T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROZİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN FARKLI MORFOLOJİYE SAHİP METAL-ORGANİK KAFESLERİN SENTEZLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA AYGÜN

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

AĞUSTOS 2024

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROZİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN FARKLI MORFOLOJİYE SAHİP METAL-ORGANİK KAFESLERİN SENTEZLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA AYGÜN

36203613032

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burhan ATEŞ
Eş Danışman: Doç. Dr. Ahmet ULU

AĞUSTOS 2024

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında maddi ve manevi olarak yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeden beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e

Çalışmalarımda her konuda fikirlerini danıştığım, bana sabırla yardımcı olan, yaptığım hatalarda çözüm bulmam konusunda yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen eş danışman hocam Doç. Dr Ahmet ULU'ya

Çalışmalarım da yanımda olup desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Nermin GÜNDÜZ ve Emine Büşra KAPLAN'a

Tüm hayatımda olduğu gibi çalışmalarımda da her türlü desteklerini esirgemeyen, bugünlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi'ne (İÜBAPB, Proje No: FYL-2022-2982) teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Tirozinaz Enziminin İmmobilizasyonu İçin Farklı Morfolojiye Sahip Metal-Organik Kafeslerin Sentezlenmesi ve Fenolik Bileşiklerin Giderilmesinde Kullanılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Tuğba AYGÜN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ ..... **iii**
ONUR SÖZÜ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
TABLOLAR ..... **vii**
ŞEKILLER TABLOSU ..... **viii**
SEMBOLLER VE KISALTMALAR ..... **ix**
ÖZET ..... **x**
ABSTRACT ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Enzimler 3
1.2 Enzimin Sınıflandırılması 4
1.2.1 Oksidoredüktazlar 6
1.3 Tirozinaz Enzimi 8
1.4 Enzim İmmobilizasyonu 10
1.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 13
1.5.1 Kimyasal immobilizasyon yöntemleri 13
1.5.2. Kovalent bağlama yöntemi 14
1.5.3. Çapraz bağlanma yöntemi 14
1.5.4. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri 15
1.5.5. Adsorbsiyon yöntemi 15
1.5.6. Tuzaklama yöntemi 16
1.5.7. Enkapsülasyon yöntemi 16
1.6 Metal Organik Kafesler 17
1.7. MOF'ların Sentez Yöntemleri 18
1.7.1 Solvotermal sentez yöntemi 19
1.7.2. Elektrokimyasal sentez yöntemi 20
1.7.3 Mekanokimyasal yöntem 20
1.7.4 Sonokimyasal yöntemi 21
1.7.5 Mikrodalga yöntemi 21
1.7.6. Difüzyon yöntemi 22
1.8. MOF'ların Avantajları 22
1.9. Enzim İmmobilizasyonunda MOF Kullanılması 22
2.MATERYAL VE YÖNTEM **25**
2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 25
2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar 25
2.3. UIO-66/NH_2 Sentezlenmesi 25
2.4. Cu/ UIO-66/NH_2 Hazırlanması 26
2.5. Tirozinaz Enziminin İmmobilizasyonu 27
2.6. Tirozinaz Aktivitesinin Tayin Edilmesi 27
2.7. İmmobilize Enzimin Aktivitesinin Ölçümesi 27
2.8. MOF'ların Fizikokimyasal Karakterizasyonları 28
2.9. Optimum pH'nın Belirlenmesi 28
2.10. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi 28

2.11. Depo Kararlılıklarının Belirlenmesi 29
2.12. Termal Kararlılık Belirlenmesi 29
2.13. Yeniden kullanılabilirlik 30
2.14. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi 30
2.15. Fenolün Giderilmesi 30
3.ARAŞTIRMA BULGULARI 32
3.1. Karakterizasyonlar 32
3.1.1 FTIR karakterizasyonları 32
3.1.2. XRD karakterizasyonları 33
3.1.3. DLS karakterizasyonları 34
3.1.4. SEM karakterizasyonları 35
3.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi 36
3.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi 37
3.4. Depolama Kararlılığının Belirlenmesi 37
3.5. Termal Kararlılığının Belirlenmesi 38
3.6. Yeniden kullanılabilirlik 39
3.7. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması 40
3.8. Fenolün Giderilmesi 41
4.TARTIŞMA 43
KAYNAKLAR 46

TABLOLAR

Tablo 1. 1 : Enzimlerin sınıflandırılması.....**5**
Tablo 3.2.1: Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın DLS ölçüm sonuçları 35
Tablo 3.7: Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH2/Tyr'ın Km Vmax değerleri gösterimi……...…….31

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1. 1 : Enzim aktif bölge şeması 3
Şekil 1. 2 : Enzim substrat ilişkisi ve aktif bölge 4
Şekil 1. 3 : Tirozinaz enzimi yapısı 8
Şekil 1. 5 : Farklı immobilizasyon yöntem 13
Şekil 1. 6 : MOF sentezlenme yöntemleri 19
Şekil 2. 1 : UIO-66NH_2 sentezi gösterimi 26
Şekil 2. 2 : Cu-UIO-66NH_2 sentezlenmesi 26
Şekil 2. 3 : Cu-UIO-66NH_2'e tirozinaz enzimi immobilizsayonu gösterimi 27
Şekil 3. 1. 1 : Cu-UIO-66/NH_2/Tyr, Cu-UIO-66/NH_2, UIO-66NH_2/Tyr ve UIO-66/NH_2 malzemelerin FTIR karakterirzasyonu 33
Şekil 3. 1.2 :MOF'ların XRD karakterizasyonu 34
Şekil 3. 1.4.1: MOF'ların farklı bakır oranlarında a) 5 mM Cu-UIO-66/NH_2 . b) 10 mM Cu-UIO-66/NH_2 c) 20 mM Cu-UIO-66/NH_2 ait SEM görüntüsü 35
Şekil 3.1.4.2: SEM görüntüleri d) Cu-UIO-66/NH_2 , e) Cu-UIO-66/NH_2/Tyr 36
Şekil 3. 2 : Optimum pH belirlenmesi 36
Şekil 3. 3 : Optimum sıcaklığın belirlenmesi 37
Şekil 3. 4 : Depolama kararlılığı belirlenmesi 38
Şekil 3. 5.1 : Serbest Tyr'ın termal kararlılığı 39
Şekil 3. 5.2 : Cu-UIO-66/NH_2Tyr'ın termal kararlılığı 39
Şekil 3. 6 : Yeniden kullanılabilirliğin belirlenmesi 40
Şekil 3. 7 : Kinetik parametrelerin belirlenmesi 41
Şekil 3. 8 : Fenolik bileşiklerin giderilmesi 42

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Tyr **:** Tirozinaz enzimi

XRD **:** X-ışını diffraksiyonu

FTIR **:** Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi

DLS **:** Dinamik ışık saçılımı

SEM **:** Taramalı elektron mikroskobu

L-DOPA **:** L-dihidroksi fenilalanin

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİROZİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN FARKLI MORFOLOJİYE SAHİP METAL-ORGANİK KAFESLERİN SENTEZLENMESİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI

Tuğba AYGÜN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

59 + LIX sayfa

2024

Danışman: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

Tirozinaz enzimi atık sularda oluşan fenolik kirleticilerin giderilmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı atık sulardan fenolik bileşikleri uzaklaştırmak için tirozinaz enzimi immobilize edilmiş çevresel koşullara dayanıklı taşıyıcı malzemeler geliştirmektir.

Bu kapsamda öncelikle UIO-66NH_2 sentezlendi ve farklı Cu konsantasyonlarıyla inkübe edilmiştir. Daha sonra tirozinaz enzimi Cu-UIO-66NH_2 taşıyıcısına immobilize edilmiştir. Çalışmada hazırlanan bütün malzemeler farklı yöntemlerle karakterize edildi. Ayrıca, immobilize enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, depolama kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreleri, fenol giderimi belirlendi ve serbest enzim ile kıyaslandı. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığı 45℃ bulunurken, serbest enzimin optimum sıcaklığı 40 ℃ bulunurken, serbest ve immobilize enzimin optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur. Ayrıca, immobilize enzimin sekizinci kullanımda başlangıç aktivitesinin %6'sını koruduğu gözlenmiştir. İmmobilizasyon sonrası serbest ve immobilize enzimin Km ve Vmax değerlerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Serbest enzimin fenolik bileşik giderimi %70 olarak belirlenirken, immobilize enzimin fenolik bileşik giderimi %80 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, tez kapsamında hazırlanan taşıyıcı malzeme atık sulardan fenol giderimi için umut verici bir malzemedir.

Anahtar Kelimeler: Enzim İmmobilizasyonu, Tirozinaz, Metal Organik Çerçeveler

ABSTRACT

Master Thesis

SYNTHESIS OF METAL-ORGANIC FRAMEWORKS WITH DIFFERENT MORPHOLOGY FOR IMMOBILIZATION OF TYROSINASE ENZYME AND THEIR USE IN THE REMOVAL OF PHENOLIC COMPOUNDS
Tuğba AYGÜN

Inonu University

Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Chemical

59 + LIX pages

2024

Supervisor: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

Tyrosinase enzyme is used to remove phenolic pollutants in wastewater. The aim of this study is to develop environmentally resistant carrier materials immobilised with tyrosinase enzyme to remove phenolic compounds from wastewater.

In this context, firstly UIO-66/NH_2 was synthesised and incubated with different Cu concentrations. Then tyrosinase enzyme was immobilised on Cu-UIO-66/NH_2 carrier. All materials prepared in the study were characterised by different methods. In addition, optimum temperature, optimum pH, storage stability, thermal stability, kinetic parameters, phenol removal of immobilised enzyme were determined and compared with free enzyme. The optimum temperature of the immobilised enzyme was found to be 45 ℃, the optimum temperature of the free enzyme was found to be 40 ℃, and the optimum pH of the free and immobilised enzyme was found to be 7. It was also observed that the immobilised enzyme retained 6% of its initial activity at the eighth use. No significant change was observed in Km and Vmax values of free and immobilised enzyme after immobilisation. The phenolic compound removal of the free enzyme was determined as 70%, while the phenolic compound removal of the immobilised enzyme was determined as 80%.

In conclusion, the carrier material prepared in this thesis is a promising material for phenol removal from wastewater.

Keywords: Enzyme Immobilisation, Tyrosinase , Metal Organic Frameworks

1. GİRİŞ

Günümüzde su kirliliği, küresel çapta önemli bir çevre sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Mevcut durumda, özelliklede gelişmiş ülkeler kirlenmiş suların arıtılması ve temiz su kaynaklarının korunması amacıyla büyük çaplı yatırımlar yapmaktadır. Fenolik bileşikler ve tekstil boyama ile baskı endüstrilerinde salınan boyalı atık sular, çevre ve insan sağlığına yönelik ciddi tehditler oluşturmaktadır. Boyalarla kirlenmiş suyun yutulması veya emilmesi sonucunda alerjiler, cilt hastalıkları ve kanser gibi ciddi sağlık sorunları ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, suda bulunan toksik kirleticilerin sudan arındırılması hayati önem taşımaktadır. Fenolik bileşiklerin parçalanmaları ve uzaklaştırılmalarında tirozinaz enzimi etkinliği, araştırmacılar tarafından sıklıkla rapor edilmiştir.

Tirozinaz enzimi (EC. 1.14.18.1, polifenol oksidaz; monofenol monooksijenaz) hayvanlarda, funguslarda ve yüksek bitkilerde bulunan tirozinaz enzimi, moleküler haldeki oksijenin etkisi ile monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu ve o-difenollerin de o-kinonlara oksidasyon tepkimelerini kataliz eden yapısında bakır bulunduran enzimdir. Metal organik kafes (MOF)' lar spesifik yüzey alanları, modifiye edile bilmeleri, geniş gözenek boyutu ve ayarlanabilen gözenek boyutları destek taşıyıcı materyal olarak kullanılmasını elverişli hale getirmektedir. Böylelikle MOF'lar enzim immobilizasyonunda taşıyıcı destek materyali olarak kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar incelendiğinde enzimleri uygun taşıyıcı destek materyallere immobilize edildiğinde çevresel şartlara dayanıklı hale gelmekte olup, düşük maliyetli, yeniden kullanılabilir, hedefe yönelik, yüksek sıcaklıklara dayanıklı yeni malzemeler elde edilmiştir.

Bu amaçla yapılan çalışma da metal organik kafes olarak UIO-66/NH_2 üretilmiştir. Daha sonra bakırla UIO-66/NH_2 inkübe edilmiştir. Oluşan Cu-Uİ O-66/NH_2'ye yeni malzemeye tirozinaz enzimi immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonu ile enzime dayanıklılık kazandırarak enzimi istenilen ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır.

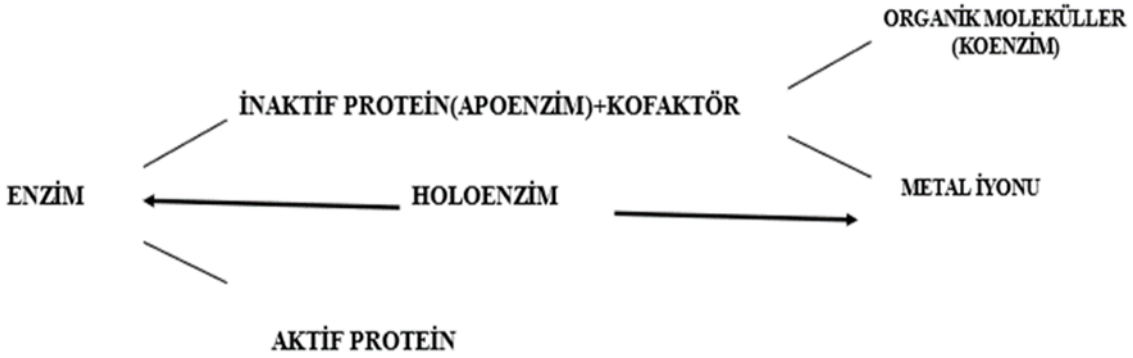
Hazırlanmış olan bütün malzemelerin karakteristik analizleri yapılmıştır. X-ışını difraksiyon (XRD), fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) karakterize edilmiştir. İmmobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılığı, depolama kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği ve bu çalışmada Cu-UIO-66/NH_2'ye immobilize enzim bağlanarak atık sularda su kirliğini giderici yeni bir ürün geliştirilmiştir.

1.1 Enzimler

Biyokimya araştırmaların büyük kısmı enzim çalışmaları üzerine olmaktadır. Biyokimya tarihinde enzim araştırmalarına sıkça rastlanmaktadır.

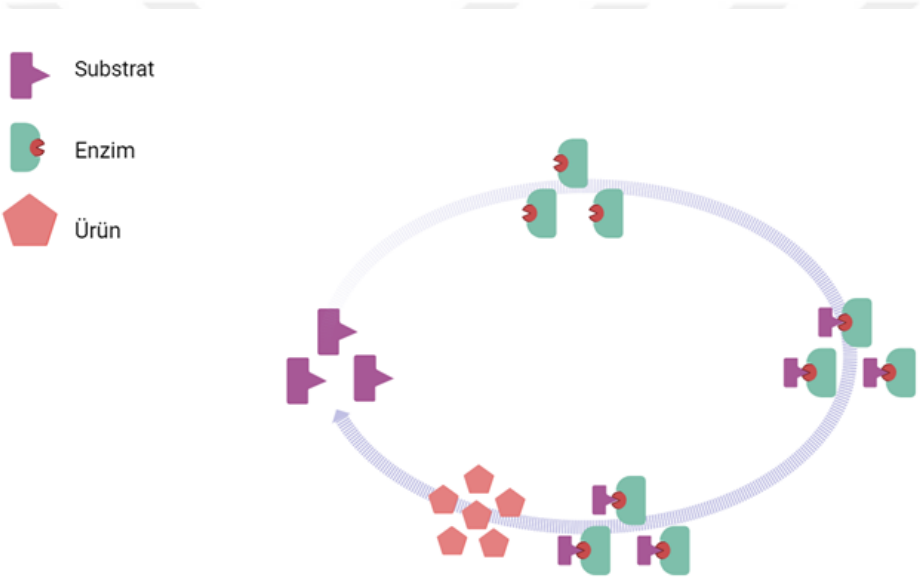
Biyolojik kataliz, ilk kez 1700'lerin sonlarına doğru, midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan araştırmalar sırasında ortaya çıkmıştır. Bilim dünyasında önemli bir dönüm noktası olmuştur. On dokuzuncu yüz yılda şekerin parçalanmasına neden olan aktif madde saflaştırılarak diastaz adı verilmiştir. Daha sonra S. S. Berzelius (1835) enzim üzerine ilk çalışmaları gerçekleştirmiştir (Nelson ve diğ. 2005).

Enzimler, metabolizmada gerçekleşen kimyasal reaksiyonları hızlandırıp ve yan ürün oluşumuna izin vermeden %100 verimle ürün sağlayan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir (van Beilen ve diğ., 2002). Laboratuarda uzun zaman alan veya yüksek sıcaklık, yüksek basınç, asidik veya bazik ortamlarda gerçekleşen reaksiyonlar, enzimlerin yardımıyla hücre içinde hızlı bir şekilde tamamlanabilmektedir (Keha ve diğ., 2004). Enzimin ürüne dönüştürdüğü maddeye, substrat denir. Enzimler belirli miktarda substrat veya substratlardan belirli miktarda ürün ya da ürünler oluşturma kabiliyeti son derece özgün ve karakteristiktir. Enzimlerin aktif olamayan protein yapılı birimine apoenzim denir. Kofaktör yapı içeren enzime haloenzim denir (Palmer, T.). Enzimler, katalitik aktivite gösterebilmek için apoenzimin yanı sıra bir koenzime ihtiyaç duyar. Koenzim genellikle metal iyonu ya da protein yapı bulunmayan organik bir yapıdan oluşmaktadır. Kofaktörler protein yapılı olmayıp kimyasal bileşik veya metalik iyon yapıdadırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1: Enzim aktif bölge şeması

Enzimler katalizledikleri tepkime türlerine ve de ürüne dönüştürülen substratlara karşı oldukça spesifik özelliktedirler. Birbirine benzeyen maddeler, aynı maddelerin stereoizomerleri dönüşümüne uğratmazlar. Substratlar enzimin aktif olan bölgesine bağlanır, bu bölgeye aktif bölge denilmektedir. Şekil 1.1.2'de enzim substrat aktif bölge ilişkisi verilmektedir. Oyuk şeklinde olan bu yapının geometrik yapısı substratın bağlanma şekline ve bağlanma durumuna uygundur. Fiziksel yapının yanı sıra, aktif bölgenin polaritesi ve elektriksel yükü de substrat molekülünün etkili bir şekilde bağlanmasına katkı sağlayan özellikler arasındadır. Substrat molekülüne ait yüklü bölgeler, aktif merkezdeki zıt yüklü alanlarla elektrostatik etkileşimler kurarlar (Keha ve diğ., 2004).



Şekil 1.2: Enzim substrat ilişkisi ve aktif bölge

1.2 Enzimin Sınıflandırılması

1970'li senelere kadar birçok enzim üzerinde çalışmalar yapılmış ve saf kristal formlarda elde edilen enzim sayıları artmıştır. Ancak bu artış beraberinde enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması ihtiyacını ortaya çaıkarmıştır. Biyokimya Cemiyeti tarafından Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC) kurulmuştur. Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre altı farklı gruba ayrılmıştır. IEC enzim sınıflandırılmasında katalizledikleri tepkime türüne göre sonuna "-az" eki getirilerek adlandırma yapılmıştır (Sarıışık 2001).

Enzim sınıflandırılması altı ana gruba ayrılmış olup tablo 1.2.'de enzimlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 1. 2: Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim Sınıfı	**EC**	**Katalizlediği Reaksiyonlar**
1.Oksidoreduktazlar		**Redoks reaksiyonu katalizlerler.**
	1.1	CH-OH grubunu etkiler
	1.2	C-O grubunu etkiler
	1.3	C-CH grubunu etkiler
	1.4	CH-NH2 grubunu etkiler
	1.5	CH-NH grubunu etkiler
2. Transferazlar		**Fonksiyonel grup transferinde görevlidir.**
	2.1	C1 gruplarını transfer yapanlar
	2.2	Karbonil gruplarını transfer yapanlar
	2.3	Açil gruplarını transfer yapanlar
	2.4	Glikozil gruplarını transfer yapanlar
	2.5	N- içeren grupları transfer yapanlar
	2.6	Fosfat gruplarını transfer yapanlar
	2.7	S- içeren grupları transfer yapanlar
3. Hidrolazlar		**Hidroliz reaksiyonu katalizlerler.**
	3.1	Ester hidrolizleyenler
	3.2	Glikozid bağı hidrolizleyenler
	3.4	Peptid bağı hidrolizleyenler
	3.5	Diğer C-N bağı hidrolizleyenler
	3.6	Asit anhidritleri hidrolizleyenler
4. Liyazlar		**Çift bağ oluşturma ve çift bağa katılma reaksiyonları katalizlerler.**
	4.1	C-C Liyazlar
	4.2	C-O Liyazlar
	4.3	C-N Liyazlar
5. İzomerazlar		**İzomer reaksiyonlarını katalizlerler**
	5.1	Rasemazlar
	5.3	Intramoleküler oksidoredüktazlar
	5.4	Intramoleküler transferazlar
6. Ligazlar		**Sentez reaksiyonunu katalizlerler.**
	6.1	C-O bağı oluşturanlar
	6.2	C-S bağı oluşturanlar
	6.3	C-N bağı oluşturanlar
	6.4	C-C bağı oluşturanlar

1.2.1 Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar enzim sınıfı, biyolojik olarak oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerinini katalizeleyen geniş çaplı enzim sınıfıdır. Kimyasal ve de biyokimyasal dönüşümlerin çoğu hem oksidasyon hem de redüksiyon süreçleri içerdiğinden, oksidoredüktaz enzimleri pratik biyokatalitik uygulamaları geliştirme fikri biyoteknolojinin başından beri zorlu ancak çekici bir hedef haline gelmiştir. Bu enzimlerin öngörülen kullanım alanlarında steroidlerin ve farklı ilaçların asimetrik oksifonksiyonelleştirilmesi, polimerin sentezini ve modifikasyonunu, hidrokarbonların oksifonksiyonelleştirilmesi kirleticilerin oksidatif bozunmalarını, çeşitli analitik ve klinik uygulamalarda biyosensörlerin geliştirilmesi bulunmaktadır (May, S. W. 1999).

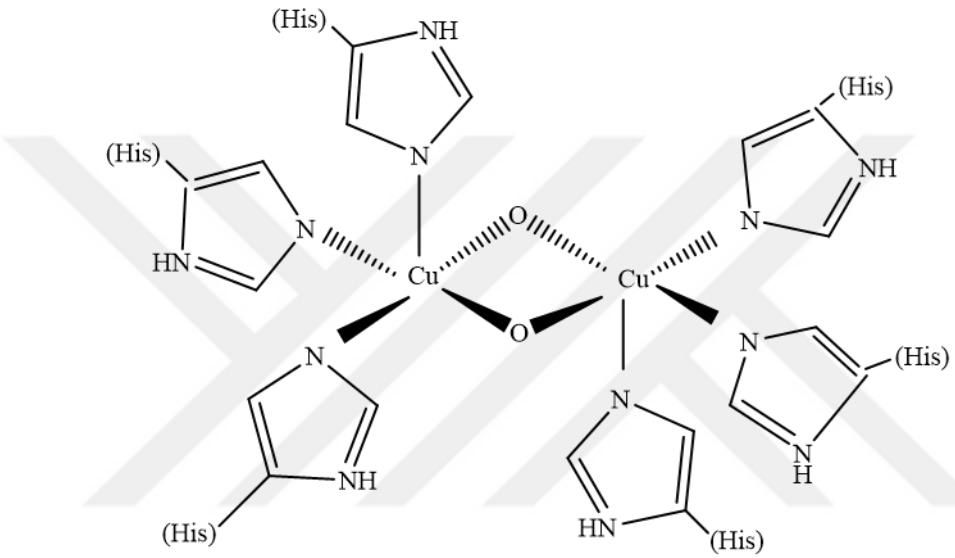
Oksidoredüktazlar, doğada yaygın olarak bulunan enzimlerdir ve proton/hidrojen ekstraksiyonu, hidrit transferi, elektron transferi, oksijen eklenmesi gibi reaksiyonlarda, elektron veren veya elektron alan moleküller arasındaki elektron değişimlerini katalizlerler. Bu enzimler; yüksek özgüllük, verimlilik ve seçicilikle çok çeşitli kimyasal reaksiyonu katalizleyerek biyolojik sistemlerde önemli roller üstlenirler. Oksidoredüktazların büyük kısmı nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) veya nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) gibi önemli bir rol olan nikotinamid kofaktöre bağımlı enzimlerdir. Bu enzimler, çeşitli redoks/aktif merkeze sahip olarak işlev görürler. Oksidoredüktaz tabanlı kataliz; biyolojik olarak özgüllük, parçalanabilirlik ve verimlilik özellikleriyle endüstriyel uygulama alanları için uygun bir seçenek haline gelmiştir. Bu sebeple, bu enzimler günümüzde gıda, tekstil, kimyasal sentez ve tıp alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksidoredüktazlar, geniş bir uygulama yelpazesi sunarlar ve şu amaçlarla kullanılmaktadırlar; karbonhidrat türevlendirme, lignoselülozik biyotransformasyon, süt ürünleri alanlarında uygulamalar, çevre koruma, gıda ve içecekleri geliştirme, nanomalzeme veya polimer sentezi, organik sentez, tıbbi sentez aynı zamanda diğer sentetik uygulama alanlarında kullanılabilmektedir. Bu enzimler, toksik veya pahalı kimyasalların yerine geçmek, enerji ve kaynak tüketiminden tasarrufu sağlamak, yeni işlevler kazandırmak ya da çevre üzerinde bulunan olumsuz etkiyi azaltmakta daha etkili biyokatalizörleri kullanılabilirler. Oksidoredüktazların yeni üretim alanlarındaki uygulamaları, endüstriyel oksidoredüktaz biyokatalizörlerinin gelecekteki genişlemesi için kritik öneme sahiptir (Younus, 2019).

Geçtiğimiz yıllar boyunca, oksidoredüktaz enzimlerinin kullanımıyla ilgili birçok önemli yeni gelişmeler olmuştur. Bu enzimlerin, gelişmiş biyosensörlerin ve halk sağlığı için kritik olan teşhis testlerinde kullanılması ile kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır. Genel olarak oksidoredüktazın katalitik aktivitesinde gerekli koenzimlerin verimli bir şekilde ekonomik olarak geri dönüştürülmesinde yenilikçi yöntemler geliştirilmiştir. Oksidoredüktazların biyokatalizinde hem poliklorlu bifeniller (PCB'ler) hem de fenolik bileşikler kirleticilerin ayrıştırılması, kömürün parçalanması ve odun hidrolizatların fermantasyon süreçlerinin iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Biyokatalitik hidrokarbonların oksifonksiyonelleşmesinin mekanistik özelliklerinin aydınlatılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir ve antibiyotik biyosentezlerinde kritik bir rol oynayan oksijenazların detaylı yapısı ortaya konmuştur. Ayrıca, yeni polimerik malzemelerin sentezi için oksijenaz katalizinin kullanımı için yeni stratejiler de araştırılmaktadır (May, S. W. (1999).

Kirletici maddelerin parçalanmasında oksidoredüktaz enzimlerinin (örneğin, peroksidazlar ve lakkazlar) kullanıldığı biyolojik yaklaşımlar, kullanım kolaylığı ve yüksek verimlilik gibi avantajlarıyla diğer yöntemlere kıyasla büyük bir potansiyele sahiptir. Su kirliliğine neden olan çeşitli dirençli organik aromatik bileşikler, çevre bilimcilerinin dikkatini çeken çevre sorunu haline gelmiştir. Bu çevre sorununda dirençli kirleticilerin büyük kısmını; tekstil boyaları, endüstriyel atıklar, ilaçlar, hormonlar ya da kişisel bakım ürünlerinin atık suya deşarj edilmesiyle meydana gelmektedir. Bu kirleticilerin kirlenmiş su kütlelerinden uzaklaştırılması veya parçalanması için çeşitli fiziksel, biyolojik ve kimyasal stratejiler ön görülmüş ve geliştirilmiştir (Alneyadi ve diğ., 2018).

1.3 Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz (EC1.14.18.1), enzimin aktif bölgesinde bakır atom kümeleri barındıran polifenoloksidaz enzimlerinin kritik bir üyesidir. Bu enzim, oksidoredüktaz sınıfında yer almaktadır. Tyr'ler, katekolaz ve krezolaz aktiviteleri olmak üzere iki ayrı aktiviteye sahiptir. Tyr, tüm çeşitlerinde ortak bir protein yapısına sahip olmadığı için yapısal özellikleri, hücresel konumu ve doku dağılımı açısından çeşitlilik göstermiştirlerdir.



Şekil 1.4: Tirozinaz enzimi aktif bölgesi

Enzimler genellikle birincil yapıları, glikozilasyon düzenleri, boyutları ve aktivasyon özellikleri yönünden farklılık göstermektedirler (Zaidi ve diğ., 2014). Tirozinaz enzimin, aktif bölgesinde altı tane nitrojen atomu içeren histidin aminoasidi bulunan ve moleküler oksijenle etkileşime giren metalloenzimdir.

Melanin oluşumunda kritik bir rol oynayan temel enzimdir. Memelilerde bulunan tirozinaz enzimi, melanin pigmentinin biyosentezide bulunan reaksiyonları katalize eder. Bu tepkimelere örnek olarak kıl ve deri verilebilmektedir. Melanin UV radyasyonlarını absorbe ederek DNA hasarı oluşumuna karşı korumayı sağlar ve böylelikle derinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Bitkilerde ise oksidasyon-redüksiyon potansiyelin düzenlenmesinde ve yara iyileştirmesinde katkı sağlamıştır. Ayrıca tirozinaz, meyve ve sebzelerde kahverengileşmenin oluşumunu da kataliz eder. Melanin, insanlarda saçtaki

melanositler ve cilt ile gözde bulunan retina pigment epitel hücreler gibi özel hücrelerin içinde bulunan melanozomlarda sentezlenir (Lai ve diğ., 2018).

Bu enzim, ilaç sanayisinde; melanom tedavisi, fenolik bileşiklerin toksik etkilerinin giderilmesi, patojenlerin, tarım ilacı kalıntılarının ve GDO'nun tespiti gibi çeşitli alanlarda enzimatik sensörlerin geliştirilmesi gibi geniş alanda yaygın kullanılmaktadır (Polatoğlu, 2016). Bazı kanser çeşitlerinde kanserli hücrelerdeki tirozinaz aktivitesinin artması, tirozinazın kanser tedavisindeki potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. Tirozinaz, tirozinin DOPA'ya dönüşümünü ve ardından DOPA'nın kinon formuna oksidasyonunu katalizler. Tirozinaz, oksijeni kullanarak monofenolleri o-difenollere hidroksilasyonunu birde o-difenollerin o-kinonlara oksidesini gerçekleştiren bir enzimdir (Dinçer ve diğ., 2012).

$$\text{Monofenol} + O_2 \rightarrow \text{o-difenol} + H_2O \qquad (1)$$

$$2\text{o-difenol} + O_2 \rightarrow 2\ \text{o-kinon} + 2H_2O \qquad (2)$$

Tyr’nin, küçük fenolik moleküllerin yanı sıra proteinlerdeki fenolik grupları (örneğin, tirozin aminoasidinin yan zinciri) oksitleme yeteneği sayesinde birçok farklı biyoteknolojik uygulamada kullanılabilir. Tyr’nin

gıda, kozmetik, sağlık, kimyasal maddelerin uzaklaştırılması gibi uygulama alanlarında kullanılabilmektedir. Tirozinaz enzimi doğada birçok bitkide bulunması sebebiyle de gıda sektöründe de ilgi görmüştür. Ayrıca bitkilerde viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direnç göstermesinde önemli rolü vardır. Gıda sektöründe istenmeyen durumları önlemek için tirozinaz inhibitörlerini kullanmaktadır. Tirozinaz enzimi doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Cooksey ve diğ, 1997). Doğada bitkilerde, hayvanlarda, mikroorganizmalarda ve mantarlarda genellikle bulunmaktadır. Bitkiler, mantarlar ve hayvanlar arasında yaygın olarak bulunan tirozinazlar, sklerotizasyon, birincil bağışıklık tepkisi pigmentasyon ve konak savunması gibi birçok biyolojik olarak önemli işlevde rol oynar (Jaenicke ve diğ., 2003).

Tirozinaz ve polifenoller, bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. L-dihidroksi fenilalanin (L-DOPA), belirli yiyecekler ve bitkilerde doğal olarak bulunan bir bileşik olup hem diyet takviyesi hem de psikoaktif ilaç olarak kullanılır. L-DOPA, merkezi sinir sisteminde dopamin sentezinin temel öncüsüdür. Bu sebeple, L-DOPA, parkinson hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç olup aynı zamanda miyokardiyal nörojenik hasarın yönetiminde de büyük önem taşımaktadır. Fenoller, endüstriyel atıklarda bulunduklarından aynı zamanda insan sağlığı için çeşitli riskler oluşturabilecek potansiyel toksik kirleticilerdir ve bazılarının kanserojen etkiler gösterebileceği düşünülmektedir. Ayrıca fenoller, suya yayıldığında suların renklenmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla bu çeşitteki bileşiklerin çevre üzerindeki zararlı etkilerini azaltmak için dekontamine edilmeleri önemlidir. Tirozinaz gibi polifenol oksidaz enzimlerinin fenol ve türevlerin gideriminde kullanılması son derece kritik ve etkili bir yöntemdir. Tirozinaz diğer enzimlere göre fenolik bileşiklerin gideriminde daha düşük maliyetli bir seçenek sunmaktadır. Çünkü hidrojen peroksit yerine moleküler oksijeni kullanmaktadırlar. Fenolik bileşiklerin tayini için kromatografik veya spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır (Zaidi ve diğ., 2014).

1.4 Enzim İmmobilizasyonu

Optimum pH ve optimum sıcaklıkta çalışması enzimin maksimum katalitik aktiviteye çıkmasını sağlar. Enzimin pH'sı amino asitlerdeki iyonlaşma durumlarını etkilemektedir. Enzimlerin ve substratların arasındaki ideal çarpışma sıcaklıktan da etkilenmektedir. Enzimler, normal koşullarda vücut sıcaklığında (37 °C'de) ideal aktivite göstermektedirler. Enzimlerin avantajları arasında yüksek katalitik aktivite, özgüllük, biyolojik olarak parçalanabilirlik, seçicilik gibi özellikler gösterilmektedir. Bununla birlikte serbest enzim tek kullanımlıktır. Bu da enzim çalışmalarını ekonomik yönden olumsuz olarak etkilemektedir. İmmobilizasyon, hareketleri sınırlandırılmış, çözünemez veya hapsedilmiş anlamına gelmektedir. İmmobilize enzimler katalitik aktivitesini koruyarak sürekli ve tekrar tekrar kullanılabilen enzimlerdir. İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre avantajları sebebiyle daha fazla ilgi görmektedir (Brena ve diğ., 2013).

İmmobilizasyon yöntemleri, enzimin kolayca yeniden kazanılması, hızlı bir şekilde sonlandırılabilmesi ve yeniden kullanılabilmesi enzim testlerini kolaylaştırıp enzimin maliyetlerinde bir düşüş sağlayabilmektedir. Enzim reaksiyonları sonrasında enzimleri ortamdan uzaklaştırmak veya yeniden kazanmak genellikle meşakkatli ve zaman alıcı

süreçtir. Bu sebeple immobilizasyon enzimlerin ayrıştırılmasında önemli rol oynamaktadır (Ulu ve diğ., 2017).

Enzim immobilizasyonu, enzimin ürün veya substrat yerine katı taşıyıcı matrikse tutunması olarak tanımlanmıştır. Taşıyıcı matriks; uygun maliyete sahip olmalı, toksiklik içermemeli, inert olmamalı, tekrar tekrar kullanılabilir olmalı, ürünlerin inhibisyonunu azaltabilmesi ve en önemli özelliği olan klinik uygulamalar da kullanılabilmesi için biyouyumluluk gibi özelliklere sahip olmalıdır. İmmobilize enzimler, serbest enzimlere oranla organik çözücülerde daha yüksek aktivite göstermektedirler (Brady ve diğ., 2008).

Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı matrikslerin bazı özellikleri aşağıda verilmiştir.

- Suda çözünmemesi
- Hidrofilik karakterde olunması
- Gözenekli (poröz) yapıya sahip olunması
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül yapısı
- Kimyasal ve termal kararlılığı
- Mikroorganizmaya karşı direnç göstermesi
- Düşük maliyetli olması
- Toksik özellik göstermemesi
- Yeniden kullanılabilir olması

Enzimin immobilizasyonu, biyokatalizörlerin fiziksel ve enzimatik stabilitesini maksimuma çıkaran birincil bir işlemdir. Bu süreç, enzimin seçiciliğini, stabilitesini ve kinetik özelliklerini taşıyıcının sahip olduğu kimyasal ve fiziksel özellikleriyle birleştirmektedir (Basso ve diğ., 2019). Desteklenen enzim hazırlıklarının özellikleri, enzimin ve taşıyıcı malzemenin özellikleri tarafından belirlenir. Bu etkileşim, immobilize bir enzimde belirli kimyasal, mekanik, biyokimyasal ve kinetik özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Taşıyıcı, sentetik bir organik polimer, bir biyopolimer ya da inorganik bir katı da olabilmektedir (Sheldon ve diğ., 2007).

İmmobilizasyon prosedürleri, enzimin kolayca yeniden kazanılmasını, hızlı bir şekilde sonlandırılmasını ve tekrarlanan enzim testlerini kolaylaştırmaktadır; bu da enzim maliyetlerinde bir azalmasını sağlamayı hedeflenir. İmmobilizasyon yönteminin tercih edilmesinin büyük rol oynayan bazı parametreler aşağıda verilmiştir. Serbest enzime göre immobilize enzimin bazı avantajları sıralanmıştır.

• Çevresel koşullarda (pH, sıcaklık vb.) dayanıklılık

•Yeniden kullanılabilirlik

• Düşük maliyetli olması (yeniden kullanılabilirliği sayesinde)

• Genellikle kararlılık

• Yüksek stabilite gösterirler

• Uzun süre kullanılırlar

• Tepkime ortamından kolay uzaklaştırıla bilmesi (santrifüjleme, süzme vs.)

• Sürekli işlem uygulaması uygun bir yapıya sahip olunması

• Klinik uygulamalarda yan etki gösterme oranını azaltması

• Ürün oluşumu kontrolü olması

• Çok adımlı tepkimler için uygun yapılı olması

• Bazı tepkime ortamlarında serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterebilmesi

• Enzimin kendi yapısını parçalaması önlenmesi

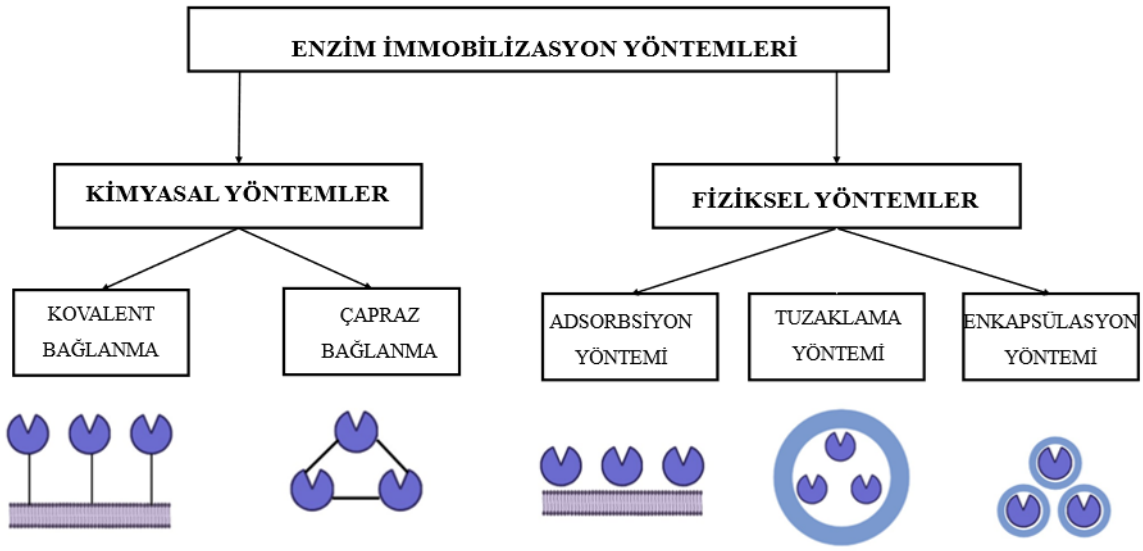
• Mekanik uygulamalar için uygun olması

İmmobilize enzim serbest enzime göre daha avantajlı olduğu görülmektedir. Bu sebeple, enzimin sürekli veya kesikli işlemler için kullanılmasını da kolaylaştırmaktadır. İmmobilize enzimin avantajları, immobilize enzimlerin gıda, ilaç, atık sularda arıtma, tekstil ve diğer endüstriyel atıklar alanında geniş bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca, immobilizasyon süreçleri için kullanılan destekleyici materyaller de immobilize enzimlerin etkinliğinde kritik bir rol oynamaktadır. Nanopartiküller, nötr polimer ve inorganik malzemeler gibi taşıyıcılar, immobilizasyon enzimlerinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Türköz ve diğ., 2024).

1.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için önemli olan bağlanma yönteminin seçimidir. Bu nedenle, enzimlerin kimyasal yapısının veya bağlanma bölgesinde bulunan reaktif grupların değişmesi, enzimlerin aktivitelerini kaybetmesini önlemek için dikkatle yönetilmelidir. Başka bir ifadeyle, enzimin bağlanma sırasında minimum hasara uğraması sağlanmalıdır. Enzimin kritik bağlanma bölgelerindeki grupların reaksiyon göstermemesi gerekmektedir. Enzimin bağlanmasında enzimin aktif bölgesi hakkında bilgi vermektedir. Enzimin aktif bölgesi, bağlanma sırasında aktivitesini yitirmemesi için, gerektiğinde uzaklaştırılabilen uzun koruyucu gruplarla korunabilir (Sheldon ve diğ., 2007).

Enzim immobilize edebilmek için birden fazla yöntem bulunmaktadır. En çok tercih edilen yöntemler ise kimyasal yöntemler (çapraz bağlama ve kovalent bağlama) ve fiziksel yöntemlere (adsorpsiyon, tuzaklama ve enkapsülasyon) dayanmaktadır (Basso ve diğ., 2019). İmmobilizasyon yöntemlerini çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte Şekil 1.6'da verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 1. 5: Farklı immobilizasyon yöntemleri

Buna göre immobilizasyon yöntemleri; fiziksel immobilizasyon ve kimyasal immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

1.5.1 Kimyasal immobilizasyon yöntemleri

Geri dönüşümsüz immobilizasyon teknikleri, enzimlerin taşıyıcı matrise kalıcı olarak entegre edildiği yöntemlerdir. Bu teknikler, enzimin kimyasal ve aktivitesini korumakla birlikte matrise tutunmasını sağlar.

1.5.2. Kovalent bağlama yöntemi

Kovalent immobilizasyon, immobilizasyon teknikleri arasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Bu immobilizasyon yöntemi, enzimler ile taşıyıcılar arasında kovalent bağ oluşturulmasına dayanır. Enzim, taşıyıcıya kovalent olarak bağlandıktan sonra taşıyıcıdan ayrılamaz. Kovalent immobilizasyonlarda, enzimler reaktif taşıyıcılar ile kovalent bağlanması protein yapısında yaygın olarak bilinen yöntemlerle ve çoğunlukla sulu ortamda gerçekleşir. Bu süreç, enzimin işlevselliğini koruyarak sabit bir matriks üzerinde kalıcı olarak tutunmasını sağlar (Cao, 2006).

Enzimin taşıyıcı matrise kovalent bağlanmasında dikkate alınması gereken kritik bir hususta bağlanmanın enzim aktivitesi için gerekli olan gruplar üzerinden yapılmaması ve bağlanma sırasında oluşabilecek sterik engellemelerin bu grupları etkilememesidir. Bu, enzimin fonksiyonelliğinin korunmasını sağlamak için önemlidir. Bağlanma, taşıyıcı yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar arasında bulunan enzim yüzeyine bağlı amino asitlere sahip fonksiyonel gruplarla gerçekleşir.

Bağlanma işlemi genellikle sulu ortamlarda gerçekleşmektedir ve taşıyıcılar ilk başta reaktif olmadıklarında bu taşıyıcılar aktifleştirilmesi için genellikle yardımcı bir reaktif kullanılmaktadır. Yardımcı reaktif, taşıyıcının uygun kimyasal özelliklere sahip olmasını sağlayarak enzimin fonksiyonel grupları ile kovalent bağlanmasını mümkün kılar sahip fonksiyonel gruplarla gerçekleşir. Yöntemin gerçekleşmesi ne kadar zor olsa da enzim ile taşıyıcı matris arasındaki bağ kuvvetli olduğundan bazı durumlarda enzim aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Nguyen ve diğ., 2017).

1.5.3. Çapraz Bağlanma Yöntemi

Çapraz bağlanma yöntem, biyokatalizörlerle iki veya daha fazla işlevli olan reaktif veya ligand ile birbirlerine bağlanmasını içeren süreçler vardır. Bu süreçte, genellikle çok yüksek molekül ağırlığına sahip ve tipik olarak çözünemeyen agregatlardan oluşur. Çapraz bağlama diğer yöntemlere göre nispeten basit bir işlemdir. Bu nedenle, bu yapılar genellikle jelatinimsi bir yapıdadır ve özellikle sert yapıya sahip değildirler. Kovalent bağ içerdikleri için, bu yapıya ait bulunan immobilize edilmiş biyokatalizörler genellikle konformasyon değişikliklerine uğrar ve sonuç olarak aktivite kaybı yaşanabilir. Bu bağlamda, diğer destek

matrikslerine bağlı olan immobilizasyon teknolojileri ile birlikte, özellikle adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş olunan enzimlerin kaybını minimuma indirmek için çapraz bağlama yöntemi iyi kullanım alanı sağlamaktadır. Çapraz bağlama yöntemi için en çok kullanılan bifonksiyonel ajanlar glutaraldehittir. Glutaraldehitin tarafında bulunan uçlarında reaktif aldehitlerin grupları, bir bazik tepkime aracılığı ile enzimlerde bulunan serbest amino grupları ile tepkimeye girerler. Bu yöntem, düşük maliyete sahip olması, yüksek verimlik ve kararlılıkları sebebiyle yaygın olarak tercih edilir. Enzimler ya da hücreler genellikle albümin, kolajen ve jelatin gibi inert protein olduğunda genellikle çapraz bağlanır ve bu yöntem bu tür matrislere uygulanabilir. Bu yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Katalitik gruplarda immobilizasyondan sorumlu reaksiyonlara katılmasından kaynaklanabilecek istenilmeyen aktivite kayıpları oluşabilmektedir. Bu yöntemle reaksiyon kolayca kontrol edilememektedir. Bu sebeple yüksek aktiviteye sahip tutma özellikli büyük enzim agregatlarını elde etmek oldukça zordur. İmmobilize edilmiş enzimlerin fiziksel yapısının jelatinimsi olması da bir çok alanlarda uygulamaları sınırlandırılmaktadır (Ahmad ve diğ., 2015).

1.5.4. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri

Fiziksel immobilizasyon tekniğinde enzimler ve taşıyıcı matriksler arasındaki bulunan ikincil etkileşim türlerinden yararlanılmaktadır. Bu teknikte enzim ve taşıyıcı matriks arasında bulunan etkileşimler geri dönüştürülebilmektedir.

1.5.5. Adsorbsiyon yöntemi

Enzimin çözünmeyen taşıyıcı matriks üzerinde adsorpsiyonu, diğer immobilizasyon tekniklerine göre çok eski aynı zamanda basit bir yöntem olmasına rağmen, geniş uygulama alanlarına ve yüksek kapasiteye sahip enzim yüklemesi bulunmaktadır. Bu yöntemde, enzimler istenilen pH ve iyonik etkileşim koşulları altında adsorbentle karıştırılarak immobilize edilir. Ardından, sıkı bağlanmamış veya bağlanmış enzimler yıkanarak immobilize edilmiş enzimler doğrudan kullanılabilir formlarda elde edilir.

Adsorpsiyon yöntemi, van der Waals etkileşimleri, hidrojen ve iyonik bağlarıyla birlikte hidrofobik etkileşimler gibi çeşitli zayıf etkileşimlere dayanmaktadır. Bu etkileşimler, adsorbe edilmiş enzimlerin aglomerasyon, hidrofobik ve proteoliz arayüzlerle etkileşim gibi sorunlardan korunmasına yardımcı olmaktadır. Adsorbent seçimleri, özellikle kullanılacak olan enzimlerin sızıntısını minimuma indirmeye yönelik olarak kritik öneme sahiptir. Enzimlerin ve destek matrisinin mevcut yüzey özellikleri, kimyasal modifikasyon

gereksinimleri ve enzim koruması açısından titizlikle değerlendirilmelidir. Kullanım sırasında pH ya da iyonik güçlerdeki olağandışı değişikliklerin, bağlanma kuvvetlerini zayıflatmamasına özen gösterilmelidir (Ahmad ve diğ., 2015).

1.5.6. Tuzaklama yöntemi

Tuzak immobilizasyon yönteminde enzim direkt taşıyıcı yüzeyine bağlanmak yerine, enzim polimerik bir ağın içine tutsak edilmektedir. Bu polimerik ağ, enzimi çevreler ve substrat ile ürün moleküllerinin geçişine izin verirken, enzim için difüzyonu kısıtlanmaktadır. Tuzaklama yönteminin immobilizasyonu genellikle iki aşamada gerçekleştirilir: İlk olarak, enzim monomer çözeltilerine karıştırılır, ikinci olarak ise, monomer çözeltisi kimyasal reaksiyon polimerizasyonu ya da deneysel koşullarda değiştirilmesi ve böylece enzim polimer ağ içinde hapsedilir. Enzim, fiziksel olarak polimerik bir kafes ağının içine hapsedildiği için, bu yöntemde enzim ile hapsedilen polimer ile arasında kimyasal bir etkileşim oluşmaz. Bu durum yönteminde enzimlerin stabilitesini artırmasını, enzim süzülmelerini ve denatürasyonunu minimuma indirmesini sağlar. Ayrıca, bu yöntemin bir başka avantajı, kapsülleme malzemesinin enzim için uygun pH, amfifilik veya polarite özelliklere sahip olacak şekilde modifiye edilerek enzim için ideal mikro ortamı oluşturma yeteneğidir. Bu şekilde, enzim aktivitesi optimize edilebilir ve çevresel koşullara karşı daha dirençli hale getirilebilir. Ancak, yöntemin bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Örneğin, polimerizasyon süreci jel matrisin kalınlığını artırabilir ve bu durum kütle transfer direncine neden olabilir, böylece substratın enzim aktif bölgesine ulaşması zorlaşabilir. Böylece, destek matrisin gözenek boyutu maksimum büyüklükteyse, hapsedilen enzimlerde sızıntıya sebep olması muhtemeldir. Yöntemde enzimin yüklenme kapasitesi genellikle düşük olur ve destek malzemeleri polimerizasyon süreciyle bozulabilir (Nguyen ve diğ., 2017).

1.5.7. Enkapsülasyon yöntemi

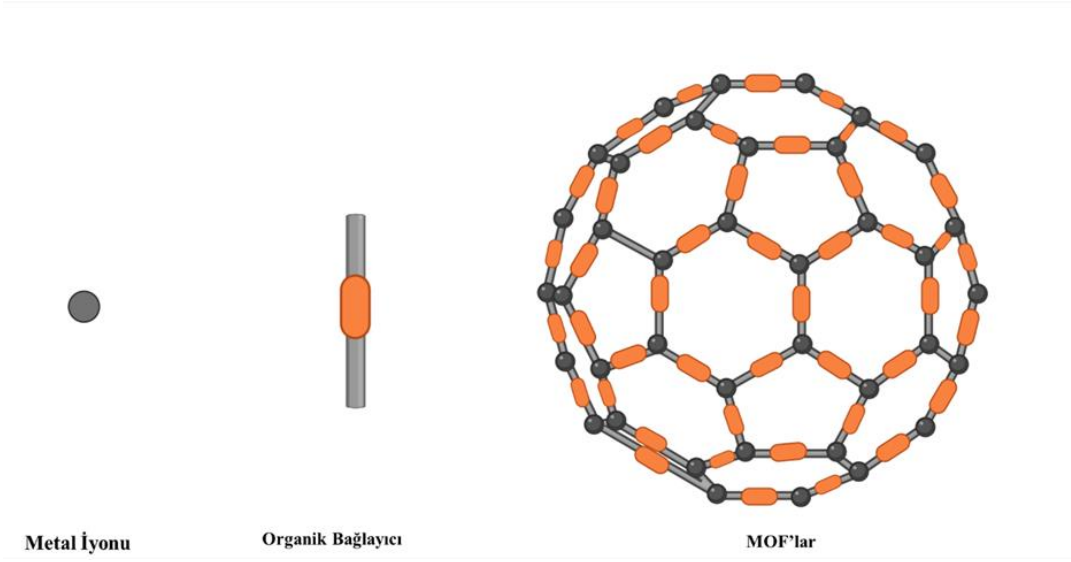
Enkapsülasyon yöntemi, enzimlerin küresel yapıda olup yarı geçirgen membran içinde hapsederek immobilize edilen bir tuzaklama çeşidi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin asıl olarak amacı, enzimin substratlarla ya da ürünlere oranla daha makro boyutta

olmasıdır. Enzimin yarı geçirgen membran içine hapsedilip ya da tıkandığında, küçük boyuttaki substrat moleküllerini içeri alınmasına ve ürün moleküllerini dışarı dağılmasına izin vermektedir. Ancak, makro boyutta sahip olan enzimler ise membrandan geçemeyerek membran içinde kalırlar. Bu sebeple, enzim kapsülün içinde serbest halde hareket etmesine rağmen membranın içinde kısıtlanmaktadır (Krishnamoorthi ve diğ., 2015).

Enkapsülasyon yöntemi, biyomoleküllerin ucuz ve etkili bir şekilde hapsetme yeteneği sayesinde büyük bir ilgi görmektedir. Bu yöntem, biyomoleküllerin bir polimer matrisin içinde hapsedilmesiyle hareketlerini kısıtlar ancak aynı zamanda substratın tanınmasına ve katalizlenmesine destekvermektedirler. Jel teknolojisi, kapsülleme işlemi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknoloji doğal veya sentetik kökenli destek malzemeleri kullanılarak uygulanabilinmektedir (Sneha ve diğ., 2019).

1.6 Metal Organik Kafesler

1989 senesinde Robson'un keşfetmesinden bu yana, manyetizma kataliz, ayırma ve daha farklı stratejik alanlar içinde potansiyel bir aday haline gelmiştir. Metal organik kafesler (MOF'lar), metal iyonları (M+) ile poli-fonksiyonel organik moleküllerle (L-) bağlanmasıyla bir, iki ya da üç boyutlu ağlar oluşturan, kristalin yapıya sahip ve gözenekli yapıda koordinasyon polimerleridir (Şekil 1.7). Bu yapı birimi, inorganik ve organik gözenekli malzemeler bir kısım özelliklerini birleştirip büyük bir yüzey alanına sahip, kolay işlenebilirlik, ayarlanabilen gözenek boyutu, yapısal çeşitlilik gibi özellikleri bulunan iyi tanımlanmış yapıları elde etmek mümkün olmuştur. (Loera-Serna ve diğ., 2012.)



Şekil 1. 6: MOF'un yapısına ait şematik gösterimi

MOF’lar kristalik yapıda olmalarından kaynaklı olarak atomik yapıları tam olarak bilinmektedir. Metal iyonları ve bağlayıcıların seçiminde, nihai olarak elde edilecek olan ağ türünü belirlemektedir. Bu seçimler, manyetik değişimi, doğrusallık bulunmayan optik alanlarda uygulamalar için merkez simetrisinin sağlanması veya moleküllerin geçişine olanak tanıyan geniş boşlukların oluşturulması gibi sonuçları belirler. Kiral merkezin veya reaktif alanların açık bir şekilde çerçeveye entegre edilmesi, işlevsel materyaller sentezinde önemli bir stratejik hedef olarak tanımlanmaktadır (Rowsell ve diğ., 2004).

Son yıllarda MOF'lar, yüksek fotoaktivite ve ürün seçicilikleri gibi özellikleriyle fotokatalizörler olarak kullanılmaktadırlar. MOF'ların fotokatalitik performansı, yarı iletkenlerle entegrasyon, yüzey modifikasyonu, metal nanoparçacıkları entegre etme ve MOF kompozit oluşturmaları gibi tekniklerle optimize edilebilmektedir.

Fotokatalitik CO_2 indirgenmesinde metal-organik çerçeveler (MOF'lar) katalizör olarak uygulanmaktadır (Ramyashree ve diğ., 2021).

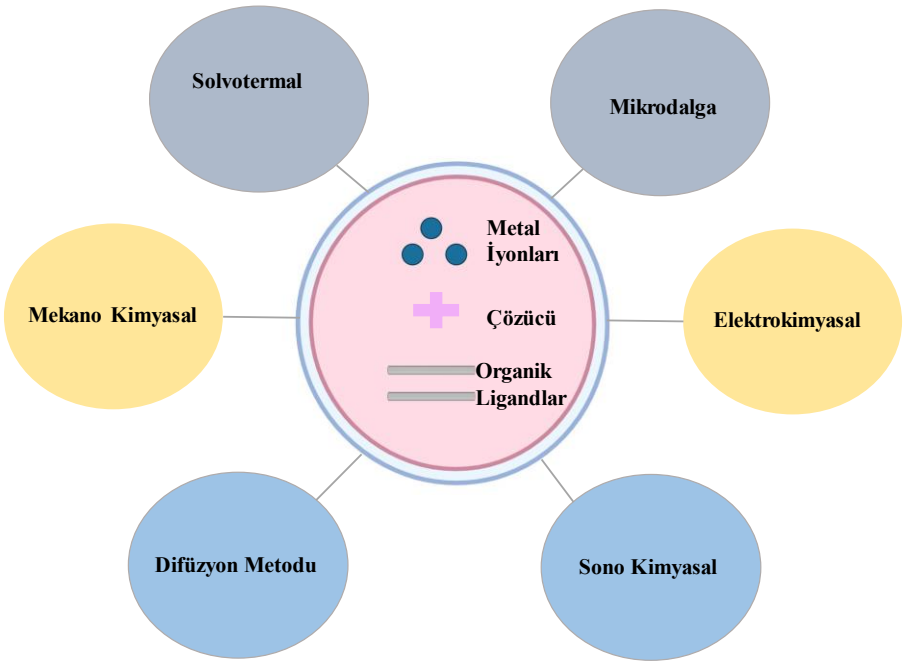
MOF'ların su tutma gaz adsorpsiyon/ayırma, lüminesans, kataliz (fotokataliz dahil), ilaç salımı, enerji depolama gibi çeşitli uygulama alanlarında kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Son yıllarda ise MOF'lar özellikle su arıtılmasında ve hava kirliliğinin kontrol altına alınmasında vb. çevresel sorunların iyileştirilmesi gibi alanlarda araştırmalar bu alanlara yönelmektedir]. 1995–2014 seneler arasında global araştırma durumunu değerlendiren bibliyometrik analizler, MOF'lerin çevresel iyileştirme uygulamalarındaki araştırma eğilimlerini ortaya koymuştur. Ön görülen çevresel iyileştirme alanında yapılan araştırmalarda MOF uygulamalarının araştırma durumunu açıklığa kavuşturmuştur. Su arıtma alanında yapılan araştırmalarda, MOF'lar sadece kirleticilerin niceliksel veya niteliksel olarak belirlemek için kullanılan algılayıcı sensör işlevi görmekle kalmaz, aynı verimlilikte yüksek adsorbanlar ya da katalizörler olarak kirleticileri de yok etmektedirler. Bu özellikleri, MOF'larin su arıtma süreçlerinde hem tespit hem de giderme işlevleriyle çok yönlü kullanımını sağlar (Li ve diğ., 2020).

MOF'lar, son dönemlerde toksik su kirleticilerini uzaklaştırılmada ve doğal özellikleri nedeniyle boyaların adsorpsiyonuna uygun adsorban olarak kullanılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde, MOF'lar su arıtma süreçlerinde etkin bir rol oynamaktadır.

1.7. MOF’ların Sentez Yöntemleri

MOF’lar için yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve çeşitlilik göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile yüzlerce MOF varlığı keşfedilmiştir (Huve diğ., 2010)

. Elde edilen MOF'ların da sentez yöntemleri çeşitlilik göstermektedir. Bunlar genel olarak, solvotermal, elektrokimyasal, mekanokimyasal, hidrotermal, mikrodalga ve sonokimyasal yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle çözücülüğü yüksek olan organik çözücüler kullanılmaktadır. Çözücü seçimleri MOF'ları etkilediğinden, İstenilen özellikte MOF'lar için çözücü seçilmesi gerekmektedir. MOF'ların sentez yöntemleri Şekil 1.8'de verilmiştir (Lee ve diğ., 2013).



Şekil 1. 8: MOF sentezlenme yöntemleri

1.7.1 Solvotermal sentez yöntemi

MOF'lar, küçük boyutta şişelerde ya da kapalı NMR tüpleri gibi geleneksel elektrikli ısıtılma yolu ile solvotermal sentez yöntemi olarak üretilir. Maksimum verimlilikte solvotermal sentezler, yeni MOF yapısının keşfedilmesini hızlandırır ve sentez prosedürlerini uygun koşullara getirmek için güçlü bir yöntemdir. Bu yöntemin amacı, MOF'ların çeşitli uygulama alanlarına yönelik özelleştirilmesine olanak tanıyıp, araştırma ve geliştirme süreçlerini önemli ölçülerde hızlandırmakdır. Solvotermal sentez yöntemi, farklı metal iyonları ve organik ligandlarla yapılan çeşitli kombinasyonlarda araştırmayı mümkün kılarak, MOF'ların yapısal çeşitliliğini ve fonksiyonel özelliklerini artırır. Bu

yöntem hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel uygulamalarda MOF üretimini daha verimli ve ekonomik hale getirir (Lee ve diğ., 2013).

Bu yöntemle üretilecek olan malzemelerin morfolojisi, boyutu ve kristal yapısı dikkatli bir şekilde kontrolü olarak elde edilebilir. Solvent türü, sentez ortamının sıcaklığı, reaksiyonda kullanılan malzemelerin konsantrasyonları ve çözeltilerin pH'sı dikkatli seçilmelidir. MOF'ların büyük kısmı solvotermal yöntemle sentezlenmiştir. (Bian ve diğ., 2018)

1.7.2. Elektrokimyasal sentez yöntemi

MOF'ların elektrokimyasal sentezinde, çözünmüş bağlayıcılı moleküller ve reaksiyon ortamında bulunan iletken tuz ile reaksiyona giren metal tuzları yerine metal kaynağı olarak anodik çözünme yoluyla sürekli olarak sağlanan metal iyonları kullanılır. Protik çözücüler kullanılarak katot üzerinde metal birikimi önlenir, ancak bu süreçte H2 üretilir. Elektrokimyasal yol, normal kesikli reaksiyonlara kıyasla daha yüksek bir katı madde içeriği elde etmek için sürekli bir süreç yürütmek de mümkündür (Lee ve diğ., 2013).

MOF'lar, elektrokimyasal sentez yöntemleri kullanılarak endüstriyel alanlara uygun üretilmektedir. Ayrıca, metal iyonları destek yüzeyinde yakında veya yerinde üretilmesi gibi sebepleriyle kristallerin istenmeyen birikimini azaltarak MOF'ların sentezi sırasında yığın aşamasında kristalleşmeyi sınırlama yeteneği bulunmaktadır. Bu özellikler, elektrokimyasal sentezi hem verimli hem de ekonomik hale getirmektedir (Butova ve diğ., 2016).

Ayrıca, elektrokimyasal sentezinde kullanılan düşük sıcaklıklar ile solvotermal sentezinde kulanılan sıcaklıklar arasında bir karşılaştırma yapıldığında soğutma sırasında termal olan indüklemenin çatlamasının etkisinin minimum belirginlikte olmasına neden olur. Bu çatlamalar, MOF ile farklı destek yapısı arasındaki termal genişleme katsayılarındaki uyumsuzluktan kaynaklanır. MOF'ların negatif bir termal genleşme katsayısı vardır. Dolayısıyla, elektrokimyasal sentez yöntemleri, voltajın kolay bir şekilde ayarlanabilmesi ya da belirli sinyallerin (örneğin darbeler, vb.) uygulanabilmesi sayesinde, solvotermal tekniklere kıyasla daha fazla ince ayar yapılmasına olanak tanır. Bu yöntem, kontrol edilebilirliği ve esnekliği ile MOF sentezinde önemli avantajlar sunar (Safaei ve diğ., 2019).

1.7.3 Mekanokimyasal yöntem

Mekanokimyasal yöntem kimyasalların öğütücü içerisinde karıştırılması ile gerçekleşen işlemlerden oluşmaktadır. Bu yöntem, çözücüyle hazırlamak yerine, oda sıcaklığı ortamında reaktifleri elle öğütme veya otomatik bilyeli değirmenlerde kullanarak

koordinasyon bağları oluşturur. Bazı koşullarda az miktarlarda çözücü katı reaksiyon karışımına eklenebilir ve bu şekilde bir boyutlu, iki boyutlu ve üç boyutlu koordinasyonlu polimerlerin elde edilmesi başarıyla gerçekleşir. Mekanokimyasal sentez yöntemi, kütle transferini kolaylaştırmaktadır, parçacık boyutlarını küçültür, reaktifleri ısıtır veya yerel olarak eritebilmektedir. Dolayısıyla bu da reaksiyon süresini hızlandırmaktadır. Bu yöntem, reaksiyon sürelerini kısaltarak yüksek saflıkta ve verimlilikte malzemeleri üretebilen çevre dostu yeşil bir kimya yöntemi olarak kabul edilir. Mekanokimyasal yöntemin MOF sentezine uygulanabilmesi, yüksek sıcaklıklarda ve basınç gerektiren solvo(hidro)termal sentezine alternatif olarak çekici hale gelir. Ancak, yöntemin en büyük dezavantajı ise tek kristal X-ışını yapısal çalışmalarında istenilmeyen amorf ürünlerin elde edilmesidir (Raptopoulou, 2021).

1.7.4 Sonokimyasal yöntemi

Sonokimyasal veya ultrasonik sentez yöntemi, MOF'ların sentezlenmesinde karıştırma işlemi yerine ultrasonik dalgalar kullanarak kullanılan bir yöntemdir. Ultrasonik dalgalar, sıvılarda küçük ve geçici boşlukların oluşmasına neden olur. Bu boşluklar, sıvı basıncının ani olarak düşmesine yol açar ve bu da sıvı içinde yüksek sıcaklık ve basınç koşullarının oluşmasına neden olur. Kabarcıkların çözülmesi, kısa süreli yüksek sıcaklık ve basınç noktaları oluşturur, bu da istenen MOF'un çekirdeklenmesine yol açar (Tahmasian ve diğ., 2012).

1.7.5 Mikrodalga yöntemi

Mikrodalga sentez yöntemi, nano boyutlardaki gözenekli malzemelerin hidrotermal koşullarda hızlı bir şekilde sentezlenmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntem, hızlı kristalleşmenin yanı sıra dar parçacık boyutların dağılımı ve morfolojinin kontrol altına alınması gibi avantajlar sunar. Ticari mikrodalga ekipmanları, ayarlanabilir güç artışlarını ve fiberlerin optik sıcaklıkta veya basınçta kontrol cihazları gibi özelliklerle donatılmıştır.

Mikrodalga sentezinde, uygun bir çözücünün içinde bulunan substrat karışımları teflon kaba eklenip ve mikrodalga ünitesine bırakılır. Belirli bir sıcaklıkta belirli bir süre boyunca ısıtılır. Bu yaklaşım, molekülün kalıcı dipol momentiyle birleştiği ve moleküler rotasyonları indüklediği bir sentez ortamı sağlamakta olup sıvı fazın hızlı bir şekilde ısınmasına yol açar (Ramyashree ve diğ., 2021).

1.7.6. Difüzyon yöntemi

Difüzyon yöntemi, metal tuzların ve organik bağlayıcıların bulunduğu çözeltilerin güçlü bir şekilde karıştırılmasıyla birlikte X-ışını kırınımına uygun olmayacak olan toz numunelerin mikro boyuttaki kristallerini oluşturmaktadır. Polikristal tozların oluşumunu engellemek için bu yönteme başvurulmaktadır. İki solüsyonu düşük hızda ve düzenli difüzyonu, X-Işını Kırınım (X-Ray Diffraction-XRD) testleri için potansiyel büyük kristaller sentezlenir. Kristalin büyüklüğünü çözücü ve sıvının difüzyonu sırasındaki oluşan tabakalar sayesinde gerçekleşir.

• İlk tabaka çözücü ve çözeltiyi bünyesinde bulundurmaktadır.

• İkinci tabaka ürünleri ve çözücülerini oluşturmaktadır.

• Üçüncü tabaka ise ilk iki tabakayı birbirinden ayırarak difüzyonu oluşturmaktadır.

Çözücülerin tabakalar arasında geçişinde kristallerin büyüklükleri tabakalardaki arayüzlerde görünür olmaktadır (Gangu, KK, ve diğ., 2016).

1.8. MOF'ların Avantajları

• MOF'lar, maksimum verimlilikte ve minimum maliyete sahip ürünler sentezlenebilmektedir.

• MOF'lar, nano ölçeklerde üretildiğinde ve kristalleri yoğun bir şekilde peletlere paketlenebilecek kadar güçlü mekanik özelliklere sahip olduğunda, hacimsel kapasiteleri en üst düzeye çıkabilmektedir.

• MOF'lar, aktivasyon sürecinde çözücünün uzaklaştırılması, adsorpsiyon kapasitesi ve binlerce döngü boyunca rejenerasyon süreçleri için termal ve kimyasal olarak kararlılık göstermelidir.

• Enzim ve MOF'ların kompozit gelişimlerinin farklı immobilizsyon yöntemleri arasında maksimum stabilite gösteren kolay, hafif ve hızlı immobilizasyon yöntemleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür.

•Gözenekli malzemeler, enzimlerin hareketsizleştirmek için potansiyel aday haline gelmektedir. Son yıllarda, MOF'lar belirgin gözenek yapısına sahip olması, termal stabilitesi onkları enzim immobilizasyonuna uygun bir aday haline gelmiştir.

1.9. Enzim İmmobilizasyonunda MOF Kullanılması

Son dönemlerde, MOF'lar ayarlanabilen maksimum yükseklikteki gözenek boyutu, yüksek spesifik yüzey alanları ve gözenek hacimi ile belirli ortamların yüksek kimyasal, mekanik ve termal stabilite gibi eşsiz özellikleri sayesinde enzim immobilizasyonunda yeni destek matrisler olarak önemli bir ilgi odağı haline gelmiştir. MOF'ların nanometre ile

mikrometre düzeylerinde hassasiyet sunan düzenli topolojileri ve homojen mikro ortamları, morfolojilere, yüzey işlevselliklerine, çeşitli boyutlara ve yük durumlarına sahip enzimlerle yüksek uyumluluk gösterir, bu da onları son derece esnek ve etkili destek matrisler yapmaktadır. Mezogözenekli MOF'ların enzimlerle birleşimi, son derecede düzenli çerçevelerle korunduklarından dolayı, organik çözücüler, yüksek sıcaklık ve yüksek bazik ya da asidik pH gibi zorlu koşullarda enzimlerin gelişmiş stabilite ve katalitik performans sergilemesini sağlar. Böylece, MOF'lar birden fazla katalitik fonksiyonel gruplara sahip olduğundan, spesifik katalitik aktiviteler ve yüksek stabiliteler sunan, enzim benzeri işlevselliğe sahip çeşitli şekillerde MOF türleri geniş çapta incelenip rapor edilmiştir. Enzimlerin korunması ayrıca immobilizasyonundan da daha önemli olan, MOF'lar ve enzimlerdeki sinerjik kataliz, gelecekte kullanılacak olan katalitik uygulama alanları için büyük bir potansiyel taşımaktadır. 2006'da MOF'ların enzim immobilizasyonun ilk kez rapor edilmesinden bu yana, bu konu giderek artan bir ilgiyle araştırılmaya devam edilmektedir. Katalitik performans, sentez metodolojisi ve MOF-enzim nanokompozitleri pratik uygulama alanlarına odaklanan bazı incelemeler yapılmış olsa da, enzim immobilizasyonu için MOF'lardaki son gelişmeleri ve gelecekte kullanılacak olan perspektifler üzerine kapsamlı ve eleştirel olan incelemeler, bu alanın hızla gelişmesi nedeniyle halen büyük bir önem taşımaktadır. Enzimler genel olarak üç ana yöntemle destek matrise immobilize edilebilmektedir: destek içine bağlanma, çapraz bağlama ve kapsülleme şeklinde bağlanma sağlanmaktadır. Aynı şekilde, enzim ile MOF matrisi arasında bulunan bağlanma sistemine göre MOF-enzim kompozitlerinin üretiminde üç temel yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler: yüzey biyokonjugasyonu (kovalent bağlama ve fiziksel adsorpsiyon dahil), MOF'lara infiltrasyon (MOF'ların gözeneklere veya kafeslere difüzyonu) ve tek pota gömme (biyomimetik mineralizasyon ve birlikte çöktürme dahil olmak üzere yerinde kapsülleme). Bu temel üç immobilizasyon yöntemini kendi ait avantajları ve uygulama alanlarının potansiyelleriyle birlikte aşağıda detaylı olarak incelenecektir (Liang ve diğ., 2020).

MOF'ların esnek yapıları gözenekli ortamı, geniş bağlanma ve etkileşim alanları, birçok enzimin immobilizasyonuna avantaj sağlayıp substratların ve ürünlerin kütlelerin transferini kolaylaştırmaktadır. MOF'lar, geniş yüzey alanına sahip olup, fazla miktarda fonksiyonel bölgeleri ve gözenekleri sayesinde yüksek oranda immobilizasyon verimliliği sunmaktadır. Ayrıca, MOF'lar yapılarında bulunan katalitik gruplar sebebiyle enzimlere benzeyen aktiviteler gösterebilirler. Dolayısıyla, etkili bir şekilde immobilizasyon sağlanabilmesi için enzimin hapsetme yöntemi dikkat edilmelidir. Enzimlerin yapısal

modifikasyonları, katalitik aktivitelerinde önemli düşüşlere neden olabileceğinden, bu süreç son derece dikkatli bir şekilde yürütülmelidir.

Enzim ve MOF arasında bulunan etkileşimlerin zayıf olması, enzimlerin çözülmesine ya da sızıntı yapmasına neden olabilmektedir. Bu sebeple, destek taşıyıcıları ile enzimlerin etkileşimlerinin yüksek seçicilikte olması gerekmektedir. Çeşitli araştırmalar, enzimlerin ve MOF'ların arasında bulunan biyokatalizörleri, bu kompozitlerin sıklıkla sentez ve immobilizasyon tekniklerini ve çeşitli uygulama alanlarını inceleyen kapsamlı değerlendirmeler sunmuştur (Silva ve diğ., 2022).

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

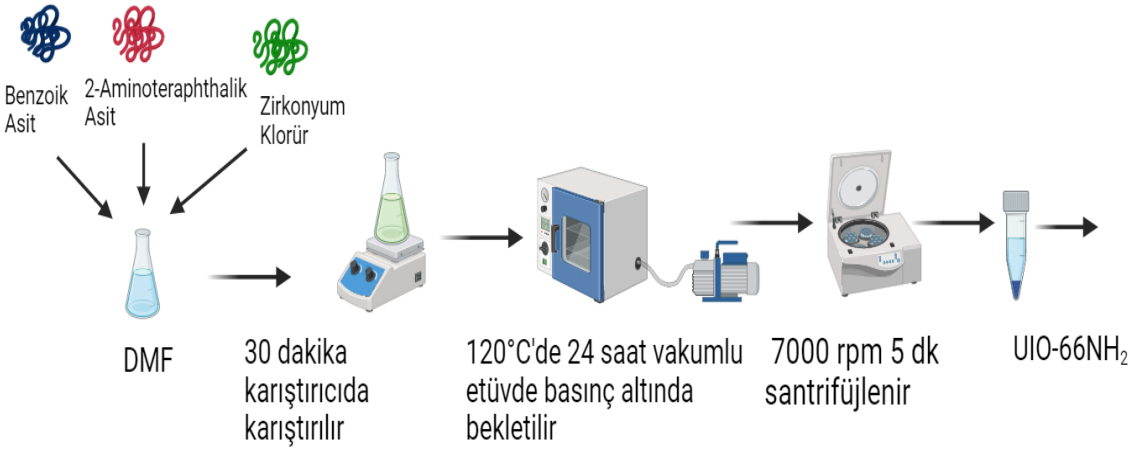
Çalışmada kullanılan kimyasallar, analitik saflık standartlarına uygun olarak temin edilip ve deneylerde kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar sıralaması ise; Tyr (Sigma), N, N-dimetilformamid (İsolab), benzoik asit (Merck), zirkonyum klorür (Sigma), 2-aminoterefialik asit (Sigma-Aldrich), 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (Sigma), bakır klorür (Boston), sodyum dihidrojen fosfat (Merck), tris hidroksimetil aminometan (Merck), di-sodyum hidrojen fosfat (Merck), hidroklorik asit (Merck), sodyum hidroksit (Merck) şeklindedir.

2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar; karıştırıcı (Wisd), pH metre (Hanna), etüv (Nüve En 120), su banyosu (Nüve NB 20) , inkübatör (Nüve ES 252), santrifüj (HermleZ 36 HK) manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Dathan), terazi (And), FTIR (Perkin Elmer), vorteks (Fisons), ultrasonikatör (Bandelin), FTIR (Perkin Elmer), ultrasonik banyo (Wisd), vakumlu etüv (Nüve), DLS (Litesizer), Eliza (Biotek) olarak sıralanmaktadır.

2.3. UIO-66/NH_2 Sentezlenmesi

Tez kapsamında UIO-66/NH_2 hidrotermal sentez yöntemiyle sentezlenmiştir. Bu yöntem için ilk olarak 0,60 g $ZrCl_4$ alınıp üzerine 0,55 g 2-aminoterefialik asit alınır daha sonra 9,50 g benzoik asit eklenmiştir. Üzerine 50 mL DMF ilave edildi. Kapaklı bir şişe içerisine konulup 30 dakika yüksek rpm'de kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 100 mL'lik teflon paslanmaz kabın içine aktarılmıştır. Hazırlanan çözelti teflon kap içerisinde 120°C'de 24 saat ısıtılarak vakum altında sentezin gerçekleştirilmiştir. Azami süre bittikten sonra teflon kap içerisindeki çözelti çıkarılır ve soğuması beklenmiştir. Çözelti tüplere alınıp santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan atılıp çöken katı 12 saat 80°C'de etüvde kurutularak UIO-66/NH_2 sentezi gerçekleşmiştir. Şekil 2.3' de UIO-66/NH_2 sentezi gösterilmiştir.



Şekil 2. 3: UIO-66/NH_2 sentezi

2.4. Cu/ UIO-66/NH_2 Hazırlanması

UIO-66/NH_2 katısı alınıp saf su içinde dağıtılıp ve farklı konsantrasyon oranlarında çeşitli miktarlarda (5 mM, 10 mM ve 20 mM) $CuCl_2$ eklenmiştir. Nihai çözelti, 30 dakika oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda homojen hale gelene kadar bekletilmiştir. Cu-modifiyeli MOF'lar inkübe edildikten sonra yıkanıp kurutulmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki bakırlı MOF'lara enzim immobilize edilip aktiviteleri ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre 20 mM $CuCl_2$ konsantrasyonuna sahip MOF seçilmiştir. Şekilde 2.4'de UIO-66/NH_2 katısına $CuCl_2$ inkübe edilmiştir.



Şekil 2. 4: Cu-UIO-66/NH_2 sentezlenmesine ait şematik gösterim

2.5. Tirozinaz Enziminin İmmobilizasyonu

Cu-UIO-66/NH_2 katısı 100 mg alınmıştır. Üzerine 25 µL gluteraldehit ilave edilip 975 µl saf su eklenmiştir. Nihai çzöeltiler +4 °C'de 30 dk çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Bekleme süresi dolduktan sonra çözelti alınıp 5000 rpm de 5 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatan atılmıştır. Mevcutta bulunan malzemenin üzerine 40 µL Tyr ilave edilip üzerine 960 µL saf su eklenmiştir. +4 °C'de 24 saat çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Beklenilen süre dolduktan sonra Cu-UIO-66/NH_2 5000 rpm de 5 dk santrifüjlenmiştir. Kuruması için 37°C'de etüv de bekletilmiştir. Şekil 2.6'da Cu-UIO-66/NH_2'e tirozinaz enzimi immobilizsayonu gösterilmektedir.



Şekil 2. 5: Cu-UIO-66/NH_2'e Tyr'nin immobilizsayonu gösterimi

2.6. Tirozinaz Aktivitesinin Tayin Edilmesi

Tirozinazın aktivitesi, serbest enzimin aktivitesi ölçülürken kullanacağımız substrat L-DOPA olacak ve kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, 5 mM L-DOPA içeren fosfat tamponu (5 mL, 0.1 M, pH 7.0) çözeltisini 1,0 mg tirozinaz içeren 0.1 mL enzim solüsyonu veya immobilize enzim (6 mg) eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Serbest enzim 40 µl alınıp ependorf tüplere ilave edilir üzeri substrat çözeltisi eklenerek 1 ml tamamlanmıştır. Daha sonra 40°C'de 15 dk inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra enzimin aktivitesi 450 nm nm'de köre karşı okuması yapılmıştır. Her ölçüm üç tekrarlı yapılıp hesaplamalar içinde ortalaması alınmıştır. 1.0 µmol dopakrom üretimi için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.7. İmmobilize Enzimin Aktivitesinin Ölçümesi

İmmobilize edilmiş enzim örneklerinden 6 mg tartılıp üzerine, 0.1 M fosfat tamponu (pH 7) ile yeni hazırlanılmış 0.1 M L-DOPA çözeltisinden 1 ml eklenip daha sonrasında

40°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi yapıldıktan sonra malzemeler 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonrasında süpernatan alınıp 450 nm'de köre karşı okuması yapılmıştır.

2.8. MOF'ların Fizikokimyasal Karakterizasyonları

Hazırlanan metal organik kafesler enzimli ve enzimsiz karakterizasyonları oda sıcaklığında FTIR analizi yapılmıştır. Morfolojilerini inceleyebilmek için SEM analizi yapılmıştır. XRD analizi yapılarak elde edilen metal organik kafeslerin litaratürde bulunan sonuçlar ile karşılaştırılması yapılmıştır. DLS ölçümleri yapılarak hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli ölçümleri incelenmiştir.

DLS ölçümü için seyreltik halde bulunan çözelti içerisindeki küçük partiküllerden saçılan ışık şiddetini ve değişimini ölçme temeline dayanmaktadır. Saçılmış olan ışık şiddetindeki değişimler, partiküllerin hareketlerine ve buna bağlı olan partikül büyüklüklerine, ortamın sıcaklığı ve viskozitesine bağlıdır. Nanopartikül çözeltileri monokromatik lazer ile aydınlatılmaktadır. Saçılmış olan ışık şiddeti, foton dedektörleri tarafından sabit bir şekilde ya da değişken tarama açısıyla kaydedilmektedir. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr 1 mg alınıp üzerine saf su 10 ml eklenip çözüldükten sonra küvete alınıp ölçüm yapılmıştır.

2.9. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değerleri tanımlanmıştır. Serbest ve immobilize tirozinazın optimum pH değerlerini belirlemek için her iki enzimin de aktivitesi farklı pH değerlerinde ölçümü yapılmıştır. Bu farklı pH larda farklı tamponlar kullanılıp, pH 4-5-6 (asetat tamponu), pH 7-8 (fosfat tamponu), pH 8-9 (tris-HCl) gibi farklı pH'larda ve farklı tamponlarda hazırlanmıştır. Daha sonra 40°C'de 30 dakika inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyon işlemini yapıldıktan sonra malzemeler 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonrasında süpernatan alınıp 450 nm'de köre karşı okuması yapılmıştır. İmmobilize Cu-UIO-66NH_2 Tyr için ise örneklerden epondorf tüplere 6 mg alınıp farklı pH'larla hazırlanan substrat çözeltilerinden 1 mL eklenerek 40 °C'de 30 dk inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında 5000 rpm'de 7 dk santrifüjlenerek üst kısımda bulunan süpernatandan 200 µl alınıp absorbansları 450 nm'de ölçüm yapılmıştır.

2.10. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Enzim aktivitesini etkileyen başlıca etkenlerden birisi de sıcaklıktır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri belirli sıcaklıklar vardır. Bu sıcaklık aralığındaki değerlere

optimum sıcaklık değerleri denilmektedir. Enzimler yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. İmmobilizasyon işlemiyle enzimler yüksek sıcaklıkta bile yapısı korunmakta olup denatürasyonu önleyerek serbest enzime oranla daha yüksek aktiviteler gösterdiği gözlemlenir. Bu çalışmada optimum sıcaklık değerleri belirlenebilmesi için öncelikle immobilize enzim ve serbest enzimin optimum pH değerleri belirlenip substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra optimum sıcaklığın belirlenmesi için serbest enzim ve immobilize enzim belirlenen oranlarda alınıp daha önceden hazırlanılmış substrat çözeltileri üzerlerine ilave edilmiştir. Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerini belirlemek için 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 ℃'de 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Her bir sıcaklık değeri için ayrı ayrı ölçüm yapılmıştır. Bütün örnekler inkübasyon edildikten sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip ve süpernatandan 100 µL alınıp 450 nm de aktivite ölçümü yapılmıştır.

2.11. Depo Kararlılıklarının Belirlenmesi

Enzimlerin çevresel etkenlere karşı duyarlı olmaları uzun zaman içerisinde saklanma koşullarını zorlaştırmaktadır. Bu sorunun önüne geçmek için yapılan immobilizasyon işlemleri enzimleri çevre koşullarına karşı daha dayanıklı hale getirerek başlangıçtaki aktivitelerinin büyük kısmını uzun zaman sonra bile koruyabilmesini sağlamaktır. İmmobilize ve serbest enzimin aktivitesinin depolanma koşullarında belirlemek için enzim hacmi ve depolama koşulları sabit tutulup her iki enzim bir ay boyunca 4 ºC 'de ve 25 ºC 'de örnekler depolanarak belirlenen günlerde haftada bir her iki enzim için aktivite tayini yapılarak başlangıçtaki aktiviteleri üzerinden % aktivite verimi hesaplanıp enzimlerin aktivitelerinin ne kadarını koruyabildiği incelenmiştir. Her ölçüm sırasında serbest enzim ve immobilize enzim için optimum pH'da hazırlanılmıştır. Optimum sıcaklıkta 30 dk inkübe edilip ölçüm yapılmıştır.

2.12. Termal Kararlılık Belirlenmesi

Bu parametrenin en önemli özelliği endüstriyel alanlarda önemli kriter olmasıdır. Genelde immobilize edilmiş enzimlerin aktivesi, özellikle de kovalent bağ ile bağlanmış sistemlerde ısı ve denatüre eden ajanlara karşı serbest enzime göre direnç göstermesidir. İmmobilize enzimlerin termal kararlılıkları bu parametrede hem immobilize enzim hem de serbest enzimin termal kararlılıkları belirlenmektedir. İlk başta serbest Tyr için seçilen optimum pH'daki tamponlarda substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda serbest ve immobilize enzim çeşitli sıcaklıklarda (50 ºC -55 ºC -60 ºC) farklı zamanlarda (0-120 dk)

substrat olmayan ortamda inkübe edilir. Daha sonra substrat ile muamele edilerek aktivite ölçümü 450 nm ölçülmüştür (Özgür ve diğ., 2018).

2.13. Yeniden kullanılabilirlik

Enzim immobilizasyonu en önemli avantajlarından biridir. Yeniden kullanılabilir özelliği enzimi ekonomik hale getirmektedir. Serbest enzimler tek sefer kullanılır ve denatüre olmaktadırlar. İmmobilize edilmiş enzimler ise istenilen reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılıp tekrar tekrar kullanılabilinmektedir. Bu deneyde Cu-UIO-66/NH_2/Tyr 60 mg alınıp ependorf tüplere ilave edilmiştir. Üzerine seçilmiş olan optimum pH ile substrat hazırlanıp 40 ℃'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi bittikten sonra 5000 rpm 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatan alınıp 450 nm absorbansında ölçüm yapılmıştır. Daha sonra süernatan ependorf tüplerinden alınıp atılmıştır. Ependorf da bulunan Cu-UIO-66/NH_2/Tyr saf su ile yıkanıp 5000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Üst kısmında kalan saf su atılmıştır. Aktivite ölçümü işlemleri immobilize edilen enzimin başlangıçtaki aktivitesini kaybedene kadar tekrar edilmiştir (Zynek ve diğ., 2011).

2.14. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Bu deneyde Cu-UIO-66/NH_2/Tyr ve serbest enzimin kinetik parametreleri belirlenmiştir. serbest enzim ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr enzimi için 0,2-0,15-0,1-0,075-0,05-0,025-0,01-0,005-0,0025-0,0001M seçilen optimum pH'da farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr enzim örnekleri her ependorfa 6 mg eklenir. İki tekrarlı olacak şekilde 1 mL substrat çözeltisi eklenmiştir. Sıcak su banyosunda 40℃'de 30 dk inkübe edilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra 5000 rpm 5dk santrifüjlenmiştir. Süpernatan alınıp 450 nm absorbanda aktivitesi okunur. Serbest enzim için örnekler farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri 0,2-0,15-0,1-0,075-0,05-0,025-0,01-0,005-0,0025-0,0001M hazırlanmıştır. Her bir substrat konsantrasyonu farklı ependorflara alınmıştır. Üzerine 40 µl serbest enzim konulup 40℃'de 30 dk su banyosuna alınıp inkübe edilir. Daha sonra 450 nm absorbansı ölçülmüştür (Marín-Zamora ve diğ., 2007).

2.15. Fenolün Giderilmesi

Öncelikle 100 ml 10 ppm fosfat tamponu (0,05M, pH 7) 2,4 diklorofenol hazırlanmıştır. Daha sonra 2mM 4-aminoantipirin fosfat tamponunda (0,05M, pH10) hazırlanmıştır. Son olarak 25 ml 6mM potasyumferrisiyanür (0,05M, pH 10) 25 ml

hazırlanmışr. Kalibrasyon grafiği çizmek için farklı oranlarda (10 ppm) fenol çözeltisi hazırlanmıştır.

Her bir konsantrasyon (ppm) için hazırlanan fenolik çözeltiden 250 µl alınır. Üzerine 2mM 4- aminoantipirin çözeltisi 50 µl ilave edilmiştir. Daha sonra 6mM potasyumferrisiyanür 50 µl ilave edilip aktivite ölçümü 500 nm absorbansta yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Kalibrason grafiği çizilmiştir.

Kalibrasyon grafiği çizildikten sonra enzim kullanılarak deneye başlanmıştır. Fenolik çözelti 10 ml 10 ppm alınıp üzerine enzim ilave edilmiştir. Deney 120 dk sürmekte olup her 30 dk da bir ölçüm yapılmıştır. Her ölçüm için 250 µl enzimli fenolik çözelti alınıp üzerine 2mM 4-aminoantipirin çözeltisi 50 µl ilave edilip daha sonra 6mM potasyumferrisiyanür 50 µl ilave edilip 500 nm de absorbans ölçümü yapılmıştır. Kalibrasyon grafiğinde aktiviteye karşılık gelen konsantrasyon değeri bulunup % fenolik bileşik giderimi hesaplanmıştır (Bayramoğlu & Arıca, 2008).

3.ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Karakterizasyonlar

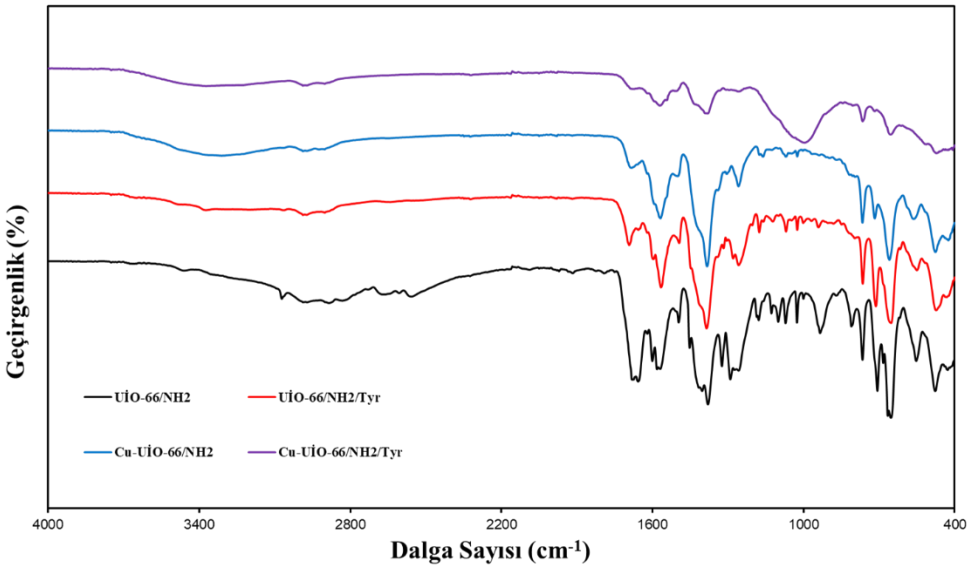
3.1.1 FTIR karakterizasyonları

UIO-66/NH_2, UIO-66/NH_2/Tyr, Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr spektroskopisi çekilmiştir. Şekil 3.1'da hazırlanan immobilize enzim ve MOF'ları FTIR spektrum pikleri görülmektedir.

UIO-66/NH_2 için FTIR sonuçları incelendiğinde 649 cm^{-1}'de C-H bağını, 771 cm^{-1}' de Zr–O bandı, gerilmelerinin $ZrCl_4$'den kaynaklı olduğu görülmektedir. 2874 cm^{-1} piki CH_3 bağını, 1135 cm^{-1} 'de esterik C-O bandı, 1655 cm^{-1} de bulunan pikler C=O bağını göstermektedir (Liu ve diğ., 2022). Daha sonra 1070 cm^{-1} piki DMF varlığını göstermektedir. 1456 cm^{-1} de amid II bandı C-N/N-H, 1564 cm^{-1} de amid II bandı N-H, 2910-2980 cm^{-1} arasındaki pikler metil gruplarının varlığını göstermektedir. 2933 cm^{-1}'de N-H titreşim bandları, 2850-2950 cm^{-1} aralığında metilen gruplarına (CH_2) ait asimetrik ve simetrik gerilme titreşimleri gözlenmektedir. 3679 cm^{-1} pikleri O-H germe pikleri bulunmaktadır. 3457 cm^{-1} pikleri sekonder aminlerin bulunduğu N-H gerilmelerini bu piklerinde 2-aminoteraftalik asitten geldiğini göstermektedir. Literatürdeki FTIR pikleriyle örtüştüğü görülmüştür.

UIO-66/NH_2/Tyr için FTIR pikleri incelendiğinde UIO-66/NH_2 'e ek olarak Tyr den kaynaklı olarak 2952 cm^{-1} 'de N-H titreşim bandı görülmekte olup, 1317 cm^{-1} 'de C-C germe titreşimlerini ve 1125 cm^{-1} 'de esterik C-O bandı görülmektedir. 1794 cm^{-1} 'de karbonil bağı görülmektedir. Bu pikler doğrultusunda enzimin immobilizasyonun gerçekleştiği gözlenilmiştir (Lasmi et al., 2018).

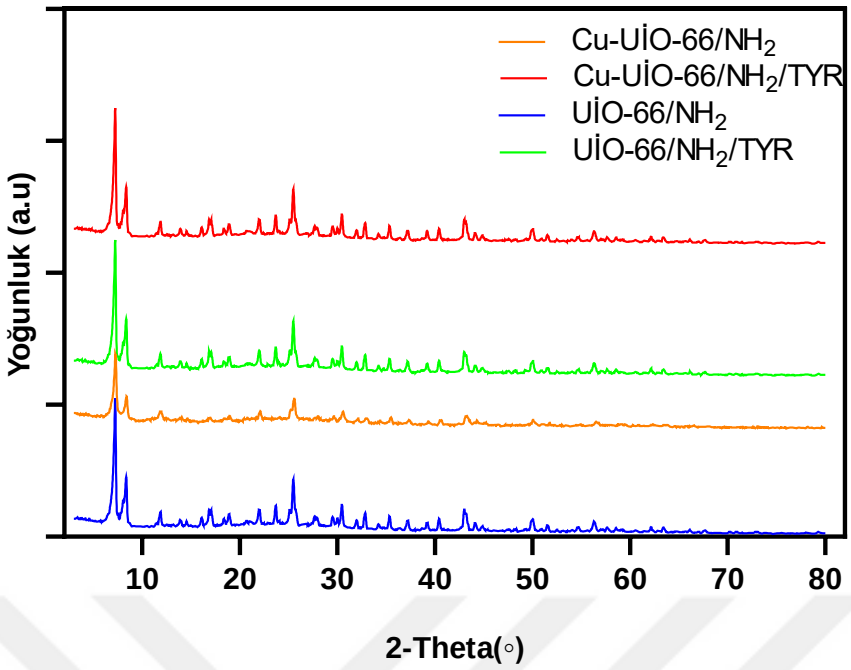
Cu-UIO-66/NH_2 İçin çekilen FTIR pikleri incelendiğinde UIO-66/NH_2'e ek olarak Cu'dan gelen metal iyonları pikleri görülmektedir. 555 cm^{-1} pikleri Cu-O bandını göstermektedir (Das et al., 2020). Cu-UIO-66/NH_2/Tyr için FYIR pikleri incelendiğinde 3433 cm^{-1} pikleri O-H germe pikleri görülmektedir. 2946 cm^{-1} bandı C-H bağını göstermektedir.1571 cm^{-1} pikleri N-H titreşimini göstermektedir (Elango ve diğ., 2018). Bu piklerin tamamına bakıldığında Cu-UIO-66/NH_2'in Tyr'nin immobilize edildiği görülmüştür (Chakarova ve diğ., 2019).



Şekil 3.1 1: Cu-UIO-66NH_2/Tyr, Cu-UIO-66/NH_2, UIO-66/NH_2/Tyr ve UIO-66/NH_2 malzemelerin FTIR karakterizasyonu

3.1.2. XRD karakterizasyonları

UIO-66/NH_2, UIO-66/NH_2/Tyr, Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr İçin XRD analizi yapılmıştır. XRD deneyinin sonuçları şekil 3.1.2' de verilmiştir. **Fotovat ve diğ., (2018)** yapmış oldukları çalışma da UIO-66/NH_2 ve UIO-66/NH_2 /Urea-POP morfolojilerinin XRD spektrumlarını incelendi ve benzer karakteristik pikler görülmüştür. UIO-66/NH_2 XRD spektrumunda 7.2, 8.4, 11.8, 25.4 ve 30.5 karakteristik pikleri bulunmaktadır. Bu pikler sırasıyla (111), (200), (220), (400), (331), (420), (600) ve (711) nm'ye karşılık gelmiştir (Fotovat ve diğ., 2018). Tez çalışması kapsamında yüzey morfolojisi UIO-66/NH_2'in kristalin yapısında değişikliğe neden olmadığı görülmektedir. Şekil 3.1.2'de gösterilen UIO-66/NH_2'ın karakteristik pikleri litaratürde verilen piklerle uyumlu olduğu görülmüştür. Malzemenin XRD sonuçlarında keskin tepeler halinde bulunan pikler MOF kristallerinin iyi derecede olduğunun kanıtı niteliğindedir. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın hazırlanan yapısında safsızlık olmadığı görülmektedir (Zhang ve diğ., 2020).



Şekil 3.1 2: MOF'ların XRD karakterizasyonu

3.1.3. DLS karakterizasyonları

Cu-UIO-66/NH_2'in Tyr ile modifikasyonunu kanıtlamakta zeta potansiyeli analizi ölçümleri kullanılıp ve sonuçlar tablo 3.2'de gösterilmiştir. DLS cihazıyla ölçümler yapılmıştır. Cu-UIO-66/NH_2 'in zeta potansiyeli ölçümü 5,29 mV ölçülmüştür. Daha sonra Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın zeta potansiyeli ölçüm sonucu -20,32 mV ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarının farklılaşmasının nedeni taşıyıcı destek matrise bağlanan immobilize enzimin amin gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır.

Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın parçacıklarının hidrodinamik çapları ölçülmüştür. DLS ölçümüne göre, Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın parçacık boyutu yaklaşık 304,65 nm ölçülmüştür. Enzim immobilizasyonu yapıldıktan sonra Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın hidrodinamik çapı ölçüldüğünde partikül boyutu 606,42 nm'ye (2 katına) çıktığı görülmüştür.

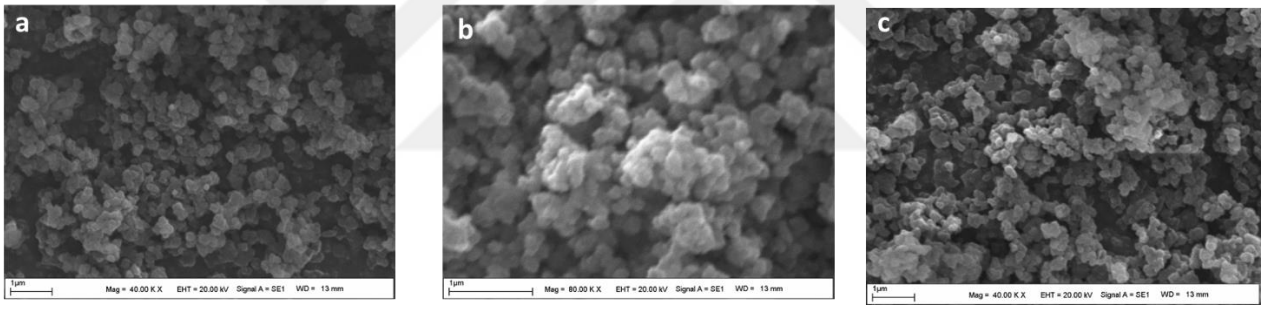
Polidispersite indeksi (PDI) değerleri kolloidal çözeltilerde bulunan nanopartiküllerin boyutlarının dağılımını değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir parametredir. PDI değerleri Cu-UIO-66/NH_2 için 13,73 olarak bulunmuştur. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr için ise 25,73 bulunmuştur (Ates ve diğ., 2018).

Tablo 3.1.3: Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın DLS ölçüm sonuçları

Örnek	Zeta Potansiyeli(mV)	Hidrodinamik Çap(nm)	Polidispersite indeksi
Cu-UIO-66/NH_2	5,29±0,67	304,65±9,21	13,73±1,81
Cu-UIO-66/NH_2/Tyr	-20,32±0,60	606,42±4,57	25,73±5,53

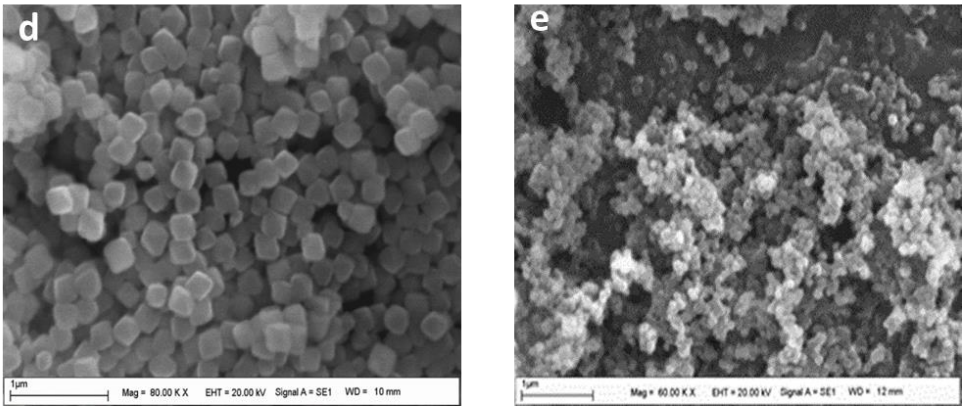
3.1.4. SEM karakterizasyonları

UIO-66/NH_2 farklı oranlarda $CuCl_2$ konsantrasyonlarıyla (5 mM, 10 mM ve 20 mM) hazırlanmıştır. Bu farklı morfolojiye ait SEM analizi görüntüleri şekil 3.1.4.1'de görülmektedir. Partikül geometrik yapısına bakıldığında Cu-UIO-66/NH_2 20 mM $CuCl_2$ konsantrasyonunda oktahedral bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Daha sonra aktivite ölçümü yapılmıştır en yüksek aktivite 20 mM Cu-UIO-66/NH_2'e ait malzemede görülmüştür. Dolayısıyla farklı konsantrasyonlar arasında 20 mM Cu-UIO-66/NH_2 malzeme seçilip enzim immobilizasyonu deneyleri bu konsantrasonda devam edilmiştir.



Şekil 3.1.4 1: MOF'ların farklı bakır oranlarında a) 5 mM Cu-UIO-66/NH_2 . b) 10 mM Cu-UIO-66/NH_2 c) 20 mM Cu-UIO-66/NH_2 ait SEM görüntüsü

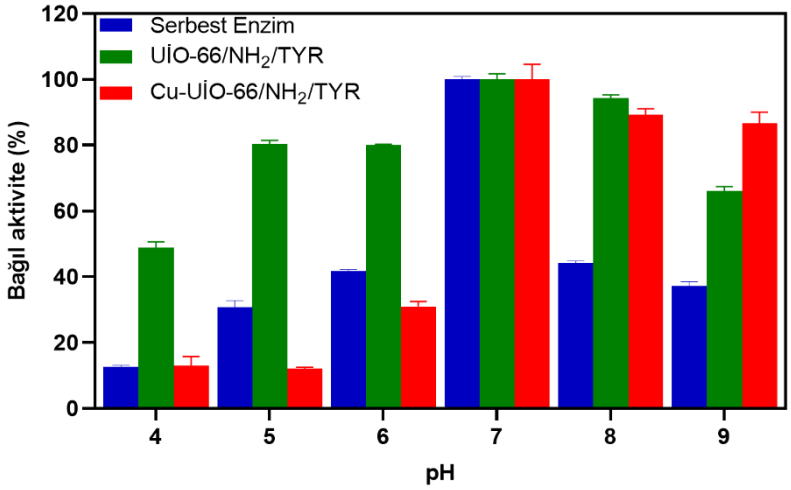
Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın SEM görüntüleri görülmektedir. Elde edilen SEM görüntüleri verilerine göre Cu-UIO-66/NH_2'e Tyr enzimi immobilize edildiğinde yapısının bozulduğu görülmüştür.



Şekil 3.1.4.2:SEM görüntüleri d) Cu-UIO-66/NH_2 , e) Cu-UIO-66/NH_2/Tyr

3.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi

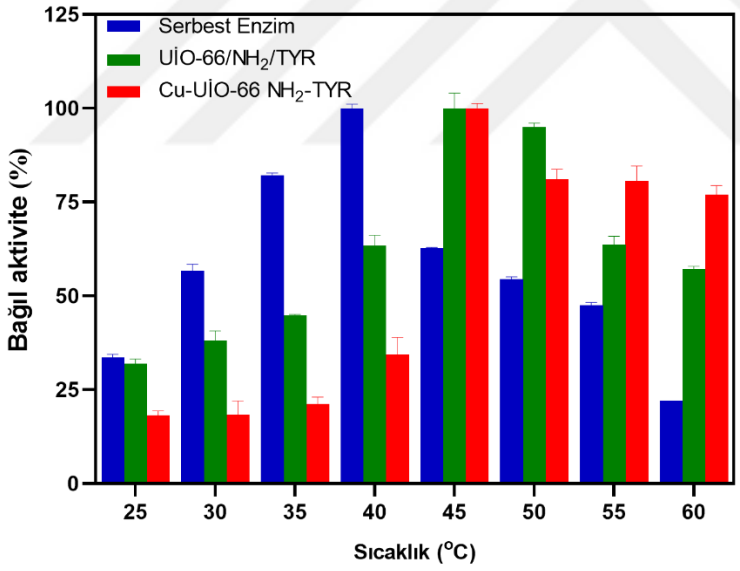
Bu deneyde serbest Tyr, UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın en yüksek aktivitesinin hangi pH aralığında gerçekleştiği belirlenecektir. Optimum pH'ları belirlenirken substrat konsantrasyonu, sıcaklık sabit olmalı ve enzimin miktarı sabit tutulmalıdır. Şekil 3.6'de görüldüğü üzere serbest Tyr'nin optimum pH değeri 7 olduğu gözlemlenirlerken, Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın de en yüksek aktiviteyi pH 7 de gösterdiği gözlemlenmiştir. Bakır bulunmayan UIO-66/NH_2/Tyr'nin yapılan optimum pH deneylerinde de optimum pH değeri 7 olduğu görülmüştür.



Şekil 3.2 : Serbest Tyr, UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'nin optimum pH değeri

3.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Bu çalışmada serbest Tyr, UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın en yüksek aktiviteyi hangi sıcaklıkta gösterdikleri belirlenip optimum sıcaklığı belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle enzimler için farklı sıcaklık değerlerinde optimum pH'larda substrat çözeltileri hazırlanıp 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 ℃ gibi farklı sıcaklıklarda, 30 dk boyunca inkübasyon yapılmıştır. Deneyin sonuçları Şekil 3.7'de verilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere serbest Tyr'nin optimum sıcaklık değeri 40 ℃ olarak bulunurken, UIO-66/NH_2/Tyr'ın optimum sıcaklığı 45 ℃ bulunmuştur ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın optimum sıcaklığı 45 ℃ bulunmuştur. Görüldüğü üzere serbest Tyr yüksek sıcaklık değerlerinde % 20'ini koruyor iken, UIO-66/NH_2/Tyr'ın aktivitesinin %65'ini korumakta olup, ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın aktivitesinin %80'ini korumaktadır. Sıcaklık üzerindeki bu farklılaşmanın immobilizasyon işlemlerinden kaynaklandığı gözlemlenmektedir. Enzimlerin üzerinde sıcaklığın etkisinin ne kadar büyük olduğu bilinilmektedir. Bu da immobilizasyonun işlemlerin en önemli avantajlarındandır.

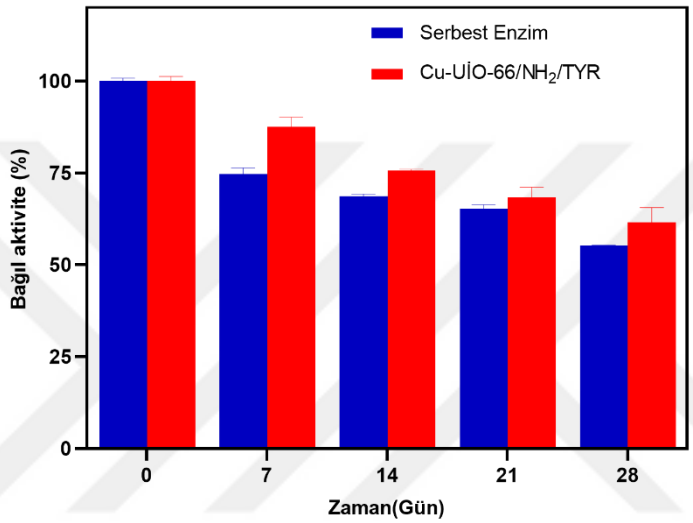


Şekil 3.3: Serbest Tyr, UIO-66NH_2Tyr ve Cu-UIO-66NH_2Tyr'ın optimum sıcaklık değerleri

3.4. Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın depolama kararlılığı çalışmaları 25 ℃ de oda sıcaklığıyla gerçekleştirilmiştir. Depolama kararlılığının belirlenmesi için aktivite ölçümleri dört hafta sürmüştür. Belirlenen günler içerisinde standart periyotlarda serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın aktiviteleri ölçülmüştür. Belirlenen azami süreleri dolduktan sonra

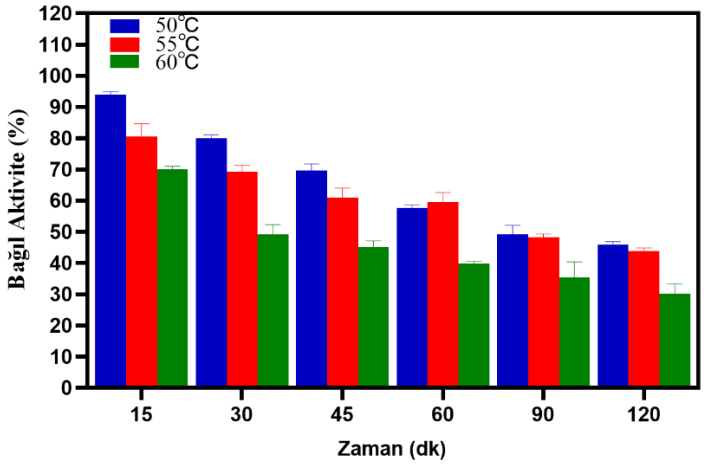
başlangıç aktiviteleriyle kıyaslamalar yapılmıştır. Deney sonuçlarının grafikleri şekil 3.9'da görüldüğü üzere serbest Tyr'nin aktivitesinin kararlı bir şekilde düşüş göstermiştir. Bunun sebebi olarak serbest enzimlerin çeversel etkenlerden etkilenme oranlarının immobile enzimlere göre daha fazla olduğunu pH ve sıcaklık değişimlerinde kolaylıkla denatüre olduğu söylebilinir. İmmobilize enzimlerin güçlü deformasyon koşullarına dayanıklılık gösterdiği gözlenilmiş olup taşıyıcı matriks ile olan bağlarının kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu deneyin sonucunda immobilizasyon işleminin enzimin üzerindeki en önemli etkilerden biri olan saklama veya depolama özelliği kazandırmaktadır.



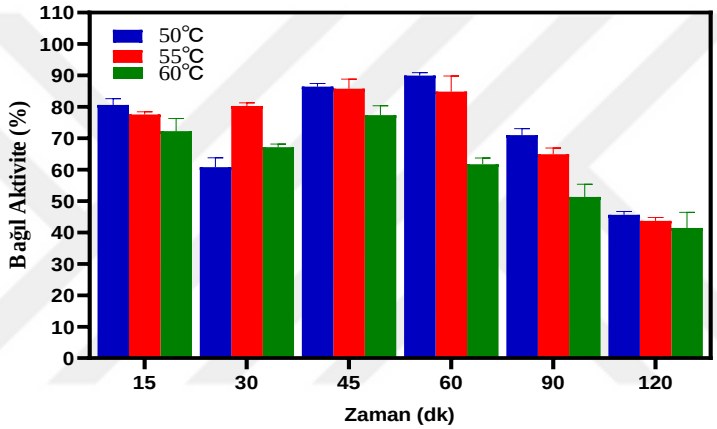
Şekil 3.4 : Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın depolama kararlılığı

3.5. Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Bu deneyde serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın termal kararlılığına 15-30-45-60-90-120 dk zaman aralıklarında iki enzim formumun aktivitesi ölçülmektedir. Deneyin aktivitelerinin grafikleri şekil 3.10'da gösterilmektedir. Sonuçlardan görüldüğü üzere termal kararlılığı 50°C bulunmuştur. Fakat 60°C yüksek bir sıcaklık olduğundan Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın başlangıç aktivitesinin %45'ini korumuştur. Serbest Tyr ise %35'ini koruduğu gözlemlenilmiştir. Enzim yüksek sıcaklıklara ulaştığında denatüre olmaktadır.



Şekil 3.5 1: Serbest Tyr'ın termal kararlılığı



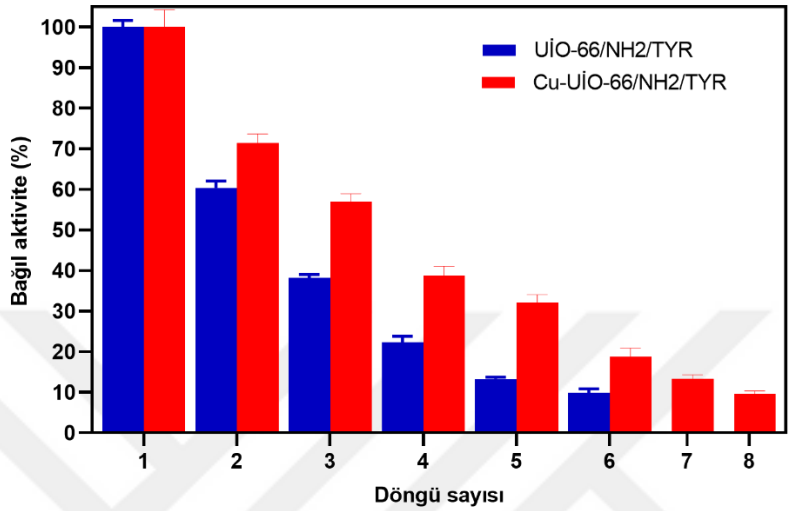
Şekil 3.5 2: Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın termal kararlılığı

Enzimler immobilize edilerek çevre koşullarına dayanıklı hale gelmektedir. İmmobilize edilmiş enzimlerin, serbest enzimlere oranla daha yüksek sıcaklıklarda bile aktivite gözlemlenmektedir.

3.6. Yeniden kullanılabilirlik

Deneyin bu aşamasında UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın yeniden kullanılabilirliği incelenip karşılaştırma yapılmıştır. Yaptığımız deneye ait sonuçlar şekil 3.8'te verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre UIO-66/NH_2/Tyr'ın aktivitesini 6 tekrar kullanımına sahip olup 6. tekrarda aktivitesinin tamamını bittiği gözlemlenirken, Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın 8 tekrara kadar aktivitesini koruyup 8. tekrarda da aktivitesinin % 6'sını koruduğu gözlemlenmektedir. Sonuçlara bakıldığında immobilize enzimin serbest enzime oranla en büyük avantajlarından biri görülmekte olup Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın MOF yapısında bulunan bakırın önemi görülmektedir. Serbest enzim sadece tek kullanıma

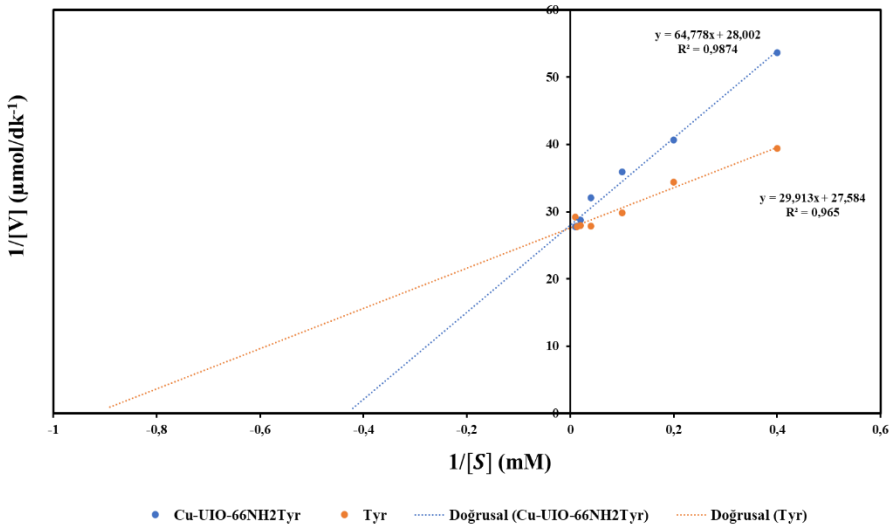
sahiptir. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın reaksiyon ortamından uzaklaştırılabilip yeniden kullanıma sahip olduğu görülmektedir. Serbest enzimler tek kullanımdan sonra denatüre olmaktadırlar. Bir enzimin yeniden kullanılabilir olması o enzimin maliyetini düşürmekte olup birçok uygulama alanına sahip olmasını sağlamaktadır.



Şekil 3.6: UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın yeniden kullanılabilirliği

3.7. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın aktivitesinde substrat derişimlerinin etkisini incelediğimizde 0,2- 0,15 - 0,1- 0,075- 0,05- 0,025-0,01-0,005-0,0025-0,0001 M seçilen optimum pH'da farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Substrat çözeltileri fosfat tamponunda (pH 7) ile hazırlanıp aktivite ölçümleri her iki enzim için yapılmıştır. Bulunan sonuçlardan faydalanarak Lineweaver-Burk (Şekil 3.5) grafiği çizilmiştir. Lineweaver-Burk denkleminde serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın Km ve Vmax değerleri için aktivite sonuçları hesaplanmıştır. Serbest Tyr için Km değeri 1.15 mM bulunuyor iken Vmax değeri 0.0367 µmol/dk^{-1} olarak bulunmuştur. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın Km değeri 1.12 mM olarak bulunuyor iken Vmax değeri 0.04 µmol/dk^{-1} bulunmuştur.



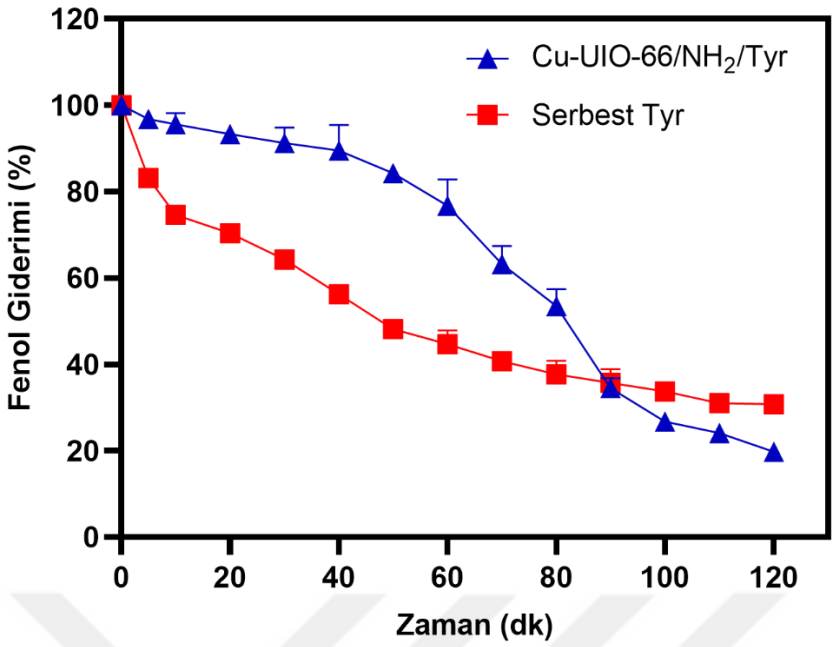
Şekil 3.7: Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın enzime ait Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3. 7: Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH2/Tyr'ın enzime ait Km ve Vmax değerleri

Enzim	**Km(mM)**	**Vmax (µmol/dk^{-1})**
Cu-UIO-66/NH_2/Tyr	1,12 ±0,56	0,03±0,001
Serbest Tyr	1,15±0,32	0,04±0,005

3.8. Fenolün Giderilmesi

Bu deneyde Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın fenolik bileşiklerin giderilmesindeki etkileri incelenmiştir. Malzemeler 120 dk boyunca belli zaman aralıklarında (5-10-20-30-40-50-60-70-80-90-100-110-120) fenolik bileşiklerle etkileşime girer ve daha sonra belirli zaman aralıklarında aktiviteleri 500 nm absorbans da ölçülmüştür. Deneyin fenol giderimi yüzdeleri şekil 3.11' de gösterilmektedir. Serbest Tyr fenolik bileşiklerle etkileştirildiğinde %70 fenolik bileşik giderimi söz konusu iken Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın fenolik bileşiklerle etkileştirildiğinde %80 fenolik bileşik giderimi gözlemlenmiştir.



Şekil 3.8: Serbest Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın Fenolik bileşikler giderimi

4.TARTIŞMA

Tirazinaz enzimi su kirliliğinde fenolik kaynaklı toksik kirliliklerin giderilmesinde önemli rol oynayan enzimdir. Tyr mantarlar ve farklı endemik bitki türlerinden üretilmektedir. Su kirliliği günümüzde evrensel bir sorun olarak kabul edilmiştir. Çeşitli çözüm yöntemleri için çalışmalar yapılmıştır. Yaptığımız çalışmada su kirliliğinde bulunan fenolik kirleticileri yok etmek için Tyr kullanılmaktadır. Enzimi immobilize ederek ucuz, uzun süre saklanabilecek, yeniden kullanılabilecek olumsuz şartlara karşı sıcaklık vb. şartlarda denatürasyonunu engellemek için enzim immobilize edildi. Taşıyıcı matriks olarak UIO-66/NH_2 kullanılmıştır. Bu çalışmada taşıyıcı olarak MOF'ları seçmemizin büyük avantajları bulunmaktadır. Gözenekli yapıya sahip kordinasyon bileşikleri olan MOF'lar kendilerine ait spesifik yüzey alanlar, çok miktarda bulunan aktif bölgeleri, çok yönlü yapısı göz önüne alındığında büyük ilgi görmüştürler.

Tyr enziminin immobilizasyonu çeşitli aşamalardan gerçekleşmektedir. İlk olarak MOF sentezi gerçekleşmiştir. UIO-66/NH_2yapısı sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bakır iyonları ile etkileştirilmiştir. En sonunda çapraz bağlam yöntemiyle enzim taşıyıcı matrikse bağlanmaktadır (Lu ve diğ., 2016).

Karakterizasyon deneyleri yapılmıştır. DLS ölçümleri yapılmıştır. Cu-UIO-66/NH_2 'in zeta potansiyeli 5,29 mV ölçülmüştür. Daha sonra Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın zeta potansiyeli ölçüm sonucu -20,32 mV ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarının farklılaşmasının nedeni taşıyıcı destek matrise bağlanan immobilize enzimin amin gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır. Cu-UIO-66/NH_2 ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın parçacıklarının hidrodinamik çapları ölçülmüştür. Ölçüm sonucuna göre Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın parçacık boyutu yaklaşık 304,65 nm ölçülmüştür. Enzim immobilizasyonu yapıldıktan sonra Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın hidrodinamik çapı ölçüldüğünde partikül boyutu 606,42 nm'ye (2 katına) çıktığı görülmüştür. PDI değerleri Cu-UIO-66/NH_2 için 13,73 olarak bulunmuştur. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr için ise 25,73 bulunmuştur. XRD analizi sonuçları incelendiğinde oluşan piklerin litaratürde verilen karakteristik piklerle uyuşmakta olduğu görülmüştür. Piklerin keskin tepecikler halinde olması MOF'un kristalik yapısının iyi olduğunu ve yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir (Kurtuldu ve diğ., 2022). SEM analizleri yapılmıştır. SEM görüntüleri incelendiğinde Cu-UIO-66/NH_2'nin oktahedral bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Farklı morfolojiye ait SEM görüntülerine bakılıp aktiviteleri incelenmiştir en yüksek aktivite gösteren konsantrasyon 20 µM olan Cu-UIO-66/NH_2 seçilip enzim

immobilizsayonu işlemi uygulanmıştır. İmmobilizasyon işleminden sonra SEM görüntüleri incelendiğinde yapının bozulduğu görülmüştür.

İmmobilizasyon işlemi enzimi olumsuz çevre koşullarına daha hale getirmektedir. Enzimler yüksek sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Serbest enzimler tek kullanımlık olup saklanma koşullarına karşı dayanıklı değillerdir. Yapılan çalışmada serbest Tyr'nin termal kararlılıkta 60 °C de doğrusal olarak azaldığı gözlemlenmiş olup aktivitesinin büyük çoğunluğunu kaybettiği görülmektedir. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın başlangıç aktivitesinin %45'ini korumuştur. Serbest Tyr ise %35'ini koruduğu gözlemlenilmiştir. Enzim yüksek sıcaklıklara ulaştığında denatüre olmaktadır. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'in ise yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olup serbest enzime oranla daha yüksek sıcaklıklara karşı direnç göstermektedirler.

Serbest Tyr optimum sıcaklığı 40 °C iken UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr optimum sıcaklığı 45°C 'ye çıkmaktadır. Dolayısıyla immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek sıcaklıklarda da yüksek aktivite göstererek yüksek sıcaklıklara karşı direç gösterdiği görülmüştür. Optimum pH ölçümleri yapılmıştır. Serbest Tyr, UIO-66/NH_2/Tyr ve Cu-UIO-66/NH_2/Tyr optimum pH değeri pH 7 olarak bulunmuştur.

İmmobilizasyon işlemi enzime tekrar tekrar kullanılabilirlik özelliği kazandırmaktadır. Serbest Tyr tek kullanımlıktır fakat UIO-66/NH_2/Tyr altı defa kullanılabilmekte olup altıncı kullanımda aktivitesinin tamamını kaybetmektedir. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr ise dokuz kullanıma kadar tekrar tekrar kullanılabilmekte olup dokuzuncu kullanımda aktivitesinin % 6'sını korumaktadır.

Enzimin kinetik parametreleri incelendiğinde Km değeri enzimin substrata karşı ilgisini göstermektedir. Vmax değeri reaksiyonun gerçekleşme hızını göstermektedir. Km değerleri ne kadar düşük ise enzimlerin substrata karşı ilgisi o kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Enzimin kinetik parametreleri incelendiğinde Km değeri enzimin substrata karşı ilgisini göstermektedir. Vmax değeri reaksiyonun gerçekleşme hızını göstermektedir. Km değerleri ne kadar düşük ise enzimlerin substrata karşı ilgisi o kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışma sonucunda Serbest Tyr ile Cu-UIO-66/NH2/Tyr'ın arasındaki Km ve Vmax değerlerinde önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Enzimlerin depolama kararlılıkları incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzim arasında farklılık gözlemlenilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda immobilize enzim başlangıç aktivitesinden zamanla kararlı bir azalma gözlemlenirken serbest enzim aktivitesinde ise immobilize enzime oranla hızlı bir azalma vardır. Bu da immobilizasyon işleminin önemli

avantajlarından olduğu gözlemlenmektedir. Cu-UIO-66/NH_2/Tyr Başlangıç aktivitesinin %61' ini korumakta olup Serbest Tyr ise başlangıçtaki aktivitesinin % 55'ini korumuştur.

Tyr atık sularda oluşan fenolik kirleticilerin giderilmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada atık sulardan fenolik bileşik uzaklaştırmak için çevresel koşullara dayanıklı taşıyıcı malzemeye Tyr enzimi immobilize edilmiş olup enziminlerin fenolik bileşik giderimi testleri yapılmıştır. Sonucunda İmmobilize enzim ve serbest enzimin zamanla fenolik bileşikleri giderdiği görülmüştür. Serbest enzimin fenolik bileşk giderimi % 70 bulunmuş iken immobilize enzimin fenolik bileşik giderimi % 80 bulunmuştur. İmmobilize enzimin serbest enzime oranla yüzde fenol giderimi daha fazla olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalar sonucunda görüldüğü üzere Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın UIO-66/NH_2 ve serbest enzime oranla yüksek pH'a değerlerinde daha yüksek aktivite gösterdiğini ve daha dirençli olduğu görülmektedir. Optimum sıcaklık değerleri incelendiğinde Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın UIO-66/NH_2'nin optimum sıcaklık değerleri 45 ℃ bulunmuştur. Fakat Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın daha yüksek sıcaklıklarda UIO-66/NH_2'e oranla daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Yeniden kullanılabilirlik deneyleri incelendiğinde ise UIO-66/NH_2'nin altı defa tekrar kullanılabildiğini fakat Cu-UIO-66/NH_2/Tyr'ın sekiz defa kullanılabildiği ve aktivitesinin %6'sını koruduğu görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda bakırın taşıyıcı MOF'a bağlanmasıyla aktivitesini arttırdığını optimum pH ve sıcaklık deneylerinde daha yüksek pH ve sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Yeniden kullanılabilirlik deneyleinde ise tekrar kullanımını arttırdığı görülmektedir.

Sonuç olarak Cu-UIO-66/NH_2 sentezlenmiş ve modifiye edilmiştir. Daha sonra Cu-UIO-66/NH_2'e tirozinaz enzimi immobilize edilerek Cu-UIO-66/NH_2/Tyr başarılı bir şekilde bağlanmıştır. Optimum parametrelerinde daha yüksek aktivite göstermiştir. Fenolün gideriminde serbest enzime oranla daha fazla fenol giderim yaptığı görülmüştür. Bu çalışma endüstriyel alanda yeni bir bakış açısı sunmakta olduğunu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, *4*(2), 1.

Ates, B., Ulu, A., Köytepe, S., Noma, S. A. A., Kolat, V. S., & Izgi, T. (2018). Magnetic-propelled Fe 3 O 4–chitosan carriers enhance L-asparaginase catalytic activity: a promising strategy for enzyme immobilization. *Royal Society of Chemistry advances*, *8*(63), 36063-36075.

Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607.

Bayramoğlu, G., & Arıca, M. Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of hazardous materials*, *156*(1-3), 148-155.

Bian, Y., Xiong, N., & Zhu, G. (2018). Technology for the remediation of water pollution: A review on the fabrication of metal organic frameworks. *Processes*, *6*(8), 122.

Butova, V. V. E., Soldatov, M. A., Guda, A. A., Lomachenko, K. A., & Lamberti, C. (2016). Metal-organic frameworks: structure, properties, methods of synthesis and characterization. *Russian Chemical Reviews*, *85*(3), 280.

Chakarova, K., Strauss, I., Mihaylov, M., Drenchev, N., & Hadjiivanov, K. (2019). Evolution of acid and basic sites in UiO-66 and UiO-66-NH2 metal-organic frameworks: FTIR study by probe molecules. *Microporous and Mesoporous Materials*, *281*, 110-122.

Das, P. E., Abu-Yousef, I. A., Majdalawieh, A. F., Narasimhan, S., & Poltronieri, P. (2020). Green synthesis of encapsulated copper nanoparticles using a hydroalcoholic extract of Moringa oleifera leaves and assessment of their antioxidant and antimicrobial activities. *Molecules*, *25*(3), 555.

Elango, M., Deepa, M., Subramanian, R., & Mohamed Musthafa, A. (2018). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of polyindole/Ag–Cuo nanocomposites by reflux condensation method. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, *57*(14), 1440-1451**.**

Fotovat, H., Khajeh, M., Oveisi, A. R., Ghaffari-Moghaddam, M., & Daliran, S. (2018). A hybrid material composed of an amino-functionalized zirconium-based metal-organic framework and a urea-based porous organic polymer as an efficient sorbent for extraction of uranium (VI). *Microchimica Acta*, *185*, 1-8.

Hu, J., Cai, H., Ren, H., Wei, Y., Xu, Z., Liu, H., & Hu, Y. (2010). Mixed-matrix membrane hollow fibers of Cu3 (BTC) 2 MOF and polyimide for gas separation and adsorption. *Industrial & engineering chemistry research*, *49*(24), 12605-12612.

Krishnamoorthi, S., Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2015). Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *Journal of Enzymology and Metabolism*, *1*(1), 010-104**.**

Kurtuldu, A., Eşgin, H., Yetim, N. K., & Semerci, F. (2022). Immobilization horseradish peroxidase onto UiO-66-NH2 for biodegradation of organic dyes. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 32(8), 2901-2909.

Lasmi, K., Derder, H., Kermad, A., Sam, S., Boukhalfa-Abib, H., Belhousse, S., ... & Gabouze, N. (2018). Tyrosinase immobilization on functionalized porous silicon surface for optical monitoring of pyrocatechol. *Applied Surface Science*, 446, 3-9.

Lee, Y. R., Kim, J., & Ahn, W. S. (2013). Synthesis of metal-organic frameworks: A mini review. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30, 1667-1680.

Liang, S., Wu, X. L., Xiong, J., Zong, M. H., & Lou, W. Y. (2020). Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: an update review. *Coordination Chemistry Reviews*, 406, 213149.

Liu, Q., Zang, G. L., & Zhao, Q. (2022). Removal of methyl orange wastewater by Ugi multicomponent reaction functionalized UiO-66-NS. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(51), 76833-76846.

Loera-Serna, **S., Oliver-Tolentino, M. A., de Lourdes López-Núñez, M., Santana-Cruz, A., Guzmán-Vargas, A., Cabrera-Sierra, R., ... & Flores, J.** (2012). Electrochemical behavior of [Cu3 (BTC) 2] metal–organic framework: The effect of the method of synthesis. *Journal of alloys and compounds*, *540*, 113-120.

Lu, X., Wang, X., Wu, L., Wu, L., Dhanjai, Fu, L., ... & Chen, J. (2016). Response characteristics of bisphenols on a metal–organic framework-based tyrosinase nanosensor. *ACS applied materials & interfaces*, *8*(25), 16533-16539.

Marín-Zamora, M. E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., & García-Ruiz, P. A. (2007). Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: a comparative study using several substrates. *Journal of biotechnology*, *131*(4), 388-396.

May, S. W. (1999). Applications of oxidoreductases. *Current opinion in biotechnology*, *10*(4), 370-375.

Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, *26*(6), 157-163.

Özgür, M. E., Ulu, A., Balcıoğlu, S., Özcan, I., Köytepe, S., & Ateş, B. (2018). The toxicity assessment of iron oxide (Fe3O4) nanoparticles on physical and biochemical quality of rainbow trout spermatozoon. *Toxics*, *6*(4), 62.

Ramyashree, M. S., Priya, S. S., Freudenberg, N. C., Sudhakar, K., & Tahir, M. (2021). Metal-organic framework-based photocatalysts for carbon dioxide reduction

to methanol: A review on progress and application. *Journal of CO_2 Utilization*, *43*, 101374.

Ramyashree, M. S., Priya, S. S., Freudenberg, N. C., Sudhakar, K., & Tahir, M. (2021). Metal-organic framework-based photocatalysts for carbon dioxide reduction to methanol: A review on progress and application. *Journal of CO_2 Utilization*, *43*, 101374.

Rowsell, J. L., & Yaghi, O. M. (2004). Metal–organic frameworks: a new class of porous materials. *Microporous and mesoporous materials*, *73*(1-2), 3-14.

Safaei, M., Foroughi, M. M., Ebrahimpoor, N., Jahani, S., Omidi, A., & Khatami, M. (2019). A review on metal-organic frameworks: Synthesis and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *118*, 401-425.

Silva, A. R., Alexandre, J. Y., Souza, J. E., Neto, J. G. L., de Sousa Júnior, P. G., Rocha, M. V., & Dos Santos, J. C. (2022). The chemistry and applications of metal–organic frameworks (MOFs) as industrial enzyme immobilization systems. *Molecules*, *27*(14), 4529.

Sneha, H. P., Beulah, K. C., & Murthy, P. S. (2019). Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 645-658). Academic Press.

Tahmasian, A., & Morsali, A. (2012). Ultrasonic synthesis of a 3D Ni (II) Metal–organic framework at ambient temperature and pressure: New precursor for synthesis of nickel (II) oxide nano-particles. *Inorganica Chimica Acta*, *387*, 327-331.

Türköz, B., Özçelik, A., & Karacabey, E. (2024). Gıda endüstrisinde immobilize enzim uygulamaları. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, *13*(3), 1056-1073.

Ulu, A., & Ates, B. (2017). Immobilization of L-asparaginase on carrier materials: a comprehensive review. *Bioconjugate chemistry*, *28*(6), 1598-1610.

Younus, H. (2019). Oxidoreductases: overview and practical applications. *Biocatalysis: Enzymatic basics and applications*, 39-55.

Zhang, Z., Tao, C. A., Zhao, J., Wang, F., Huang, J., & Wang, J. (2020). Microwave-assisted solvothermal synthesis of UiO-66-NH2 and its catalytic performance toward the hydrolysis of a nerve agent simulant. *Catalysts*, *10*(9), 1086.

Zynek, K., Bryjak, J., Szymańska, K., & Jarzębski, A. B. (2011). Screening of porous an cellular materials for covalent immobilisation of Agaricus bisporus tyrosinase. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 16, 180-189.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Tuğba AYGÜN

ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** **:** 2021, İnönü Üniversite, Fen Edebiyat Fakülte, Kimya Bölüm
- **Yüksek Lisans** **:** İnönü Üniversitesi, BiyokimyaAnabilim Dalı, Program

ÇALIŞMA ALANLARI

- Biyouyumluluk
- Antioksidan
- Antimikrobiyal
- Antikanser
- Enzim
- Fonksiyonel gıda üretim
- Enzim İmmobilizasyonu
- İlaç salımı
- Nanofiber üretim

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR (Makaleler, Bildiriler, Patentler v.b.)

- **Ulu, A., Aygün, T., Birhanlı, E., & Ateş, B. (2022).** Preparation, characterization, and evaluation of multi–biofunctional properties of a novel chitosan–carboxymethylcellulose–Pluronic P123 hydrogel membranes loaded with tetracycline hydrochloride. *International Journal of Biological Macromolecules,* 222, 2670-2682.
- **Aygun, T; Ulu, A; Bırhanlı, E; Ates, B.;** (2022) Preparation, Characterization, and Evaluation of Multibiofunctional Properties of Novel Chitosan–Carboxymethylcellulose–Pluronic P123 Hydrogel Membranes Loaded with Tetracycline Hydrochloride

  VIII.Polymer Science and Technology Congress with International Participatio

- **Aygun, T; Ulu, A; Ates, B.;** (2023) Synthesis of Tyrosinase Immobilized Metal-Organic Frameworks (MOFs) for Use in The Removal of Phenolic Compounds

  Systems. 5rd Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress

PROJELER

- 2247-C Stajyer Araştırmacı Burs Programı
- 1005 TAGEM