

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN ENZİM  
İMMOBİLİZASYONU AMACI İLE KULLANILMALARI  
VE GÜNCEL GELİŞMELER**

**Hazırlayan  
Morteza ROUEINTAN**

**Danışman  
Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kasım 2024  
KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN ENZİM  
İMMOBİLİZASYONU AMACI İLE KULLANILMALARI  
VE GÜNCEL GELİŞMELER**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan  
Morteza ROUEINTAN**

**Danışman  
Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

**Kasım 2024  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Morteza ROUEINTAN**

**“Manyetik Nanoparçacıkların Enzim İmmobilizasyonu Amacı ile Kullanılmaları ve Güncel Gelişmeler”** adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**

Morteza ROUEINTAN

**Danışman**

Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR

**Kimya ABD Başkanı**

Prof. Dr. İlhan Özer İLHAN

## TEŞEKKÜR

Bana lisansüstü tez çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden bugüne gelmem de gösterdiği anlayış ve sabırla en büyük pay sahibi olan, bilgi ve desteğini esirgemeyen, sayın danışmanım Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR'e,

Eğitim hayatım ve tez çalışmam süresinde beni hep destekleyen ve her türlü fedakarlığı gösteren, her zaman teşvik eden değerli aileme yürekten teşekkür ederim.

Morteza ROUEINTAN

Kayseri-2024

# MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN ENZİM İMMOBİLİZASYONU AMACI İLE KULLANILMALARI VE GÜNCEL GELİŞMELER

**Morteza ROUEINTAN**

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2024**

**Danışman: Prof. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

## ÖZET

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalize eden biyokatalizörlerdir. Ancak enzimlerin serbest olarak nitelendirilen çözünür formları, çeşitli nedenlerden sulu ortamlarda hızlı bir şekilde aktivitelerini kaybederler. Bu durum enzimlerin pek çok alanda uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Bu dezavantajın önüne geçmek için enzim immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Manyetik nano parçacıklar (MNP'ler) proteinleri, enzimleri, antikorları ve ilaçları bağlamak için taşıyıcı olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. MNP'ler enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan materyaller olmasına rağmen en güncel kullanım alanları enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklere (Ei-hNÇ'lere) manyetik özellik kazandırmak amacı ile kullanılmalarıdır. Ei-hNÇ'ler, gelişmiş katalitik aktiviteleri, yüksek kararlılıkları, sentez yönteminin kolaylığı vb sebeplerden enzim immobilizasyonu alanında son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Bununla birlikte, Ei-hNÇ'lerin enzim immobilizasyonda kullanılmasıdaki en büyük dezavantajı, düşük yoğunlukları ve yüksek dağılımları nedeniyle çözelti ortamından ayrılma zorluğudur. Bu sorunu çözmek için manyetik enzim-inorganik hibrit nanoçiçekler (MEi-hNÇ'ler), manyetik bir alan kullanılarak kolay ayrılabilir, yapısal kararlılıkları ve katalitik verimliliği artırma yetenekleri nedeniyle umut verici alternatif bir enzim immobilizasyon platformu olarak ortaya çıkmıştır. Bu tez kapsamında, MEi-hNÇ'lerin tasarımına yönelik farklı yöntemlerin yanı sıra gelecekteki araştırma yönlerine dair ayrıntılı literatür araştırması yapıldı. Ayrıca MEi-hNÇ'lerin sentez mekanizması ve kullanım alanları ile ilgili çalışmalar ayrıntılı olarak verildi.

**Anahtar Kelimeler:** Manyetik nanoparçacıklar, enzim immobilizasyonu, manyetik özellikli enzim-inorganik hibrit nano çiçekler

## USE OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ENZYME IMMOBILIZATION AND CURRENT DEVELOPMENTS

**Morteza ROUEINTAN**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**Msc Thesis, November 2024**

**Supervisor: Prof. Nalan ÖZDEMİR**

### ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts that catalyze biochemical reactions. However, the soluble forms of enzymes, which are considered free, lose their activity rapidly in aqueous environments for various reasons. This situation limits the applications of enzymes in many areas. Enzyme immobilization methods are used to overcome this disadvantage.

Magnetic nanoparticles (MNPs) are increasingly used as carriers to bind proteins, enzymes, antibodies and drugs. Although MNPs are frequently used materials in enzyme immobilization, their most recent application area is to impart magnetic properties to enzyme-inorganic hybrid nanoflowers (Ei-hNFs). Ei-hNFs have attracted great attention in the field of enzyme immobilization in recent years due to their enhanced catalytic activity, high stability, ease of synthesis method, etc. However, the biggest disadvantage of Ei-hNFs in enzyme immobilization is the difficulty of their separation from the solution due to their low density and high dispersion. To solve this problem, magnetic enzyme-inorganic hybrid nanoflowers (MEi-hNFs) have emerged as a promising alternative enzyme immobilization platform due to their easy separation using a magnetic field, structural stability and ability to increase catalytic efficiency. In the scope of this thesis, a detailed literature review was conducted on different methods for the design of MEi-hNFs as well as future research directions. Additionally, studies on the synthesis mechanism and usage areas of MEi-hNFs were given in detail.

**Keywords:** Magnetic nanoparticles, enzyme immobilization, magnetic enzyme-inorganic hybrid nanoflowers



## İÇİNDEKİLER

### MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN ENZİM İMMOBİLİZASYONU AMACI İLE KULLANILMALARI VE GÜNCEL GELİŞMELER

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK .....    | ii   |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ..... | iii  |
| KABUL VE ONAY SAYFASI .....      | iv   |
| TEŞEKKÜR.....                    | v    |
| ÖZET.....                        | vi   |
| ABSTRACT.....                    | vii  |
| İÇİNDEKİLER .....                | viii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....           | x    |
| KISALTMALAR LİSTESİ.....         | xi   |
| GİRİŞ .....                      | 1    |

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Enzimler .....                                                                    | 4  |
| 1.2. Enzim İmmobilizasyonu .....                                                       | 5  |
| 1.2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....                                           | 6  |
| 1.2.2. Manyetik Parçacıklar (MNP'ler) .....                                            | 10 |
| 1.2.3. Manyetik Nanoparçacıklar (MNP'ler) Üzerine Enzim<br>İmmobilizasyonu.....        | 12 |
| 1.2.4. MNP'ler Üzerinde Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları ve<br>Dezavantajları..... | 13 |
| 1.3. Manyetik Özellikli Enzim-İnorganik Hibrit Nano Çiçekler (MEi-hNÇ'ler)....         | 14 |

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Kullanılan Yöntem ve Kapsamı.....                                          | 18 |
| 2.2. Literatür Taramasında Kullanılan Veri Tabanları ve Anahtar Kelimeler ..... | 18 |

### 3. BÖLÜM

#### BULGULAR

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçekler (Ei-hNÇ'ler) .....                                              | 21 |
| 3.2. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin)<br>Sentez Mekanizması.....           | 25 |
| 3.3. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin)<br>Karakterizasyon Çalışmaları ..... | 30 |
| 3.4. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin)<br>Uygulamaları .....                | 32 |
| 3.4.1. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin)<br>Çevre Uygulamaları .....        | 33 |
| 3.4.2. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin)<br>Biyosensör Uygulamaları .....   | 35 |
| 3.4.3. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin)<br>Biyokataliz Uygulamaları .....  | 36 |

### 4. BÖLÜM

#### TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 4.1. Tartışma-Sonuç ve Öneriler ..... | 38 |
| KAYNAKLAR .....                       | 42 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                        | 52 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin fiziksel ve kimyasal yöntemler şeklinde sınıflandırılması .....                       | 6  |
| Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin çözünmez ve çözünen formda immobilizasyon yöntemleri şeklinde sınıflandırılması ..... | 9  |
| Şekil 1.3. Enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin oluşum mekanizması .....                                                           | 15 |
| Şekil 3.1. Oi-hNÇ'lerin sentezi amacı ile kullanılan organik ve inorganik bileşenler .....                                          | 21 |
| Şekil 3.2. Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) mıknatısla ayrılmasının şematik gösterimi.....           | 26 |
| Şekil 3.3. MNP'lerin Ei-hNÇ yüzeyine adsorplanması ile yapılan ME-ihNÇ sentezinin şematik gösterimi .....                           | 28 |
| Şekil 3.4. MNP'lerin Ei-hNÇ'lerde enkapsülasyonu ile yapılan ME-ihNÇ sentezinin şematik gösterimi .....                             | 29 |
| Şekil 3.5. Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) karakterizasyonu amacı ile kullanılan teknikler.....     | 31 |
| Şekil 3.6. MEi-hNÇ'lerin uygulama alanlarının şematik gösterimi.....                                                                | 33 |

## KISALTMALAR LİSTESİ

|         |                                              |
|---------|----------------------------------------------|
| BET     | : Brunauer-Emmett-Teller                     |
| BSA     | : Sığır serum albümin                        |
| EDX     | : Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi    |
| Ei-hNÇ  | : Enzim-inorganik hibrit nanoçiçek           |
| FT-IR   | : Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi |
| GOD     | : Glikoz oksidaz                             |
| hNÇ     | : Hibrit nanoçiçek                           |
| MEi-hNÇ | : Manyetik enzim-inorganik hibrit nanoçiçek  |
| MNP     | : Manyetik nanoparçacık                      |
| Oi-hNÇ  | : Organik-inorganik hibrit nano çiçek        |
| SEM     | : Taramalı Elektron Mikroskobu               |
| XRD     | : X-Işını Kırınımı spektroskopisi            |

## GİRİŞ

Enzimler biyolojik süreçlerdeki etkinliklerinin yanı sıra kimyasal süreçlerde göstermiş oldukları yüksek katalitik verimlilik ve yüksek seçicilik gibi özellikleri ile uygun pH ve sıcaklıklarda aktivite gösterme ve düşük toksisite gibi benzersiz özellikleri ile kimyasal katalizörlere alternatif olarak gösterilmektedir. Büyük çoğunluğu protein yapısında olan ve canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler uygun şartlar altında hücre dışında da aktivite gösterebilirler. Bu nedenle, enzimlerin çok çeşitli endüstriyel süreçlerde pratik kullanımları vardır. Ancak, çoğu biyomolekül gibi, enzimlerin de bazı çevresel sebepler nedeniyle pratik uygulamalarını sınırlayan dezavantajları vardır. Endüstriyel uygulamaların gerektirdiği zorlu koşullarda (yüksek sıcaklık, organik çözücüler, inhibitörlerin varlığı ve/veya pH değişimleri gibi) enzimlerin kararsızlıkları ve yapısal bozunmaları enzimlerin kullanım alanlarını sınırlamaktadır. Bu nedenle, enzim kararlılığının artırılması gerekmektedir. Enzimlerin pratik uygulamalarda kullanılabilmesi için kararlılıklarının yanı sıra aktivitelerinin ve geri kazanımlarının artırılması gerekmektedir. Enzim kararlılığını artırmak için immobilizasyon, modifikasyon, protein mühendisliği gibi bazı yaklaşımlar vardır.

Farklı enzimler ve farklı uygulamalar için farklı immobilizasyon yöntemleri ve immobilizasyon materyali kullanılabilir. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarında immobilizasyon destek malzemeleri olarak büyük yüzey alanı sağlayan çeşitli nanoyapılar geliştirilmiştir. Enzimlerin yeniden kullanımlarındaki zorlukların üstesinden gelmek ve kararlılıklarını artırmak amacı ile kullanılan immobilizasyon araçlarından biri de manyetik nanoparçacıklardır (MNP'lerdir).

MNP'ler kullanılarak yapılan en güncel enzim immobilizasyon çalışmaları MNP'lerin enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin (Ei-hNÇ'lerin) yapısına dahil edilmesi ile elde edilen manyetik özellikli enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerdir (MEi-hNÇ'ler). Bu nedenle tez kapsamında Ei-hNÇ'ler ve MEi-hNÇ'ler ile ilgili ayrıntılı literatür

araştırılması yapıldı ve bu konudaki güncel çalışmalar verildi. Literatürde MEi-hNÇ teknolojisi alanında yapılmış olan çalışmaların genel bir çerçevede incelenmesi ve eksikliklerin ortaya konulması amaçlandı. Ei-hNÇ'ler ve MEi-hNÇ'ler ile ilgili hem araştırma makaleleri hem de derleme (Review) makaleleri incelendi ve bu inceleme sonucu elde edilen bilgiler değerlendirildi.

Ei-hNÇ'lere MNP'ler dahil edilerek manyetik özellik kazandırılması bu malzemelerin kullanımını daha pratik hale getirmektedir. Bu sayede sentezlenen manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler (MEi-hNÇ'ler) santrifüje ihtiyaç olmadan dış bir manyetik alan uygulanarak kolaylıkla reaksiyon ortamından ayrılabilir. Ek olarak, MNP'lerin Ei-hNÇ'lere dahil edilmesi enzimlerin immobilize formda kararlılığını da arttırmaktadır. MEi-hNÇ'ler, enzim aktivitesinin artırılması gibi Ei-hNÇ'lerin bilinen avantajlarını sunmakla kalmaz, aynı zamanda daha çok bağlanma bölgesi ve daha yüksek mekanik mukavemet sağlar.

Literatürde manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler (MEi-hNÇ'ler) ile ilgili çalışmalara bakıldığında;

- 1- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerin (hNÇ'lerin) yüzeyine tutturulması ve
- 2- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerde (hNÇ'lerde) enkapsülasyonu

iki farklı şekilde sentezlendikleri görülmektedir. Tez kapsamında hem Ei-hNÇ'lerin sentez mekanizması hem de MEi-hNÇ'lerin her iki yöntemle sentezlenmesi ile ilgili literatürde rapor edilmiş çalışmalar incelendi. Ayrıca MEi-hNÇ'lerin kullanım alanları ile ilgili çalışmalar ayrıntılı olarak verildi.

Nanomalzeme kapsamında değerlendirilen MEi-hNÇ'ler, üstün özellikleri nedeniyle fizikçilerin, malzeme bilimcilerin ve kimyacıların ilgisini çekmektedir. Sentez sonrası MEi-hNÇ'lerde elde edilen spesifik yüzey alanları, diğer nanopartiküllere kıyasla daha fazladır. Bu durum bu yapıların yüzeyinde daha çok aktif merkez bulundurulmasında etkili olan bir nedendir. MEi-hNÇ'lerin bu özelliği, onları mükemmel bir katalitik malzeme olma yeteneği kazandırmaktadır. Bu nedenle MEi-hNÇ'ler endüstriyel alanda pek çok alanda kullanım potansiyeline sahiptir. MEi-hNÇ'lerin mükemmel katalitik malzeme olma özelliği toksik organik bileşikler, boyalar, pestisitler ve bakterileri farklı

ortamlarda parçalamak için kullanılmaktadır. Tez kapsamında MEi-hNÇ'lerin çevre, biyosensör ve biyokataliz uygulamaları ayrıntılı olarak verildi.



## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

#### 1.1. Enzimler

Enzimler, canlı sistemlerdeki biyokimyasal türlerin dönüşümünü sağlayan, bitki, hayvan ve mikroorganizma olmak üzere bütün canlılarda bulunan biyokatalizörlerdir. Biyo uyumludurlar, biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilirler (Sheldon ve van Pelt, 2013). Bu özelliklere ek olarak, yüksek kemo-, regio-, ve stereo selektiviteye sahiptirler.

Enzimler biyolojik süreçlerdeki etkinliklerinin yanı sıra kimyasal süreçlerde göstermiş oldukları yüksek katalitik verimlilik ve yüksek seçicilik gibi özellikleri ile uygun pH ve sıcaklıklarda aktivite gösterme ve düşük toksisite gibi benzersiz özellikleri ile kimyasal katalizörlere alternatif olarak gösterilmektedir (Fritzen-Garcia vd. 2013; Sheldon vd. 2017; Bilal vd. 2018; Basso ve Serban, 2019; Bilal vd. 2019; Chen vd. 2023).

Büyük çoğunluğu protein yapısında olan ve canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler uygun şartlar altında hücre dışında da aktivite gösterebilirler. Bu nedenle, enzimlerin çok çeşitli endüstriyel süreçlerde pratik kullanımları vardır (Kim vd. 2006). Yüksek oranda eksprese edilen enzimlerin endüstriyel olarak uygulanabilir olması bunların endüstriyel proseslerin geliştirilmesinde ekonomik değerine katkı sağlayacaktır. Ancak, çoğu biyomolekül gibi, enzimlerin de bazı çevresel sebepler nedeniyle pratik uygulamalarını sınırlayan dezavantajları vardır (Chen vd. 2023). Sulu ortamda çözünür bir yapıya sahip olmaları enzimlerin önemli avantajları arasındadır. Ancak, enzimler sulu ortamda oksidasyon, iyon veya kofaktör ayrılması ya da oligomerik enzimler için alt birimlerin ayrışması gibi sebeplerden hızlı bir şekilde denature olabilirler (Cui ve Jia, 2017; Zhao vd. 2019). Yapısal olarak bozulan yani denature olan enzimler aktivitelerini de çok hızlı bir şekilde kaybeder (Cui ve Jia, 2015; Cui ve Jia, 2017). Çözünür enzimlerin



katalitik aktivitelerinin çevresel koşullara aşırı duyarlı olması dezavantajının yanı sıra operasyonel kararlılıklarının çok düşük olması, geri kazanım ve tekrar kullanılabilirliklerinin zor olması gibi başka dezavantajları da vardır (Lin vd. 2014). Endüstriyel uygulamaların gerektirdiği zorlu koşullarda (yüksek sıcaklık, organik çözücüler, inhibitörlerin varlığı ve/veya pH değişimleri gibi) enzimlerin kararsızlıkları ve yapısal bozunmaları enzimlerin kullanım alanlarını sınırlamaktadır (Lin vd. 2014; Yang vd. 2018; Dube ve Rawtani, 2023). Bu nedenle, enzim kararlılığının artırılması gerekmektedir. Enzimlerin kararlılıklarının iyileştirilmesi bu sorunları çözebilir, dezavantajları giderebilir ve pratik uygulamalarını artırabilir (Bickerstaff, 1997; Jafarizadeh-Malmiri vd. 2012).

Enzimlerin pratik uygulamalarda kullanılabilmesi için kararlılıklarının yanı sıra aktivitelerinin ve geri kazanımlarının artırılması gerekmektedir (Altınkaynak vd. 2018). Enzim kararlılığını artırmak için immobilizasyon, modifikasyon, protein mühendisliği gibi bazı yaklaşımlar vardır. Enzimleri endüstriyel alanlarda büyük ölçekli uygulamalara uygun hale getirebilmek ve daha iyi yeniden kullanılabilirlik, geliştirilmiş operasyonel kararlılık, gelişmiş enantioseçicilik ve daha uygun ürün geri kazanımı sağlamak için immobilize enzim teknolojisi bu yaklaşımlar arasında en çok tercih edilen yaklaşımdır (Chen vd. 2023; Xu vd. 2023).

## 1.2. Enzim İmmobilizasyonu

1971’de Enzim Mühendisliği Konferansında ilk defa kullanılan “İmmobilizasyon” terimi enzimlerin fiziksel olarak belirli bir bölgeye hapsedilmesi ve hareketinin sınırlandırılması anlamına gelmektedir (Kragl, 1996). İmmobilize enzim terimi, fiziksel olarak sınırlanmış veya belirli tanımlanmış bir uzay bölgesine yerleştirilmiş, katalitik aktiviteleri korunan, tekrar tekrar ve sürekli kullanılabilen enzimi ifade eder (Brena vd. 2013; Nadar vd. 2020).

İmmobilize enzimlerin serbest (immobilize edilmemiş veya çözünür) enzimlere karşı üstünlükleri aşağıda sıralanmıştır.

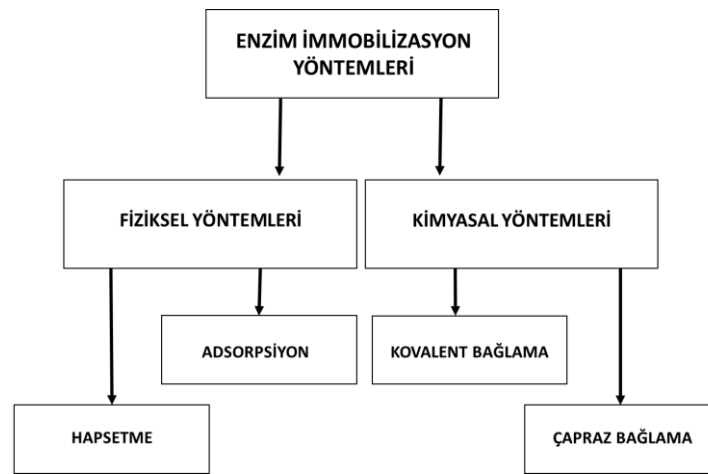
- ✓ Serbest enzimlere göre daha kararlıdırlar
- ✓ Tekrar tekrar ve uzun süre kullanılabilirler
- ✓ Reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilirler

- ✓ Sürekli ve büyük ölçekli üretimlere olanak sağlarlar
- ✓ Serbest enzimlere göre maliyetlerinin düşüktür
- ✓ Birbirini takip eden reaksiyonlar için uygundur
- ✓ Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı dayanıklıdır

Bir veya daha fazla sayıda enzimin belirli bir alana fiziksel olarak hapsedilmesi veya yerleştirilmesi yani immobilize edilmesi, enzimlerin hücre dışında katalitik aktivitelerinin korunması, geri kazanılmaları ve yeniden kullanım sorunlarının çözülmesi amacı ile yapılmaktadır.

### 1.2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Şimdiye kadar literatürde çok çeşitli enzim immobilizasyon yöntemi rapor edilmiştir ve enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Prensip olarak, enzimler (i) fiziksel veya (ii) kimyasal olmak üzere iki ana yoldan immobilize edilebilirler. Fiziksel veya kimyasal olarak kullanılan en yaygın tekniklerden dördü tuzaklanma, adsorpsiyon, kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadır. Her immobilizasyon yöntemin kendine özgü çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Bu durum metodolojilerin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır (Hwang ve Gu, 2013). Şekil 1.1.'de enzim immobilizasyon yöntemlerinin fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırılması verilmiştir.



Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin fiziksel ve kimyasal yöntemler şeklinde sınıflandırılması

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri suda çözünmeyen bir destek malzemesi ve enzim arasında kovalent bağ ya da birden çok enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerekli kılar. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri genel olarak tersinmez (geri dönüşümsüz) olarak yürür. Bu nedenle serbest enzimin immobilize edildiği destek malzemesinden tekrar geri kazanımı mümkün olmamaktadır. Kimyasal yöntem ile immobilizasyon işleminde enzimin hem kimyasal hem de fiziksel özellikleri değişebilir. Kimyasal yöntemlerle immobilize edilen enzimler dayanıklılık ve kararlılık bakımından oldukça üstün özelliklere sahipken kinetik özelliklerinde ciddi farklılıklar oluşur. Şekil 1.1.'de görüldüğü üzere kimyasal yöntemlerle immobilizasyon kovalent ve çapraz bağlama olarak iki grupta incelenir.

**Kovalent Bağlama:** Enzim ile suda çözünmeyen bir destek malzemesi arasında kovalent bağ oluşumu ile yapılan immobilizasyon şeklidir ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Kovalent olarak immobilize edilen enzimin kararlılığının artması ve enzimin destek malzemesinden çözeltiye geçmemesi bu yöntemin avantajları olarak sayılabilir. Böylece kovalent bağlanma ile immobilize edilen bir enzim her türlü akış ortamında kullanılabilir. Kovalent bağlanma ile immobilizasyonun dezavantajı ise enzim ve destek malzemesi arasında oluşan kovalent bağlanma enzimin doğal konformasyonunu bozabilir olmasıdır.

**Çapraz Bağlama:** Bu yöntemde, birden fazla fonksiyonel grup bulunduran küçük moleküllü maddeler (çapraz bağlayıcı madde) ile enzim molekülleri arasında suda çözünmeyen kompleks yapıların oluşumu sağlanır. Çapraz bağlanma derecesi, protein derişimine, pH vb parametreler immobilize edilecek enzime bağlı olarak değişir. Çapraz bağlama yönteminde molekül içi bağlanmaların yanı sıra moleküller arası bağlanmalarda söz konusudur. Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimlerin kolaylıkla immobilize edilebilir olmasıdır. Yöntemin dezavantajı ise moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir.

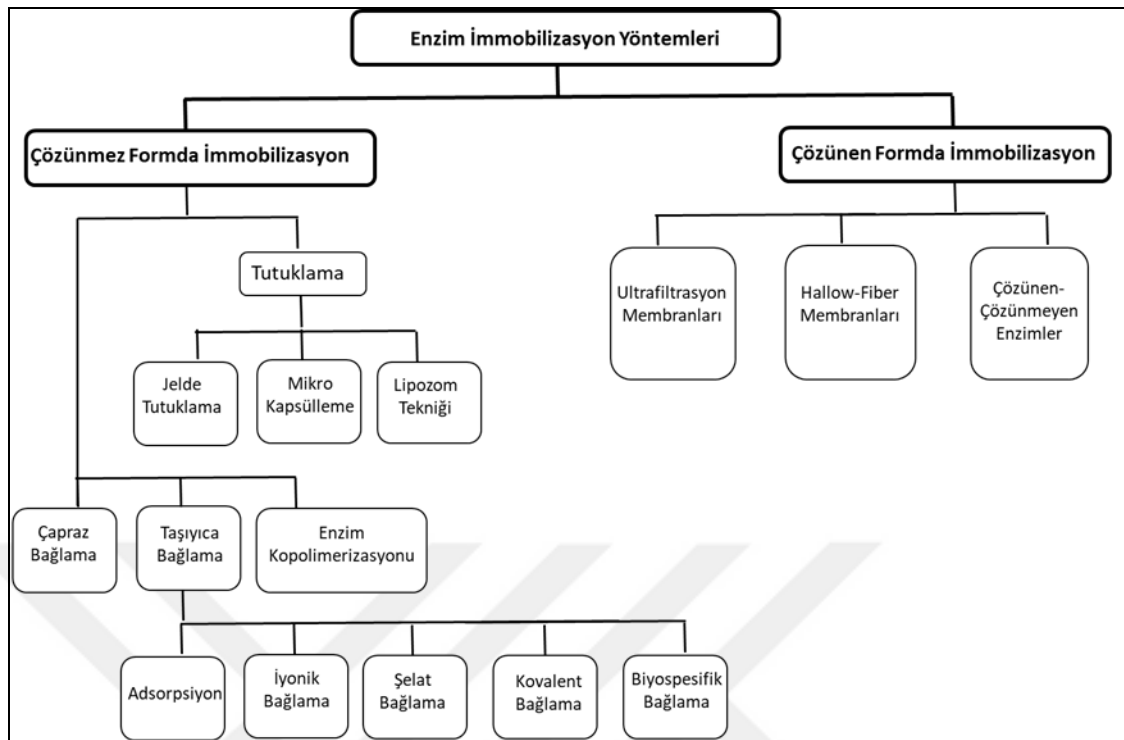
Fiziksel yöntemlerle yapılan immobilizasyon, enzimin fiziksel olarak belirli bir yere adsorbe edilmesi veya hapsedilmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Enzimlerin immobilizasyon işlemi bazı fiziksel kuvvetlerin bir araya getirilerek etkileşimde bulunmaları sonucu, iyonik bağ oluşumları, protein-protein etkileşimi, gibi enzimin destek maddesindeki mikro düzeyde bölmeler içerisinde ya da gözenekli yapı gösteren membranlara tutturulması ile sağlanır. Bazı istisna örneklerde dikkat edilecek düzeyde

tersinmez bağ oluşumu gözlense de fiziksel immobilizasyon yöntemleri genel olarak tersinirdir bu yüzden de en çok tercih edilen yöntemdir. Şekil 1.1.'de de görüldüğü üzere fiziksel metotlar, adsorpsiyon ve hapsedme ile immobilizasyon olarak iki grupta incelenir (Nisha vd. 2012).

**Adsorpsiyon:** Bu yöntem, oldukça eski ve basit bir immobilizasyon yöntemidir. Adsorpsiyon ile enzim immobilizasyonu, katı bir matriks üzerinde enzimin iyonik bağlanmasına ya da fiziksel adsorpsiyonuna dayanan bir yöntemdir. Fiziksel adsorpsiyon işleminde immobilizasyondan sorumlu olan kuvvetler London kuvvetleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon işleminde, proteinin yük taşıyıcı olan grupları ile destek olarak kullanılan materyalin karşıt yük gruplarının arasında birbirini çekme kuvvetlerine dayanır. Enzimin su içerisinde çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, sıcaklık, pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ve adsorbanın derişimi gibi deney koşullarına bağlıdır. Adsorpsiyon ile immobilizasyon hem kolay olarak yapılabilmektedir hemde bu yöntemle immobilize edilen enzimlerin aktivitesi büyük ölçüde korumaktadır. Ayrıca bu yöntemin tersinir olması destek materyalinin ve enzimin farklı amaçlar için tekrar kullanımına olanak sağlar.

**Hapsedme:** Yarı geçirgen membranlarda ya da polimerik matrikslerde enzimin hapsedilmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Enzim, sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer çapraz bağlanma, ısı, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılarak, hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir. Yöntem her türden enzimi, başka biyokatalizörleri, bütün hücreleri ya da farklı çaplarda bulunan mikroorganizmaları hapsedme amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Chen vd. 1996). Bu yöntemle Enzim herhangi bir kimyasal değişime uğramaz ve enzimin özelliklerinde de herhangi bir değişim olmaz.

Şekil 1.2.'de ise enzim immobilizasyon yöntemleri çözünmez ve çözünür yöntemler olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin çözünmez ve çözünen formda immobilizasyon yöntemleri şeklinde sınıflandırılması

Uygulanan bu çok çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri sayesinde immobilize enzimlerin kararlılıkları arttırılarak ve hedeflenen geri kazanım özelliği sağlanarak ekonomik açıdan avantajlı olmaları sağlanmaktadır.

Son birkaç on yıl boyunca, enzim immobilizasyon teknolojisi ile biyosensör, antibiyotik üretimi, ilaç metabolizması, gıda endüstrisi, biyodizel üretimi veya biyoremediasyon gibi birçok uygulamalı disiplinde başarılı ilerlemeler sağlanmıştır (Hwang ve Gu, 2013).

Enzim immobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılması yapılan multidisipliner bir alandır. İmmobilizasyon yöntemlerinin çeşitlilik göstermesi, farklı enzim türlerinin çoğunda uygulanabilecek olduğunu gösteren bir özelliktir (Han vd. 2020). Çok farklı ve çok sayıda immobilizasyon tekniğinin geliştirilmiş olmasına rağmen bütün enzimler için uygun olan tek bir yöntem yoktur (Lei vd. 2018; Zhu vd. 2018).

Pek çok üstün özelliğine rağmen immobilize enzimlerin bazı dezavantajları vardır. Literatürde rapor edilen çalışmalarda bazı istisnai örnekler dışında immobilize edilmiş enzimlerin serbest enzimlere karşı kararlılıklarının artmasına rağmen aktivitelerinin

düştüğü görülmüştür (Wang vd. 2013; Netto vd. 2013; Cui ve Jia, 2017). İmmobilize enzimin aktivitesinin düşmesinin sebepleri aşağıda sıralanmıştır.

- 1) Uygun olmayan bir immobilizasyon yönteminin tercih edilmesi
- 2) İmmobilizasyon sırasında uygun olmayan bir çözücü kullanılması ve çözücünün enzimi denatüre etmesi
- 3) İmmobilize enzim için kütle transfer sınırlamalarının olması
- 4) İmmobilizasyon işlemi sırasında enzim ve destek malzeme arasında kimyasal bir reaksiyonun gerçekleşmesi
- 5) Enzim ve destek malzeme arasında oluşan reaksiyon sonucunda, enzimin yapısal değişikliğe uğraması ve karakteristik özelliklerini kaybetmesi

Şimdiye kadar 2000'den fazla enzim saflaştırılmış ve kristalize halde elde edilmiştir. Saflaştırılan bu enzimlerin bir çoğuna uygulanabilecek çok farklı enzim immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen enzimlerin kimyasal yapılarının, bileşenlerinin, substratlarının ve ürünlerinin çok farklı özelliklerde olmasından dolayı bütün enzimler ve bunların uygulamaları için uygun evrensel bir enzim immobilizasyon yöntemi bulunmamaktadır (Lei vd., 2018; Zhu vd., 2018; Zdarta vd., 2018).

Farklı enzimler ve farklı uygulamalar için farklı immobilizasyon yöntemleri ve immobilizasyon materyali kullanılabilir. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarında immobilizasyon destek malzemeleri olarak büyük yüzey alanı sağlayan çeşitli nanoyapılar geliştirilmiştir. Manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler) enzim immobilizasyonunda geniş yüzey alanı sağlayan ve oldukça sıklıkla tercih edilen nano malzemelerden biridir.

### **1.2.2. Manyetik Parçacıklar (MNP'ler)**

Enzimlerin yeniden kullanımlarındaki zorlukların üstesinden gelmek ve kararlılıklarını artırmak amacı ile kullanılan immobilizasyon araçlarından biri de manyetik nanoparçacıklardır (MNP'ler). MNP'lerin boyutu, bazı yoğun NP topluluklarında birkaç nm'den birkaç yüz nm'ye kadar değişebilir ve bu topluluklar çeşitli yapısal şekiller sergiler

(Holo vd. 2015). MNP'ler, kobalt ve nikel gibi metaller, demir/platin gibi alaşımlar ve demir oksitler gibi metal oksitler ve ferritler gibi bir dizi malzemeden oluşabilmektedirler.

Metal oksitlerden biri olan ferro ferrik oksit ( $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (manyetit), düşük maliyetli, yüksek kimyasal ve termal kararlılık, yaygın kullanılabilirlik gibi ilgi çekici özellikleri nedeniyle katalizör veya immobilizasyon destek malzemesi olarak kabul edilmektedir. Toksik değildir ve çevre dostudur (Cheng vd. 2009). Dahası, demir okside mezo-gözeneklerin eklenmesi, daha çok katalitik olarak aktif bölgeye ve geliştirilmiş yüzey işlevselliklerine sahip bir malzeme sentezine imkan sağlar. Genişletilmiş yüzey alanları, MNP'leri heterojen katalizde uygulama için umut verici bir aday haline getirir.

Ferrit nano parçacıkları en çok çalışılan MNP'lerdir. MNP'ler, fonksiyonel moleküllerle seçici olarak bağlanabilir ve dış manyetik alan altında hedeflenen bir yere taşınmasına izin verebilir. Birleşmenin önlenmesi ve parçacıkların ortam ile etkileşimini en aza indirmek için, yüzey kaplaması uygun bir çözümdür. Ferit nanopartiküllerin yüzeyleri sık sık silikonlar, yüzeysel aktif maddeler, silika veya diğer malzemelerle sabitliklerini artırmak için değiştirilir (Ma vd. 2018).

Çeşitli nanoyapılar arasında MNP'ler, süperparamanyetizma, düşük toksisite ve biyouyumluluk gibi benzersiz özelliklere sahiptir ve geniş bir uygulama yelpazesi vardır (Ashtari vd. 2012). Bu özellikler MNP'lerin, hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonu, biyoseparasyon, immün testler, ilaç dağıtımı ve biyosensörler gibi çeşitli potansiyel uygulamaları için önemli özelliklerdir (Govan ve Gun'ko, 2014). MNP'ler, proteinleri, enzimleri, antikorları ve ilaçları bağlamak için taşıyıcı olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Biyolojik olarak aktif bileşikler için manyetik immobilizasyon prosedürleri biyotıp ve biyoteknolojinin farklı alanlarında büyük etkiye sahiptir.

MNP'lerin özellikleri, sentez yöntemine ve kimyasal doğasına bağlı olarak değişmektedir. Tez kapsamında MNP'lerin sentez yöntemlerinden bahsedilmeyecektir. MNP'lerin enzim immobilizasyonu amacı ile kullanılmalarındaki güncel gelişmeler tez konusu kapsamında verilmiştir.

### 1.2.3. Manyetik Nanoparçacıklar (MNP'ler) Üzerine Enzim İmmobilizasyonu

Enzimleri içeren manyetik nanosistemler, biyoteknoloji araştırmalarının en hızlı büyüyen alanlarından biridir. MNP'ler geniş yüzey alanı, geniş yüzey/hacim oranı, yüksek kütle aktarımı, düşük toksisite, yüzeyinin fonksiyonel hale getirilebilmesi ve böylece enzim immobilizasyonu için daha uygun hale getirilebilmesi gibi istisnai özellikleri sayesinde çok yönlü taşıyıcılar ve immobilizasyon araçları (matrisler) olarak özel bir yer kazanmıştır. Daha da önemlisi, immobilize enzimin harici bir manyetik alan uygulanarak kolayca ayrılabilir ve geri kazanılabilir olması MNP'leri çok önemli bir noktaya taşımaktadır (Bilal vd. 2018; Vaghari vd. 2016). Uygulamalarda biyomoleküllere kazandırdıkları avantajlar ve sağladıkları üstün özellikler nedeniyle son yıllarda çeşitli alanlarda kullanımı artmaktadır. MNP'ler sadece akademik açıdan değil ilaç salınımı çalışmalarında, protein/nükleik asit saflaştırma işlemlerinde, medikal uygulamalarda da kullanılmaktadırlar (Fu vd. 2019; Han vd. 2019; Lee vd. 2019; Neuberger vd. 2005).

Nanometre ölçeğindeki manyetik parçacıklar, süperparamanyetizma, yüksek yüzey alanı, büyük yüzey hacim oranı ve dış manyetik alanlar altında kolay ayrışma gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Bu özellikler, yükleme kapasitesini büyük ölçüde artırmakta ve difüzyon sınırlamalarını azaltmaktadır. (Xu vd. 2014). Ayrıca, MNP'ler üzerine immobilize enzimler yüksek aktivite gibi avantajlı özellikler göstermektedir. (Zhou ve ark. 2013). En yaygın kullanılan manyetik parçacıklar, düşük toksisite ve biyouyumlulukları nedeniyle manyetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ve maghemittir ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (Xu vd. 2014).

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak MNP'ler üç işlevsel bölümden oluşur: bir manyetik çekirdek, manyetik çekirdeği korumak için bir yüzey kaplaması ve işlevselleştirilmiş (fonksiyonelleştirilmiş) bir dış kaplama. (Vatta vd. 2006). Seçilen kabuk, geçiş metali komplekslerini de içerecek şekilde, kolayca işlevselleştirilebilir ve çeşitli katalitik türlerin bağlanması için uygundur (Govan ve Gun'ko 2014). MNP'ler, enzim immobilizasyonunu ve katalizörün manyetik olarak geri kazanımını sağlayan son derece faydalı bir katalizör destekleyici olarak hizmet edebilir. Genel olarak, enzimlerin MNP'lere bağlanması, bu malzemelerin reaksiyon sonunda geri kazanılması için tutulmasını sağlar. Bu, reaksiyon ortamından katalizörü geri kazanmak için ek bir işleme olan gereksinimi ortadan kaldıracak ve onu önceki yaklaşımlara kıyasla "yeşil" bir katalizör haline getirecektir (Baig ve Varma 2013).



Yenilenebilir "biyokatalizörler" olarak, daha yeşil biyoyakıt üretimi için de kullanılabilirler (Ansari ve Husain 2012).

#### **1.2.4. MNP'ler Üzerinde Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları ve Dezavantajları**

MNP'lere enzimleri immobilize etmenin birkaç teknolojik avantajı vardır. Her şeyden önce, aktif malzemenin manyetik geri kazanımı üretim maliyetini düşürmektedir. Ayrıca, immobilize edilmiş enzimler genellikle immobilize edilmemiş enzimlere kıyasla daha iyi sıcaklık stabilitesi, pH stabilitesi ve daha yüksek aktivite sergiler (Holo vd. 2015). Enzimlerin immobilizasyonu, kullanım kolaylığı, enzimlerin reaksiyon karışımından ayrılmasının ve yeniden ve tekrar tekrar kullanılmasının sağlanması gibi avantajları nedeniyle ticari uygulamalar için faydalıdır. Böylece, sürekli veya sabit yataklı işletmelerde maliyet etkin bir kullanımını mümkün kılar (Ansari and Husain 2012). MNP'lerden tam anlamıyla faydalanmanın önemli bir avantajı, enzimlerin bu destek malzemeler üzerindeki yönlendirmesinin ideal bir şekilde yapılabilmesidir. Gözenekli desteklerle karşılaştırıldığında, gözeneksiz nanopartiküllerin dış difüzyon sorunları yoktur, bu da onları özellikle katı-sıvı sistemlerinde (örneğin, çökeltilmiş protein) büyük ölçekli endüstriyel kullanım için daha rekabetçi hale getirir (Xu vd. 2014). Bir diğer avantaj, genellikle zor depolama ve işletme koşulları altında, enzimin ısı veya otoliz ile denatürasyona karşı artırılmış kararlılığıdır. Enzim performansını ve yeniden kullanılabilirliğini artırmak, ürün başına enzim maliyetlerini azaltacaktır (Sheldon ve van Pelt, 2013).

MNP'lere immobilize edilmiş enzimin beraberinde getirdiği avantajlara rağmen, bazı dezavantajları da bulunmaktadır; bunlar arasında aktivitedeki düşüş, enzimin konformasyonel değişimi, enzimin denatürasyon olasılığı, özelliklerinde oluşabilecek değişiklikler, kütle transfer sınırlamaları ve çözünmez substratlara karşı etkinliğin azalması yer almaktadır. Ayrıca, immobilize enzimlerin uzun vadeli endüstriyel kullanımı, belirli bir reaksiyon için uygun işlevsel özelliklere (örneğin, aktivite ve seçicilik) sahip çok stabil türevlerin hazırlanmasını gerektirir (Singh vd. 2013).

MNP'ler kullanılarak yapılan en güncel enzim immobilizasyon çalışmaları MNP'lerin enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin (Ei-hNÇ'lerin) yapısına dahil edilmesi ile elde edilen manyetik özellikli enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerdir (MEi-hNÇ'ler). Bu nedenle tez kapsamında MEi-hNÇ'ler ile ilgili güncel çalışmalar verilmiştir.

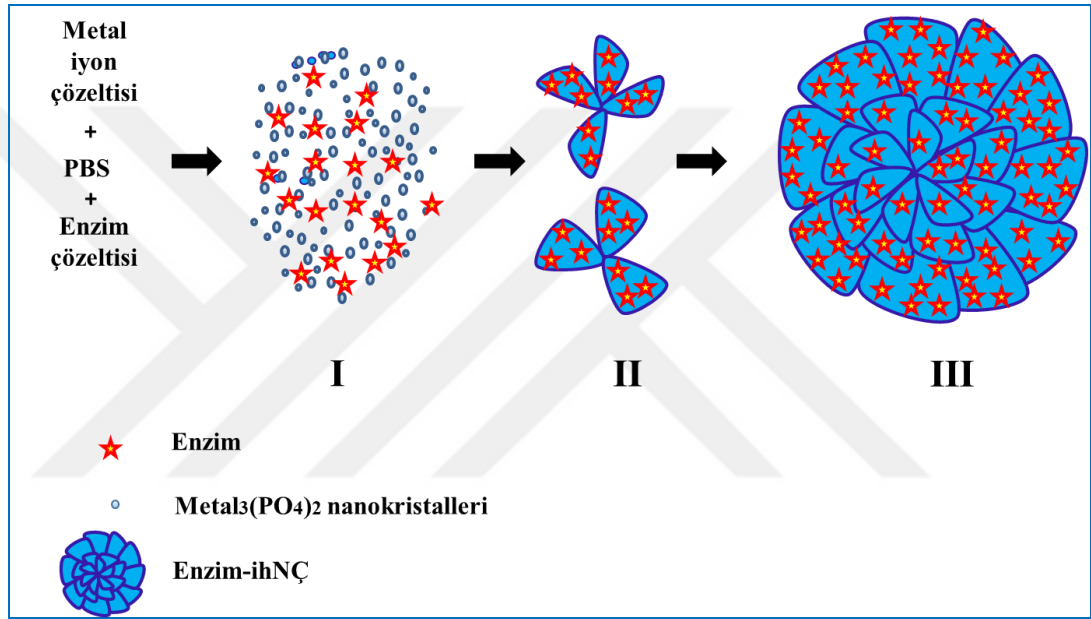
### 1.3. Manyetik Özellikli Enzim-İnorganik Hibrit Nano Çiçekler (MEi-hNÇ'ler)

Farklı bileşenlerden meydana getirilen hibrit yapılar için belirtilen “hibrit” terimi, ayrı ayrı bileşenlerde bulunmayan ancak oluşan bu yeni yapı içerisinde ortaya çıkan eşsiz ve gelişmiş özellikleri belirtmek için kullanılmaktadır (Galvão vd. 2018). Bugüne kadar yürütülen çeşitli çalışmalarda, hibrit malzeme geliştirilmesinin tıp, biyolojik bilimler, sensör teknolojisi, yeşil kimya ve diğer pek çok alanda etkili olduğu bu neden ile yaklaşımların multidisipliner bir özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu özelliği ile hibrit malzemelerinin kullanımının birçok alanda şart olduğu belirtilmektedir (Zhang vd. 2021).

Tez kapsamında incelenen manyetik özellikli enzim-inorganik hibrit nanoçiçekler (MEi-hNÇ'ler) hibrit malzemelerin çok özel bir sınıfını oluşturmaktadır. Geleneksel immobilizasyon yöntemlerinden farklı olarak yeni bir yaklaşımla enzimler “Enzim-inorganik hibrit nano çiçekler; (Ei-hNÇ'ler)” (Enzyme-inorganic hybrid nano flowers, Ei-hNFs) olarak adlandırılan yapılarda immobilize edilmektedir (Ge vd. 2012; Altınkaynak vd. 2016). Tanım olarak “nanoçiçek” mikroskopik görünümde çiçeklere benzerlik gösteren üç boyutlu (3B) bir yapıyı ifade etmektedir (Ge vd. 2012; Negron vd. 2016; Ma vd. 2017; Shende vd. 2018). Şimdiye kadar bahsi geçen bu hibrit nanoçiçekler (hNÇ'ler), enzimlerin yanı sıra proteinler, DNA, aminoasitler, biyopolimerler vb çok geniş bir biyomolekül yelpazesini immobilize etmek için kullanılmıştır (Özdemir vd. 2022; Chen vd. 2023).

Enzimlerin bazı metal iyon çözeltilerinde kendiliğinden bir araya gelme (self assembly) yoluyla immobilize edilmesine yönelik bu yaklaşım, ilk defa 2012 yılında Stanford Üniversitesinden Prof. Dr. Richard Zare ve ekibi tarafından tesadüfen keşfedilmiştir (Ge vd. 2012). Hibrit nano çiçekler (hNÇ'ler) hem organik (enzim, protein, DNA, küçük organik moleküller vb) hem de inorganik ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  gibi bazı metal iyonları) bileşenlerin özelliklerini birleştirerek aynı anda yararlandıkları ve bu sayede sinerjetik bir etki oluşturdıkları için son yıllarda artan bir şekilde araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Özellikle organik bileşen olarak enzimlerin kullanılması ile hazırlanan enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (Ei-hNÇ'ler) çok yoğun olarak çalışılmaktadır. Araştırmacılar Ei-hNÇ'ler şeklinde immobilize edilen enzimlerin büyük çoğunluğunun kararlılığının artmasının yanı sıra enzimatik aktivitelerinde de bir artış gözlemlediklerini rapor etmişlerdir (Özdemir vd. 2022; Chen vd. 2023).

Sentezlenen Ei-hNÇ'lerin oluşum aşamaları çekirdeklenme, büyüme ve tamamlanma olmak üzere üç basamakta açıklanmaktadır (Ge vd. 2012; Cui ve Jia, 2017; Lei vd. 2018; Bilal vd., 2019; Costa vd., 2022; Chen vd., 2023). Ei-hNÇ'lerin sentez mekanizması ilk olarak bunların kendi kendine montaj sürecinde farklı dönemlerde elde edilen SEM görüntülerinin elde edilmesiyle önerilmiştir (Chen vd., 2023). Senteze dayalı oluşum mekanizması Şekil 1.3.'de verilmiştir.



Şekil 1.3. Enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin oluşum mekanizması (Ge vd. 2012; Somtürk vd. 2015; Aydemir vd. 2020; Noma vd. 2021)

- I. Basamak: Çekirdeklenme;** Sentezde kullanılan metal iyonunun türüne göre ilk önce primer metal fosfat ( $M_3(PO_4)_2$ ) nano kristalleri oluşur. Bu basamakta oluşan  $M_3(PO_4)_2$  nanokristallerinin yapısında bulunan su sayısı metal iyonu türüne göre değişir. Oluşan  $M_3(PO_4)_2$  nanokristallerindeki metal iyonları ile protein yapısında bulunan amino gruplarının koordinasyonu sayesinde kompleksler oluşur. Oluşan bu kompleksler metal fosfat birincil nanokristallerin çekirdeklenme alanlarına dönüşür.
- II. Basamak: Büyüme;** Bu basamakta proteinler ve primer  $M_3(PO_4)_2$  nanokristalleri topaklar haline gelir. Çekirdeklenme basamağında oluşan  $M_3(PO_4)_2$  nanokristallerinin kinetik olarak kontrolü agregatların yüzeyindeki bireysel metal bağlayıcı bölgelerden kaynaklanır ki bu da ayrı ayrı yapıların oluşmasına neden

olur. Yapraklar anizotropik olarak büyüyerek dallı çiçeğe benzer bir yapının oluşmasını sağlar.

**III. Basamak: Tamamlanma;** Bu basamakta anizotropik büyümenin devam etmesi ile dallı ve çiçek-benzeri bir yapının oluşumu gerçekleşir. Önerilen bu büyüme sürecinde, proteinler  $M_3(PO_4)_2$  nanokristallerinin çekirdeklenmesini indükler ve böylece nano boyutta yapraklar oluşur. Nano boyuttaki yaprak şekilli yapılar hiyerarşik olarak bir araya gelerek birleşir ve anizotropik büyüme mekanizması sonucu Enzim- $M_3(PO_4)_2$  nanoçiçekler (Ei-hNÇ'ler) oluşur. Bu basamak metal iyonu türüne göre farklı sayılarda hidrat suyu içeren Enzim- $M_3(PO_4)_2$  nanoçiçeklerin (Ei-hNÇ'lerin) oluşumunun son basamağıdır.

Ei-hNÇ'ler çoğunlukla inkübasyon (tek kap biyomineralizasyon) yöntemi ile kolaylıkla sentezlenmektedir. Son on iki yılda, benzersiz ve mükemmel özelliklerinden dolayı yaygın bir ilgi kazanan hNÇ'ler özellikle enzim immobilizasyonu amacı ile yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, Ei-hNÇ'lerin sentez veya reaksiyon ortamından tamamen ayrılabilmesi için santrifüjlenmesi gerekmektedir. Kırılgan bir yapıya sahip Ei-hNÇ'lerin her işlem sonrası santrifüjlenmesi yapılarının parçalanmasına ve bozulmasına neden olabilmektedir.

Enzimlerin tekrar kullanımlarındaki zorlukların üstesinden gelmek amacı ile kullanılan immobilizasyon araçlarından biri de manyetik nanoparçacıklardır (MNP'ler). Bu nedenle son dönemde sentezlenen Ei-hNÇ'lere MNP'ler dahil edilerek bu yapılara manyetik özellik kazandırılmaktadır (Patil vd. 2023). Ei-hNÇ'lere manyetik özellik kazandırılması bu malzemelerin kullanımını daha pratik hale getirmektedir. Bu sayede sentezlenen manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler (MEi-hNÇ'ler) santrifüje ihtiyaç olmadan dış bir manyetik alan uygulanarak kolaylıkla reaksiyon ortamından ayrılabilir (Vaghari vd. 2016; Bilal vd. 2018; Ren vd. 2019; Li vd. 2021; Badoei-dalfard vd. 2022; Patil vd. 2023). Ek olarak, MNP'lerin Ei-hNÇ'lere dahil edilmesi enzimlerin immobilize formda kararlılığını da arttırmaktadır. MEi-hNÇ'ler, enzim aktivitesinin artırılması gibi Ei-hNÇ'lerin bilinen avantajlarını sunmakla kalmaz, aynı zamanda daha çok bağlanma bölgesi ve daha yüksek mekanik mukavemet sağlar (Patil vd. 2023).

Literatürde manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler (MEi-hNÇ'ler) ile ilgili çalışmalara bakıldığında iki farklı şekilde sentezlendikleri görülmektedir (Bilal vd. 2018; Ren vd.

2019; Fu vd. 2019; Zhong vd. 2021; Gül ve Ocsoy 2021; Altınkaynak vd. 2021; Badoei-dalfard vd. 2022; Patil vd. 2023).

- 3- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerin (hNÇ'lerin) yüzeyine tutturulması ve
- 4- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerde (hNÇ'lerde) enkapsülasyonu

**1- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerin (hNÇ'lerin) yüzeyine tutturulması:** Uygulanan bu yöntemde önce Ei-hNÇ'ler sentezlenmekte ve daha sonra MNP'ler sentezlenen Ei-hNÇ'ler üzerine tutturulmaktadır (Fu vd. 2019; Gül ve Ocsoy 2021; Altınkaynak vd. 2021).

**2- 1- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerde (hNÇ'lerde) enkapsülasyonu:** Uygulanan bu yöntemde ise MNP'ler Ei-hÇ'lerin sentezlenmesi sırasında hibrit yapıya enkapsüle edilmektedir (Zhang vd. 2018; Wang vd. 2018; Han vd. 2019; Cheon vd. 2019; Lee vd. 2020; Zhong vd. 2021). Bu amaçla önce enzim önce MNP'ler üzerine immobilize edilmekte daha sonra ise hibrit nano çiçek (hNÇ) sentezi yapılmaktadır.

Her iki yöntemde de Ei-hNÇ'lere manyetik özellik kazandırılmaktadır. Literatürde rapor edilmiş MEi-hNÇ'ler ile ilgili çalışmalar incelendiğinde her iki yöntemin de kendine özgü bazı avantaj ve dezavantajlarının olduğu görülmektedir.

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

#### 2.1. Kullanılan Yöntem ve Kapsamı

Bu tez kapsamında, enzim immobilizasyonunda manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) en güncel kullanım alanı olarak manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler) ile ilgili literatür araştırılması yapıldı. Literatürde MEi-hNÇ teknolojisi alanında yapılmış olan çalışmaların genel bir çerçevede incelenmesi ve eksikliklerin ortaya konulması amaçlandı.

#### 2.2. Literatür Taramasında Kullanılan Veri Tabanları ve Anahtar Kelimeler

Tez kapsamında incelenen MEi-hNÇ'ler ile ilgili makaleler Web of Science (WOS) veri tabanından taranarak belirlendi. Bu amaçla 2012 yılından itibaren Ei-hNÇ'ler ve MEi-hNÇ'ler ile ilgili yayımlanmış çalışmalar seçildi.

Tez kapsamında incelenen makaleler Web of Science veri tabanından aşağıda verilen anahtar kelimeleri kullanılarak elde edildi.

“Magnetic nanoparticles” (Manyetik nanoparçacıklar)

“Organic-inorganic hybrid nanflowers” (Organik-inorganik hibrit nanoçiçekler)

“Protein-inorganic hybrid nanflowers” (Protein-inorganik hibrit nanoçiçekler)

“Enzyme-inorganic hybrid nanflowers” (Enzim-inorganik hibrit nanoçiçekler)

“Magnetic protein-inorganic hybrid nanflowers” (Manyetik protein-inorganik hibrit nanoçiçekler)

“Magnetic enzyme-inorganic hybrid nanflowers” (Manyetik enzim-inorganik hibrit nanoçiçekler)

Tez kapsamında Ei-hNÇ’ler ve MEi-hNÇ’ler ile ilgili hem araştırma makaleleri hem de derleme (Review) makleler incelendi ve bu inceleme sonucu elde edilen bilgiler değerlendirildi.



### 3. BÖLÜM

#### BULGULAR

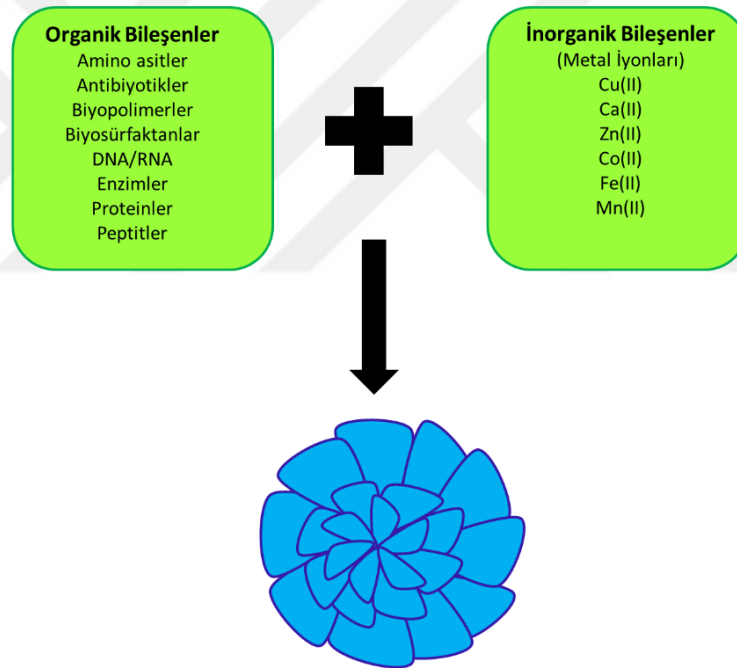
Yüzyılı aşkın süredir, çeşitli biyotransformasyon süreçlerinin sürdürülebilir gelişimi için enzimlerin rolü ve faydaları, endüstriyel kullanımlarıyla birlikte kutlanmaktadır. Enzimler sadece çevreye zararlı kimyasal katalizörlere alternatif olmakla kalmıyor, aynı zamanda farmasötikler, gıda ürünleri, biyosensörler ve temizlik ürünleri gibi birçok ürünün geliştirilmesinde daha iyi özgüllük ve seçicilik sağladığını da kanıtlamaktadır.

Ancak endüstriyel uygulamaların gerektirdiği zorlu koşullarda (yüksek sıcaklık, çeşitli organik çözücüler, inhibitörlerin varlığı ve/veya pH değişimleri gibi) kararsızlıkları ve bozunmaları nedeniyle enzimlerin ticari kullanımı sınırlanmaktadır. Ayrıca reaksiyon ortamından serbest (çözünür) enzimlerin ayrılması da bir diğer önemli bir sorundur. Enzimlerin kararlılığını ve geri dönüşümünü geliştirmek ve endüstriyel uygulamalarda maliyetini azaltmak amacıyla araştırmacılar farklı stratejiler geliştirmişlerdir. İmmobilizasyon, serbest enzimlerin sınırlı aktivite, stabilite ve zorlu koşullar altında geri kazanım gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla uygulanan önemli bir atılımdır.

Literatür incelendiğinde günümüze kadar araştırmacıların çok farklı immobilizasyon yöntemi ve materyalini rapor ettiği görülecektir. Manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler) sıklıkla kullanılan enzim immobilizasyon malzemelerindendir. MNP'ler farklı fonksiyonel gruplarla (amino, karboksilat vb) fonksiyonelleştirilmiş olarak veya fonksiyonelleştirilmeden kullanılabilir. MNP'lerin en güncel kullanım alanı manyetik özellikli enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler) şeklindeki kullanımlarıdır. Bu nedenle tez kapsamında, öncelikle enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (Ei-hNÇ'ler) daha sonra ise manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler) hakkında bilgi verilmiştir.



Enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (Ei-hNÇ'ler) organik-inorganik hibrit nano çiçeklerin (Oi-hNÇ'lerin) özel bir sınıfıdır. Güncel olarak yürütülen çalışmalarda organik-inorganik hibrit nano çiçekler (Oi-hNÇ'ler) sentez sırasında kullanılan inorganik bileşenlerin (metal iyonu türü) veya organik bileşenlerin (protein/enzim vb) türüne göre sınıflandırılmaktadır (Jafari-Nodoushan vd. 2022). Son 12 yılda birçok araştırmacı, çok farklı metal iyonlarını (Cu(II), Ca(II), Co(II), Zn(II), Mn(II) vb.) ve organik molekülleri (çeşitli enzimler, BSA, DNA, kitosan veya aljinat gibi biyopolimerler ve amino asitler gibi küçük organik moleküller) Oi-hNÇ'lerin sentezinde kullanmıştır (Kumar vd. 2021; Özdemir vd. 2022; Jafari-Nodoushan vd. 2022; Chen vd. 2023). Şekil 3.1.'de Oi-hNÇ'lerin sentezi amacı ile kullanılan organik bileşenler ve inorganik bileşenler verilmiştir.



Şekil 3.1. Oi-hNÇ'lerin sentezi amacı ile kullanılan organik ve inorganik bileşenler (Jafari-Nodoushan vd. 2022; Chen vd. 2023)

Enzimler, Oi-hNÇ'lerin sentezi amacı ile en fazla kullanılan organik bileşendir. Bu nedenle, Ei-hNÇ'ler çok yeni ve en güncel enzim immobilizasyon yöntemi olarak son 12 yıldır oldukça yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.

### 3.1. Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçekler (Ei-hNÇ'ler)

Daha önce defalarca belirtildiği üzere, enzim immobilizasyonu amacı ile seçilebilecek çok çeşitli geleneksel immobilizasyon yöntemleri ve materyali bulunmaktadır. Ancak,

geleneksel immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilen enzimlerin kararlılıklarının artmasına rağmen aktivitelerinin düştüğü yapılan yayınlarda rapor edilmiştir (Bilal vd. 2019; Jafari-Nodoushan vd. 2022; 2022; Chen vd. 2023). İmmobilize enzimin aktivitesindeki düşüşe bağlı olarak enzimlerin uygulamalarında bazı sınırlanmalar olduğu yine literatürde çeşitli yayınlarda rapor edilmiştir (Jafari-Nodoushan vd. 2022; 2022; Chen vd., 2023). Bu nedenle yeni enzim immobilizasyon yöntemlerinin araştırılmasına, yeni ve basit yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Bilal vd. 2019). Enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (Ei-hNÇ'ler) ve manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler) enzim immobilizasyonunda en yeni ve güncel yaklaşımlardır.

Organik ve inorganik iki farklı bileşenden meydana gelen hibrit yapılar için belirtilen “hibrit” terimi, ayrı ayrı bileşenlerde bulunmayan ancak oluşan bu yeni yapı içerisinde ortaya çıkan eşsiz ve gelişmiş özellikleri belirtmek için kullanılmaktadır (Galvão vd. 2018). Çeşitlilik gösteren özellikler genel olarak tek bir materyal ile oluşturulan yapıların, organik ve inorganik bileşenlerle ortaya çıkardıkları kombinasyonunu ifade etmektedir. Hibrit yapılar, farklı uygulamalar için farklı bileşenlerden oluşturulan sıradan karışımlara kıyasla daha avantajlı yapılardır (Nadar ve Rathod. 2018). Bugüne kadar yürütülen çeşitli çalışmalarda, hibrit malzeme geliştirilmesinin tıp, biyolojik bilimler, sensör teknolojisi, yeşil kimya ve diğer pek çok alanda etkili olduğu bu neden ile yaklaşımların multidisipliner bir özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu özelliği ile hibrit malzemelerinin kullanımının birçok alanda şart olduğu belirtilmektedir (Zhang vd. 2021).

Tez kapsamında incelenen enzim-inorganik nano çiçekler (Ei-hNÇ'ler) ve manyetik enzim-inorganik nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler), hibrit malzemeler arasında en yeni ve en özel bir sınıfı oluşturmaktadır. Hibrit nanoçiçekler (hNÇ'ler), enzimlerin yanı sıra çok geniş bir biyomolekül yelpazesini (proteinler, DNA, aminoasitler, biyopolimerler vb) immobilize etmek için ana platform olarak iyi bir potansiyel göstermektedir (Özdemir vd. 2022; Chen vd. 2023). Son on iki yılda, benzersiz ve mükemmel özelliklerinden dolayı yaygın bir ilgi kazanan hNÇ'ler özellikle enzim immobilizasyonu amacı ile yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Enzimlerin kendiliğinden bir araya gelerek (self assembly) çökeltme yoluyla immobilize edilmesine yönelik bu zarif yaklaşım, ilk defa 2012 yılında Prof. Dr. Richard Zare ve

ekibi tarafından tesadüfen keşfedilmiştir (Ge vd. 2012). Stanford Üniversitesinden Dr. Zare ve arkadaşları tarafından protein-inorganik hibrit nanoçiçekler şeklinde adlandırılan ve “Nature Nanoteknoloji” dergisinde yayımlanan çalışma enzim immobilizasyonunda yeni bir yol açmıştır. Bahsi geçen çalışmada yer alan protein-inorganik hibrit nanoçiçeklerin etkili bir enzim immobilizasyon yöntemi olabileceği rapor edilmiştir (Ge vd. 2012).

Dr. Zare ve ekibi tarafından sentezlenen çiçek benzeri şekillere sahip hibrit yapıların boyutlarının mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) boyutlarında olmalarına karşın, nano (nm) boyutlarında yapraklardan oluştukları ve nano malzeme özellikleri gösterdikleri tespit edilmiştir. Sentezlenen bu hibrit yapılar “Nanoflowers” (Nanoçiçekler) olarak yine ilk kez bu araştırmacılar tarafından adlandırılmıştır. Tanım olarak “nanoçiçekler” mikroskopik görünümde çiçeklere benzerlik gösteren üç boyutlu (3B) bir yapıyı ifade etmektedir (Ge vd. 2012; Negron vd. 2016; Ma vd. 2017; Shende vd. 2018; Özdemir vd. 2022). Sentezlenen bu yapılar (hNÇ’ler) daha önceden hiç uygulanmamış yeni ve oldukça kolay bir yaklaşım sonucu elde edilmiştir. Dr. Zare ve ekibi tarafından rapor edilen bu çalışmada, organik kısım olarak bazı proteinler ve enzimler (laktalbumin, lakkaz, karbonik anhidraz, lipaz ve BSA) ve inorganik kısım olarak Cu(II) iyonu kullanılmıştır. Rapor edilen bu yöntemde “Protein-inorganik hibrit nanoçiçekler” olarak adlandırılan yapıların metal iyon çözeltisinin (Cu(II)) çeşitli protein çözeltilerine eklenerek kolaylıkla sentezlendiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda özellikle lakkaz enzimi kullanılarak sentezlenen Ei-hNÇ’lerin kararlılıklarının yanısıra aktivite oranlarında etkili bir artış olduğu saptanmıştır (Ge vd. 2012). Sentez yöntemin basitliği daha sonra pek çok biyomolekülün (protein, enzim, DNA vb) hNÇ’lerde immobilizasyonunu sağlamıştır. Rapor edilen çalışmaların büyük çoğunluğunda hNÇ’lerde immobilize edilen enzimlerin serbest (çözünür) enzimlere ve geleneksel immobilizasyon teknikleri uygulanan enzimlere kıyasla aktivite değerlerinde çok ciddi artışların gözlemlendiği belirtilmiştir (Ge vd. 2012, Bilal vd. 2019; Chen vd. 2023). Sentez işlemi sonucunda elde edilen enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin (Ei-hNÇ’lerin) aktivitelerinin artmasında etkili olan sebepler şu şekilde belirtilmiştir (Ge vd. 2012; Cui vd. 2017):

- 1) Oluşan yeni yapıların yüksek yüzey alanına sahip olması sayesinde kütle transferi sınırlamaların ortadan kaldırılması,

- 2) Sentezlenen nano ölçek içerisinde hapsedilmiş enzim moleküllerinin arasında oluşan kooperatif etki ve enzim moleküllerinin nanokristal yapı içerisinde korunması,
- 3) Yapılarında metal iyonu içeren enzimlerin (metalloenzimler) sentez sırasında içerdiği metal iyonlarının oluşturduğu kristaller ile çevrelenmesi. Bu duruma örnek olarak lakkaz enzimi bakır iyonları içerdiği için enzimin bakır iyonları içeren çevresi ile etkileşimi verilmiştir.

Yeni nanomateriyaller/nanokompozitler arasında, hibrit nanoçiçeklerin (hNÇ'lerin) topografik özellikleri, kolay sentezlenmeleri, küresel bir yapıya sahip olmaları ve yüksek yüzey-hacim oranına sahip olmaları nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Yılmaz vd. 2016; Altınkaynak vd. 2016; Altınkaynak vd. 2018, Bilal vd. 2019; Al-Maqdi vd. 2021). hNÇ'lerin çiçek benzeri morfolojisi, onlara geniş bir yüzey-hacim oranı ve önemli ölçüde geliştirilmiş katalitik aktivite sağlar. hNÇ'lerin yüksek stabilitesi ise yapılarındaki organik bileşenleri (enzimleri) koruyan inorganik bileşenlerine (metal iyonu, fosfat grupları ve hidratlardan oluşan nanokristal örgüye) atfedilmektedir (Chen vd. 2023).

Son on iki yılda, benzersiz ve mükemmel özelliklerinden dolayı yaygın bir ilgi kazanan ve yoğun bir şekilde kullanılan Ei-hNÇ'lerin bazı dezavantajları vardır. Ei-hNÇ'lerin reaksiyon ortamından çoğunlukla santrifüjlenerek ayrılması en önemli dezavantajlarından biridir. Kırılgan bir yapıya sahip Ei-hNÇ'lerin her işlem sonrası santrifüjlenmesi yapılarının parçalanmasına ve bozulmasına neden olabilmektedir. Enzimlerin tekrar kullanımlarındaki zorlukların üstesinden gelmek amacı ile kullanılan immobilizasyon araçlarından biri de manyetik nanopartiküllerdir (MNP'ler). Bu nedenle son dönemde sentezlenen Ei-hNÇ'lere MNP'ler dahil edilerek bu yapılara manyetik özellik kazandırılmaktadır (Altınkaynak vd. 2023; Patil vd. 2023). Ei-hNÇ'lere manyetik özellik kazandırılması bu malzemelerin kullanımını daha pratik hale getirmektedir. Bu sayede sentezlenen manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler (MEi-hNÇ'ler) santrifüje ihtiyaç olmadan dış bir manyetik alan uygulanarak kolaylıkla reaksiyon ortamından ayrılabilir (Vaghari vd. 2016; Bilal vd. 2018; Ren vd. 2019; Li vd. 2021; Badoei-dalfard vd. 2022; Patil vd. 2023). Ek olarak, MNP'lerin hNÇ'lere dahil edilmesi enzimlerin bu şekilde immobilize formda kararlılığını da arttırmaktadır. MEi-hNÇ'ler,

enzim aktivitesinin arttırılması gibi Ei-hNÇ'lerin bilinen avantajlarını sunmakla kalmaz, aynı zamanda daha çok bağlanma bölgesi ve daha yüksek mekanik mukavemet sağlar (Patil vd. 2023).

### **3.2. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) Sentez Mekanizması**

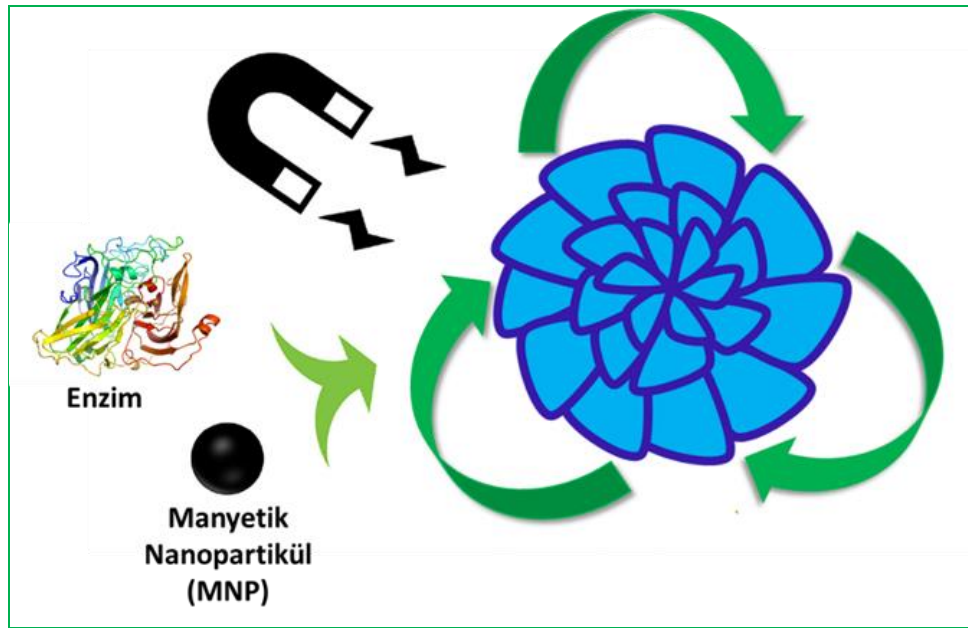
N, O, S gibi metal bağlayıcı alanlara sahip biyomoleküller ile Cu(II), Ca(II), Zn(II), Fe(II), Co(II) gibi bazı metal iyonları koordinasyon bağı yoluyla ile kompleksler oluşturabilirler. Metal iyonlarının yaptığı bu kompleksler ve özellikleri araştırmacılar tarafından oldukça fazla çalışılmıştır.

Çoğunluğu protein yapılı olan enzimlerin büyük bir kısmı kofaktör olarak çeşitli metal iyonlarına (Cu(II), Zn(II), Fe(II) vb) ihtiyaç duymaktadır. Çoğunluğu protein yapılı olan enzimler 20 standart amino asitin peptit bağları ile bir araya gelerek oluşturdıkları kendilerine has üç boyutlu yapıları olan sofistike biyopolimerlerdir. Protein yapısında bulunan N, O, S gibi elektron verici atomlar elektron çifti alıcıları olan Cu(II), Ca(II), Zn(II), Fe(II), Co(II) gibi metal iyonları ile koordinasyon bağı için özellikle uygundur. Uygun şartlar altında bu kompleksler çiçek benzeri şekillere sahip hibrit yapılar (hNÇ'ler) oluşturmaktadır.

Organik kısım olarak çeşitli enzimler kullanılarak sentezlenen Ei-hNÇ'ler, esas olarak 24-72 saat arasında bir sürede inkübasyon yoluyla elde edilmektedir. Yöntem basitçe, enzimleri içeren bir tuzlu fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline; PBS, tuzlu fosfat tamponu) çözeltisine bir metal iyonu (çoğunlukla Cu(II) iyonu) çözeltisinin eklenmesini içerir. Protein içeren PBS çözeltisine metal iyonunun eklenmesi, nano boyutlu yaprakçıklardan oluşan çiçek benzeri yapıların oluşumuna yol açar. Yöntemde enzimler PBS çözeltisinde çözülür ve belirli derişimlerde metal iyonlarının çözeltileri ile karıştırılarak koaylıkla enzim-inorganik hibrit nanoçiçekler (Ei-hNÇ'ler) şeklinde immobilize edilebilirler.

Metal iyonu (II) çözeltisine protein eklemek kadar basit bir sentez süreci, araştırmaların büyük ilgisini çeken böylesine etkileyici bir yapının imalatını çok çekici hale getiriyor. Bu hibrit nanoyapılı biyokatalizörler, biyosensörler, biyodönüşüm, çevresel iyileştirme ve antimikrobiyal uygulamalar gibi çeşitli alanlarda araştırılmıştır. Bu kadar kolay bir

şekilde ve yeşil sentezle sentezlenebilen ve çok geniş bir uygulama alanı bulan Ei-hNÇ'ler ile ilgili en önemli sorun hNÇ'lerin filtreleme veya santrifüjleme yoluyla ayrılabilir olmasıdır. Bu durum sonuçta biyokatalizörün kütle transferini ve genel katalitik verimliliğini etkileyen topak oluşumuna ve yeniden dağılıma zorluğuna neden olabilmektedir. Filtreleme veya santrifüjleme işlemleri ile biyokatalizörün geri kazanılması yorucu, zaman alıcı ve yoğun sermaye gerektiren bir durumdur. Ayrıca kırılgan bir yapıya sahip Ei-hNÇ'lerin her işlem sonrası santrifüjlenmesi yapılarının parçalanmasına ve bozulmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, Ei-hNÇ'lerin tekrar kullanımlarındaki bu zorlukların üstesinden gelmek amacı ile son zamanlarda manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler) kullanılmaktadır. Son birkaç yıldır sentezlenen Ei-hNÇ'lere MNP'ler dahil edilerek bu yapılara manyetik özellik kazandırılmaktadır (Patil vd. 2023). Ei-hNÇ'lere manyetik özellik kazandırılması bunların kullanımını daha pratik hale getirmektedir. Bu sayede sentezlenen manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler (MEi-hNÇ'ler) santrifüje ihtiyaç olmadan dış bir manyetik alan uygulanarak kolaylıkla reaksiyon ortamından ayrılabilir (Vaghari vd. 2016; Bilal vd. 2018; Ren vd. 2019; Li vd. 2021; Badoei-dalfard vd. 2022; Patil vd. 2023). Şekil 3.2.'de Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) mıknatısla ayrılması şematik olarak gösterilmiştir.



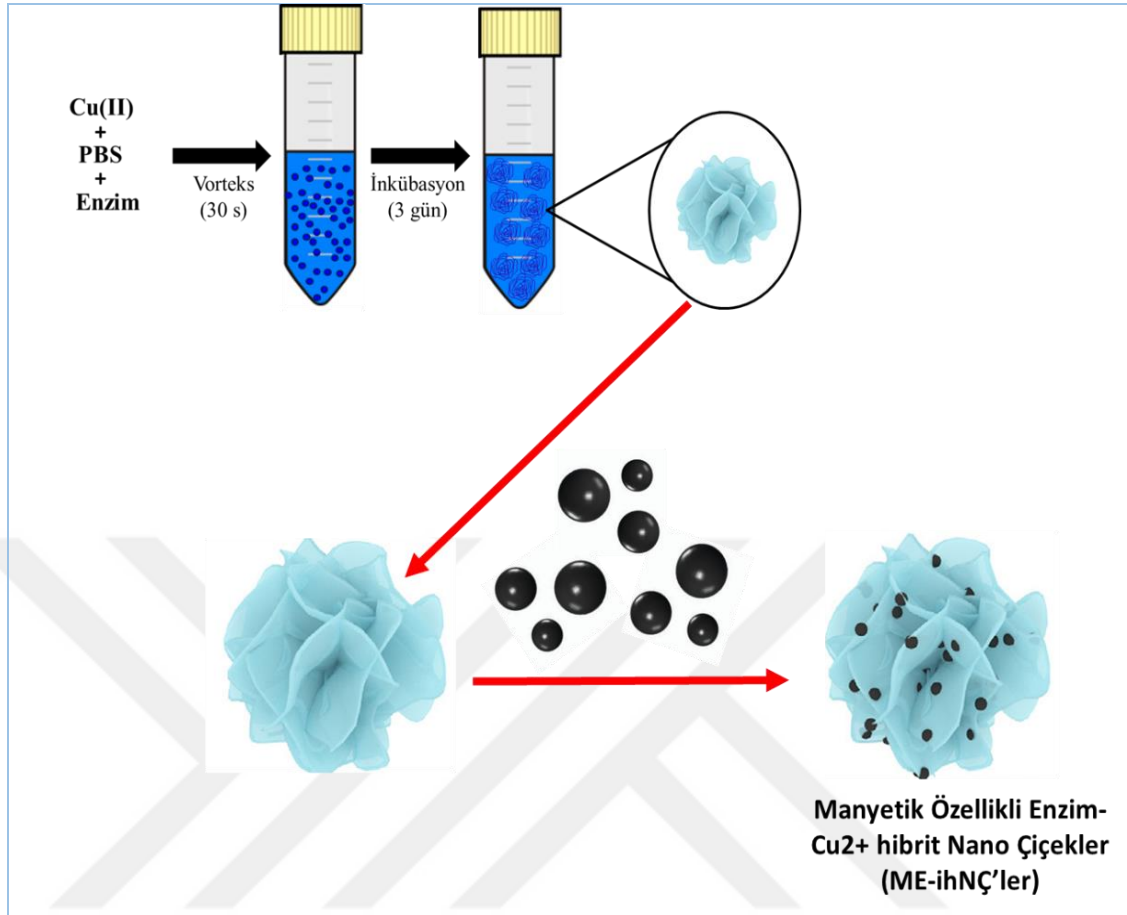
Şekil 3.2. Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) mıknatısla ayrılmasının şematik gösterimi (Zhong vd. 2021)

MNP'lerin Ei-hNÇ'lere dahil edilmesi ayrıca enzimlerin immobilize formda kararlılığını da arttırmaktadır. MEi-hNÇ'ler, enzim aktivitesinin artırılması gibi Ei-hNÇ'lerin bilinen avantajlarını sunmakla kalmaz, aynı zamanda daha çok bağlanma bölgesi ve daha yüksek mekanik mukavemet sağlar (Patil vd. 2023). Ayrıca yapıya MNP'lerin dahil edilmesi bu yapılara manyetik özellikler sağlamakla kalmaz, aynı zamanda reaksiyondaki enzimlerin katalitik etkinliğini de geliştirmektedir (kimyasal, termal ve pH stabilitesi açısından). Ayrıca, enzim moleküllerinin etrafındaki koruyucu kalkan (inorganik çevre tarafından oluşturulan), potansiyel uygulamalar için önemli geliştirmelerde kullanılabilecek kimyasal-mekanik stabilite sağlamaktadır.

Prensip olarak, MEi-hNÇ'lerin sentezlenme mekanizması bazı farklılıklarla birlikte Ei-hNÇ'lerin sentez mekanizmasına benzemektedir. Literatürde MEi-hNÇ'ler ile ilgili çalışmalara bakıldığında iki farklı şekilde sentezlendikleri görülmektedir (Bilal vd. 2018; Ren vd. 2019; Fu vd. 2019; Zhong vd. 2021; Gül ve Ocsoy 2021; Altınkaynak vd. 2021; Badoei-dalfard vd. 2022; Patil vd. 2023).

- 1- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerin yüzeyine (hNÇ'lerin) tutturulması ve
- 2- Manyetik nanoparçacıkların (MNP'lerin) hibrit nano çiçeklerde (hNÇ'lerde) enkapsülasyonu

**1- Manyetik Nanoparçacıkların (MNP'lerin) Hibrit Nano Çiçeklerin Yüzeyine (hNÇ'lerin) Tutturulması:** Uygulanan bu yöntemde önce Ei-hNÇ'ler sentezlenmekte ve daha sonra MNP'ler sentezlenen Ei-hNÇ'ler üzerine tutturulmaktadır (Fu vd. 2019; Gül ve Ocsoy 2021; Altınkaynak vd. 2021). Şekil 3.3.'de MNP'lerin Ei-hNÇ yüzeyine adsorplanması ile yapılan ME-ihNÇ sentezi şematik olarak gösterilmiştir.

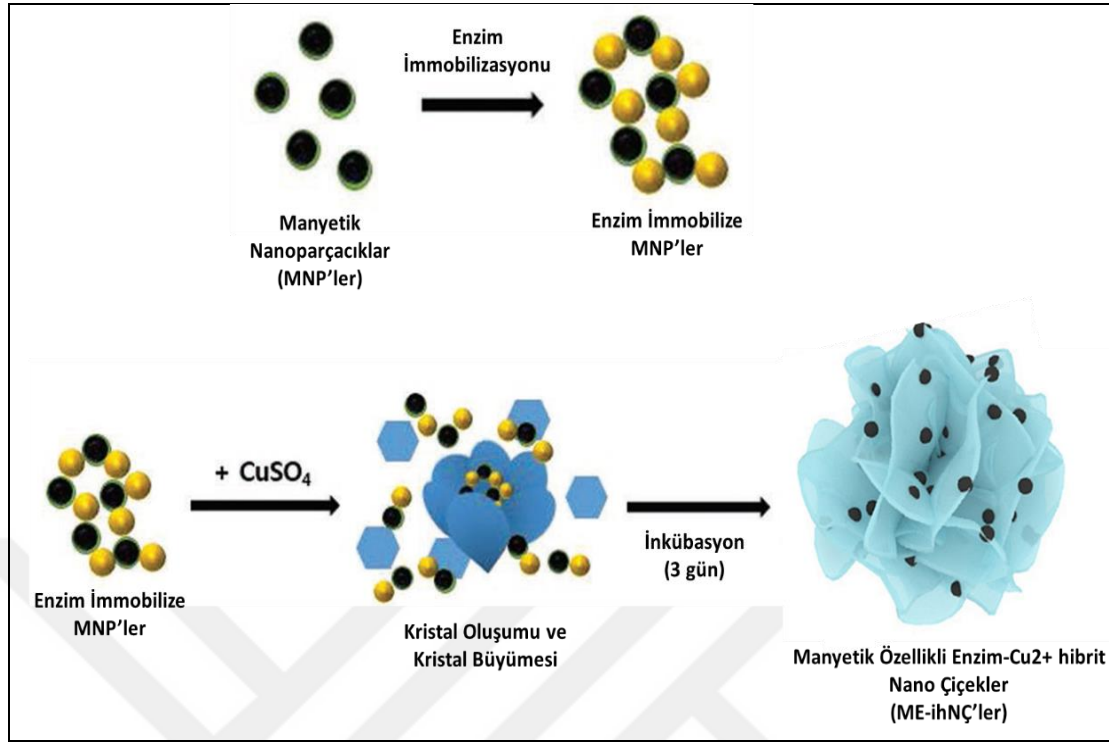


Şekil 3.3. MNP'lerin Ei-hNC yüzeyine adsorplanması ile yapılan ME-ihNC sentezinin şematik gösterimi (Zhong vd. 2021; Altınkaynak vd. 2022; Patil vd. 2023)

## 2- Manyetik Nanoparçacıkların (MNP'lerin) Hibrit Nano Çiçeklerde (hNC'lerde)

**Enkapsülasyonu:** Uygulanan bu yöntemde ise MNP'ler Ei-hNC'lerin sentezlenmesi sırasında hibrit yapıya enkapsüle edilmektedir (Zhang vd. 2018; Wang vd. 2018; Han vd. 2019; Cheon vd. 2019; Lee vd. 2020; Zhong vd. 2021). Bu amaçla önce enzim MNP'ler üzerine immobilize edilmekte daha sonra ise hibrit nano çiçek (hNC) sentezi yapılmaktadır. Şekil 3.4.'de MNP'lerin Ei-hNC'lerde enkapsülasyonu ile yapılan ME-ihNC sentezi şematik olarak gösterilmiştir.





Şekil 3.4. MNP'lerin Ei-hNC'lerde enkapsülasyonu ile yapılan ME-ihNC sentezinin şematik gösterimi (Cheon vd. 2019; Patil vd. 2023)

Bu yaklaşımda enzim, biyomineralizasyon stratejisiyle çiçek şeklinde inorganik bir yapıya kendiliğinden (self assembly) enkapsüle edilmektedir. Ei-hNC'lerin sentezindeki gibi enzim içeren fosfat tampon çözeltisi, MNP'lerin varlığında iki değerlikli metal tuzu (en çok tercihen Cu(II) iyonu tuzu) ile karıştırılmakta ve oldukça ılımlı koşullar altında (pH 7 ve oda sıcaklığı) belirli süreler boyunca inkübe edilmektedir. Araştırmacılar, bu yöntemde, MEi-hNC'lerin sentezinin çekirdeklenme, büyüme ve tam nanoçiçeklerin oluşumu olmak üzere üç adımda gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Erken büyüme aşamasında bimetalik iyonlar, birincil fosfat kristalleri için bir çekirdeklenme alanı sağlayan koordinasyon bağları yoluyla enzimlerin amid grupları ile kompleks oluşturmaktadır. İkinci büyüme aşamasında, enzim ve fosfat nanokristalleri, MNP'lerin varlığında bir araya gelerek birincil nano yaprakları oluşturur. Son büyüme adımında, enzim molekülleri, tam manyetik nanoçiçekler oluşturmak üzere işlevselleştirilmiş manyetik nanopartiküllerin etrafındaki fosfat kristalli yaprakları bağlamak için bir "yapıştırıcı" görevi görür. hNC'lerde metal iyonlarının varlığı, enzim aktivitesinin ve stabilitesinin artırılması üzerinde sinerjik bir etkiye neden olmaktadır. pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve organik ve inorganik bileşenlerin derişimi gibi temel parametrelerin

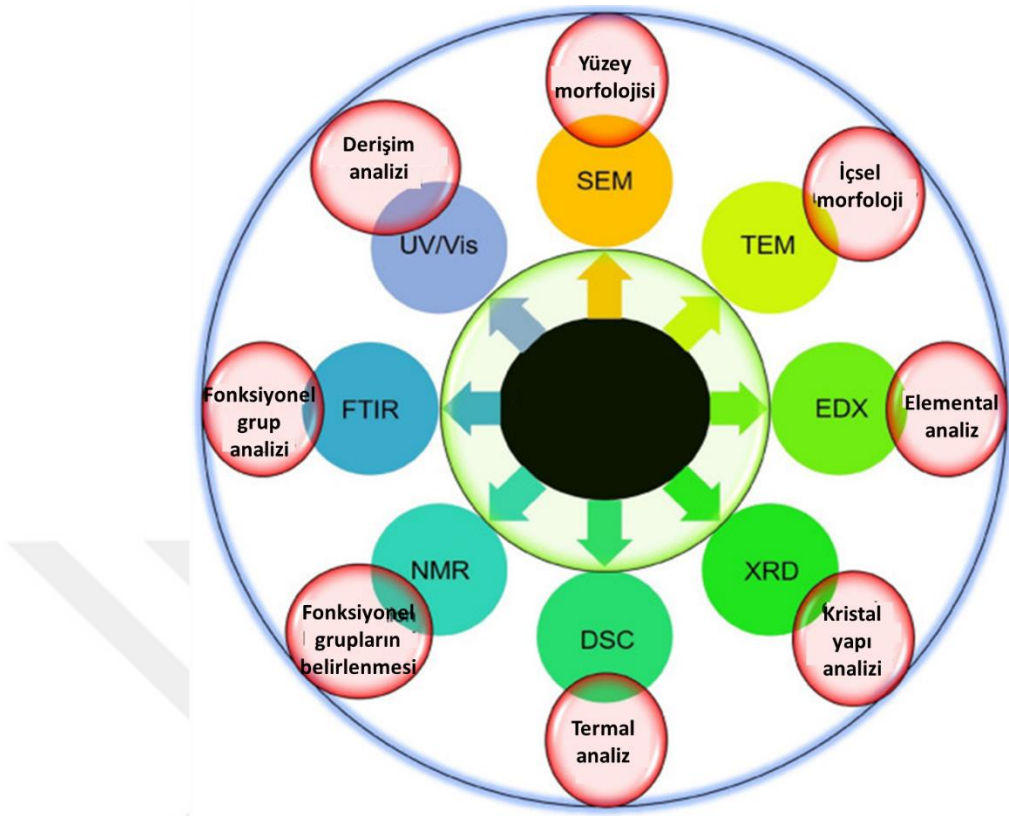
hNÇ'lerin oluşumunda hayati bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Zhang vd. 2018; Patil vd. 2023).

Manyetik özellikli hibrit nanoçiçekler ile ilgili çalışmalardan bazıları tez kapsamında verilmiştir. Rapor edilen bir çalışmada, Zhang ve arkadaşları (2018), BSA'yı (model protein olarak), Zn(II) iyonları, fosfat grupları ve MNP'lerle birlikte kullanarak manyetik hibrit nanoçiçek sentezlemişler ve sentezledikleri bu hNÇ'leri derinlemesine incelemişlerdir. Araştırmacılar, BSA konsantrasyonundaki değişikliklerle ilgili olarak manyetik hNÇ'lerin morfolojik özelliklerini açıklamışlardır. Sentezde BSA miktarındaki artışla, hNÇ boyutunun gözle görülür şekilde azaldığı ve morfolojinin değişme eğiliminde olduğu rapor edilmiştir. Operasyonel koşullardaki hafif bir değişikliğin, hNÇ'nin morfolojisini büyük ölçüde etkilediği belirtilmiştir. Bu nedenle, tüm reaksiyon koşullarının tanımlanması ve optimize edilmesi, yüksek düzeyde aktif enzim gömülü manyetik nanoçiçekler elde etmek için son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (Zhang vd. 2018).

Her iki yöntemde de Ei-hNÇ'lere manyetik özellik kazandırılmaktadır. Literatürde manyetik özellikli Ei-hNÇ'ler ile ilgili rapor edilen çalışmalar incelendiğinde her iki yöntemin de kendine özgü bazı avantaj ve dezavantajlarının olduğu görülmektedir.

### **3.3. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) Karakterizasyon Çalışmaları**

Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) karakterizasyonu amacı ile kullanılan teknikler Şekil 3.5.'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) karakterizasyonu amacı ile kullanılan teknikler

Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) yüzey morfolojileri SEM (Scanning Electron Microscopy; Taramalı Elektron Mikroskobu) ile karakterize edilmektedir.

Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) kimyasal yapılarının aydınlatılmasında Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) kullanılmaktadır.

Manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) kimyasal bileşimlerinin ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), kristal yapıları XRD (X-Ray Diffraction; X-Işını Kırınımı) ile aydınlatılmaktadır.

Ayrıca, manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) üzerinde/içinde enzimlerin varlığı (enzimden kaynaklanan N, S gibi bazı elementlerin varlığından) MNP'lerin varlığı ise (Fe elementinin varlığından) SEM-EDX ile gösterilmektedir. Enzim ve MNP'lerin MEi-hNÇ'lerde dağılımını dağılımları ise SEM-EDX elemental haritalama yapılarak gösterilmektedir.

Ayrıca, manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerde (MEi-hNÇ'lerde) enzim immobilizasyonundan önce ve sonra Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi ile yüzey alanındaki değişiklik, doğrulayıcı karakterizasyon tekniklerinden biri olarak kullanılmaktadır.

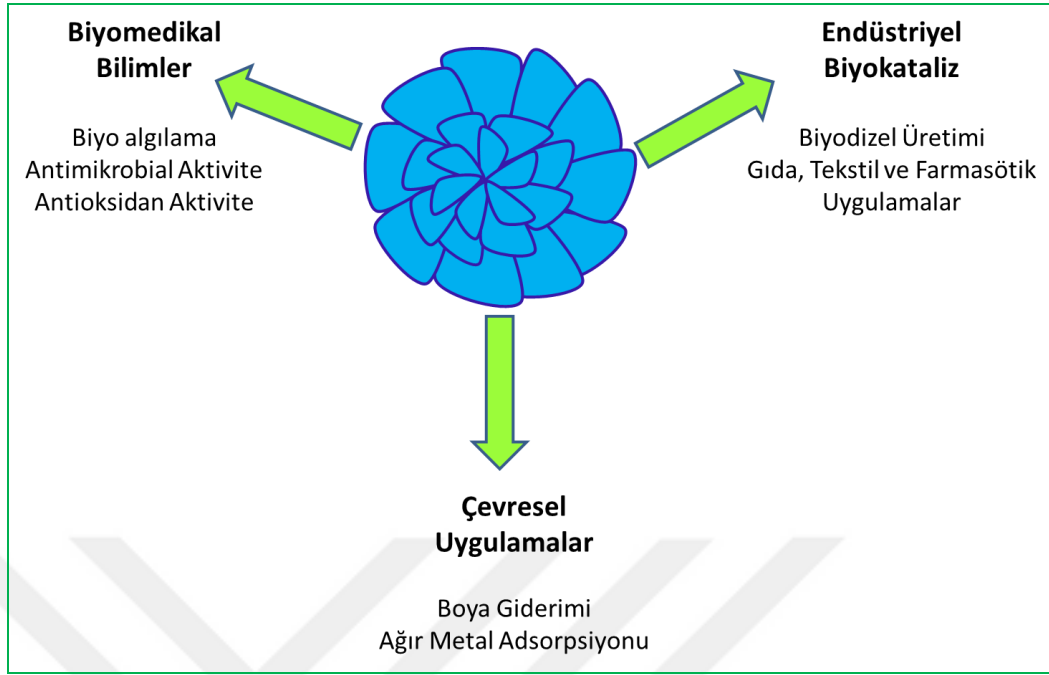
#### **3.4. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) Uygulamaları**

MEi-hNÇ'lerin endüstriyel uygulamaları arasında biyotransformasyon, biyosensör, atık su arıtımı, gıda işleme, biyokataliz gibi örnekler sayılabilir (Patil vd. 2023).

Son yıllarda, biyokatalitik süreçler, endüstriyel uygulamalarda geleneksel kimyasal katalizin üstün bir "yeşil" ikamesi olarak görülmektedir. Farklı bileşiklerin enzimatik sentezi, enzimlerin biyolojik olarak parçalanabilirliği, yüksek katalitik verimleri ve ılımlı reaksiyon koşulları kullanma olasılığı nedeniyle geleneksel sentez yöntemlerine kıyasla birçok avantaja sahiptir.

Ge ve arkadaşlarının 2012'de protein-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hNÇ'leri hazırlamak için yeni bir sentez tekniğini ilk keşfettiklerinden beri, organik-inorganik hibrit nanoçiçeklerin benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması, biyoloji, fizik, kimya, malzeme bilimi, tıp vb alanlarda yeni fırsatların oluşturulmasında da etkili olmaktadır (Nguyen vd. 2022). Nanomalzemeler kapsamında değerlendirilen MEi-hNÇ'ler, fotoelektrik ve kimyasal özellikleri fizikçiler ile birlikte malzeme bilimcileri ve kimyacıların ilgisini çekmektedir. Sentezlenen MEi-hNÇ'lerde elde edilen spesifik yüzey alanları, diğer nanopartiküllere kıyasla daha fazladır. Bu durum bu yapıların yüzeyinde daha çok aktif merkez bulundurmasında etkili olan bir nedendir. MEi-hNÇ'lerin bu özelliği, onları mükemmel bir katalitik malzeme olma yeteneği kazandırmaktadır. MEi-hNÇ'lerin bu özellikleri, toksik organik bileşikleri, boyaları, pestisitleri ve bakterileri farklı ortamlarda parçalamak için kullanılmaktadır (Song vd. 2022).

Bu bölümde MEi-hNÇ'lerin bazı uygulamaları örneklendirilerek anlatıldı. MEi-hNÇ'lerin uygulama alanları şematik olarak Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. MEi-hNC'lerin uygulama alanlarının şematik gösterimi

#### 3.4.1. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNC'lerin) Çevre Uygulamaları

Endüstrinin hızlı gelişimi, dünya genelinde mevcut su kaynaklarının azalmasına yol açmıştır. Endüstriyel fenolik bileşikler, organik boyalar gibi kirleticiler nehirlerle ve göllere boşaltılmaları su kirliliğinin ana nedenlerinden biridir. Bu durum ise ekosistemleri ve insan sağlığını tehdit eden büyük bir küresel sorundur. Atıksulardan bu tarz kirleticilerin uzaklaştırılması çevre kirliliğinin önlenmesi için önemli bir adımdır. Günümüzde en yaygın kullanılan renk giderme yöntemleri arasında adsorpsiyon, filtrasyon ve oksidasyon bulunmaktadır. Ancak bu geleneksel renk giderme yöntemlerinin yüksek maliyet, yüksek enerji tüketimi, uzun işlem süreleri ve düşük verim gibi çeşitli dezavantajları vardır. Atık suyun enzimatik olarak arıtılması da kirletici iyileştirme için umut verici bir stratejidir. Bununla birlikte, serbest enzimler pahalı olduğu ve tekrar kullanılamadığı için enzimatik arıtma yöntemleri de bazı zorluklarla karşı karşıyadır. Son zamanlarda, kirleticileri arıtmak için enzimlerin immobilizasyonu önemli bir araştırma odağı olmuştur ve MEi-hNC'lerin kullanımı en etkili immobilizasyon stratejilerinden biridir.

Yapılan bir çalışmada, Zhang ve arkadaşları (2018), manyetik protein-inorganik hibrit nano çiçeklerin sentezi için oldukça basit ve hızlı bir sentez yöntemi rapor etmişlerdir. Zhang ve arkadaşları (2018) rapor ettikleri bu çalışmada, BSA,  $Zn^{2+}$  iyonları ve  $Fe_3O_4$  MNP'leri kullanarak fosfat BSA/ $Zn_3(PO_4)_2/Fe_3O_4$  hNÇ'leri sentezlemişlerdir. Araştırmacılar sentezledikleri BSA/ $Zn_3(PO_4)_2/Fe_3O_4$  hNÇ'leri sulardan  $Cu^{2+}$  iyonlarının uzaklaştırılması amacı ile kullanmışlardır (Zhang vd. 2018).

Lakkaz, çevresel kirleticilerin (fenoller, organik boyalar vb) parçalanması için yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Fu ve arkadaşları (2019) hiyerarşik olarak yapılandırılmış manyetik lakkaz@ $Cu_3(PO_4)_2$  hNÇ'leri başarıyla sentezlediklerini ve bisfenol giderimi amacıyla kullanılabilirliğini araştırdıklarını rapor etmişlerdir (Fu vd. 2019). Araştırmacılar sentezledikleri manyetik lakkaz@ $Cu_3(PO_4)_2$  hNÇ'lerin ortalama 15  $\mu m$  çapında küresel, gözenekli ve hiyerarşik bir yapıya sahip olduğunu ve ABTS varlığında oda sıcaklığı altında BPA bozunması üzerinde mükemmel katalitik aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir (Fu vd. 2019).

Han ve arkadaşları (2019) tarafından rapor edilen bir çalışmada organik bileşen olarak yaban turpu peroksidaz (Horse radish peroksidaz: HRP) enzimini ve inorganik bileşen olarak  $Cu^{2+}$  iyonları ve  $Fe_3O_4$  MNP'lerden oluşan hiyerarşik hNÇ'ler ( $Fe_3O_4@PMG-IDA-Cu^{2+}$ ) sentezlemişlerdir. Araştırmacılar daha sonra sentezledikleri bu  $Fe_3O_4@PMG-IDA-Cu^{2+}$  hNÇ'leri bisfenol A gideriminde kullanılabilirliğini araştırmışlardır (Han vd. 2019).

Sun ve arkadaşları (2020), MNP'ler,  $Cu(II)$  iyonları ve lakkaz enzimi kullanarak manyetik lakkaz hNÇ'leri sentezlediklerini rapor etmişlerdir. Sentezledikleri manyetik lakkaz hNÇ'lerin SEM ile yapılan karakterizasyon çalışmalarında  $\sim 10 \mu m$  çapında küresel, gözenekli ve çiçek benzeri kristaller olduğunu ve  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküllerin hibrit lakkaz nanoçiçeklerin içinde eşit şekilde kapsüllendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca sentezledikleri manyetik lakkaz hNÇ'lerin enzimatik aktivitesi ve yeniden kullanılabilirliği ve malahit yeşilinin giderimi amacı ile kullanılabilirliğini araştırmışlardır (Sun vd. 2020).

Mohammad ve arkadaşları (2020), manyetik polidopamin (PDA),  $Cu(II)$  ve  $Fe_3O_4$  kullanarak manyetik PDA-Cu nanoçiçekleri sentezlemişler ve karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar PDA-Cu nanoçiçekleri,  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$  çekirdek/kabuk

nanopartiküllerin sırasıyla organik ve inorganik kısımlar olarak midyeden ilham alan polidopamin ve bakır fosfata dahil edilmesi yoluyla birleştirdiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca sentezledikleri bu manyetik hibrit nanoçiçeklerin organik boyaların indirgenmesi amacı ile kullanılabilirliklerini araştırmışlardır (Mohammad vd. 2020).

Alhayali ve arkadaşları (2021), nitroanilin ve metil kırmızısı boyanın katalitik indirgenmesi için iyi sonuçlar gösteren manyetik katalaz@Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hNÇ'leri sentezlemişlerdir (Alhayali vd. 2021).

### **3.4.2. Manyetik Enzim-İnorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) Biyosensör Uygulamaları**

Günümüzde klinik teşhisle ilgili analitlerin doğru ve hızlı ölçümüne yönelik artan bir talep vardır. Enzim bazlı biyosensörler, renk değişikliklerine dayalı olarak çeşitli analitleri çıplak gözle tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu biyosensörler kolay kullanımları, yüksek seçicilikleri ve hassasiyetleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Ancak enzim bazlı biyosensörlerin, çalışma koşulları ve kararlılıkları ile ilgili hala çözülememiş sorunları vardır. Bu nedenle erişilebilir, dayanıklı ve hassas izlemeyi mümkün kılmak için yüksek verimli biyosensörlerin geliştirilmesi hâlâ zorunludur. Hibrit manyetik biyokatalizörlerle entegre edilmiş biyo-tabanlı sensörlerin geliştirilmesine yönelik çok sayıda çalışma rapor edilmiştir.

Bir çalışmada, Wang ve arkadaşları (2018), hemin inkorpore edilmiş yeni çok işlevli peroksidaz benzeri aktivite gösteren hibrit nanoçiçekleri sentezlediklerini ve elde edilen hibrit malzemelerin, gıda kaynaklı patojenik bakterilerin sandviç tipi kolorimetrik tespiti için ideal olduğunu rapor etmişlerdir (Wang vd. 2018).

Cheon ve arkadaşları (2019), yaptıkları bir çalışmada önce Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNP'leri sentezlemişler, daha sonra MNP'leri amino grubu ile fonksiyonelleşmişler ve daha sonra glikoz oksidaz (GOD) immobilizasyonu yaptıklarını rapor etmişlerdir. GOD immobilize edilmiş MNP'ler ve Cu(II) iyonlarını kullanarak MNP gömülü GOD-bakır hNÇ'ler sentezlemişler ve glikoz tayininde kullanılabilirliğini araştırmışlardır (Cheon vd. 2019).

Guo ve arkadaşları (2019), glikoz oksidaz-demir fosfat hibrit nanoçiçekler (GOD-Fe<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O hNÇ'ler) sentezlemişler ve sentezlenen bu çiçek benzeri morfolojiye

sahip yapıların mükemmel katalitik aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir (Guo vd. 2019).

Manyetik enzim-inorganik hibrit nanoçiçekler (MEi-hNÇ'ler), klinik açıdan önemli hedef moleküllerin hızlı, sağlam ve uygun şekilde tespit edilmesine atfedilebilen biyosensörlerin geliştirilmesi için büyük bir alan açmıştır. Bu biyosensörler tek kullanımlıdır, taşınabilir, kullanımı kolaydır ve analitleri tespit etmek için daha az zaman gerektirir.

### 3.4.3. Manyetik Enzim-Inorganik Hibrit Nanoçiçeklerin (MEi-hNÇ'lerin) Biyokataliz Uygulamaları

Biyokatalizörler yüksek katalitik verimlilikleri, biyoyumlu reaksiyon sistemleri ve seçicilikleri nedeniyle büyüleyici, sofistike biyomoleküllerdir. Manyetik hibrit nano çiçekler, protein yapısındaki amino asitin MNP'ler ile koordinasyon bağları oluşturması ile sentezlenebilmektedir. Yapıya dahil edilen MNP'ler sayesinde hNÇ'lerin kararlılıkları artmakta ve çok katmanlı çiçek benzeri yapıları sayesinde katalitik verimlilikleride artmaktadır.

Lipaz, çeşitli biyotransformasyon süreçlerinde en çok araştırılan endüstriyel enzimlerden biridir. Rapor edilen bir çalışmada, Ren ve arkadaşları (2019) lipaz enzimi,  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları ve MNP'leri kullanarak birlikte çökeltme yöntemi ile manyetik bir alan sayesinde reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilen manyetik lipaz- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  hNÇ'ler sentezlemişlerdir. Araştırmacılar sentezledikleri bu manyetik lipaz- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  hNÇ'lerin bir dış manyetik alan altında reaksiyon sisteminden kolaylıkla ayrılabilmesini rapor etmişlerdir. Rapor ettikleri çalışmada önce manyetik nanopartiküller sentezlenmiş,  $-\text{NH}_2$  grubu ile fonksiyonelleştirilmiş ve daha sonra lipaz immobilizasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar sentezledikleri manyetik lipaz- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  hNÇ'lerin serbest lipazla karşılaştırıldığında, manyetik lipaz- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  hNÇ'lerin daha yüksek enzimatik aktivite ve daha iyi termal ve pH stabilitesi sergilediğini bildirmişlerdir (Ren vd. 2019).

Bir başka çalışmada, *Pseudozyma Antarctica Lipase B*, inorganik bir bileşen olarak iki değerlikli bakır ve mangan ve MNP'ler kullanılarak hibrit manyetik hibrit nanoçiçeklerde immobilize edildiği rapor edilmiştir (Fatiadou vd. 2019). Araştırmacılar MNP'lerin çevresinde dikkat çekici çiçek yapısının oluşmasına hem  $\text{Cu(II)}$  hem de  $\text{Mn(II)}$



iyonlarının yardımcı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bakır bazlı manyetik hibrit nanoçiçekte gözlemlenen spesifik aktivitenin, mangan bazlı hibrit nanoçiçekle (96,7 U/g) karşılaştırıldığında çok daha az (8,3 U/g) bulunduğu rapor edilmiştir.

Feng ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada papain, Cu(II) iyonları ve MNP'ler kullanarak manyetik papain-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O hNÇ'leri sentezlemek için basit bir yöntem oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Sentezlenen manyetik papain-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O hNÇ'lerin serbest alkalın papainden %1556 daha yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Feng vd. 2020).

Costa ve arkadaşları (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, enzim konfigürasyonunun hNÇ üretimi üzerindeki etkisini anlamak için farklı kaynaklardan elde edilen lipaz enzimi immobilize edildiği rapor edilmiştir. Costa ve ekibi, *Candida antarctica* tip B (CALB) ve *Thermomyces lanuginosus* (TLL) gibi iki farklı kaynaktan elde edilen lipazları immobilize etmek için manyetik hibrit nanoçiçekler tasarlamışlardır. Lipaz immobilizasyonunun, bakır klorür ve sülfat tuzları kullanılarak 3 gün inkubasyon ile gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre, MNP'lerin nanoçiçeklere eklenmesinin, yalnızca nanoçiçeklere daha iyi yeniden kullanılabilirlik sağlamadığını aynı zamanda MNP'lerin eklenmesinin hibrit nanoçiçek yapısını daha sağlam ve kararlı hale getirdiğini ve dolayısıyla performansını arttırdığını rapor etmişlerdir (Costa vd. 2023).

Özetle, rapor edilen çalışmalarda, özel olarak tasarlanmış hibrit manyetik nanoçiçek bazlı biyokatalizör, katalitik süreçte gelişmiş aktivite, dikkate değer kararlılık ve artırılmış geri dönüştürülebilirlik göstermiştir. Bir enzimin metal iyonlarıyla uyumluluğu ve sentez koşulları (pH, sıcaklık ve inkubasyon süresi gibi), enzim içeren manyetik nanoçiçeklerin konfigürasyonunda ve katalitik verimliliğinde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, organik/inorganik kısımların artırılmasının rolü araştırılabilir ve enzim katalizi için oldukça gelişmiş bir platform elde etmek için derinlemesine bir anlayışın geliştirilmesi gerekmektedir.

## 4. BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

#### 4.1.Tartışma-Sonuç ve Öneriler

Yüzyılı aşkın bir süredir enzimler çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılarak immobilize edilmektedir. Özellikle enzimleri içeren manyetik nanosistemler, biyoteknoloji araştırmalarının en hızlı büyüyen alanlarından biridir. MNP'ler geniş yüzey alanı, geniş yüzey/ hacim oranı, yüksek kütle aktarımı, düşük toksisite, yüzeyinin fonksiyonel hale getirilebilmesi ve böylece enzim immobilizasyonu için daha uygun hale getirilebilmesi gibi istisnai özellikleri sayesinde çok yönlü taşıyıcılar ve immobilizasyon araçları (matrisler) olarak özel bir yer kazanmıştır. Daha da önemlisi, immobilize enzimin harici bir manyetik alan uygulanarak kolayca ayrılabilir ve geri kazanılabilir olması MNP'leri çok önemli bir noktaya taşımaktadır (Bilal vd. 2018; Vaghari vd. 2016). Uygulamalarda kazandırdıkları avantajlar ve sağladıkları üstün özellikler sebebiyle son yıllarda çeşitli alanlarda kullanımı oldukça popülerdir. MNP'ler sadece akademik açıdan değil ilaç salınımı çalışmalarında, protein/nükleik asit saflaştırma işlemlerinde, medikal uygulamalarda da kullanılmaktadırlar (Fan vd. 2019; Fu vd. 2019; Han vd. 2019; Lee vd. 2019; Lomnicki ve Dellinger, 2003; Neuberger vd. 2005; Zayat vd. 2003).

MNP'lerin en güncel kullanım şekli manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler) şeklindeki kullanımlarıdır. O nedenle tez kapsamında öncelikle enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (Ei-hNÇ'ler) daha sonra ise manyetik enzim-inorganik hibrit nano çiçekler (MEi-hNÇ'ler) hakkında bilgi verildi.

Bu tez kapsamında,

- Öncelikle enzimler ve geleneksel enzim immobilizasyon yöntemlerinden bahsedildi.

- Manyetik nanoparçacıklardan (MNP'lerden) bahsedildi.
- Daha sonra yeni bir enzim immobilizasyon yöntemi olarak “Enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin” (Ei-hNÇ'lerin) sentez ve oluşum mekanizmaları tartışıldı.
- “Manyetik enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin” (MEi-hNÇ'lerin) sentez ve oluşum mekanizmaları tartışıldı.
- MEi-hNÇ sentezi amacı ile uygulanan iki farklı yöntem tartışıldı.
- MEi-hNÇ'lerin karakterizasyonu amacı ile kullanılan tekniklerden bahsedildi.
- MEi-hNÇ'lerin endüstriyel biyokataliz, çevresel biyoremediasyon ve biyosensör uygulamaları ayrıntılı olarak anlatıldı.
- Son olarak, oldukça verimli ve çok işlevli ME-ihNÇ bazlı biyokatalizörlerin daha da geliştirilmesi için kalan zorluklar ve beklentiler sunuldu.

Özellikle ME-ihNÇ'lerin multidisipliner olarak farklı alanlarda kullanılabilir olması, nanoteknolojinin rolünü arttırmaktadır. Klasik farmasötik kimya ve biyoteknolojinin kullandığı ve biyomateryallerin kullanıldığı yerlerde geçerli olan testlerin Ei-hNÇ'ler ve ME-ihNÇ'ler aracılığı ile gerçekleştirilebileceğine dair yeni çalışmalar yapılmaktadır. Bu şekilde Ei-hNÇ'ler ve ME-ihNÇ'ler bağlamında geçerli olan testlerin sadece o uygulamalar için standardize edilmesi planlanmaktadır. Nanosensör özelliğe sahip Ei-hNÇ'ler ve ME-ihNÇ'ler, insan vücudundaki hastalıkları önceden tespit edilmesinde kullanılabilecek olması halinde erken tedavi imkânı oluşturulabilecektir.

Ancak rapor edilen çalışmalarda, kullanılan sentez yöntemlerinin nispeten yeni olması nedeniyle ME-ihNÇ'leri oluşturan biyomolekül-metal fosfat hibrit yapıların etki mekanizması net olarak belirlenememiştir. Bu nedenle sentez sırasında etkili olan faktörlere ait araştırmalar devam etmektedir. Biyomoleküller, MNP'ler ve metal fosfatlar arasındaki etkileşimlerin incelenmesi sırasında, hibrit malzemelerin reaksiyona ilave edilmesinin sentezlenen ürünlerin işlevselliklerini sinerjik olarak etkileyerek artmasına neden olduğu saptanmıştır. Gelecekte yapılacak olan araştırmaların çok sayıda yeni ME-ihNÇ'lerin sentezlenmesine yönelik olacağı, bunların ise genellikle biyo-algılama, biyokataliz, enzim mimetikler gibi farklı birçok alanlar olacağı tahmin edilmektedir. Bu

alanlarda ME-ihNÇ'lerin oldukça fazla kullanım alanı bulacağı ve araştırmaların yoğunluk kazanacağı varsayılmaktadır. Dolayısıyla farklı moleküllerin ya da makromoleküller kullanılması ile sentezi gerçekleştirilecek olan ME-ihNÇ'lerin gelecekte hızla değişen teknolojik ve bilimsel uygulamalar için önemli bir ürün olarak kullanılacağı öngörülmektedir.

Manyetik olarak immobilize edilmiş enzimler, ayrılma ve yeniden kullanım kolaylığı nedeniyle ticari uygulamalar için avantajlar sunmaktadır. Gözenekli desteklerle karşılaştırıldığında, nanopartiküllerin dış difüzyon sorunları yoktur, bu da onları büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar için cazip kılar. Son zamanlarda enzimlerin MNP'lere immobilizasyonundaki ilerlemelere rağmen, bu sistemler hâlâ özelliklerindeki değişiklikler, kütle transferi sınırlamaları ve çözünmeyen substratlara karşı düşük etkinlik gibi sorunlarla karşı karşıyadır. Bu sorunları uzun vadeli endüstriyel enzim uygulamaları için ele almak amacıyla daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bu tez kapsamında sunulan MEi-hNÇ bazlı enzim immobilizasyonunun çeşitli olumlu yönlerine rağmen, bu immobilizasyon stratejilerini daha faydalı hale getirmek için çeşitli zorlukların ele alınması gerekmektedir. Bu zorluklar aşağıda sıralanmıştır.

- (i) Sentez süreci: Çoğunlukla süreç, ilk adımda manyetik nanopartiküllerin sentezini ve bir sonraki adımda işlevselleştirmeyi içermektedir. MEi-hNÇ bazlı biyokatalizörlerin sentezlenmesinde yer alan çoklu adımlar, sürecin karmaşıklığını artırmaktadır. Ayrıca boyut, aktivite ve stabilite gibi benzer özelliklere sahip enzim gömülü manyetik hibrit nanoçiçeklerin sentezi de büyük bir zorluktur. Bu sorun, mikroakışkanlara dayalı sentetik yaklaşım kullanılarak çözülebilir. Ancak bu konuda yalnızca birkaç rapor mevcut.
- (ii) Yapısal ilişkinin anlaşılması: Yeni organik-inorganik veya protein inorganik hibrit nanoçiçeklerin imalatında, kapsamlı bir mekanik nanoçiçek-enzim ilişkisi ile birlikte, karmaşık ve en son teknolojiye sahip bilimsel yöntemlerle ele alınması gereken temel engeller bulunmaktadır. Bu nedenle, biyokatalizörlerin katalitik aktivitesini tahmin etmek için moleküler düzeyde MEi-hNÇ'lerde gerçekleşen etkileşimlerin temel anlaşılması gerekmektedir.
- (iii) Enzim aktivitesinin engellenmesi: MEi-hNÇ platformu, ayrılma kolaylığı ve yüksek bir yüzey alanı sağlasa da, MNP'lerin ve diğer organik ve inorganik

bileşenlerin varlığı, enzimlerin aktif bölgelerini engelleyebilir/bloke edebilir, bu da sonuçta biyokatalizörün katalitik performansını etkileyebilir. Enzim ve inorganik bileşen ile MNP'ler arasındaki spesifik etkileşimin, ampirik rasyonel tasarım yaklaşımları veya stokastik yaklaşımlar aracılığıyla çeşitli biyoenformatik araçlarla değerlendirilmesi gerekmektedir.

- (iv) Ölçeklenebilirlik: MEi-hNÇ'ler, enzim immobilizasyonu için daha iyi bir destek olarak gelişse de, MEi-hNÇ'lere dayalı biyokatalizörün sentezinin ölçeklendirilmesi oldukça zordur. Çünkü organik ve/veya inorganik bileşenlerin (MNP'ler de dahil) enzim molekülleri ile etkileşimi hakkında yetersiz bilgi mevcuttur.
- (v) Yeniliklerin kapsamı: (a) MEi-hNÇ'lerin içsel enzim taklit etme özelliğinin, çoklu enzimatik basamaklı sistemlerle birleşmesi ile birlikte araştırılması gerekmektedir. (b) Enzim gömülü manyetik hibrit nanoçiçeklerin sağlamlığı, hibrit nanoçiçeklere üstün fonksiyonel özellikler kazandırmak için farklı çapraz bağlama maddeleri ve kaplama maddeleri kullanılarak daha da geliştirilebilir. (c) Çok yönlülüğünü ve uygulanabilirliğini arttırmak için nanoçiçek oluşumunda iki değerlikli metal iyonlarının ve demir esaslı manyetik nanopartiküllerin kullanımının ötesine geçmek gerekir. (d) Endüstriyel biyokataliz uygulamaları için yararlı olabilecek hibrit nanoçiçeklerin üretimi için farklı organik ortamlar veya derin ötektik çözücüler araştırılmalıdır.

MEi-hNÇ'lerin özelliklerinin araştırılmasında, karakteristikleri ve uygulamaları açısından kapsamlı ilerleme kaydedilmiştir. MEi-hNÇ bazlı nano-mühendislik malzemesi, enzimlere yapısal kararlılık sağlar ve katalitik aktivitelerini önemli dercede arttırır. MEi-hNÇ biyokatalizörlerin sentezlenmesi için örnekleriyle açıklanan farklı yaklaşımlar vardır. Bu yöntemlerden hangisinin seçileceği enzimin türüne, sentetik koşullarla uyumluluğuna ve uygulamalarına bağlı olarak değişir.

Özetle, MEi-hNÇ'lerin kesinlikle gelecekteki teknolojik ve bilimsel uygulamalarda önemli bir rolü olacaktır. Manyetik hibrit nanoçiçekler biçiminde daha kararlı, daha kolay geri kazanılabilir ve yeniden kullanılabilir endüstriyel biyokatalizörlerin hazırlanması, gelecekteki kapsamlı araştırmaların özünü oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

- Alhayali, N. I., Özpozan, N. K., Dayan, S., Özdemir, N., & Yılmaz, B. S. 2021. Catalase/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ Cu<sup>2+</sup> hybrid biocatalytic nanoflowers fabrication and efficiency in the reduction of organic pollutants. **Polyhedron**, **194**: 114888-114901.
- Al-Maqdi, K. A., Bilal, M., Alzamly, A., Iqbal, H. M., Shah, I., & Ashraf, S. S. 2021. Enzyme-loaded flower-shaped nanomaterials: a versatile platform with biosensing, biocatalytic, and environmental promise. **Nanomaterials**, **11**(6): 1460-1471.
- Altinkaynak, C., Gulmez, C., Atakisi, O., & Özdemir, N. 2020. Evaluation of organic-inorganic hybrid nanoflower's enzymatic activity in the presence of different metal ions and organic solvents. **International Journal of Biological Macromolecules**, **164**: 162-171.
- Altinkaynak, C., Kocazorbaz, E., Özdemir, N., & Zihnioglu, F. (2018). Egg white hybrid nanoflower (EW-hNF) with biomimetic polyphenol oxidase reactivity: synthesis, characterization and potential use in decolorization of synthetic dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, **109**: 205-211.
- Altinkaynak, C., Tavlasoglu, S., Kalin, R., Sadeghian, N., Ozdemir, H., Ocsoy, I., & Özdemir, N. (2017). A hierarchical assembly of flower-like hybrid Turkish black radish peroxidase-Cu<sup>2+</sup> nanobiocatalyst and its effective use in dye decolorization. **Chemosphere**, **182**: 122-128.
- Altinkaynak, C., Yilmaz, I., Koksall, Z., Özdemir, H., Ocsoy, I., & Özdemir, N. 2016. Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, **84**: 402-409.
- Ansari, S. A., & Husain, Q. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, **30**(3): 512-523.
- Ashtari, K., Khajeh, K., Fasihi, J., Ashtari, P., Ramazani, A., & Vali, H. 2012. Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: enzyme immobilization and cytotoxic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, **50**(4): 1063-1069.

- Aydemir, D., Gecili, F., Özdemir, N., & Ulusu, N. N. 2020. Synthesis and characterization of a triple enzyme-inorganic hybrid nanoflower (TrpE@ ihNF) as a combination of three pancreatic digestive enzymes amylase, protease and lipase. **Journal of bioscience and bioengineering**, **129**(6): 679-686.
- Badoei-Dalfard, A., Monemi, F., & Hassanshahian, M. 2022. One-pot synthesis and biochemical characterization of a magnetic collagenase nanoflower and evaluation of its biotechnological applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **211**: 112302.
- Baig, R. N., & Varma, R. S. 2013. Magnetically retrievable catalysts for organic synthesis. **Chemical Communications**, **49**(8): 752-770.
- Basivi, P. K., Ramesh, S., Kakani, V., Yadav, H. M., Bathula, C., Afsar, N., ... & Lee, H. 2021. Ultrasonication-mediated nitrogen-doped multiwalled carbon nanotubes involving carboxy methylcellulose composite for solid-state supercapacitor applications. **Scientific Reports**, **11**(1): 9918.
- Basso, A., & Serban, S. 2019. Industrial applications of immobilized enzymes-A review. **Molecular Catalysis**, **479**: 110607.
- Bickerstaff, G. F. 1997. Immobilization of enzymes and cells: some practical considerations (pp. 1-11). Humana press.
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. 2019. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. **Environment international**, **124**: 336-353.
- Bilal, M., Zhao, Y., Rasheed, T., & Iqbal, H. M. 2018. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, **120**: 2530-2544.
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. 2013. Immobilization of enzymes: a literature survey. **Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition**, **1051**: 15-31.
- Chakraborty, A., Ruzimuradov, O., Gupta, R. K., Cho, J., & Prakash, J. 2022. TiO<sub>2</sub> nanoflower photocatalysts: Synthesis, modifications and applications in wastewater treatment for removal of emerging organic pollutants. **Environmental Research**, **212**: 113550.

- Chen, J., Guo, Z., Xin, Y., Gu, Z., Zhang, L., & Guo, X. 2023. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: a comprehensive review of current trends, advances, and future perspectives. **Coordination Chemistry Reviews**, **489**: 215191.
- Chen, T., Yang, W., Guo, Y., Yuan, R., Xu, L., & Yan, Y. 2014. Enhancing catalytic performance of  $\beta$ -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, **63**: 50-57.
- Chen, X., An, N., Zeng, M., & Yuan, J. 2021. Host–guest complexation modulated aqueous polymerization-induced self-assembly for monodisperse hierarchical nanoflowers. **Chemical Communications**, **57**(100): 13720-13723.
- Chen, Y. Z., Ching, C. B., & Xu, R. 2009. Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effects of modifiers. **Process Biochemistry**, **44**(11): 1245-1251.
- Cheon, H. J., Adhikari, M. D., Chung, M., Tran, T. D., Kim, J., & Kim, M. I. 2019. Magnetic nanoparticles-embedded enzyme-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced peroxidase-like activity and substrate channeling for glucose biosensing. **Advanced Healthcare Materials**, **8**(9): 1801507.
- Cui, J., & Jia, S. 2017. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: A novel host platform for immobilizing biomolecules. **Coordination Chemistry Reviews**, **352**: 249-263.
- da Costa, F. P., Cipolatti, E. P., Furigo Junior, A., & Oliveira Henriques, R. 2022. Nanoflowers: A new approach of enzyme immobilization. **The Chemical Record**, **22**(4): e202100293.
- Ding, C., Sun, H., Ren, J., & Qu, X. 2017. Immobilization of enzyme on chiral polyelectrolyte surface. **Analytica Chimica Acta**, **952**: 88-95.
- Dube, S., & Rawtani, D. 2021. Understanding intricacies of bioinspired organic-inorganic hybrid nanoflowers: a quest to achieve enhanced biomolecules immobilization for biocatalytic, biosensing and bioremediation applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, **295**: 102484.
- Feng, N., Zhang, H., Li, Y., Liu, Y., Xu, L., Wang, Y., ... & Tian, J. 2020. A novel catalytic material for hydrolyzing cow's milk allergenic proteins: Papain-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O-magnetic nanoflowers. **Food Chemistry**, **311**: 125911.
- Fritzen-Garcia, M. B., Monteiro, F. F., Cristofolini, T., Acuña, J. J. S., Zanetti-Ramos, B. G., Oliveira, I. R. W., ... & Creczynski-Pasa, T. B. 2013. Characterization of



- horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **182**: 264-272.
- Fu, M., Xing, J., & Ge, Z. 2019. Preparation of laccase-loaded magnetic nanoflowers and their recycling for efficient degradation of bisphenol A. **Science of The Total Environment**, **651**: 2857-2865.
- Galvão, W. S., Pinheiro, B. B., Golçalves, L. R. B., De Mattos, M. C., Fonseca, T. S., Regis, T., ... & Fachine, P. B. A. 2018. Novel nanohybrid biocatalyst: application in the kinetic resolution of secondary alcohols. **Journal of Materials Science**, **53**(20): 14121-14137.
- Garg, R., Gupta, R., Singh, N., & Bansal, A. 2021. Characterization and performance evaluation of synthesized ZnO nanoflowers, nanorods, and their hybrid nanocomposites with graphene oxide for degradation of Orange G. **Environmental Science and Pollution Research**, **28**(40): 57009-57029.
- Ge, J., Lei, J., & Zare, R. N. 2012. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. **Nature nanotechnology**, **7**(7): 428-432.
- Govan, J., & Gun'ko, Y. K. 2014. Recent advances in the application of magnetic nanoparticles as a support for homogeneous catalysts. **Nanomaterials**, **4**(2): 222-241.
- Gul, O. T., & Ocsoy, I. 2021. Co-Enzymes based nanoflowers incorporated-magnetic carbon nanotubes: A new generation nanocatalyst for superior removal of cationic and anionic dyes with great repeated use. **Environmental Technology & Innovation**, **24**: 101992.
- Guo, J., Wang, Y., & Zhao, M. 2019. A self-activated nanobiocatalytic cascade system based on an enzyme-inorganic hybrid nanoflower for colorimetric and visual detection of glucose in human serum. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **284**: 45-54.
- Han, J., Luo, P., Wang, L., Li, C., Mao, Y., & Wang, Y. 2019. Construction of magnetic nanoflower biocatalytic system with enhanced enzymatic performance by biomineralization and its application for bisphenol A removal. **Journal of Hazardous Materials**, **380**: 120901.
- Han, J., Luo, P., Wang, L., Wu, J., Li, C., & Wang, Y. 2020. Construction of a

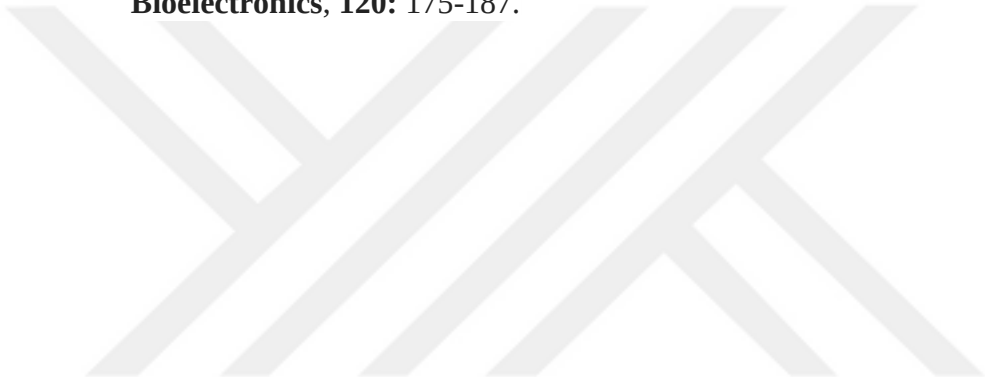
- multienzymatic cascade reaction system of coimmobilized hybrid nanoflowers for efficient conversion of starch into gluconic acid. **ACS applied materials & interfaces**, **12**(13) : 15023-15033.
- Hola, K., Markova, Z., Zoppellaro, G., Tucek, J., & Zboril, R. 2015. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. **Biotechnology advances**, **33**(6): 1162-1176.
- Hwang, E. T., & Gu, M. B. 2013. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, **13**(1): 49-61.
- Jafari-Nodoushan, H., Mojtavavi, S., Faramarzi, M. A., & Samadi, N. 2022. Organic-inorganic hybrid nanoflowers: The known, the unknown, and the future. **Advances in Colloid and Interface Science**, **309**: 102780.
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical engineering science**, **61**(3): 1017-1026.
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., & Wandrey, C. 1996. Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. **Biotechnology and bioengineering**, **52**(2): 309-319.
- Kumar, B., Smita, K., Borovskikh, P., Shchegolkov, A., Debut, A., & Cumbal, L. 2021. Spectroscopic and morphological characterization of Nephelium lappaceum peel extract synthesized gold nanoflowers and its catalytic activity. **Inorganic Chemistry Communications**, **133**: 108868.
- Lee, I., Cheon, H. J., Adhikari, M. D., Tran, T. D., Yeon, K. M., Kim, M. I., & Kim, J. 2020. Glucose oxidase-copper hybrid nanoflowers embedded with magnetic nanoparticles as an effective antibacterial agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, **155**: 1520-1531.
- Lee, I., Cheon, H. J., Adhikari, M. D., Tran, T. D., Yeon, K. M., Kim, M. I., & Kim, J. 2020. Glucose oxidase-copper hybrid nanoflowers embedded with magnetic nanoparticles as an effective antibacterial agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, **155**: 1520-1531.
- Lei, Z., Gao, C., Chen, L., He, Y., Ma, W., & Lin, Z. 2018. Recent advances in biomolecule immobilization based on self-assembly: organic–inorganic hybrid

- nanoflowers and metal–organic frameworks as novel substrates. **Journal of Materials Chemistry B**, **6**(11): 1581-1594.
- Li, F., Oliva-Ramírez, M., Wang, D., & Schaaf, P. 2021. Formation and evolution of Au-SiO<sub>x</sub> heterostructures: from nanoflowers to nanosprouts. **Materials & Design**, **209**: 109956.
- Li, Y., Wu, H., & Su, Z. 2020. Enzyme-based hybrid nanoflowers with high performances for biocatalytic, biomedical, and environmental applications. **Coordination Chemistry Reviews**, **416**: 213342.
- Lin, Z., Xiao, Y., Yin, Y., Hu, W., Liu, W., & Yang, H. 2014. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol. **ACS applied materials & interfaces**, **6**(13): 10775-10782.
- Ma, Q., Liao, J., Tian, T., Zhang, Q., & Cai, X. 2017. A potential flower-like coating consisting of calcium-phosphate nanosheets on titanium surface. **Chinese Chemical Letters**, **28**(9): 1893-1896.
- Malmiri, H. J., Jahanian, M. A. G., & Berenjian, A. 2012. Potential applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. **Am. J. Biochem. Biotechnol**, **8**(4): 203-219.
- Mehata, M. S. 2022. Surface plasmon resonance allied applications of silver nanoflowers synthesized from Breynia vitis-idaea leaf extract. **Dalton Transactions**, **51**(7): 2726-2736.
- Mohamed, S. A., Al-Malki, A. L., Kumosani, T. A., & El-Shishtawy, R. M. 2013. Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results. **International journal of biological macromolecules**, **60**: 295-300.
- Nadar, S. S., & Rathod, V. K. 2018. Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): A novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications. **International journal of biological macromolecules**, **120**: 2293-2302.
- Nadar, S. S., Gawas, S. D., & Rathod, V. K. 2016. Self-assembled organic-inorganic hybrid glucoamylase nanoflowers with enhanced activity and stability. **International journal of biological macromolecules**, **92**: 660-669.

- Nadar, S. S., Patil, P. D., & Rohra, N. M. 2020. Magnetic nanobiocatalyst for extraction of bioactive ingredients: A novel approach. **Trends in Food Science & Technology**, **103**: 225-238.
- Negrón, L. M., Díaz, T. L., Ortiz-Quiles, E. O., Dieppa-Matos, D., Madera-Soto, B., & Rivera, J. M. 2016. Organic nanoflowers from a wide variety of molecules templated by a hierarchical supramolecular scaffold. **Langmuir**, **32**(10): 2283-2290.
- Netto, C. G., Toma, H. E., & Andrade, L. H. 2013. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **85**: 71-92.
- Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & Von Rechenberg, B. 2005. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, **293**(1): 483-496.
- Nisha, S., Karthick, S. A., & Gobi, N. 2012. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, **1**(3): 148-155.
- Noma, S. A. A., Yılmaz, B. S., Ulu, A., Özdemir, N., & Ateş, B. 2021. Development of L-asparaginase@ hybrid nanoflowers (ASNase@ HNFs) reactor system with enhanced enzymatic reusability and stability. **Catalysis Letters**, **151**: 1191-1201.
- Özdemir, N., Altinkaynak, C., Türk, M., Geçili, F., & Tavlaşoğlu, S. 2022. Amino acid-metal phosphate hybrid nanoflowers (AaHNFs): their preparation, characterization and anti-oxidant capacities. **Polymer Bulletin**, **79**: 9697–9716.
- Pallavolu, M. R., Nallapureddy, J., Nallapureddy, R. R., Neelima, G., Yedluri, A. K., Mandal, T. K., ... & Joo, S. W. 2021. Self-assembled and highly faceted growth of Mo and V doped ZnO nanoflowers for high-performance supercapacitors. **Journal of Alloys and Compounds**, **886**: 161234.
- Patel, S. K., Choi, H., & Lee, J. K. 2019. Multimetal-based inorganic–protein hybrid system for enzyme immobilization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, **7**(16): 13633-13638.

- Ren, S., Li, C., Jiao, X., Jia, S., Jiang, Y., Bilal, M., & Cui, J. 2019. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. **Chemical Engineering Journal**, **373**: 1254-1278.
- Ren, W., Li, Y., Wang, J., Li, L., Xu, L., Wu, Y., ... & Tian, J. 2019. Synthesis of magnetic nanoflower immobilized lipase and its continuous catalytic application. **New Journal of Chemistry**, **43**(28): 11082-11090.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical society reviews**, **42**(15): 6223-6235.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical society reviews**, **42**(15): 6223-6235.
- Shende, P., Kasture, P., & Gaud, R. S. 2018. Nanoflowers: The future trend of nanotechnology for multi-applications. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, **46**(1): 413-422.
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., & Lee, J. K. 2013. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **International journal of molecular sciences**, **14**(1): 1232-1277.
- Somturk, B., Hancer, M., Ocsoy, I., & Özdemir, N. 2015. Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. **Dalton Transactions**, **44**(31): 13845-13852.
- Song, F., Sun, H., Ma, H., & Gao, H. 2022. Porous TiO<sub>2</sub>/carbon dot nanoflowers with enhanced surface areas for improving photocatalytic activity. **Nanomaterials**, **12**(15): 2536-2251.
- Sun, T., Fu, M., Xing, J., & Ge, Z. 2020. Magnetic nanoparticles encapsulated laccase nanoflowers: evaluation of enzymatic activity and reusability for degradation of malachite green. **Water Science and Technology**, **81**(1): 29-39.
- Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., & Nasiri, S. 2016. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, **38**: 223-233.
- Vatta, L. L., Sanderson, R. D., & Koch, K. R. 2006. Magnetic nanoparticles: Properties and potential applications. **Pure and Applied Chemistry**, **78**(9): 1793-1801.

- Wang, C., Tan, R., & Wang, Q. 2018. One-step synthesized flower-like materials used for sensitively detecting amyloid precursor protein. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **410**: 6901-6909.
- Wang, L. B., Wang, Y. C., He, R., Zhuang, A., Wang, X., Zeng, J., & Hou, J. G. 2013. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. **Journal of the American Chemical Society**, **135**(4): 1272-1275.
- Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., & Sun, M. 2014. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. **Molecules**, **19**(8): 11465-11486.
- Yang, Z., Wang, C., & Lu, X. 2018. Conducting polymer-based peroxidase mimics: synthesis, synergistic enhanced properties and applications. **Sci. China Mater**, **61**(5): 653-670.
- Yilmaz, E., Ocsoy, I., Ozdemir, N., & Soylak, M. 2016. Bovine serum albumin-Cu (II) hybrid nanoflowers: An effective adsorbent for solid phase extraction and slurry sampling flame atomic absorption spectrometric analysis of cadmium and lead in water, hair, food and cigarette samples. **Analytica Chimica Acta**, **906**: 110-117.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, **8**(2): 92-103.
- Zhang, B., Chen, J., Wang, J., Huyan, Y., Zhang, H., & Zhang, Q. 2018. Flowerlike BSA/Zn<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic hybrid particles: preparation and application to adsorption of copper ions. **Journal of Chemical & Engineering Data**, **63**(10): 3913-3922.
- Zhang, C. Y., Zhang, H., & Yang, F. Q. 2021. Enhanced peroxidase-like activity of copper phosphate modified by hydrophilic phytic-acid and its application in colorimetric detection of hydrogen peroxide. **Microchemical Journal**, **168**: 106489.
- Zhang, M., Zhang, Y., Yang, C., Ma, C., & Tang, J. 2021. Enzyme-inorganic hybrid nanoflowers: Classification, synthesis, functionalization and potential applications. **Chemical Engineering Journal**, **415**: 129075.

- Zhao, M., Rong, J., Han, J., Zhou, Y., Li, C., Wang, L., ... & Wang, Y. 2019. Novel synthesis strategy for biocatalyst: Fast purification and immobilization of His-and ELP-tagged enzyme from fermentation broth. **ACS Applied Materials & Interfaces**, **11**(35): 31878-31888.
- Zhou, Y., Pan, S., Wei, X., Wang, L., & Liu, Y. 2013. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase onto Magnetic Nanoparticles and Evaluation of the Enzymatic Properties. **BioResources**, **8**(2): 2605-2619.
- Zhu, J., Wen, M., Wen, W., Du, D., Zhang, X., Wang, S., & Lin, Y. 2018. Recent progress in biosensors based on organic-inorganic hybrid nanoflowers. **Biosensors and Bioelectronics**, **120**: 175-187.
- 

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı:** Morteza ROUEINTAN

**Uyruğu:** IRAN

**Doğum Tarihi ve Yeri:**

**Medeni Durum:**

**e-mail:**

**Yazışma Adresi:**

### EĞİTİM

| Derece | Kurum                   | Mezuniyet Tarihi |
|--------|-------------------------|------------------|
| Lisans | Urumiye üniversite iran | 2004             |
| Lise   | Emirkebir Lisesi IRAN   | 2001             |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl       | Kurum                 | Görev    |
|-----------|-----------------------|----------|
| 2004-2016 | Eğitim Bakanlığı IRAN | Öğretmen |
| 2014-2023 |                       |          |

### YABANCI DİL

İngilizce