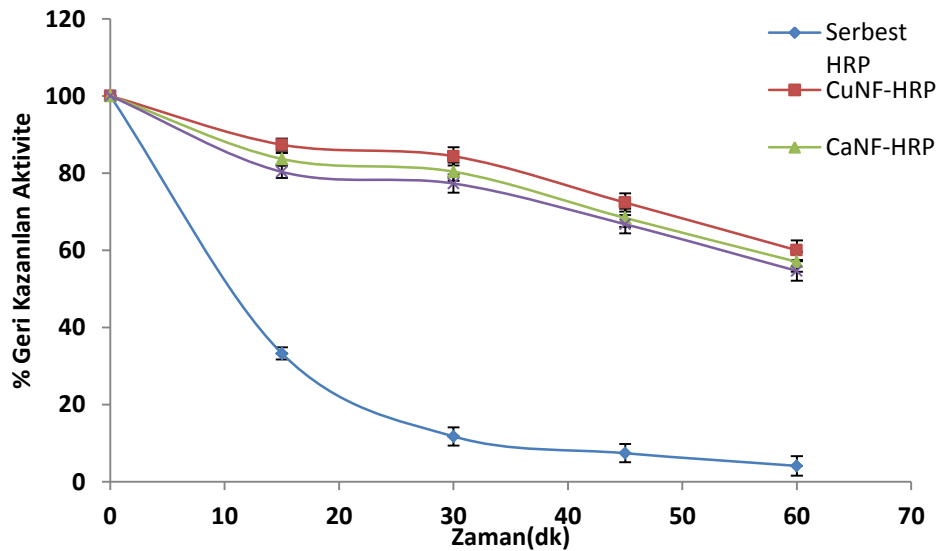


Şekil 4.34. Serbest ve HNF-GA immobilize enzimlerinin optimum sıcaklık grafikleri. (a: CuNF-HRP ile CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP ile CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP ile MnNF-HRP-GA)

Serbest enzim ve sentezlenen tüm HNF yapılarının sıcaklık stabilitesini belirlemek için 20 – 70 °C’de arasında değişen sıcaklıklarda 1 saat bekletildi ve geri kalan aktivite değerleri ölçüldüğünde (Şekil 4.35) immobilize edilmiş tüm HNF-HRP'lerin termal stabilitesinin serbest enzime göre daha iyi olduğu bulundu. İmmobilize enzimlerin yüksek sıcaklıkta konformasyon geçişini önleyen enzim ve destek arasındaki kovalent bağ sayesinde sıcaklık stabiliteilerinin serbest olandan çok daha iyi olduğu görülmektedir. İmmobilize enzimlerin termal stabilitesinin daha iyi olması, immobilize edilmiş enzimlerin genel avantajlarından biri olarak görülmektedir.



(a)

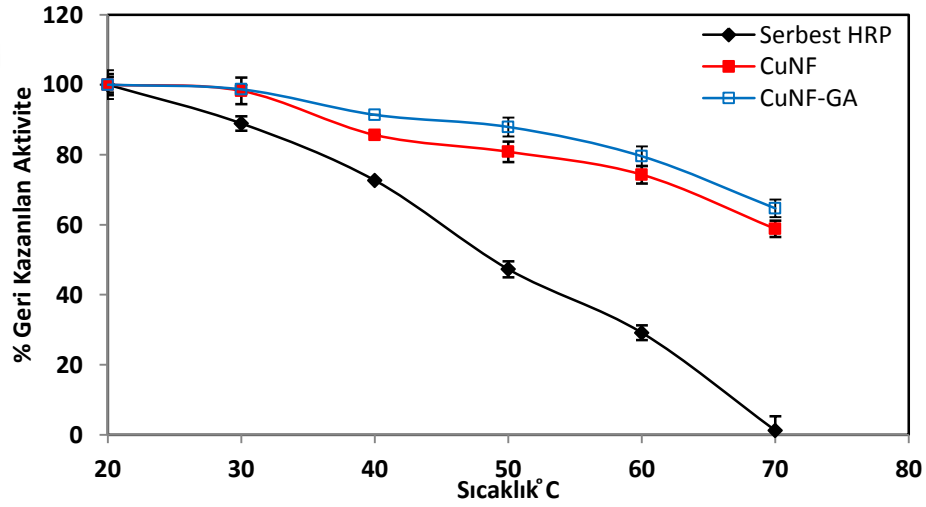


(b)

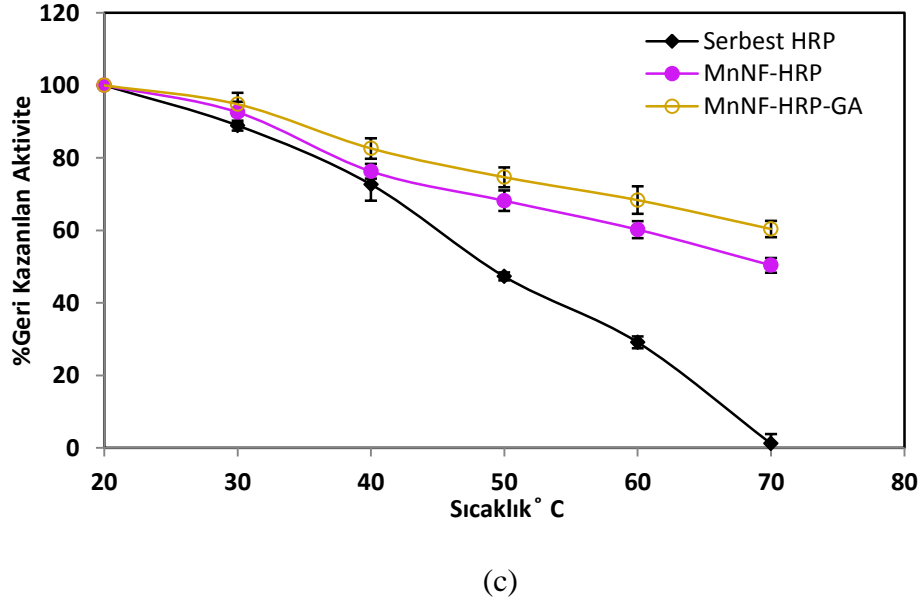
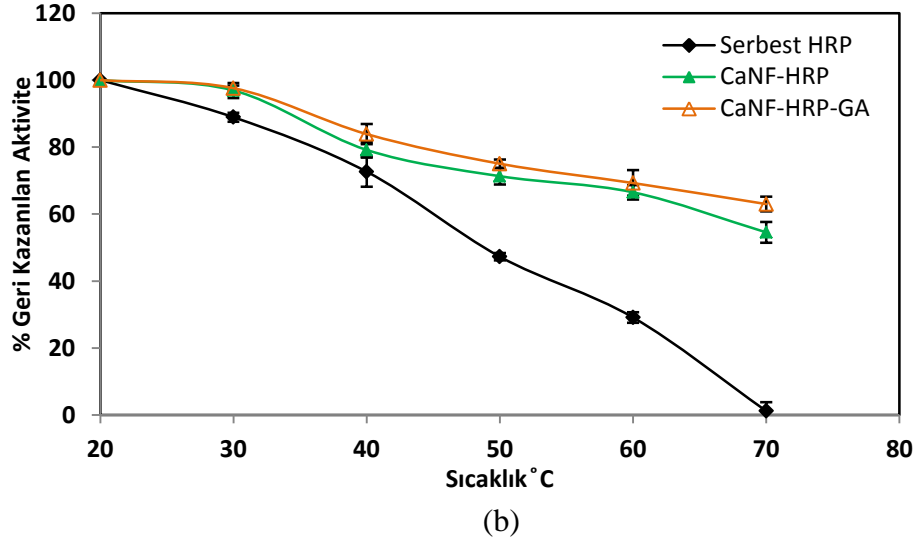
Şekil 4.35. Serbest enzim ve HNF’lerin termal stabilite grafiği (a:60°C, b:70°C)

Serbest enzimin sıcaklık stabilite grafiği incelendiğinde; bir saatlik inkübasyon sonunda 60°C'de aktivitesinin %27,14'ünü, 70°C'de ise aktivitesinin %4,09'unu koruduğu tespit edildi. Sentezlenen HNF ve çapraz bağlı HNF yapıları 25°C'de aktivitelerinin tamamını koruyorken, 70°C'ye çıkıldığı zaman tüm HNF-HRP yapılarının geri kazanılan aktivitelerinin %55-60 aralığında, GA ile çapraz bağlı HNF yapılarının ise 70°C'de geri kazanılan aktivitelerinin %60-70 aralığında olduğu bulundu (Şekil 4.36). Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında enzim immobilizasyonunun önemli ölçüde termal stabilite artışı sağladığı görülmektedir.

El-Nahaas ve ark. (2018) immobilizasyonun çeşitli sıcaklıklarda stabilite üzerindeki etkisinin, serbest ve immobilize edilmiş HRP'nin 30 ila 80°C arasındaki sıcaklıklarda 30 dakika boyunca inkübe edildiği deneylerde değerlendirmişlerdir. Sonuçlarında, özünür ve immobilize edilmiş HRP'nin sırasıyla 40°C ve 50°C'ye kadar stabil olduğunu göstermişlerdir. Serbest enzim 70°C'de 30 dakika inkübasyonun ardından tam bir aktivite kaybı sergilese de, immobilize enzim, aktivitesinin %25'ini koruduğunu tespit etmişlerdir [73].



(a)



Şekil 4.36. Serbest ve HNF-GA immobilize enzimlerinin termal stabilite grafikleri. (a: CuNF-HRP ile CuNF-HRP-GA b: CaNF-HRP ile CaNF-HRP-GA c: MnNF-HRP ile MnNF-HRP-GA)

Glutaraldehit maddesi diğer gruplarla reaksiyona girebilmesine karşın, esas olarak proteinlerin amino gruplarını içeren farklı enzim kısımlarıyla reaksiyona girebilmektedir. Hem asidik hem de nötr koşullar altında, Ga'dan aldehit grupları, schiff bazlarının oluşmasıyla proteinler ile reaksiyona girer. Bu da yapıya daha büyük bir dayanıklılık kazandırır.

İmmobilize enzimlerin ısıya karşı dayanıklılığı, enzim gruplarının pozisyonlarının aktif yönlendirilmesinde sabit tutulmasını sağlayan ve bu nedenle

HRP'yi yüksek sıcaklıkta uygunsuz yapısal değişikliklerden koruyan büyük bir çapraz bağlama reaktifi gibi davranması nedeniyle olabilmektedir.

4.4.4. Substrat Spesifikliği

Horseradish peroksidaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için, pirogallol, 4- Metil katekol, gallik asit, tirozin, katekol, ABTS ve 4-AAP substrat çözeltileri kullanıldı. Her bir substrat çözeltisi 10 mM derişimde hazırlananarak, max dalga boylarında absorbans ölçümleri alındı ve aktiviteleri hesaplandı. En yüksek aktivitenin bulunduğu substrat %100 olarak kabul edilerek sıralama % olarak yapıldı (Tablo 4.5).

Tablo 4.7. Serbest enzim ve HNF'lerin Substrat Spesifikliği

| Substrat | % Gözlenen Aktivite | | | |
|-------------------------|---------------------|----------|----------|----------|
| | Serbest HRP | CuNF-HRP | CaNF-HRP | MnNF-HRP |
| Gayakol (10 mM) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Pirogallol (10 mM) | 74 | 71 | 61 | 63 |
| 4-metil katekol (10 mM) | 54 | 49 | 47 | 45 |
| Tirozin (10 mM) | 36 | 33 | 34 | 31 |
| Katekol (10 mM) | 29 | 28 | 26 | 24 |
| ABTS (10 mM) | 25 | 25 | 22 | 22 |
| Fenol(4-AAP) (10 mM) | 23 | 24 | 19 | 20 |
| Gallik asit (10 mM) | 15 | 14 | 12 | 11 |

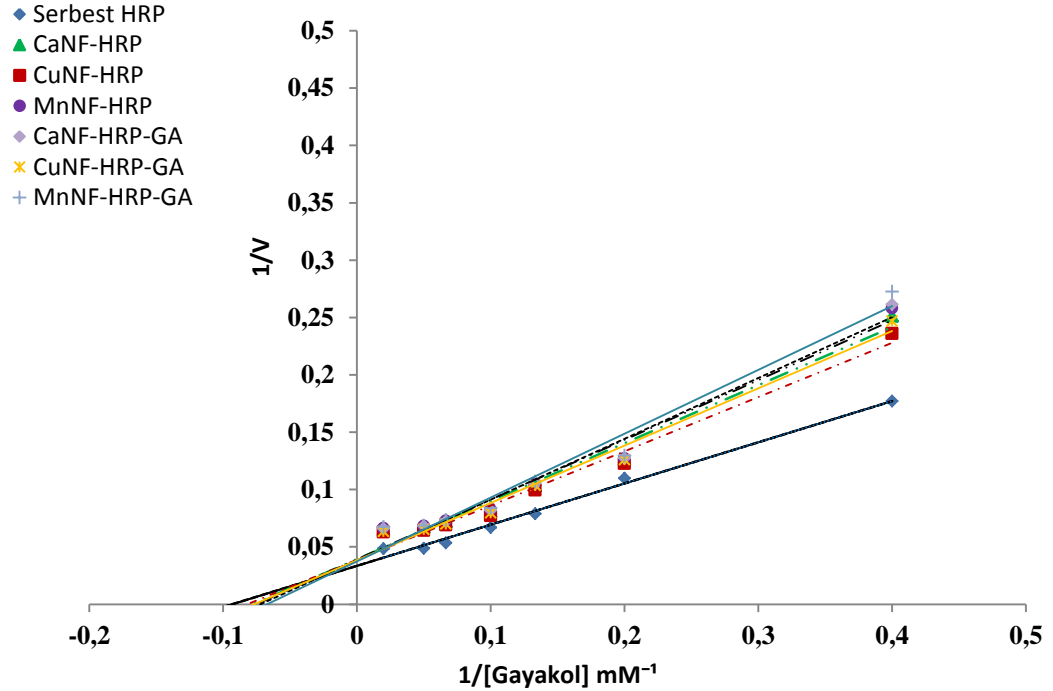
Reaksiyon süresi: 3dk, reaksiyon hacmi: 3 mL, sıcaklık: 40°C

Sonuç olarak horseradish peroksidaz enzimi için en iyi substratın gayakol olduğu tespit edildi. Diğer substratlar ise sırasıyla pirogallol > 4-metil katekol > tirozin > katekol > ABTS >4-AAP >gallik asit olduğu saptanmıştır.

Mohamed ve ark. (2012) yaptıkları HRP enziminin stabilite çalışmasında benzer şekilde o-fenilendiaminin, enzim için en iyi substrat, ardından gayakol, o-dianisidin, pirogallol ve p-aminoantipiridin olduğunu belirtmişlerdir [78]. Mohamed ve ark. (2017) Fe₃O₄ manyetik nanoparçacık üzerinde immobilize edilmiş çözünür HRP ve HRP 'nin substrat spesifikliğı için yaptıkları çalışmada gayakol ile aktiviteyi %100 olarak kabul etmişlerdir ve oksidasyon aktivitesini, sırasıyla %69, %29, %22, %12 ve %4 nispi aktivite ile çözünür HRP için o-fenilendiamin > o-dianisidin > p-aminoantipirin > pirogallol > ABTS olarak rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada immobilize enzimler için oksidasyon aktivitesini, sırasıyla %100, %90, %60, %28 ve %25 nispi aktiviteye sahip immobilize edilmiş HRP ile o-fenilendiamin > p-aminoantipirin > o-dianisidin > pirogallol > ABTS olduğunu tespit etmişlerdir [79].

4.4.5. Enzim Kinetiğı

Serbest HRP enziminin ve HNF yapılarının 0,1 M pH 6,0 tamponu içerisinde farklı substrat derişimleri kullanılarak 40⁰C'de belirlenen aktivite değerleri ile elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Serbest ve HNF horseradish peroxidase enzimlerinin gayakol substratı ile çizilen Lineweaver-Burk grafiğı

Tablo 4. 8. Serbest enzim ve HNF yapılarının K_M ve V_{max} değerleri

| | Km | Vmax | Vmax |
|--------------------|-----------|---------------------|---------------------|
| Serbest HRP | 10,71 mM | 29,85 U/mL | 298,05 U/mg protein |
| CuNF-HRP | 12,15 mM | 25,70 U/mg taşıyıcı | 285,55 U/mg protein |
| CuNF-HRP-GA | 12,97 mM | 25,97 U/mg taşıyıcı | 288,55 U/mg protein |
| CaNF-HRP | 12,83 mM | 25,38 U/mg taşıyıcı | 291,72 U/mg protein |
| CaNF-HRP-GA | 13,87 mM | 26,17 U/mg taşıyıcı | 300,80 U/mg protein |
| MnNF-HRP | 13,31 mM | 25,57 U/mg taşıyıcı | 311,82 U/mg protein |
| MnNF-HRP-GA | 14,87 mM | 26,73 U/mg taşıyıcı | 325,97 U/mg protein |

İmmobilize HRP-hibrit nanoçiçek yapılarının K_M ve V_{max} değerlerindeki farklanma, serbest HRP' ye kıyasla enzim-substrat afinite kapasiteside bir değişime işaret etmektedir. Bu değişim substratın HRP'nin aktif bölgesine erişimine yönelik sterik engel ve/veya taşıyıcının katı yüzeyi ile temas ettikten sonra HRP'nin konformasyonundaki bir değişiklik sebebiyle olabilir.

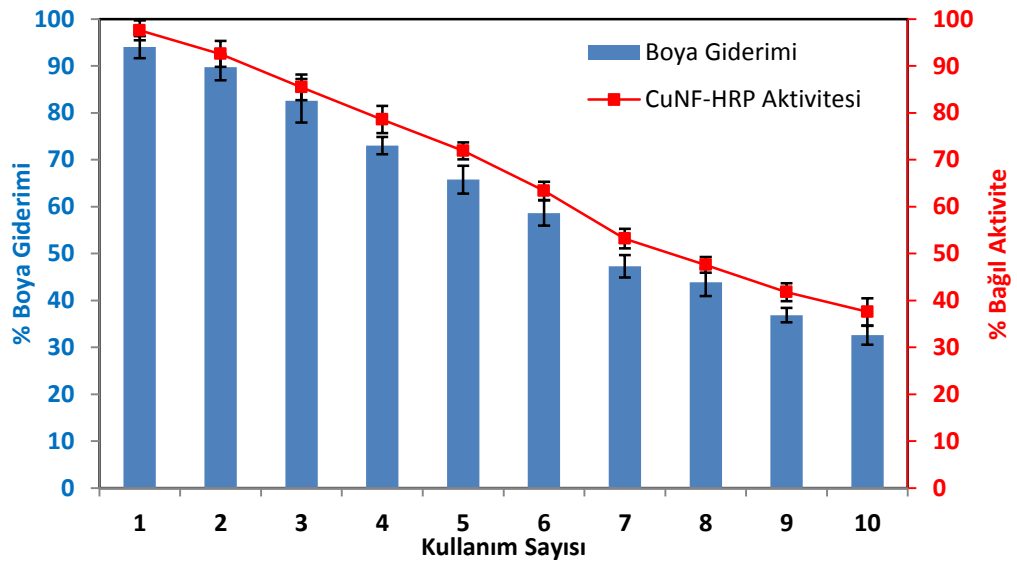
Literatürde El-Nahass ve ark. (2018) yaptıkları HRP immobilizasyonu çalışmasında gayakol substratı için serbest enzimin K_M değerini 10, mM ve immobilize enzimin K_M değerini 12 mM, H_2O_2 substratı ile yaptıkları kinetik çalışmada serbest enzim için K_M değerini 5.27 mM ve immobilize enzim için K_M değerini 3,9 mM olduğunu belirtmişlerdir [73]. Mohamed ve ark. (2016) yaptıkları HRP immobilizasyonu çalışmasında substrat olarak gayakol kullanmış ve serbest enzim için K_M değerini 31 mM, V_{max} değerini 2,17 U/mL, H_2O_2 ile yaptıkları kinetik çalışmada serbest enzim için K_M değerini 5 mM, V_{max} değerini ise 2,12 U/mL bulmuşlardır [80]. Mohamed ve ark. (2017) yaptıkları Fe_3O_4 manyetik nanopartikül üzerine HRP enzimi immobilizasyonu çalışmasında substrat olarak gayakol kullanmış ve serbest enzim için K_M değerini 31 mM ve immobilize enzim için K_M değerini 45 mM, H_2O_2 ile yaptıkları kinetik çalışmada serbest enzim için K_M değerini 5 mM, immobilize enzim için K_M değerini 7 mM bulmuşlardır [79]. Xu ve ark. (2013) ABTS substratı ile yaptıkları kinetik çalışmada serbest enzimin K_M

değerini 0,34 mM, immobilize enzimin K_M değerini 0,62 mM, serbest enzim için V_{max} değerini 133,1 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{dk}$, immobilize enzim için V_{max} değerini 99,8 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{dk}$ olduğunu tespit etmişlerdir [81]. Monier ve ark. (2010) pirogallol substratı ile yaptıkları çalışmada serbest enzim için K_M değerini 2,235 mM, immobilize enzimler için K_M değerini 2,87 ve 3,78 mM, V_{max} değerleri ise serbest için 1,153 $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, immobilize enzimler için V_{max} değerlerini 0,917 $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ve 0,656 $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olduğunu rapor etmişlerdir [82].

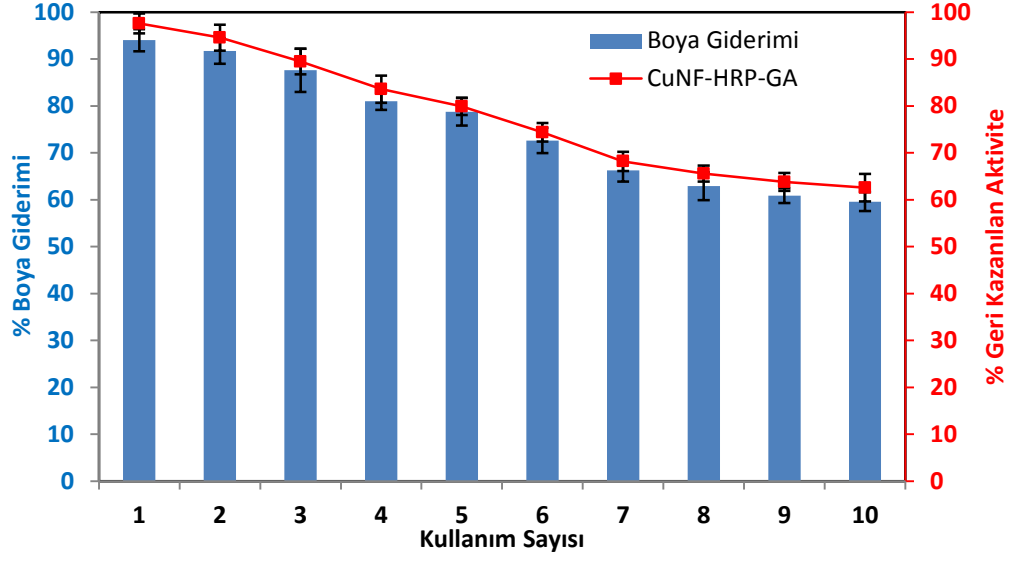
4.4.6. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği

Nanoçiçek hibrit yapılarının tekrar kullanılabilirliğini tespit etmek için 10 ppm Amarant boyasının giderimi yapıldı ve her bir kullanımdan sonra aktiviteleri standart yöntemle göre ölçüldü. HNF yapılarının 10 kullanımdan sonra ortalama aktivite gösterdiği ve boya gideriminin gerçekleştiği bulundu.

HNF ve HNF-GA yapılarının tekrar kullanılabilirliklerine ait grafikler Şekil 4.38-4.39-4.40'te gösterildi. 10 kullanım sonucunda CuNF-HRP yapısının aktivitesinin %38'ini, CuNF-HRP-GA yapısının ise aktivitesinin %63'ünü koruduğu, CaNF-HRP yapısının aktivitesinin %37'sini, CaNF-HRP-GA yapısının ise aktivitesinin %58'ini koruduğu ve MnNF-HRP yapısının aktivitesinin %35'ini, MnNF-HRP-GA yapısının ise aktivitesinin %54'ünü koruduğu saptandı.

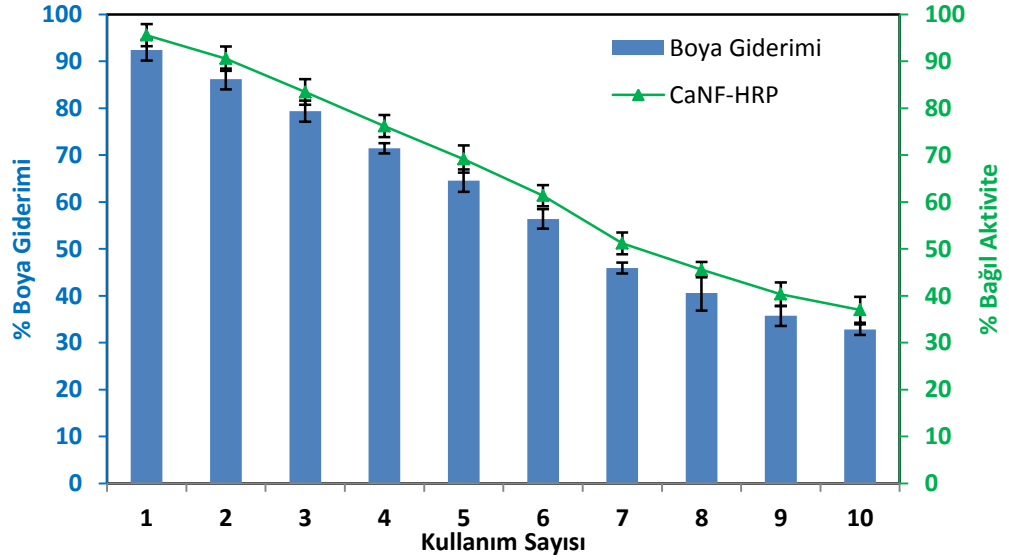


(a)

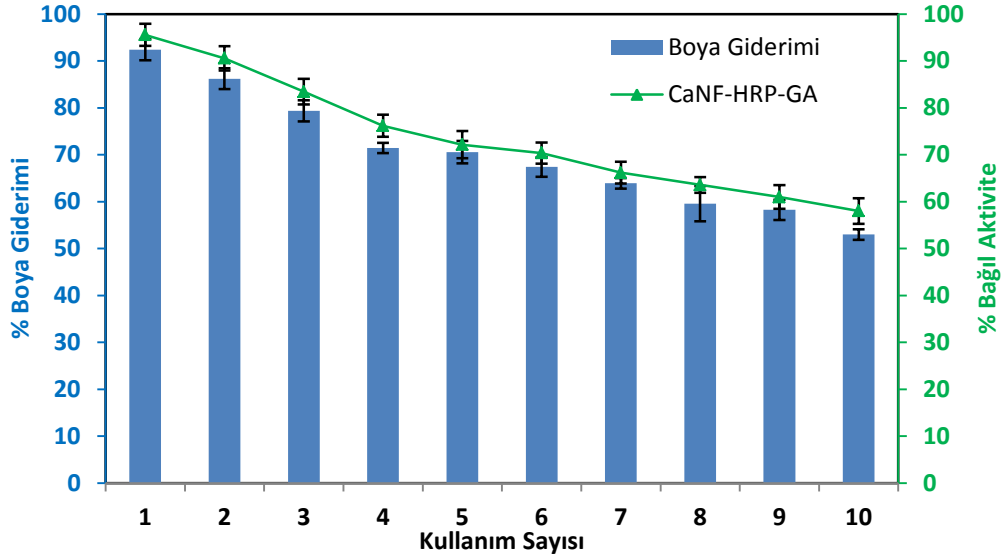


(b)

Şekil 4.38. CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA yapılarının Amarant boya giderimindeki tekrar kullanılabilirlikleri; [(a: CuNF-HRP, b: CuNF-HRP-GA) (İmmobilize enzim miktarı: 500 µL, reaksiyon süresi: 2,5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C]

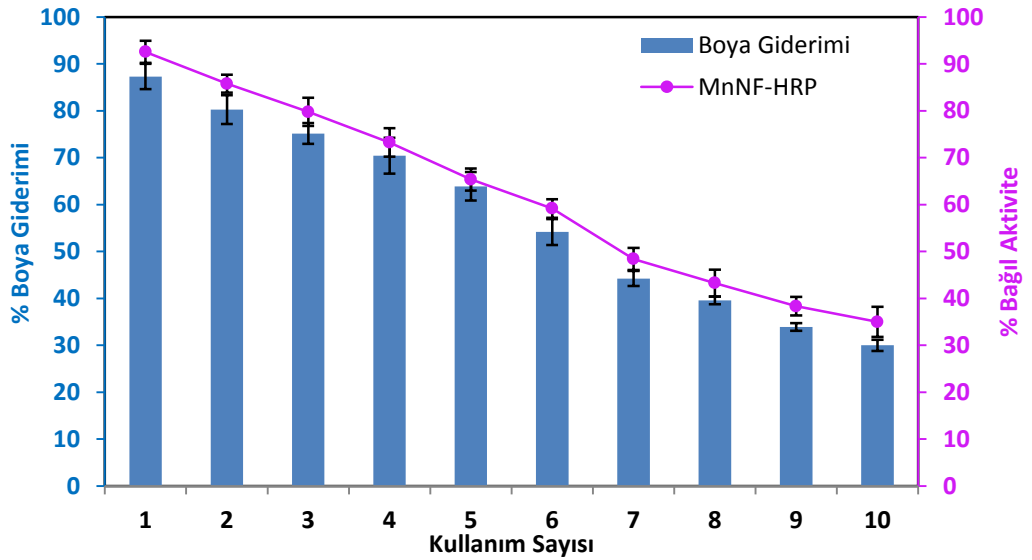


(a)

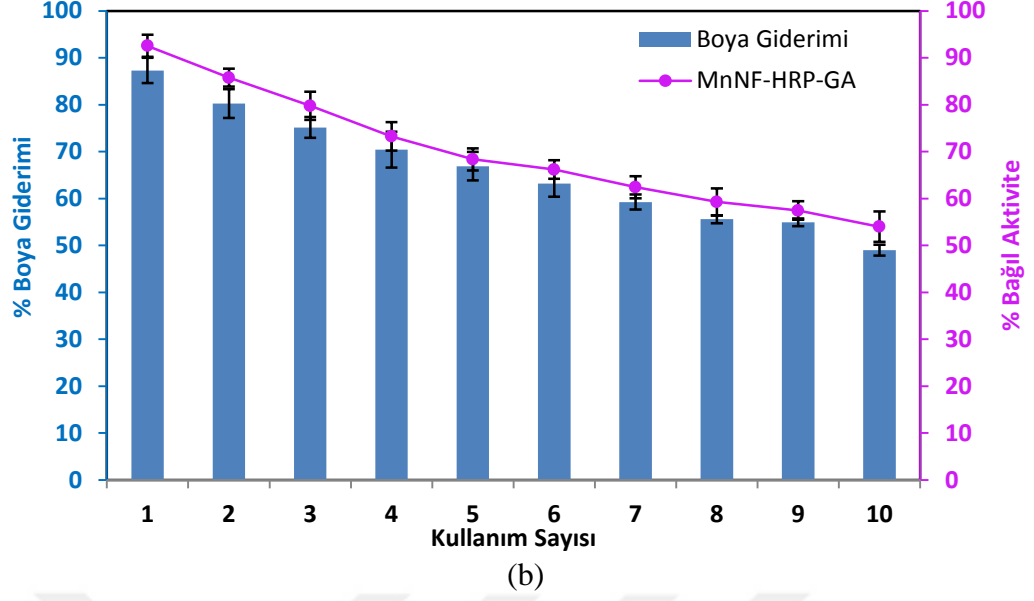


(b)

Şekil 4.39. CaNF-HRP ve CaNF-HRP-GA yapılarının Amarant boya giderimindeki tekrar kullanılabilirlikleri; [(a: CaNF-HRP, b: CaNF-HRP-GA) (İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 2,5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C)]



(a)



Şekil 4.40. MnNF-HRP ve MnNF-HRP-GA yapılarının Amaranat boya giderimindeki tekrar kullanılabilirlikleri; [(a: MnNF-HRP, b: MnNF-HRP-GA) (İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 2,5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C)]

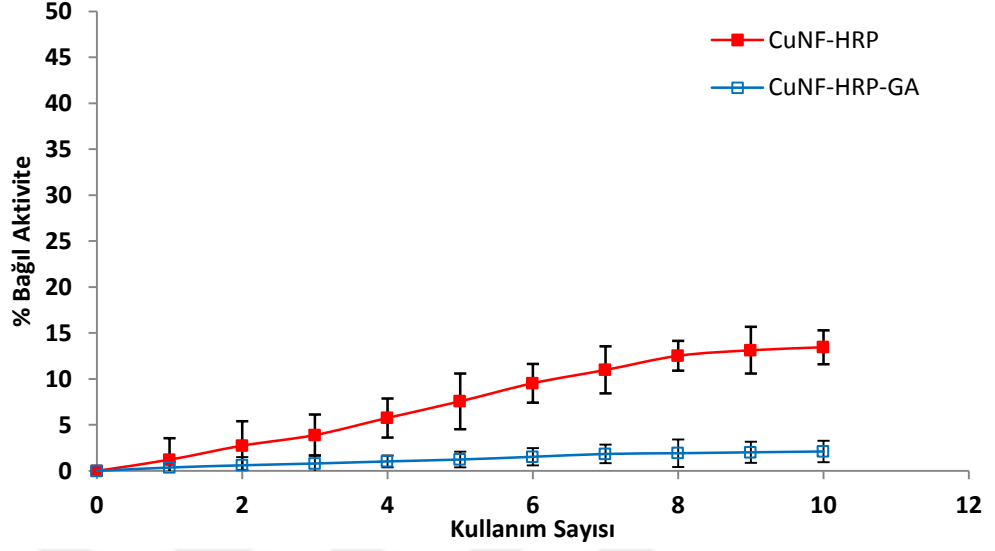
Temoçin ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada immobilize horseradish peroksidaz enzimi için 20 kullanım sonucunda aktivitenin %54'ünü koruduğunu tespit etmişlerdir [83]. Patel ve ark. (2018) nanoçiçek yapılarının 10 kullanım sonucunda aktivitelerinin %40,2 aktivitelerini koruduğunu rapor etmişlerdir [84].

4.4.7. Enzim Kaçışı

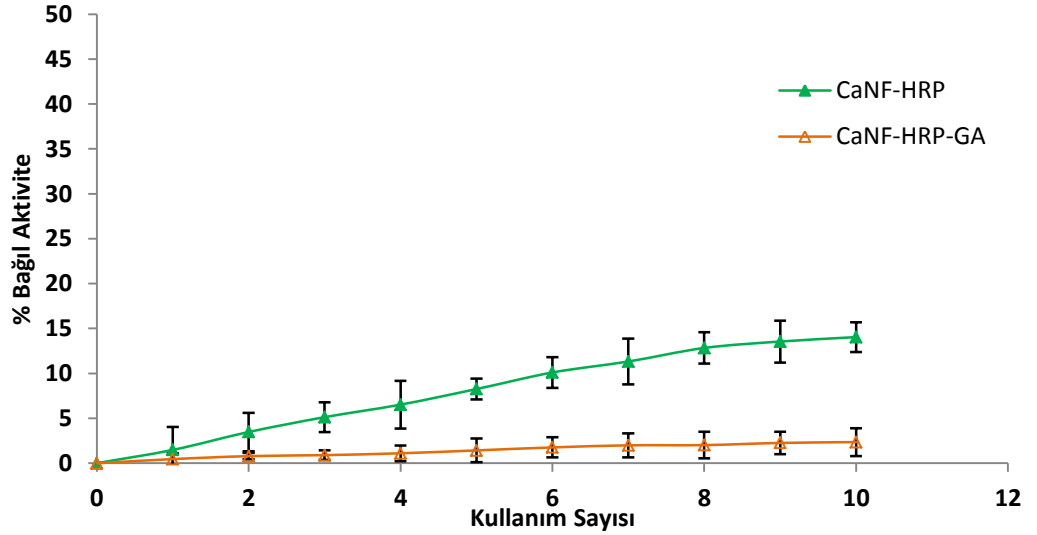
Nanoçiçek hibrit yapılarından enzim kaçışına ait grafikler Şekil 4.41-4.42-4.43'te gösterilmiştir. Aynı yapılar ile 10 kez tekrarlanan aktivite ölçümü sonucunda; HNF ve HNF-GA yapılarının enzim kaçış oranları % olarak bulundu.

CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarından enzim kaçışı grafiği Şekil 4.41'de incelendiğinde, 10. kullanımda enzim kaçış oranının CuNF-HRP için %13,45, CuNF-HRP-GA için %1,11, CaNF-HRP ve CaNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının enzim kaçışı grafiği Şekil 4.42'de incelendiğinde, 10. kullanımda enzim kaçış oranının CaNF-HRP için %14,04, CaNF-HRP-GA için %1,35, MnNF-HRP ve MnNF-HRP-GA nanoçiçek yapılarının enzim kaçışı grafiği Şekil 4.43'te

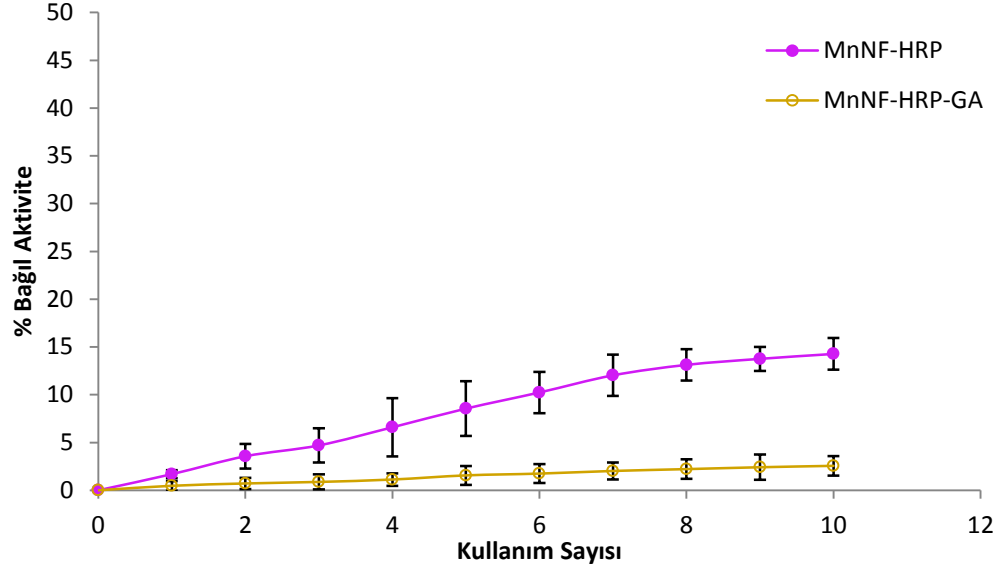
incelendiğinde, 10. Kullanımda enzim kaçış oranının MnNF-HRP için %14,27, MnNF-HRP-GA için %1,56 olduğu tespit edildi.



Şekil 4.41. CuNF-HRP ve CuNF-HRP-GA yapılarının enzim kaçışı grafiği



Şekil 4.42. CaNF-HRP ve CaNF-HRP- GA yapılarının enzim kaçışı grafiği



Şekil 4.43. MnNF-HRP ve MnNF-HRP- GA yapılarının enzim kaçıışı grafiği

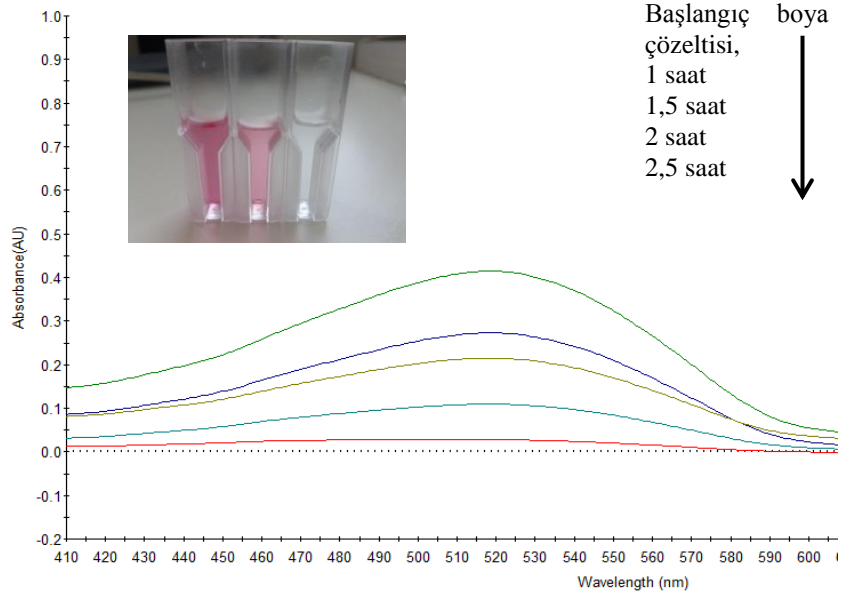
Sonuç olarak yaptığımız çalışmada HRP-hibrit nanoçiçek yapılarının glutaraldehit ile çapraz bağlanması, bu yapılardan enzim kaçışını büyük ölçüde engelleyerek stabiliteğini arttırdığı bulundu.

Literatürde Patel ve ark. (2018) sentezledikleri lakkaz nanoçiçek yapılarının enzim kaçış oranlarını 10 kullanımdan sonra %40,2, glutaraldehit çapraz bağlı nanoçiçek yapılarının 10 kullanımdan sonra %3,9 enzim kaçış oranı gösterdiğini rapor etmişlerdir [84].

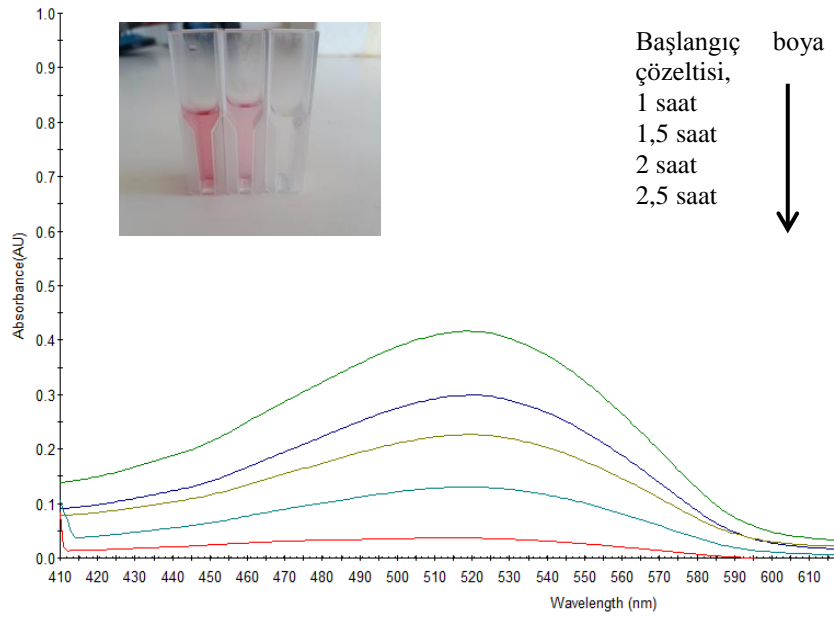
4.5. HNF-HRP Yapıları İle Boya Giderimi

Çalışmanın ikinci aşamasında elde edilen horseradish peroksidaz hibrit nanoçiçek yapılarının endüstriyel uygulaması olarak tekstil boyalarının giderimi incelendi. Model boya olarak Amarant, Kristal Viöle, ve Tartrazin boya kullanıldı. Boyaların CuNF-HRP, CaNF-HRP ve MnNF-HRP immobilize enzimler tarafından zamana bağlı boya giderimi incelendi ve giderim oranları aşağıdaki formül ile hesaplandı:

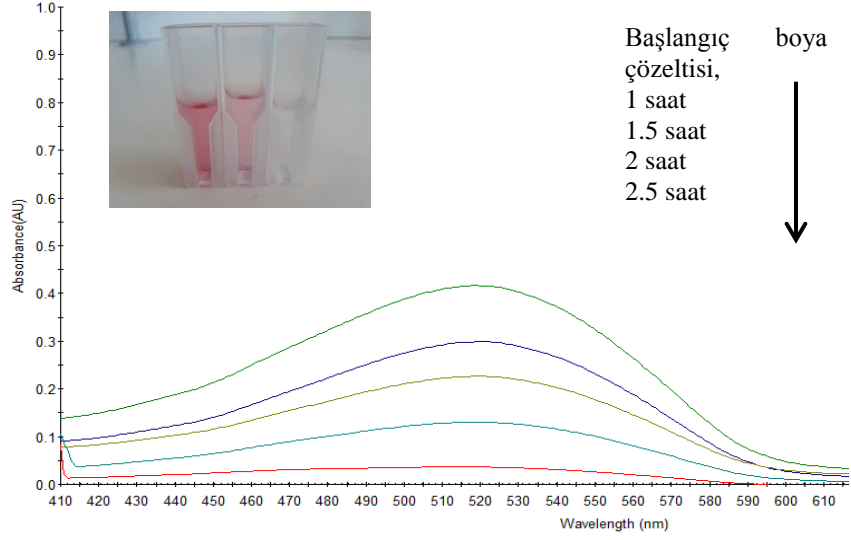
$$\% \text{ Boya Giderimi} = \frac{\Delta A_{(t-o)}}{A_0} \times 100 \quad (8)$$



(a)

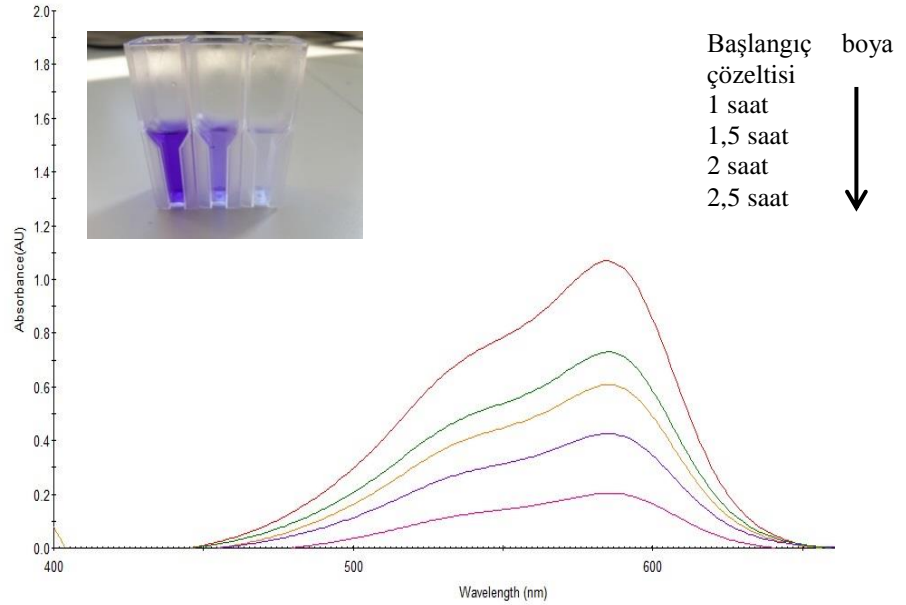


(b)

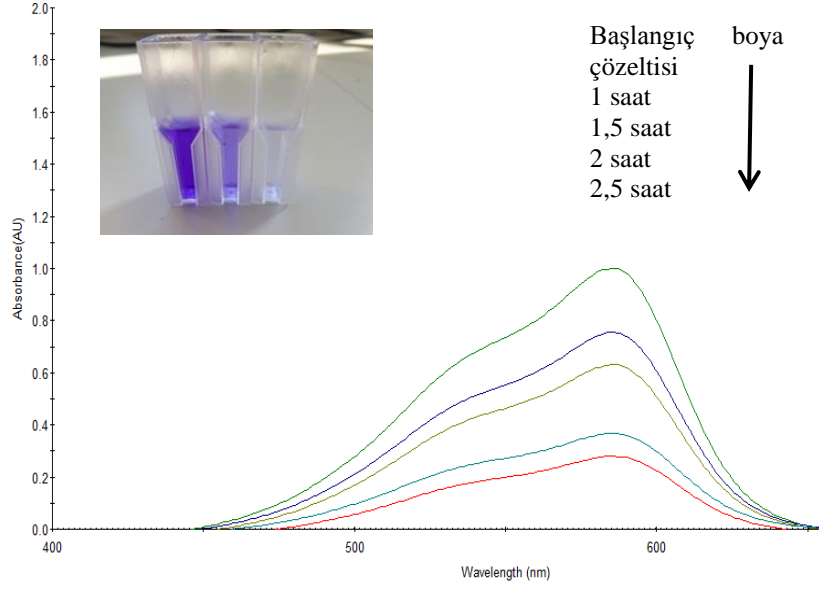


(c)

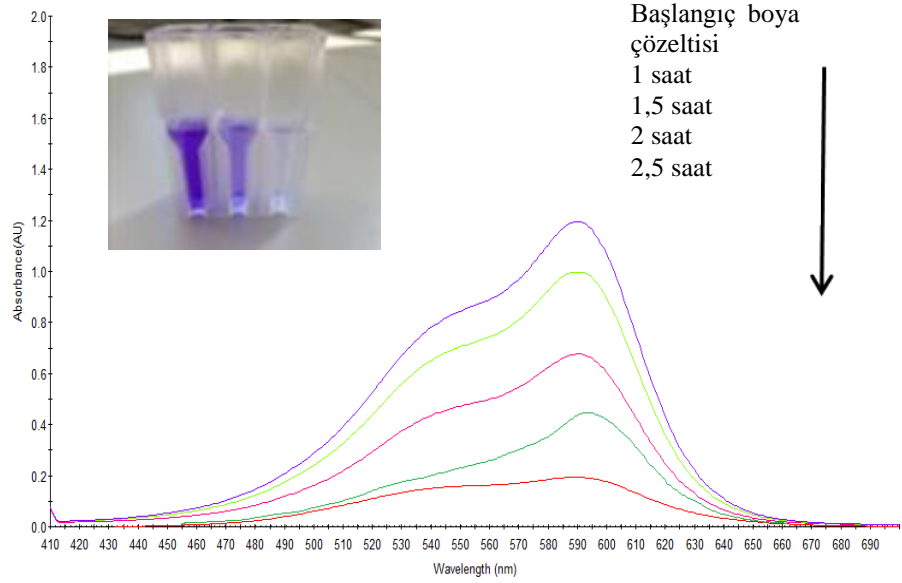
Şekil 4.44. HNF-HRP immobilize enzimlerinin Amaranth boyasının gideriminde elde edilen UV-Vis spektrumları ve Amaranth boyasının başlangıç, 1 saat ve 2,5 saat gideriminden sonraki görünümü [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 2,5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]



(a)

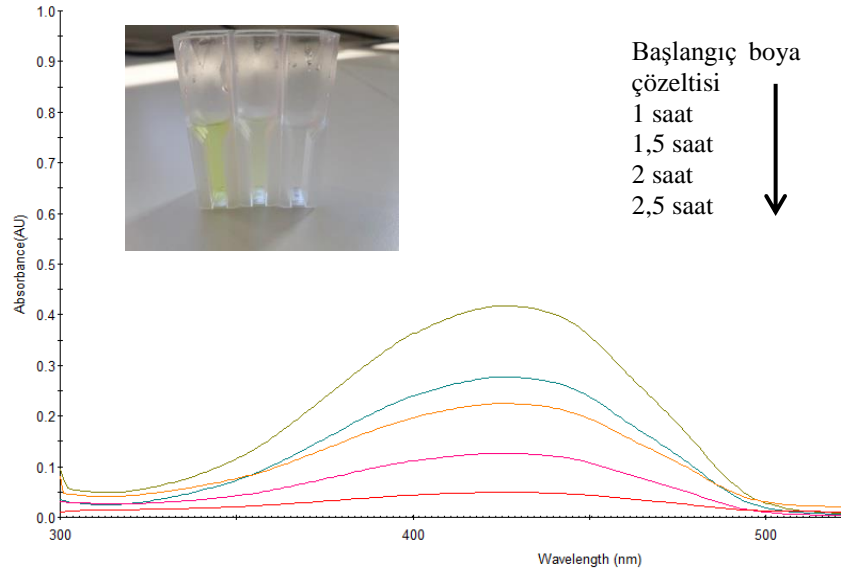


(b)

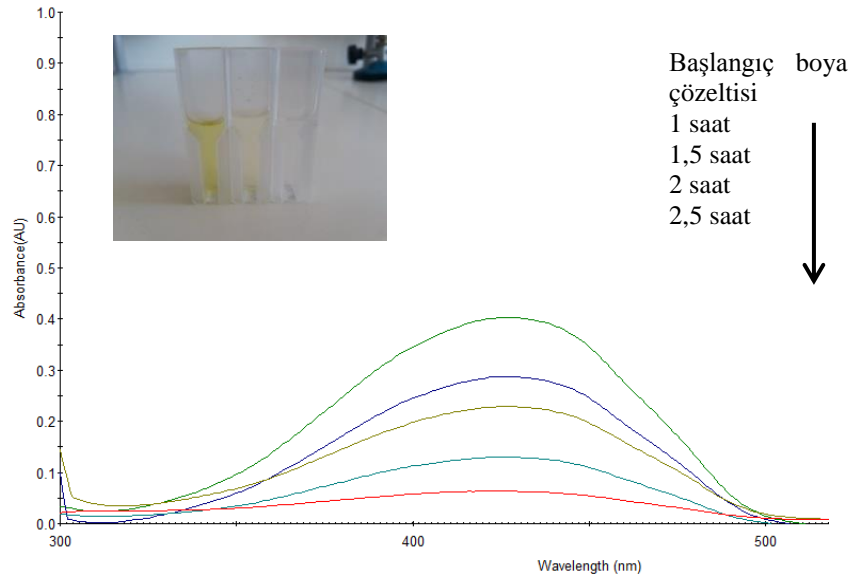


(c)

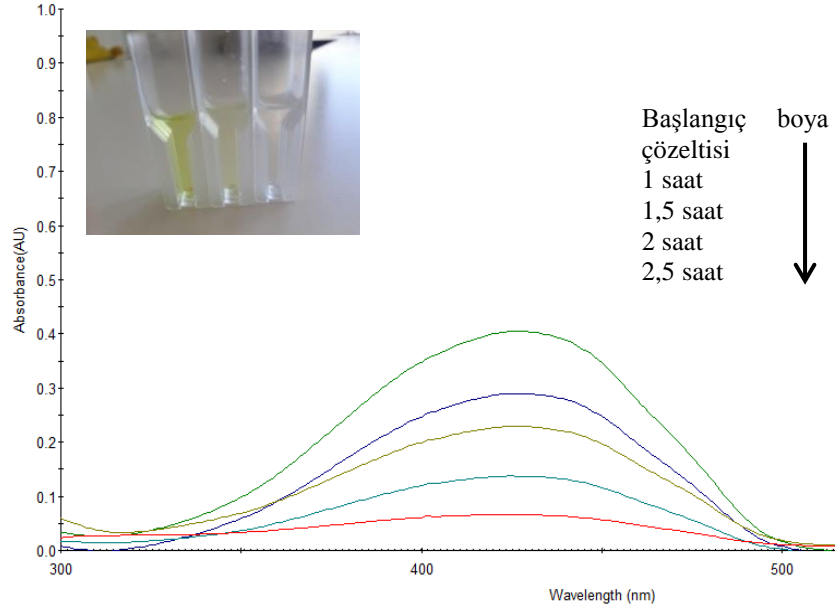
Şekil 4.45. HNF-HRP immobilize enzimlerinin Kristal Viole boyasının gideriminde elde edilen UV-Vis spektrumları ve Kristal Violet boyasının başlangıç, 1 saat ve 2,5 saat gideriminden sonraki görünümü [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 2,5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]



(a)



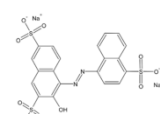
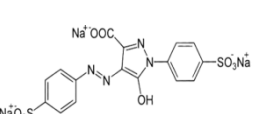
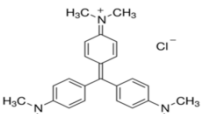


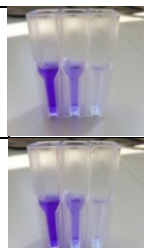



(b)



(c)

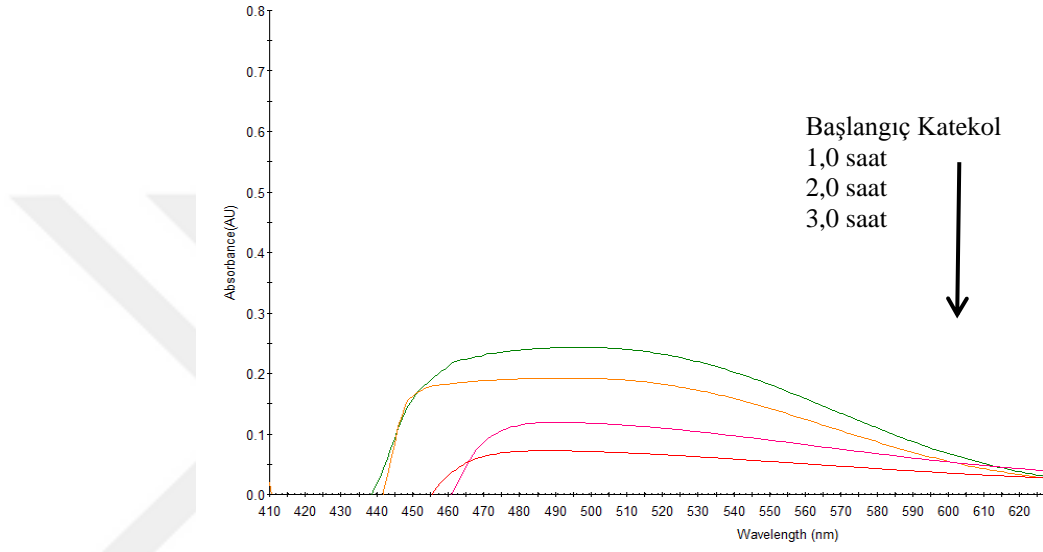
Şekil 4.46. HNF-HRP immobilize enzimlerinin Tartrazin boyasının gideriminde elde edilen UV-Vis spektrumları ve Tartrazin boyasının başlangıç, 1 saat ve 2,5 saat gideriminden sonraki görünümü [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 2,5 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, boya konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]

Tablo 4. 9. Sentezlenen HNF-HRP yapıları ile % boya giderimi

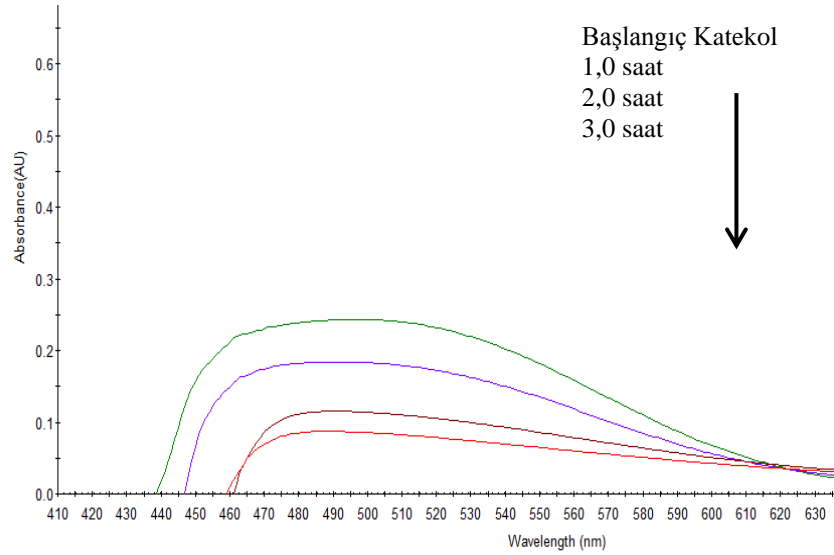
| HNF Yapıları | Amarant | Tartrazin | Kristal Viole | | |
|--------------|---|--|---|--|--|
| | % Boya Giderimi | | | | |
| CuNF-HRP |  96 |  90 |  82 | | |
| CaNF-HRP |  91 |  84 |  81 | | |
| MnNF-HRP |  89 |  81 |  80 | | |

4.6. İmmobilize Horseradish Peroxidase Enzimleri İle Fenolik Bileşik Oksidasyonu

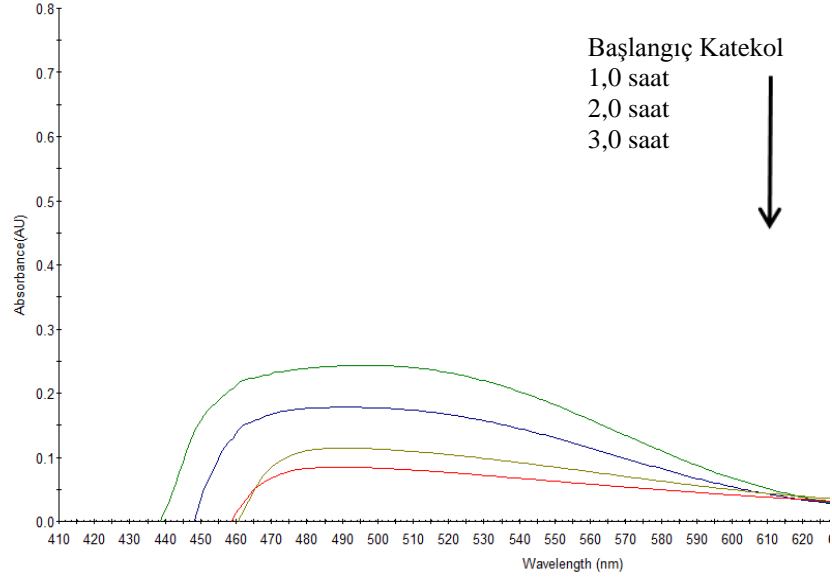
İmmobilize enzimlerin fenolik bileşik oksidasyonu çalışmasında fenolik bileşik olarak katekol, pirogallol, fenol, L-tirozin ve gayakol bileşikleri kullanıldı. Fenolik bileşiklerin CuNF-HRP, CaNF-HRP ve MnNF-HRP immobilize enzimler tarafından yarım saat, 1 saat, 2 saat ve 3 saat sürelerinde alınan UV-Vis spektrum tarama sonuçları etkili bir fenolik bileşik oksidasyonu gerçekleştirildiğini gösterdi.



(a)

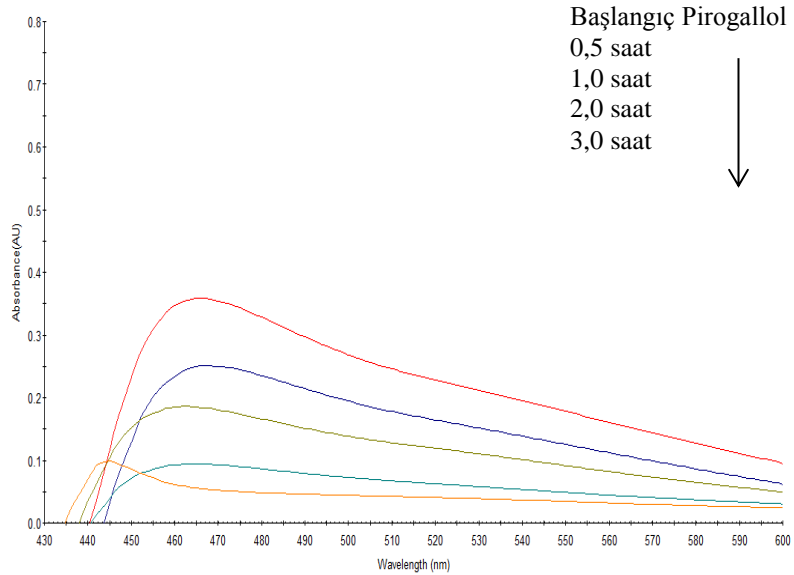


(b)

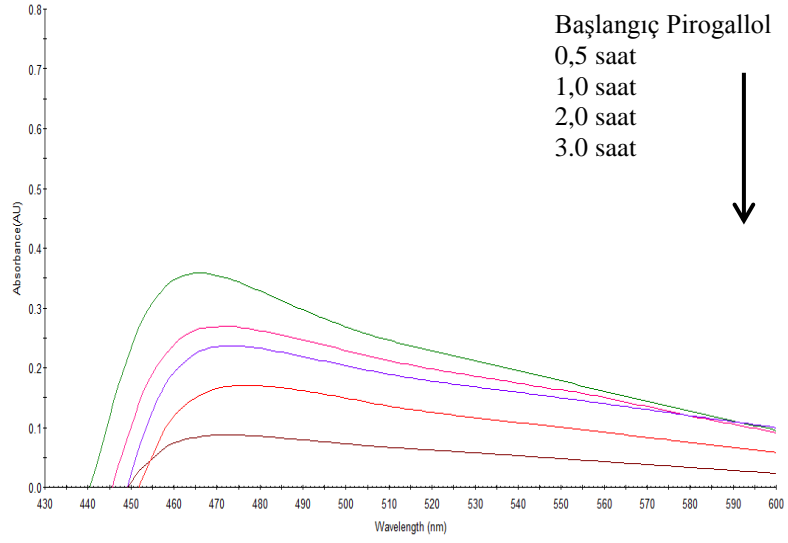


(c)

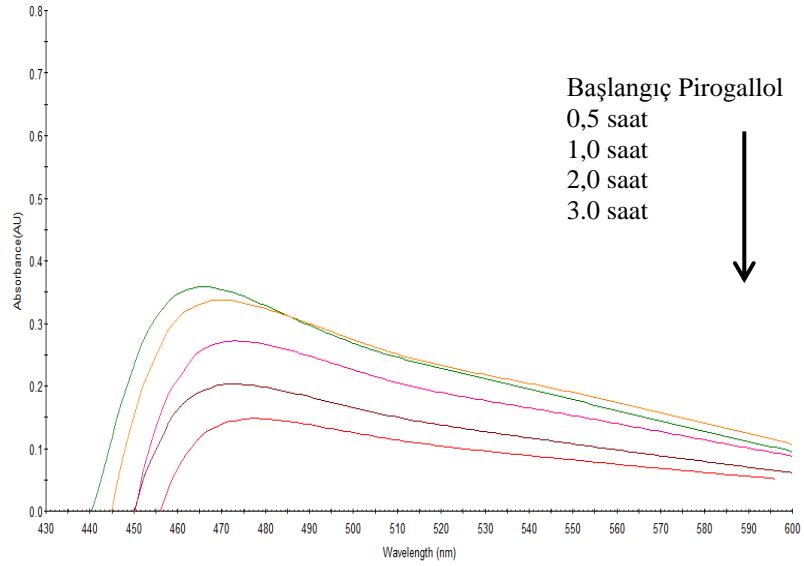
Şekil 4.47. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Katekol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25⁰C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]



(a)

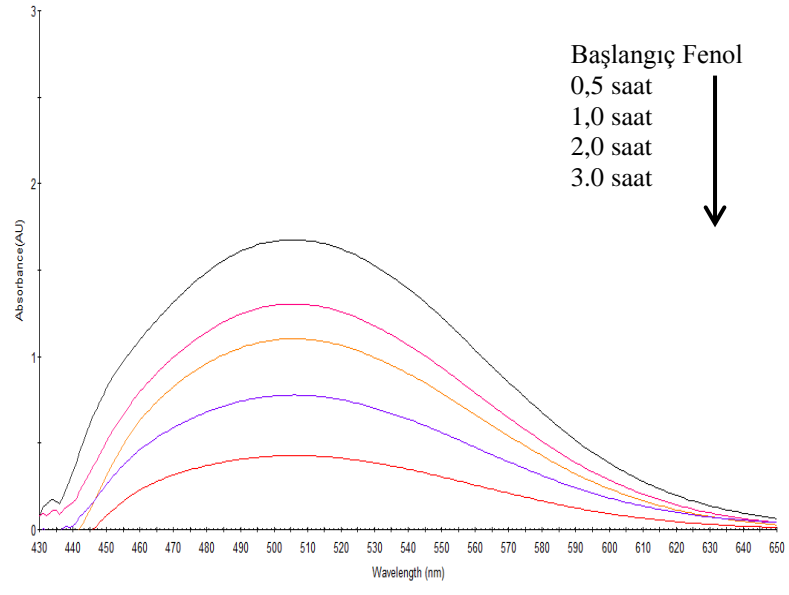


(b)

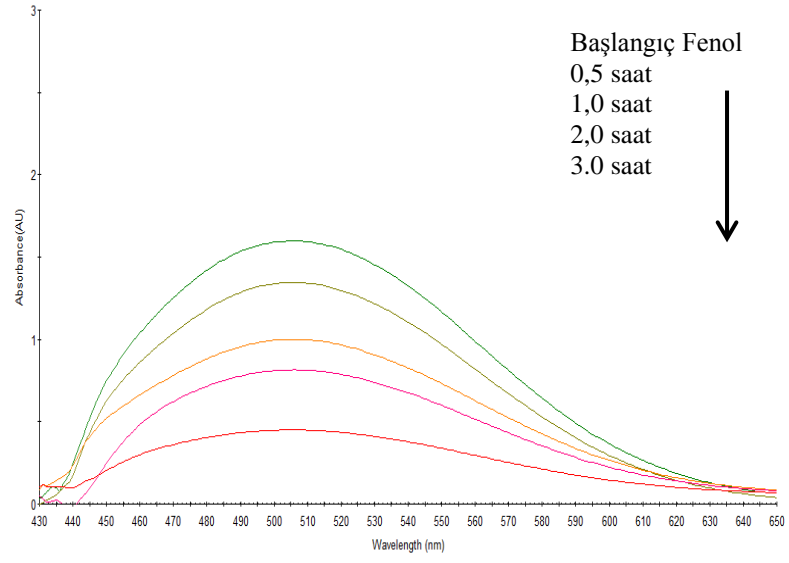


(c)

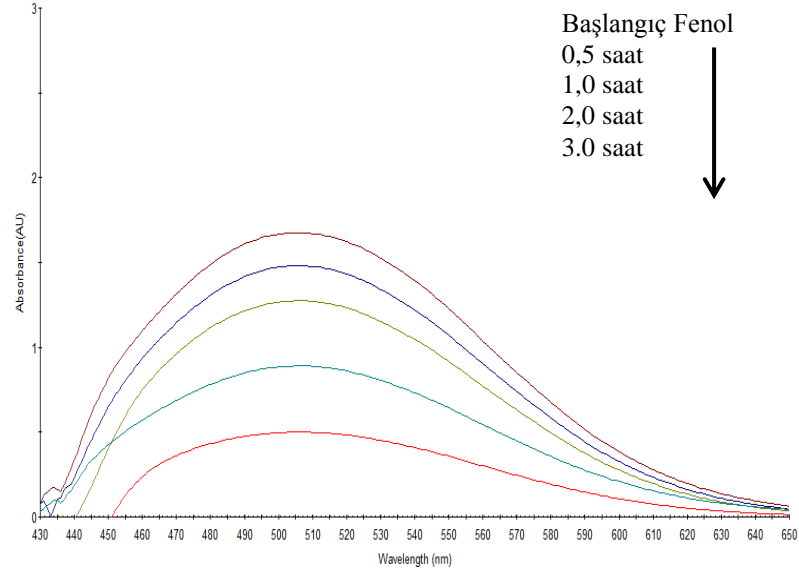
Şekil 4.48. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Pirogallol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]



(a)

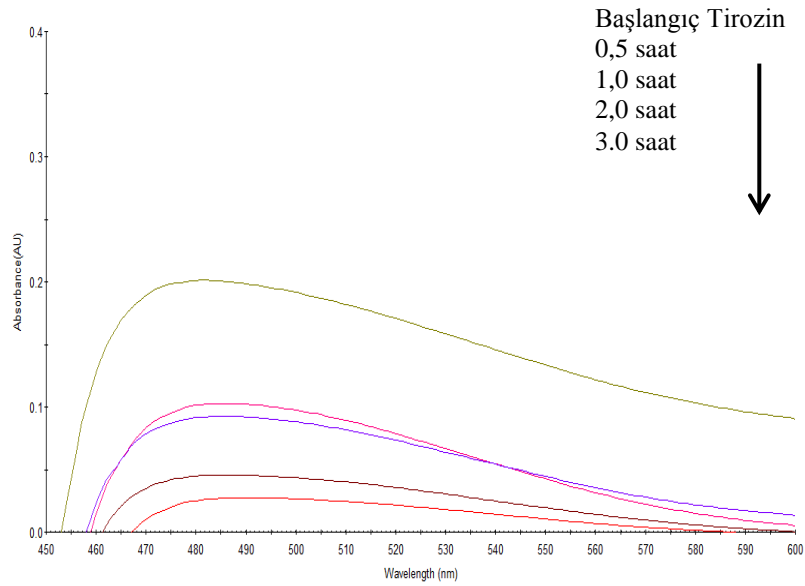


(b)

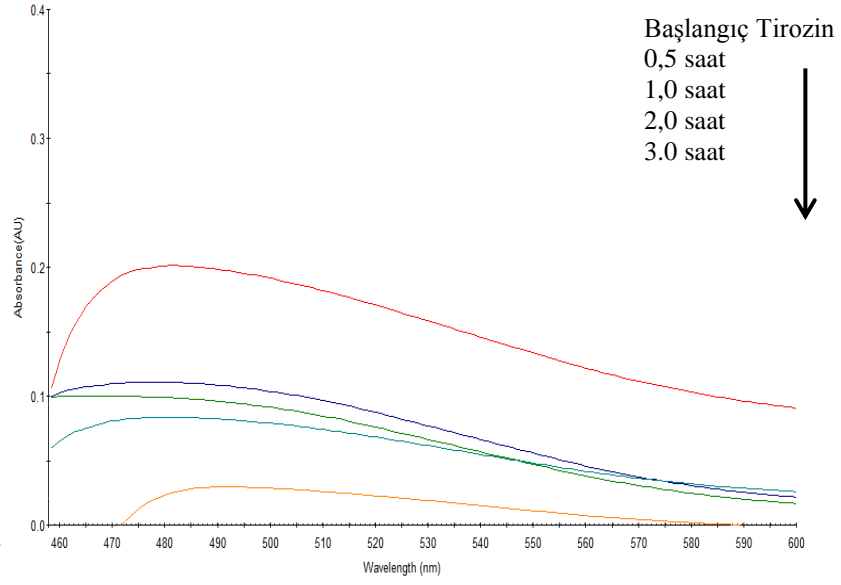


(c)

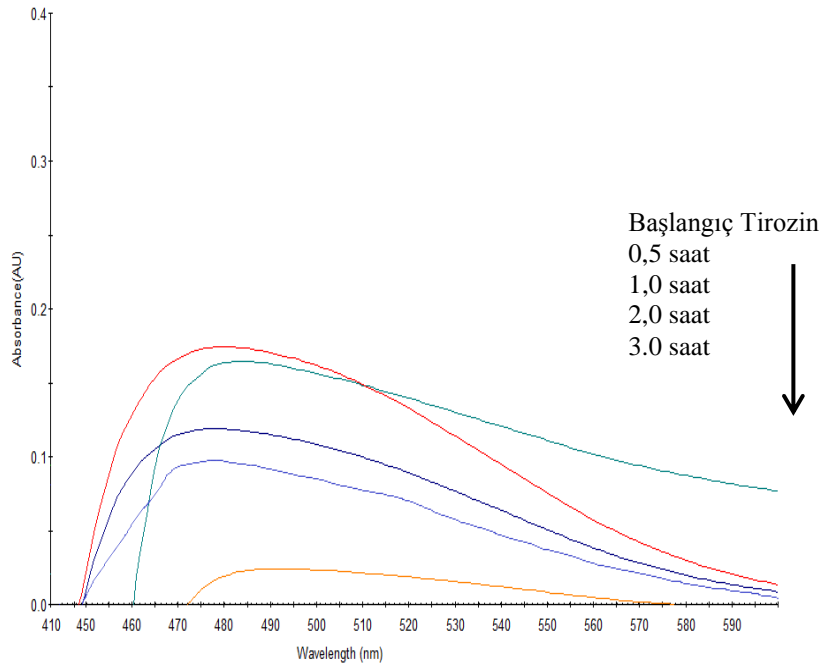
Şekil 4.49. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Fenol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]



(a)

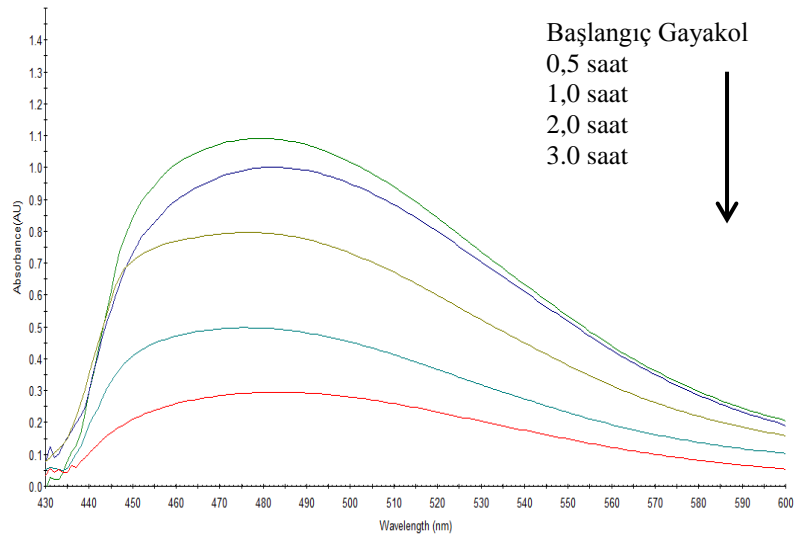


(b)

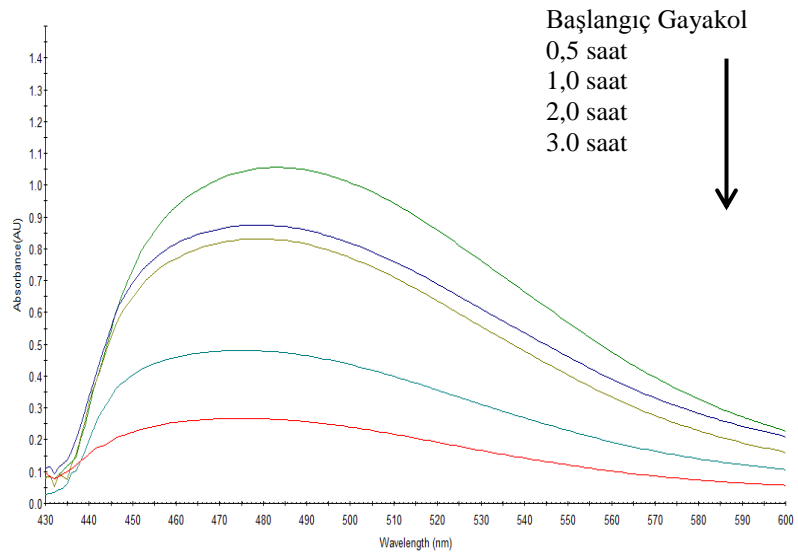


(c)

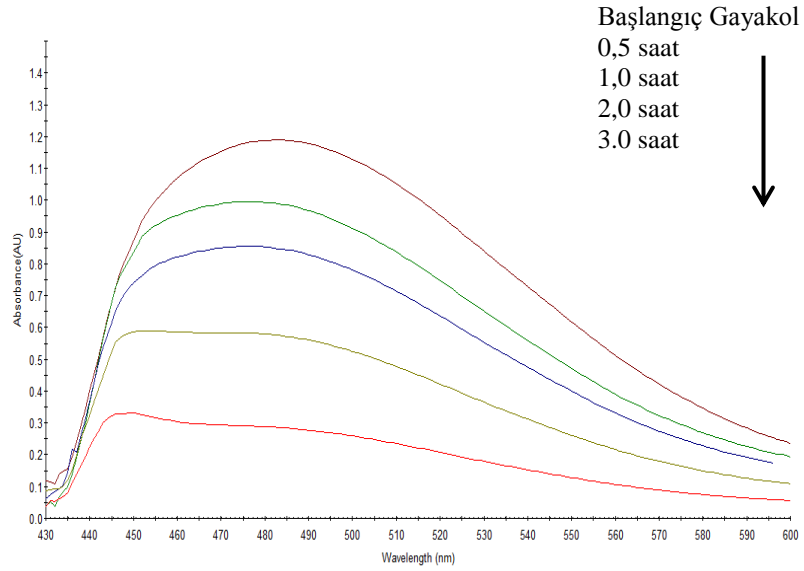
Şekil 4.50. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Tirozin oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]



(a)



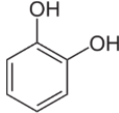
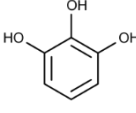
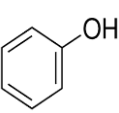
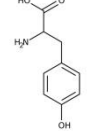
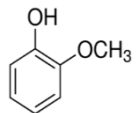
(b)



(c)

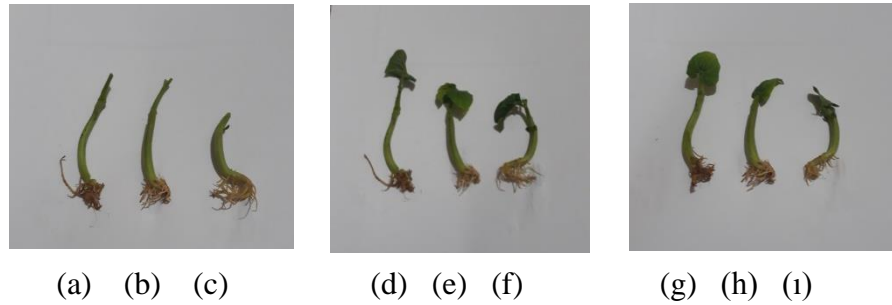
Şekil 4.51. HNF-HRP immobilize enzimleri ile Gayakol oksidasyonunda elde edilen UV-Vis spektrumları [(İmmobilize enzim miktarı: 500 μ L, reaksiyon süresi: 3 saat, reaksiyon hacmi: 5 mL, fenolik bileşik konsantrasyonu: 10 ppm, karıştırma hızı: 20 rpm, sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C) (a:CuNF-HRP, b:CaNF-HRP, c:MnNF-HRP)]

Tablo 4.10. Sentezlenen HNF-HRP yapıları ile % fenolik bileşik oksidasyonu

| HNF Yapıları | % Fenolik Bileşik Oksidasyonu | | | | |
|--------------|--|---|---|--|--|
| | Katekol  | Pirogallol  | Fenol  | Tirozin  | Gayakol  |
| CuNF-HRP | 74 | 78 | 78 | 91 | 75 |
| CaNF-HRP | 68 | 75 | 76 | 89 | 73 |
| MnNF-HRP | 65 | 73 | 72 | 88 | 71 |

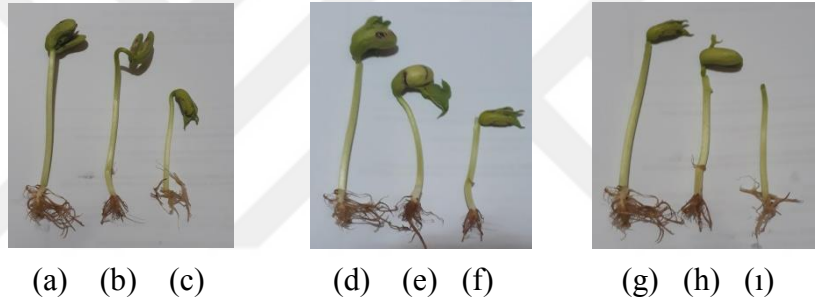
4.7. Fitotoksisite Çalışması

Atık sularda boya veya fenolik bileşik gideriminden sonra, atık suyun kullanılabilirliklerinin ve toksisitelerinin belirlenmesi amacı ile fitotoksisite çalışması yapıldı. Bu deneyde kontrol örneğinde, boya gideriminden önce ve sonraki çözeltilerde fasulye tohumları çimlendirilerek çimlenme indeksi (GI) hesaplandı. Toksik etkili bileşenlerin varlığına karşı duyarlı olan kök uzaması ve tohum çimlenmesi ölçümleri dikkate alındı. Fasulye bitkisinin kontrol grubunda ortalama kök uzunluğu $8\pm0,2$ cm ölçüldü ve %100 olarak kabul edildi. CuNF-HRP immobilize enzimi ile giderilen amarant boyasında fasulye bitkisi yetiştirildi ve 1 hafta sonraki kök uzunluğu $7,8\pm0,2$ cm olarak ölçüldü. Arıtılmamış amarant boya çözeltilerinde yetiştirilen fasulye bitkisinin kök uzunluğu ise $6,2\pm0,2$ cm olarak ölçüldü. CuNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen tartrazin boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $7\pm0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış tartrazin boyasında büyütülen fasulye bitkisinin boyutu $5,2\pm0,2$ cm olarak ölçülmüştür. CuNF immobilize enzimi ile inkübe edilen kristal viole boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $6,6\pm0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış tartrazin boyasında büyütülen fasulye bitkisinin boyutu $5,0\pm0,2$ cm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.52)



Şekil 4.52. CuNF-HRP yapısı ile arıtılmış boyalarda yetiştirilen tohumların kök boyutları [(a; kontrol, b; amarant boyası giderim sonrası, c; amarant boyası), (d;kontrol, e; tartrazin boyası giderim sonrası, f; tartrazin boyası), (g; kontrol, h; kristal viole boyası giderim sonrası, i; kristal viole boyası)(Yetiştirme süresi: 1 hafta, sıcaklık: 25°C)].

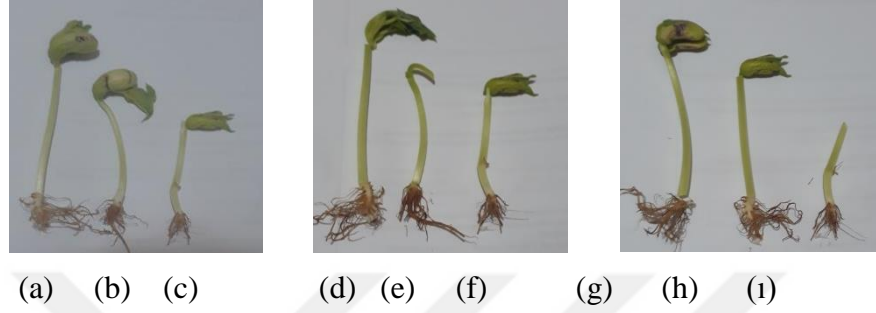
Fasulye bitkisinin kontrol grubunda ortalama kök uzunluğu $8\pm 0,2$ cm'dir ve %100 olarak kabul edilmiştir. CaNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen amarant boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $7,6\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış amarant boya çözeltisinde yetiştirilen fasulye bitkisinin kök uzunluğu ise $6,2\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. CaNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen tartrazin boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $6,9\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış tartrazin boyasında büyütülen fasulye bitkisinin boyutu $5,2\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. CaNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen kristal viole boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $6,3\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış kristal viole boyasında büyütülen fasulye bitkisinin boyutu $5,0\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.53)



Şekil 4.53. CaNF-HRP yapısı ile arıtılmış boyalarda yetiştirilen tohumların kök boyutları [(a; kontrol, b; amarant boyası giderim sonrası, c; amarant boyası), (d;kontrol, e; tartrazin boyası giderim sonrası, f; tartrazin boyası), (g; kontrol, h; kristal viole boyası giderim sonrası, i; kristal viole boyası) (Yetiştirme süresi: 1 hafta, sıcaklık: 25°C)]

Fasulye bitkisinin kontrol grubunda ortalama kök uzunluğu $8\pm 0,2$ cm'dir ve %100 olarak kabul edilmiştir. MnNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen amarant boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $7,55\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış amarant boya çözeltisinde yetiştirilen fasulye bitkisinin kök uzunluğu ise $6,2\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. MnNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen tartrazin boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $6,7\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış tartrazin boyasında büyütülen fasulye bitkisinin boyutu $5,2\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür.

CaNF-HRP immobilize enzimi ile inkübe edilen kristal viole boyası ile büyütülen fasulye bitkisinin 1 hafta sonraki kök uzunluğu $6,0\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür. Arıtılmamış kristal viole boyasında büyütülen fasulye bitkisinin boyutu $5,0\pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.54)



Şekil 4.54. MnNF-HRP yapısı ile arıtılmış boyalarda yetiştirilen tohumların kök boyutları [(a; kontrol, b; amaranth boyası giderim sonrası, c; amaranth boyası), (d; kontrol, e; tartrazine boyası giderim sonrası, f; tartrazine boyası), (g; kontrol, h; kristal viole boyası giderim sonrası, i; kristal viole boyası) (Yetiştirme süresi: 1 hafta, sıcaklık: 25°C)]

Sonuç olarak arıtılmış boya çözeltilerinde, arıtılmamış boya çözeltilerine oranla daha büyük kök uzunlukları olduğu, bu da bitkilerin arıtılmış atık boyalarda büyütülebileceği anlamına gelmektedir. Arıtılmamış boyalardaki kök uzama oranına bakıldığında, kristal viole boyasının daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürde Bilal ve ark. (2016) HRP enzimiyle çalıştıkları denemelerde boya giderimi yapmış ve fitotoksitelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, boyaların fitotoksite analizi, yaygın bir tarımsal ürün fidesi (*T. aestivum*) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre %60 ile %80 arasında değişen çeşitli kök uzamaları olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, muamele edilmemiş boya numuneleri ile çimlendirilmiş bitki fidelerinde, boya çözeltilerinin bitkinin hayatta kalması üzerindeki toksik etkisine işaret kök uzaması inhibe edilmiştir. Aksine, immobilize HRP enzimi ile muamele edilmiş boya numunelerinde kök ve sürgün uzunluklarında önemli ölçüde uzaması olan bitki tohumlarının %80'inde çimlenme

gözlendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, muamele edilmiş boya numunelerinde filizlenme ve kök uzunluklarına ilişkin çimlendirilen bitkilerin sağlıklı durumu, immobilize edilmiş enzimin kompleks boyaları toksik olmayan bir forma dönüştürme rolünün önemine vurgu yapmışlardır [85].

Tablo 4.11. % Çimlenme indeksi

| HNF Yapıları | | Amarant | Tartrazin | Kristal Viole |
|---------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------------|
| CuNF-HRP | Kontrol | 100 | 100 | 100 |
| | Giderim Sonrası | 98 | 87 | 82 |
| | Boya Çözeltisi | 77 | 65 | 62 |
| CaNF-HRP | Kontrol | 100 | 100 | 100 |
| | Giderim Sonrası | 95 | 86 | 78 |
| | Boya Çözeltisi | 77 | 65 | 62 |
| MnNF-HRP | Kontrol | 100 | 100 | 100 |
| | Giderim Sonrası | 94 | 84 | 75 |
| | Boya Çözeltisi | 77 | 65 | 62 |

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, inorganik kısım için farklı metal iyonları (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) ile organik kısım için horseradish peroxidase enzimi kullanılarak inorganik-organik hibrit nanoçiçek (HNF) yapıları sentezlendi ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Sentezlenen hibrit nanoçiçek yapıları GA ile çapraz bağlanarak stabilitelelerdeki artış karşılaştırmalı olarak çalışıldı.

Yapılan çalışmalarda, sentezlenen HNF yapılarının SEM analizi ile 72 saat sonunda çiçek benzeri gözenekli yapılarının oluştuğu, enzimsiz nanoçiçek yapıları ile enzimli hibrit nanoçiçek yapılarının FT-IR analizleri yapılarak, hibrit nanoçiçeklerdeki enzim immobilizasyonunun gerçekleştiği, EDX analizleri yapılarak C, O ve N miktarlarının haritalanması ile yapılarındaki elemental değişim oranının HRP'nin yapıya katılmasıyla arttığı ve XRD analizi yapılarak, XRD spektrumlarının kristal yapılar için uyumlu olduğu görüldü.

Serbest ve immobilize HNF yapılarının optimum koşullarının belirlenmesi için yapılan pH ve sıcaklık çalışmaları sonucunda, serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH değerleri 6,0 olarak belirlendi. Stabil pH değerinin ise değişmediği, bazik bölgeye kayıldıkça aktivitenin ve stabilitenin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca GA ile çapraz bağlanan HNF yapılarının stabilitelelerinin normal HNF yapılarına göre daha iyi olduğu ve optimum pH değerinin değişmediği gözlemlendi.

Yapılan optimum sıcaklık çalışması sonucunda, serbest ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık değerinin 40°C olduğu tespit edildi. Termal stabilite sonuçlarına bakıldığında, 70°C 'de serbest enzimin aktivitesini tamamen yitirdiği gözlenirken immobilize enzimlerin ise aktivitelerinin $40-50^{\circ}\text{C}$ arasında değiştiği gözlemlendi. Glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlı HNF yapılarının, normal HNF yapılarına oranla sıcaklık koşullarına daha dayanıklı olduğu tespit edildi.

Serbest ve immobilize HNF yapıları kinetik çalışmada gayakol substrat olarak kullanıldığında serbest enzimin K_M ve V_{\max} değeri sırasıyla 10,71 mM ve 29,85 U/mL bulundu. CuNF-HRP için K_M ve V_{\max} değeri 12,15 mM ve 25,70 U/mg,

CaNF-HRP için K_M ve V_{max} değeri 12,83 mM ve 25,38 U/mg, MnNF-HRP için K_M ve V_{max} değeri 13,31mM ve 25,57 U/mg bulundu.

Serbest ve immobilize enzimler için yapılan substrat spesifikliği çalışmasında en yüksek aktivitenin gayakol substratı ile okunduğu, daha sonra aktivite sıralaması pirogallol > 4-metil katekol > tirozin > katekol > ABTS >4-AAP >gallik asit olduğu bulundu.

HNF yapılarındaki enzim kaçışı sonuçları incelendiğinde, CuNF-HRP'nin 10. kullanımda %13,45 enzim kaçışı olduğu, CuNF-HRP-GA'nın 10. kullanımda %1,11 enzim kaçışının olduğu tespit edildi. CaNF-HRP'nin 10. kullanımda %14,04 enzim kaçışı olduğu, CaNF-HRP-GA'nın 10. kullanımda %1,35 enzim kaçışının olduğu tespit edildi. MnNF-HRP'nin 10. kullanımda %14,27 enzim kaçışı olduğu, MnNF-HRP-GA'nın 10. kullanımda %1,56 enzim kaçışının olduğu tespit edildi.

HNF yapılarının boya giderimde tekrar kullanılabilirliği çalışıldı ve 10 kullanım sonucunda aktivitelerinin; CuNF-HRP için %38 kadarını gösterdiği, CuNF-HRP-GA için %63, CaNF-HRP için %37 kadarını gösterdiği, CaNF-HRP-GA için %58, MnNF-HRP için %35, MnNF-HRP-GA için %54 kadarını gösterdiği tespit edildi. Bu farklanmanın HNF yapılarındaki farklılık ve immobilizasyon veriminden kaynaklandığı düşünölmektedir.

HNF yapıları ile yapılan boya giderimi çalışmasında Amarant, Tartrazin ve Kristal Viole boyaları kullanıldı. CuNF-HRP immobilize enzimi için bu boyalardaki giderim %'leri sırası ile %96, %90 ve %82 bulundu. CaNF-HRP immobilize enzimi için bu boyalardaki giderim %'leri sırası ile %94, %84 ve %81 olarak bulundu. MnNF-HRP immobilize enzimi için bu boyalardaki giderim %'leri sırası ile %89, %81 ve %80 olarak bulundu.

Hibrit nanoçiçek yapılarını sentezlemek için organik bileşen olarak Horseradish peroxidase enzimi seğıildi. Metalloenzim özelliğindeki HRP, H_2O_2 varlığında spesifik olarak birkaç organik ve inorganik substratı katalize eder. HRP, yüksekatalitik aktivite, yüksek hassasiyet ve substrat spesifikliği dahil olmak üzere benzersiz özelliklere sahiptir. Bu özellikler nedeniyle HRP, fenolik bileşiklerin ve

diğer kirleticilerin sulardan uzaklaştırılması, biyosensör tasarımı ve analitik organik sentez gibi çeşitli uygulamalarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve kullanılmaktadır.

Optimum pH ve sıcaklık, kinetik parametreler, tekrar kullanılabilirlik, HRP-HNF'lerin pH ve ısı kararlılığı da incelenmiştir. Ayrıca yaptığımız çalışmada HRP-HNF'lerin atıksulardaki bazı sentetik boya ların giderilmesinde potansiyel kullanımı da değerlendirildi.

Özetle, glutaraldehit ile çapraz bağlanarak elde edilen HRP-HNF sentezi yoluyla etkili bir horseradish peroxidase immobilizasyonu geliştirilmiştir. HNF-HRP-GA, katalitik verim, tekrar kullanılabilirlik ve pH ile sıcaklığa karşı daha iyi stabiliteye sahip olması bakımından enzim özelliklerinde önemli bir gelişme göstermiştir. HNF'lerin yeniden kullanılabilirliği, çapraz bağlamadan sonra önemli ölçüde arttırıldı. Bu sonuçlar, HNF-HRP ve HNF-HRP-GA sistemlerinin, enzimlerin stabilitesini ve yeniden kullanılabilirliğini arttırmada etkili bir yaklaşım olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Husain,Q., Ulber, R. Immobilized Peroxidase as a Valuable Tool in the Remediation of Aromatic Pollutants and Xenobiotic Compounds: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2013, 41:8, 770-804.
- [2] Zare, K., Sadegh, H., Shahryari-ghoshekandi, R., Maazinejad, B., Ali, V., Tyagi I. Enhanced removal of toxic Congo red dye using multi walled carbon nanotubes: Kinetic, equilibrium studies and its comparison with other adsorbents, *Journal of Molecular Liquids*. 2015, 266-27.
- [3] Chung, K. Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2016, 34, 233-261.
- [4] Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2004, 2–3 (2), 126– 139.
- [5] Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity: stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microbiol. Technol.* 2007, 40, 1451–1463.
- [6] Zuckerkand, E., Pauling, L. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 1965, 8, 357-366.
- [7] Horton, R., Hunta, H., Ho, S., Pullen, J., Pease, L. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. 1989, *Gene* Volume 77, Issue 1, 61-68.
- [8] *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012, 51, 555– 560.
- [9] Kikuchi, Y., Sasaki, N. Site-specific cleavage of natural mRNA sequences by newly designed hairpin catalytic RNAs., *Nucleic Acid Research*. 1991, 19(24): 6751 – 6755.
- [10] Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., Greppin, H. Peroxidases. Geneve:1982, Universite´ de Gene`ve, Centre de Botanique.
- [11] Welinder, KG. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett* 1976, 72:19–23.
- [12] Soltis, PS., E Soltis D. *Isozymes in Plant Biology*. 1990, Baltimore: Timber Press.
- [13] Veitch, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004, 65, 249–259.
- [14] Aibara, S., Yamashita, H., Mori, E., Kato, M., Morita, Y. Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase. *J Biochem (Tokyo)* 1982, 92, 531-539.
- [15] Franco Fragus, L., Batista-Viera, F., Carlsson, J., Preparation of high-density Concavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *J. Chromatogr. B*. 2004, 803, 237-241.
- [16] Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., v.d., Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tubers. *Plant Science*. 2002, 163, 1011-1019.
- [17] Carvalho, L., Neves-Petersen, M.T., Peterson, S.B. Formation of a misfolded conformation during refolding of HSPA1 in the presence of calcium, *Biochim. Et Biophys. Acta*. 2005, 1747, 99-107.
- [18] Everse, J. The structure of heme proteins Compound I and II: some misconceptions. *Free Rad Biol Med* 1998, 24:1338–1346.

- [19] Wang, B., Zhang, Y., Venkatasamy, C., Wu, B., Pan, Z., Ma, H., Effect of pulsed light on activity and structural changes of horseradish peroxidase, *Food Chemistry* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.149>
- [20] Tonami, H., Uyama, H., Nagahata, R., Kobayashi, S. Guaiacol Oxidation Products in the Enzyme-Activity Assay Reaction by Horseradish Peroxidase Catalysis. *Chemistry Letters* 2004, Vol.33, No.7.
- [21] Wang, S., Zheng, D., Yin, L., Wang, F. Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle, *Enzyme Microb. Technol.* 2017, 107, 22-31.
- [22] Krajewska, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.* 2004, 35, 126-39.
- [23] Aguiar-oliveira, E., Maugeri, F. Effects of the addition of substrate and salts in both the fructosyltransferase immobilization and its catalytic properties. *J. Food Biochem.* 2012, 37, 520-527.
- [24] Dicosimo, R., Mcauliffe, J., Poulouse, A.J., Bohlmann, G. Industrial use of immobilized enzymes, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6437-6474.
- [25] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisá'n, J. Reversible enzyme immobilization via a very strong and non-distorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 68, 98-105.
- [26] Roy, J.J., Abraham, T.E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem. Rev.* 2004, 104, 3705-3721.
- [27] Roessl, U., Naha'lka, J., Nidetzky, B. Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 341-350.
- [28] Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Springer.* 2014, 20:801-821
- [29] Ge, J., Lei, J., Zare, RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol.* 2012, 7(7), 428-32.
- [30] Schärtl, W. Crosslinked spherical nanoparticles with core-shell topology. *Adv Mater.* 2000, 12(24), 1899-908.
- [31] Lattuada, M., Hatton ,TA. Synthesis, properties and applications of Janus nanoparticles. *Nano Today.* 2011, 6(3), 286-308.
- [32] Zhu, L., Gong, L., Zhang, Y., Wang, R., Ge, J., Liu, Z., Zare, RN. Rapid detection of phenol using a membrane containing laccase nanoflowers. *Chem Asian J.* 2013, 8(10), 2358-60.
- [33] Sun, J., Ge, J., Liu, W., Lan, M., Zhang, H., Wang, P. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale.* 2014, 6(1), 255-62.
- [34] Grau, P. Textile industry wastewaters treatment. *Water SciTechnol.* 1991, 24, 97-103.
- [35] Pagga, U., Bruan, D. The degradation of dyestuffs part II:behaviour of dyestuffs in airobic biodegradation tests.*Chemosphere.* 1986, 15, 479-91.
- [36] Duran, N., Esposito E. *Catalysis B: Environ.* 2000, 28(2), 83-99.
- [37] Mohan, SV., Prasad, K.K., Rao, N.C., Sarma, P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere.* 2005, 58, 1097-1105.
- [38] Wagner, M., Nicell, JA. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Sci Technol.* 2001, 43, 253-260.
- [39] Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food

- colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, 48, 2934–2944.
- [40] Nevado, J. J. B., Cabanillas, C. G., & Salcedo, A. M. C. Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra. *Talanta*. 1995, 42, 2043–2051.
- [41] King-Thom, C. Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes. *Journal of Environmental Science and Health C*. 2000, 18, 51–74.
- [42] Amin, K.A., Hameid II, H.A., Abd Elstta, A.H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, 48, 2994-2999.
- [43] Singh, K.P., Gupta, S., Singh, A.K., Sinha, S. Optimizing adsorption of crystal violet dye from water by magnetic nanocomposite using response surface modeling approach. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, 186, 1462–1473.
- [44] Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004, 65, 249–259.
- [45] Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, 248-254.
- [46] Gu, A., Wang, G., Zhang, X., Fang, B. Synthesis of CuO nanoflower and its application as a H₂O₂ sensor. *Indian Academy of Sciences*. 2010, vol 33, 17-20.
- [47] Yin, Y., Xiao, Y., Lin, G., Xiao, Q., Lin, Z., Cai, Z. Enzyme inorganic hybrid nanoflowers based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *Journal of Materials Chemistry B*. 2012, DOI: 10.1039/x0xx00000x
- [48] Zhang, Z., Zhang, Y., He, L., Yang, Y., Liu, S., Wang, M., Fang, S., Fu G. A feasible synthesis of Mn₃(PO₄)₂@BSA nanoflowers and its application as the support nanomaterial for Pt catalyst. *Journal of Power Sources*. 2015, 284, 170-177.
- [49] Lee, H. R., Chung, M., Kim, M.I., Ha, S.H. Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2017, 105, 24-29.
- [50] Li, H., Hou, J., Duan, L., Ji, C., Zhang, Y., Chen, V. Graphene oxide-enzyme hybrid nanoflowers for efficient water soluble dye removal. *Journal of Hazardous Materials*. 2017, Volume 338, 93-101.
- [51] Shi, J., Zhang, S., Wang, X., Yang, C., Jiang, Z. Preparation and enzymatic application of flowerlike hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach. *Journal of Materials Chemistry B*. 2010, DOI: 10.1039/c4tb00507d.
- [52] Zhang, M., Yang, N., Liu, Y., Tang, J. Synthesis of catalase-inorganic hybrid nanoflowers via sonication for colorimetric detection of hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*. 2019, 128, 22-25.
- [53] S. Batule, B., Park, K.S., Gautam, S., Cheon, H.J., Kim, M.I., Park, H.G. Intrinsic peroxidase-like activity of sonochemically synthesized protein copper nanoflowers and its application for the sensitive detection of glucose. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 283, 749-754.
- [54] Yin, Y., Xiao, Y., Lin, G., Xiao, Q., Lin, Z., Cai, Z. Enzyme-inorganic hybrid nanoflowers based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *Journal of Materials Chemistry B*. 2012, DOI: 10.1039/x0xx00000x.

- [55] Ma, Q., Liao, J., Tian, T., Zhang, Q., Cai, X. A potential flower-like coating consisting of calcium-phosphate nanosheets on titanium surface. *Chinese Chemical Letters*. 2017, 28-9, 1893-1896.
- [56] Zhang, Z., Zhang, Y., Song, R., Wang, M., Yan, F., He, L., Feng, X., Fang, S., Zhao, J., Zhanga, H. Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. *Sensors and Actuators B*, 2015, 211, 310–317.
- [57] Munyemana, J.C., He, H., Ding, S., Yin, J., Xi, P., Xiao, J. Synthesis of manganese phosphate hybrid nanoflowers by collagen-templated biomineralization. *This journal is © The Royal Society of Chemistry*. 2018, 8, 2708–2713.
- [58] Soni, S., Dwivedee, B.P., Banerjee, U.C. An ultrafast sonochemical strategy to synthesize lipase-manganese phosphate hybrid nanoflowers with promoted biocatalytic performance in the kinetic resolution of β -aryloxyalcohols. *Chemistry of Nanomaterials for Energy, Biology and More*. 2018, <http://dx.doi.org/10.1002/cnma.201800250>.
- [59] Rai, S.K., Narnoliya, L.K., Sangwan, R.S., Yadav, S.K. Self-Assembled Hybrid Nanoflowers of Manganese Phosphate and L-Arabinose Isomerase: A Stable and Recyclable Nanobiocatalyst for Equilibrium Level Conversion of D-Galactose to D-Tagatose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6(5), 6296–6304.
- [60] Zhang, B., Li, P., Zhang, H., Wang, H., Li, X., Tian, L., Ali, Nisar., Ali, Z. Preparation of lipase/Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers and its catalytic performance as an immobilized enzyme. *Chemical Engineering Journal*. 2016, 291, 287-297.
- [61] Jin, R., Kong, D., Zhao, X., Li, H., Yan, X., Liu, F., Sun, P., Du, D., Lin, Y., Lu, G. Tandem catalysis driven by enzymes directed hybrid nanoflowers for on site ultrasensitive detection of organophosphorus pesticide. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111473>.
- [62] Zhu, P., Wang, Y., Li, G., Liu, K., Liu, Y., He, J., Lei, J. Preparation and application of a chemically modified laccase and copper phosphate hybrid flower-like biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.020>.
- [63] Chang, Q., Jiang, G., Tang, H., Li, N., Huang, J., Wu, L. Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite. *Chinese Journal of Catalysis*. 2015, 36, 961–968.
- [64] Zhang, L., Ma, Y., Wang, C., Wang, Z., Chen, X., Li, M., Zhao, R., Wang, L. Application of dual-enzyme nanoflower in the epoxidation of alkenes. *Process Biochemistry*. 2018, doi:10.1016/j.procbio.2018.08.029.
- [65] Yuanbi Z., Zumin, Q., Jiaying, H. Preparation and Analysis of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Used as Targeted-drug Carriers, *Chin. J. Eng.* 2008, 16(3), 451-455.
- [66] Somturk, B., Yilmaz, İ., Altinkaynak, C., Karatepe, A., Özdemir, N., Ocsoy, İ. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme and Microbial Technology*. 2016, 86, 134–142.
- [67] Yu, Y., Fei, X., Tian, J., Xu, L., Wang, X., Wang, Y. Self-assembled enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application to enzyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, 7037, 6.
- [68] Wang, L.B., Wang, Y.C., He, R., Zhuang, A., Wang, X., Zeng, J., Hou, J. G. A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Enzymatic Performance. *Journal of the American Chemical Society*. 2013, 135, 1272–1275.

- [69] Ye, R., Zhu, C., Song, Y., Song, J., Fu, S., Lu, X., Yang, X., Zhu, M., Du, D., Li, H., Lin, Y. One-pot bioinspired synthesis of all-inclusive protein-protein nanoflowers for point-of-care bioassay: Detection of *E. coli*O157:H7 from milk. 2013, DOI: 10.1039/x0xx00000x.
- [70] Zhang, Z., Zhang, Y., He, L., Yang, Y., Liu, S., Wang, M., Fang, S., Fu, G. A feasible synthesis of Mn₃(PO₄)₂@BSA nanoflowers and its application as the support nanomaterial for Pt catalyst. *Journal of Power Sources*. 2015, 284, 170-177.
- [71] Hao, M., Fan, G., Zhang, Y., Xin, Y., Zhang, L. Preparation and characterization of copper-Brevibacterium cholesterol oxidase hybrid nanoflowers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 126, 539-548
- [72] Mohamed, S. A., Al-Malki, A.L., Kumosani, T.A., El-Shishtawy, R. M. Horseradish peroxidase and chitosan : Activation, immobilization and comparative results. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 60, 295–300.
- [73] El-Nahass, M.N., El-keiy, M.M., Ali, E.M.M. Immobilization of horseradish peroxidase into cubic mesoporous silicate, SBA-16 with high activity and enhanced stability. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 116, 1304-1309.
- [74] Köksal, E., Gülçin, İ. Purification and Characterization of Peroxidase from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) Buds. *Protein & Peptide Letters*. 2008, 15, 1-7.
- [75] Pandey, V.P., Rani, J., Jaiswal, N., Singh, S., Awasthi, M., Shasany, A.K., Tiwari, S., Dwivedi, U.N. Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 8.
- [76] Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J., Cunha, G.B. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots, *J. Agric. Food Chem*. 2010, 58, 8471–8476.
- [77] Al-Bagmi, M.S., Khan, M.S., Ismael, M.A., Al-Senaidy, A.M., Bacha, A.B., Husain, F.M., Alamery, S.F. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019, 26, 301-307.
- [78] Mohamed, S.A., Al-Malki, A.L., Khan, J.A., Sulaiman, M.I., Kumosani, T.A. Properties of peroxidase from chewing stick miswak. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012, Vol. 6(9), 660-670.
- [79] Mohamed, S.A., Al-Harbi, M.H., Almulaiky, Y.Q., Ibrahim, I.H., El-Shishtawy, R.M. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017, Volume 27, 84-90.
- [80] Mohamed, S.A., Al-Ghamdi, S.S., El-Shishtawy, R.M. Immobilization of horseradish peroxidase on amidoximated acrylic polymer activated by cyanuric chloride. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, 91, 663-670.
- [81] Xu, R., Chi, C., Li, F., Zhang, B. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource Technology*. 2013, 149, 111-116.
- [82] Monier, M., Ayad, D.M., Wei, Y., Sarhan, A.A. Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010, 46, Issue 3, 324-330.
- [83] Temoçin, Z., Yiğitoğlu, M. Studies on the activity and stability of immobilized horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate) grafted acrylamide fiber. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009, 32, Issue 4, 467–474.
- [84] Patel, S.K.S., Otari, S.V., Li, J., Kim, D.R., Cho, B.K., Kalia, V.C., Kang, Y.C., Lee, J.K. Synthesis of cross-linked protein-metal hybrid nanoflowers and its

application in repeated batch decolorization of synthetic dyes. *Journal of Hazardous Materials*.2018, 347, 442-450.

[85] Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Shah, S.Z.H., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. *Journal of Environmental Management*. 2016, 183, 836-842.

[86] Ocsoy, I., Dogru, E., Usta, S. A New Generation of Flowerlike Horseradish Peroxidas a Nanobiocatalyst for Superior Enzymatic Activity. *Enzyme and Microbial Technology*.2015, Volumes 75–76, pages 25-29.

[87] Li, Y., Fei, X., Liang, L., Tian, J., Xu, L., Wang, X., Wang, Y. The influence of synthesis conditions on enzymatic activity of enzyme inorganic hybrid nanoflowers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016, 133, 92–97.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Oya ÜSKÜP

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : oyauskup@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Karataş Lisesi, 2011

Ön Lisans: Anadolu Üniversitesi, Laborant ve Veteriner Sağlık, 2019

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2016

Yüksek Lisans: Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2019

Mesleki Deneyim

İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi – Patoloji Laboratuvarı
2013 (20 Gün Staj)

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri ve Araştırma Merkezi
2016 (20 Gün Staj)

Manisa Fatih Anadolu Lisesi
2016 (30 Gün Staj)

Kongreler

Üsküp, O., Çınar, S., Eser, A., Aydemir, T., Dinçer, A. Eco-friendly Dyes Applications in Textile Industry. 15. ULUSAL 1. ULUSLARARASI TEKSTİL TEKNOLOJİSİ VE KİMYASINDAKİ SON GELİŞMELER SEMPOZYUMU. Poster sunumu, 2017.