

**METAL ORGANİK KAFES YAPILARININ DİOL İÇEREN
BİYOMOLEKÜL TAYİNİ VE İZOLASYONU İÇİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE USABILITY OF METAL
ORGANIC FRAMEWORKS STRUCTURES FOR
DETECTION AND ISOLATION OF DIOL CONTAINING
BIOMOLECULE**

SEHER PARLAK

Doç. Dr. F. Çiğdem KİP

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

Dost'a...



ÖZET

METAL ORGANİK KAFES YAPILARININ DİYOL İÇEREN BİYOMOLEKÜL TAYİNİ VE İZOLASYONU İÇİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

Seher PARLAK

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatoş Çiğdem KİP

Ocak 2024, 59 sayfa

Metal-organik kafeslerin (MOF' ların), yüksek yüzey alanı ve modifikasyon kolaylığı gibi çok yönlü özellikleri nedeniyle proteomik uygulamalarında kullanımları, malzeme bilimi araştırmalarına önemli katkı sağlamaktadır. Afinite sorbentleri olarak, geleneksel olarak kullanılan malzemelerden daha yüksek seçicilik, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik özelliklerine sahip oldukları için glikoproteinler, sakkaritler ve nükleosidler gibi diol içeren biyomoleküllerin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Diol içeren biyomoleküllerin seviyeleri insanların fizyolojik durumunu yansıttığı ve bu nedenle hastalık teşhisinde önemli olduğu için bu biyomoleküller, fizyolojik farmakoloji alanında yapılan çalışmalarda aktif bir rol oynamaktadır. Bu nedenle diol içeren moleküller için yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip bir sorbentin tasarlanması ve geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, 4-formilfenilborik asit (FPBA) ile fonksiyonelleştirilmiş zirkonyum aminobenzendikarboksilat bazlı MOF (UiO-66-NH₂) malzeme, yeni bir boronat afinite materyali (FPBA-UiO-66-NH₂) olarak uygun pH (pH=8.5) 'ta biyomoleküllerin seçici olarak zenginleştirilmesi ve elüsyonu için kullanılmıştır. Boronik asit ve diol grubu arasındaki afinite sonucu biyomolekül olarak seçilen β -NAD için 80 mg/g'lık yüksek bir adsorpsiyon kapasitesine yüksek seçicilik ve

kullanılabilirlik ile ulaşılmıştır. Adsorbe edilen β -NAD, kantitatif desorpsiyon oranı ile nötr pH tampon ortamında kolayca izole edilmiştir.

Son birkaç yılda özellikle kolorimetrik biyoalgılama, biyolojik bilimlerde ve analitik kimyada yoğun ilgi görmektedir. Bu yöntem basitlik, hızlılık ve düşük maliyet avantajlarına sahip olmasının yanında herhangi bir karmaşık enstrümantasyona gerek duymamaktadır. Kontrol edilebilir hazırlama yöntemlerinin oluşu, değiştirilebilir yapıları, ayarlanabilir aktiviteleri ve yüksek stabiliteleri sayesinde MOF'lar mükemmel peroksidaz taklitleridir. Son yıllarda, MOF' ların biyoalgılama uygulanmalarına ilişkin çalışmalar hız kazanmıştır. Tez kapsamında, diol içeren biyomolekülün kolorimetrik tespiti için geliştirilen MOF bazlı nanozim yüksek peroksidaz katalitik aktivite sergilemiştir. Sentezlenen malzeme, renksiz o-fenilen diaminin (OPDA) sarı ürün olan oxOPDA' ya oksidasyonunu katalize etmiş ve bu değişim 416 nm'de adsorpsiyon değerinde belirgin bir değişikliğe yol açmıştır. Bu yöntem, tampon çözeltisi içerisindeki β -NAD'ın seçici tayini ve miktarının belirlenmesi için uygulanmıştır. Optimum koşullarda elde edilen kalibrasyon grafiğinin 0-0.75 mM aralığında doğrusal olduğu görülmüştür. Yöntemin tayin sınırı (LOD) 0.033 mM (S/N=10 alınarak) olarak hesaplanmıştır. Tüm sonuçlar, geliştirilen boronik asit grubu ile fonksiyonelleştirilmiş MOF malzemesinin diol içeren biyomoleküllerin izolasyonu ve tayini için umut verici bir malzeme olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Metal-organik kafes (MOF), biyomolekül, boranat afinite sorbent, peroksidaz benzeri aktivite, biyosensör.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE USABILITY OF METAL-ORGANIC FRAMEWORKS STRUCTURES FOR DETECTION AND ISOLATION OF DIOL CONTAINING BIOMOLECULE

Seher PARLAK

Master of Science, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Fatoş Çiğdem KİP

January 2024, 59 pages

The use of metal-organic frameworks (MOFs) in proteomics applications makes a significant contribution to materials science research due to their versatile properties such as high surface area and ease of modification. Since they have higher selectivity, sensitivity and reproducibility than traditionally used materials, they are used as affinity sorbents to enrich diol-containing biomolecules such as glycoproteins, saccharides and nucleosides. Since the levels of diol containing biomolecules reflect the physiological state of humans and are therefore important in disease diagnosis, these biomolecules play an active role in physiological pharmacology studies. Therefore, it is of great importance to design and develop sorbents with high adsorption capacity for diol containing biomolecules. In this study, zirconium aminobenzenedicarboxylate-based MOF (UiO-66-NH₂) material functionalized with 4-formylphenylboric acid (FPBA) as a new boronate affinity material (FPBA-UiO-66-NH₂) for selective enrichment and elution of biomolecules at appropriate pH (pH=8). As a result of the affinity between boronic acid and diol, a high adsorption capacity of 80 mg/g was achieved for β -NAD, which was selected as the biomolecules with high selectivity and reusability. The

adsorbed β -NAD was easily isolated in neutral pH buffer medium with quantitative desorption rate.

In the last few years, colorimetric biosensing has attracted considerable attention in biological sciences and analytical chemistry. This method has the advantages of speed, low-cost equipment, simplicity, low cost and does not require any complex instrumentation. MOFs are excellent peroxidase-like mimics thanks to their controllable preparation methods, tunable structures and activities and high stability. In recent years, studies on biosensing applications of MOFs have gained momentum. Within the scope of the thesis, the MOF-based nanozyme developed for the colorimetric detection of diol containing biomolecule exhibited high peroxidase catalytic activity. The synthesized material catalyzed the oxidation of colorless o-phenylene diamine (OPDA) to the yellow product (referred to as oxOPDA), and this change led to a significant change in the adsorption value at 416 nm. This method was applied for the selective determination and quantification of β -NAD in buffer solution. It was observed that the calibration graph obtained under optimum conditions was linear in the range of 0-0.75 mM. The limit of detection (LOD) of the method was calculated as 0.033 mM (taking S/N=10). All results show that the developed boronic acid group-functionalized MOF material is a promising material for the isolation and determination of diol containing biomolecules.

Keywords: Metal-organic framework (MOF), biomolecule, boronate affinity sorbent, peroxidase-like activity, biosensor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sürecinde her zaman yanımda olan, destek veren, bilgi birikiminden faydalanma olanağı bulduğum için çok şanslı olduğumu hissettiğim, bana yol gösteren kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Çiğdem Kip'e,

Çalışmalarımı kendisinin araştırma laboratuvarında yapma fırsatı sağlayan, bilgi birikimi, üstün tecrübeleri ile desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali TUNCEL'e,

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen ve tez boyunca her türlü desteği gördüğüm değerli hocalarım Arş. Gör.Duygu HACİEFENDİOĞLU'na ve Arş. Gör.Burcu GÖKÇAL KAPUCU'ya,

Bu tez kapsamında hazırlanan “Metal organik kafes yapılarının protein tayini ve izolasyonu için kullanılabilirliğinin incelenmesi” başlıklı ve FYL-2022-20046 numaralı projeye maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca yanımda olan beni bugünlere getiren babam Osman PARLAK'a, annem Dilara PARLAK'a ve kardeşim Aslı PARLAK 'a, araştırmalarımı yaparken varlıkları ile huzur bulduğum can dostlarım Mini, Gri ve Ktır' a,

En içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler ve Sınıflandırılması.....	3
2.2. Michaelis- Menten Kinetiği.....	4
2.3. Nanozimler (Enzim- Mimetik).....	6
2.4. Peroksidaz Benzeri Aktivite.....	7
2.5. Biyosensörler.....	8
2.6. Diol İçeren Biyomoleküller.....	9
2.7. Afinite Kromatografisi.....	10
2.8. Boronat Afinite Kromatografisi.....	11
2.8.1. Boronat Afinitesi Sabit Fazlar.....	12
2.8.2. Uygulamalar.....	12
2.9. Metal Organik Kafesler.....	13
2.9.1. Sentez Yöntemleri.....	13
2.9.1.1. Difüzyon Yöntemi.....	14
2.9.1.2. Hidro (solvo) Termal Yöntem.....	14
2.9.1.3. Mikrodalga Yöntemi.....	15
2.9.1.4. Elektrokimyasal Yöntem.....	15
2.9.1.5. Mekanokimyasal Yöntem.....	15
2.9.1.6. Sonokimyasal Yöntem.....	15

2.9.2. Kullanım Alanları ve Avantajları.....	16
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	17
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	17
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	18
3.3. Zirkonyum Bazlı Metal Organik Yapıların Sentezi.....	19
3.4. FPBA'nın UiO-66-NH ₂ 'a Kovalent Bağlanması.....	20
3.5. UiO-66-NH ₂ -FPBA Partiküllerin Karakterizasyonu.....	20
3.6. Diol İçeren Biyomolekül Adsorpsiyon-Desorpsiyon Deneyleri.....	22
3.7. UiO-66-NH ₂ -FPBA Partikülün Peroksidaz-Mimetik Aktivitesi.....	25
3.8. Tek Basamaklı Tayin Protokolünde UiO-66-NH ₂ -FPBA Kullanılarak Tampon Ortamında β -NAD Tayini.....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. UiO-66-NH ₂ ve UiO-66-NH ₂ -FPBA partiküllerinin yapısal ve kimyasal karakterizasyonları.....	28
4.2. UiO-66-NH ₂ -FPBA partiküllerinin boronat affinite sorbenti olarak kullanılarak yapılan denge β -NAD adsorpsiyon desorpsiyon çalışmaları.....	34
4.2.1. Adsorpsiyon ortam pH'ının Adsorpsiyon Verimine Etkisi.....	35
4.2.2. Başlangıç β -NAD Derişiminin Adsorpsiyon Verimine Etkisi.....	36
4.2.3. Adsorpsiyon İzotermi.....	37
4.2.4. Adsorpsiyon Kinetiği.....	40
4.2.5. Elüsyon tamponundaki sorbitol derişiminin etkisi.....	42
4.2.6. Boronat Sorbentlerinin Biyomolekül Adsorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması.....	42
4.2.7. β -NAD'ın UiO-66-NH ₂ -FPBA Partikülü Tarafından Seçici Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	44
4.2.8. UiO-66-NH ₂ -FPBA Partikülün Tekrar Kullanılabilirliği.....	45
4.3. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülün Peroksidaz-Mimetik Aktivitesi.....	45
4.3.1. UiO-66-NH ₂ -FPBA Partikülün Değişen Substrat Derişimi (OPDA) İçin Peroksidaz Benzeri Aktivitesi Ölçümleri.....	46

4.3.2. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülü ile Tampon ortamında β -NAD Tayini.....	47
5. SONUÇLAR.....	50
6.KAYNAKLAR.....	53
EKLER	60
EK 1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu	60
ÖZGEÇMİŞ.....	61



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. A) Zirkonyum aminobenzendikarboksilat bazlı MOF (UiO-66-NH ₂) sentez yönteminin B) FPBA'nın, MOF yapısına bağlanmasının şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.2. A) Model biyomolekül olarak seçilen β -NAD'ın seçici olarak UiO-66-NH ₂ -FPBA yapısına bağlanma mekanizması ve B) β -NAD'ın adsorpsiyon-desorpsiyon süreci	22
Şekil 4.1. A) UiO-66-NH ₂ ve B) UiO-66-NH ₂ -FPBA partiküllerinin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 5.0X, 40.0X (B) 5.0X , 40.0X.....	28
Şekil 4.2. A)UiO-66-NH ₂ ve B) UiO-66-NH ₂ -FPBA yapılarına ait ortalama partikül boyutu grafikleri.....	29
Şekil 4.3. A)UiO-66-NH ₂ ve B) UiO-66-NH ₂ -FPBA partiküllerine ait azot adsorpsiyon-desorpsiyon eğrileri; C)UiO-66-NH ₂ ve D) UiO-66-NH ₂ -FPBA yapılarına ait gözenek boyutu dağılım eğrileri.....	29
Şekil 4.4. A)UiO-66-NH ₂ ve B) UiO-66-NH ₂ -FPBA partiküllerine ait EDS haritalama analiz sonuçları.....	30
Şekil 4.5. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülüne ait genel XPS spektrumu (survey spectrum) ve çekirdek seviye spektrumları (core level spectra of O 1s, N 1s, C 1s, Zr 3d ve B 1s).....	31
Şekil 4.6. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülüne ait FTIR spektrumu.....	32
Şekil 4.7. A) UiO-66-NH ₂ ve B) UiO-66-NH ₂ -FPBA partiküllerine ait XRD grafikler.	33
Şekil 4.8. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülü tarafından β -NAD adsorpsiyonu üzerinde pH'ın etkisi (temas süresi: 60 dakika, sorbent derişimi 5 mg/mL, T = 25°C).....	35

Şekil 4.9. (A) UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülü kullanılarak denge β -NAD adsorpsiyonu üzerine başlangıç β -NAD derişiminin etkisi (B) β -NAD desorpsiyon verimi üzerine başlangıç β -NAD derişiminin etkisi.....	36
Şekil 4.10. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülü üzerine β -NAD adsorpsiyonu için elde edilen A) Langmuir izoterm ve B) Freundlich izoterm grafikleri.....	38
Şekil 4.11. β -NAD adsorpsiyonunun psödo a) 1. Dereceden Kinetiği b) 2. Dereceden Kinetiği (β -NAD derişimi: 2 mg/mL, sorbent derişimi: 0.005 mg/mL, pH: 8.5).....	40
Şekil 4.12. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülün β -NAD adsorpsiyonu üzerinde sorbitol derişiminin etkisi (temas süresi: 60 dakika, sorbent derişimi: 5 mg/mL, β -NAD derişimi: 2mg/mL, T = 25°C).....	42
Şekil 4.13. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülün farklı biyomoleküller için adsorpsiyon kapasiteleri.....	43
Şekil 4.14. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikül için tekrarlanabilirlik testi.....	44
Şekil 4.15. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülüne ait A) Michaelis Menten B) Lineweaver Burk grafikleri.....	45
Şekil 4.16. A) UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülü tarafından katalize edilen OPDA'nın kolorimetrik dönüşümünün tamamlanmasından sonra farklı β -NAD derişimleriyle hazırlanan sulu çözeltilerin fotoğrafları. (B) UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülü kullanılarak OPDA ile muameleden sonra β -NAD'ın değışen derişimleri için UV-Vis spektrumları.....	46
Şekil 4.17. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülün peroksidaz benzeri aktivitesinin sulu tampon ortamındaki β -NAD derişimi ile değışimi.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Enzim sınıflandırılması ve özellikleri.....	4
Çizelge 4.1. Langmuir ve Freundlich İzotermi Denklemleri Parametreleri.....	39
Çizelge 4.2. β -NAD'ın adsorpsiyonuna ait kinetik değerler.....	41
Çizelge 4.3. Farklı malzemelerin diol içeren biyomoleküllere bağlanma yetenekleri	42
Çizelge 4.4. UiO-66-NH ₂ -FPBA partikülün β -NAD tayin özellikleri.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

k_1	Enzim-substrat kompleksinin oluşumunun ikinci dereceden hız sabiti
k_{-1}	Enzim-substrat kompleksinin ayrışma hız sabiti
k_2	Katalitik sabiti
C	S substratının bir E enzimini tersinir olarak bağlaması sonucunda oluşan kompleks yapı
C_e	β -NAD'ın (adsorplanan biyomolekölün) denge anındaki (adsorplanmadan kalan) derişimi (mg/mL)
C_o	β -NAD'ın (adsorplanan biyomolekölün) başlangıç derişimi (mg/mL)
q_e	Sorbentin dengede β -NAD'ın adsorpsiyon miktarı (mg/g)
q_m	Sorbentin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)
V	Çözelti hacmi (mL)
m	Sorbent ağırlığı (g)
K_L	Langmuir sabiti
K_f	Freundlich sabiti
A	Absorbans
ϵ	OPDA oksidasyon ürününün molar sönme katsayısı
b	Işığın yol uzunluğu
$-r_m$	Maksimum substrat tüketim hızı
K_m	Michaelis-Menten sabiti

$r_{\max}$,	Enzimin doymuş substrat değerinde reaksiyon hızı
r_m	Enzimatik reaksiyon hızı
R_L	Denge parametresi, ayırma faktörü
DAP	2,3-diaminofenazin
K_M	Michaelis Sabiti
S_0	Substratın Başlangıç Derişimi
$V_{\max}$	Maksimum Reaksiyon Hızı
E_0	Enzimin Başlangıç Değeri
Fe_3O_4	Demir Oksit
CeO_2	Seryum Oksit
Fe	Demir
Ag	Gümüş
Au	Altın
Ti	Titanyum
Pt	Platin
ZnO	Çinko Oksit
CuO	Bakır Oksit
NiO	Nikel Oksit
Co_3O_2	Kobalt Oksit
VO_2	Vanadyum Dioksit
GO	Glikoz Oksidaz
CNTs	Karbon Nanotüpler
C60	Fulleren
H_2O_2	Hidrojen Peroksit

Kısaltmalar

EC	Enzim Komisyonu
S	Substrat
E	Enzim
C	Kompleks
P	Ürün
ODE	Adi Diferansiyel Denklem
MM	Michaelis Menten
MNP	Manyetik Nanopartikül
Pt NP	Platin Nanopartikül
HILIC	Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi
ELISA	Enzim bağlı immüno sorbent tahlili
MOF	Metal Organik Kafes
AFP	α -fetoprotein
CEA	Karsinoembriyonik antijen
PSA	Prostat spesifik antijen
BAC	Borolat Afinit Kromatografisi
ILAG	Sıvı Destekli Öğütme
UiO-66-NH ₂	Zirkonyum aminobenzendikarboksilat
FPBA	4-Formilfenilborik asit
OPDA	o-Phenylenediamine
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
XRD	X-ışını kırınım yöntemi
XPS	X-ray fotoelektron spektroskopisi
BET	Brunauer-Emmet-Teller
ZrCl ₄	Zirkonyum tetraklorür
DMF	Dimetilformamid
-NH ₂	Amin grubu
BDC-NH ₂	2-aminotereftalik asit
HCl	Hidroklorik asit

NaOH	Sodyum hidroksit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
β -NAD	β -Nikotinamid adenin dinükleotit
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi
LOD	Tayin limiti
DAP	2,3-diaminofenazin
MIP	Moleküler Baskılanmış Malzemeler



1. GİRİŞ

Metal iyonları ve organik ligandlardan oluşan metal-organik kafesler (MOF'ler), son yıllarda çok fazla araştırılan gözenekli malzemelerdir. Ultra yüksek yüzey alanı, kalıcı gözeneklilik, ayarlanabilir gözenek yapıları, kolay sentez prosedürü ve kolay işlevselleştirilebilme gibi çeşitli üstün özelliklere sahiptirler. Son yıllarda proteomikteki uygulamaları ilgi odağı haline gelmiştir. MOF'lar afinite sorbentleri olarak, geleneksel olarak kullanılan malzemelerden daha yüksek seçicilik, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik gösterdikleri için proteinler, fosfopeptidler ve nükleosidler gibi diol içeren biyomoleküllerin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı fonksiyonel grupların veya spesifik kompozitlerin MOF'a dahil edilmesi ile MOF'a diol içeren bileşikler yakalama konusunda seçicilik kazandırmak konusunda son yıllarda yapılan çalışmalar MOF'ların biyomolekül izolasyonunda büyük potansiyelini göstermektedir [1].

Enzimler, bir grup reaksiyonu, kendilerini tüketmeden hızlandırma gücüne sahip biyokatalizörlerdir. Günümüzde ticari olarak temin edilebilen çoğu enzim, organizmalardan ayrıştırılmakta ve saflaştırılmaktadır. Mükemmel substrat seçiciliği ve aktivitesi sayesinde bu biyolojik enzimler, biyotıp, biyokimyasal tespit, tarım bilimi, gıda işleme ve çevresel iyileştirme gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, genellikle zorlu ortamlarda zayıf kararlılık, tekrar kullanılabilirlik zorluğu ve karmaşık ve yüksek maliyetli üretim gibi sorunlarla karşı karşıya kalırlar [2]. Bunun yerine, son yıllarda bilim insanları porfirinler, siklodekstrinler ve supramoleküller gibi doğal enzimlere potansiyel alternatif olarak kullanılabilecek uygun yapay enzimler konusunda yoğun araştırmalar yapmaktadırlar. Nanoteknolojinin hızlı gelişimi ile biyosensör olarak kullanılan özellikle nanozimler, protein enzimlerinden daha yüksek katalitik kararlılık, modifikasyon kolaylığı ve daha düşük üretim maliyeti sunmaktadır [3].

Biyosensörlerin geliştirilmesi ve kullanımı, kimya, biyoloji, fizik ve mühendislik gibi çok disiplinli alanlarda bir devrime yol açmıştır. Biyosensörler kullanılarak yapılan analizlerin kolay yapılabilir olması, sonuçlarının kolay izlenebilmesi ve spesifik ve

hassas sonuçlar elde edilebilmesi gibi avantajlarından dolayı biyosensörler ile ilgili çalışmalar son zamanlarda oldukça önem kazanmıştır. Son yıllarda, peroksidaz, oksidaz ve hidrolaz dahil olmak üzere farklı tipte enzim aktivitelere sahip gelecek vaat eden nanozimler olarak MOF'lar geliştirilmektedir. Ayrıca bazı MOF'ların aynı koşullar altında veya farklı ortamlarda iki veya daha fazla çeşit enzim aktivitesi sergiledikleri bulunmuştur [4].

Tez çalışması kapsamında yüksek yüzey alanı ve uygun gözeneklilik özelliklerine sahip metal-organik kafesler (MOF'lar) sentezlenerek diol içeren biyomolekül tayini ve izolasyonu için yeni bir sorbent geliştirilmiştir. Diol içeren biyomolekül olarak seçilen β -NAD'ın partikül yüzeyine adsorpsiyonu için farklı reaksiyon koşulları (pH, biyomolekül derişimi vb.) denenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum denge koşulları altında, biyomolekül besleme ve sorbent derişiminin, partikül adsorpsiyon kapasitesi ve desorpsiyon verimi üzerindeki etkileri belirlenmiş, sorbentin seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği test edilmiştir. Elde edilen denge adsorpsiyon verilerini modellemek için Langmuir ve Freundlich izotermi kullanılmıştır. Adsorpsiyon kinetiği verileri 1. derece ve 2. derece kinetik eşitlikleri kullanılarak modellenmiştir. Geliştirilen sorbent ile tampon ortamından ilgili biyomolekülün seçici adsorpsiyonu sağlanmıştır.

Ayrıca çalışma kapsamında sentezlenen malzemenin peroksidaz aktivitesi, uygun peroksidaz substratı (o-fenilen diamin, OPDA) kullanılarak tayin edilmiştir. Biyoaffinite kromatografisi prensipleri kullanılarak seçilen biyomoleküle duyarlı, H_2O_2 varlığında o-fenilendiaminin (OPDA) oksidasyonunu katalize eden yüksek verimli, peroksidaz benzeri aktiviteye sahip MOF bazlı malzemeler geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Sınıflandırılması

Enzimler, canlı organizmaların içerisinde, biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörlerdir. Ayrıca hücrelerden ayrılabilir ve daha sonra ticari açıdan önemli süreçlerde geniş bir kullanım alanında katalizör olarak kullanılabilirler.

Alman fizyolog Wilhelm Kühne, 'Enzim' kelimesini ilk kez 1878 yılında mayanın şekerden alkol üretme yeteneğini tanımlarken kullanmıştır. Yunanca en ('içinde') ve zume('maya') kelimelerinden türetilmiştir [5].

Enzim bulunan ortamda, reaksiyonlar enzim olmayan ortama göre çok daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu biyolojik moleküller, dönüştürülecek maddeleri tanıma konusunda spesifiktir. Enzimler biyolojik uygulamalar arasında üstün özelliklere ve çeşitliliğe sahip olduğundan yeni biyokatalizörlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır [6].

Enzimler tipik olarak katalizledikleri reaksiyona atıf yapan ortak isimlere sahiptir ve sonlarında -az eki alırlar (örn. oksidaz, dehidrojenaz, karboksilaz). Genellikle proteolitik enzimler -in son ekine sahiptir (örn. kimotripsin, papain, tripsin). İsimlendirme yapılırken genel olarak etki ettikleri substratın adı da belirtilmektedir (örn. glukoz oksidaz, alkol dehidrojenaz, piruvat dekarboksilaz) [7-9].

Enzimlerin isimlendirilmesinde oluşan karmaşıklık ve tutarsızlıklar nedeniyle Uluslararası Biyokimya Birliği bu konu için Enzim Komisyonu'nu kurmuştur. Bu sistemde, tüm enzimler dört bölümden oluşan Enzim Komisyonu (EC) tarafından tanımlanan numaralara sahiptir [10].

Enzim araştırmaları için ön koşullar, tanımlama ve sınıflandırmadır. Enzim Komisyonu'na göre, enzimler altı kategoriye ayrılır [10-12]:

- (1) Oksidoredüktaz, oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını;
- (2) Transferaz, bir kimyasal grubu, örneğin bir bileşikten (donör) başka bir bileşiğe (alıcı) bir metil veya bir glikozil grubu;
- (3) Hidrolaz, hidrolizi;
- (4) Liyaz, bir grubun bir substrattan hidrolitik olmayan bir şekilde çıkarılıp bunun sonucunda bir çift bağ oluşumunu;
- (5) İzomeraz, bir molekülde gerçekleşen geometrik veya yapısal değişiklikleri;
- (6) Ligaz, ATP veya benzer bir trifosfatta bir pirofosfat bağının hidrolizi ile iki molekülün birleşmesini katalize etmektedir.

Çizelge 2.1. Enzim sınıflandırılması ve özellikleri

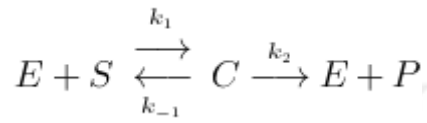
Sınıflandırma	Fonksiyonları
Oksidoredüktaz	Oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalize eder
Transferaz	Bir bileşeni diğerine aktarır
Hidrolaz	Hidroliz yoluyla bağları katalize eder
Liyaz	Hidroliz ve oksidasyon dışında çeşitli kimyasal bağların kırılmasını sağlar
İzomeraz	Yapısal veya geometrik değişiklikleri katalize eder
Ligaz	Yeni bir kimyasal bağ oluşturarak iki büyük molekülün birleşmesini katalize eder

2.2. Michaelis- Menten Kinetiği

Enzim kinetiği, bir hücre içindeki proteinler arasındaki karmaşık reaksiyon ağlarının matematiksel açıklamasını ifade etmek için önemli bir araçtır. Enzim kinetiği modeli 1901'de Henri, daha sonra 1913'te Michaelis ve Menten tarafından tanıtılmıştır [13].

Michaelis-Menten denklemi, izole enzimlerin kinetik özelliklerini belirlemek ve salınım davranışı gösteren enzim sistemlerinin dinamiklerini modellenmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [14-16].

Süreç, bir S substratının bir E enzimini tersinir olarak bağlaması sonucunda bir C (ES) kompleksinin oluşması reaksiyonunu ele almaktadır. Kompleks daha sonra tersinmez olarak bir P ürününe bozunmakta ve enzim daha sonra substratın başka bir molekülüne bağlanmak için serbest kalmaktadır. Bu süreç aşağıdaki reaksiyonla ifade edilmektedir [13]:



Burada k_1 , k_{-1} ve k_2 reaksiyon hızları ile bağlantılı olan kinetik parametrelerdir:

k_1 enzim-substrat kompleksinin oluşumunun ikinci dereceden hız sabitidir;

k_{-1} enzim-substrat kompleksinin ayrışma hız sabitidir;

k_2 katalitik sabittir.

Biyokimyasal bir reaksiyonun karakterizasyonu için kullanılan Michaelis–Menten modelinde ürün oluşum hızı aşağıdaki Eşitlik 2.1 ile gösterilmektedir [17-18].

$$v = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} = k_{cat} [E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eşitlik 2.1}$$

Burada, E_0 , t=0 anında toplam enzim derişimini; $[S]$, substrat derişimini; V_{max} maksimum hızı, k_{cat} ürüne dönüşüm hız sabitini (katalitik hız sabitini) ve K_M , Michaelis sabitini ifade etmektedir. Bu temel eşitlikte, tepkimede bulunan substrat derişimi $[S]$, enzim katalizli bir tepkimenin hızı (v) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) ile ilişkilendirilmektedir [13].

Michaelis sabiti, reaksiyon hızının maksimum hızın yarısı olduğu substrat derişimidir. Bu sabit, substratın enzime olan afinitesinin ters bir ölçüsü olarak ifade edilmektedir. K_M değeri küçüldükçe, afinite yükselmektedir. k_{cat}/K_M sabiti, enzimin, substratı ürüne ne kadar verimli bir şekilde dönüştürdüğünü göstermektedir. Michaelis-Menten kinetiğinde hız ve substrat derişimi arasındaki ilişkiyi gösteren eğri, doğrusal olmayan bir regresyon modeli olarak formüle edilebilir. Lineweaver–Burk grafiği, $1/V$ 'ye karşılık $1/S$ değerlerinin çizilmesi ile elde edilen lineer bir eğriden V_{max} ve K_m değerlerini bulmak için kullanılmaktadır [13].

2.3. Nanozimler (Enzim-Mimetik)

Katalitik etkinliklerine rağmen, doğal enzimler, endüstriyel uygulamalar için kritik sınırlamalara sahiptir. Bu sınırlamalar, zorlu koşullarda (sıcaklık ve pH) düşük stabilite ve hazırlama, saflaştırma ve depolama için nispeten yüksek maliyetler gibi sebeplerden kaynaklanabilir. Bu nedenle, son yıllarda araştırmacılar çeşitli uygulamalar için yapay enzimler geliştirmek üzerine yoğun bir çaba göstermişlerdir. Doğal enzimlerin katalitik aktivitesini taklit etmek için, siklodekstrin, porfirin, hemin, hematin ve nükleik asitler ve protein gibi biyomoleküllere dayanan kimyasal kompleksler, başarıyla kullanılmaktadır [19-20].

Manyetik nanopartiküllerinin (MNP'ler) içsel peroksidaz aktivitesi sergilediğinin bulunması yeni bir enzim mimetiği sınıfının yolunu açmıştır. Bugüne kadar, manyetik nanopartiküllere ek olarak çeşitli nanoyapılı malzemelerin içsel enzimatik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bunlara örnek olarak, platin nanopartiküller (Pt NP'ler) ve seryum oksit nanopartiküller (CeO_2 NP'ler) verilebilir [19].

Enzim benzeri katalitik aktiviteye sahip bu nanomalzemeler "nanozimler" olarak adlandırılmaktadır. Doğal enzimlerin tersine, nanozimler doğası gereği sağlam, zorlu ortam koşullarında (pH ve sıcaklık) kararlı olabilen ve basit ölçeklendirme ile seri üretimi kolay malzemelerdir. Bu avantajlar onları analitik ve çevresel uygulamalarda umut verici malzemeler haline getirmektedir [20-24].

Nanozimler geniş uygulama alanlarına sahiptir. Bunlar arasında, biyosensör, immunoassay, kanser teşhisi ve tedavisi ve çevre mühendisliği bulunmaktadır. "Nanozim" terimi ilk kez Manea, Houillon, Pasquato ve Scrimin tarafından ortaya atılmıştır [20].

2.4. Peroksidaz Benzeri Aktivite

Nanozimlerin NP'lerin boyutuna ve şekline bağlı olması gibi bazı dezavantajlar vardır. İnorganik nanomalzemelerden, çeşitli yaklaşımlarla doğal enzimlerin yapılarını ve işlevlerini taklit eden nanozim çeşitleri; metal bazlı nanozimler (Fe, Ag, Au, Ti, Pt, vb. gibi), metal oksit bazlı nanozimler (CeO_2 , ZnO , CuO , NiO , VO_2 , CO_3O_4 gibi), karbon yapı bazlı nanozimler (GO, CNTs, C_{60} gibi) ve diğer nanomalzemeler olmak üzere dört şekilde sınıflandırılmıştır. Peroksidazlar üç ana kategoriye ayrılır; bitki peroksidazları, hayvan peroksidazları ve katalazlar [20-23]. Peroksidazlar, glikoz, kreatin ve ürik asit tayini gibi birçok önemli çalışmada kilit rol oynayan klinik çalışmalarda önemli yer almaktadır. Peroksidaz enziminin immobilizasyonu, biyosensör tasarımında büyük önemdedir. Linosier ve meslektaşları tarafından ismi verilen peroksidaz, H_2O_2 varlığında çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonunu katalize etmektedir. Peroksidazlar bakteri, siyanobakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmaların kirleticileri parçalama etkinliğinde, çeşitli endüstrilerde (tekstil endüstrisinde boya renk giderimi) ve çeşitli biyolojik süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [21-24].

Proteinlere benzer şekilde, peroksidaz enzimleri sıcaklık, pH, iyonik kuvvet vb. gibi çevresel koşullara karşı son derece hassastır ve kontrollerinin maliyetli yüksektir. Çevresel faktörlerin değişmesiyle, protein denatürasyonundan dolayı peroksidazın katalitik aktivitesi kaybolmaktadır. Bu gibi zorlukları azaltmak için araştırmacılar, enzimlerle benzer aktiviteye sahip malzemelerin kullanılmasını önermiş olup bunun için kullanılan en önemli bileşiklerden biri, endüstrilerdeki sorunları büyük oranda azaltan nanozimlerdir. Çok sayıda NP, doğal peroksidazlara benzer bir içsel enzim taklit aktivitesi sergilemektedir. Derişim, pH ve sıcaklık gibi bazı reaksiyon parametreleri, NP'lerin katalitik aktivitesini büyük ölçüde etkilemektedir [20-23].

Enzim benzeri nanozimler, kolay sentez, yüksek katalitik aktivite ve uygun maliyet gibi avantajlara sahiptir. Bu nedenle, içsel peroksidaz benzeri aktiviteye sahip bazı inorganik nanomateriyal bazlı nanozimler yaygın olarak uygulamalarda kullanılmaktadır. Farklı yapılardaki inorganik nanomalzeme bazlı nanozimlerin H_2O_2 , glikoz ve bir dizi bileşiğin ultra hassas tespiti için peroksidaz mimetik olarak hareket edebileceği gözlenmiştir [20-24].

2.5. Biyosensörler

Biyosensörler, belirli bir hedef analit varlığında bir numuneyi analiz etmeyi sağlayan analitik cihazlardır. Tipik olarak biyosensör, moleküler tanımayı sağlayan biyolojik bir bileşenden ve fizikokimyasal bir dedektör bileşeninden veya transdüserden oluşur. Biyosensörler, enzimler, antikorlar, nükleik asitler veya hücreler gibi kullanılan biyolojik bileşene göre veya elektrokimyasal, optik, kütle bazlı veya piezoelektrik dönüştürücü gibi dönüştürücünün tipine göre sınıflandırılır. Biyosensörlerin başka bir sınıflandırma yöntemi daha vardır. Etkileşimlerin yeni bir biyokimyasal reaksiyon ürününün oluşumuyla sonuçlanmış olduğu katalitik biyosensör ve etkileşimlerin analitin dönüştürücü yüzeyine bağlanması ile oluşan afinite biyosensörü olmak üzere iki tip biyosensör bulunmaktadır [25].

Son yıllarda enzim tabanlı biyoalgılama cihazları geliştirilmiş ve geniş bir uygulama alanında çeşitli hedef substratların kalitatif ve kantitatif analizinde yenilikçi teknikler olduğunu göstermiştir. Enzim bazlı biyosensörler, yüksek hassasiyet ve özgüllük, taşınabilirlik, maliyet etkinliği gibi avantajlara sahiptir. Bu avantajlar onları klinik analiz, gıda güvenliği kontrolü veya hastalık izleme amaçlarına odaklanan araştırmalar için giderek daha cazip hale getirmektedir [25-26].

Biyosensörler, yüksek seçicilikleri nedeniyle, antijenler, nükleik asitler, amino asitler, kreatinin, üre ve glikoz gibi önemli biyolojik molekülleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Canlı sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların çoğu enzimler tarafından

katalize edildiğinden enzimler araştırma ve geliştirmede yaygın olarak kullanılan biyolojik tanıma molekülleri olarak tercih edilmektedir [27-28].

2.6. Diol İçeren Biyomoleküller

Biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan karbonhidratlar, glikoproteinler/glikopeptidler, ribonükleaz asitleri, nükleozitler, glukozitler ve katekol içeren bazı moleküllerin izolasyonu/ayrılması ve analizi biyoloji biliminde çok önemlidir. Biyomoleküller ve ilaç metabolitleri doku, kan ve idrarda geniş çapta dağılmıştır. Bununla birlikte, diol içeren bu biyomoleküllerin ortak özelliği, karmaşık numunelerde genellikle çok düşük miktarda mevcut olmaları, buna karşın girişim yapan diğer maddelerin ise yüksek miktarda mevcut olmasıdır. Bu biyomoleküllerin spesifik olarak yakalanması, izolasyonu/ayrılması ve etkili bir şekilde zenginleştirilmesi bu nedenle kritik öneme sahiptir. Boronik asitler, alkali koşullarda tersinir ester oluşumu yoluyla diol içeren bileşiklere yüksek afiniteyle bağlanabilirken, asidik koşullarda ayrışmalar meydana gelir, dolayısıyla boronik asitler, diol içeren bileşikler için spesifik seçiciliğe sahiptir [29].

Günümüze kadar biyolojik sıvılardaki nükleosidlerin ve türevlerinin analizi için UV ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), radyoaktivite veya kütle spektrometresi (MS) tespiti ve kapiler elektroforez (CE) gibi bazı analitik yöntemler geliştirilmiştir. UV absorbansına dayalı tespit, bileşiklerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Radyoaktivite tespitli HPLC hassastır ancak radyoaktif malzemelerin kullanımını içermektedir. Kütle spektrometrisi yapısal bilgi sağlar ve purin ve pirimidin nükleosid antiviral ajanların ve doğal olarak oluşan nükleosidlerin analizleri için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, biyolojik sıvılarda bulunan modifiye edilmiş nükleositlerin düşük bolluğunun yanı sıra biyolojik numunelerdeki ciddi matris müdahaleleri nedeniyle, biyolojik sıvılarda modifiye edilmiş nükleositlerin kapsamlı profilinin çıkarılması, klinik araştırmalarda hala zor konular arasındadır.

Boronik asitler sakkaritler, glikoproteinler ve nükleozitler gibi diol içeren biyomoleküllerin izolasyonu ve algılanması için önemli ligandlardır. Bu bakımdan boronik asitler, nanopartikülleri, nanotüpleri ve monolitleri içeren fonksiyonel malzemelerin yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son zamanlarda gözenekli karbon malzemeler, adsorpsiyon, enerji depolama, elektrokatalizörler vb. gibi birçok alanda uygulamaya yönelik yeni bir malzeme sınıfı olarak ortaya çıkmıştır. Günümüzde gözenekli karbon malzemelerin sentezi için çeşitli yenilikçi teknolojiler sürekli olarak geliştirilmektedir. Gözenekli karbon malzemeler arasında metal-organik kafesler (MOF'ler), yapısal ve morfolojik özellikleri nedeniyle aday şablon malzemesi olarak dikkat çekmektedir. Metal organik kafesler (MOF'lar), metal iyonları ve organik ligandlardan oluşan gözenekli yeni bir malzeme sınıfıdır ve son yıllarda, MOF'lar proteomikte diol içeren biyomoleküllerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [29-31].

2.7. Afinite Kromatografisi

Doğadaki pek çok örnek, birçok maddenin karışımından oluşmaktadır. Bu gerçek, bu tür örneklerde bileşenlerin saflaştırılması, analiz edilmesi veya incelenmesi gibi durumlarda sıvı kromatografisi gibi kimyasal ayırma yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Kullanılan sabit faz ve mobil faz türlerine bağlı olarak bu ayırma işlemlerinde kullanılabilecek kimyasal etkileşimlerin ve yöntemlerin çeşitliliği, birçok sıvı kromatografi türünü ortaya çıkarmıştır [32].

Bu tür yöntemlerin çok çeşitli olması sayesinde, sıvı kromatografik yöntemler sıvı faz örneklerinde birçok kimyasal türünün ayrıştırılması veya analizi için kullanılmaktadır. Sonuç olarak, sıvı kromatografisi hem endüstriyel ortamlarda hem de araştırma laboratuvarlarında uygulanan yaygın bir sıvı faz ayırma yöntemidir [32].

Afinite kromatografisi biyolojik etkileşimlerde sıklıkla karşılaşılan geri dönüşümlü spesifik bağlanmaya dayanmaktadır. Bu biyolojik etkileşimlere bir antikoron hedefiyle

(veya antijeniyle) bağlanması, bir hormonun reseptörüyle bağlanması ve bir enzimin substratıyla etkileşimi örnekleri verilmektedir. Bu tür seçici bağlanma, etkileşen ajanlardan birinin kolona yerleştirilmesi ve ajanın sabit faz olarak kullanılmak amacıyla bir desteğe immobilize edilmesi şeklinde afinite kromatografisinde kullanılır. Bu immobilize bağlayıcı ajana "afinite ligandı" adı verilir ve tamamlayıcı hedefin afinite kolonu tarafından izole edilmesinin veya saflaştırılmasının temelini oluşturur. İstenen hedefi içeren bir numune, hedefin afinite ligandına bağlanmasını sağlamak için doğru bileşim ve pH değerine sahip bir mobil faz varlığında kolona uygulanır. Numune bu mobil fazın varlığında afinite kolonuna uygulandığında, hedef tutulur. Tutulan hedef daha sonra kolondan elüe edilip ölçüldükten sonra, kullanılmak için toplanır veya daha fazla ayırma veya analiz için ikinci bir yöntemle aktarılır. Afinite kromatografisinde kullanılacak çok fazla sayıda bağlayıcı madde ve destek malzeme vardır. Birçok afinite ligandının yüksek seçiciliğinden dolayı, bu yöntem enzimlerin ve biyofarmasötiklerin büyük ölçekli saflaştırılmasında oldukça popüler bir yöntemdir [32].

2.8. Boronat Afinite Kromatografisi

Boronat afinite kromatografisi (BAC), diol içeren bileşiklerin seçici izolasyonu ve zenginleştirilmesinde ligand olarak bir boronik asidin kullanıldığı bir afinite kromatografisi türüdür ve mekanizması temel olarak diol grupları ile boronik asit ligandı arasındaki pH kontrollü tersinir kovalent etkileşimlere dayanır. Diol içeren bileşikler, birçok molekülü içeren önemli bir bileşik ailesidir bu bileşikler glikoproteinler, katekolaminler, nükleozitler ve sakkaritlerdir. Diol içeren biyomoleküller biyolojik süreçlerin birçoğunda önemli rol oynamakta ve hastalık teşhisinde önem taşımaktadır. Örneğin, glikoproteinler moleküler tanıma, bağışıklık yanıtı, hücreler arası ve hücre içi sinyalizasyon, sperm-yumurta etkileşimi gibi konularda önemli roller oynarken, α -fetoprotein (AFP), prostat spesifik antijen (PSA) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) gibi çok çeşitli glikoproteinler klinik tanılarda hastalıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır [33].

BAC, geniş spektrumlu seçicilik, geri dönüşümlü kovalent bağlanma, pH kontrollü bağlanma/salıverme ve hızlı birleşme/desorpsiyon kinetiği gibi, diğer afinite kromatografik tekniklerinden farklı olarak birçok önemli özellik sergilemektedir. Bu özellikleri sayesinde BAC, afinite ayırma, proteomik analiz ve metabolomik analiz gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [33].

BAC prensip olarak, diol içeren bileşikler ile boronik asit ligandları arasındaki tersinir kovalent reaksiyondan oluşur. pH kontrollü tersinir kovalent reaksiyonla, BAC'de yakalanan analitlerin elüsyonu basit bir şekilde gerçekleştirilebilir, sadece elüsyon tamponu olarak asidik bir çözeltiye ihtiyaç vardır. Alternatif şekilde, yakalanan analitlerin boronik asit ligandları tarafından serbest bırakılması, yükleme tamponuna sorbitol gibi aşırı miktarda rakip diol içeren moleküller eklenerek gerçekleştirilmektedir [33].

Boronat afinitesi için kritik bir faktör bağlanma pH'ıdır. Diğer bir önemli faktör ise seçiciliktir. Küçük diol bulunduran moleküller için iyi bir seçicilik elde etmek genellikle kolayken, glikoproteinler gibi makromoleküller için bu genellikle zordur [33].

2.8.1. Boronat Afinitesi Sabit Fazlar

BAC'de kullanılan sabit fazlar ikiye ayrılır:

- (1) mikroküreler
- (2) monolitik kolonlar

Ayrıca, nanopartiküller, mezogözenekli malzemeler ve moleküler baskılanmış malzemeler (MIP'ler) de dahil olmak üzere diol içeren bileşiklerin ekstraksiyonu veya yakalanması için boronat afinite sorbentleri olarak yeni malzeme biçimleri kullanılmaktadır [33].

2.8.2. Uygulamalar

Boronat afinite kromatografisinin ortaya çıkışı 1970 gibi erken bir tarih olmasına rağmen, yakın zamana kadar geniş bir uygulama alanı bulamamıştır. Uygulamalar dört ana grupta sınıflandırılabilir.

1. Diol içeren küçük partiküllerin seçici olarak zenginleştirilmesi;
2. Glikoproteinlerin seçici zenginleştirilmesi;
3. Glikoprotein hastalık biyobelirteçlerinin spesifik olarak tespit edilmesi;
4. Glikopeptitlerin seçici zenginleştirilmesi.

Boronat afinite materyallerinin geleneksel biçimi olan mikro partiküllere ek olarak, son yıllarda yeni boronat afinite materyalleri başarıyla geliştirilmiştir. Bu materyaller; makrogözenekli monolitler, nanopartiküller, mezogözenekli materyaller ve moleküler baskılı polimerlerdir. Bağlanma pH'ı sorunlarını ortadan kaldırmak için çeşitli boronik asit ligandları geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda, BAC'nin kan, gözyaşı, tükürük ve idrar gibi biyolojik örneklerle doğrudan uygulanmaktadır [33].

2.9. Metal-Organik Kafesler

Metal-organik kafesler (MOF'lar), bir metal ve organik malzemeyi kapsayan bir gözenekli kristal malzeme sınıfıdır. MOF'lar ince ayarlanabilirliği, geniş spesifik yüzey alanı ve yüksek gözenekliliğinden dolayı üstün özelliklere sahip malzemelerdir [34]. MOF tabanlı malzemeler, yüksek yüzey alanları sayesinde, yüksek MOF-ligand afinitesine, kararlılığa ve özgüllüğe sahiptirler. MOF'lar organik ligandlardan ve uygun metal iyonlarının kümelerinden oluşur. Metal kümelerin ve organik ligandların neredeyse sonsuz kombinasyonu oluşturularak farklı özelliklere sahip MOF'lar elde etmek mümkündür. MOF'ların bileşenlerini belirlerken çok geniş seçim aralığı olması, gözenek boyutlarını mikro gözeneklerden mezo gözeneklere veya makro gözeneklere ayarlamayı mümkün kılmaktadır [34-35].

2.9.1. Sentez Yöntemleri

Özel fonksiyonel ve yapısal özelliklerinden dolayı MOF'lar günümüzde gözenekli bileşiklerin önemli bir grubu olarak bilinmektedir. Bu yapılar, organik bağlayıcılar ile metal iyon kümeleri ve metal iyonları arasındaki köprülerden oluşmaktadır. Bununla birlikte, sıcaklık, reaksiyon süresi, basınç, pH ve çözücü gibi diğer birçok parametrenin sentez sırasında dikkate alınması gerekmektedir. MOF sentez yöntemleri; Yavaş difüzyon, hidrotermal (solvotermal), elektrokimyasal, mekanokimyasal, mikrodalga destekli ısıtma ve ultrason dahil olmak üzere çok sayıda farklı yaklaşımdan oluşmaktadır [36].

2.9.1.1. Difüzyon Yöntemi

Yöntem oda sıcaklığında gerçekleştirilir ve enerji kaynağına ihtiyaç duyulmaz. Yavaş buharlaştırma yöntemi sırasında, reaktiflerin çözeltileri karıştırılır ve yavaş buharlaşmaya bırakılır ve çekirdeklenmeyi ve kristal büyümesini desteklemek için kritik bir derişime ulaşıldığında kristaller oluşur. İşlemi hızlandırmak için genellikle düşük kaynama noktalı çözücülerin karışımları kullanılır. [36].

2.9.1.2. Hidro (solvo) Termal Yöntem

Solvo(hidro)termal reaksiyonlar kapalı kaplarda, çözücünün kaynama noktası üzerindeki basınç altında gerçekleştirilmektedir. Reaksiyonlar genellikle kapalı kaplar (otoklavlar) kullanılarak 50-260°C aralığındaki sıcaklıklarda ve polar solventler içerisinde uzun sürelerde gerçekleşmektedir. Teflon kaplı otoklavlar 400°C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklardaki reaksiyonlar için kullanılır. Özellikle kinetik olarak inert iyonlar kullanıldığında bağ oluşumunu kolaylaştırmak ve uygun kristalizasyonu sağlamak için reaksiyonların sıcaklığı artırılabilir. Sıcaklık aynı zamanda kristallerin morfolojisini de etkiler; uzun süreli reaksiyon süreleri ise nihai ürünün bozunmasına neden olabilir. Kaynama noktası yüksek solventler (dimetil formamid (DMF), dietil formamid (DEF), MeCN, MeOH, EtOH) çoğunlukla kullanılmaktadır [36].

2.9.1.3. Mikrodalga Yöntemi

Mikrodalga yardımı ile gerçekleştirilen işlemler sonucunda küçük metal ve oksit partikülleri oluşturulmasına dayalı bir yöntemdir. Bu tür işlemlerde, metalin nano boyutlu kristallerini oluşturmak için çözelti sıcaklığı mikrodalgalarla bir süre yükseltilebilir. Sentezi yüksek hızda gerçekleştirmek için etkili bir yöntemdir ve elde edilen partiküllerin şekli ve boyutu bu yöntemle uygun şekilde kontrol edilebilmektedir [36].

2.9.1.4. Elektrokimyasal Yöntem

Endüstriyel ölçekte, elektrokimyasal teknik uygulanarak MOF tozları üretilmektedir. Metal tuzlarından nitratlar gibi anyonlardan kaçınılması, daha düşük reaksiyon sıcaklıkları ve solvotermal senteze kıyasla son derece hızlı bir sentez olması gibi avantajları vardır [36].

2.9.1.5. Mekanokimyasal Yöntem

Mekanokimyasal sentezde molekül içi bağlar mekanik olarak kırılmadan önce kimyasal bir dönüşüm gerçekleşir. Bu süreçle beraber, molekül düzeyinde reaktanların hareketliliğinde bir artış yoluyla mekanokimyasal reaksiyonlar hızlandırılır [36].

2.9.1.6. Sonokimyasal Yöntem

Sonokimya, yüksek enerjili ultrasonik radyasyon (20 kHz-10 MHz) altında moleküllerin kimyasal dönüşümleriyle ilgilenmektedir. Bir reaksiyon çözeltisi ultrason radyasyonuna maruz bırakıldığında oluşan kabarcıklar, kimyasal reaksiyonları ve kristalizasyon çekirdeklerinin anında oluşumunu sağlayarak yüksek sıcaklık ve basınçla kısa ömürlü yerel sıcaklık noktaları oluşturur. MOF-5 ve MOF-177'in yüksek kaliteli kristalleri sırasıyla 5–25 µm ve 5–20 µm boyutunda, solvent olarak 1-metil-2-pirolidon varlığında sonokimyasal yöntemle hazırlanmıştır [36].

2.9.2. Kullanım Alanları ve Avantajları

Gözenekli malzemeler ve metal organik kafesler (MOF'lar) ilk olarak 1965 yılında Tomic'in bu konu hakkındaki ilk yayını ile o dönemde bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Malzemelerin önemi, yaşamda aldıkları rol ve teknolojinin geleceği üzerindeki etkisi ile belirlenmiştir [35].

MOF'lar yaygın olarak; çevre koruma, biyosensörler, rejeneratif tıp, tıp mühendisliği, hücre tedavisi, katalizörler ve ilaç dağıtımı gibi alanlarda kullanılmaktadır. Son çalışmalara bakarak, ilaç tespiti ve dağıtımı gibi biyomedikal uygulamalar için MOF'ların önemli özellikleri olduğu bildirilmiştir. MOF'lar, geniş yüzey alanı, yüksek gözeneklilik, kristallik ve termal stabilite ve gözeneklerin ve kafeslerin işlevselliği gibi bir dizi yapısal özellik sergilemektedir; bu da onları katalizörler, sensörler, toksik gazlar için emiciler gibi çevresel ve biyomedikal uygulamalar için umut verici malzemeler haline getirmektedir [35-39].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yüksek yüzey alanı ve uygun gözeneklilik özelliklerine sahip metal-organik kafesler (MOF'lar) sentezlenmiştir. Bu kapsamda Zirkonyum aminobenzendikarboksilat bazlı MOF (UiO-66-NH₂) solvotermal yöntemle başarılı olarak sentezlenmiş ve biyomoleküllerin tayin ve izolasyonu gibi proteomik uygulamalardaki büyük potansiyeli nedeniyle hedef MOF olarak seçilmiştir. Tek basamakta sentezlenen amin işlevselleştirilmiş Zr-MOF, düşük derişimli diol içeren biyomoleküllerin seçici izolasyonunu mümkün afiniteye sahip sorbenti elde etmek için 4-Formilfenilborik asit (FPBA) ile reaksiyona sokularak Zr-MOF yüzeyine borik asit grubu içeren kromatografik ligand bağlanmıştır. Diol içeren biyomolekül olarak seçilecek model biyomolekülün Zr-MOF yüzeyine adsorpsiyonu için farklı adsorpsiyon koşulları (pH, tampon vb.) denenerek optimum koşullar belirlenecektir. Optimum denge koşulları altında, biyomolekül besleme derişiminin, sorbentin adsorpsiyon kapasitesi ve desorpsiyon verimi üzerindeki etkileri belirlenecek ve sorbentin tekrar kullanılabilirliği test edilecektir. Ayrıca çalışma kapsamında sentezlenecek malzemenin literatürle karşılaştırmalı olarak peroksidaz aktivite davranışları incelenecek ve böylece metal-organik kafes (MOF) yapısının yeni nesil biyosensörlerin tasarımında kullanılabilirliği gösterilecektir. Tayinde peroksidaz substratı olarak o-Phenylenediamine (OPDA) kullanılacaktır. Böylece peroksidaz aktivitesinde biyomolekül derişimine bağlı olarak oluşan değişim, seçilen peroksidaz substratının vermiş olduğu reaksiyon ile görünür bölgede spektrofotometrik olarak izlenecektir. Geliştirilen malzemenin yüzey morfolojisini ve partikül boyutunu belirlemede taramalı elektron mikroskobu (SEM), kristal örgü yapısını anlamak için X-ışını kırınım yöntemi (XRD), sorbent yüzeyi ile ilgili olarak atomik ve moleküler bilgi sağlanması amacıyla X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS), spesifik yüzey alanı ve gözenek yapısı hakkında bilgi sağlanması amacıyla da Brunauer-Emmet-Teller (BET) yöntemi kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

MOF sentezinde kullanılan metal tuzu Zirkonyum tetraklorür ($ZrCl_4$), dimetilformamid (DMF), amin grubu ($-NH_2$) içeren organik bağlayıcı olarak seçilen 2-aminotereftalik asit (BDC- NH_2) ve modülatör olarak kullanılan hidroklorik asit (%37 HCl) Sigma-Aldrich Chem Co. ABD 'den temin edilmiştir. Fenilboronik asit (PBA) içeren ligand, 4-formilfenil boronik asit (FPBA) yine Sigma-Aldrich'ten tedarik edilmiştir.

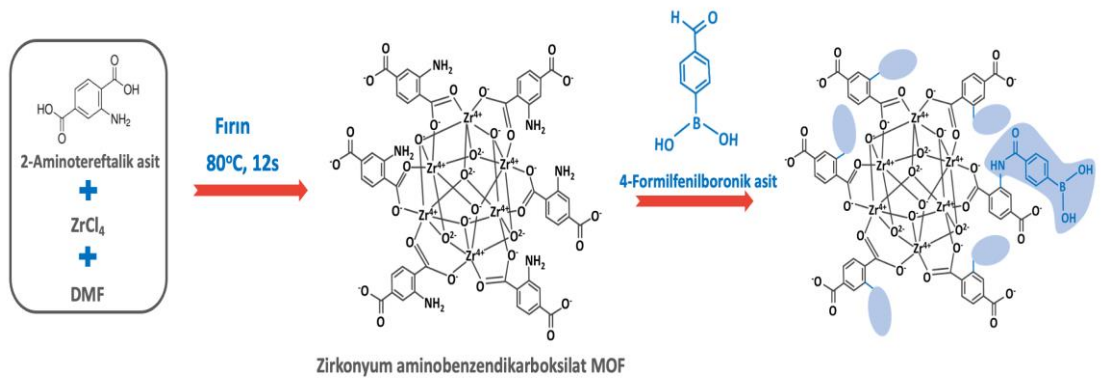
Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan kimyasallar, hazırlanan tampon çözeltilerin pH ayarlamaları için hidroklorik asit (HCl) ve sodyum hidroksit (NaOH), tampon çözeltileri için 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit (HEPES), sorbitol, Hidroksimetil aminometan hidroklorür (Tris HCl), biyomolekül olarak β -Nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD), Meck firmasından (Darmstadt, Germany) temin edilmiştir. Peroksidaz benzeri aktivite tayini çalışmalarında kullanılan o-fenilendiamin (OPDA) ve hidrojen peroksit (H_2O_2 , a/a %50) Sigma-Aldrich'ten tedarik edilmiştir. Deneylerde, kimyasallar herhangi bir saflaştırma yapılmadan doğrudan deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve deneysel çalışmalar için kullanılan çözeltiler taze hazırlanmıştır. Tüm deneylerde Direct-Q3, Millipore, ABD'den elde edilen deiyonize su (kimyasal direnci: 18 M Ω cm) kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tüm deneylerde kullanılan deiyonize su (kimyasal direnci: 18 M Ω cm) Millipore Direct-Q® 3 UV marka cihazdan temin edilmiştir. Kimyasalların miktar analizleri Sartorius Entris® 224I-1S marka analitik terazi ile ölçülmüş, bu kimyasalların manyetik karışımı IKA C-MAG HS 7 digital marka manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Deneysel çalışmalardaki MOF üretimi sırasında gerçekleşen ısıtma ve kurutma işlemleri Memmert UN55 marka etüv kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon ve peroksidaz benzeri aktivite tayini çalışmalarında absorbans ölçümleri The Thermo Scientific GENESYS marka UV-Visible Spectrophotometer cihaz ile yapılmıştır. Çözeltilerin pH ayarlamaları için NeoMet pH/ISE Meter pH-240L marka cihaz kullanılmıştır.

3.3. Zirkonyum Bazlı Metal Organik Yapıların Sentezi

Tez kapsamında zirkonyum bazlı metak organik yapıların diol içeren biyomoleküllerin izolasyonu ve tespiti amaçlı çıkış materyali olarak hazırlanması hedeflenmiştir. Solvothermal yöntemle sentezlenen zirkonyum bazlı metal organik nanoyapıların eldesinde kullanılan metal tuzu zirkonyum tetraklorür ($ZrCl_4$) olarak seçilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda, cam deney tüpü içine 30 mL dimetil formamid (DMF) üzerine 0.25 g zirkonyum tetraklorür eklenmiş ve ultrasonikasyon yapılarak zirkonyum tetraklorürün çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen metal çözeltisi üzerine amin grubu ($-NH_2$) içeren organik bağlayıcı olarak 0.268 g 2-aminotereftalik asit ($BDC-NH_2$) eklenmiştir. Elde edilen karışıma nanoyapı formunda metak organik kafeslerin oluşması amacıyla 5.4 mL HCl eklenmiştir. Karışımı içeren cam deney tüpü sızdırmazlık sağlayan ve basınca dayanıklı plastik septum ile kapatılmıştır. Karışım, cam şişede $80^\circ C$ 'de solvothermal yöntemle fırında ısıtılmıştır. Reaksiyon süresi sonunda etüv kapatılarak doğal yollarla oda sıcaklığına soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işlemi sonrasında santrifüj yardımıyla kristal yapısına dahil olmayan metal tuzları, bağlayıcılar veya modülatörler, çözücü ortamından uzaklaştırılmış ve etüvde $50^\circ C$ 'de 12 saat boyunca kurutulmuştur. Bu işlemler doğrultusunda malzeme kullanıma hazır hale getirilmiştir. Sentez yönteminin şematik gösterimi Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. A) Zirkonyum aminobenzendikarboksilat bazlı MOF (UiO-66-NH₂) sentez yönteminin B) FPBA'nın, MOF yapısına bağlanmasının şematik gösterimi.

3.4. FPBA'nın Zr-MOF'a Kovalent Bağlanması

Şekil 3.1.B'de MOF yapısının fonksiyonelleştirilmesinin şematik gösterimi verilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi fonksiyonel grup (örn: -NH₂ grubu) içeren ligand (örn: 2-aminotereftalik asit) kullanılarak ön-fonksiyonelleştirme yöntemiyle doğrudan MOF yapısı oluşturulmuştur. FPBA, su ortamında, tepkimeye girerek MOF yapısındaki amino grubuna Schiff baz reaksiyonu ile direkt bağlanmıştır. Yöntemde sodyum borhidrür kullanılarak, oluşan kovalent bağın stabilizasyonu sağlanmıştır. Böylece NH₂ grubu içeren MOF, FPBA ile reaksiyona sokularak MOF yüzeyine borik asit grubu içeren kromatografik ligand bağlanması sağlanmıştır (Şekil 3.1).

Tipik olarak FPBA (100 mg) içeren mutlak etanol (20 mL) ortamı içerisine sentezlenen MOF (100 mg) eklenmiş ve çözelti içerisinde ultrasonikasyon yoluyla dağıtılmıştır. Reaksiyon ortamı 40°C'de 400 rpm'de karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamına 4 ve 8. saatlerde eşit miktarlarda (2x75 mg) NaBH₄ ilave edilmiştir. İkinci NaBH₄ ilavesinden sonra karıştırmaya 15 dakika daha devam edilmiştir. FPBA bağlı Zr-MOF yapılar (UiO-66-NH₂-FPBA), santrifüjleme-dekantasyon yoluyla iki kez etanol ve DI su ile yıkanmıştır.

3.5. UiO-66-NH₂-FPBA Partiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen yapıların boyutu ve yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile incelenecektir. Enerji dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) haritalaması ile yüzey atomik bileşimi incelenecektir. Kristalin yapısı X-ışını difraksiyon (XRD) spektrofotometre ile tayin edilecektir. Yapının yüzey alanı Brunauer-Emmet-Teller (BET) ve fiziksel/kimyasal özellikleri X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) analiz yöntemleri kullanılarak tayin edilecektir. Elde edilen malzemenin fonksiyonel grupları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak tayin edilmiştir.

Elde edilen ürünlerin BET gözenek boyutu ve yüzey alanı ölçümleri laboratuvarımızda Quantochrome, Nova 2200e, ABD cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Toz malzemelerin (yaklaşık 0.1 g) BET yüzey alanı, -196 °C'deki sıvı azot ortamında azot (N₂) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak m²/g olarak ölçülmüştür.

MOF yapısının boyut ve yüzey morfolojisi görüntülenmesi amacıyla SEM analizleri yapılmıştır. Analizler, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'te GAIA3+Oxford XMax 150 EDS model cihazda ve yüksek vakum altında 30 kV'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen numunenin iletkenliğinin sağlanması için Leica ACE 600 model Au/Pd/C kaplama cihazı ile Au/Pd kaplama yapılmıştır, ardından taramalı elektron mikroskopuyla 5.0 x-40.0x büyütme ve 40µm-5µm çözünürlük aralığında görüntüler alınmıştır. EDS analizleri ile numune üzerinde belirli bir noktaya odaklanılıp bu alanların taranması sonucu numunenin yüzey atomik bileşimi % elementel oran olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen numunenin fonksiyonel gruplarının analizi Nicolet, Wisconsin, ABD marka Thermo Nicolet 380 spektrometresinde gerçekleştirilmiştir. FTIR analizinde 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında tarama yapılarak yapıdaki fonksiyonel grupların absorbands değerleri belirlenmiştir.

Elde edilen numunenin nitel yapı analizi için ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda (Ultima IV X-ray diffractometer, Rigaku Ultima IV, Japan marka) XRD cihazı kullanılmıştır. Numunenin kristalin yapısal analizi 2Θ=2-80° tarama aralığında oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Mikrokürelerin yüzey atomik bileşenlerinin belirlenmesi için EGE Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde XPS (Thermo Scientific, K-Alpha, A.B.D.) cihazı kullanılmıştır. XPS spektrumları, elde edilen grafiğin tepe yoğunlukları ve tepe konumları cinsinden ölçülerek yüzey kimyası ve malzemenin içeriği hakkında bilgi sağlamaktadır.

Numune yapısında bulunan bor metali miktarının tayinini yapmak için ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi) cihazı kullanılmıştır. Perkin Elmer Optima 4300DV marka cihaz ile hazırlanan malzemedeki Bor yoğunluğu, ışıın-madde etkileşimlerinin incelenmesi sonucu kütlece tespit edilmiştir.

Partiküllerin boy-boy dağılımları Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'te Malvern marka Mastersizer 3000 Partikül Boyutu Analiz cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Analiz sonuçları 3 tekrarlı kontrollü deney çalışmaları sonucunda standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

3.6. Diol İçeren Biyomolekül Adsorpsiyon-Desorpsiyon Deneyleri

Model diol içeren biyomolekül olarak seçilen β -NAD'ın seçici olarak MOF'lara bağlanma mekanizması ve adsorpsiyon-desorpsiyon süreci sırasıyla Şekil 3.2A ve 3.2B'de gösterilmektedir. β -NAD ucunda bulunan diol ile fenilborik asit ligandı arasında tersinir formda halkasal borat esteri oluşumu ile biyomolekülün sorbent üzerine bağlanması sağlanacaktır. Bununla birlikte, adsorpsiyon işlemi genellikle, yıkama, koşullandırma, numune yükleme ve elüsyon gibi basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 3.2).

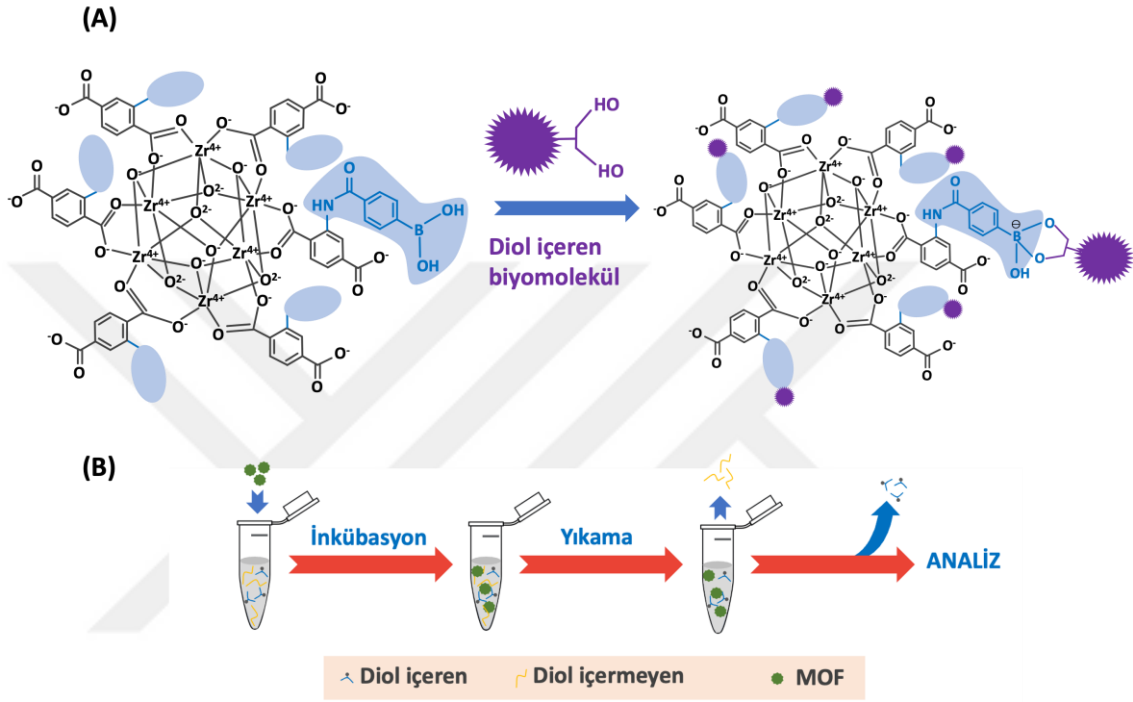
Bu kapsamda hazırlanan malzemenin β -NAD adsorpsiyon kapasitesinin bulunması için öncelikle 2 mg/mL β -NAD stok çözeltisi hazırlanmıştır. Malzemenin adsorpsiyon kapasitelerini belirleyebilmek için temas süresi (60 dk), sorbent miktarı (5 mg) ve ortam sıcaklığı (293K) sabit tutularak ortam pH'ı (5-9) ve β -NAD derişimi (0.025-2 mg/mL) parametrelerinin etkileri ayrı olarak incelenmiştir.

Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan adsorpsiyon tamponları şu şekildedir:

pH 5/ pH 6 : 25 mM HOC(CO₂H)(CH₂CO₂H)₂/ HOC(COONa)(CH₂COONa)₂ · 2H₂O

pH 7 : 25 mM NaH₂HPO₄/ Na₂HPO₄

pH 8 / pH 8.5 / pH 9 : 25 mM HEPES



Şekil 3.2. A) Model biyomolekül olarak seçilen β-NAD'ın seçici olarak UiO-66-NH₂-FPBA yapısına bağlanma mekanizması ve B) β-NAD'ın adsorpsiyon-desorpsiyon süreci

Adsorpsiyon çalışmalarında 5 mg sorbent tartılıp istenilen derişimde hazırlanmış β-NAD çözeltisi içine eklenmiştir. Ortam pH=8.5'e 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl yardımıyla ayarlanarak 60 dk süre boyunca oda sıcaklığında rotator yardımıyla karıştırılmıştır. Adsorpsiyon sonunda çözelti içerisinde kalan β-NAD derişimlerinin belirlenmesi için UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 260 nm dalga boyunda ölçümler kaydedilmiştir. Optimum şartlar belirlenerek adsorpsiyon belirlenen koşullarda tekrarlanmıştır. Çözücü olarak ise deiyonize su ve UV-Vis spektrofotometre cihazında okumaları yapabilmek için 1cm'lik quartz küvetler kullanılmıştır.

Adsorpsiyon sürecinde sistem dengeye ulaştığında sorbentin birim kütlesinin adsorpladığı madde miktarı aşağıdaki Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} V \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

q_e : Sorbentin dengede adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)

C_0 : β -NAD'ın (adsorplanan biyomolekülün) başlangıç derişimi (mg/mL)

C_e : β -NAD'ın (adsorplanan biyomolekülün) denge anındaki (adsorplanmadan kalan) derişimi (mg/mL)

V : Çözelti hacmi (mL)

m : Sorbent ağırlığı (g)

Desorpsiyon çalışmalarında adsorpsiyon işleminde kullanılan 5 mg sorbent, desorpsiyon çözeltisi (pH 7 100 mM fosfat tamponu, 300 mM sorbitol) içine eklenmiştir. Çözelti 60 dk süre boyunca oda sıcaklığında rotator yardımıyla karıştırılmıştır. Desorpsiyon sonunda çözelti içerisinde kalan (desorplanan) β -NAD derişimlerinin belirlenmesi için UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 260 nm dalga boyunda ölçümler kaydedilmiştir.

Elde edilen izotermeler, Langmuir ve Freundlich izotermal modelleri ile değerlendirilmiştir. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermeleri sırasıyla Eşitlik (3.2) ve Eşitlik (3.3) ile tanımlanmaktadır.

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_L q_m C_e} \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

$$\lg q = \lg K_f + \frac{1}{n} \lg C_e \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

C_e = β -NAD'ın (adsorplanan biyomolekölün) denge anındaki (adsorplanmadan kalan) derişimi (mg/mL)

q = Sorbentin dengede β -NAD adsorpsiyon miktarı (mg/g)

q_m = Sorbentin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)

K_L = Langmuir sabiti

K_f = Freundlich sabiti

$1/n$ = Boyutsuz sabit

Adsorpsiyon kinetiği, adsorbent yüzeyine β -NAD'ın adsorpsiyonu sırasında hangi mekanizmaların gerçekleştiğini belirlemek için kullanılır. Adsorpsiyon kinetiği aşığıda verilen Psödo birinci ve ikinci dereceden eşitlikleri ile açıklanır (Eşitlik 3.4 ve 3.5).

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_t) - \frac{k_1}{2.303} t \quad \text{Eşitlik 3.4}$$

$$\frac{t}{q_t} = \left[\frac{1}{k_2 q_e^2} \right] + \frac{1}{q_e} t \quad \text{Eşitlik 3.5}$$

Eşitlik 3.4'te k_1 psödo 1. dereceden hız sabiti (dk^{-1}) ve q_e ve q_t (mg/g) sırasıyla adsorpsiyon dengede ve t zamanında adsorbe edilen biyomolekül adsorpsiyon miktarıdır. $\ln(q_e - q_t)$ ' nin t ' ye karşı çizilen grafiği ile 1. dereceden kinetiğinin uygunluğu değerlendirilir. Eşitlik 3.5' te k_2 (g/mgdk) 2. dereceden reaksiyon hız sabitidir. t/q_t ' nin t 'ye karşı grafiği ile 2. dereceden kinetiğinin uygunluğu değerlendirilir.

3.7. UiO-66-NH₂-FPBA Partikölün Peroksidaz-Mimetik Aktivitesi

FPBA bağı MOF yapıların (UiO-66-NH₂-FPBA) peroksidaz benzeri aktivitesi, pH 8.5 tampon ortamında o-fenilendiamin (OPDA) ve H₂O₂ kullanılarak araştırılmıştır. UiO-66-NH₂-FPBA (12.5 mg), seçilen tampon çözeltisi ile üç kez santrifüjleme yoluyla yıkanmıştır. Daha sonra, belirli bir pH'da (pH 8.5) OPDA çözeltisi (50–3000 µM, 2 mL) içerisinde dağıtılmıştır. Konsantre H₂O₂ solüsyonu (5 µL, %50 w/w) ortama eklenmiştir. Reaksiyon, karanlıkta, oda sıcaklığında, rotatorda 100 rpm'lik bir dönüş hızıyla gerçekleştirilmiştir. UiO-66-NH₂-FPBA'nın santrifüjleme yoluyla ayrılmasından sonra, süpernatanın absorbansı reaksiyonun 1.dakikasında UV-vis spektrofotometrede (Thermo Scientific, ABD) 416 nm'de ölçülmüştür. OPDA oksidasyonu için 416 nm'de absorbansın izlenmesiyle Lambert Beer yasasına göre kararlı durum reaksiyon hızları elde edilmiştir (Eşitlik 3.6).

$$A = \varepsilon \times b \times C.$$

Eşitlik 3.6

A ölçülen absorbanstır; ε , OPDA oksidasyon ürününün molar sönme katsayısıdır ($\varepsilon = 16,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); b, ışığın yol uzunluğudur (b = 1 cm).

Maksimum substrat tüketim hızı ($-r_m$, µM OPDA/dak) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m), Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. r_{max} , enzimin doymuş substrat değerinde reaksiyon hızıdır. K_m , Michaelis sabiti olarak adlandırılır ve enzimatik reaksiyon hızı r_m , r_{max} 'ın yarısına ulaştığındaki substrat derişimini [S] ifade eder. $1/r_m$ 'in $1/[S]$ 'in fonksiyonu olarak çizilmesiyle oluşturulan doğrunun X eksenindeki kesişimi $-1/K_m$ 'yi, Y eksenini ise $1/r_{max}$ 'ı temsil etmektedir.

3.8. Tek Basamaklı Tayin Protokolünde UiO-66-NH₂-FPBA Kullanılarak Tampon Ortamında β -NAD Tayini

UiO-66-NH₂-FPBA (5 mg), farklı derişimlerde hazırlanmış β -NAD içeren çözelti (1 mL, 25 mM HEPES tamponu, pH 8.5) içinde vortekslenerek dağıtılmıştır. Dispersiyon, oda sıcaklığında 100 rpm'de 1 saat süreyle rotatorda karıştırılmıştır. Daha sonra ortama

OPDA çözeltisi (1 mL, 6.0 mM) ve H₂O₂ (2 µL, %10 w.w⁻¹) eklenmiştir. Nihai dispersiyon, kolorimetrik reaksiyonun tamamlaması için aynı koşullar altında 20 dakika süreyle karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda dispersiyon 4000 rpm'de (1400 g) 4 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanın absorbanası UV-Vis spektrofotometresinde 416 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon grafiği ölçülen absorbanas verileri ile elde edilmiştir. β-NAD için tayin limiti (limit of detection, LOD) Eşitlik 3.7' e göre hesaplanmıştır. Burada σ ve m sırasıyla standart sapma ve kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

$$\text{LOD} = 3\sigma/m$$

Eşitlik 3.7

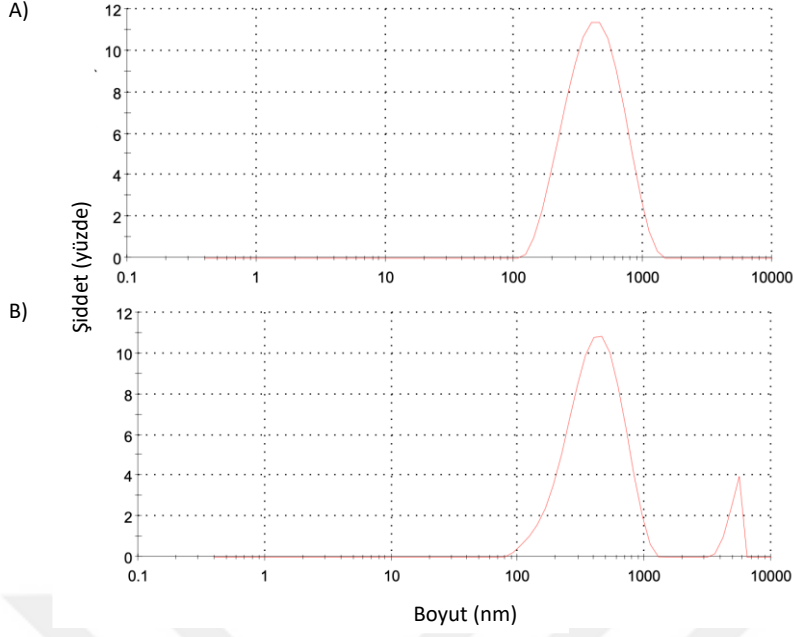
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında FPBA bağlı Zr-MOF yapıların (UiO-66-NH₂-FPBA partikülü) sentez protokolü, karakterizasyon sonuçları, boronat afinite kromatografisi sorbenti olarak kullanımı, peroksidaz benzeri aktivite ölçüm sonuçları ve model biyomolekül olarak seçilen β -NAD'ın tampon ortamında izolasyonunda ve kolorimetrik tayininde kullanılmasına ait deney sonuçları incelenmiştir.

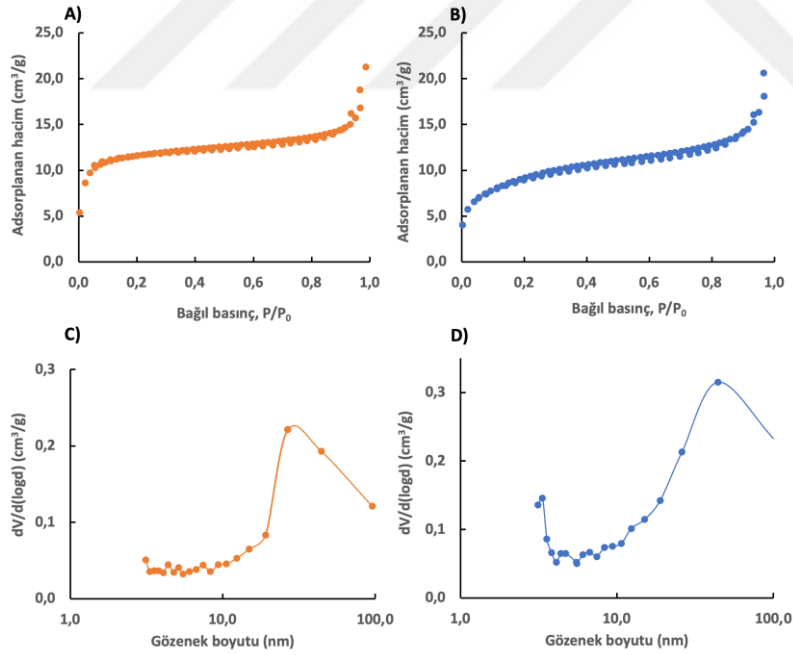
4.1. UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA Partiküllerinin Yapısal ve Kimyasal Karakterizasyonları

UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin SEM görüntüleri Şekil 4.1 'de gösterilmektedir. Sem görüntüleri incelendiğinde UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin düzgün bir kübik kristal yapıda olduğu ve modifikasyondan sonra ortaya çıkan UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin yüzeyi daha pürüzlü hale geldiği görülmektedir. UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin hafifçe topaklaşmış şekilde olmasının nedeninin organik bağlayıcı nedeniyle, MOF'ların gözeneklerinin NH₂ grubu ile işlevselleştirilmesi sonucu bloke edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [38].

Ortalama çap değerleri Dinamik ışık saçılımı metodu ile ölçülmüştür. UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin ortalama boyut değerleri sırasıyla 0.3764 ± 0.0040 μm ve 0.4523 ± 0.0178 μm olarak bulunmuştur. Şekil 4.2'de, UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerine ait ortalama partikül boyutu grafikleri verilmektedir. FPBA'nın kovalent bağlanması için uygulanan türevlendirme yöntemiyle UiO-66-NH₂'nin ortalama boyutunda ve boyut dağılımında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Sonuçlar elektron mikroskobu görüntüleri ile iyi bir uyum içindedir. Elde edilen değerler mikrokürelerin afinite ortamından santrifüjleme yoluyla kolayca ayrılması için uygundur.

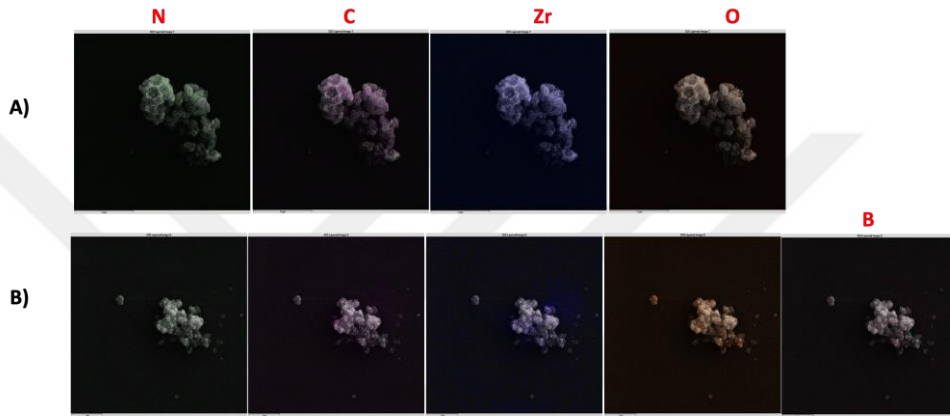


Şekil 4.2, A)UiO-66-NH₂ ve B) UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerine ait ortalama partikül boyutu grafikleri



Şekil 4.3. A)UiO-66-NH₂ ve B) UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerine ait azot adsorpsiyon-desorpsiyon eğrileri; C)UiO-66-NH₂ ve D) UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerine ait gözenek boyutu dağılım eğrileri

UiO-66-NH₂-FPBA ve UiO-66-NH₂ partiküllerine ait Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi (EDS) haritalama görüntüleri Şekil 4.4 'te verilmektedir. EDS çalışmaları C, O, N, Zr ve B elementlerinin kristal üzerinde düzgün bir şekilde dağıldığını göstermektedir. Aynı zamanda Bor (B) atomu için alınan EDS haritalama sonuçları, UiO-66-NH₂-FPBA yapısında FPBA'nın varlığını kanıtlamaktadır (Şekil 4.4.B). UiO-66-NH₂-FPBA partikülünün FPBA içeriği, bor içeriğinin (55 mg B/g sorbent) ICP-OES ile belirlenmesiyle 5.09 mmol FPBA/g sorbent olarak hesaplanmıştır.



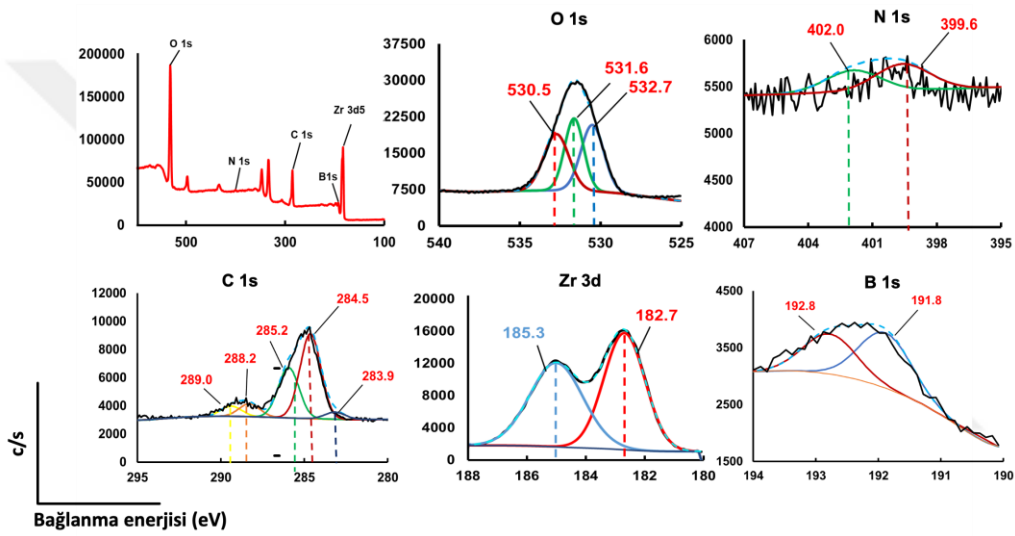
Şekil 4.4. A)UiO-66-NH₂ ve B) UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerine ait EDS haritalama analiz sonuçları

UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin yüzey kimyasal durumları X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak tespit edilmiştir. XPS spektrumu ile yapıdaki C, N, O, B ve Zr elementlerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Şekil 4.5 'te gösterildiği gibi C 1s, O 1s, N 1s, B 1s ve Zr 3d için sırasıyla 285.30, 531.85, 399.97, 192.09 ve 183.70 eV'de en yüksek pik yoğunlukları gözlenmiştir.

Şekil 4.5 'te görüldüğü gibi, C 1s spektrumu beş pik şeklinde, sırasıyla 283.9, 284.5, 285.2, 288.2 ve 289.0 eV'ye karşılık gelen C-B, C-C/C=C, C-O, C-N ve C-C=C bağlarını göstermektedir. O 1 spektrumu, B-O-H (530.5 eV), C-O (531.6 eV) ve C=O (532.7 eV) gruplarına karşılık gelen dört pik şeklinde ayrıştırılabilir.

Zr 3d spektrumu iki pik şeklinde, sırasıyla 182.7 (Zr 3d_{5/2}) ve 185.3 eV (Zr 3d_{3/2}) 'ye karşılık gelen yüksek pik yoğunlukları UiO-66-NH₂ yapısının karakteristik özelliğidir [41].

N 1s spektrumu analiz edildiğinde N-H bağı 399.6 eV'ye ve UiO-66-NH₂-FPBA yapısındaki amino grubu ile FPBA'daki aldehit grubu arasındaki reaksiyonu kanıtlayan -N-C=O bağı 402.00 eV'ye karşılık gelen pikler gözlemlenmiştir. B 1s spektrumlarında, B-O (192.8 eV) ve B-C'nin (191.8 eV) karakteristik tepe noktaları gözlenmiştir [41, 42].

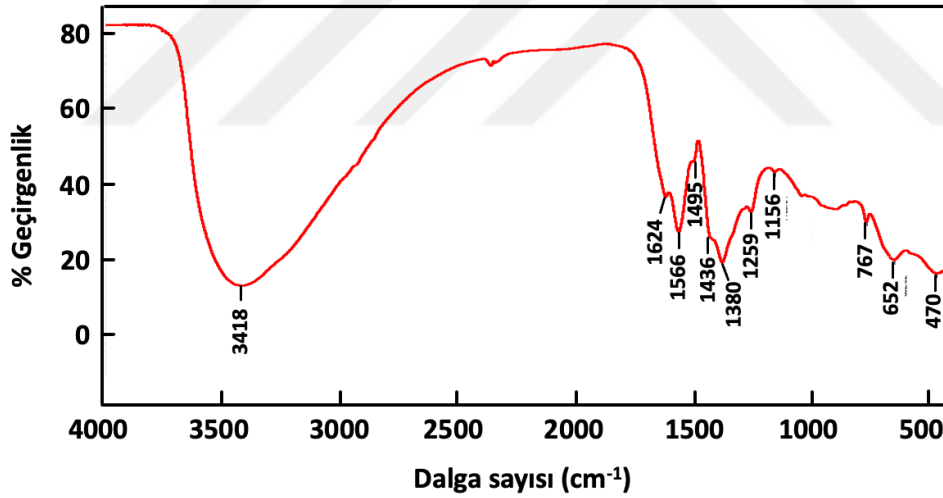


Şekil 4.5. UiO-66-NH₂-FPBA partikülüne ait genel XPS spektrumu (survey spectrum) ve çekirdek seviye spektrumları (core level spectra of O 1s, N 1s, C 1s, Zr 3d ve B 1s)

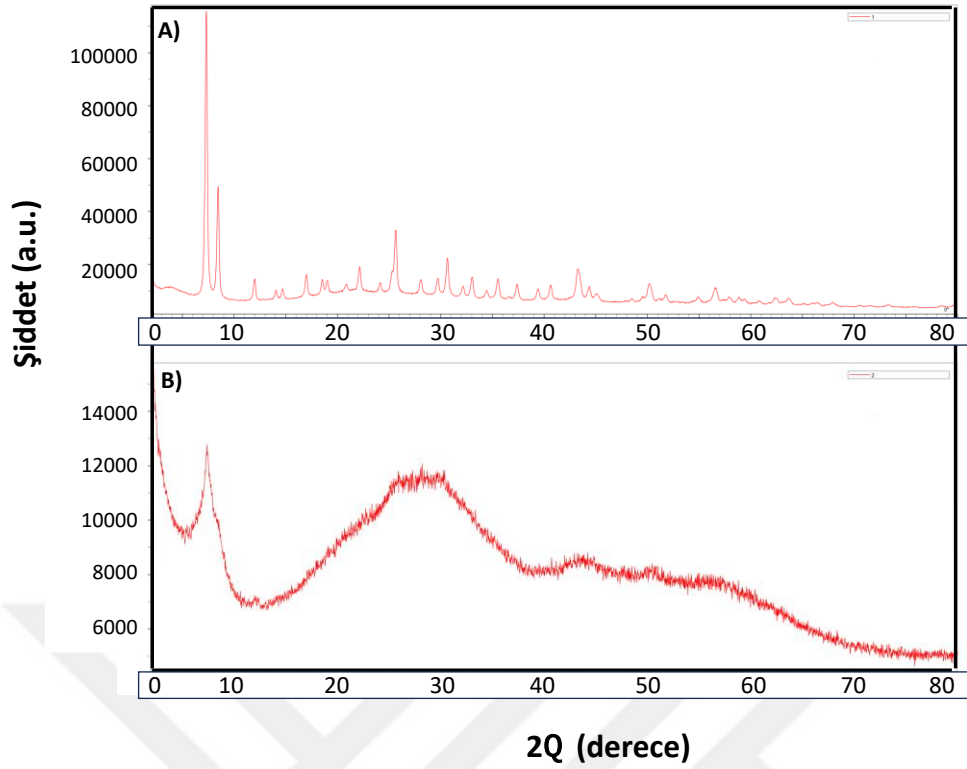
UiO-66-NH₂-FPBA partikülünün başarılı bir şekilde hazırlandığı FT-IR karakterizasyonu ile da kanıtlanmıştır (Şekil 4.6). Yaklaşık 3418 cm⁻¹ bandlarında görülen pikler UiO-66-NH₂-FPBA yapısındaki aromatik amino gruplarının (-NH₂ titreşimlerinin) etkisiyle oluşmuştur. Şekil 4.6' da yaklaşık 1624 cm⁻¹ ve 1566 cm⁻¹ bandındaki pikler C-O'nun gerilme titreşimlerinin, 1495 cm⁻¹'lik bandında görülen keskin pik C-C gerilme titreşimlerinin, 1436 cm⁻¹'lik bandında görülen keskin pik C-N gerilme titreşimlerinin varlığını göstermektedir. 1380 cm⁻¹ ve 1259 cm⁻¹ bandındaki pikler, B-O-H gerilme titreşimi; 1156 cm⁻¹ civarındaki pik, B-C gerilme titreşimi

sonucunda oluşmuştur. Bu sonuçlar yapıdaki borik asit varlığını da desteklemektedir. 767 cm^{-1} , 652 cm^{-1} ve 470 cm^{-1} civarındaki karakteristik pikler, UiO-66-NH₂ yapısı üzerindeki Zr-O titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [43,44].

Şekil 4.7’de, sentezlenen UiO-66-NH₂-FPBA partikülüne ait XRD grafiği gösterilmektedir. Fazların maksimum pik yaptığı 2θ değerleri 7.4, 8.5 ve 25.8 olacak şekilde veri tabanı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Grafiğe bakıldığında, elde edilen verilerin literatürde tanımlanmış MOF yapısı için XRD verileri ile iyi bir uyum içinde olduğu görülmüştür. UiO-66-NH₂-FPBA partikülünde kristal tepe noktaları ile geniş amorf tepe noktalarının (10° - 25°) karışımı mevcuttur. XRD spektrumuna bakıldığında daha az kristal yapıya sahip olmasına rağmen $2\theta = 5\text{--}10^\circ$ ’de UiO-66-NH₂ MOF yapısının karakteristik sinyalinin varlığı (Şekil 4.7b), boronik asit gruplu MOF yapısının başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir [45].



Şekil 4.6. UiO-66-NH₂-FPBA partikülüne ait FTIR spektrumu



Şekil 4.7. A) UiO-66-NH₂ ve B) UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerine ait XRD grafikleri

4.2. UiO-66-NH₂-FPBA Partiküllerinin Boronat Affinite Sorbenti Olarak Kullanılarak Yapılan Denge β -NAD Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları

Biyomolekül tayinine yönelik biyosensörlerin sentezi amacıyla öncelikle diol içeren biyomoleküle selektif olarak duyarlı halde olan metal-organik kafesler (MOF'lar) kullanılarak maksimum adsorpsiyon koşullarında kesikli sistemde β -NAD'ın izolasyonu sağlanmıştır. β -NAD, siklik boronat ester oluşumu ve ayrışması yoluyla boronat affinite kromatografisinde kullanılan sorbentlerinin adsorpsiyon ve desorpsiyon davranışlarını test etmek için uygun diol işlevselliğini taşıyan küçük bir moleküldür.

UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerinin maksimum adsorpsiyon performansına ulaşmak için adsorpsiyon ve desorpsiyon adımları ayrı ayrı optimize edilmiştir. Malzemelerin biyomolekül denge adsorpsiyonu üzerine adsorpsiyon ortam pH'ının ve başlangıç biyomolekül (β -NAD) derişiminin etkisi incelenmiştir. β -NAD adsorpsiyonu sonrasında, desorpsiyon ortamı olarak kullanılan 100 mM pH 7 PB tamponu içerisinde

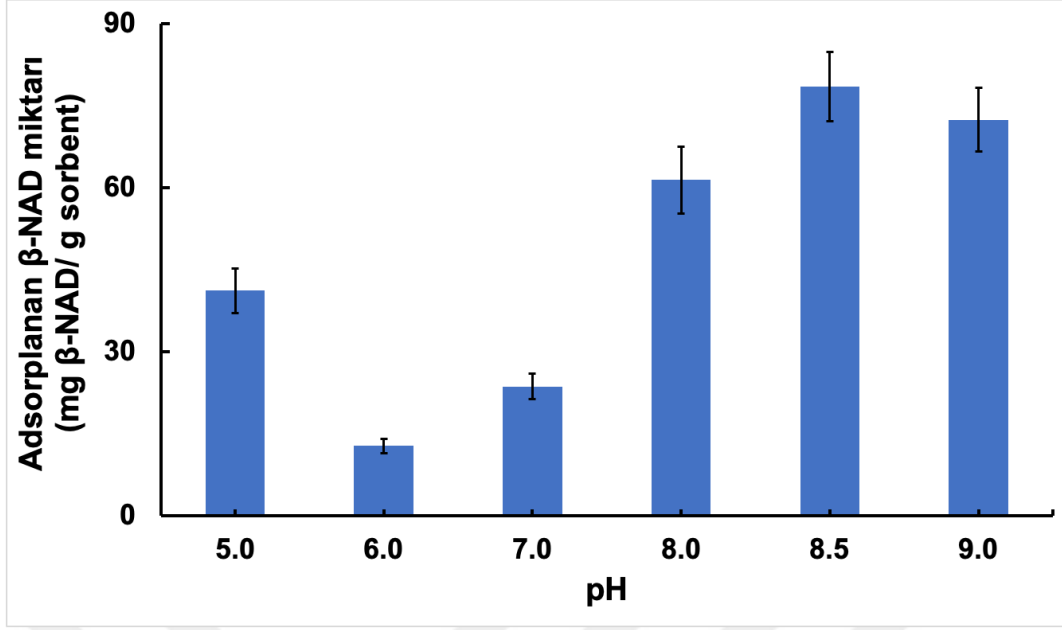
farklı miktarlardaki desorpsiyon ajanı sorbitolun desorpsiyon verimi üzerine etkisi tayin edilmiştir.

4.2.1. Adsorpsiyon Ortam pH'nın Adsorpsiyon Verimine Etkisi

Boronat afinitesi için ortam pH değeri çok önemlidir. Boronik asit grupları, ortam pH'ı biyomolekölün pKa'sından daha büyük olduğunda, tersine çevrilebilir bir kovalent reaksiyon yoluyla biyomolekülleri yakalayabilmektedir. Ayrıca ortam pH'ı asidik hale getirildiğinde boronat ester bağı ayrışır ve hedef biyomolekül salınabilir.

β -NAD adsorpsiyonunda ortam pH değerinin (5-9) malzemenin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini belirlemek için, 2 mg/mL biyomolekül derişiminde, 5 mg malzeme ve 120 dakika temas süresi ile çalışılmıştır. MOF bazlı malzemelerde çözünmeden dolayı yapılarında bozunma olabileceği için yüksek pH değerlerinde (aşırı alkali şartlarda) deneyler yapılmamıştır. Şekil 4.8 'de gösterildiği gibi pH değerleri 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5 ve 9.0 olan β -NAD çözeltisi ortamında biyomolekül adsorpsiyon çalışmaları sonucunda pH 8.5 olduğunda malzemenin β -NAD'ı iyi bir şekilde yakaladığı, yüksek bağlanma yeteneği sergileyerek maksimum denge β -NAD adsorpsiyon miktarı (mg/g) elde edildiği görülmektedir. Aynı malzeme ile pH 5.0-7.0 aralığında elde edilen β -NAD denge adsorpsiyon miktarları, alkali bölgede elde edilenlerden daha düşüktür.

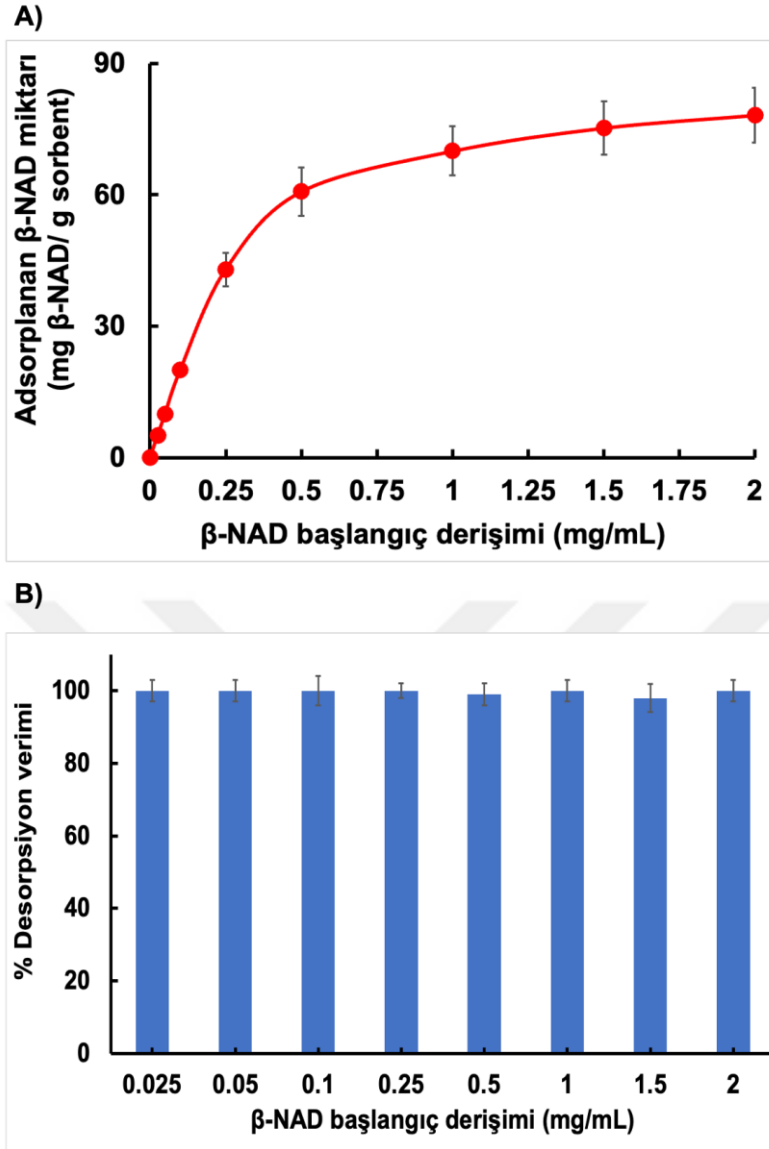
Bilindiği gibi fenil boronik asit ligandının pKa'sı, hidrofilik tersiyer formun oluşmasıyla en yüksek derecede iyonizasyonun meydana geldiği pH hakkında fikir vermektedir. Bu pH değerinde, uygun siklik boronat ester oluşumunu sağlanmaktadır. FPBA'nın pKa'sı 7.6'dır ve maksimum β -NAD adsorpsiyonunun gözlemlendiği pH değeri bu değerden yüksek olmalıdır [55]. Bu nedenle, maksimum denge β -NAD adsorpsiyonunun pH 8.5 olması geleneksel BA mekanizmasının geçerliliği ile açıklanabilir.



Şekil 4.8 UiO-66-NH₂-FPBA partikülü tarafından β -NAD adsorpsiyonu üzerinde pH'ın etkisi (temas süresi: 60 dakika, sorbent derişimi 5 mg/mL, T = 25°C).

4.2.2. Başlangıç β -NAD Derişiminin Adsorpsiyon Verimine Etkisi

Başlangıç biyomolekül derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini incelemek için 25 mM, pH:8.5 HEPES tampon ortamında, sorbent derişimi 5 mg/mL olacak şekilde 0.1-2.0 mg/mL aralığında biyomolekül derişimlerinde çalışmalar yapılmıştır. Şekil 4.9A'da başlangıç β -NAD derişiminin partikülün adsorpsiyon kapasitesine etkisi gösterilmektedir. Grafikten gözlemlendiği gibi β -NAD adsorpsiyon verimi, biyomolekül derişimi arttıkça artmaktadır. Geliştirilen malzemenin denge β -NAD adsorpsiyon kapasitesi 80 mg β -NAD/g sorbent olarak belirlenmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak sorbitol kullanılarak nötr pH'ta elde edilen neredeyse kantitatif desorpsiyon verimleri, UiO-66-NH₂-FPBA yapısına diol bağlanmasının FPBA ligandı varlığıyla siklik boronat ester oluşumu yoluyla gerçekleştiğini açıkça göstermektedir (Şekil 4.9B).



Şekil 4.9 (A) UiO-66-NH₂-FPBA partikülü kullanılarak denge β -NAD adsorpsiyon miktarı üzerine başlangıç β -NAD derişiminin etkisi (B) β -NAD desorpsiyon verimi üzerine başlangıç β -NAD derişiminin etkisi

4.2.3. Adsorpsiyon İzotermi

Farklı başlangıç β -NAD derişimleri (0.025-2 mg/mL) kullanılarak yapılan adsorpsiyon çalışmalarında ulaşılan denge derişimleri ile birim sorbent başına adsorplanan madde miktarı arasındaki ilişkinin ortaya konması amacıyla Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri kullanılmıştır.

Eşitlik (4.1) ve (4.2)'te verilen eşitlikler ile çizilen eğrilerin eğim değerlerinden adsorpsiyon izoterm sabitleri elde edilmiştir. Eşitliklerde; q_e , sorbent tarafından adsorplanan molekül miktarını (mg/g); C_e , dengedeki molekül derişimini (mg/L) ifade etmektedir [46, 47].

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad \text{Eşitlik 4.1}$$

$$\log q_e = \log k_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad \text{Eşitlik 4.2}$$

Bu denklemlerde q_e (mg/g) adsorplanan β -NAD miktarını belirlemektedir. C_e (mg/L) dengedeki β -NAD derişimidir. q_m (mg/g) maksimum adsorpsiyon kapasitesidir. K_L Langmuir adsorpsiyon sabiti, K_f (L/g) ve $1/n$ model parametreleridir.

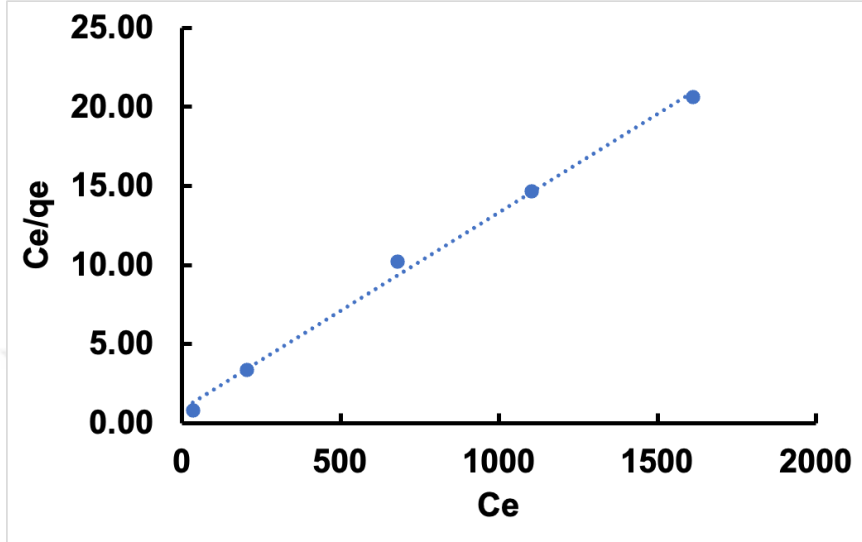
Denge durumunda adsorpsiyon verilerinin analizi farklı adsorpsiyon izotermeleri yardımıyla (Langmuir ve Freundlich izotermeleri) incelenmiştir (Şekil 4.10). Langmuir sabitleri K_L ve q_m , C_e/q_m ve C_e 'nin doğrusal grafiğinin kesişim noktasından ve eğiminden bulunmuştur (Şekil 4.10.A). Freundlich sabitleri K_F ve n , $\ln C_e$ ve $\ln q_e$ 'nin doğrusal grafiğinin kesişim noktasından ve eğiminden bulunmuştur (Şekil 4.10.B).

Bu izotermeler yardımıyla elde edilen deneysel verilere bakıldığında en yüksek korelasyon katsayısı (R^2) değerinden, adsorpsiyon mekanizmasının Freundlich modeli ($R^2 = 0.9789$) yerine Langmuir modeline ($R^2 = 0.9959$) uygunluk gösterdiği söylenebilmektedir (Çizelge 4.1).

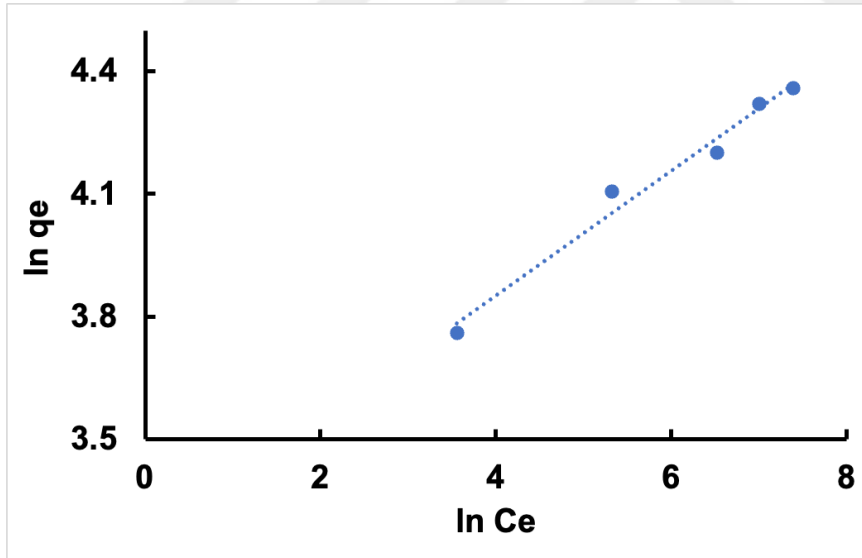
Bu nedenle sorbent yüzeyinin homojen olduğu, yüzeyin adsorplanan moleküller tarafından tek tabaka ile kaplandığı ve yüzeyin her tarafında adsorpsiyon enerjisinin aynı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Langmuir izoterminde adsorpsiyon kapasitesini ifade

eden $Q_{\max}$ değeri, $q_m=80.00$ mg/g ve adsorpsiyon enerjisine işaret eden K_L değeri ise, $K_L=0.014$ L/mg olarak bulunmuştur.

A)



B)



Şekil 4.10. UiO-66-NH₂-FPBA partikülü üzerine β -NAD adsorpsiyonu için elde edilen A) Langmuir izoterm ve B) Freundlich izoterm grafikleri

Langmuir izoterminin daha ileri bir analizi boyutsuz bir temele dayanarak yapılabilir. Denge parametresi, R_L , aynı zamanda ayırma faktörü olarak da bilinir ve Eşitlik (4.3) ile gösterilmektedir.

$$R_L = \frac{1}{1+K_L C_0}$$

Eşitlik 4.3

Eşitlikte C_0 (mg/L), en yüksek β -NAD başlangıç derişimidir. R_L parametresi, izoterm şeklinin uygun olduğunun ($0 < R_L < 1$), ve ya uygun olmadığının ($R_L > 1$) bir göstergesidir. R_L değerinin 0.042 olarak bulunması β -NAD 'ın adsorban üzerindeki adsorpsiyon davranışının, 80.0 mg/g maksimum adsorpsiyon kapasitesi (q_m) ile olumlu olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir [47].

Çizelge 4.1. Langmuir ve Freundlich İzoterm İdenlem Parametreleri.

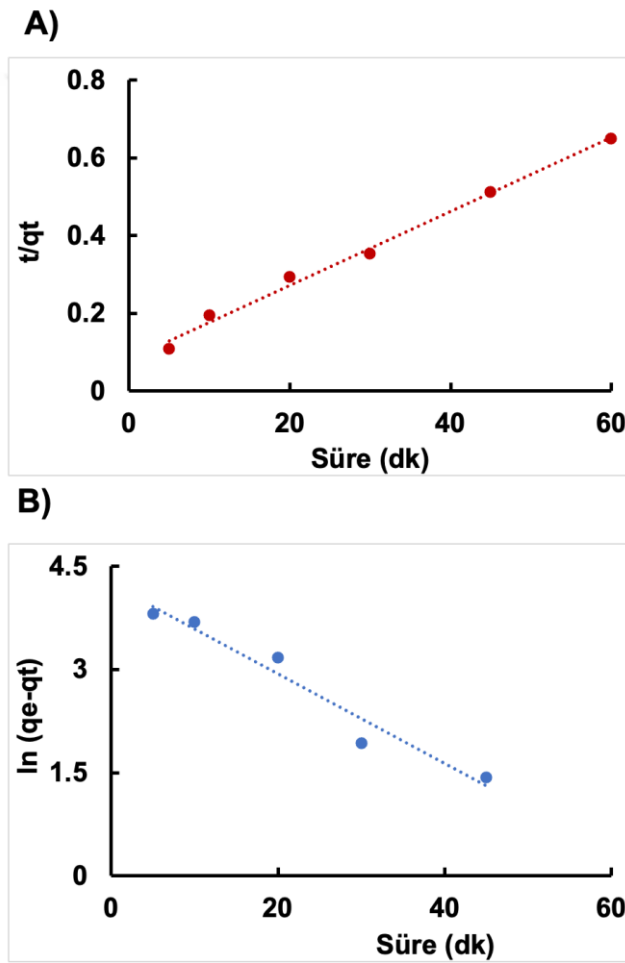
Freundlich İzoterm		
$K_f ((\text{mg/g})(\text{mg/L})^{1/n})$	n	R^2
25.53	6.55	0.9789
Langmuir İzoterm		
$q_m(\text{mg/g})$	$K_L (\text{l/mg})$	R^2
80.00	0.014	0.9959

4.2.4. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyonun denge durumuna ulaşması için geçen sürenin yani adsorpsiyon hızının belirlenmesi oldukça önemli bir bilgidir [48]. Bunun belirlenebilmesi için, β -NAD adsorpsiyonu 1. derece ve 2.derece kinetik modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. β -NAD'ın adsorpsiyonuna ait Eşitlik 4.2 'e göre çizilen 1. derece ve 2.derece hız grafikleri Şekil 4.11 'de gösterilmektedir. Grafiğin eğimi ve kesim noktasından

hesaplanan hız sabitleri (k_1 ve k_2) ve adsorpsiyon kapasiteleri (q_e) değerleri Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Reaksiyon derecesinin nihai değerlendirmesi yapılırken, model parametre değerlerinin yorumlanmasına ve özellikle R^2 ve $q_{eq,cal}$ değerine ve bu parametrenin değerinin deneysel olarak belirlenen $q_{eq,exp}$ ’e nasıl karşılık geldiğine dayanması gerektiğine dikkat edilmelidir. R^2 değerleri incelendiğinde hem 1.derece hem de 2.derece kinetik modeline uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11. β -NAD adsorpsiyonunun psödo a) 1. Dereceden kinetiği b) 2. Dereceden kinetiği (β -NAD derişimi: 2 mg/mL, sorbent derişimi: 5 mg/mL, pH: 8.5)

Çizelge 4.2. β -NAD'ın adsorpsiyonuna ait kinetik değerler

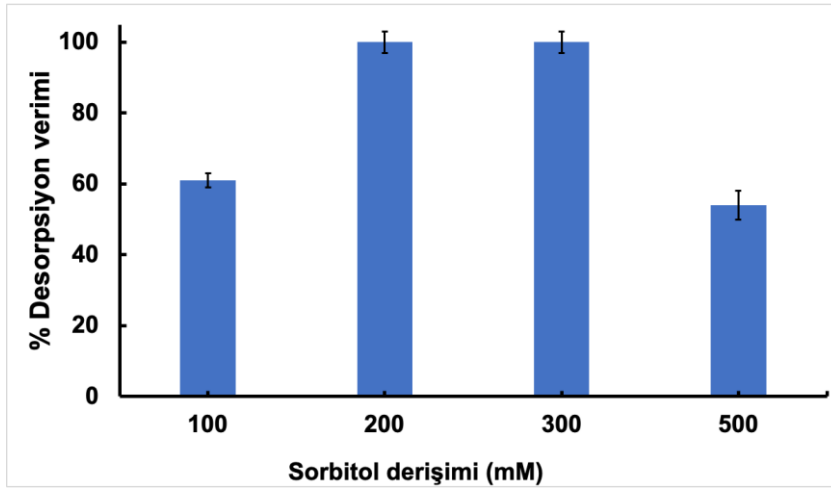
	Psödo 1. dereceden			Psödo 2. Dereceden		
qe, exp (mg/g)	k₁ (dk⁻¹)	qe, cal (mg/g)	R²	k₂ (g.mg⁻¹dk⁻¹)	qe, cal (mg/g)	R²
80	0.065	70.1	0.9519	0.001	105	0.9927

4.2.5. Elüsyon Tamponundaki Sorbitol Derişiminin Etkisi

Sorbitol, adsorplanan β -NAD 'ın elüsyonu için yarışmalı diol olarak kullanılmıştır. Bir dizi elüsyon tamponu, elüsyon tamponuna 100 ila 500 mM arasında değişen farklı sorbitol derişimleri eklenerek test edilmiştir. Şekil 4.12'de gösterildiği gibi β -NAD elüsyonu sorbitol derişiminin artmasıyla artmaktadır. β -NAD, > 100 mM sorbitol derişimi için ≥ 90 oranında desorpsiyon verimine ulaşılmıştır. 300 mM sorbitol derişiminde, neredeyse kantitatif desorpsiyon verimine ulaşılmıştır ve bu nedenle sonraki kullanımlar için desorpsiyon ortamı olarak 300 mM sorbitol içeren pH 7.0, 100 mM sodyum fosfat tamponu seçilmiştir.

4.2.6. Boronat Sorbentlerinin Biyomolekül Adsorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması

Tez kapsamında sentezlenen UiO-66-NH₂-FPBA partikülün β -NAD'a bağlanma özelliği literatürde rapor edilen malzemelerin adsorpsiyon kapasitesi, elüsyon pH'ı ve adsorpsiyon denge süresi özellikleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.3' e bakıldığında geliştirilen malzemenin bağlanma yeteneğinin rapor edilen çoğu sorbentlerden daha iyi olduğu anlaşılmaktadır. Yapılan deneylerde adsorpsiyon süresi 60 dakika olmasına rağmen partikülün denge adsorpsiyon kapasitesinin (q_m) 80 mg/g'e ulaştığı ve β -NAD'ın, nötr pH değerinde elüsyon edildiği görülmektedir.



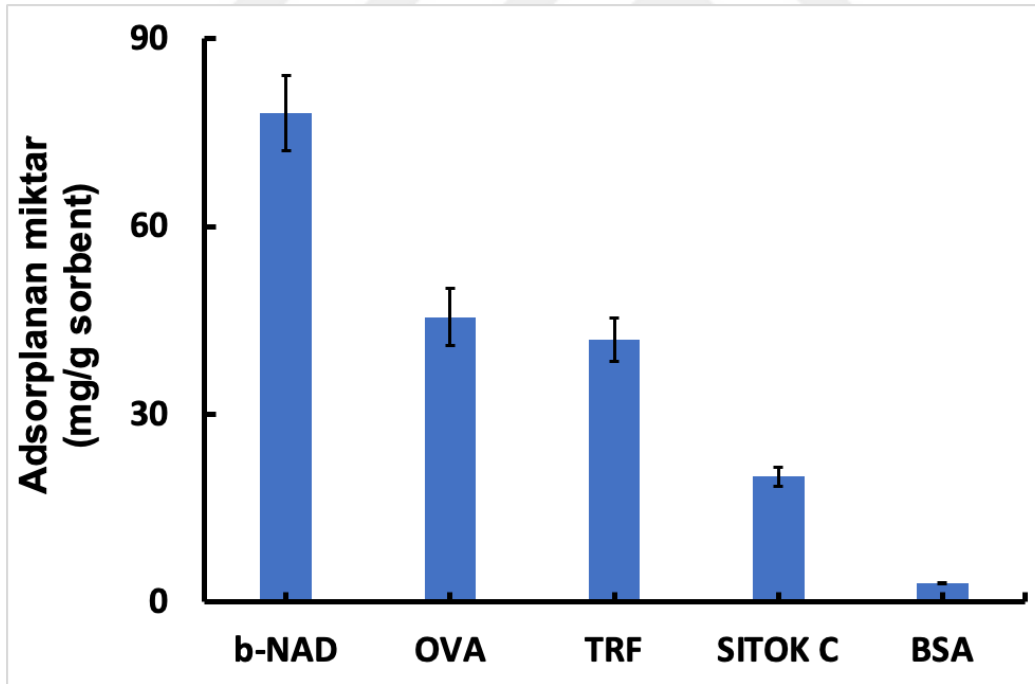
Şekil 4.12. UiO-66-NH₂-FPBA partikülün β -NAD adsorpsiyonu üzerinde sorbitol derişiminin etkisi (temas süresi: 60 dakika, sorbent derişimi: 5 mg/mL, β -NAD derişimi: 2mg/mL, T = 25°C).

Çizelge 4.3. Farklı malzemelerin diol içeren biyomoleküllere bağlanma yetenekleri

Adsorbent	Biyomolekül	Adsorpsiyon süresi (min)	Q (mg/g)	Elüsyon pH	Ref
PEIPBA-SNPs	HRP	120	22.5	2.7	49
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -BA	TRF	240	5.46	4.5	50
Fe ₃ O ₄ @pTiO ₂ -VPBA	OVA	40	78	2.7	51
SiO ₂ @PEI-FPBA MS	β -NAD	60	149.2	7	52
SiO ₂ @PEI-CBBx	HRP	120	23.8	2.7	53
PVPBA- <i>g</i> -PGMA beads	OVA	180	32.17	4	54
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @P (MMA-co-VPBA)	HRP	60	7.63	4	55
ATP-Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -DFFPBA	Adenozin	9	13.78	3	56
UiO-66-NH ₂ -FPBA	β -NAD	60	80	7	Bu tez

4.2.7. β -NAD'ın UiO-66-NH₂-FPBA Partikülü Tarafından Seçici Adsorpsiyonunun İncelenmesi

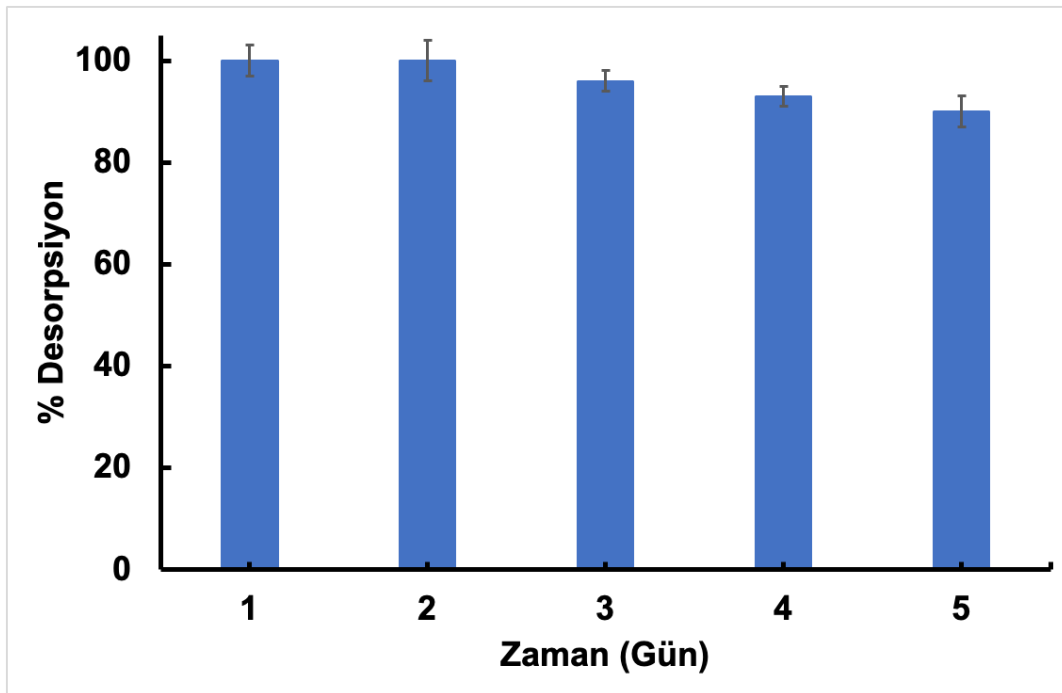
Seçicilik deneyleri için diol işlevselliği taşıyan küçük ve büyük moleküller (örn. Ovalbumin (OVA) ve Transferin (TRF)) ve diol işlevselliği içermeyen moleküller (örn. Sitokrom C (SITOK C) ve Bovin serum albumin (BSA)) seçilmiştir. Dört biyomolekül çözeltisine (2 mg/mL), 5 mg/mL derişimde sorbent ilave edilmiş, karışım, 25 °C sıcaklıktaki çalkalayıcıda 60 dakika bekletilmiştir. Çözelti absorbansı UV-vis absorpsiyon spektroskopisi ile tespit edilmiştir. Hazırlanan malzemenin seçiciliği Şekil 4.13 'te verilmektedir. Diol işlevselliği taşıyan küçük ve büyük moleküller (örn. β -NAD, OVA ve TRF) ile yüksek denge adsorpsiyon kapasiteleri elde edilmiştir. Diol işlevselliği içermeyen moleküller (örn. Sitokrom C ve BSA) çok düşük denge adsorpsiyon kapasiteleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar UiO-66-NH₂-FPBA partikülün diol içeren biyomoleküllere karşı yüksek seçiciliğe sahip olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 4.13. UiO-66-NH₂-FPBA partikülün farklı biyomoleküller için adsorpsiyon kapasiteleri

4.2.8. UiO-66-NH₂-FPBA Partikülün Tekrar Kullanılabilirliği

UiO-66-NH₂-FPBA partikülün yeniden kullanılabilirlik kapasitesi, ardışık beş adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüyle değerlendirilmiştir. UiO-66-NH₂-FPBA partikülün desorpsiyon veriminin beş döngüden sonra önemli ölçüde azalmadığı (yalnızca % 10) görülmektedir (Şekil 4.14). Sonuç olarak hazırlanan UiO-66-NH₂-FPBA partikülün β -NAD izolasyonu uygulamalarında uygun ve yüksek bir potansiyel değere ve mükemmel bir yeniden kullanılabilirliğe sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir.



Şekil 4.14. UiO-66-NH₂-FPBA partikül için tekrarlanabilirlik testi

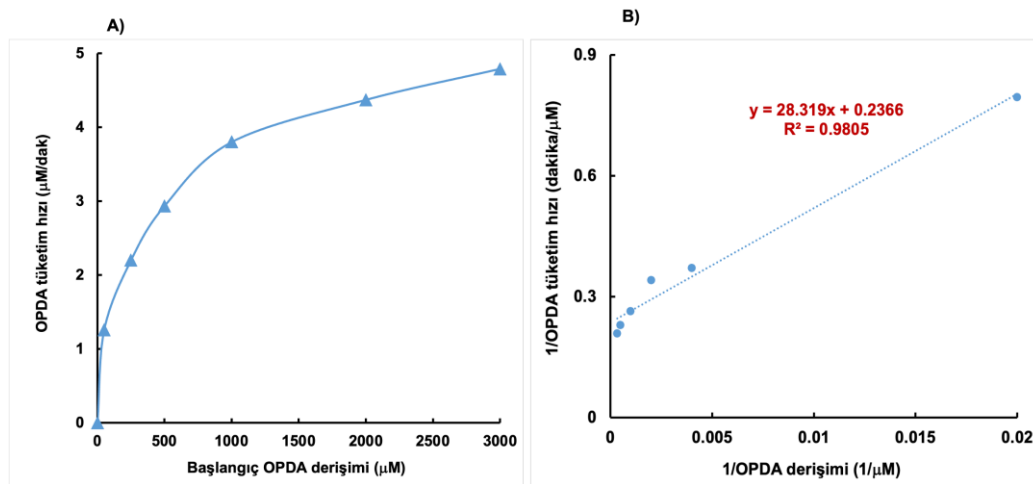
4.3. UiO-66-NH₂-FPBA Partikülün Peroksidaz-Mimetik Aktivitesi

UiO-66-NH₂-FPBA partikül, hem belirlenen hedef moleküle (β -NAD) karşı seçici bağlanma hem de seçilen substrata (OPDA) karşı peroksidaz benzeri aktivite göstermektedir. β -NAD saflaştırmalarının pH 8.5 ortamda etkili bir şekilde yürütüldüğü Bölüm 4.3.1 de anlatılmıştır. Bu nedenle, pH 8.5 'ta FPBA bağlı MOF yapılar için kayda değer bir peroksidaz benzeri aktivite elde edilmelidir.

OPDA, pH 8.5 'ta UiO-66-NH₂-FPBA partikülün peroksidaz-mimetik aktivitesi sayesinde dönüştürülen substrat olarak seçilmiştir. Peroksidaz mimetik aktivite, OPDA'nın renkli ürün olan 2,3-diaminofenazine dönüşümüne neden olmaktadır. Oluşan ürün (DAP), 416 nm'de görünür bölgede maksimum absorbans sağlamaktadır.

4.3.1. UiO-66-NH₂-FPBA Partikülün Değişen Substrat (OPDA) Derişimi İçin Peroksidaz Benzeri Aktivitesi Ölçümleri

UiO-66-NH₂-FPBA partikülün aktivite davranışını anlamak için sabit pH değerinde (pH:8.5) farklı OPDA derişimleri kullanılarak yapılan peroksidaz benzeri aktivite çalışmalarından elde edilen Michaelis Menten grafikleri Şekil 4.15A'da verilmiştir. Artan OPDA derişimiyle çözeltilerdeki sarı renk koyulaşmış ve UV-Vis spektrofotometresinde 416 nm dalgaboyunda daha yüksek absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.15B'de UiO-66-NH₂-FPBA partikülüne ait Lineweaver Burk grafiği verilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kinetik veriyi görüntülemek için yaygın kullanılmaktadır. Lineweaver Burk analizi, K_m ve V_{max} kinetik sabitlerini belirlemek amacıyla "1/OPDA derişimi" ve "1/OPDA Tüketim Hızı" arasında doğrusal ilişkiyi gösterme yöntemidir.

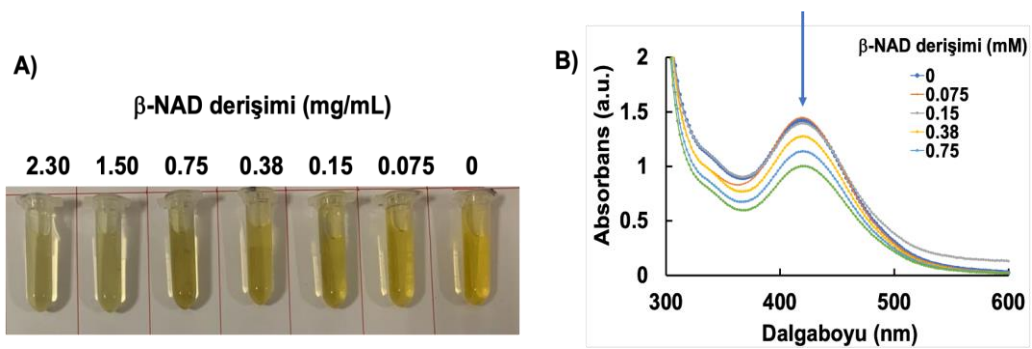


Şekil 4.15. UiO-66-NH₂-FPBA partikülüne ait A) Michaelis Menten B) Lineweaver Burk grafikleri

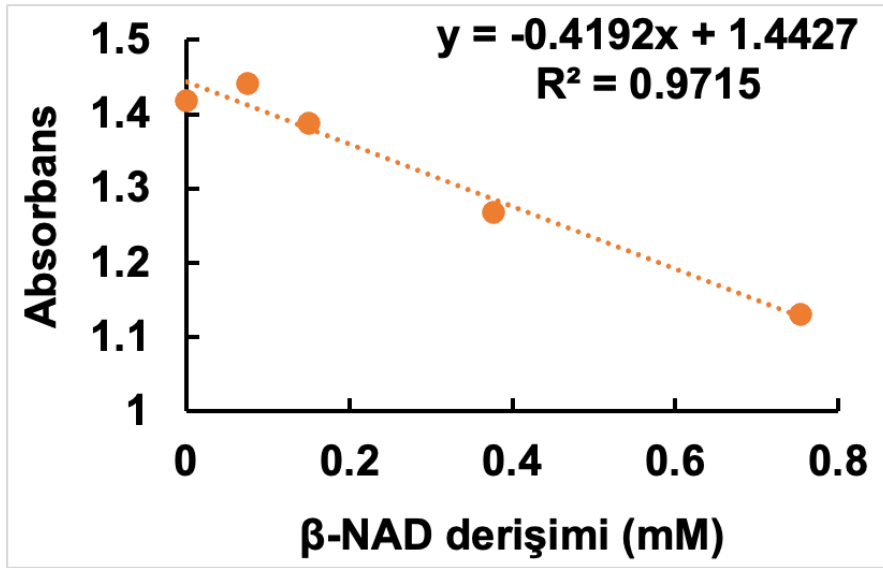
UiO-66-NH₂-FPBA partikülü için reaksiyondan elde edilebilecek maksimum hız (V_m) ve K_m ise (Michaelis sabiti) değerleri sırasıyla 4.23 μ M/dakika ve 120 μ M olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı (R^2) değerinin yüksek olması “1/OPDA derişimi” ve “1/OPDA Tüketim Hızı” arasında doğrusal ilişkinin kanıtıdır.

4.3.2. UiO-66-NH₂-FPBA Partikülü ile Tampon Ortamında β -NAD Tayini

β -NAD tayini analizinde OPDA'nın, H₂O₂ tarafından oksidasyonu UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesi ile katalize edilmektedir. Sarı renkli ürün olan oksitlenmiş OPDA (2,3 Diaminophenazine), OPDA ile H₂O₂ arasındaki reaksiyon yoluyla elde edilmiştir. Böylece, içeriğindeki β -NAD derişimi ile doğru orantılı olarak farklı tonlarda sarı renkli çözelti yanıtı elde edilmiştir (Şekil 4.16 A). 60 dakikalık reaksiyon süresinden sonra UV-VIS Spektrofotometrede 200-800 nm aralığında değerler okunmuştur. Şekil 4.16B’de, oluşan 2,3 Diaminophenazine bileşiğine ilişkin karakteristik absorpsiyon pikinin 416 nm’de olduğu görülmüştür. UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesinin tampon ortamındaki β -NAD derişimi ile değişimi Şekil 4.17’de verilmiştir. Şekil 4.17’de gözlenen değişiklik, numunedeki β -NAD derişiminin artmasıyla birlikte oksitlenen ürünün derişiminin azalmasından kaynaklanmalıdır.



Şekil 4.16. A) UiO-66-NH₂-FPBA partikülü tarafından katalize edilen OPDA'nın kolorimetrik dönüşümünün tamamlanmasından sonra farklı β -NAD derişimleriyle hazırlanan sulu çözeltilerin fotoğrafları. (B) UiO-66-NH₂-FPBA partikülü kullanılarak OPDA ile muameleden sonra β -NAD'ın değişen derişimleri için UV-Vis spektrumları



Şekil 4.17 UiO-66-NH₂-FPBA partikülün peroksidaz benzeri aktivitesinin sulu tampon ortamındaki β -NAD derişimi ile değişimi

UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesi, 0-0.75 mM (0-0.5 mg / mL) aralığında artan β -NAD derişimi ile doğrusal olarak azalmıştır. Tampon ortamında β -NAD tayini için uygun tayin limiti (limit of detection, LOD) ve korelasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Şekil 4.17 ve Çizelge 4.4 'e bakıldığında, 0-0.75 mM aralığında β -NAD derişimleri için tatmin edici düzeyde yüksek korelasyon katsayısına ($R^2 = 0.9715$) sahip doğrusal ilişki elde edildiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.4 UiO-66-NH₂-FPBA partikülün β -NAD tayin özellikleri

Tayin aralığı mM (mg/mL)	LOD mM	a*	b*	R ²
0-0.75 mM (0-0.5 mg / mL)	0.033	0.4192	1.443	0.9715

*Kalibrasyon grafiği Eşitlik 4.4 ile tanımlanmıştır:

$$A = aC_b + b$$

Eşitlik 4.4

Eşitlikte A: 416 nm'deki absorbans, C_b (mM): Tampon ortamındaki β -NAD derişimi ve LOD: Tayin limiti olarak tanımlanmaktadır.

Sonuç olarak güçlü peroksidaz benzeri aktiviteye sahip UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerin, özellikle 0–0.75 mM aralğında β -NAD derişimlerinin kesin tespiti için geliştirilmiş yeni bir nanozim olarak kullanılabileceğı sonucuna varılabilmektedir.



5. SONUÇLAR

- Çalışma kapsamında Zirkonyum aminobenzendikarboksilat bazlı MOF (UiO-66-NH₂), seçilen bir metalin klor tuzları (zirkonyum tetraklorür (ZrCl₄)) ve organik bağlayıcı (BDC-NH₂) ile uygun bir çözücü ortamında (DMF) hidrotermal yöntemle sentezlenmiştir. Kristal oluşumu tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına soğutulan reaksiyon ortamı, uygun çözücüler yardımıyla yıkama işlemi yapılarak kristal yapısına dahil olmayan metal tuzlarının, bağlayıcıların veya modülatörlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Safılaştırılan MOF kristalleri düşük sıcaklıktaki etüve yerleştirilerek çözücü uzaklaştırılmış ve uygulama için kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- MOF yapısının fonksiyonelleştirilmesi için FPBA, su ortamında, tepkimeye girerek MOF yapısındaki amino grubuna Schiff baz reaksiyonu ile direkt bağlanmıştır. Yöntemde sodyum borhidrür kullanılarak, oluşan kovalent bağın stabilizasyonu sağlanmıştır. Böylece NH₂ grubu içeren MOF, FPBA ile reaksiyona sokularak MOF yüzeyine borik asit grubu içeren kromatografik ligand bağlanması sağlanmıştır.
- Sentezlenen yapıların (UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partüküllerin) boyutu ve yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile incelenecektir. Enerji dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) haritalaması ile yüzey atomik bileşimi incelenecektir. Kristalin yapısı X-ışını difraksiyon (XRD) spektrofotometre ile tayin edilecektir. Yapının yüzey alanı Brunauer-Emmet-Teller (BET) ve fiziksel/kimyasal özellikleri X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) analiz yöntemleri kullanılarak tayin edilecektir. Elde edilen malzemenin fonksiyonel grupları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak tayin edilmiştir. Malzemenin Bor içeriği Endüktif olarak eşleştirilmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES) cihazı ile analiz edilmiştir.
- UiO-66-NH₂ ve UiO-66-NH₂-FPBA partüküllerinin, BJH (Barrett-Joynes-Halenda) yöntemiyle belirlenen ortalama gözenek boyutları sırasıyla 2.96 nm ve 4.78 nm, özgül yüzey alanları sırasıyla 770 m²/g ve 353 m²/g ve gözenek hacimleri sırasıyla 0.36 cm³/g ve 0.11 cm³/g olarak bulunmuştur. UiO-66-NH₂-FPBA partikülünün FPBA içeriği, bor içeriğinin (55 mg B/g sorbent) ICP-OES ile belirlenmesiyle 5.09 mmol FPBA/g sorbent olarak hesaplanmıştır.

- Biyomoleköl tayinine yönelik biyosensörlerin sentezi amacıyla öncelikle biyomoleküllere seçici olarak duyarlı halde olan metal-organik kafesler (MOF'lar) kullanılarak maksimum adsorpsiyon koşullarında kesikli sistemde tampon ortamından diol içeren biyomoleköl olarak seçilen β -NAD'ın izolasyonu sağlanmıştır. Malzemelerin β -NAD denge adsorpsiyonu üzerine başlangıç β -NAD derişimi ve tampon pH etkisi incelenmiştir. β -NAD adsorpsiyonu sonrasında, bir dizi elüsyon tamponu kullanılarak, elüsyon tamponuna 100 ila 500 mM arasında değişen farklı sorbitol derişimleri eklenerek, seçilen desorpsiyon ortamlarında, desorpsiyon verimleri tayin edilmiştir. UiO-66-NH₂-FPBA partikülün maksimum denge β -NAD adsorpsiyon kapasitesi, pH 8.5 ve başlangıç β -NAD derişimi 2mg/mL olduğu durumda 80 mg β -NAD /g sorbent olarak bulunmuştur. Sorbitol derişimi > 100 mM için $\geq$ %90 oranında desorpsiyon verimine ulaşılmıştır. 300 mM sorbitol derişiminde, neredeyse kantitatif desorpsiyon verimine ulaşılmıştır ve bu nedenle sonraki kullanımlar için desorpsiyon ortamı olarak 300 mM sorbitol içeren pH 7.0, 100 mM sodyum fosfat tamponu seçilmiştir.
- Adsorpsiyon izotermeleri yardımıyla elde edilen deneysel verilere bakıldığında en yüksek korelasyon katsayısı (R^2) değerinden, adsorpsiyon mekanizmasının Freundlich modeli ($R^2 = 0.9789$) yerine Langmuir modeline ($R^2= 0.9959$) uygunluk gösterdiği anlaşılmıştır.
- Reaksiyon derecesinin nihai değerlendirmesi sonucunda, R^2 değerleri incelenerek adsorpsiyon kinetiğinin hem 1.derece hem de 2.derece kinetik modeline uyumlu olduğu görülmüştür.
- UiO-66-NH₂-FPBA partikülün diol içeren biyomoleküllere karşı yüksek seçiciliğe ve mükemmel bir yeniden kullanılabilirliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.
- UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesi, 0-0.75 mM (0-0.5 mg / mL) aralığında artan β -NAD derişimi ile doğrusal olarak azalmıştır. Tampon ortamında β -NAD tayini için uygun tayin limiti (limit of detection, LOD) ve korelasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir. 0-0.75 mM aralığında β -NAD derişimleri için tatmin edici düzeyde yüksek korelasyon katsayısına ($R^2 = 0.9715$) sahip doğrusal ilişki elde edildiği anlaşılmaktadır. Sonuç olarak güçlü peroksidaz benzeri aktiviteye sahip UiO-66-NH₂-FPBA partiküllerin, özellikle 0-0.75 mM

aralığında β -NAD derişimlerinin tayin limiti 0.033 mM olacak şekilde kesin tespiti için geliştirilmiş yeni bir nanozim olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- [1] X. F. Hu, Q. J. Liu, Y. L. Wu, Z. Q. Deng, Magnetic metal-organic frameworks containing abundant carboxylic groups for highly effective enrichment of glycopeptides in breast cancer serum, *Talanta*, 204 **(2019)**, 446-454.
- [2] D. Schomburg, I. Schomburg, Enzyme databases, *Data Mining Techniques For The Life Sciences*, 609 **(2010)**, 113-128.
- [3] Y. Huang, J. Ren, X. Qu, Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications, *Chemical Reviews*, 119 **(2019)**, 4357-4412.
- [4] F. Arduini, A. Amine, Biosensors based on enzyme inhibition, *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*, 140, **(2013)**, 299-326.
- [5] P. K. Robinson, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in Biochemistry*, 59 **(2015)**, 1-41.
- [6] A. Sharma, G. Gupta, T. Ahmad, S. Mansoor, B. Kaur, Enzyme engineering: current trends and future perspectives, *Food Reviews International*, 37, **(2021)**, 121-154.
- [7] L. Lu, Z. Qian, Y. D. Cai, Y. Li, ECS: an automatic enzyme classifier based on functional domain composition, *Computational Biology and Chemistry*, 31, **(2007)**, 226-232.
- [8] A. McDonald, T. Keith F, Enzyme nomenclature and classification: the state of the art, *Febs Journal*, 290, **(2023)**, 2214-2231.
- [9] C. K. Cavas, E. Nasibov, Efficiency analysis of KNN and minimum distance-based classifiers in enzyme family prediction, *Computational Biology and Chemistry*, 33, **(2009)**, 461-464.
- [10] C. Yandi, K. C. Chou, Using functional domain composition to predict enzyme family classes, *Journal of Proteome Research*, 4, **(2005)**, 109-111.

- [11] B. J. Lee, J. Y. Lee, H. G. Lee, K. H. Ryu, Classification of enzyme function from protein sequence based on feature representation, Proceedings Of The 7th Ieee International Symposium On Bioinformatics and Bioengineering, Vols I And II, 741, **(2007)**.
- [12] P. D. Dobson, A. J. Doig, Predicting enzyme class from protein structure without alignments, Journal of Molecular Biology, 345, **(2005)**, 187-199.
- [13] A. M. Bersani, G. Dell'Acqua, Asymptotic expansions in enzyme reactions with high enzyme concentrations, Mathematical Methods in The Applied Sciences, 34, **(2011)**, 1954-1960.
- [14] A. Goldbeter, Oscillatory enzyme reactions and Michaelis–Menten kinetics, Febs Letters, 587, **(2013)**, 2778-2784.
- [15] E. Reznik, O. Chaudhary, D. Segre, The average enzyme principle, Febs Letters, 587, **(2013)**, 2891-2894.
- [16] J. M. G. Rodriguez, N. P. Hux, S. J. Philips, M. H. Towns, Michaelis–Menten graphs, Lineweaver–Burk plots, and reaction schemes: investigating introductory biochemistry students' conceptions of representations in enzyme kinetics, Journal of Chemical Education, 96, **(2019)**, 1833-1845.
- [17] N. Nesakumar, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, J. B. B. Rayappan, Non-Linearization of modified Michaelis-Menten kinetics, Journal of Computational And Theoretical Nanoscience, 11, **(2014)**, 2596-2602.
- [18] Z. Liu, R. Kang, Michaelis-Menten pharmacokinetics based on uncertain differential equations, Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing, **(2022)**.
- [19] H. Y. Shin, T. J. Park, M. Kim, Recent research trends and future prospects in nanozymes, Journal of Nanomaterials, **(2015)**.

- [20] F. Attar, M. G. Shahpar, B. Rasti, M. Sharifi, A. A. Saboury, S. M. Rezayat, M. Falahati, Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities, *Journal Of Molecular Liquids*, 278, **(2019)**, 130-144.
- [21] Y. C. Lyu, P. Scrimin, Mimicking enzymes: the quest powerful catalysts from simple molecules to nanozymes, *Acs Catalysis*, 11, (2021), 11501-11509.
- [22] X. Yan, *Nanozymology: connecting biology and nanotechnology*, Springer Nature, (2020).
- [23] B. Jiang, D. Duan, L. Gao, M. Zhou, K. Fan, Y. Tang, N. Xie, Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes, *Nature Protocols*, 13, **(2018)**, 1506-1520.
- [24] A. T. Carrie, S. Peter, Variation in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) components to lower sulfathiazole detection limits, *Journal of Food Science*, 60, **(1995)**, 872-879.
- [25] H. H. Nguyen, S. H. Lee, U. J. Lee, C. D. Fermin, M. Kim, Immobilized enzymes in biosensor applications, *Materials*, 12, **(2019)**, 121.
- [26] B. L. Wu, G. M. Zhang, S. M. Shuang, M. M. F. Choi, Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane, *Talanta*, 64, **(2004)**, 546-553.
- [27] P. Mohankumar, J. Ajayan, T. Mohanraj, R. Yasodharan, Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A Review, *Measurement*, 167, **(2021)**.
- [28] P. Wang, Q. J. Liu, Biosensors and measurement, *Biomedical Sensors and Measurement*, **(2011)**, 199-275.
- [29] B. Y. Zhang, X. Chen, J. H. He, B. L. Guo, S. Bi, F. Zhang, M. M. Tian, Preparation of a boronate affinity-functionalized metal–organic framework material for selective recognition and separation of glycoproteins at physiological pH, *New Journal of Chemistry*, 46, **(2022)**, 13207-13212.

- [30] R. Zhu, L. Zacharias, K. M. Wooding, W. Peng, Y. Mechref, Glycoprotein enrichment analytical techniques: advantages and disadvantages, *Methods in Enzymology*, 585, **(2017)**, 397-429.
- [31] R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, Decoration of proteins with sugar chains: recent advances in glycoprotein synthesis, *Current Opinion in Chemical Biology*, 22, **(2014)**, 92-99.
- [32] D. S. Hage, R. Matsuda, Affinity Chromatography: a historical perspective, *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, 3rd Edition, 1286, **(2015)**, 1-19.
- [33] M. Pir, L. Daojin, L. Zhen, Boronate Affinity Chromatography, *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*, Robert A. Meyers (Ed.), Wiley, USA, **2015**.
- [34] X. Wu, X. M. Chen, G. Q. Zhong, C. Y. Chen, C. Q. Cai, A novel Wulff-type boronate acid-functionalized magnetic metal-organic framework imprinted polymer for specific recognition of glycoproteins under physiological Ph, *Journal of Separation Science*, 43, **(2020)**, 3785-3792.
- [35] F. V. Harzand, S. N. M. Nejad, A. Babapoor, S. M. Mousavi, S. A. Hashemi, A. Gholami, W. H. Chiang, M. G. Buonomenna, C. W. Lai, Recent advances in metal-organic framework (MOF) asymmetric membranes/composites for biomedical applications, *Symmetry- Basel*, 15, **(2023)**, 403.
- [36] M. Safaei, M. M. Foroughi, N. Ebrahimpoor, S. Jahani, A. Omid, M. Khatami, A review on metal-organic frameworks: synthesis and applications, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 118, **(2019)**, 401-425.
- [37] D. H. Hong, H. S. Shim, J. Ha, H. R. Moon, MOF-on-MOF architectures: applications in separation, catalysis, and sensing, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 42, **(2021)**, 956-969.
- [38] J. J. Zhu, L. B. Wu, Z. Y. Bu, S. Y. Jie, B. G. Li, Polyethyleneimine-modified UiO-66-NH₂(Zr) metal-organic frameworks: preparation and enhanced CO₂ selective adsorption, *ACS Omega*, 4, **(2019)**, 3188-3197.

- [39] Z. Baoyue, C. Xue, H. Jianghua, G. Bailin, B. Sheng, Z. Feng, T. Miaomiao, Preparation of boronate affinity-functionalized metal-organic framework material for two selective recognition and separation of glycoprotein under physiological pH, *New Journal of Chemistry*, 46, **(2022)**, 13207-13212.
- [40] Y. Cao, H. M. Zhang, F. J. Song, T. Huang, J. Y. Ji, Q. Zhong, W. Chu, Q. Xu, UiO-66-NH₂/GO composite: synthesis, characterization and CO₂ adsorption performance, *Materials*, 11, **(2018)**, 589.
- [41] S. C. Liu, Z. Hu, X. C. Yan, S. B. Geng, X. Zhao, H. X. Ou, J. M. Pan, Separation and purification of target flavonoids using covalently connected MOFs@boronic acid-functionalized-COFs magnetic hybrids: precise identification and enhanced stability, *Separation and Purification Technology*, 320, **(2023)**, 124061.
- [42] R. R. Solis, M. G. Penas, C. Belver, J. J. Rodriguez, J. Bedia, Highly stable UiO-66-NH₂ by the microwave-assisted synthesis for solar photocatalytic water treatment, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, **(2022)**, 107122.
- [43] F. G. Nejad, H. Beitollahi, I. Sheikhsheiaie, UiO-66-NH₂ MOF/PAMAM dendrimer nanocomposite for electrochemical detection of tramadol in the presence of acetaminophen in pharmaceutical formulations, *Biosensors-Basel*, 13, **(2023)**, 514.
- [44] X. Fang, S. B. Wu, Y. H. Wu, W. Yang, Y. L. Li, J. Y. He, P. D. Hong, M. X. Nie, C. Xie, Z. J. Wu, K. S. Zhang, L. T. Kong, J. H. Liu, High-efficiency adsorption of norfloxacin using octahedral UiO-66-NH₂ nanomaterials: dynamics, thermodynamics, and mechanisms, *Applied Surface Science*, 518, **(2020)**, 146226.
- [45] Y. Z. Jiang, C. Y. Liu, J. Caro, A. S. Huang, A new UiO-66-NH₂ based mixed-matrix membranes with high CO₂/CH₄ separation performance, *Microporous and Mesoporous Materials*, 274, **(2019)**, 203-211.
- [46] S. H. Adam, A. A. Jalil, S. Triwahyono, Novel removal of water-insoluble disperse dye onto a low-cost adsorbent prepared from tropical fruit waste, *Desalination and Water Treatment*, 49, **(2012)**, 337-347.
- [47] A. K. Bhattacharya, T. K. Naiya, S. N. Mandal, S. K. Das, Adsorption, kinetics and equilibrium studies on removal of Cr(VI) from aqueous solutions using different low-cost adsorbents, *Chemical Engineering Journal*, 137, **(2008)**, 529-541.

- [48] G. Tzvetkov, N. Kaneva, T. Spassov, Room-temperature fabrication of core-shell nano-ZnO/pollen grain biocomposite for adsorptive removal of organic dye from water, *Applied Surface Science*, 400, **(2017)**, 481-491.
- [49] H. J. Xia, S. S. Wang and L. Wang, Branched polyethyleneimine-assisted boronic acid-functionalized silica nanoparticles for the selective enrichment of trace glycoprotein, *Talanta*, 184, **(2018)**, 235–243.
- [50] X. T. Xue, R. Lu, M. Liu, Y. Li, J. S. Li and L. J. Wang, A facile and general approach for the preparation of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for the selective enrichment of glycoproteins, *Analyst*, 144, **(2019)**, 641–648.
- [51] X. Y. Sun, R. T. Ma, J. Chen, Y. P. Shi, Magnetic boronate modified molecularly imprinted polymers on magnetite microspheres modified with porous TiO₂ (Fe₃O₄@pTiO₂@MIP) with enhanced adsorption capacity for glycoproteins and with wide operational pH range, *Microchimica Acta*, 185, **(2018)**, 565.
- [52] B. Gökçal, Ç. Kip, A. Tuncel, Monodisperse-porous silica microspheres with flexible phenylboronic acid functionalized-polycationic molecular brushes as a sorbent for teamed boronate affinity chromatography in batch and capillary column systems, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 676, **(2023)**, 132143.
- [53] D. J. Li, H. J. Xia, L. Wang, Branched polyethyleneimine-assisted boronic acid-functionalized silica nanoparticles for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Talanta*, 184, **(2018)**, 235-243.
- [54] J. Zhang, Y. L. Ni, X. L. Zheng, Preparation of poly(vinylphenylboronic acid) chain grafted poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads for the selective enrichment of glycoprotein, *Journal of Separation Science*, 38, **(2015)**, 81-86.
- [55] M. R. Pan, Y. F. Sun, J. Zheng, W. L. Yang, Boronic Acid-Functionalized Core–Shell–Shell Magnetic Composite Microspheres for the Selective Enrichment of Glycoprotein, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5, **(2013)**, 8351-8358.

- [56] Y. Pan, X. Guo, S. Li, X. Liu, H. Zhang, A boronate-decorated porous carbon material derived from a zinc-based metal–organic framework for enrichment of cis-diol-containing nucleosides, *New Journal of Chemistry*, 42, **(2018)**, 2288.

