

**YABAN TURBU-PEROKSİDAZ ÇAPRAZ BAĞLI
KATALİTİK KOLON GELİŞTİRİLMESİ VE
PEDOT/PSS ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİ**

Gözde YAVUZ
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Ağustos 2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gözde Yavuz' un "Yaban Turbu-Peroksidaz Çapraz Bağlı Katalitik Kolon Geliştirilmesi ve PEDOT/PSS Üretiminde Kullanılabilirliği" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 13.08.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
Üye	: Prof. Dr. Rıdvan SAY
Üye	: Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YABAN TURBU-PEROKSİDAZ ÇAPRAZ BAĞLI KATALİTİK KOLON GELİŞTİRİLMESİ VE PEDOT/PSS ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİ

Gözde YAVUZ

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
2015, 77 sayfa**

Bu çalışmada; yaban turbu horseradish peroksidaz (HRP) enziminin iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmasına yönelik 2-akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit (AMPS) bağlı katyonik değiştirici özellikte kriyojel kolon geliştirilmiş ve bu kolonun HRP saflaştırılmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Daha sonra, saflaştırılan HRP kullanılarak kriyojel kolon geliştirilmiş ve bu kolon kullanılarak enzimatik polimerizasyon yöntemi ile iletken poli(3,4-etilendioksitifoyen (PEDOT) polimeri sentezlenmiştir. Bu doğrultuda ilk aşamada; hidroksi etilmetakrilat (HEMA) monomeri, N,N' metilenbisakrilamid (MBA) varlığında polimerleştirilerek AMPS kriyojel kolon hazırlanmıştır. Şişme testi, BET, SEM ve FT-IR analizleri ile hazırlanan kriyojel kolonun karakterizasyonu, Bradford yöntemi ile saflaştırılan HRP' nin protein içeriği ve SDS Page analizi ile molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; MBA, HEMA ve rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) yöntemi kullanılarak HRP kriyojel kolon hazırlanmıştır. Daha sonra, HRP kriyojel kolondan poli(sodyum 4-sitirensülfonat) (Na/PSS) ve 3,4-etilendioksitifoyen (EDOT) monomeri ile peristaltik pompa kullanılarak PEDOT/PSS polimeri sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Horseradish Peroksidaz, İyon Değişim Kromatografisi,

Enzim Saflaştırma, PEDOT, GPC

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DEVELOPMENT OF HORSERADISH PEROXIDASE CROSSLINKED CATALYTIC COLUMN AND AVAILABILITY IN THE PRODUCTION OF PEDOT/PSS

Gözde YAVUZ

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

**Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
2015, 77 pages**

In this study; 2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid (AMPS) based cationic exchanger cryogel column has been developed for the purification of horseradish peroxidase (HRP) by ion exchange chromatography, the efficiency of this column for HRP purification has been investigated. Then, purified HRP cryogel column has been developed and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) conductive polymer has been synthesized by enzymatic polymerization method by using this column. In this direction in the first stage; AMPS cryogel column has been prepared by the polymerization of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) monomer in the presence of N,N' Methylenebisacrylamide (MBA). Characterization of the prepared cryogel column has been carried out by swelling tests, BET, SEM and FT-IR analysis, Bradford method for protein content of the purified HRP and SDS-Page analysis for determination of molecular weight.

In the second step of the study, HRP cryogel column has been prepared by MBA, HEMA and ruthenium based amino acid monomers using photosensitive cross-linking technique (ANADOLUCA). Then, PEDOT/PSS polymer has been synthesized from HRP cryogel column by poly(sodium 4-styrenesulfonate) and 3,4-ethylenedioxythiophene monomer by using peristaltic pump. Molecular weight of synthesized polymer has been determined by Gel Permeation Chromatography (GPC).

Keywords: Horseradish Peroxidase, Ion Exchange Chromatography,
Enzyme Purification, PEDOT, GPC

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen çok sevdiğim hocam Prof. Dr. Arzu Ersöz' e

Deneysel çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her zaman destekleyen, tanıdığım için kendimi şanslı hissettiğim hocalarım Prof. Dr. Rıdvan Say, Doç. Dr. Sibel Emir Diltemiz ve Doç. Dr. Ayça Atılır Özcan' a

Teorik ve deneysel her konuda desteğini yanımda hissettiğim sevgili hocam ve arkadaşım Rüstem Keçili' ye;

İlgilerini ve desteklerini yalnızca laboratuvarında değil, hayatımın her alanında hissettiğim, ikinci ailem dediğim Biyokimya Lab. ekibine ve o ekipten olan sevgili dostlarım Ayça Bakır, Berfu Engin, Yasemin Uymaz, Fatma Yediyıldız, Derya Karaarslan, Burcu Yazıcı, Halil İbrahim Akbaş ve Semra Özgün Köse' ye,

Tez yazım aşamasında sabır ve ilgileriyle beni her türlü destekleyen ve zorlandığım her anımda yanımda bulunan sevgili arkadaşlarım Atilla Selvi, Emre Özdemir ve Gizem Yücel' e

Eğitim hayatım boyunca aldığım her kararda, attığım her adımda yanımda olan, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi fedakar davranan ve kendimi özel hissettiren ablama, kardeşime, anneme ve babama

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gözde YAVUZ

Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

<u>ÖZET</u>	i
<u>ABSTRACT</u>	ii
<u>TEŞEKKÜR</u>	iii
<u>İÇİNDEKİLER</u>	iv
<u>SEKİLLER DİZİNİ</u>	ix
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ</u>	xii
<u>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</u>	xiii
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİ	3
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	4
2.1.3. Enzim Aktivitesi	6
2.1.4. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	6
2.1.4.1. Enzim Değişimi	6
2.1.4.2. Substrat Değişimi.....	7
2.1.4.3. pH	8
2.1.4.4. Sıcaklık.....	8
2.1.4.5. İnhibitörler	9
2.1.4.6. Enzim Kinetiği.....	10

2.1.5. Peroksidazlar	13
2.1.5.1. Horseradish Peroksidaz	14
2.2. Enzim Ön Deriştirme ve Saflaştırma Yöntemleri	18
2.2.1. Kromatografik Yöntemler	19
2.2.1.1. İyon Değişim Kromatografisi	21
2.2.2. Kriyojeller.....	23
2.3. Rutenyum Tabanlı Aminoasit Monomerleriyle Fotosensitif Çapraz Bağlama ve ANADOLUCA Yöntemi	25
2.4. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)	26
2.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-Page).....	28
2.6. Polimerler.....	29
2.6.1. İletken Polimerler.....	30
2.6.2. İletken Polimerlerin Sentezlenmesi	32
2.6.2.1. Enzimatik Polimerizasyon	32
2.6.3. PEDOT [Poli(3,4-etilendioksitiyofen)].....	33
2.6.4. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC).....	34
3. MATERYAL VE METOD.....	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	36
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	36
3.2. Metod	37
3.2.1. AMPS kriyojel kolonun hazırlanması	37

3.2.2. AMPS kriyojel kolonun karakterizasyon çalışmaları	37
3.2.2.1. FT-IR analizi	37
3.2.2.2. Şişme Testi	38
3.2.2.3. Yüzey Morfolojisi	38
3.2.2.4. Yüzey Alanı Ölçümü.....	38
3.2.3. Enzim Ön Deriştirilmesi	38
3.2.4. Enzim Saflaştırılması	39
3.2.5. Enzimin Aktivitesi ve Protein Tayini.....	39
3.2.6. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	40
3.2.7. SDS-Page Analizi	40
3.2.8. bis(2-2'-bipiridil) (MATyr) ₂ Rutenyum (II) sentezi	41
3.2.9. HRP kriyojel kolonun hazırlanması.....	41
3.2.10. HRP kriyojel kolonun karakterizasyon çalışmaları	42
3.2.10.1. FT-IR analizi	42
3.2.10.2. Şişme Testi	42
3.2.10.3. Yüzey Morfolojisi	42
3.2.10.4. Yüzey Alanı Ölçümü.....	42
3.2.11. PEDOT polimerinin sentezi	42
3.2.12. PEDOT polimerinin karakterizasyon çalışmaları	43
3.2.12.1. UV spektroskopik ölçümü.....	44
3.2.12.2. Floresans Ölçümleri	44
3.2.12.3. Molekül Ağırlığı Tayini	44
4. BULGULAR	46
4.1. Poli(HEMA-ko-AMPS)' nin Karakterizasyonu	46

4.1.1. Poli(HEMA-ko-AMPS)' nin FT-IR Spektrumu.....	46
4.1.2. AMPS Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi.....	46
4.1.3. AMPS Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi.....	47
4.1.4. AMPS Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü	47
4.2. Enzim Örneklerinin Protein İçeriği Tayini	47
4.3. Enzim Saflaştırılması	49
4.3.1. FPLC Analizi	49
4.3.2. Saflaştırılan Enzimin Protein Miktarı ve Aktivite Tayini	50
4.3.3. HRP Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi.....	51
4.3.3.1. pH Etkisi	51
4.3.3.2. Enzim Derişimi Etkisi.....	52
4.3.3.3. Sıcaklık Etkisi	53
4.3.3.4. Substrat Derişimi Etkisi	53
4.3.4. HRP' nin V_{mak} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi	54
4.4. SDS-PAGE Analizi.....	55
4.5. Poli(HEMA-ko-HRP)' nin Karakterizasyonu	56
4.5.1. Poli(HEMA-ko-HRP)' nin FT-IR Spektrumu	56
4.5.2. HRP Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi.....	56
4.5.3. HRP Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi.....	57
4.5.4. HRP Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü	58
4.6. PEDOT Polimerinin Karakterizasyon Çalışmaları	58
4.6.1. Polimer Sentezi	58
4.6.2. UV Spektroskopik Ölçümleri.....	61
4.6.3. Floresans Spektrum Ölçümleri.....	62

4.6.4. Molekül Ağırlığı Tayini	63
5. SONUÇ VE YORUM	65
KAYNAKLAR	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Apoenzim, Koenzim ve Holoenzim Yapısı	4
Şekil 2.2. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	7
Şekil 2.3. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	7
Şekil 2.4. pH' ın reaksiyon hızına etkisi	8
Şekil 2.5. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi	9
Şekil 2.6. İnhibisyon çeşitleri	10
Şekil 2.7. Michaelis-Menten grafiği	12
Şekil 2.8. Lineweaver-Burk grafiği	12
Şekil 2.9. Basit haliyle porfirin yapısı	13
Şekil 2.10. Hem grubu bağlı porfirin yapısı	13
Şekil 2.11. Peroksidaz saflaştırılmasında kullanılan yaban turbu (<i>Amoracia rusticana</i>)	14
Şekil 2.12. HRP-C' nin hem kısmı ve hem demir atomuyla His 170 koordine bağlar.....	15
Şekil 2.13. X-ışını kristalografisi ile HRP' nin üç boyutlu molekül yapısı	15
Şekil 2.14. Hem bölgesini çevreleyen anahtar amino asid kalıntıları.....	16
Şekil 2.15. HRP enziminin çalışma mekanizması	17
Şekil 2.16. HRP' nin katalitik döngüsü	17
Şekil 2.17. Diyaliz işleminin.....	19
Şekil 2.18. Katyon değişim kromatografi örneği.....	21
Şekil 2.19. İyon değiştiriciler. (a) Anyon değiştirici, (b) Katyon değiştirici	22
Şekil 2.20. Farklı şekillere sahip kriyojeller	24
Şekil 2.21. Kriyojelleşme süreci	24

Şekil 2.22. FPLC cihazı bileşenleri	27
Şekil 2.23. FPLC kromatogramı	27
Şekil 2.24. SDS-PAGE: SDS-poliakrilamid jel elektroforezi	28
Şekil 2.25. İletken polimer örnekleri	30
Şekil 2.26. PEDOT yapısı.....	33
Şekil 2.27. Jel Geçirgenlik Kromatografisi.....	35
Şekil 3.1. Anadolu Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı FPLC cihazı.....	39
Şekil 3.2. TMB substratının HRP ile reaksiyon mekanizması	39
Şekil 3.3. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr) ₂ -Rutenyum (II) molekül yapısı.....	41
Şekil 3.4. Peristaltik pompa deney düzeneği	43
Şekil 3.5. EDOT' un polimerizasyon mekanizması	43
Şekil 3.6. PEDOT ve PSS arasındaki reaksiyonun şematik gösterimi	44
Şekil 3.7. Anadolu Üniversitesi Kromatografi Laboratuvarı GPC cihazı	45
Şekil 4.1. AMPS' nin FT-IR spektrumu	46
Şekil 4.2. Poli(HEMA) boş kriyojel kolon	47
Şekil 4.3. Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolon	47
Şekil 4.4. Bradford standart grafiği.....	48
Şekil 4.5. Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolonundan geçirilen ticari HRP' nin kromatogramı	49
Şekil 4.6. Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolonu ile HRP saflaştırılmasına ait kromatogram	50
Şekil 4.7. Substrat olarak TMB kullanıldığında HRP aktivitesinin pH ile değişimi.....	52
Şekil 4.8. pH 5 tamponu ve TMB substratı kullanılarak oluşturulan enzim	

derişiminin aktivite üzerine etkisi	52
Şekil 4.9. Substrat olarak TMB kullanıldığında HRP aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim grafiğı	53
Şekil 4.10. pH 5 tamponu ve farklı derişimlerde TMB kullanılarak oluşturulan derişim grafiğı	54
Şekil 4.11. Farklı derişimlerde TMB substratı ve pH 5 tamponu kullanılarak oluşturulan Lineweaver Burk Eğrisi	54
Şekil 4.12. SDS-Page görüntüsü	55
Şekil 4.13. HRP' nin FT-IR spektrumu	56
Şekil 4.14. (a) Poli(HEMA) boş kriyojel kolon (b) HRP bağı fotosensitif kriyojel kolon (c) HRP bağı fotosensitif kriyojel kolon	58
Şekil 4.15. (a) Karışımın 7. Saat sonundaki rengi (b) Karışımın 16. saat sonundaki rengi	58
Şekil 4.16. 3. saat sonunda HRP bağı fotosensitif kriyojel kolon kullanılan deney düzenegi	59
Şekil 4.17. (a) HRP bağı fotosensitif kriyojel kolon kullanılan deneyin 1. saat sonundaki rengi (b) HRP bağı fotosensitif kriyojel kolon kullanılan deneyin 3. saat sonundaki rengi	60
Şekil 4.18. Çözelti ortamında sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin UV grafiğı .	61
Şekil 4.19. Sürekli sistemde sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin UV grafiğı ...	61
Şekil 4.20. Ticari EDOT monomerinin floresans spektrumu, Ex: 300 nm	62
Şekil 4.21. Sentezlenen PEDOT/PSS' un floresans spektrumu, Ex: 300 nm	62
Şekil 4.22. PEG/PEO standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiğı....	63
Şekil 4.23. Sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin GPC kromatogramı	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kolon kromatografi tipleri ve ayrılma prensipleri.....	20
Çizelge 2.2. Değiştirici fonksiyonel gruplar	22
Çizelge 4.1. HRP' ye ait saflaştırma tablosu	50
Çizelge 4.2. HRP saflaştırılmasının değişik araştırma gruplarının çalışmalarıyla karşılaştırılması	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
AMPS	: 2-akrilamido 1-metil 1-propan sülfonik asit
TMB	: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
PEDOT	: Poli(3,4-etilendioksitifoyen)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FPLC	: Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
PSS	: Poli(sodyum 4-sitirensülfonat)
HEMA	: Hidroksietilmetakrilat
HRP	: Horseradish (Yaban turbu) Peroksidaz
kDa	: Kilodalton
Km	: Michealis-Menten Sabiti
MBA	: N'N, Metilenbisakrilamit
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	: Sodyum n-dodesil sülfat
TEMED	: Tetraetilmetilendiamin
U	: Enzim Ünitesi
V_{mak}	: Maksimum reaksiyon hızı
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi

1. GİRİŞ

Biyokimya; canlı organizmaların kimyasal yapısını, işlevini, metabolizmasını ve hayatın devamı boyunca canlının içinde meydana gelen kimyasal olayları ele alan ve inceleyen bir bilim dalıdır. Biyokimya; moleküler düzeyde gerçekleşen olayları ve hücrelerimizde nelerin olduğunu aydınlatmada; protein, yağ, karbonhidrat, nükleik asit ve diğer biyomoleküller gibi bileşenleri incelemede büyük rol oynar. Ayrıca, hücrelerin birbirleriyle büyüme sırasında veya hastalıklarla savaşmada nasıl etkileşim içinde olduğuna bakar. Biyokimya son 40 yılda botanikten tıba kadar birçok hayat biliminde çok başarılı bir sürece girmiştir [1].

Biyokimyanın başlangıcı bugünkü adıyla amilaz olarak bilinen ilk enzim 'diastaz'ın 1833 yılında Anselme Payen tarafından keşfiyle başlamıştır [2]. Daha sonra 1896 yılında Eduard Buncher, mayanın hücre ekstraktlarında alkol fermantasyonu gerçekleştirerek ilk defa hücre dışında karmaşık bir biyokimyasal olayın gerçekleşmesine katkıda bulunmuştur [3]. Biyokimya terimi ilk olarak 1903 yılında Alman kimyager Carl Neuberg tarafından ortaya atılmıştır [4]. Biyokimya uygulama alanları arasında ayrıca moleküler biyoloji ve genetik, organik kimya, anorganik kimya ve mikrobiyoloji gibi birçok bilim dalı da vardır. Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello 2006 yılında [5], ribonükleik asit interferaz (RNAi)'in gen ifadesinin susturulmasındaki rolünü keşfetmeleriyle Nobel ödülü almışlardır.

Enzimler, biyokimya ve tıpta; bununla birlikte kozmetik, tekstil, gıda, kağıt ve deterjan endüstrisinde çok sık kullanılan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin saflaştırılmalarının pratik ve ekonomik olması; daha kısa sürede daha çok verim sağlamak için çok önemlidir. Enzim saflaştırmak için kullanılan kaynaklardan bitkisel kaynaklar; hem daha az maliyetli oluşu, hem kolay bulunabilirliği hem de herhangi bir çevre kirliliği yaratmaması nedeniyle sıkça tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında; horseradish peroksidaz (HRP) enzimi saflaştırılması için yaban turbu kullanılmış ve izolasyonu bu bitkinin köklerinden sağlanmıştır. Buna bağlı olarak izole edilen enzimin saflaştırılması için güçlü bir katyon değiştirici olan 2-akrilamido 1-metil 1-propan sülfonik asit (AMPS)

tabanlı kriyojel kolon kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Enzimlerin diğer bir kullanımı ise fenolik bileşiklerle gerçekleştirdiği enzimatik polimerizasyondur. Bu yöntemle sentezlenen ürünler elde edilirken, toksik kimyasallar kullanılmadığı için, enzimatik polimerizasyon yöntemi “çevre dostu” olarak bilinmektedir. Ayrıca, enzim katalizli reaksiyonların tersinir olması oluşan polimerin doğada bu enzimlere sahip mikroorganizmalar tarafından parçalanabilir olmasını da mümkün kılmaktadır. Böylelikle hem çözünebilir hem işlenebilir polimer elde edilmiş olur, hem de yüksek kazançlı polimerleşme gerçekleşir.

Bu kapsamda çalışmanın ikinci aşamasında; saflaştırılan HRP enzimi ile rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) [61] yöntemi kullanılarak katalitik kriyojel kolon hazırlanmış, elektriksel iletkenliği oldukça yüksek, düşük yükseltgenme potansiyeline sahip, kimyasal ve termal kararlılığı yüksek, poli(3,4-etilendioksitifoyen) (PEDOT) polimeri sentezlenmiştir. PEDOT, oldukça iyi bir iletken polimer olup, biyosensörler, biyomedikal, organik piller ve optik ekranlar gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

2. TEORİK BİLGİ

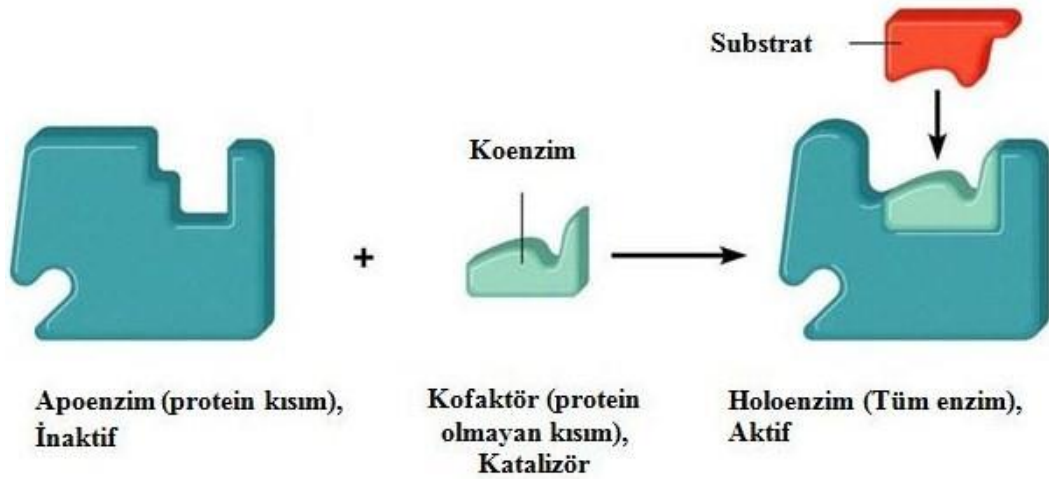
2.1. Enzimler

2.1.1. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Enzimler; parçalanmadan veya değişikliğe uğramadan, canlı hücreler tarafından oluşturulan, kimyasal reaksiyonları yapısındaki organik kimyasal maddeler tarafından katalizleyen moleküllerdir. Biyolojik sistemlerin bu reaksiyon katalizörleri, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır. Enzimler ayrıca, moleküllerin yıkılmasını, kimyasal enerjinin vücutta depolanmasını ve şeklinin değiştirilmesini katalizleyip, basit moleküllerden biyolojik makromoleküllerin yapıldığı metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalizleme görevini yerine getirirler. Enzimler, hücrelerde çok önemli metabolik görevlere sahiptir; bu nedenle günlük ve ekonomik hayatta oldukça önemli bir yere sahiptirler [6].

Enzimler, bazı katalitik RNA molekülleri dışında protein yapıdadırlar. Bu nedenle proteinlere ait tüm yapısal özellikleri gösterirler. Enzimlerin molekül ağırlığı, diğer proteinler gibi 12.000' den 1.000.000' a kadar değişebilmektedir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, kendi doğal proteinlerinin üç boyutlu yapısal bütünlüğüne bağlıdır. Enzim proteinleri primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıda olup, katalitik aktiviteleri için temeldir. Enzimlerin protein yapılarına "apoenzim" denir. Bazı enzimler aktiviteleri için başka hiçbir kimyasal gruba ihtiyaç duymazken bazı enzimler ise "koenzim" diye adlandırılan bir ek kimyasal gruba ihtiyaç duyarlar. Bu moleküller tek başına etkili olmayıp ancak apoenzim varlığında etkinlik gösterebilirler. Bazı enzimler ise "kofaktör" adı verilen metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar [7]. Koenzim ve apoenzimin oluşturduğu yapının tamamına ise "haloenzim" adı verilir (Şekil 2.1).

Enzimlerin etki ettiği maddeye "substrat" adı verilir. Her enzimin yüzeyinde substrat molekülünün bağlandığı aktif bir bölge vardır. Enzim ile substratın bağlanması sonucunda enzimin katalitik etkisi substratı ürüne dönüştürür. Enzimin aminoasit yapısından dolayı üzerindeki aktif bölge, substratla bir uyum sağlar. Bu yüzden her enzimin kendine özgü bir substratı vardır.



Şekil 2.1. Apoenzim, Koenzim ve Holoenzim Yapısı [8]

2.1.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzim adlandırılması, substratlarının sonuna veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna “az” eklenmesiyle gerçekleştirilir. Amilaz, arjinaz, üreaz, proteaz ve lipaz isimleri substratı tanımlarken; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Ürenin hidrolizini üreaz katalize ederken; DNA polimeraz ise DNA'nın sentezini katalize eden enzimlere birer örnektir [9].

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından öne sürülen enzimler adlandırmalarda, altı gruba ayrılmaktadırlar. Her grubun da kendine ait, katalizlenen reaksiyon tipine dayalı alt sınıfları bulunmaktadır. Bu adlandırma, her enzime enzim komisyonu (EC) tarafından dört rakamlı kod numarası ve katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistematik ad verilmektedir. Birinci numara enzimin 6 temel sınıftan hangisine ait olduğunu göstermekte, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu ifade etmekte ve dördüncü numara da enzimin kendi grubundaki sıra numarasını vermektedir [10].

Sınıflandırma numarası EC 1.1.1.1 olan Alkol dehidrojenaz enzimini ele alacak olursak; ilk 1 sayısının, enzimin oksidoredüktaz sınıfına dahil olduğu söylenebilir. İkinci 1 sayısı verici maddenin CH-OH grubu üzerine etki yaptığını; üçüncü 1 sayısı, alıcı olarak NAD ve NADP' den yararlanıldığını göstermektedir. Dördüncü 1 sayısı ise enzimin sistematik adı olan Alkol-NAD oksidoredüktazı açıklamaktadır [11].

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre başlıca altı büyük sınıfta toplanırlar. Bunlar;

- 1. Oksidoredüktazlar:** Biyolojik oksidasyonla ilgili enzimlerdir. Redüktaz ve oksidazlar olarak ikiye ayrılırlar. Redüktazlar; uygun bir H alıcısının varlığında substrattan H' i alırlar, oksidazlar; H alıcısı olarak oksijene sahiptirler. Kısaca indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (dehidrojenazlar, peroksidazlar, redüktazlar).
- 2. Transferazlar:** Belirli grupların bir bileşikten diğerine transfer reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Bir C' lu grupları, aldehit veya keton gruplarını, açıl veya şeker gruplarını transfer ederler (transamilazlar, transmetilazlar).
- 3. Hidrolazlar:** Substrata su ekleyerek hidrolize neden olan enzimlerdir. Bunlar: basit esterazlar, lipazlar, fosfatazlar, kolinesterazlar, peptid hidrolazlar, nükleazlar, karbonhidratları etkileyen enzimler (amilaz, selülaz, inülaz, glikozidaz) ve karbon azot bağıını koparan, amino içeren grupları ayıran enzimlerdir (üreaz, asparajinaz, glutaminaz, nüklein deaminaz, arjinaz).
- 4. Liyazlar:** Bu enzimler, C-C, C-O ve C-N arasındaki bağıları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağı ilave ederler. Bunlar: dekarboksilazlar, karbonik anhidraz, aspartat amonyak liyaz, sistein desülhidrazdır.
- 5. İzomerazlar:** Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değışiklikleri yani izomerizasyon reaksiyonlarını katalize ederler. Bunlar: rasemazlar ve epimerazlar, cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksidoredüktazlar, intramoleküler transferazlardır.
- 6. Ligazlar:** C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağı oluşmasını sağılayan enzimlerdir. Bu enzimler, genellikle ATP' deki ya da diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağılanmasını katalize ederler [12].

2.1.3. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivitesi; enzim miktarının etkisiyle değişime uğrayan, belirli bir zamanda başlayan, substrat miktarının kantitatif olarak ölçülebilmesi şeklinde açıklanan değerdir. Yüksek miktarda substratın ürüne dönüşmesi için etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim gerekmektedir.

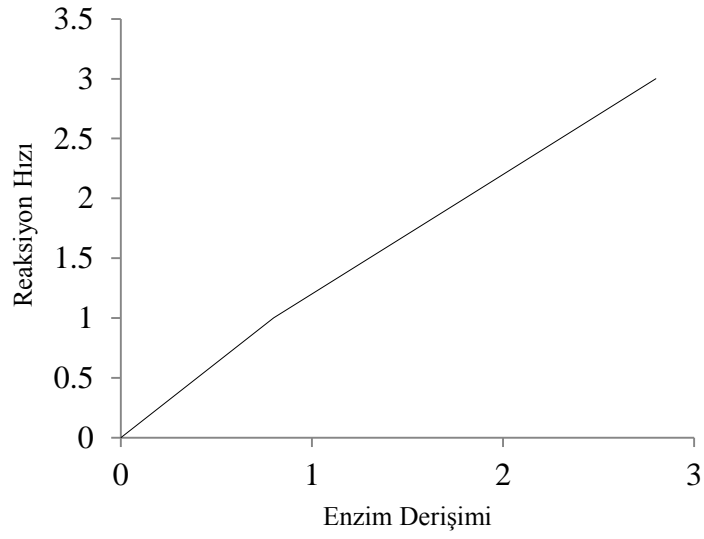
Optimal pH, sıcaklık ve doyurucu substrat derişiminde, bir tek enzim molekülü tarafından 1 saniyede ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzime ait dönüşüm (turnover) sayısı denir. En çok kullanılan enzim aktivite birimi IU' dir. 1 IU enzim aktivitesi, optimum koşullarda, 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim etkinliğidir. Enzim aktivitesi tanımında bazen "katal" denilen başka bir ifade de kullanılmaktadır. 1 katal enzim aktivitesinin tanımı için; uygun koşullar altında, 1 saniyede 1 mol substratı değiştiren enzim etkinliği kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi aynı zamanda spesifik aktivite olarak da ifade edilir. Bir enzim için spesifik aktivite tanımı ise, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi (IU veya katal) sayısı şeklinde ifade edilmiştir. Spesifik aktivite; enzim saflığı arttıkça artmaktadır.

2.1.4. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen birçok faktörden bazıları şunlardır: enzim derişimi, substrat derişimi, pH, ısı veya sıcaklık ve inhibitörler.

2.1.4.1. Enzim Derişimi

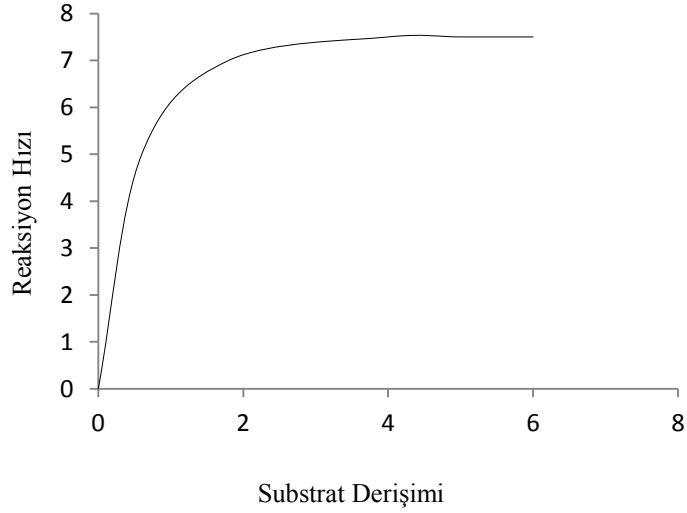
Bir enzim reaksiyonunun hızı enzim derişimi ile doğru orantılıdır. Enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı da artar. Reaksiyonun devamında hız, inhibe edici etkenler ve substratın gitgide azalarak tükenmesi nedeniyle azalmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi

2.1.4.2. Substrat Derişimi

Sabit enzim derişiminde, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat derişimi ile artar. Daha sonra substrat derişiminin artması ile reaksiyon hızı değişmez ve belli bir düzeyde sabit kalır (Şekil 2.3).

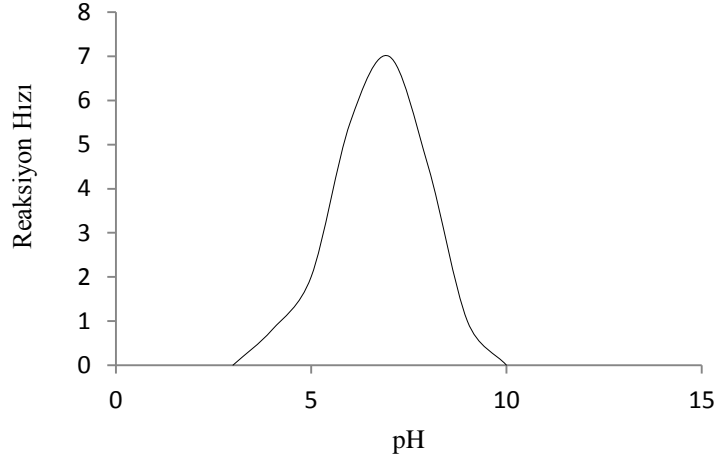


Şekil 2.3. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

2.1.4.3. pH

Enzimlerin aktivite değişimleri, H^+ iyonu derişimi veya pH değişmelerinden ileri gelir. pH değişimi bir enzimin aktif merkezindeki iyon alış-verişini büyük ölçüde bozmaktadır. Ayrıca substrat molekülünün de çözünürlüğünü değiştirerek enzim-substrat etkileşimini değiştirmektedir. Enzimlerin amino asit zincirindeki iyonik karakterler değiştii için enzim denatüre olur ve katalitik aktivitelerini kaybederler.

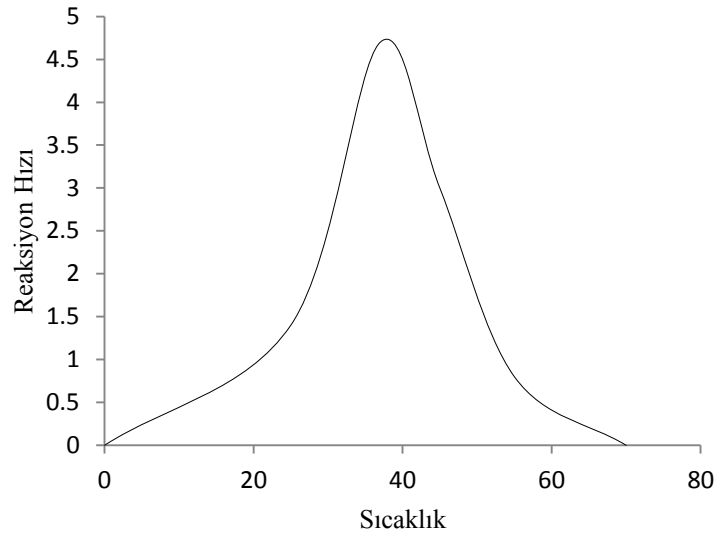
Her enzim en yüksek aktivite gösterdiği bir pH değerine sahiptir. Optimal pH denilen bu pH değeri her enzim için farklıdır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. pH' ın reaksiyon hızına etkisi

2.1.4.4. Sıcaklık

Sıcaklık değişmeleri, enzimlerin reaksiyon hızlarını etkileyen diğer bir etmendir. Sıcaklığın artmasıyla belli bir değere kadar enzimatik reaksiyonun hızı da artmaya devam eder. Çok yüksek sıcaklıklarda enzim artık aktivitesini kaybeder ve denatüre olur. Bu da reaksiyon hızının azalmasına neden olur. Enzimatik reaksiyonun hızının en yüksek olduğu sıcaklık derecesine optimal sıcaklık denir (Şekil 2.5).

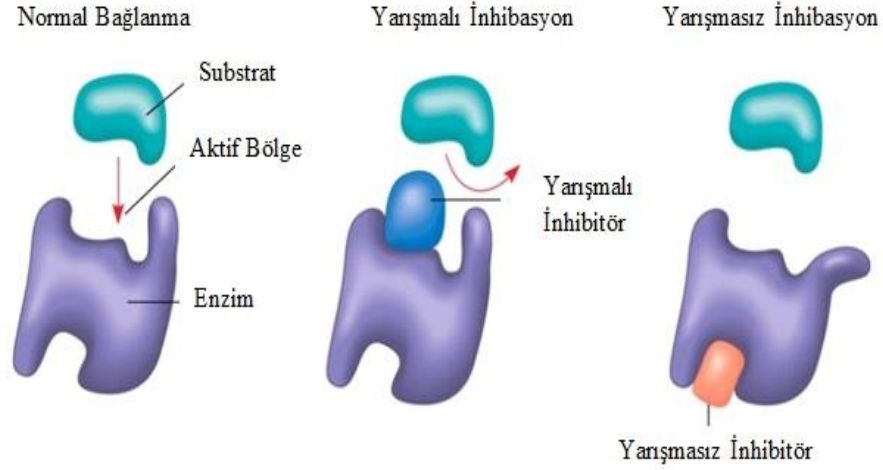


Şekil 2.5. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi

2.1.4.5. İnhibitörler

Enzimatik tepkimenin hızını azaltan ya da tamamen durduran maddeler “inhibitör” olarak adlandırılır. Enzimlerin katalitik etkilerine engel olan inhibitörlerin başında bazı ilaçlar veya toksik maddeler gelmektedir. Bu maddeler enzimlerin etkilerini önleyerek “enzim inhibitörleri” adını alırlar.

Enzimler, etki mekanizmalarına göre genelde üç farklı şekilde inhibasyona uğrarlar (Şekil 2.6). Bunlar: yarışmalı, yarışmasız ve geri dönüşümsüz inhibitörlerdir. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzime kovalent bağ ile bağlanarak enzim aktivitesini tamamen durduran inhibitörlerdir. Yarışmalı inhibitörler kovalent bağ yapmadıkları için enzime geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Bu inhibitörler substratlara benzedikleri için, enzime bağlanmak için substratla yarışır. İnhibitörlerin enzimlere bağlanma olasılığı ortamda bulunan substrat derişimiyle değişmektedir. Substrat derişimi fazla ise bağlanma şansı daha az olup, substrat derişimi az ise bağlanma şansı daha fazladır.



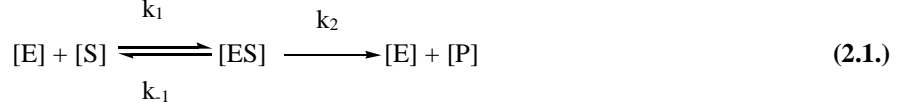
Şekil 2.6. İnhibisyon çeşitleri [13]

Yarışmasız inhibitörler de kovalent bağ yapmadan enzime geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Yarışmalı inhibitörlerden farkı; fazla substrat ilavesi yarışmasız inhibitörlerin enzimden ayrılmasını sağlamaz çünkü substratlara benzemezler ve aktif bölgeden başka bir yere bağlanarak enzim aktivitesini düşürürler.

2.1.4.6. Enzim Kinetiği

Enzimle katalize edilen bir reaksiyon tersinir olarak daha hızlı gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonlar sırasında diğer katalitik kimyasal reaksiyonlardan farklı olarak, enzimin doymuş hale geldiği bir basamağın bulunduğu, bu basamağa varıldıktan sonra substrat ilavesinin reaksiyon hızında herhangi bir değişikliğe sebep olmayacağı görülmektedir. J. Brown ve V. Henri [15], enzimatik reaksiyonları incelerken enzim ve substratın bir araya gelip kompleks bir yapı oluşacağını, daha sonra da ayrılacaklarını öne sürmüşlerdir. L. Michaelis ve M.L. Menten [15] de bu ifadeden yola çıkarak bir teori geliştirmişlerdir. Bu teori, enzim kinetiği ve inhibisyonunda kantitatif analizlerin yapılabilmesi için oldukça elverişlidir. George Edwards Briggs ve J. B. Sanderson Halden [15] 1925 yılında bu teoriyi daha da genişletmişlerdir. Michaelis Menten teorisinin en önemli yönü, enzimatik bir reaksiyon sırasında, substratın değişikliğe uğramasından önce enzim ve substratın birleşmesinden oluşan bir ara maddenin meydana geldiğinin kabul olunmasıdır. Bu teoriye göre enzim, substratı ürüne

dönüştürürken önce bir enzim-substrat kompleksi oluşturmaktadır. Daha sonra, bu kompleks ürün tekrar enzime dönüşmektedir. Enzim kinetiği mekanizması aşağıdaki Denklem 2.1' deki gibi gösterilir:



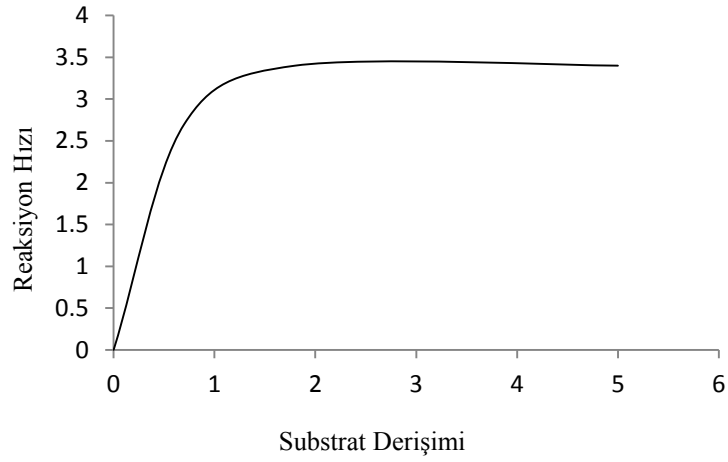
Burada enzim-substrat kompleksi [ES]; enzim [E] ve substrat [S]' den k_1 hız sabiti ile oluşmaktadır. Bu reaksiyonun hızlı ve tersinir olduğu, kimyasal bir değişim olmadan enzim ile substratın bir arada fiziksel kuvvetler yardımıyla buldukları kabul edilmektedir. Daha sonra [ES] kompleksi, k_{-1} hız sabitli geri reaksiyonla ve k_2 hız sabiti ile ürün ve enzime ayrılmaktadır. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca "Kararlı Durum İlkesine göre [ES]' nin oluşma hızı ayrışma hızına eşit olur, yani derişimi zamanla değişmez.

Michaelis Menten denkleminde yararlanılarak tek substratlı enzimlerin reaksiyon hızları ile substrat derişimleri arasındaki ilişkilerin kantitatif niteliklerinin açıklanması mümkündür. Bunu yapabilmek için ilgili enzimin V_{mak} ve K_m değerlerinin bilinmesi gerekir [14]. V_{mak} , ilgili enzimin, belirli substratla, belirli şartlar ve zaman içerisinde reaksiyona girdiğinde ulaşabileceği en yüksek katalitik etki düzeyini göstermektedir. K_m ise böyle bir reaksiyonda enzim aktivitenin en yüksek katalitik aktivitenin yarı hızına ulaştığı sıradaki substrat derişimini belirlemektedir. Diğer bir deyişle K_m Michaelis-Menten sabiti anlamına gelmektedir veya bunu $V_{mak}/2'$ deki substrat derişimi diye açıklamak da mümkündür. K_m tek substratlı enzimler için, enzim derişimine bağımlı olmaksızın molL^{-1} olarak ifade edilir ve bir çok enzim için bu değer $10^{-3} - 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ arasında değişir.

Michaelis Menten enzimatik reaksiyon için aşağıdaki eşitlik (Denklem 2.2) türetilmiştir [15].

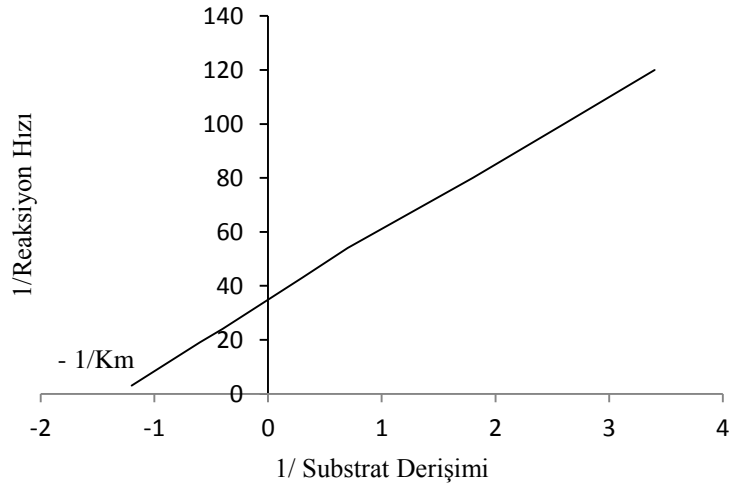
$$V = \frac{V_{mak} [S]}{[S] + K_m} \quad (2.2.)$$

Michaelis-Menten denklemi, enzimatik bir reaksiyon için başlangıç hızını (V_0) substrat derişiminin [S] bir fonksiyonu kabul ederek çizilen hiperbolik eğrinin matematiksel ifadesidir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Michaelis-Menten grafiği

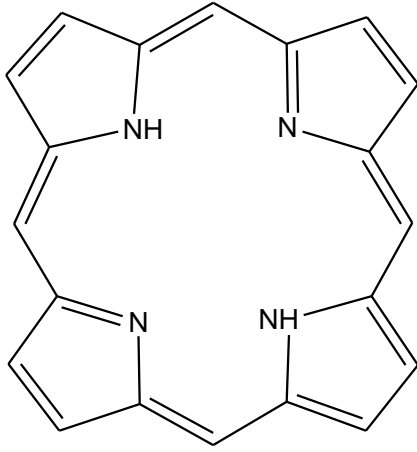
Michaelis-Menten denklemi bir hiperbolik eğrinin denklemidir. Bu eğriye özgü noktaların belirlenmesi oldukça zordur. Bu noktaların belirlenmesi için ve enzime ait V_{max} ve K_m değerlerinin sayısal olarak elde edilmesini kolaylaştırmak için doğrusal olan başka grafikler önerilmiştir. Bunlardan Lineweaver-Burk grafiği en çok kullanılan grafik olup, elde edilmesi Michaelis-Menten denkleminin tersine çevrilip çarpanlarına ayrılması şeklindedir (Şekil 2.8).



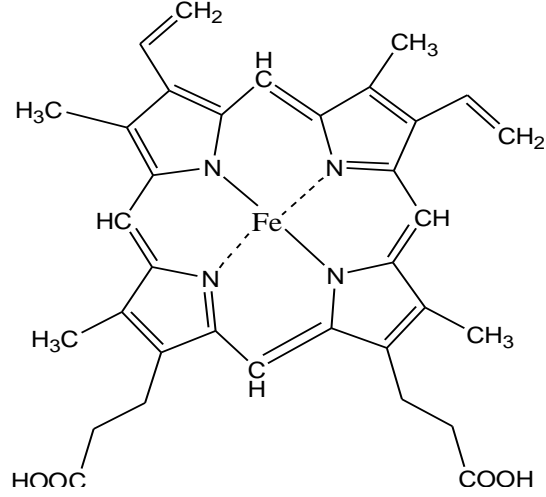
Şekil 2.8. Lineweaver-Burk grafiği

2.1.5. Peroksidazlar

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), H_2O_2 veya organik peroksidaz gibi türevlerini kullanarak organik veya inorganik maddelerin oksidasyonunu katalizleyen, Fe(III) porfirin sınıfında (Şekil 2.9) yer alan ya da almayan oksidoredüktazlardır (Şekil 2.10) [16,17]. Peroksidazların yapısında N-bağlı oligosakkarid bulunmaktadır ve bu yüzden glikoproteinler olarak bilinmektedirler [18,19].



Şekil 2.9. Basit haliyle porfirin yapısı



Şekil 2.10. Hem grubu bağlı porfirin yapısı

Peroksidazlar birçok bitki hücresinde, bazı hayvanların organ ve dokularında, bakterilerde ve mantarlar gibi biyolojik organizmalarda yaygın olarak bulunur ve kolayca elde edilebilirler [20,21]. Peroksidaz ismi ilk olarak irinden izole eden Linossier [17] tarafından 1898 yılında ortaya atılmıştır.

Peroksidaz enzimleri, biyoteknoloji, biyokimya, biyokataliz, tanı kitleri, biyosensörler, rekombinant protein ekspresyonu, biyoinformatik, protein mühendisliği, transgenetik ve terapötik gibi pek çok bilim alanlarında kullanılırlar [22-28]. Çeşitli fenollerin, aromatik grupların, bifenil ve fenollerin atık sulardaki toksik etkilerini gidermek için kullanıldığı saptanmıştır [29]. Ayrıca, fenolik reçinelerin sentezinde katalizör olarak, tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında malzeme olarak ve gıda işlem süreçlerinde oluşan reaktif oksijen türleri için indikatör olarak kullanılırlar [30,31].

Peroksidazlar bitki, katalaz ve hayvan peroksidazlar olarak üç büyük sınıfa ayrılmaktadır. Bitki peroksidaz ailesi, hem prokaryot hem ökaryot kökenli olup, amino asit dizilimlerine dayalı olarak üç sınıfa ayrılırlar [32].

1. Grup Peroksidazlar: Bu grup peroksidaz ailesi, plastid ve mitokondri isimli prokaryotik kökenli organellerde olup, sitokrom c peroksidaz (CcP) [33,34], kloroplast ve sitosolik askorbat peroksidaz (AsP) [35] ve gen kopyalanmış bakteriyal katalaz peroksidazlardır [36].

2. Grup Peroksidazlar: Bu grup peroksidazlar, iki kalsiyum iyonu ve dört tane disülfid bağıyla çevrilmiş % 5 karbonhidrat bulundururlar. Mantar kökenli olup lignin peroksidaz (LiP) [37] ve mangan peroksidaz (MnP) [38] içerirler.

3. Grup Peroksidazlar: Bu grup peroksidazlara örnek olarak horseradish peroksidaz (HRP), yer fıstığı peroksidaz (TuP) [39], soya fasulyesi peroksidaz (SoP) [40] ve tütün peroksidaz (TobP) [41] verilebilir. İki kalsiyum iyonu, dört disülfid bağı, hem kısmına erişimde önemli bir rol oynayan ekstra sarmal bölge ve % 0 ila 25 arasında değişen karbonhidrat içeriğine sahiptirler.

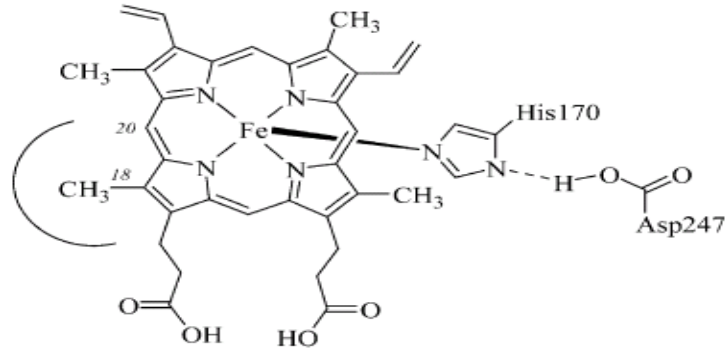
2.1.5.1. Horseradish Peroksidaz

Horseradish peroksidaz enzimi (EC 1.11.1.7), yapısında 308 amino asid içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur [42]. Bu enzimin yaklaşık olarak 40 tane farklı izoenzimi vardır. Bu izoenzimlerden en önemli üçü asidik, nötral ya da kısmen bazik ve olan oldukça bazik olan izoenzim A (HRP-A), C (HRP-C) ve HRP enzimleridir. Bu izoenzimlerden en çok kullanılanı, kararlı bir yapıda olması ve yaban turbunun köklerinden (Şekil 2.11) kolayca izole edilebilmesi nedeniyle birçok uygulamada kullanılan HRP-C' dir.



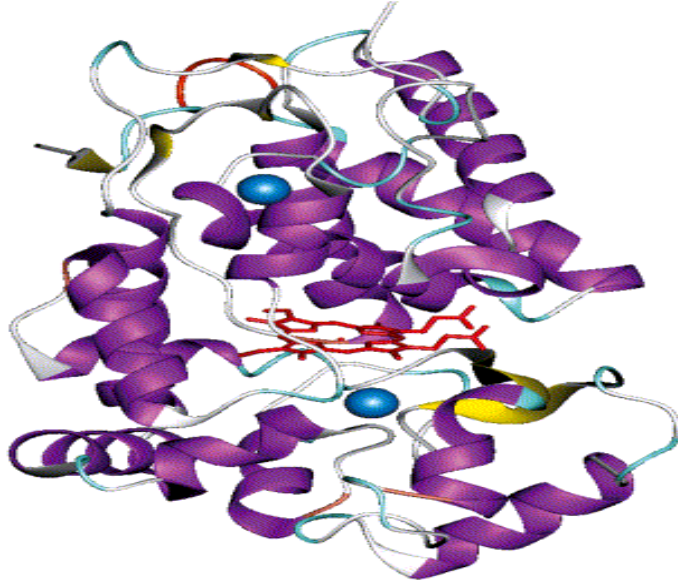
Şekil 2.11. Peroksidaz saflaştırılmasında kullanılan yaban turbu (*Amoracia rusticana*)

HRP-C, % 18-22 arasında değişen karbonhidrat içeriğine sahip bir glikoproteindir ve iki farklı tipte metal merkezi içermektedir. Bunlar; Fe(III) protoporfirin IX (hem grubu olarak da adlandırılır) ve iki Ca(II) iyonlarıdır. Her ikisi de enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korur ve holoenzim yapısını sağlar (Şekil 2.12).



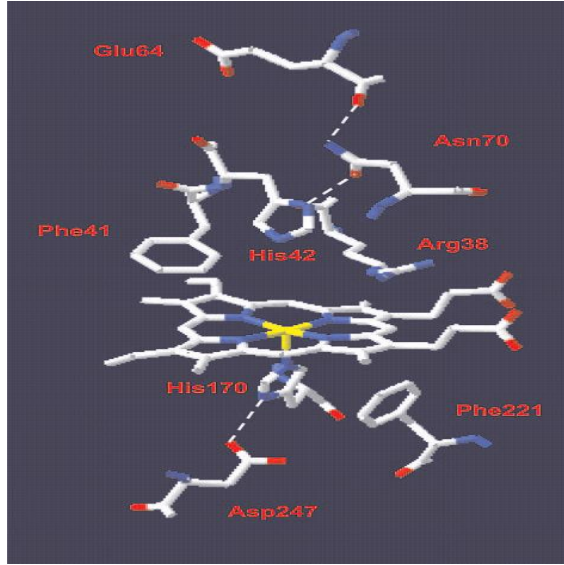
Şekil 2.12. HRP-C' nin hem kısmı ve hem demir atomuyla His 170 arasındaki koordine bağlar [27].

Hem grubu His 170 (proksimal kısım) amino asid kalıntısına bağlıdır (Şekil 2.13). Kalsiyum iyonları ise hem grubuna distal ve proksimal olarak hidrojen bağları ile bağlıdır. Distal bölge hem grubundan uzakta bulunan bölgeyi, proksimal bölge ise hem grubuna yakın olan bölgeyi belirtmektedir. Kalsiyum iyonları HRP mekanizmasına etki etmese de bu iyonların kaybı enzimin aktivitesini ve termal dengesini düşürmektedir [43].



Şekil 2.13. X-ışını kristalografisi ile HRP' nin üç boyutlu molekül yapısı. Mor renkli kısım α -helix yapısını, sarı renkli kısım β -tabaka bölgeyi, kırmızıyla gösterilen yer hem grubunu, iki tane mavi kısım ise iki kalsiyum iyonunu ifade eder [27].

HRP' nin ekseni boyunca proksimal bölgesinde His 170, Leu 237 ve Tyr 185, distal bölgesinde ise Arg 38, His 42 ve Phe 41 amino asid kalıntıları vardır (Şekil 2.14). Ayrıca, HRP' nin her bir molekülünün 11-91, 44-49, 97-301, 177-209 sistein kalıntıları arasında 4 tane disülfit bağı bulunmaktadır [44]. Polipeptid zincirinin molekül ağırlığı 33,890 Da, hem grubunun ağırlığı 572 Da ve kalsiyum iyonlarının ağırlığı 80 Da' dur. Yapının % 20 civarının karbonhidratlardan oluştuğunu düşünürsek enzimin toplam molekül ağırlığı 42 kDa' dur [25].

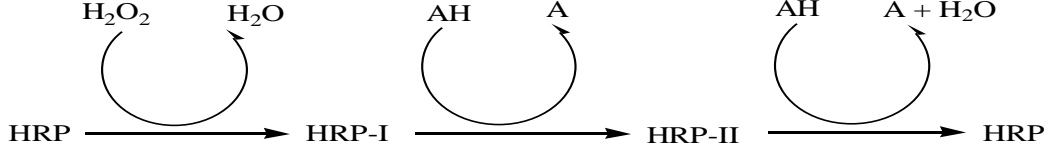


Şekil 2.14. Hem bölgesini çevreleyen anahtar amino asid kalıntıları. Sarı renkli kısım hem grubu ve hem demir atomunu, diğer beyaz kısımlar amino asid kalıntılarını ifade eder [25].

HRP enziminin aktivitesini hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve katalitik redüksiyon mekanizmaları vermektedir. HRP' nin çalışma mekanizmasında üç farklı bileşik oluşmaktadır [45]. Bileşik I ve bileşik-II sırasıyla HRP-I ve HRP-II' yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir (Şekil 2.15). Peroksidaz reaksiyon döngüsünün birinci basamağını, saf peroksidazın (HRP) ferrihem prostetik grubunun H_2O_2 ile gerçekleşen 2 elektron oksidasyonu oluşturmaktadır. Bu basamak oksiferil demir ($Fe^{+4}=O$) ve bir porfirin katyon radikali içeren HRP-I bileşiği (demirin formal oksidasyon bölgesi: V) formasyonu ile sonuçlanmaktadır.

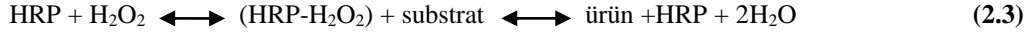
Reaksiyonun ikinci basamağında; HRP-II bileşiğinin şekillenmesi gerçekleşmektedir. Bu olay, HRP-I bileşiğinin elektron donörü AH ile bir elektron redüksiyonu sonucunda oluşmaktadır (oksidasyon bölgesi IV). Reaksiyonun son

basamağında bir önceki basamakta eklenen elektron AH' dan ayrılır ve enzim tekrardan reaksiyonun başlangıç bölgesine döner.

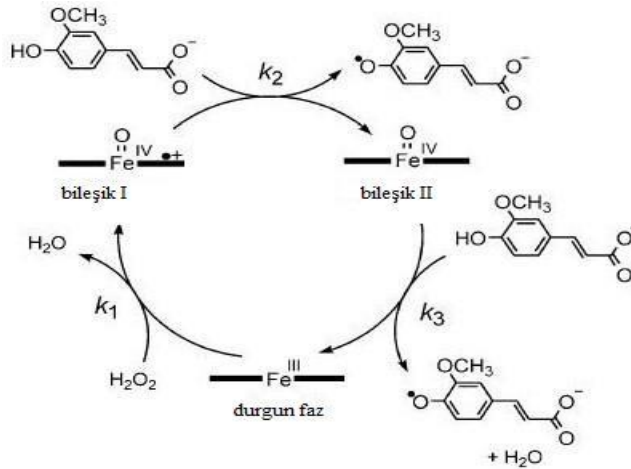


Şekil 2.15. HRP enziminin çalışma mekanizması

HRP, H_2O_2 ' yi indirgeyerek organik ve inorganik substratları oksitler [46]. Bu substratlar genellikle aminler, indoller, sülfonatlar, fenoller ve fenolik asitlerdir. HRP, H_2O_2 ile birleşerek HRP- H_2O_2 kompleksini oluşturmaktadır (Denklem 2.3).



HRP' nin katalitik döngüsünü incelediğimizde ilk adımda HRP' nin H_2O_2 ile yükseltgenmesi sonucu, enzimin aktif formu olan bileşik I ara ürünü oluşmaktadır (Şekil 2.16). Bileşik I, kromojenik substratın (o-dianisidin) yükseltgenmesi sonucu bileşik II formuna dönüşmektedir. Katalitik olarak enzimin ikinci aktif formu olan bileşik II ise, o-dianisidin tekrar yükseltgenmesi sonunda enzimin doğal formunu oluşturmaktadır. Bileşik III, enzimin inaktif formudur. Bu ise yavaş bir şekilde enzimi doğal formuna ya da bir elektron oksidasyonu ile bileşik I' e dönüşebilir [47,48].



Şekil 2.16. HRP' nin katalitik döngüsü. İndirgenen substrat ferulattır. k_1 , k_2 ve k_3 hız sabitleri sırasıyla 1. Bileşik, 2. Bileşik ve 3. Bileşiğin hız sabitleridir [27].

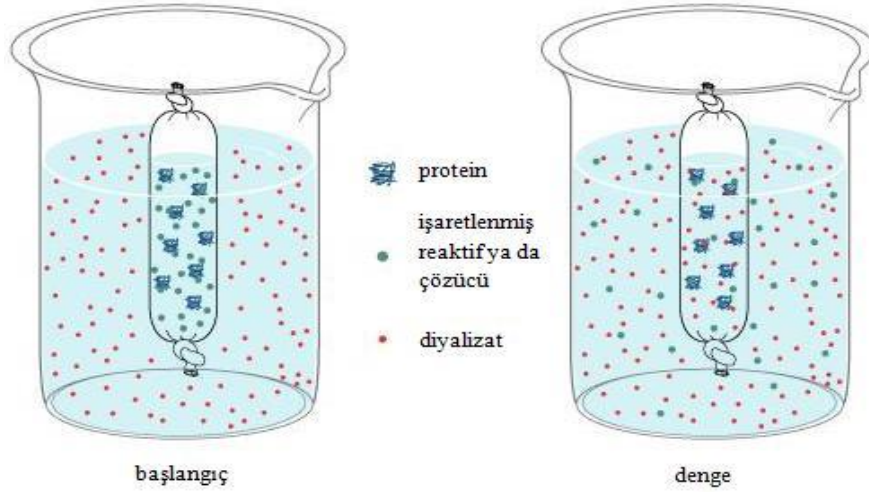
2.2. Enzim Ön Deriştirme ve Saflaştırma Yöntemleri

Enzim ön deriştirme teknikleri yapılmadan önce saflaştırılacak enzimin kaynağı iyi seşilmelidir. Seşilen kaynaktan hedeflenen enzim hem kararlı hem de bol bulunmalıdır. Ayrıca, kaynağın kolay erişilebilir, bol ve ucuz olması da önemlidir. Enzimler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir. Ayrıca enzim hayvan dokularından, uygun küf, maya ve bakteri türlerinden de üretilmektedir. Hayvansal kaynaklar seşilirken dikkat edilmesi gereken unsurlar; enzim miktarına uygun büyüklükte hayvan ve yabani yerine evcil hayvanların seşilmesidir. Mikrobiyal yolla enzim üretilmesi ise çok iyi kültür tekniği gerekmektedir, çünkü üretim birçok faktörden etkilenebilir. Besi ortamının bileşimi, pH ve kontaminasyon mikrobiyal enzim üretiminde sıkıntı yaratabilmektedir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoteknolojik enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir ve toksik özelliği olmayan bu bitkilerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır [49]. Ayrıca, bitkisel kaynaklı enzimler ucuz ve kolay bulunabilmesi, enzim ekstraksiyonunun kolay olması, saflaştırma için kullanılabilmesi ve çevreyi kirletip herhangi bir hastalığa sebep olmaması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir.

Enzim ön deriştirme yöntemlerinden biri olan çöktürme, ilgili enzimin diğer enzimlerden ayrılmasında sıkça kullanılmaktadır. Enzimlerin yüzeyindeki hidrofolik ve hidrofobik grupların dağılımı enzimlerin çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğüne etki etmektedir. Enzimler bu özelliklerinden yararlanılarak amaca uygun farklı şekillerde çöktürme işlemleri yapılabilmektedir. Bunlar; pH, ısı, organik çözücüler, organik polimerler ve yüksek tuz derişiklerinde çöktürme işlemleridir. Bu çöktürme işlemlerinden en çok tercih edileni yüksek tuz derişikleri ile çöktürmedir. Çöktürme işlemi ile çok seyreltik olan enzim çözeltileri de deriştirilebilir. Bu işlemde birçok avantajı nedeniyle en fazla kullanılan tuz amonyum sülfattır ((NH₄)₂SO₄). Amonyum sülfat enzimleri denatürasyon ve bakteriyel kontaminasyona karşı kararlılığını korumaktadır.

Enzim çözeltilerindeki tuzların uzaklaştırılmasında veya çözelti tamponunun deriştirilmesinde çoğunlukla diyaliz işlemi uygulanmaktadır (Şekil 2.17). Bu işlem için genellikle selüloz asetattan yapılmış, gözenekli ve küçük molekülleri geçiren ancak büyük molekülleri geçirmeyen yarı geçirgen bir membrandan

oluşan diyaliz torbası kullanılmaktadır. Küçük moleküller membrandaki ozmotik basınç dengelenene kadar serbestçe membrandan geçmektedirler. Dengeye ulaştığında moleküllerin dış tampona geçmesi durmaktadır. Bu nedenle; membran içindeki tuz veya tamponu tamamen uzaklaştırmak için, membran dışındaki tamponu birkaç kez değiştirmek gerekmektedir. Enzim aktivitesindeki kaybı en aza indirmek için diyaliz genellikle +4 °C' de yaklaşık 16-18 saat yapılmaktadır.



Şekil 2.17. Diyaliz işlemi

Diğer bir işlem ise jel filtrasyonudur. Bu yöntem tuzların uzaklaştırılmasında ve tampon değiştirilmesinde diyalize göre daha hızlı olmasına rağmen, küçük hacimlerde uygulama yapılması ve işlem sona erdiğinde oldukça seyreltik bir enzim çözeltisi elde edilmesi nedeniyle dezavantajlıdır.

Ultrafiltrasyon enzim saflaştırma adımlarında çok fazla kullanılan bir tekniktir. Ultrafiltrasyon sistemi basınç uygulanacak özel bir üniteden moleküllerin ayrılmasında kullanılacak farklı gözenekli membranlardan (1000 Da' dan 300000 Da kadar) ve basınç sağlayan aletlerden oluşmaktadır. Enzim çözeltisindeki su ve diğer küçük moleküller, yarı geçirgen bir membrana uygulanan basınç ile geçirilerek deriştirilmektedir. Bu işlem hassas, hızlı ve oldukça ucuz bir yöntemdir [50].

2.2.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, moleküllerin hareketli ve durgun iki faz arasında dağılımı ile yapılan bir ayırma işlem olup; hareketli faz, durgun fazın üzerinden geçerek ayrılması istenen molekülü beraberinde sürükler. Uygulamaların çoğunda durgun

faz, bir kolon içine doldurulan küresel taneciklerden oluşur. Ayrılacak enzimlerin bir karışımı hareketli faza verilerek, bu fazın içinde kolon boyunca göç etmesi sağlanır. Katı faza daha fazla etkileşimi olan enzimler, hareketli fazla daha fazla etkileşimi olan enzimlerden daha yavaş olacak şekilde göç ederler ve bunun sonucunda ayrılma gerçekleşir.

Araştırmanın amacına ve ilgili enzimin yapısal özelliklerine göre, kromatografi tiplerinden hangisi veya hangilerinin kullanılacağına karar verilerek kromatografi çalışmalarına başlanır (Tablo 2.1).

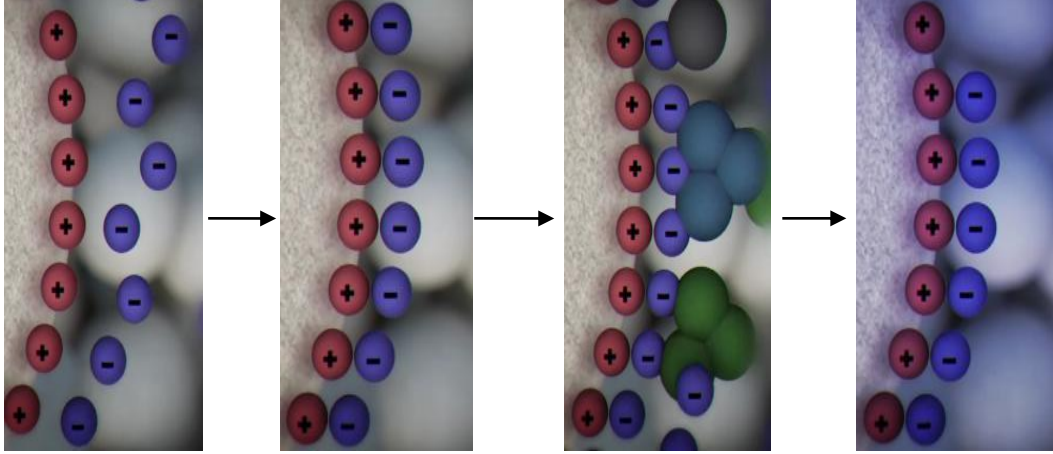
Tablo 2.1. Kolon kromatografi tipleri ve ayrılma prensipleri [51]

Ayrılma Prensibi	Kromatografi Tipi
Moleküler büyüklük ve şekil	Jel filtrasyonu
Net yük	İyon değişim kromatografisi
Biyolojik fonksiyon	Afinite kromatografisi
Hidrofobik etkileşim	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
İzoelektrik nokta	Kromatofocusing
Sülfidril grup içeriği	Kovalent kromatografisi
Metal bağlama	Metal iyon afinite kromatografisi

Kullanılan kromatografi çeşidine göre, kolon dolgu maddeleri özel işlemlerden geçirilerek şişirildikten sonra, kolona uygun bir şekilde doldurulur. Daha sonra uygun tamponlarla kolon dolgu maddesi dengeye getirilir. Dengeleme işleminden sonra örnek kolona yüklenir ve kolon tampon ile yıkanır. Kromatografi tekniğine bağlı olarak kullanılan tampon ve içeriği değişebilir. Her bir enzim özelliğine göre hızlı veya yavaş olarak kolon boyunca hareket eder. Kolondan belli bir akış hızında çıkan elüsyon, kolona bağlı fraksiyon toplayıcısı ile belirli bir hacimde tüplerde toplanır. İlgili enzimin bulunduğu fraksiyonlar birleştirilir. Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, saflaştırma tablosu yapılarak her bir adımda kaç kat saflaştırma yapıldığı ve saflaştırma veriminin ne olduğu hesaplanır. Yüksek bir verimle saflaştırma işlemi yapıldığına karar verilirse ilgili enzimin karakterizasyon çalışmalarına başlanır.

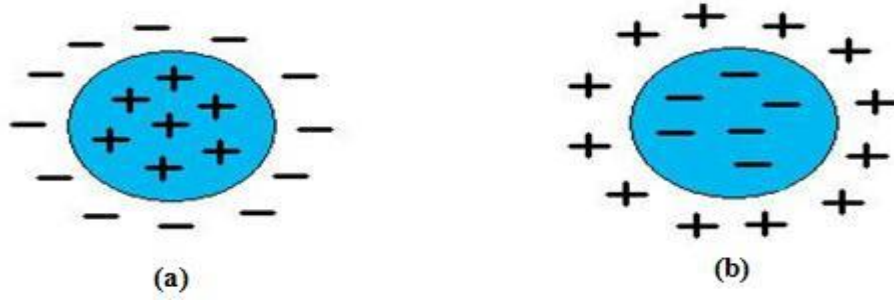
2.2.1.1. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, sıvı kromatografi yöntemlerinden ilkidir. İyon değiştirici reçinelerin kullanımına dayanır. İyonların ayrılması ve tayini için modern, etkili ve ekonomik bir yöntemdir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Katyon değişim kromatografisi örneği [52]

İyon kromatografisi ilk olarak 1970' li yıllarda geliştirilmiştir. Anyon-değiştirici veya katyon-değiştirici reçine ile doldurulmuş yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonlarında anyon ve katyon karışımlarının kolaylıkla ayrılabilmesi görülmüştür. 1970 yılından sonra amino asit analizlerinde, yüksek çözünürlüklü iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. 1970' li yılların sonlarından itibaren ise sıvı kromatografisindeki büyük ilerlemeler ile nükleik asit ve bazlar, nükleositler ve zar kaplamalı iyon değiştiricilerde nükleotitlerin ayrılması ve analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kolon dolgu materyallerinin çeşitliliği yüksek molekül ağırlıklı iyonik örneklerin ayrılmasını gerçekleştirmekte ve iyon değişim kromatografisinin gelişmesine katkı sağlamaktadır. İyon değişim kromatografisi, fonksiyonel grup taşıyan dolgu materyalleriyle yürütülür. İyon değiştirici dolgu maddesi eğer pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olur ve bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdiklerinden dolayı “anyon değiştiriciler” adını alırlar. Benzer şekilde eğer dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar pozitif olup, bu tür iyon değiştiriciler de pozitif iyonları değiştirdiklerinden dolayı “katyon değiştiriciler” adını alırlar (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. İyon değiştiriciler. (a) Anyon değiştirici, (b) Katyon değiştirici

Genel tutunma mekanizması sabit fazdaki yüklü gruplar R ile mobil fazdaki Y iyonları ile örneğe ait X iyonları arasındaki basit iyon değişimidir (Denklem 2.4).

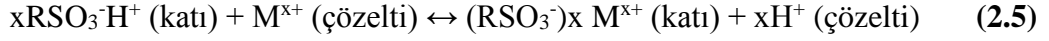


Katyon değiştirici reçinelerin en genel aktif bölgeleri, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit ($-\text{SO}_3\text{-H}^+$) ve zayıf bir asit olan ($-\text{COO}^-\text{H}^+$)' dur. Anyonik iyon değiştiriciler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{-OH}^+$) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ($-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$) içermektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Değiştirici fonksiyonel gruplar

	Katyon Değiştiriciler	Anyon Değiştiriciler
Kuvvetli	$-\text{SO}_3^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
	$-\text{COO}^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{CH}_2\text{OH} \text{Cl}^-$
	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{H}^+$	$-\text{NR}_2\text{H} \text{Cl}^-$
	$-\text{O}^- \text{H}^+$	$-\text{NRH}_2 \text{Cl}^-$
Zayıf	$-\text{HPO}_2^- \text{H}^+$	$-\text{N}^+\text{H}_3 \text{Cl}^-$

Sülfonik asit tipi bir iyon değiştirici, M^{X^+} katyonunu içeren bir sulu çözelti ile temas ettiği zaman, aşağıdaki gibi gösterilebilen bir yer değiştirme dengesi meydana gelir (Denklem 2.5):



Burada, $x\text{RSO}_3\text{H}^+$ büyük bir polimer molekülüne tutunmuş çok sayıdaki sülfonik asit grubundan bir tanesini ifade etmektedir.

Katyon değiştirici reğinelerde bulunan hidrojen iyonu sodyum tuzları ile muamele edilerek sodyum iyonu formuna dönüştürülebilir. Sodyum iyonları da diğer katyonlarla değişime uğrar. Bu nedenle hareketli fazda sodyum asetat gibi tuzlar bulunabilir. Kuvvetli asit reğineler pH 1-14 aralığında kullanılır. İyon değişim kromatografisinin avantajları řu şekilde sıralanabilir:

1. Yüksek duyarlılığa sahiptir (ppm düzeyi).
2. Numunedeki çok farklı-aynı tür yüklü iyonlar tek basamakta kolayca belirlenebilir.
3. Diğer analitik tekniklerde sorun yaratan matriks sorunları ile karşılaşılmaz.

İyon değişim kromatografisinin uygulama alanları oldukça geniştir. Su işlemlerinde yumuşatma ve deiyonizasyon, iğme suyu ve atık su işlemlerinde, yiyecek endüstrisinde proteinlerin geri kazanımı ve amino asit ayrılmasında [53], süt endüstrisinde sodyumun uzaklaştırılması [54], saf kazein elde edilmesi [55], laktoz saflaştırılması, renk ve asitlik gidermede, ilaç endüstrisinde antibiyotiklerin ayrılması, askorbik asidin geri kazanılması [56] ve vitaminlerin ayrılmasında, tıpta kanın korunmasında, kimya endüstrisinde bor üretimi, kataliz ve saflaştırmada ve fotoğrafçılıkta fotoğraf banyolarında gümüşün ayrılmasında kullanılır.

2.2.2. Kriyojeller

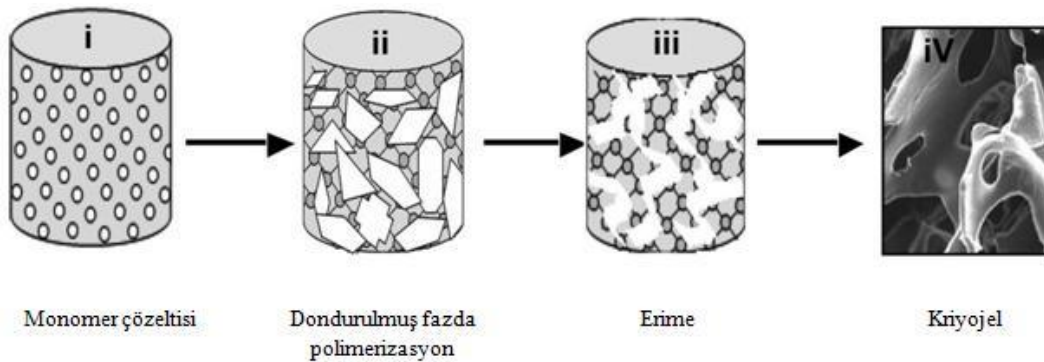
Hidrojeller fiziksel ya da kimyasal yolla çapraz bağlanmış, bol miktarda su absorbe edebilen polimer ağlarıdır. Hidrojellerin bir türü de biyoteknolojide büyük bir öneme sahip olan kriyojellerdir. Polimerik gözenekli materyaller “kriyojeller” olarak bilinmektedir. Yunanca’da krios (kryos) donma veya buz anlamına gelmektedir. Kriyojelleşme (ya da sıfırın altındaki sıcaklıklarda jelleşme), gözeneklilik derecesi kontrol edilebilen makro gözenekli kriyojellerin oluşumuna olanak sağlar. Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilir ve birçok değişik yapıya ve gözenek boyutuna sahiptirler (Şekil 2.20).

Gözenekli ve elastik yapılarıyla kromatografik sistemlerde kolon malzemesi olarak kullanıma uygundurlar, çünkü hareketli fazın kolondan geçmesiyle kolonda oluşacak geri basıncı elimine ederler. Bu da biyomoleküllerin bozunmadan ve denatüre olmadan, kromatografik tekniklerle, verimli bir şekilde saflaştırılmasına imkan tanır.



Şekil 2.20. Farklı şekillere sahip kriyojeller [57]

Kriyojellerin oluşumu çözücünün donma noktasının altında gerçekleşir. Böylelikle zamanla çözücünün büyük bir kısmı donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafında donmamış sıvıda bulunan polimer öncülleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev görür. Polimerleşmeden sonra donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiğinde buz kristalleri erir ve makro gözeneklere sahip polimer ağ yapı elde edilir (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. Kriyojelleşme süreci [58]

Çözücünün kristalleşmesinden dolayı, donmamış sıvı mikro fazın toplam hacmi başlangıç hacminden daha düşüktür. Diğer bir ifadeyle, donmamış sıvı fazdaki polimer ya da monomer derişimi başlangıç derişiminden daha yüksektir.

Jel oluşturucu ajanların derişiminin hızla artması, jel oluşumunu tetikleyerek jelleşme hızını artırır. Polimer matriksin gözenek boyutu 10 µm ile 200 µm arasında değişebilir.

Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), polivinilalkol (PVA) temeline dayanmaktadır [59]. Kriyojeller, hücrelerin gelişimi ve üremesi için uygun üç boyutlu yapıya sahiptirler. Makrogözenekli yapılarından dolayı sahip oldukları hızlı şişme kinetiği, onları ilaç taşınım araçları ve biyosensörler gibi uyarı-duyarlı sistemlerin tasarımına elverişli kılar. Kriyojeller DNA, virüs, biyopolimerler gibi saflığı yüksek biyomateryallerin geliştirilmesi ve biyoayırmada kullanılan polimerik materyallerin gelişiminde çok önemli rol oynamışlardır [60].

2.3. Rutenyum Tabanlı Aminoasit Monomerleriyle Fotosensitif apraz Bağlama ve ANADOLUCA Yöntemi

Yaşam bilimleri ve biyoteknolojide kullanılmak üzere geliştiren ANADOLUCA konsept yöntemi (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) [61], rutenyum tabanlı, fotosensitif (ışığa duyarlı), amino asit monomer ve oligomerlerinin sentezleri; fotosensitif proteinlerin konjugasyonu ve çapraz bağlanması işlemlerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Farklı hücre tiplerini, dokuları ve diğer hedefleri algılamak için istenen mikro veya nanoyapılar entegre edilebilir. Protokol, bir çok proteinde yer alan sistein, triptofan ve tirozin amino asitlerine rutenyum tabanlı amino asit monomerler tarafından elektron kuşaklar atılarak sağlam çapraz bağlı konjugasyon işlemleri ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemde; fotosensitif monomerler, kovalent ve çapraz bağlanma işlemi nedeniyle doğru antikör oryantasyonu için yönlendirme sağlanmakta ve denatürasyon engellenmektedir.

ANADOLUCA yöntemi, silika materyallere, süperparamanyetik partiküllere, nanokristallere, karbon nanotüplere, Ag/Au nanopartiküllere ve Au yüzeylerine protein entegrasyonu yanı sıra proteinimsi polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında ve ilgili yüzeylerle entegrasyonuna da uygulanabilir.

ANADOLUCA, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, teranostikler (aynı anda tanı ve tedavi olanığı), nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılabilen yeni nesil nano-biyokonjugantların oluşturulduğu bir yöntemdir.

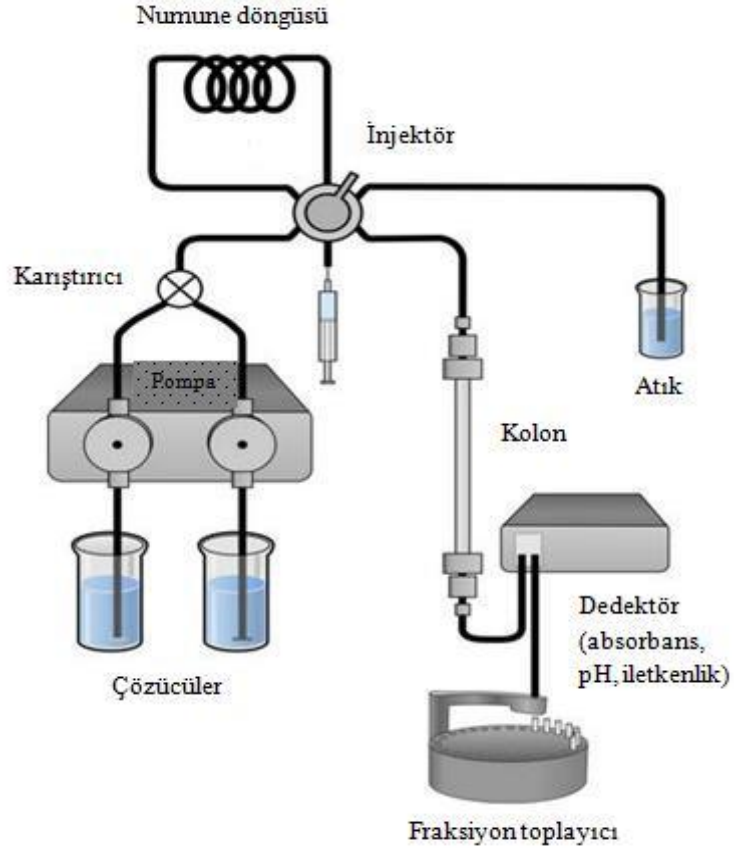
Bu yöntem ile multifonksiyonel, biyouyumlu, stabil ve spesifik mikro ve nano biyokonjugasyon işlemleri sağladığı gibi kataliz ve tayin amaçlı da kullanılabilir. Oluşan nano-biyokonjugantlarda proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonları etkilenmez, pH ve sıcaklıktan bağımsız bir yöntemdir.

2.4. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)

Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC), genellikle protein ve enzim karışımlarının ayrıştırılması ve analizinde sıkça kullanılan bir sıvı kromatografi yöntemidir. Proteinlerin tek basamakta saflaştırılmasını sağlaması nedeni ile biyokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. FPLC iyon değişim, kromatofocusing, hidrofobik etkileşim, jel filtrasyon gibi kromatografik yöntemlerin de kullanım alanlarını büyük ölçüde sağlar. Saflaştırılmak istenen enzim veya protein, uygun bir hareketli faz ile (tampon çözelti), hazırlanan kolonun üzerinden geçirilir; kolona tutunmayan türler kolonu terk ederken; kolona tersinir olarak tutunan numune elüsyon çözeltisi ile kolondan saf bir şekilde toplanır.

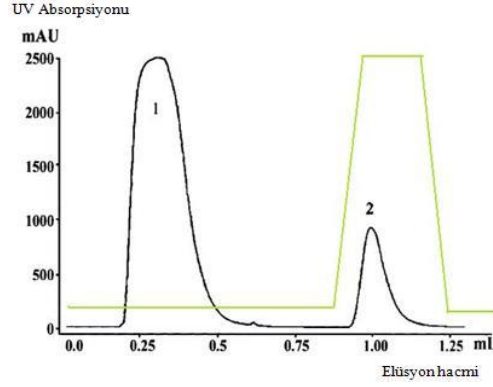
FPLC cihazı, çözücü kabı, pompalar, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör, fraksiyon toplama ünitesi ve bir de veri kaydediciden (bilgisayar) oluşmaktadır (Şekil 2.22). Çözücü kaplarında kolonu şartlandırma çözeltisi ve tutunan numuneyi kolondan sökme amaçlı ise elüsyon çözeltisi bulunur. Pompalar bu çözeltileri cihaza verilen komuta bağlı olarak önce enjeksiyon ünitesinden, daha sonra cihaza yüklenen numuneyi de alarak, belirli bir hızda kolondan geçirir.

Kolonu terk eden türler dedektöre ulaşır ve belirli fraksiyonlarda örnek toplama ünitesindeki tüplerde toplanır. Bilgisayar dedektörden gelen sinyallere bağlı olarak oluşan piklerin kromatogram halinde görüntülenmesini sağlar.



Şekil 2.22. FPLC cihazı bileşenleri

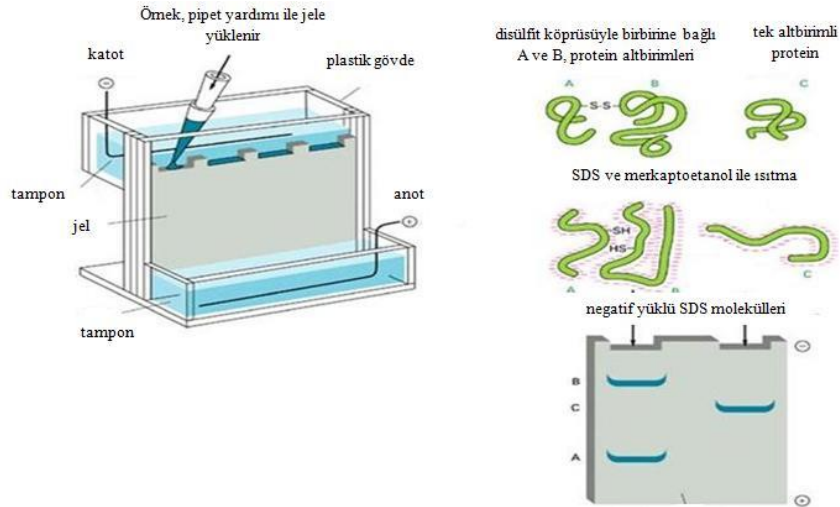
Şekil 2.23' de görülen örnek bir FPLC kromatogramında gözlenen 1 numaralı pik kolona tutunmadan kolonu terk eden türlere aittir. Bu türler şartlandırma çözeltisiyle birlikte kolondan ayrılır. Kolon malzemesine bağlanan hedef molekülün elüsyon çözeltisi geçirildikten sonra kolondan söküldüğü durum, 2 numaralı pikle gösterilmiştir.



Şekil 2.23. FPLC kromatogramı [62]

2.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-Page)

SDS-Page yöntemi protein ve enzimlerin saflığının kontrolü ve molekül ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda enzimin ya da proteinin birden fazla alt birime sahip olup olmadığını saptamada önemlidir. SDS-Page, Page' den farklı olarak protein ya da enzim karışımına tiyol ayracı olan merkaptoetanol ve SDS ilave edilerek 100 °C' de ısıtılarak denatüre edilir. Merkaptoetanol, proteindeki disülfid bağlarını koparır. Denatüre edici bir deterjan olan SDS proteine bağlanır (bir molekül SDS yaklaşık iki amino asit kalıntısı bağlar) ve proteini net negatif yük ile kaplar, bu durumda proteinin kendi yükü ihmal edilir. Proteinin doğal konformasyonu değişir, proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olurlar ve poliakrilamid jel içerisinde sadece molekül ağırlığına göre ayrılırlar (Şekil 2.24).



Şekil 2.24. SDS-PAGE: SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi [63]

Buna göre büyük moleküller jel matriksinde tutunurken küçük moleküller daha hızlı göç ederler. Molekül ağırlığı bilinen molekül standartları, ilgili protein örnekleriyle birlikte yürütülerek saflaştırılmış proteinin veya enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak hesaplanır.

2.6. Polimerler

Polimer adı “poli + meros (çok + parçalı)” olarak Greekçe' den gelmektedir. Polimer molekülü içerisinde tekrarlanan küçük ve basit kimyasal birime “mer” (tekrarlanan birim), polimeri elde etmek için başlangıçta kullanılan küçük moleküllu organik maddelere de “monomer” denir. Polimerler, en basit tanımıyla çok sayıda aynı veya farklı monomerlerin kovalent bağlarla az veya çok düzenli bir biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Polimer, birden fazla monomerin ısı ve basınç altında birleşerek uzun zincirlerin meydana gelmesiyle oluşur. Polimerler genellikle beşten fazla monomerden oluşur ve bazıları ise her bir zincirde yüzlerce veya binlerce monomer içerebilir.

Polimerler; hafif, ucuz, mekanik özellikleri çoğu kez yeterli, kolay şekillendirilebilen, değişik amaçlarda kullanıma uygun, dekoratif, kimyasal açıdan inert ve korozyona uğramayan maddelerdir. Bu üstün özelliklerden dolayı sadece kimyada değil makine, tekstil, fizik, tıp, biyokimya, biyofizik gibi birçok bilim dalında da kullanılır.

Polimerler; kaynaklarına göre doğal ve sentetik şeklinde ikiye ayrılır. Ana zinciri oluşturan atomların türüne göre organik ve anorganik polimerler, sentez tepkimelerinin mekanizmasına göre basamaklı ve katılma polimerleri, ısı karşısındaki davranışlarına göre termoplastikler ve termosettingler, zincirlerinin fiziksel biçimlerine göre düz zincirli, dallanmış ve çapraz bağlı polimerler şeklinde kendi içlerinde farklı olarak gruplandırılabilir. Monomer çeşitlerine göre ise tek bir monomerin polimerleşmesiyle elde edilen polimerler homopolimerler, iki farklı monomerin birleşmesiyle elde edilen kopolimerler ve üç farklı monomerin birleşmesiyle oluşan polimerler ise terpolimerler olarak adlandırılır.

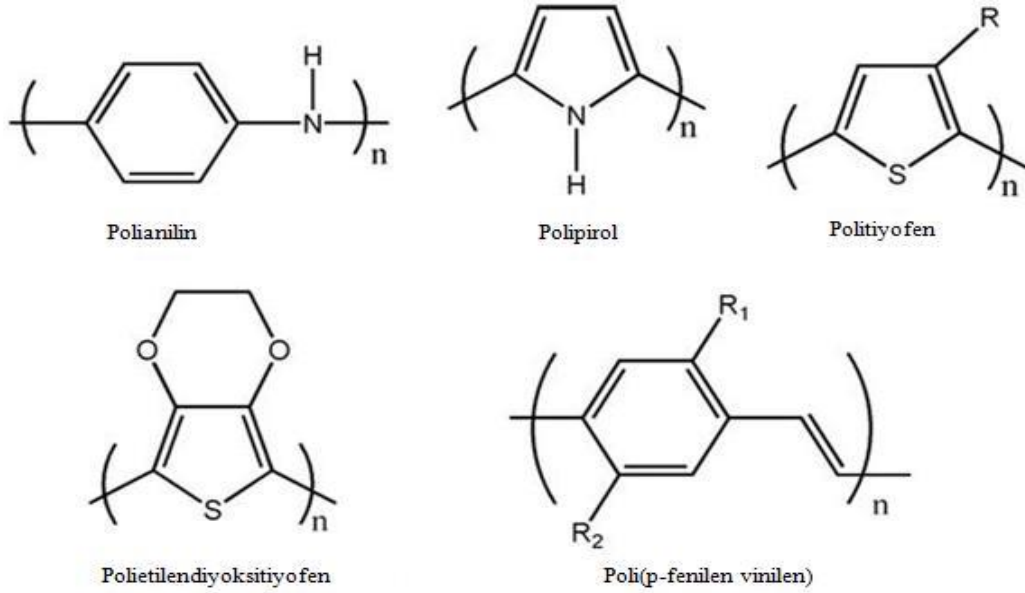
Molekül ağırlığı 500-600 g mol⁻¹ civarında olan polimerlere “oligomer” adı verilir. Bir polimerin yeterli fiziksel özelliklere sahip olabilmesi için molekül

ağırlığının 10^4 g mol^{-1} den fazla olması gerekir. 10^6 g mol^{-1} ve daha büyük molekül ağırlıklı polimerler için bazen “yüksek polimer” sözcüğü de kullanılabilir.

Polimerleşme reaksiyonları genel işleyiş mekanizmaları açısından incelendiğinde katılma (zincir) polimerizasyonu ve basamaklı polimerizasyon olmak üzere iki temel kısma ayrılabilir [64].

2.6.1. İletken Polimerler

“İletken Polimer” terimi Amerikan bilim adamları Heeger ve MacDiarmid [86] tarafından 1977’ de poliasetilenin iyot ile yükseltgenip iletkenliğinin metallerinkine yakın özellik göstermesi ile ortaya atılmıştır. Aynı bilim adamları poliasetilenin yükseltgenmesinin başarılı olmasıyla, poliasetilenin şarj edilebilir pil özelliği üzerine çalışmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarla poliasetilen ile benzer özellikler gösteren polianilin, polipirol, politiyofen gibi (Şekil 2.25) birçok iletken polimer keşfedilmiştir [65,66].



Şekil 2.25. İletken polimer örnekleri

Polimerler, metallerle kıyaslandığında, polimerlerin genellikle metallerden daha hafif ve ucuz olduğu, kolay şekil alabildiği fakat iletken olmadıkları göze çarpmaktadır. Metallerin ise zor işlenebilen, ağır, pahalı olmalarının aksine iletkenlikleri yüksek maddeler olduğu bilinmektedir. Polimerler ile metallerin üstün özellikleri bir araya getirilerek iletkenlik özelliği taşıyan polimerlerin elde

edilmesi mümkün olmuştur. Bu amaçla hazırlanan polimerler, iletken polimerler olarak isimlendirilmiştir [67].

İletken polimerler, ana iskelet zincirlerinde zayıf bağlı elektronlar içeren polimerler olarak tanımlanırlar. Polimerlerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ana zincirinde konjuge çift bağlar bulunan polimerler sağlar. İletken polimerleri, diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan bir zincir yapısına sahip olmalarıdır. Bu şekilde sırayla değişen bağ yapısına “konjügasyon” denir. Bu yüzden iletken polimerlere “konjuge polimerler” denmektedir. İletkenlik özelliği elektronların serbestçe hareket etme özelliğidir. Atomik bağ sistemine sahip olan katılarda elektronlar belirli enerji bantlarında hareket ederler. Elektronik yapı, herhangi bir materyalin elektriksel özelliklerini belirler ve bu yolla bant teorisi açıklanabilir [68]. Her enerji bandının kendine özgü elektron alabilme yeteneği bellidir. Bu bantlar dolu ya da boş olabilir. Elektronların ise bir enerji bandında bulunabilmeleri için belli bir enerjiye sahip olmaları gerekir. Bantlar tam boş ve tam dolu olmadığı için iletkenlik gözlenir. Yalıtkanlarda ise bu bantlar tam dolu veya boş olduğundan iletkenlik söz konusu değildir.

İletken polimerler, çeşitli elektrokimyasal özelliklerinden dolayı çok değişik alanlarda kullanılabilirler. Özellikle, sensörler, şarj olabilen piller, fotokimyasal hücreler, elektrokromik aletler, ışık saçan diyotlar (LED, OLED), radar algılama sistemleri, bilgisayarlar için elektromanyetik koruyucular ve iyon seçici elektrotların yapımında kullanım potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. İletken polimerler, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle sentezlenebilmeleri, metallere yakın elektriksel iletkenlik göstermeleri ve kolay işlenebilirliklerinden dolayı çok geniş uygulama alanına sahiptirler. İletken polimerler, çok düşük akımlar üretmeleri ve çok uzun ömürlü olmaları nedeniyle kalp pillerinde elektrot olarak kullanılmaktadır. Radyo frekansı ya da kızılötesi dalgalar, gönderilen bütün radyasyonu emdikleri için bu polimerler radar dalgalarına karşı görünmez cihazların yapımında kullanılan materyallerdir [69].

2.6.2. İletken Polimerlerin Sentezlenmesi

İletken polimerler, π sisteminin yükseltgenmesi ya da indirgenmesiyle yüksek iletkenlik vermek üzere dop edildiği için iletken polimerin sentezinde kullanılan monomerlerin yapısında π elektronları içermesi önemli bir noktadır [70]. İletken polimerlerin sentezinde başlangıçta kullanılan monomerler sonuçta oluşan polimerin yapısında korunabilen tipik aromatik veya çoklu konjuge bağ yapısına sahip monomerlerdir. İletken polimerleri, diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan konjuge zincir yapısına sahip olmaları ve yapılarındaki uzun konjuge çift bağlı zincirler nedeniyle iletkenlik özelliğine sahiptirler. Dolayısıyla sadece konjüge olmuş polimerler elektriği iletirler. İletken polimerlerin sentezinde; kimyasal polimerleşme, elektrokimyasal polimerleşme, fotokimyasal polimerleşme, metal bileşikleri ile yapılan polimerleşme, emülsiyon polimerleşmesi, plazma polimerleşmesi, gaz fazı yöntemi, piroliz yöntemi, ara yüz polimerleşmesi ve oksidatif polimerleşme çeşidi olan enzimatik polimerizasyon kullanılır [71,72].

2.6.2.1. Enzimatik Polimerizasyon

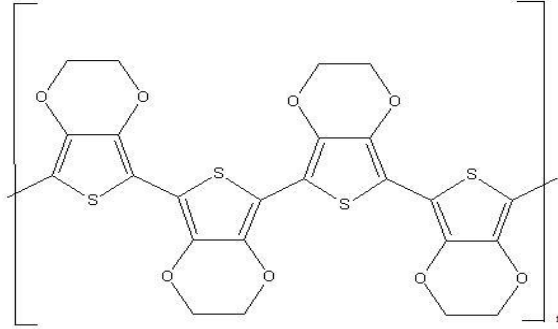
Enzimler sadece kendi doğal substratlarını değil benzer yapıdaki diğer bileşiklerin dönüşümlerini de katalizleyebilirler. Yararlı bileşiklerin elde edilmesinde kullanılabilmesi nedeniyle hücre-dışı enzim-katalizli organik reaksiyonlar oldukça dikkat çekmektedir. Enzimatik polimerleşme reaksiyonları, petrokimya ürünü olmayan yenilenebilir kaynakları substrat olarak kullanıp fonksiyonel polimerik maddelerin üretimlerini sağlarlar. Bu tip reaksiyonlarda ürün polimerler toksik maddeler kullanılmadan elde edilebilirler. Bu nedenle, enzimatik polimerleşme reaksiyonları, biyosentetik olmayan (metabolik olmayan) in vitro yollarla, bir enzim tarafından katalizlenen çevreye duyarlı kimyasal polimer sentezi olarak tanımlanabilir. Enzimler istenmeyen yan reaksiyonlar vermemeleri, ılımlı koşullarda yüksek aktivite göstermeleri ve yüksek seçicilikleri nedeniyle diğer katalizörlere göre daha üstündürler. Bu nedenle enzimler biyopolimer üretimlerinin başlıca katalizör kaynaklarıdır.

Çevreci faydalarının yanı sıra enzimler halka açılması polimerizasyonunda büyük halkalı yapıları metalik katalizörlerden çok daha hızlı, verimli

dönüştürebilirler ve yüksek molekül ağırlıklı polimer elde edilmesini sağlarlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar halkalı yapıya sahip maddelerin enzimlerle polimerleşebildiklerini ispatlamıştır [73]. Enzimler yapılarından dolayı çözünür ve işlenebilir iletken polimerlerde çevre açısından zararsız reaksiyon, yüksek verimde polimerizasyon ve yüksek kontrollü mekanizma sağlarlar. Enzimlerle gerçekleştirilen bu biyokatalik reaksiyonlar için genellikle yaban turbu [74-77], soya fasulyesi [78] ve palmye ağacı peroksidazları kullanılır.

2.6.3. PEDOT [Poli(3,4-etilendioksitiyofen)]

Poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT), π -konjuge iletken polimerlerden bir tanesidir. 1800' lü yıllarda tiyofenin bir türevi olarak bulunan PEDOT' un yapısında sülfür bağlı karbon yapısına tiyofen bağlı iki oksijen atomu vardır (Şekil 2.26).



Şekil 2.26. PEDOT yapısı

PEDOT; termal ve kimyasal kararlılığı, düşük yükseltgenme potansiyeli, yüksek elektriksel iletkenliği ve elektrokimyasal açıdan kararlı olması nedeniyle en çok tercih edilen iletken polimerlerden biridir. Çok fazla kullanılan PEDOT, EDOT monomerinin güçlü yükseltgeyiciler varlığında sentezlenmesiyle elde edilmektedir. Enzimler gibi güçlü biyokatalizörlerin PEDOT sentezi için kullanılması son yıllarda ‘‘yeşil çevre kimyası’’ için büyük önem taşımaktadır [79,80]. PEDOT, geleneksel politiyofene göre daha düşük yükseltgenme potansiyeline sahip olması en çok sentezlenen iletken polimerlerden biri haline gelmiştir. Sentezlenen polimerin, bir iletken polimer olması yani iletkenliğinin saf

halindekinden daha yüksek değerlere çıkarılması için mutlaka katkılanması gereklidir. Katkılama (doping) işlemi; iletken polimerler hazırlamak için konjuge π bağlarına sahip olan bir polimeri uygun bir reaktif ile indirgemek veya yükseltmek yoluyla gerçekleştirilir. Katkılama işlemiyle polimer yapısına iletkenliği sağlayacak olan elektronlar verilir veya elektronlar alınarak polimer örgüsünde artı yüklü boşluklar oluşturulur. Katkılama işlemiyle yük taşıyıcıların sayısı arttırılır. İletken polimerler; katkılanmış yapılarında bulunan doping anyonları/kasyonları uzaklaştırılarak yeniden yalıtkan hale dnüşürülebilirler [70]. Polisitiren sülfonat (PSS) [81,82], FeCl₃ ve Fe(III)tosilat gibi PEDOT ince film katkılaması için yükseltgen özellikleri uygun olan katkılayıcılardır [83].

PEDOT' un kullanım alanları oldukça geniştir. Bunların arasında; elektrokromik cihazlar [84], biyosensörler [85], biyomedikal, biyoalgılama, organik piller, mikroelektronik, antistatik kaplama [86], optik ekranlar ve elektromanyetik koruyucular vardır.

2.6.4. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Jel filtrasyon mekanizması ile karışımdaki bileşenler büyüklük farkına dayanılarak ayrılırlar. Herhangi bir karışım gözenekli bir jel içerisine döküldüğünde, karışım içindeki küçük moleküller gözeneklere tutunurken büyük moleküller jelden akarak geçerler. Böylece özellikle kromatografik saflaştırma sırasında bozunabilecek biyolojik bazı karışımlar (protein, enzim, vb.) bu mekanizmanın etkin olduğu jel geçirgenlik kromatografisi ile ayrılabilir (Şekil 2.27).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan yaban turbu bitkisi R.Say ve arkadaşlarından temin edilmiştir. Enzim saflaştırmada kullanılan Sodyum asetat (NaAc) ve Sodyum klorür (NaCl) kimyasalları Sigma' dan, kriyojel kolon sentezlemede kullanılan Amonyum persülfat (APS), Tetraetilmetilendiamin (TEMED), Etanol (C₂H₅OH), 2-akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit (AMPS) Sigma' dan, Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros' dan ve N,N' Metilenbisakrilamit (MBA) Sigma Aldrich' den temin edilmiştir. Enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) Sigma' dan, alınmıştır. Jel elektroforez işleminde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar' dan, Coomassie Blue Appli Chem' den, Tris(hidroksimetil)aminometan, Hidroklorik asit (HCl) ve Akrlamid Merck' den, Asetik asit (CH₃COOH) Riedel-de Haen firmasından, Metanol (CH₃OH) Sigma' dan, Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) Panreac' dan temin edilmiştir. Polimer sentezi için kullanılan 3,4-etilendioksitiyofen (EDOT) monomeri, Poli(sodyum 4-sitirensülfonat) (Na/PSS) ve Glisin (NH₂CH₂COOH) Sigma' dan ve Dimetil sülfoksit (DMSO) Riedel-de Haen' dan temin edilmiştir. Polimer sentezi için kullanılan kriyojel kolon sentezinde ek olarak R.Say ve arkadaşları tarafından geliştirilen fotosensitif monomer bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂ Rutenyum(II) kullanılmıştır. Sentezlenen polimerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan Sodyum azid (NaN₃) Sigma' dan, easivial Polietilenglikol/oksit (PEG/PEO) standartları Agilent/EasyVial' den temin edilmiştir. Saf su ise Thermo Scientific firmasından alınan saf su cihazından elde edilip kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Enzim saflaştırma için AKTA P-920 UPC-900 model FPLC cihazı kullanılmış, enzimin protein içeriği ve aktivitesi BioTek Synergy H1 ELISA Reader ile yapılan UV absorbans ölçümleri ile tayin edilmiştir. SDS PAGE analizi Thermo Scientific elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Polimer sentezi

Heidolph Pumpdrive 5101 marka peristaltik pompa ile sürekli sistemden geçirilerek elde edilmiştir. Polimerin molekül ağırlığını belirlemek için Agilent marka 1100 seri model GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi) cihazı kullanılmıştır. Sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometresi, yüzey morfolojisinin incelenmesinde Zeiss Ultra Plus SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve polimerlerin yüzey alanının belirlenmesinde Quantachrome Nova 2200E model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan tampon çözeltilerin pH' ları HANNA HI 2211 pH/ORP metre ile ölçülmüştür. Ayrıca, sentezlenen polimerin UV spektroskopik ölçümleri Shimazu UV-3150 ile floresans ölçümleri ise Varian Cary Eclipse marka floresans cihazı ile gerçekleştirilmiştir

3.2. Metod

3.2.1. AMPS kriyojel kolonun hazırlanması

Kriyojenik karışım hazırlanması için öncelikle 70,75 mg çapraz bağlayıcı MBA ve 50 mg AMPS suda çözülerek 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 325 µL HEMA monomeri çözeltiye ilave edilip 1 saat daha karıştırılmıştır. Bu işlem bittikten sonra hazırlanan çözelti 5 mL' lik şırınga içine alınmış ve bir süre buz banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için 5 mg APS ve 6,25 µL TEMED karışıma ilave edilip, çözeltide polimerleşme başlayana kadar buz banyosunda tutulmuş ve sonra -20 °C' de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda polimerleşme tamamlanmıştır. Hazırlanan kolon kullanıma kadar etil alkol içerisinde +4 °C' de saklanmıştır.

3.2.2. AMPS kriyojel kolonun karakterizasyon çalışmaları

3.2.2.1. FT-IR Analizi

Hazırlanan kriyojel kolondan 0.2 g tartılıp ATR başlığı kullanılarak FT-IR cihazıyla spektrumu alınmıştır.

3.2.2.2. Şişme Testi

AMPS kriyojel kolondan bir parça kesilip 24 saat boyunca, oda sıcaklığında, 30 mL saf su içerisinde bekletilmiştir. 24 saat sonunda sudan çıkarılan polimerin süzgeç kağıdı yardımı ile fazla suyu alınmış ve polimerin şişmiş hali tekrar tartılmıştır. Polimerin ilk ağırlığı ($W_{kurujel}$) ile son ağırlığı ($W_{islakjel}$) belirlenmiş ve Denklem 3.1 kullanılarak polimerin yüzde su tutma kapasitesi hesaplanmıştır [90].

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \left[\frac{W_{islakjel} - W_{kurujel}}{W_i} \right] \times 100 \quad (3.1.)$$

3.2.2.3. Yüzey Morfolojisi

Polimer monolitinden bir parça alınıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra SEM cihazının örnek haznesine yerleştirilmiş ve vakum altında altın tabakası ile kaplanmıştır. Ardından SEM ile polimerin yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

3.2.2.4. Yüzey Alanı Ölçümü

Polimer monolitinden bir parça alınıp etüvde 50 °C' de 1 gece boyunca kurutulmuştur. Ardından polimer monolitinin BET cihazı ile spesifik yüzey alanı belirlenmiştir.

3.2.3. Enzim Önderiştirilmesi

Temin edilen yaban turbu bitkisi blender ile öğütülmüş fakat süzülmesi zor olduğu için nuche hunisi ve erleni kullanılarak vakum altında süzme hızlandırılmıştır. Süzgeç kağıdı, nuche hunisinin çapına göre kesilmiş ve huninin altındaki delikli kısım tamamen kapanmıştır. Erlenin yanındaki boru bir lastik hortumla hava borusuna bağlanmıştır. Daha sonra kristaller ana çözeltiden tamamen ayrılmış ve 30 dakika boyunca 12000 rpm devirle 4 °C' de santrifüjde çöktürülmüştür. Çözeltinin içerdiği proteinler % 80' lik amonyum sülfat ile çöktürülerek ortamdan ayrılmıştır.

3.2.4. Enzim Saflaştırılması

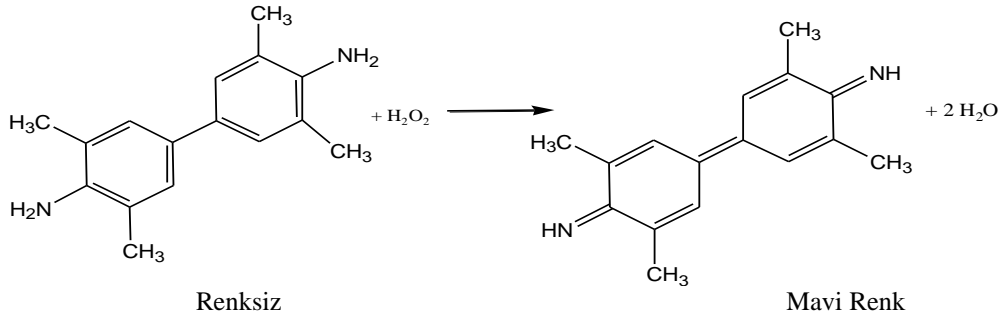
Yaban turbundan izole edilen horseradish peroksidaz enzimi FPLC cihazı ile AMPS bağlı kriyojel kolon kullanılarak saflaştırılmıştır (Şekil 3.1). Enzimin kolona tutturmak için tutma çözeltisi olarak 100 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu, enzimin kolondan desorpsiyonu için ise sökme çözeltisi olarak 0,1 M NaCl içeren 100 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Anadolu Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı FPLC cihazı

3.2.5. Enzimin Aktivitesi ve Protein Tayini

HRP enziminin aktivite tayini, Bradford yöntemiyle içerdikleri protein miktarı belirlenmiştir. Bradford metodu bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bradford ayırıcı olarak Commassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Bu yöntem, Commassie brilliant Blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanma temeline dayanmaktadır. Aktivite hesaplarındaki molar uyarılma katsayısı (ϵ_{595}) $3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alınmıştır [91].



Şekil 3.2. TMB substratının HRP ile reaksiyon mekanizması

HRP enzim aktivitesinin hesaplanmasında Denklem 3.2 kullanılmıştır [92].

$$U/mL = \frac{\Delta OD/min \times RmV \times df}{\epsilon_{595} \times EV} \quad (3.2.)$$

$\Delta OD/min$: Absorbansın dakika başına değişimi

RmV : Çözeltinin toplam hacmi (mL)

$\epsilon_{595} (M^{-1} cm^{-1})$: 595 nm'deki TMB' in molar absorpsiyon katsayısı

EV : Enzim ektrat hacmi

3.2.6. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivite tayini için farklı pH, enzim derişimi, substrat derişimi ve sıcaklıklara bakılmıştır.

HRP enzim aktivitesinde pH etkisinin incelenmesi için 25°C' de farklı pH aralığında (2-7) ölçümler yapılmıştır. Aktivite işlemleri sırasında substrat olarak 10 mM TMB ve 20 mM H₂O₂ kullanılmıştır.

Enzim derişiminin incelenmesi için de farklı derişim aralığında (10-50 mM) HRP çözeltisi, pH 5 tamponu, 10 mM TMB ve 20 mM H₂O₂ kullanılmıştır.

Substrat derişiminin incelenmesi için farklı derişim aralığında (5-20 mM) TMB substratı hazırlanmış, pH 5 tamponu, 20 mM H₂O₂ ve 10 µL enzim kullanılmıştır. Enzimin substrata olan ilgisi 595 nm' de takip edilmiştir. Daha sonra substrat derişimine karşı enzim aktivitesini hesaplamak için Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden V_{mak} ve K_m değerleri bulunmuştur.

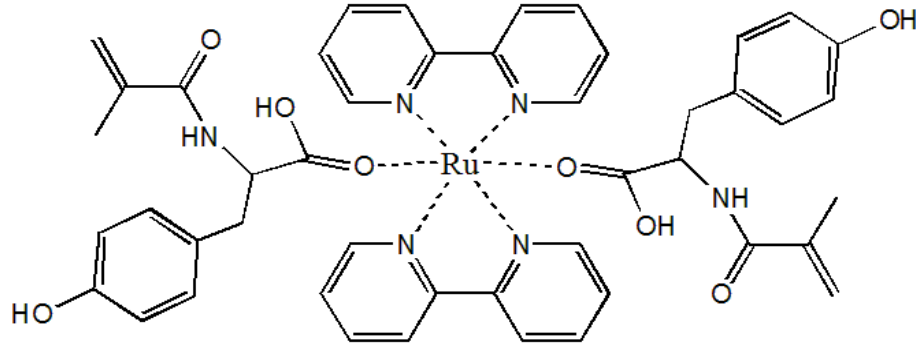
3.2.7. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi için öncelikle % 10' luk iki farklı poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bu jellerin içine akrilamid-bis monomerleri, TEMED, APS, SDS ve pH 8.8 Tris tamponu ilave edilmiştir. HRP analizi için numuların her birinden 15' er µL alınmış ve 15 µL Coomassie Blue G boyası ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımın homojen olması için 15 dakika su banyosunda bir beherde ısıtılmıştır. Daha sonra önce ayırma jeli ardından yükleme jeli SDS camı içerisine

konmuş ve jel tanka dökülmüştür. Uygun bir tarak ile jelde eşit hacimde kuyucuklar oluşturulmuş, tank tamponu çözelti ile doldurulmuş, numuneler kuyucuklara yüklenmiştir. Enzim örneklerinin jelde ilerlemesi için önce 35 mA akım daha sonra 55 mA akım verilmiştir. Analiz sonunda tanktan çıkarılan jel önce Coomassie Blue boya çözeltisi içinde 1 saat bekletilmiş daha sonra bantların görüntülenmesi için belirli aralıklarla CH₃COOH ve CH₃OH karışımı olan yıkama çözeltisi yıkanmıştır. Saflaştırılan HRP'nin saflığı ve molekül ağırlığı bu örneğe ait bant ile ticari HRP' ye ait bandın karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

3.2.8. bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)₂ Rutenyum (II) sentezi

Işığa duyarlı rutenyum merkezli bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂ Rutenyum(II) aminoasit-monomerin kimyasal sentezi için uygulanan yöntemde, 1g diklorobis(2-2'-bipiridil) rutenyum(II) (RuCl₂(bipy)₂) saf su içinde çözülmüş ve çözelti 0 °C' a soğutulmuştur. Daha sonra trietilamin ve 1,0 g MATyr sulu çözeltisi damla damla RuCl₂(bipy)₂ çözeltisine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Karışım 80 °C' da 24 saat reflaks edilmiştir. Oluşan kahverengi kompleks süzülmüş, eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur (Şekil 3.3) [61].



Şekil 3.3. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) molekül yapısı

3.2.9. HRP kriyojel kolonun hazırlanması

375 µL HEMA monomeri, 70,75 mg çapraz bağlayıcı MBA, saflaştırılan HRP enzimi ile 50 µL MATyr-Ru-MATyr fotosensitif aminoasit monomeri suda çözülerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında N₂ gazı altında karıştırılmıştır. Bu işlem bittikten sonra hazırlanan çözelti, 5 mL' lik şırınga içine alınmış ve bir süre buz banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için 6,5 mg APS

ve 6,25 µL TEMED karışıma ilave edilmiştir. Çözeltide polimerleşme başlayana kadar buz banyosunda tutulmuş ve sonra -20 °C' de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda polimerleşme tamamlanmıştır. Hazırlanan kolon kullanıma kadar C₂H₅OH içerisinde +4 derecede saklanmıştır.

3.2.10. HRP kriyojel kolonun karakterizasyon çalışmaları

3.2.10.1. FT-IR Analizi

Hazırlanan kriyojel kolondan 0.5 g tartılıp ATR başlığı kullanılarak FT-IR cihazıyla spektrumu alınmıştır.

3.2.10.2. Şişme Testi

HRP kriyojel kolondan bir parça kesilip 3.2.2.2' deki prosedüre göre ilk ve son ağırlığı belirlenmiş, denklem 3.1. kullanılarak kriyojel kolonun su tutma kapasitesi hesaplanmıştır.

3.2.10.3. Yüzey Morfolojisi

HRP kriyojel kolondan bir parça alınıp 3.2.2.3' deki prosedüre göre SEM ile yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

3.2.10.4. Yüzey Alanı Ölçümü

HRP kriyojel kolondan bir parça alınıp etüvde 50 °C' de 1 gece boyunca kurutulmuştur. Ardından polimer monolitinin BET cihazı ile spesifik yüzey alanı belirlenmiştir.

3.2.11. PEDOT Polimerinin Sentezi

PEDOT/PSS sentezi için iki farklı yöntem uygulanmıştır. Birinci yöntemde; 100 ppm ticari HRP enzimi, 0,5 mL ticari EDOT monomeri, katkılama için 0,055 M PSS, 5 mL DMSO ve pH 2 glisin tamponu içerisinde manyetik karıştırıcıda 25 °C' de 16 saat karıştırılmıştır.

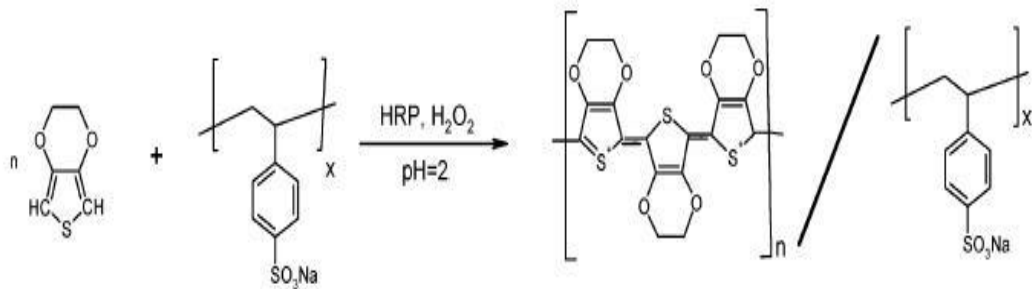
İkinci yöntemde ise sürekli bir sistem kurgulanmıştır. Sürekli sistemde EDOT' dan PEDOT/PSS üretimi için saflaştırılan HRP' den sentezlenen kriyojel katalik kolon kullanılmıştır. Bu düzenekte peristaltik pompa hortumu C₂H₅OH ve

H₂O ile yıkanmıştır. 5 mL' lik şırınga içine hazırlanan HRP kriyojel kolonun üst kısmına peristaltik pompa hortumu sabitlenmiştir. HRP kolonun aktivite göstermesi için önce kolona 10 ml 0,05 M H₂O₂ verilmiştir. Asidik ortamda polimerleşmenin reaksiyon hızı arttığından 0,05 M pH 2 glisin tamponu hazırlanmıştır. Suda çözünürlüğü az olduğu için 0,5 mL ticari EDOT monomeri ve 0,055 M Na/PSS, 5 mL DMSO' da çözünüp hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti pH 2 glisin tamponu içine son çözelti 20 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra 20 mL' lik toplam çözeltinin içine peristaltik pompa hortumunun diğer ucu daldırılmış ve sürekli sistem oluşturularak 0,2 mLdk⁻¹ akış hızında PEDOT polimeri oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.4). İki deneyin sonuçları karşılaştırılmıştır.



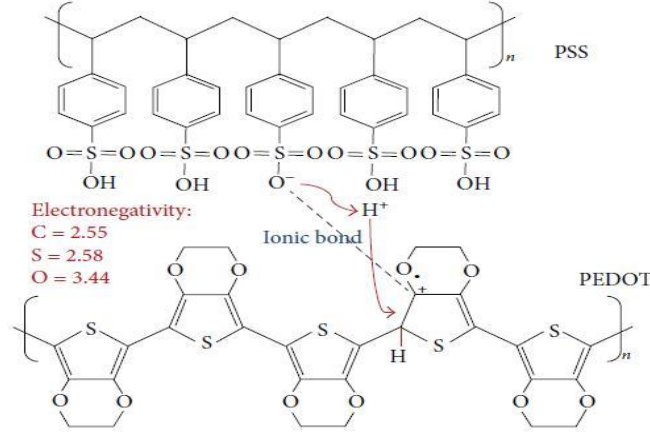
Şekil 3.4. Peristaltik pompa deney düzeneği

EDOT' un olası polimerizasyon mekanizması Şekil 3.5' deki gibidir.



Şekil 3.5. EDOT' un polimerizasyon mekanizması [78]

PEDOT' un PSS ile vermiş olduğu tepkime mekanizması ise Şekil 3.6' daki gibidir.



Şekil 3.6. PEDOT ve PSS arasındaki reaksiyonun şematik gösterimi [93]

3.2.12. PEDOT polimerinin karakterizasyon çalışmaları

3.2.12.1. UV Spektroskopik Ölçümler

Sentezlenen PEDOT polimerinin dalga boyu UV spektrofotometre cihazında 220-800 dalga boyu aralığında dalga boyu taraması yapılarak belirlenmiştir.

3.2.12.2. Floresans Ölçümleri

Floresans ölçümleri için önce ticari olarak alınan 100 µL EDOT monomeri 300 nm' de uyarılarak floresans spektrumu ölçülmüştür. Daha sonra enzimatik yolla sentezlenen 100 µL PEDOT/PSS polimeri 300 nm' de uyarılarak floresans spektrumu ölçülmüştür.

3.2.12.3. Molekül Ağırlığı Tayini

DMSO' da çözülmüş olan PEDOT polimeri, PL aquagel-OH 8 µm' lik kolon ve % 0,02 NaN₃ içeren elüent ile 1 mLdk⁻¹ akış hızı ile GPC cihazında refraktif indeks dedektörü ile tayin edilmiştir. Tayin için easivial PEG/PEO standartları kullanılmıştır. PEG/PEO standartlarından bir kalibrasyon grafiği elde

edilmiştir. PEDOT polimeri için GPC kromatogramları ve elde edilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak mol kütle aralığı bulunmuştur (Şekil 3.7).



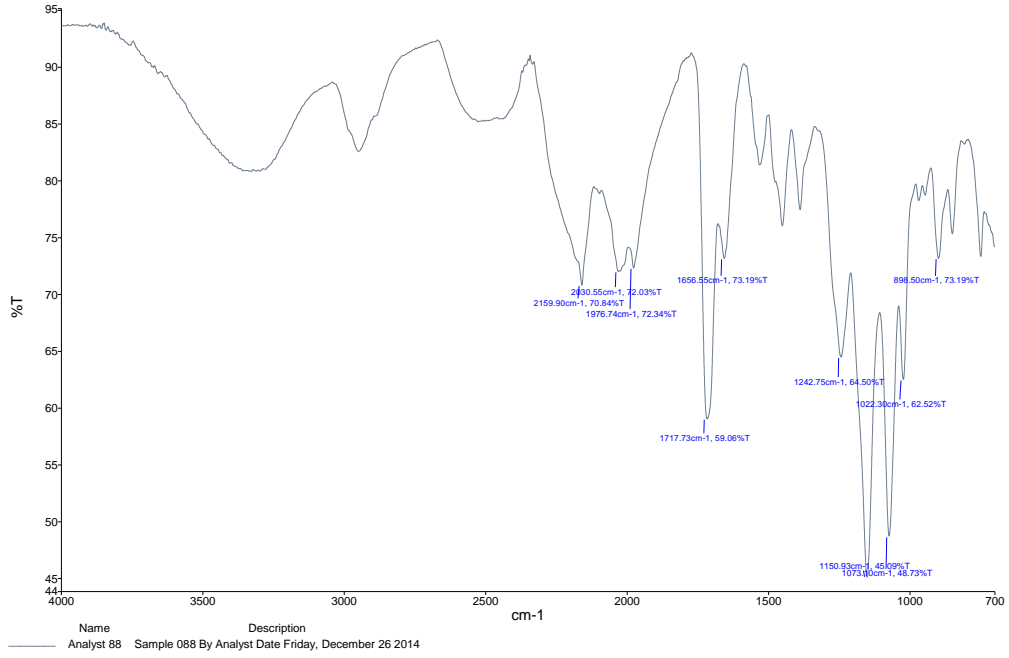
Şekil 3.7. Anadolu Üniversitesi Kromatografi Laboratuvarı GPC cihazı

4. BULGULAR

4.1. Poli(HEMA-ko-AMPS)' nin Karakterizasyonu

4.1.1. Poli(HEMA-ko-AMPS)' nin FT-IR Spektrumu

Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojelinde (Şekil 4.1) 3300 cm^{-1} civarında (-OH) ve 1150 cm^{-1} (-CO-O-C) frekanslarında HEMA' daki fonksiyonel gruplara ait pikler görülmektedir. Bunun dışında 1656 cm^{-1} ' de AMPS' deki birincil amin (-N-H) ve 1073 cm^{-1} ' de sülfonik asit (-SO₃-H) titreşimine ait karakteristik bant gözlenmektedir. 2900 cm^{-1} civarı gelen pik -C-H bandının gerilme titreşimlerini, 1242 cm^{-1} ' de simetrik -C-H eğilme titreşimleri gözlenmektedir. AMPS yapısında bulunan karbonil grubuna ait C=O gerilme titreşimleri 1717 cm^{-1} ' de gözlenmektedir.



Şekil 4.1. AMPS' nin FT-IR spektrumu

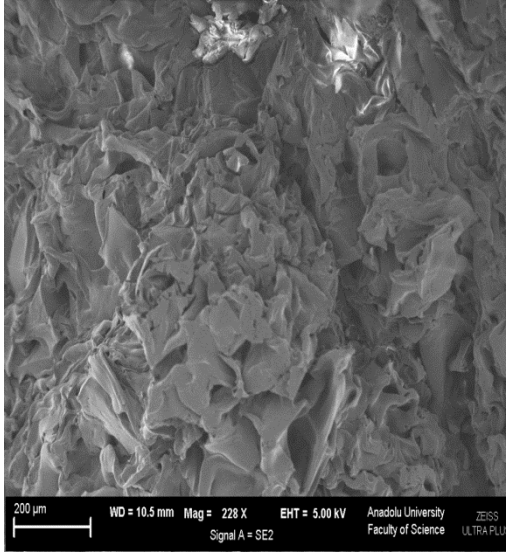
4.1.2. AMPS Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi

Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojeli çapraz bağlar içeren hidrofilik bir polimerdir. Hidrofilitesine bağlı olarak yapısına su alır ve şişme özelliği gösterir. Polimer zincirleri şişme yaparak polimer sıvı etkileşimi maksimum olur. Bu

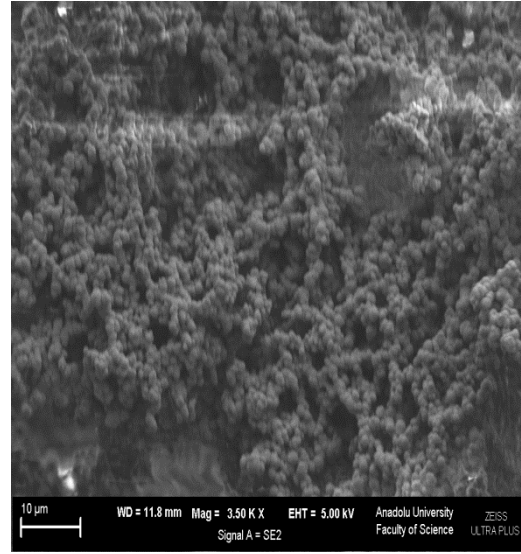
çalışmada sentezlenen kriyojel kolonun su tutma kapasitesi % 520 olarak hesaplanmıştır.

4.1.3. AMPS Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojelinin ve poli(HEMA) boş kriyojelin yüzey morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.3' de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojelin gözenek boyutu oldukça büyüktür ve heterojen bir gözenek dağılımına sahiptir. Gözenek boyutunun büyük olması yüzey alanının büyük olmasını sağlamaktadır.



Şekil 4.2. Poli(HEMA) boş kriyojel kolon



Şekil 4.3. Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolon

4.1.4. AMPS Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü

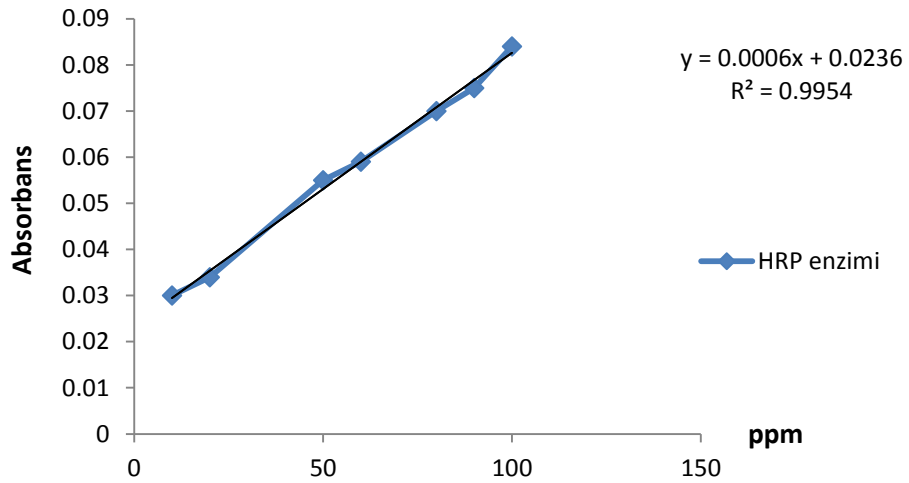
Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolonunun yüzey alanı ölçümü BET cihazı ile yapılmıştır. 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı ölçümü sonucu kolonun spesifik yüzey alanı $80 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ polimer bulunmuştur.

4.2. Enzim Örneklerinin Protein İçeriği Tayini

Yaban turbundan uygun işlemler sonrası izole edilen HRP enzimi içeren ham ekstrakt ile % 80 oranında $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ çöktürmesi yapılmış örneklerin Bradford yöntemiyle içerdikleri protein miktarı belirlenmiştir. Bradford metodu bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan

yöntemlerden biridir. Bradford ayırıcı olarak Commassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Bu yöntem, Commassie brilliant Blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanma temeline dayanmaktadır. Oluşan kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması, 2 dakika gibi çok hızlı bir zamanda gerçekleşir.

Tayin işleminde, Bradford metoduna göre, pH 7 fosfat tamponu içinde farklı derişimlerde standart protein (bovin serum albumin) içeren örnekler hazırlanmıştır ve bu örnekler Bradford belirteci ile 1:10 oranında reaksiyona sokularak maksimum dalga boyunda (595 nm) absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri, standart grafik olarak elde edilmiştir (Şekil 4.4). HRP enzimi için 595 nm' de okunan absorbans değeri 0,045 olarak ölçülmüştür ve standart eğri yardımıyla protein miktarı 356 ppm olarak bulunmuştur.



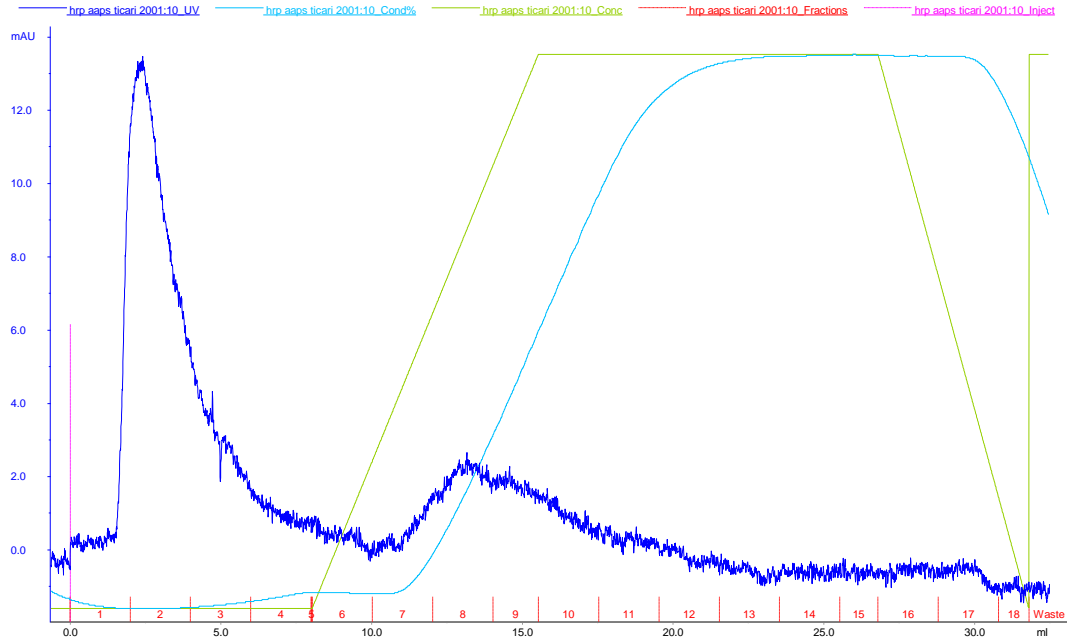
Şekil 4.4. Bradford standart grafiği

4.3. Enzim Saflaştırılması

4.3.1. FPLC Analizi

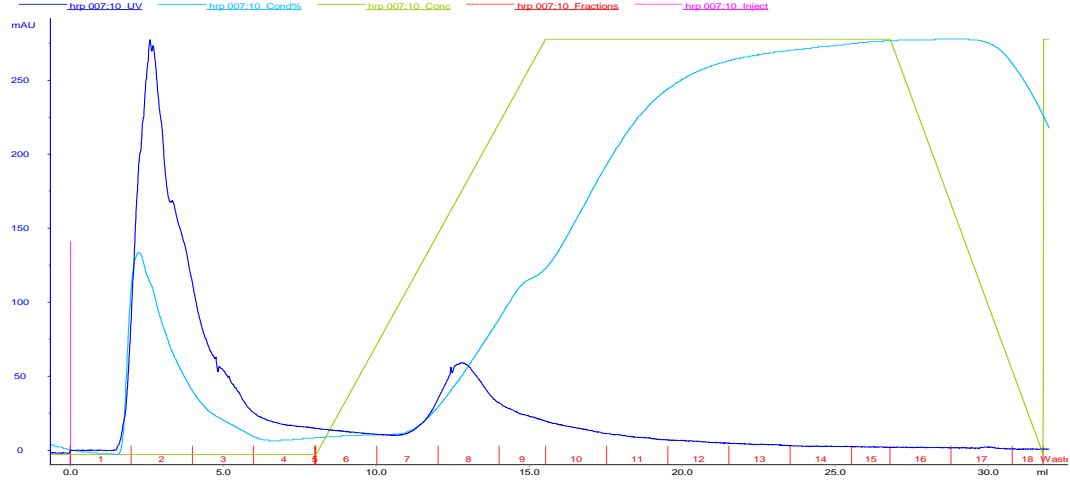
Yaban turbandan izole edilen HRP enzimi iyon değişim kromatografisi yöntemi ile FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu çalışmada iyon değişim kromatografisinde, saflaştırılmak istenen enzimin aktif bölgesinde bulunan Fe^{+3} iyonuna bağlanacak uygun bir madde matrikse tutturulmuş ve enzimi bulunduran numune bu kolon üzerinden uygun pH' da hazırlanmış tampon çözelti ile geçirilmiştir. Bu çalışmada; HRP enziminin saflaştırılmasına yönelik AMPS bağlı kationik değiştirici özellikte kriyojel kolon hazırlanmıştır. HRP enzimi AMPS' deki negatif yüklü sülfonik asite bağlanarak kolona tutunmuştur.

Şekil 4.5' de ticari HRP enziminin AMPS gömülü kolondan geçirilmesiyle elde edilen kromatogram verilmiştir. Şekil 4.6' da elde edilen kromatogramda görülen ilk pik kolondan tutunmadan çıkan türleri ifade eder. Elüsyon çözeltisi gradientli olarak kolondan geçirilmeye başlandıktan sonra ise kolona girip tersinir ve zayıf bağlarla tutunmuş olan HRP enzimi kolondan ayrılmıştır. Kromatogramda görülen ikinci pik ise saflaştırılan HRP enzimine aittir.



Şekil 4.5. Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolonundan geçirilen ticari HRP' nin kromatogramı

Şekil 4.6 incelendiğinde poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolon kullanılarak saflaştırılan HRP enziminin verdiği kromatogram, kriyojel kolona ticari HRP enzimi verildiğindeki kromatogramla örtüşmektedir.



Şekil 4.6. Poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolonu ile HRP saflaştırılmasına ait kromatogram

4.3.2. Saflaştırılan Enzimin Protein Miktarı ve Aktivite Tayini

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan HRP enziminin protein içeriği ve aktivitesi 3.2.5’ de bahsedilen şekilde tayin edilmiştir. Saflaştırma sonrası HRP, ortamda bulunan diğer protein moleküllerinden başarılı bir şekilde ayrıldığı için FPLC’ den toplanan numunenin protein içeriği ham ekstrakt ve tuz ile çöktürülmüş örneklerle göre daha düşük, aktivitesi ise bu örneklerle göre daha yüksektir. İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesinde (Tablo 4.1) belirgin bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.1. HRP’ ye ait saflaştırma tablosu

Numune	Toplam Protein (µg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (Umg ⁻¹)	Saflaştırma Kat Sayısı	% Verim
Ham Ekstrakt	1560	0.322	0.212	10	100
%80 A.S Çök. Sonrası	135	0.212	1.56	7	65.8
Poli(HEMA-co-AMPS) kriyojeli ile saflaştırma sonrası	14	0.081	5.64	27	25.15

Tablo 4.2. HRP saflaştırılmasının değişik araştırma gruplarının çalışmalarıyla karşılaştırılması

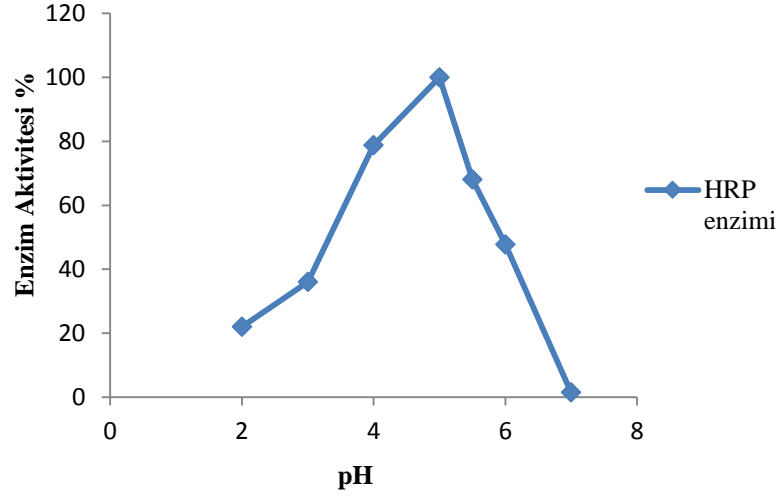
Referans	Spesifik Aktivite (Umg ⁻¹)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Mevcut Çalışma	5.64	27	25.15
[94]	4.8	13.5	90.8
[95]	1.11 × 10 ⁷	2.3	24.5
[96]	2.17	41	27.8
[97]	17.4	14	73

İyon değişim kromatografisiyle yapılan saflaştırılma sonrası elde edilen spesifik aktivitenin diğer araştırma gruplarının çalışmalarıyla karşılaştırılması Tablo 4.2’ de görülmektedir. Tabloda görüldüğü gibi; Poli(HEMA-ko-AMPS) kullanılarak saflaştırılan HRP’ nin spesifik aktivitesi ve saflaştırma katsayısı daha önce yapılmış çalışmalardan daha yüksektir.

4.3.3. HRP Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi

4.3.3.1. pH Etkisi

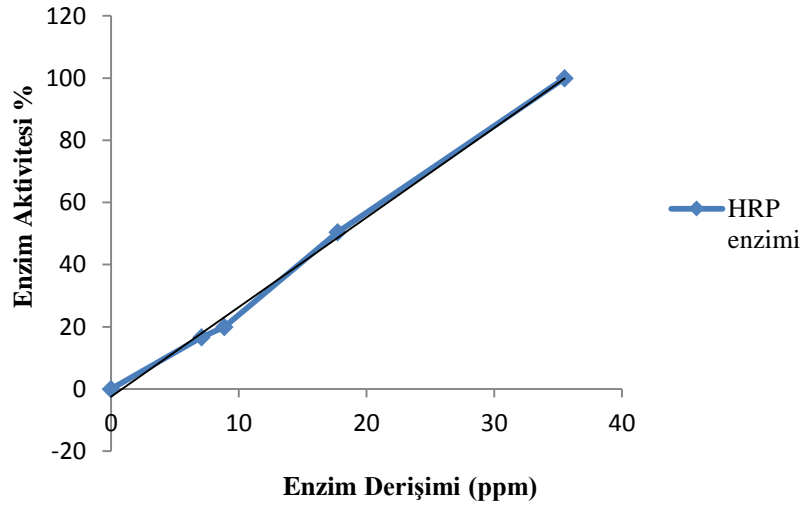
Saflaştırılan HRP enziminin aktivitesi 25 °C’ de farklı pH aralığında ölçümler yapılmıştır (Şekil 4.7). Aktivite işlemleri sırasında 10 mM TMB ve 20 mM H₂O₂ kullanılmıştır. pH 2-7 arası tampon çözeltiler kullanılarak yapılan analizlerde, enzimin her bir pH değerinde farklı aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri o enzim için optimum pH’ dır. HRP enzimi pH 5 ve 6 aralığında iyi çalışmakta, pH 5’ de ise maksimum aktiviteye ulaşmaktadır.



Şekil 4.7. Substrat olarak TMB kullanıldığında HRP aktivitesinin pH ile değişimi

4.3.3.2. Enzim Derişimi Etkisi

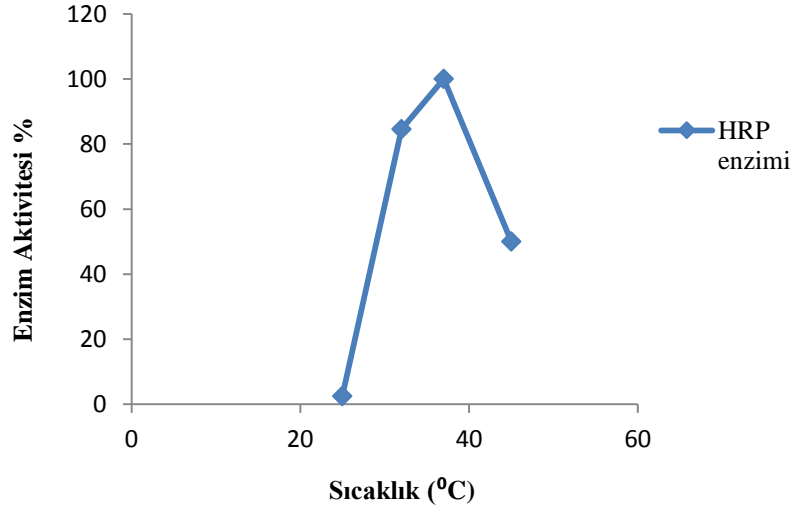
pH 5 tamponu, 10 mM TMB ve 20 mM H₂O₂ kullanılarak yapılan aktivite işleminde enzim derişiminin artmasıyla enzim aktivitesinin doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.8). Enzim miktarının fazla olması, ürün miktarının fazla olmasını sağlamaktadır.



Şekil 4.8. pH 5 tamponu ve TMB substratı kullanılarak oluşturulan enzim derişiminin aktivite üzerine etkisi

4.3.3.3. Sıcaklık Etkisi

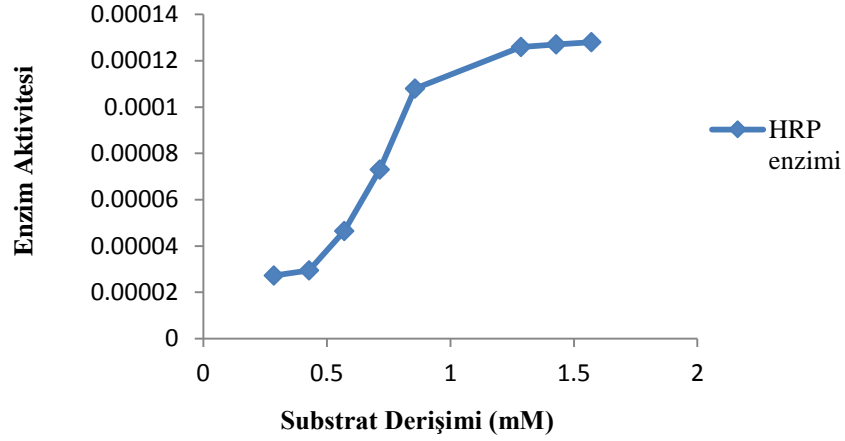
Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin ölçümleri 25, 32, 37 ve 45°C’ de gerçekleştirilmiştir. Aktivite işlemleri sırasında pH 5 tamponu, 10 mM TMB ve 20 mM H₂O₂ kullanılmıştır. Şekil 4.9.’da görüldüğü üzere HRP enzimi en iyi aktiviteyi 37 °C’ de vermiştir.



Şekil 4.9. Substrat olarak TMB kullanıldığında HRP aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim grafiği

4.3.3.4. Substrat Derişimi Etkisi

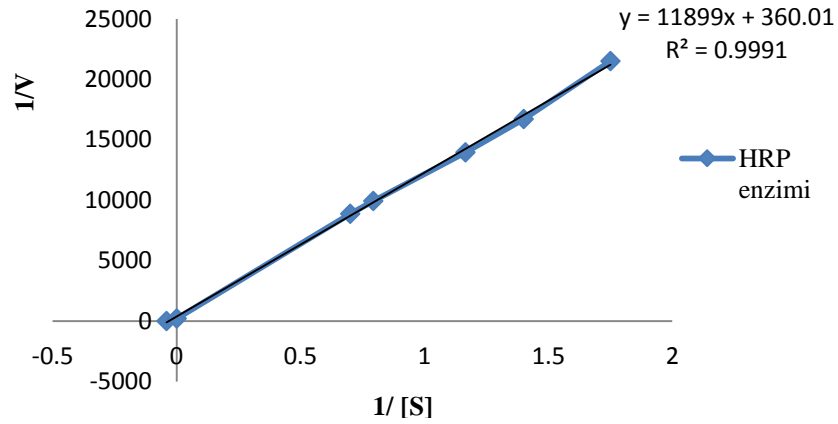
Enzimin kendine daha fazla substrat bağlayabilmesi için reaksiyon ortamındaki substrat derişiminin düşük olması gerekmektedir. Enzim aktivite gösterebilmek için, ortamdaki substrat miktarı arttığında, kendine daha çok substrat bağlayacaktır. Enzimin substrata tamamen doyunluğa ulaştığı noktada, substrat miktarı en yüksek derişimlerde olmaktadır. Doygunluğa ulaşan enzimin aktivitesi daha fazla artış göstermez ve bir süre sonra sabit kalır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. pH 5 tamponu ve farklı derişimlerde TMB kullanılarak oluşturulan derişim grafiği

4.3.4. HRP' nin V_{mak} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi

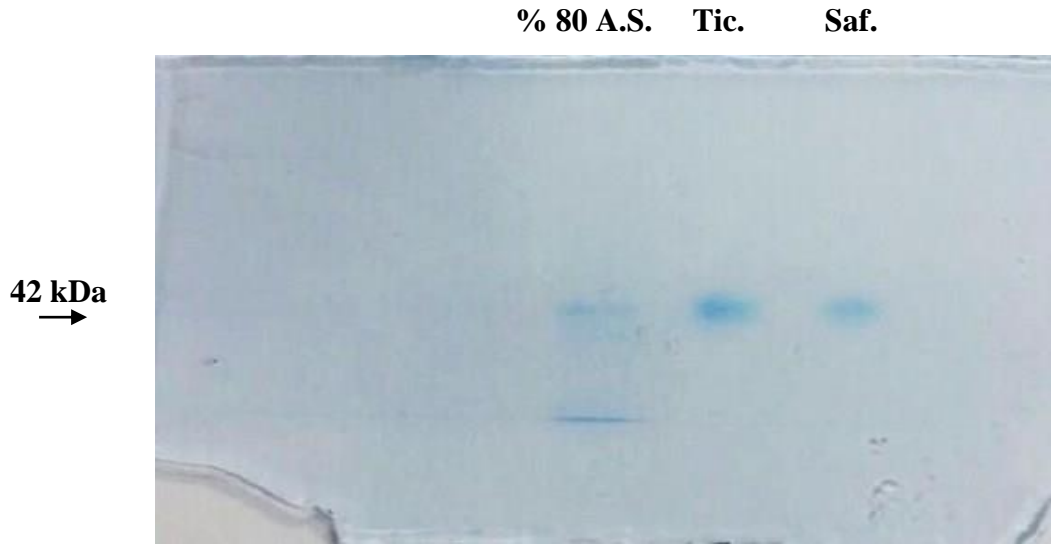
HRP enziminin farklı substrat derişimlerine karşı aktivitesi substrat derişimine karşı çizilen enzim aktivitesi grafiği (Michaelis-Menten) parabolik olduğu için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek belirlenmiştir (Şekil 4.11). Lineweaver-Burk grafiği $1/[S]$ ' e karşı $1/V$ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilmektedir. Enzim bağlayabileceği maksimum miktarda substratı bağladığında reaksiyon maksimum hıza ulaşmakta ve HRP enzimi için V_{mak} değeri bulunmaktadır. K_m ise; $V_{mak}/2'$ ye karşılık gelen substrat derişimini ifade etmektedir. AMPS' ye karşı aktivitesi belirlenen HRP enziminin V_{mak} değeri 0.0027, K_m değeri ise 32,96 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. Farklı derişimlerde TMB substratı ve pH 5 tamponu kullanılarak oluşturulan Lineweaver Burk Eğrisi

4.4. SDS-PAGE Analizi

Yaban turbandan izole edilen enzim örneklerinin HRP içeriği ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan HRP' nin saflığını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Örnekler SDS varlığında, % 10' luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. % 80' lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonucu elde edilen örnekte birden fazla bant gözlenmesinin sebebi çok sayıda protein içermesindedir. Saflaştırılan HRP enzimi, ticari HRP enzimi ile aynı yerde gelmiştir. Saflaştırılan enziminin ~42 kDa olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).

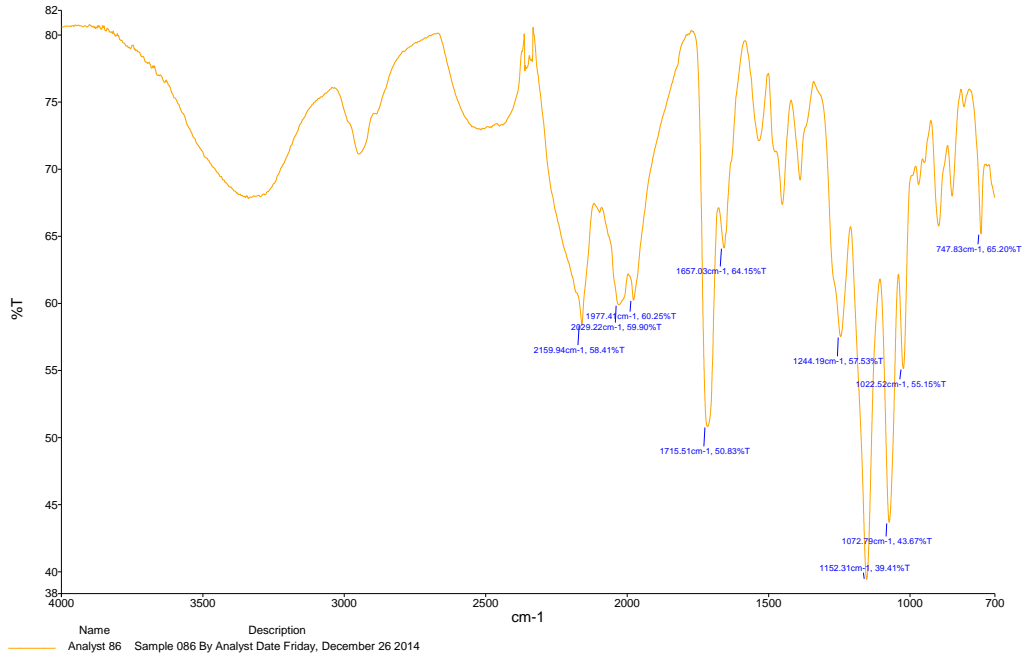


Şekil 4.12. SDS-Page görüntüsü

4.5. HRP Kriyojel Kolonun Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. Poli(HEMA-ko-HRP)' nin FT-IR Spektrumu

Poli(HEMA-ko-HRP) kriyojelinde (Şekil 4.13) 3400 cm^{-1} (-OH) civarı ve 1552 cm^{-1} (-CO-O-C) frekanslarında HEMA' daki fonksiyonel gruplara ait pikler görülmektedir. HRP' nin yapısındaki karbonil (-C=O) grubuna ait gerilme titreşimleri 1715 cm^{-1} ' de görülmektedir. Bunun dışında 1244 cm^{-1} ' de HRP' deki aromatik amin (-C-N) gerilme titreşimine ait karakteristik bant ve ayrıca 1657 cm^{-1} ' de alken (-C=C-) grubuna ait gerilme titreşimi gözlenmiştir.



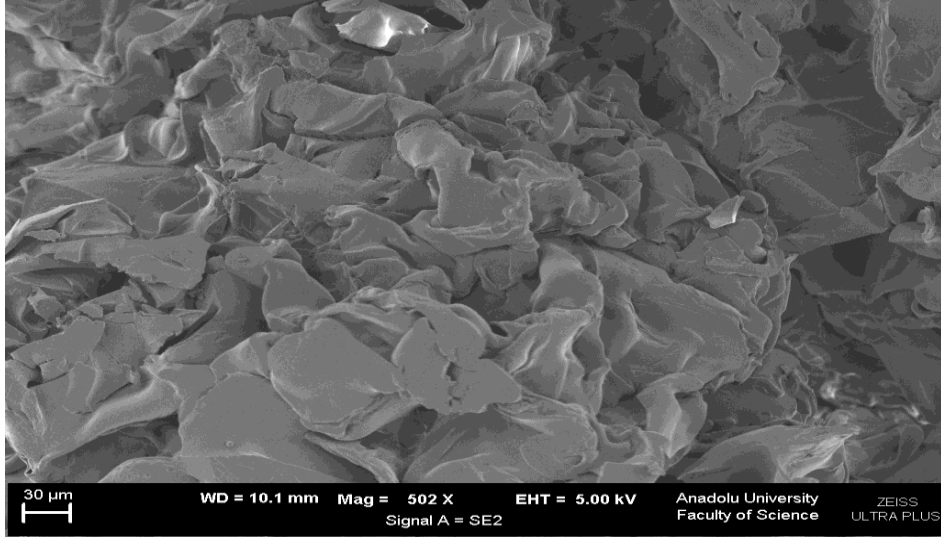
Şekil 4.13. HRP' nin FT-IR spektrumu

4.5.2. HRP Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi

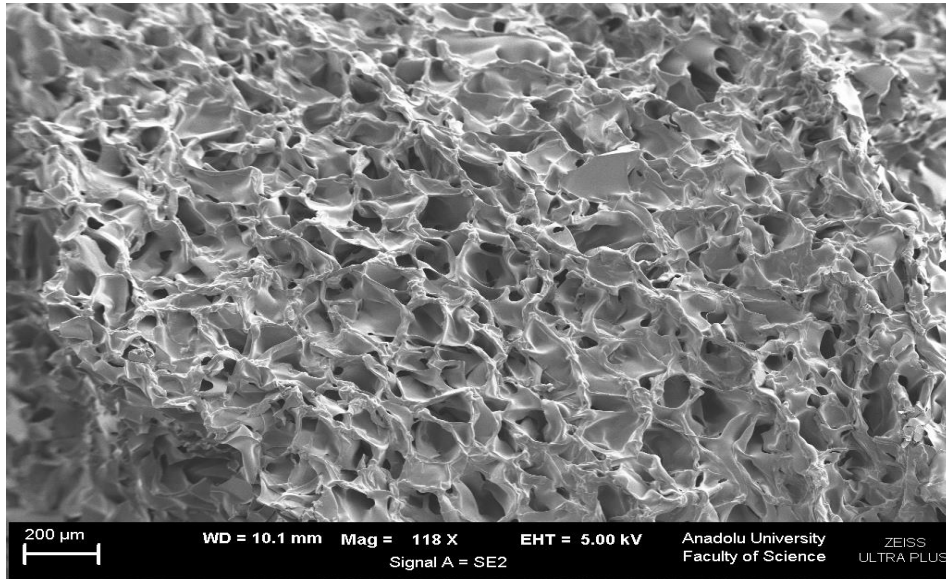
HRP bağlı sensitif kriyojel kolonu, çapraz bağlar içeren hidrofilik bir polimerdir. Hidrofilitesine bağlı olarak yapısına su alır ve şişme özelliği göstermektedir. Polimer zincirleri şişme yaparak polimer sıvı etkileşimi maksimum olmaktadır. Bu çalışmada sentezlenen kriyojel kolonun su tutma kapasitesi % 740 olarak hesaplanmıştır.

4.5.3. HRP Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi

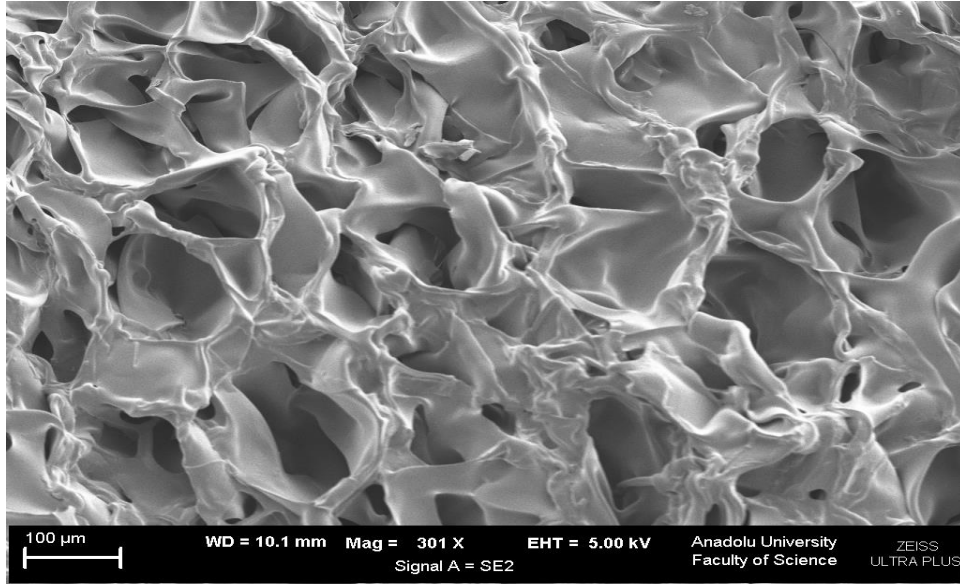
HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolon ve poli(HEMA) boş kriyojel kolonun (Şekil 4.14a) yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.14b ve Şekil 4.13c' de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojelin gözenek boyutu enzim immobilizasyonunu sağlayacak kadar büyüktür ve heterojen bir gözenek dağılımına sahiptir. Gözenek boyutunun büyük olması yüzey alanının büyük olmasını sağlamaktadır.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.14. (a) Poli(HEMA) boş kriyojel kolon (b) HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolon (c) HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolon

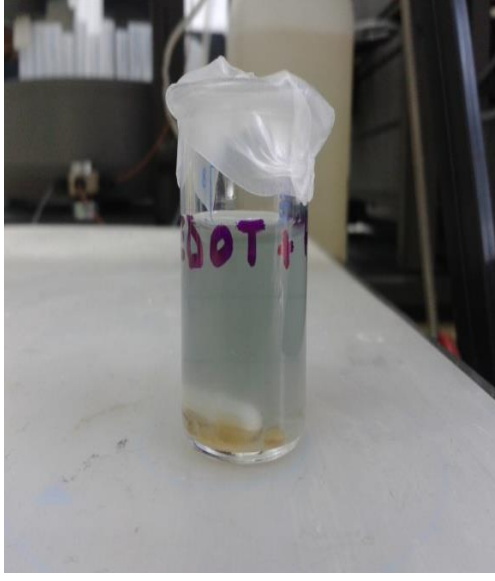
4.5.4. HRP Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü

HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolonunun yüzey alanı ölçümü BET cihazı ile yapılmıştır. 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı ölçümü sonucu kolonun spesifik yüzey alanı $84 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ polimer bulunmuştur.

4.6. PEDOT polimerinin karakterizasyon çalışmaları

4.6.1. Polimer sentezi

Enzimatik polimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlenmek istenen PEDOT, önce kriyojel kolon kullanılmadan doğrudan ticari HRP enzimi, H_2O_2 , ticari EDOT monomeri, PSS ve DMSO çözeltisinde pH 2 glisin tamponu içerisinde manyetik karıştırıcıda $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de 16 saat boyunca karıştırılmıştır. 7. saatin sonunda Şekil 4.15a' da görüldüğü gibi karışımın açık mavi rengi ticari PEDOT/PSS polimerinin rengine yakın hale gelmiştir. 16. saatin sonunda ise karışımın koyu mavi rengi ticari PEDOT/PSS' nin rengiyle örtüşme göstermiştir (Şekil 4.15b).



(a)



(b)

Şekil 4.15. (a) Karışımın 7. Saat sonundaki rengi (b) Karışımın 16. saat sonundaki rengi

Sürekli sistemde sentezlenen HRP katalitik kolon kullanılarak hazırlanan düzenekte; katalitik kolon 10 mL H_2O_2 ile doyurulmuştur. Daha sonra bir beherin içerisine ticari EDOT monomeri, PSS, DMSO ve pH 2 glisin tamponu 20 mL olacak şekilde eklenmiştir. Peristaltik pompanın hortumunun bir ucu HRP bağlı kolona diğer ucu ise beherin içine daldırılarak sürekli bir sistem (Şekil 16) gerçekleştirilmiştir.

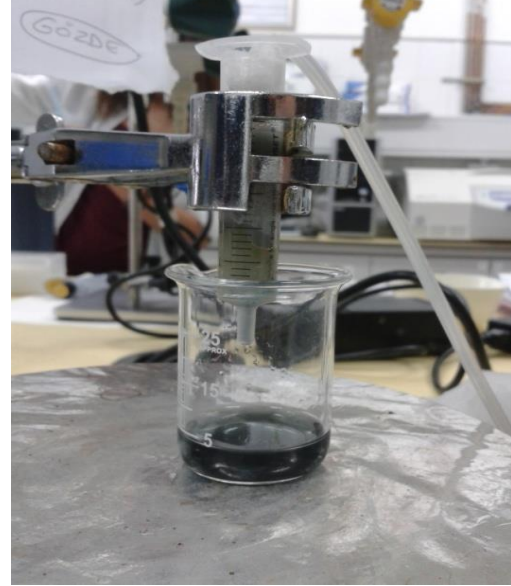


Şekil 4.16. 3. saat sonunda HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolon kullanılan deney düzeneği

Sürekli sistemde karışımın renginin 1. saatin sonunda açık mavi renge dönüştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.17a). Poli(HEMA-ko-HRP) katalitik kolonun yer aldığı sürekli sistemde 3. saatin sonunda ticari PEDOT/PSS' nin rengiyle birebir aynı olduğu gözlenen nihai PEDOT/PSS üretilmiştir (Şekil 4.17b).



(a)



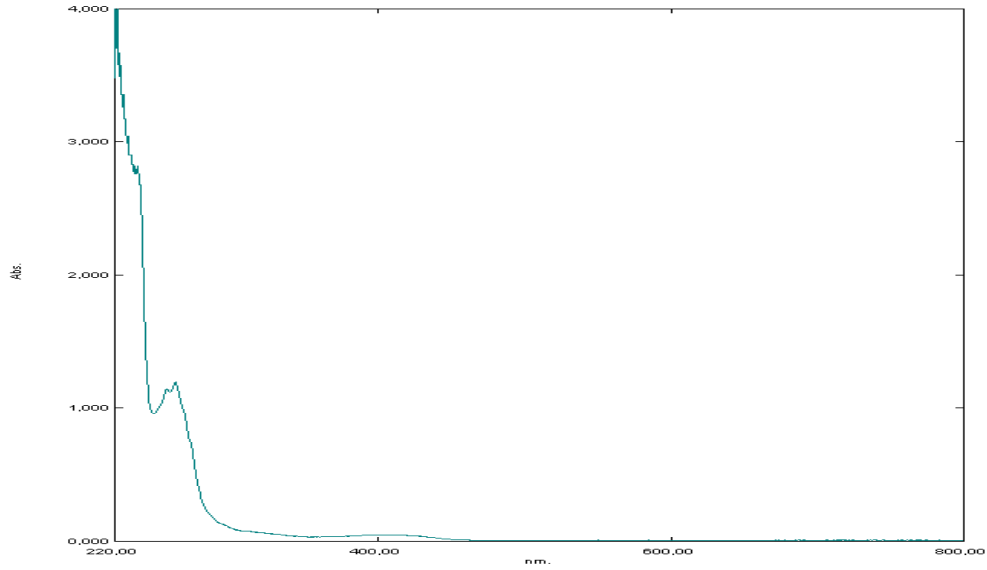
(b)

Şekil 4.17. (a) HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolon kullanılan deneyin 1.saat sonundaki rengi
(b) HRP bağlı fotosensitif kriyojel kolon kullanılan deneyin 3.saat sonundaki rengi

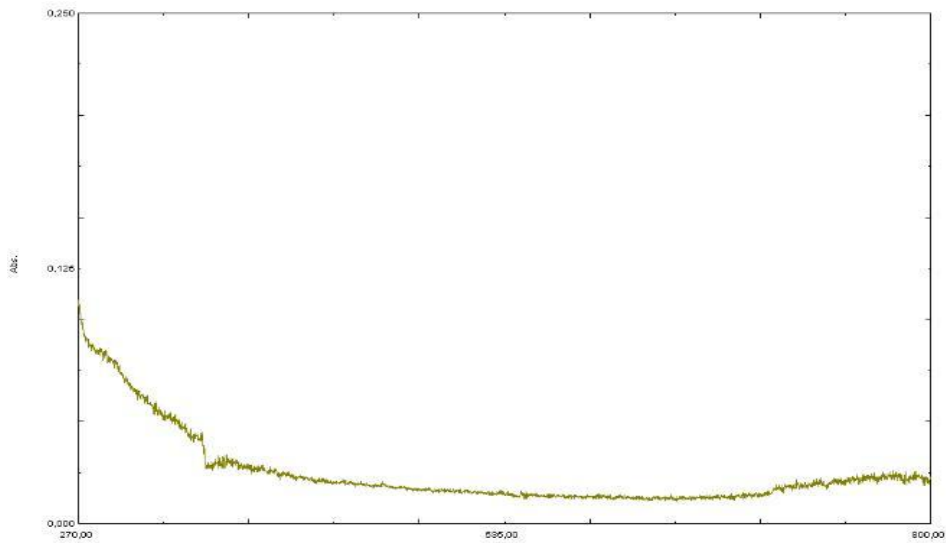
Ayrıca; Poli(HEMA-ko-HRP) kolonun PEDOT/PSS sentezinde tekrar kullanılabilirliği çalışılmıştır. Çalışmanın sonunda kolonun 5 kez çalışabilirliği görülmüştür.

4.6.2. UV spektroskopik ölçümleri

Şekil 4.18’ de çözelti ortamında sentezlenen PEDOT/PSS’ nin UV absorbans piki 400 nm civarı gelirken, Şekil 4.19’ da saflaştırılan HRP enzim tabanlı fotosensitif kriyojel kolondan enzimatik polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen PEDOT/PSS polimeri 800 nm’ de gelmiştir. UV piki ve absorbans değerindeki artış literatür verileri ile örtüşerek polimerizasyonun gerçekleştiği gözlenmiştir [98]. Sürekli sistemde UV spektrumu ile çözelti fazında UV spektrumuna dayalı karşılaştırılma yapıldığında daha verimli bir üretim gerçekleştiği söylenebilir.



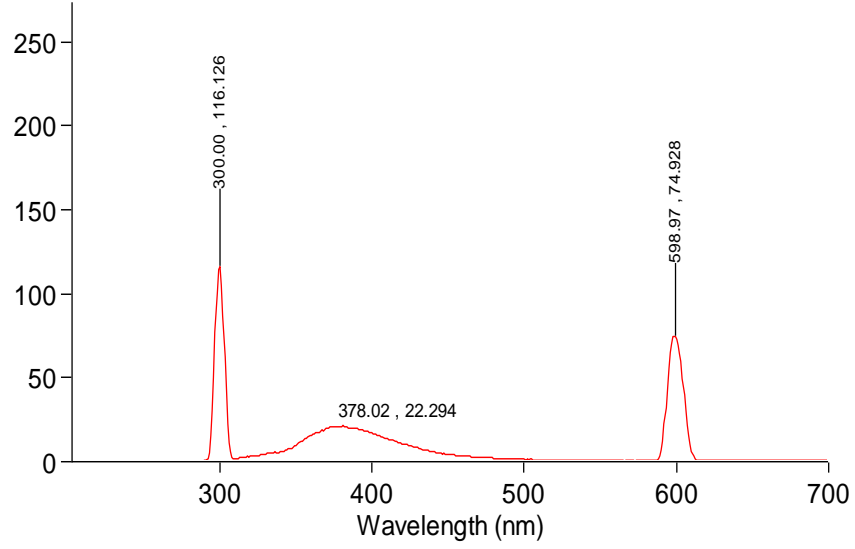
Şekil 4.18. Çözelti ortamında sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin UV grafiği



Şekil 4.19. Sürekli sistemde sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin UV grafiği

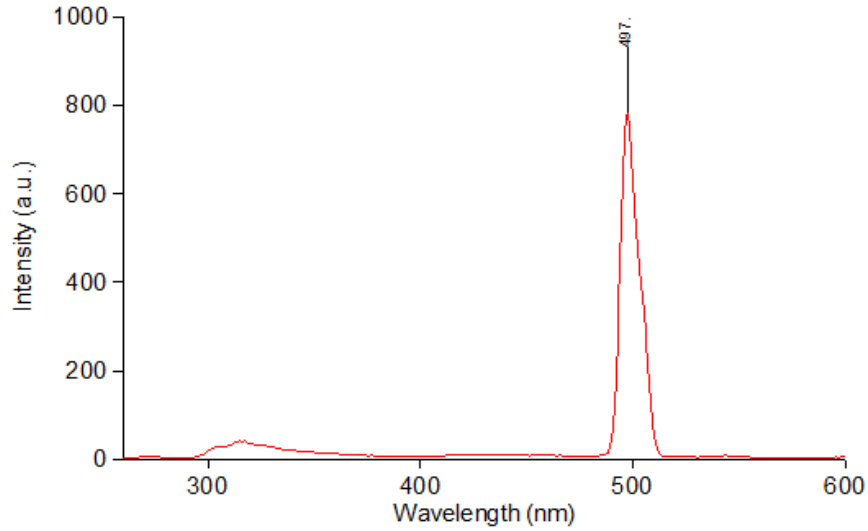
4.6.3. Floresans Spektrum Ölçümleri

3.2.12.2' de anlatıldığı gibi önce ticari EDOT monomerinin 300 nm' de uyarılmayla elde edilen floresans spektrumu Şekil 4.20' de verilmiştir. Burada gözlenen 378,02 nm dalga boyu literatür verileriyle örtüşmektedir [99].



Şekil 4.20. Ticari EDOT monomerinin floresans spektrumu, Ex: 300 nm

Enzimatik polimerizasyonla sentezlenen PEDOT polimerinin 300 nm' de uyarılmayla elde edilen floresans spektrumu ise Şekil 4.21' de verilmiştir.

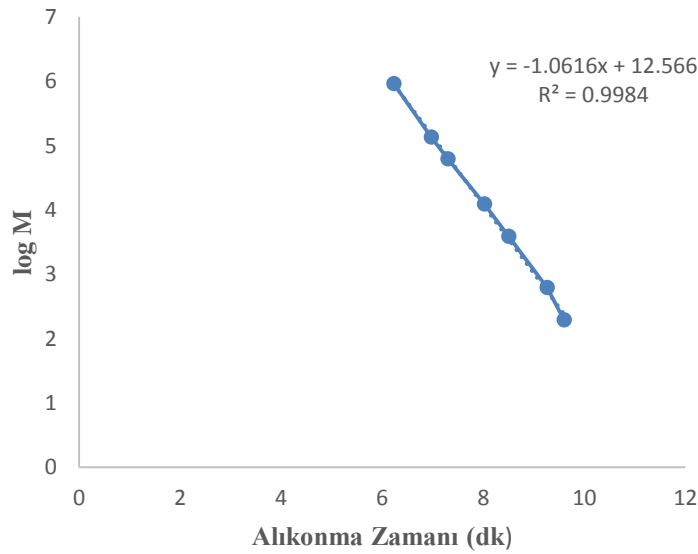


Şekil 4.21. Sentezlenen PEDOT/PSS' un floresans spektrumu, Ex: 300 nm

EDOT' un 300 nm' de uyarılması ile elde edilen floresans piki 378,02' de gözlenirken, polimerleşmeden sonra elde edilen PEDOT/PSS' nin floresans piki 500 nm civarında ve yüksek şiddetle gelmektedir. Bu farklılaşma; EDOT' un PSS ile katkılanmasının HRP çapraz bağlı katalitik HEMA kolonla (HEMA-ko-HRP) başladığını ve çok hızlı bir şekilde PEDOT/PSS' nin sentezlendiğini göstermiştir.

4.6.4. Sürekli Sistemde Elde Edilen PEDOT/PSS' nin Molekül Ağırlığı Tayini

Sürekli sistemde poli(HEMA-ko-HRP) katalitik kolonla sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin moleküler ağırlığı Jel Geçirgenlik Kromatografisi ile tayin edilmiştir. DMSO da çözülmüş olan PEDOT, % 0,02 NaN₃ içeren elüent ile 1 mLdk⁻¹ akış hızı ile GPC cihazında refraktif indeks dedektörü ile tayin edilmiştir. Tayin için PEG/PEO standartları kullanılmış ve bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.22).



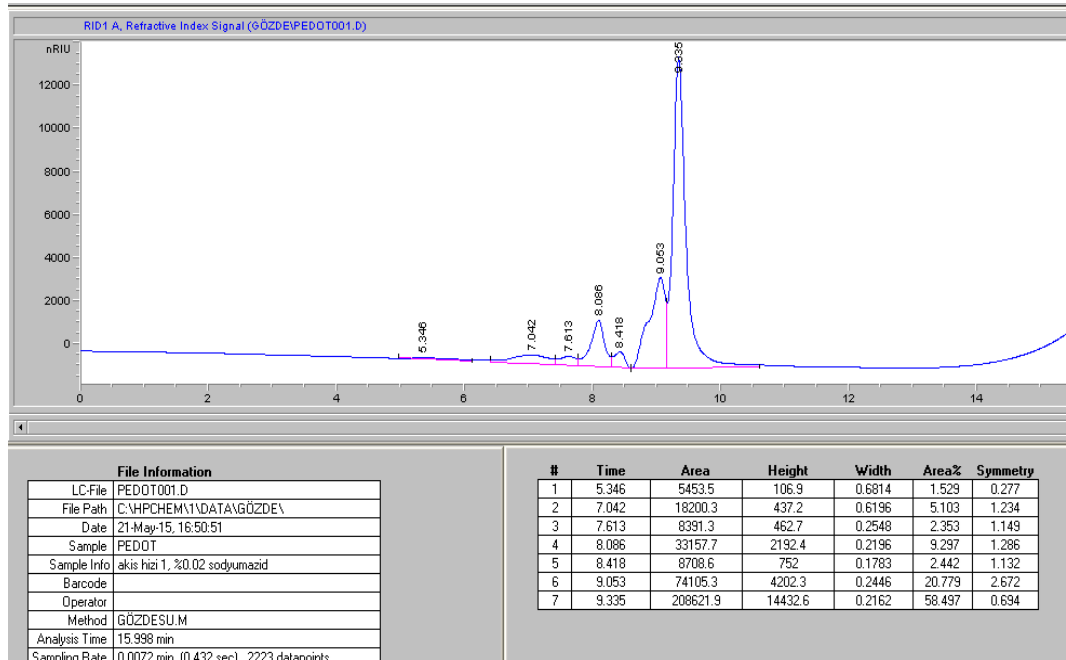
Şekil 4.22. PEG/PEO standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği

Sentezlenen PEDOT/PSS polimeri için GPC kromatogramları (Şekil 4.23) ve elde edilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak elde edilen moleküler ağırlığı 117788,8 gmol⁻¹ olarak bulunmuştur. Kullanılan PSS' nin moleküler ağırlığı 70000 gmol⁻¹ dür. Sürekli sistemde sentezlenen PEDOT' un moleküler ağırlığı ise:

$117788,8 \text{ gmol}^{-1} - 70000 \text{ gmol}^{-1} = 47788,8 \text{ gmol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Bulunan mol kütesinin 10^4 den büyük olması ve molekül ağırlıkları aralığı literatür verileri ile örtüşerek [100] polimerin sentezlendiği doğrulanmıştır. EDOT' un moleküler ağırlığı $142,18 \text{ gmol}^{-1}$ olduğuna göre sentezlenen PEDOT polimerinin molekül ağırlığını EDOT monomerinin molekül ağırlığına böldüğümüzde:

$47788,8 \text{ gmol}^{-1} / 142,18 \text{ gmol}^{-1} = 336$ tane EDOT monomerinin bağlanmış olduğu görülmektedir.



Şekil 4.23. Sentezlenen PEDOT/PSS polimerinin GPC kromatogramı

5. YORUM VE SONUÇ

İyon değişim kromatografisi diğer kromatografik yöntemlere kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Çözeltideki farklı türdeki iyonların kolayca ayrılmasını sağlayabilir ve kullanılan dolgu maddeleri diğer analitik yöntemlerde kullanılan dolgu maddelerinden daha ekonomiktir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda görölmüştür ki; iyon kromatografisinin çalışma alanları yeni kolon dolgu materyallerinin kullanımı ile birlikte çok yüksek molekül ağırlıklı iyonik örneklerin ayrılmasıyla oldukça genişlemiştir [55]. Böylece yeni biyomoleküllerle çalışma imkanı oldukça artmıştır.

Bu çalışmada yaban turbu bitkisinin köklerinden elde edilen HRP enziminin saflaştırılmasına yönelik katyonik değiştirici tabanlı kriyojel kolon geliştirilmiş ve bu kolonun enzimin saflaştırılmasındaki etkinliği incelenmiştir. Kriyojel kolon dolgu maddesi olarak aktif bölgelerinde kuvvetli bir asit olan sülfonik asit (-SO₃H⁺)' e sahip AMPS kullanılmıştır. AMPS' nin, çapraz bağlayıcı MBA varlığında HEMA monomeri ile polimerleştirilmesiyle poli(HEMA-ko-AMPS) kriyojel kolonu hazırlanmıştır. Hazırlanan kolonun SEM görüntüsünde yapıya gömülü AMPS kürecikleri ve FT-IR spektrumunda AMPS' ye ait pikler görölmektedir. İzole edilen HRP enzimine % 80 oranında ((NH₄)₂SO₄) çöktürmesi yapılarak en çok aktivite gözleendiğinden bu örnekler FPLC cihazı kullanılarak kriyojel kolondan geçirilmiş ve saflaştırmaya ait kromatogramlar elde edilmiştir. Bu doğrultuda saflaştırıldığı düşünölen HRP enzimi SDS-Page analizi yapılarak jelde yürütölmüş, elde edilen bant yaklaşık 42 kDa olarak görölmüştür. Bu durumda ticari HRP enzimi ile aynı moleküler ağırlıkta olduğu saptanmıştır.

Daha sonra saflaştırılan HRP enziminin ELISA' da kinetik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzime ait optimum pH 5 ve optimum sıcaklık değerleri 37 °C olarak ölçölmüştür. Enzim için Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan V_{mak} değeri 0.024, K_m değeri ise 92,27 dir. K_m değerinin düşük olması enzimin substrata daha çok ilgi gösterdiği anlamına gelmektedir.

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar arasında sadece kendi doğal substratları değil, bu yapılara oldukça benzeyen bileşikler de vardır [72-79].

Enzimlerin kullanımıyla gerçekleşen polimerizasyon reaksiyonlarının pek çok avantajı vardır. Doğada kolaylıkla bulunabildikleri için yenilebilir kaynakları substrat olarak kullanabilirler. Böylece sentezlenen polimerin üretimini doğadaki geri dönüşüm zincirini bozmadan gerçekleştirirler. Enzim katalizli reaksiyonlarda toksik madde kullanılmadığından, herhangi bir çevre kirliliğine sebep olmadan polimerler elde edilebilir. Enzimlerin diğer katalizörlere göre daha yüksek seçiciliğe sahip olmaları, yüksek aktivite göstermeleri ve tepkime sırasında istenmeyen reaksiyon vermemeleri üstün özellikleri olarak söylenebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar halkalı yapıya sahip maddelerin enzimlerle polimerleşebildiklerini ispatlamıştır [95].

Bu çalışmanın ikinci aşamasında; saflaştırılan HRP enzimi kullanılarak iletken bir polimer olan PEDOT' un sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla katalizör olarak HRP, monomer olarak EDOT, yükseltgen olarak H₂O₂, katkılamayı arttırmak için PSS, çözünürlüğü arttırmak için DMSO ve çözelti tamponu olarak pH 2 glisin tamponu kullanılmıştır. Asidik ortamın polimerleşmeyi arttırdığı, aynı zamanda enzim aktivitesini düşürdüğü de bilinmektedir [78]. Öncelikle çözelti ortamında PEDOT/PSS sentezlenmiş; daha sonra HRP kriyojel kolon kullanılarak sürekli sistemde PEDOT/PSS sentezleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözelti ortamındaki polimerleşmenin 16 saat sonunda, sürekli sistemdeki polimerleşmenin ise 3 saat sonunda PEDOT/PSS sentezini gerçekleştirdiği ve HRP enzim aktivitesini kaybetmeyerek katalizör görevi gördüğü görülmüştür. PEDOT saf durumdan oksidasyon seviyesine yükselttiğinde, elektrokimyasal yapısında olduğu kadar fiziksel görüntüsünde de rengi açısından değişikliğe uğrayarak koyu mavi renge dönüşmüştür. Bunun sebebi de iletken polimerik yapının, yapılan yükseltgen işleminden sonra daha yüksek dalga boylarında sönmeye yapacak olmasıdır.

Bir polimer sentezlenirken oluşan polimer zincirinin uzunluğu, polimer reaksiyonunun her basamağında farklılık gösterdiğinden elde edilen molekül kütleleri ortalama değerlerdir. Bu ortalama değerlerin belli bir büyüklükten fazlası dikkate alınarak oluşan polimerin molekül kütlesi belirlenir. PEDOT/PSS zincirinin 10⁴ den büyük olması sentezlenen yapının polimer büyüklüğünde olduğunu ispatlamıştır. Daha önceki çalışmalarda PEDOT polimeri FeCl₃ ve

Fe(III)tosilat gibi, PSS dışında PEDOT için yükseltgen özellikleri uygun olan katkılayıcılarla polimerleştirilmiş ve molekül ağırlıkları GPC ile saptanmıştır [100]. Bu çalışmalar sonucu saptanan molekül ağırlıkları, PEDOT/PSS ile örtüşmektedir fakat PSS kullanımını FeCl₃ ve Fe(III)tosilat kullanımından daha avantajlıdır. FeCl₃ ve Fe(III)tosilat gibi katkılayıcılar da oksidatif polimerizasyon için gereklidir fakat PSS kullanıldığında oksidatif polimerizasyonda katkılama ile oluşan hatalar gerçekleşmemektedir. Aynı molekülde negatif yüklü iyonları içerdiği için suda çözünürlüğü ve iletkenliği diğer katkılayıcılara göre daha fazladır.

Enzimatik polimerizasyon yöntemi ile saflaştırılan HRP enzimi kullanılarak ANADOLUCA yöntemiyle hazırlanan kriyojel kolonla sentezlenen PEDOT/PSS; çözelti ortamında sentezlenen PEDOT/PSS' ye göre daha kısa sürede sentezlenmiş ve daha yüksek verime sahip olduğu görülmüştür.

Tekrarlanabilirliği daha fazladır, böylece büyük derişimlerde enzim sarfiyatına sebep olmadan PEDOT/PSS polimeri sentezlenebilir.

KAYNAKÇA

- [1] Guan, X., Xu, X., Lu, M., & Li, H. (2012). Pretreatment of oil shale retort wastewater by acidification and ferric-carbon micro-electrolysis. *Energy Procedia*, 17, 1655-1661.
- [2] Mertens, J. (2003). Anselme Payen (1795–1871), Learned Manufacturer of Chemical Products. *Ambix*, 50(2), 182-207.
- [3] Wisniak, J. (2005). Anselme Payen. *Educación química*, 16, 4.
- [4] Zhang, X., Zhang, Y., & Malhotra, A. (2014). Radiolabeling in Biology. *Cell biochemistry and biophysics*, 1-10.
- [5] Sen, C. K., & Roy, S. (2007). miRNA: licensed to kill the messenger. *DNA and cell biology*, 26(4), 193-194.
- [6] Wiseman, A., (1987) Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. *The Application of Enzymes in Industry*, 3, 274-373.
- [7] Kamerlin, S. C., & Warshel, A. (2010). At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(6), 1339-1375.
- [8] Larry, M., & Kandel, J. (1996). Microbiology: essentials and applications.
- [9] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*, Macmillan.
- [10] F.K. John (1987) *Enzyme technology*, Biotechnology, 7, 37-62.
- [11] G. Bingöl (1977) *Vitaminler ve enzimler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi.
- [12] Yarkın, Z. (2007). İki farklı fermentasyon tekniği ile *Aspergillus sclerotiorum*'dan amilaz üretimi ve nişasta hidrolizinde kullanılması.
- [13] Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2008). Hormones and the endocrine system. *Campbell biology. Global edition, 9th edn. Pearson Education, San Francisco, CA*, 1020-1041.
- [14] Cornish-Bowden, A. & Endrenyi, L. (1986). Robust regression of enzyme kinetic data. *Biochemical Journal*, 234, 21-9.
- [15] Cornish-Bowden, A., Porter, W.R. & Trager, W.F. (1978). Evaluation of

distribution-free confidence limits for enzyme kinetic parameters. *Journal of Theoretical Biology*, 74, 63-75.

- [16] Duarte-Vazquez MA, García-Almendárez BE, Rojo-Domínguez A, & Whitaker JR, Regalado C (2003). Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *J Agric Food Chem*, 50, 96–102.
- [17] Hamid M, Khalil-ur-Rehman (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chem*, 115, 1177–86.
- [18] Dunford HB, Stillman JS (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chem Rev*, 19, 187-251.
- [19] Gray JS, Montgomery R (1997). The N-glycosylation sites of soybean seed coat peroxidase. *Glycobiology*, 7, 679-85.
- [20] Burnette, F. S (1977). Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *J. Food Sci.*, 42, 1-6.
- [21] Lim, M. H., Velasco, P. J., Pangborn, R. M. & Whitaker, J. R (1989). Enzymes involved in off-aroma formation in broccoli. *Quality Factors of Fruits and Vegetables Chemistry and Technology*, 72-83.
- [22] Wanger, M. & Nicell, J.A. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research*, 36, 4041-4052.
- [23] Van de Velde, F. et al. (2001). Improving the catalytic performance of peroxidase in organic synthesis. *Trends Biotechnol*, 19, 73–80.
- [24] Dotsikas, Y. & Loukas, Y.L. (2004). Employment of 4-(1-imidazolyl)phenol as a luminol signal enhancer in a competitivetype chemiluminescence immunoassay and its comparison with the conventional antigen–horseradish peroxidase conjugate-based assay. *Anal. Chim. Acta*, 509, 103–109.
- [25] Azevedo, A.M. et al. (2003). Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* 9, 199–247.
- [26] Jung, Y. et al. (2001). High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 55, 187–191.
- [27] Veitch, N.C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic

- enzyme. *Phytochemistry* 65, 249–259.
- [28] Duroux, L. & Welinder, K.G. (2003). The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* 57, 397–407.
- [29] Morawski, B. et al. (2000). Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 13, 377–384.
- [30] Tupper, J. et al. (2004). Use of horseradish peroxidase for gene-directed enzyme prodrug therapy with paracetamol. *Br. J. Cancer* 90, 1858–1862.
- [31] Bayramoglu, G., Gursel, I., Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2012). Immobilization of laccase on itaconic acid grafted and Cu (II) ion chelated chitosan membrane for bioremediation of hazardous materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(4), 530-539.
- [32] Cho, I. H., Paek, E. H., Kim, Y. K., Kim, J. H., & Paek, S. H. (2009). Chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a chip biosensor based on cross-flow chromatography. *Analytica chimica acta*, 632(2), 247-255.
- [33] Swanson, C., & D'Andrea, A. (2013). Lateral flow assay with near-infrared dye for multiplex detection. *Clinical chemistry*, 59(4), 641-648.
- [34] Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388-393.
- [35] Finzel, B. C., Poulos, T. L., & Kraut, J. (1984). Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 259(21), 13027-13036.
- [36] Poulos, T. L., Freer, S. T., Alden, R. A., Edwards, S. L., Skogland, U., Takio, K., ... & Kraut, J. (1980). The crystal structure of cytochrome c peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 575-580.
- [37] Patterson, W. R., & Poulos, T. L. (1995). Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry*, 34(13), 4331-4341.
- [38] Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Rueker, F., Switala, J., Loewen, P. C., & Obinger, C. (2001). The role of distal tryptophan in the bifunctional activity of catalase-peroxidases. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 99-105.

- [39] Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H., & Gold, M. H. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4429-4440.
- [40] Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., & Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32759-32767.
- [41] Schuller, D. J., Ban, N., van Huystee, R. B., McPHERSON, A., & Poulos, T. L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4(3), 311-321.
- [42] Puppo, A., Rigaud, J., Job, D., Ricard, J., & Zeba, B. (1980). Peroxidase content of soybean root nodules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Enzymology*, 614(2), 303-312.
- [43] Mäder, M., & Füssl, R. (1982). Role of peroxidase in lignification of tobacco cells II. Regulation by phenolic compounds. *Plant physiology*, 70(4), 1132-1134.
- [44] Welinder, K. G. (1992). Plant peroxidases: structure-function relationships. *Plant peroxidases. University of Geneva, Geneva, Switzerland*, 1-24.
- [45] Haschke, R. H., & Friedhoff, J. M. (1978). Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 80(4), 1039-1042.
- [46] Welinder, K. G. (1976). Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11. 1.7). *FEBS letters*, 72(1), 19-23.
- [47] Tams, J. W., Welinder, K. G. (1995). Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal. Biochem.*, 228, 48-55.
- [48] Dunger, G., Arabolaza, A. L., Gottig, N., Orellano, E. G., & Ottado, J. (2005). Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathology*, 54(6), 781-788.

- [49] Filizola, M., Loew, G. H. (2000). Role of protein environment in horseradish peroxidase compound I formation: molecular dynamics simulations of horseradish peroxidase-HOOH complex. *J. Am. Chem. Soc.*, *122*, 18-25.
- [50] Yamazaki, I., Tamura, M., Nakajima, R. (1981). Horseradish peroxidase. *C. Mol. Cell. Biochem.*, *40*, 143-153.
- [51] Kennedy, J. F., & Rehm, H. J. (Eds.). (1987). *Enzyme technology* (Vol. 7). John Wiley & Sons.
- [52] Yıldırım A., Bardakçı F., Karatas M. & Tanyolac B. (2010). *Moleküler Biyoloji*, *15*, 563-573.
- Healthcare, G. E. (2007). *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods*. Edition AA, Amersham Biosciences, 7.
- [54] Qi, X., Watanabe, M., Aida, T. M., & Smith Jr, R. L. (2008). Selective conversion of D-fructose to 5-hydroxymethylfurfural by ion-exchange resin in acetone/dimethyl sulfoxide solvent mixtures. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *47*(23), 9234-9239.
- [55] Boni, A. L. (1966). Rapid ion exchange analysis of radiocesium in milk, urine, sea water, and environmental samples. *Analytical chemistry*, *38*(1), 89-92.
- [56] Kunz, C., & Lönnerdal, B. (1990). Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *The American journal of clinical nutrition*, *51*(1), 37-46.
- [57] Hernanz, A. (1988). High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in serum using paired-ion chromatography and UV spectrophotometric detection. *J Clin Chem Clin Biochem*, *26*(7), 459-61.
- [58] Kirsebom, H., Topgaard, D., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2010). Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes. *Langmuir*, *26*(20), 16129-16133.

- [59] Andaç, M., & Denizli, A. (2014). Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies. *RSC Advances*, 4(59), 31130-31141.
- [60] Galaev, I. Y., Dainiak, M. B., Plieva, F., & Mattiasson, B. (2007). Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel. *Langmuir*, 23(1), 35-40.
- [61] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. (2002). The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10, 163-188.
- [62] Ersoz, A., Hur, D., Yilmaz, F., Denizli, A., Ozcan, A. A., Diltemiz, S. E., ... & Findik, T. (2009). *U.S. Patent Application*, 13/203, 833.
- [63] Fu, H. Y., Zhang, J., Ding, G. F., & Fan, S. G. (2003). A protein in pig spleen similar to immune suppressive protein of stress. *Acta pharmacologica Sinica*, 24(6), 593-598.
- [64] Saçak, M. (2002). *Polimer kimyası*. Gazi Kitabevi.
- [65] Heinze, J. (1991). Electrochemistry of conducting polymers. *Synthetic Metals*, 43(1), 2805-2823.
- [66] Hyodo, K. (1994). Electrochromism of conducting polymers. *Electrochimica acta*, 39(2), 265-272.
- [67] Coşkun, K. (2009). *Kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle İletken polimerlerin sentezi ve Membran Uygulamaları* (Doctoral dissertation, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [68] Bredas, J. L., Chance, R. R., Silbey, R., Nicolas, G. & Durand, P., (1983). Electronic Properties Of Sulfur Containing Conjugated Polymers. *J. Chem. Phys.*, 78 (9): 5656-5656.
- [69] Toppare, L. (2003). *Bilim ve Teknik Dergisi Yayınları*.
- [70] Winslow, F. H., Baker, W. O., & Yager, W. A. (1955). Odd electrons in polymer molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 77(18), 4751-4756.

- [71] Kobayashi, S., Kurioka, H. & Uyama, H. (1996). Enzymatic synthesis of soluble polyphenol derivative from 4,40-bisphenyldiol. *Macromol Rapid Commun*, 17,503-508.
- [72] Kobayashi, S. (1999). Enzymatic polymerization: a new method of polymer synthesis. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 37, 3041–3056.
- [73] Kazandjian, R. Z., Dordick, J. S., & Klibanov, A. M. (1986). Enzymatic analyses in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering*, 28(3), 417-421.
- [74] Hynninen, P. H., Kaartinen, V., & Kolehmainen, E. (2010). Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophyll a with hydrogen peroxide: characterization of the products and mechanism of the reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(5), 531-542.
- [75] Zhang, L., Zhao, W., Ma, Z., Nie, G., & Cui, Y. (2012). Enzymatic polymerization of phenol catalyzed by horseradish peroxidase in aqueous micelle system. *European Polymer Journal*, 48(3), 580-585.
- [76] Zhang, L., Zhao, W., Chen, H., & Cui, Y. (2013). Enzymatic synthesis of phenol polymer and its functionalization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 30-36.
- [77] Tewari, A., Kokil, A., Ravichandran, S., Nagarajan, S., Bouldin, R., Samuelson, L. A., ... & Kumar, J. (2010). Soybean peroxidase catalyzed enzymatic synthesis of pyrrole/EDOT copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211(14), 1610-1617.
- [78] Rumbau, V., Pomposo, J. A., Eleta, A., Rodriguez, J., Grande, H., Mecerreyes, D., & Ochoteco, E. (2007). First enzymatic synthesis of water-soluble conducting poly (3, 4-ethylenedioxythiophene). *Biomacromolecules*, 8(2), 315-317.
- [79] Wang, J., & Gu, Y. (2014). Extraction and characterizations of enzymatically synthesized conductive poly (3, 4-ethylenedioxythiophene). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), 1170-1175.

- [80] Roncali, J. (1992). Conjugated poly (thiophenes): synthesis, functionalization, and applications. *Chemical Reviews*, 92(4), 711-738.
- [81] Xia, Y., & Ouyang, J. (2012). Significant different conductivities of the two grades of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): poly (styrenesulfonate), Clevios P and Clevios Ph1000, arising from different molecular weights. *ACS applied materials & interfaces*, 4(8), 4131-4140.
- [82] Park, H. S., Ko, S. J., Park, J. S., Kim, J. Y., & Song, H. K. (2013). Redox-active charge carriers of conducting polymers as a tuner of conductivity and its potential window. *Scientific reports*, 3.
- [83] Patra, A., Wijsboom, Y. H., Zade, S. S., Li, M., Sheynin, Y., Leitus, G., & Bendikov, M. (2008). Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene). *Journal of the American Chemical Society*, 130(21), 6734-6736.
- [84] Pei, Q., Zuccarello, G., Ahlskog, M., & Inganäs, O. (1994). Electrochromic and highly stable poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) switches between opaque blue-black and transparent sky blue. *Polymer*, 35(7), 1347-1351.
- [85] Yamato, H., Ohwa, M., & Wernet, W. (1995). Stability of polypyrrole and poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) for biosensor application. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 397(1), 163-170.
- [86] Jonas, F., & Morrison, J. T. (1997). 3, 4-polyethylenedioxythiophene (PEDOT): Conductive coatings technical applications and properties. *Synthetic Metals*, 85(1), 1397-1398.
- [87] Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35(20), 2923-2950.
- [88] Boni, K. A., Sliemers, F. A., & Stickney, P. B. (1968). Development of gel permeation chromatography for polymer characterization. I. Operational variables. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics*, 6(9), 1567-1578.

- [89] Bleha, T., Bakoš, D., & Berek, D. (1977). Estimation of thermodynamic quality of the solvent from the concentration effect in gel permeation chromatography of polymers. *Polymer*, 18(9), 897-904.
- [90] Yavuz, M., & Baysal, Z. (2013). Preparation and Use of Poly (hydroxyethyl methacrylate) Cryogels Containing L-Histidine for β -Casein Adsorption. *Journal of food science*, 78(2), E238-E243.
- [91] Higuchi, A., Siao, Y. D., Yang, S. T., Hsieh, P. V., Fukushima, H., Chang, Y., ... & Chen, W. Y. (2008). Preparation of a DNA Aptamer– Pt Complex and Its Use in the Colorimetric Sensing of Thrombin and Anti-Thrombin Antibodies. *Analytical chemistry*, 80(17), 6580-6586.
- [92] Ambatkar, M., & Mukundan, U. (2014). Calcium Salts Enhance Activity and Azo Dye Decolourisation Capacity of Crude Peroxidase from *Armoracia rusticana*. *American Journal of Plant Sciences*, 2014.
- [93] Meen, T. H., Chen, K. L., Chen, Y. H., Chen, W. R., Chou, D. W., Lan, W. H., & Huang, C. J. (2013). The Effects of Dilute Sulfuric Acid on Sheet Resistance and Transmittance in Poly (3, 4-thylenedioxythiophene): Poly (styrenesulfonate) Films. *International Journal of Photoenergy*, 2013.
- [94] Mar'ia, V. M., & Cascone, O. (1995). Horseradish peroxidase extraction and purification by aqueous two-phase partition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(2), 147-154.
- [95] Guo, W., & Ruckenstein, E. (2003). Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *Journal of membrane science*, 211(1), 101-111.
- [96] Miranda, M. V., Fernández-lahore, H. M., Cascone, O., & Dobrecky, J. (1998). The extractive purification of peroxidase from plant raw materials in aqueous two-phase systems. *Acta Biotechnologica*, 18(3), 179-188.
- [97] Fraguas, L. F., Batista-Viera, F., & Carlsson, J. (2004). Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. *Journal of Chromatography B*, 803(2), 237-241.

- [98] Lu, B., Lu, Y., Wen, Y., Duan, X., Xu, J., Chen, S., & Zhang, L. (2013). Synthesis, Characterization, and Vitamin C Detection of a Novel L-Alanine-Modified PEDOT with Enhanced Chirality. *Int. J. Electrochem. Sci*, 8, 2826-2841.
- [99] Sikora, T., Marcilla, R., Mecerreyes, D., Rodriguez, J., Pomposo, J. A., & Ochoteco, E. (2009). Enzymatic synthesis of water-soluble conducting poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): A simple enzyme immobilization strategy for recycling and reusing. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(1), 306-309.
- [100] Kirchmeyer, S., Elschner, A., Reuter, K., Lovenich, W., & Merker, U. (2011). PEDOT: principles and applications of an intrinsically conductive polymer. *CRC, Boca Raton*.