

**KARBONDİOKSİT TUTUCU VE DÖNÜŞTÜRÜCÜ
BİYOMİMİK NANOENZİM SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI**

Özlem ÜNLÜER

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ağustos 2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1210F16**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özlem ÜNLÜER'in “**Karbondioksit Tutucu ve Dönüştürücü Biyomimik Nano Enzim Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları**” başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 17.08.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) :Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

.....

Üye :Prof. Dr. Lütfi GENÇ

.....

Üye :Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ

.....

Üye :Yard. Doç. Dr. Bora GARİPCAN

.....

Üye :Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ

.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KARBONDİOKSİT TUTUCU VE DÖNÜŞTÜRÜCÜ BİYOMİMİK NANOENZİM SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

Özlem ÜNLÜER

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2015, 172 sayfa

Bu çalışmada; nano enzim sistemleri, rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) metoduna göre sentezlenerek, karbondioksidi (CO₂) tutucu ve dönüştürücü sistemler olarak farklı uygulamalarda kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında; nano yapılı karbonik anhidraz (CA) enzimi sentezlenerek 4-nitrofenilasetata karşı enzimatik aktivitesi belirlenmiştir. Ardından, ticari CA enzimiyle karşılaştırmalı olarak CO₂'yi bikarbonata dönüştürme reaksiyonları incelenmiştir.

İkinci aşamada, format dehidrogenaz (FateDH), formaldehit dehidrogenaz (FaldDH) ve alkol dehidrogenaz (ADH) enzimlerini içeren nano multi enzim yapısı yine ANADOLUCA metoduyla sentezlenmiş ve nano multi enzim kriyojel kolona çapraz bağlanmıştır. Sentezlenen bu sistemin CO₂'yi metanole dönüştürme reaksiyonları incelenerek, literatürdeki enzimatik yöntemlerle CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonlarına göre üstünlüğü ortaya konmuştur.

Çalışmanın son aşamasında, fotosentezdeki krebs döngüsünde rol alan 1,5 ribulaz bisfosfat karboksilaz/oksijenaz enzimi (RuBisCo) nano yapılı olarak ANADOLUCA metoduyla sentezlenerek, CO₂ tutucu ve dönüştürücü özelliği incelenmiştir. Ayrıca; ıspanak yapraklarından da RuBisCo enzimi izole edilerek izole edilen enzimin de CO₂ tutucu ve dönüştürücü olarak etkinliği incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanoenzim, CO₂ dönüştürücü sistemler, karbonik anhidraz, RuBisCo, multi nano (format dehidrogenaz-alkol dehidrogenaz-aldehit dehidrogenaz) enzim.

ABSTRACT

PhD Dissertation

DEVELOPING CARBONDIOXIDE CAPTURE AND CONVERTING BIOMIMICK NANOENZYME SYSTEMS AND THEIR APPLICATIONS

Özlem ÜNLÜER

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program**

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Co-Advisor: Prof. Dr. Rıdvan SAY

2015, 172 pages

In this study, nano enzyme systems have been synthesized according to AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach (ANADOLUCA) method and used for carbondioxide (CO₂) capture and converting applications.

In the first stage of the study, nano carbonic anhydrase (CA) enzyme has been synthesized and the enzymatic activity has been determined using 4-nitrophenyl acetate. Then, conversion reaction of CO₂ to bicarbonate have been investigated using nano CA and free CA enzymes, comperatively.

In the second stage of the study, the nano multi enzyme that contains formate dehydrogenase (FateDH), formaldehyde dehydrogenase (FaldDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) has been synthesized using ANADOLUCA method and this nano multi enzyme has been cross-linked into cryogel. Conversion reaction of CO₂ into methanol using this synthesized system has been investigated and the superiority of this synthesized system has been investigated comparing literature.

At the last stage of the study, nano ribulase bisphosphate carboxylase/oxygenase enzyme (RuBisCo) that acts a part in calvin cycle in photoseynthesis has been synthesized according to ANADOLUCA method and CO₂ capture and converting feature have been investigated. Besides, RuBisCo enzyme has been isolated from spinach and activity in CO₂ capture and conversion have been investigated.

Key words: Nano enzyme, CO₂ conversion systems, carbonic anhydrase, RuBisCo, multi nano (formate dehydrogenase-alcohol dehydrogenase- formaldehyde dehydrogenase) enzyme.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, ilgisi, bilgisi, yardımlarıyla yanımda olan, bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, çalışmalarında ve hayatın her alanında bana yol gösteren, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Deneysel çalışmalarında ve her konuda, tecrübesi, bilgisi ve öngörülerıyla her zaman bana yol gösteren, desteğini ve yardımlarını eksik etmeyen çok değerli ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

Çalışmalarım sırasında monomerlerin sentezlenmesinde bana yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Filiz YILMAZ'a, bilgi birikimlerinin yanında manevi destekleriyle de hep yanımda olan Sayın Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ, Sayın Doç. Dr. Ayça ÖZCAN, Sayın Araş. Gör. Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA ve Sayın Araş. Gör. Simge METİNOĞLU'ya,

Çalışmalarıma getirdikleri yorumlar ve farklı bakış açılarıyla tezimin şekillenmesinde emekleri olan Sayın Prof. Dr. Lütfi GENÇ ve Sayın Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ'a,

Çalışmalarım boyunca laboratuvar, malzeme gibi imkanlardan faydalanmamı sağlayan Kimya Bölümü ve Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) yönetici ve çalışanlarına,

Laboratuvarda birlikte çalıştığım arkadaşlarım, Ender KÖSE, Semra KÖSE, Burak YILDIZ, Fatma YEDİYILDIZ, Yasemin UYMAZ, Ayça BAKIR ve diğer tüm Biyokimya Laboratuvarı ekibine,

Tezimi okuyup, değerlendirdikleri için Sayın Yard. Doç. Dr. Bora GARİPCAN ve Sayın Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e,

Tezimin tamamlanmasına kadar geçen süreçte, benimle birlikte yoğun tempoya katlanan, sabır gösteren, ilgisi ve desteğiyle her anımda yanımda olan, sevgili eşim Zafer ÜNLÜER'e, hayatımıza sürpriz bir şekilde girerek, evimize ses getiren, hayatımıza renk ve anlam katan, her zaman moral ve neşe kaynağımız, biricik oğlumuz Bora ÜNLÜER'e,

Manevi desteğini her zaman hissettiğim, bu zorlu ve uzun süreçte hep yanımda olan canımın içi biricik kardeşim İbrahim BİÇEN'e,

Ve üzerimdeki emeklerini hiç bir zaman ödeyemeyeceğim, beni bu günlere getiren, sevgi, emek, destek ve ilgileriyle daima yanımda olan, bana sonsuz güvenen, canım annem Hülya BİÇEN ve canım babam Ali BİÇEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem ÜNLÜER
Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMLAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoteknoloji.....	1
1.1.1.Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri.....	5
1.2. Enzimler.....	10
1.2.1.Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması.....	14
1.2.2.Enzim Aktivitesi	16
1.2.3.Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	16
1.2.4.Enzim Kinetiği.....	21
1.2.5.Karbonik Anhidraz Enzimi.....	24
1.2.6.Format Dehidrogenaz Enzimi.....	28
1.2.7.Formaldehit Dehidrogenaz Enzimi.....	30
1.2.8.Alkol Dehidrogenaz Enzimi	31
1.2.9.Ribulaz-1,5-Bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz Enzimi	32
1.3. Nanoenzimler	35
1.4. Karbondioksit (CO ₂)	37
1.4.1.Karbondioksit Dönüştürücü Sistemler.....	39
1.5. Kriyojel	47

1.6.	Afinite Kromatografisi.....	50
1.7.	Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC).....	52
1.8.	Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi.....	54
2.	MATERYAL VE METOT	59
2.1.	Materyal	59
2.1.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	59
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar.....	61
2.2.	Metot.....	62
2.2.1.	Fotoduyarlı Çapraz Bağlayıcı Sentezi ve Karakterizasyonu	62
2.2.2.	Nano CA Enzimi	64
2.2.3.	Nano CA Enzimiyle CO ₂ ' nin Bikarbonata Dönüşümünün İncelenmesi.....	68
2.2.4.	Multi Nano Enzim Sistemi	70
2.2.5.	Kriyojel Kolon Sentezleri ve Karakterizasyonları.....	72
2.2.6.	Kriyojel Kolonlarla CO ₂ ' nin Metanole Dönüşümü.....	75
2.2.7.	Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksigenaz (RuBisCo) Enzimi ve Uygulamaları	78
2.2.8.	Nano RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri ve Enzimatik Aktiviteye Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi	81
3.	BULGULAR	85
3.1.	Fotoduyarlı Çapraz Bağlayıcı Karakterizasyonu	85
3.1.1.	N-metakriloil amino-(L)-tirozin (MATyr) Karakterizasyonu	85
3.1.2.	Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr) ₂ Rutenyum (II) Karakterizasyonu	85
3.1.3.	Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)(NADH) Rutenyum (II) Monomerinin Karakterizasyonu	86
3.2.	Nano CA Enzimi.....	86
3.2.1.	Nano CA Enzimi Karakterizasyonu	86

3.2.2. Nano CA Enziminin Protein Tayini	90
3.2.3. Nano CA Enziminin Aktivite Tayini	91
3.2.4. Nano CA Enzim Aktivitesine Substrat Derişimi Etkisi	93
3.2.5. Nano CA Enzim Aktivitesine pH Etkisi	94
3.2.6. Nano CA Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	95
3.2.7. Nano CA Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği	96
3.3. Nano CA Enzimiyle CO ₂ 'nin Bikarbonata Dönüşümünün İncelenmesi	97
3.3.1. Nano CA Enzim Derişiminin CO ₂ 'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi	97
3.3.2. pH'ın CO ₂ 'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi	98
3.3.3. CO ₂ Akış Hızının CO ₂ 'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi	99
3.3.4. Nano CA Enziminin CO ₂ 'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği	100
3.4. Multi Nano Enzim Sistemi	101
3.4.1. Nano [FateDH, FaldDH, ADH] Enzim Sisteminin Karakterizasyonu	101
3.5. Kriyojel Kolon Karakterizasyonu	106
3.5.1. HEMA Kriyojeli Karakterizasyonu	106
3.5.2. Bis(2-2'-Bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) /[FateDH, FaldDH AdDH] Enzimleri Kompleksi Çapraz Bağlı Fotoduyarlı Kriyojel Kolon Karakterizasyonu	107
3.5.3. Multi Nano Enzim (FateDH, FaldDH, ADH) İçeren Kriyojel Kolon Karakterizasyonu	108
3.5.4. Multi Enzim İçeren (FateDH, FaldDH, ADH) Kriyojel Kolon Sentezi ve Karakterizasyonu	109
3.6. Kriyojel Kolonlarla CO ₂ 'nin Metanole Dönüşümü	110

3.6.1. Kriyojel Kolonlarla CO ₂ 'nin Metanole Dönüşümüne pH Etkisi.....	110
3.6.2. Kriyojel Kolonlarla CO ₂ 'nin Metanole Dönüşümüne Enzim Derişiminin Etkisi.....	112
3.6.3. Kriyojel Kolonlarla CO ₂ 'nin Metanole Dönüşümüne CO ₂ Miktarının Etkisi.....	113
3.6.4. Kriyojel Kolonlarla CO ₂ 'nin Metanole Dönüşümünde CO ₂ 'nin Kriyojel Kolonla Etkileşim Süresinin İncelenmesi	114
3.6.5. CO ₂ 'nin Metanole Dönüşümünde Kullanılan Kriyojel Kolonların Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	115
3.7. Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz (RuBisCo) Enzimi ve Uygulamaları	116
3.7.1. Nano Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz (RuBisCo) Enzimi Sentezi ve Karakterizasyonu	116
3.7.2. Gözeneklerine Anti-RuBisCo Antibadi Çapraz Bağlı Kriyojel Sentezi ve Karakterizasyonu	119
3.7.3. Nano Yapıda Sentezlenen İspanaktan İzole RuBisCo Enziminin Karakterizasyonu	121
3.8. Nano RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri ve Enzimatik Aktiviteye Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi	124
3.8.1. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri.....	124
3.8.2. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Substrat Derişimi Etkisi.....	129
3.8.3. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Mg ²⁺ İyonu Derişimi Etkisi	130
3.8.4. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine pH Etkisi.....	131
3.8.5. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	132

3.8.6. Nano RuBisCo ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Tekrar	
Kullanılabilirliği	133
3.9. Sentezlenen Nano Enzimlerin SDS-PAGE ile	
Karakterizasyonu	133
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	136
5. KAYNAKLAR	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Farklı yapıların boyut skalasında gösterimi.....	3
Şekil 1.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar	5
Şekil 1.3. Enzimde kofaktör, koenzim, apoenzim ve holoenzim kısımlarının şematik gösterimi.....	11
Şekil 1.4. Enzimlerin genel çalışma prensibi.....	12
Şekil 1.5. Anahtar-kilit uyum modeli.....	12
Şekil 1.6. İndüklenmiş uyum modeli	13
Şekil 1.7. Enzim derişiminin enzimatik aktiviteye etkisi.....	17
Şekil 1.8. Substrat derişiminin enzimatik aktiviteye etkisi.....	18
Şekil 1.9. pH' ın reaksiyon hızına etkisi	19
Şekil 1.10. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi	20
Şekil 1.11. Enzimatik bir reaksiyonun hızına substrat derişiminin etkisi.....	21
Şekil 1.12. Lineweaver-Burk grafiğı.....	23
Şekil 1.13. Eadie-Hofstee grafiğı	23
Şekil 1.14. CA izoenzimlerinin katalitik bölgeleri.....	25
Şekil 1.15. CA enziminin Xışınları kristallografi ile gösterimi	26
Şekil 1.16. Formatın CO ₂ 'ye oksidasyonunun FateDH enzimi ve NAD ⁺ varlığında gösterimi	29
Şekil 1.17. FateDH enziminin X ışınları kristallografi ile gösterimi	30
Şekil 1.18. ADH enziminin Xışınları kristallografi ile gösterimi	32
Şekil 1.19. Atmosferdeki CO ₂ 'nin RuBisCo enzimiyle tutulması.....	33
Şekil 1.20. RuBisCo enzim yapısının boşluk doldurma modeliyle gösterimi	34
Şekil 1.21. Bitkilerde RuBisCo enziminin yeri.....	34
Şekil 1.22. CO ₂ miktarının yıllara göre artışı	38
Şekil 1.23. CO ₂ 'nin metanole biyodönüşümü.....	44
Şekil 1.24. NADH ve substrat arasındaki oksidoredüktaz katalizli redox reaksiyonu	46
Şekil 1.25. Kriyojel oluşum süreci.....	49
Şekil 1.26. Kromatografik yöntemlerin ayırma mekanizmaları	51
Şekil 1.27. FPLC cihazı	53

Şekil 1.28. a. Dikey polarize ışık, b. Yatay polarize ışık	55
Şekil 1.29. a. Sol yönlü polarize ışık, b. Sağ yönlü polarize ışık.....	56
Şekil 1.30. Numunenin dairesel polarize ışık ile etkileşimi.....	57
Şekil 2.1. N-metakriloil amino-(L)- tirozin sentezi	62
Şekil 2.2. Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)2-Rutenyum (II) bileşiğinin sentezi	63
Şekil 2.3. Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)Ru (II) monomerinin sentezi.....	64
Şekil 2.4. Nano CA enzim yapısının şematik olarak gösterimi	65
Şekil 2.5. CO ₂ ' nin metanole dönüşüm reaksiyonu	70
Şekil 2.6. CO ₂ ' den nano multi enzim sistemiyle metanol eldesi sisteminin şematik gösterimi	71
Şekil 2.7. Kriyojel kolon ve FPLC cihazına entegrasyonu	80
Şekil 3.1. Nano CA enziminin TEM görüntüsü	87
Şekil 3.2. Nano CA enziminin zeta boyut dağılımı analizi.....	87
Şekil 3.3. Nano CA enziminin floresans spektrumu	88
Şekil 3.4. a. Ticari CA enzime ait CD spektrumu, b. Nano CA enzime ait CD spektrumu	89
Şekil 3.5. Protein miktarı tayini için oluşturulan kalibrasyon grafiği	90
Şekil 3.6. a. Ticari CA enziminin enzimatik aktivitesi b. Nano CA enziminin enzimatik aktivitesi	92
Şekil 3.7. Ticari CA ve nano CA enzimlerinin hidrataz aktivitesi	93
Şekil 3.8. Ticari CA ve nano CA enzimleri için Lineweaver-Burk Grafiği	93
Şekil 3.9. pH'ın ticari CA ve nano CA enzim aktivitelerine etkisi.....	95
Şekil 3.10. Ticari CA ve nano CA enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	96
Şekil 3.11. Nano CA enzimlerinin tekrar kullanılabilirliği.....	97
Şekil 3.12. CA enzim derişimlerinin CO ₂ 'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonlarına etkisi.....	98
Şekil 3.13. pH' ın CO ₂ ' nin bikarbonata dönüşümüne etkisi.....	99
Şekil 3.14. CO ₂ Akış hızının bikarbonat oluşumuna etkisi.....	100
Şekil 3.15. Nano CA enziminin tekrar kullanılabilirliği	101
Şekil 3.16. Multi nano enzim sisteminin TEM görüntüsü	102
Şekil 3.17. Multi nano enzim sistemi zeta boyut analizi.....	102
Şekil 3.18. Multi nano enzim sisteminin floresans spektrumu	103

Şekil 3.19. a. ADH enziminin CD spektrumu b. FateDH enziminin CD spektrumu c. FaldDH enziminin CD spektrumu d. Multi nano enzim sisteminin CD spektrumu	105
Şekil 3.20. HEMA kriyojeli SEM görüntüsü	107
Şekil 3.21. Foto duyarlı kriyojel kolon SEM görüntüsü	108
Şekil 3.22. Multi nano enzim içeren kriyojellerin SEM görüntüsü	109
Şekil 3.23. Multi enzim içeren kriyojellerin SEM görüntüsü	110
Şekil 3.24. Kriyojel kolonlarda CO ₂ 'nin metanole dönüşümüne pH etkisi a. Foto duyarlı kriyojel kolon b. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon c. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon	111
Şekil 3.25. Kriyojel kolonlarda CO ₂ 'nin metanole dönüşümüne enzim derişimi etkisi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon	112
Şekil 3.26. Kriyojel kolonlarda CO ₂ 'nin metanole dönüşümüne CO ₂ miktarının etkisi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon	113
Şekil 3.27. Kriyojel kolonlarda CO ₂ 'nin metanole dönüşümüne CO ₂ 'nin kolonla etkileşim süresinin incelenmesi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon	114
Şekil 3.28. Kriyojel kolonların CO ₂ 'nin metanole dönüşümünde tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon (dışarıdan NADH verilmeden) b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon d. Multi	115
Şekil 3.29. Nano RuBisCo enziminin TEM görüntüsü.....	116
Şekil 3.30. Nano RuBisCo enziminin floresans spektrumu	117
Şekil 3.31. Nano RuBisCo enziminin zeta boyut dağılımı grafiği.....	117
Şekil 3.32. Ticari ve nano RuBisCo enzimlerine ait CD spektrumları	118

Şekil 3.33. Gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojel kolonun SEM görüntüsü.....	119
Şekil 3.34. RuBisCo enzimi izolasyonuna ait kromatogram	120
Şekil 3.35. Ispanaktan izole edilen nano yapılı RuBisCo enziminin TEM görüntüsü	121
Şekil 3.36. Ispanaktan izole edilen nano yapılı RuBisCo enziminin zeta boyut dağılımı analizi	122
Şekil 3.37. Ispanaktan izole edilen nano yapılı RuBisCo enziminin floresans spektrumu	122
Şekil 3.38. a. Ispanaktan izole edilen RuBisCo enziminin CD spektrumu b. Ispanaktan izole edilen nano yapıdaki RuBisCo enziminin CD spektrumu	124
Şekil 3.39. a. Ticari RuBisCo enziminin aktivite eğrisi, b. Nano RuBisCo enziminin aktivite eğrisi, c. Ispanaktan izole edilen RuBisCo enziminin aktivite eğrisi, d. Ispanaktan izole edilen ve nano yapıda sentezlenen RuBisCo enziminin aktivite eğrisi	126
Şekil 3.40. RuBisCo enzimlerinin CO ₂ ile etkileşimi sonrası ortamda oluşan 3-fosfogliseraldehitin İTK ile belirlenmesi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Ispanaktan izole edilen RuBisCo enzimi c. Nano RuBisCo enzimi d. Ispanaktan izole edildikten sonra nano yapıda sentez	128
Şekil 3.41. Ribulaz-1,5 bifosfat derişiminin RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. İzole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.....	129
Şekil 3.42. Sistemden geçirilen CO ₂ miktarının RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. İzole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.....	130
Şekil 3.43. Mg ²⁺ iyon derişiminin RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. izole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.....	131

Şekil 3.44. pH'ın RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. İzole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.	132
Şekil 3.45. NanoRuBisCo enzimlerinin tekrar kullanılabilirliği a. Nano RuBisCo enzimi b. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.....	133
Şekil 3.46. RuBisCo ve CA ticari ve nano enzimlerin SDS-PAGE analizi.....	134

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	: Alkol dehidrogenaz
AGY	: Asal gaz yoğunlaştırma yöntemi
APS	: Amonyum Persülfat
ANADOLUCA	: AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach
BET	: Azot adsorpsiyon porozimetri
BSA	: Sığır serum albümini
CA	: Karbonik anhidraz
CD	: Dairesel dikroizm
CO₂	: Karbondioksit
CVC	: Kimyasal buharlaştırma yöntemi
DTT	: Ditiyoeritrol
E.C.	: Enzim Komitesi
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
FalddH	: Formaldehit dehidrogenaz
FateDH	: Format dehidrogenaz
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared
FPLC	: Hızlı protein sıvı kromatografisi
GDH	: Glutamat dehidrogenaz
HEMA	: 2-hidroksi etil metakrilat
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

İTK	: İnce tabaka kromatografisi
K_m	: Michealis sabiti
MATyr	: Metakriloil amido tirozin
MBAAm	: N,N' Metilenbisakrilamit
NADH	: Nikotinamit adenin dinükleotit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pNPP	: p-nitrofenil palmitat
PVA	: Poli vinil alkol
RuBisCo	: Ribulaz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksigenaz
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SDS PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
TEM	: Geçirgenlik elektron mikroskobu
TEMED	: N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin
TNF-α	: Tümör nekrosis faktör alfa
U	: Ünit aktivite
USP	: Ultrasonik sprej piroliz
V_{mak}	: Maksimum reaksiyon hızı

1. GİRİŞ

Günümüzde endüstrileşmenin ve ekonomik büyümenin artması karbondioksitin (CO_2) global emisyonunu arttırmaktadır. Sera gazlarının % 90'ı CO_2 emisyonunu arttırmaktadır. Diğer yandan CO_2 emisyonunun %40'ı elektrik sektöründen kaynaklanırken, % 25'lik bir kısımda ise demir ve çelik prosesi, petrol rafinerisi, çimento endüstrisi, doğal gaz işlenmesi gibi geniş ölçekli endüstriyel işlemlerin emisyonu arttırdığı görülmektedir. Araştırmalar, endüstriyel faaliyetlerin artmasından sonra atmosferdeki CO_2 miktarının arttığını göstermektedir. İnsanoğlu atmosferdeki fazla CO_2 'yi işleme ya da yararlı ürünlere dönüştürmek gibi faaliyetlerde bulunmadığı sürece, uzun vadede atmosferdeki artan CO_2 , iklim değişikliklerine neden olacaktır: Dünyanın ısınmasına, okyanusların ve denizlerin daha asidik olmasına ve dolayısıyla bitkilerin ve diğer canlıların yaşamını tehdit edici unsurlara yol açacaktır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, CO_2 'nin yararlı kimyasallara dönüştürülmesi, veya bir süreçte diğer prosesler için hammadde olabilecek ürünlere dönüştürülmesi son zamanlarda oldukça önem arz etmektedir.

Yapılan çalışmada, CO_2 'yi tutucu ve dönüştürücü biyo mimik sistemler nano enzimlerle birlikte kombine edilerek geliştirilmiş ve farklı uygulamaları ortaya konmuştur.

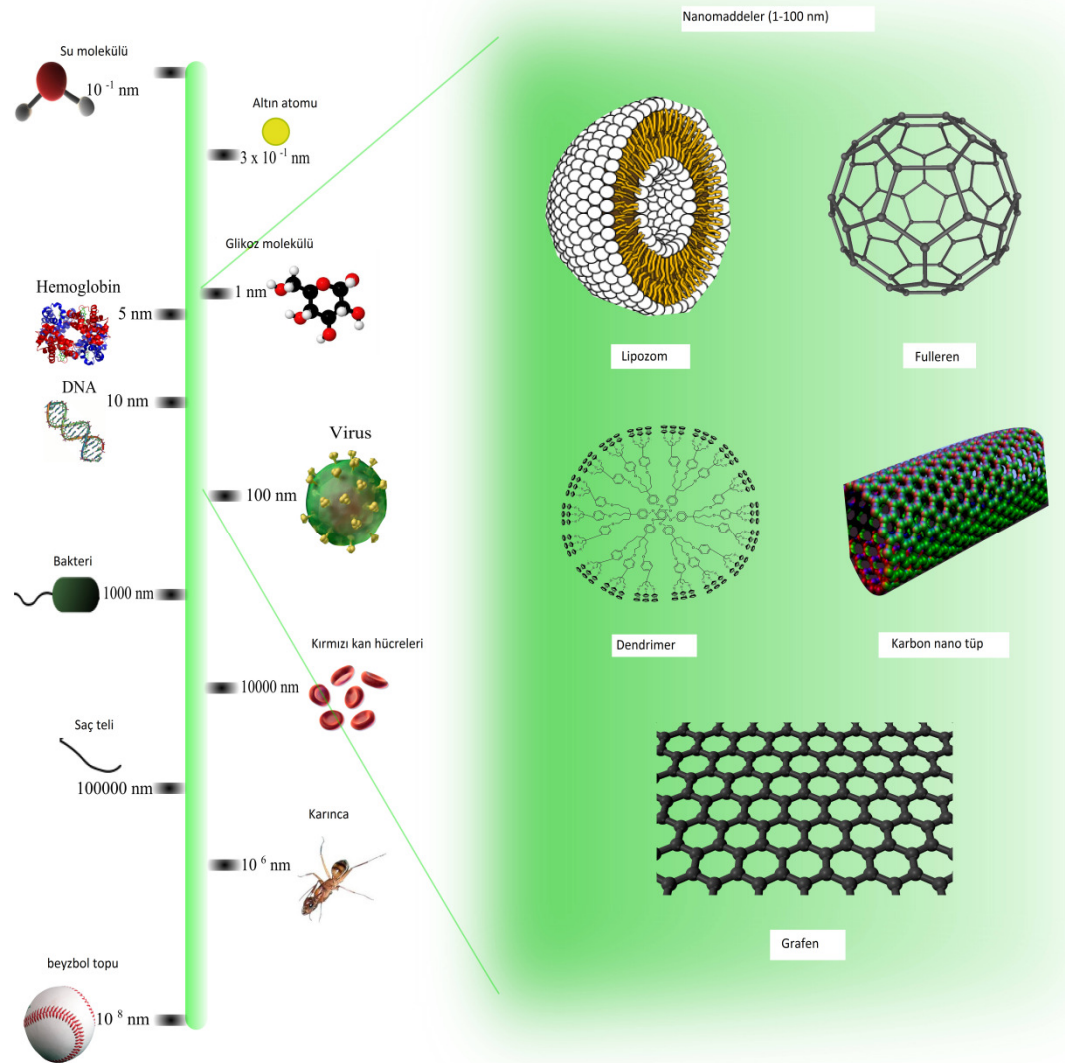
1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddenin atomik, moleküler ve supramoleküler düzeyde kontrolünü inceleyen bir bilim dalıdır. Genel bir ifadeyle, en az bir boyutunun büyüklüğü 1'den 100 nm'ye kadar olan maddenin kontrolü olarak tanımlanmaktadır. Latince anlamı cüce olan nano kelimesi, herhangi bir fiziksel büyüklüğün milyarda birini ifade etmektedir. Bir nanometre (nm), uzunluk birimi açısından metrenin milyarda biridir. Nanometre biriminin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı büyüklüklerin karşılaştırılması yapılabilir. Örnek olarak, bir gazete kağıdının kalınlığı 100000 nm, insan saç teli 20000-50000 nm aralığında, bir

DNA çift sarmalı yaklaşık 2 nm çapta ve en küçük hücresel yaşam formları olan mikroplazma familyasının bakterileri yaklaşık 200 nm uzunluktadır. Şekil 1.1 nanometrenin boyut skalasındaki yerini farklı örneklerle göstermektedir [1].

Maddenin büyüklüğü nanometre boyutuna indiğinde kuantum davranışlar, bilinen klasik davranışların yerini alarak maddenin fiziksel özelliklerinde büyük bir değişim gözlenmektedir. Kimyasal ve fiziksel özelliklere bakıldığında, yapının büyüklüğüne ve atom yapısının ayrıntılarına, dışarıdan sisteme bağlanan yabancı bir atomun cinsine ve yerine göre oldukça farklı ve olağan üstü davranışlar göstermektedir. Örnek olarak, karbon atomlarından oluşan bir elmas kristali iyi bir yalıtkan olduğu halde, bir boyutlu karbon atom zinciri, altın veya gümüş zincirlerden bile daha iyi bir iletken olabilmektedir. Buna göre, nanobilim nanometre ölçülerinde ortaya çıkan maddedeki bu yeni davranışları anlamamızı sağlar ve nanoteknoloji ise, yeni nanoyapılar tasarlayıp sentezlemeyi veya nanoyapılara yeni farklı özellikler kazandırmayı ve bu özellikleri yeni işlevlerde kullanmayı hedefler [2].

Nanoteknoloji ile biyoteknolojinin birlikte gelişmesi ve moleküler biyoloji alanındaki bilgi birikiminin bu gelişen iki alanı desteklemesiyle ortaya nanobiyoteknoloji araştırma alanı çıkmıştır. Böylelikle bugüne kadar mümkün olmayan tanı ve terapötik uygulamalar da bilim insanlarınca geliştirilmeye başlanmıştır. Literatürdeki son zamanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında ise, nano teknolojinin enzim, protein, antijen, antikor gibi biyomoleküllere de uygulanarak, farklı alanlarda uygulamalar geliştirilmeye başlandığı görülmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalarda, biyomoleküller nanomateryaller üzerine konjuge edilerek etkinlikleri incelenmektedir. Diğer yandan da patentlenmiş birtakım çalışmalarla, biyomoleküllerin kendisi nano formatta hazırlanarak, farklı alanlarda kullanılabilmektedir.



Şekil 1.1. Farklı yapıların boyut skalasında gösterimi [3]

Günümüzde yoğun ilginin bulunduğu nanoteknoloji konusunun aslında bir buçuk asır öncede aynı terim kullanılmasa da ilgi çektiği Michael Faraday’ın “Philosophical Transactions of the Royal Society” de 1857 yılında yayınlanan makalesinden anlaşılmaktadır. Makalede 19. yüzyılın ortasında birçok kişinin maddelerin boyutu küçültüldükçe özelliklerinin ne olduğunu anlamaya çalıştığı ortaya çıkmaktadır. Faraday’ın araştırdığı malzemeler arasında altın kolloidal çözeltileri en ünlüsü olup, bu renklerden bir tanesi olan yakut kırmızısı, 100 nm’ nin altında partiküller içermektedir. Bu sebeple Faraday’ı nanomalzemeler üzerinde sistematik çalışmalar yapan ilk bilim adamı olarak tanımlamak uygun

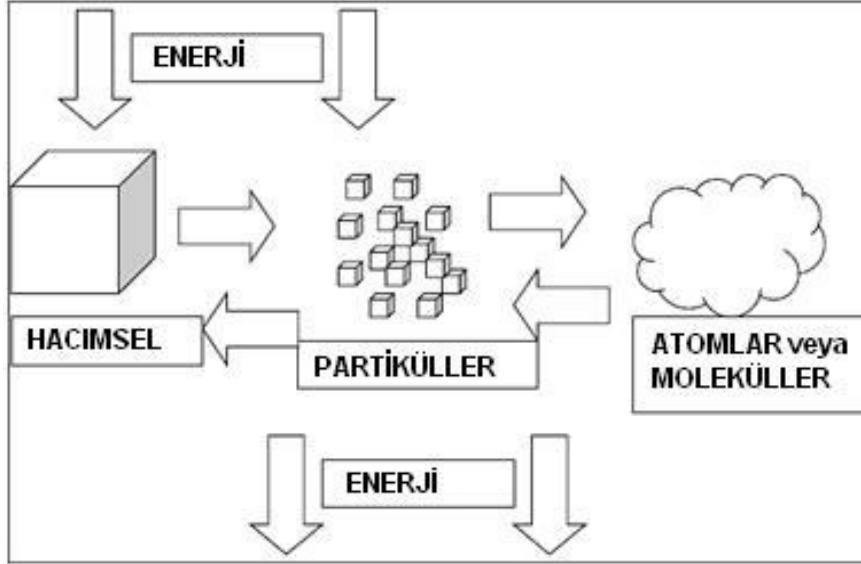
olacaktır. Bununla birlikte nano-yapıların kullanımının en önemli göstergesi Mayaların mavi boyasının rengini bir organik pigmentin, oksit süperlatistlerinin ve metal nanopartiküllerinin bir araya gelmesiyle, parlak ve kimyasal olarak kararlı bir pigment oluşturmasıyla meydana geldiğine inanılmasıdır. Ayrıca altın kolloidleri, cam boyalarında ve altın tuzlarının kalay klorür kullanılarak indirgenmesiyle elde edilen Cassius'un nanoparçacıklı mor pigmentinde geniş olarak bulunmaktadır.

Günümüzdeki nanoteknoloji akımını fikir olarak 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'na konuşma yapan ve daha sonra Nobel ödülü kazanan Richard P. Feynman başlattı ya da en azından bu düşüncüyü somut hale getirdi. "En altta biraz yer var" başlıklı konuşmasında tüm Britannica Ansiklopedisini toplu iğnenin başına yazılabileceği örneğini verdi. Aynı zamanda tekil atomların hareket ettirilmesi, bilgisayarların küçültülmesi ve bu küçücük ayrıntıları görmek için daha iyi teknikler ve makineler geliştirilmesinden bahsetti. Dr. Feynman'ın konuşması tamamen teorikti ve fantastik görünüyordu. Fizik kurallarının tekil atomları ya da molekülleri hareket ettirmenin ve işlemenin engel olmadığını tarif etti. Atomların tam olarak işlenebileceği zamanın önlenemez olarak geleceğini doğru tahmin etti. Feynman'ın konuşması sadece ABD'de değil diğer ülkelerde de etkili olmuş ve bu konu üzerinde çalışmalar başlamıştır. Bu düşünce akımının etkisinde Japonya, Tokyo Bilim Üniversitesinde çalışmalarını sürdüren Norio Taniguchi 1974 yılındaki bildirisinde ilk defa nanoteknoloji terimini kullanarak literatüre bu terimi sokan kişi olarak bilim tarihine geçmiştir. Aynı tarihte tek atom katmanından oluşan ince filmlerin üretimi Finlandiya'da Dr. Tuomo Suntola ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. 1981 yılında taramalı tünel mikroskopunun (STM) icadı ve bundan birkaç yıl sonra 1984'de atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) geliştirilmesiyle nano boyutta ölçüm yapmak mümkün olduğundan nano-teknoloji alanındaki çalışmaların artışı ve hızlı ilerlemeler bu tarihlerden sonra başlamıştır [4].

1.1.1. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri

Nanopartiküller, boyutları 100 nm ve altında kalan tozlar olarak tanımlanmaktadır ve nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Bu maddeleri diğer maddelerden ayıran ve üstünlük olarak nitelendirilen özelliklerinin nedenleri, kuantum boyut etkileri, elektronik yapılarının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının eşsiz karakteri ve yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmalarıdır [5]. Nanoteknolojik malzemelerin çıkış noktasını oluşturan nanopartiküller geniş bir kimyasal aralık ve morfolojide üretilebilirler. Günümüzde çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu, küresel, çubuk benzeri ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilere sahip metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı veya bunların karışımından istenilen özelliklere sahip nanopartiküller hazırlanabilir [6].

Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan yöntemler “aşağıdan yukarı” ve “yukarıdan aşağı” olmak üzere iki türdür [7]. Şekil 1.2 nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımları kısaca özetlemektedir.



Şekil 1.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar [7]

Yukarıdan aşağıya yaklaşımına dahil olan yöntemlerde hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nanoboyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması temel alınmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımına dahil olan yöntemlerde ise,

atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyüterek partikül oluşumu gerçekleştirilmektedir. Nanopartikül üretiminde kullanılan bu yöntemlerin yanında fiziksel veya kimyasal temelli olarak farklı iki yaklaşımın da yapılması sözkonusu olabilir. Mekanik enerjinin kullanılarak nanopartikül üretimi fiziksel yöntemler, kimyasal reaksiyonların sonucunda nanopartikülün oluştuğu yöntemler ise, kimyasal temelli yöntemler olarak kabul edilmektedir [8].

1.1.1.1. Kimyasal Buhar Yoğunlaştırma Yöntemi

Kimyasal buharlaştırma yöntemi (CVC), yüksek miktarda nanopartikül elde etmek için oldukça kullanışlı bir yöntemdir ve ilk olarak 1994'de Almanya'da geliştirilmiştir. Bu yöntemde, metalorganikler, karboniller, klorürler ve hidrürler gibi buhar fazına kolaylıkla geçebilecek bileşikler başlangıç malzemesi olarak kullanılmaktadır. Yöntem, ısı parçalanma ile gaz fazındaki malzemenin nanopartiküle dönüşümü esasına dayanmaktadır. Başlangıç malzemesinin gaz fazına geçtiği bölgeye gaz akışı verilerek buharın reaktör içine taşınıp buradaki fırınla ısı parçalanma işlemini içerir. Taşıyıcı gaz olarak He, Ar veya N₂ gibi inert gazlar kullanılmaktadır. Aglomere olmamış nanopartiküllerin hazırlanması ve isteğe bağlı olarak çekirdek-kabuk veya içi boş partiküllerin sentezlenebildiği bir yöntemdir [9-11].

1.1.1.2. Hidrojen Redüksiyonu Yöntemi

Hidrojen redüksiyon yöntemi, gaz fazında indirgeme işlemiyle metalik nanopartiküllerin üretiminin gerçekleştirilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle, özellikle demir grubu metal (Fe, Ni ve Co) nanopartiküllerinin laboratuvar ölçekli sentezi görülmektedir. Yöntemde ilk olarak, kullanılan başlangıç çözeltilisi buharlaştırılarak, taşıyıcı veya indirgeyici bir gazla önceden ısıtılmış bölgeye ardından daha sıcak bölgeye taşınarak nanopartikül sentezi gerçekleştirilmektedir. İşlemler sırasında hidrojen gazı tek başına hem indirgeyici hem de taşıyıcı gaz olarak kullanılabileceği gibi, azot, argon gibi inert gazlar da taşıyıcı gaz olarak kullanılabilmektedir.

1.1.1.3. Asal Gaz Yoğunlaştırma (AGY) Yöntemi

Asal gaz yoğunlaştırma yöntemiyle (AGY) nanokristalin metal ve alaşımlarının doğrudan aşırı doygun buhar fazından üretimi gerçekleştirilir. Günümüzde, laboratuvar ölçekli nanotozların sentezinde kullanılmaktadır. Yöntemde, buharlaşan atomlar veya moleküller homojen olarak birikerek, ısı kaynağının yakınında aşırı doygunluğa ulaşır. Başlangıç malzemesinin buharlaşan atomlarıyla sistemdeki gaz moleküllerinin çarpışması sonucu çekirdeklenme ve partikül oluşumu sıvı metale yakın bölgede gerçekleşir. Yüksek gaz basıncının varlığıyla, daha hızlı soğuma olur ve çok ince nano partiküllerin oluşumu gerçekleştirilir.

1.1.1.4. Mikroheterojen Sistemlerden Nanopartikül Sentezi

Mikroheterojen nanopartikül sentez yöntemleri, aşağıdan yukarıya yaklaşımla nanopartikül üretimi için kullanılan metotları kapsamaktadır. Mikroheterojen sistemler, sıvı kristaller, jeller, misel çözeltileri ve mikroemülsiyonlar olabilir. Bunlar, metaller, oksitler, sülfatlar ve suda çözünmeyen maddeler ile birlikte suda çözünür inorganik ve organik malzemelerin nano formunda sentezlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca; bu teknikle, çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç veya poröz nanopartiküllerin üretimi mümkün olmaktadır.

Nanopartiküllerin mikroheterojen sistemlerden sentezlenmesi birbirini takip eden işlem basamaklarını gerektirir. Bunlar; istenen nanomalzemeye uygun mikroheterojen sistemin seçilmesi, reaktantların yapısının bu sisteme uygunluğu, karıştırma işlemi sonunda sistemin fizikokimyasal özelliklerinin karakterizasyonu olarak belirlenebilir. Sentezler genellikle oda sıcaklığında gerçekleşir ve ince boyutlu nanopartikül sentezine olanak sağlar.

1.1.1.5. Alev Sentezi Yöntemi

Alev sentezi yöntemi, nanopartiküllerin ticari miktarlarda sentezi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, kimyasal bileşim aralığı, partikül morfolojisinin kontrolü, partikül boyut dağılımının kontrolü daha kontrol edilebilir düzeydedir. Ayrıca yöntem diğer nanopartikül sentez yöntemlerine göre, daha düşük maliyetlidir. Alev ortamının yüksek oksitleyici özelliğinden dolayı, oksit nanopartiküllerinin sentezi için oldukça elverişlidir. Alev sentezi yönteminde, kolay uçuculuğa sahip, metal halojenürler başlangıç malzemesi olarak kullanılmaktadır.

1.1.1.6. Mekanik Aşındırma Yöntemi

Alaşımların ve faz karışımlarının nanopartikül halinde sentezi bu yöntemle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem, yukarıdan aşağıya üretim yaklaşımına uygun bir yöntemdir ve nanoyapılar atomik veya moleküler düzeyden kaba tanecikli yapıların plastik deformasyonu sonucunda ayrışmasıyla oluşmaktadır. Alaşım, intermetalik, seramik ve kompozit gibi amorf malzemelerin nanoyapıda sentezi metalik aşındırma metoduyla yapılabilir.

1.1.1.7. Ultrasonik Sprey Piroliz (USP) Yöntemi

Nanopartikül üretiminde, küresel ve aglomere olmamış, geniş bir aralıkta değişen kimyasal bileşime, morfolojiye ve boyuta sahip nanopartiküllerin üretiminde ultrasonik sprey piroliz (USP) yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde yüksek saflıkta metal tuzlarının veya ikincil hammaddelerin temizlenmiş çözeltileri kullanılmaktadır. Yöntemde başlangıç çözeltisinden, birbirinden ayrık damlacıkların aerosol formatında oluşumu, ısı parçalanma işlemi ve faz değişimi kontrolü önemli basamaklardır. Aerosol senteziyle, farklı partikül morfolojisine sahip ürünler elde edilebilir. Aerosol buharı, yüksek sıcaklık alanına girdiğinde, damlacığın buharlaşması veya kurumması, çökmesi ve

parçalanması damlacık seviyesinde gerçekleşmektedir. Oluşan nanopartikül boyutu, damlacık boyutuna, başlangıç çözeltisinin özelliklerine ve sıcaklık gibi parametrelere bağlı olarak değişir [12-20].

1.1.1.8. Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi

ANADOLUCA (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) yöntemi R. Say ve ark. tarafından patentlenen [21], biyoteknoloji alanında ve yaşam bilimlerinde kullanılmak üzere geliştirilen bir yöntem olup, rutenyum tabanlı, ışığa duyarlı, aminoasit monomer ve oligomerlerin sentezini, ışığa duyarlı proteinlerin konjugasyonunu ve çapraz bağlanmasını kurgulayan bir yöntemdir.

ANADOLUCA yöntemiyle, farklı hücre tiplerini, dokuları ve diğer hedefleri algılamak için istenen mikro veya nanoyapılar sentezlenebilmektedir. Yöntemin temelinde, bir çok proteinde yer alan sistein, triptofan ve tirozin amino asitlerine rutenyum tabanlı amino asit monomerler tarafından elektron kuşaklar atılarak sağlam çapraz bağlı konjugasyonlar oluşturularak moleküllerin kararlılığını, dayanıklılığını ve fonksiyonelliğini arttırmak yer alır. Işığa duyarlı monomerlere, kovalent ve çapraz bağlanma işlemi nedeniyle doğru antikör oryantasyonu için yönlendirme sağlanmakta ve denatürasyon engellenmektedir.

ANADOLUCA yöntemi, silika materyallere, süperparamanyetik partiküllere, nanokristallere, karbon nanotüplere, Ag/Au nanopartiküllere ve Au yüzeylerine protein entegrasyonu yanı sıra proteinimsi polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında ve ilgili yüzeylerle etkileşiminde de uygulanabilir. Bunun yanında, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, aynı anda tanı ve tedavi olanağı sağlayan kitler, nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılabilen yeni nesil nanobiyokonjugantlar sentezlenebilir. ANADOLUCA yöntemi, çok fonksiyonelli, biyolojik olarak uyumlu, kararlı ve seçici mikro ve nano biyokonjugasyon işlemlerini sağlamasının yanında, kataliz ve de tayin amaçlı

olarak kullanılabilir. Sentezlenen nanobiyo konjugatlarda proteinlerin konformasyonları, fonksiyonellikleri etkilenmediği gibi geniş pH ve sıcaklık aralığında da çalışma imkanı sağlamaktadır [22].

Bu tezin çalışmaları doğrultusunda sentezlenen nano enzim yapıları, Say R. ve arkadaşları tarafından patentlenen ‘‘Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA konsept yöntemi’’ ile sentezlenmiştir.

1.2. Enzimler

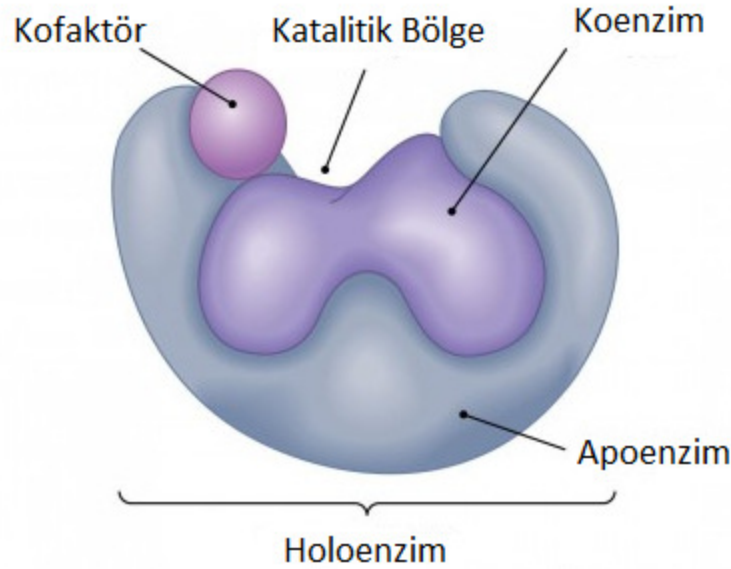
Enzimler, canlılardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yüksek verimlerle ürün elde edilmesini sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluşturmaktadırlar. Canlıları oluşturan moleküller, kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bunun için, bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir [23].

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmıştır. Enzim katalizi ile ilgili önemli çalışmalar ilk olarak, 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma, 1835 yılında yapılmış olup, diastazın nişastayı ‘‘in vivo’’ olarak sülfürik asitten daha yüksek verimde hidrolizlediğini göstermiştir. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda, 1860 yılında L.Pasteur, fermantasyonda enzimlerin rol aldığını deneylerle kanıtlamıştır. Enzimoloji alanında yapılan çalışmalardaki en önemli gelişme, 1926 yılında Sumner’in üreaz enzimini izole ederek, protein yapısındaki bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır. 1930-1936 yılları arasında Northrop’un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirip protein yapısında olduğunu kanıtlaması enzimlerin protein yapısındaki bileşikler olduğunu tartışmasız kılmıştır.

Kimyasal katalizörlere göre enzimlerin pek çok üstünlükleri vardır. Örneğin, biyolojik katalizörler, reaksiyon hızını yaklaşık 10^{20} ’ye kadar arttırırken, diğer katalizörler 10^2 - 10^4 kadar arttırabilmektedir. Bu özellik, reaksiyonların ilerlemesi açısından oldukça önemlidir. Bir başka açıdan

değerlendirildiklerinde, enzimler çok spesifik maddelerdir. Enzimle ilintili substrata çok benzeyen maddeleri, hatta substratın stereoizomerlerini bile dönüştürme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda yüzlerce biyokimyasal reaksiyon oluşmaktadır [24].

Bazı enzimler katalizleme reaksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirirken bazıları da protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar, “kofaktör” adı verilen bu gruplar bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen enzim aktivitesi için ikisi de gerekebilir. Koenzimle birlikte olan enzim molekülüne "haloenzim", kofaktörsüz olan protein kısmına ise "apoenzim" denir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite göstermezler, ancak koenzimle veya kofaktörle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar [25]. Şekil 1.3’de bir enzimdeki apoenzim, kofaktör, koenzim ve haloenzim kısımları şematik olarak gösterilmiştir.



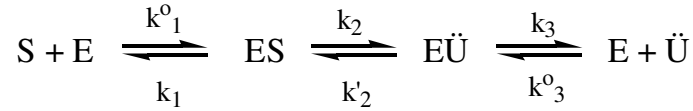
Şekil 1.3. Enzimde kofaktör, koenzim, apoenzim ve haloenzim kısımlarının şematik gösterimi[26]

Enzimler sadece canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalarak hücre içinde faaliyet gösterir. Böyle enzimlere “intraselüler” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde

sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara da “ekstraselüler” (hücre dışı) enzimler denir.

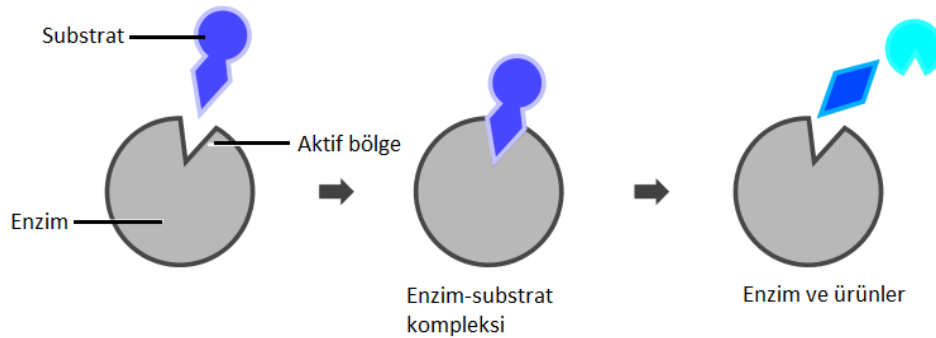
Substratlar, enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelerdir ve enzimde “aktif merkez” denilen özel bir bölgeye bağlanırlar. Bu aktif merkez, polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katmanları ile oluşmaktadır ve katalitik aktiviteden sorumludur. Aktif bölge, substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Substrat ürün yapısına çevrilerek enzim üründen ayrılır.

Şekil 1.4’de enzimlerin substratlarına bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturması ardından bu kompleks üzerinden ürün (Ü) oluşması şematize edilmiştir.



Şekil 1.4. Enzimlerin genel çalışma prensibi

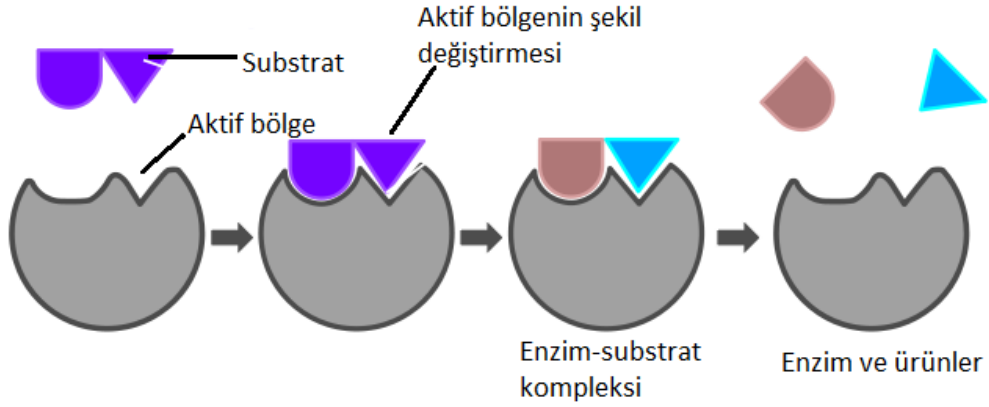
Enzimler substratlarıyla şimdiye kadar belirlenen başlıca iki tür etkileşimle reaksiyona girerek ürün oluştururlar. Bunlardan biri anahtar-kilit uyumu modeli, diğeri ise indüklenmiş uyum modelidir. Anahtar-kilit uyum modeli, 1894 yılında Fisher tarafından ortaya konulmuş ve substrat ve enzimin aktif yerinin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğunu varsaymıştır. Başka bir deyişle, enzim ve substratın birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekillerinin olmasıyla birbirlerini spesifik olarak tanıdığını ortaya koymaktadır. Şekil 1.5’te anahtar-kilit uyum modeli şematize edilmiştir.



Şekil 1.5. Anahtar-kilit uyum modeli [27]

Anahtar-kilit uyum modeline göre, enzimin aktif bölgesi ve substrat birbirlerine şekil olarak tam uyumludur ve substrat enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzim substrat kompleksi oluşturur. Ardından, ürün oluşumuyla enzim tekrar serbest hale geçer.

Bu tanım, enzimlerin substratla etkileşimlerinde spesifikliği açıklasa da geçiş hali (enzim-substrat kompleksi oluşumunu) tam olarak açıklayamamaktadır. 1958’de Koshland anahtar-kilit uyum modelinin üzerine bir teori geliştirerek, indüklenmiş uyum modeliyle, enzimlerin göreceli olarak esnek yapıda olduklarını ortaya atmış ve substratın enzimle etkileşirken aktif merkezin sürekli olarak substrat tarafından değiştirildiğini öne sürmüştür [28]. Şekil 1.6’da enzimlerin indüklenmiş uyum modeliyle substratlarına bağlanmaları şematize edilmiştir. Bu teoriye göre, substrat sadece enzimdeki hareketsiz bir aktif merkeze bağlanmayıp, aktif merkezi oluşturan aminoasit yan zincirleri şekillenerek, enzimin katalitik işlevini yerine getirmesini sağlamaktadır. Yani, substrat tamamen enzime bağlanıncaya kadar aktif bölgedeki aminoasit yan zincirler şekillenmektedir, substrat tamamen bağlanınca son noktada şekil ve yükü belirlenmiş olmaktadır [29, 30].



Şekil 1.6. İndüklenmiş uyum modeli [31]

1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Enzimler adlandırılırken, önceleri katalitik etki gösterdikleri substratların isimlerinin sonuna “az” eki getirilerek adlandırılırlardı. Örneğin fosfat esterlerinin katalizlenmesini sağlayan enzimler, fosfataz olarak bilinirdi. Ancak, enzimoloji alanının gelişmesiyle yeni enzimlerin bulunması ve pepsin, katalaz, tripsin gibi substrat ve katalizledikleri reaksiyon hakkında bilgi içermeyen enzim isimleri kullanılmaya başlanmasıyla enzimlerin adlandırılması için uluslararası enzim komitesi tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve mekanizmalarına göre bir sınıflandırma yapılmıştır.

Sistemik isimlendirme yapılırken bazı noktalara dikkat edilmelidir. Bunlar:

a. Reaksiyonlar ve onları katalizledikleri enzim grupları başlıca 6 alt gruba ayrılmıştır. Enzimin hangi alt gruba ait olduğu belirtilmelidir. Enzimlerin ayrıldıkları 6 alt ana grup şu şekilde incelenebilir:

- i. Oksidoredüktazlar:** Oksidoredüktazlar, iki substrat arasındaki indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim grubudur. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen vericidir. Dehidrogenazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar bu gruptandır. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidazlar olarak isimlendirilirler.
- ii. Transferazlar:** İki substrat arasında, hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzim grubudur. Diğer bir söylemle, verici üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Amino-transferazlar, CoA-transferazlar bu grubun örnekleridir.
- iii. Hidrolazlar:** Eter, peptid, ester, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılımıyla hidrolizlenmesini katalizleyen enzim grubudur. Lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve bütün proteolitik enzimler bu grupta yer almaktadır.
- iv. Liyazlar:** Substratlardan, fonksiyonel grupların uzaklaştırılarak, çift bağların kurulumunu katalizleyen enzim grubudur. Hidratasyon

ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler, dekarboksilazlar ve aldolazlar bu grupta yer almaktadır.

- v. **İzomerazlar:** Bir moleküldeki yapısal ve geometrik değişimleri yani geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Katalizledikleri izomerasyon türlerine göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz ya da sikloizomeraz şeklinde adlandırılabilirler.
- vi. **Ligazlar:** Adenozintrifosfat (ATP) veya guanizintrifosfat (GTP) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopmasıyla meydana gelen enerjiyi kullanarak, iki molekülün bağlanmasını katalizleyen enzim grubudur. Aminoasitleri aktive eden enzimler, açılCoA – sentetazlar bu enzim grubuna örnek verilebilir [32].
- b. İsimlendirmede, enzim adı iki bölümde verilmektedir. Enzim adının ilk bölümünde substrat veya substratlar yer alır, ikinci bölümünde ise; katalizlenen reaksiyonun türüne göre “az” eki getirilmiş hali yani grup veya alt grup adı yazılır. Substratlar, aralarına iki nokta kullanılarak yazılır.
- c. Reaksiyonun türüne ilişkin ilaveten bir açıklama yazılacaksa, parantez içinde ismin sonuna yazılmaktadır. Örnek olarak,
$$\text{L-malat} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{Piruvat} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$$
 reaksiyonu bir dekarboksilasyon reaksiyonudur. Bunu ayrıca belirtmek için enzim adı
L-malat:NADP⁺ oksidoredüktaz (dekarboksile eden) şeklinde yazılmaktadır.
- d. Her enzime Uluslararası Enzim Komitesi tarafından sistematik bir kod numarası verilmiştir. Bu numara, E.C. (Enzyme Commission) harflerinden sonra ardarda gelen dört rakamdan oluşmaktadır. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterir, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt grubun alt grubunu ve dördüncü rakam ise enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını vermektedir. Örneğin karbonat hidroliyaz olarak da adlandırılan karbonik anhidraz enziminin bu şekilde sınıflandırmayla ifadesi E.C.4.2.1.1. şeklindedir. Alkol dehidrogenaz enzimi ise E.C. 1.1.1.1 şeklinde isimlendirilmektedir.

1.2.2. Enzim Aktivitesi

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda bulunduklarından kantitatif olarak miktarlarının belirlenmesi çok zordur. Bu nedenle enzimlerin aktiviteleri ölçülerek etki ettikleri reaksiyonlarda substratıyla bağlantılı olarak miktarları hakkında bilgi verilebilir. Enzimlerin katalizör olarak etkinliğinin belirlenebilmesi için bir çözeltideki toplam miktarları yerine ürüne dönüştürdükleri substrat miktarının ölçülmesi gerekir. Optimum reaksiyon koşullarında, birim zamanda, substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı “enzim aktivitesi” olarak tanımlanır.

Bir enzimin aktivitesi farklı yöntemlerle belirlenebilir. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği, oluşan ürünün absorbans değişikliği ya da harcanan substratın zamanla absorbansındaki değişiklik bir birim olarak ifade edilebilir. Bunun yanında enzimlerin aktivitesini ifade etmek için uluslararası kabul edilen tanımlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin enzim ünitesi, optimum şartlarda, bir ünite enzim, bir dak’da 1 μ mol substratın dönüşümünü (veya 1 μ mol ürünün oluşumunu) katalizleyen enzim miktarıdır. Bir enzimin aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer bir birim de spesifik aktivitedir. Bir enziminin spesifik aktivitesi, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır. Spesifik aktivite kullanılarak, enzim ünitesini miligram olarak tanımlamak da mümkündür. Diğer bir enzimatik aktiviteyi belirleyen birim ise katalıdır. Optimum şartlarda 1 katal, 1 san’de 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Turnover sayısı ise, moleküler aktivite olarak da bilinir ve optimum koşullarda, bir saniyede, bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısı olarak tanımlanmaktadır [33].

1.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimatik aktiviteyi enzim derişimi, substrat derişimi, pH, sıcaklık, ve inhibitörler etkilemektedir.

1.2.3.1. Enzim Derişimi

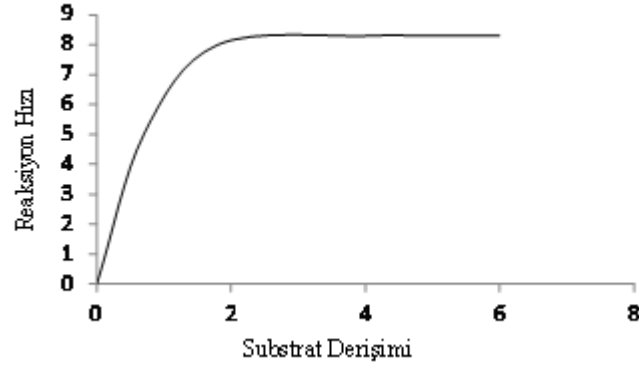
Bir enzimatik tepkimenin hızı, tüm substrat derişimlerinde enzim derişimi ile orantılı olarak değişir. Tepkime ortamda yeterli miktarda substrat derişimi bulunması halinde tepkime hızı, enzim derişimi ile artmaktadır. Ancak, ortamdaki substrat tükendiğinde ürüne dönüştürülecek herhangi bir madde olmadığından enzim derişimi ne kadar artarsa artsın reaksiyon sabit bir hızla devam eder. Şekil 1.7’de enzim derişiminin enzimatik aktiviteye etkisi gösterilmektedir. Buna göre ortamdaki enzim derişimi arttıkça reaksiyon hızı da buna bağlı olarak artmaktadır.



Şekil 1.7. Enzim derişiminin enzimatik aktiviteye etkisi

1.2.3.2. Substrat Derişimi

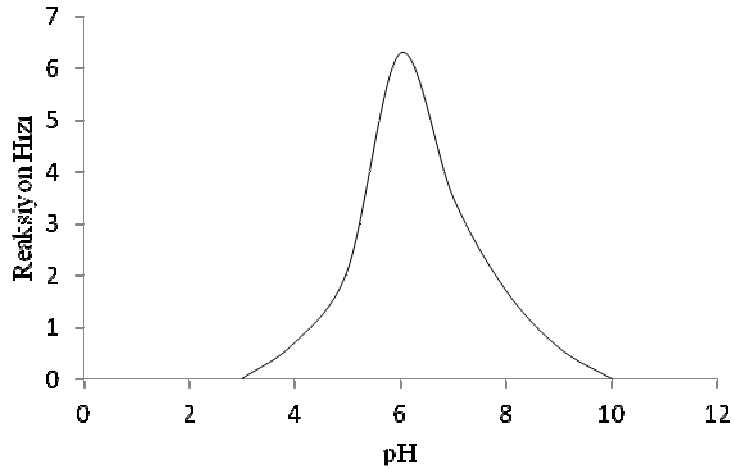
Enzim derişimi ve diğer bütün Őartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat derişiminin artırılmasıyla başlangığta doğrusal bir artış gösterir. Ancak enzimin aktif bölgeleri ortamdaki substratla doygun hale geldiğinde enzim ulaşabileceği maksimum hıza (V_{mak}) ulaşır ve bu noktadan sonra reaksiyon sabit bir hızla devam eder ve substrat derişimi artsa da reaksiyon hızı sabit seyretmektedir. Şekil 1.8’de substrat derişiminin enzimatik aktiviteye etkisi gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Substrat derişiminin enzimatik aktiviteye etkisi

1.2.3.3. pH Etkisi

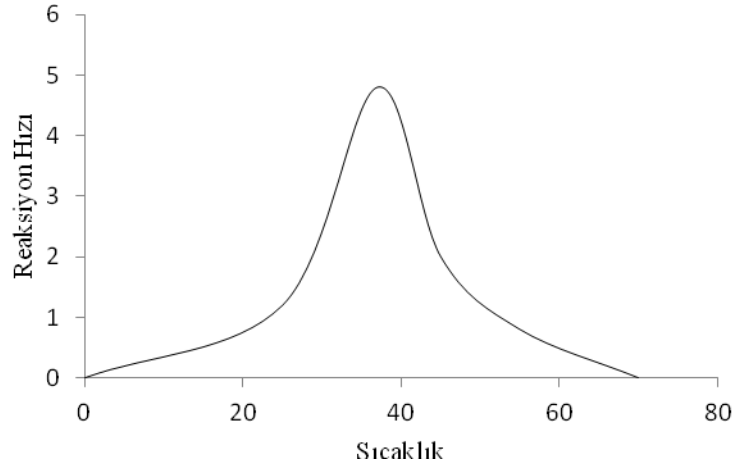
Enzimler protein yapısında maddelerdir ve yapılarında bulunan amin ve karboksil grupları yani aktif uçlarındaki asitlik ve bazlık, ortamın pH değişimine göre farklı iyonlaşma dereceleri gösterir. Bu da enzimin yapısında değişikliklere neden olur. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli bir pH değeri vardır. Bu değer o enzim için optimum pH'dır. Optimum değerin altındaki veya üstündeki pH dereceleri protein yapısından dolayı enzimde denatürasyona neden olarak enzim aktivitesini azaltabilir veya tamamen durdurabilir. Şekil 1.9'da pH değişiminin enzimatik aktivite üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 1.9. pH' ın reaksiyon hızına etkisi

1.2.3.4. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın artması, reaksiyondaki moleküller arasındaki etkin çarpışma sayısını artıracığından reaksiyonun da hızlanmasını sağlar. Genel olarak enzimatik reaksiyonlarda, sıcaklıktaki her 1°C artış % 10 daha yüksek bir enzim aktivitesi sağlamaktadır. Ancak enzimlerin protein yapısında olması yüksek sıcaklık değerlerinde iç denatürasyona sebep olduğundan reaksiyon hızında da azalma gözlenir. Böylece, her enzimin maksimum verimle çalıştığı belirli bir sıcaklık değeri vardır ve bu değer o enzim için optimum sıcaklıktır. Şekil 1.10'da sıcaklığın enzimatik aktiviteye etkisi gösterilmiştir. Buna göre, sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı da bir noktaya kadar artmıştır. Ancak protein yapısının sıcaklık artışıyla enzimin denatüre olmaya başlamasıyla reaksiyon hızı azalmaya başlamıştır [34].



Şekil 1.10. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi

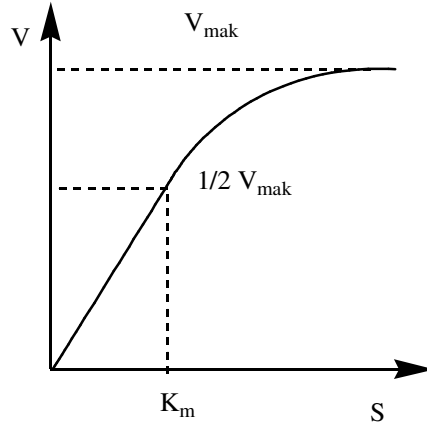
1.2.3.5. İnhibitörlerin Etkisi

İnhibitörler enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerini azaltan hatta yok eden bileşiklerdir. Bu işleme de inhibisyon denilmektedir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ya da dönüşümsüz olmak üzere iki türlü olabilir. Dönüşümsüz inhibitör, enzime kovalent olarak bağlanabilir veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümlü inhibisyonda ise, enzimle inhibitör etkileşimi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonlar, yarışmalı inhibisyon, yarışmasız inhibisyon ve yarı yarışmalı inhibisyon olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Yarışmalı inhibitörlerin yapısı substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylelikle aktif bölgeye enzim bağlanamaz. Yarışmasız inhibitörler ve substrat aynı anda enzim moleküllerine bağlanabilir. Yarışmasız inhibitör etkinliğini, enzimin turnover sayısını ya da katalitik etkinliğini düşürerek gösterir. Yarı yarışmalı inhibisyon türünde ise, inhibitör enzim-substrat kompleksine bağlanır ve katalitik aktiviteyi azaltır.

1.2.4. Enzim Kinetiği

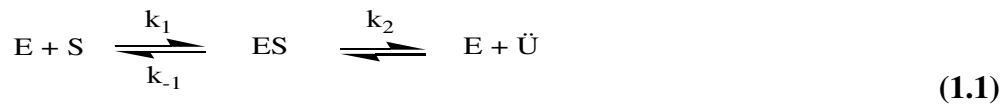
Enzim kinetiği, enzimlerin substratlarına bağlanmasını ve substratların ürüne dönüştürülmesini araştıran bilim dalıdır. Enzim kinetiği alanındaki ilk çalışmalar 1902 yılında Victor Henri, 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten isimli araştırmacılar tarafından yapılmıştır [35,36].

Michaelis ve Menten enzimatik reaksiyonların ilk basamağında, bir enzim-substrat (ES) kompleksi oluşmasını ve enzimlerin substratlarına doymasını temel alarak bir çok enzimin kinetik özelliğini açıklamak için, Şekil 1.11’de verilmiş grafik üzerinden kinetiğinin belirlenmesini ortaya koymuştur.



Şekil 1.11. Enzimatik bir reaksiyonun hızına substrat derişiminin etkisi

Buna göre, düşük substrat derişiminde, reaksiyon hızı substrat derişimiyle orantılı olarak artar. Bu noktalarda reaksiyon substrata göre birinci derecedendir. Substrat derişimi arttırıldığında, reaksiyon hızında da artış görülür. Bu kısımda reaksiyon derecesi sıfırıncı derece ile birinci derece arasındadır. Substrat derişimi daha da arttırıldığında ise, reaksiyon hızı sabitlenir ve substrat derişiminin arttırılmasıyla reaksiyon hızı değişmez. Bu kısımda reaksiyon sıfırıncı mertebeden olup, reaktantların derişiminden bağımsızdır. Yani enzim molekülleri substratla doyunluk halindedir. İşte bu kısım ES kompleksinin oluştuğu kısımdır. Bu teoriye göre; ES kompleksine ait tepkime,



şeklindedir. Bu eşitlikte verilen E = enzim, S = substrat, ES = enzim-substrat kompleksi, Ü = ürünü göstermektedir.

Michaelis-Menten eşitliğine göre substrat derişimi ve reaksiyon hızı doğru orantılı bir artış göstermektedir. Michaelis-Menten eşitliğine göre enzimatik tepkime hızı eşitlik 1.2 ile verilmektedir.

$$V = \frac{V_{mak} \times [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten eşitliği} \quad (1.2)$$

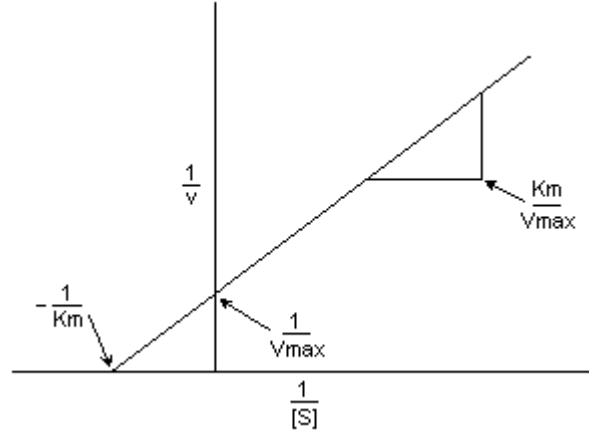
Eşitlik 1.2’de V_{mak}; sistemden elde edilebilecek en yüksek reaksiyon hızıdır ve ancak enzimin substratla doygun olduğu noktada bu hıza ulaşılır. K_m; Michaelis Menten sabiti olarak bilinmektedir ve reaksiyon hızının (V_{mak}) yarısı olduğu substrat derişimidir. S; substrat derişimini ifade etmektedir. Şekil 1.11’de verilen enzimatik bir reaksiyonun hızına substrat derişiminin etkisi grafiğinde, K_m, V_{mak} değerlerinin grafiksel olarak belirlenmesi gösterilmiştir. Genellikle tek substratlı enzimatik reaksiyonların Michaelis-Menten kinetik modeline uyduğu varsayılmaktadır.

Bir enzimin kinetik özellikleri bakımından en doğru bilgiler, Michaelis Menten eşitliğiyle elde edilebilir. Ancak bazı deneysel çalışmalarda, enzimin doygun olduğu substrat derişimi hazırlanamayabilir. Şekil 1.11’de verilen eğrinin her noktası deneysel olarak bulunamaz. Bunun sonucunda da K_m ve V_{mak} değerleri tam olarak hesaplanamaz. Bu gibi durumlarda, Michaelis-Menten eşitliğinin her iki tarafı 1’e bölünerek bir doğru denklemi türetilir. Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile elde edilen bu doğru denklemi Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{mak}} \quad \text{Lineweaver-Burk eşitliği} \quad (1.3)$$

Bu eşitlikte, V; başlangıç hızı, V_{mak} ; maksimum hızı, K_m ; Michaelis-Menten sabitini, S; substrat derişimini ifade etmektedir. Eşitlik 1.3’te verilen denklemde, 1/V ile 1/[S] arasında grafik çizildiğinde (Şekil 1.12) elde edilen

doğrunun eğim ve kesim noktasından sırasıyla $V_{\max}$ ve K_m değerleri hesaplanabilmektedir.



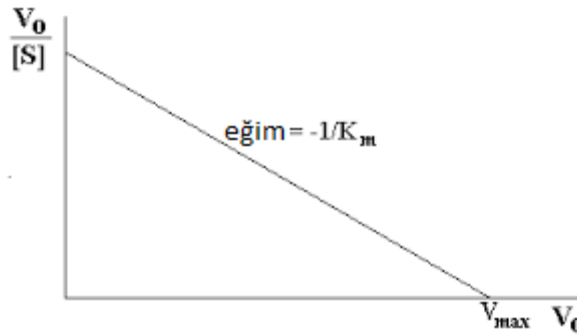
Şekil 1.12. Lineweaver-Burk grafiği

Grafikten de görüldüğü üzere, doğru, x eksenini kesecek şekilde uzatıldığında, $-1/K_m$ değeri, doğrunun eğiminden de $K_m/V_{\max}$ değeri bulunabilmektedir.

Eşitlik 1.3'te verilen Lineweaver-Burk denkleminin her iki tarafının $V_{\max} \cdot V$ ile çarpılması sonucu eşitlik 1.4'te verilen yeni bir doğru denklemi elde edilmektedir.

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_{\max} \quad (1.4)$$

Bu doğru denkleminde V ile $V/[S]$ arasında grafik çizildiğinde meydana gelen doğrusal grafik Eadie-Hofstee grafiğidir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Eadie-Hofstee grafiği

Eadie-Hofstee grafiğinin eğimi $-1/K_m$ değerini, x eksenini kesim noktası ise V_{mak} değerini vermektedir [37, 38].

Enzimlerin kinetik ifadelerinde K_m değerleri çok önemlidir ve enzimler için farklılık gösterir. K_m değeri 0.1 ile 10^{-6} arasında değişiklik gösterir. Enzimatik ifadelerde K_m değeri enzim derişimine bağılı değildir ve substratın yapısı, sıcaklık, pH ve iyonik şiddetle değişmektedir. Tek substratlı enzimatik reaksiyonlar için tek bir K_m değeri bulunurken, birden fazla substrata sahip enzimler için birden fazla K_m değeri vardır. K_m değeri, ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_m değeri zayıf bağlanmayı, düşük K_m değeri ise kuvvetli bağlanmayı göstermektedir.

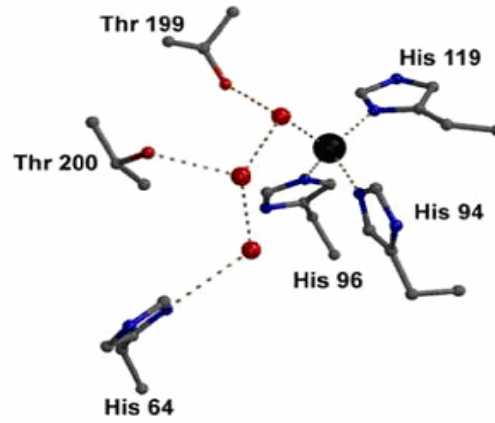
Enzimlerin V_{mak} değerleri, katalitik aktivitenin bir göstergesi olup, substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişmektedir.

1.2.5. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA) enzimi, tüm hayvanlarda, fotosentez yapan organizmalarda ve hatta bazı non-fotosensitif bakterilerde bulunan bir enzimdir. CA enziminin sistematik isimlendirmesi E.C.4.2.1.1. şeklinde olup, liyaz sınıfı bir enzimdir. CA enzimi kofaktör olarak aktif bölgede çinko metali bulundurur ve yavaş bir reaksiyon olan karbondioksidin (CO_2) bikarbonata dönüşüm reaksiyonunu katalizleyerek reaksiyon hızını saniyede 10^4 - 10^6 'ya ulaştırır. CA enzimi ilk olarak 1933 yılında, eritrositlerden saflaştırılmış ve daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla α , β ve γ olmak üzere üç farklı türde karakterize edilmiştir. α ve β sınıfı içerisinde sırasıyla hayvan ve bitki kökenli CA enzimi yer almaktadır. CA izoenzimlerine bakıldığında, herbirindeki ortak noktanın aktif bölgelerinde bir çinko metalinin kofaktör olarak bulunmasıdır. CA aileleri arasında önemli bir sekans homolojisi yoktur, fakat bütün CA enzimleri çinko enzimleridir. Enzim aktif merkezi geniş ve koni biçimli bir boşluktur. Çinko atomu boşluğun dibine yakın bir yerde bulunmaktadır. Tetrahedral geometrideki histidin amino asitleri azot atomları tarafından koordine edilmiştir. CA yapılan metal iyon bağlama çalışmalarının ilk evrelerinde, CA izoenzimlerinde çinko

atomunun bazı şelasyon ajanlarına karşı diyaliz ile uzaklaştırılabileceği görülmüştür [39].

Şekil 1.14’de CA izoenzimlerinin katalitik bölgeleri gösterilmektedir. Katalitik bölgede histidin aminoasitleri (His 94, His 96, His 119) yer almaktadır. Şekilde, büyük küre Zn^{+2} iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.



Şekil 1.14. CA izoenzimlerinin katalitik bölgeleri [40]

CA enzimi birçok fizyolojik olayda yer almaktadır. Bunlar, asit-baz dengesi, kardiyovasküler tonusun düzenlenmesi, sindirim, hücre bölümleri arasında iyon değişimleri ve farklı enzimatik reaksiyonlar için bikarbonat iyonunun sağlanması şeklinde sıralanabilir. Metabolizmada, kan plazmasında bulunan CO_2 , kırmızı kan hücrelerine difüzyonla geçtiğinde, kırmızı kan hücrelerindeki CA enzimi, CO_2 'yi çok hızlı bir şekilde karbonata dönüştürür. Oluşan karbonat, proton ve bikarbonata ayrılarak tekrar kana geçer ve kan pH'nın 7.4'te dengelenmesini sağlar. Böylece; CA enzimi metabolizmada doğal bir tampon gibi davranmaktadır [41].

Şekil 1.15'te CA enziminin X ışınları kristallografi tekniğiyle yapısı gösterilmektedir. Buna göre, aktif bölgede bulunan çinko iyonları aminoasit zincirleriyle sarılmış ve 3 boyutlu CA enzimi yapısı ortaya konmuştur.



Şekil 1.15. CA enziminin Xışınları kristallografi ile gösterimi [42]

CA izoenzimlerinin α grubunda yer alan izoenzimleri, ilk tespit edilen ve en fazla çalışılan gruptur ve bu gruptaki CA izoenzimleri monomerik yapıda bulunmaktadır. α grubu CA izoenzimlerinin katalitik mekanizmasına bakıldığında, His-64 birimi enzim aktif bölgesinden protonun dış çözücü ortamına aktarılmasında aracı olmaktadır. Proton His-64'e, His-64 ve çinko atomu arasındaki su molekülleri aracılığı ile aktarılmaktadır. Yine bu bölgede Lys-91 ve Tyr-131 birimleri de görev almaktadır.

β sınıfında bulunan CA izoenzimleri, dimerler, tetramerler, heksamerler ve oktameler halinde bulunmaktadır. Bitkilerle birlikte alg, bakteri ve arkeon türlerinde de β grubu CA izoenzimleri tespit edilmiştir. Bu gruptaki CA izoenzimlerinde aktif bölgedeki Zn iyonu iki sistein ve bir histidin ligandlarıyla bağlanmaktadır.

Diğer γ grubundaki CA izoenzimleri ise trimer yapıda olup, metal bağlanma bölgesinde üç histidin birimi ligand oluşturmaktadır.

CA enziminin katalitik aktivite gösterdiği reaksiyon $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ şeklinde gerçekleşen CO_2 'nin hidrasyonudur. CA enzimlerinin mekanizması çinko bağlı hidroksil iyonu etrafında döner. Kısaca, substrat molekül (CO_2) çinko bağlı hidroksil tarafından nükleofilik atağın yapılacağı yer olan CA aktif merkezine getirilir. Bu direkt olarak bikarbonat iyonunu oluşturur. Daha sonra bikarbonat iyonu aktif merkezde su molekülleri ile yer değiştirir. Bikarbonat iyonunun aktif merkezdeki yer değişiminin direkt olarak olup olmadığı kesin

değildir. Ama, çinko iyonu, su moleküllerini bağlar. Çinko bağlı hidroksil proton mekik mekanizması yardımıyla proton uzaklaştırılarak rejenere edilir. Reaksiyonda, çinko bağlı hidroksilin rejenerasyonu hız sınırlayıcı basamaktır. Çinkonun uzaklaşmasıyla inaktif hale gelen CA, metalin yeniden yapıya eklenmesiyle aktivitesini geri kazanır. CA enzimi metabolizmada, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ reaksiyonu ile kırmızı kan hücrelerinde CO_2 'yi bikarbonata, çok hızlı bir şekilde karbonik asite dönüştürülür ve oluşan karbonik asit, proton H^+ ve bikarbonat HCO_3^- iyonlarına ayrılarak tekrar kana geçer ve kan pH'sının 7,4' te dengelenmesini sağlayarak doğal bir tampon çözelti gibi çalışır [41].

CA'nın katalizlediği temel enzimatik olay olan CO_2 'nin hidrasyonunun temel mekanizması üzerindeki kinetik çalışmalar, bütün CA izoenzimlerinde iki basamaklı bir mekanizmanın olduğunu göstermiştir. İlk basamakta enzim kofaktörü olan çinkoya bağlı hidroksil iyonunun CO_2 'ye nükleofilik saldırısı gerçekleşmektedir. İkinci basamakta ise çinkoya bağlı su molekülünün iyonlaşması ve protonun uzaklaştırılmasıyla aktif bölgenin tekrar oluşturulması olayları gerçekleşmektedir ($\text{Zn}^{2+}\text{-OH}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Zn}^{2+} + \text{HCO}_3^-$).

$\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{Zn}^{2+}\text{-OH}^-$ mekanizmasında, protonun dış çözücü ortamına aktarılması için enzimin aktif bölgesindeki bir amino asit birimi proton taşıyıcı birim olarak rol oynamaktadır. Proton taşıyıcı birim, aldığı protonu ortamdaki tampon moleküllerine $\text{Proton taşıyıcı} + \text{Zn}^{2+}\text{-H}_2\text{O} \rightarrow \text{Zn}^{2+}\text{-OH}^- + \text{Proton taşıyıcı-H}^+$ ve $\text{Proton taşıyıcı-H}^+ + \text{B} \rightarrow \text{Proton taşıyıcı} + \text{B-H}^+$ reaksiyonlarına göre aktarmaktadır [43].

Enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak, protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması evresidir. Bundan dolayı, aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip amino asit birimleri enzim aktivite tayininde önemlidirler. CA hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson metoduna göre tayin edilmektedir [44, 45]. Bu yöntemle göre CO_2 hidrasyonundaki pH değişimleri enzimatik olmayan ve enzimatik reaksiyonlar için ölçülerek enzim ünitesi olarak enzim aktivitesi ifade edilmektedir. CA esteraz aktivitesi ise, CA enzimi varlığında, 4-nitrofenilasetatın 4-nitrofenilat iyonuna dönüşümünün 348 nm de takip edilmesiyle belirlenmektedir [46].

CA enziminin, CO₂ tutucu ve dönüştürücü sistemlerde kullanılmasına ilişkin incelenen literatür çalışmalarına örnek olarak, CA 02813640 numaralı patent çalışmasında, CO₂ dönüşümü için bir biyoreaktör geliştirilmiştir [47]. Geliştirilen biyo reaktörde CA enzimi kovalent bağlarla katı destek materyaline tutturulmuştur. CA enzimi, naylon, polisitiren, poliüretan veya silika jel gibi poröz substratlar içerisine haspsedilmiştir. Biyoreaktör içerisine CO₂ gaz akışı verilerek, CA enzimiyle CO₂'nin bikarbonat ve karbonata dönüşümü tayin edilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise, Yong ve ark. [48] silika nanopartikülleri üzerine CA enzimini yükleyerek, elde edilen nano platformları CO₂'nin hidrasyon reaksiyonlarında kullanmışlardır. CA enzimatik aktivitesi, esteraz aktivitesi baz alınarak yapılmış olup, elde edilen nanoplatformların 4-nitrofenilasetatı 4-nitrofenilat iyonuna dönüştürmesiyle belirlenmiştir.

Ji ve ark. [49], CA enzimini nanofiberlere tutturarak, CO₂'nin metanole dönüşümü reaksiyonunu incelemişlerdir. Nanofiberlere tutturulan CA enzimiyle ilintili sistemin CO₂'nin dönüşümünü % 80 desteklediğini ifade etmişlerdir.

Hou ve ark. [50], yaptığı çalışmada, yine CA enziminin CO₂'nin hidrasyonuna yönelmişler ve bu yönde biyomimetik bir sistem geliştirmişlerdir. Bunun için TiO₂ bazlı biyokatalitik nanopartikülleri ve CA tutturulmuş biyomembranların bir arada olduğu bir sistemle CO₂'nin hidrasyonu etkinliği üzerinde çalışmışlardır.

Tez kapsamında yapılan çalışmada; nano CA enzimi ANADOLUCA metoduna göre sentezlenerek, CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonları titrimetrik olarak incelenmiştir.

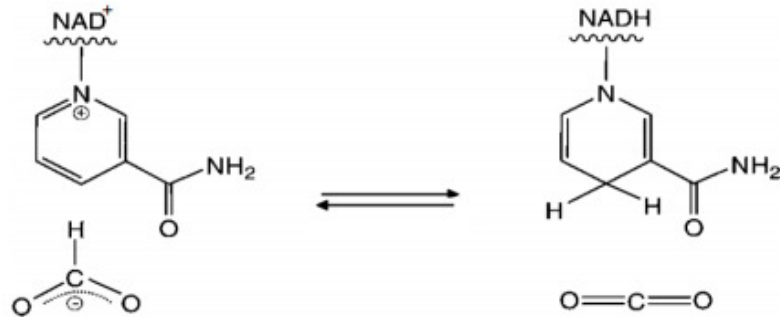
1.2.6. Format Dehidrogenaz Enzimi

Format dehidrogenaz (FateDH) enzimi, formatın CO₂'ye oksidasyonunu katalizleyen oksidoredüktaz grubu enzimdir. Sistematik adlandırmada E.C. 1.2.1.2 şeklinde isimlendirilir. CO₂ oksidasyonunda ikincil bir substrat görevi yapan nikotinamit adenin dinükleotide (NAD⁺) veya sitokroma elektron transferi için ihtiyaç duyar [51].

NAD⁺ bağımlı reaksiyonları CO₂ oksidasyonunda; Formate + NAD⁺ ↔ CO₂ + NADH + H⁺ reaksiyonuna göre iki yönlü olarak gerçekleşmektedir.

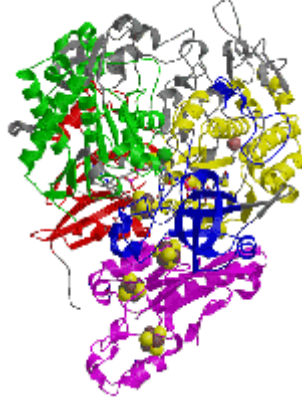
FateDH aynı zamanda, hidrit transfer reaksiyonlarını katalize eden, koenzim rejenerasyonunu sağlayan, organik ve asimetrik sentezlerde eczacılık alanında da kullanılan bir enzimdir [46, 47]. FateDH, bazı organizmalarda da oldukça etkin rol oynar. Örneğin, metilotroflarda (metanol, metan gibi bileşiklerde tek bir karbon atomunu indirgeyerek enerji sağlayan mikroorganizma), canlılığı sağlamada gerekli enerji ihtiyacında C1 karbonunun oksidasyonunu sağlar. Bu mikroorganizmalar, bir seri zincir dehidrogenaz enzimlerle metanolu CO₂'ye oksitler. Prokaryot ve ökaryotlarda, metanol metabolizmasında, bitkilerde ise stres yönetiminde etkilidir [52, 54].

FateDH enzimi, biyo katalitik istemlerde CO₂'nin formata dönüşümü reaksiyonlarında baş roldeki enzimdir ve NAD⁺ kofaktörü varlığında, CO₂'nin formata dönüşümü reaksiyonunu çift yönlü katalizler. Kataliz reaksiyonu şematik olarak Şekil 1.16'da verilmiştir.



Şekil 1.16. Formate'nin CO₂'ye oksidasyonunun FateDH enzimi ve NAD⁺ varlığında gösterimi [55].

FateDH enzimi bir homodimerik enzimdir yani herhangi bir metal iyonu ya da prostetik grup içermez. Şekil 1.17.'de FateDH enziminin yapısı, X ışınları kristallografisi ile gösterilmiştir.



Şekil 1.17. FateDH enziminin X ışınları kristallografi ile gösterimi [56]

FateDH enzimi geniş bir pH aralığında (5.5 - 11) aktivite gösterir ve bu nedenle diğer dehidrogenaz enzimlerle kombine edilerek çalışma imkanı vardır. FateDH enzimi, NAD bağlayıcı 15 α heliks ve 13 β tabakalı iki büyük bölge içerir. Aynı zamanda bu bölge katalitik bölge olarak da adlandırılmaktadır [53].

1.2.7. Formaldehit Dehidrogenaz Enzimi

Formaldehit dehidrogenaz (FaldDH) enzimi organizmada, toksik bileşiklerin formaldehide dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Sistematik adlandırmada E.C. 1.2.1.46 olarak isimlendirilir ve çinko içeren orta zincirli dehidrogenaz/redüktaz enzim grubu içerisinde yer almaktadır.

FaldDH enzimi, reaksiyonlarda NAD^+ ve glutatyon gerektirir. Örneğin, insanlarda, ratlarda karaciğerde ve *Candida boidinii*'de gerçekleşen FaldDH enzimatik reaksiyonları glutatyon (GSH) bağımlı reaksiyonlardır [55, 57].

Enzim alt ünitesinde bulunan 2 çinko iyonu katalitik bölgedeki ligandlara bağlanır. Katalitik çinko iyonu su molekülüne ve katalitik bölgedeki üç protein ligandına (C46, H67 ve D169) bağlanır. Yapıdaki çinko iyonu ise katalitik kısımdaki 4 protein ligandına bağlanır. Bu 4 ligand, 4 sistein aminoasidinden gelen sülfür iyonlarıdır. Yapıdaki bu sisteinler ise, C97, C100, C103 ve C111'dir [58, 59].

Enzimatik reaksiyonda, NAD(H) molekülü protein yüzeyine 6 hidrojen bağıyla bağlanır. 3 hidrojen bağı nikotinamit halkasındaki karboksiamit grupları ve T338, G336, P299 protein kısımları arasında olurken, 3 hidrojen bağı ise, nikotinamit riboz grubundaki hidroksil grubu ve protein yan zincirdeki S48 proteini ve H51 proteinleri arasında olur. Aynı zamanda protein yüzeyindeki G47, V197, R222, D217, R267 ve H269 kısımlarla da NADH arasında ekstra hidrojen bağları kurulmaktadır [60].

FalddDH enzimi, biyokatalizde CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonunda ara basamağı, yani format yapısından formaldehit yapısının oluşumu basamağını katalizlemektedir.

1.2.8. Alkol Dehidrogenaz Enzimi

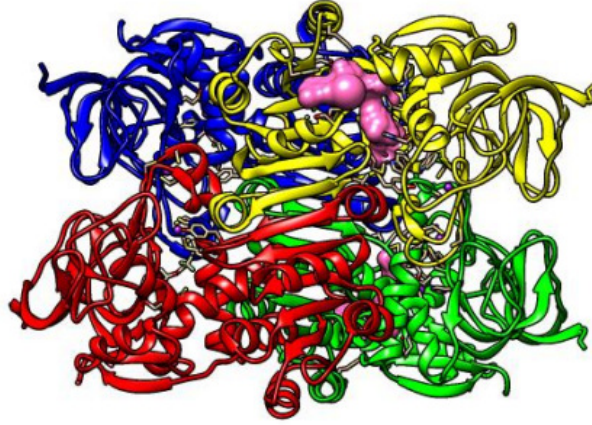
Alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi, 1937 yılında ilk kez ekmek mayasından saflaştırılan oligomerik bir enzimdir. Sistematik isimlendirmede enzim adı E.C.1.1.1.1 şeklindedir ve oksidoredüktaz enzim sınıfının yedi alt biriminden biridir. Alkol, aldehit veya ketonlar arasındaki dönüşümler NAD⁺'nın NADH'e indirgenmesiyle ADH enzimi aracılığıyla gerçekleşir.

ADH izoenzimleri, omurgalılarda, bitkilerde, ökaryotik mikroorganizmalarda ve prokaryotik bakterilerde olmak üzere 4 çeşittir [61]. Homotetramerik ADH enziminin 4 alt ünitesi olmakla birlikte, izoelektrik noktası 5.4 - 5.8 arasındadır. Herbir alt ünite, 347 aminoasit kısımlarından oluşur ve 36 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Katalitik çinko ve yapısal çinko olmak üzere enzim yapısında toplamda 2 çinko atomu bulunur. Enzimin toplam molekül ağırlığı yaklaşık 150 kDa ağırlığındadır. Katalitik çinko, C46, H67 ve C174'ten oluşan katalitik kısma bağlanır, yapısal çinko ise, C97, C100, C103 ve C101 sisteinlerine bağlanır.

ADH insanda dimerik bir enzim olup, izoenzimlerinin çeşitliliği 7 yapısal genin (σ , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, π , X, ve σ) varlığına bağlıdır [62].

Şekil 1.18'de ADH enziminin yapısı X ışınları kristallografisiyle gösterilmiştir. Enzimin aktif bölgesinde çinko atomu ve His-67, Cys-174, Cys-46, Thr-48, His-51, Ile-269, Val-292, Ala-317 ve Leu-319 aminoasitleri

bulunmaktadır. Çinko atomu, 4 sistein ligandının tetrahedron oluşturduğu yapı arasında kalmaktadır. Çinko, substratla koordinasyon bileşiği oluşturur ve bu sırada aktif bölgedeki His-67, Leu-319, Ala-317, His-51, Ile-269 ve Val-292 aminoasitleri NAD^+ koenzimini hidrojen bağlarıyla sabitler. Dolayısıyla, aktif bölgedeki çinko kofaktörü proteinin kararlılığı için önemli bir role sahiptir [63].



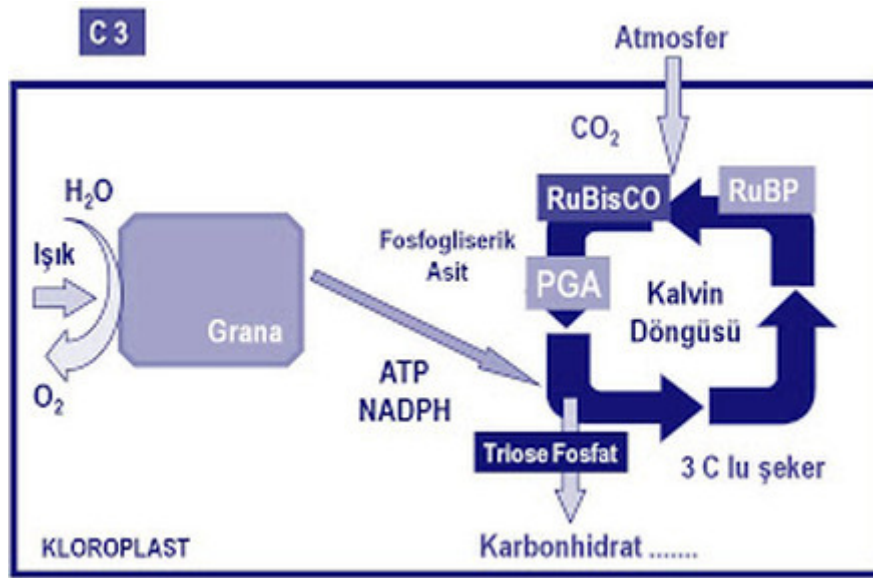
Şekil 1.18. ADH enziminin Xışınları kristallografi ile gösterimi [64]

Biyokatalitik sistemde, CO_2 'nin metanole dönüşüm reaksiyonunda son basamakta görev almaktadır ve formaldehitin metanole dönüşümünü çift yönlü katalizler.

1.2.9. Ribulaz-1,5-Bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz Enzimi

Ribulaz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz enzimi (RuBisCo), (E.C. 4.1.1.39), bitkilerin glikoz gibi yüksek enerjili malzemelerin sentezindeki en önemli ilk basamakta karbon fiksasyonunda yer alır. Kimyasal olarak, ribulaz 1,5 bifosfatın karboksilasyonunu katalizler [65]. RuBisCo enzimi C3 bitkilerinin yapraklarının % 50'sinde, C4 bitkilerinin yapraklarının % 30'unda bulunur. RuBisCo enzimi gerçekte biyolojik anlamda oldukça önemli bir enzimdir, çünkü biyosfere giren inorganik karbonun kimyasal reaksiyonunu katalizler. Birçok ototrof bakteri ve algler asetil Co-A, 3-hidroksipropionate veya Krebs döngüsüyle karbon fiksasyonu yaparlar. Ancak bu şekildeki karbon fiksasyonu, RuBisCo enziminin katalizlediği reaksiyondaki karbon fiksasyonunun yanında oldukça küçük kalmaktadır [66].

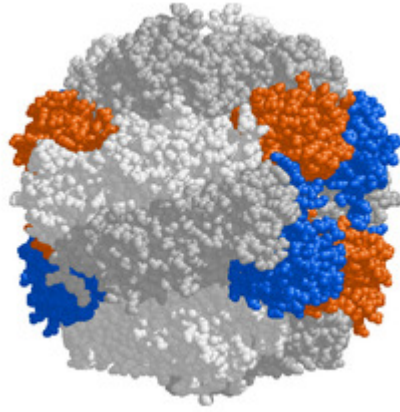
Bitki hücrelerinde bulunan RuBisCo enzimi havadaki CO₂ molekülünü yakalar. Bu olay, bitkilerin fotosentezi ve atmosferdeki CO₂ dengesini gerçekleştiren mekanizmalardan biridir. Kısaca mekanizmaya değinilirse, bitkilerdeki RuBisCo enzimi havadaki CO₂ ile etkileşerek, CO₂'yi 5 karbonlu bir şekere ekler ve bitki hücresinin ihtiyacı olan 6 karbonlu yeni bir şeker oluşumunu sağlar. Oluşan yeni şeker molekülü 3'er karbon atomu içeren iki eş moleküle bölünür. Bu moleküller fosfogliserat, bu işlem ise karbon bağlama döngüsü olarak nitelendirilir. Bu işlemler Şekil 1.19'da şematize edilmiştir.



Şekil 1.19. Atmosferdeki CO₂'nin RuBisCo enzimiyle tutulması

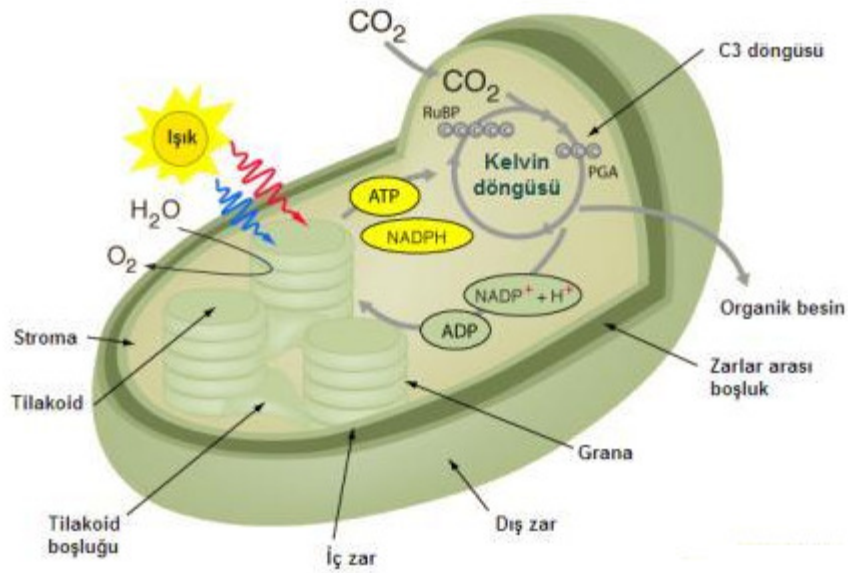
RuBisCo enzimi, 8 ağır zincir (yaklaşık 55 kDa) ve 8 hafif zincirden (yaklaşık 13 kDa) meydana gelen 540 kDa'luk yapıya sahiptir. Ağır zincir geni bitkilerdeki kloroplast DNA'sının bir kısmını oluşturmaktadır. Enzimatik olarak aktif substrat bağlama bölgeleri ağır zincirde konumlanmıştır [67].

Şekil 1.20'de RuBisCo enziminin ağır ve hafif zincirleri boşluk doldurma modeliyle belirtilmiştir. Buna göre; beyaz-gri olarak gösterilen bölgeler enzimin ağır zincir bölgesini, mavi-turuncu olarak gösterilen bölgeler ise enzimin hafif zincir bölgesini göstermektedir.



Şekil 1.20. RuBisCo enzim yapısının boşluk doldurma modeliyle gösterimi [68]

RuBisCo enzimi, bitkilerde (Şekil 1.21), alglerde, siyanobakterilerde, fototrof ve kemotrof protobakterilerde genellikle iki alt üniteden oluşan kimyasal formunda bulunmaktadır [67-70].



Şekil 1.21. Bitkilerde RuBisCo enziminin yeri [71]

RuBisCo enziminin aktivite gösterebilmesi için Mg^{2+} iyonları gereklidir. Enzim aktif bölgesindeki Mg^{2+} iyonlarının doğru yönlenmiş olması, aktif bölgede CO_2 molekülünün lizin molekülüne karbamat oluşturmak üzere aktivasyonunu sağlar. Karbamat oluşumu alkali pH'ta gerçekleşir. Mg^{2+} iyonlarının derişimi ve pH bitkilerdeki kloroplast stromasında ışıktaki artış gösterir. Mg^{2+} iyon derişimi ve pH değışimi RuBisCo enzim aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli

parametrelerdir [72]. Rubisco enzimi Kelvin döngüsündeki birçok enzimden biridir. Karbon fiksasyonu süresince RuBisCo için substrat moleküller Ribulaz 1,5 bifosfat, CO_2 ve O_2 'dir. CO_2 , substrat olarak kullanıldığında, karboksilaz reaksiyonunun ürünü oldukça kararsız 6 karbonlu fosforillenmiş ara ürün olan 3-keto-2-karboksiarabinitol-1,5-bifosfattır. Bu bileşik 2 molekül gliserat 3-fosfata indirgenir. 3-fosfoglisarat ise, glukoz gibi büyük moleküllerin oluşmasında kullanılmaktadır. Diğer enzimlere kıyasla Rubisco enzimi yavaş aktivite gösterir. Herbir molekül enzim saniyede 3-10 CO_2 molekülünü fikse edebilir. RuBisCo enzimi sadece gün ışığında aktiftir, çünkü karanlıkta ribulaz 1,5-bifosfat sentezlenmez. Bu durum bir bakıma Kelvin döngüsündeki diğer enzimlerle de bağlantılıdır. Bunun dışında, RuBisCo enziminin aktivitesi Kelvin döngüsündeki diğer enzimlerle koordinasyona da bağlıdır [72-74].

Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmada, RuBisCo enzimi ANADOLUCA metoduyla, nano formatta sentezlenerek, CO_2 substratıyla aktivitesi incelenmiştir. Ayrıca ıspanak yapraklarından izole edilerek, izole edilen RuBisCo enziminin yine CO_2 'ye karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bunun yanında izole edilen RuBisCo enzimi de nano formatta sentezlenerek, nano RuBisCo enziminin de aktivitesi incelenmiştir.

1.3. Nanoenzimler

Nanoenzimler, ticari enzimlerden yola çıkılarak, mikroemülsiyon polimerizasyonu, gün ışığında, azot atmosferinde ve oda sıcaklığında sentezlenen, boyutları 20-100 nm arasında değişen enzim yapılarıdır.

Nanoenzimler, R.Say ve arkadaşları tarafından patentlenen ANADOLUCA metoduna göre sentezlendikten sonra reaksiyon ortamından santrifüjle ayrılarak, ilgili reaksiyonlarca defalarca yapılarında herhangi bir deformasyon olmadan tekrar tekrar kullanılabilirler. Bu enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve ilgili reaksiyonları aktivitelerinde herhangi bir azalma olmadan katalizlemeleri, yapılarını eşsiz kılmakla birlikte ticari yönden de reaksiyonlarda maliyetin azalmasını sağlamaktadır. Bunun yanında ticari enzimler optimum pH, sıcaklık değerlerinde katalitik aktivite gösterirken, nanoenzimler

geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışma imkanı sunarlar. Sentez aşamasında kullanılan fotoduyarlı rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerle konjugasyon, nanoenzimlerin farklı reaksiyon koşullarına karşı dayanıklılığını ve kararlılığını arttırmaktadır.

Literatürdeki nanoenzim çalışmaları incelendiğinde, R. Say ve ark. [75] çalışmasında ANADOLUCA yöntemiyle sentezlenen nano lipaz enzimi sentezlenmiştir. Sentezde, lipaz enzimi rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle foto duyarlı çağraz bağlama ile fonksiyonellendirilerek elde edilen nano lipaz enzimlerinin aktiviteleri ticari lipaz enzimiyle karşılaştırmalı olarak p-nitrofenilpalmitat (pNPP) hidrolizinde incelenmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu geçirgenlik elektron mikroskobu (TEM) ve zeta boyut analizi ile belirlenerek ortalama partikül boyutu yaklaşık 100 nm olarak bulunmuştur. Lipaz nanopartiküllerin aktivitelerini belirlemek amacıyla, pNPP hidrolizi sonucunda absorpsiyon artışı spektrofotometrik olarak 405 nm'de ölçülmüş ve hidrolitik aktivite üzerine pH, sıcaklık gibi parametrelerin etkisi taranmıştır. Ayrıca, lipaz nanopartiküllerin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, aynı nanopartiküller reaksiyon ortamından santrifüjle ayrılarak, 10 kez aynı reaksiyon için kullanılmıştır. Sterilizasyon için her döngü sonrasında nanopartiküller önce etanol ile daha sonra su ile yıkanmıştır. 10 döngü sonrasında lipaz nanopartiküllerin enzimatik aktivitesinde kayda değer bir azalma olmamıştır [75].

R. Say ve ark. [76] bu yönde yaptığı diğer bir çalışmada ise tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) tayini için reflektometrik interferans spektroskopisine dayalı sensör sistemleri hazırlamışlardır. Bu amaçla; fotosensitif nanoyapılı TNF- α ANADOLUCA yöntemiyle rutenyum tabanlı aminoasit monomeriyle çapraz bağlanarak nano yapılı olarak sentezlenmiştir. Hazırlanan TNF- α nanopartiküller, romatoit artirit hastalığı tanısına yönelik, TNF- α tayininde sensör olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan nanosensörün TNF- α nın seçici olarak tayininde etkin şekilde kullanılabilirliğini göstermiştir.

R. Say ve ark. [77] yaptığı diğer bir çalışmada ise pektinaz enzimi ANADOLUCA metoduna göre nano boyutta sentezlenerek, pektin hidrolizindeki aktivitesi ticari pektinaz enzimi ile karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Pektin hidrolizine etki eden, pH, sıcaklık, substrat derişimi gibi parametreler incelenerek,

sentezlenen nano pektinaz enzimlerinin de ticari pektinaz enzimleri gibi pektin hidrolizini gerçekleştirdiği ve hatta bir basamak öne çıkarak daha geniş sıcaklık ve pH aralığında da bu nano pektinaz enzimlerinin kullanıldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca reaksiyon sonrasında ortamdan alınan nano pektinaz enzimlerinin tekrar tekrar kullanılabilir yapılar olduğu ortaya konmuştur.

Bu yönde yapılan çalışmalarda, R. Say ve ark.'nın [78] ANADOLUCA metoduyla sentezledikleri diğer bir nano enzim nano amilazdır. Bu çalışmada amilaz enzimi ANADOLUCA yöntemine göre nano platform olarak sentezlenmiş ve nişastanın hidrolizinde kullanılmıştır. Diğer nano enzimler gibi nano amilaz enziminin de nişastanın hidrolizinde ticari amilaz enziminden farklı olarak geniş sıcaklık ve pH aralığında çalışabilme imkanı bulunmakla birlikte aynı nano amilaz platformlarının reaksiyonda tekrar kullanılabilir olduğu vurgulanmaktadır.

Yapılan nano enzim çalışmalarına bir diğer örnek olarak nano Taq DNA polimeraz enziminin sentezlenmesi verilebilir. R. Say ve ark. [79] ticari DNA Taq polimeraz enzimini, fotoduyarlı rutenyum tabanlı aminoasit monomeriyle çapraz bağlayarak, ANADOLUCA metoduna göre, gün ışığında, oda sıcaklığında ve azot atmosferinde nano boyutta sentezlemişler ve bu enzimin polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) etkinliğini incelemişlerdir. Aynı nano DNA Taq polimeraz enzimleri, santrifüjle reaksiyon ortamından ayrılarak, tekrar tekrar PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında DNA Taq polimeraz enziminin PCR reaksiyonlarında kullanımında optimum bir sıcaklık ve pH değerinde çalışabiliyor iken, sentezlenen nano Taq DNA polimeraz enziminin oldukça hassas olan PCR reaksiyonlarında da geniş bir kullanım aralığı olduğu görülmüştür.

1.4. Karbondioksit (CO₂)

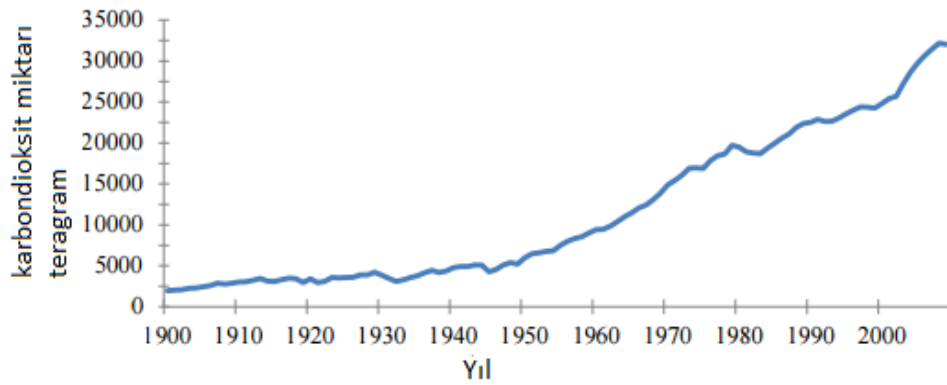
CO₂, kovalent bağlı bir karbon ve iki oksijen atomlarından oluşmuş, molekül ağırlığı 44 g mol⁻¹ olan ve normal koşullarda gaz halinde olan bir bileşiktir. Metabolizmada, karbon içeren organik moleküllerin metabolizması sonucunda meydana gelen son üründür. Günlük hayatta, serbest gaz halinde volkanik bölgelerden çıkan gazlarda, maden suyunda, gazlı içeceklerde, egsoz

gazlarında, sera gazlarında, atmosferde, okyanuslarda, toprakta, fosillerde, yeryüzü oluşumlarında, canlılarda dolayısıyla doğada tüm formlarıyla bulunmaktadır. Doğada fotosentez ile yeşil bitkiler CO₂'yi su ve gün ışığı ile yararlı organik bileşiklere çevirmektedir [80].

CO₂, enerji hammaddesi için gereken C1 karbonuna sahip doğada en fazla bulunan maddedir [81] ve endüstriyel alanda, kahve taneciklerinden aroma ve kafein ekstraksiyonunda, kuru temizlemede, polimer endüstrisinde, zincir polimerizasyonlarında çözücü olarak köpük polimerik materyallerin hazırlanması gibi birçok işlerde kullanılmaktadır [82 - 84].

Diğer maddeler gibi, maddenin üç halinde yani katı, sıvı ve gaz olarak bulunabilir. CO₂'nin fiziksel özelliği, kimyasal yapısına, basınca ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Atmosferik basınç ve sıcaklıkta CO₂ gaz halinde bulunurken, basınç ve sıcaklık arttırıldığında, kritik noktaya ulaşır ve buharıyla dengede olan sıvı formda bulunur.

Son yıllarda CO₂ emisyonu, sera gazlarının etkisiyle doğru orantılı olarak artmaktadır [85]. Yapılan çalışmalar, CO₂ emisyonunu azaltıcı nitelikte olmaya başlamaktadır. Şekil 1.22, atmosfere salınan CO₂ miktarının yıllara göre artan endüstrileşmeyle değişimini göstermektedir.



Şekil 1.22. CO₂ miktarının yıllara göre artışı [85]

Endüstri devriminden önce, atmosferik CO₂ miktarı 280 ppm civarındayken, karbon bazlı fosil yakıtların yanmasıyla bu değer 393 ppm'e kadar ulaşmıştır [86]. İnsanoğlunun bilinçsizce davranışları, ormanların yok edilmesi, kömür vs. gibi yakıtların sıklıkla kullanılması, endüstrileşmenin artması gibi nedenlerden dolayı atmosfere CO₂ salınımı gün geçtikçe artmaktadır. Bunun

sonucu olarak, endüstriyel alanda şirketler, CO₂ emisyonunu azaltıcı sistemler geliştirme yoluna gitmişlerdir [80,86].

CO₂'nin atmosfere salınımının artması, küresel ısınmanın artması, buz dağlarının erimesi, okyanusların ve denizlerin asitliğinin ve su seviyesinin artması ve buna bağlı olarak ekosisteminin değişmesi ve çok ciddi iklim değişikliklerinin olması gibi çok önemli zararlı değişikliklere yol açacaktır.

1.4.1. Karbondioksit Dönüştürücü Sistemler

Bitkiler tarafından, fotosentez aracılığıyla CO₂ dönüşümü kendiliğinden gerçekleşmektedir. Fakat, yapay yollardan doğaya salınan CO₂ miktarının artması, doğal yolların yetersiz kalmasına sebep olmaktadır. Bu durumun önüne geçilebilmesi için yapılan çalışmalar son yıllarda oldukça artmış ve önemli bir hale gelmiştir. Bu yönde yapılan çalışmalarda, CO₂ işlenerek ya diğer yararlı kimyasallara dönüştürülmekte ya da bir başka reaksiyonla, üretim proseslerinde hammadde olacak şekilde başka formlara dönüştürülmektedir. Örneğin; CO₂, etilen glikol, çeşitli polyester ürünleri, polipropilen karbonat ve kerosen gibi endüstriyel anlamda yararlı çeşitli farklı malzemelere dönüştürülebilmektedir.

CO₂, göreceli olarak inert bir gaz olduğundan, termodinamik açıdan başka kimyasallara dönüşümü istemsizdir. Örneğin, katalizörsüz bir reaksiyon ortamında, CO₂'nin metanole dönüşümü kendiliğinden gerçekleşmez çünkü reaksiyon için serbest Gibbs enerji değeri (ΔG) 3.30 kJmol⁻¹'dir. Bu nedenle, dönüşüm reaksiyonunun gerçekleşmesi için sisteme, yüksek miktarda bir enerji girdisi olması gerekmektedir. Bu durum bir katalizör kullanılması ya da yüksek sıcaklıklara çıkılmasıyla aşılmaktadır.

Gaz karışımlarından CO₂'yi tutuklamak için, bir çözelti içerisine absorplamak, uygun katı desteklere absorplamak, kriyojenik ayırım ya da membranlardan geçirimler gibi bir takım fiziksel ya da kimyasal metotlar kullanılmaktadır. Tüm bu işlemler rejenerasyon gerektirmesinin yanında, yüksek enerjiye gereksinim duyar ve sistemlerde sınırlı miktarda absorpsiyon gerçekleşmektedir. Aynı zamanda, H₂S ve SO_x gibi gazları da uzaklaştırmak gereklidir.

CO₂'nin diğerk bileşiklere dönüştürme metotları başlıklar halinde toplanırsa, bunlar;

- Heterojen ve homojen kataliz reaksiyonları
- Elektrokimyasal kataliz
- Fotokimyasal kataliz
- Termokimyasal kataliz
- Enzimatik kataliz olarak sınıflandırılabilir.

Homojen kataliz reaksiyonlarında; çözünebilir bir katalizör kullanılır ve katalizör reaktantlarla aynı fazdadır. Kullanılan katalizörler genellikle organometalik katalizörlerdir. Bunun yanında, asit katalizörler ve enzimatik katalizörler homojen katalizörlere örnek olarak verilebilir. Çoğunlukla homojen katalizli reaksiyonlarda reaktantların sulu çözeltisine, sulu çözeltisi hazırlanmış bir kataliz eklenerek reaksiyon gerçekleştirilir. Bu nedenle de çoğu zaman, asit veya baz katalizörler bağ polarizasyonunun reaksiyon hızını arttırmasından dolayı tercih edilmektedir. Homojen kataliz reaksiyonlarının bir avantajı, katalizörün ve reaktantların yüksek derecede etkileşimle reaksiyon ortamında etkileşmesidir. Ancak, homojen katalizli reaksiyon sonunda katalizör yenilenemez niteliktedir. Homojen katalizörler, reaksiyon hızını sıcaklık arttırılmasına gerek duymadan arttırdıkları için endüstriyel alanda da oldukça fazla kullanım alanına sahiptir [87].

CO₂ dönüşüm reaksiyonlarında homojen katalizörler olarak daha çok organometallerin çözeltileri kullanılmaktadır.

Heterojen katalizde ise, homojen katalize alternatif bir teknik olarak geliştirilmekle birlikte, katalizör iki ara fazda olabilir; gaz-sıvı gibi yada sıvı reaksiyonda katı partiküler halde katalizörler gibi. Heterojen katalizde, katalizörler reaksiyon hızını kolloid teorisine göre arttırmaktadırlar. Heterojen katalizin avantajlı yönü, katalizörün reaksiyon sonunda ortamdan ayrılabilmesi ve rejenere edilebilmesidir. Bu da maliyet açısından oldukça önemlidir. Heterojen katalizde, katalizörün yüzey alanı tamamen reaktant molekülleriyle doyurulur ve ürünler katalizör yüzeyinden tamamen ayrılmadan reaksiyon tamamlanmaz yani katalizör yüzeyinden ayrılan ürünlerin yarattığı boşluklara yeni reaktantlar bağlanamaz. Bu nedenle de adsorpsiyon kısmı çoğu zaman heterojen kataliz reaksiyonlarında hız sınırlayıcı basamaktır.

Dibenedetto ve ark. [88] yaptıkları çalışmada, CO₂'nin farklı kimyasallara dönüşümü için stok malzeme olarak kullanıldığı homojen ve heterojen kataliz reaksiyonlarını incelemişlerdir. CO₂'in oldukça inert olması ve dönüşümünün kinetik ve termodinamik açıdan zorlayıcı olması sebeplerinden termodinamik bariyerin aşılmasının kolaylaşması amacıyla homojen ve heterojen katalizörlerin özelliklerini birleştirerek yeni bir aktif katalizör üretimi ile ilgilenmişlerdir. Dihidrojen, alkoller, epoksitler, aminler, olefinler, dienler ve diğer doyurulmamış hidrokarbonların reaksiyonlarında katalizör olarak bazı metaller veya enzimler kullanıldığı zaman değişimlerini incelemişlerdir. Deneylerin sonucunda ürün olarak formik asit ve esterleri, formamidler, metanol, dimetil karbonat, alkilen karbonat, karbamitasit esterleri, laktonlar, karboksilik asitler ve polikarbonatlar elde etmişlerdir. Bazı metal öncüllerin, iyonik sıvıların ve metanol, epoksitler, asetal, orto-ester veya diğer türlerin katalitik sistemlerde CO₂'nin metanol, siklik karbonat ve DMC' ye dönüşümünde aktif rol aldıkları sonucuna ulaşmışlardır.

Elektrokimyasal katalizde, katalizör, elektrokimyasal reaksiyon içerisinde rol alır. Elektrokatalizörler, katalizörlerin spesifik bir türü olup, elektrot yüzeyinde ya da elektrodun kendisi olarak görev yaparlar. Bir elektrokatalizör platin yüzeyi ya da nanopartiküller gibi heterojen olabildiği gibi, koordinasyon kompleksleri veya enzimler gibi homojen olabilirler. Elektrokatalizörler, elektrot ve reaktantlar arasında elektronları transfer ederler.

CO₂'nin metanole elektrokimyasal katalizle dönüşümünü 1994 yılında Kuwabata ve ark. [89] incelemişlerdir. Kataliz reaksiyonunda, metil viyolojen (MV²⁺) veya pirolokuinolinkuinon (PQQ) elektron sağlayıcısı olarak ve FateDH ve metanoldehidrogenaz (MDH) enzimleri de katalizör olarak kullanılmıştır. Elektrokimyasal kataliz reaksiyonu incelendiğinde, ilk enzim CO₂'yi formata indirgemiş ve ardından ikinci enzim de ormada oluşan formatı formaldehite en son olarak da metanole dönüştürmüştür.

Elektrokimyasal katalizle CO₂'nin dönüşümüne örnek olarak diğer bir çalışmada ise, Lu ve ark. [90] yaptıkları çalışmada fonksiyonlandırılmış iyonik bir sıvı içerisinde CO₂'in dimetil karbonata elektrokimyasal dönüşümünü incelemişlerdir. Bu amaçla; amino-fonksiyonlandırılmış iyonik sıvı sentezlemişler

ve dönüşümde grafit katot kullanarak elektrolit olarak kullanmışlardır. Kullanılan elektrolitlerin etkilerinin incelenmesi amacıyla farklı elektrolit sıvıların verim, seçicilik ve iletkenlik değerlerini karşılaştırmışlardır. Aynı şekilde, elektrot etkisinin incelenmesi amacıyla da farklı elektrotların verim ve seçicilik değerleri karşılaştırılmıştır. Sıcaklığın ve zamanın elektrolize olan etkisi de incelenmiş ve 1-(3-aminopropil)-3-metilimidazolyum bromit (ApmimBr) elektrolitinin ve grafit katotun en iyi sonuçları verdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Fotokimyasal kataliz, bir katalizör varlığında, fotokimyasal reaksiyonun hızını arttırması olayıdır. Katalizli fotoliz reaksiyonunda, ışık bir adsorban substrat tarafından adsorblanır. Fotokimyasal katalizde, fotokatalitik aktivite, katalizin elektron boşluk çiftlerini oluşturmaya dolayısıyla serbest radikaller oluşmasına bağlıdır. Örnek olarak hidroksil radikalleri verilebilir. Fotokataliz, homojen fotokataliz ve heterojen fotokataliz olarak ikiye ayrılır. Homojen fotokatalizde, reaktantlar ve fotokatalizörler aynı fazda bulunurlar. En çok kullanılan homojen fotokataliz işlemleri ozon ve foto-fenton içeren sistemlerdir. Heterojen fotokataliz sistemlerinde ise, katalizör ve reaktantlar farklı fazlarda bulunmaktadır. En çok kullanılan heterojen fotokatalizörler, geçiş metal oksitleri ve yarı iletkenlerdir.

J.A. Tossell [91] yaptığı çalışmada piridine dayanan, fotokimyasal özellik gösteren bir katalitik sistem içerisinde bulunan çeşitli moleküllerin yapısal, spektral ve enerji özelliklerini ortaya çıkartmıştır. Ayrıca piridin bazlı moleküller ile $C_4NH_4^+$ ve TBD (1,5,7-triazabisiklo[4.4.0]dec-5-en) moleküllerinin fotokimyasal indirgenme özelliklerini incelemiştir. Deneyler sonucunda özellikleri incelenen moleküllerin yapısal özelliklerindeki farklılıklar ve bunların yaratabileceği enerji farklılıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar CO_2 indirgenmesi için $C_4NH_4^+$ ve TBD' nin CO_2 ile yaptıkları komplekslerin iyi birer katalizör olarak düşünülebileceğini göstermektedir. C_5NH_5COOH için yapılan hesaplamalar ise $COOH$ radikalının oluşumu esnasında kırılan N-C bağının kırılmasının tercih edildiğini göstermiştir. Bu radikalın daha sonraki basamaklarda daha fazla indirgenmiş ürün oluşumunda görev alabileceği belirtilmiştir. C_5NH_5COOH 'in elde edilebilmesi için gerekli olan enerji ise yapılan hesaplamalara göre 27.7 kcal/mol olarak bulunmuştur.

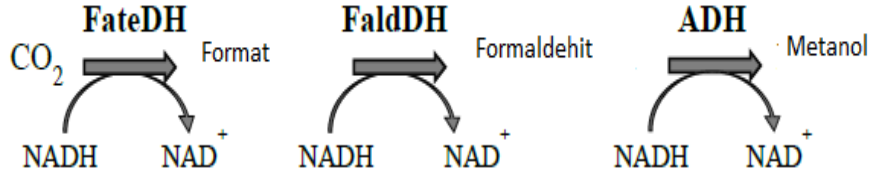
Termokimyasal katalizde, kataliz reaksiyonunda kullanılan katalizörler dışarıdan ısı verildiğinde aktive olurlar ve reaksiyonun geçiş enerjisini düşürerek, reaksiyonu hızlandırırlar.

Abanades ve Villafan-Vidales [92] yaptıkları çalışmada demir oksit redox çifti kullanarak CO_2 ve H_2O 'nun solar yakıtlara iki basamaklı bir termokimyasal reaksiyon ile dönüşümünü incelemişlerdir. İki basamaklı reaksiyonun ilk basamağında yüksek sıcaklıkta bir solar kimyasal reaktör içerisinde Fe(II, III) 'in FeO ve O_2 ' ye dönüşümü, ikinci basamağında ise CO_2 ve H_2O dönüşümü gerçekleşmektedir. Sentezlenen FeO açısından zengin materyaller ile gerçekleşen bu dönüşüm reaksiyonlarının $600\text{-}800^\circ\text{C}$ sıcaklıklarda gerçekleştiğini keşfetmişlerdir. Deney çeşitli sıcaklıklarda ve farklı bileşenler içeren materyaller ile denenmiş ve karşılaştırmalar yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda 1600°C ' nin üzerindeki sıcaklıklarda test edilen bir solar reaktör prototipi oluşturulmuştur.

Enzimatik kataliz; kataliz reaksiyonunda enzimlerin kullanılmasıyla katalitik aktivitenin gerçekleştirildiği kataliz türüdür. Enzimler hakkında detaylı bilgi Kısım 1.2. Enzimler bölümünde verilmiştir. Enzimatik katalizin diğer kimyasal katalizden ayrılan yönü, reaksiyonlar sonrasında enzimlerin reaksiyondan harcanmadan ya da değişime uğramadan çıkmasıdır. Enzimatik katalizde, enzim substratla $[\text{ES}]$ geçiş kompleksi oluşturur ve bu kompleks üzerinden ilgili reaksiyonun aktivasyon enerjisi düşürülür. Enzimatik katalizin bir diğer avantajı ise, reaksiyonlarda katalizör olarak enzimlerin kullanılmasıyla yüksek sıcaklıklara veya basınçlara çıkmaya gerek duyulmamasıdır.

CO_2 ' nin metanole dönüşümünün enzimatik katalizli reaksiyonu incelendiğinde, tasarlanan biyokatalitik sistemde dönüşüm için gerekli üç oksidoredüktaz enzimi görev almaktadır. Bunlar, FateDH, FaldDH ve ADH enzimleridir ve kofaktör olarak NADH varlığında CO_2 redüksiyonunu katalizlemektedir. Yapılan çalışmalarda bu enzimler bir matriks üzerine immobilize edilmiş ve sistemden sürekli olarak NADH çözeltisinin geçirilmesiyle, CO_2 önce formata, ardından, formaldehite ve en son metanole dönüştürülmüştür. Şekil 1. 23'de CO_2 'nin metanole biyodönüşümü FateDH,

FaldDH ve ADH enzimleri ve NADH kofaktörü varlığında şematize edilmiştir.



Şekil 1.23. CO₂'nin metanole biyodönüşümü

CO₂'nin multienzimatik sistemlerle metanole dönüşümü farklı çalışmalarla incelenmiştir.

1999 yılında Obert ve Dave [93] isimli araştırmacılar, sulu çözeltide FateDH, FaldDH ve ADH enzimlerini ve NADH elektron donörünü kullanarak CO₂'nin metanole dönüşümü reaksiyonunu incelemişlerdir. Hazırladıkları biyodönüşüm sisteminde, enzimleri sol-jel matriksi içerisine immobilize etmişlerdir. Sistemden sürekli olarak NADH geçirerek CO₂'nin metanole dönüşümünü incelemişlerdir. Reaksiyon sırasında, 100 µmol NADH kullanıldığında % 21.0, 50 µmol NADH kullanıldığında ise, % 91.2 verim elde ettiklerini vurgulamışlardır.

Multi enzimatik sistem, El-Zahab ve ark. tarafından tasarlanarak, yine CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonları incelenmiştir [94]. Çalışmada bu defa kofaktör NADH rejenerasyonu in situ olarak gerçekleştirilmiş, bunun için de sisteme FateDH, FaldDH ve ADH enzimlerinin yanında dördüncü enzim olarak glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat eklenmiştir. Tüm enzimler polistiren partiküllere immobilize edilerek CO₂ geçirilmiş ve 11 döngünün sonunda % 127 metanol verimi elde edilmiştir.

Bu yönde yapılmış çalışmalardan, Sun ve ark. [95] yine multienzimatik sistemi kullanarak CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonlarını incelemişler ancak enzimleri titanyum partikülleri içerisine hapsedmişlerdir. Bu yöntemle yaptıkları çalışmada metanol verimini % 60 olarak bulmuşlardır.

Enzim kararlılığını ve reaktivitesini geliştirmek yönünde Xu ve ark. [96] enzimleri aljinat içeren sol-jel matriksi içerisine hapsederek matriks ortamının metanol oluşumuna etkisini incelemişlerdir.

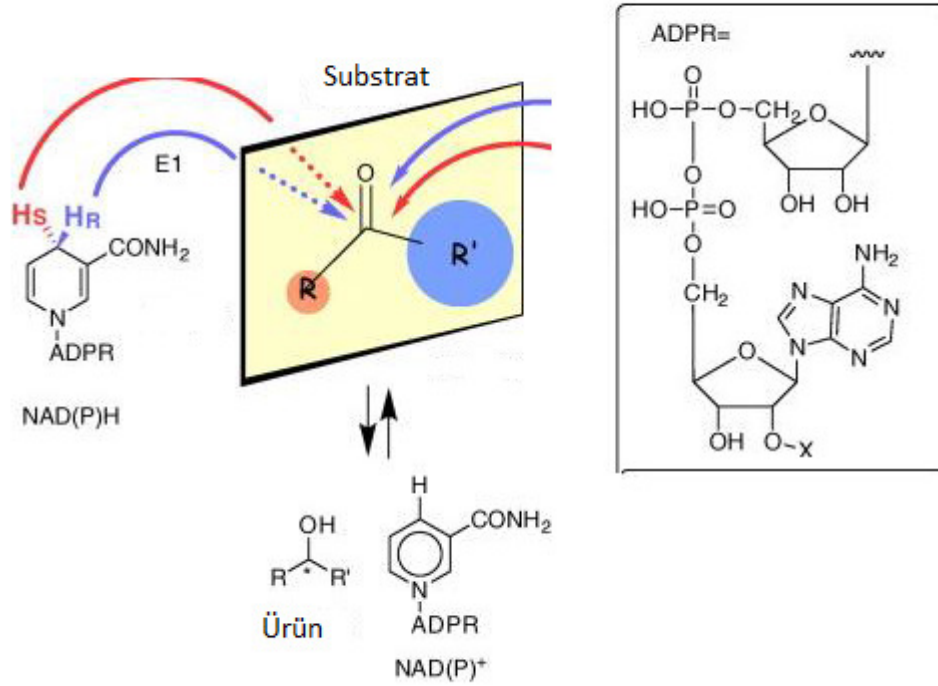
Dibenedetto ve ark [97] ise yaptıkları çalışmada yine bu üç multi enzim sistemini kullanmışlar ancak bu defa NADH rejenerasyonunu sistemde

fotokatalitik olarak gerçekleştirmişlerdir. Böylelikle metanol oluşum verimini % 95'e taşımışlardır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, multi enzim sistemlerinin işleyebilmesi için NADH kofaktörü gerekli olduğu görülmektedir. FaldDH, FaldDH ve ADH enzimleri oksidoredüktaz enzim grubunda yer almaktadır. Oksidoredüktaz enzim grubu incelendiğinde enzim grubunun, yapısal olarak 2 kısmı içerdiği belirtilmektedir. Bu kısımlar; NAD⁺ bağlayıcı kısım ve katalitik kısım. NAD bağlayıcı kısım, aktif konformasyondaki NADH yada NAD⁺ tanıyıcı ve bağlayıcı kısımdır. Katalitik kısım ise, kataliz için gerekli aminoasit kalıntıları içerir, aktif bölgede bu aminoasitler doğru sıralamayla yerleşirler ve her enzim için spesifik olan kısmı oluştururlar. Oksidoredüktazlar tarafından, kofaktör NADH indirgenmesi spesifik olarak 3 basamakta gerçekleşir. Bu basamaklar sırasıyla;

- Kofaktör ve substratın enzime bağlanması,
- Kofaktörün yükseltgenirken, substratın indirgenmesi,
- Kofaktör ve ürünün enzimden ayrılması şeklindedir [98, 99].

Şekil 1.24'de E1 ile gösterimi verilen bir oksidoredüktaz katalizinde substrat ve NADH arasındaki indirgenme-yükseltgenme reaksiyonu şematik olarak gösterilmektedir. Buna göre, NADH yükseltgenirken, substrat indirgenmektedir. En son ürün oluşumuyla sistemden NADH ve enzim ayrılmaktadır.



Şekil 1.24. NADH ve substrat arasındaki oksidoredüktaz katalizli redox reaksiyonu [98]

FateDH, FaldDH ve ADH enzimleri kullanılarak geliştirilen multi enzim sistemlerinde, CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonlarında elektron donörü olarak NADH'ın kullanımı ve sistemde rejenerasyonu gerekmektedir.

NADH rejenerasyonu için literatürde geliştirilen çalışmalar sınıflandırıldığında 5 ana kategori ortaya çıkmaktadır.

Bunlar:

- Sodyum ditiyonit, rutenyum(II) ve rodyum (III) kompleksleri gibi katalizörler kullanılarak yapılan kimyasal rejenerasyon,
- Sisteme başka bir oksidoredüktaz entegrasyonu ile enzimatik rejenerasyon. Bu sistemlerde kullanılan teknikler;
 - Glutamat substratıyla birlikte GDH kullanılması
 - Etanol substratıyla birlikte ADH kullanılması
 - NADH oksidaz enzimi kullanılması
 - Laktik asidin substrat olarak kullanılmasıyla laktat dehidrogenaz enziminin kullanılması

- Formik asitle birlikte FateDH kullanılması
- Glikoz dehidrogenaz ve glikoz 6-P-dehidrogenaz kullanılması
- *Geotrichum candidum* ve *Methylosinus trichosporium* gibi mikroorganizmalar kullanılarak, mikrobiyal rejenerasyon,
- SiO₂ destekli kuantum noktalar, geçiş metal sistemleri ve karbon nitrat gibi fotokatalizörler kullanılarak, fotokimyasal rejenerasyon,
- Camsı karbon ya da altın elektrotlar, vanadyum silika kuru jeller, rodyum araçları ve karbon nanofiber katotlar kullanılarak elektrokimyasal rejenerasyon şeklinde sıralanabilir [100-111].

Tez kapsamında, bu yönde yapılan çalışmada, FateDH, FaldDH ve ADH enzimleri aynı nano yapı içerisinde ANADOLUCA metoduyla, rutenyum tabanlı NADH içeren fotoduyarlı aminoasit monomerleriyle çapraz bağlanarak kriyojel katı destek materyali içerisine bağlanmıştır. Sistemden CO₂ geçirilerek elde edilen metanol miktarı tayin edilmiştir.

1.5. Kriyojel

Kriyojel, jel matrisleri olup, monomerik ve polimerik yapıların uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenir. Kriyojel sözcüğü Yunanca kökenlidir, -kryos- (buz, soğuk) ve -gel- (jel) sözcüklerinin bir araya getirilmesinden oluşmuştur. Böylece, soğukta yapılan jel anlamını taşımaktadır.

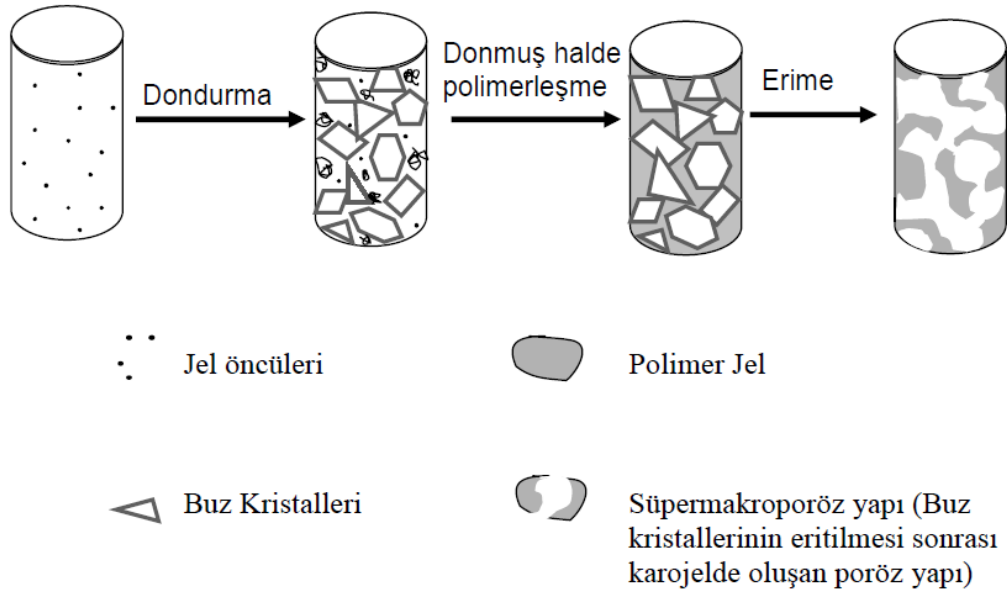
Kriyojellerin birbirine bağlantılı büyük gözenekleri pratik olarak, herhangi bir büyüklükteki çözünenlerin difüzyonuna, nano partüküllerin, mikropartiküllerin kütle geçişlerine izin vermektedir. Kriyojellerin yapısı morfolojik olarak sünger yapısı gibidir. Yani birbirine bağlantılı gözenekli sürekli bir yapı kriyojellerin temel yapısıdır. Bu şekilde organize edilen gözenek sistemi çözünenlerin kriyojellerin içinden madde kaybı olmadan geçişlerini sağlamaktadır. Kriyojellerin makrogözenekli yapısı, osmotik basınçları, kimyasal ve mekanik dayanıklılığıyla bir araya getirildiğinde, plazmidler, virüsler, hücre organelleri

gibi biyolojik nanopartiküllerin, mikropartiküllerin, hatta bütün hücrelerin kromatografisi için ilgi çekici destek materyalleri haline getirmektedir [112]. Kriyojellerin, kromatografik sistemlerde kolon dolgu materyali olarak kullanıma uygun olmasının nedeni, hareketli fazın kolondan geçmesiyle kolonda oluşacak geri basıncı önlemeleridir. Kriyojellerin bu özelliği, biyomoleküllerin denatüre olmadan, kromatografik tekniklerle, etkili bir şekilde izolasyonuna ve saflaştırılmasına imkan verir. Kriyojeller, biyoteknolojik alanda, enzim, protein, hormon, karbonhidrat, nükleik asit ve antikor gibi biyomoleküllerin tanımlanmasında ve saflaştırılmasında, bununla birlikte enzim immobilizasyonu çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır.

Kriyojeller, dondurma-eritme de denilen karyotropik jelasyon işlemiyle sentezlenirler. Kriyojel sentezinin temel basamakları sırasıyla, monomer, monomer karışımları veya polimerin uygun bir çözücüde çözülerek homojen çözeltisinin hazırlanması, bu çözelti içine uygun çapraz bağlayıcı ve gerekli reaksiyon başlatıcı ajanların eklenmesi, hazırlanan homojen karışımın belirli bir süre -16°C, -18 °C gibi düşük sıcaklıkta bekletilmesi ve oluşan buz halindeki karışımın oda sıcaklığına alınarak polimer içinde oluşan buz kristallerinin eriyerek kriyojel oluşumunun başlaması basamaklarıdır. Oda sıcaklığında erime prosesinde, polimer içerisindeki buz kristalleri yerini birbirine bağlantılı gözeneklerden oluşan ürüne yani kriyojele bırakır [113].

Şekil 1.25'te kriyojel hazırlama aşamaları şematik olarak gösterilmiştir. Buna göre, ilk olarak, jel oluşturma ajanları donmuş çözücü kristalleri içerisinde yerleşmiş donmamış sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır. Burada donmamış sıvı mikrofaz başlangıç toplam hacmin sadece küçük bir kısmını içermesine rağmen, jel öncülerinin derişimi jel oluşumunu ilerleterek yavaş yavaş artmaktadır. Gözenek oluşturunca ajan görevini, donmuş çözücü kristalleri üstlenir. Eritildiğinde boşlukları terk ederler ve büyük gözenekler çözücü ile dolar. Kriyojellerde, gözenek yüzeyini pürüzsüzleştiren ve gözeneklerin şeklini belirleyen etken, çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey tansiyonudur. çözücü kristalleri donma işleminde, diğer kristallerle karşılaşınca kadar büyüyerek, erime işlemi sonrasında jelde birbirine bağlantılı gözenek sistemi oluşur.

Kriyojelin gözenekliliği heterogözenekler şeklindedir çünkü, polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşan mikro gözenekler içermektedir.



yöntemiyle yapılan analizler, -198°C deki sıvı azot ortamında azot (N_2) gazı adsorpsiyonuyla, katıların m^2g^{-1} olarak yüzey alanlarının ölçülmesi esasına dayanır.

Şişme testiyle sentezlenen kriyojelin bünyesindeki su tutma kapasitesi ve su tuttuğunda hacmindeki esneme miktarı belirlenmektedir. Kriyojellerin şişme oranı aşağıdaki Eşitlik 1.5 ile bulunabilir [114].

$$\text{Şişme oranı (\%)}: [(W_{\text{şişmiş}} - W_{\text{kuru}}) / W_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (1.5)$$

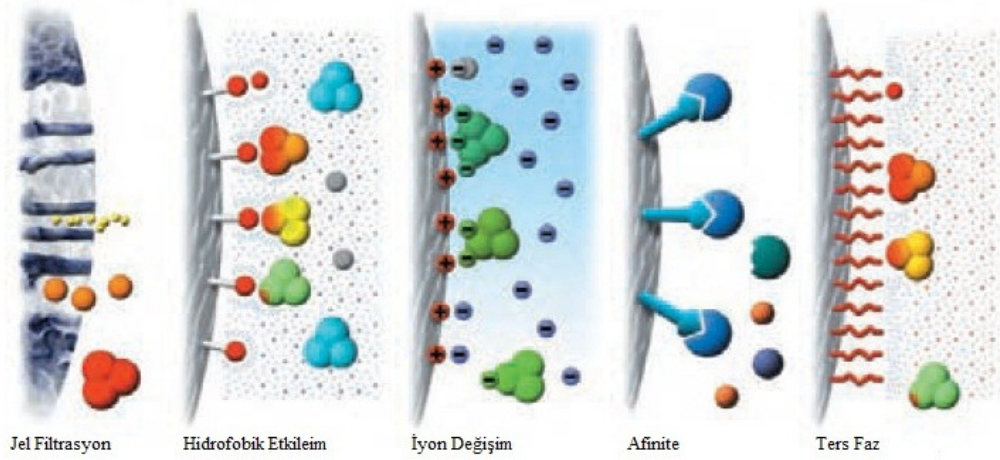
$W_{\text{şişmiş}}$: şişen kriyojellerin ağırlığı, W_{kuru} : kuru kriyojellerin ağırlığı

Yapılan tez çalışmasında, CO_2 dönüştürücü nano enzim sistemleri kriyojel kolon dolgu maddesine çapraz bağlanmış ve CO_2 'nin metanole dönüşümü incelenmiştir.

1.6. Afinite Kromatografisi

Kromatografi, bir tür ayırma ve saflaştırma yöntemi olup, incelenen moleküllerin hareketli faz ve sabit faz arasındaki fiziksel etkileşimlere dayanarak birbirinden ayrılması prensibine göre geliştirilmiş bir yöntemdir. Afinite kromatografisi, enzim saflaştırma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayırma mekanizmaları incelendiğinde, kolon kromatografisi yöntemleri jel filtrasyon kromatografisi hariç, adsorpsiyon mekanizmasına göre ayırma yapmaktadır. Şekil 1.26'da farklı kromatografi türlerinin ayırma mekanizmaları kısaca şematize edilmiştir.

Afinite kromatografisi, sıvı kromatografisinin özelleştirilmiş bir türü olup, biyomoleküllerin uygun ligandlarla adsorpsiyon mekanizmasına göre ayrılmasını sağlamaktadır. Yöntemin, yüksek seçicilik, spesifik ayırma, verimli saflaştırma gibi avantajları vardır ve bunlar sayesinde, birçok biyolojik molekülün saflaştırılmasında kullanılmaktadır [115].



Şekil 1.26. Kromatografik yöntemlerin ayırma mekanizmaları [115]

Afiniteye dayalı kromatografik saflaştırma sistemlerinde ligand, hedef molekülün bağlandığı madde, matriks de ligandın üzerine tutturulduğu katı materyaldir. Matriks ligand ile herhangi bir kimyasal etkileşime veya reaksiyona girmemeli ve fiziksel olarak inert olmalıdır. Ligand, saflaştırılacak moleküle spesifik olmalı ve zayıf tersinir bağlarla bağlanmalıdır. Afinite kromatografisinde, uzatıcı kollar ligand ve hedef molekülün sterik engeller gibi bazı etkiler nedeniyle bağlanamadığı durumlarda kullanılmaktadır. Uzatıcı kollar, genellikle düz zincirli hidrokarbon türevleri olan küçük moleküller olup, hedef molekülün bağlanmasını kolaylaştırmaktadırlar [116].

Afinite kromatografisinin uygulamalarında, saflaştırma işleminin üç basamakta gerçekleştiği görülmektedir. İlk aşamada; hedef molekülü içeren kolon üzerinden uygun bir yıkama tamponu geçirilerek, kolonun çözücü ile dengelenmesi sağlanır. İkinci aşamada; hedef molekül sabit faza spesifik ve tersinir olarak bağlanır ve bu arada ligand ile bağlanmayan türler kolondan çıkarlar. En son; hedef molekülün kolondan elüsyonu gerçekleştirilir. Bu amaçla, afinite ortamına ya kompetitif başka bir ligand ilave edilir ya da hareketli fazın bileşimi (iyonik şiddeti, pH' ı ya da polaritesi) değiştirilir [117]. Böylece kolondan alınan saflaştırmak istenilen biyomolekül, afinite temelli olarak izole edilir.

Biyomoleküllerin tek basamakta, spesifik ve etkili bir şekilde, yüksek verimde saflaştırılması için afinite yöntemi sıklıkla kullanılır. Aslında pahalı bir metot olarak görülen afinite yöntemi, saflaştırılacak biyomolekülle afinite gösteren metal, boya, organik sentez moleküllerinin sistemde ligand olarak kullanımıyla, daha ucuz bir yöntem haline indirgenebilir. Diğer kromatografik yöntemlerde, iyon değişim, jel filtrasyon gibi, daha çok bir grubun ayrılması gerçekleştirilmektedir. Afinite kromatografisiyle enzimler ve substratları moleküler etkileşimleri kullanarak, bunun sonucu olarak spesifik bağlanmalara dayalı ayırım gerçekleştirildiğinden yalnızca istenen enzimin, bulunduğu protein içeriğinden ayrılması daha pratiktir. İzole edilmek istenen enzimin matriks ortamında, derişimi çok düşük olsa bile verimli bir saflaştırma gerçekleşmektedir. Afinite kromatografisi, spesifik, verimli, tekrarlanabilir ve kolay uygulanabilir bir yöntem olmasından dolayı, enzim saflaştırmada kullanılan ve yeni etkileşimler kullanılarak, farklı ligandlarla yeni kolon sistemleri geliştirilmesine uygun bir yöntemdir.

Tez çalışmasında, kriyojel gözenekleri modifiye edilerek ıspanaktan RuBisCo enzimi saflaştırılması afinite kromatografisiyle gerçekleştirilmiştir.

1.7. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)

Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC), proteinlerin ayrıştırılması, saflaştırılması, nicel olarak belirlenmesi ve nitelendirilmesi, peptid vb. ayırımlarının gerçekleştirilmesi amacıyla geliştirilmiş bir sıvı ve kolon kromatografisi modelidir. Özellikle membran proteinleri başta olmak üzere, proteinlerin tek bir adımda saflaştırılmasını sağlaması nedeni ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Sistemin temeli basit bir kromatografik ayırıma dayanmaktadır. Saflaştırılmak istenen enzim veya protein, uygun bir hareketli faz ile (tampon çözelti), hazırlanan kolonun üzerinden geçirilir; kolona tutunmayan türler kolonu hemen terk ederken; kolona tersinir olarak tutunan numune elüsyon çözeltisi ile kolondan saf bir şekilde toplanır [117]. Şekil 1.27’de tez kapsamı içerisinde kullanılan FPLC cihazı gösterilmiştir.



Şekil 1.27. FPLC cihazı

FPLC cihaz bileşenleri incelendiğinde, dedektör olarak UV-Vis, Floresans, Kırılma indisi gibi dedektörler kullanıldığı, pompa, fraksiyon toplayıcı ve afinite kolonları gibi kısımlardan oluştuğu görülmektedir.

UV-Vis dedektör; ksenon flaş lambası hem UV hem görünür bölge aralığında çalışmaktadır (190-700 nm). Çift yollu akış hücresi dinamik absorbans aralığını 10⁻⁵'den 40 AU'nin üzerine kadar genişletir. Floresans dedektörüyle lüminesans, fosforesans, kemilüminesans ve biolüminesans ölçümleri mümkündür. Kırılma indisi Dedektörü; polimerler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, alkoller ve yağ asitleri gibi absorbans yapamayan bileşiklerin analizleri için idealdir.

FPLC cihazında kullanılan pompa, güçlü mekanik motoru sayesinde 4000 psi (275 bar) geri-basınçlarına kadar dakikada 50 mL sıvı pompalayabilir.

FPLC cihazındaki fraksiyon toplayıcısında 18 mm çapındaki tüpler için 144 parça kapasitesi vardır.

FPLC cihazında farklı analiz metotları için farklı kolonlar kullanılabilir: İyon-değişirme metodu için; Hiprep 16/10 Q sefaroze XL ve Hiprep 16/10 SP sefaroze XL kolonları bulunur. Sefarozla önceden paketlenmiş Q XL or SP XL ortamı, 20 mL preparatif anyon ve kation-değişim kolonları yüksek yükleme

kapasitesi ve hızlı elüsyon sağlar. Jel filtrasyon metodu için; Hiload 16/60 süperdex 200 pg ve Hiload 26/60 superdex 75 pg kolonları bulunur. Süperdex 75 kolonu prep peptidler, daha büyük proteinler, oligosakkaritler yani Mr 3000-70000 için uygundur. Superdex 200 kolonu ise prep antikorlar ve Mr 10000-600000 proteinler için uygundur. FPLC’de hazırlanan örneklerin özelliklerine bakıldığında, 100 µL-5 mL arasında berrak ve safsızlıklardan arındırılmış sıvı örneğin FPLC sistemine enjeksiyonu yapılabilir. Biliniyorsa örnek içerisindeki protein miktarı veya derişimi de verilmelidir. Analizi yapılacak örnek, FPLC cihazına enjeksiyonla verilir ve hareketli faz sayesinde ayırımın yapılacağı kolona taşınır [114, 118].

Sunulan tez çalışmasında, kriyojel gözenekleri modifiye edilerek ıspanaktan RuBisCo enzimi saflaştırılması afinite kromatografisi metodu ve FPLC tekniğiyle gerçekleştirilmiştir.

1.8. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi, moleküllerin dairesel spektrumlarını belirli dalga boylarında ölçen spektroskopik bir yöntemdir. CD, dairesel polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile polarize ışığın sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farktır [119]. Eşitlik 1.6’da CD formüle edilmiştir.

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{\text{sola yönlü polarize ışık}} - A(\lambda)_{\text{sağ yönlü polarize ışık}} \quad (1.6)$$

(λ = Dalgaboyu)

Bu eşitlikte, A; polarize ışığın absorbansını, ΔA ise; polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile polarize ışığın sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farkı göstermektedir.

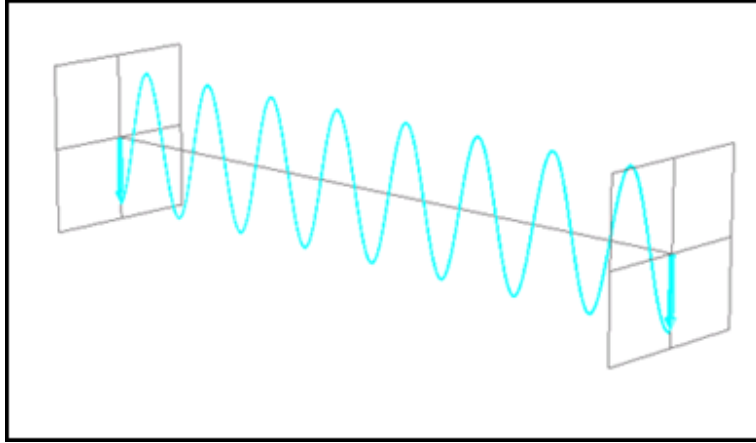
Eğer bir molekül, bir veya daha fazla kiral kromofor grup içeriyorsa CD oluşmaktadır. CD spektroskopisi, özellikle, proteinlerin ikincil yapılarının çevreye, sıcaklığa ve pH değişimlerine göre nasıl etkilendiğini ve diğer moleküllerle etkileşimini incelemek için geliştirilmiştir. Bunun yanında, makromoleküllerin yapısal, kinetik ve termodinamik bilgileri elde edilebilmektedir. Spektrofotometre ile ölçümler, elektronik geçişlerin

gözlemlendiği elektro-manyetik spektrumun görünür ve UV bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Spektrumlar proteinlerin ikincil yapılarına ait, α -heliks, β katlanmaları, düzensiz sarmal yapılarının yanında, proteinlerin tersiyer yapısındaki aromatik grupların da varlığına ait bilgiler vermektedir [120].

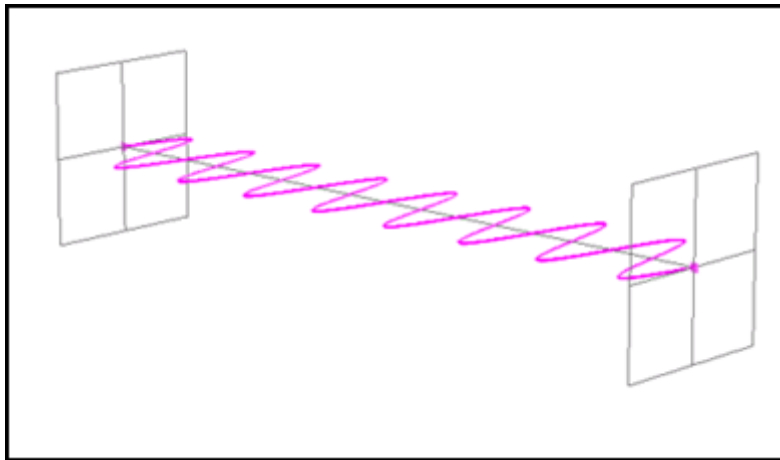
CD'nin detaylı olarak açıklanabilmesi için öncelikle polarize ışık ve sağ yönlü ve sol yönlü polarize ışık terimlerini açıklamak gerekmektedir.

Polarize ışık tek bir düzlemde titreşerek ilerleyen ışıktır. Bütün polarize ışıklar, birbirine dik iki doğrusal polarize bileşenin toplamı şeklindedir. Şekil 1.28a dikey polarize ışığı, Şekil 1.28b yatay polarize ışığı göstermektedir.

(a)



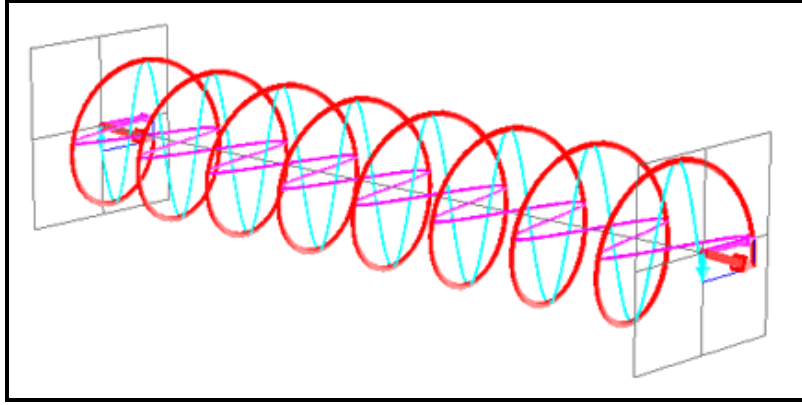
(b)



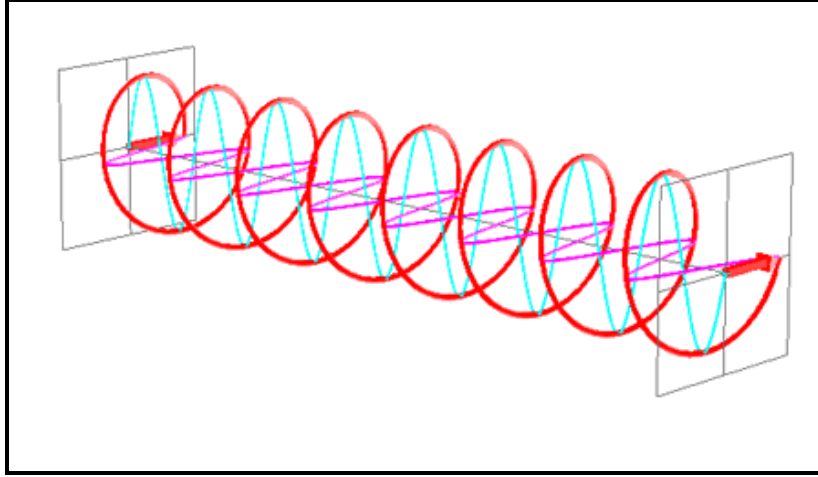
Şekil 1.28. a. Dikey polarize ışık, b. Yatay polarize ışık [121]

Eğer iki polarize ışık aynı fazda değilse, doğrusal ışık oluşmaz. Dairesel polarize ışık, bir polarize ışığın diğerine çeyrek faz farkla gelmesinden meydana gelir. Oluşan dairesel ışık sağ yönlü veya sol yönlü olabilmektedir. Şekil 1.29a sol yönlü dairesel polarize ışığı, Şekil 1.29b ise, sağ yönlü dairesel polarize ışığı şematize etmektedir.

(a)



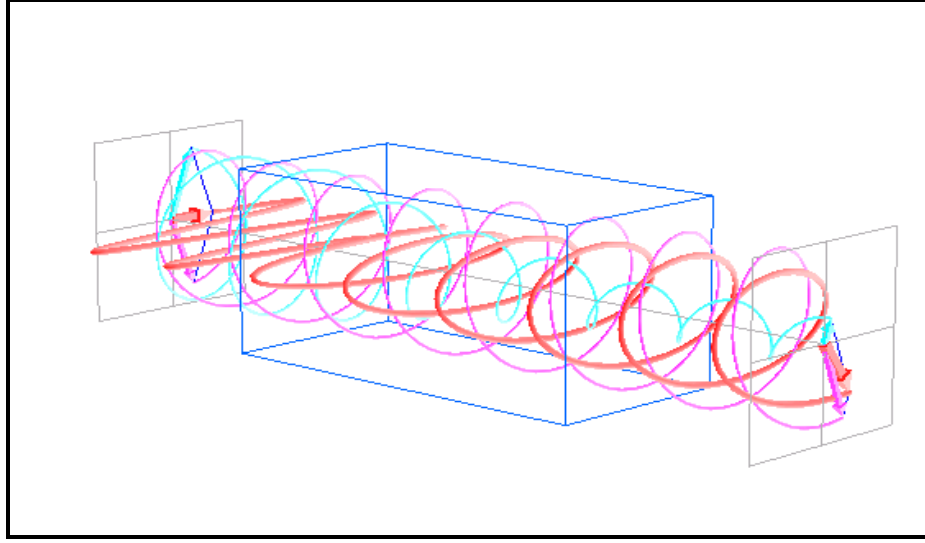
(b)



Şekil 1.29. a. Sol yönlü polarize ışık, b. Sağ yönlü polarize ışık [121]

CD'nin gerçekleşebilmesi için kiral bir molekülün varlığına ihtiyaç vardır. Çünkü kiral moleküllerde, dairesel polarize ışık farklı şekilde absorplanır. Örneğin; bir kiral moleküldeki kromofor, sağ yönlü polarize ışığı % 90 oranında absorplarken, sol yönlü polarize ışığı % 87 oranında absorplayabilir. İşte buradaki

fark CD'yi vermektedir. Şekil 1.30'da numunenin dairesel polarize ışık ile etkileşimini göstermektedir. Mavi hücre örneği temsil etmektedir.



Şekil 1.30. Numunenin dairesel polarize ışık ile etkileşimi [121]

CD spektroskopisi, farklı birçok alanda, farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. En çok kullanım alanı UV CD spektroskopisinin proteinlerin ikincil yapısının tayininde olduğu görülmektedir. UV/Vis CD spektroskopisi moleküllerdeki yük transfer geçişlerinde, Vis CD spektroskopisi metal atomlarındaki d-d geçişleriyle geometrik ve elektronik yapının incelenmesinde, titreşimli CD spektroskopisi ise, küçük organik moleküllerin, proteinlerin ve DNA'ların yapısal analizlerini ortaya koymak amaçlı kullanılmaktadır [122-124].

CD spektroskopisinin genel olarak biyomoleküllere uygulanmasının sebebi, biyomoleküllerdeki sağa ve sola çevirici bileşenlerinden yani kiralitelerinden ileri gelir. Proteinlerin α -heliks yapısı ve nükleik asitlerin çift heliks yapıları CD spektrum sinyalleri vermektedir. Uzak UV bölgesinde, proteinlerin ikincil yapılarına ilişkin yapıdaki, α -heliks konformasyonu, beta katlanmaları veya beta tabakaları ya da diğer rastgele katlanmalar hakkında bilgi alınabilir [125]. Bunun yanında proteinlerdeki konformasyonel değişikliklerin ifadesinde CD spektroskopisi büyük önem taşır. Örneğin, sıcaklıkla ya da denatüre edici ajanlar varlığında ya da bu ajanların derişimleriyle proteinin ikincil yapısının nasıl değiştiğini incelemek için sıklıkla kullanılır. Yakın UV CD spektroskopisi (>250 nm) bölgesinde proteinlerin üçüncül yapıları hakkında bilgi sahibi olunabilir. 250-

300 nm bölgesinde alınan sinyallerde, dipol oryantasyonu ve yapıdaki fenilalanin, tirozin, sistein veya disülfid bağları ve triptofan aminoasitlerinin yapıda olup olmadığı bilgisi alınabilir. Ayrıca yakın UV CD spektroskopisiyle hemoglobin veya sitokrom C'deki hem grubu gibi prostetik grupların da varlığı tespit edilebilir.

Yapılan tez çalışmasında ticari enzimlerin, nano enzim formatında sentezlendikten sonra yapılarındaki değişim CD spektroskopisiyle incelenmiştir.

Çalışmada, günümüzde CO₂ emisyonunun artmasıyla, oluşabilecek etkileri en aza indirmek ya da bertaraf etmek amacıyla CO₂'yi tutucu ve diğer yararlı maddelere dönüştürücü enzim sistemleri tasarlanmış ancak içerik olarak enzim sistemlerine farklı bir perspektiften yaklaşarak, tekrar tekrar kullanılabilir, kolay uygulanabilir ve etkili nano enzimler geliştirilmiştir. Geliştirilen nano enzimlerin etkinliklerine göre, CO₂ farklı formlara dönüştürülmüş ve bu dönüşümlerin mekanizmalarına etki eden parametreler incelenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Sunulan çalışma kapsamında yapılan çalışmaları aşağıdaki başlıklar altında toplamak mümkündür:

1. Nano CA sentezi, karakterizasyonu ve nano enzim aktivitesinin ticari CA enzimiyle karşılaştırmalı olarak belirlenmesi,
2. Nano CA enziminin CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonlarında aktivitesinin belirlenmesi,
3. Nano FateDH, FalddDH ve ADH çoklu enzim sistemi sentezi ve karakterizasyonu,
4. Nano FateDH, FalddDH ve ADH çoklu enzim sisteminin kriyojel kolona çapraz bağlanması ve CO₂'nin metanole dönüşümünde incelenmesi,
5. Nano RuBisCo enzimi sentezi ve karakterizasyonu
6. Nano RuBisCo enziminin CO₂'nin dönüşüm reaksiyonlarında aktivitesinin ticari RuBisCo enzimiyle karşılaştırmalı olarak incelenmesi,
7. RuBisCo enziminin ıspanak yapraklarından afinite kromatografisi tekniğiyle FPLC ile saflaştırılması ve karakterizasyonu,
8. Ispanaktan saflaştırılan RuBisCo enziminin nano formatta sentezlenmesi ve ticari RuBisCo enziminden sentezlenen nano RuBisCo enzimiyle karşılaştırmalı olarak, CO₂'nin dönüşüm reaksiyonlarında aktivitesinin incelenmesi.

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Nanoenzimlerin sentezi için; karbonik anhidraz (CA, sığır mukozasından izole edilmiş), format dehidrogenaz (FateDH, *Candida biodinii*'den izole edilmiş), formaldehit dehidrogenaz (FalddDH, *Pseudomonas sp*'den izole edilmiş), alkol dehidrogenaz (ADH, ekmek mayasından izole edilmiş), Ribulaz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksigenaz enzimi (RuBisCo, ıspanak yapraklarından izole

edilmiş) enzimleri ve Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH), Sigma firmasından temin edilmiştir.

Tampon çözeltiler için; tartarik asit (pH : 3), asetik asit (pH : 4-5), potasyum fosfat mono bazik ve potasyum fosfat di bazik (pH : 6-7-8), glisin (pH : 9-10), saf su, NaOH ve HCl kullanılmıştır. Kullanılan bu kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından tedarik edilmiştir.

Substratların hazırlanması için, Ribulaz 1,5-bifosfat ve 4-nitrofenil asetat Sigma'dan temin edilmiştir.

Jel elektroforez ve kriyojel kolon sentezleme işlemlerinde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar'dan, N,N' Metilenbisakrilamid (MBAm) Sigma Aldrich'den, 2-Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros'dan, Amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin (TEMED) Sigma'dan, Coomassie Blue Appli Chem'den, Akrilamid Merck'den temin edilmiştir.

Enzim örneklerinin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan Bradford Reaktif Amresco'dan, sığır serum albumin (BSA) Sigma' dan alınmıştır.

RuBisCo enziminin ekstraksiyonu işlemlerinde etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), $MgCl_2$, sorbitol, sodyumpirosülfat ve askorbik asit Anadolu Üniversitesi Kimya Bölümü kimyasal deposundan ve ditiyoeritrol (DTT) Sigma firmasından temin edilmiştir.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) işlemlerinde, yürütme çözeltilisinin bileşenleri olan n-propanol, derişik NH_3 ve HCl ve şeker görüntüleme ajanı olarak kullanılan $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ yine Anadolu Üniversitesi Kimya Bölümü kimyasal deposundan temin edilmiştir. İTK işlemlerinde, TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ marka plakalar kullanılmıştır.

Deneyler sırasında kullanılan saf su, Thermo Scientific firmasından alınan saf su cihazından elde edilmiş olup iletkenliği $18 \text{ megaohmcm}^{-1}$ dir.

Ayrıca cam malzemeler (beher, balon joje vb.), 96 kuyulu polistiren mikro plaka, mikro pipet ve pipet uçları gibi malzemeler çalışmalarda kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Nano-enzim sentezinde ve çözeltilerin karıştırılması işlemlerinde JEIO TECH MS-52M manyetik karıştırıcı, nano partikülleri bulundukları ortamdan ayırmak için MPW-251 santrifüj, pH ölçümleri için Hanna Instruments HI 2211 pH metre, kinetik ölçümleri için BioTek Synergy H1 mikro plaka okuyucu ve GEN5 v2.00 yazılımı, kinetik ölçümlerde 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda Shimadzu UV-2450 UV-VİS spektrofotometre ve Shimadzu TCC-240A sıcaklık kontrollü hücre tutucu kullanılmıştır.

Enzim saflaştırma işlemi AKTA P-920 UPC-900 model FPLC (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi) cihazı ile yapılmış, enzimin protein içeriği ve aktivitesi BioTek Synergy H1 ELISA Reader ile yapılan UV absorbans ölçümleri ile tayin edilmiştir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS PAGE) analizi ise Thermo Scientific elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Kriyojellerin yüzey morfolojisinin incelenmesinde Zeiss Ultra Plus SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve yüzey alanının belirlenmesinde Quantachrome Nova 2200E model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır.

CO₂'nin metanole dönüşümü ve elde edilen metanol miktarı Agilent marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir.

Çözücü uzaklaştırmada liyofilizasyon işleminde LABCONCO marka Freezone 2.5 model liyafilizatör kullanılmıştır.

Nano-enzim yapının karakterizasyonu, Malvern Instruments Nano ZS zetaser, FEI Company-Tecnai™ G2 Spirit/Biotwin Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (TEM) ve Varian Cary Eclipse Floresans Spektrofotometresiyle yapılmıştır. Ayrıca kullanılan ticari enzimlerin ve sentezlenen nano enzimlerin yapısı Chirascan Dairesel Dikroizm (CD) spektrofotometresiyle aydınlatılmıştır.

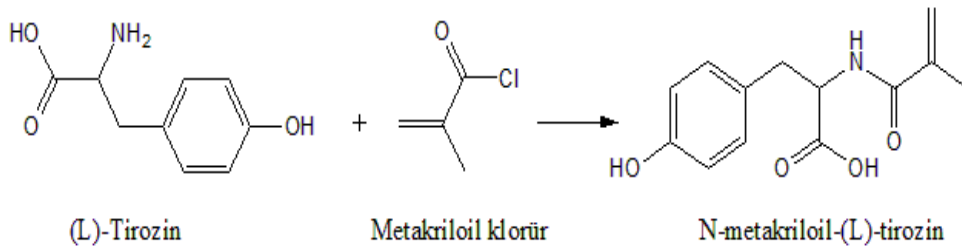
2.2. Metot

2.2.1. Fotoduyarlı Çapraz Bağlayıcı Sentezi ve Karakterizasyonu

2.2.1.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin (MATyr) sentezi

3-(4-hidroksifenil)-2-[(2-metakriloil) amino] propanoik asit (metakriloil amino tirozin, (MATyr)) sentezinde (Şekil 2.1), 0.5 g L-tirozin metilester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL CH₂Cl₂'de çözülmüştür. Çözelti 0 °C'a soğutulmuş ve 12.7 g trietilamin çözeltiye ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti üzerine 5 mL metakriloil klorür yavaşça eklenmiştir ve çözelti azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda, hidrokinon ve reaksiyona girmeyen metakriloilin fazlası % 10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra su fazı döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım, (MATyr), eter-sikloheksan karışımı ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır [21].

Elde edilen monomerin karakterizasyonu ¹H NMR ile yapılmıştır



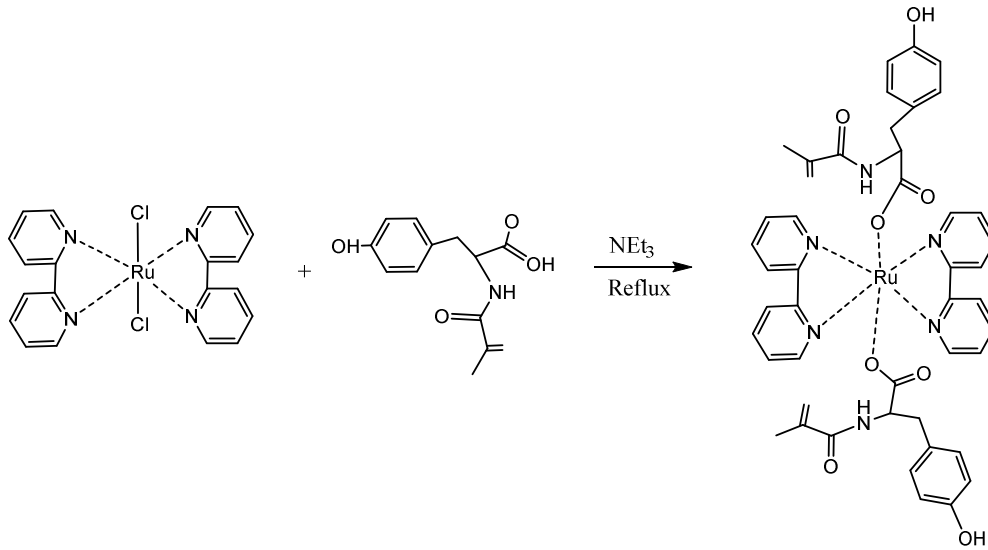
Şekil 2.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin sentezi

2.2.1.2. Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)₂ Rutenyum (II) Sentezi ve Karakterizasyonu

Işığa duyarlı rutenyum merkezli bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂ Rutenyum(II) aminoasit-monomerin kimyasal sentezinde (Şekil 2.2), 1 g diklorobis(2-2'-

bipiridil) rutenyum(II) ($\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2$) saf su içinde çözülmüş ve çözelti 0 °C'a soğutulmuştur. Daha sonra trietilamin ve 1 g MATyr sulu çözeltisi damla damla $\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2$ çözeltisine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Karışım 80 °C' da 24 saat reflaks edilmiştir. Oluşan kahverengi kompleks süzölmüş, eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur [21].

Elde edilen monomerin karakterizasyonu, elementel analiz ve ^1H NMR ile yapılmıştır.

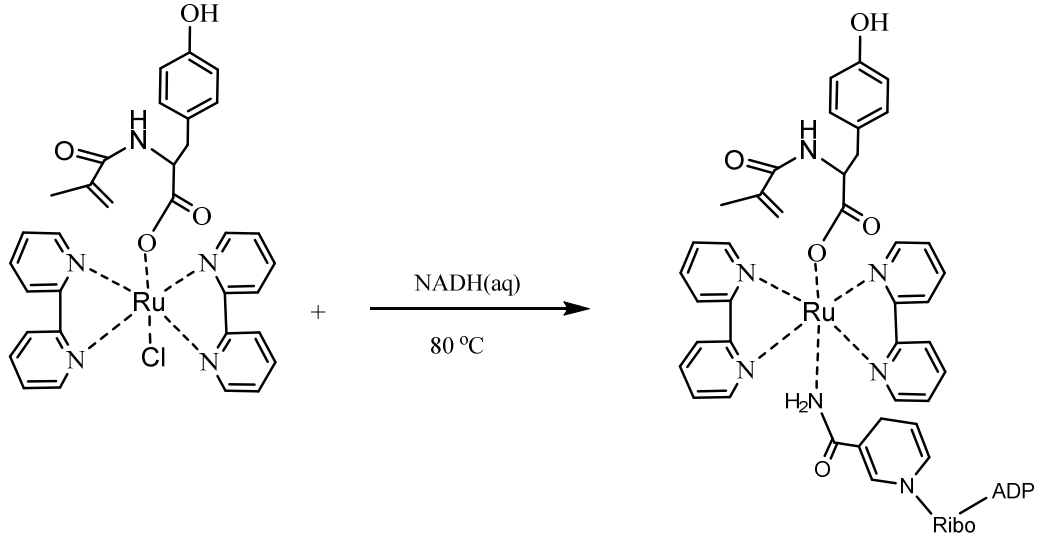


Şekil 2.2. Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)2-Rutenyum (II) bileşiğinin sentezi

2.2.1.3. Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)(NADH) Rutenyum (II) Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH) Ru (II) monomerin sentezi (Şekil 2.3) için eşit oranlarda $\text{RuCl}(\text{MATyr})(\text{bipy})_2$ ve NADH sulu çözeltisi 24 saat 80 °C sıcaklıkta reflaks edilmiştir. Reaksiyon sonunda, çözücüsü uzaklaştırılarak dietil eter ile yıkanmış ve oda sıcaklığında vakum altında kurutulmuştur.

Elde edilen monomerin karakterizasyonu, elementel analiz ve ^1H NMR ile yapılmıştır.

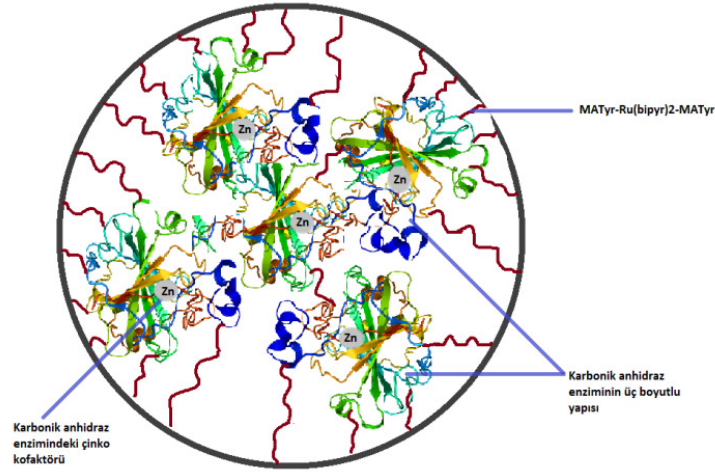


Şekil 2.3. Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)Ru (II) monomerinin sentezi

2.2.2. Nano CA Enzimi

2.2.2.1. Nano CA Sentezi ve Karakterizasyonu

Nano CA enzimi (Şekil 2.4), mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğiyle ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Mikro emülsiyon polimerizasyon ortamı 0.5 g polivinil alkolün 45 mL deiyonize suda dispers edilmesiyle hazırlanmıştır. Rutenyumlu metal-şelat aminoasit monomer, (MATyr)₂Ru(bipyr)₂, CA enzimiyle etkileştirilmiş ve ardından dispersiyon ortamına eklenmiştir. Polimerizasyonu başlatıcı olarak APS'in reaksiyon ortamına eklenmesiyle, azot ortamında, gün ışında ve oda sıcaklığında mikroemülsiyon polimerizasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. 48 saat süren reaksiyonun ardından ortamda oluşan nano CA enzimleri 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenerak reaksiyon ortamından uzaklaştırılmış ve 3 defa deiyonize su ile yıkanmıştır.



Şekil 2.4. Nano CA enzim yapısının şematik olarak gösterimi

Sentezlenen nano CA enzimlerinin karakterizasyonu geçirgenlik elektron mikroskop görüntüsünün alınması, zeta boyut analiz ve floresans spektrumuyla yapılmıştır. Bunun için 2000 mgmL^{-1} derişimindeki nano CA, 1:3 oranında deiyonize suyla seyreltilerek örnekler hazırlanmıştır. Çalışmada ayrıca ticari CA ve nano CA enzimleri CD spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Bu teknikle; CA enziminin nano enzim formatına getirildikten sonra sekonder yapısında değişim olup olmadığı belirlenmiştir.

Nano CA ve ticari CA enzimleri SDS-PAGE elektroforezinde yürütülerek nano CA enziminin molekül ağırlığı ve saflığı test edilmiştir.

Nano CA enzimi içeriğindeki protein tayini için Bradford metodu kullanılmıştır [126]. Bu amaçla, 5.00; 10.0; 25.0 ve 50.0 ppm' lik standart serum albümin protein çözeltileri hazırlanarak içerisine 1:3 oranında Bradford reaktifi eklenmiş ve 595 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Her bir protein derişimine karşılık gelen absorbans değeriyle kalibrasyon grafiği çizilmiş ve nano CA'nın absorbans değerinden içeriğindeki protein miktarı saptanmıştır.

2.2.2.2. Nano CA Enziminin Aktivite Tayini

Sentezlenen nano CA aktivitesi, esteraz aktivitesi belirleme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [127]. Bu yöntemle göre, CA enzimi varlığında 4-nitrofenil asetatın, 4-nitrofenilata dönüşümü 348 nm'de UV absorbansındaki

değişime göre belirlenmektedir. 4-nitrofenilasetatın nitrofenilata hidrolizinde gözlenen maksimum dalga boyu 348 nm'dir. Bu nedenle, enzimatik reaksiyonun takibinde 348 nm'deki UV absorpsiyonu kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyonlarda aynı koşullarda nano CA ve ticari CA enzimleri kullanılarak enzim aktiviteleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Enzimatik reaksiyonlarda 1.4 mL 0.05 M Tris-SO₄ pH 7.4 tamponu, 1 mL 3 mM 4-nitrofenilasetat, 0.5 mL su ve 0.1 mL CA enzimi olacak şekilde toplamda 3 mL'lik karışım hazırlanmış ve enzim aktiviteleri mikropilaya okuyucu cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Her bir enzimatik reaksiyonda kullanılan nano CA ve CA enzim derişimleri eşit olacak şekilde ayarlanmıştır.

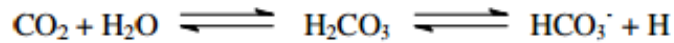
Enzim aktivitesini belirlemede kullanılan toplam hacim mikropilanın her bir kuyusu için 100 µL olarak çalışılmıştır.

CA ve nano CA enziminin aktivitesinin hesaplanmasında türetilen eşitlik 2.1'de verilen denklem kullanılmıştır.

$$U = \frac{\Delta A}{\epsilon \times 348 \times l} \times V \times \frac{10^6 \mu mol}{1 mol} \times \frac{1 L}{10^6 \mu L} \quad (2.1)$$

Bu denklemde U (µmoldak⁻¹) unit aktiviteyi, ΔA mutlak absorpsiyonu, ε (M⁻¹cm⁻¹) CA enzimi molar absorpsiyon katsayısını, V (µL) çözeltinin toplam hacmini ifade etmektedir.

Sentezlenen nano CA aktivitesi, hidrataz aktivitesi belirleme yöntemine göre de belirlenmiştir. CA enzimi varlığında pH değişimin 8.3'ten 6.3'e düşmesiyle ölçülen bir aktivite metodudur.



reaksiyonunda görüldüğü gibi, H₂CO₃ oluşumu kantitatif olarak monometrik yollarla tespit edilebilir. Fakat manometrik metodun, reaksiyon pH'ının değişken olması, CO₂ molekülünün suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır. 2. reaksiyondan yararlanılarak, belirli bir pH düşmesi veya yükselmesi için geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle de

belirlenebilir. Hidrataz aktivitesi belirleme yöntemine göre pH değerinin 8.3'ten 6.3'e düşüşü için geçen süre ölçülmekte ve enzimin birimi, enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi (to) ile enzimli reaksiyon süreleri (tc) arasındaki farkın tc'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Buna göre;

$$\text{Enzim Aktivitesi} = (t_o - t_c) / (t_c \times \text{enzim çözeltisi hacmi}) \quad (2.2)$$

formülünden hesaplanır [44].

Enzimatik reaksiyonlarda 3 mL, pH 8.3 trizma tamponu, 2 mL substrat (CO₂ ile doyurulmuş su) ve 0.05 mL enzim çözeltisinden oluşan karışım hazırlanmış ve enzim aktiviteleri pH metre kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.2.3. Nano CA Enzim Aktivitesine Etki Eden pH, Substrat

Başlangıç Derişimi ve Sıcaklık Parametrelerinin İncelenmesi

Enzim aktivitesine etki eden her bir parametrenin belirlenmesinde nano CA ve ticari CA enzim derişimleri eşit olacak şekilde alınmıştır. Enzim aktivitesine pH'nın etkisini incelemek için pH 6 ve pH 10 arasında farklı tamponlar hazırlanmış ve esteraz aktivitesi belirleme yöntemiyle enzim aktiviteleri farklı pH'larda incelenmiştir.

Substrat başlangıç derişiminin enzim aktivitesine etkisini incelemek için farklı derişimlerde (1.00; 1.33; 2.00; 2.67; 3.33 mM) 4-nitrofenilasetat hazırlanmıştır. pH 8.0'de oda sıcaklığında her bir substrat derişimi için hem nano CA hem de ticari CA enziminin aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizilerek enzimatik reaksiyon için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri belirlenmiştir.

Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisini incelemek için, pH 8.0'de ve 0.5 mM 4-nitrofenilasetat substratı varlığında farklı sıcaklıklarda (5-80°C) enzim aktivitesi hem nano CA hem de ticari CA için karşılaştırmalı olarak UV absorbanlarının 348 nm de ölçülmesiyle belirlenmiştir.

2.2.2.4. Nano CA Enzimlerinin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Nano CA enzimlerinin kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi için enzimatik reaksiyon sonucu nano CA enzimi 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenerek enzimatik ortamdan alınmış ve 1 M NaOH ile sterilizasyonun sağlanması amacıyla yıkanmıştır. Her bir döngüde aynı işlem tekrarlanmıştır. pH 8.0 ve 35 °C’de, toplamda 10 döngüde aynı nano CA enzimi kullanılarak enzimatik reaksiyon incelenmiştir.

2.2.3. Nano CA Enzimiyle CO₂’ nin Bikarbonata Dönüşümünün İncelenmesi

CO₂’ nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonlarında ticari CA enzimi ve nano CA enzimi derişimleri Bradford yöntemine göre belirlenerek, her ikisinde de aynı derişimde enzim içerecek şekilde ayarlanmıştır. Yöntemde, CO₂ ile doymun saf su hazırlanmış ve nano CA ve ticari CA enzimleriyle ayrı ayrı etkileştirilmiştir. Reaksiyon ortamında oluşan bikarbonat miktarı, ayarlı HCl ile titre edilerek titrimetrik yöntemle tayin edilmiştir.

2.2.3.1. Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi

Nano CA enzim derişiminin CO₂’ nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonunda etkisini incelemek için, nano CA derişimi Bradford yöntemiyle tayin edilerek farklı derişimlerde (1-4 ppm aralığında) hazırlanarak reaksiyon ortamına eklenmiştir. 10 mL deiyonize su 8 mLdk⁻¹ akış hızındaki CO₂ ile 5 dakika boyunca doyurulduktan sonra her bir derişimde 100 µL nano CA enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon oda koşullarında gerçekleştirilerek, reaksiyon sonrasında ortamda oluşan bikarbonat miktarı titrimetrik yöntemle tayin edilmiştir. Aynı işlemler 1-4 mgmL⁻¹ ticari CA enzimi kullanılarak da yapılmıştır.

2.2.3.2. pH'ın CO₂'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi

Nano CA enzimi katalizörlüğünde, CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonuna pH etkisini incelemek amacıyla, pH 3-10 arasında tampon çözeltiler hazırlanarak, dönüşüm bu tampon çözeltilerde incelenmiştir. 10 mL deiyonize su 8mLdak⁻¹ akış hızındaki CO₂ ile 5 dakika boyunca doyurulduktan sonra 100 µL 3mgmL⁻¹ nano CA enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon ortamında oluşan bikarbonat miktarı titrimetrik yöntemle belirlenmiştir. Aynı işlemler 3 mgmL⁻¹ ticari CA enzimi ile de yapılmıştır.

2.2.3.3. CO₂ Akış Hızının, CO₂'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi

Nano CA enzimi kullanılarak, CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonuna CO₂'nin akış hızının etkisini incelemek amacıyla, 4; 8; 12; 16 Ldak⁻¹ CO₂, pH 8 tamponunda 3 mgmL⁻¹ nano CA içeren reaksiyon ortamından geçirilerek ortamda oluşan bikarbonat miktarı titrimetrik yöntemle incelenmiştir. Aynı işlemler 3 mgmL⁻¹ derişiminde ticari CA enzimi kullanılarak da yapılmıştır.

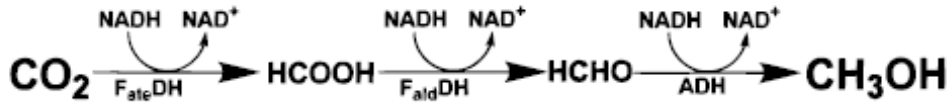
2.2.3.4. Nano CA Enziminin CO₂'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği

Nano CA enziminin CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonunda tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi deneylerinde, 10 mL saf su 8 mLdak⁻¹ akış hızındaki CO₂ ile doymun hale getirilmiş ve pH 8 tamponunda 100 µL 3 mgmL⁻¹ nano CA bulunan reaksiyon ortamına eklenmiştir. Reaksiyon sonrasında, ortamdaki nano CA enzimleri 10000 rpm devirde 10 dakika boyunca santrifüjlenerek ayrılmış ve deiyonize su ile yıkanarak bir sonraki döngü için hazır hale getirilmiştir. Reaksiyon sonrası oluşan bikarbonat miktarı titrimetrik yöntemle tayin edilmiştir. Ardından aynı işlemler, aynı nano CA enzimlerini kullanarak 14 döngü için tekrar edilmiştir.

2.2.4. Multi Nano Enzim Sistemi

CO₂'nin metanole dönüşümü reaksiyonu için literatürde yer alan multi oksidoredüktaz enzimleriyle (FateDH, FalddDH ve ADH) metanole dönüşüme farklı bir bakış açısı getirilerek, bu enzimler nano formatta üçlü enzim olarak sentezlenmiştir.

Reaksiyonlardaki akış sırasına tekrar değinilecek olursa, öncelikli olarak, CO₂, FateDH katalizörlüğünde formata, ardından, format, FalddDH katalizörlüğünde formaldehite indirgenir ve son olarak da ADH katalizörlüğünde metanole dönüştürülür. Bu dönüşüm Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Bu reaksiyonlarda NADH her bir dehidrogenaz katalizli reaksiyon için terminal elektron donörü olarak görev yapmaktadır.

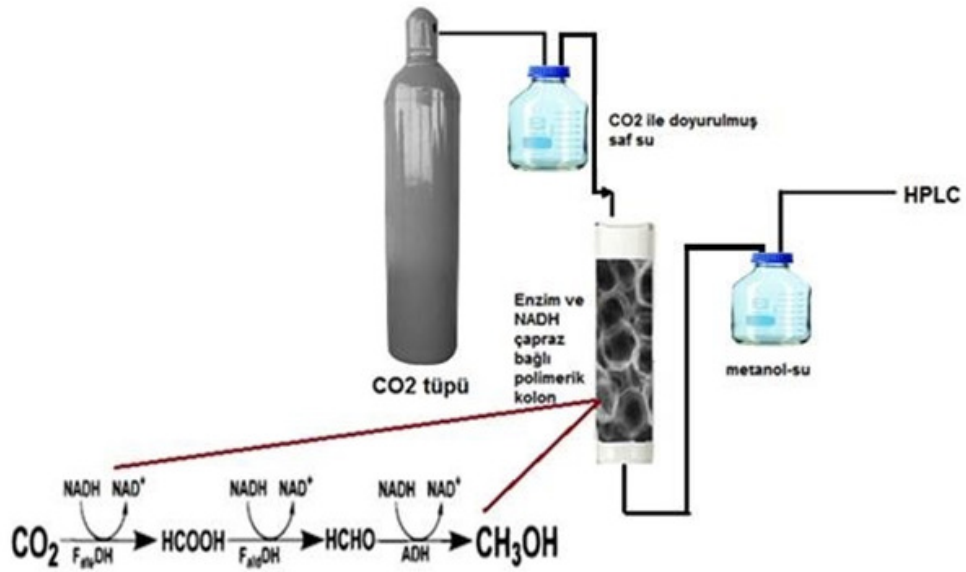


Şekil 2.5. CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonu

Bu bakış açısından hareketle, FateDH, FalddDH ve ADH enzimleri aynı nano yapının içerisinde ANADOLUCA metoduna göre sentezlenirken, çapraz bağlayıcı olarak yine ANADOLUCA metoduna göre ayrıca sentezlenmiş bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) kullanımıyla yeni oluşturulan nano multi enzim sistemine reaksiyonda görev yapacak elektron donörü NADH da entegre edilmiştir.

Sentezlenen nano multi enzim sistemi HEMA tabanlı kriyojel kolona çapraz bağlanarak, kolondan CO₂ ile doyurulmuş saf suyun geçirilmesiyle elde edilen metanol HPLC ile tayin edilmiştir.

Şekil 2.6'da CO₂'nin nano multi enzim sistemi çapraz bağlanmış kriyojel kolondan geçirilerek Şekil 2.5'te gösterilen reaksiyon akışına göre metanole dönüşümü için kurgulanan düzenek gösterilmiştir.



Şekil 2.6. CO₂' den nano multi enzim sistemiyle metanol eldesi sisteminin şematik gösterimi

2.2.4.1. Nano [FateDH, FaldDH, ADH] Enzim Sisteminin Sentezi ve Karakterizasyonu

Nano [FateDH, FaldDH, ADH] multi enzim sistemi ANADOLUCA metoduna göre mikroemülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir. Bu tekniğe göre mikroemülsiyon ortamı, 0.5 g polivinil alkolün 45 mL deiyonize suda dispers edilmesiyle oluşturulmuştur. Bir başka yerde, 1 mL 200 mgmL⁻¹ FateDH, 1 mL 2000 mgmL⁻¹ ve 1 mL 2000 mgmL⁻¹ ADH enzimleri 3 mL bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) ile 3 saat boyunca buz banyosunda karıştırılarak, enzim yapısında çapraz bağlanmaların oluşması sağlanmıştır. Elde edilen enzim kompleksi 25 mL'lik mikroemülsiyon ortamına eklenmiş ve ardından reaksiyon başlatıcısı olarak 0.02 g APS' nin 45 mL deiyonize suda çözülmesiyle elde edilen çözeltiden 25 mL reaksiyon ortamına eklenmiştir. Elde edilen polimerizasyon reaksiyon karışımı 48 saat, azot atmosferinde, oda sıcaklığında ve gün ışığında karıştırılmıştır. Bu süre sonunda elde edilen NADH-Ru içeren nano multi enzimler reaksiyon ortamından 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenerek ayrılmış ve 3 defa deiyonize su ile yıkanmıştır.

Nano multi enzim sisteminin karakterizasyonu, TEM görüntülerinin alınması, floresans spektrumu, zeta boyut ölçümü ile yapılmıştır. Bunun yanında her bir enzimin ve nano multi enzim sisteminin CD spektrumları alınarak nano formata geldikten sonra enzimlerin ikincil yapılarındaki değişiklik incelenmiştir.

2.2.5. Kriyojel Kolon Sentezleri ve Karakterizasyonları

CO₂'nin metanole enzimatik dönüşümünün incelenmesinde sistemde, nano multienzim sistemi ve fotoduyarlı enzim sistemi kriyojel kolonlara çapraz bağlanarak bu kriyojel kolonlar destek materyali olarak kullanılmıştır.

2.2.5.1. HEMA Kriyojeli Sentezi ve Karakterizasyonu

HEMA tabanlı kriyojeller kriyopolimerizasyon tekniğiyle hazırlanmıştır. Bunun için, HEMA monomer olarak, 2-2'-Metilenbisakrilamit (MBAAm) çapraz bağlayıcı, TEMED ve APS polimerizasyonu soğukta başlatıcı ajanlar olarak kullanılmıştır. Kriyojel sentezi için, 0.3 g MBAAm ve 1.6 mL HEMA 10 mL deiyonize suya eklenmiş 2 saat karıştırılarak monomer-çapraz bağlayıcı çifti elde edilmiştir. Bu karışım 20 dakika boyunca buz banyosunda soğutularak 25 mg APS ve 20 µL TEMED reaksiyon ortamına eklenecek 2 dakika daha karıştırılmıştır. Elde edilen kriyojel çözeltisi 10 mL' lik plastik enjektöre konularak -12 °C' de 18 saat boyunca dondurulmuştur. Bu sürenin sonunda, enjektör oda sıcaklığına bırakılarak erime işlemine tabi tutulmuştur. Bu süre içerisinde, kriyojel gözenekleri arasında kalan buz kristalleri eriyerek büyük gözeneklerin oluşumunu sağlamıştır. Elde edilen kriyojel deiyonize su ile yıkanarak, reaksiyona girmemiş reaktiflerle, safsızlıklar yapıdan uzaklaştırılmıştır. Kriyojel kullanılıncaya kadar % 0.02 NaN₃ çözeltisi içerisinde saklanmıştır.

Elde edilen kriyojelin karakterizasyonu, SEM görüntüsünün alınması, şişme testi, sıkıştırma testi ve BET analiziyle yapılmıştır.

2.2.5.2. Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru(II) / [FateDH, FaldDH, ADH] Enzimleri Kompleksi Çapraz Bağlı Fotoduyarlı Kriyojel Kolon Sentezi ve Karakterizasyonu

Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) / [FateDH, FaldDH, ADH] enzimleri kompleksi çapraz bağlı fotoduyarlı kriyojel kolon yine HEMA tabanlı kriyojel kolon olarak sentezlenmiştir. Kısım 2.2.5.1.'deki aynı oranlarda monomer, çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcılar kullanılmıştır.

Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) / [FateDH, FaldDH, ADH] enzimleri kompleksi sentezi için, 1 mL 200 mgmL⁻¹ FateDH, 1 mL 200 mgmL⁻¹ FaldDH ve 1 mL 200 mgmL⁻¹ ADH enzimleri 5 mL Bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) monomeriyle 5 saat süreyle buz banyosunda etkileştirilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen kompleks, HEMA ve MBAAm çözeltisi içerisine eklenerek bir süre daha karıştırılmıştır. Çözelti soğutulurak, APS ve TEMED eklenmiş ve kriyojel kolon -12 °C' de 18 saat boyunca dondurulmuştur. Bu süre sonunda, elde edilen kriyojel kolon oda sıcaklığında erime işlemine bırakılmış ve ardından deiyonize su ile yıkanmıştır. Sentezlenen bu kriyojel diğer deneysel kısımlarda “*foto duyarlı kriyojel kolon sistemi*” olarak ifade edilecektir.

Foto duyarlı kriyojel kolon sisteminin karakterizasyonu, SEM görüntülerinin alınması, şişme testi, sıkıştırma testi ve BET analiziyle yapılmıştır.

2.2.5.3. Nano Multi Enzim (FateDH, FaldDH, ADH) İçeren Kriyojel Kolon Sentezi ve Karakterizasyonu

Nano Multi Enzim (FateDH, FaldDH, ADH) içeren kriyojel kolon sentezinde, Kısım 2.2.4.1'de sentezi açıklanmış olan nano yapılı multi enzim sistemi kullanılarak, kriyojel kolon sentez işlemi sırasında gözeneklere tutturulmuştur. Bu amaçla, kullanılan monomer, çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcıların oranları Kısım 2.2.5.1.'de verilen oranlarla aynı alınmıştır. HEMA ve MBAAm karışımı içerisine 3 mL 200 mgmL⁻¹ nano multi enzim eklenerek 5 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından, bu karışım içerisine APS

ve TEMED eklenerek elde edilen kriyojel çözeltisi kolon içerisinde -12°C 'de 18 saat boyunca dondurulmuştur. Bu süre sonunda, kriyojel kolon oda sıcaklığında erime işlemine bırakılmış ve ardından deiyonize su ile yıkanmıştır. Sentezlenen bu kriyojel diğer deneysel kısımlarda “*nano multi enzim içeren kriyojel kolon sistemi*” olarak ifade edilecektir.

Nano multi enzim içeren kriyojel kolonun karakterizasyonu, SEM görüntülerinin alınması, şişme testi, sıkıştırma testi ve BET analiziyle yapılmıştır.

2.2.5.4. Multi Enzim İçeren (FateDH, FaldDH, ADH) Kriyojel Kolon Sentezi ve Karakterizasyonu

Kriyojel kolonun sentezinde diğer sistemlerden farklı olarak, kolonda herhangi bir rutenyum tabanlı monomer kullanılmadan, FateDH, FaldDH, ADH olmak üzere üç enzim karyopolimerizasyon işlemiyle HEMA kriyojel gözeneklerine tutturulmuştur. Bu işlem için, kullanılan monomer, çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcıların oranları Kısım 2.2.5.1.'de verilen oranlarla aynı alınmıştır. FateDH, FaldDH ve ADH enzimlerinden her birinden 1' er mL 2000 mgmL^{-1} derişimde alınarak bir beher içerisinde karıştırılmış ve HEMA ve MBAAm karışımı içerisinde bu karışım eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, 5 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından, bu karışım içerisinde APS ve TEMED eklenerek elde edilen kriyojel çözeltisi kolon içerisinde -12°C ' de 18 saat boyunca dondurulmuştur. Bu süre sonunda, kriyojel kolon oda sıcaklığında erime işlemine bırakılmış ve ardından deiyonize su ile yıkanmıştır.

Elde edilen bu kriyojel sistemi, NADH içermediğinden, CO_2 'nin metanole dönüşümü sırasında NADH kriyojel kolona dışarıdan verilip kriyojel kolon her bir dönüşüm sonrasında rejenere edilmiştir. Sentezlenen bu kriyojel diğer deneysel kısımlarda “*multi enzim içeren kriyojel kolon sistemi*” olarak ifade edilecektir.

Multi enzim içeren kriyojel kolonun karakterizasyonu, SEM görüntülerinin alınması, şişme testi, sıkıştırma testi ve BET analiziyle yapılmıştır.

2.2.6. Kriyojel Kolonlarla CO₂' nin Metanole Dönüşümü

CO₂'nin metanole dönüşümünde, Kısım 2.2.5.2., 2.2.5.3. ve 2.2.5.4.' te anlatılan üç farklı kriyojel kolondan CO₂ ile doyurulmuş su geçirilerek kolondaki enzimlerin katalizörlüğünde metanol oluşumu karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kolondan alınan çözeltideki metanol miktarı HPLC ile 200 nm'de çözücü absorbansının geldiği bölgede tayin edilmiştir. HPLC analizlerinde sabit faz olarak C18 kolon ve hareketli faz olarak fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılmıştır. Metanol pikleri 3. dakikada gelmiştir. Kriyojel kolonlardan alınan metanolün miktarını tayin edebilmek için öncelikli olarak farklı derişimlerde metanol kolona enjekte edilerek pik yüksekliklerinin derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Ardından, kriyojel kolonlardan alınan metanol içeren sulu çözelti HPLC'ye verilerek, elde edilen pikin yüksekliğinden herbir çalışma sonunda elde edilen metanolün derişimi tayin edilmiştir.

2.2.6.1. Kriyojel Kolonlarla CO₂' nin Metanole Dönüşümüne pH Etkisi

CO₂' nin metanole dönüşüm reaksiyonlarında pH etkisini incelemek için, farklı tampon çözeltiler hazırlanarak (pH 5-10), herbir tampon çözelti CO₂ ile doyurulmuştur.

Fotoduyarlı kriyojel kriyojel kolon kullanılarak yapılan çalışmada, her bir enzimin derişimi 200 mgmL⁻¹ olacak şekilde kriyojel kolon sentezlenmiştir.

Nano multi enzim içeren kriyojel kolon kullanıldığında nano enzimlerin derişimi 200 mgmL⁻¹ olarak nano enzim sentezi gerçekleştirilmiş ve kolona bağlanmıştır.

Multi enzim içeren kriyojel kolon kullanıldığında ise, her enzimden 200 mgmL⁻¹ alınarak, üç enzim de kriyojel sentez aşamasında kriyojele tutturulmuş ve sisteme sürekli dışarıdan NADH çözeltisi verilerek deneysel sistem kurgulanmıştır. Her bir kolondan alınan sulu çözeltideki metanol miktarı HPLC ile farklı pH değerleri için belirlenmiştir.

2.2.6.2. Kriyojel Kolonlarla CO₂'nin Metanole Dönüşümüne Enzim Derişiminin Etkisi

CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonlarında enzim derişiminin etkisini incelemek için pH 7'de dakikada 8 L CO₂ gazı geçirilerek elde edilen doyunu çözelti her üç kriyojel kolondan geçirilmiş ve kolondan alınan sulu çözeltideki metanol miktarı HPLC ile belirlenmiştir.

Fotoduyarlı kriyojel kolon kullanılarak yapılan çalışmada her üç enzimin derişimleri 50, 100, 150, 200 ve 250 mgmL⁻¹ olacak şekilde 5 farklı fotoduyarlı kriyojel kolon sentezlenmiş ve deneyler bu kolonlar kullanılarak yapılmıştır.

Nano multi enzim içeren kriyojel kolon kullanıldığında ise, nano enzimlerin derişimi yine 50, 100, 150, 200 ve 250 mgmL⁻¹ olacak şekilde 5 farklı derişimde enzimler içeren multi nano enzim sistemleri sentezlenmiş ve her bir nano multi enzim sistemi ayrı ayrı 4 farklı kriyojel kolona bağlanmıştır. Her bir kriyojel kolondan CO₂ ile doyunu su geçirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

Multi enzim içeren kriyojel kolonlarla yapılan çalışmada, her üç enzimin de derişimleri 50, 100, 150, 200 ve 250 mgmL⁻¹ olacak şekilde 5 farklı enzim karışımı oluşturularak, 5 farklı HEMA kriyojeline bağlanmış ve her bir kolondan CO₂ ile doyunu su geçirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Multi enzim içeren kriyojel kolonlarla çalışılırken CO₂ geçirilmeden önce kriyojel kolondan 150 mgL⁻¹ derişiminde NADH geçirilerek, sisteme elektron donörü eklenmiştir. CO₂ geçirildikten sonra kolon rejenere edilmiştir.

2.2.6.3. Kriyojel Kolonlarla CO₂'nin Metanole Dönüşümüne CO₂ Miktarının Etkisi

CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonlarında CO₂ derişiminin etkisini incelemek için pH 7'de farklı derişimlerdeki CO₂ ile sulu çözeltiler hazırlanarak her üç kriyojel kolon sistemindeki enzimlerin 200 mgmL⁻¹ olduğu kriyojellerden geçirilerek elde edilen metanol miktarları HPLC ile tayin edilmiştir. Multi enzim içeren kriyojel kolonlardan CO₂ geçirilmeden önce kriyojel kolondan dönüşüm

olması için 150 mgL^{-1} derişiminde NADH geçirilerek, sisteme elektron donörü eklenmiştir.

2.2.6.4. Kriyojel Kolonlarla CO₂' nin Metanole Dönüşümünde CO₂'nin Kriyojel Kolonla Etkileşim Süresinin İncelenmesi

CO₂'nin metanole dönüşümün kriyojel kolonlarla etkileşiminde CO₂'nin kriyojel kolonla etkileşim süresi de enzimatik dönüşümün tamamlanabilmesi için önemli bir parametredir. Bu amaçla, pH 7'de CO₂ ile doygun hale getirilmiş saf su, içerisinde 200 mgmL^{-1} enzim sistemleri bulunan her üç kriyojel kolonlarla farklı sürelerde etkileştirilmiş ve deneyler sonunda elde edilen metanol miktarı HPLC ile tayin edilmiştir. Yine, multi enzim içeren kriyojel kolonlardan CO₂ geçirilmeden önce kriyojel kolondan dönüşüm olması için 150 mgL^{-1} derişiminde NADH geçirilerek, sisteme elektron donörü eklenmiştir.

2.2.6.5. CO₂' nin Metanole Dönüşümünde Kullanılan Kriyojel Kolonların Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Fotoduyarlı kriyojel kolon, Nano multi enzim içeren kriyojel kolon ve multi enzim içeren kriyojel kolonlarla CO₂' nin metanole dönüşüm reaksiyonlarında bu kolonların tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi çalışmalarında aynı kolondan CO₂ tekrar tekrar geçirilerek elde edilen metanolün miktarı tayin edilmiştir. İçerisinde 200 mgmL^{-1} derişiminde enzim bulunan her üç tür kolondan 15 g CO_2 pH 7'de 10 tekrar olarak geçirilmiş ve elde edilen metanol miktarı HPLC ile tayin edilmiştir. Multi enzim içeren kriyojel kolonlardan CO₂ geçirilmeden önce kriyojel kolondan dönüşüm olması için 150 mgL^{-1} derişiminde NADH her döngü öncesinde geçirilmiş ve reaksiyon sonrası deiyonize suyla kolon yıkanarak rejenere edilmiştir.

2.2.7. Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz (RuBisCo) Enzimi ve Uygulamaları

2.2.7.1. Nano Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz (RuBisCo) Enzimi Sentezi ve Karakterizasyonu

Nano RuBisCo enzimi, mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğiyle ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Mikro emülsiyon polimerizasyon ortamı 0.5 g polivinil alkolün 45 mL deiyonize suda dispers edilmesiyle hazırlanmıştır. Diğer yandan, (MATyr)₂Ru(bipyr)₂, RuBisCo enzimiyle etkileştirilmiş ve ardından dispersiyon ortamına eklenmiştir. Polimerizasyonu başlatıcı olarak, APS'nin reaksiyon ortamına eklenmesiyle, azot ortamında, gün ışığında ve oda sıcaklığında mikroemülsiyon polimerizasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. 48 saat süren reaksiyonun ardından ortamda oluşan nano RuBisCo enzimleri 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenerak reaksiyon ortamından uzaklaştırılmış ve 3 defa deiyonize su ile yıkanmıştır.

Sentezlenen nano RuBisCo enzimlerinin karakterizasyonu TEM görüntüsünün alınması, zeta boyutanaliz ve floresans spektrumuyla yapılmıştır. Bunun için 2000 mgmL⁻¹ derişimindeki nano RuBisCo, 1:3 oranında deiyonize suyla seyreltilerek örnekler hazırlanmıştır. Çalışmada ayrıca ticari RuBisCo ve nano RuBisCo enzimleri CD spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Bu teknikle; RuBisCo enziminin nano enzim formatına getirildikten sonra sekonder yapısında değışim olup olmadığı belirlenmiştir.

2.2.7.2. RuBisCo Enziminin İspanaktan Ekstraksiyonu

RuBisCo enzimi, ıspanaktan izole edilmiştir. Bunun için kriyojel kolon sistemi RuBisCo enzimi izolasyonuna uygun olarak sentezlenmiştir. Bu amaçla; HEMA tabanlı kriyojelin gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağı kriyojeller hazırlanmış ve FPLC ile afinite kromatografisi temelli olarak izole edilmiştir. Ortamdan izole edilen RuBisCo enzimlerinin ticari RuBisCo ve nano

RuBisCo enzimleriyle birlikte SDS-PAGE elektroforeziyle analizi sonrası saflığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

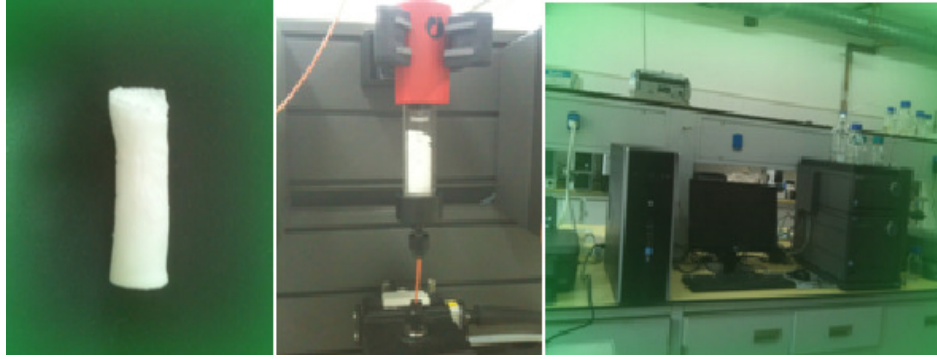
2.2.7.3. Ispanaktan Ekstraktın Hazırlanması

Ekstraksiyon işlemi için iyice öğütülmüş ıspanaktan 4 g kullanılmıştır. Öğütme çözeltisi olarak 0.33 M sorbitol, 10 mM sodyumpirosülfat, 4 mM $MgCl_2$ ve 2 mM askorbik asitten oluşan karışım kullanılmıştır. Hazırlanan 40 mL öğütme çözeltisi, 4 g öğütülmüş ıspanak üzerine eklenmiş ve bu karışım bir gün buz içerisinde bekletilmiştir. Çözelti bir gün bekledikten sonra süzölmüş ve elde edilen süzöntü 10 dakika 10000 devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak kloroplastlar elde edilmiştir. Bu işlemlerin hepsi soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Kloroplastların üzerine 0.035 M NaCl çözeltisi eklenerek resuspende edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen RuBisCo içeren süpernatant alınarak FPLC'ye enjeksiyon için -20 °C' de saklanmıştır.

2.2.7.4. Gözeneklerine Anti-RuBisCo Antibadi Çapraz Bağlı Kriyojel Sentezi ve Karakterizasyonu

Gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojel, dondurma-eritme yöntemiyle ANADOLUCA metodunda belirtilen fotoduyarlı karyopolimerizasyon tekniğine göre sentezlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle 260 µL HEMA'ya 740 µL su eklenmiş ve bu karışıma 2 mL suda 56.6 mg MBAAm çözülmesiyle hazırlanan çözelti ilave edilmiştir. Monomer HEMA ve çapraz bağlayıcı MBAAm' den oluşan çözelti 20 dakika karıştırıldıktan sonra üzerine 25 µL Rutenyumlu metal-şelat aminoasit monomer, $(MATyr)_2Ru(bipyr)_2$ ile etkileştirilen 2 mL, 2000 $mgmL^{-1}$ anti-RuBisCo antibadi eklenmiştir. 3 saat karıştırıldıktan sonra, APS ve TEMED polimerizasyonu başlatıcı çifti, reaksiyon ortamına eklenerek hazırlanan kriyojel çözeltisi FPLC kolonuna doldurulmuştur. 16 saat -18 °C'de bekletildikten sonra, 8 saat oda sıcaklığına alınmış ve elde edilen kriyojel deiyonize su ile 3 defa yıkanarak safsızlıkların yapıdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı

kriyojel FPLC’de ıspanaktan RuBisCo enzimi izolasyonu için kolon dolgu maddesi olarak kullanılmıştır. Şekil 2.7’de sentezlenen kriyojel kolon ve bu kriyojel kolonun FPLC’de kolon dolgu maddesi olarak entegrasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Kriyojel kolon ve FPLC cihazına entegrasyonu

Sentezlenen anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojelin karakterizasyonu, SEM görüntülerinin alınması, şişme testi, sıkıştırma testi ve BET analiziyle yapılmıştır.

2.2.7.5. FPLC Çalışmaları

Ekstraksiyon sonucu elde edilen çözelti FPLC ile analizlenerek, ekstraksiyon çözeltisinden RuBisCo enzimi ayrılmıştır. Analizde kolon dolgu maddesi olarak gözeneklerine anti- RuBisCo antibadi çapraz bağlı fotoduyarlı kriyojel kullanılmıştır. Çözücü sistemi olarak, kriyojel kolonla RuBisCo enziminin etkileşmesini sağlayacak çözelti olarak Tris-HCl kullanılmıştır. Bu çözelti sistemden geçirilerek kriyojel kolonda RuBisCo enziminin tutulmasını sağlamıştır. Ekstraksiyon çözeltisi içerisindeki RuBisCo enzimi haricindeki diğer türler kolondan ayrılmıştır. Diğer aşamada, kriyojel kolonda etkileşen RuBisCo enziminin kriyojel kolonla etkileşimini kırmak için 0.1 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Böylece kriyojel kolondan RuBisCo enzimi salınmıştır. Kolondan alınan RuBisCo enzimi liyofilizasyon ile çözücüsünden ayrılmıştır. FPLC ile izolasyonu yapılan RuBisCo enziminin saflığı SDS-PAGE analiziyle kontrol edilmiştir.

2.2.7.6. Ispanaktan İzole Edilen RuBisCo Enziminin Nano Yapıda Sentezi ve Karakterizasyonu

Ispanaktan izole edilen RuBisCo enziminin de nano yapıda sentezlenmesi için ANADOLUCA metodu kullanılmış ve Kısım 2.2.7.1’ de belirtilen aynı işlem basamakları ve kimyasallar kullanılmıştır.

Elde edilen nano izole RuBisCo enziminin karakterizasyonu TEM analizi, zeta boyut analiz ve floresans spektrumuyla yapılmıştır. Ayrıca protein içeriği Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Ticari ve nano RuBisCo enzimlerinin yanında nano izole RuBisCo enziminin de ikincil yapısındaki değişim olup olmadığı CD spektroskopisi ile incelenmiştir.

2.2.8. Nano RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri ve Enzimatik Aktiviteye Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi

2.2.8.1. Ticari, Nano, İzole Edilen ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri

RuBisCo enziminin aktivitesi, D-ribulaz-1,5 bifosfat ve CO₂ ile reaksiyonu sonunda oluşan 3-fosfogliseraldehit şekerinin 340 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon için, 12.5 mM D-ribulaz-1,5 bifosfat substrat çözeltisi, pH 8.2 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. Çözeltiye 0.4 mM EDTA ve 1 mM DTT eklenmiştir. Bu çözelti, 37 °C’ de 2 M MgCl₂ ile etkileştirilerek öncelikle substratın aktivasyonu yapılmıştır. Hazırlanan çözelti 4 eşit kısma ayrılarak birinci kısma ticari RuBisCo enzimi (1 mg), ikinci kısma nano RuBisCo enzimi, üçüncü kısma ıspanaktan izole edilen rubisco enzimi ve dördüncü kısma nano izole edilmiş RuBisCo enzimi eklenmiş ve her bir çözeltiden 8Ldak⁻¹ CO₂ gazı 10 dakika boyunca geçirilmiştir. Reaksiyonlar 37 °C’de gün ışığında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortamından alınan 80 µL örnekler mikropalakalara yerleştirilerek, 2 dakika boyunca 340 nm’de 3-fosfogliseraldehit oluşumu absorbans değişimiyle incelenmiştir.

RuBisCo enziminin aktivitesinin hesaplanmasında türetilen aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$U = \frac{\Delta A}{\epsilon \times 340 \times l} \times V \times \frac{10^6 \mu mol}{1 mol} \times \frac{1 L}{10^6 \mu l} \quad (2.3)$$

Bu denklemde U (μmoldak^{-1}) unit aktiviteyi, ΔA mutlak absorsiyonu, ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 340 nm'deki 3-fosfogliseraldehitin molar absorpsiyon katsayısını (6.22 mM^{-1}), V (μL) çözeltinin toplam hacmini ifade etmektedir.

Diğer bir yandan, hazırlanan RuBisCo enzimlerinin aktivitesi, RuBisCo enziminin D-ribulaz-1,5 bifosfat varlığında CO_2 ile etkileşimi sonucu 3-fosfogliseraldehit oluşumu ince tabaka sıvı kromatografisiyle (İTK) takip edilmiştir. Bu amaçla, reaksiyon ortamından alınan örnekler, İTK' da spotlanarak, % 60 (h/h) n-propanol, % 30 (h/h) derişik amonyal ve % 10 (h/h) distile su dan oluşan çözücü sisteminde yürütülmüştür. Ardından $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ görüntülemesi yapılarak reaksiyon sonucu oluşan 3-fosfogliseraldehit spotu görüntülenmiştir. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ görüntülemesi için, 5 mL % 60 (h/h) HClO_4 , 10 mL 0.1 N HCl ve 25 mL % 0.4 (k/h) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri karıştırılarak son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltide tekrar İTK uygulanmış ve spotların daha görünür hale gelmesi için 85°C 'de 7 dakika bekletilmiştir.

2.2.8.2. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Substrat Derişimi Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine substrat derişiminin etkisi iki yönlü olarak incelenmiştir.

İlk olarak sistemden geçirilen CO_2 miktarı sabit tutulup, farklı derişimdeki (1 – 3.25 mM) D-ribulaz-1,5 bifosfat substratıyla etkileşim sonucu aktivite incelenmiştir. Aktivite ölçümleri Eşitlik 2.3'te verilen eşitliğe göre hesaplanarak, substrat derişimine karşı grafiğe aktarılmıştır.

İkinci olarak, sistemdeki D-ribulaz-1,5 bifosfat substratının derişimi sabit tutulmuş, sistemden farklı derişimlerde (4–16 Ldak⁻¹ arasında değişen akış hızlarında CO₂ ile 200 mL saf su 3 dakika boyunca doyurularak hazırlanmıştır) CO₂ geçirilmiştir. Herbir derişime karşılık gelen enzim aktivite değerleri bulunarak, substrat derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu işlemler ticari, nano, izole edilen ve nano izole RuBisCo enzimleri için ayrı ayrı yapılmıştır.

2.2.8.3. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Mg²⁺ İyonu Derişimi Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine Mg²⁺ iyonunun etkisinin belirlenmesi için farklı derişimlerde (0.1–1.2 mM) MgCl₂ çözeltileri hazırlanarak, ilk önce D-ribulaz-1,5 bifosfat ile pH 7’de etkileştirilmiş ve RuBisCo enzimi reaksiyon ortamına eklenmiştir. CO₂’nin sistemden geçirilmesinden sonra ortamda oluşan 3-fosfogliseraldehitin absorbansı mikropkaka okuyucu ile takip edilerek her bir Mg²⁺ iyon derişimi için enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bu işlemler ticari, nano, izole ve nano izole edilen RuBisCo enzimleri için yapılmıştır.

2.2.8.4. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine pH Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine Mg²⁺ iyonunun etkisinin belirlenmesi için farklı pH’larda (5-10) tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir tampon çözeltiye öncelikli olarak D-ribulaz-1,5 bifosfat substratı ve MgCl₂ çözeltisi eklenmiştir. RuBisCo enzimi reaksiyon ortamına eklenerek sistemden CO₂ geçirilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan 3-fosfogliseraldehit absorbansı yine mikropkaka okuyucu ile takip edilerek her bir pH’taki enzimatik aktivite belirlenmiştir. Bu işlemler ticari, nano, izole ve nano edilen RuBisCo enzimleri için sırasıyla yapılmıştır.

2.2.8.5. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla, pH 7'de D-ribulaz-1,5 bifosfat substratı ve $MgCl_2$ çözeltisi etkileştirilerek bu çözeltinin sıcaklığı sırasıyla 23, 25, 35, 37, 40 ve 42 °C'ye getirilmiştir. Her bir sıcaklık noktasında, elde edilen çözeltiye RuBisCo enzimi eklenmiş ve sistemden CO_2 geçirilmiştir. Reaksiyon ortamında oluşan 3-fosfogliseraldehit absorbansının belirlenmesi sırasında mikropilaya sıcaklığı da çalışılan sıcaklığa getirilerek reaksiyon sıcaklığında değişim olmaması sağlanmıştır. Böylelikle, verilen her bir sıcaklık değeri için enzim aktivitesi değerleri belirlenmiştir. Sıcaklık taraması, ticari, nano, izole ve nano izole RuBisCo enzimleri için sırasıyla yapılmıştır.

2.2.8.6. Nano RuBisCo ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Tekrar Kullanılabilirliği

Sentezlenen nano RuBisCo ve nano izole RuBisCo enzimlerinin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi çalışmaları için, nano RuBisCo enzimleri her bir reaksiyon sonrasında ortamdan 10000 rpm devir ve 10 dakika santrifüj sonrasında ayrılarak deiyonize su ile 4 defa yıkanmıştır. Ardından, tekrar pH 7'de D-ribulaz-1,5 bifosfat substratı ve $MgCl_2$ çözeltisi ile etkileştirilerek CO_2 sistemden geçirilmiş ve enzimatik aktivite mikropilaya okuyucu ile 3-fosfogliseraldehitin oluşmasının takip edilmesiyle belirlenmiştir. Aynı nano enzimler tekrar tekrar enzimatik reaksiyonda kullanılarak her bir döngü için enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Bu işlemler hem nano RuBisCo hem de nano izole RuBisCo enzimi için ayrı ayrı yapılarak her iki nano enzimin de tekrar kullanılabilirliği belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Fotoduyarlı Çapraz Bağlayıcı Karakterizasyonu

3.1.1. N-metakriloil amino-(L)- tirozin (MATyr) Karakterizasyonu

Monomerin karakterizasyonuna ilişkin elde edilen ^1H NMR analizi sonucunda elde edilen pikler aşağıdaki gibidir:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ : 7.35 (d, $J = 8.05$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H), 6.29 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.15 (dd, $J = 4.49, 14.25$ Hz, 1H), 3.02 (dd, $J = 4.02, 14.12$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 7.75, 14.20$ Hz, 1H), 2.00 (s, 3H) ppm.

Monomerin ^1H NMR spektrumunda gözlenen kimyasal kayma değerlerinden 7.35 ve 7.05 ppm'de gözlenen piklerin tirozin halka protonlarına, 3.15 ve 3.02 ppm'deki piklerin terminal metilen ($-\text{CH}_2$) protonlarına ve 2 ppm'de gözlenen singlet pikin bu gruba komşu $-\text{CH}$ protonlarına ait olduğu söylenebilir.

3.1.2. Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr) $_2$ Rutenyum (II) Karakterizasyonu

Sentezlenen monomerin karakterizasyonuna ilişkin yapılan analizler sonucunda, erime noktası 125 -128 °C olarak bulunmuştur.

Elementel analiz verilerine göre; $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{ClN}_5\text{O}_4\text{Ru}$ kapalı formülüne sahip monomer, C % 56.75, H % 5.01, N % 10.23. Kapalı formülünden teorik olarak hesaplandığında C % 57.34, H % 4.67, N % 9.83 içeriğine sahiptir. Buna göre elementel analiz sonuçları birbiriyle uyumludur.

Kompleksin ^1H NMR spektrumunda ligandlara ait bazı spesifik pikler belirlenmiştir. Buna göre; 8.56 ppm'de gözlenen dublet pikin bipiridil (bipy) ligandına, 5,3 ppm'de gözlenen dublet pikin MAT grubunun terminal metilen ($-\text{CH}_2$) grubuna, 1.8'deki triplet pikin ise buna komşu $-\text{CH}$ protonlarına ait olduğu ve MAT grubunun tirozin halka protonlarının 7.18- 7.12'de gözlenen dublet pikler olduğu düşünülmektedir.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), ppm: 9.7 (d, 4H, ³J= 5.08 Hz), 8.56 (d, 4H, ³J= 7.92 Hz), 7.92 (t, 4H, ³J= 7.82 Hz), 7.3 (t, 1H, ³J= 7.4 Hz), 7.23 (t, 2H, ³J= 7.47 Hz), 7.18 (d, 2H, ³J=7.46 Hz), 7.12 (d, 4H, ³J= 6.30 Hz), 5.3 (d, 1H, ²J= 1.52Hz), 1.8 (t, 1H) şeklinde gelmiştir.

3.1.3. Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)(NADH) Rutenyum (II) Monomerinin Karakterizasyonu

NADH içeren C₅₅H₆₀N₁₂O₁₇P₂Ru kapalı formülüne sahip fotoduyarlı monomerin, karakterizasyonuna ilişkin elde edilen elementel analiz sonuçları; C % 47.58, H % 4.69 ve N % 13.31 şeklindedir. Teorik olarak bu değerler hesaplandığında, C % 49.89, H % 4.57 ve N % 12.69 elde edilmektedir. Dolayısıyla elde edilen veriler birbiriyle uyumludur.

Bileşiğin ¹H NMR spektrumunda 8.68 ppm'de gözlenen singlet pikin NADH ligandının adenin halkasına, 4.55, 3.92 ve 3.19 ppm'de gözlenen piklerin ise bu ligandın ribo ve nikotin amid aromatik halka gruplarına ait olduğu düşünülmektedir. Yine kompleks yapısındaki 8.57 ve 8.51 ppm civarında gözlenen dublet piklerin bipy ligandına, 5.42 ppm'deki dublet pikin ve 1.9 ppm'deki triplet pikin ise MAT ligandlarının protonlarına ait sinyaller olduğu düşünülmektedir.

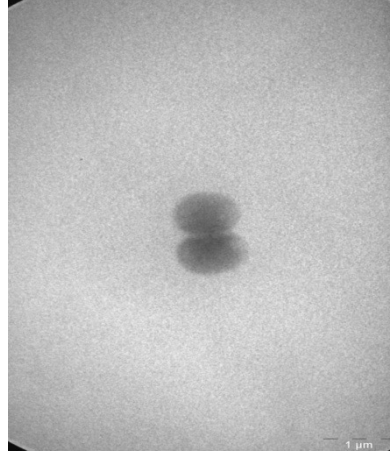
¹H NMR (500 MHz, d⁶ DMSO), ppm: 8.68 (s, 1H), 8.57 (d, 2H), 8.51 (d, 2H), 8.2 (s, 1H), 7.62 (t, 2H, ³J= 7.82 Hz), 7.14 (d, 2H), 6.89 (d, 2H), 6.59 (d, 2H), 5.42 (d, 2H), 4.55 (s, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.19 (d, 2H), 1.9 (t, 1H) şeklinde verilmektedir.

3.2. . Nano CA Enzimi

3.2.1. Nano CA Enzimi Karakterizasyonu

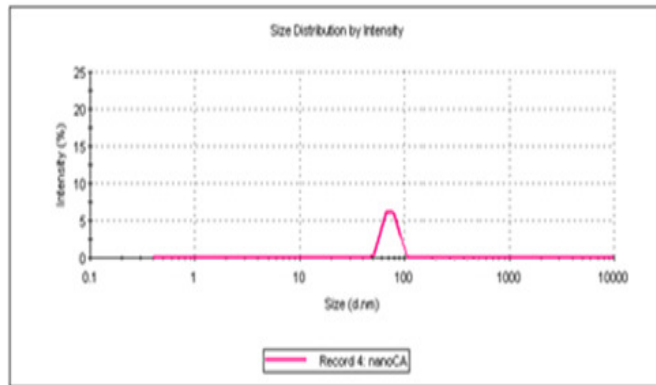
ANADOLUCA metoduna göre, mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğiyle sentezlenen Nano CA enziminin karakterizasyonu çalışmaları

öncelikli olarak nano enzimin boyutlarını belirlemek amaçlı olarak TEM görüntüsü alınmıştır. Şekil 3.1’de nano CA enziminin TEM görüntüsü görülmektedir. Buna göre, sentezlenen nano CA enziminin boyutları 93-95 nm aralığında görülmektedir.



Şekil 3.1. Nano CA enziminin TEM görüntüsü

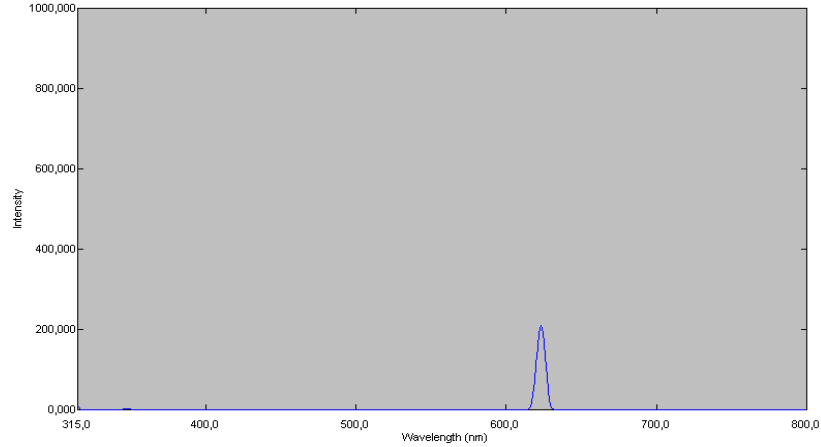
Boyut analizini desteklemesi amaçlı olarak zeta boyut analiziyle de nano CA enziminin boyutları belirlenmiştir. Şekil 3.2’de sentezlenen nano CA enzimlerine ait zeta boyut analizi grafiği verilmiştir. Analiz sonucunda, nano CA enziminin boyut dağılımı 93 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2. Nano CA enziminin zeta boyut dağılımı analizi

Nano CA sentez aşamasında, ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiş rutenyum tabanlı monomerlerin enzimle etkileşimi sonucunda, enzim yapılarında konjugasyonlar meydana getirilerek, nano enzimler tekrar kullanılabilir, kararlı ve floresans özelliği taşıyan yapıya ulaşmaktadır. Bu nedenle, nano enzim

yapısındaki floresans özelliğın değeriendirilmesi açısından, nano CA enziminin 100 µL'si 3 mL'de dispers edilmiş ve floresans spektrumu 310 nm'de uyarılarak alınmıştır. Şekil 3.3.'de Nano CA enziminin floresans spektrumu görölmektedir.

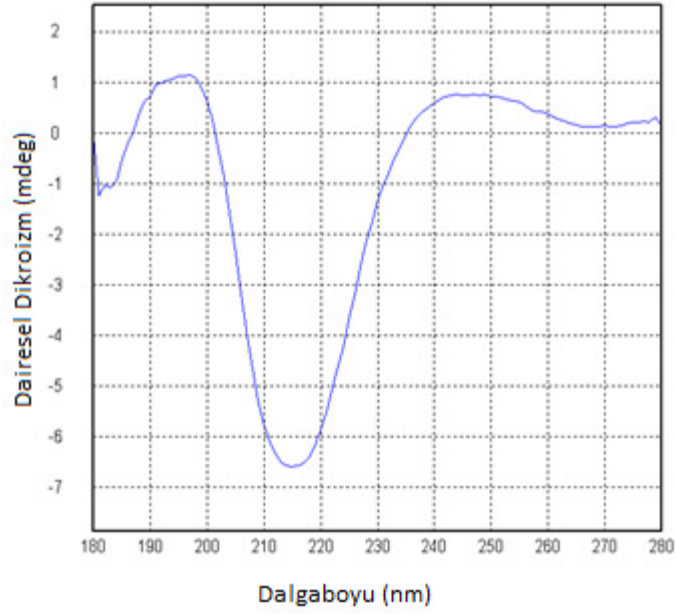


Şekil 3.3. Nano CA enziminin floresans spektrumu

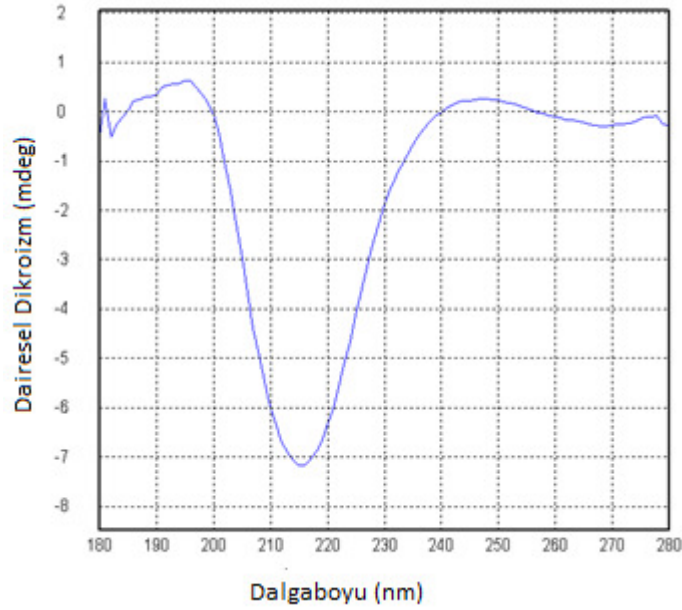
Buna göre, 310 nm'de uyarılan nano CA enziminin 625 nm de 210 a.u. şiddetinde pik gelmiştir. Bu da, nano CA partiküllerinin floresans özelliğini doğrulamaktadır. Nano CA enziminin floresans özelliği göstermesi, enzime floresans tabanlı farklı uygulamalarda kullanılabilirlik açısından yeni bir özellik kazandırmıştır.

CA enziminin karakterizasyon çalışmalarına ilişkin diğeri bir çalışma ise ticari CA enziminin ve nano CA enziminin CD spektrumlarının alınmasıdır. Böylelikle nano yapıdan önce ve sonraki enzim yapısındaki ikincil yapıdaki değışiklik kontrol edilmiş, enzim yapısında reaksiyonlar sonrasında bozunma olup olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 3.4'de ticari CA enzime, Şekil 3.5'te nano CA enzime ait CD spektrumları verilmiştir. CD spektrumları alınırken, ticari enzim ve nano enzim derişimleri 2000 mgmL⁻¹ olarak alınmış, cihazda monokromatöre 280 ile 180 nm dalga boyunda her 1 nm'de taramalar yapacak şekilde ayarlanmıştır. Monokromatörün slit aralığı da 0.5 nm'ye ayarlanmıştır.

(a)



(b)



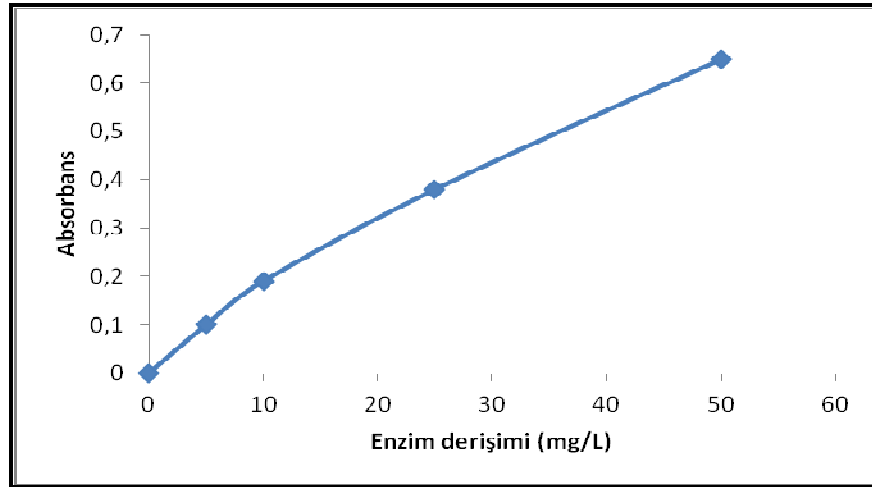
Şekil 3.4. a. Ticari CA enzimine ait CD spektrumu, b. Nano CA enzimine ait CD spektrumu

Şekil 3.4.a ve Şekil 3.4.b'deki spektrumlar değerlendirildiğinde, ticari CA enzimi için, 190-200 nm ve 210-230 nm arasında gelen pik CA enziminin ikincil yapısındaki α -helix katlanmalarını göstermektedir. Nano CA enziminin CD spektrumunda, 190-200 nm ve 210-230 nm arasında gelen pikler nano yapıda da α -helix katlanmasının bozunmadığını dolayısıyla enzimin nano yapıda da aktif

olduğunu göstermektedir. Ayrıca, nano CA enzimine ait CD spektrumunda 270-280 nm arasında gelen pik, nano enzim sentezi sırasında enzim yapısına konjuge edilen rutenyum tabanlı aminoasit monomerinden gelen aromatik grupları göstermektedir.

3.2.2. Nano CA Enziminin Protein Tayini

Nano CA enziminin protein içeriğinin tayininde Bradford reaktifiyle etkileştirilen farklı derişimlerdeki (5 - 50 mgL⁻¹) BSA çözeltilerinin 595 nm’de verdikleri absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.5). Nano CA enzimleri Bradford reaktifiyle etkileştirilerek elde edilen absorbans değerinin karşılık geldiği enzim derişimi nano CA enzim derişimi olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Protein miktarı tayini için oluşturulan kalibrasyon grafiği

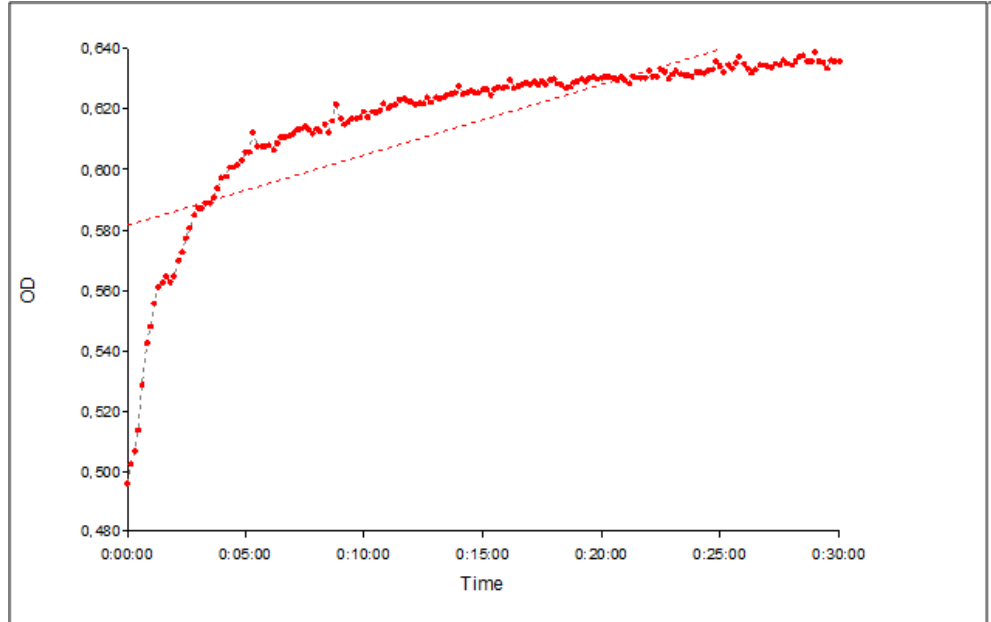
Oluşturulan kalibrasyon grafiğine göre sentezlenen nano CA enziminin en yüksek derişimi 2000 mgL^{-1} olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarda bu enzimden belirli miktarda alınıp deiyonize su ile seyreltme işlemi yapılmış ve istenilen derişimler bu kalibrasyon grafiği yardımıyla belirlenerek ticari enzimlerle nano enzimlerin derişimleri aynı olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3. Nano CA Enziminin Aktivite Tayini

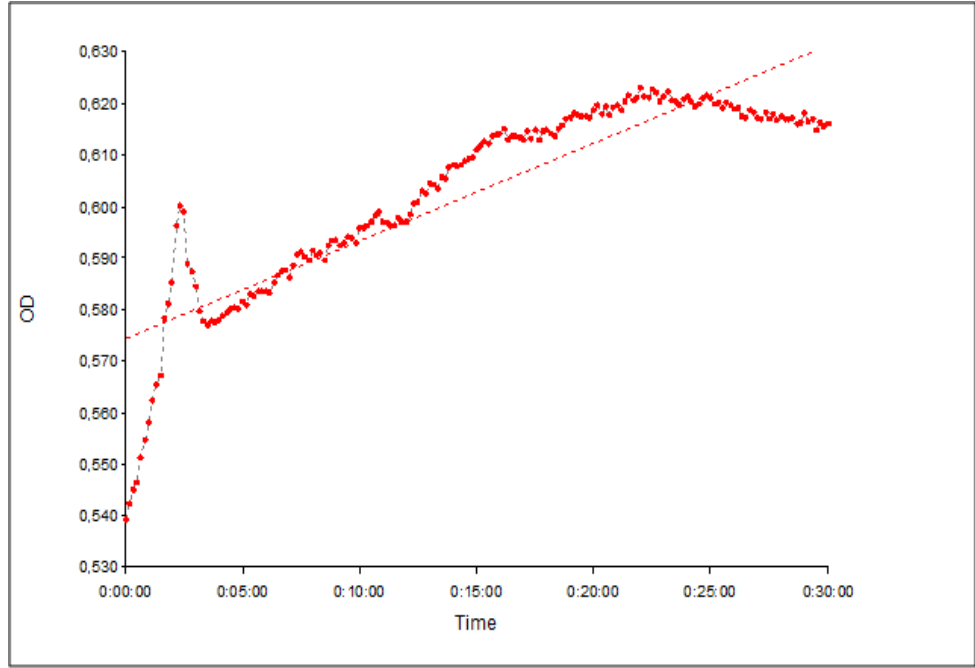
Sentezlenen nano CA enzim aktivitesi esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesi olmak üzere iki farklı metotla belirlenmiştir.

Esteraz aktivite belirleme yönteminde, CA enzimi varlığında 4-nitrofenil asetatın, 4-nitrofenilata dönüşümü 348 nm’de UV absorbansındaki değişimi 30 dakika boyunca incelenmiştir. Şekil 3.6.a.ve Şekil 3.6.b. ticari CA ve nano CA enzimlerinin mikropilaka okuyucu ile belirlenen esteraz aktivitesini göstermektedir.

(a)



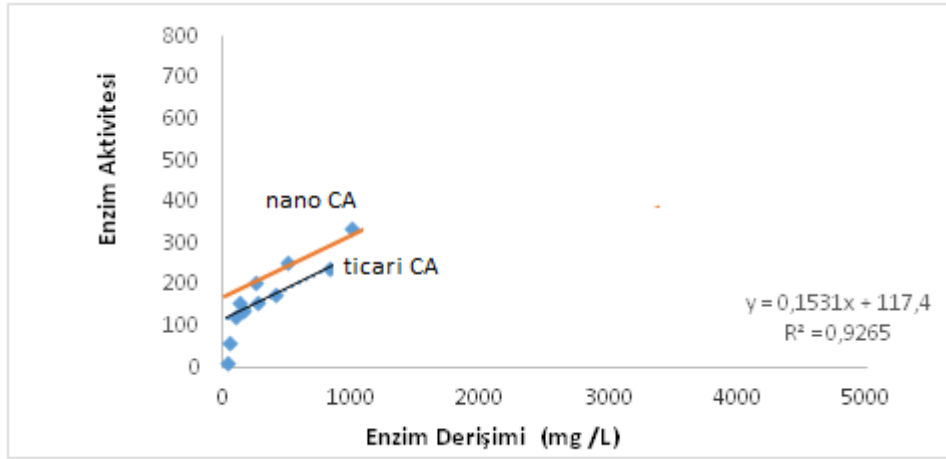
(b)



Şekil 3.6. a. Ticari CA enziminin enzimatik aktivitesi b. Nano CA enziminin enzimatik aktivitesi

Buna göre Eşitlik 2.1'e göre enzim aktivitesi hesaplandığında ticari CA enziminin bağıl aktivitesi % 22.92 U (μmoldak^{-1}) olarak, nano CA enziminin bağıl aktivitesi ise % 19.58 U (μmoldak^{-1}) olarak bulunmuştur.

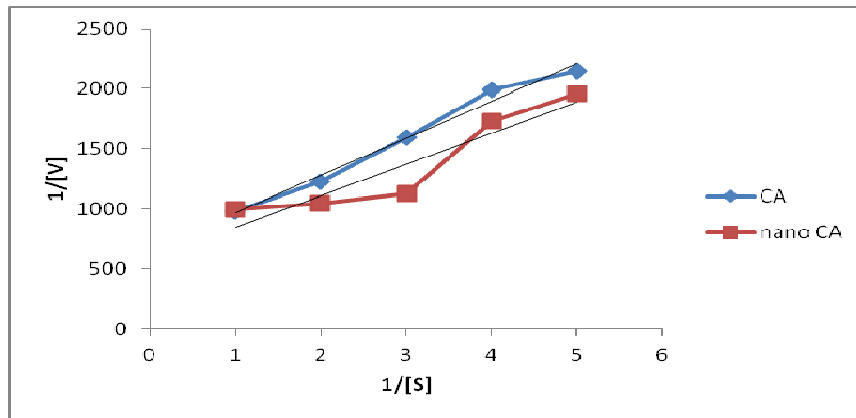
Hidrataz aktivite belirleme yöntemine göre, CA enzimi varlığında pH değişiminin 8.3'ten 6.3'e düşmesi gözlemlenmiştir. Şekil 3.7. ticari CA ve nano CA enzimlerinin hidrataz aktivitesini göstermektedir.



Şekil 3.7. Ticari CA ve nano CA enzimlerinin hidrataz aktivitesi

3.2.4. Nano CA Enzim Aktivitesine Substrat Derişimi Etkisi

Substrat derişiminin enzim aktivitesine etkisini incelemek için farklı derişimlerde (1.00; 1.33; 2.00; 2.67; 3.33 mM) 4-nitrofenilasetat çözeltisi hazırlanarak, pH 8.0’de oda sıcaklığında her bir substrat derişimi için hem nano CA hem de ticari CA enziminin aktivitesi belirlenmiştir. Şekil 3.8’de farklı substrat derişimlerine karşı mikropilaka okuyucuda belirlenen enzim aktiviteleri gösterilmektedir. Herbir değer Lineweaver-Burk grafiğine uygun olarak düzenlenerek ($1/S - 1/V$) enzimatik aktivite için K_m ve V_{max} değerleri hem ticari CA hem de nano CA için belirlenmiştir.



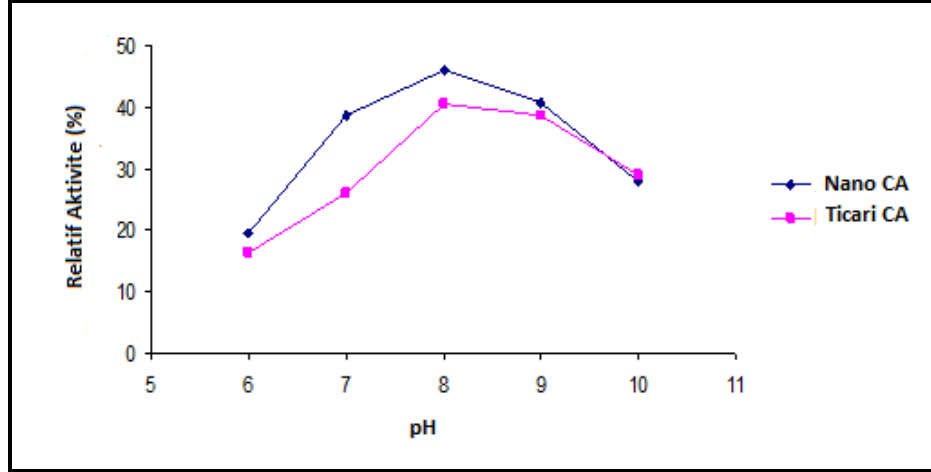
Şekil 3.8. Ticari CA ve nano CA enzimleri için Lineweaver-Burk Grafiği

Şekil 3.8’de verilen Lineweaver-Burk grafiğinden ticari CA enzimi için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, 0.471 mM ve 1.5×10^{-3} mMdk⁻¹ olarak bulunmuştur. Nano CA enzimi için ise, K_m değeri 0.442 mM ve V_{max} değeri ise 1.6×10^{-3} mMdk⁻¹ olarak bulunmuştur. Elde edilen verilere göre, CA ve nano CA enzimleri için elde edilen K_m ve V_{max} değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, bu değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Buradan hareketle, nano CA enzimlerinin de aynı derişimdeki ticari CA enzimi kadar enzimatik aktivite gösterdiği görülmektedir.

Elde edilen K_m ve V_{max} değerleri literatürle karşılaştırıldığında, benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir [128-130].

3.2.5. Nano CA Enzim Aktivitesine pH Etkisi

CA enzim aktivitesine pH’ın etkisini incelemek için pH 6 ve pH 10 arasında farklı tampon çözeltiler hazırlanarak esteraz aktivitesi belirleme yöntemiyle enzim aktiviteleri farklı pH’larda hem ticari CA hem de nano CA enzimi için belirlenmiştir. 0.1 mM 4-nitrofenil asetat, 0.01 mM ticari CA ve nano CA ile 35 °C’ de her bir pH profili için 3 dakika boyunca etkileştirilmiştir. Şekil 3.9’da enzim aktivitesinin farklı pH’lara göre değişimi verilmiştir. Buna göre ticari CA enzimi için optimum pH değeri 8.0 iken, nano CA enziminin pH 7 - 9 arasında da yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu görülmektedir.

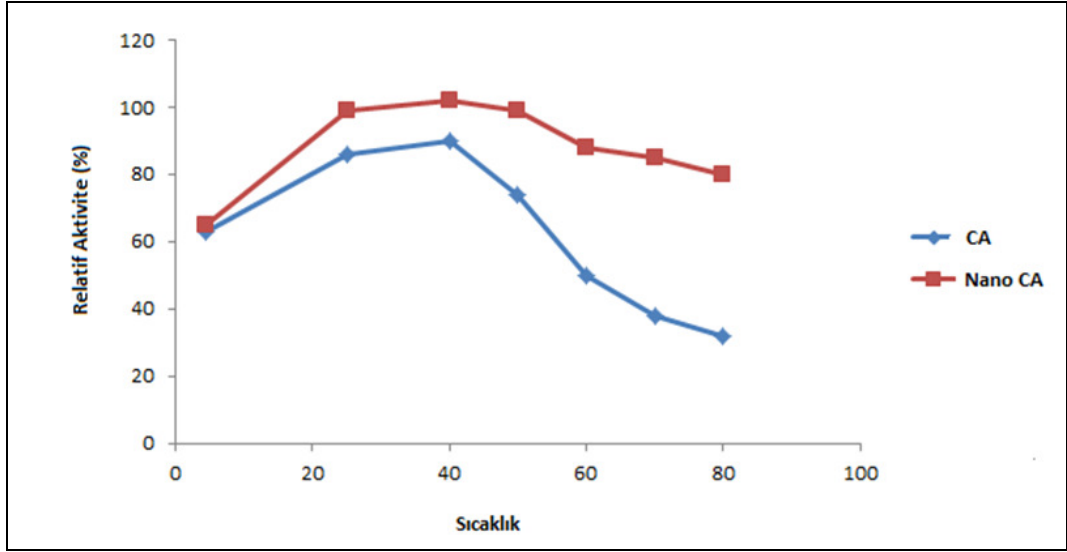


Şekil 3.9. pH'ın ticari CA ve nano CA enzim aktivitelerine etkisi

Sentezlenen nano CA enziminin geniş bir pH aralığında (pH 7-9) yüksek enzim aktivitesine sahip olması nano CA enziminin bir başka yönden kullanılabilirliğini bir adım daha öne çıkarmıştır. Enzimlerin çalışması için optimum pH gerekli iken, nano enzimin birkaç farklı pH'ta aktivite göstermesi nano enzimlerin kullanım alanını genişletmektedir.

3.2.6. Nano CA Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisini incelemek için, pH 8.0'de ve 0.5 mM 4-nitrofenilasetat substratı varlığında 5 ve 80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi hem nano CA hem de ticari CA için karşılaştırmalı olarak UV absorbanslarının 458 nm de ölçülmesiyle belirlenmiştir. Şekil 3.10'da nano CA ve ticari CA enzimleri için sıcaklıkla enzim aktivitesinin değişimi gösterilmiştir. Buna göre, optimum sıcaklık her iki enzim için 35-40 °C olarak belirlenmiştir. Nano CA enzimi için sıcaklık profiline bakıldığında, sıcaklık arttırıldıkça enzim aktivitesinde çok keskin düşüşler olmadığı, aktivitenin ticari CA enzime göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da sentezlenen nano CA enzimleri için geniş bir çalışma aralığına imkan vermektedir.

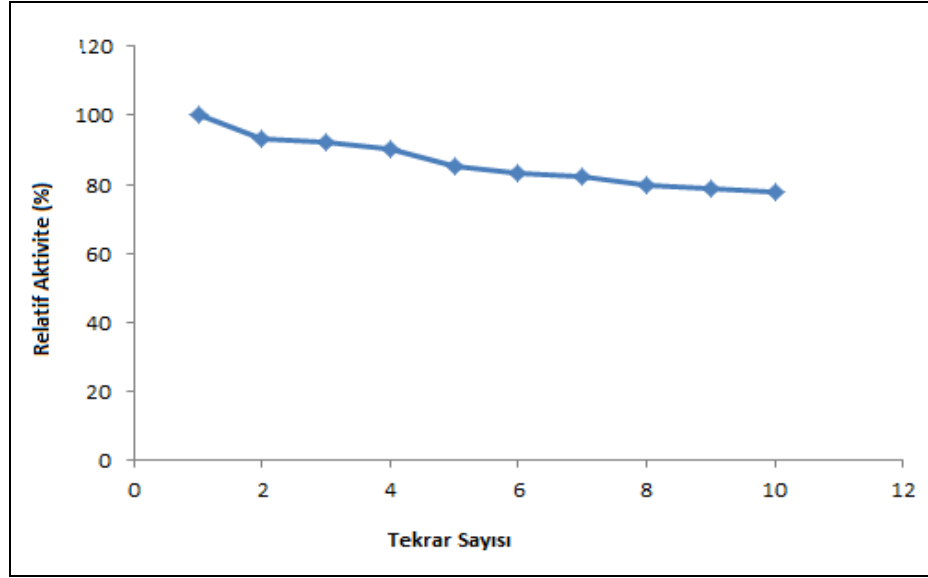


Şekil 3.10. Ticari CA ve nano CA enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Şekil 3.10’da verilen grafik değerlendirildiğinde, 50 °C’den sonra, ticari CA enziminin aktivitesi sıcaklık arttıkça azalmıştır. Çünkü belirli bir sıcaklığın üzerinde protein yapıları denatüre olmaya başlar, enzim yapısı bozulur. Ancak; nano CA enziminin halen enzimatik aktivite gösterdiği görülmektedir.

3.2.7. Nano CA Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği

Nano CA enzimlerinin esteraz aktivite belirleme yöntemine göre yeniden kullanılabilirliğinin tayini için, aynı nano enzim partikülleri ortamdan santrifüjle ayrılarak, diğer bir aktivite döngüsü içerisinde kullanılmıştır. Elde edilen veriler grafiğe aktarıldığında, Şekil 3.11’de görüldüğü gibi nano CA enzimleri pH 8.0 ve 35 °C’de 10 kez enzimatik aktivitede çok yüksek bir azalma olmadan tekrar tekrar kullanılabilir.



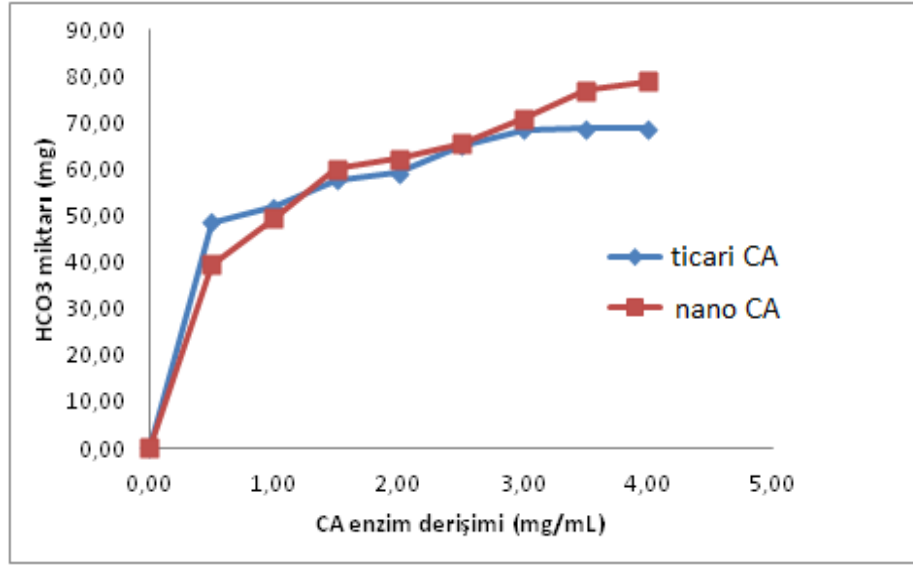
Şekil 3.11. Nano CA enzimlerinin tekrar kullanılabilirliği

Nano enzimlerin ilgili reaksiyonları sonucu ortamdan izole edilip tekrar aynı reaksiyon için tekrar tekrar kullanılabilirmeleri onları, yapıları ve kullanım alanları itibariyle ileri derecede organize olmuş sentetik enzim yapıları olarak karşımıza çıkarmaktadır.

3.3. Nano CA Enzimiyle CO₂' nin Bikarbonata Dönüşümünün İncelenmesi

3.3.1. Nano CA Enzim Derişiminin CO₂' nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi

CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonunda substrat (CO₂) derişimi sabit tutulup enzim derişimi arttırılarak, her bir reaksiyonda oluşan bikarbonat miktarı titrimetrik yöntemle tayin edilmiş ve elde edilen veriler grafiğe geçirilmiştir. Şekil 3.12'de verilen grafikte enzim derişimine bağlı olarak ortamda oluşan bikarbonat miktarı hem nano CA hem de ticari CA varlığında görülmektedir.

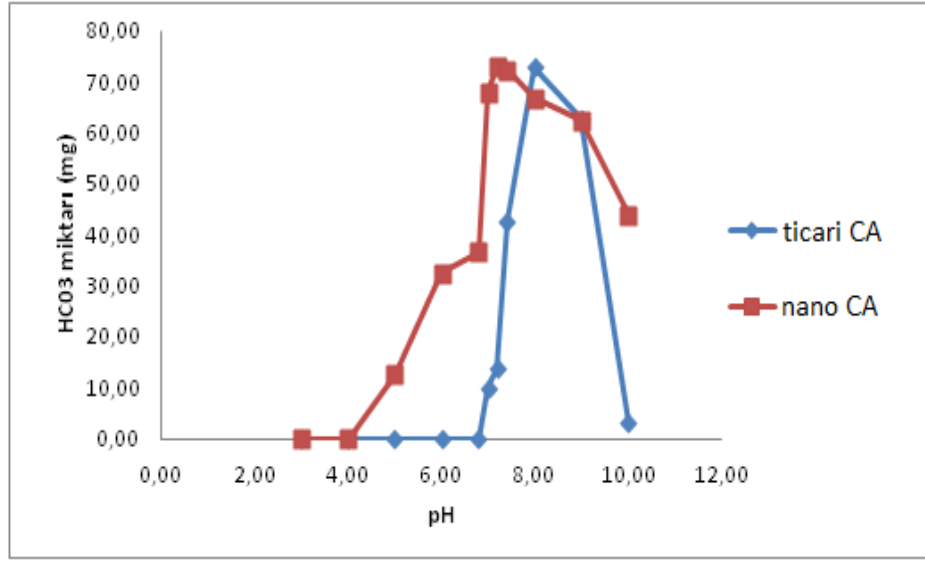


Şekil 3.12. CA enzim derişimlerinin CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonlarına etkisi

Ticari CA ve nano CA enzim derişimleri arttırıldığında reaksiyon ortamında oluşan bikarbonat miktarı da artmaktadır. Ancak, substratların tamamen enzimle doygunluğa ulaştıkları noktada, enzim derişimi artsa bile, ortamda oluşan bikarbonat miktarı sabit kalmaktadır.

3.3.2. pH'ın CO₂'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi

CO₂'nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonunda, pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı tampon çözeltilerde dönüşüm reaksiyonu incelenmiştir. Nano CA ve ticari CA varlığında, ortamda oluşan bikarbonat miktarı titrimetrik yöntemle tayin edilerek elde edilen veriler, Şekil 3.13'de verilen grafiğe aktarılmıştır.

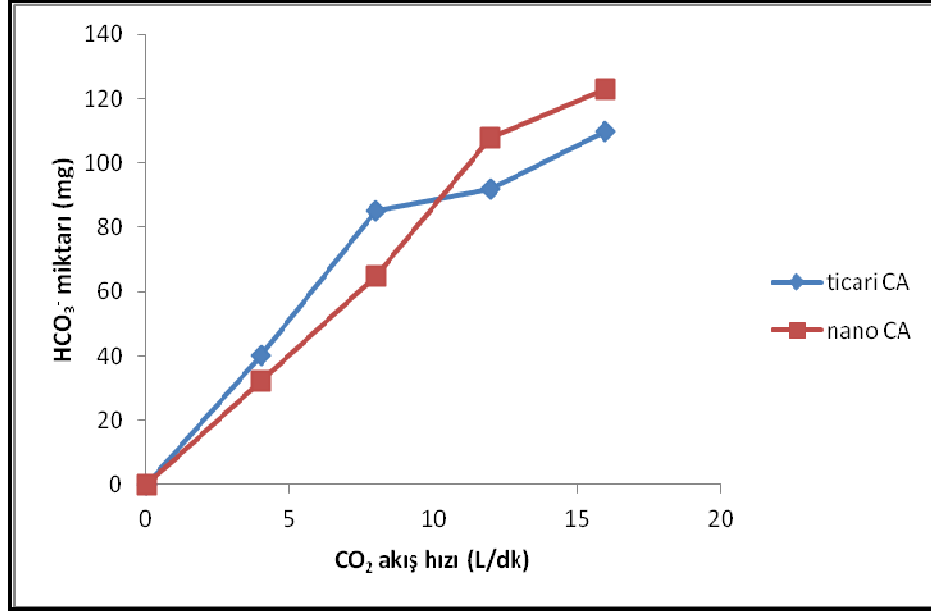


Şekil 3.13. pH' ın CO₂' nin bikarbonata dönüşümüne etkisi

Buna göre, aynı derişimlerde ticari CA ve nano CA enzimleri kullanıldığında, ticari CA enzimi sadece pH 7.5-9 aralığında maksimum enzimatik aktivite gösterirken, nano CA enziminin hem asidik hem de bazik pH' larda geniş bir skalada enzim aktif olduğu görülmektedir. Bu özelliğiyle nano CA enzimi farklı koşullarda aktivite göstererek ticari CA enzime göre üstünlük sağlamış bulunmaktadır. Grafik değerlendirildiğinde, ticari CA enzimi için optimum pH, 8 olarak bulunmuş ve bu pH değerinde, 72.90 mg bikarbonat elde edildiği, nano CA enzimi için optimum pH değeri 7.20 bulunmuş ve bu pH' ta elde edilen bikarbonat miktarı 72.82 mg olduğu görülmektedir.

3.3.3. CO₂ Akış Hızının CO₂' nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonuna Etkisi

Nano CA ve ticari CA enzimleri miktarı sabit tutularak (3 mgmL⁻¹), pH 8' de reaksiyon ortamından farklı akış hızlarında CO₂ geçirilerek, CO₂ derişiminin bikarbonat oluşumuna etkisi incelenmiş ve elde edilen veriler, Şekil 3.14' de verilen grafiğe geçirilmiştir.

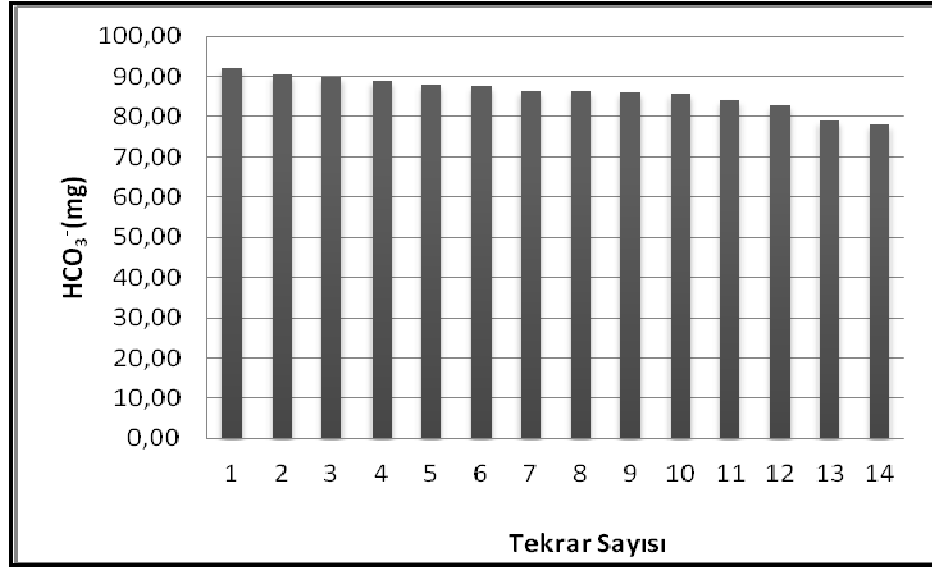


Şekil 3.14. CO₂ Akış hızının bikarbonat oluşumuna etkisi

Buna göre, reaksiyon ortamından geçirilen CO₂ miktarı arttıkça, ortamda oluşan bikarbonat miktarı da artmıştır.

3.3.4. Nano CA Enziminin CO₂'nin Bikarbonata Dönüşüm Reaksiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği

Reaksiyonda kullanılan aynı nano CA enzimlerinin ortamdan santrifüjle ayrılarak bir sonraki döngüde kullanılmasıyla her bir döngüde ortamda oluşan bikarbonat miktarı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 3.15 aynı nano CA enzimlerinin CO₂'nin bikarbonata dönüştürülmesi reaksiyonunda 14 kez kullanıldığında aktivitelerinde önemli bir değişiklik olmadan tekrar tekrar kullanılabilirliğini göstermektedir. Serbest CA enziminin enzimatik reaksiyonda sadece bir kez kullanılmasına karşılık, nano CA enziminin tekrar tekrar kullanılabilir olması maliyet açısından da üstünlük sağlamaktadır.

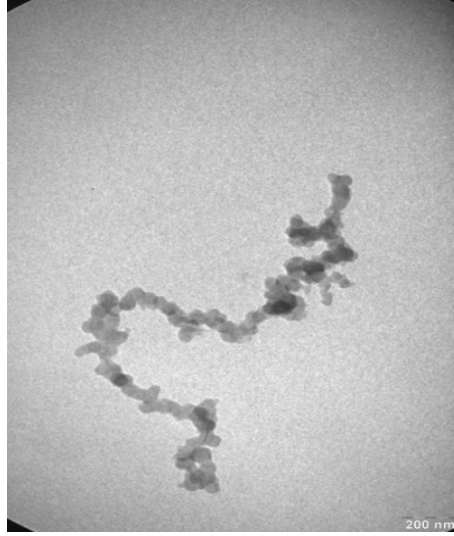


Şekil 3.15. Nano CA enziminin tekrar kullanılabilirliği

3.4. Multi Nano Enzim Sistemi

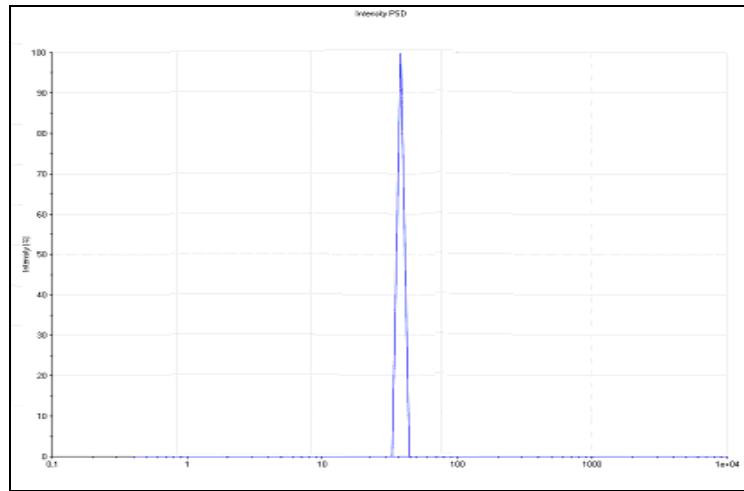
3.4.1. Nano [FateDH, FaldDH, ADH] Enzim Sisteminin Karakterizasyonu

ANADOLUCA metoduna göre mikroemülsiyon tekniğiyle sentezlenen üçlü nano [FateDH, FaldDH, ADH] enzim sisteminin karakterizasyonuna yönelik çalışmalarda öncelikli olarak nano enzim yapısının boyut ve şekil olarak incelemek amaçlı TEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.16’da multi nano enzim sisteminin TEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.16. Multi nano enzim sisteminin TEM görüntüsü

TEM görüntüsü incelendiğinde, sentezlenen multi nano enzim sistemi için partikül boyutlarının 63-65 nm aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu veriyi desteklemek için, multi nano enzim sisteminin boyut dağılımı zeta boyut analiziyle de belirlenmiştir. Şekil 3.17’de zeta boyut analizi sonrasında, nanopartiküllerin ortalama boyutunu gösteren grafik verilmiştir.

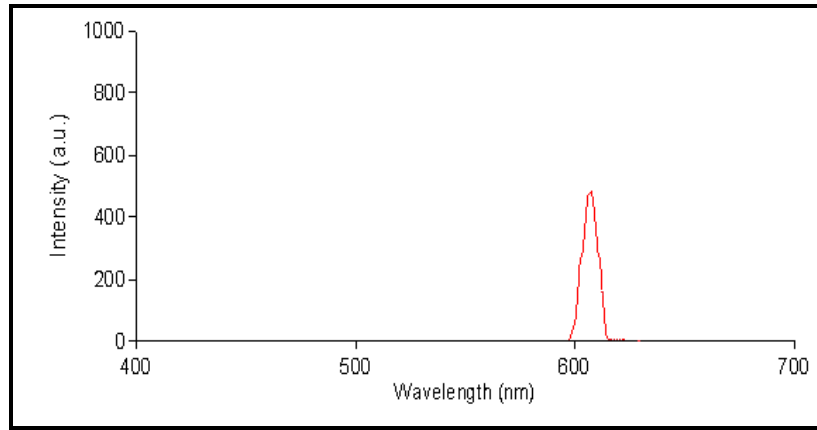


Şekil 3.17. Multi nano enzim sistemi zeta boyut analizi

Zeta boyut analizi verilerine göre sentezlenen multi nano enzim sisteminin ortalama boyut dağılımı 65 nm olarak bulunmuştur. Bu da TEM analizi ve zeta boyut analizinin birbirini desteklediğini göstermektedir.

Multi nano enzimi sentezi sırasında, ANADOLUCA konsepti gereği, enzim sistemlerinin daha kararlı ve dayanıklı yapılara sahip olması amacıyla

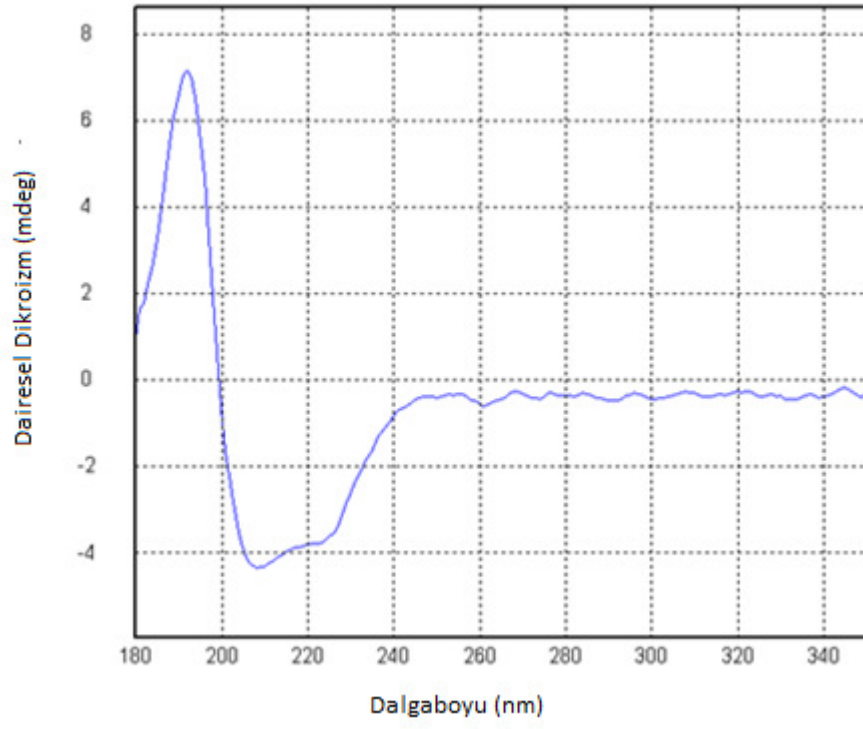
reaksiyon ortamına rutenyum tabanlı aminoasit monomer eklenmektedir. Bu monomerlerin enzim yapılarına katılmasıyla enzimlere aynı zamanda floresans özellik de katmaktadır. Sentezlenen nano multi enzim sisteminin floresans özelliğinin belirlenmesi amacıyla 310 nm’de uyarılarak floresans spektrumu alınmıştır. Şekil 3.18’de görülen floresans spektrumuna göre, 627 nm’de 510 a.u. olarak gelen pik nanopartiküllerin floresans özelliğinin olduğunu kanıtlamaktadır.



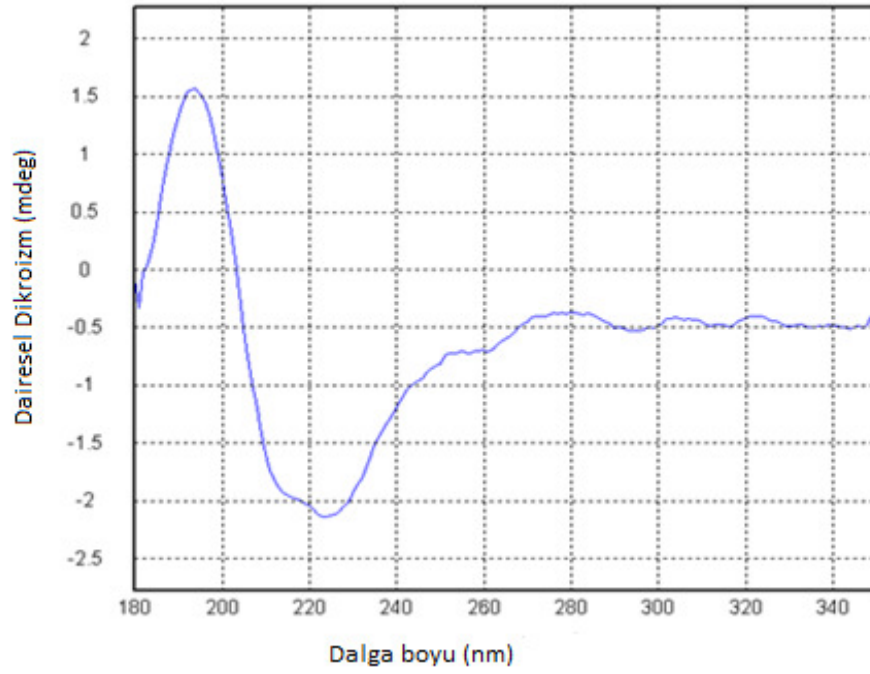
Şekil 3.18. Multi nano enzim sisteminin floresans spektrumu

Her bir enzimin nano yapıda üçlü multi nano enzim sistemi oluşturmadan önceki yapılarının CD spektrumları alınarak, nano yapı sentezinden sonraki CD spektrumlarıyla karşılaştırılmış ve multi nano enzim sentezi sırasında enzimlerin içeriğindeki protein yapılarındaki ikincil yapıdaki deformasyon olup olmadığı aydınlatılmıştır. Şekil 3.19.a ADH enzimine, Şekil 3.19.b. FateDH enzimine, Şekil 3.19.c. FaldDH enzimine ve Şekil 3.19.d. multi nano enzim sistemine ait CD spektrumlarını göstermektedir.

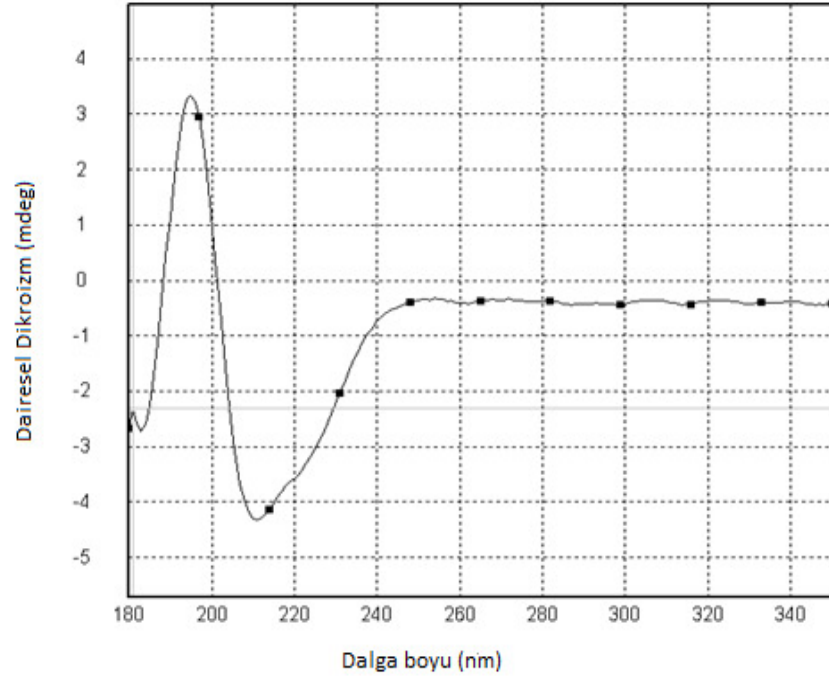
(a)



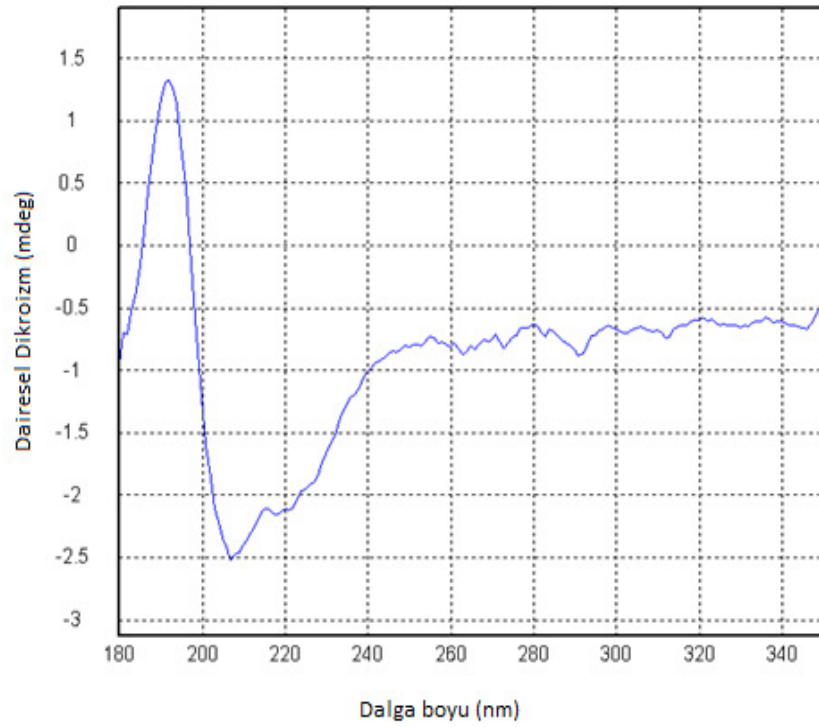
(b)



(c)



(d)



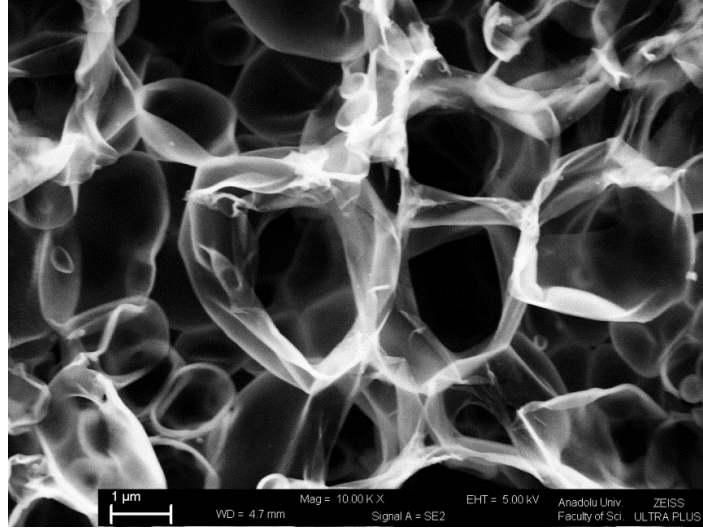
Şekil 3.19. a. ADH enziminin CD spektrumu b. FateDH enziminin CD spektrumu c. FaldDH enziminin CD spektrumu d. Multi nano enzim sisteminin CD spektrumu

Şekil 3.19. a, b ve c' de verilen CD spektrumları incelendiğinde 190-220 nm arasında gelen pik enzimlerin yapısındaki protein katlanmalarındaki α heliks sarmalını ifade etmektedir. Bu spektrumlarda gelen değerlendirmeye alınabilecek en belirgin pik budur. Şekil 3.19.d' de verilen multi nano enzim sistemine ait CD spektrumu değerlendirildiğinde, yine 190-220 nm arasında proteinlerin α heliks yapısını korunduğunu göstermektedir. Bunun yanında, 300-340 nm arasında gelen küçük pikler nano enzim yapısındaki aromatik grupları ifade etmektedir. Bunun da nano enzim sentezi sırasında yapıya katılan rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerden geldiği düşünülmektedir.

3.5. Kriyojel Kolon Karakterizasyonu

3.5.1. HEMA Kriyojeli Karakterizasyonu

Karyopolimerizasyon tekniğine göre sentezlenen HEMA kriyojellerinin gözenek dağılımı ve yüzey morfolojisinin analizi için SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.20). Buna göre, kriyojelin birbirine bağlantılı büyük gözeneklerden oluştuğu görülmektedir. Böyle bir yapı da gözeneklerin modifikasyonuna uygun ve kolon dolgu maddesi olarak kullanıldığında, bileşenlerin geçişine izin veren bir yapıyı oluşturmaktadır.



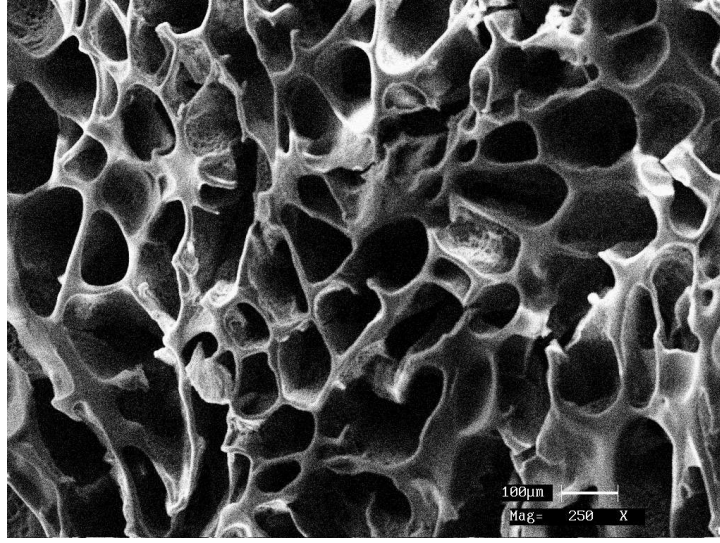
Şekil 3.20. HEMA kriyojeli SEM görüntüsü

Kriyojeller oldukça hidrofilik yapıda olduğu için, sentezlenen kriyojellerin su tutma kapasiteleri ve kuru kriyojel suyun içine atıldığında elde edilen şişme kapasiteleri, kriyojel karakterizasyonu için önemlidir. Buna göre, sentezlenen HEMA kriyojelinin su tutma kapasitesi, g polimer başına 2.06 g su olarak, şişme kapasitesi ise % 312 olarak bulunmuştur. Bu değerler, HEMA kriyojelinin hidrofilik yapısını desteklemektedir.

Kriyojellerin yüzey alanı ise, gözeneklerine azot adsorpsiyonuna dayalı BET metoduna göre hesaplanmıştır. Buna göre HEMA kriyojelinin yüzey alanı $978 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

3.5.2. Bis(2-2'-Bipiridil)(MATyr)(NADH)-Ru (II) /[FateDH, FaldDH AddH] Enzimleri Kompleksi Çapraz Bağlı Fotoduyarlı Kriyojel Kolon Karakterizasyonu

Foto duyarlı kriyojel kolonun karakterizasyonu için gözenek boyutu ve dağılımı analizi için öncelikli olarak SEM görüntüsü alınmıştır. Şekil 3.21'de foto duyarlı kriyojel kolonun SEM görüntüsü verilmiştir. Buna göre, sentezlenen kriyojellerin, morfolojik olarak birbirine bağlı büyük gözeneklerden oluşan polimerik ağ şeklinde olduğu görülmektedir.



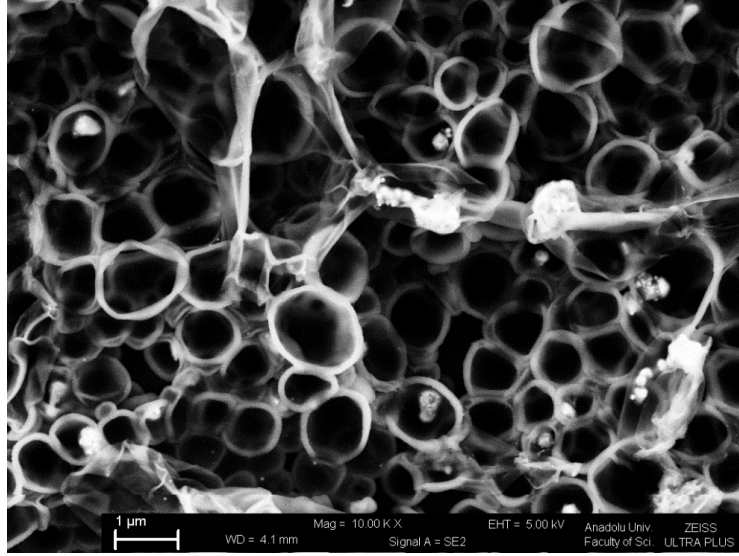
Şekil 3.21. Foto duyarlı kriyojel kolon SEM görüntüsü

Diğer bir karakterizasyon işlemi olarak foto duyarlı kriyojele şişme ve sıkıştırma testleri uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre, kriyojelin g polimer başına 5.02 g su olarak su tutma kapasitesine sahip olduğu ve % 412 şişme kapasitesinin olduğu bulunmuştur. HEMA kriyojeliyle kıyaslandığında, foto duyarlı kriyojellerin daha hidrofilik yapıda olduğu ve bunun da gözeneklerine çapraz bağlanmış enzimatik yapılardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

BET analizi sonucunda, foto duyarlı kriyojellerin yüzey alanı $969 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu değer de HEMA kriyojeliyle yaklaşık değerdedir.

3.5.3. Multi Nano Enzim (FateDH, FaldDH, ADH) İçeren Kriyojel Kolon Karakterizasyonu

Gözeneklerine multi nano enzim çapraz bağlanmış kriyojel kolonun yüzey morfolojisi analizi için SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.22’de verilen SEM görüntüsüne göre, kriyojelin birbirine bağlantılı büyük gözeneklerden oluştuğu görülmektedir. Ayrıca SEM görüntüsünde, gözeneklere bağlanmış olarak görülen μm büyüklüğündeki noktacıklar agreve olmuş nano multi enzimleri göstermektedir.



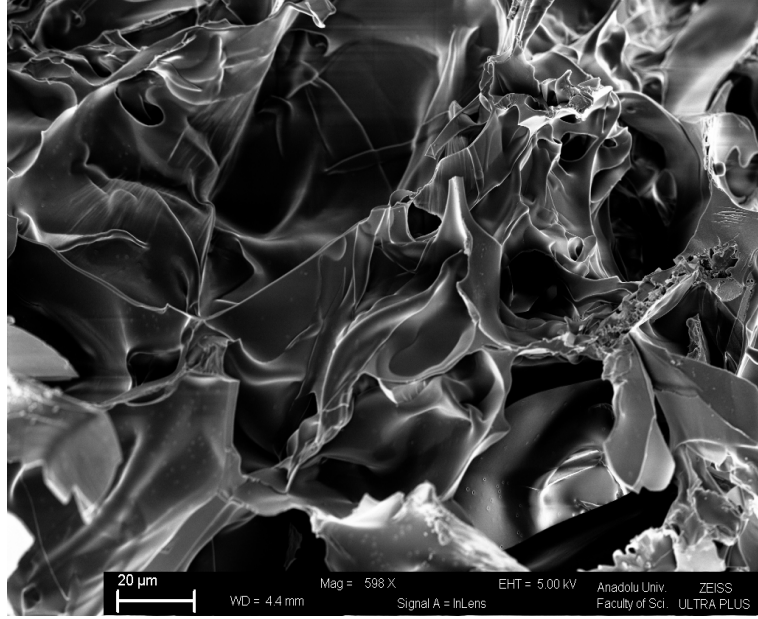
Şekil 3.22. Multi nano enzim içeren kriyojellerin SEM görüntüsü

Multi nano enzim içeren kriyojellerin hidrofilik özelliklerini ortaya koymak için yapılan şişme ve sıkıştırma testleri sonucunda, şişme kapasitesinin % 547 ve g polimer başına 9.02 g su tutma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu değerlerin HEMA kriyojeli ve fotoduyarlı kriyojele göre daha yüksek çıkması beklenen bir durumdur. Çünkü, multi nano enzim sistemlerinin kriyojel gözeneklerine çapraz bağlanmasıyla HEMA kriyojelinin hidrofilikliği artmıştır.

BET analizi sonucunda da kriyojellerin yüzey alanı, $1040 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kriyojel gözeneklerine multi nano enzim çapraz bağlanmasının yüzey alanını arttırdığı görülmüştür.

3.5.4. Multi Enzim İçeren (FateDH, FaldDH, ADH) Kriyojel Kolon Sentezi ve Karakterizasyonu

Multi enzim içeren kriyojellerin yüzey morfolojisi ve gözenekliliği analizi için SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.23’de verilen SEM görüntüsü, multi enzim içeren kriyojellerin birbirine bağlantılı geniş gözeneklerden oluşan polimerik bir yapı olduğunu desteklemektedir.



Şekil 3.23. Multi enzim içeren kriyojellerin SEM görüntüsü

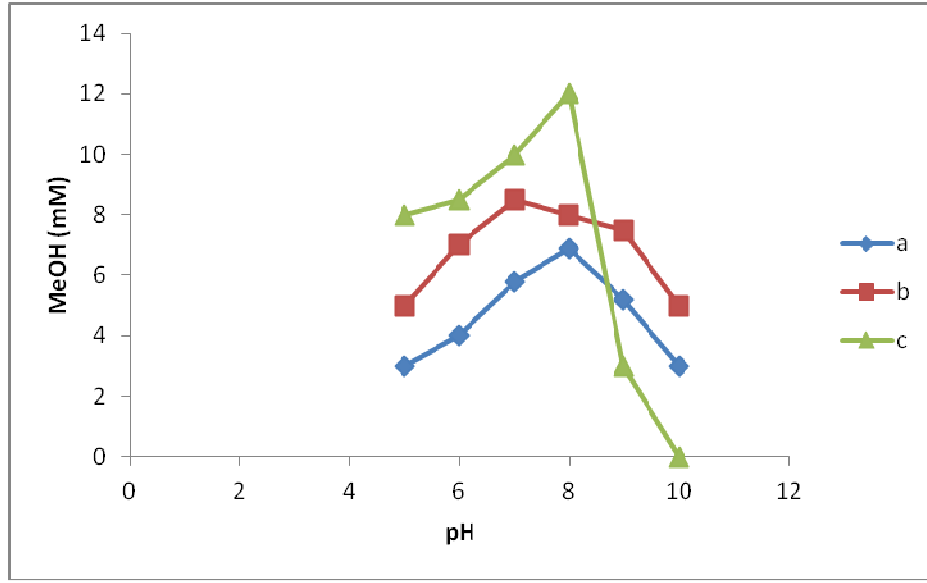
Sentezlenen multi enzim içeren kriyojellerin şişme testi ve sıkıştırma testi ile su tutma kapasiteleri belirlenmiştir. Buna göre kriyojeller g polimer başına 3.49 g su tutmakta ve % 326 şişme kapasitesine sahiptir. Bu sonuçlar HEMA kriyojeliyle yakınlık göstermektedir.

BET analizi sonuçlarına göre, sentezlenen kriyojelin yüzey alanı $926 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yine, BET analizi sonucunun da HEMA kriyojeli ile yakınlık göstermektedir.

3.6. Kriyojel Kolonlarla CO₂'nin Metanole Dönüşümü

3.6.1. Kriyojel Kolonlarla CO₂'nin Metanole Dönüşümüne pH Etkisi

Foto duyarlı kriyojel kolonlar, nano multi enzim içeren kriyojel kolonlar ve multi enzim içeren kriyojel kolonların her biriyle aynı koşullarda CO₂ geçirilerek, CO₂'nin metanole dönüşümü ve buna bağlı parametrelerden pH etkisi incelenmiştir. Herbir kolonla her bir pH değerinde elde edilen metanol miktarı HPLC ile belirlenerek elde edilen veriler grafiğe aktarılmıştır. Şekil 3.24'de kolonlarda CO₂'nin metanole dönüşümünde pH etkisi gösterilmiştir.



Şekil 3.24. Kriyojel kolonlarda CO₂'nin metanole dönüşümüne pH etkisi a. Foto duyarlı kriyojel kolon b. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon c. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon

Şekil 3.24'de verilen grafiğe göre foto duyarlı kriyojel kolon kullanıldığında, pH 6.5 ile 8.5 arasında yüksek miktarda metanole dönüşüm olduğu görülmektedir. Bu sistemde, NADH elektron donörü dışarıdan kolona verilmemektedir. Multi enzim sistemine rutenyumlu çapraz bağlayıcı ile bağlanmıştır. Sistemde, geniş pH aralığında dönüşümün olması ve dışarıdan ekstra elektron sağlayıcısına ihtiyaç olmaması bu kriyojel kolonları avantajlı hale getirmektedir.

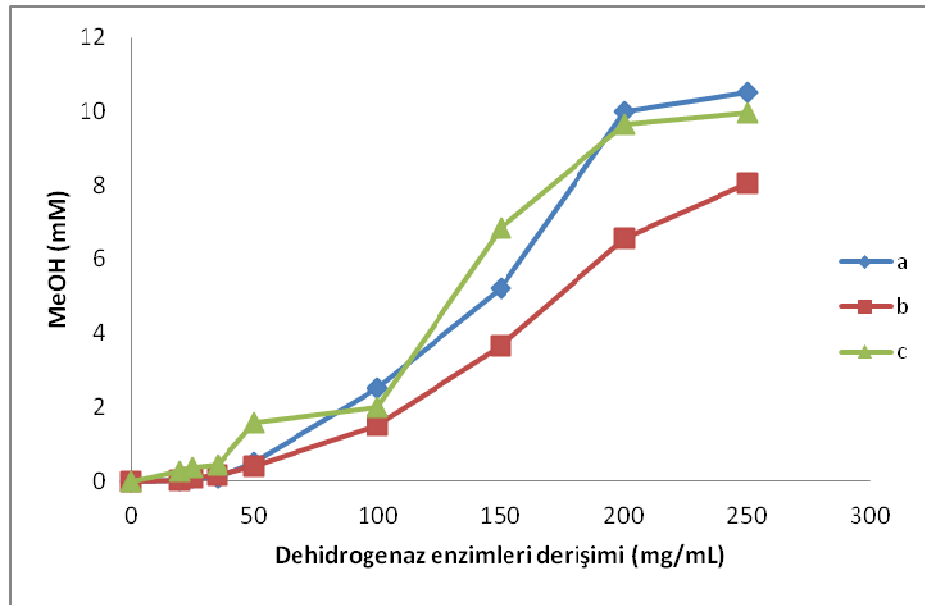
Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolonlarda CO₂'nin metanole dönüşümüne bakıldığında, pH 7 ile 9 arasında hala yüksek miktarda metanol eldesi olduğu görülmektedir. Bu sistemde elektron donörü olan NADH, rutenyumlu kompleksle nano enzim yapısına katılmış ve sistemde dışarıdan herhangi bir elektron donörü alış verişi gerek kalmamıştır. Nano enzimlerin geniş bir pH aralığında aktivitelerini devam ettirme özelliği, bu sistemde de kendini göstermekle birlikte, dışarıdan ekstra bir elektron sağlayıcısına ihtiyaç kalmaması da sistemin diğer bir üstünlüğüdür.

Multi enzim içeren kriyojel kolonla dönüşüm incelendiğinde, kriyojel kolonla maksimum miktarda metanol dönüşümü pH 8'de olduğu görülmektedir. pH değeri arttıkça dönüşüm hızla azalarak pH 9.5-10 civarında hemen hemen hiç

dönüşüm olmamaktadır. Bu sistemde, NADH elektron donörü sisteme sürekli dışarıdan verilmektedir.

3.6.2. Kriyojel Kolonlarla CO₂'nin Metanole Dönüşümüne Enzim Derişiminin Etkisi

CO₂'nin metanole dönüşümü reaksiyonlarında kriyojel kolondaki enzim derişiminin metanole dönüşüm üzerine etkisi her üç kriyojel kolon için incelenmiş ve elde edilen veriler Şekil 3.25'de verilen grafiğe aktarılmıştır.

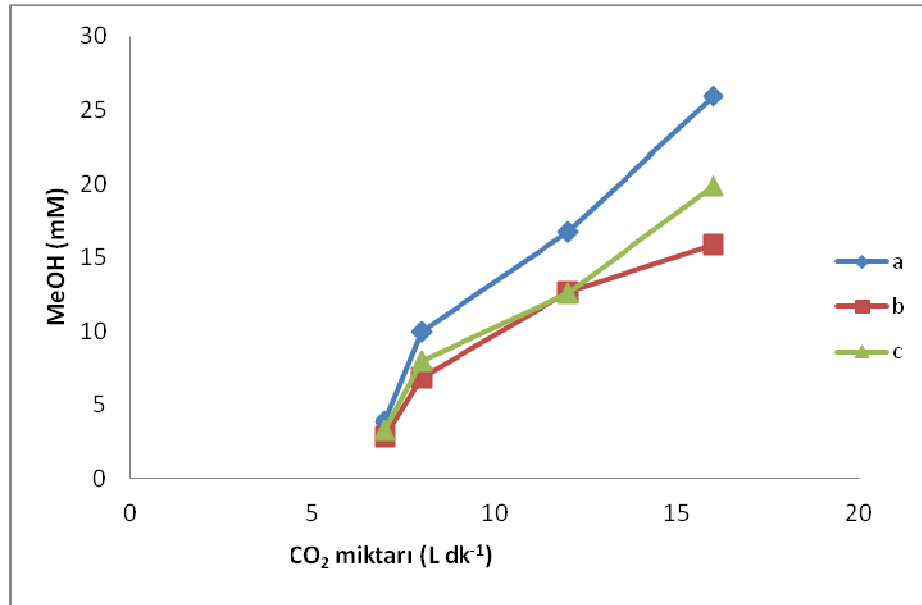


Şekil 3.25. Kriyojel kolonlarda CO₂'nin metanole dönüşümüne enzim derişimi etkisi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon

Şekil 3.25'te verilen grafiğe göre, her üç sistemde de enzim derişimi arttırıldıkça elde edilen metanol miktarının da arttığı görülmüştür. Ancak; grafikte plato bölgelerinde enzimle CO₂ tamamen doygun hale geldiği için, daha fazla dönüşüm sağlanamamaktadır.

3.6.3. Kriyojel Kolonlarla CO₂' nin Metanole Dönüşümüne CO₂ Miktarının Etkisi

Sentezlenen kriyojel kolonlarda enzim derişimleri ve pH sabit tutulup, her üç kolondan da farklı miktarlarda CO₂ geçirilmiştir. Böylelikle CO₂ miktarının CO₂'nin metanole dönüşümü reaksiyonları üzerine etkisi incelenmiştir Elde edilen veriler grafiğe aktarılarak, Şekil 3.26'da verilen grafik oluşturulmuştur.



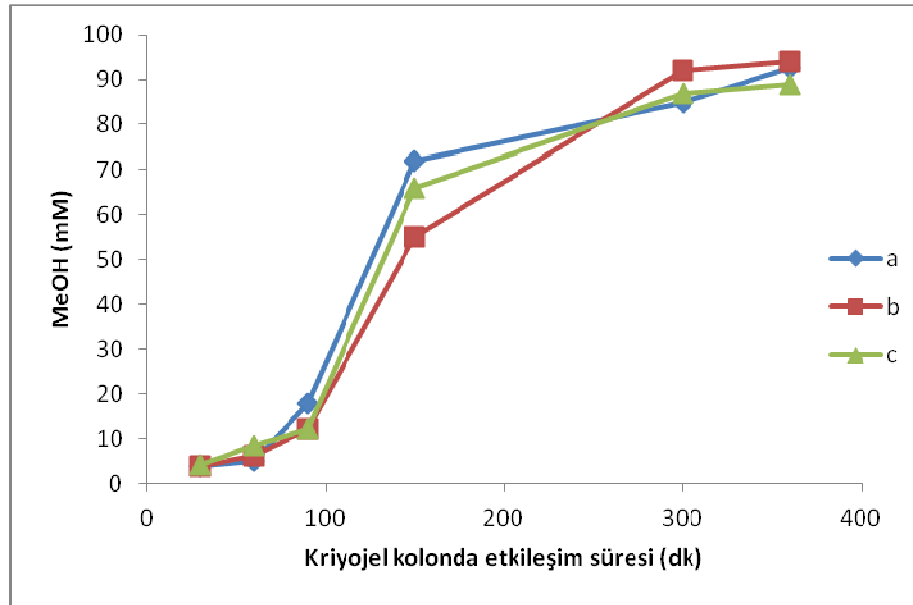
Şekil 3.26. Kriyojel kolonlarda CO₂'nin metanole dönüşümüne CO₂ miktarının etkisi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon

Grafik incelendiğinde sistemdeki CO₂ miktarı artırıldığında, en fazla dönüşümün multi enzim sistemi içeren kriyojelde olduğu görülmektedir. Ancak; bu sistemde elektron donörü olan NADH her bir dönüşüm öncesinde sisteme dışarıdan eklenmektedir.

Nano multi enzim sistemi içeren ve foto duyarlı kriyojel kolonlarda da sistemdeki CO₂ miktarı arttıkça dönüşen MeOH miktarında da artış olduğu görülmektedir. Her iki sistemde de reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan elektron donörünün dışarıdan verilmemesi, dönüşüm sistemlerinin içinde olması uygulama açısından büyük bir avantajdır.

3.6.4. Kriyojel Kolonlarla CO₂'nin Metanole Dönüşümünde CO₂'nin Kriyojel Kolonla Etkileşim Süresinin İncelenmesi

CO₂'nin metanole dönüşümünde, CO₂'nin kriyojel kolonla etkileşim süresinin metanol oluşumuna etkisi sentezlenen her üç kriyojel kolonda da incelenmiş, elde edilen veriler grafiğe aktarılarak Şekil 3.27'de verilen grafik elde edilmiştir.

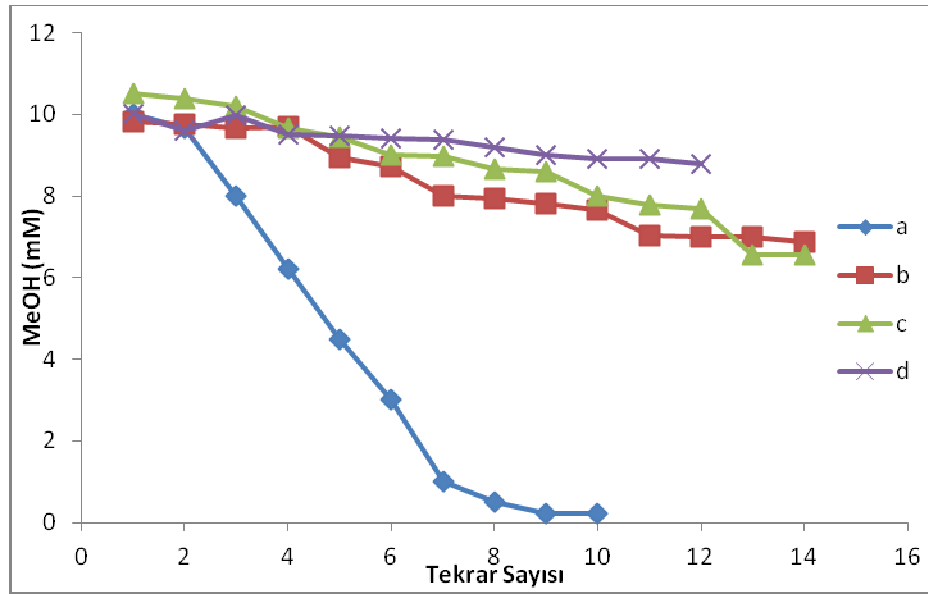


Şekil 3.27. Kriyojel kolonlarda CO₂'nin metanole dönüşümüne CO₂'nin kolonla etkileşim süresinin incelenmesi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon

Buna göre, etkileşim süresi arttıkça kriyojel kolonlardaki metanol oluşum miktarı da artmaktadır. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolonlarda elektron donörü olan NADH sisteme dışarıdan verilmiştir. Diğer iki sisemde elektron donörü sistem içerisinde çapraz bağlı bulunmaktadır. İlk yarım saatlik etkileşimde kolonlarda 3 ile 5 mM metanol oluşurken, bu değer 3 saat içinde 18-25 mM'a ulaşmaktadır. En yüksek metanol derişimleri kolonlarla 5-5.5 saat etkileşim sonrasında alınmıştır.

3.6.5. CO₂'nin Metanole Dönüşümünde Kullanılan Kriyojel Kolonların Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Sentezlenen kriyojel kolonların CO₂'nin metanole dönüşüm reaksiyonlarında tekrar kullanılabilirliği, aynı kriyojel kolonlardan CO₂'nin defalarca geçirilmesiyle incelenmiştir. Elde edilen veriler grafiğe geçirilmiş ve Şekil 3.28'de verilmiştir.



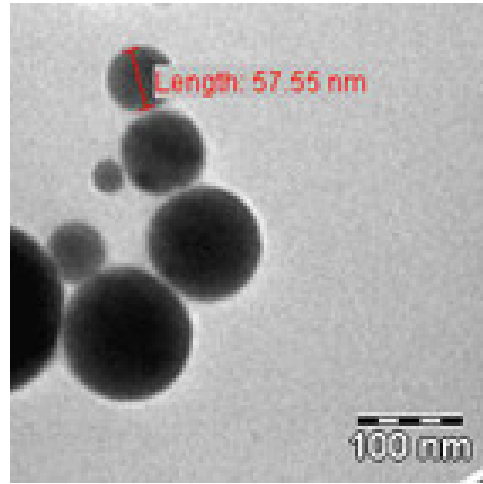
Şekil 3.28. Kriyojel kolonların CO₂'nin metanole dönüşümünde tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi a. Multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon (dışarıdan NADH verilmeden) b. Foto duyarlı kriyojel kolon c. Nano multi enzim sistemi içeren kriyojel kolon d. Multi

Buna göre, foto duyarlı kriyojel kolon ve nano multi enzim içeren kriyojel kolonların NADH rejenerasyonuna gerek kalmadan tekrar tekrar kullanılabilirliği görülmektedir. Multi enzim içeren kriyojel kolondan ise NADH dışarıdan verilmediğinde, kolonda metanol oluşmadığı, sisteme NADH verildiğinde ise, bu kolonların da CO₂'nin metanole dönüşüm sistemleri için tekrar kullanılabilir olduğu görülmektedir.

3.7. Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz (RuBisCo) Enzimi ve Uygulamaları

3.7.1. Nano Ribulaz-1,5-bifosfat Karboksilaz/Oksijenaz (RuBisCo) Enzimi Sentezi ve Karakterizasyonu

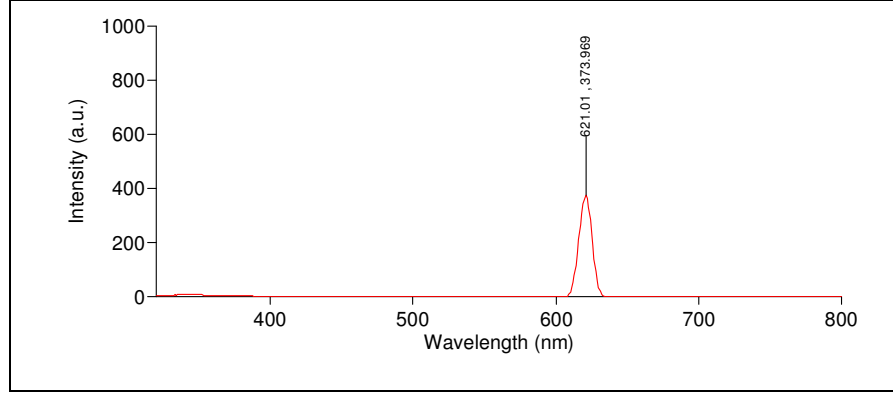
Nano RuBisCo enzimi ANADOLUCA metoduna göre sentezlenerek, elde edilen nano enzimlerin karakterizasyonu TEM görüntülerinin (Şekil 3.29) alınarak boyut analiziyle yapılmıştır.



Şekil 3.29. Nano RuBisCo enziminin TEM görüntüsü

Buna göre, sentezlenen nano RuBisCo enziminin partikül boyutları 50 ile 80 nm arasında değişmektedir.

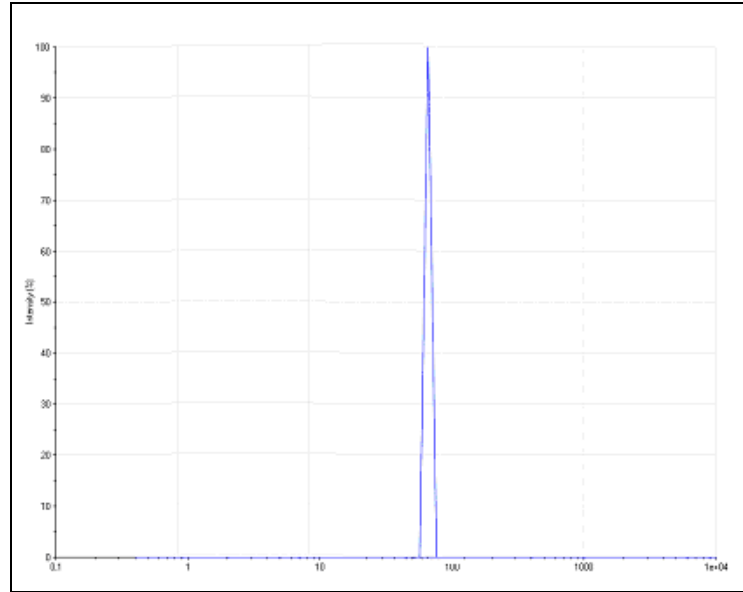
Diğer bir karakterizasyon işlemi için, sentezlenen nano RuBisCo enziminin floresans spektrumu alınmıştır. Bunun için nano partiküller 310 nm’de uyarılmıştır (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. Nano RuBisCo enziminin floresans spektrumu

Şekil 3.30'daki nano RuBisCo enzimine ait spektruma göre, enzim partiküllerinin 621 nm'de 373 a.u. floresans şiddetinin olduğu görülmektedir. Bu floresans özelliği, nano enzim sentezi sırasında enzimin rutenyum tabanlı aminoasit monomerler etkileştirilmesiyle, enzim yapısında sürekli konjugasyonun olması ve buna bağlı olarak da floresans ışınması yapmasıyla açıklanabilir. Dolayısıyla nano RuBisCo enzimi, floresans içerikli diğer analizler de kullanılabilir niteliktedir.

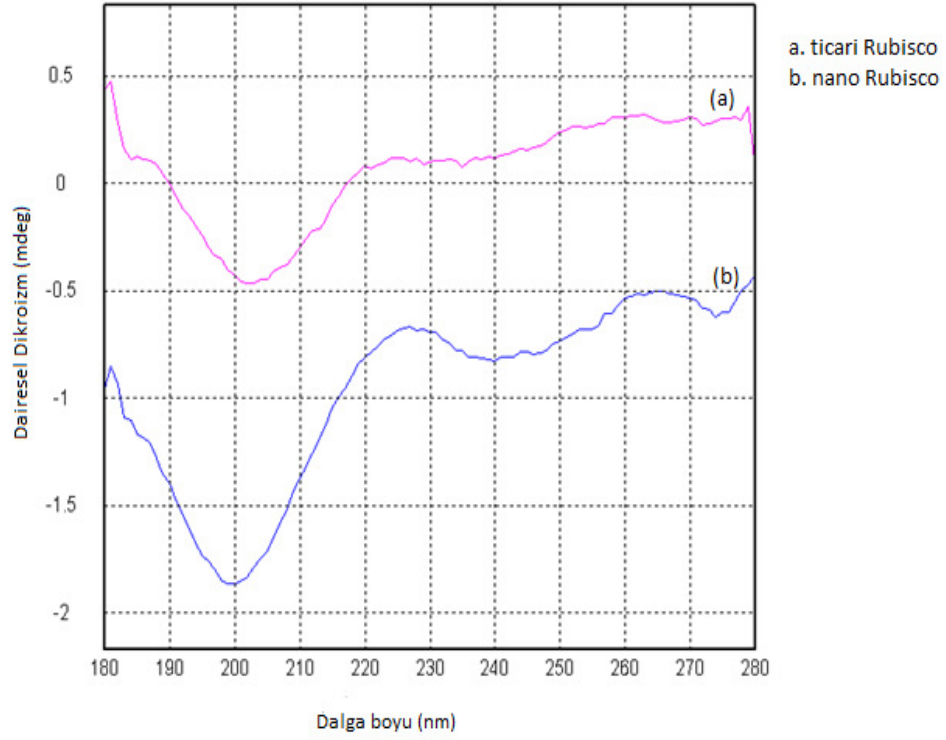
Nano RuBisCo enziminin bir diğer karakterizasyon işlemi zeta boyut analiziyle yapılmıştır. Elde edilen boyut dağılımı grafiği Şekil 3.31'de verilmiştir.



Şekil 3.31. Nano RuBisCo enziminin zeta boyut dağılımı grafiği

Buna göre, nano RuBisCo enziminin partikül boyutu dağılımı 82 nm olarak bulunmuştur. Elde edilen değer, TEM görüntülerini destekler niteliktedir.

Ticari RuBisCo ve nano RuBisCo enzimlerinin CD spektrumları alınarak, enzim yapısını oluşturan proteinlerin ikincil yapıları incelenmiş ve nano enzim sentezlendikten sonra, ikincil yapıda değişim olup olmadığı aydınlatılmıştır. Şekil 3.32’de ticari RuBisCo enzimi ve nano RuBisCo enzimine ait CD spektrumlarının karşılaştırılmış hali görülmektedir.

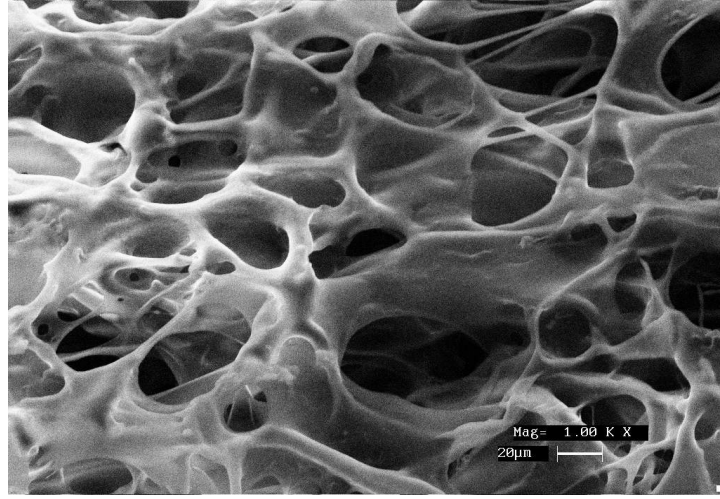


Şekil 3.32. Ticari ve nano RuBisCo enzimlerine ait CD spektrumları

Buna göre spektrumlar değerlendirildiğine, 190-210 nm arasında gelen pik enzimlerin yapısındaki α -helix sarmalını, 230 nm’ de gelen pik β katlanmalarını, 260-270 nm arasında gelen pik ise nano enzim sentezindeki konjugasyon sırasında rutenyum tabanlı aminoasit monomerden, nano enzim yapısına giren aromatik grupları göstermektedir. CD spektrumuna bakıldığında, nano RuBisCo enziminde yapıda bozunma olmadığı anlaşılmaktadır.

3.7.2. Gözeneklerine Anti-RuBisCo Antibadi Çapraz Bağlı Kriyojel Sentezi ve Karakterizasyonu

RuBisCo enziminin ıspanak yapraklarından afinite kromatografisi tekniğiyle FPLC cihazı kullanarak izole etmek için gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojel kolon sentezlenmiştir. Sentezlenen kriyojel kolonun karakterizasyonu, kriyojelin gözenek boyutu ve gözenek dağılımını belirlemek için SEM görüntüsü alınmıştır. Şekil 3.33'de gözeneklerine anti- RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojel kolona ait SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.33. Gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojel kolonun SEM görüntüsü

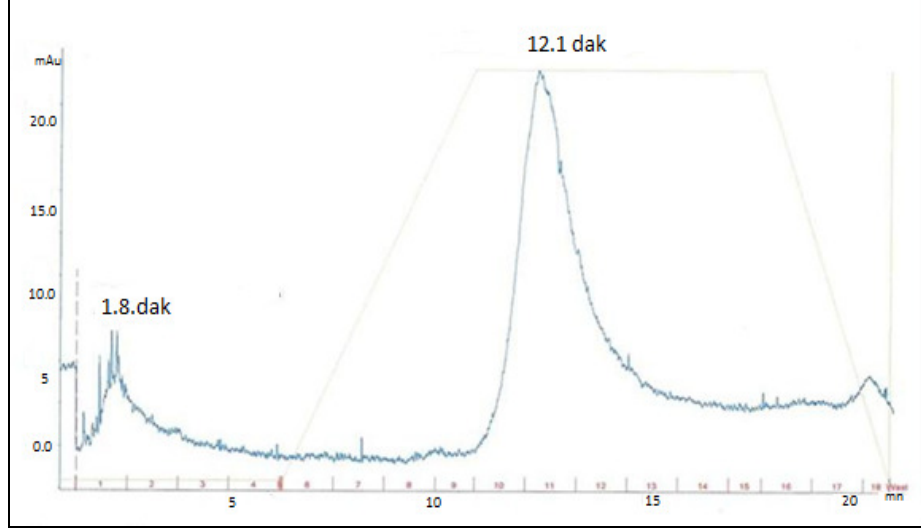
SEM görüntüsünden de, sentezlenen kriyojel kolonun birbirine bağlı büyük gözeneklerden oluşmuş polimerik yapı olduğu görülmektedir.

Kriyojelin hidrofilik özelliğinden dolayı, su tutma kapasitesi ve şişme kapasitesi belirlenmiş ve g polimer başına 4.02 g su tuttuğu ve % 428 şişme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu değerler de, sentezlenen kriyojelin hidrofilik özelliğini doğrulamaktadır.

Kriyojelin yüzey alanının analizi BET analiziyle yapılmıştır. Bunun sonucunda, $910 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ yüzey alanına sahip olduğu belirlenmiştir.

3.7.2.1. FPLC Çalışmaları

FPLC’de kolon dolgu maddesinin gözeneklerine anti-RuBisCo antibadi çapraz bağlı kriyojelin kullanıldığı kromatografik sistemde, ıspanak ekstraktının FPLC cihazına enjeksiyonuyla, RuBisCo enzimi izole edilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 3.34’de verilmiştir.



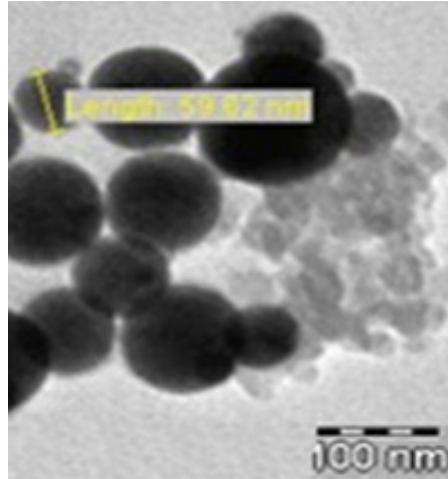
Şekil 3.34. RuBisCo enzimi izolasyonuna ait kromatogram

Şekil 3.34’de verilen kromatograma göre, 1.8. dakikada gelen ilk pik ıspanak ekstraktındaki RuBisCo enzimi dışındaki diğer maddeleri ifade etmektedir. Bu sırada RuBisCo enzimi kriyojel kolondaki anti-RuBisCo antibadi ile antijen-antibadi etkileşimiyle tutunmaktadır. 6. dakikadan sonra, hareketli fazın değiştirilmesiyle, kriyojel kolondaki antibadi-antijen etkileşimi kırılarak RuBisCo enziminin kriyojel kolondan salınması sağlanmıştır. 12.1 dakikada gelen pik RuBisCo enzimine ait piktir. Bu pikin geldiği alan boyunca kolondan alınan çözelti fraksiyon toplama ünitesinde toplanmıştır. Kolondan alınan çözeltinin çözücüsü liyofilizasyon ile uzaklaştırılarak, izole edilen RuBisCo enzimi SDS-PAGE analizi yapılarak saflığı belirlenmiş ve ardından ANADOLUCA metoduna göre nano boyutta sentezlenmiştir.

3.7.3. Nano Yapıda Sentezlenen Ispanaktan İzole RuBisCo Enziminin Karakterizasyonu

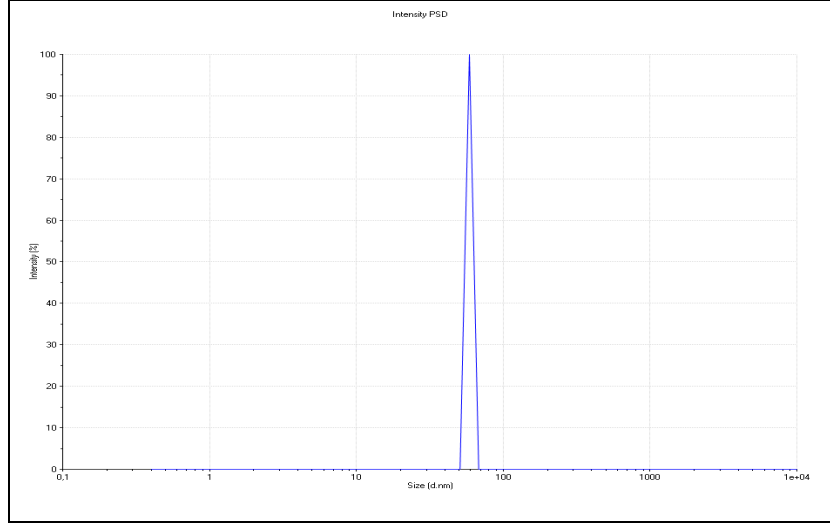
Ispanaktan izole edilen RuBisCo enzimi ANADOLUCA metoduna göre nano yapıda sentezlenerek, enzimin kararlılığı ve farklı reaksiyon koşullarına karşı dayanıklılığının artması sağlanmıştır. Elde edilen nano enzimin karakterizasyonu diğer nano enzimlerin karakterizasyonu gibi TEM görüntülerinin alınması, zeta boyut analizi, floresans ve CD spektrumlarının alınmasıyla yapılmıştır.

Şekil 3.35 sentezlenen nano enzimin TEM görüntüsünü göstermektedir. Buna göre, nano enzimin partikül büyüklüğü 60-95 nm arasında değişmektedir.



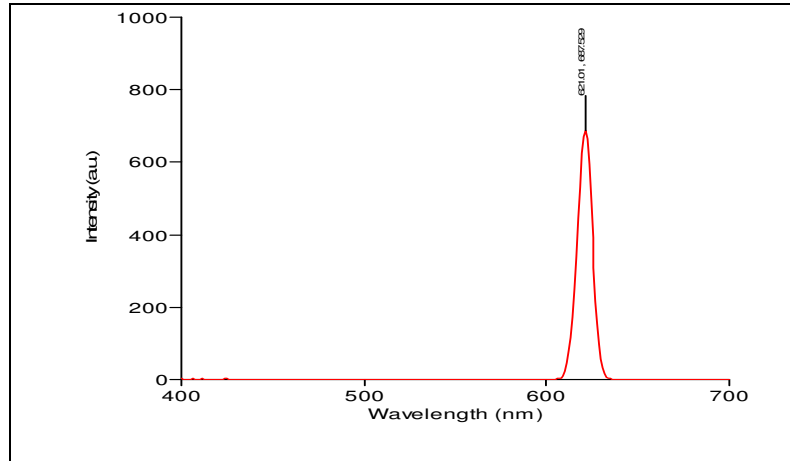
Şekil 3.35. Ispanaktan izole edilen nano yapılu RuBisCo enziminin TEM görüntüsü

Elde edilen nano enzimin partikül büyüklüğü zeta boyut analiziyle de belirlenmiş ve boyut dağılımı 93 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuç da TEM görüntüsüyle belirlenen boyutları desteklemektedir. Şekil 3.36’da nano enzime ait zeta boyut analizi verilmiştir.



Şekil 3.36. Ispanaktan izole edilen nano yapılı RuBisCo enziminin zeta boyut dağılımı analizi

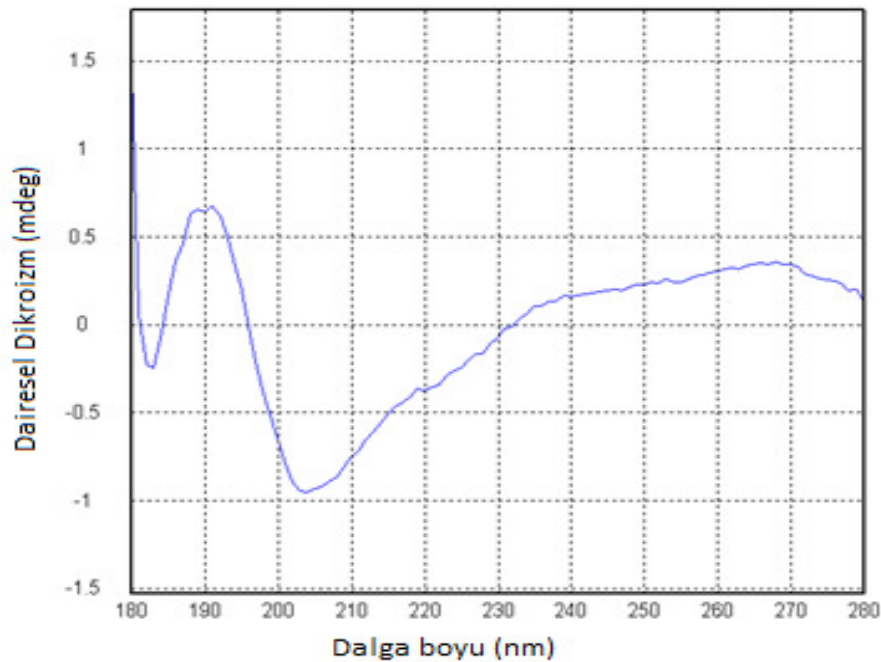
Nano yapıda sentezlenen ıspanaktan izole edilen RuBisCo enziminin diğer bir karakterizasyon işlemi floresans spektrumunun alınmasıyla yapılmıştır. Nano yapının sentezinde kullanılan rutenyum tabanlı aminoasit monomerle etkileşimi sonrası enzimin sahip olduğu floresans ışığının şiddeti 887 a.u olarak bulunmuştur. Şekil 3.37’de sentezlenen nano enzime ait floresans spektrumu görülmektedir. Floresans ışığının diğer enzimlere göre bu kadar şiddetli olmasının sebebi, enzim miktarının ve enzimle etkileştirilen rutenyum tabanlı aminoasit miktarının diğerlerine göre daha fazla olmasıdır.



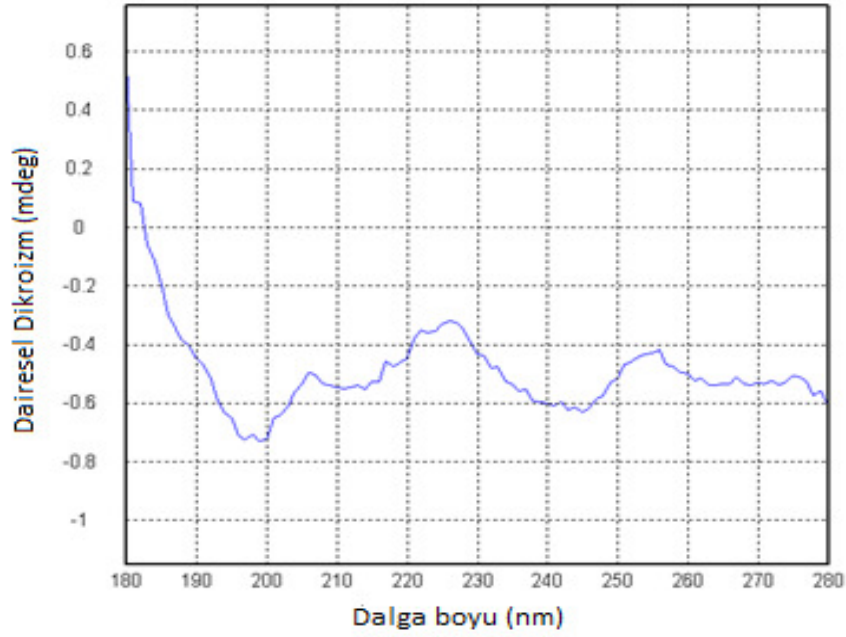
Şekil 3.37. Ispanaktan izole edilen nano yapılı RuBisCo enziminin floresans spektrumu

Nano yapılı izole edilen RuBisCo enziminin diğ er bir karakterizasyon işlemi izole edildikten sonra ve nano yapıda sentezlendikten sonra CD spektrumlarının alınmasıyla yapılmıştır. Ispanaktan izole edildikten sonra enzim yapısındaki proteinlerin ikincil yapıları ve aynı enzimin nano formata geldikten sonraki ikincil yapıları alınan CD spektrumlarıyla değerlendirilmiştir. şekil 3.38.a. ıspanaktan izole edilen RuBisCo enziminin CD spektrumunu göstermektedir. Buna göre, 185-200 nm ve 200-210 nm arasında gelen pik α heliks sarmalını göstermektedir. Dolayısıyla enzimin sekonder yapısı bozunmadan izolasyon yapılmıştır. şekil 3.38.b. ise, ıspanaktan izole edilen nano yapılı RuBisCo enziminin CD spektrumunu göstermektedir. Bu spektrum değerlendirildiğinde, 190-210 nm arasında gelen pik enzimlerin yapısındaki α heliks sarmalını, 220-230 nm’de gelen pik β katlanmalarını, 270-280 nm arasında gelen pik ise nano enzim sentezindeki konjugasyon sırasında rutenyum tabanlı aminoasit monomerden nano enzim yapısına giren aromatik grupları göstermektedir. Nano enzim formatındaki yapıda sekonder yapıda α heliks katlanmasının yanında, β katlanmaları ve aromatik gruplar da ön plana çıkmıştır.

(a)



(b)



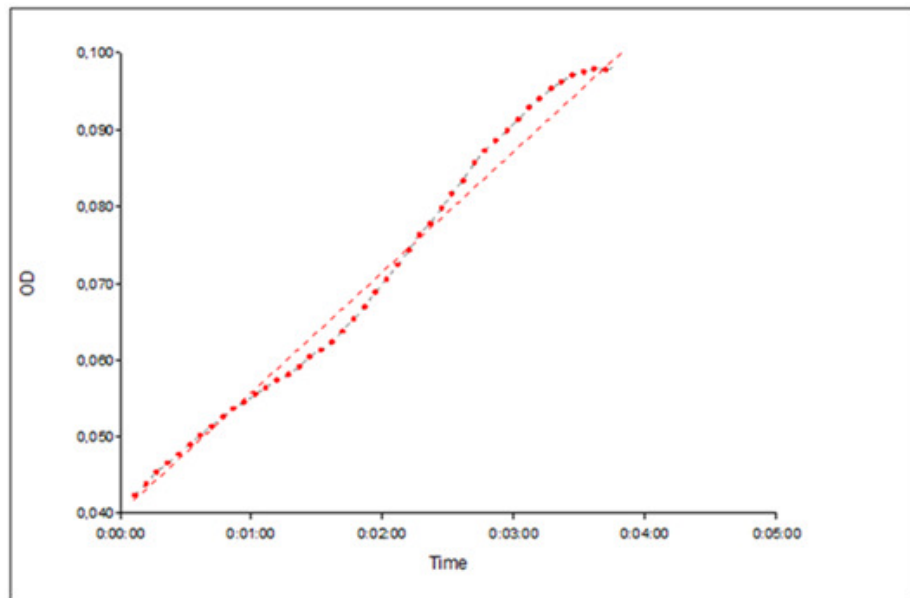
Şekil 3.38. a. Ispanaktan izole edilen RuBisCo enziminin CD spektrumu b. Ispanaktan izole edilen nano yapıdaki RuBisCo enziminin CD spektrumu

3.8. Nano RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri ve Enzimatik Aktiviteye Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi

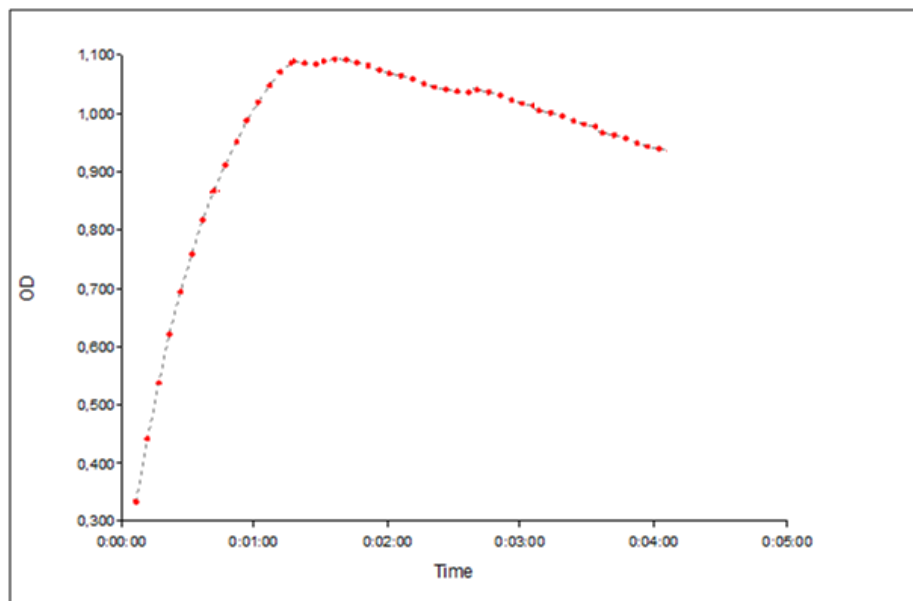
3.8.1. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivite Tayinleri

RuBisCo enziminin aktivitesi, substrat olarak D-ribulaz-1,5 bifosfat ve CO_2 ile reaksiyonu sonunda oluşan 3-fosfogliseraldehit şekerinin 340 nm’de mikropilaka okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonrasında bulunmuştur. Eşitlik 2.3 kullanılarak yapılan hesaplamalarla her dört RuBisCo enzimi grubuna ait enzim aktivite değerleri bulunmuştur. Şekil 3.39.a. CO_2 ile etkileşimi sonrasındaki ticari RuBisCo enzime ait aktiviteyi, Şekil 3.39.b. nano RuBisCo enziminin aktivite eğrisini, 3.39.c. ıspanaktan izole edilen RuBisCo enziminin aktivitesini, 3.39.d. ise, ıspanaktan izole edildikten sonra nano yapıda sentezlenen RuBisCo enzime ait aktiviteyi göstermektedir.

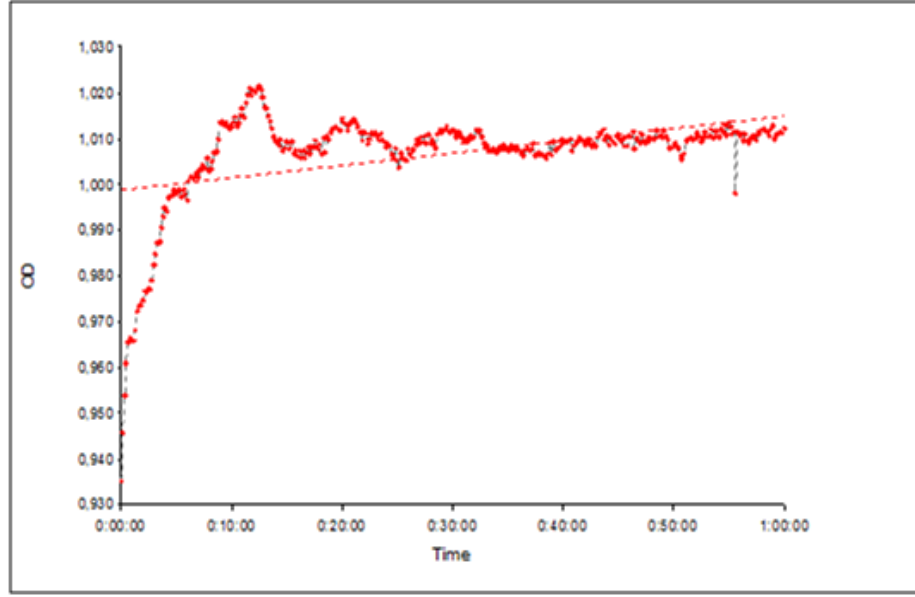
(a)



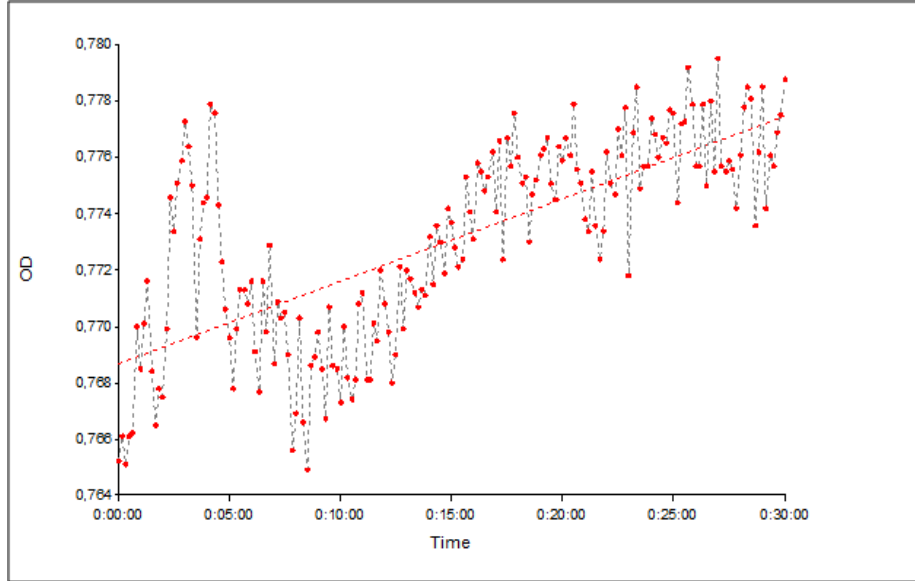
(b)



(c)



(d)



Şekil 3.39. **a.** Ticari RuBisCo enziminin aktivite eğrisi, **b.** Nano RuBisCo enziminin aktivite eğrisi, **c.** Ispanaktan izole edilen RuBisCo enziminin aktivite eğrisi, **d.** Ispanaktan izole edilen ve nano yapıda sentezlenen RuBisCo enziminin aktivite eğrisi

Buna göre, ticari RuBisCo enziminin bağıl aktivite değeri % 36 U (μmoldk^{-1}) olarak bulunmuştur. Bağıl aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, literatürde verilen spektrofotometrik yöntemle RuBisCo enzim aktivitesi değerleriyle uyumluluk göstermektedir [131-132]. Chakrabarti S. ve ark. [131] RuBisCo enzim aktivitesi için radyoaktif metotlara alternatif olarak spektrofotometrik bir metot geliştirmişler ve RuBisCo enzim aktivitesini % 45 olarak bulmuşlardır. Bu deneyde elde edilen RuBisCo enziminin % 36 bağıl aktivite değeri bu çalışmayla yakınlık göstermektedir. Sharkey ve ark. da 1991 yılında yaptıkları çalışmada [132], RuBisCo enzim aktivitesinin belirlenmesi için fotometrik bir yöntem geliştirdikleri deneyler sonucunda, bağıl enzim aktivitesini % 30 olarak bulmuşlardır. Dolayısıyla, tez çalışmalarında bulunan RuBisCo enzim aktivite değeri literatürdeki bu çalışmalarla yakınlık göstermektedir.

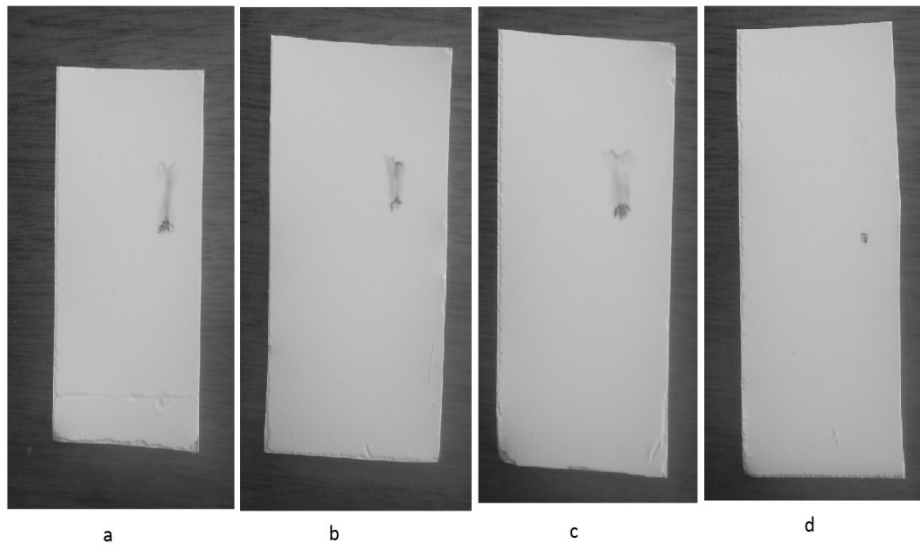
Şekil 3.39.b'de verilen eğriye göre, nano RuBisCo enzim bağıl aktivitesi % 11.62 U (μmoldak^{-1}) olarak bulunmuştur. Bu değer ticari RuBisCo enziminin 3 kat daha az olduğu görülmektedir. Ancak, sentezlenen nano yapı enzim CO₂ ile etkileşiminden sonra bu şekilde enzimatik aktivite göstermesi, hazırlanan biyo mimik enzimin çalıştığını ifade etmektedir. Ayrıca nano enzimlerin sahip olduğu kararlılık ve dayanıklılık özellikleri düşünüldüğünde, sentezlenen nano RuBisCo enziminin CO₂ tutucu ve dönüştürücü olarak kullanılabileceği görülmektedir.

Şekil 3.39.c.'de verilen eğriden elde edilen absorbans verilerine göre ıspanaktan izole edilen RuBisCo enziminin bağıl aktivitesi % 62.7 U (μmoldak^{-1}) olarak bulunmuştur. Ticari RuBisCo enziminin aktivitesinden daha büyük bir değerde enzim aktivitesinin bulunmasının sebebi, burada kullanılan enzim derişiminin 7 kat daha fazla olmasıdır. Enzimatik aktivitenin belirgin bir şekilde gözlenebilmesi için, FPLC'den izole edilen RuBisCo enzimleri liyofilizasyonla çözücüleri uçurularak biraraya getirilmiş ve enzimatik aktivite tayini yapılmıştır.

Şekil 3.39.d'de verilen eğriden elde edilen verilere göre, ıspanaktan izole edilen ve nano yapıda sentezlenen RuBisCo enziminin bağıl aktivitesi % 0.64 U (μmoldak^{-1}) olarak bulunmuştur. CD spektrumundan da yapısı belirlenen bu nano enzimde, nano yapı sentezi sırasında enzim içeriğinde sekonder yapıda değişiklikler çok fazla olmuştur. β katlanmaları, rastgele katlanmalar ve aromatik

grupların varlığı enzimdeki proteinlerin sekonder yapısında bir miktar değişikliğe yol açmıştır. Bu nedenle bu enzimin aktivitesinin diğer RuBisCo enzimlerine göre düşük olması beklenen bir durumdur.

RuBisCo enzimatik aktivitenin diğer bir göstergesi, RuBisCo enzimlerinin ribulaz-1,5 bifosfat varlığında CO₂ ile etkileşimi sonucu 3-fosfogliseraldehit oluşturmalarıdır. Reaksiyon sonrasında oluşan 3-fosfogliseraldehit İTK ile belirlenerek, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O ile şeker görüntüleme prosedürüne göre görüntüleme yapılmıştır. Şekil 3.40 İTK verilerini göstermektedir.



Şekil 3.40. RuBisCo enzimlerinin CO₂ ile etkileşimi sonrası ortamda oluşan 3-fosfogliseraldehitin İTK ile belirlenmesi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Ispanaktan izole edilen RuBisCo enzimi c. Nano RuBisCo enzimi d. Ispanaktan izole edildikten sonra nano yapıda sentez

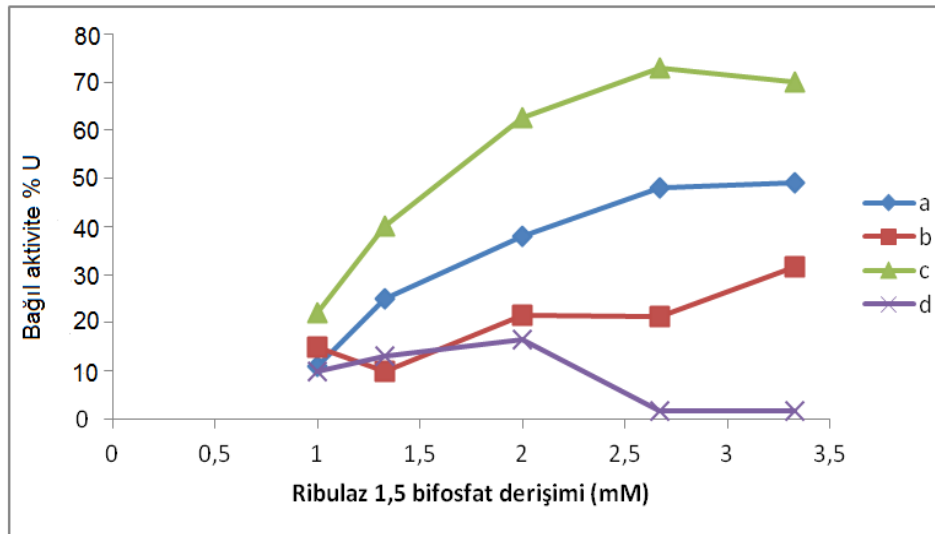
Buna göre her bir RuBisCo enziminin CO₂ ile etkileşimi sonucunda reaksiyon ortamında 3-fosfogliseraldehit oluşmaktadır. Yani, çalışılan RuBisCo enzimlerinin aktivitesi bir de bu açıdan ortaya konulmuştur. Şekil 3.40'da d ile gösterilen İTK verisinde spotun çok küçük olmasının nedeni, reaksiyonda kullanılan izole edildikten sonra nano yapılan RuBisCo enziminin derişiminin diğerlerine göre çok daha küçük olmasıdır.

3.8.2. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Substrat Değişimi Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine substrat değişiminin etkisi, ribulaz-1,5 bifosfat değişiminin etkisi ve CO₂ miktarının etkisi olarak iki yönlü incelenmiştir.

a. Ribulaz-1,5 bifosfat Değişiminin Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine ribulaz-1,5 bifosfat değişiminin etkisini incelemek için, sistemden geçirilen CO₂ miktarı 8 Ldk⁻¹ olarak sabitlenip, 1,00; 1,33; 2,00; 2,67; 3,33 mM değişimlerdeki D-ribulaz-1,5 bifosfat substratıyla etkileşim sonucu aktivite incelenmiştir. Aktivite ölçümleri Eşitlik 2.3'te verilen eşitliğe göre hesaplanarak, substrat değişimine karşı grafiğe aktarılmıştır. (Şekil3.41).



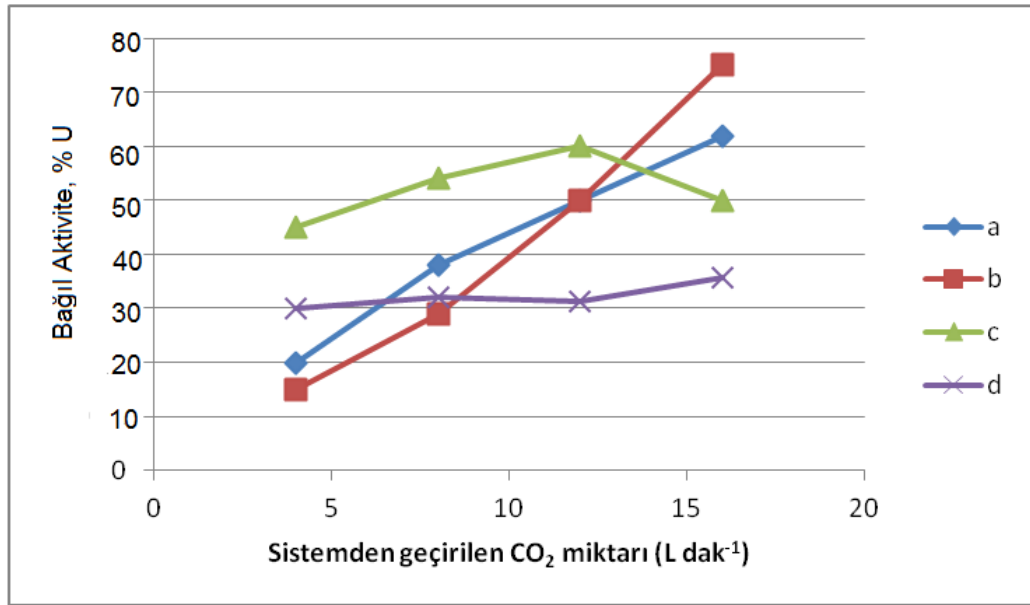
Şekil 3.41. Ribulaz-1,5 bifosfat değişiminin RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. İzole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.

Şekil 3.41'de verilen grafik incelendiğinde, substrat değişimi arttıkça enzim aktivitenin de her bir RuBisCo enzimi için arttığı görülmektedir. Ticari ve izole edilen RuBisCo enzimleri için substrat değişimi 2.5 mM olduktan sonra enzimler substratla doygunluğa ulaşmış ve bu noktadan sonra substrat değişimi

arttırıldığında bile enzim aktivitesi artmamaktadır. Diğer nano yapılı enzimlerde substrat derişimine bağı olarak enzim aktivitesinin de arttığı görülmüştür.

b. CO₂ Miktarının Etkisi

CO₂ miktarının, RuBisCo enzim aktivitesine etkisini incelemek için, reaksiyonda D-ribulaz-1,5 bifosfat substratının derişimi sabit tutularak 2 mM olarak kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyonlardan, farklı miktarlarda CO₂ geçirilmiştir. Herbir CO₂ miktarına karşılık gelen enzim aktivite değerleri bulunarak, substrat derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.42). Buna göre, CO₂ miktarı arttıkça enzim aktivitesinin de arttığı görülmüştür.

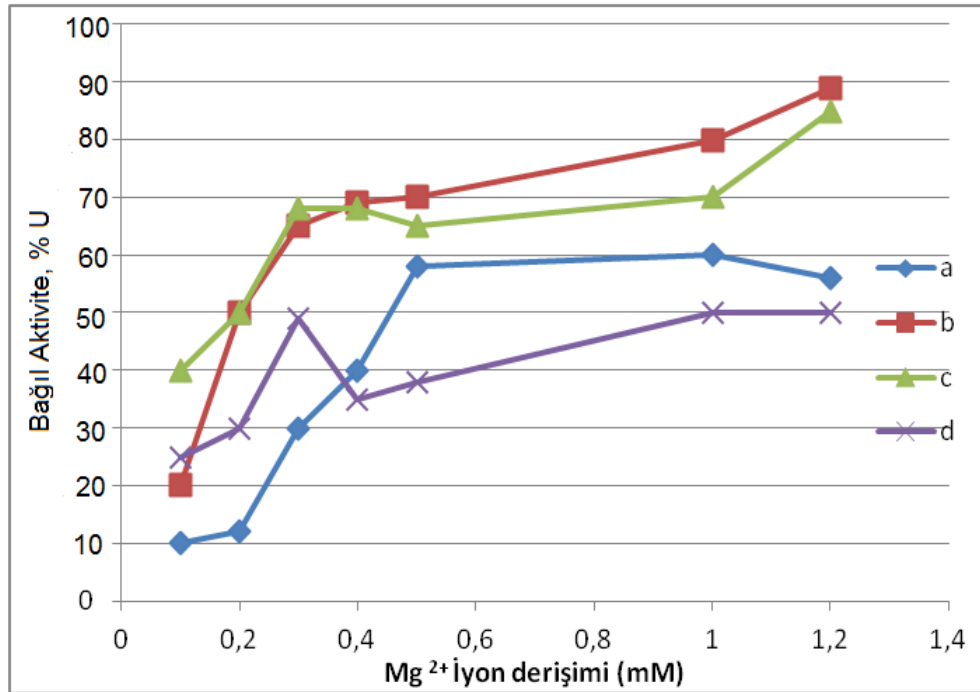


Şekil 3.42. Sistemden geçirilen CO₂ miktarının RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. İzole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı

3.8.3. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Mg²⁺ İyonu Derişimi Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivite göstermesi için Mg²⁺ iyonunun varlığı gereklidir. Çünkü Mg²⁺ iyonu enzimi aktive etmektedir. Mg²⁺ iyonunun RuBisCo enzim derişimine etkisini incelemek için ribulaz-1,5 bifosfat derişimi 2 mM

alınarak, reaksiyondan 8 Ldak⁻¹ CO₂ geçirilmiştir. Reaksiyon ortamına farklı derişimlerde Mg²⁺ iyonu eklenerek Mg iyon derişiminin etkisi incelenmiştir. Şekil 3.43'de RuBisCo enzimlerinin aktivitesine Mg²⁺ iyon derişiminin etkisi gösterilmiştir. Buna göre, Mg²⁺ iyon derişimi arttırıldıkça RuBisCo enzim aktivitesi artmaktadır. Nano RuBisCo enzimi Mg²⁺ iyon derişimi arttırıldıkça en yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Ticari RuBisCo ve ıspanaktan izole edilen RuBisCo enzimlerinin 0.5 mM ve 1 mM Mg²⁺ iyon derişimlerinin varlığında enzim aktivitesi aynı değerde seyretmiştir.

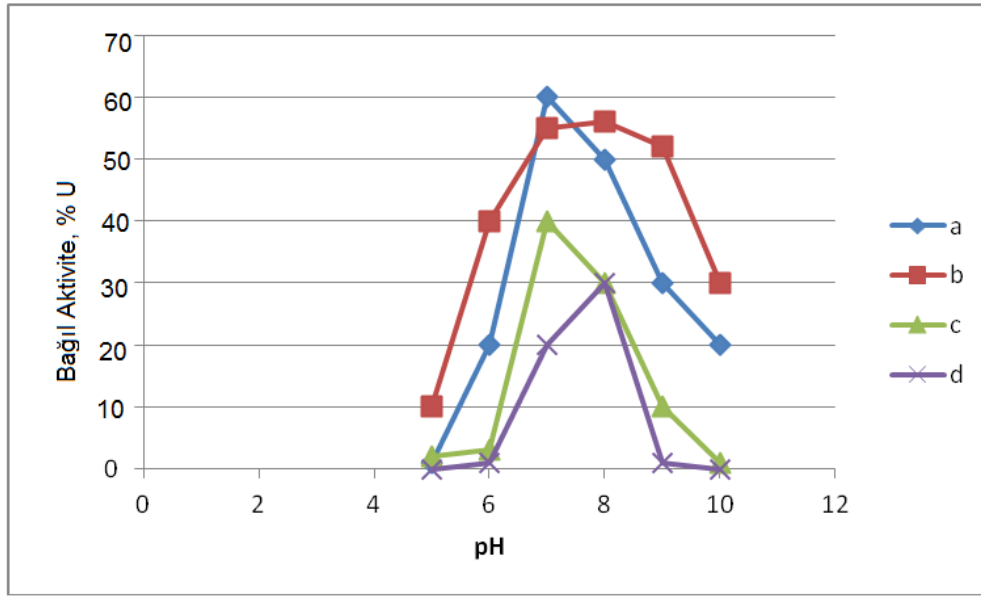


Şekil 3.43. Mg²⁺ iyon derişiminin RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. izole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.

3.8.4. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine pH Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitelere pH etkisini incelemek için reaksiyonlar farklı pH tamponları içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyonda, ribulaz-1,5 bifosfat derişimi 2 mM, Mg²⁺ iyon derişimi 1 mM alınarak, reaksiyondan 8 Ldak⁻¹ CO₂ geçirilmiştir.

Elde edilen veriler Şekil 3.44'deki grafikte gösterilmektedir. Buna göre, nano RuBisCo enzimlerinin geniş pH aralığında aktivite gösterirken, ticari ve izole edilen RuBisCo enzimleri pH 7 olmak üzere sadece tek bir pH değerinde enzim aktivitesi göstermektedir. Nano enzimlerin farklı pH aralığında aktivite gösteren yapılar olduğu burada sentezlenmiş olan RuBisCo enziminde de kanıtlanmıştır.



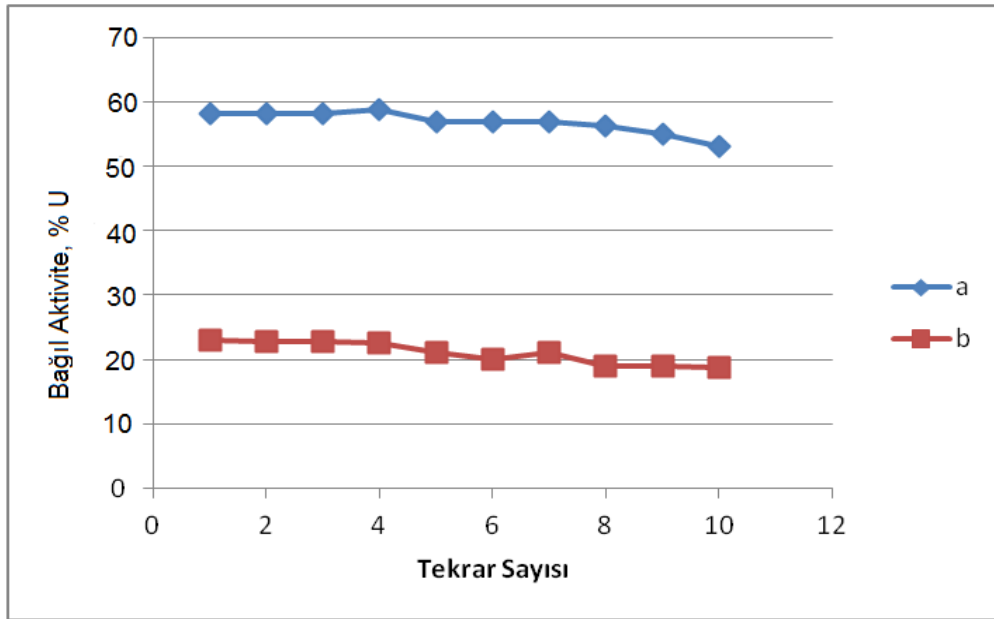
Şekil 3.44. pH'ın RuBisCo enzimlerinin aktivitesine etkisi a. Ticari RuBisCo enzimi b. Nano RuBisCo enzimi c. İzole edilen RuBisCo enzimi d. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı.

3.8.5. Ticari, Nano, İzole ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Enzimatik Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

RuBisCo enzimlerinin aktivitesine sıcaklık etkisini incelemek için, pH 7'de D-ribulaz-1,5 bifosfat ve $MgCl_2$ çözeltisi etkileştirilerek, sırasıyla 23, 25, 35, 37, 40 ve 42 °C'de enzimatik aktivite belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda sadece 37°C'de hem nano RuBisCo enzimlerinin hem de ticari ve izole edilen RuBisCo enzimlerinin aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 3.39'da verilen RuBisCo enzimlerinin aktivite eğrileri 37°C sıcaklıkta elde edilmiştir.

3.8.6. Nano RuBisCo ve Nano İzole RuBisCo Enzimlerinin Tekrar Kullanılabilirliği

Nano RuBisCo enzimlerinin enzimatik reaksiyonlar sonrası tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesinde, enzimler reaksiyon ortamından santrifüjle ayrılarak bir sonraki enzimatik reaksiyonda tekrar kullanılmıştır. 10 döngü için nano RuBisCo enzimi ve ıspanaktan izole edilen RuBisCo enziminin nano yapıları kullanılarak Şekil 3.45’de verilen tekrar kullanılabilirlik grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.45. NanoRuBisCo enzimlerinin tekrar kullanılabilirliği a. Nano RuBisCo enzimi b. İzole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı

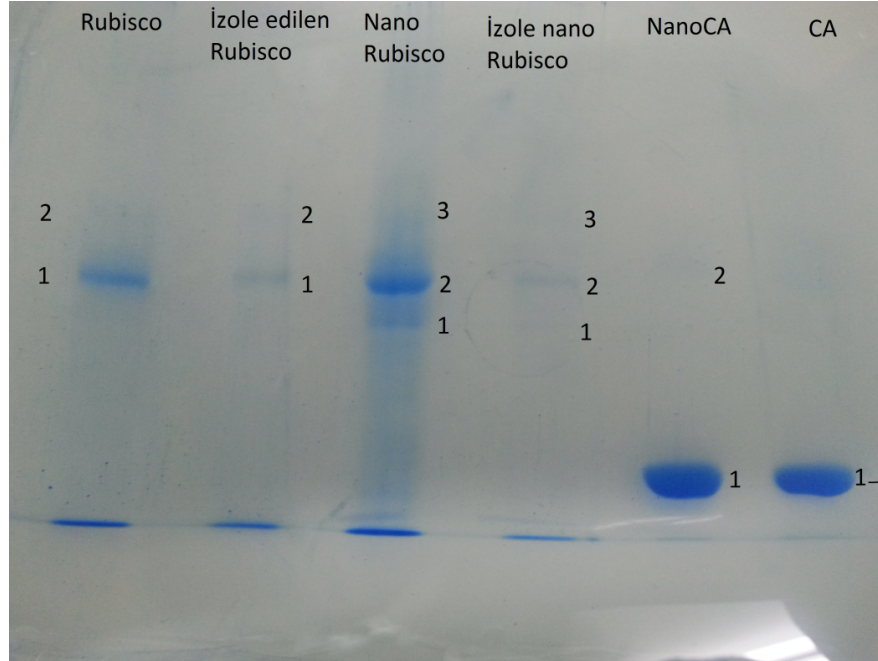
Buna göre sentezlenen nano RuBisCo enzimlerinin 10 döngü sonrasında da enzimatik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Her iki nano RuBisCo enzimi de CO₂' nin 3-fosfogliseraldehite dönüşümünü tekrar tekrar katalizlemektedir.

3.9. Sentezlenen Nano Enzimlerin SDS-PAGE ile Karakterizasyonu

Tez kapsamı çalışmaları boyunca sentezlenen nano CA, nano multi enzim sistemi, ıspanaktan izole edilen RuBisCo enzimi, nano RuBisCo enzimi ve ıspanaktan izole edilen RuBisCo enziminin nano yapısı SDS-PAGE’ de

yürütülerek sentezlenen nano enzimlerin ticari enzimlerle karşılaştırılması yapılmıştır.

SDS-PAGE analizi için akrilamid-bis monomerleri 29:1 oranında karıştırılarak, bu karışıma, TEMED, APS, SDS ve pH 8.8 Tris tamponu eklenmiş ve böylece % 10'luk poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Jele yüklenecek enzimlerden 15' er μL alınarak her biri 15 μL Coomassie Blue G boyası ile etkileştirilmiştir. Etkileşimin daha hızlı ve homojen olması için ve denatürasyonun sağlanması için boyayla etkileştirilen örnekler bir süre ısıtılmıştır. Ardından, tanka poliakrilamid jeli dökülmüş ve uygun bir tarak ile jelde eşit hacimde kuyucuklar açılmıştır. Tank tampon çözelti ile doldurularak enzim örnekleri açılan kuyucuklardan jele yüklenmiştir. 25-35 mA akım, enzim örneklerinin jelde ilerlemesi için kullanılmıştır. Analiz süresi tamamlandığında, tanktan çıkarılan jel önce Coomassie Blue boya çözeltisi içinde bekletilmiştir. Ardından, proteinlere ait bantların görüntülenmesi için belirli aralıklarla 35 mL CH_3COOH ile 25 mL CH_3OH karışımından oluşan yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Nano enzimlere ait bantlar, ile ticari enzimlere ait bantlar karşılaştırılmıştır. Şekil 3.46'da RuBisCo ticari ve nano enzimlerinin ve CA ticari ve nano enzimlerine ait SDS-PAGE analizi verilmiştir.



Şekil 3.46. RuBisCo ve CA ticari ve nano enzimlerin SDS-PAGE analizi

Şekil 3.46 incelendiğinde, RuBisCo enziminin 55 kDA ve 14 kDa olmak üzere sahip olduğu iki alt birimin jelde farklı iki bant şeklinde geldiği görülmektedir. Bu bantlar izole edilen RuBisCo enziminde de görülmektedir. Nano RuBisCo enzimine ait bantlar değerlendirildiğinde, RuBisCo enzimine ait 2 bandın yanında 1 bandında enzimin nano sentezi sırasında etkileştirildiği rutenyum tabanlı aminoasite ait bant olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, nano RuBisCo yapısında toplamda 3 bandın gelmesi beklenmektedir.

Aynı analiz CA ve nano CA enzimi için değerlendirildiğinde, CA enzimine ait bandın yanında, nano CA enziminde 1 tane de rutenyum tabanlı aminoasite ait bant gelmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, doğaya salınan CO₂ miktarı endüstrileşmenin artması, fosil yakıtların kullanılması, orman alanlarının yok edilmesi gibi sebeplerle giderek artmaktadır. Bu nedenle; son yıllarda CO₂ tutuklama ve dönüştürme çalışmaları hız kazanmış olup bu işlemlerin en pratik, en hızlı ve en kolay yolu araştırılmaktadır.

Yapılan tez çalışmasında, CO₂'nin tutuklanması ve dönüştürülmesi için biyomimik nano enzim sistemleri geliştirilmiştir. CO₂'nin diğer dönüşüm prosesleri incelendiğinde, yüksek basınç ve sıcaklık kullanarak dönüşümler, inorganik veya organik katalizörler kullanarak dönüşümler görülmektedir. Bu sistemler incelendiğinde, CO₂'nin tutuklanması ve dönüştürülmesi için reaksiyon koşulları (sıcaklık, atmosferik basınç vs.) ve zaman açısından en uygun sistemlerin enzimatik sistemler olduğu bulunmuştur. Ancak; enzimlerle gerçekleştirilen biyokatalitik sistemlerde enzimlerin pahalı olması, farklı koşullara dayanıksız olması, sadece çalışabildikleri optimum parametrelerin olması gibi nedenlerden dolayı, reaksiyon verimleri azalmakta ve endüstriyel boyuta taşınamamaktadır.

Bu gibi sorunların aşılması ve CO₂ tutuklama ve dönüşüm proseslerinin endüstriyel boyuta da uygulanabilir olması bakımından hareketle nano enzim sistemleri geliştirilmiştir. Nano enzimler, geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışabilen, aktivitelerinde herhangi bir azalma olmadan tekrar tekrar kullanılabilir kararlı yapılardır. Böylelikle, nano enzimler kullanılarak, hem reaksiyon koşulları zenginleştirilmiş hem de tekrar kullanılabilirlik sayesinde maliyet azaltılmış olacaktır.

Tez çalışmasında, CO₂ tutucu ve dönüştürücü nano enzim sistemleri üç farklı prosesle incelenmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, CA enziminin CO₂'nin bikarbonata dönüşümünü katalizlemesi temel alınarak, CO₂'nin bikarbonata dönüşümü için 93 nm boyutunda nano CA enzimi ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Nano CA enzimi ilk defa sentezlenmiş olup literatürde nano CA enzimine ilişkin

miktarını arttırdığı görülmüştür. Ancak burada, CO₂' nin bikarbonata dönüşüm reaksiyonlarında sentezlenen nano CA enzimlerinin üstünlüğü, farklı pH aralıklarında (pH 5-9), 35-75 mg arası bikarbonat dönüşümünü gerçekleştirmesi ve yine aynı nano CA enzimlerinin 14 döngü boyunca aktivitelerinde bir azalma olmadan CO₂' nin dönüşüm reaksiyonlarında kullanılabilir olmasıdır. CO₂'nin tutuklanması ve dönüşümü sonrasında oluşan bikarbonatın da endüstriyel açıdan karbonat mineralleri açısından oldukça fazla uygulama yeri vardır. Kalsit, aragonit gibi bikarbonattan yola çıkılarak üretilen karbonat mineralleri aynı zamanda geniş bir karbon rezervi olarak da kullanılmaktadır. Nano CA enzimiyle yapılan CO₂' nin dönüşümü bir başka açıdan değerlendirildiğinde, reaksiyonlar sırasında yüksek sıcaklık ve basınç gibi ekstra maliyet gerektiren sistemlere ihtiyaç duyulmamıştır. Çalışmada sentezlenen nano CA enziminin yapısının ticari CA enzimine göre üstünlüğü, reaksiyon koşullarının da kolay uygulanabilir olmasıyla birleştirildiğinde, bu dönüşüm sisteminin endüstriyel alanda da uygulanabilir nitelikte olduğu düşünülmektedir. Literatürde şimdiye kadar nano CA enzimi sentezi ve nano CA enzimiyle CO₂'nin bikarbonata dönüşümüne ilişkin çalışma bulunmadığından, elde edilen verilerin literatürle karşılaştırma olanağı olmamıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, CO₂'nin tutuklanması ve dönüşümü yine nano enzimlerle ele alınmış ancak farklı bir açıdan değerlendirilmiştir. Bu aşamada, CO₂'nin metanole dönüşümü oksidoredüktaz enzim grubuyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalardan farklı olarak, FateDH, FaldDH ve ADH enzimleri ANADOLUCA metaduna göre konjugasyonla üçlü enzim içeren tek bir nano enzim şeklinde sentezlenmiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, her bir aşamada, sistemde elektron sağlayıcısı olarak görev yapacak NADH koenzimine ihtiyaç duyulmaktadır. CO₂'nin metanole dönüşüm sırasında, enzimatik dönüşümün gerçekleşmesi için her seferinde dışarıdan NADH eklenmesi ve reaksiyon sonunda da NADH'ın rejenerasyonu zaman alıcı ve maliyetli bir süreçtir. Bu aşamada yapılan çalışmalarla, CO₂'nin metanole dönüşümünün enzimlerle gerçekleştirilmesi ancak, tekrar kullanılabilirliğin olması ve geniş bir skalada çalışabilirlik adına enzimler nanoboyutta multi nano enzim sistemi olarak sentezlenmiştir. Enzimatik dönüşüm sisteminde, elektron

sağlayıcısının sisteme sürekli olarak dışarıdan verilmesini engellemek ve bu işlemi tek basamakta yapmak için, ANADOLUCA metoduna göre, rutenyum tabanlı aminoasit monomere NADH konjuge edilmiştir. Bu konjugat, nano enzim sentezi sırasında multi nano enzimle etkileştirilerek, aynı nano enzim yapısında hem multi enzimlerin hem de elektron sağlayıcısı NADH'ın bir arada bulunduğu bir sistem geliştirilmiştir. Böylelikle geliştirilen multi nano enzim yapısıyla, NADH elektron sağlayıcısının sürekli sisteme dışarıdan eklenmesi ve rejenerasyon basamağı elimine edilmiştir. Sentezlenen multi nano enzim sistemi kriyojel kolona çapraz bağlanarak, sistemden CO₂ geçirilmesiyle CO₂'nin multi nano enzim sistemiyle metanole dönüşümü incelenmiştir. Sentezlenen multi nano enzim sisteminin CO₂'nin metanole dönüşümü etkinliği, foto duyarlı kriyojellerin kullanımı ve oksidoredüktaz enzimlerinin kriyojele bağlanmasıyla sentezlenen kriyojel kolonlarla dönüşümle karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, multi nano enzim içeren kriyojel kolonların CO₂'nin metanole dönüşümü reaksiyonları için tekrar tekrar kullanılabilir, dışarıdan NADH eklenmesi ve bunun yanında ekstra rejenerasyon sistemi gerektirmeyen sistemler olduğu bulunmuştur. Literatürde bu yöndeki çalışmalar incelendiğinde [94-96], FateDH, FaldDH ve ADH enzimleri farklı destek materyalleri üzerine bağlanmış ya da enkapsüle edilmiştir. Hazırlanan materyallerden sürekli CO₂ geçirilerek sistemde elde edilen metanol miktarı bulunmuştur. Bu çalışmaya ek olarak, Obert ve ark. [93] silika sol jel matrisleri içerisine FateDAH, FaldDH ve ADH enzimlerini immobilize ederek sistemden CO₂ geçirmişler ve elde edilen metanol miktarını bulmuşlardır. Bu çalışmada da elektron donörü sistemden her defasında geçirilmiştir. Ancak, bu sistemlerin bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar, CO₂ geçirilmeden önce sistemden NADH çözeltisi geçirilmesi zorunluluğu ve reaksiyon sonrasında da ekstra rejenerasyon basamağının olmasıdır. Bunlar dönüşüm sisteminde maliyetli olmakla birlikte, analizin uzun sürede tamamlanmasına neden olmaktadır. Bunun yanında hazırlanan dönüşüm sistemleri tek kullanımlık sistemlerdir. Dönüşüm sonrasında elde edilen metanol, günümüzde otomotiv sektöründen, kimyasal endüstriye kadar pek çok alanda kullanılmaktadır ve bir çok maddenin sentezi veya üretimi için hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında yapılan çalışmalarla geliştirilen nano multi enzim içeren

kriyojel kolonlar literatürde bu yönde sentezlenen malzemelere göre üstünlük göstermekte ve endüstriyel alanda da kullanılabilir yöndedir.

Tez çalışmasının üçüncü aşamasında, CO₂ tutuklayıcı ve dönüştürücü sistemler olarak doğal bir sistem olan fotosentez üzerinden yola çıkılmıştır. Bitkilerin fotosentez sırasında, CO₂'yi büyük moleküllü şekerlere dönüştürücü enzim sistemlerinin çalışma prensibiyle mimik nano enzim sistemi geliştirilmiştir. Fotosentezdeki Krebs döngüsünde yer alan RuBisCo enziminin CO₂ tutuklaması ve CO₂'den yola çıkılarak şeker molekülleri sentezine yönelik CO₂'yi tutucu ve dönüştürücü yeni bir nano enzim sistemi geliştirilmiştir. Bu bağlamda; RuBisCo enzimi 93 nm olarak nano boyutta sentezlenmiştir. Sentezlenen nano RuBisCo enzimiyle CO₂ substratı varlığında 3-fosfogliseraldehit oluşumu incelenmiştir. Literatürde RuBisCo enzim aktivitesi radyoaktif yöntemlerle incelenmektedir. Bu yöntemler hem tehlikeli hem de pahalı yöntemler olmakla birlikte uygulama kolaylığı sunmamaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, spektrofotometrik yöntemlerle enzim aktivitesi incelenmektedir. Nano RuBisCo enzimi literatürde ilk defa sentezlenmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar ticari RuBisCo enzimiyle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında, ticari RuBisCo enziminin bağıl aktivite değeri % 36 U (μmoldak⁻¹) olarak ve nano RuBisCo enzimine ait spektrofotometrik yöntemle bulunan enzim aktivite değeri ise % 11.62 U (μmoldak⁻¹) olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre, sentezlenen nano RuBisCo enziminin de CO₂'nin dönüşümünü katalizlediği görülmektedir. Böylelikle, hem nano formatta RuBisCo enzimi sentezlenmiş hem de spektroskopik yöntemle enzim aktivite tayini yapılmıştır. Sentezlenen nano RuBisCo enziminin 10 döngü için tekrar tekrar kullanılabilir olması ve yine diğer nano enzimler için farklı pH aralıklarında çalışabilir olması bu enzimleri uygulama alanında ön plana çıkarmaktadır. Nano RuBisCo enzimi sentezi yanında, tez kapsamındaki çalışmalarda, ıspanaktan RuBisCo enzimi izole edilerek bu enzimin de aktivitesi incelenmiş ve nano formata getirilmiştir. Aynı zamanda nano yapılı izole enzimin de spektrofotometrik yöntemle enzim aktivitesi belirlenmiş ve bu enzimin de CO₂'nin dönüşüm reaksiyonunda tekrar tekrar kullanılabilir enzim yapısında olduğu bulunmuştur. Literatürde nano RuBisCO enzimi sentezi ve CO₂ tutucu olarak kullanıldığı benzer çalışmalar

olmadığından, elde edilen verilerin literatürle karşılaştırma olanağı olmamıştır. Bu bölümdeki çalışmalarla, CO₂' nin diğer dönüşümlerden farklı olarak şekerlere dönüşümü sentezlenen mimik nano enzim sistemiyle incelenmiştir. Tekrar kullanılabilir, kolay uygulanabilir ve kolay tayin edilebilir sistem olması açısından, bu çalışma da endüstriyel boyuta taşınabilir niteliktedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirilecek olursa, CO₂ tutucu ve dönüştürücü olarak sentezlenen biyo mimik nano enzimlerle, CO₂' nin diğer faydalı kimyasallara dönüşümü, etkili, kolay uygulanabilir ve kolay tayin edilebilir sistemlerdir.

5. KAYNAKLAR

- [1] J. C. Miller, R. Serrato, J. M. Represas-Cardenas ve G. Kundahl, The Handbook of Nanotechnology, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [2] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/nanoteknoloji.pdf>
- [3] Anonim, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Nanoteknoloji>
- [4] History of Nanotehcnoology, [Çevrimiçi]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_nanotechnology. [20 Kasım 2012 tarihinde erişilmiştir].
- [5] F V. T. Liveri, Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006.
- [6] B. Bhushan, Handbook of nanotechnology, Germany: Springer, 2004.
- [7] http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi150/d150_3138.pdf
- [8] L. Wolfgang. Bottom-up Methods for Making Nanotechnology Products. Erişim 22 Ekim 2007.
- [9] Z. H. Wang, C. J. Choi, B. K. Kim, J. C. Kim, Z. D. Zhang. “Characterization of Fe-Co alloyed nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation.” *Materials Letters*, **57**, 3560-3564, 2003.
- [10] M. Winterer, V. Srdic, R. Djenadic, A. Kompch, T. E. Weirich “*Chemical vapor synthesis of nanocrystalline perovskites using laser flash evaporation of low volatility solid precursors*” *Rec. Sci. Instr.* **78**, 133903-133908, 2007.
- [11] J. S. Lee , S. S. Im, C. W. Lee, J. H. Yu, Y. H. Choa, S.T. Oh. “Hollow nanoparticles of β -iron oxide synthesized by chemical vapor condensation” *Journal of Nanoparticle Research*, **6**, 627-631, 2004.
- [12] Z. H. Wang, C. J. Choi, B. K. Kim, J. C. Kim, Z. D. Zhang. “Microstructure and magnetic property of Fe-Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process” *J. of All. and Comp.* **351**, 319-323, 2003.

- [13] C.J. Choi, X. L. Dong, B.K. Kim. "Characterization of Fe and Co nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation, *Scripta Mater*, **44**, 2225-2229, 2001.
- [14] D. Li, C. J. Choi, J. H. Yu, B. K. Kim, Z. D. Zhang. "Nanocrystalline α -Fe and ϵ -Fe₃N particles prepared by chemical vapor condensation process" *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **283**, 8-15, 2004.
- [15] C. J. Choi, O. Tolochko, B. K. Kim. "Preparation of iron nanoparticles by chemical vapor condensation" *Materials Letter*, **56**, 289-294, 2002.
- [16] S. S. Jung, Y. S. Kang, J. S. Lee. "The optimization of hydrogen reduction process for mass production of Fe-8wt%Ni nanoalloy powder" *Material Science Forum*, **534**, 153-156, 2007.
- [17] M. H. Khedr, A. A. Farghali, A. A. AbdelKhalek. "Microstructure, kinetics and mechanisms of nano-crystalline CuFe₂O₄ reduction in flowing hydrogen at 300-600°C for the production of metallic nano-wires" *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **78**, 1-6, 2007.
- [18] Y. Hu, C. Li, F. Gu, Y. Zhao. "Facile flame synthesis and photoluminescent properties of core/shell TiO₂/SiO₂ nanoparticles." *Journal of Alloys and Compounds*, **432**, 5-9, 2007.
- [19] H. Chang, J. H Park, H. D. Jang. "Flame synthesis of silica nanoparticles by adopting two fluid nozzle spray." *Colloids and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **187**, 2007.
- [20] S. Gürmen, S. Stopic, B. Friedrich. "Synthesis of nanosized spherical cobalt powder by ultrasonic spray pyrolysis." *Mater. Res. Bull.* **41**, 1882-1890, 2006.
- [21] R. Say Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology. World Intellectual Property Organization-PatentScope (Pub. No.: WO/2011/070402; Int. Appl. No.: PCT/IB2009.055707.
- [22] R. Say, A. Ersöz, D. Hür, F. Yılmaz, A. Denizli, A. Atılır Özcan, S. Emir Diltemiz, S. Yazar, Ö. Biçen, S. Büyüktiryaki, R. Keçili, G. Saka, T. Fındık. "Photosensitive Aminoacid-Monomer Linkage And

- Bioconjugation Applications In Life Sciences And Biotechnology”. ABD Patent WO/2011/070402, 16. 06. 2011.
- [23] Ö. B. Ünlüer, Ö. Tomsuk, A. Ersöz, H. Sivas, R. Say. “Novel nanoimaging approach: Antibodious polymeric nanolabel for intracellular alpha-fetoprotein targeted monitoring.” *Biotechnology Progress*, **29** (2), 472-479, 2013.
- [24] R. Say, S. Emir Diltemiz, S. Çelik, A. Ersöz. “Nanolabel for TNF- α determination” *Applied Surface Science*, **275**, 233-238, 2013.
- [25] E. Zıyan. “*Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (Pyrus communis)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi*” Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, 1998.
- [26] <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/enzymes.html>
- [27] Anonim, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim>
- [28] D. E. Koshland "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44** (2), 98–104. 1958.
- [29] A. Vasella, G.J. Davies, M. Bohm. "Glycosidase mechanisms". *Curr Opin Chem Biol.* **6** (5), 619–629, 2002.
- [30] R. Boyer. “Concepts in Biochemistry” (2nd ed. bas.). New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, Inc. ss. 137–138. ISBN 0-470-00379-0.
- [31] Anonim, <http://ibguides.com/biology/notes/enzymes-hl>
- [32] H. Ako, W. K. Nip. “Enzyme Classification and Nomenclature.” *Food Biochemistry and Food Processing*, 135–154, 2007.
- [33] Özler A. (2009). *Malatya kayısısından (prunus armeniaca l.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [34] M. Altınışik. “Enzimler”. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>, 1999.
- [35] A. Cornish-Bowden, “One hundred years of Michaelis–Menten kinetics,” *Perspectives in Science*, **4**, 3-9, 2015.

- [36] A. K. Johnson, S. R. Goody. "The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper" *Biochemistry*. **50** (39), 8264–8269, 2011.
- [37] G. S. Eadie. "The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine". *Journal of Biological Chemistry* **146**, 85–93, 1942.
- [38] B. H. J. Hofstee. "Non-Inverted Versus Inverted Plots in Enzyme Kinetics". *Nature* **184** (4695), 1296–1298, 1959.
- [39] I. Puscas, C. Puscas, M. Coltau, M. Baican, G. Domuta. "The serum of carcinoma patients powerfully activates carbonic anhydrase II." *Experimental Oncology*, **22**, 162-164, 2000.
- [40] <http://pharmacology.med.ufl.edu/faculty/emeritus-faculty/about-dr-silverman/dr-silvermans-personal-web-page/>
- [41] S. Lindskog. "Structure and mechanism of carbonic anhydrase" *Pharmacology & Therapeutics*, **74**, (1), 1-20, 1997.
- [42] Anonim, https://en.wikipedia.org/wiki/Carbonic_anhydrase
- [43] B. C. Tripp, K. Smith, J. G. Ferry. "Minireview: Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme." *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (52), 48615-48618, 2001.
- [44] K. M. Wilbur, N.G. Anderson. "Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase." *J Biol Chem*, **176**, 147–154, 1948.
- [45] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, "Conversion of a protein to homogenous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with diphosphorhodium(I) moiety." *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 306-307, 1978.
- [46] R. E. Tashian, S. K. Riggs, L. Yu. "Characterization of a mutant human erythrocyte carbonic anhydrase: Carbonic anhydrase IcGuam: The amino acid substitution and carboxylesterase and hydratase activities" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **117**, (2), 320-327, 1966.
- [47] CA 02813640. Patent. *Carbonic Anhydrase system and process for treating a CO₂ containing gas*. 2013-04-17.
- [48] J. K. J. Yong, J. Cui, C. K. Lun, S. W. Geoffrey, C. Frank, S. E. Kentish. "Surface Engineering of Polypropylene Membranes with Carbonic

Anhydrase-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for Improved Carbon Dioxide Hydration” *Langmuir*, 2015. (Baskıda)

- [49] X. Ji, Z. Su, P. Wang, G. Ma, S. Zhang. “Tethering of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Inside Hollow Nanofibers for High-Yield Synthesis of Methanol from Carbon Dioxide Catalyzed by Coencapsulated Multienzymes.” *ACS Nano*, **9** (4), 4600-4610, 2015.
- [50] J. Hou, G. Dong, B. Xiao, C. Malassigne, V. Chen. “Preparation of titania based biocatalytic nanoparticles and membranes for CO₂ conversion” *Journal of Materials Chemistry A: Materials for Energy and Sustainability* **3**, (7), 3332-3342, 2015.
- [51] J. G. Ferry. "Formate dehydrogenase". *FEMS Microbiol. Rev.* **7** (3–4), 377–82, 1990.
- [52] S. H. Lee, J. Ryu, D. H. Nam, C.B. Park. “Photoenzymatic synthesis through sustainable NADH regeneration by SiO₂-supported quantum dots.” *Chem. Commun.* **47**, 4643–4645, 2011.
- [53] V. O. Popov, V.S. Lamzin. “NAD⁺-dependent formate dehydrogenase” *Biochem. J.* **301**, 625–643, 1994.
- [54] V. I. Tishkov, V. O. Popov. “Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase” *Biochem.* **69**, 1252–1267, 2004.
- [55] H. Schutte, J. Flossdorf, H. Sahm, M. Kula. “Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*” *Eur. J. Biochem.* **62**, 151–160, 1976.
- [56] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2JHF>
- [57] M. H. Kim, S. Park, Y. H. Kim, K. Won, S. H. Lee. “ Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates.” *Journal of Molecular Catalysis:B Enzymatic*, **97**, 209-214, 2013.
- [58] T. Pourmotabbed, D. J. Creighton. “Substrate Specificity of Bovine Liver Formaldehyde Dehydrogenase” *J. Biol. Chem.* **261**, 14240–14244, 1986.
- [59] N. Tanaka, Y. Kusakabe, K. Ito, T. Yoshimoto, K. T. Nakamura. “Crystal structure of glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase” *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 211–218, 2003.

- [60] N. Tanaka, Y. Kusakabe, K. Ito, T. Yoshimoto, K.T. Nakamura. "Crystal Structure of Formaldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the Structural Origin of the Tightly Bound Cofactor in Nicotinoprotein Dehydrogenases" *J. Mol. Biol.* **324**, 519–533, 2002.
- [61] V. Leskovac. "The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res.* **2**, 481–494, 2002.
- [62] E. Negelein, H.J. Wulff. "Diphosphopyridinproteid (Alcohol, Acetaldehyde reductase)" *Biochem. Z.* **293**, 351, 1937.
- [63] S. Hammes-Schiffer, S. J. Benkovic "Relating protein motion to catalysis". *Annual Review of Biochemistry* **75**, 519–41, 2006.
- [64] <http://sites.udel.edu/bahnson/research/>
- [65] Cooper, M. Geoffrey. "10.The Chloroplast Genome". *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). Washington, D.C: ASM Press. ISBN 0-87893-106-6. 2000.
- [66] U. Feller, I. Anders, T. Mae "Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated." *J. Exp. Bot.*, **59**, (7), 1615–24, 2008.
- [67] P. M. Curmi, D. Cascio, R. M. Sweet, D. Eisenberg, H. Schreuder "Crystal structure of the unactivated form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tobacco refined at 2.0-Å resolution." *J. Biol. Chem.*, **267** (24), 16980–9, 1992.
- [68] Anonim, <https://bs.wikipedia.org/wiki/Rubisco#/media/File:Rubisco.png>
- [69] A. Dhingra, A. R. Portis, H. Daniell. "Enhanced Translation Of A Chloroplast-Expressed Rbcs Gene Restores Small Subunit Levels And Photosynthesis In Nuclearrbcs Antisense Plants." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, (16), 6315–20, 2004
- [70] M. Yoon, J. J. Putterill, G. S. Ross, W. A. Laing. "Determination Of The Relative Expression Levels Of Rubisco Small Subunit Genes In Arabidopsis By Rapid Amplification Of Cdna Ends. *Anal. Biochem.* 291 (2), 237–44, 2001.
- [71] <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/organic/rubisco.html>

- [72] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko. "20. The Calvin Cycle and the Pentose Phosphate Pathway". *Biochemistry* (5th ed.). San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-3051-0, 2002.
- [73] H. Farazdaghi. "The single-process biochemical reaction of Rubisco: a unified theory and model with the effects of irradiance, CO₂ and rate-limiting step on the kinetics of C₃ and C₄ photosynthesis from gas exchange." *BioSystems* **103** (2), 265–284, 2011.
- [74] A. R. Portis. "Rubisco Activase - Rubisco's Catalytic Chaperone." *Photosyn. Res.* **75** (1), 11–27, 2003.
- [75] R. Say, R. Keçili, Ö. Biçen, F. Y. Şişman, D. Hür, A. Denizli, A. Ersöz, A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase, *Process Biochemistry*, **46** (8), 1688-1692, 2011.
- [76] R. Say, E. B. Özkütük, Ö. B. Ünlüer, D. Uğurağ, A. Ersöz. "Nano anti-tumor necrosis factor-alpha based potentiometric sensor for tumor necrosis factor-alpha detection" *Sensors and Actuators B: Chemical*, **209** (31), 864-869, 2015.
- [77] R. Say, E. Çınar, Ö. B. Ünlüer, A. Ersöz. "Reusable Pectinase Nano Polymeric Particles." *J Biocatal Biotransformation* **3** (1), 2014.
- [78] R. Say, R. H. Şenay, Ö. Biçen, A. Ersöz, F. Ş. Yılmaz, S. Akgöl, A. Denizli "Polymeric amylase nanoparticles as a new semi-synthetic enzyme system for hydrolysis of starch" *Materials Science and Engineering: C*, **33** (4), 1900-1906, 2013.
- [79] R. Say, Ö. B. Ünlüer, A. Ersöz, C. Öziç. "Reusable nanocopy machine particles for the replication of DNA." *Biotechnology Progress*, **31** (1), 119-123, 2015.
- [80] G.A. Olah, A. Goeppert, G.K.S. Prakash. "Chemical recycling of carbon dioxide to methanol and dimethyl ether: from greenhouse gas to renewable, environmentally carbon neutral fuels and synthetic hydrocarbons". *J. Org. Chem.* **74**, 487–498, 2009.
- [81] A. Boddien, F. Gärtner, C. Federsel, I. Piras, H. Junge, R. Jackstell. "Catalytic Utilization of Carbon Dioxide: Actual Status and Perspectives, in: K. Ding, L.-X. Dai (Eds.), *Organic Chemistry -Breakthroughs and*

Perspective, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 685–724, 2012.

- [82] E. J. Beckman. “Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing” *J. Supercrit. Fluids*. **28**, 121–191, 2004.
- [83] W. Leitner. “Designed to dissolve” *Nature*. **405**, 129–130, 2000.
- [84] S. Keskin, D. Kayrak Talay, U. Akman, Ö. Hortaçsu. “A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications.” *J. Supercrit. Fluids*. **43**, 150–180, 2007.
- [85] T. A. Boden, G. Marland, R. J. Andres. “Global, Regional, and National Fossil-Fuel CO₂ Emissions.” Carbon Dioxide Information Analysis Center Oak Ridge National Laboratory U.S. Dep. Energy, 2010. Available at :http://cdiac.ornl.gov/ftp/ndp030/global.1751_2008.ems.
- [86] G.A. Olah, A. Goeppert, G.K.S. Prakash, Beyond oil and gas : the methanol economy, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Los Angeles, 2006.
- [87] Anonim,<https://www.boundless.com/chemistry/textbooks/boundless-chemistry-textbook/chemical-kinetics-13/catalysis-102/homogeneous-catalysis-431-4699/>
- [88] A. Dibenedetto, A. Angelini, P. Stufano “Use of carbon dioxide as feedstock for chemicals and fuels: homogeneous and heterogeneous catalysis”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89 (3), 334–353, 2013.
- [89] S. Kuwabata, R. Tsuda, H. Yoneyama. “Electrochemical Conversion of Carbon Dioxide to Methanol with the Assistance of Formate Dehydrogenase and Methanol Dehydrogenase as Biocatalysts” *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5437–5443, 1994.
- [90] B. Lu, X. Wang, Y. Li, J. Sun, J. Zhao, Q. Cai. “Electrochemical conversion of CO₂ into dimethyl carbonate in a functionalized ionic liquid”, *Journal of CO₂ Utilization*, 3–4 (98–101), 2013.
- [91] J. A. Tossell. “Calculation of the properties of molecules in the pyridine catalyst system for the photochemical conversion of CO₂ to methanol”, *Computational and Theoretical Chemistry*, 977 (1–3), 123–127, 2011.

- [92] S. Abanades, H. I. Villafan-Vidales. "CO₂ and H₂O conversion to solar fuels via two-step solar thermochemical looping using iron oxide redox pair". *Chemical Engineering Journal*, **175**, 368–375, 2011.
- [93] R. Obert, B. C. Dave. "Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide to Methanol: Enhanced Methanol Production in Silica Sol–Gel Matrices" *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 12192–12193, 1999.
- [94] B. El-zahab, D. Donnelly, P. Wang. "Particle-Tethered NADH for Production of Methanol From CO₂ catalyzed by Coimmobilized Enzymes" *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 508–514, 2008.
- [95] Q. Sun, Y. Jiang, Z. Jiang, L. Zhang, X. Sun, J. Li. "Green and Efficient Conversion of CO₂ to Methanol by Biomimetic Coimmobilization of Three Dehydrogenases in Protamine-Templated Titania." *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**, 4210–4215, 2009.
- [96] S. Xu, Y. Lu, J. Li, Z. Jiang, H. Wu. "Efficient Conversion of CO₂ to Methanol Catalyzed by Three Dehydrogenases Co-encapsulated in an Alginate–Silica (ALG–SiO₂) Hybrid Gel" *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**, 4567–4573, 2006.
- [97] A. Dibenedetto, P. Stufano, W. Macyk, T. Baran, C. Fragale, M. Costa. "Hybrid Technologies for an Enhanced Carbon Recycling Based on the Enzymatic Reduction of CO₂ to Methanol in Water: Chemical and Photochemical NADH Regeneration" *ChemSusChem.* **5**, 373–378, 2012.
- [98] T. Matsuda, R. Yamanaka, K. Nakamura. "Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction" *Tetrahedron: Asymmetry.* **20**, 513–557, 2009.
- [99] T. Schmidt, C. Michalik, M. Zavrel, A. Spiess, W. Marquardt, M. B. Ansorge-Schumacher. "Mechanistic model for prediction of formate dehydrogenase kinetics under industrially relevant conditions" *Biotechnol. Prog.* **26**, 73–8, 2010.
- [100] A. Salic, M. Ivankovic, E. Ferk, B. Zelic. "ADH based NAD⁺ regeneration in a microreactor" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**, 1721–1729, 2013.

- [101] A.V. Presecki, D. Vasic-Racki. "Mathematical modelling of the dehydrogenase catalyzed hexanol oxidation with coenzyme regeneration by NADH oxidase" *Process Biochem.* **44**, 54–61, 2009.
- [102] I. Ali, B. Soomro, S. Omanovic. "Electrochemical regeneration of NADH on a glassy carbon electrode surface: The influence of electrolysis potential" *Electrochem. Commun.* **13**, 562–565, 2011.
- [103] X. Tong, B. El-zahab, X. Zhao, Y. Liu, P. Wang. "Enzymatic Synthesis of L -Lactic Acid From Carbon Dioxide and Ethanol With an Inherent Cofactor Regeneration Cycle" *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 465–469, 2011.
- [104] D. Zhu, Y. Yang, L. Hua. "Stereoselective Enzymatic Synthesis of Chiral Alcohols with the Use of a Carbonyl Reductase from *Candida magnoliae* with Anti-Prelog Enantioselectivity" *J. Org. Chem.* **71**, 4202–4205, 2006.
- [105] C. Rodriguez, G. de Gonzalo, D. E. T. Pazmino, M. W. Fraaije, V. Gotor. "Selective Baeyer–Villiger oxidation of racemic ketones in aqueous–organic media catalyzed by phenylacetone monooxygenase" *Tetrahedron: Asymmetry.* **19**, 197–203, 2008.
- [106] J. Liu, M. Antonietti. "Bioinspired NADH regeneration by carbon nitride photocatalysis using diatom templates" *Energy Environ. Sci.* **6**, 1486–1493, 2013.
- [107] E. Siu, K. Won, C. B. Park. "Electrochemical Regeneration of NADH Using Conductive Vanadia-Silica Xerogels" *Biotechnol. Prog.* **23**, 293–296, 2007.
- [108] A. Damian, S. Omanovic. "Interactive Adsorption Behavior of NAD⁺ at a Gold Electrode Surface" *Langmuir*, **23**, 3162–3171, 2007.
- [109] V. Höllrigl, K. Otto, A. Schmid. "Electroenzymatic Asymmetric Reduction of rac-3-Methylcyclo-hexanone to (1S,3S) -3-Methylcyclohexanol in Organic/Aqueous Media Catalyzed by a Thermophilic Alcohol Dehydrogenase" *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1337–1340, 2007.
- [110] I. Ali, M. Mcarthur, N. Hordy, S. Coulombe, S. Omanovic. "Electrochemical Regeneration of the Cofactor NADH Employing a Carbon Nanofibers Cathode" *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**, 7675–7683, 2012.

- [111] S. H. Lee, J. Ryu, D.H. Nam, C.B. Park. "Photoenzymatic synthesis through sustainable NADH regeneration by SiO₂-supported quantum dots." *Chem. Commun.* **47**, 4643–4645, 2011.
- [112] I. V. Lozinsky, Y. I. Galaev, M. F. Plieva, I. N. Savina, H. Jungvid, B. Mattiasson, "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest" *Trends in Biotechnology*, **21**, 445-451, 2003.
- [113] K. Yao, S. Shen, J. Yun, L. Wang, X. He, X. Yu. "Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions" *Chemical Engineering Science*, **61**, 6701 – 6708, 2006.
- [114] Ö. Biçen, *Moleküler baskılanmış polimer tabanlı kriyojel ayırma sistemleri ve biyo-ayırma uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2009.
- [115] P. Cutler. "Affinity chromatography" *Methods in molecular biology Clifton, N.J.,* **59**, 1996.
- [116] M. Pistolozzi, C. Fortugno, C. Franchini, F. Corbo, M. Muraglia, M. Roy, G.Felix, C. Bertucci. "Species-dependent binding of tocinide analogues to albumin: Affinity chromatography and circular dichroism study" *Journal of Chromatography B*, **968**, 69-78, 2014.
- [117] S. Magdeldin, A. Moser 2012. "Affinity Chromatography: Principles and Applications," *Affinity Chromatography*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0325-7, 3-28.
- [118] F. Svec, J. M. J. Frechet. "Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media." *Anal. Chem.*, **64** (7), 820-822, 1992.
- [119] B.A Wallace, Robert W. Janes. "Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics" *Current Opinion in Chemical Biology*, **5** (5), 567-571, 2011.
- [120] G. Siligardi, R. Hussain. "Applications of Circular Dichroism. Reference Module in Chemistry." *Molecular Sciences and Chemical Engineering, from Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* **9**, 14, 2010.

- [121] <http://www.derilkim.com/urunler/analitik-cihazlar/cd-spektrometre/2-kiral-molekuller/>
- [122] N. Solomon, A. T. Wecksler, G. Schenk, T. R. Holman. "Kinetic and Spectroscopic Studies of N694C Lipoxygenase: A Probe of the Substrate Activation Mechanism of a Non-Heme Ferric Enzyme". *J. Amer. Chem. Soc.* **129** (24): 7531–7537, 2007.
- [123] N. Kōji, N. Berova, R. Woody. 1994. *Circular dichroism: principles and applications*. VCH. p. 473. ISBN 978-1-56081-618-8. Retrieved 29 April 2011.
- [124] E. I. Solomon, A. B. P. Lever (2006). *Inorganic electronic structure and spectroscopy*. Wiley-Interscience. p. 78. ISBN 978-0-471-97124-5. Retrieved 29 April 2011.
- [125] L. Whitmore, B.A. Wallace "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases". *Biopolymers* **89** (5): 392–400, 2008.
- [126] M. M. Bradford, "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**, 248–254, 1976.
- [127] Ş. Beydemir, M. Çiftçi, İ. Özmen, M. E. Büyük Okuroglu, H. Özdemir, Ö.İ. Küfrevioğlu. "Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo" *Pharmacological Research*, **42**, 2, 187-191, 2000.
- [128] S. B. Ceyhun, M. Şentürk, E. Yerlikaya, O. Erdoğan, Ö. İ. Küfrevioğlu, D. Ekinici. "Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity" *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **32**, 1, 69-74, 2011.
- [129] K. Kumar, R.W. King, P.R. Carey. "Resonance Raman studies on some carbonic anhydrase-aromatic sulfonamide complexes. *Biochemistry*, 1976.
- [130] E.D. Kaya, H. Söyüt, Ş. Beydemir. "The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus*

- aurata) gills” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **39**, 2, 825-832, 2015.
- [131] S.Chakrabarti, S. Bhattacharya, S. K. Bhattacharya. “A nonradioactive assay method for determination of enzymatic activity of d-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **52** (3), 179-187, 2002.
- [132] D. S. Thomas, V. S. Leonid, D. B. Nola. “Technical communication Photometric method for routine determination of kcat and carbamylation of rubisco.” *Photosynthesis Research* **28**, 41-48, 1991.
- [133] R. Demirdağ, V. Çomaklı, M. Şentürk, D. Ekinçi, Ö. İ. Küfrevioğlu, C. T. Supuran. “Purification and characterization of carbonic anhydrase from sheep kidney and effects of sulfonamides on enzyme activity” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21** (6), 1522-1525, 2013.