T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

Yüksek Katalitik Aktivite ve Kararlılığa Sahip Çiçek Şekilli Yeni Nesil Nanobiyokatalizörlerin Sentezlenmesi

Proje No: FBA-2015-5604

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
İsmail Öçsoy
Eczacılık Fakültesi/ Temel Eczacılık Bilimleri

Araştırmacı: M. Serdar Önses
Mühendislik Fakültesi/Malzeme Bilimi ve Mühendisliği
Araştırmacı: Arş.Gör. Hasan Hüseyin İPEKCİ
Mühendislik Fakültesi/Malzeme Bilimi ve Mühendisliği
Araştırmacı: Arş.Gör. Burcu SOMTÜR
Fen Fakültesi/Kimya Bölümü
Araştırmacı: Y. L Öğrencisi Müşerref ARSLAN ÖÇSOY
Fen Bilimleri Enstitüsü/Fen Fakültesi/Fizik Bölümü

Ağustos 2015

KAYSERİ

TESEKKÜR

FBA-2015-5604 numaralı projemiz Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Projemize finansal desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkürü bir borç bilirim. Projenin çalışma süresince araştırmacı olarak önemli katkıları olan, Yrd. Doç. Dr. M. Serdar Önses, Arş. Gör. Burcu Somtürk, Arş. Gör. Hasan Hüseyin İpekci ve Yüksek Lisans Öğrencisi Müşerref Arslan Öçsoy'a teşekkür ederiz. Ayrıca projede resmi araştırmacı olarak yer almayıp, proje kapsamındaki deneylere dâhil olan, Doç. Dr. Mehmet Hançer, Yrd. Doç. Dr. Nalan Özdemir, Dr. Cevahir Altınkaynak, yüksek lisans öğrencileri Esra Doğru ve Şeyda Usta'ya da gösterdikleri etkin katkı ve performanslarından dolayı teşekkür ederiz. Projemiz Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM) laboratuarlarında gerçekleştirilmiştir. Projemizin başarılı bir şekilde yürümesi ve tamamlaması için ERNAM'da çalışma imkânı sağlayan ERNAM müdürümüz Sayın Doç. Dr. Mehmet Hançer'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Nano Boyutlu Yapraklardan Oluşan Çiçek Şekilli Enzim-İnorganik Hibrit Yapıların Sentezi	14
3.2. Sentezlenecek ÇHNYlerin Karakterizasyonu	15
3.3. Enzim-İnorganik Çiçek-Şekilli Hibrit Nano Yapıların Aktivitesinin ve Kararlılığının Test Edilmesi	15
3.4. Aktivite Tayininde Kullanılacak Çözücüler	16
4. BULGULAR	17
4.1.HRP-Fe^{2+} Çiçek Şekilli Nano Yapıların Bulguları	17
4.2. HRP-Cu^{2+} Çiçek Şekilli Nano Yapıların Bulguları	20
4.3.Üreaz-Cu^{2+} Çiçek Şekilli Nano Yapıların Bulguları	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	28
6. KAYNAKLAR	29
7. EKLER	

ÖZET

Enzimler, reaksiyonları yüksek özgüllük ve çok yüksek hız ile katalize eden biyokatalizörlerdir. Yüksek katalitik verimlilik, yüksek seçicilik, düşük toksisite ve suda çözünme gibi özellikleri sayesinde enzimler, kimya, biyokimya, biyomedikal, ilaç, gıda ve tekstil gibi endüstriyel alanlarda geniş uygulama alanları bulmaktadırlar. Bununla birlikte, enzimlerin serbest formları, kısa bir yaşam süresine sahiptir ve bu durum enzimlerin pek çok alanda uygulamalarını sınırlar. Bu amaçla enzim immobilizasyonu çok yaygın olarak çalışılmaktadır. İmmobilizasyon, enzimlerin katı bir destek üzerine tutturulması ya da içerisine hapsedilmesi şeklinde gerçekleştirilebilir. Ancak immobilizasyon çalışmalarında, sadece birkaç enzim hariç, immobilize edilen enzimlerin kararlılığının ve çevresel şartlara karşı direncinin artmasına rağmen aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Son zamanlarda, farklı bir enzim immobilizasyon yaklaşımı kullanılarak enzimlerin aktivite ve kararlılığının yükseltilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla bazı enzim ve metal iyonlarının etkileşimleri ile çiçek şekilli enzim-inorganik hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir. Fakat yapılan literatür araştırmasında, pH, sıcaklık ve konsantrasyon gibi deneysel şartların sentezlenen çiçek şekilli hibrit yapıların morfolojisine ve bu yapıların enzimatik aktivite ve kararlılığına etkilerini gösteren sistematik bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu amaçlar doğrultusunda; önerilen projede model enzim olarak yabanturpu (Horseradish peroxidase, HRP) peroksidaz enzimi ve metal iyonu olarak Fe^{2+} iyonları kullanılarak çiçek şekilli hibrit yapıların sentezlenmiş ve yüksek aktivite ve kararlılık gösterdikleri ispatlanmıştır. Benzer prosedür üreaz enzimenine uygulanmış ve yine çok yüksek katalitik aktivite ve karalılık üre substratına karşı elde edilmiştir.

ABSTRACT

Enzymes which catalyze reactions with high specificity and very high rapidity are biocatalysts. Enzymes have wide application areas in the fields of chemistry, biochemistry, biomedical, drug; in industrial fields as food and textile due to their properties of as high catalytic yield, high selectivity, low toxicity and water-solubilty. However, free forms of enzymes have a short life time and this situation limites applications of enzymes in many areas. For this purpose, enzyme immobilization is one of the methods used. Immobilization is carried out by attaching enzymes on surface of solid supports or trapping enzymes into them. However, although stability and resistance of enzymes againts envorinmental conditions are increased, decrease on the ezyme activity has been seen except a few enzymes in the immobilization studies. Recently, incerasing activity and stability of enzymes is aimed by using a different enzyme immobilization approach. For this purpose, production of flower-like hybrid structures (FHS) with reaction of enzyme and some metal ions has been reported in the literature. But based on the literature searches, a systamtic study inclduing effect of experimental conditions as pH and temperature on both formation of FHS and enzymatic activity and stability of FHS has not been met. In the line with these objectives in the proposed project, the synthesis of FHSs by using horseradish peroxidase (HRP) as a model enzyme and Fe^{2+} ion as a metal ion and their high activity and stability has been proved. The same procedure was applied to urease enzyme and very high catalytic activity and stability were obtained towards urea substrate.

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Enzimler substratları yüksek seçicilik ve çok yüksek hız ile katalize eden biyokatalizörlerdir. Enzimler temelde "*in vivo*" ve" *in vitro*" sistemlerinde biyolojik molekülleri katalize etse de, günümüzde kimya, biyokimya, eczacılık, tıp gibi doğa bilimlerinin yanısıra tekstil ve gıda gibi birçok endüstriyel alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin çok geniş bir kullanım yelpazesine sahip olmasının nedeni enzimlerin kendilerine özgü eşsiz özellikleridir. Örneğin, enzimler çevre dostudur, düşük toksisiteye sahiptir, suda çözünürlüğü yüksektir ve substratlara karşı yüksek katalitik aktivite ve özgüllük gösterirler. Bununla birlikte, serbest enzimler birçok dezavantajlar ve sınırlamalar gösterir. Öncelikle enzimler çok pahalı biyomoleküllerdir, suda çözündüklerinde çok kısa bir yaşam süresine sahiptir, az miktarda organik çözücülerin varlığında dahi hemen yapıları bozulur, yüksek sıcaklığa, düşük ve yüksek pH ortamlarına karşı kararsızdırlar ve çözeltiden geri kazınım ve tekrar kullanım olasılığı yoktur. Serbest enzimlerin gösterdiği bu dezavantajlar, araştırmacıları enzimleri farklı şekilde kullanmaya ve bu dezavantajları minimize etmeye yönlendirmiştir.

Bu amaçla, enzimleri daha verimli kullanma adına pek çok teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en yangın kullanılanı enzim immobilizasyonudur. Enzimler katı bir destek içerisine ya da yüzeyine kovalent, kovalent olmayan, kapsülleme ve çapraz bağlama gibi yollarla iliştirilmiştir. Enzimlerin immobilizasyonu için pek çok katı destekler kullanılmıştır. Ancak immobilizasyon çalışmalarında, sadece birkaç enzim hariç, immobilize edilen enzimlerin kararlılığının ve çevresel şartlara karşı direncinin artmasına rağmen aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Enzimlerin katalitik aktivitenin düşmesi bunların uygulamalarını büyük oranda sınırlamaktadır. Bu nedenle, geliştirilmiş katalitik etkinliğe sahip enzimlerin hazırlanması için yeni ve verimli bir yaklaşımın geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu amaç doğrultusunda, projemizde model enzim olarak yabanturpu (Horseradish peroxidase (HRP)) peroksidaz enzimi ve model metal iyonu olarak Fe^{2+} iyonu kullanılarak çiçek şekilli hibrit nano yapıların (ÇHNY) sentezlenmesi ve bunlarının katalitik aktivite ve kararlılığının test edilmesi amaçlanmaktadır. Peroksidaz enzimi geniş katalitik aktivite, yüksek hassasiyet ve yaygın substrat spesifikliğine sahip, önemli bir enzimdir. Bu özellikler sayesinde HRP enzimi, kirletilmiş sulardan fenollerin uzaklaştırılması, organik sentezlerin kolaylaştırılması, biyosensör tasarımı, klinik ve mikro-analitik gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Demir iyonları HRP enziminin katalitik performansını artıran aktivatör iyonlar arasındadır ve ayrıca uygulanan çok düşük manyetik alanın HRP enziminin aktivitesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu sebeplerden dolayı Fe^{2+} iyonunun model metal iyonu olarak seçilmiştir. Sentezlenecek olan kompakt yapıdaki ÇHNYlerin hem katalitik aktivitesinin hem de kararlılığının serbest enzime ve bir katı üzerine ya da içerisine immobilize edilmiş enzime göre çok daha yüksek olacağı öngörülmektedir.

Projenin genel amacının dışında spesifik amaçları ve gerekçeleri daha detaylı olarak aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

1. HRP enzimi ile Fe^{2+} metal iyonları fosfat tamponlu tuz çözeltisinde karıştırılarak, enzimdeki peptidlerin taşıdıkları amin gruplarının Fe^{2+} iyonları ile koordinasyon reaksiyonu vererek çoklu tabakalardan oluşan çiçek şekilli hibrit nano yapıların oluşturulması,

2. HRP enziminin ve Fe^{2+} iyonunun derişimi başta olmak üzere, fosfat tamponlu tuz çözeltisindeki klorür iyonunun derişimi, çözelti ortamının pH ve sıcaklığı gibi faktörlerin ÇHNYlerin morfolojisindeki etkilerinin incelenmesi,

3. HRP enziminin izoelektrik noktası dikkate alınarak farklı pH'larda sentezlenen ÇHNYlerin morfolojilerin, yüzey yük türünün, yük şiddetinin araştırılması,

4. Farklı deney şartlarında elde edilen farklı morfolojideki ÇHNYlerin içerdikleri protein miktarının Bradford protein tayin yöntemi ile hesaplanması,

5. Farklı deney şartlarında elde edilen farklı morfolojideki ÇHNYlerin katalitik aktivitelerinin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında incelenmesi,

6. Ayrıca, farklı deney şartlarında elde edilen farklı morfolojideki ÇHNY çözeltilerinin hem +4ºC de hem de oda sıcaklığında saklanarak katalitik aktivite ve kararlılığının araştırılması,

7. Son olarak sentezlenen ÇHNYlerin fenol ve dopamin gibi organik ve biyo-moleküllerin tespiti ve biyo-analitik uygulamalarının araştırılması.

2. GENEL BİLGİLER

Enzimler substratları yüksek seçicilik ve çok yüksek hız ile katalize eden biyokatalizörlerdir. Enzimler temelde "*in vivo*" ve" *in vitro*" sistemlerinde biyolojik molekülleri katalize ederler. Genel olarak enzimlerin biyolojik sistemlerde bileşikleri sentezleme, parçalama veya başka bir moleküle dönüştürme gibi görevleri vardır. Enzimler reaksiyona girdikleri substratlara göre tepkimeleri 10^3-10^{17} arasında hızlandırdılar ve canlı hücrelerde aktivasyon enerjisini önemli oranda düşürerek hücrelerde harcanan enerjiyi minimum düzeye indirerek tepkimelerin tamamlanmasını sağlar. Günümüzde enzimler kimya, biyokimya, eczacılık, tıp gibi doğa bilimlerinin yansıra tekstil ve gıda gibi birçok endüstriyel alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin çok geniş bir kullanım yelpazesine sahip olmasının nedeni enzimlerin kendilerine özgü eşsiz özellikleridir. Örneğin, enzimler çevre dostudur, düşük toksisiteye sahiptir, suda çözünürlüğü yüksektir, substratlara karşı yüksek katalitik aktivite ve özgüllük gösterirler ve enzim tepkimeleri istenmeyen ürünler oluşturmazlar (1-3). Bu avantajlarla birlikte, serbest enzimler birçok dezavantajlar ve sınırlamamalar gösterir. Öncelikle enzimler çok pahalı biyo-molekülleridir, suda çözündüklerinde çok kısa bir yaşam süresine sahiptir, az miktarda organik çözücülerin varlığında dahi hemen yapıları bozulur, yükse sıcaklığa, düşük ve yüksek pH ortamlarına karşı kararsızdırlar ve çözeltiden geri kazınım ve tekrar kullanım olasılığı yoktur. Serbest enzimlerin gösterdiği bu dezavantajlar,

araştırmacıları enzimleri farklı şekilde kullanmaya ve bu dezavantajlar minimize etmeye yönlendirmiştir.

Bu amaçla, enzimleri daha verimli kullanma adına pek çok teknik geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kimyasal modifikasyon ve immobilizasyon teknikleridir. Kimyasal modifikasyon yöntemi ile enzimin katalitik aktivitesi serbest enzime göre kısmen bir artış gösterse de, kararlılık bakımından zayıf kalmıştır. Ayrıca, çok zaman alması, pahalı olması, verimin düşük olması ve enzim modifikasyonu için uzmanlık istemesi kimyasal modifikasyon tekniğinin en önemli dezavantajlarındadır (4,5). Kimyasal modifikasyon tekniğine karşı, enzim immobilizasyonu en yaygın kullanılan tekniktir. Enzimler katı bir destek içerisine ya da yüzeyine kovalent, kovalent olmayan, kapsülleme ve çapraz bağlama gibi yollarla iliştirilmiştir (6-8). Enzimlerin immobilizasyonu için pek çok katı destekler kullanılmıştır. Enzimler kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler ile organik ve inorganik nano malzemelerin üzerlerine iliştirilirken, nano ve mikro gözenekli nano yapılar içerisine, sol-gel malzemeler ve fosfolipid kökenli zarlar içerine hapsedilmiş ve bazı polimer zincirlerine ve matrislere çapraz bağlanmıştır (9-26). Enzim immobilizasyonlarına nano malzemelerin bir platform olarak kullanılmasının çeşitli sebepleri vardır. Bunlar, nano malzemelerin boyutunun ve şeklinin kolayca kontrol edilebilmesi, yüksek yüzey alanına sahip olması ve enzimlerin nano malzemelerin yüzeyine kolaylıkla bağlanması diye sıralanabilir. Nano malzemelerin geniş yüzey alanına sahip olası çok miktarda enzimin yüzeye bağlanması sağlamıştır. Böylelikle enzimlerin yüksek katalitik aktivite ve kararlılık göstermesi hedeflenmiştir. Ancak immobilizasyon çalışmalarında, sadece birkaç enzim hariç, immobilize edilen enzimlerin kararlılığının ve çevresel şartlara karşı direncinin artmasına rağmen aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Ackerman ve arkadaşları organofosfor hidrolaz enzimini karbonil, metil-ve aminopropil ile işlevselleştirilmiş 30 nm boyutunda gözeneklere sahip olan mikro boyutlu silika parçacıkların içerisine hapsetmişlerdir ve serbest enzime göre % 200 daha yüksek enzim

aktivitesi elde etmişlerdir (27). Fakat bu immobilize enzimin aktivitesinin arttığını gösteren nadir örneklerindendir. İmmobilize enzimlerin katalitik aktivitenin düşmesi bunların uygulamalarını büyük oranda sınırlamaktadır. İmmobilize enzimlerin katalitik aktivitelerinin düşmesinin temel nedenleri: i) immobilizasyon işlemi sırasında enzimi inaktif hale getirin çözücüler kullanılması, ii) immobilize enzimler için enzim ile substrat arasında yeterli bir kütle transferinin olmaması, iii) immobilizasyon sırasında protein ile destek nano malzeme arasında kimyasal veya fiziksel bir reaksiyonun sonucu enzimin yapısal değişikliğe uğraması veya aktif tarafının blok edilmesi diye sıralanabilir (28-40). Bu durum biyokatalitik sistemlerin geniş bir uygulama alanına sahip olmasını engellemektedir. Bu nedenle, geliştirilmiş katalitik etkinliğe sahip enzimlerin hazırlanması için yeni ve verimli bir yaklaşımın geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Yakın bir zamanda Zare ve arkadaşları tarafından farklı bir enzim immobilizasyon yaklaşımı geliştirilmiş ve enzimin hem katalitik aktivitesi hem de kararlılığı dikkate değer ölçüde artmıştır. Zare ve arkadaşları ilk olarak organik bileşen olarak BSA proteinini ve inorganik bileşen olarak Cu(II) iyonunu kullanarak fosfat tamponu içerisinde çiçek şekilli hibrit nano yapıları üretmişlerdir. Şans eseri olarak üretilen bu yapıların sentez tekniği, daha sonra enzimlere de uygulanmış ve çok yüksek katalitik performans elde edilmiştir (41). Sentezledikleri hibrit nano yapıların şekillerinin çiçek şekline benzemesi nedeniyle "nanoflower" olarak adlandırmışlardır. Bu yapıların gösterdiği katalitik performans geleneksel immobilizasyon teknikleri ve serbest formdaki enzimler ile karşılaştırıldığında enzim-inorganik nano yapıların (nanoflowers) kararlılığının ve aktivitesinin dikkat çekici ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Rapor edilen bu çalışmada, lakkaz enzimi ile oluşturulan hibrit yapıların aktivitesinin serbest enzime göre 4.5/6.5 kat arttığı ve serbest enzim aktivitesinin %50 sini 10 gün sonra kaybederken aynı şartlarda lakkaz hibrit yapıların başlangıç aktivitelerinin %95'ini 2 ay boyunca koruduğu belirtilmiştir. Diğer enzimler için de benzer

sonuçlar elde edilmiştir. Sentezlenen protein-inorganik hibrit nano yapıların aktivitelerinin artmasının, muhtemel sebepleri şu belirtmişlerdir; i) oluşan yapıların yüksek yüzey alanı sahip olması ki önemli bir kütle transfer sınırlaması yoktur, ii) nano ölçekli-haps edilmiş enzim moleküllerinin kooperatif etkisi, iii) aktivitesi test edilen enzimlerden özellikle lakkaz enzimi, bakır iyonları içerdiği için enzimin yine bakır iyonları içeren çevresi ile etkileşimi. Yine aynı araştırma grubu tarafından protein ve inorganik malzemelerin fonksiyonlarının birleştirilmesi ile oluşturulan protein-inorganik hibrit nano çiçeklerin biyosensör, biyoanalitik cihazlar, biyoyakıt hücreleri ve endüstriyel biyokataliz gibi alanlarda önemli uygulamalara sahip olmalarının muhtemel olduğu rapor edilmiştir. Fakat " nanoflower" enzimlerin aktivitesinin artma mekanizması tam olarak açıklanmamış ve validasyonu yapılmamıştır. Ayrıca bu " nanoflower" yapıların morfolojisini etkileyen deneysel faktörler de incelenmemiştir.

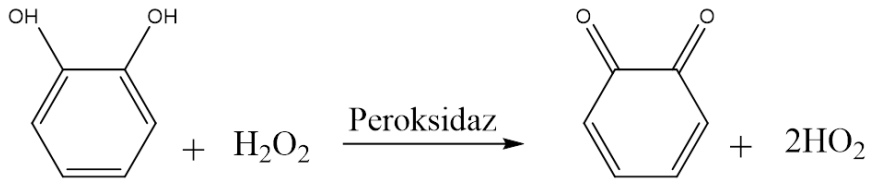
Önerilen proje, enzim-inorganik hibrit nano yapıların oluşturulmasına ve karakterizasyonuna yönelik oldukça kapsamlı ve sistematik bir çalışmadır. Bu proje kapsamında, organik kısım olarak yabanturpu (ya da karaturp) (Horseradish peroxidase (HRP)) peroksidaz enzimi ve inorganik kısım olarak Fe^{2+} iyonları kullanılarak yüksek katalitik aktivite ve kararlılığa sahip, çiçek benzeri şekilli (flower like) enzim-inorganik hibrit yapılar sentezlenecek ve karakterizasyon çalışmaları yapılacaktır. Ayrıca bu yapıların biyo-analitik başta olmak üzere farklı alanlarda bazı uygulamaları da gösterilecektir. Yapılan literatür araştırmasında, Fe^{2+} iyonları kullanılarak HRP enzim kökenli her hangi bir yapıya rastlanmadığı görülmüştür.

Peroksidaz enzimi [E.C: 1.11.1.7], doğada çok yaygın olarak bulunan ve hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H_2O_2 bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır. Peroksidaz enzimi, hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrogenasyon reaksiyonlarını da katalizler (42-46).

Peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar oldukça karışıktır ancak aşağıda verildiği şekilde özetlenebilir (47).

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{Peroksidaz}} 2H_2O + A$$

Peroksidaz enzimi peroksit karşısında gualiakol, pirogalol, klorogenik asit, katekin ve katekol gibi birçok fenolik bileşikleri de yükseltgeyebilir (48). Örnek olarak, katekolun oksidasyonu verilebilir (Şekil 1).



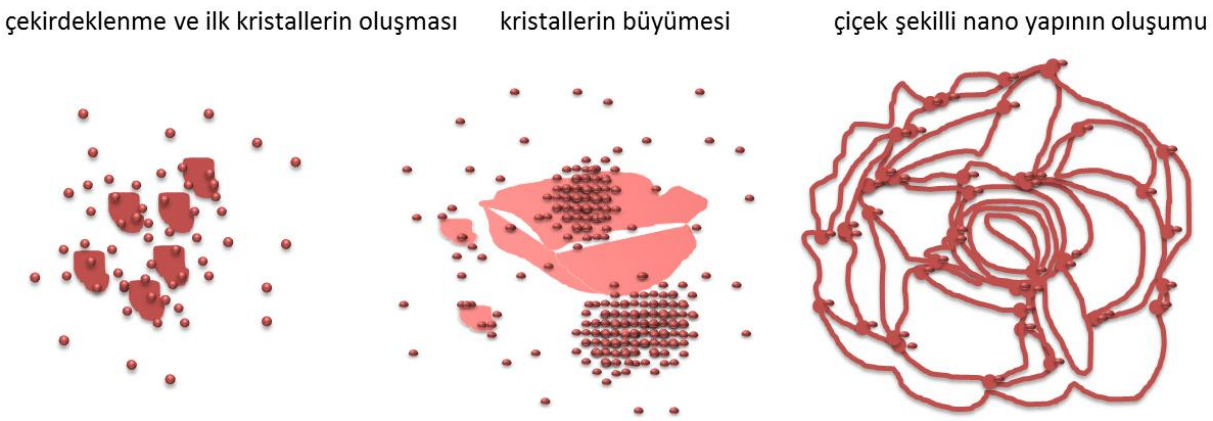
Şekil 1. Katekol oksidasyonu

Peroksidaz enzimi geniş katalitik aktivite, yüksek hassasiyet ve yaygın substrat spesifikliğine sahip, önemli bir enzimdir (45, 46, 49). Ayrıca enzimin aktivite tayini spektrofotometrik olarak kolaylıkla ve yüksek doğrulukla ölçülebilmektedir. Peroksidaz enziminin sayılan bu özellikleri enzimi mikroanalitik, biyomedikal ve endüstriyel uygulamalarda kullanışlı hale getirmektedir (50-52). Peroksidaz enzimi ticari olarak, biyosensör yapımında (52, 53), tıbbi tanı kitlerinin bir bileşeni olarak (54-56), organik bileşiklerin biyo-tranformasyonunda (57-59) ve atık suların arıtılmasında (fenoller, aromatik aminlerin, bifenil ve bisfenoller gibi çeşitli kirleticilerden) kullanılmaktadır (60-63). Ayrıca çok farklı alanlarda peroksidaz enzimi için yeni uygulamalar önerilmektedir. Önerilen bu uygulamalar arasında; fenolik kirletici maddelerin ve bunlarla ilgili bileşiklerin uzaklaştırılması, sentetik boyaların renklerinin giderilmesi, organik ve polimer sentezi sayılabilir (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Nano Boyutlu Yapraklardan Oluşan Çiçek Şekilli Enzim-İnorganik Hibrit Yapıların Sentezi:

Çalışmada hibrit yapıların hazırlanmasında organik kısım olarak HRP ve üreaz enzimleri, inorganik kısım olarak ($CuSO_4$ ve $FeSO_4$) kullanılacaktır. Protein moleküllerinin Cu^{2+} veya Fe^{2+} iyonları ile kompleks oluşturduğu bilinen bir durumdur. İlk basamakta çekirdek bakır II fosfat ($Cu_3(PO_4)_2$. $3H_2O$ vaya demir II fosfat ($Fe_3(PO_4)_2$ kristallerinin oluşması beklenir. Böylece protein molekülleri baskın olarak Cu^{2+} veya Fe^{2+} iyonlarıile özellikle protein omurgasındaki amin gruplarının koordinasyonu sayesinde kompleksler oluştururlar. Oluşan bu kompleksler demir fosfat birincil kristallerin çekirdeklenme alanları haline gelir. İkinci basamak büyüme olarak adlandırılır, protein molekülleri ve birincil kristaller iri topaklar haline gelir. Demir fosfat kristallerinin kinetik olarak kontrolü agregatların yüzeyindeki bireysel demir bağlayıcı bölgelerden kaynaklanır ki buda ayrı ayrı nano boyuttaki yaprakların oluşması sağlar. Son basamakta büyüme mekanizması sonlanır ve bu anizotropik büyüme çok katmanlı çiçek-benzeri bir yapının oluşması ile sonuçlanır. Önerilen bu büyüme sürecinde, protein yaprak skafoldların oluşturulması için demir fosfat kristallerinin çekirdeklenmesini indükler ve yaprakları birbirine bağlamak için bir "tutkal" olarak görev yapar. Nano boyuttaki bu yaprak şekilli yapılar bir araya gelerek birbirine bağlanırlar ve çiçek benzeri şekillere sahip yapılar oluştururlar. Bu nedenle sentezlenen yapılar "çiçek şekilli nano yapılar" (flower-like nanostructures) olarak adlandırılmıştır. HRP- Cu^{2+}, HRP-Fe^{2+} ve Üreaz-Cu^{2+} hibrit çiçek şekilli nano yapının oluşum basamakları Şekil 2 de gösterilmiştir.



Şekil 2. Önerilen HRP veya üreaz enzim-inorganik çiçek şekilli nano yapının oluşum mekanizması. Kahve renkli demir eya bakır iyonlarını temsil eder ve bunlar enzimlerdeki amin gruplarına bağlanmaktadır.

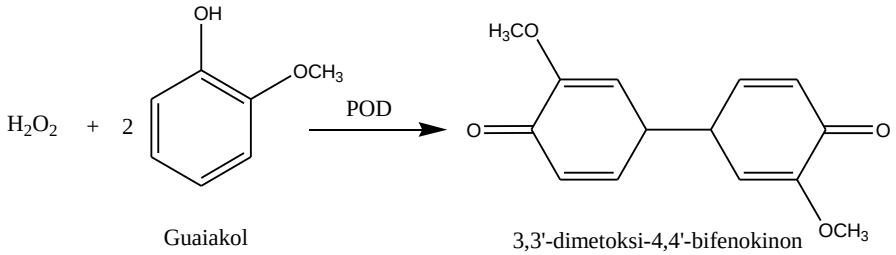
3.2. Sentezlenecek ÇHNYlerin Karakterizasyonu

ÇHNYlerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve taramalı tünelleme miksirkobu (STM) ile karakterize edilecektir. X-ışını kırınım (XRD) ile ÇHNYlerin kristal yapıları aydınlatılırken, Zeta potansiyel ile yüzey yüklerin türü ve şiddeti ölçülecektir. Bradford yöntemi ile sentezlenen ÇHNYlerin enzim içeriği belirlenecektir.

3.3. Enzim-İnorganik Çiçek-Şekilli Hibrit Nano Yapıların Aktivitesinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

Sentezlenecek ÇHNYlerin aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi amacıyla ilk olarak hibrit yapıların enzim enkapsülasyon oranları Bradford yöntemi ile spektrofotometrik (UV-spectrophotometer) olarak hesaplanacaktır. Daha sonra aynı enkapsülasyon oranına ÇHNYler kullanılarak aktivite deneyleri yapılacaktır. ÇHNYlerin aktivite ölçümü, Somtürk ve arkadaşlarının (2014) uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlenecektir. Yöntem H_2O_2 tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin (3,3'-dimetoksi-4,4'-bifenokinon) meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm de izlenmesi esasına dayanmaktadır (46). Reaksiyon enzim çözeltisinin ilavesiyle başlar ve 3

dakika süreyle her 1 dakikada bir olmak üzere oda sıcaklığında 470 nm'de absorbans artışı spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edilir.



Şekil 3. Guaiakol substratının yükseltgenmesi

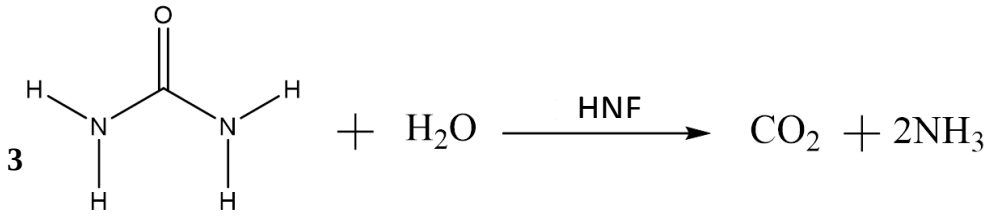
0,1 M KH_2P0_4 (pH:6,8) (Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 1,36 g KH_2P0_4, 80 ml destile suda çözülür ve 1M NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlanır.

45 mM Guaiakol çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılacak substrat çözeltisi): 498 µL guaiakol alınır son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

22,5 mM H_2O_2 çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılacak substrat çözeltisi): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/mL olan H_2O_2'den 228 µL alınarak destile suyla 100 mL'ye tamamlanır.

Aktivite tayininde kullanılacak çözücüler hazırlandıktan sonra aynı enzim enkapsülasyon oranına sahip olan ÇHNYler alınarak 1mL fosfat tamponunda (pH:6.8) çözülecek ve üzerine 1mL guaiakol ve 1mL H_2O_2 ilave edilerek farklı sıcaklıklarda (+4°C ve oda sıcaklığı) saklanacaktır. Ölçümler 30 gün boyunca spektrofotometrik olarak gerçekleştirilecek ve bu şekilde kararlılıkları tespit edilecektir.

Üreaz ÇHNYler aktivitesi ve kararlılığı ise üre substratına göre belirlenmiştir.

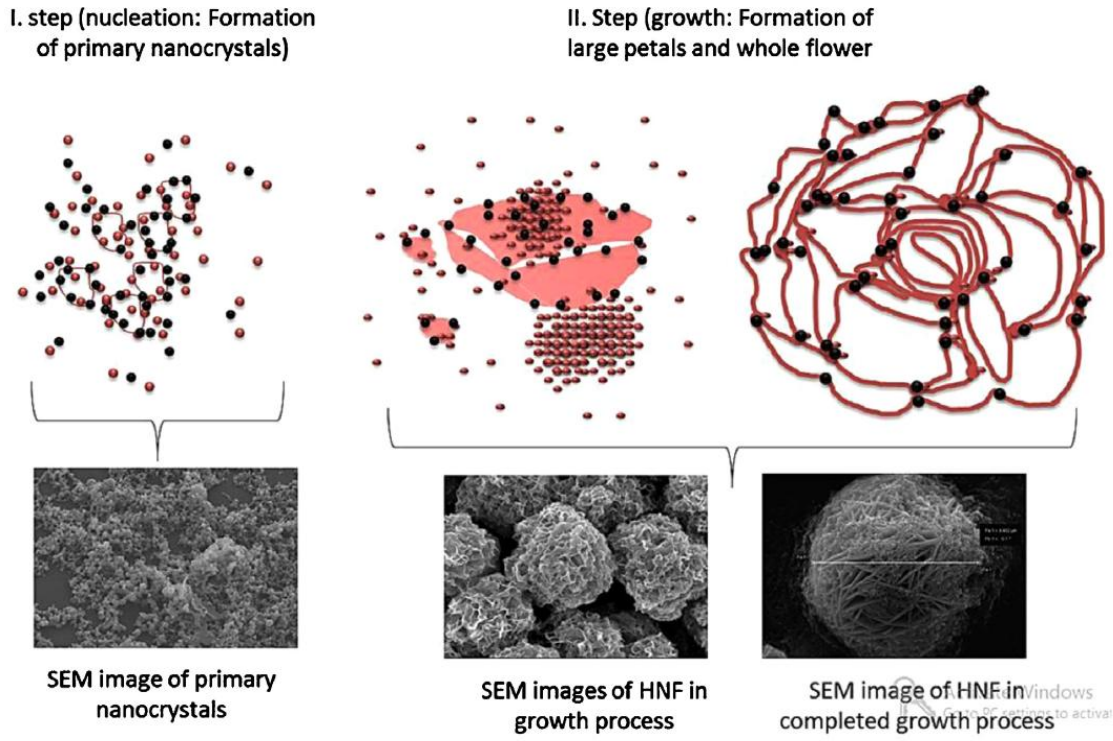


Şekil 4. Ürenin hidrolizi

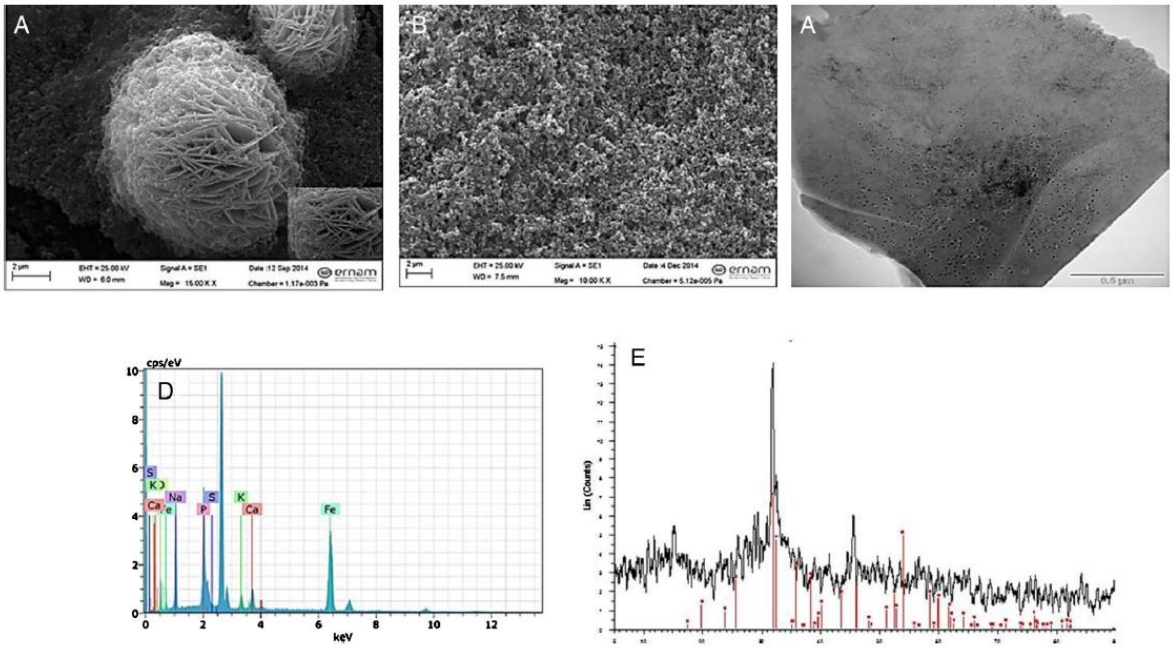
Serbest üreaz ve ÇHNYler (1 mg mL^{-1}) tampon çözelti içerisinde çözülür (pH 7.0) ve iki ayrı reaksiyon tüpüne transfer edilir. Herbir tüpe, 0.8 mL üre (3 mg mL-1) eklenir ve çözelti 30 dk inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, 4 mL su ve 100 μL Nessler's ajanı eklenir. NH_3 üretimi spektrometrik olarak at 425 nm de ölçülür.[43-48]

4. BULGULAR

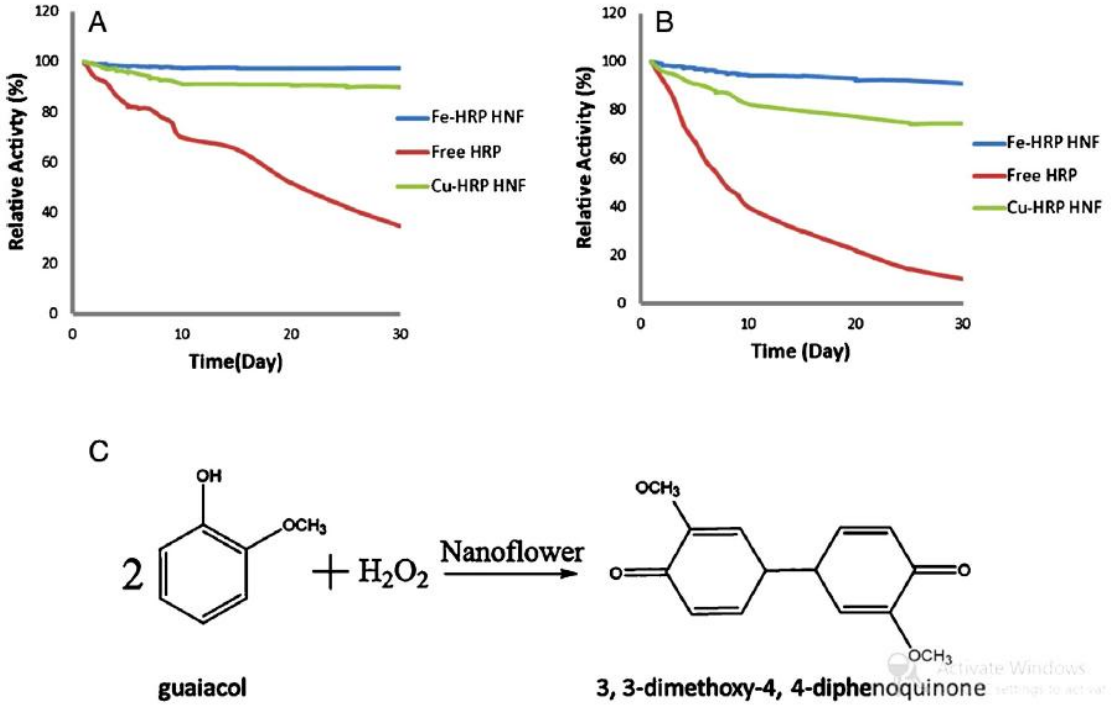
4.1. HRP-Fe^{2+} Çiçek Şekilli Nano Yapıların Bulguları



Şekil 1. İki basamaktan oluşan Fe-HRP ÇHNYlerin önerilen oluşum mekanizmasının şematik gösterimi: (I) çekirdeklenme ve (II) büyüme. I ve II. basamakta elde edilen taramalı elektron mikroskop resimler. Not: Kahverengi küreler HRP moleküllerini işaret ederken, siyah küreler nanokristaller temsil eder.

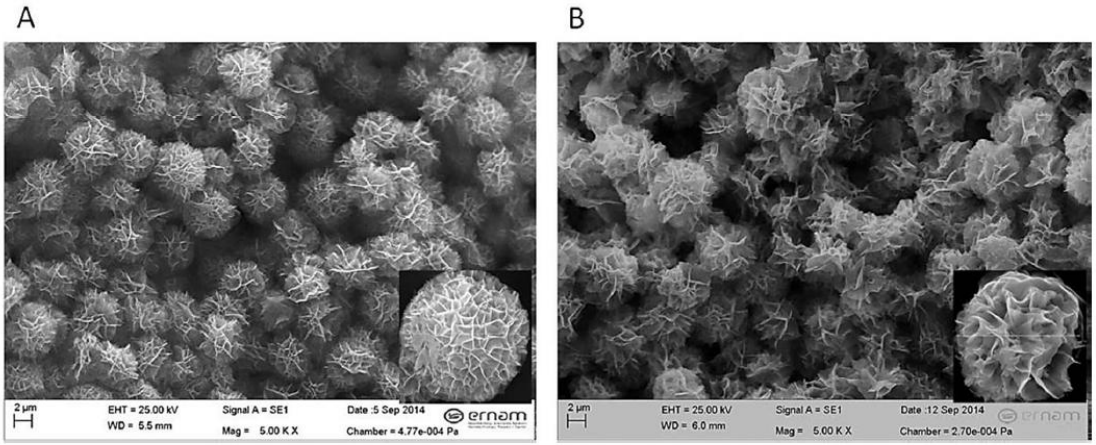


Şekil 2. (A) Fe-HRP ÇHNYnin taramalı elektron mikroskop resmi. İlave: Fe-HRP ÇHNYnin resmi 40.00Kx büyütme ile. (B) Klorür iyonu yokluğunda Fe-HRP ÇHNYnin taramalı elektron mikroskop resmi. (C) Fe-HRP ÇHNYnin geçişli elektron mikroskop resmi. (D) Fe-HRP ÇHNYnin enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi analizi. (E) Fe-HRP ÇHNYnin FeP_4 nano kristalinin (kırmızı çizgi) X-ışını difraksiyon analizi. Bu analiz JCPDS (32-0-471) standardı ile uyumludur (siyah çizgi).

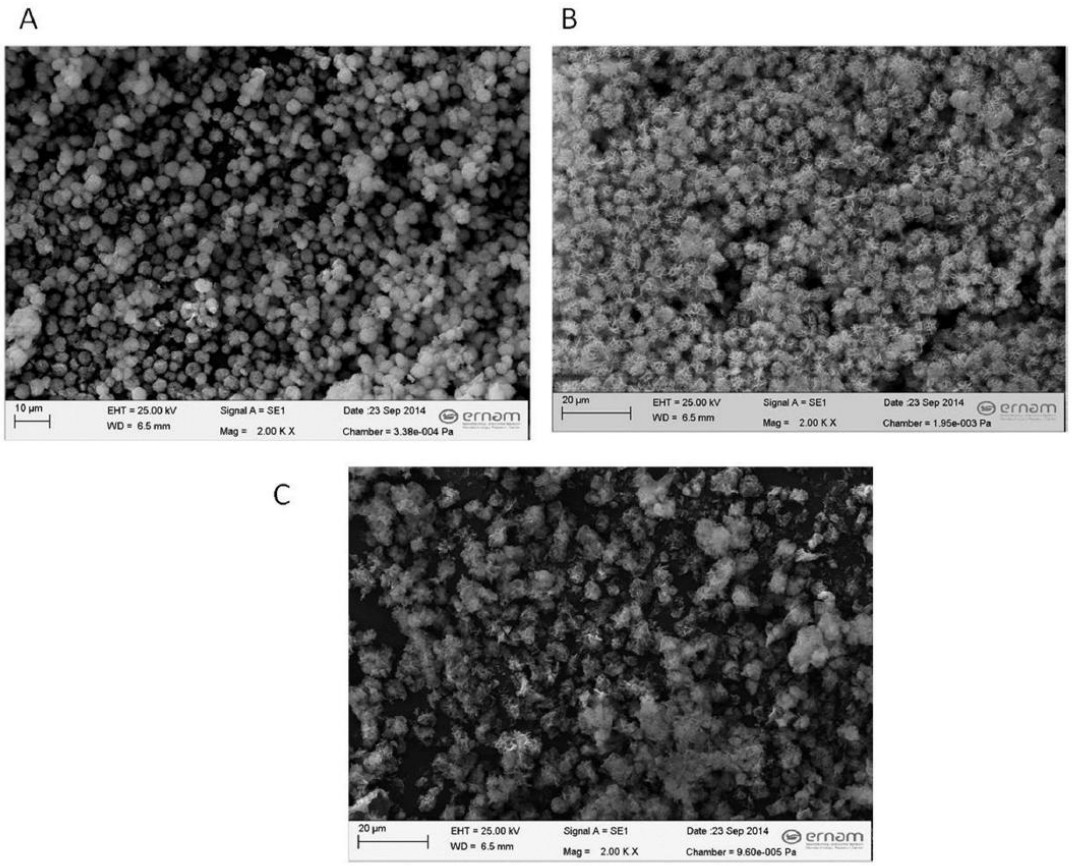


Şekil 3. Fe-HRP ÇHNY, Cu-HRP ÇHNY and serbest HRP yapılarının karalılık grafiği. (A) +4◦C de saklama. (B) Oda sıcaklığında saklama (20◦C). H_20_2 varlığında Fe-HRP ÇHNY tarafından kataliz edilen guaiakol sonucu 3, 3-dimetoksi-4,4-difenokinon oluşur. .

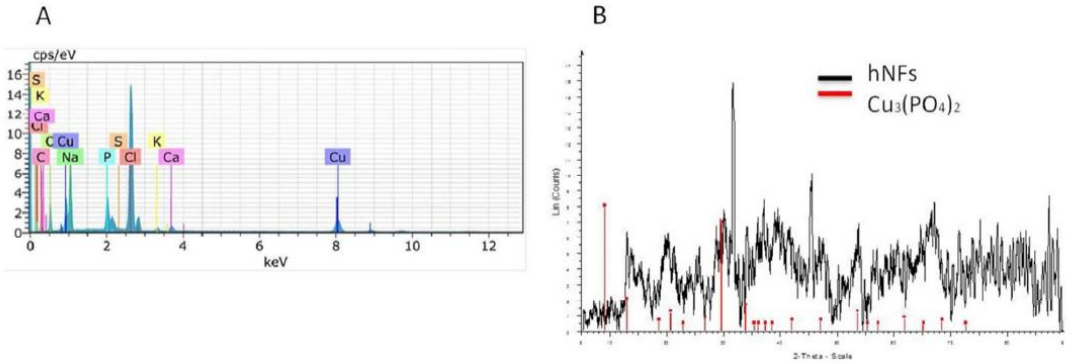
4.2. HRP-Cu^{2+} Çiçek Şekilli Nano Yapıların Bulguları



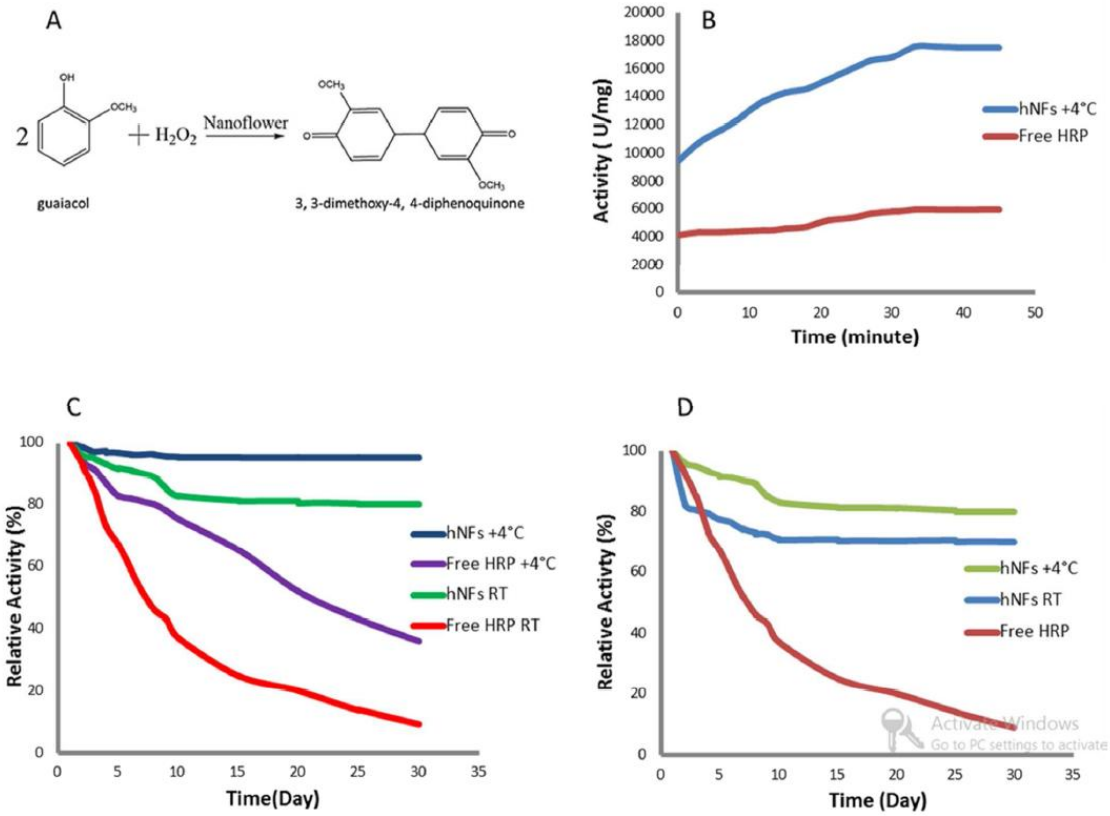
Şekil 1. Cu-HRP ÇHNYnin taramalı elektron mikroskop resimleri. (A) +4°C ve İlave: Cu-HRP ÇHNYnin resmi 25.00Kx büyütme ile. (B) Oda sıcaklığı (20◦C) ve İlave: Cu-HRP ÇHNYnin resmi 25.00Kx büyütme ile



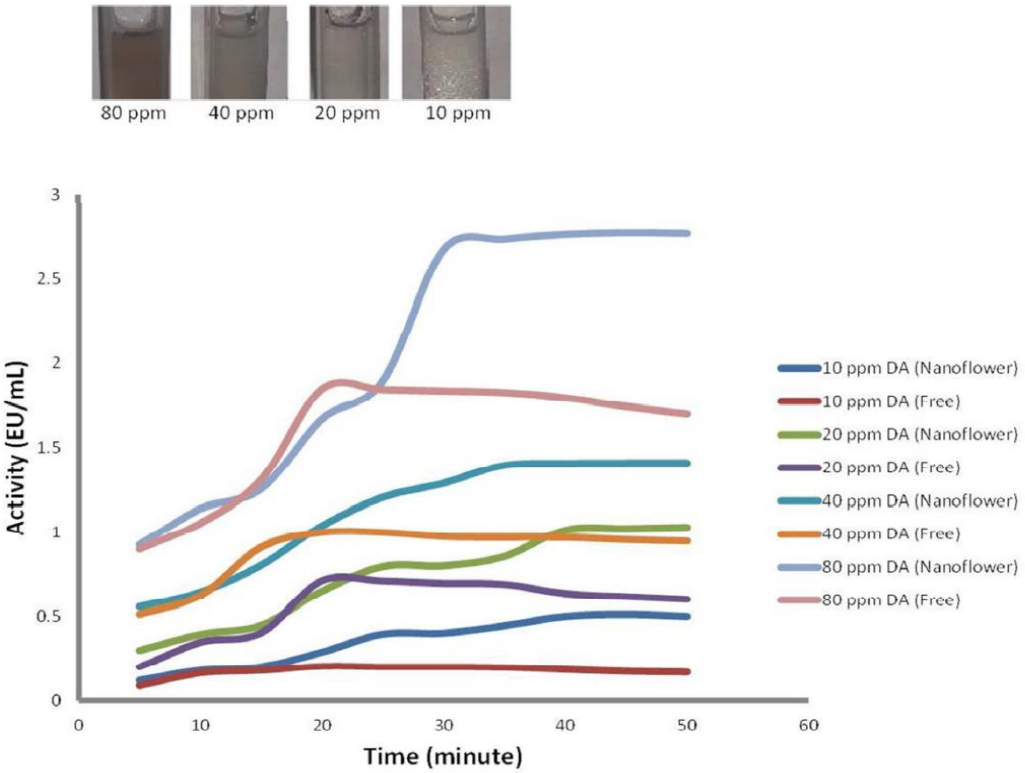
Şekil 2. Farklı pH değerlerindeki oluşan Cu-HRP ÇHNYlerin resimleri. (A) pH: 6, (B) pH: 8, (C) pH: 9.



Şekil 3. (A) Cu-HRP ÇHNYnin enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi analizi. (B) Fe-HRP ÇHNYnin $Cu_3(PO_4)$. $3H_2O$ (kırmızı çizgi) nano kristalinin X-ışını difraksiyon analizi. Bu analiz JCPDS (00−022−0548) standardı ile uyumludur (siyah çizgi).

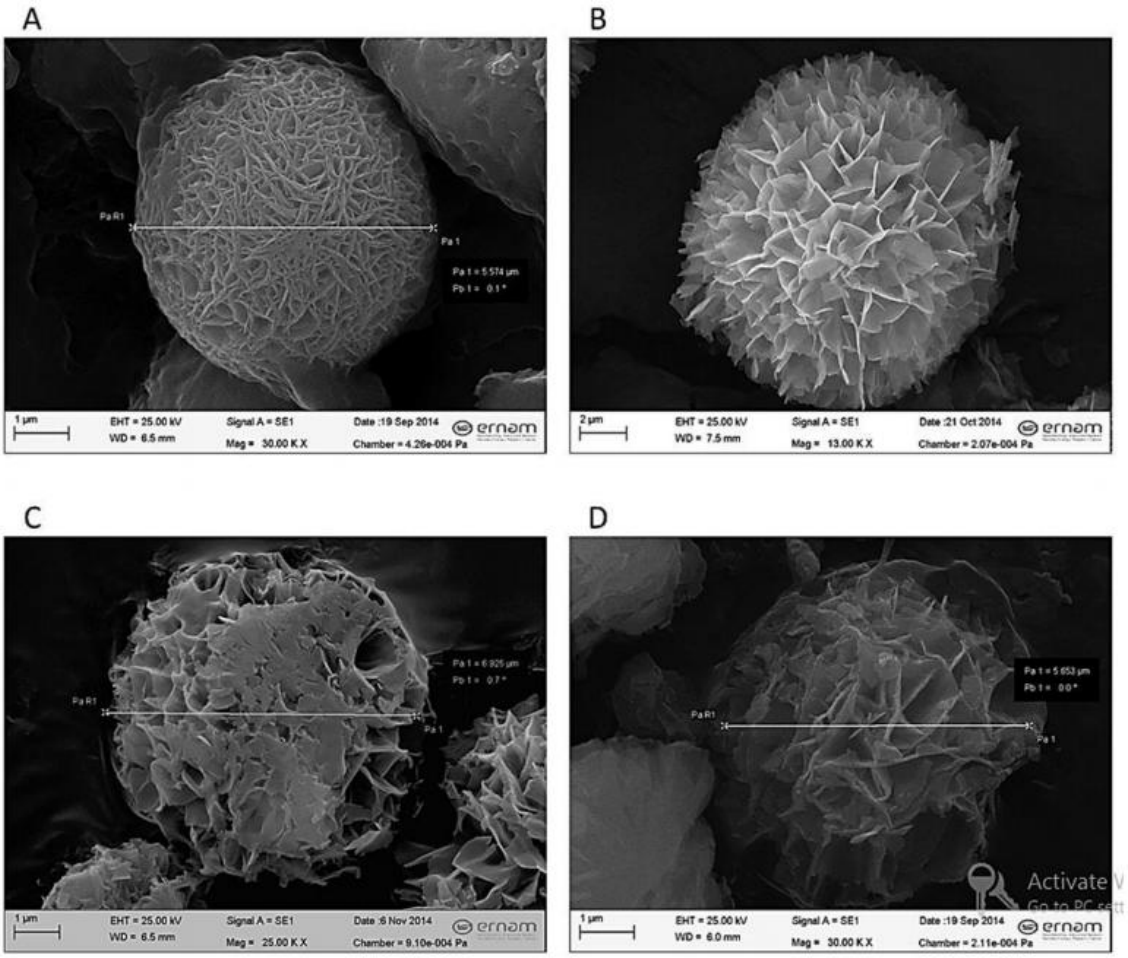


Şekil 4. Cu-HRP ÇHNY ve serbest enzimlerin guaiakol karşı aktivite ve kararlılığı. (A) H_20_2 varlığında Fe-HRP ÇHNY tarafından kataliz edilen guaiakol sonucu turuncu renkli 3, 3-dimetoksi-4,4-difenokinon oluşur. (B) +4°C de sentezlenmiş Cu-HRP ÇHNYlerin +4°C (mavi çizgi) ve 20°C deki (yeşil çizgi) kararlılık ölçümleri. Serbest HRP enzimin 4°C (mor çizgi) ve 20°C deki (kırmızı çizgi) kararlılık ölçümleri. (D) 20°C de sentezlenmiş Cu-HRP ÇHNYlerin +4°C (yeşil çizgi) ve 20°C deki (mavi çizgi) kararlılık ölçümleri. Serbest HRP enzimin 20°C deki (siyah çizgi) kararlılık ölçümleri

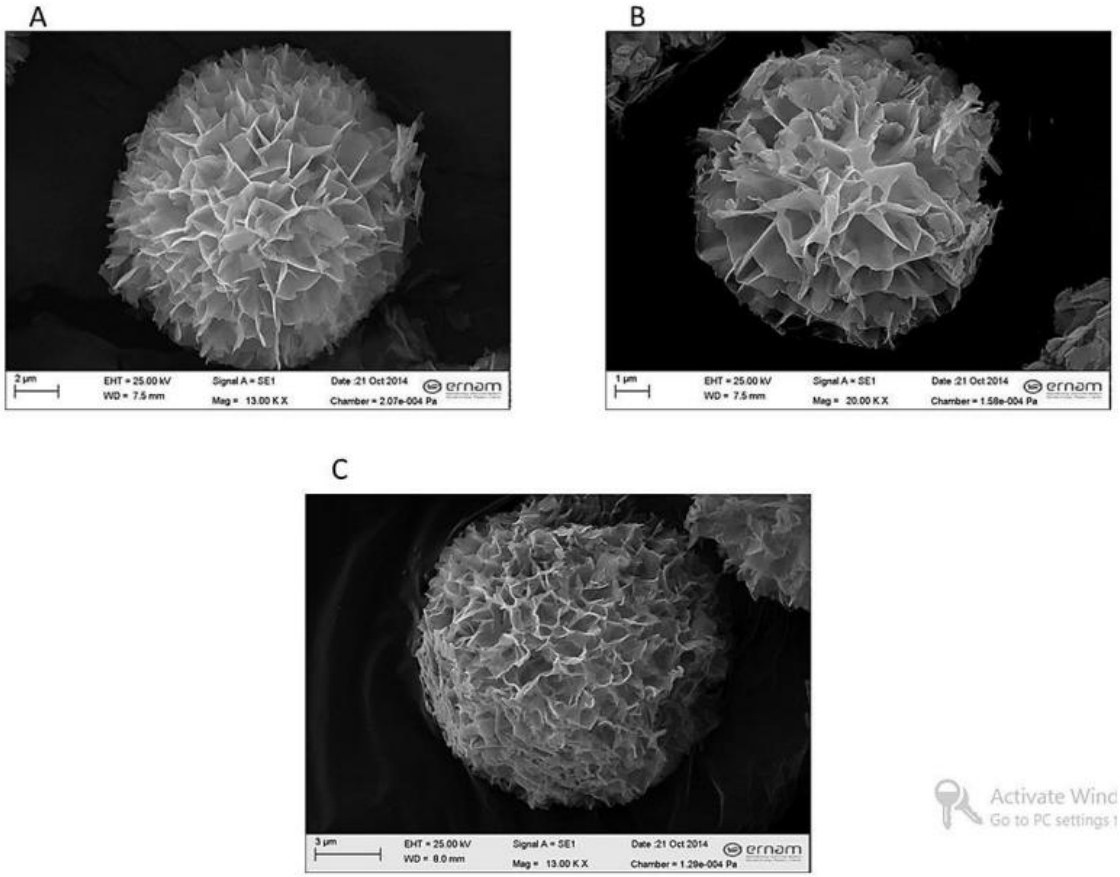


Şekil 4. Cu-HRP ÇHNY ve serbest enzimler tarafından oksitlenen dopaminin kinetik grafiği. İlave: Dopamin konsantrasyonuna çözeltisindeki renk değişimi (10, 20, 40, 80 µg mL^{-1}).

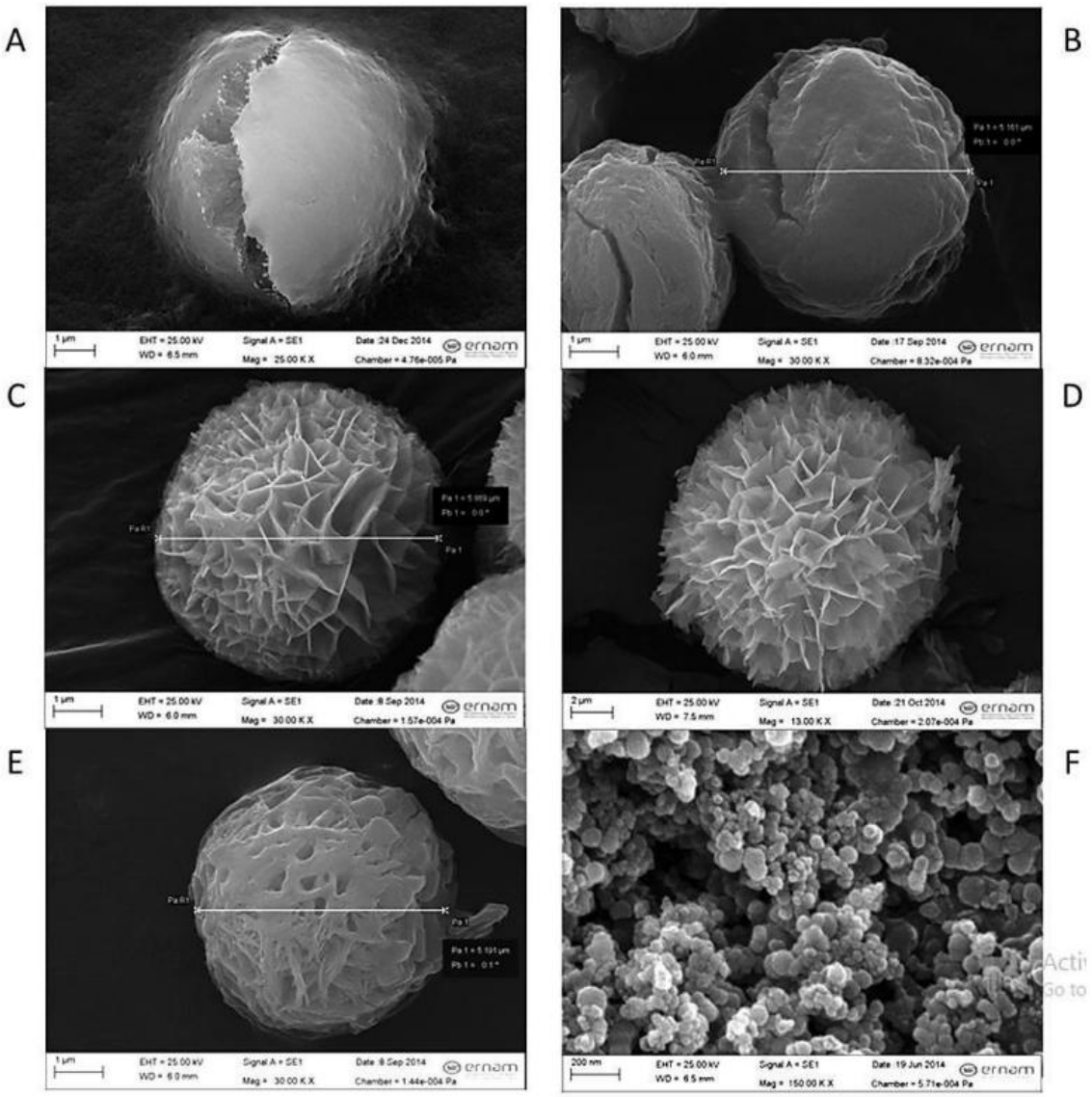
4.3. Üreaz-Cu^{2+} Çiçek Şekilli Nano Yapıların Bulguları



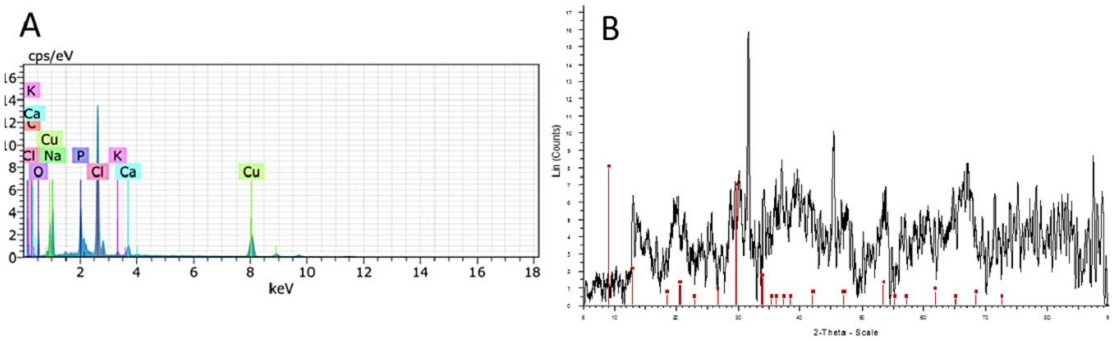
Şekil. 1. Farklı pH değerlerinde HNF oluşumu. (A) pH: 6, (B) pH: 7.4, (C) pH: 8 and (D) pH: 9.



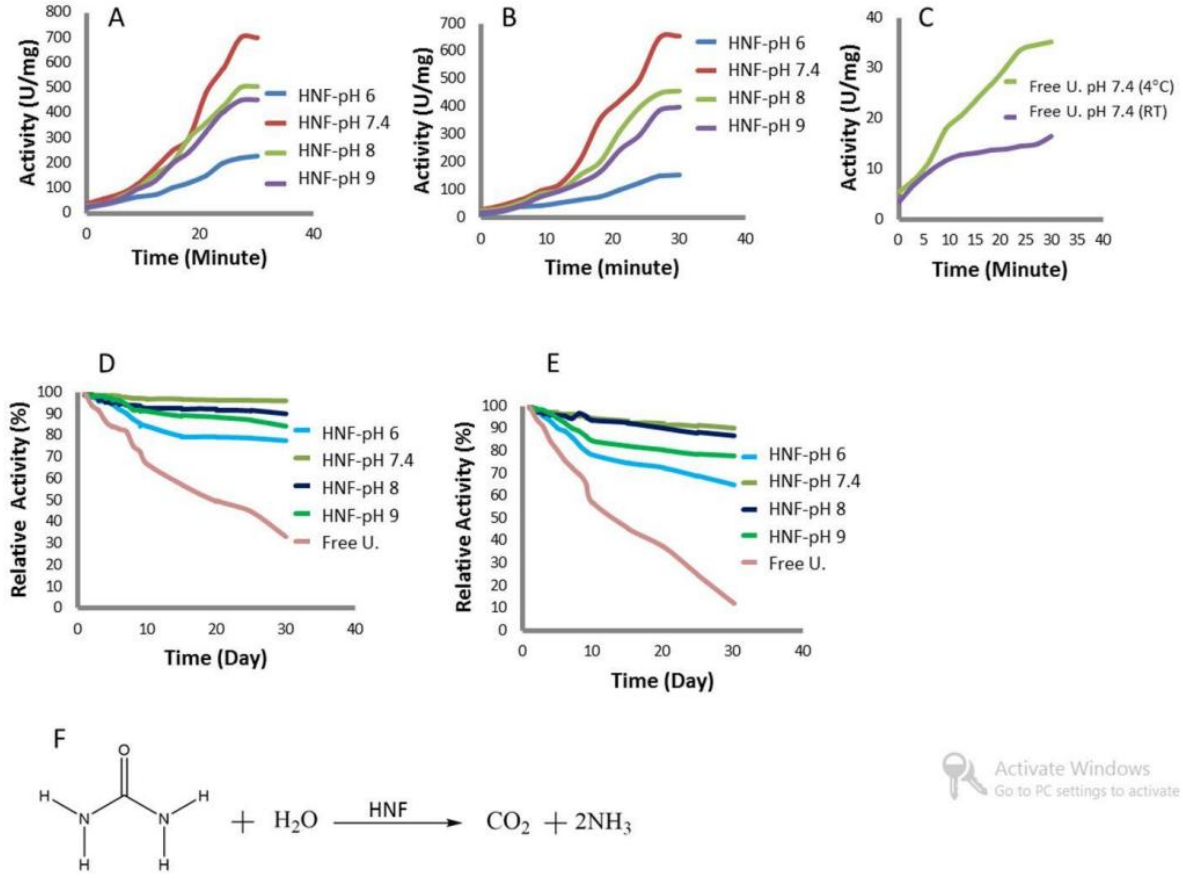
Şekil. 2. Farklı pH değerlerinde HNF oluşumu. (A) 0.8 mM, (B) 8 mM, (C) 80 mM.



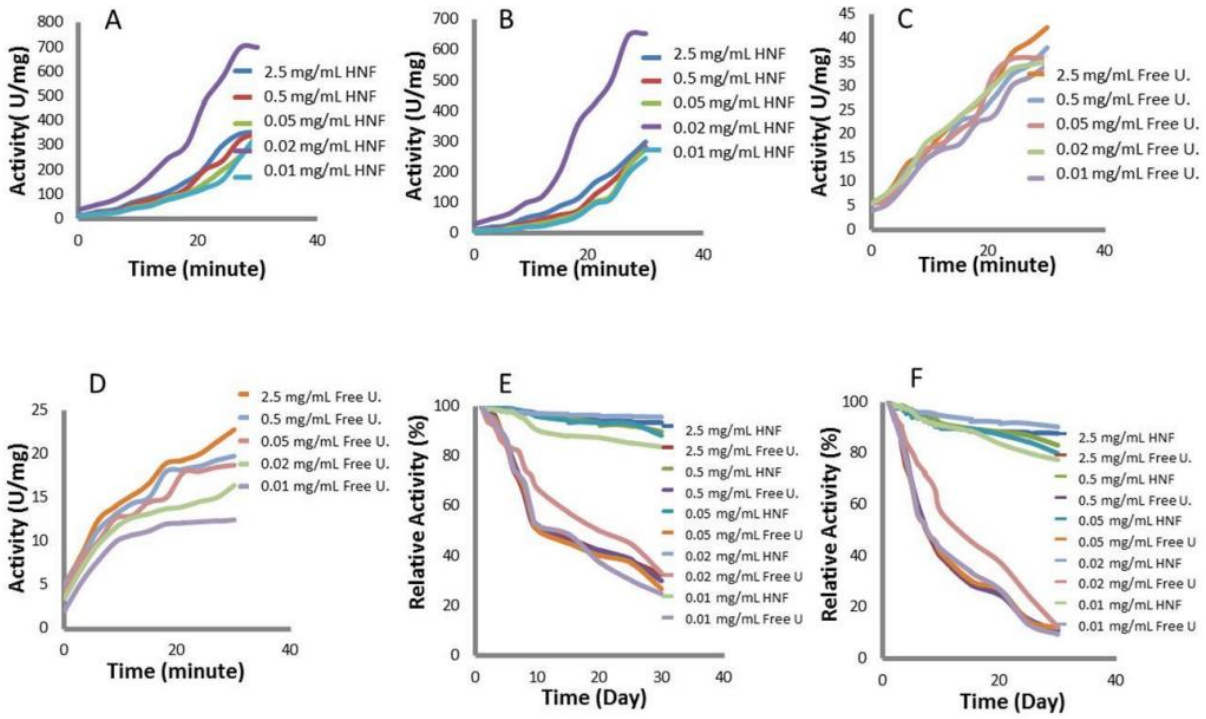
Şekil. 3. Farklı üreaz konsantrasyonlarında ve aşırı Cl^- konsantrasyonunda HNF oluşumu. (A) 2.5, (B) 0.5, (C) 0.05, (D) 0.02 and (E) 0.01 mg mL^{-1} üreaz konsantrasyonları. (F) 7 M ve üzerinde Cl^- konsantrasyonu.



Şekil. 4. (A) Üreaz HNF EDX ve (B) Üreaz HNF XRD analizleri.



Şekil. 5. Farklı pH değerlerinde sentezlenen ve farklı sıcaklıklarda (+4°C ve oda sıcaklığı, 20°C,) inkübe edilen HNF aktivite ölçümleri. (A) +4°C'de HNF inkübe, (B) 20°C'de HNF inkübe. (C) A) +4°C'de ve 20°C'de serbest üreaz inkübe. HNF ve serbest üreazın farklı sıcaklılarda inkübe edildikten sonraki kararlılık deneyleri. (D) +4°C'de inkübe ve (E) 20°C'de HNF inkübe. (F) Ürenin HNF tarafından kataliz edilerek hidroliz edilmesinin kimyasal denklem ile gösterilmesi.



Şekil. 6. Farklı üreaz konsantrasyonlarında (2.5, 0.5, 0.1, 0.02 and 0.01 mg mL^{-1}) sentezlenen ve farklı sıcaklıklarda (+4°C ve oda sıcaklığı, 20°C,) inkübe edilen HNF aktivite ölçümleri. (A) +4°C'de HNF inkübe, (B) 20°C'de HNF inkübe. (C) A) +4°C'de, (D) 20°C'de serbest üreaz inkübe. HNF ve serbest üreazın farklı sıcaklılarda inkübe edildikten sonraki kararlılık deneyleri. (E) +4°C'de inkübe ve (F) 20°C'de inkübe.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Proje kapsamında farklı bir enzim immobilizasyon yaklaşımı kullanılarak enzimlerin aktivite ve kararlılığının çok yüksek derecede arttığı başarı ile gösterilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, projemizde model enzim olarak yabanturpu (Horseradish peroxidase (HRP)) peroksidaz ve üreaz enzimleri ve model metal iyonları olarak Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonları kullanılarak çiçek şekilli hibrit nano yapıların (ÇHNY) sentezlenmesi ve bunlarının katalitik aktivite ve kararlılığının test edilmesi amaçlanmaktadır. Peroksidaz enzimi geniş katalitik aktivite, yüksek hassasiyet ve yaygın substrat spesifikliğine sahip, önemli bir enzimdir. Bu özellikler sayesinde HRP enzimi, kirletilmiş sulardan fenollerin uzaklaştırılması, organik sentezlerin kolaylaştırılması, biyosensör tasarımı, klinik ve mikro-analitik gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bulgularda belirtildiği üzere sentezlenenen kompakt yapıdaki ÇHNYlerin hem katalitik aktivitesinin hem de kararlılığının serbest enzime ve bir katı üzerine ya da içerisine immobilize edilmiş enzime göre çok daha yüksek olduğu gösterilmektedir.

Projenin sonuçları detaylı olarak aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

1. HRP enzimi ile Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonları metal iyonları fosfat tamponlu tuz çözeltisinde karıştırılarak, enzimdeki peptidlerin taşıdıkları amin gruplarının Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonları iyonları ile koordinasyon reaksiyonu vererek çoklu tabakalardan oluşan çiçek şekilli hibrit nano yapılar oluşturulmuştur.

2. HRP enziminin ve Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının derişimi başta olmak üzere, fosfat tamponlu tuz çözeltisindeki klorür iyonunun derişimi, çözelti ortamının pH ve sıcaklığı gibi faktörlerin ÇHNYlerin morfolojisindeki etkilerinin incelenmiştir.

3. HRP enziminin izoelektrik noktası dikkate alınarak farklı pH'larda sentezlenen ÇHNYlerin morfolojilerin, yüzey yük türünün, yük şiddeti araştırılmıştır,

4. Farklı deney şartlarında elde edilen farklı morfolojideki ÇHNYlerin içerdikleri protein miktarının Bradford protein tayin yöntemi ile hesaplanmıştır,

5. Farklı deney şartlarında elde edilen farklı morfolojideki ÇHNYlerin katalitik aktivitelerinin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında incelenmiştir,

6. Ayrıca, farklı deney şartlarında elde edilen farklı morfolojideki ÇHNY çözeltilerinin hem +4ºC de hem de oda sıcaklığında saklanarak katalitik aktivite ve kararlılığının ölçülmüştür,

7. Son olarak sentezlenen ÇHNYlerin fenol ve dopamin gibi organik ve biyo-moleküllerin tespiti ve biyo-analitik uygulamalarının araştırılmıştır.

8. Üreaz ile sentezlenen ÇHNYlerin yüksek aktiviteleri ve kararlılıkları üre substratına göre test edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

[1] Kim J, Grate JW, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. TrendsBiotechnol 2008;26:639–46.

[2] Ge J, Lu D, Liu Z, Liu Z. Recent advances in nanostructured biocatalysts. BiochemEng J 2009;44:53–9.

[3] Wang P. Nanoscale biocatalyst systems. Curr Opin Biotechnol 2006;17:574–9.

[4] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzymeimmobilizations: a review. Enzyme Microb Technol 2004;35:126–39.

[5] Mesing R. Immobilized enzymes for industrial reactors. New York: AcademicPress; 1995.

[6] Cao L. lmmobilised enzymes: science or art? Curr Opin Chem Biol 2005;9:217–26.

[7] Yu L, Banerjee IA, Gao X, Nuraje N, Matsui H. Fabrication and application ofenzyme-incorporated peptide nanotubes. Bioconjug Chem 2005;16:1484–7.

[8] Biotechnology for environmental management and resource recovery.GuisanJM, editor. Methods in Biotechnology. Totowa, NJ: Humana Press; 2006. p. 449.

[9] Schmid JS, Dordick B, Hauer A, Kiener M, Wubbolts M, Witholt B. Review articleindustrial biocatalysis today and tomorrow. Nature 2001;409:258–68.

[10] Patel RN. Chemo-enzymatic synthesis of pharmaceutical intermediates. ExpertOpin Drug Discov 2008;3:187–245.

[11] Turner NJ. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. NatChem Biol 2009;5:567–73.

[12] Zhu JY, Zhang YF, Lu DN, Zare RN, Ge J, Liu Z. Temperature-responsiveenzyme–polymer nanoconjugates with enhanced catalytic activities in organicmedia. Chem Commun 2013;49:6090–2.

[13] Lee CH, Lin TS, Mou CY. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. NanoToday 2009;4:165–79.

[14] Wang P. Multi-scale features in recent development of enzymic biocatalystsystems. Appl Biochem Biotechnol 2009;152:343–52.

[15] Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. AdvSynth Catal 2007;349:1289–307.

[16] Cao A, Ye Z, Cai Z, Dong E, Yang X, Liu G, et al. A facile method to encapsulateproteins in silica nanoparticles: encapsulated green fluorescent protein as arobust fluorescence probe. Angew Chem Int Ed 2010;49:3022–5.

[17] Lei C, Shin Y, Liu J, Ackerman EJ. Entrapping enzyme in a functionalizednanoporous support. J Am Chem Soc 2002;124:11242–3.

[18] Dulay MT, Baca QJ, Zare RN. Enhanced proteolytic activity of covalently boundenzymes in photopolymerized sol gel. Anal Chem 2005;77:4604.

[19] Frenkel-Mullerad H, Avnir D. Sol–gel materials as efficient enzyme protectors:preserving the activity of phosphatases under extreme pH conditions. J AmChem Soc 2005;127:8077.

[20] Temocin Z. Covalent immobilization of candida rugosa lipase on aldehyde functionalized hydrophobic support and the application for synthesis of oleic acidester. J Biomater Sci Polym Ed 2013;24:1618–35.

[23] Luckarift HR, Spain JC, Naik RR, Stone MO. Enzyme immobilization in abiomimetic silica support. Nat Biotechnol 2004;22:211–3.

[24] Mateo C. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. NatProtoc 2007;2:1022–7.

[25] Ge J, Lei J, Zare RN. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. Nat Nanotechnol2012;7:428–32.

[26] Wang R, Zhang Y, Lu D, Ge J, Liu Z, Zare RN. Functional protein–organic/inorganic hybrid nanomaterials. WIREs Nanomed Nanobiotechnol2013;5:320–8.

[27] Zhu L, Gong L, Zhang Y, Wang R, Ge J, Liu Z, et al. Rapid detection of phe-nol using a membrane containing laccase nanoflowers. Chem Asian J 2013;8:2358–60.

[28] Wang L, Wang Y, He R, Zhuang A, Wang X, Zeng J, et al. A new nanobiocat-alytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymaticperformance. J Am Chem Soc 2013;135:1272–5.

[29] Lin Z, Xiao Y, Yin Y, Hu W, Liu W, Yang H. Facile synthesis of enzyme–inorganichybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visualdetection of hydrogen peroxide and phenol. ACS Appl Mater Interfaces2014;6:10775–82.

[30] Somturk B, Hancer M, Ocsoy I, Özdemir N. Synthesis of copper ion incorporatedhorseradish peroxidase-based hybrid nanoflower for enhanced catalytic activ-ity and stability. Dalton Trans 2015, http://dx.doi.org/10.1039/C5DT01250.C.

[31] Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phyto-chemistry 2004;65:249–59.

[32] Ocsoy I, Gulbakan B, Shukoor M, Xiong X, Chen T, Powell DH, et al. Aptamerconjugated multifunctional nanoflowers as a novel platform for targeting, cap-ture and detection in laser desorption ionization mass spectrometry. ACS Nano2013;7:417–27.

[33] Ocsoy I, Paret ML, Arslan Ocsoy M, Kunwar S, Chen T, You M, et al. Nanotech-nology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles ongraphene oxide as an antibacterial against xanthomonas perforans. ACS Nano2013;7:8972–80.

[34] Ma X, Zhao Y, Liang X. Theranostic nanoparticles engineered for clinic andpharmaceutics. Acc Chem Res 2011;44:1114–22.

[35] Ocsoy I, Gulbakan B, Chen T, Zhu G, Chen Z, Sari MM, et al. DNA-guided-metal nanoparticle formation on graphene oxide surface. Adv Mater2013;25:2319–25.

[36] LaMer VK, Dinegar RH. Theory, production and mechanism of formation ofmonodispersed hydrosols. J Am Chem Soc 1950;72:4847–54.

[37] Kalın R, Atasever A, Özdemir H. The single-step purification of peroxidaseby4-aminobenzohydrazide from turkish black radish (Raphanus sativus L.) andturnip (Brassica rapa L.) roots. Food Chem 2014;50:335–40.

[38] Somtürk B, Kalın R, Özdemir N. Purification of peroxidase from red cab-bage (Brassica oleracea var. capitata f. rubra) by affinity chromatography. ApplBiochem Biotechnol 2014;173:1815–28.

[39] Mohsina H, Khalil-ur- R. Potential applications of peroxidases. Food Chem2009;115:1177–86.

[40] Meng XG, GuO Y, Hu C-W, Zeng X-C. Mimic model of peroxidase-kitenicstudies of the catalytic oxidation of hydroquinone by H2O2. J Inorg Biochem2004;98:2107–13.

[41] Chen S-x, Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions.Eur J Biochem 1999;260:726–35.

[42] Chalkias NG, Kahawong P, Giannelis EP. Activity increase of horseradishper-oxidase in the presence of magnetic particles. J Am Chem Soc 2008;130:2910–1.

[43] B. P. Roberts, B. R. Miller, A. E. III Roitberg, K. M. Jr. Merz, Wide-open flaps are key to urease activity.J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 9934–9937.

[44] A. Tiwari, S. Aryal, S. Pilla, S. Gong, An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. Talanta. 78 (2009) 1401–1407.

[45] J. Shalini, K. J. Sankaran, C. Y. Lee, N. H. Tai, I. N. Lin. An amperometric urea bisosensor based on covalent immobilization of urease on N2 incorporated diamond nanowire electrode. Biosens. Bioelectron. 56 (2014) 64–70.

[46] C. Ronco, R. Bellomo, P. Homel, A. Brendolan, M. Dan, P. Piccinni, G. L. Greca, Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. Lancet. 355 (2000) 26-30.

[47] P. A. Karplus, M. A. Pearson, R. P. Hausinger, Chemistry of Ni2+ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. Acc. Chem. Res. 30 (1997) 330-337.

[48] M. Tyagia, M. Tomar, V. Gupta, NiO nanoparticle-based urea biosensor. Biosens Bioelectrons. 41 (2013) 110–115.

7. EKLER

- Yayınlar

1. Somtürk Burcu,Hançer Mehmet,Öçsoy İsmail,Özdemir Nalan (2015). Synthesis of Copper Ion Incorporated Horseradish Peroxidase-Based Hybrid Nanoflower for Enhanced Catalytic Activity and Stability. Dalton Transactions, 44, 13845-13852.

2. Öçsoy İsmail, Doğru Esra,Usta Şeyda (2015). A New Generation of Flowerlike Horseradish Peroxides As A Nanobiocatalyst for Superior Enzymatic Activity. Enzyme and Microbial Technology, 75, 25-29.

3. Somtürk Burcu,Yilmaz İsmail, Özdemir Nalan, Öçsoy İsmail (2015). Synthesis of Urease Hybrid Nanoflowers and Their Enhanced Catalytic Properties. Enzyme and Microbial Technology. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.09.005.

- Konferanslarda Sunulan Bildiriler

1. Ismail Oçsoy, Nalan Özdemir and Burcu Somturk "A New Generation of Flower-Like Nanobiocatalyst for Superior Enzymatic Activity." Nanotech France 2015 International Conference and Exhibition, June 15-17th 2015, Paris, France (Oral)

2. Nalan Özdemir, Ismail Oçsoy, İsmail Yılmaz, Cevahir Altınkaynak and Hasan Özdemir "Preparation and Characterizaiton of Lactoperoxidase Hybrid Nanaoflowers (LPO hNFs)." NanoTR-11, June 22-25th 2015, Ankara, Turkey (Poster)

3. Ismail Oçsoy, Nalan Özdemir, Burcu Somtürk, Mehmet Hançer, Esra Dağru, Şeyda Usta "High catalytic activity and stability with Flower Shaped Synthesis and Applications of New Generation Nanobiyokatalizör."at the 27th General Chemistry Conference, August, 23-28th 2015, Çanakkale, Turkey, (Oral)