



**Fe₃O₄@SiO₂@APTES DESTEKLİ HORSERADISH
PEROKSİDAZ (HRP) ENZİM KATALİZÖRÜNÜN
ÜRETİMİ VE HİDROKSİTİROZOLÜN OKSİDATİF
POLİMERİZASYON SENTEZ AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Gülşah AKTAŞ

**Danışman: Prof. Dr. Fatih SEVİM
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı
2024**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**Fe₃O₄@SiO₂@APTES DESTEKLİ HORSERADISH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİM
KATALİZÖRÜNÜN ÜRETİMİ VE HİDROKSİTİROZOLÜN OKSİDATİF
POLİMERİZASYON SENTEZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

(Production of Fe₃O₄@SiO₂@APTES Supported Horseradish Peroxidase (HRP) Enzyme
Catalyst and Determination of the Oxidative Polymerization Synthesis Activities of
Hydroxytyrosol)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşah AKTAŞ

Danışman: Prof. Dr. Fatih SEVİM

Erzurum
Ocak, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Gülşah AKTAŞ tarafından hazırlanan “Fe₃O₄@SiO₂@APTES Destekli Horseradish Peroksidaz (HRP) Enzim Katalizörünün Üretimi Ve Hidroksitirozolün Oksidatif Polimerizasyon Sentez Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışması 11 / 01 / 2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Taner TEKİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Fatih SEVİM <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Ali Sinan DİKE <i>Adana Alparslan Türkeş Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2022-10473

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Fatih SEVİM danışmanlığında sunulan “Fe₃O₄@SiO₂@APTES Destekli Horseradish Peroksidaz (HRP) Enzim Katalizörünün Üretimi Ve Hidroksitirozolün Oksidatif Polimerizasyon Sentez Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	%4	30
Kuramsal Temeller	%15	30
Materyal ve Metot	%10	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	%3	20
Sonuçlar ve Öneriler	%0	20
Tezin Geneli	%11	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Gülşah AKTAŞ	Prof. Dr. Fatih SEVİM
11.1.2024	11.1.2024
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak yapmış olduğum bu çalışmada bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, ilgi ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatih SEVİM'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca değerli yardımlarını gördüğüm Kimya Mühendisliği Öğretim Üyeleri ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Analiz yorumlamalarım sırasında desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ersen GÖKTÜRK'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan babam, annem ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca tezimi FYL-2022-10473 proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Gülşah AKTAŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fe₃O₄@SiO₂@APTES DESTEKLİ HORSERADISH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİM KATALİZÖRÜNÜN ÜRETİMİ VE HİDROKSİTİROZOLÜN OKSİDATİF POLİMERİZASYON SENTEZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Gülşah AKTAŞ

Danışman: Prof. Dr. Fatih SEVİM

Amaç: Enzim katalizör kullanımı son yıllarda tercih edilen bir yöntemdir fakat reaksiyon sonunda katalizörün geri kazanımı mümkün olmadığı için yüksek maliyete sebebiyet verir. Bu çalışmada Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP katalizörünün sentezlenmesi ile katalizörün geri kazanımı ve katalizörün Hidroksitirozolün polimerizasyonunda kullanılması ve polimerizasyon için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: İlk olarak, Fe₃O₄ nanoparçacıkları solvotermal yöntemi kullanılarak sentezlendi. Daha sonra Fe₃O₄ nanoparçacıklarının yüzeyi SiO₂ ile stöber yöntemi kullanılarak kaplandı ve Fe₃O₄@SiO₂ nanoparçacıkları sentezlendi. Silika kaplı Fe₃O₄ nanoparçacıklarını amin gruplarıyla işlevselleştirmek için 3-aminopropiltrietoksilan kullanıldı. Horseradish peroksidazı (HRP) amin gruplarına immobilize etmek için önce enzim ve amin grupları arasında azometin bağları oluşturması için çapraz bağlama yöntemiyle gluteraldehid kullanıldı ve son olarak HRP taşıyıcı yüzeyine immobilize edildi. Böylece enzim katalizör elde edildi. Sentezlenen bu katalizör enzimatik oksidatif polimerizasyon yöntemi ile hidroksitirozolün polimerleştirilmesinde kullanıldı.

Bulgular: Sentezlenen katalizöre SEM-EDS, FT-IR analizleri yapıldı ve sonuçlar literatürle karşılaştırıldı. Polimere SEM-EDS, FT-IR, Q-TOF, ¹H-NMR ve ZETA-SIZER analizleri yapıldı ve sonuçlar literatürle karşılaştırıldı.

Sonuç: Hidroksitirozolün polimerizasyonu başarıyla sentezlenmiş, polimerizasyon işlemi 25°C’de pH=5 olacak şekilde sulu asetat tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda enzim katalizörünün başarıyla sentezlendiği görülmektedir. Sentezlenen katalizör 10 kez kullanılmış ve polimerizasyon işlemi %73 verimle gerçekleşmiştir. Poli (HTX)’in molekül ağırlığı 30000 g/mol olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hidroksitirozol, Enzimatik polimerizasyon, HRP, Enzim katalizör, Immobilizasyon

Ocak 2024, 67 sayfa

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE

PRODUCTION OF $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$ SUPPORTED HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) ENZYME CATALYST AND DETERMINATION OF THE OXIDATIVE POLYMERIZATION SYNTHESIS ACTIVITIES OF HYDROXYTYROSOL

Gülşah AKTAŞ

Supervisor: Prof. Dr. Fatih SEVİM

Purpose: The use of enzyme catalysts has been a preferred method in recent years, but it causes high costs because it is not possible to recover the catalyst at the end of the reaction. In this study, it is aimed to synthesize the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}@GA@HRP$ catalyst, to recover the catalyst, to use the catalyst in the polymerization of Hydroxytyrosol and to determine the optimum working conditions for polymerization.

Method: First, Fe_3O_4 nanoparticles were synthesized using the solvothermal method. Then, the surface of Fe_3O_4 nanoparticles was coated with SiO_2 using the Stöber method and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles were synthesized. 3-aminopropyltriethoxysilane was used to functionalize silica-coated Fe_3O_4 nanoparticles with amine groups. To immobilize the amine moiety of horseradish peroxidase (HRP), first glutaraldehyde was used by cross-linking method to form azomethine bonds between the enzyme and amino groups, and finally it was immobilized on the HRP carrier surface. Thus, the enzyme catalyst was obtained. This synthesized catalyst was used in the polymerization of hydroxytyrosol by the enzymatic oxidative polymerization method.

Findings: SEM-EDS, FTIR analysis were performed on the synthesized catalyst and the results were compared with the literature. SEM-EDS, FT-IR, Q-TOF, ^1H -NMR and ZETASIZER analysis were performed on the polymer and the results were compared with the literature.

Results: The polymerization of hydroxytyrosol was successfully synthesized, and the polymerization process was carried out in aqueous acetate buffer at 25°C with $\text{pH} = 5$. As a result of the analyses, it is seen that the enzyme catalyst was successfully synthesized. The synthesized catalyst was used 10 times and the polymerization process was achieved with 73% efficiency. The molecular weight of poly (HTX) was found to be 30000 g/mol.

Keywords: Hydroxytyrosol, Enzymatic polymerization, HRP, Enzyme catalyst, Immobilization

January 2024, 67 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xi
GİRİŞ.....	1
Teze Genel Bakış ve Literatür Özeti.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	5
Enzimler	5
Enzimlerin genel özellikleri;	6
Enzimlerin sınıflandırılması.....	6
Horseradish Peroxidase (HRP)	6
Enzim immobilizasyonu.....	8
İmmobilizasyon metodları	8
Katalizörler.....	9
Aktivite.....	10
Seçicilik.....	10
Kararlılık	10
Nanokatalizörler.....	11
Demir oksit (Fe_3O_4).....	11
Demir oksit nanopartiküllerinin sentez yöntemleri.....	13
Silisyum Dioksit (SiO_2)	16
Polimerler.....	18
Enzimatik Polimerizasyon	19
Fenollerin enzimatik polimerizasyon mekanizması.....	20
Hidroksitirozol	20
MATERYAL VE METOD	23
Materyal	23

Yararlanılan alet ve cihazlar.....	23
Kullanılan kimyasallar	24
Metod	24
Fe ₃ O ₄ (manyetit) sentezi	24
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ sentezi.....	25
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES sentezi.....	26
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA sentezi	26
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA enzim immobilizasyonu	26
Manyetik Nanokatalizör ile Hidroksitirozolün Polimerizasyonu	27
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	29
Polimerizasyonun Optimum Şartlarının Belirlenmesi	29
Nanokompozitlerin ve Polimerin Taramalı Elektron Mikroskobu SEM-EDS Analizi ..	30
Fe ₃ O ₄ 'in SEM-EDS analizi	30
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 'in SEM-EDS analizi.....	31
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES'in SEM-EDS analizi.....	32
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA'nın SEM-EDS analizi	33
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA@HRP'ın SEM-EDS analizi.....	34
Polimerin SEM-EDS analizi	35
Nanopartiküllerin ve Polimerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi	36
Fe ₃ O ₄ 'ün FT-IR analizi	36
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 'in FT-IR analizi.....	37
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES'in FT-IR analizi.....	38
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA'nın FT-IR analizi	39
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA@HRP'nin FT-IR analizi	40
Polimerin FT-IR analizi	41
Polimerin Q-TOF LC/MS Analizi	43
Polimerin Çözünürlük Özellikleri	45
Polimerin Molekül Ağırlığı Tayini	45
Polimerin ¹ H-NMR Analizi	46
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
Sonuçlar.....	47
Öneriler	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Sentez Metotlarının Kıyaslanması.....	16
Tablo 2. Kristal ve Amorf SiO ₂ 'nin Fiziksel Özellikleri	18
Tablo 3. Polimerlerin Sınıflandırılması	19
Tablo 4. Deney Süresince Kullanılan Cihazlar.....	23
Tablo 5. Polimerizasyonun Optimum Şartlarının Belirlenmesi ve Polimer Verimi	29
Tablo 6. Mobil Fazlar İçin Çalışma Koşulları	44
Tablo 7. Hidroksitirosol Polimer Bileşiklerinin Q-TOF Analizi ile Tanımlanması	45
Tablo 8. Monomer ve Polimerin Çözünürlük Özellikleri.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzim-substrat ilişkisi ve aktif bölge gösterimi.....	5
Şekil 2. Horseradish bitkisi	7
Şekil 3. HRP enzimi çalışma mekanizması.....	7
Şekil 4. Bir reaksiyonun katalizli ve katalizsiz durumdaki potansiyel enerji değişimi.....	11
Şekil 5. Manyetitin kristal yapısı.....	12
Şekil 6. Manyetit örneği	12
Şekil 7. Tetrahedral alanların ferromanyetik ve oktahedral alanların antiferromanyetik (ferrimanyetik) davranışları	13
Şekil 8. Hidrotermal yöntemde sıvı-katı-solüsyon stratejisi	14
Şekil 9. SiO ₂ 'nin yapısı	17
Şekil 10. Polietilen'e ait polimer zinciri gösterimleri	19
Şekil 11. Hidroksitirozolün moleküler yapısı.....	21
Şekil 12. Fe ₃ O ₄ (manyetit) sentez prosesinin temsili gösterimi	25
Şekil 13. Sentezlenen Fe ₃ O ₄ 'ün (manyetit) manyetik özelliği	25
Şekil 14. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ sentez prosesinin temsili gösterimi	25
Şekil 15. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES sentez prosesinin temsili gösterimi.....	26
Şekil 16. Hidroksitirozolün polimerizasyonu.....	27
Şekil 17. Hidroksitirozolün polimerizasyonu.....	28
Şekil 18. Fe ₃ O ₄ 'e ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)	30
Şekil 19. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 'e ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)	31
Şekil 20. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES'e ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)	32
Şekil 21. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA'ya ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b).....	33
Şekil 22. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA@HRP'ye ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b).....	34
Şekil 23. Polimere ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)	35
Şekil 24. Fe ₃ O ₄ 'e ait FT-IR spektrumu	36
Şekil 25. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 'e ait FT-IR spektrumu	37
Şekil 26. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES'e ait FT-IR spektrumu	38
Şekil 27. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA'e ait FT-IR spektrumu.....	39
Şekil 28. Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @APTES@GA@HRP'ye ait FT-IR spektrumu	40
Şekil 29. Monomere ait FT-IR spektrumu	41

Şekil 30. Polimere ait FT-IR spektrumu	42
Şekil 31. Polimere ait Q-TOF LC/MS analizi (a-b-c)	43
Şekil 32. Polimere ait ^1H -NMR spektrumu.....	46



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

APTES	: 3-Aminopropiltrietoksisilan
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g/mol	: Molar kütle
GA	: Gluteraldehit
¹H-NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans
HRP	: Horseradish peroksidaz
m/z	: Kütle- Yük oranı
ml	: Mililitre
MNP	: Manyetik Nano Partikül
Mw	: Molekül Ağırlığı Ağırlık Ortalaması
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
PBS	: Fosfat tamponlu salin
Q-TOF	: Dört kutuplu uçuş süresi (QTOF) kütle spektrometresi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEOS	: Tetraetil ortosilikat
THF	: Tetrahidrofuran

GİRİŞ

Teze Genel Bakış ve Literatür Özeti

Günümüzde ilerleyen teknolojiyle beraber biyoteknolojik uygulamalara olan ilgi de gittikçe artmaktadır. Bu alanda üretilen biyomalzemelerin, toksik olmamaları, kimyasal açıdan kararlı olmaları, yüksek mekanik dayanıma sahip olmaları ve kanserojen etkiye sahip olmamaları gibi özelliklere sahip olması beklenir.

Son yıllarda biyopolimer sentezi de polimer kimyasında önemli çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. Biyopolimerler enzimatik ya da kimyasal yollarla sentezlenebilir fakat enzimatik polimerizasyon, toksik olmaması, yan ürün oluşturmaması, yüksek katalitik aktiviteye sahip olması ve özellikle çevre dostu bir uygulama olması sebebiyle yeşil kimya için umut vaad eden bir uygulama olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda kullanılan enzim katalizörler hem verimlilikleri hem de geleneksel kimyasal katalizörler ile üretilmesi zor olan polimerleri sentezlemesi gibi özelliklerinden ötürü yaygın olarak tercih edilmektedirler (Akkara et al., 1996). Özellikle peroksidazlar ve lakkazlar, fenolik grupların oksidasyonunu katalizlemeleri sayesinde önemli ölçüde tercih edilirler.

Yapmış olduğumuz bu çalışmamızda, enzim katalizörün sentez ortamından daha kolay ve yüksek verimle geri kazanımını sağlayacak çekirdek manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezlenmiştir. Fe_3O_4 'ün manyetik etkinliğinin korunması için sıvı ile temasını ortadan kaldıracak ayrıca etkin yüzey alanını arttıracak kabuk SiO_2 ve enzim (HRP) destekli nanokatalizörlerin üretimi ve bu katalizörlerin polimer sentezinde kullanımı üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Akkara ve arkadaşları (1996) anilin ve türevlerini HRP katalizörü eşliğinde polimerleştirmişlerdir. Sulu organik çözücüler ortamında anilinin HRP katalizörü ile gerçekleştirilen polimerizasyon veriminin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Gözlemlerine göre oluşan polimer yüksek oranda üçüncü derece doğrusal olmayan optik özellikler göstermiştir (Akkara et al. 1996).

Kobayashi ve arkadaşları (2005) HRP katalizörlüğünde gerçekleştirdikleri polimerizasyonunda P-n-alkilfenollerin sulu 1,4-dioksan ortamı kullanmışlardır ve bu polimerizasyon reaksiyonunda alkil grubunun zincir uzunluğu değiştirildiğinde (zincir uzunluğu 1'den 5'e yükseltilmiş) polimer veriminin değiştiği gözlemlenmiştir ve bu değişim polimer veriminde artış olarak kayıtlara geçmiştir (Kobayashi et al. 2005).

Akkara ve arkadaşları (1991) aseton, metanol ve 1,4-dioksan gibi suyla karışabilen bir çözücünden oluşan karışımda peroksidazın farklı fenol türevlerinin oksidatif polimerizasyon reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılabildiğini ortaya koymuştur (Akkara et al. 1991).

Oguchi ve arkadaşları (1999) enzim katalizör olarak HRP ve oksitleyici olarak da H_2O_2 kullanarak suda çözünebilir polifenolün enzimatik oksidatif polimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. N,N-dimetilformamide karşı polimerin çözünebilirliğini kanıtlamak için pH tamponu ve alkol çözücü karışımını geliştirmişlerdir. Sentezlenen polimerin fenilen ve oksifenilen gruplarından oluştuğunu saptamışlardır. Çözücü yapılarını, polimerin molekül ağırlığı ve kısmi molekül ağırlığını değiştirerek elde edilen polimerin yüksek ısı kararlılığına sahip olduğunu belirlemişlerdir (Oguchi et al. 1999).

Kawakita (2012) altın, platin ve paladyum gibi metallerin geri kazanımı sağlamak için fenol türevlerinin enzimatik oksidatif polimerizasyonunda enzim olarak HRP kullanmışlardır. İyon değişim yeteneği olan poli(tiramin) polimerizasyon sonucunda sentezlenmiştir. Altın iyonlarını hidroksil grupları üzerine Platin ve Paladyum iyonlarını ise poli(tiramin) üzerine adsorbe edildiğini görmüşlerdir. (Kawakita, 2012).

Zwane ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada 3-hidroksitirozolün dimerini elde etmek için lakkaz enzimi eşliğinde polimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Dimer hidroksitirozolün karakterizasyonu için HPLC-MS, NMR ve antioksidan analizleri yapmışlardır. Yapılan antioksidan analizinde dimerin hidroksitirozole göre üç kat daha fazla antioksidan özelliğe sahip olduğunu görmüşlerdir. Sonuç olarak dimerin daha güçlü bir antioksidan olduğunu görmüş ve cilt bakım ürünleri, sağlık ve nutrasotiklerde kullanılabileceğini ön görmüşlerdir (Zwane et al. 2012).

Chang ve Tang (2014) sentezledikleri Fe_3O_4 nanoparçacıklarını ürettikleri silika ile kaplamışlardır. Silika kaplı Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yüzeyini de APTES kullanarak primer amin gruplarıyla modifiye etmişlerdir. HRP'nin manyetik çekirdek kabuğu parçacıkları üzerine immobilizasyonu glutaraldehit ile yapılmıştır. İmmobilize edilen enzim ısıya karşı dayanıklılığı ve pH değişiminin serbest HRP'ye göre arttığını gözlemlemişlerdir (Chang & Tang, 2014).

Junker ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz ve HRP katalizörü eşliğinde PANI sentezlemişlerdir. Lakkaz katalizörü eşliğinde Sodyum bis-(2-etilhekzil)sülfosüksinat (AOT) etkisini araştırmışlardır ve gerçekleştirdikleri tepkimede en uygun pH=3,5 olarak belirlemişlerdir. Horseradish peroxidase ile gerçekleştirilen tepkime için en uygun pH ise 4,3 olarak belirlenmiştir (Junker et al. 2015).

Saif ve arkadaşları (2015) Fe_3O_4 nanoparçacıkları üzerine APTES'i Morin (MR) için taşıyıcı olması amacıyla sentezlemişlerdir. TEM görüntülerinden, APTES'in ($\text{MNP}_5\text{-APTES}$) ortalama parçacık boyutunun yaklaşık 26,7 nm olduğu saptanmıştır. ($\text{MNP}_5\text{-APTES}$)'in Morin yükleme ve bırakma davranışları incelendiğinde 4 saat içinde adsorbe edilen ilacın %60'ını salındığı görülmüştür (Saif et al. 2015).

Laochai ve arkadaşları (2016) sentezledikleri manyetik nanopartikülleri kitosan ve polivinil alkol ile bağlayarak kovalent bağlama yoluyla da HRP immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize HRP'nin 10. kullanımdan sonra da aktivitesini koruduğunu görmüşlerdir. Aynı zamanda manyetik nanopartiküllerin enzim aktivitesine sahip olmalarına ek olarak basit, sağlam ve düşük maliyetli bir yöntem olduğunu doğrulamışlardır (Laochai et al. 2016).

Isci ve arkadaşları (2016) (E)-2-(1-(2-fenilhidrazon)etil)fenol'ün (FHEF) sentezini HRP ile enzimatik oksidatif polimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çözücü, reaksiyon sıcaklığı ve pH gibi faktörlerin polimerizasyona etkilerini araştırmışlardır. Termogravimetrik analiz (TGA/DTA), Infrared spektroskopisi (FT-IR), Ultraviyole spektroskopisi (UV-Vis), Nükleer manyetik rezonans (^1H ve ^{13}C NMR), Dönüşümlü voltametri (CV) ve Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) yöntemleriyle elde edilen polimer ürününün karakterizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir (Isci et al. 2016).

Topal ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada enzimatik polimerizasyonda oligofenolün yan zincirindeki imin işlevselliğinin etkisini araştırmışlardır. Orto-imin ikameli fenol (PTIMP), organik çözücüler ve H_2O_2 eşliğinde, HRP enzimi kullanılarak polimerize edilmiştir. Farklı parametlerin (çözücü, pH ve sıcaklık) etkisi araştırılarak polimerizasyon için optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen oligofenolün organik çözücülerin çoğunda çözüldüğünü görmüşlerdir. Ayrıca karakterizasyon için NMR, UV-Vis, CV, FT-IR ve TGA yöntemleri kullanılmıştır (Topal et al. 2017).

Kiratitanavit ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada floresan konjuge polifenoller elde etmek üzere oksidoredüktaz enzimlerini katalizör olarak kullanarak polimerizasyonu gerçekleştirmişlerdir. 4-hidroksifenilasetik asit (HPA), hidroksitirosol (HDT) ve klorojenik asidi (CGA) HRP kullanarak polimerize etmişlerdir. Polifenollerin karakterizasyonları için UV-Vis, FT-IR, Floresan analizi ve söndürme çalışmaları, TGA ve GPC analizleri yapmışlardır. Bu floresan polifenollerin, onları söndürme bazlı sensörlerde kullanılmaya uygun hale getiren önemli Stokes kayması sergilediklerini görmüşlerdir. Konjuge polifenollere yönelik bu yaklaşımın 'daha yeşil' sentetik metodolojilerin kullanımında yeni olanaklar açacağı görüşünü bildirmişlerdir (Kiratitanavit et al. 2018).

Göktürk (2021) yaptığı çalışmada Fe^{+2} iyonlarının HRP ile oluşturduğu (başlatıcı olarak H_2O_2 kullanılmıştır.) çiçek şeklindeki hibrit nano biyokatalizörlerin hidrokinon'un polimerleştirilmesinde kullanmıştır. Elde ettiği sonuçlara göre yüksek sıcaklıklarda HRP- Fe^{+2} biyokatalizörü serbest HRP'ye göre daha yüksek katalitik kararlılık göstermiştir. $70^{\circ}C$ sıcaklıkta HRP enzimi denatüre olurken, HRP- Fe^{+2} biyokatalizörü bozunmadan katalitik aktivite göstermiştir. $pH=7,4$ tamponunda Poly(hidrokinon)'u %44 verimle sentezlemiştir. HRP- Fe^{+2} biyokatalizörü ve serbest enzimle gerçekleştirilen polimerleşme verimlerinin birbirine yakın olduğu, fakat serbest HRP enzimi ile sentezlenen polimerin molekül ağırlığının HRP- Fe^{+2} ile sentezlenen polimere göre daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Bunların yanında serbest HRP enzimine göre HRP- Fe^{+2} biyokatalizörünün katalitik aktivitesinin azaldığını görmüştür (Göktürk, 2021).

Manzano-Nicolas ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada oleuropein ve 3-hidroksitirozolün lakkaz, tirozinaz ve HRP ile oksidasyonunu incelemişlerdir. Bir spektrometrik yöntem ve başka bir spektrofotometrik kronometrik yöntem kullanılarak her bir enzim için V_{max} ve K_M kinetik parametreleri belirlenmiştir. En yüksek bağlanma afinitesi lakkaz tarafından gösterilmiştir. Oleuropein ve 3- hidroksitirozolün antioksidan kapasiteleri de analiz edilmiş ve bu iki molekül arasında benzerlik görülmüştür (Manzano-Nicolas et al. 2021).

Xie ve arkadaşları (2021) yaptıkları bir çalışmada hidroksitirozolün oksidatif polimerizasyonunu lakkaz, tirozinaz ve HRP varlığında gerçekleştirmişlerdir. Her bir enzim için optimum polimerizasyon koşulları belirlenmiştir. En yüksek dönüşüm lakkaz enziminde elde edilmiştir. Karakterizasyon için FT-IR, NMR, HPLC-ESI-TOF-MS analizleri yapılmıştır. Kataliz sürecinin kinetiği ve termodinamiği analiz edilmiştir. Ayrıca, enzim proteini ile hidroksitirozol arasındaki etkileşim sırasında enzim değişikliklerini CD deneyleri yaparak doğrulamışlardır (Xie et al. 2021b).

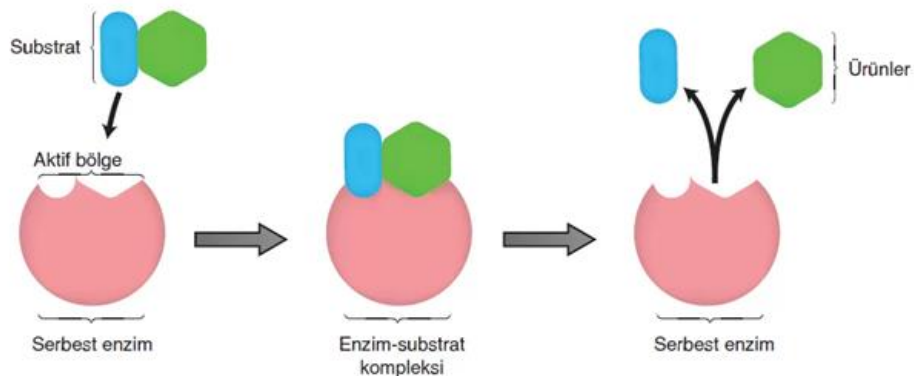
KURAMSAL TEMELLER

Enzimler

Enzimler, bütün canlı organizmalardaki biyokimyasal olayların uyum içinde oluşmasına katkı sağlayan en önemli moleküllerdir. Enzimler biyolojik olaylarda katalizör görevini üstlenirler. Bitki, hayvan ve mikroorganizma kökenli olmasından ötürü çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılırlar fakat daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olması, hayvan ve bitki enzimlerine göre daha kararlı ve ucuz olması sebebiyle genellikle mikroorganizmalardan elde edilirler (Uçar, A., 2011).

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırmaktadırlar. Enzim katalizörler aynı reaksiyonda tekrar tekrar kullanılabilirler. Enzimler protein yapılarından dolayı diğer katalizörlerden farklı olarak, pH ve sıcaklığa bağlıdır. Enzimler günümüzde ekmek, bira ve peynir üretimi, çeşitli deterjan ve temizleyicilerin üretimi gibi endüstriyel alanlarda, tıpta tanı ve tedavide oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Dinçbaş, S., 2009).

Enzimlerin tepkime sırasında katalizlediği ve ürüne dönüştürdüğü kimyasal moleküller ‘substrat’ olarak isimlendirilir. Enzimler, substratlarına karşı oldukça özgül davranırlar ve molekülün sadece belirli bir bölgesini etkilerler. Etkiledikleri bu alandan bir veya birçok atomu ya da işlevsel grubu almaktadırlar. Enzim moleküllerinin bünyesinde yer alan aktif bölgede bulunan aminoasit yan zincirleri, substratla üç boyutlu bir yüzey oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Aktif bölge substratı absorplar ve sonuç olarak enzim-substrat (ES) kompleksi oluştururlar. Meydana gelen bu enzim-substrat kompleksi, parçalanarak enzim ve ürüne dönüşür (Aktay, S., 2017). Enzimle substrat arasında anahtar-kilit uyumu vardır. Enzim substratı ürüne dönüştürdükten sonra reaksiyondan değişime uğramadan çıkar. Şekil 1’de enzim ve substratın anahtar-kilit modeli gösterilmiştir.



Şekil 1. Enzim-substrat ilişkisi ve aktif bölge gösterimi (Blanco & Blanco, 2017)

Enzimlerin genel özellikleri;

- a. Enzimler reaksiyon sırasında tüketilmeyen protein katalizörlerdir.
- b. Aynı türdeki reaksiyonlar enzimler tarafından birçok kez gerçekleştirilebilirler.
- c. Bir enzim, tek bir reaksiyona ya da benzer reaksiyonlara özgü spesifite gösterir.
- d. Reaksiyonun termodinamik özelliklerinde bir değişime sebep olmazlar.
- e. Enzimler reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşürerek reaksiyonları hızlandırırlar.
- f. Oluşacak reaksiyonun dengeye varmasını hızlandırırlar.
- g. Enzimler canlı ve cansız biyolojik ortamlarda etkinlik gösterirler. (Yıldız, M. L., 2021).

Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler altı ana grupta sınıflandırılmaktadırlar:

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar

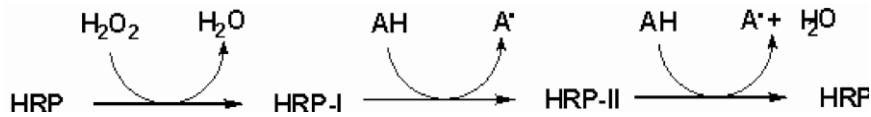
Horseradish Peroxidase (HRP)

Horseradish veya yaban turbu iklim olarak ılıman bölgelerde yetiştirilen dayanıklı bir bitki türüdür. Bu bitki kökünden elde edilen Horseradish peroksidaz yapısında hem grubunu bulundurur. HRP, anilin ve fenol türevlerini polimerleştirerek muhtelif türlerde çevre dostu poliaromatik yapıların oluşmasına öncülük eder. Fenollerin enzimatik polimerizasyonu ilk kez 1987 yılında Dordick ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile bulunmuştur. Fenollerin enzimatik polimerleştirilmesi HRP katalizörlüğünde ve sulu organik çözücü ortamında gerçekleştirilmiştir (Dordick et al. 1987). Sulu ortamda gerçekleştirilen enzimatik polimerleştirme çevre dostu bir uygulama olarak kabul görmektedir.



Şekil 2. Horseradish bitkisi (Veitch, 2004)

HRP, H_2O_2 varlığında üç farklı yapı oluşturur. Aşağıda verilen şekilde; HRP-I ve HRP-II sırasıyla bileşik I ve bileşik II'yi gösterir, AH_2 ve AH^* ise indirgenen ve oksitlenmiş substrat radikallerini gösterir (Önder, R. S., 2008); (Leon et al. 2002); (Krainer & Glieder, 2015). HRP'nin enzimatik aktivitesini, aktif merkezinde bulunan heme grubundaki demirin oksidasyonu ve redüksiyonu olarak tanımlayabiliriz. Uygun ortam ve koşullarda HRP, H_2O_2 ile birleşerek kompleks bir bileşik oluşturur. Oluşan bu kompleks bileşik çeşitli elektron vericiler tarafından oksitlenir ve iki mol su açığa çıkar.



Şekil 3. HRP enzimi çalışma mekanizması



Endüstriyel uygulamalarda enzim katalizörlü polimerizasyon yönteminin bazı dezavantajlarıyla karşılaşılmaktadır. Kullanılan enzimlerin maliyetinin yüksek olması, katalitik aktivitelerinin düşmesi ve sulu çözelti içerisindeki kararsızlıkları gibi dezavantajlara sahiptir (Gross et al. 2001). Bu dezavantajlar enzim immobilizasyonu yoluyla giderilmeye çalışılmış ve kısmi olarak başarı sağlanmıştır.

Enzimlerin katı bir destek yüzeyine immobilizasyonu basit ve tek basamaklı bir işlemdir. İmmobilize edilen enzimler yüksek kararlılık, tekrar kullanılabilme, daha ekonomik olma gibi avantajlar sunarlar. Enzim immobilizasyonu için genel bir metod yoktur. Burada

amaç, enzim immobilizasyonunu başarıyla gerçekleştirmek için uygun bir taşıyıcı ve reaksiyon koşulları (pH, T, vb.) belirlemektir. İmmobilizasyon, kovalent, nonkovalent, çapraz bağlanma ve tuzaklama gibi farklı yollarla gerçekleştirilir (Mateo et al. 2007); (Rana et al. 2010); (Wang, 2009); (Sheldon, 2007); (Fernandez-Lafuente, 2009). Nano malzemelerin yüksek yüzey alanına sahip olmaları fazla miktarda enzimi immobilize etmelerine olanak sağlar (Kim et al. 2004); (Avnir et al. 1994); (Luckarift et al. 2004).

Enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzimlerin su ile temasında çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanmasını ve aynı zamanda enzim özelliklerini geliştirme yönünde avantaj sağlar. İmmobilize enzimler genel olarak daha iyi pH aralığı ve sıcaklık kararlılığı gösterirler (Tutar, H., 2009).

İmmobilizasyon metodları

Kullanılan enzimin kimyasal yapısı, bileşimi, substrat ve ürünlerin nitelikleri, elde edilen ürünün kullanılacağı endüstriyel alanlar gibi parametreler, immobilizasyon yöntemi seçiminde önem arz etmektedir. Diğer önemli unsur ise, enzimde aktivite kaybına sebebiyet vermeyecek, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarda ve kimyasal yapısında değişiklik meydana getirmeyecek bir yöntem seçilmesidir. Enzimin bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyon vermesinin önüne geçilmelidir (Krajewska, 2004).

Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma, su içerisinde çözünmeyen bir taşıyıcının enzimle kovalent bağlarla bağlanmasıdır. Taşıyıcı ve enzim arasında oluşturulan bu bağlar diğer yöntemlere göre daha kuvvetlidir. Bu yöntemde taşıyıcı ile enzimin katalitik aktif bölgesinde yer alan fonksiyonel gruplar arasında bağ oluşmamasına dikkat edilmesi gerekir (Kasavi, C., 2006).

Fiziksel adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon, immobilizasyon yöntemleri içerisindeki en basit ve en kolay yöntemdir. Bu yöntem, suda çözünmeyen yüzey aktif bir adsorbanın, enzim çözeltisiyle karıştırılmasıyla ve bağlanmayan enzimin birkaç kez tekrar eden yıkamalarla çözeltiden uzaklaştırılması esasına dayanır. Bu metodun sağladığı önemli avantaj, destek malzemesinin pH ve sıcaklık gibi iki parametrenin etkileri sonucunda yeniden kullanımıdır. Fiziksel adsorpsiyonda iki önemli parametre vardır; bunlar sıcaklık ve zamandır. Ek olarak, difüzyon gözenekli taşıyıcılar için önemli bir parametredir. Bu avantajların yanı sıra fiziksel adsorpsiyon,

oluşan zayıf bağlardan kaynaklı kullanım sırasında desorpsiyon oluşumu gibi bir dezavantaj sunar. Bu da aktivite kaybı ve ürün kirliliğini beraberinde getirir (Tutar, H., 2009).

İyonik bağlanma

Bu metot, enzimin, suda çözünmeyen ve bünyesinde iyon değiştirici ajanlar bulunduran bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması temeline dayanır. Taşıyıcı olarak sentetik polimerler ve iyon değiştirici ajanlara sahip olan polisakkaritler tercih edilir. İyonik bağlanmada enzimin taşıyıcıya bağlanması diğer yöntemlere kıyasla daha kolaydır. Ek olarak bu yöntemle gerçekleştirilen immobilizasyon sırasında enzimin konformasyonel yapısında ve aktif bölgesinde daha az değişim gerçekleşir (Tutar, H., 2009).

Çapraz bağlanma

Bu prosedürde enzimler serbest amin ve karboksil grupları gibi çok fonksiyonlu bileşiklerle kovalent bağ yaparlar ve üç boyutlu çapraz bağlanma sonucu enzim grupları meydana getirirler. Bu yöntemde çapraz bağlayıcı olarak sıklıkla gluteraldehit ve diazobenzidin gibi maddeler tercih edilir. Bu metotta taşıyıcı ile enzim arasında oluşan bağlar çok kuvvetlidir. Bundan dolayı sıcaklık, pH ve iyon şiddeti değişimi gibi faktörler enzimin kararlılığını etkilemez ve enzim taşıyıcıdan ayrılmaz. Fakat, bu yöntem zor şartlar altında gerçekleşir. Bu sebeple enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişiklik ve aktivite kaybı olabilir (Kasavi, C., 2006).

Tutuklama yöntemi

Bu yöntem, enzimin kafes görevi gören polimer matris veya membran içerisinde tutuklanmasıdır. Reaksiyon sırasında substratın (kafesten) içeri girmesine imkân sunulurken, enzim de odacık içerisinde muhafaza edilir. Bu yöntem, enzimin çözelti içinde bağımsız olarak hareket etmesine olanak sağlamasıyla kovalent ve çapraz bağlanma yöntemlerinden farklıdır. Ancak enzimin membran ya da jel matris içerisinde tutulması hareketinin kısıtlanmasına sebep olur. Bu nedenle bu yöntem daha geniş uygulama alanına sahip olmasıyla diğer tekniklerden ayrılır. Bu yöntemin avantajları arasında biyokatalizörlerin modifikasyonlara uğramaması ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlığına sahip enzim inhibitörlerinin etkisini bertaraf etmesi vardır. Taşıyıcıların geri kazanılamaması ve yüksek molekül ağırlıklı substratların enzime güç bir şekilde tutunmaları bu yöntemin dezavantajıdır (Tutar, H., 2009).

Katalizörler

Katalizör, kimyasal bir tepkime sırasında herhangi bir değişime uğramayan ve reaksiyonun yolunu değiştirerek tepkimenin hızını artıran maddedir. Bu olaya kataliz

denilmektedir. Tepkime hızını artırmak için sıcaklığı artırmak bir çözümdür, fakat tepkimeye giren maddeler ve oluşan ürünler yüksek sıcaklıkta bozunabilirler. Bu yüzden katalizör kullanımı önemli hale gelmektedir. Katalizör, kendiliğinden ilerleyen bir tepkimenin aktivasyon enerjisini azaltarak tepkime hızını artırır ve reaksiyonun daha kısa sürede tamamlanmasını sağlar (Şenol, N., 2010); (Özsaçmacı, G., 2016).

Katalizörler homojen, heterojen ve biyolojik olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Homojen katalizörler, substrat ile tek bir faz oluştururken, heterojen katalizörler substratla farklı faz oluşturur ve genellikle katı formdadırlar. Biyolojik katalizörler ise çoğunluğu protein yapılıdır. Aynı zamanda enzim katalizörler olarak da bilinmektedirler. Yaşamımız ve biyolojik faaliyetlerimizi sürdürebilmemiz için enzimler (biyokatalizörler) hayati bir önem taşımaktadır (Şenol, N., 2010). Katalizörlerin en önemli özellikleri arasında aktivite, seçicilik ve kararlılık yer almaktadır. Katalizörün yüksek kararlılığa sahip olması, aktivitesini ne kadar sürede koruyacağını bir ölçütüdür (Gözetin, İ., 2020).

Aktivite

Bir ya da daha fazla reaksiyonun katalizör eşliğinde ne kadar hızlı gerçekleştiğinin ölçütü katalizör aktivitesi olarak tanımlanır.

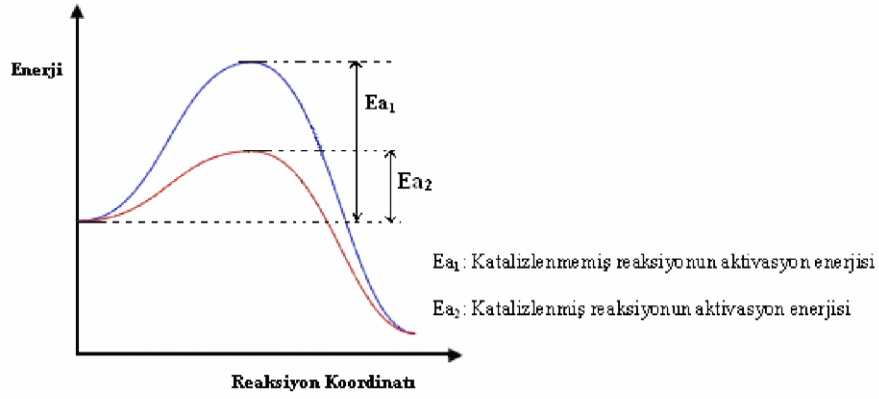
Seçicilik

Her katalizör her reaksiyon için uygun değildir. Reaksiyon için uygun katalizör deneysel çalışmalarla bulunur. Var olan reaksiyonlardan yalnızca birini katalizlemesi katalizörlerin seçicilik özelliğindendir.

Kararlılık

Endüstriyel reaktörlerde, katalizör termal, kimyasal ve mekaniksel kararlılığı, dekompozisyon, koklaşma ve zehirlenme gibi faktörlerden etkilenir. Bir katalizör için aktivite, seçicilik ve kararlılık özellikleri dikkate alındığında öncelik sırası: seçicilik> kararlılık >aktivite olmalıdır (Şenol, N., 2010).

Katalizör tepkime sırasında reaksiyonun yolunu değiştirdiği için katalizli tepkime ve katalizsiz tepkime mekanizmaları birbirinden farklıdır. Katalizli tepkimenin aktivasyon enerjisi katalizsiz tepkimeye göre daha düşük olduğundan daha hızlı ilerlemektedir (Şenol, N., 2010).



Şekil 4. Bir reaksiyonun katalizli ve katalizsiz durumdaki potansiyel enerji değişimi

Nanokatalizörler

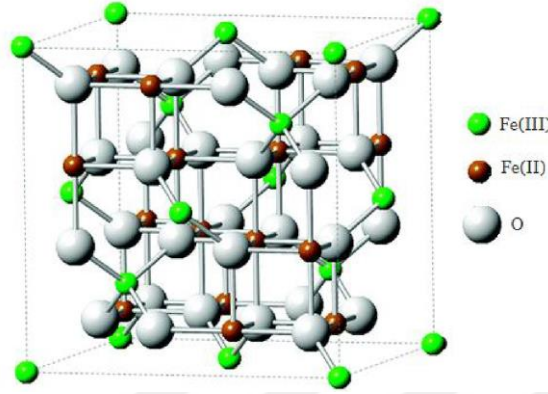
Nanoteknolojinin sanayi, elektronik, tıp, kimya, enerji ve çevre endüstrisindeki malzemeler üzerindeki etkisinden dolayı son yıllarda nanokatalizörlere olan ilgi artmıştır. Nanoteknoloji ve katalizör birbirini tamamlarlar. Bu sebeple nanokatalizörler nanoteknolojide önemli bir yer edinmişlerdir.

Katı katalizörler ile gerçekleşen kimyasal proseslerde reaksiyonlar, gözenekli yapıya sahip katalizörlerde katalizörün hem iç hem de dış yüzeyinde meydana gelir. Birim katalizör miktarı başına birim zamanda ürüne dönüşen reaktan miktarının fazla olması katalizör yüzeyine erişen reaktan miktarıyla doğru orantılıdır. Dikkat edilmesi gereken husus metal katalizörlerin uygun geniş yüzey alanlı, gözenekli formda olan maddelerin yüzeyinde homojen bir şekilde dağıtılmasıdır. Uygun üretim koşulları metal oksit katalizörlerinin reaksiyonlarda direkt olarak kullanılabilecek kadar geniş yüzey alanlarına sahip olmalarına olanak sunar. Nano boyutta ele alındığında, parçacık boyutu küçüldükçe daha geniş bir yüzey alanı ve malzemenin kimyasal etkinliğinde artış söz konusu olur. Bu özelliklerinden dolayı nano malzemeler yakıt hücreleri ve pillerde katalizör olarak kullanılmaktadır. Geniş yüzey alanlarına sahip nanoparçacıklar aktif merkezlerinin çoğunu yüzeylerinde bulundururlar. Bu da kimyasal tepkimelerde yüksek katalitik aktivite sağlar (Thomas & Thomas, 2014); (Şakar, S., 2019).

Demir oksit (Fe_3O_4)

Demir oksit, doğada rahatça bulunabilen, laboratuvarlarda kolayca sentezlenebilen bir bileşiktir. Demir oksitler doğada $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) ve Fe_3O_4 (manyetit) vb. gibi farklı formlarda bulunur. Bilinen ilk demir oksit hematittir. Toprak ve kayalarda bulunur ve farklı çevresel şartlara karşı oldukça dayanıklıdır. Manyetit, herkül taşı, mıknatıs taşı veya siyah demir oksit olarak bilinir. Manyetit diğer demir oksitlerle kıyaslandığında daha güçlü manyetik özellik göstermektedir. Maghemit ise diğer oksitlerin yıkıma uğraması veya toprakta bulunan manyetitin havaya maruz kalması sonucu oluşan demir oksittir.

Manyetit, yüzey merkezli kübik ters spinel bir yapıya sahiptir. Şekil 5'te görüldüğü üzere demir (II)'nin oktahedral kafes alanlarının yarısını kapladığı görülmektedir. Ayrıca demir (III)'ün diğer tetrahedral ve oktahedral kafes alanlarını kapladığı görülmektedir. Genel kapalı formülü $Y[XY]O_4$ olarak verilmektedir ve X ve Y sırasıyla demir (II) ve demir (III)'ü temsil eder.



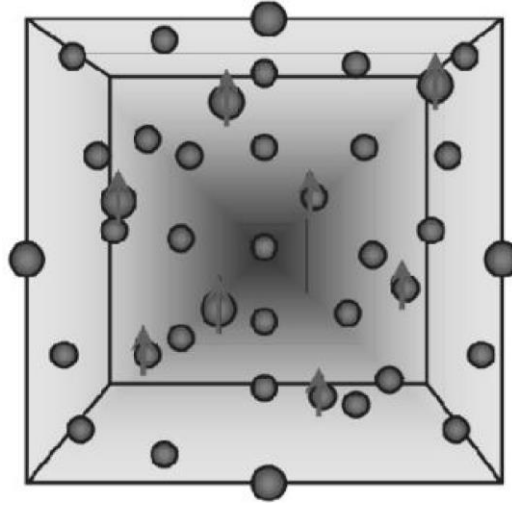
Şekil 5. Manyetitin kristal yapısı

Doğal ve sentezlenmiş mikro ölçekli manyetit kristaller, metalik bir parlaklığa ve mat siyah renge sahiptirler. Yoğunluğu $5,18 \text{ g/cm}^3$ olan manyetitin erime noktası $1583\text{-}1597^\circ\text{C}$ 'dir. Hücre parametresi $a = 0,8396 \text{ nm}$ olup ortam sıcaklığında manyetit parçacıkları cam ile aynı sertliğe (5,5) sahiptirler.



Şekil 6. Manyetit örneği

Manyetitin Curie sıcaklığının 850 K olduğu gözlenmiştir. Manyetitin manyetik yapısı oda sıcaklığında ferrimanyetiktir. Curie sıcaklığı altında, demir (III)'ün kapladığı tetrahedral alanlardaki manyetik momentler ferromanyetik özellik gösterirken, demir (II)'in kapladığı oktahedral alanlardaki manyetik momentler antiferromanyetik özellik gösterirler ve birbirini nötrlerler. Bu tür bir davranış ferrimanyetik özellik olarak adlandırılır.



Şekil 7. Tetrahedral alanların ferromanyetik ve oktahedral alanların antiferromanyetik (ferrimanyetik) davranışları

Demir oksit nanopartiküllerinin sentez yöntemleri

Birçok uygulamada kullanılan demir oksit nanopartiküllerinin çeşitli sentez yöntemleri mevcuttur. Teja ve Koh'a göre kullanılan sentez yönteminin, parçacık boyutu ve şekline, büyüklük dağılımına, yüzey kimyasının belirlenmesine büyük etkisi vardır. Bunların yanı sıra sentez yöntemi partikülün kirlilik derecesini ve yapısal kusurluk derecesini belirler. Bundan dolayı birçok sentez yöntemi tüm bu özellikler dikkate alınarak geliştirilmiştir (Teja & Koh, 2009); (Akın, D., 2012). Genellikle Fe₃O₄ nanopartiküllerini sentezlemek için birlikte çökelme, mikroemülsiyon, hidrotermal yöntemleri kullanılır. Literatüre bakıldığında bu sentez yöntemlerine ek olarak termal bozunma, elektrokimyasal biriktirme, sol-jel metodu, sonokimyasal, hibrit indirgenmesi ve polyol sentez yöntemlerinin de mevcut olduğu görülmektedir.

Birlikte çökelme yöntemi

Birlikte çökelme yöntemi kullanılan en yaygın yöntem olup, normal şartlar altında ya da daha yüksek sıcaklıklarda nötr şartlar altında bir bazın Fe⁺²/Fe⁺³ ilave edilmesi ile demir oksitlerin sentezinde kullanılır. Kullanılan tuzların çeşidi, pH değeri, Fe⁺²/Fe⁺³ oranı, ortamın iyonik gücü, reaksiyon sıcaklığı ve karıştırma hızı gibi faktörler manyetik nanopartiküllerin boyutu, şekli ve bileşimi üzerinde etkilidir. Birlikte çökelme yönteminde istenen özellikte demir oksit elde etmek reaksiyon şartlarının değiştirilmesiyle mümkün hale gelir.

Demir oksit nanopartiküllerin birlikte çökelme yöntemi ile sentez basamakları aşağıda verilmiştir.



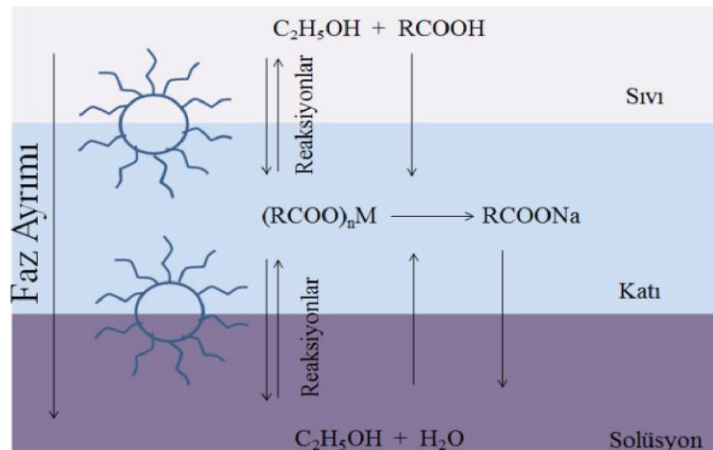


Manyetik nanopartiküller çevresel faktörlere karşı çok duyarlı ve kararlı değildir. Bu yüzden asidik ortamda çözünebilirler ve oksidasyona maruz kalıp kolayca maghemite dönüşürler. Maghemit ferrimanyetik olduğu için oksidasyon problemi daha azdır. Birlikte çökeltme yöntemiyle uygun koşullar sağlandığında 2-8 nm arası boyutlarda manyetik nanopartiküller sentezlemek mümkündür.

Hidrotermal sentez yöntemi

Bu yöntem, kapalı bir kap içerisinde başlangıç maddeleri ve çözücünün belirli bir sıcaklığa kadar ısıtılmasıdır. Bu yöntemde çözücü olarak su kullanılırsa hidrotermal yöntem, alkol veya farklı bir organik çözücü kullanılırsa solvotermal yöntem olarak isimlendirilir. Çözücü içerisinde başlangıç maddelerinin tamamen çözünmesi istenen bir durumdur ancak buna rağmen sıcaklık, pH ve süre kontrolü sağlanırsa tam çözünme olmadan da istenilen sonuç elde edilebilir.

Hidrotermal şartlar altında, nanoyapılı materyallerin birçoğunu sentezlemek mümkündür. Farklı nano kristallerin sentezi için genel hidrotermal yönteminde kullanılan reaksiyon, sıvı-katı solüsyon reaksiyonudur. Hidrotermal şartlar altında sistem, farklı reaksiyon sıcaklıklarında, sıvı fazda etanol-linoik, katı fazda metal-linoneat ve solüsyon fazında ise su-etanol karışımlarını bulundurur. Şekil 8’de gösterdiği gibi bu yöntem, proses süresince sıvı, katı ve solüsyon fazlarının ara yüzeylerinde oluşan genel faz transferi ve ayırma mekanizması esasına dayanır. FeCl_3 , etilen glikol (EG), sodyum asetat (NaAc) ve polietilen glikol (PEG)’dan oluşan çözelti, güçlü bir şekilde karıştırıldıktan sonra reaksiyon 200°C sıcaklıkta 8-72 saat aralığında sürdürülür. Bu metot ile monodispers ferrit kürelerinin boyutu 200-800 nm çapları arasında ayarlanabilir (Lu et al. 2007).



Şekil 8. Hidrotermal yöntemde sıvı-katı-solüsyon stratejisi

Hidrotermal sentez yönteminin avantajları aşağıdaki gibidir;

- Kimyasal açıdan kontrol edilebilir bir yöntemdir (Hu & Yu, 2008).
- Hammaddeler ile kıyaslandığında homojenliği daha iyi sağlar.
- Yüksek saflıkta ürün elde etmek mümkündür.
- Farklı yapı ve özellikte malzeme sentezi kolay olur.
- Üretim için düşük sıcaklıklar da uygundur.
- Yüzey alanı yüksek malzemelerin sentezi mümkün olur.
- Tek adımda malzeme sentezi mümkündür.

Mikroemülsiyon yöntem

Birbiri içerisinde karışmayan iki sıvının termodinamik olarak kararlı izotropik dispersiyonu mikroemülsiyon olarak ifade edilir. Burada, her iki sıvının mikro domaini surfaktan moleküllerinin arayüz filmi ile stabilize edilir. Yağ içinde su mikro emülsiyonlarında, sulu faz devamlı hidrokarbon fazında surfaktan moleküllerinin monotabakası ile çevrelenen ortalama 1-50 nm boyutuna sahip mikro damlacıklar şeklinde dağıtılır. Bu yöntemde surfaktan ve suyun molar oranı değiştirilerek ters misel yapılmaktadır. Arzu edilen bileşenleri barındıran her iki sistemde de sürekli kolloidal sistem sağlanır. Nihayetinde çöken ürün misellerin içinde oluşmaktadır. Bu sisteme aseton veya etanol gibi çözücülerin eklenmesi sonucu meydana gelen çökeltinin ayrıştırılma işlemi filtreleme veya santrifüj yapılarak gerçekleştirilir. Bu metodda kullanılan surfaktanın cinsine ve konsantrasyonuna bağlı olarak mikro emülsiyonların şekli değişiklik gösterir (Lu et al. 2007). Böylelikle arzu edilen morfolojik yapıda ürün sentezlemek mümkün hale gelir. Sonuç olarak, bir mikro emülsiyon nanopartiküllerin oluşumunda nanoreaktör olarak görev yapabilir.

Termal bozunma

Susuz ortamda, manyetik nanopartiküllerin boyut ve şekil kontrolünü sağlamak amacıyla yüksek kaliteli yarı iletken nanokristal ve oksitlerin sentezinden ilham alınarak geliştirilen bir yöntemdir. Temelde, daha küçük boyutlarda monodispers manyetik nanokristaller, stabilize edici surfaktan içeren yüksek kaynama noktasına sahip organik solventler içerisinde organometalik bileşenlerin termal bozunması yoluyla sentezlenmektedir. Organometalik öncüller metilasetilasetonatlar, $[M(acac)_n]$, ($M=Fe, Co, Ni, Mn, Cr$; $n=2$ veya 3 , $acac=asetilasetonat$), metal cupferronatlar $[M^xCup_x]$ ($M=$ metal iyonu; $Cup=N$ -nitrosofenilhidroksilamin $C_6H_5N(NO)O^-$) veya karbonillerdir. Genellikle surfaktan olarak yağ asidi, oleik asit ve heksadesilamin tercih edilmektedir. Temelde, organometalik bileşen içeren başlatıcı reaktiflerin oranı, solvent ve surfaktan gibi parametreler manyetik nanopartiküllerin

boyut ve morfolojisi için belirleyici rol oynar. Bunun yanı sıra reaksiyon süresi ve sıcaklığı da boyut ve morfolojinin kontrolü açısından önemli etken faktörlerdir.

Eğer öncül içinde bulunan metalin değerliliği sıfırsa, termal bozunma ilk olarak metalin oluşumuna sebebiyet verir. Ancak oksit nanopartiküllerin sentezi için iki basamaklı prosedür kullanılır. Örneğin demirpentakarbonil, 100°C’de oleik asit ve oktil eterin karışımında ayrıştırılır. Daha sonra sıcaklık yükseltilerek trietilamin oksit (CH₃)₃NO eklenir. Reaksiyon, yaklaşık olarak 13 nm boyutunda γ -Fe₂O₃ nanokristallerin oluşumu ile sonuçlanır. Katyonik metal merkezler ile öncüllerin direk olarak bozunması ise oksit yapıların, yani Fe₃O₄ nanoyapıların oluşumunu sağlar.

Tablo 1’de bahsi geçen sentez yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarına yer verilmiştir (Cheng et al. 2005).

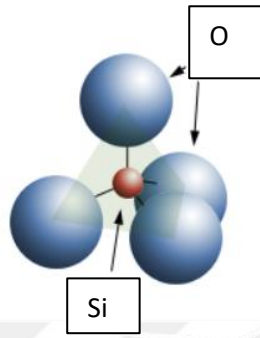
Tablo 1. Sentez Metotlarının Kıyaslanması

	Sentez Metodu			
	Birlikte çöktürme	Termal bozunma	Mikro emülsiyon	Hidrotermal
Sentez	Çok basit, uygun şartlar	Karmaşık, inert atmosfer	Karmaşık, uygun şartlar	Basit, yüksek basınç
Reaksiyon sıcaklığı (°C)	20-90	100-320	20-50	220
Reaksiyon süresi	Dakika	Saat- gün	Saat	Saat
Çözücü	Su	Organik bileşik	Organik bileşik	Su, etanol
Yüzey kaplayıcı ajanlar	Gerekli, sentez sürecinde veya sonrasında	Gerekli, sentez sırasında	Gerekli, sentez sırasında	Gerekli, sentez sırasında
Boyut dağılımı	Nispeten dar	Çok dar	İyi	Çok iyi
Şekil kontrolü	Yüksek ölçeklenebilir	Yüksek ölçeklenebilir	Düşük	Orta
Verim	İyi değil	Çok iyi	İyi	Çok iyi

Silisyum Dioksit (SiO₂)

Kayaların, değerli ve değersiz taşların, minarellerin yapılarında bulunan, silika olarak da bilinen silisyum dioksit (SiO₂), genellikle amorf formdadır. SiO₂, nano yapıli malzemelerin sentezinde sıklıkla tercih edilen bir bileşiktir. SiO₂, çok iyi bir yarı iletkenidir, suda çözünmez ve yüksek erime sıcaklığı nedeniyle yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklıdır. SiO₂ genel anlamda kimyasal olarak inert olmasına karşın, yüksek sıcaklıklarda Hidrojen florür, Sodyum hidroksit ve Potasyum hidroksit bileşiklerinin sulu çözeltileriyle reaksiyona girme yeteneğine sahiptir. Silika, silikon, cam, ilaç ve gıda sektörlerinde oldukça yoğun kullanım alanına sahiptir.

Çekirdek malzeme destekli sabit fazlarda kimyasal bağlı gözenekli formdaki silika, yüksek yüzey alanına sahip olmasından ötürü adsorban ve katalizör olarak kullanılmaktadır. Çapları 5-1000 nm arasında değişen silika nanopartikülleri, 545 ile 2,73 m²/g aralığında değişen özgül yüzey alanına sahip olabilmektedir. Günümüzde Silika nanopartikülleri; biyosensörler, kimyasal sensörler, fotonik kristaller, gelişmiş kompozit malzemeler için nano-dolgu maddeleri, biyo görüntüleme için işaretleyiciler, kuantum noktaları ve katalizörler için substrat malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Xia et al., 2010). Şekil 9’da gösterildiği gibi kristal yapıdaki silisyum dioksit, her bir silisyum atomuna dört oksijen atomunun bağlandığı tetrahedral yapıya sahiptir.



Şekil 9. SiO₂’nin yapısı

Nano silika yüksek yüzey alanına sahip olduğundan elde edilebilecek enerji sayesinde adsorpsiyonu artırdığı söylenebilir. Silika geniş gözenek çaplarına sahip olması ve yüksek adsorpsiyon yeteneğinden ötürü çekirdek-kabuk yapılarında destek malzemesi olarak sıklıkla tercih edilir.

Silikanın temel yapı taşı SiO₄’tür. Kristalin silika formlarının yapısı SiO₄ ünitesinin sürekli uzantısı olarak kabul edilir. Silisyum atmosferdeki O₂’ye maruz kaldığında SiO₂ oluşur. Her bir -O-Si-O- bağı arasında oluşan açı 109,5° olmasına karşın, kuartz için bu açı yaklaşık olarak 144°’dir. Düzgün dört yüzlü yapıda yüksek derecede pozitif yüklü merkeze ve güçlü negatif köşelere sahip eşit olmayan yük dağılımı mevcuttur. Gaz halinde SiO₂ yapısı doğrusal O=Si=O molekül yapısına sahiptir. Silisyum dioksitin molekül formülünde, silisyumu çevreleyen dört oksijen atomu ile gösterilmesinin sebebi, her bir düzgün dört yüzlünün dört oksijen atomunun her birini komşu dört yüzlü ile paylaşılması net kimyasal formülünün SiO₂ olmasına neden olmaktadır.

Düzgün dört yüzlü yapısından dolayı Silisyum dioksitin (SiO₂) erime noktası oldukça yüksektir. 1700°C seviyesindeki sıcaklıklarda güçlü silisyum-oksijen kovalent bağları kopar. Bununla birlikte bu güçlü kovalent bağdan dolayı, silisyum dioksit çok sert ve esnek olmayan

bir katı özelliğindedir. Ayrıca, moleküler yapısında serbest elektronların olmaması sebebiyle SiO₂ çok zayıf iletkenlik göstermektedir. Tablo 2’de SiO₂’nin hem kristal hem de amorf yapıdaki fiziksel özelliklerine yer verilmiştir.

Tablo 2. Kristal ve Amorf SiO₂’nin Fiziksel Özellikleri

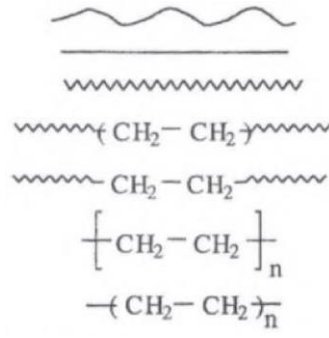
Fiziksel Özellik	Kristal SiO ₂	Amorf SiO ₂
Yoğunluk	2,6 g/cm ³	2,2 g/cm ³
Özdirenç	10 ¹² -10 ¹⁶ ohm.cm	10 ¹⁶ ohm.cm’den fazla
Kırılma İndisi	1,46	1,46
Termal İletkenlik	1,3 W.m ⁻¹ .K ⁻¹	1,4 W.m ⁻¹ .K ⁻¹
Erime Noktası	Yaklaşık 1700°C	Yaklaşık 1700°C
Termal Genleşme Katsayısı	7,64x10 ⁻⁷ K ⁻¹	5,4x10 ⁻⁷ K ⁻¹

Aşırı kararlı bir yapıya sahip olduğundan dolayı Silisyum dioksit çok az madde ile reaksiyona girer. NaOH, KOH, HF, CaCO₃, karbon ve su silikon dioksit ile reaksiyona giren maddelerdir. Kuvars Hidroflorik asit (HF) içerisinde çözünür ancak, diğer asitlerle reaksiyona girmez. Tepkime oda sıcaklığında gerçekleşir ve reaksiyon sonucunda Hidrofluorosilik asit (H₂SiF₆) ana ürünü oluşur. Doğal silika veya kuvars karbonla 2000°C’de reaksiyona girer ve Silisyum (Si) elde edilir. Hidrofluorosilik asit ve Silisyum oluşum reaksiyonları aşağıda verilmiştir.



Polimerler

Monomerler, birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak daha büyük molekül oluşumuna yol açan küçük mol kütleli kimyasal maddelerdir. Çok sayıda monomer de kovalent bağ yaparak makro molekülleri oluşturur. Bu oluşan makro moleküllere ise polimer denir. Monomerlerin polimerlerleri oluşturmalarına polimerizasyon veya polimerleşme tepkimesi adı verilir. Polietilen örneğinde etilen molekülleri polimerizasyon tepkimesiyle birbirlerine bağlanırlar ve bir polimer molekülü veya diğer bir deyişle polimer zinciri elde edilir. Polimer zincirlerinin farklı gösterimleri mevcuttur. Şekil 10’da polietilen’e ait polimer zincirleri gösterimlerine yer verilmiştir.



Şekil 10. Polietilen'e ait polimer zinciri gösterimleri

Polimerler sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklere göre sınıflandırılabilirler.

Tablo 3. Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerlerin Sınıflandırılması	
Molekül büyüklüğüne göre polimerler	Oligomerler Makromoleküller Jeller
Oluşumlarına göre polimerler	Doğal polimerler Yarı sentetik veya yapay polimerler Sentetik polimerler
Kaynaklarına göre polimerler	Organik polimerler İnorganik polimerler
Sentezine göre polimerler	Basamaklı polimerizasyon Katılma polimerizasyonu
Zincirlerine göre polimerler	Düz zincirli polimerler Dallanmış zincirli polimerler Çapraz bağlı polimerler
Isıya karşı davranışlarına karşı polimerler	Termoplastik polimerler Termoset polimerler
Tekrarlanan birimin kimyasal bileşimine göre polimerler	Homopolimer Kopolimer

Enzimatik Polimerizasyon

Enzimatik polimerizasyonu, polimerlerin izole edilen bir enzim tarafından biyosentetik olmayan yollarla *in vitro* olarak kimyasal sentezi olarak tanımlayabiliriz (Kobayashi et al. 2001); (Kaplan et al., 2006). Fenol-formaldehit reçineler endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılırlar fakat formaldehidin toksik özelliği bu reçinelerin kullanımını sınırlandırmıştır. Bu nedenle formaldehid kullanmadan fenol polimer üretmek için alternatif bir proses geliştirilmek istenmiştir. Alternatif bir proses olan fenol türevlerinin enzimatik polimerizasyonu, toksik olmayan katalizör üretimi ve hafif reaksiyon koşulları gibi avantajlara sahiptir ve fonksiyonel materyalleri üretebilmek için bölgesel ve kimyasal seçici polimerizasyon sağlar.

Aromatik bileşiklerin in vitro oksidatif polimerizasyonunda oksidoredüktaz, peroksidaz ve bilirubin oksidaz'ın kullanıldığı bilinmektedir ve bunlar arasında en sık kullanılan ise peroksidazlardır. Peroksidazlar, bir alıcının hidrojen peroksit tarafından oksitlenerek ve iki su molekülünü serbest bırakan oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Endüstriyel polimerleşme reaksiyonlarında en sık kullanılan HRP (Horseradish peroksidaz), oksitleyici olarak H_2O_2 kullanarak bazı fenol ve anilin türevlerinin polimerleştirilmesinde kullanılan enzimdir.

Fenollerin enzimatik polimerizasyon mekanizması

Enzimin görevi hafif reaksiyon koşulları altında fenoksi radikalleri üretmektir. Elde edilen bu fenoksi radikalleri, uygun reaksiyon ortamı, substrat türü ve pH değerinde rekombinasyon yoluyla polimer oluşturabilirler. Fenollerin oksidatif polimerizasyonu bir polikondenzasyon reaksiyonudur ve polimerizasyon oluşumu dört aşamadan oluşan bir mekanizma geliştirilmiştir. Bu mekanizma HRP üzerinden anlatılırsa;

1. Fenoller HRP katalizli oksidasyon ile fenoksi radikallerini oluşturur.
(Enzim kinetiği tarafından kontrol edilebilen tek basamaktır.)
2. Fenoksi radikalleri, rekombinasyon yoluyla dimerleri oluşturur.
3. Elektron transferi reaksiyonu sonucunda oligomer radikalleri oluşur.
4. Fenoksi ve oligomer radikal transfer reaksiyonları, HRP tarafından tekrar oksitlenebilen fenol monomerini yeniden oluşturur ve monomerler HRP tarafından oksitlenerek polimerlere dönüşürler.

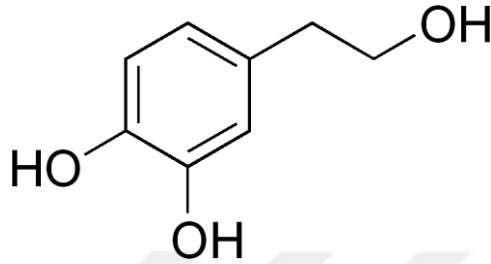
Eğer fenoksi radikalleri, rekombinasyon veya transfer basamağında reaksiyona yeterince hızlı girmezse keton oluşumuna yol açan oksidasyon gerçekleşir (Reihmann & Ritter*, 2001); (Sahoo et al. 2002); (Mejias et al. 2002).

Fenollerin polimerizasyonunda çözücü seçimi de oldukça önemlidir. İncelenen birçok peroksidaz katalizli polimerizasyonlar, bir organik çözücü ve sulu tampon çözelti içerisinde gerçekleşmiş ve bu şartlar altında polimerler çökmüştür. Yapılan birçok çalışmada çözücü bileşiminin elde edilen polimer verimi ve molekül ağırlığı üzerine etkileri görülmüştür (Dordick et al. 1986); (Akkara et al. 1991); (Kaplan et al., 2006).

Hidroksitirozol

Zeytinyağı üretiminde yan ürün olan zeytin değirmeni atık suyu, fenolik bileşikler açısından zengindir. Bu fenollerden biri olan Hidroksitirozol, antioksidan ve potansiyel olarak insan sağlığı üzerine olan faydalı özellikleri sebebiyle, katma değeri yüksek bir bileşik olarak öne çıkmaktadır (Hamden et al. 2009).

154,16 g/mol molekül ağırlığına sahip HTX, feniletıl alkol yapısındaki amfipatik fenoldür. Saf HTX renksiz ve sıvı haldedir (Xu et al. 1995). Uluslararası Saf Ve Uygulamalı Kimya Birlięi (IUPAC) tarafından 3,4-dihidroksifeniletanol (DOPET), 3,4-dihidroksifenoletanol (3,4-DHPEA) veya 4-2 (2-hidroksietil)-1,2-benzendiol olarak da adlandırılır (Robles-Almazan ve ark., 2018). HTX zeytinyağında yaklaşık 1,9 mg/kg'lık konsantrasyonda bulunur ve araştırmalara en çok konu olan fenolik bileşiklerden biridir (Rodríguez-Morató et al. 2015).



şekil 11. Hidroksitirozolün moleküler yapısı

Bazı sıklıkla karşılaşılan hastalıkların önlenmesindeki etkilerinden dolayı Polifenoller oldukça ilgi görmektedir. Antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antialerjik ve antikanserojenik gibi biyolojik aktivitelere sahiptirler. HTX, insan sağlığı üzerine olan yararları ve antioksidan özelliğinden dolayı polifenoller arasında önemli bir yere sahiptir (Hamden et al. 2009).

Beslenme ve sağlığa olan faydalı özelliklerinden dolayı dünyada zeytinyağı üretiminin ve yaygınlaşmasının artması dikkate alınmasıyla (Bargougui et al. 2019) üreticiler için en büyük sorunu zeytinyağı fabrikası atık suyu (OMW) teşkil etmiştir. Dünya çapında yaklaşık 30 milyon ton/yıl üretim ile direkt olarak deşarj edildiğinde, ekosistemde toprak kirliliği, su kızarıklığı, pis koku ve fitotoksisite gibi ciddi zararlar oluşturmaktadır (Aharonov-Nadborny et al. 2018). OMW'de HTX, tirozol, organik asitler ve flavonoidlerden oluşan fenolik bileşikler bulunur. OMW'deki toplam fenol içeriği 9,0 g/L'nin üzerine çıkabilir (Koutrotsios et al. 2018). Fenolik bileşikler bu çevre etkilerinden yoğun bir şekilde sorumludurlar. HTX ve tirozol, topraktaki akut toksisiteden büyük oranda sorumludur (Levy et al. 2018). Çünkü her ikisi de OMW'deki fenolik bileşiklerden en yüksek içeriğe sahiptir. Özellikle HTX OMW'nin yaklaşık %70'ini oluşturur (Duran & Esposito, 2000).

Zeytinyağı üretiminden elde edilen pirina HTX ve oleuropein bakımından zengindir ve oksidazların etkisi, reaksiyonlarında polimerizasyona yol açabilecek ürünler oluşturabilir ve bu polimerizasyonun olumlu etkileri olabilir. Çünkü antioksidan kapasite artabilir ve böylelikle yeni fonksiyonel besinler veya beslenme bileşenleri olarak potansiyel uygulamayla sağlık yararlarını artırabilir (Xie et al. 2021a);(Xie et al. 2021b).

Hidroksitirozolü polimere dönüştürmek için gerekli yollardan biri polifenol oksidazlar veya peroksidazları kullanmaktır. Avantajları;

1. Enzimatik polimerizasyon oda sıcaklığında, hafif çalışma koşulları altında gerçekleşir (Que Jr & Tolman, 2008).
2. Fenolik polimerlerin bazıları özellikle oligomerler fonksiyonel gıda, kozmetik ve eczacılık alanlarında ara ürün ve yardımcı bileşenler olarak önemli rol alırlar.
3. Bu teknik yalnızca biyokimyasal ve kimyasal oksijen talebi seviyelerini düşürmek için değil, aynı zamanda atığı (omw'de HTX) bir dereceye kadar zenginleştirmek için yani HTX oligomeri haline dönüştürmek için oldukça faydalıdır.



MATERYAL VE METOD

Materyal

Yararlanılan alet ve cihazlar

Tablo 4. Deney Süresince Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model
Hassas terazi	Kern 770
pH metre	Thermo Orion 3 Star
Ultrasonic karıştırıcı	Sonics Vibracell
Manyetik karıştırıcı	Wisestir Daihan Scientific
Çalkalamalı inkübatör	Edmund Bühler GmbH
Buzdolabı	Vestel
Evaporatör	Heidolph
Etüv	PH050A
Ultrasonik banyo	Çalışkan Digital Pro ⁺
Saf su cihazı	Nüve ND12

Mikro pipet, pastör pipet, beher, erlen mayer, şırınga, tartım kağıtları, spatül, balon joje ve teflon otoklav reaktör deney süresince kullanılmıştır.

SEM-EDS analizleri Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) ve Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (YÜTAM) bulunan Zeiss Sigma 300 ve Quanta FEG-250 marka cihazlar kullanılarak yapılmıştır.

FT-IR analizleri Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda bulunan PERKIN ELMER marka cihaz kullanılarak yapılmıştır.

Q-TOF LC/MS analizi Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) bulunan Agilent 6530 Accurate-Mass marka cihaz kullanılarak yapılmıştır.

¹H-NMR analizi Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan Bruker 400 MHz marka cihaz kullanılarak yapılmıştır. Çözücü olarak metanol-D₄, standart olarak Tetrametilsilan (TMS) kullanılmıştır.

ZETASIZER analizi Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) bulunan Malvern Zetasizer Nano ZSP marka cihaz kullanılarak yapılmıştır.

Kullanılan kimyasallar

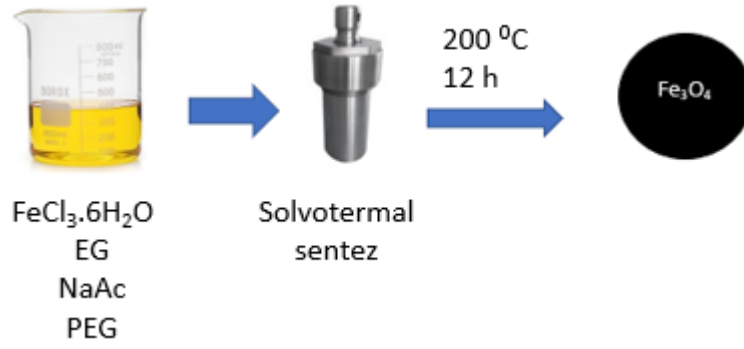
Bütün sentez aşamaları boyunca kullanılan kimyasallar aşağıda belirtildiği gibidir;

Demir(III) klorür hegzahidrat (Sigma Aldrich, %98), Etilen glikol (Sigma Aldrich, %98), Sodyum asetat (Sigma Aldrich, %99), Polietilen glikol (Sigma Aldrich, M_r 7000-9000), Etanol (Isolab, %99,9), Amonyum hidroksit (Sigma Aldrich, %25), Tetraetil ortosilikat (Sigma Aldrich, %99), APTES (Sigma Aldrich, %99), Monosodyum fosfat (BLD Pharmatech, %99), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Isolab, %99,5), Sodyum hidroksit (Isolab, %99), Hidroklorik asit (Merck, %37), HRP (Sigma Aldrich), 3-Hydroxytyrosol (BLD Pharmatech), Hidrojen peroksit (Tekkim, %35), Metanol (Merck, %99,7), Dimethylformamide (Tekkim, %99), Aseton (Sigma Aldrich, %99,5), Toluen (Sigma Aldrich, %99,8), Kloroform (Sigma Aldrich, $\geq$ %99), Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich, $\geq$ %99,9), Tetrahydrofuran (Sigma Aldrich, $\geq$ %99,9), Gluteraldehit (Tekkim, %50).

Metod

Fe₃O₄ (manyetit) sentezi

Solvothermal yöntemi kullanılarak Fe₃O₄ parçacıkları sentezlenmiştir. Öncelikle 80 ml etilen glikol içerisine 5,6 gr FeCl₃.6H₂O ilave edilerek ultrasonik karıştırıcı vasıtasıyla homojen ve açık sarı renk elde edilinceye kadar karıştırıldı. Solüsyona 4 gr polietilen glikol ve 14,4 gr sodyum asetat ilave edilerek karıştırma işlemi 15 dk daha sürdürüldü. Bu işlemlerden sonra çözelti, 200 ml'lik teflon otoklav reaktör içerisine alınarak etüv içerisinde 200°C'de 12 saat boyunca ısıtma işlemine tabi tutuldu. Isıtma işlemi tamamlandıktan sonra otoklav reaktör oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve sentezlenen Fe₃O₄ parçacıkları mıknatıs yardımıyla çözeltiden ayrıldı. Çözeltiden uzaklaştırılan Fe₃O₄ parçacıkları öncelikle distile su ve ardından etanol ile 5 kez yıkandıktan sonra 60°C'de 3 saat boyunca etüv ortamında kurumaya bırakıldı (L. Yang et al. 2016).



Şekil 12. Fe_3O_4 (manyetit) sentez prosesinin temsili gösterimi



Şekil 13. Sentezlenen Fe_3O_4 'ün (manyetit) manyetik özelliği

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ sentezi

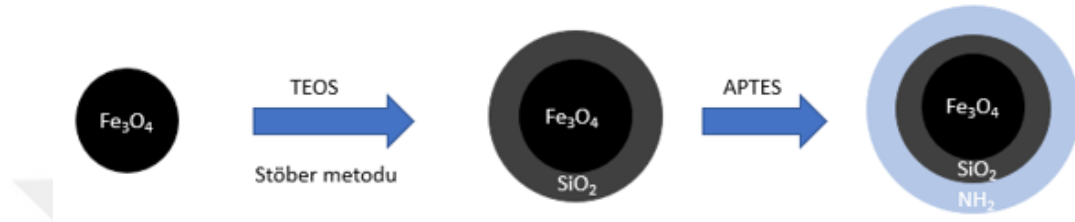
Stöber metodundan yararlanılarak $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ parçacıkları sentezlenmiştir. Bu sentez için, 80 ml etil alkol ve 20 ml deiyonize sudan oluşan çözelti içerisine bir önceki aşamada elde edilen 0,1 gr Fe_3O_4 ilave edilerek ultrasonik karıştırıcı kullanılarak 15 dk boyunca karıştırıldı. Daha sonra homojen hale gelen çözeltiye 5 ml %25'lik (w/w) NH_4OH ilave edilerek karıştırma işlemine 5 dk daha devam edildi ve çözelti içerisine 1 ml TEOS damla damla ilave edildi. Ardından çözelti %45'lik amplitüd altında 3 saat boyunca karıştırıldı. Karıştırma işlemi sona erdikten sonra mıknatıs yardımıyla $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ parçacıkları çözelti ortamından uzaklaştırıldı. Elde edilen parçacıklar önce distile su ve ardından etanol ile 5 kez yıkandıktan sonra etüvde 60°C'de 3 saat boyunca kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında nanoparçacıklar 2 saat boyunca 200°C'de kalsinasyona tabi tutuldu (Stöber et al. 1968).



Şekil 14. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ sentez prosesinin temsili gösterimi

Fe₃O₄@SiO₂@APTES sentezi

Fe₃O₄@SiO₂@APTES sentezi için, elde edilen Fe₃O₄@SiO₂'den 0,50 gr alınarak 100 ml etanol ve 100 ml deiyonize sudan oluşan çözelti içerisine ilave edildi ve sonrasında ultrasonik karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 dk boyunca karıştırıldı. Karıştırma işlemi sonrasında 4 ml APTES çözeltiye damla damla çok yavaş bir şekilde ilave edildi. Çözelti 1 saat boyunca ultrasonik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Süre sonunda Fe₃O₄@SiO₂@APTES parçacıkları harici mıknatıs kullanılarak çözelti ortamından uzaklaştırıldı. İlk önce distile su ve ardından etanol ile 5 kez yıkanarak, etüvde 75°C'de 6 saat boyunca kurutuldu.



Şekil 15. Fe₃O₄@SiO₂@APTES sentez prosesinin temsili gösterimi

Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA sentezi

Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA sentezi için gerekli olan PBS tamponu öncelikli olarak hazırlandı.

Fosfat Buffer Solüsyon (PBS) hazırlanışı;

0,35 gr Na₂H₂PO₄·2H₂O ve 0,48 gr NaH₂PO₄ bir behere aktarıldı ve üzerine 50 ml saf su ilave edildi. Çözelti bir süre ultrasonic banyoda bekletildi. Sonra pH metre ile pH ölçümü yapıldı. İstenen pH değerine ayarlamak için NaOH (artırmak için) ve HCl (azaltmak için) çözeltileri kullanıldı.

pH=7,8 olan 40 ml PBS tamponuna Fe₃O₄@SiO₂@APTES'ten 0,45 gr ilave edildi ve bu karışım 1 saat boyunca ultrasonic banyoda bekletildi. Çözelti süre sonunda karıştırıcıya alındı ve karıştırılmaya devam edildi. pH'sı 7 olarak ayarlanan 3,5 ml gluteraldehit (%50) çözeltiye pastör pipet ile yavaş bir şekilde damla damla eklendi. Son olarak çözelti oda sıcaklığında (25°C) 150 rpm'de 24 saat süreyle karışmaya bırakıldı.

Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA enzim immobilizasyonu

Hazırlanan 50 ml pH=7 PBS tampon çözelti içerisine 25 mg HRP enzimi ilave edildi. Çözelti ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Süre sonunda başka bir cam şişeye aktarılan çözelti üzerine 0,40 gr Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA eklendi. Çözelti, çalkalama cihazında 150 rpm'de 48 saat boyunca karışmaya bırakıldı. Süre sonunda mıknatıs yardımıyla

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}@\text{HRP}$ nanokatalizörleri çözelti ortamından uzaklaştırıldı ve saf su ile yıkandı.

Manyetik Nanokatalizör ile Hidroksitirozolün Polimerizasyonu

İlk olarak polimerizasyon reaksiyonunda kullanmak için gerekli olan asetat tamponu hazırlandı.

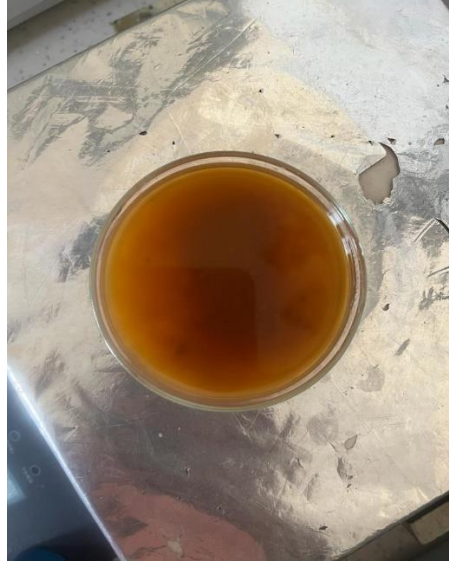
Asetat tampon hazırlanışı;

0,2 M 82 ml Asetik asit ve 0,2 M 18 ml Sodyum asetat çözeltilerinden elde edilen karışım saf su ile 200 ml tamamlandı. pH=5'e ayarlamak için 0,1 M'lık asit-baz çözeltileri kullanıldı. pH artırmak için NaOH, azaltmak için ise HCl kullanıldı ve istediğimiz değere gelinceye kadar asit-baz eklemesine devam edildi.

Sonra Polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak için 80 mg manyetik nanokatalizör üzerine 10 ml saf su, 10 ml pH=5 asetat tamponu ve 100 mg hidroksitirozol ilave edildi. Çözeltiye oksitleyici olarak 500 μl (%99,8 saflıkta) H_2O_2 , çözelti ortamına 15 dakikada bir toplam 14 kez mikropipet yardımıyla ilave edildi. İlk H_2O_2 ilavesinden sonra çözeltide renk değişimi gözlemlendi (kırmızı-kahverengi). Çözelti evaporatörde 25°C'de 180 rpm'de 24 saat karışmaya bırakıldı. Süre sonunda elde edilen polimer ürünlerini katalizörden ayırmak için mıknatıslama yapıldı. Mıknatıslama ile katalizörden uzaklaştırılan ürüne birkaç kez saf su ile yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra polimer ürünleri kurutuldu ve analizler için -20°C'de muhafaza edildi. Manyetik malzeme önce tamponla sonra saf su ile birkaç kez yıkandıktan sonra üzerine saf su eklenek tekrar kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 16. Hidroksitirozolün polimerizasyonu



Şekil 17. Hidroksitirozolün polimerizasyonu

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Polimerizasyonun Optimum Şartlarının Belirlenmesi

Hidroksitirozolün polimerizasyonu için optimum deney koşulları belirlenmiştir. Deneyler oda sıcaklığında (25°C) farklı pH tampon ve farklı çözücüler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sadece H₂O kullanılarak yapılan deneyde ürün elde edilememiştir. Yapılan deneyler sonucunda en iyi verim sulu tampon (pH=5) çözeltide elde edilmiştir. Sentezlenen katalizör 10 kez kullanılmıştır. Sonraki denemelerde katalizörün etkinliğinin düştüğü gözlemlenmiştir. pH=5 tamponu kullanılarak yapılan deney verimlerinin ortalaması alındığında polimerizasyon verimi %73 olarak bulunmuştur.

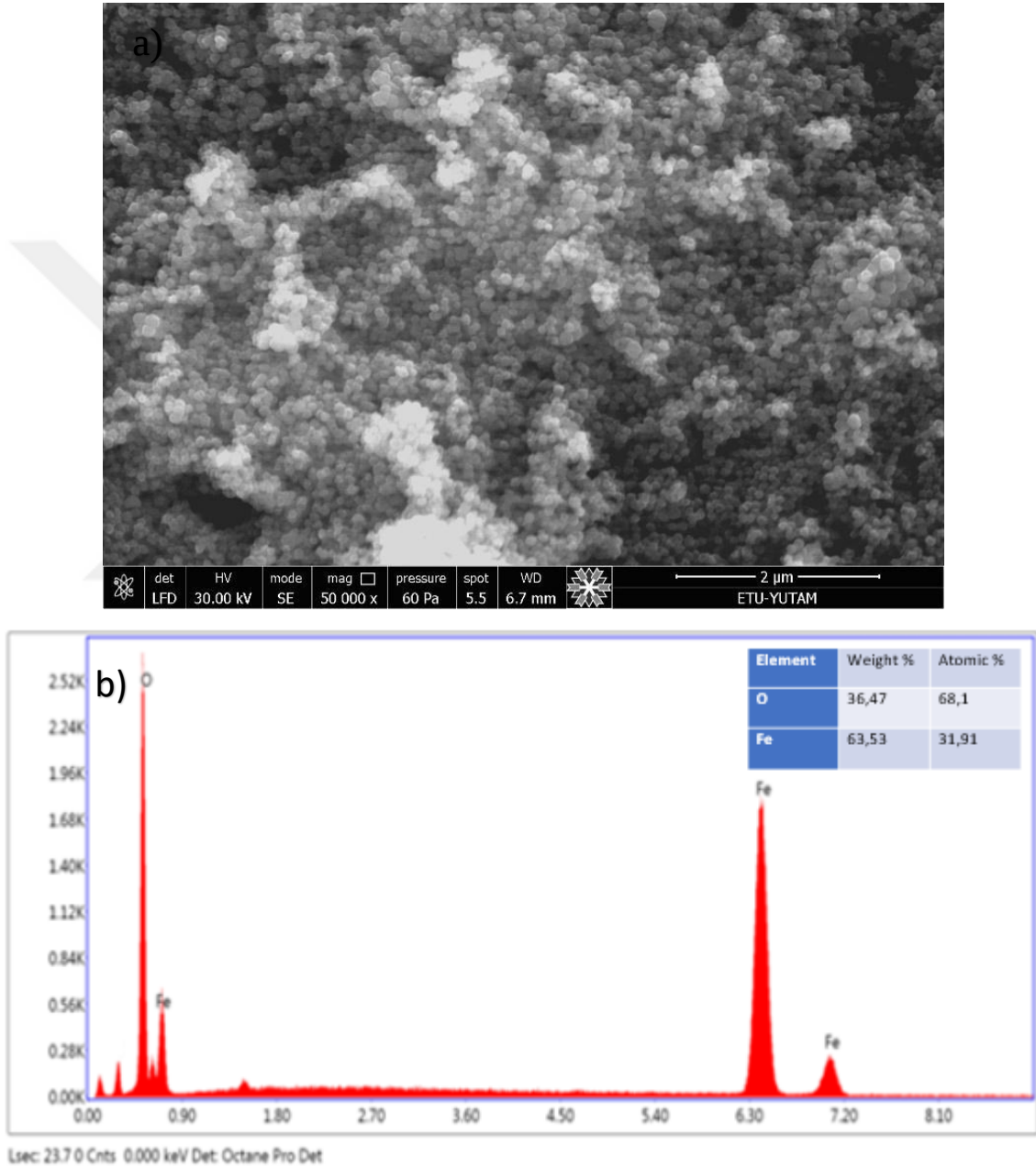
Tablo 5. Polimerizasyonun Optimum Şartlarının Belirlenmesi ve Polimer Verimi

Deney No	Monomer (HTX)	Katalizör	Çözücü	pH	Saat (t)	Verim (%)
1	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	4	24	25
2	100 mg	80 mg	H ₂ O+ Etanol	4	24	49
3	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	76
4	100 mg	80 mg	H ₂ O+ Etanol	5	24	35
5	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	58
6	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	82
7	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	90
8	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	68
9	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	53
10	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	70
11	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	85
12	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	66
13	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	5	24	82
14	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	6	24	25
15	100 mg	80 mg	H ₂ O+ Etanol	6	24	38
16	100 mg	80 mg	H ₂ O+Tampon	7	24	32
17	100 mg	80 mg	H ₂ O+ Etanol	7	24	17
18	100 mg	80 mg	H ₂ O	7	24	0

Nanokompozitlerin ve Polimerin Taramalı Elektron Mikroskobu SEM-EDS Analizi

Sırasıyla Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}@\text{GA}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}@\text{GA}@\text{HRP}$ ve polimere ait SEM ve EDS analiz sonuçları incelenmiştir. SEM analizinde yüzey morfolojisi, EDS analizinde ise nano katalizörün ve polimerin elementel içeriği incelenmiş ve literatürle karşılaştırılmıştır.

Fe_3O_4 'in SEM-EDS analizi

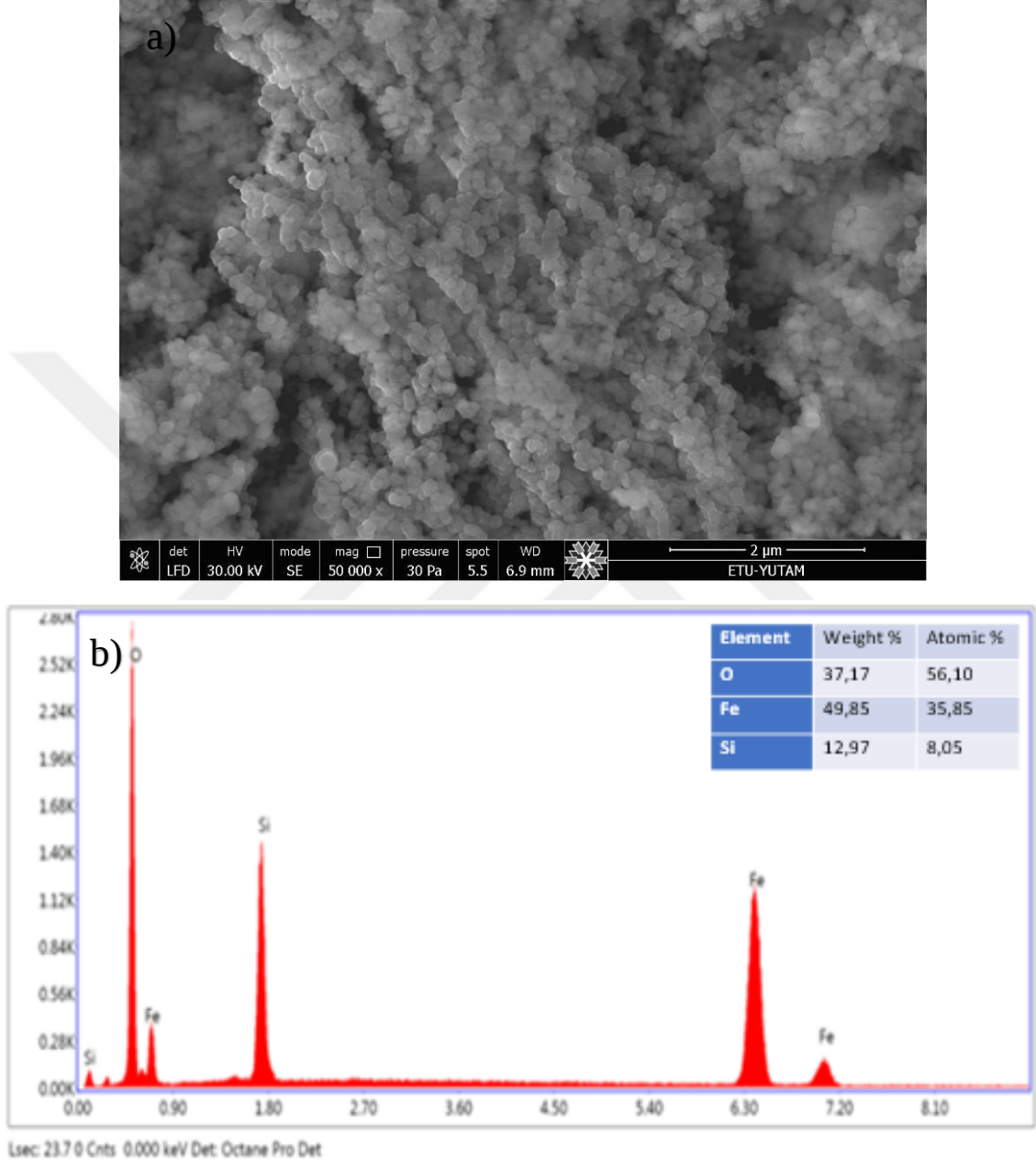


Şekil 18. Fe_3O_4 'e ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)

Şekil 18(a) ve 18(b)'de Fe_3O_4 nanopartikülüne ait SEM ve EDS analizi sonuçları verilmiştir. SEM analizinde görüldüğü gibi Fe_3O_4 nanoparçacıkları homojen olarak dağılmıştır ve küresel oluşumunu tamamlamıştır. Parçacıkların yüzeyinde pürüzlülük olması, daha küçük

Fe_3O_4 parçacıklarının bir araya gelerek büyük parçacıkları oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. (Kızıлтаş, H., 2018). EDS analizi sonucunda ise nanoparçacıktaki demir ve oksijen varlığına rastlanmıştır.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 'in SEM-EDS analizi

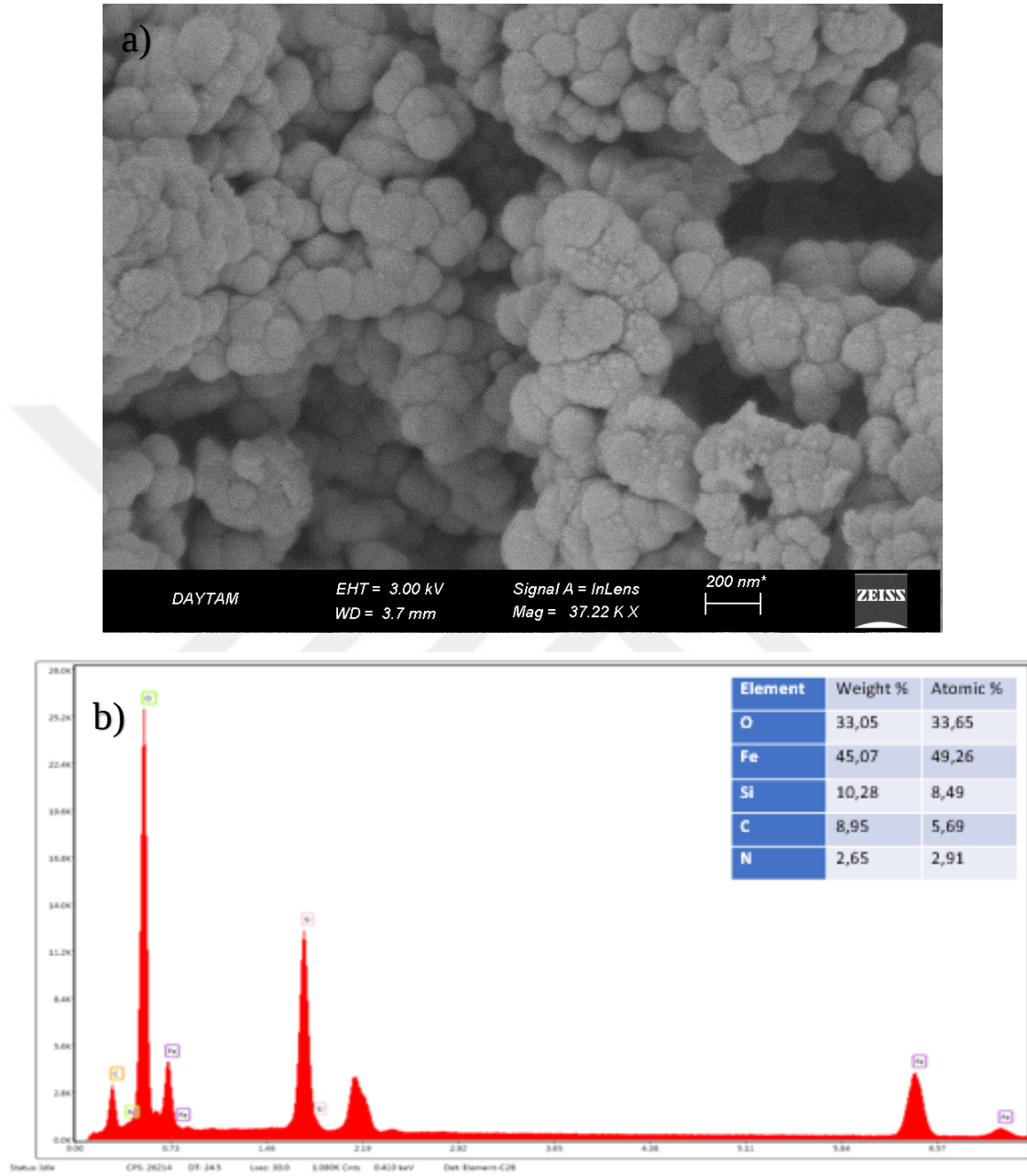


Şekil 19. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 'e ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)

Şekil 19(a) ve 19(b)'de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanopartiküllerine ait SEM ve EDS analizi sonuçları verilmiştir. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanopartikülleri, Fe_3O_4 gibi iyi bir monodispersiyon göstererek küresel oluşumunu tamamlamıştır. Kaplanan silisyumdan kaynaklı Fe_3O_4 'e göre daha büyük parçacıklar halindedir ve SiO_2 nanoparçacıkları Fe_3O_4 yüzeyinde granüller halinde görülmektedir (Kızıлтаş, H., 2018).

Yapılan EDS analizinde demir ve oksijen varlığına ek olarak silisyum varlığı da kanıtlanmıştır.

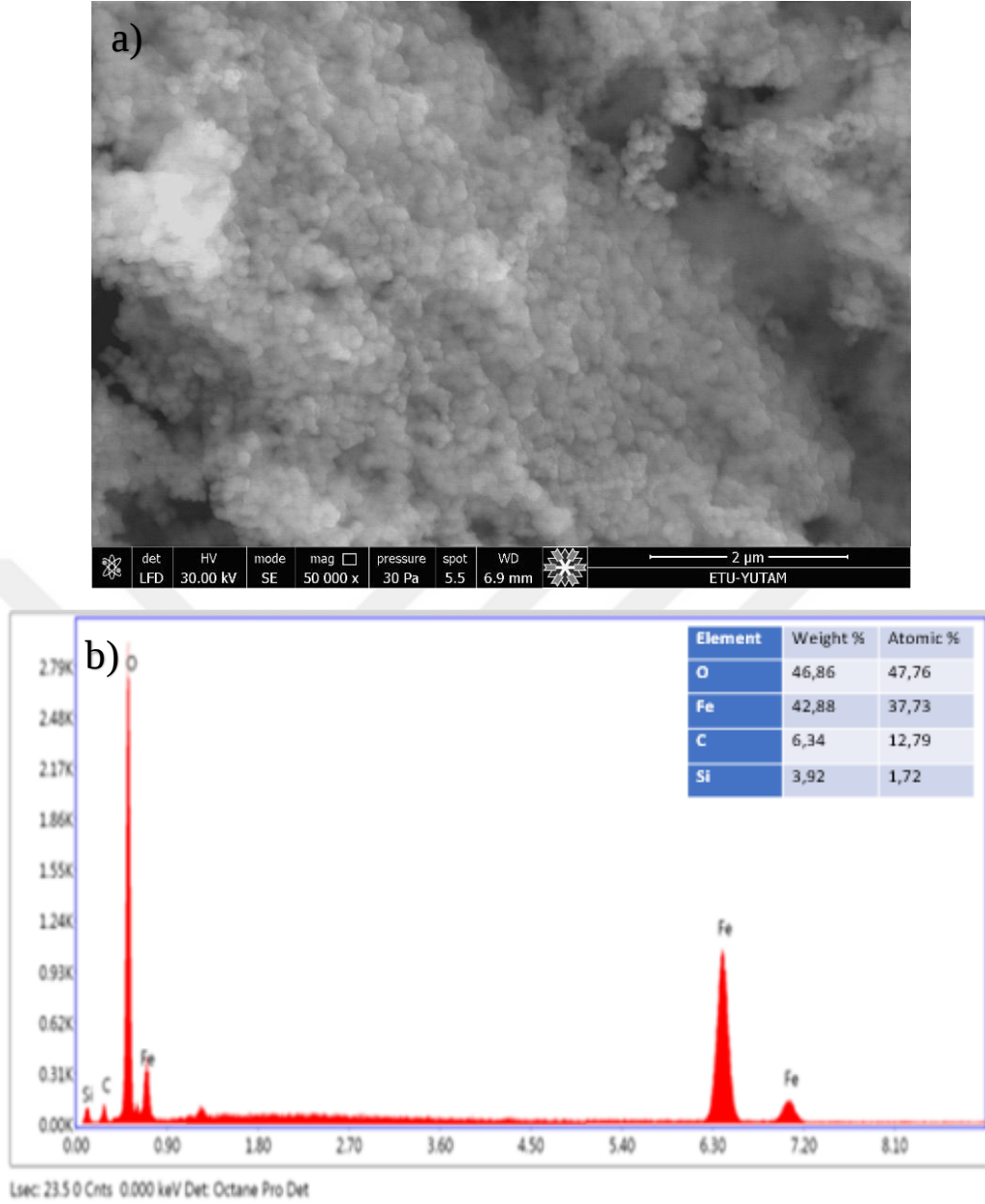
Fe₃O₄@SiO₂@APTES'in SEM-EDS analizi



Şekil 20. Fe₃O₄@SiO₂@APTES'e ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)

Şekil 20(a) ve 20(b)'de Fe₃O₄@SiO₂@APTES nanopartiküllerine ait SEM ve EDS analizi sonuçları verilmiştir. Nanoparçacıkların değişen büyüklüklerde küresel olduğu ve genellikle bir araya toplandıkları görülmektedir (Şakar, S., 2019). EDS diyagramında da görüldüğü gibi nanoparçacığa ait demir, oksijen, silisyum, karbon ve azot varlığına rastlanmıştır.

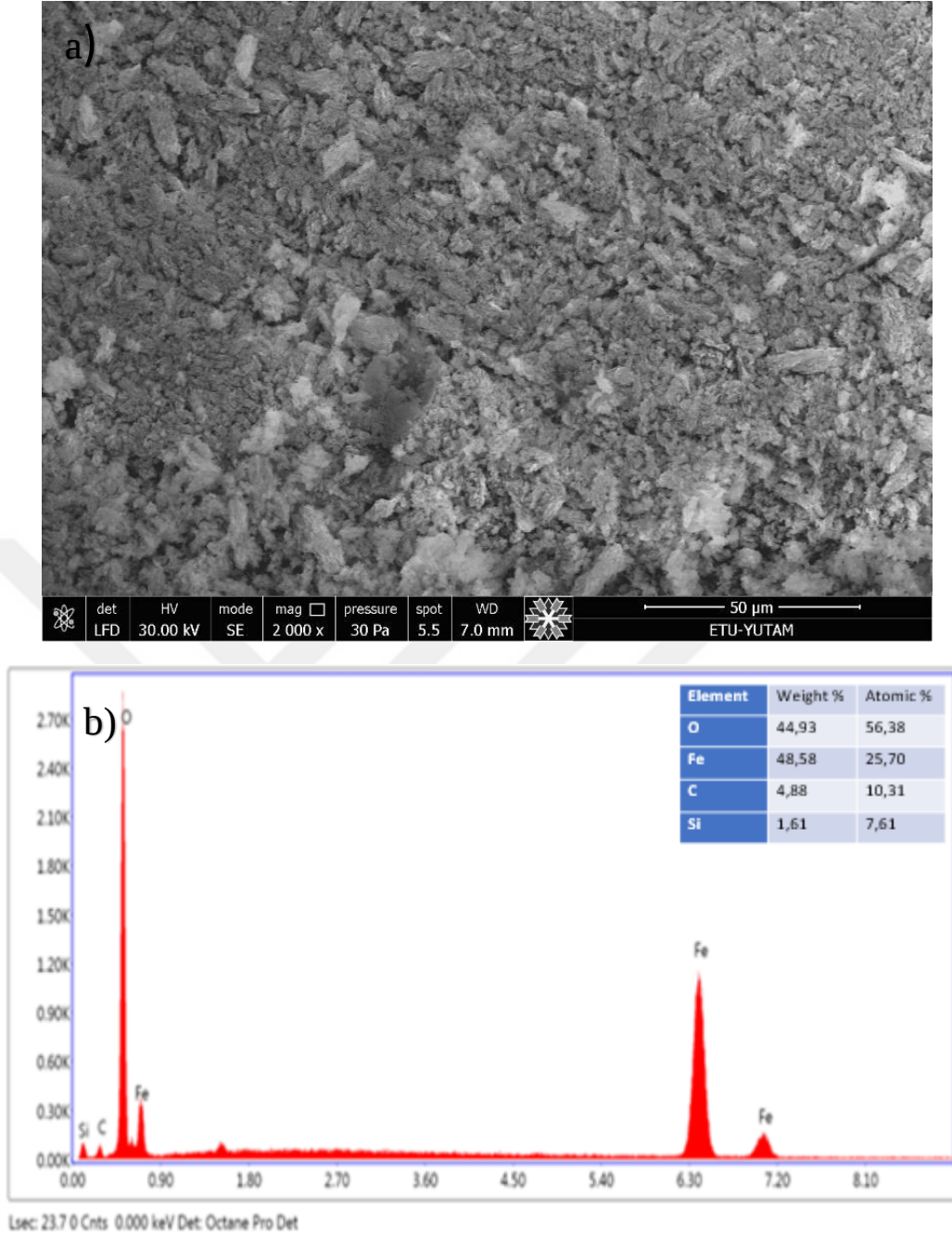
Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA'nın SEM-EDS analizi



Şekil 21. Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA'ya ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)

Şekil 21(a) ve 21(b)'de Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA'ya ait SEM ve EDS analizi sonuçları verilmiştir. Nanoparçacığa gluteraldehid bağladıktan sonra yüzey morfolojisinde farklılıklar olduğu ve daha büyük parçacıkların oluştuğu görülmüştür (Şakar, S., 2019). Yapılan EDS analizinde nanoparçacığa ait demir, oksijen, silisyum ve karbon varlığı kanıtlanmıştır.

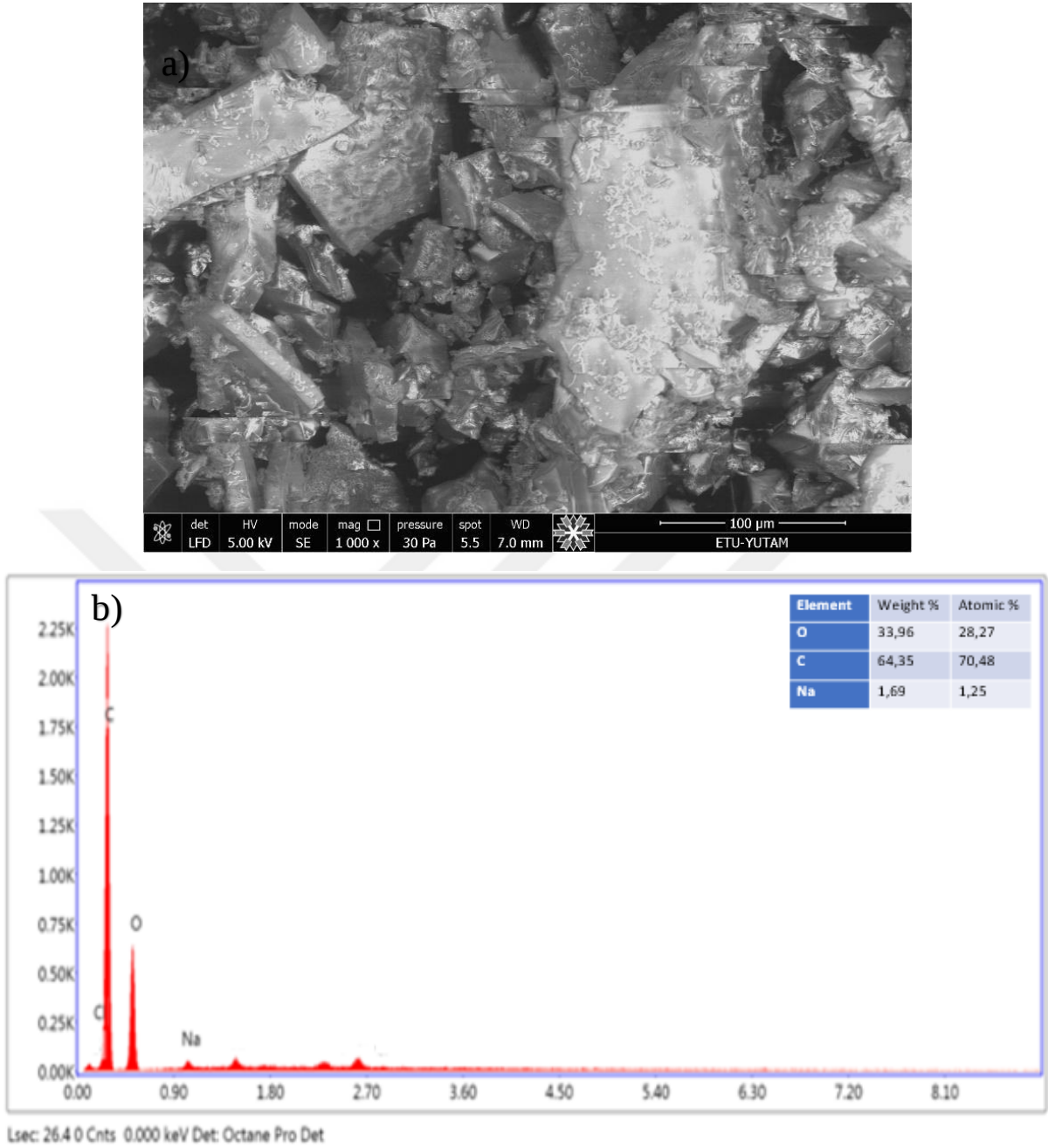
Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP'ın SEM-EDS analizi



Şekil 22. Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP'ye ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)

Şekil 22(a) ve 22(b)'de Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP'ye ait SEM ve EDS analizi sonuçları verilmiştir. HRP ilavesinden sonra nanoparçacıkların yüzey morfolojisinde farklılıklar olduğu görülmüştür. Yapılan EDS analizinde karbon, oksijen ve demir elementlerinin varlığı kanıtlanmıştır. HRP'den gelen Fe elementinden dolayı Fe oranının arttığı görülmüştür. Bu da HRP immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Polimerin SEM-EDS analizi



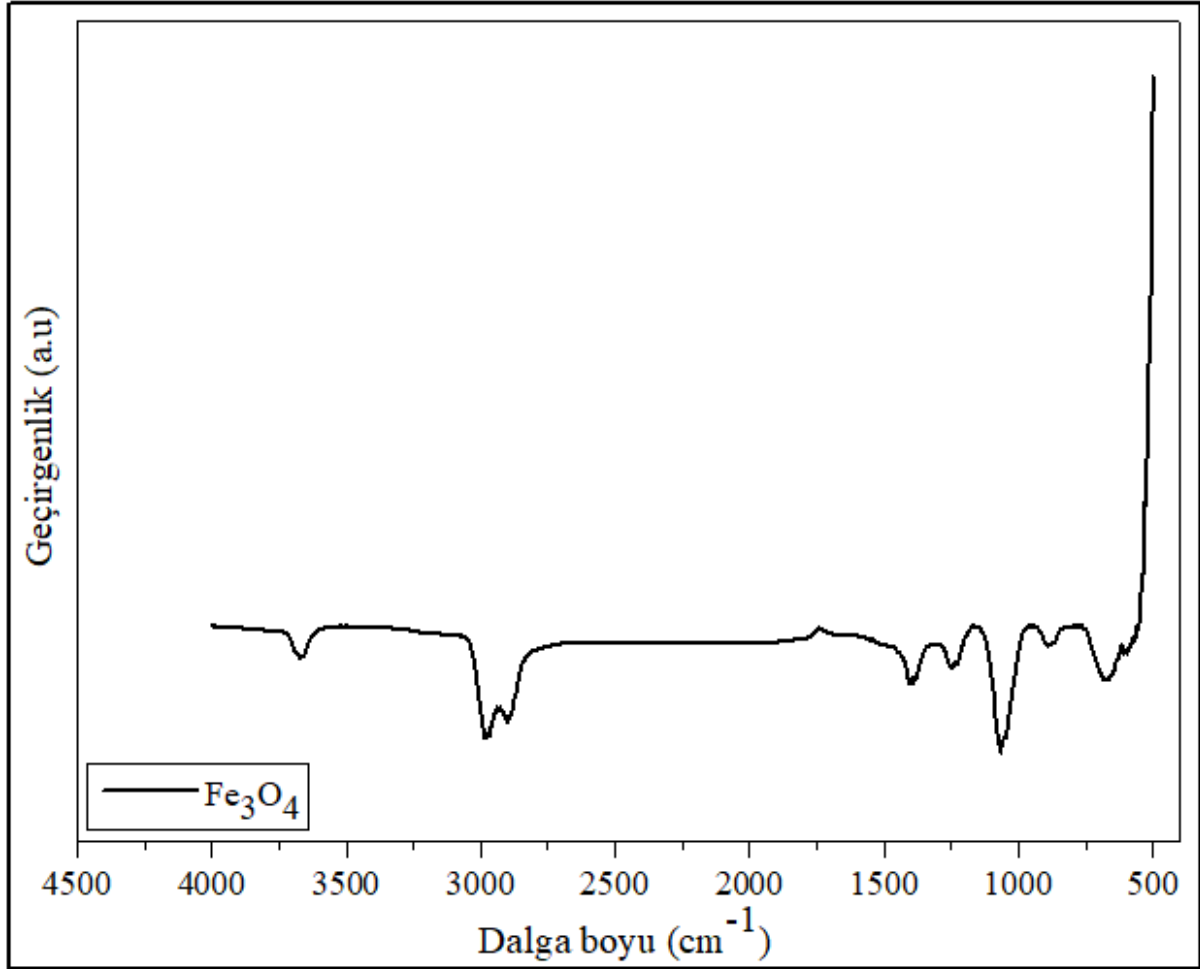
Şekil 23. Polimere ait SEM görüntüsü (a) ve EDS diyagramı (b)

Şekil 23(a) ve 23(b)'de polimere ait SEM ve EDS analizi sonuçları verilmiştir. Polimere yapılan SEM ve EDS analizinde hidroksitirozolu yapısından gelen karbon ve azot elementlerinin varlığı görülmüştür ve bu da polimerizasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Ek olarak eser miktarda bulunan sodyumun, kullanılan tampon solüsyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Nanopartiküllerin ve Polimerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Sırasıyla Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}@GA$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{APTES}@GA@HRP$ ve polimere ait FT-IR analiz sonuçları incelenmiştir ve sonuçlar literatürle karşılaştırılmıştır.

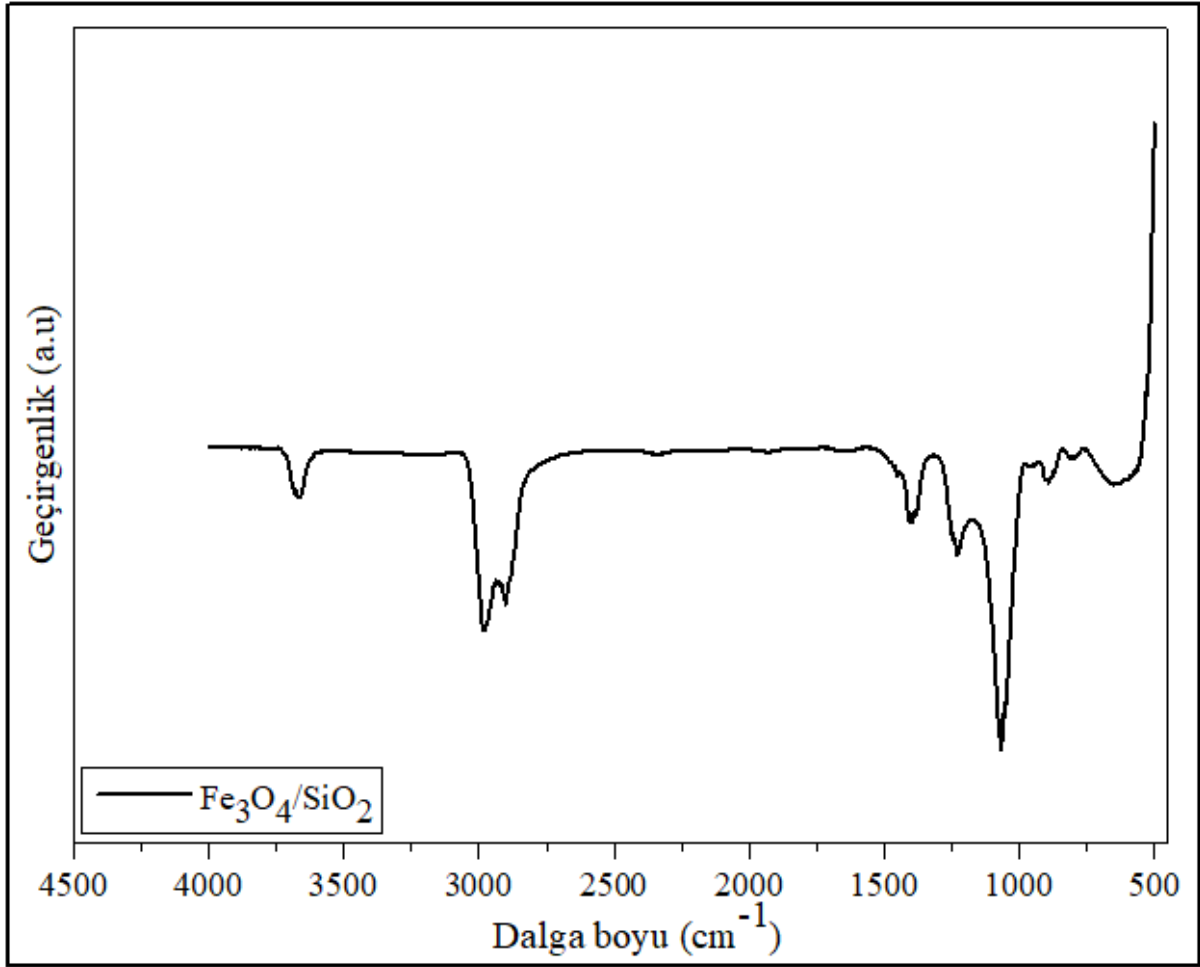
Fe_3O_4 'ün FT-IR analizi



Şekil 24. Fe_3O_4 'e ait FT-IR spektrumu

Şekil 24'de sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu gösterilmiştir. Yaklaşık 547 cm^{-1} ve 636 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler Fe-O titreşimine aittir (Lin et al. 2011); (Uppal et al. 2019); (Gezer, E., 2018). 3660 cm^{-1} 'deki pik ise beklenen O-H gerilme bandına ait piktir. 1705 cm^{-1} ve 1394 cm^{-1} 'deki bantlar ise absorplanan karboksilat gruplarının varlığını göstermiştir (K. Yang et al. 2010). Sonuçlar literatürle örtüşmüştür.

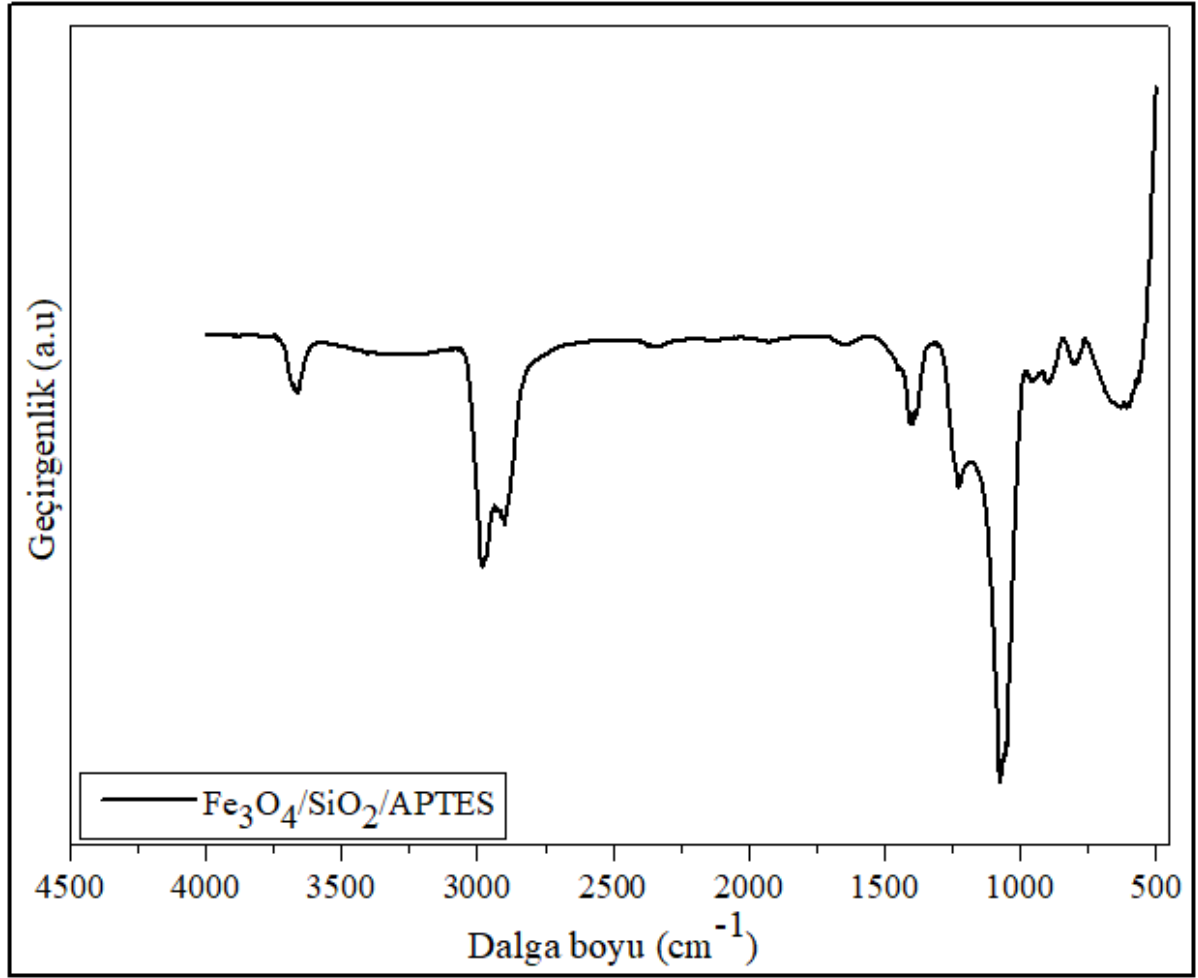
Fe₃O₄@SiO₂'in FT-IR analizi



Şekil 25. Fe₃O₄@SiO₂'e ait FT-IR spektrumu

Şekil 25'de sentezlenen Fe₃O₄@SiO₂ nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu verilmiştir. Bu spektrumda da Fe₃O₄ nanopartiküllerine ait karakteristik pikler görülmektedir (Rezayan et al. 2016). 1066 cm⁻¹ simetrik, 797 cm⁻¹ ise asimetrik Si-O-Si bağlarının titreşim piklerini göstermektedir (Liu et al. 2016). Ek olarak yaklaşık 896 cm⁻¹'deki pik serbest Si-OH gruplarına aittir (Wechakorn et al. 2019); (Erdem et al. 2018); (Sheikhmohammadi et al. 2019). Bu pikler, Fe₃O₄ nanopartikülleri yüzeyine SiO₂'nin kaplandığını doğrulamaktadır.

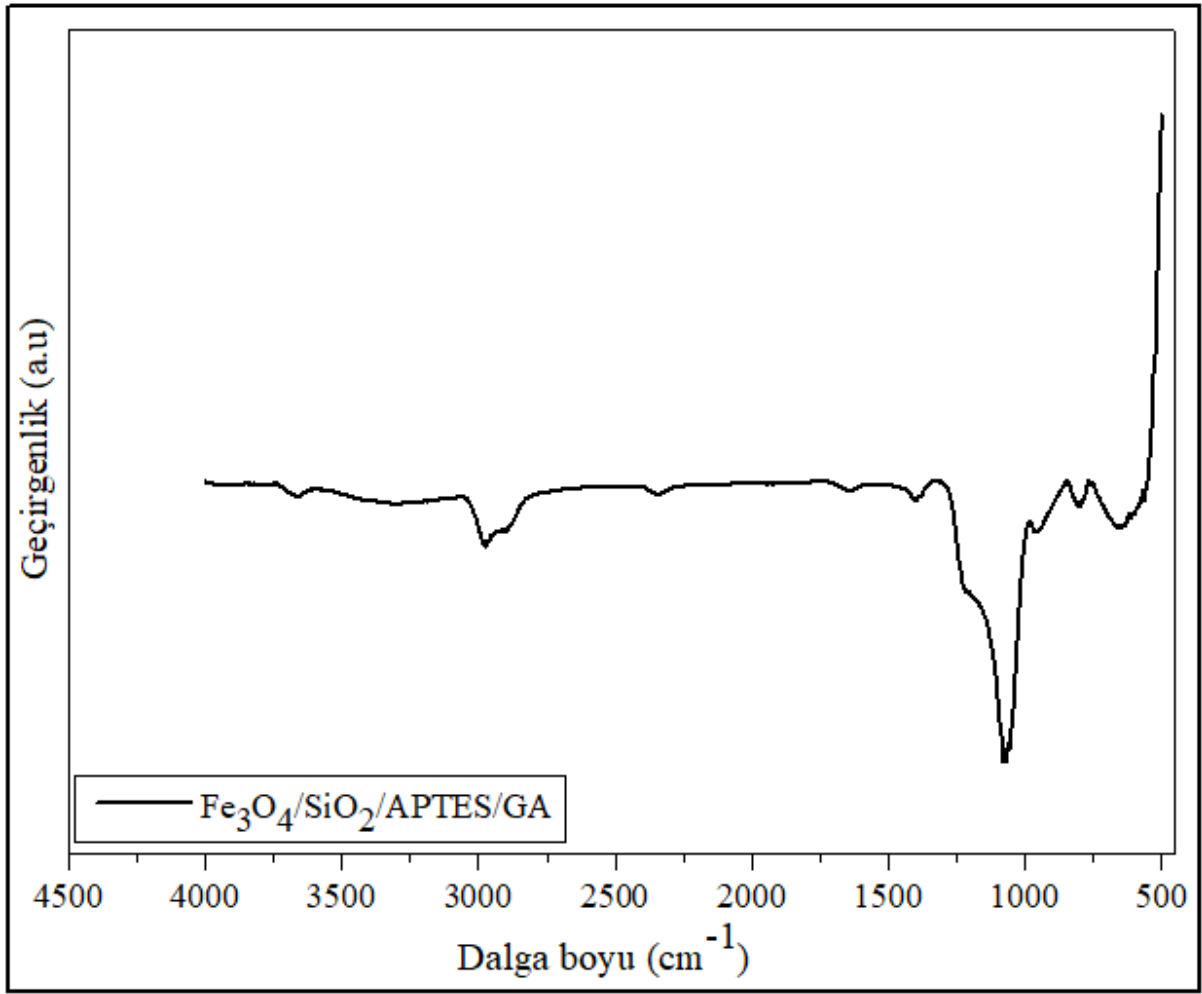
Fe₃O₄@SiO₂@APTES'in FT-IR analizi



Şekil 26. Fe₃O₄@SiO₂@APTES'e ait FT-IR spektrumu

Şekil 26'da görüldüğü gibi Fe₃O₄@SiO₂@APTES nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu verilmiştir. 2982 cm⁻¹'deki pik C-H gruplarına ait simetrik gerilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmektedir. Bu demir oksit nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir (Yazdani et al. 2023).

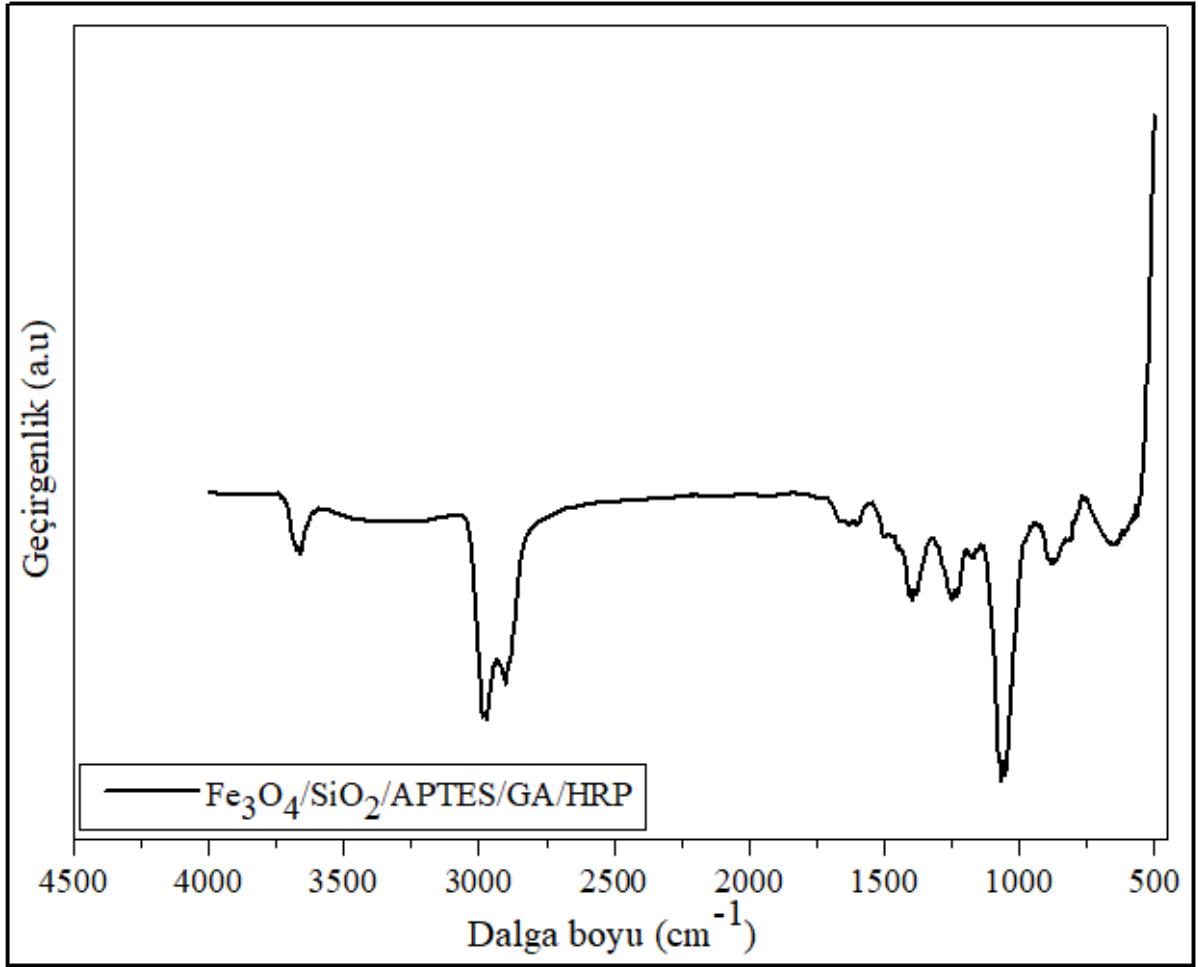
Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA'nın FT-IR analizi



Şekil 27. Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA'e ait FT-IR spektrumu

Şekil 27'de görüldüğü gibi Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu verilmiştir. 2900 cm⁻¹'deki pik GA'nın C-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1629 cm⁻¹'deki pikin aldehit grubunun C=O germe bağından kaynaklandığı düşünülmektedir (Aghababaie et al. 2018).

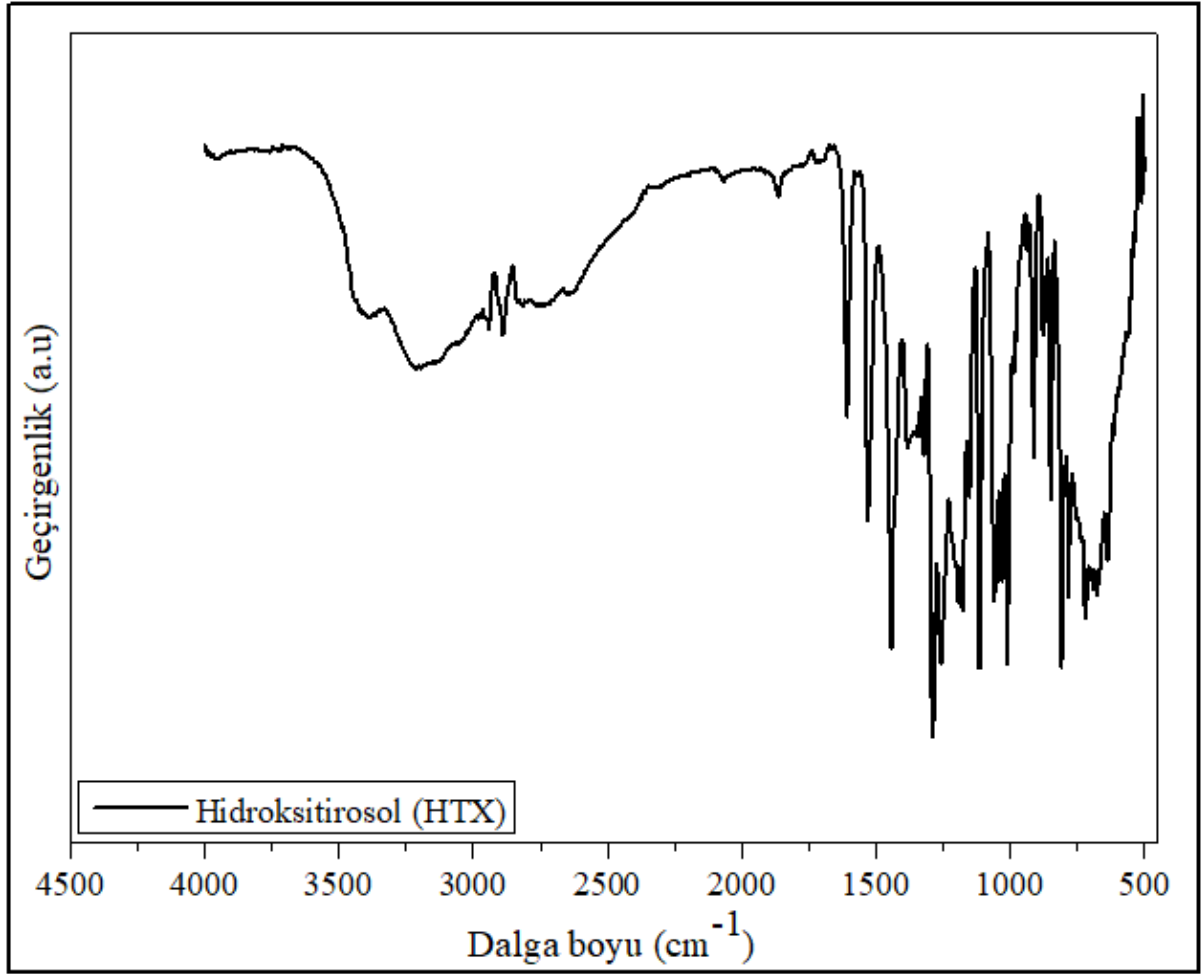
Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP'nin FT-IR analizi



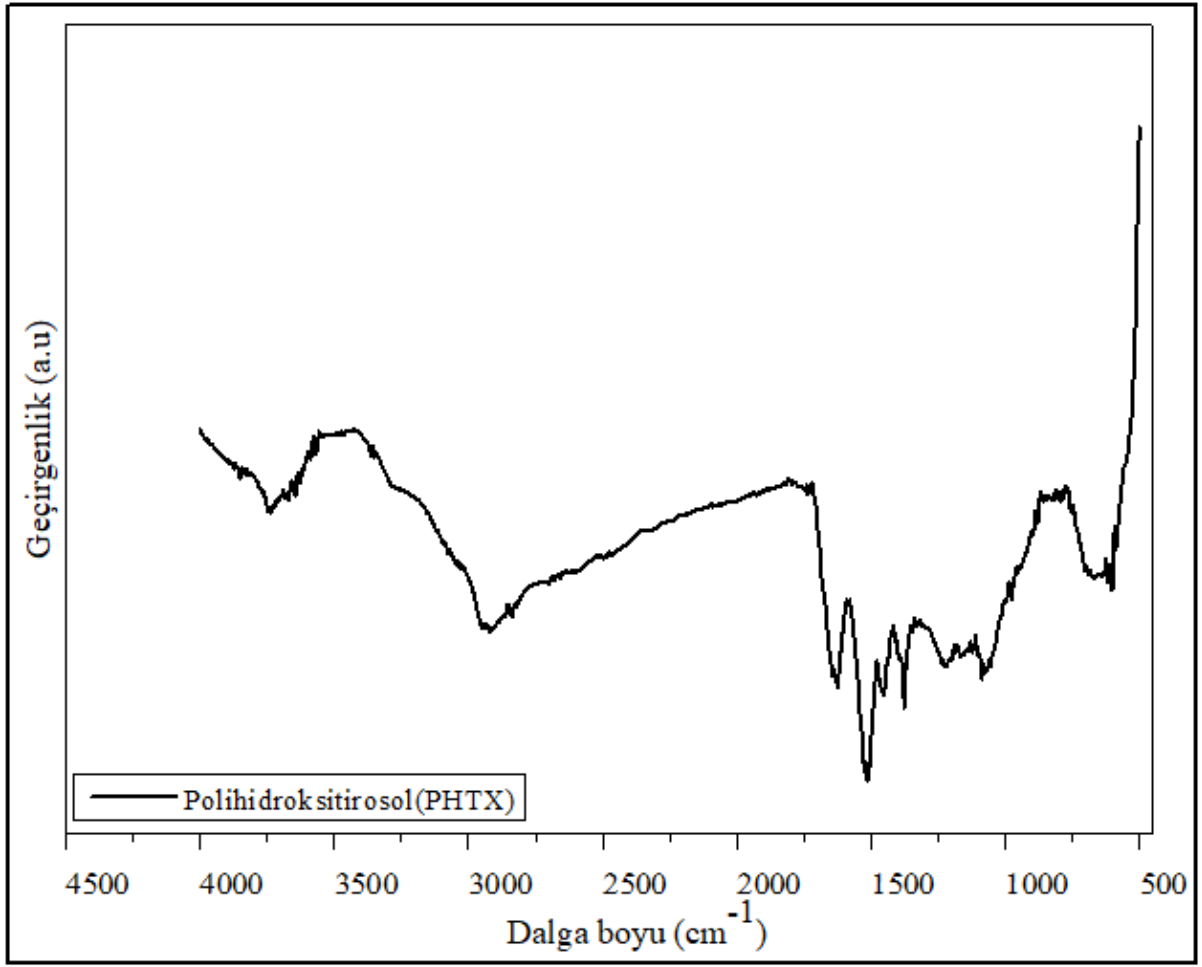
Şekil 28. Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP'ye ait FT-IR spektrumu

Şekil 28'de görüldüğü gibi Fe₃O₄@SiO₂@APTES@GA@HRP katalizörüne ait FT-IR spektrumu verilmiştir ve diğer spektrumlarla benzer pikler vermiştir. 1066 cm⁻¹'deki pik Si-O-Si bağlarının titreşim piklerini gösterir ve Fe₃O₄@SiO₂ ile uyumlu olduğu görülmektedir. 2974 cm⁻¹'deki karakteristik bant -CH₂ gruplarının gerilme bantlarıdır. 1634 cm⁻¹ ve 1395 cm⁻¹'deki pikler -CONH- (amid I ve amid II) bağlarından gelmektedir. Hareketsizleştirilmiş HRP de bu bantları temsil eden pikleri verir. Bu da HRP'nin Fe₃O₄@SiO₂@ APTES yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir (Chang & Tang, 2014); (Keshta et al. 2021).

Polimerin FT-IR analizi



Şekil 29. Monomere ait FT-IR spektrumu



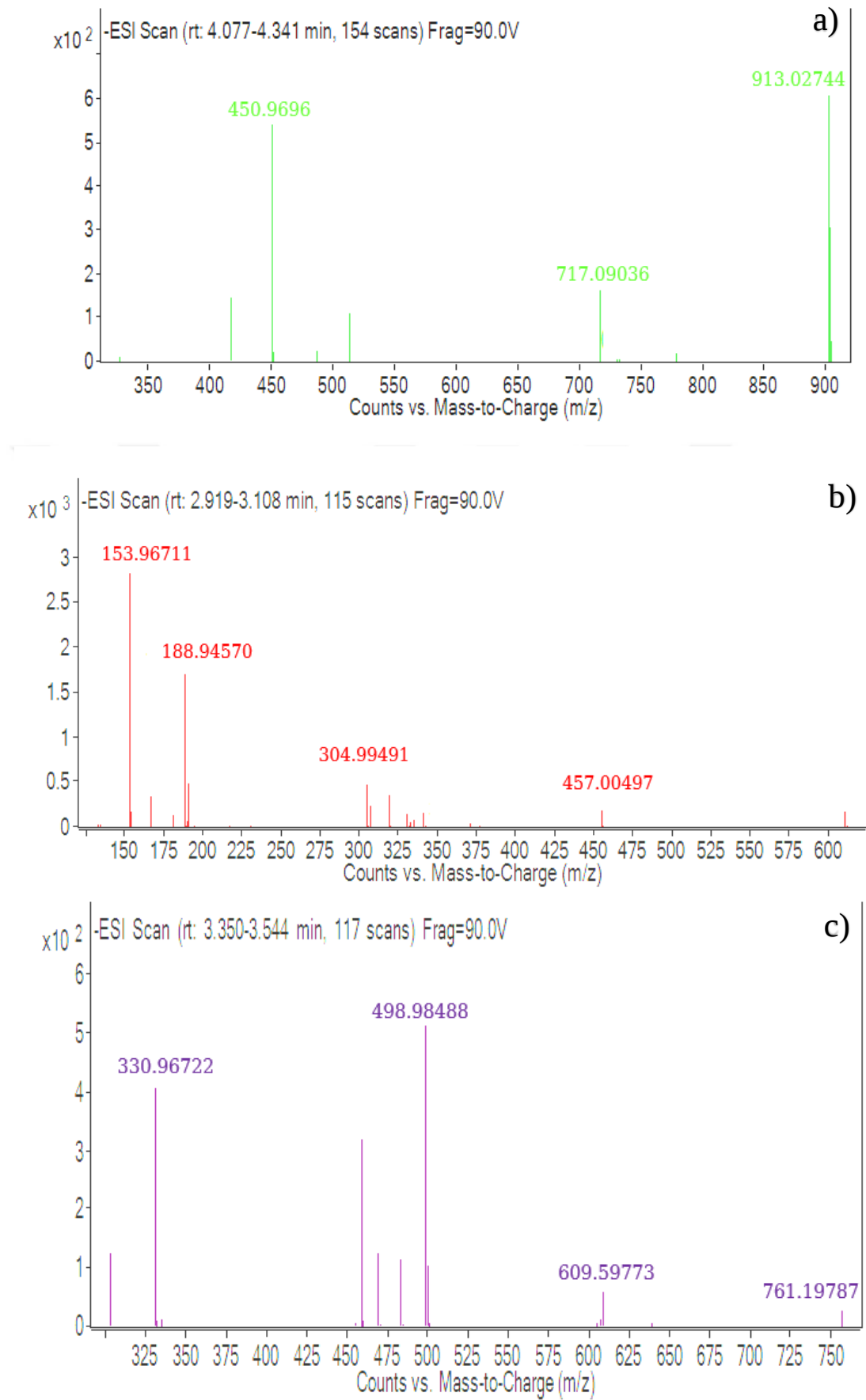
Şekil 30. Polimere ait FT-IR spektrumu

Şekil 29 ve şekil 30’da sırasıyla monomer ve polimere ait FT-IR spektrumları verilmiştir.

1066 cm^{-1} ’deki pik C-O bağından ve 1377 cm^{-1} ’deki pik O-H bağının bükülme titreşimlerinden meydana gelmektedir. 1629 cm^{-1} ’deki pik C=C bağından kaynaklanmaktadır. 2925 cm^{-1} ’deki adsorpsiyon piki C-H bağından kaynaklanmaktadır. 3277 cm^{-1} ’deki pik O-H bağının gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir ve bu sonuçlar polimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Xie et al. 2021b).

Monomer ile karşılaştırıldığında C-H bağlarından kaynaklı oluşan piklerin polimer ürününden daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu da polimer oluşumundan kaynaklı moleküller arası hidrojen etkisinin daha güçlü olmasından ileri gelmektedir (Tahir et al. 2017).

Polimerin Q-TOF LC/MS Analizi



Şekil 31. Polimere ait Q-TOF LC/MS analizi (a-b-c)

Zorbax SB-C18 (4,6 x 100 mm, 3,5-Micron) kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Doğrusal bir gradyan mobil faz A ve mobil faz B'den oluşur. Mobil faz A %0,1 formik asit-ultra saf sudan oluşmaktadır. Mobil faz B ise %100 asetronitril'den oluşmaktadır. Mobil fazlar için çalışma koşulları Tablo 6'da verilmiştir.

Kolon akış hızı 0,8 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlanmıştır. Cihaz negatif iyon modunda çalıştırılmıştır. Cihaz gaz akışı 9 L/dk, Kabuk gaz akışı 11 L/dk, kabuk gaz sıcaklığı 350°C, nebulizer basıncı 35 psig olarak ayarlandı. Kapiler ve fragmenter voltaj sırasıyla 2500V ve 90V olarak ayarlandı. Kütle tarama aralığı 50-2200 (m/z) aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 6. Mobil Fazlar İçin Çalışma Koşulları

Zaman (dk)	Mobil Faz A(%)	Mobil Faz B(%)
0,35	95,0	5,0
4,00	20,0	80,0
5,00	0,0	100,0
7,00	95,0	5,0

Şekil 31(a-b-c)'de polimer malzemesine yapılan yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (Q-TOF) analizi yer almaktadır. Şekilde görüldüğü gibi MNP*HRP katalizörü ile gerçekleştirilen polimerizasyonda oligomer ürünlerinin varlığı kanıtlanmıştır. Farklı alıkonma sürelerinde oluşan pikler (153,96711, 304,99491, 457,00497, 609,59773, 761,19787 ve 913,02744) monomer, dimer, trimer, tetramer, pentamer, hexamer varlığını göstermiştir (Xie et al. 2021b). Buna ek olarak 188,94570, 330,96722, 450,9696, 498,98488 ve 717,09036'da elde edilen piklerin ise oluşan ara ürünlere ait olduğu düşünülmektedir. Oluşan ara ürünler (öncü iyonlar), hedef ürünü (ürün iyonlarını) oluşturmak için birleşirler. Tablo 7'de ölçülen ve teorik kütleler, hata oranı, oluşan bileşikler ve formüllerine yer verilmiştir (Zwane et al., 2012); (Xie et al., 2021b).

Tablo 7. Hidroksitirosol Polimer Bileşiklerinin Q-TOF Analizi ile Tanımlanması

No	Ölçülen (m/z)	Formül	Teorik (m/z)	Hata oranı (%)	Bileşikler
1	153,96711	C ₈ H ₁₀ O ₃	153,02	0,94	HT monomer
2	188,94570	-	-	-	Ara ürün
3	304,99491	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	305,13	-0,14	HT dimer
4	330,96722	-	-	-	Ara ürün
5	450,9696	-	-	-	Ara ürün
6	457,00497	C ₂₄ H ₂₆ O ₉	457,16	-0,16	HT trimer
7	498,98488	-	-	-	Ara ürün
8	609,59773	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₂	609,61	-0,02	HT tetramer
9	717,09036	-	-	-	Ara ürün
10	761,19787	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₅	761,25	-0,06	HT pentamer
11	913,02744	C ₄₈ H ₅₀ O ₁₈	913,30	-0,28	HT hexamer

Polimerin Çözünürlük Özellikleri

Monomer ve Polimere yapılan çözünürlük testlerinde Tablo 8’de de gösterildiği gibi monomerin saf su, aseton, metanol, toluen, THF, DMSO ve DMF’de çözündüğü fakat kloroform’da çözünmediği görülmüştür. Polimerin ise saf su ve DMF’de çözündüğü, aseton, toluen, kloroform ve DMSO’da ise çözünmediği, metanol ve THF’de kısmen çözündüğü görülmüştür.

Tablo 8. Monomer ve Polimerin Çözünürlük Özellikleri

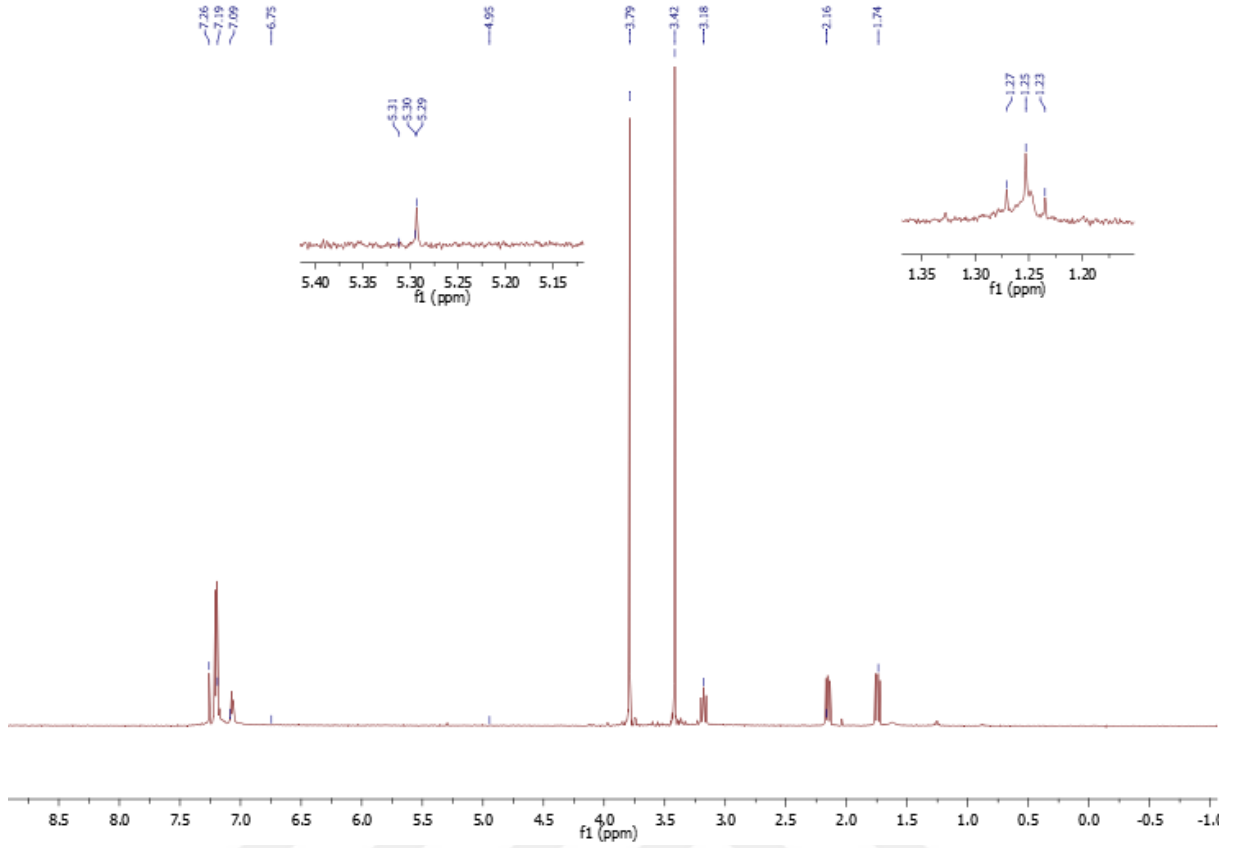
Çözücü	Saf Su	Aseton	Metanol	Toluen	Kloroform	THF	DMSO	DMF
Monomer	+	+	+	+	-	+	+	+
Polimer	+	-	++	-	-	++	-	+

(+: çözünür, -: çözünmez, ++: kısmen çözünür)

Polimerin Molekül Ağırlığı Tayini

Elde edilen polimere Zeta Sizer Nano cihazında molekül ağırlığı tayini yapıldı ve polimer molekül ağırlığı (Mw): 30000 g/mol olarak bulunmuştur.

Polimerin ^1H -NMR Analizi



Şekil 32. Polimere ait ^1H -NMR spektrumu

Şekil 32'deki ^1H -NMR spektrumu polimer ürününe aittir. 23.42 ve 3.79 ppm de gözlemlenen pikler metanol- D_4 çözücü pikine ait piklerdir. Spektrumda 7,09 - 7,19 - 7,26 ppm'deki pikler fenol halkasındaki aromatik ($=\text{C}-\text{H}$) protonlarını göstermektedir. 1.74 ve 2.16 ppm'de gözlemlenen pikler (triplet'in dubleti) fenil halkasına bağlı metilen ($-\text{CH}_2$) protonlarını göstermektedir. 3.18 ppm'de ise hidroksil grubuna bağlı metilen protonları ($-\text{CH}_2$) görülmektedir. Metilen grubuna bağlı hidroksil ($-\text{OH}$) protonu 5.30 ppm'de gözlemlenirken, fenil halkası üzerindeki hidroksil ($-\text{OH}$) gruplarına ait protonlar spektrumda görülememektedir. Üretilen polimer ürününde minimum düzeyde manyetik katalizör kalıntıları olduğundan düşük sinyaller elde edilmiştir (Xie et al. 2021b); (Zwane et al., 2012).

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuçlar

Bu çalışmada manyetik malzeme destekli enzim katalizör sentezlenmiştir. Manyetit Silisyum ile kaplanarak, yüzeyinin suyla teması engellenmiştir. Amin gruplarıyla işlevselleştirilen manyetik nano partikül gluteraldehit eşliğinde çapraz bağlama yapılarak HRP enzimiyle modifiye edilmiştir. Sentezlenen bu katalizör hidroksitirozolun polimerizasyonunda kullanılmış ve polimerizasyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon için optimum şartlar belirlenmiştir ve en yüksek verim sulu asetat tamponunda elde edilmiştir. Polimerizasyonda oksitleyici olarak H_2O_2 kullanılmıştır. Elde edilen katalizöre SEM-EDS, FT-IR, polimere ise SEM-EDS, FT-IR, Q-TOF, 1H -NMR, ZETASIZER teknikleri kullanılarak karakterizasyon analizleri yapılmıştır.

Yapılan SEM-EDS, FT-IR, Q-TOF analiz sonuçları literatür ile karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Polimer malzemesinde eser miktarda kalan manyetik katalizör kalıntısından kaynaklı 1H -NMR analizinde düşük sinyaller elde edilmiştir.

Öneriler

Enzimlerin katalizör olarak kullanılması çevre dostu bir uygulama olmakla beraber, yüksek maliyetli oluşu yöntemin kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Sentezlenen manyetik nanokatalizör, tepkime ortamından kolayca uzaklaştırılmış ve reaksiyonda tekrar kullanılmıştır. Enzim destekli manyetik katalizörün geri kazanımı ve tekrar kullanımı polimerizasyon maliyetini düşürmüştür. Enzimatik polimerizasyon yönteminde yüksek dönüşüm oranları ve yüksek molekül ağırlıklı polifenol elde edilmiştir. Enzim destekli manyetik katalizör kullanımıyla formaldehid gibi toksik özellikte olan kimyasal katalizörlerin kullanımı azalacak ve çevre dostu uygulamalar artacaktır. Bu yüzden bu deneylerin daha da geliştirilerek kullanılması önerilmektedir.

Bu çalışma, zeytin değirmeni atık suyu gibi zeytin yan ürünlerinin çevre dostu bir şekilde bertaraf edilmesine olanak sağlayan yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca, enzimatik polimerizasyonla sentezlenen polifenollerin özelliklerini daha da geliştirerek gelecekte gıda ve eczacılık alanında kullanılacak hammaddelerin geliştirilmesine imkân sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aghababaie, M., Beheshti, M., Bordbar, A.-K., & Razmjou, A. (2018). Novel approaches to immobilize *Candida rugosa* lipase on nanocomposite membranes prepared by covalent attachment of magnetic nanoparticles on poly acrylonitrile membrane. *RSC Advances*, 8(9), 4561–4570.
- Aharonov-Nadborny, R., Tsechansky, L., Raviv, M., & Graber, E. R. (2018). Mechanisms governing the leaching of soil metals as a result of disposal of olive mill wastewater on agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 630, 1115–1123.
- Akın, D., 2012. Manyetik Fe₃O₄-kitosan mikro/nanoparçacıkların sentezi, karakterizasyonu ve sulu ortamdan bromtimol mavisi uzaklaştırma kapasitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Akkara, J. A., Kaplan, D. L., John, V. T., & Tripathy, S. K. (1996). Enzyme-catalyzed polymerization. *Polymeric Materials Encyclopedia*, 3, 2116–2125.
- Akkara, J. A., Senecal, K. J., & Kaplan, D. L. (1991). Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 29(11), 1561–1574.
- Aktay, S., 2017. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerine bazı sulfanilamid türevi moleküllerinin inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O., & Ottolenghi, M. (1994). Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chemistry of Materials*, 6(10), 1605–1614.
- Bargougui, L., Guergueb, Z., Chaieb, M., Braham, M., & Mekki, A. (2019). Agro-physiological and biochemical responses of *Sorghum bicolor* in soil amended by olive mill wastewater. *Agricultural Water Management*, 212, 60–67.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). *Medical biochemistry*. Academic Press.
- Chang, Q., & Tang, H. (2014). Immobilization of horseradish peroxidase on NH₂-modified magnetic Fe₃O₄/SiO₂ particles and its application in removal of 2, 4-dichlorophenol. *Molecules*, 19(10), 15768–15782.
- Cheng, Q., Peng, T. Z., & Liu, A. L. (2005). Preparation of functional magnetic nanoparticles and its application in diagnostic analysis. *Chinese Chemical Letters*, 16(8), 1059.
- Dinçbaş, S., 2009. Alginat Kapsüllerinde Tutuklanan *Bacillus Amyloliquefaciens* A-Amilaz Enziminin Farklı Nişasta Kaynaklarını Hidrolizleme Yeteneğinin Araştırılması. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Uludağ Üniversitesi, Bursa.
- Dordick, J. S., Marletta, M. A., & Klibanov, A. M. (1986). Peroxidases depolymerize lignin in organic media but not in water. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(17), 6255–6257.
- Dordick, J. S., Marletta, M. A., & Klibanov, A. M. (1987). Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(1), 31–36.

- Duran, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28(2), 83–99.
- Erdem, B., Avşar, S. B., Erdem, S., & Tekin, N. (2018). Adsorption of light green and brilliant yellow anionic dyes using amino functionalized magnetic silica (Fe₃O₄@ SiO₂@ NH₂) nanocomposite. *Journal of Dispersion Science and Technology*.
- Fernandez-Lafuente, R. (2009). Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6–7), 405–418.
- Gezer, E., 2018. Fe₃O₄ (Demir Oksit) bağlanmış dioksim içeren Fe₃O₄/L(1-5) ve Fe₃O₄/L(1-5)/Pd(II) tipi partiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve katalitik çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Göktürk, E. (2021). Horseradish Peroksidaz Nano Biyokatalizörü İle Hidrokinon'un Polimerleştirilmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(1), 384–392.
- Gözeten, İ., 2020. MWCNT, Aktif Karbon Ve Al₂O₃ Destekli Paladyum Nanokatalizörlerinin Sentezi, Tanımlanması Ve Cr⁺⁶'nın Cr⁺³'e İndirgenmesindeki Katalitik Performanslarının İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- Gross, R. A., Kumar, A., & Kalra, B. (2001). Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chemical Reviews*, 101(7), 2097–2124.
- Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., & Elfeki, A. (2009). Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 180(3), 421–432.
- Hu, X., & Yu, J. C. (2008). Continuous aspect-ratio tuning and fine shape control of monodisperse α -Fe₂O₃ nanocrystals by a programmed microwave–hydrothermal method. *Advanced Functional Materials*, 18(6), 880–887.
- Isci, I., Gokturk, E., Turac, E., & Sahmetlioglu, E. (2016). Chemoenzymatic polymerization of hydrazone functionalized phenol. *Polymer Science Series B*, 58, 411–420.
- Junker, K., Zandomenighi, G., Schuler, L. D., Kissner, R., & Walde, P. (2015). Enzymatic polymerization of pyrrole with *Trametes versicolor* laccase and dioxygen in the presence of vesicles formed from AOT (sodium bis-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate) as templates. *Synthetic Metals*, 200, 123–134.
- Kaplan, D. L., Kobayashi, S., Matsumura, S., Ohmae, M., Reihmann, M., Singh, A., Uyama, H., & Xu, P. (2006). *Enzyme-catalyzed synthesis of polymers* (Vol. 194). Springer Science & Business Media.
- Kasavi, C., 2006. Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Kawakita, H. (2012). Metal recovery using polyphenols prepared by enzymatic reactions of horseradish peroxidase. *Science and Technology*, 2(1), 25–29.
- Keshta, B. E., Gemeay, A. H., & Khamis, A. A. (2021). *The assisting-approach of horseradish peroxidase immobilized onto amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a biocatalyst*.
- Kızıldaş, H., 2018. SiO₂, TiO₂, ZnO ve Ag Katkılı Manyetik Çekirdek-Kabuk Yapılı Nanokompozit Katalizörlerin Üretimi, Karakterizasyonu, Fotokatalitik ve

Antibakteriyel Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

- Kim, J.-K., Park, J.-K., & Kim, H.-K. (2004). Synthesis and characterization of nanoporous silica support for enzyme immobilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 241(1–3), 113–117.
- Kiratitanavit, W., Bruno, F. F., Kumar, J., & Nagarajan, R. (2018). Facile enzymatic preparation of fluorescent conjugated polymers of phenols and their application in sensing. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(30), 46496.
- Kobayashi, S., Shoda, S., & Uyama, H. (2005). Enzymatic polymerization and oligomerization. *Polymer Synthesis/Polymer Engineering*, 1–30.
- Kobayashi, S., Uyama, H., & Kimura, S. (2001). Enzymatic polymerization. *Chemical Reviews*, 101(12), 3793–3818.
- Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., & Zervakis, G. I. (2018). Toward an increased functionality in oyster (*Pleurotus*) mushrooms produced on grape marc or olive mill wastes serving as sources of bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 5971–5983.
- Krainer, F. W., & Glieder, A. (2015). An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1611–1625.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139.
- Laochai, T., Mooltongchun, M., & Teepoo, S. (2016). Design and construction of magnetic nanoparticles incorporated with a chitosan and poly (vinyl) alcohol cryogel and its application for immobilization of horseradish peroxidase. *Energy Procedia*, 89, 248–254.
- Leon, J. C., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I. Y., Csoregi, E., & Sakharov, I. Y. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163(5), 1011–1019.
- Levy, G. J., Dag, A., Raviv, M., Zipori, I., Medina, S., Saadi, I., Krasnovski, A., Eizenberg, H., & Laor, Y. (2018). Annual spreading of olive mill wastewater over consecutive years: Effects on cultivated soils' physical properties. *Land Degradation & Development*, 29(1), 176–187.
- Lin, Y., Chen, H., Lin, K., Chen, B., & Chiou, C. (2011). Application of magnetic particles modified with amino groups to adsorb copper ions in aqueous solution. *Journal of Environmental Sciences*, 23(1), 44–50.
- Liu, Y., Fu, R., Sun, Y., Zhou, X., Baig, S. A., & Xu, X. (2016). Multifunctional nanocomposites Fe₃O₄@ SiO₂-EDTA for Pb (II) and Cu (II) removal from aqueous solutions. *Applied Surface Science*, 369, 267–276.
- Lu, A., Salabas, E. emsp14L, & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222–1244.
- Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., & Stone, M. O. (2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology*, 22(2), 211–213.
- Manzano-Nicolas, J., Taboada-Rodriguez, A., Teruel-Puche, J. A., Marin-Iniesta, F., Garcia-Molina, F., García-Cánovas, F., Tudela-Serrano, J., & Munoz-Munoz, J. (2021).

- Enzymatic oxidation of oleuropein and 3-hydroxytyrosol by laccase, peroxidase, and tyrosinase. *Journal of Food Biochemistry*, 45(8), e13803.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463.
- Mejias, L., Reihmann, M. H., Sepulveda-Boza, S., & Ritter, H. (2002). New polymers from natural phenols using horseradish or soybean peroxidase. *Macromolecular Bioscience*, 2(1), 24–32.
- Oguchi, T., Tawaki, S., Uyama, H., & Kobayashi, S. (1999). Soluble polyphenol. *Macromolecular Rapid Communications*, 20(7), 401–403.
- Önder, R. S., 2008. "Horseradish" peroksidaz (bayır turpu peroksidazı) (HRP) ve dekstran türevinin çevre kirletici boyalara etkisinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Özsaçmacı, G., 2016. Tekli, çoklu ve bimetalik katalizörler ile borhidrür bileşiklerinin parçalanması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hitit Üniversitesi, Çorum.
- Que Jr, L., & Tolman, W. B. (2008). Biologically inspired oxidation catalysis. *Nature*, 455(7211), 333–340.
- Rana, S., Yeh, Y.-C., & Rotello, V. M. (2010). Engineering the nanoparticle–protein interface: applications and possibilities. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(6), 828–834.
- Reihmann, M. H., & Ritter*, H. (2001). Oxidative copolymerisation of para-functionalized phenols catalyzed by Horseradish peroxidase and thermocrosslinking via Diels-Alder and (1+ 3) cycloaddition. *Macromolecular Bioscience*, 1(3), 85–90.
- Rezayan, A. H., Mousavi, M., Kheirjou, S., Amoabediny, G., Ardestani, M. S., & Mohammadnejad, J. (2016). Monodisperse magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles modified with water soluble polymers for the diagnosis of breast cancer by MRI method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 420, 210–217.
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & De la Torre, R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655–4680.
- Sahoo, S. K., Liu, W., Samuelson, L. A., Kumar, J., & Cholli, A. L. (2002). Biocatalytic polymerization of p-cresol: An in-situ NMR approach to understand the coupling mechanism. *Macromolecules*, 35(27), 9990–9998.
- Saif, B., Wang, C., Chuan, D., & Shuang, S. (2015). Synthesis and characterization of Fe₃O₄ coated on APTES as carriers for morin-anticancer drug. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6(04), 267.
- Sheikhmohammadi, A., Safari, M., Alinejad, A., Esrafil, A., Nourmoradi, H., & Asgari, E. (2019). The synthesis and application of the Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane as an efficient sorbent for the adsorption of ethylparaben from wastewater: Synthesis, kinetic, thermodynamic and equilibrium studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 103315.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289–1307.
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62–69.

- Şakar, S., 2019. Manyetik Nanomalzeme Destekli Enzim Katalizörlerin, Polimer Sentezinde Kullanımı. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Şenol, N., 2010. Doğal gazdan hidrojen üretimi için katalizör geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X., Wang, S., & Mariod, A. A. (2017). Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, 202–211.
- Teja, A. S., & Koh, P.-Y. (2009). Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55(1–2), 22–45.
- Thomas, J. M., & Thomas, W. J. (2014). *Principles and practice of heterogeneous catalysis*. John Wiley & Sons.
- Topal, Y., Tapan, S., Gokturk, E., & Sahmetlioglu, E. (2017). Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of ortho-imino-phenol: synthesis, characterization, thermal stability and electrochemical properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(6), 731–740.
- Tutar, H., 2009. Candida rugosa lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Uçar, A., 2011. Aspergillus sp. tarafından üretilen amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- Uppal, S., Arora, A., Gautam, S., Singh, S., Choudhary, R. J., & Mehta, S. K. (2019). Magnetically retrievable Ce-doped Fe₃O₄ nanoparticles as scaffolds for the removal of azo dyes. *RSC Advances*, 9(40), 23129–23141.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259.
- Wang, P. (2009). Multi-scale features in recent development of enzymic biocatalyst systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152, 343–352.
- Wechakorn, K., Chanpanich, P., Kamkalong, P., & Anantachisilp, S. (2019). Rhodamine-Triazole functionalized Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles as fluorescent sensors for heavy metal ions. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(3), 1054.
- Xia, K., Ferguson, R. Z., Losier, M., Tchoukanova, N., Brüning, R., & Djaoued, Y. (2010). Synthesis of hybrid silica materials with tunable pore structures and morphology and their application for heavy metal removal from drinking water. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1–3), 554–564.
- Xie, P., Fan, L., Huang, L., & Zhang, C. (2021a). Oxidative polymerization of hydroxytyrosol catalyzed by laccase, tyrosinase or horseradish peroxidase: influencing factors and molecular simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(15), 5486–5497.
- Xie, P., Fan, L., Huang, L., & Zhang, C. (2021b). Oxidative polymerization process of hydroxytyrosol catalysed by polyphenol oxidases or peroxidase: Characterization, kinetics and thermodynamics. *Food Chemistry*, 337, 127996.

- Xu, X., Ding, H., & Wang, X. (1995). Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 50(6), 407–415.
- Yang, K., Peng, H., Wen, Y., & Li, N. (2010). Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Applied Surface Science*, 256(10), 3093–3097.
- Yang, L., Chen, X., Zhou, Z., Zhang, R., Li, L., Cheng, Z., & Fang, X. (2016). Magnetic Fe₃O₄@ SiO₂/Pd and Fe₃O₄@ SiO₂/Pd-M (M= Ag, Cu and Zn) Catalysts for Selective Hydrogenation of Phenylacetylene. *ChemistrySelect*, 1(18), 5599–5606.
- Yazdani, M. R., Fozooni, S., Khabazzadeh, H., & Nazarizadeh, E. (2023). Fe₃O₄@ SiO₂-APTES@ Isophthaloyl Dichloride/Montmorillonite Magnetic Nanoparticles for Efficient Removal of Pb²⁺ and Cd²⁺. *Chemical Engineering & Technology*, 46(9), 1896–1910.
- Yıldız, M.L., 2021. Bazı florofeniltiyöre bileşiklerinin insan eritrositlerinden saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6- fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Zwane, R. E., Parker, A., Kudanga, T., Davids, L. M., & Burton, S. G. (2012). Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11509–11517.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Gülşah AKTAŞ
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Uyruğu:
Adres:
Tel:
E-mail:
Eğitim
Lise:
Lisans:
Yüksek lisans:
Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Tezden Üretilmiş Yayınlar