



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**METAL ORGANİK KAFES TABANLI
POLİMERİK FİLM HAZIRLANMASI VE FİŞİN
ENZİM UYGULAMALARI**

MERVE KADAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Burcu OKTAY

EŞ DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap DEMİR

İSTANBUL, 2024



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**METAL ORGANİK KAFES TABANLI
POLİMERİK FİLM HAZIRLANMASI VE FİŞİN
ENZİM UYGULAMALARI**

MERVE KADAL
520621003

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Burcu OKTAY

EŞ DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap DEMİR

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ

Bu çalışmamızda bana yol gösteren, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana yardımcı olan sevgili danışman hocam Doç.Dr. Burcu Oktay'a,

Yüksek Lisans eğitimimde ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde, bilgi ve destekleriyle her zaman yardımcı olan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen çok sevdiğim sevgili eş danışmanım Prof. Dr. Serap Demir'e,

FYL-2023-10989 no.lu Yüksek Lisans Tez çalışmamı destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonuna,

Çalışma hayatımda ve akademik olarak kendimi geliştirmem için her zaman destek olan sevgili direktörüm Aslı Bahadır'a,

Her konuda beni destekleyen ve sevgilerini her zaman hissettiğim, başta sevgili eşim Fatih Kadal olmak üzere tüm aileme her şey için sonsuz teşekkür ederim.

Haziran, 2024

Merve KADAL

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ	i
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER	viii
KISALTMALAR	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Giriş ve Amaç	1
1.2 Enzimler	2
1.3 Enzim Fonksiyonu	6
1.4 Fisin Enzimi	9
1.5 Enzim İmmobilizasyonu	11
1.6 Metal-Organik Çerçeveler	13
1.7 Kitosan	16
1.9 Fisin Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	17

2. MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1. Deneysel Çalışma Planı	19
2.2 Araştırma Araçları	20
2.3 Kimyasallar	21
2.4 Deneysel Yöntemler	21
2.4.1 Zeolit İmidazol Kafes (ZIF) Sentezi ve Amin Modifikasyonu	21
2.4.2 Kitosan Film	21
2.4.3 ZIF8-Kitosan Film	22
2.4.4 Enzim İmmobilizasyonu	22
2.4.5 Karakterizasyon	22
2.4.6 Aktivite Çalışması	22
2.4.7 Kinetik Parametrelerin Hesaplanması	22
2.4.8 Tekrar Kullanılabilirlik	23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
3.1 Filmlerin Yapısal Analizi	24
3.2 Enzim immobilizasyonu	25
3.3 pH Etkisi	27

3.4 Sıcaklık Etkisi	29
3.5 Kinetik Değerler	30
3.6 Tekrar Kullanılabilirlik	32
3.7 Depolama Zamanı	33
4. SONUÇLAR	34
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	40

ÖZET

METAL ORGANİK KAFES TABANLI POLİMERİK FİLM HAZIRLANMASI VE FİSİN ENZİM UYGULAMALARI

Bu çalışmada, incir ağaçlarının lateksinden ekstrakte edilen proteaz aktivitesinin yanı sıra, içsel peroksidaz benzeri aktiviteye sahip bir sistein proteolitik enzimi olan fisin, zeolitik imidazolat çerçevesi-8 (ZIF8)-Kitosan ve Kitosan filmlerine immobilize edildi. Kitosan ve ZIF8-Kitosan filme sırasıyla gram polimere 0,486 mg ve 0,666 mg enzim bağlandığı ve enzim bağlanma yüzdeleri 61,7 ve 72,5 şeklinde bulundu. Fisin, yükleme kapasitesi nedeniyle ZIF8-Kitosan filmine özellikle daha iyi immobilize olmuştur.

Serbest fisin pH 7 ve 60 °C'de maksimum aktivite gösterirken, immobilize Kitosan-Enzim pH 8 ve 80°C ve ZIF8-Kitosan-Enzim pH 6 ve 80°C'de maksimum aktivite göstermişlerdir. Immobilize enzimlerin termal stabilitelerinin arttığı görülmektedir. Immobilize enzimlerin V_{maks} değerleri, serbest formunkinden daha düşük, K_m değerleri ise daha yüksek tayin edilmiştir.

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin geri kazanılması ve yeniden kullanılabilirliği başarılı operasyonlar için anahtar faktörlerden biridir. Birbirini takip eden 15 tekrardan sonra immobilize Kitosan-Enzim ve ZIF8-Kitosan-Enzim başlangıç aktivitelerini yaklaşık %50 ve 55 oranında korumuştur. Serbest fisinin, Kitosan-Enzim ve ZIF8-Kitosan-Enzim üzerinde 60 günlük bir süre boyunca depolama stabilitesi incelendiğinde yaklaşık %30, %14 ve %10 aktivite kaybı gösterdikleri bulunmuştur.

Haziran, 2024

Merve KADAL

ABSTRACT

PREPARATION OF METAL ORGANIC FRAMEWORK POLYMERIC FILM AND APPLICATIONS OF FICIN ENZYME

In this study, ficin, a cysteine proteolytic enzyme with intrinsic peroxidase-like activity, as well as protease activity extracted from the latex of fig trees, was immobilized into zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF8)-Chitosan and Chitosan films. It was found that 0.486 mg and 0.666 mg of enzyme were bound to Chitosan and ZIF8-Chitosan film per gram of polymer, respectively, and the enzyme binding percentages were 61.7 and 72.5. Ficin was particularly better immobilized to the ZIF8-Chitosan film due to its loading capacity.

While free ficin showed maximum activity at pH 7 and 60 °C, immobilized Chitosan-Enzyme showed maximum activity at pH 8 and 80 °C and ZIF8-Chitosan-Enzyme showed maximum activity at pH 6 and 80 °C. It appears that the thermal stability of immobilized enzymes increases. Vmax values of immobilized enzymes were determined to be lower than those of the free form, and Km values were determined to be higher.

In industrial applications, the recovery and reusability of enzymes is one of the key factors for successful operations. After 15 consecutive repetitions, immobilized Chitosan-Enzyme and ZIF8-Chitosan-Enzyme retained their initial activities at approximately 50 and 55%. When the storage stability of free ficin on Chitosan-Enzyme and ZIF8-Chitosan-Enzyme was examined over a period of 60 days, it was found that they showed approximately 30%, 14% and 10% loss of activity.

January, 2024

Merve KADAL

SEMBOLLER

%	: Yüzde
°C	: Santigrad derece
β	: Beta
γ	: Gama
g	: Gram
mL	: Mililitre
L	: Litre
pH	: Hidrojenin kuvveti
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
v	: Hacim
w	: Ağırlık
mM	: Milimolar

KISALTMALAR

E	: Enzim
ES	: Enzim-substrat kompleksi
KTS	: Kitosan
K_m	: Michaelis Menten sabiti
MOF	: Metal Organik Çerçeve
S	: Substrat
V_{max}	: Maksimum hız
ZIF	: Zeolit İmidazol Çerçeve

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Genel enzim modeli	3
Şekil 1.2. Anahtar ve kilit modeli	3
Şekil 1.3. Uyarılmış uyum modeli	4
Şekil 1.4. Enzim serbest enerji-reaksiyon yönü grafiği	6
Şekil 1.5. Michaelis-Menten eğrisi	8
Şekil 1.6. Lineweaver Burk grafiği	9
Şekil 1.7. Fisin kullanım alanları	10
Şekil 1.8. Enzim immobilizasyon çeşitleri	13
Şekil 1.9. ZIF yapısı	15
Şekil.1.10. Kitinin deasetilasyonu ile kitosan eldesi	17
Şekil 2.1. Deneysel çalışma planı	20
Şekil 3.1. ZIF ATR-FTIR grafiği	24
Şekil 3.2. Kitosan grafiği	25
Şekil 3.3. Protein standart grafiği	27
Şekil 3.4. Serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi	28
Şekil 3.5. Ürün standart grafiği	29
Şekil 3.6. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	31

Şekil 3.7. Kinetik çalışmaya ait grafikler	32
Şekil 3.8. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği	33
Şekil 3.9. Depolama kararlılığı	34



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Enzim sınıflandırması	5
Tablo 3.1. İmmobilizasyon verimi	26
Tablo 3.2. Kinetik parametreler	31



1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Biyolojik makromoleküllerden biri olan enzimler yaşamın ilerlemesinde hayati rol oynar. Doğal biyokatalizör olarak enzimler, temel ve karmaşık reaksiyonlarda yüksek katalitik aktivite, seçicilik, özgülük ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi avantajlar sergiler. Bu avantajlardan yararlanan enzimler, farmasötik araştırmalar, gıda modifikasyonu, deterjan, biyoyakıt geliştirme, tarımsal sanayi ve balıkçılık atıklarının değerlendirilmesi gibi çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Feng vd, 2022). Bununla birlikte, serbest enzimlerin genellikle ekstraksiyon, ayırma ve saflaştırmadaki zorluklardan dolayı yüksek maliyet, zorlu ortamlarda düşük tolerans ve zayıf stabilite (termal, pH ve depolama kararlılığı), yeniden kullanılabilirlik eksikliği gibi birçok doğal dezavantajı vardır. Çok sayıda çalışma, etkili immobilizasyon stratejilerinin kullanılmasının sorunların üstesinden gelmek için uygun yöntemlerden biri olduğunu göstermiştir.

Enzim immobilizasyonu, serbest enzimlerin katı maddeler içinde hapsedilmesi veya belirli fiziksel veya kimyasal önlemlerle verimli bir şekilde katalize edilmesi için belirli bir bölgeye sınırlandırılması, tekrar tekrar ve seri olarak kullanılmasına olanak sağlanması anlamına gelir. Immobilizasyondan sonra enzimlerin stabilitesi ve katalitik performansı artar. Ayrıca, enzimlerin immobilizasyonu, enzimlerin substrat, ürün ve ortamdan ayrılmasına yardımcı olur ve bu da onların yeniden kullanımını kolaylaştırır. Etkili destek platformlarının geliştirilmesi, enzim immobilizasyonunda her zaman araştırmaların sıcak noktası olmuştur. İdeal bir immobilizasyon desteği, enzim katalizli reaksiyonlara olanak tanıyan biyoyumlu bir mikro ortam, enzimleri yükleme kapasitesinin yüksek olması ve ayrıca enzimlerin denatürasyonunu ve deaktivasyonunu önlemek için termal, mekanik ve kimyasal stabilite sağlayabilmelidir (Ji vd.,2024).

Metal Organik Çerçeveler (MOF), metal iyonları veya kümeleri ve organik bağlayıcılardan oluşan, nano gözenekli ve genellikle kristalin malzemelerin bir sınıfını oluşturur. Bu yapılar, biyoyumlulukları, geniş yüzey alanları, ayarlanabilirlikleri ve iyi tanımlanmış gözenekleri nedeniyle enzimler için taşıyıcı olarak yaygın şekilde kullanılır

ve onlara diğ er taşıyıcılara göre çok büyük bir avantaj sağlar (Alvarado-Ram rez vd, 2024).

Toksik olmayan, biyobozunur, biyoyumlu ve biyo-yenilenebilir bir polisakkarit olan kitosan, enzimlerin anyonik kalıntılarıyla kolayca iyonik bağlar oluşturan reaktif amino gruplarına sahiptir ve enzim immobilizasyonu potansiyelini arttırmaktadır (Cabrera-Barjas vd, 2024)

Bu çalışmada, incir ağaçlarının lateksinden ekstrakte edilen proteaz aktivitesinin yanı sıra, içsel peroksidaz benzeri aktiviteye sahip bir sistein proteolitik enzimi olan fisin, zeolitik imidazolat  er evesi-8 (ZIF8)-kitosan ve kitosan filmlerine immobilize edildi. İlk olarak ZIF8 sentezlendi ve amin grupları ile modifiye edildi. Modifiye edilmiş ZIF8, kitosan ile karıştırıldı ve ATR-FTIR ile karakterize edildi. Hazırlanan filmlere fisin immobilize edildi. Sıcaklık ve pH'ın serbest ve immobilize enzimler üzerindeki etkileri incelendi. Kinetik parametreler, tekrar kullanılabilirlik ve depolama süresi belirlendi.

1.2. Enzimler

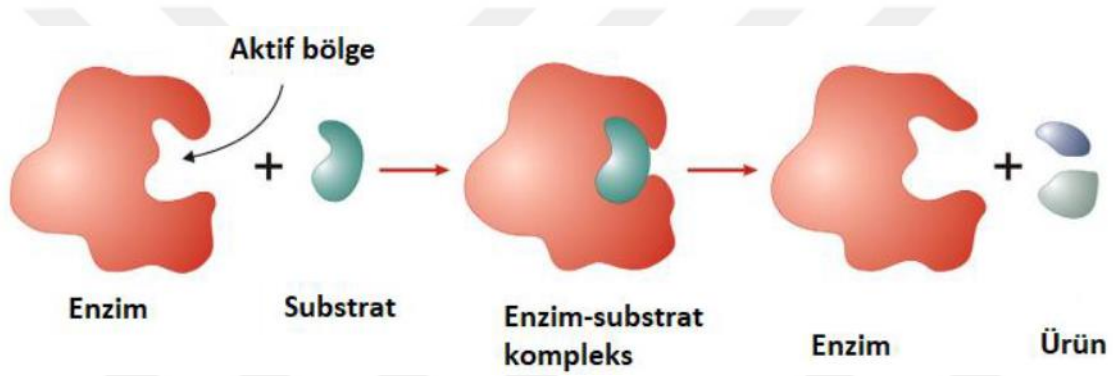
Enzimler, çoğu canlı tarafından oluşturulan ve belirli biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek için katalizör görevi gören biyolojik makromoleküller veya maddelerdir. Hücredeki metabolik süreçler ve diğer kimyasal reaksiyonlar, yaşamın sürdürülmesi için gerekli olan bir dizi enzim tarafından gerçekleştirilir. Metabolik sürecin başlangıç aşaması, substrat adı verilen bir molekülle reaksiyona giren enzimlere bağlıdır. Enzimler substratları ürün olarak bilinen diğer farklı moleküllere dönüştürür.

Enzimlerin düzenlenmesi, yaşam süreçlerini sürdürmedeki rolleri nedeniyle klinik tanıda önemli bir unsur olmuştur. Ribozim adı verilen RNA katalizörleri sınıfı dışında, tüm enzimlerin makromoleküler bileşenleri proteinden oluşur. Ribozim kelimesi ribonükleik asit enziminden türetilmiştir. Birçok ribozim, kendi bağlarından birinde veya diğer RNA'lar arasında reaksiyonları katalize eden ribonükleik asit molekülleridir.

Enzimler esas olarak hücre içi ve hücre dışı enzimlere ayrılır. Mikroorganizmalar tarafından salgılanan hücre dışı enzimler, gıda, tekstil, biyorafineriler, tarım, k ğıt hamuru ve k ğıt, yem, deterjan ve ilaç gibi endüstrilerde yaygın olarak uygulanabilmeleri

nedeniyle önemli biyokatalizörlerdir.

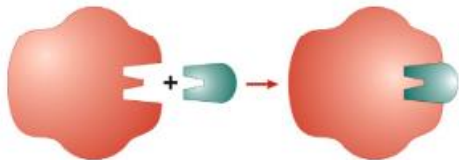
Enzimlerin yapıları, reaksiyonun meydana geldiği aktif bir bölgenin varlığı nedeniyle, katalize ettikleri reaksiyona ve dolayısıyla dahil olan reaktanlara (substrat) oldukça spesifiktir. Aktif bölge enzim içinde spesifik bir amino asit yapısına sahip küçük bir yarıktır ve substratın bağlanmasını ve enzim-substrat kompleksini (ES) oluşturmasını sağlar; bu kompleks, reaksiyon tamamlandığında kompleksin ayrışmasını sağlamak üzere zayıf bağlarla bir arada tutulur. Enzimin geri kalanı bir iskele görevi görerek bu önemli amino asitleri bir araya getirir.(Şekil 1.1)



Şekil 1.1 Genel enzim modeli (Blanco ve Blanco, 2017)

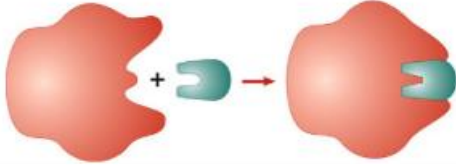
Aktif bölge, spesifik substratın şeklinin tamamlayıcısıdır. Bu etkileşimin nasıl gerçekleştiğine ilişkin iki ana model vardır:

Anahtar ve kilit modeli – aktif bölge substrata mükemmel uyum sağlar ve bağlanması için herhangi bir değişiklik gerektirmez.(Şekil 1.2)



Şekil 1.2 Anahtar ve kilit modeli (Blanco ve Blanco, 2017)

Uyarılmış uyum modeli: Aktif bölge substratın neredeyse tamamlayıcısıdır ancak bağlandığında enzim, aktif bölgenin şeklinin daha iyi uyum sağlaması için konformasyonel değişikliklere uğrar. Kilit ve anahtar modeline göre daha kabul görmektedir. (Şekil 1.3.)



Şekil 1.3 Uyarılmış uyum modeli (Blanco ve Blanco, 2017)

Enzimlerin en iyi şekilde çalışabilecekleri bir optimum sıcaklık ve pH değeri vardır; bu, enzimin işlevine ve hem hücresel hem de organ konumuna bağlı olarak değişir. pH'daki değişiklikler kritik iyonlaşma durumlarını değiştirebilir, sıcaklıktaki değişiklikler ise önemli bağları bozarak enzimin yapısını ve dolayısıyla işlevini etkileyebilir.

Şiddetli sıcaklık ve/veya pH değişikliklerine maruz kalması durumunda aktif bölgenin şekli değişebilir. Buna enzim denatürasyonu denir ve enzimin artık substratına bağlanamayacağı veya biyolojik işlevini yerine getiremeyeceği anlamına gelir.

Enzim Komisyonu (EC) numarası, bu proteinlerin katalize ettiği kimyasal reaksiyonlara dayanan bir isimlendirme sistemidir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından geliştirilmiştir ve her sayının enzim katalizli bir reaksiyonla ilişkilendirildiği sayısal bir sınıflandırma şemasından oluşur (McDonald ve Tipton, 2021).

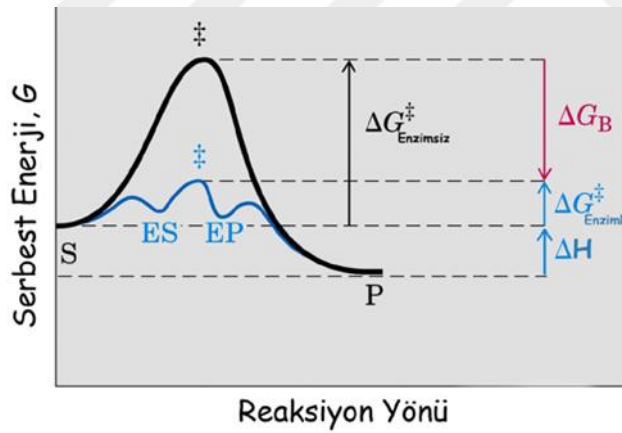
Tablo 1.1 Enzim sınıflandırması

EC 1: Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler.
EC 2: Transferazlar	Fonksiyonel bir grubu (örneğin bir metil veya fosfat grubu) aktaran enzimler.
EC 3: Hidrolazlar	Çeşitli bağların hidrolizini katalize eden enzimler.
EC 4: Liyazlar	Hidroliz ve oksidasyon dışındaki yollarla çeşitli kimyasal bağları kıran, sıklıkla yeni bir çift bağ veya halka yapısı oluşturan enzimler.
EC 5: İzomerazlar	Moleküller içindeki grupların izomerik formlar elde etmek üzere transferini katalize eden enzimler.
EC 6: Ligazlar	Tipik olarak ATP kullanarak iki molekülü bir araya getiren enzimler.
EC 7: Translokazlar	İyonların veya moleküllerin zarlar boyunca hareketini veya bunların zarlar içinde ayrılmasını katalize eden enzimler.

Bir EC numarası tipik olarak, önerilen bir isimle bağlantılı, noktalarla ayrılmış dört sayıdan oluşan bir dizi olarak temsil edilir. Örneğin EC 1.1.1.1 (alkol dehidrojenaz). Birinci Sayı: Reaksiyonun türü veya enzim sınıfını ifade eder ve her birinin katalize ettiği reaksiyonun türüne bağlı olarak enzim sınıfını gösterir (Tablo 1). İkinci ve üçüncü sayılar: Enzim alt sınıfı ve alt alt sınıfı olup enzim katalizli reaksiyonda yer alan moleküler grup, bağ veya ürünün türü hakkında daha fazla ayrıntı sağlayarak reaksiyonun özgüllüğünü daraltır. Dördüncü sayı enzimin seri numarasıdır. Enzim katalizli reaksiyonda yer alan spesifik metabolitler ve/veya kofaktörlerle ilgili spesifik enzim kimliğini temsil eder (McDonald ve Tipton, 2021).

1.3. Enzim Fonksiyonu

Enzimler, bir reaksiyonun gerçekleşmesi ve substratları ürünlere dönüştürmesi için gereken minimum enerji girdisi olan daha düşük aktivasyon enerjisine (E_a) sahip olan bir reaksiyon için alternatif bir yol sağlar.



Şekil 1.4. Enzim serbest enerji-reaksiyon yönü grafiği

Geçiş durumu, substrat ile ürünü arasında reaksiyonun geçtiği moleküler bir ara maddedir. Zayıf substrat bağlanması üzerine, enzimin aktif bölgesi, geçiş durumuna ilk substrattan daha iyi uyacak şekilde konformasyonu değiştirir, dolayısıyla bu geçiş durumuna daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu, ona ulaşmak için gereken aktivasyon enerjisini azaltır. Bu nedenle substrat aktif bölgeye bağlandığında reaksiyonun devam

etmesi teşvik edilir ve geçiş durumuna ve sonuçta reaksiyonun nihai ürününe dönüştürülür. Enerji açısından olumlu olan bu süreç, belirli bir süre içinde daha fazla substrat molekülünün ürünlere dönüştürülmesine olanak tanır.

Geçiş hali yüksek enerjiye sahip olduğundan kararsızdır ve yalnızca geçici olarak var olabilir. Kendiliğinden daha düşük enerjiye sahip, daha kararlı bir ürüne dönüşür. Enzimin aktif bölgesinin bu ürüne afinitesi düşüktür, dolayısıyla ayrışır ve serbest bırakılır.

Herhangi bir reaksiyonun hız sınırlayıcı adımı en yavaş adımıdır ve tüm reaksiyonun hızını belirleyen de budur. Enzimatik reaksiyonlarda enzim-substrat kompleksinin ürüne dönüşümü normalde hız sınırlayıcıdır. Bu adımın hızı (ve dolayısıyla tüm enzimatik reaksiyon), ES kompleksinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaksiyon ilerledikçe ES kompleksinin konsantrasyonu değişir ve dolayısıyla ürün oluşum hızı da buna göre değişir. Reaksiyon dengeye ulaştığında (kararlı durum fazı), ES konsantrasyonu (ve dolayısıyla reaksiyon hızı) nispeten sabit kalır.

Michaelis-Menten kinetiği, enzim katalizli reaksiyon hızının, enzim ve substrat konsantrasyonuna nasıl bağlı olduğunu açıklayan bir enzim kinetiği modelidir. Substratın (S), enzime (E) geri dönüşümlü olarak bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturduğu ve daha sonra geri dönüşümsüz bir şekilde reaksiyona girerek ürün (P) oluşturduğu ve enzimi tekrar serbest bıraktığı bir reaksiyon olarak ifade edilir. (Şekil 1.4)



Michaelis-Menten kinetiğinde iki anahtar terim şunlardır:

V_{maks} : Enzimin aktif bölgelerinin tümü substratla doyurulduğunda bu, reaksiyonun maksimum hızıdır.

K_m (Michaelis sabiti) – Maksimum hızın %50'si olduğu substrat konsantrasyonu Michaelis sabiti (K_m) olarak bilinir. Enzimin substratına olan afinitesinin bir ölçüsüdür; K_m değeri ne kadar düşükse, enzimin substratına olan ilgisi o kadar fazladır ve daha

düşük substrat konsantrasyonlarında aktivite gösterir.(Şekil 1.5)

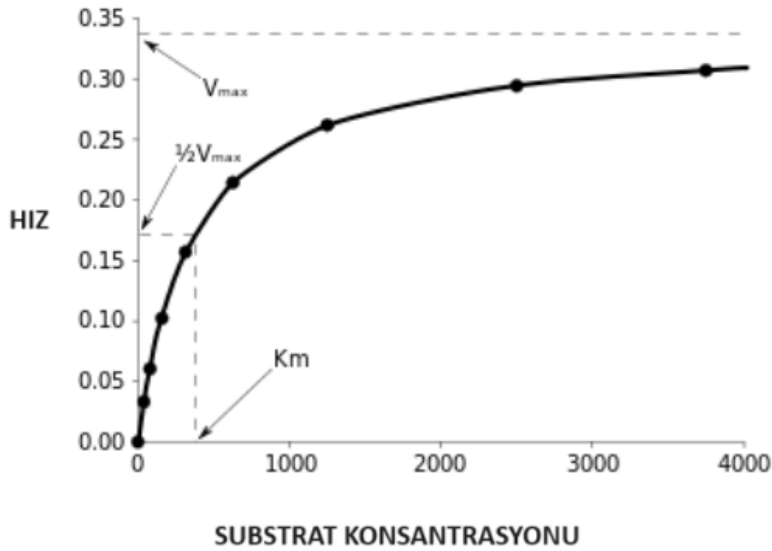
Yukarıdaki reaksiyon için Michaelis-Menten denklemi şöyledir:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

V= Hız

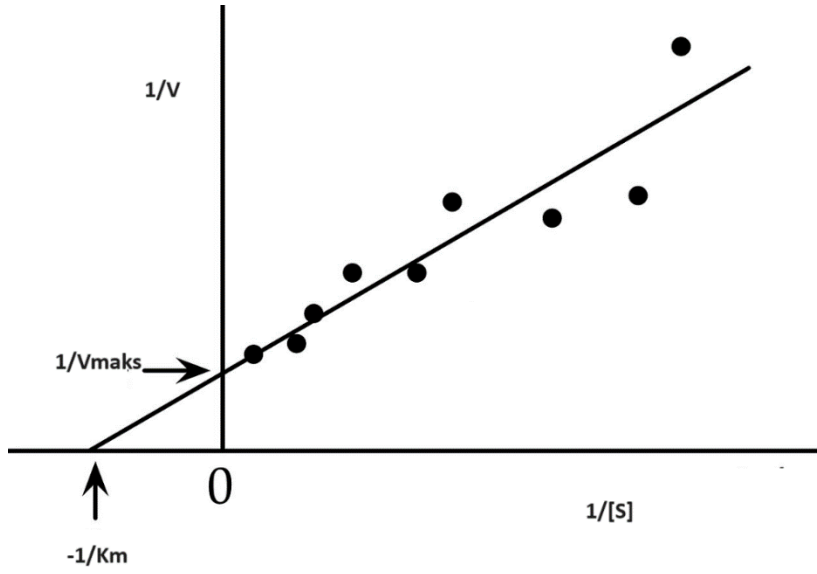
Vmaks= Maksimum hız

S= Substrat



Şekil 1.5 Michaelis-Menten Eğrisi

Substrat konsantrasyonuna karşı reaksiyon hızının bu grafiği, dikdörtgen bir hiperbol şekline sahiptir. Bununla birlikte, Michaelis-Menten kinetiğinin daha kullanışlı bir temsili, Lineweaver-Burk grafiği olarak adlandırılan ve reaksiyon hızının tersini (1/V) substrat konsantrasyonunun tersine (1/[S]) karşı gösteren bir grafikdir.(Şekil 1.6)



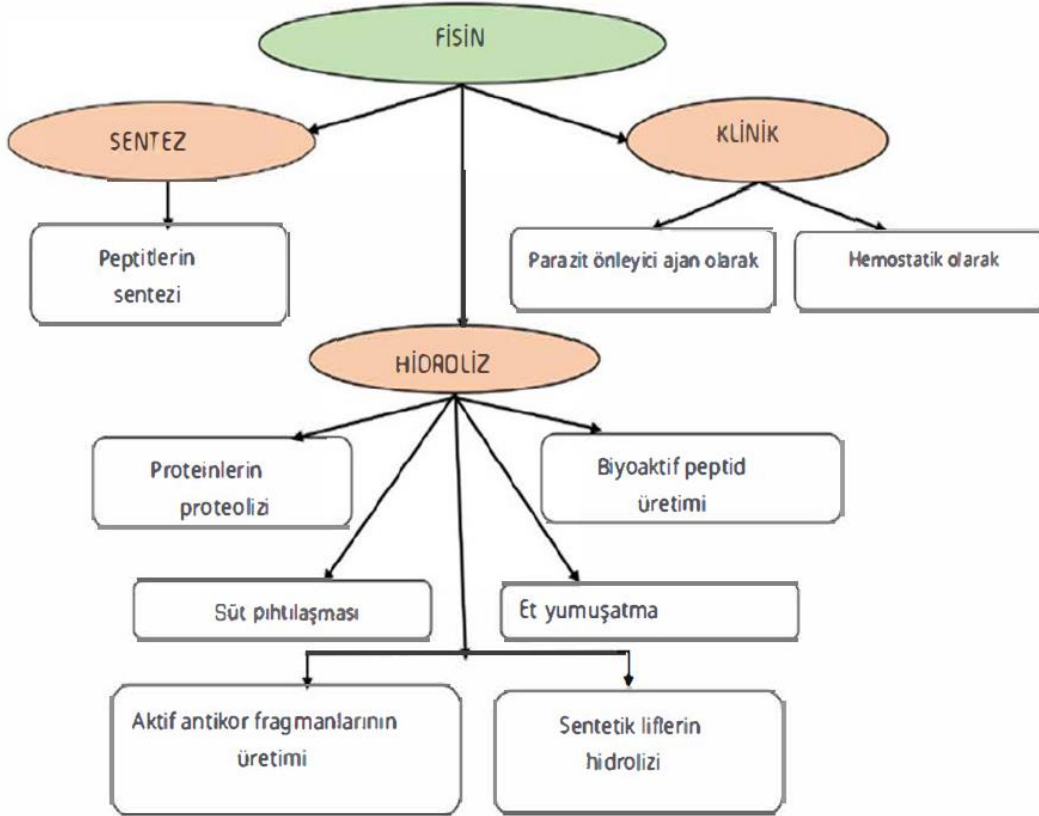
Şekil 1.6 Lineweaver Burk grafiği

Bir enzimin aktivitesi, belirli bir sürede bir reaksiyonda oluşan ürün veya tüketilen substrat miktarının ölçülmesiyle belirlenir. Başlangıç hızı, tüketilen substrat miktarı başlangıçta mevcut olan toplam substratın %20'sinden az olduğunda ölçülen aktiviteye karşılık gelir. Enzim aktivitesi, uluslararası birimler (IU) veya tanımlanmış pH ve sıcaklık koşulları altında saniyede 1 μ mol substratın dönüşümünü katalize eden enzim miktarı cinsinden ifade edilir. Spesifik aktivite, miligram protein başına enzim birimidir. Molar aktivite veya devir sayısı, enzim hız sınırlayıcı faktör olduğunda, tek bir enzim molekülü tarafından dakikada dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısı olarak tanımlanır. Enzimatik reaksiyonun hızı, numunede bulunan enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Ayrıca S konsantrasyonu, ortam sıcaklığı ve ortamın pH'ı reaksiyon hızını etkiler.

1.4. Fisin Enzimi

Fisin (EC 3.4.22.3) proteaz aktivitesinin yanı sıra, intrinsik peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğu tespit edilen incir ağaçlarının lateksinden ekstrakte edilen bir sistein proteolitik enzimdir (Aider 2021; Long vd., 2020). 10-15 gram ağırlığındaki bir yeşil incir, 100-150 mg proteaz içerir. Fisin proteolitik aktivitesini pH 5-8 ve 45-55°C sıcaklık aralığında gösterir. Şimdiye kadar 3 fisin fragmanı incelenmiştir: Sistein (Cys) katalitik bölgesi etrafındaki bir fragman, Histidin (His) çevresindeki katalitik bir fragman ve N-terminal fragmanı (Aider 2021).

Fisin, katalitik mekanizması aktif bölgedeki bir Cys grubunu içeren sistein proteazlar grubuna aittir. Tiyol proteazlar olarak da bilinen sistein proteazlar, bir proteinin sisteinden gelen nükleofilik bir tiyol kullanarak peptit bağlarına etki ederek proteinlerin parçalanmasını katalize eder. *Ficus carica*'dan elde edilen proteazlar, Glisin (Gly), Valin (Val), Lösin (Leu), Alanin (Ala), Serin (Ser), Asparajin (Asn), Arginin (Arg) ve His gibi temel ve nötr aminoasitlere karşı karşı geniş bir spesifikliğe sahiptir. Fisin, Tirozin (Tyr), Fenilalanin (Phe) ve Val bağlarındaki proteinleri parçalar (Aider 2021).



Şekil 1.7 Fisin Kullanım alanları

Fisin, protein hidrolizatları üretmek için ve et ürünlerinde yumuşaklığın arttırılması, bira için soğuğa karşı koruma maddesi, hamur yumuşatıcı, peynir mayası ikamesi ve önceden pişirilmiş tahıllar için işleme yardımcısı gibi farklı gıda uygulamalarında kullanılmaktadır (Aider 2021). (Şekil 1.7)

Fisin intrinsik peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olması nedeni ile glikoz, dopamin, L-sistein gibi bazı biyomateryallerin tespitinde kullanılmaktadır. Ancak stabilitesinin düşük olması nedeniyle analitik uygulamalarda peroksidaz benzeri bir enzim olarak kullanım oranı düşüktür. (Long vd., 2020).

1.5. Enzim İmmobilizasyonu

Geleneksel katalizörlerle karşılaştırıldığında enzim kullanımının büyük avantajlarına rağmen, bunların serbest formlarında kullanımında bazı zorluklar ortaya çıkar. Büyük ölçekli uygulamalarda serbest enzimlerin kullanımı kararsız ve kısa bir raf ömrüne sahip olmaları nedeni ile uygun değildir. Enzimler yüksek sıcaklık, aşırı pH gibi çeşitli zorlu proses koşullarına karşı oldukça hassastır. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılması bu hassasiyetler nedeniyle oldukça zor olmaktadır (Ji vd.,2024; Bolivar vd., 2022).

Bu eksikliklerin üstesinden gelmek için enzim immobilizasyonu, enzimlerin geniş ölçekli uygulamalarını genişletmek için etkili ve pratik bir yöntemdir. İmmobilize enzimler, tekrar kullanılmayı ve reaksiyon sisteminden hızlı ayrılmayı sağlarken aynı zamanda enzimin aktivitesini ve stabilitesini önemli ölçüde artırabilir. Enzim verimliliğini, stabilitesini ve aktivitesini arttıracak çok sayıda enzim immobilizasyon tekniği ortaya çıkmıştır. Bu stratejiler arasında adsorpsiyon, kovalent bağlanma, çapraz bağlama, tutuklama, MOF yerleştirme ve kapsülleme yer almaktadır. (Şekil 1.8) Enzim immobilizasyonunun etkinliği ve immobilize edilmiş enzimin genel performansı immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı malzemenin seçimi gibi faktörlerden önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle uygun taşıyıcıların geliştirilmesi ve tasarımı her zaman immobilizasyon teknolojisinin temel sorunu olmuştur (Ji vd.,2024; Bolivar vd., 2022).

Taşıyıcı malzemeler enzim immobilizasyonunda önemli bir rol oynar. Taşıyıcılar sadece

enzimler için uygun bir mikro ortam sağlamakla kalmaz, aynı zamanda immobilize edilmiş enzimlerin stabilitesini ve yeniden kullanılabilirliğini de etkiler. Bu malzemeler, inorganik malzemeler, organik malzemeler ve organik-inorganik kompozit malzemeler dahil olmak üzere bir dizi seçeneği kapsar. Enzim immobilizasyonunda etkili ve stabil destek olarak çok çeşitli inorganik ve organik malzemelerin yanı sıra kompozit malzemeler de kullanılabilir. Nanokompozitler, inorganik ve organik özelliklerin birleşiminden kaynaklanan benzersiz avantajları nedeniyle, enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan ve etkili taşıyıcılar olarak ortaya çıkmıştır. Nanomalzemeler tipik olarak yüksek yükleme kapasitesine ve immobilize enzimlerin yeniden kullanılabilirliğine katkıda bulunan geniş spesifik yüzey alanları, önemli miktarda gözeneklilik busayede de enzime ait bol miktarda aktif bölge sergiler (Ji vd.,2024; Bolivar vd., 2022).

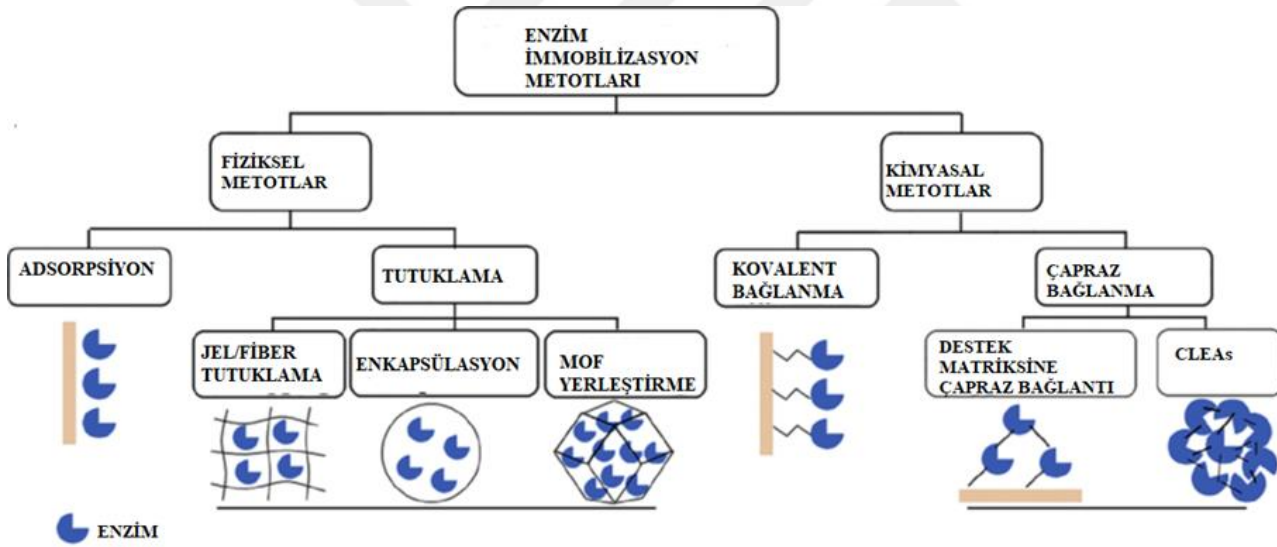
İmmobilizasyon yöntemleri aynı zamanda immobilize edilmiş enzimin özelliklerini etkiler. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, kullanımı nispeten kolay olmasına ve daha yüksek enzim aktivitesini sürdürmesine rağmen, enzimler ve taşıyıcılar arasındaki zayıf etkileşimler nedeniyle sıklıkla enzim sızıntısına sebep olur. Kovalent bağlanma ise daha güçlü etkileşimler sağlayarak enzim sızıntısını en aza indirir ve enzim stabilitesini ve yeniden kullanılabilirliğini artırır. Ancak bu yöntem aynı zamanda zorlu reaksiyon koşulları nedeniyle geri dönüşü olmayan enzim inaktivasyonuna da yol açabilir. Başka bir yaklaşım olan gömme yöntemi, mekanik stabiliteyi artırır ve enzim sızıntısını azaltır ancak reaksiyon koşulları üzerinde sıkı kontrol gerektirir (Ji vd.,2024; Bolivar vd., 2022).

Enzim immobilizasyonu hem kullanılan enzimlerin hem de destek malzemelerinin kolayca geri kazanılmasına olanak tanır ve bu özellikle gıda, tıbbi ve farmasötik uygulamalarda faydalıdır. Enzimlerin immobilize formlarının çok daha yüksek stabiliteye sahip olmaları, reaksiyonlarda tekrar tekrar kullanılmalrı ve serbest formlarıyla karşılaştırıldığında kullanımı daha kolaydır. İmmobilizasyon işleminin bir diğer faydası, enzimatik bağlanma sonrasında katalizörlerin homojenden heterojen formlara dönüşebilmesidir, bu da enzimlerin ayrılmasına ve yüksek saflıkta ürünler üretilmesine yardımcı olmaktadır (Ji vd.,2024; Bolivar vd., 2022).

Enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan destekler arasında doğal

polimerler, karbon nanotüpler, grafen oksit ve benzerleri yer almaktadır. Bu materyaller enzimlerin aktivitesini ve stabilitesini etkili bir şekilde geliştirebilir ve ürünlerin inhibisyonunu azaltabilir. Bu mükemmel özelliklere rağmen, immobilize enzimlerin bu malzemelerle mevcut uygulamaları hala düşük yükleme verimliliği, esnek olmayan gözenek boyutları gibi özellikleri ile sınırlıdır. Bu nedenle yeni immobilizasyon matrislerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır (Feng vd., 2022).

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesi enzim immobilizasyonu için birçok yeni fırsat sağlamıştır. Gözenekli nanomalzemelerin geliştirilmesi dikkate değer başarılar sağlamıştır. Özellikle metal-organik çerçeveler (MOF'ler) yeni gözenekli çerçeve malzemeleri olarak çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Feng vd., 2022).



Şekil 1.8 Enzim immobilizasyon çeşitleri

1.6. Metal-Organik Çerçeveler

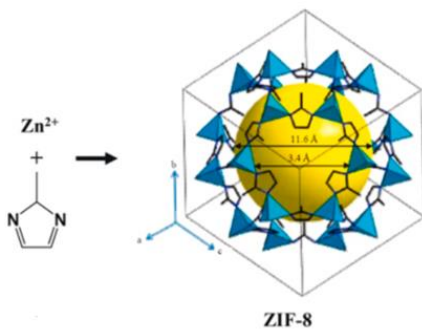
Metal-Organik Çerçeveler (MOF'ler), metal bazlı düğümlerden ve fonksiyonel gruplara (örneğin, karboksilatlar, aminler, nitratlar, fosfatlar ve sülfonatlar) sahip organik ligandlardan oluşan, inorganik ve organik materyallerdir (Bilal vd.,2019). Çeşitli post-

sentetik modifikasyon tekniklerinin yardımıyla, MOF'ların kimyasal fonksiyonları, düğümlerin ve bağlayıcıların rasyonel tasarımı yoluyla spesifik uygulamalar için hassas bir şekilde uyarlanabilir (Feng vd., 2022). Bugüne kadar MOF'ler adsorpsiyon (Howarth vd., 2015), kataliz (Song vd., 2019), gaz depolama ve ayırma (Rodenas vd., 2015), algılama (Huang vd.,2024), ilaç salınımı (Xiang vd.,2024) gibi çeşitli alanlarda büyük ilgi görmüştür. MOF'ların derinlemesine araştırılması ve başarılı bir şekilde geliştirilmesiyle, çeşitli topolojiye sahip MOF'lar tarafından enzim immobilizasyonunun geniş çapta rapor edildiği görülmektedir (Feng vd., 2022). Enzim immobilizasyon matrisleri olarak MOF'ların sağladığı avantajların ilki ultra yüksek yüzey alanına (hatta 6000 m²/g'ye kadar) sahip olmasıdır ve bu daha yüksek miktarda enzim yüklenmesini sağlar. İkinci olarak, MOF iskeleleri, farklı moleküler ağırlık boyutlarına sahip enzimlerin immobilizasyonuna olanak sağlayan açıklık boyutunun ve yapısının ayarlanması yoluyla enzimle eşleşecek şekilde tasarlanabilir. Üçüncüsü, yüksek düzeyde düzenli çerçevenin enzimlere karşı koruma etkisidir ve özellik onları yüksek sıcaklık, organik çözücü ve aşırı yüksek asidik veya alkali ortam gibi zorlu koşullar altında daha kararlı hale getirir. Ayrıca enzimin ayrıştırılmasını ve saflaştırılmasını sağlayarak yeniden kullanılabilirliğini sağlar. Tüm bunlar MOF'ların uygulama alanlarını artırır. Enzim immobilizasyonu için MOF kavramı ilk kez 2006'da bildirildiğinden beri, farklı stratejiler yoluyla enzimleri immobilize etmek için MOF'ları taşıyıcı olarak kullanan çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (Feng vd., 2022). Enzim ve MOF matrisi arasındaki etkileşim moduna göre, enzim-MOF kompozitleri oluşturma stratejileri temel olarak yüzey biyokonjugasyonu (fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlantı dahil), MOF'ların gözenek ağlarına difüzyon (infiltrasyon) ve yerinde kapsülleme şeklinde olabilmektedir (Feng vd.,2022).

Yerinde kapsülleme, enzimlerin önceden sentezlenmiş bir yapıya enjekte edilmesi yerine, MOF sentezinin ve enzim ilavesinin tek bir kaptaki yapılmasıdır. Buna aynı zamanda de novo kapsülleme denir. Difüzyon stratejisine benzer şekilde, bu strateji enzimlerin denatürasyonunu ve deaktivasyonunu önlemek için 3 boyutlu mikro ortam sağlar. Bununla birlikte, yerinde kapsülleme stratejisinin, enzimin moleküler boyutu ve MOF boşluğunun yapısı konusunda özel bir gerekliliği yoktur. Bu stratejide, enzimler MOF'ların gözeneklerinde veya kanallarında değildir, ancak ihmal edilebilir düzeyde enzim ile MOF'ların çerçevesi ile çevrelenmiştir. Üstelik bu 'tek kap' stratejisi immobilizasyon sürecini basitleştirir. Enzimlerin denatürasyonunu önlemek için bu stratejinin genellikle

ılımlı koşullar altında (örneğin, sulu çözelti ve oda sıcaklığı) uygulanması gerekir. Bu durum MOF'nin organik çözücülerde hazırlanmasının neden olduğu su stabilitesi sorununun kısıtlamalarının üstesinden gelir. Ancak bu immobilizasyon stratejisinde kullanılacak MOF'lar sentez koşullarının kısıtlı olması nedeniyle oldukça sınırlıdır. Yerinde kapsülleme için kullanılacak MOF'lar arasında Zeolit İmidazol Kafes(ZIF)'ler, Hong Kong University of Science and Technology (HKUST)-1 ve metal-azolate frameworks (MAF)-7 yer almaktadır; bunların arasında zeolitik imidazolat çerçeve-8 (ZIF-8), hafif olması nedeniyle en çok kullanılan iskelettir (Alvarado-Ramírez vd.,2024; Feng vd.,2022).

ZIF'ler, MOF'ların bir alt ailesi olarak kabul edilir ve topolojileri zeolitlerinkine benzerdir. ZIF'ler, kristallik, gözeneklilik ve büyüleyici kimyasal ve termal stabilite gibi bu iki malzemenin özelliklerine sahip oldukları için hem MOF'ların hem de zeolitlerin avantajlarını birleştirir. ZIF'ler, adsorpsiyonla veya membranlarda gaz ayırmada, algılamada ve katalizde çeşitli uygulamalar için çekici adaylar olarak kabul edilmektedir. Yapısal esneklikleri nedeniyle sentezin kontrol edilebilirliği hem gözenek boyutlarının hem de yüzey işlevselliğinin tasarlanmasını sağlamaktadır. ZIF-8 nanopartiküller tekrar kullanılmayı sağlayan üstün stabiliteleri nedeni ile ZIF ailesinin en çok çalışılan yapısıdır (Alvarado-Ramírez vd.,2024; Bergaoui vd.,2021).



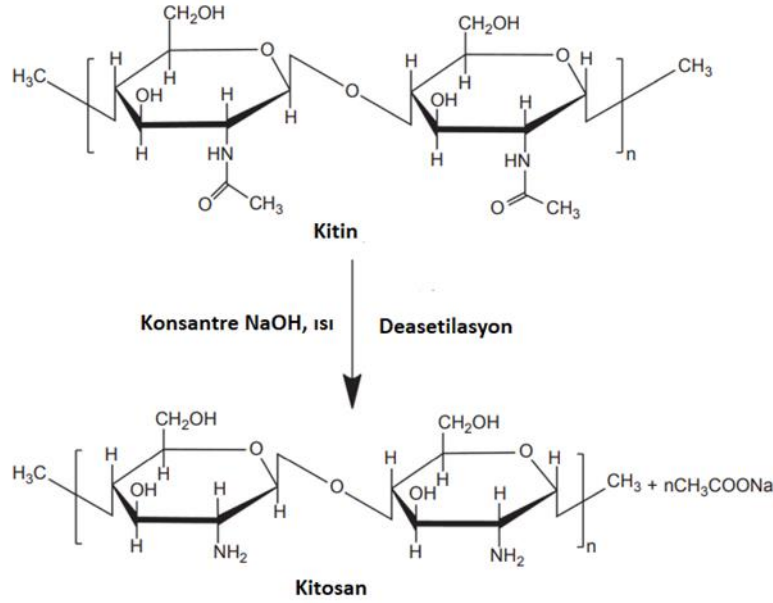
Şekil 1.9 ZIF Yapısı (Bergaoui vd.,2021)

1.7. Kitosan

Kitosan, mantarların hücre duvarlarında, kabukluların ve böceklerin dış iskeletlerinde bulunan kitinin deasetilasyonu elde edilen doğal bir polimerdir. Biyolojik olarak parçalanabilirliği ve toksik olmaması nedeniyle 2000'li yıllardan bu yana ilaç ve aşı taşıyıcı sistemleri ve doku mühendisliği gibi tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosan parçacıklarının boyutunun mikron ve mikron altı boyutta düzenlenmesiyle, yüzey alanı/hacim oranı önemli ölçüde artar, böylece ilaçların difüzyonu artar ve ilaç salınımı hızlandırılır (Nainggolan vd.,2024).

Kitosan, orta derecede antimikrobiyal aktiviteye, düşük oksijen ve CO₂ geçirgenliğine sahiptir ancak kitosan yüksek su emme oranına, yüksek su buharı geçirgenliğine sahiptir ve organik asitlerde kolayca çözünür. Çoğu gıdanın organik asitler ve bir miktar su içermesi nedeniyle kitosan gıda ambalaj malzemesi olarak düşünüldüğünde bu özellikler dezavantajlıdır. Kitosan aynı zamanda mekanik mukavemet ve stabiliteden de yoksundur, ancak bu, hammaddenin moleküler ağırlığına bağlı olarak değişebilir. Kitosan filmlerin fonksiyonel ve fiziksel özelliklerini geliştirmek için nanofiberler/nanopartiküller, çapraz bağlayıcılar ve antimikrobiyaller sisteme dahil edilir (Cabrera-Barjas vd., 2024).

Kitosanın bir miktar antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermesine rağmen, etkinliği hala sentetik pestisitlerle kıyaslanamaz ve çevre sorunlarını azaltmak için diğer aktif bileşenlerle, tercihen doğal biyoaktif bileşenlerle kombinasyon gerektirir. Son zamanlardaki yaklaşımlardan biri, yüksek antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal aktivite sağlayan doğal katkı maddeleri olduğundan, kitosan filmlerinin biyolojik aktivitesini arttırmak için fenolik bileşiklerin kullanılmasıdır (Cabrera-Barjas vd., 2024).



Şekil 1.10 Kitinin deasetilasyonu ile kitosan eldesi (Vunain vd., 2017)

1.8. Fisın Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Fisin esas olarak serbest formda kullanılmasına rağmen farklı protokoller kullanılarak immobilize edilmiştir (Morellon-Sterling vd., 2020). Fisin et yumuşatıcı (Sullivan vd., 2010), süt pıhtılaşması (Raskovic vd., 2016), protein/pigment film giderme (Yao vd, 2013), peptit sentezi (Hansler vd.,1995), balık proteini hidrolizat üretimi (Feijoo-siota vd., 2011), bira- bitirme işlemleri (Feijoo-siota vd, 2011, Yamamoto vd, 2007), laksatif ajan (Raskovic vd.,2016), mikrobiyal biyofilmi hedefleyerek antelmintik etki (Baidamshina vd, 2017), cilt tümörü ve siğil tedavisinde üzerine kullanıldığı bildirilmiştir (Raskovic vd, 2016). Fisin, uygun biyolojik reaksiyon koşulları altında yüksek katalitik etkinliğe sahiptir (Pang vd, 2018). Bununla birlikte, bu proteazın yaygın kullanımı, enzim doğal ortamından çıkarıldıktan sonra üç boyutlu moleküler yapısının kararsızlığı nedeniyle engellendiği ve bu kararsızlığın, ortamın pH veya sıcaklığındaki değişiklikler nedeniyle amino asit zincirlerinin moleküller arası etkileşimlerinin azalması sonucu olduğu bildirilmiştir (Rojas-Mercadovd, 2018). Tahsiri ve arkadaşları manyetik grafen oksite fisin enzimini immobilize ettikleri çalışmada, enzimin harici bir manyetik kuvvetle

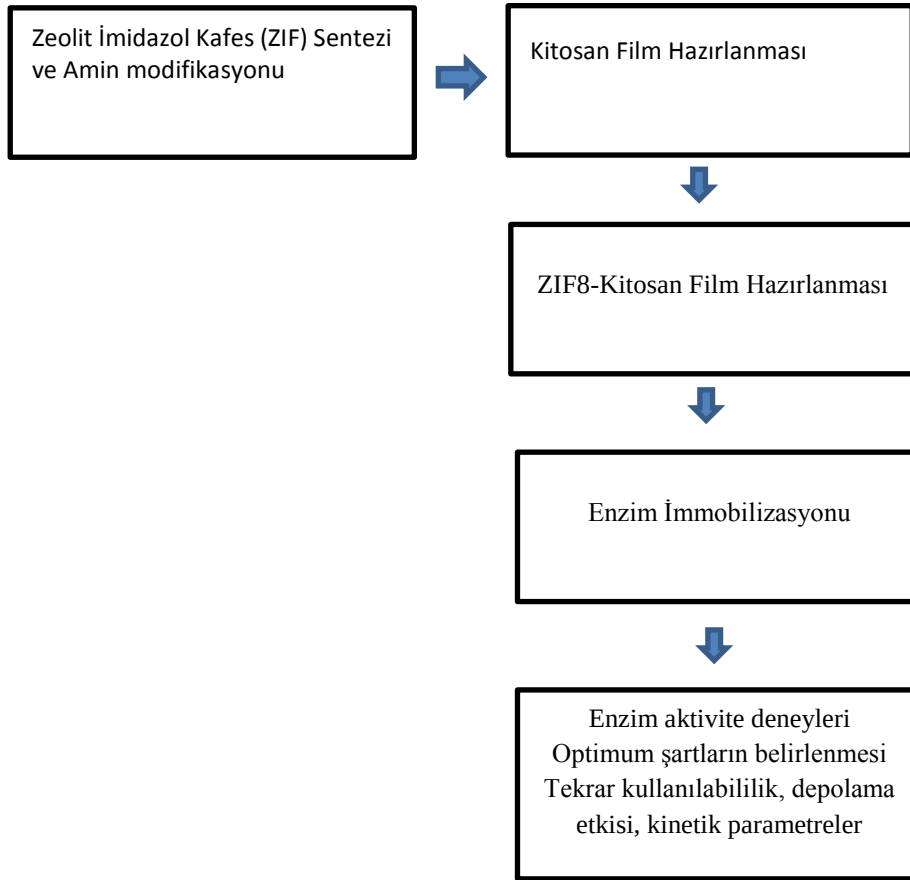
ayrılması yoluyla yeniden kullanılabilirliğini sağlamakla kalmayıp aynı zamanda enzimin termal stabilitesinin arttığını bildirmişlerdir (Tahsiri vd. 2023). Başka bir çalışmada biyomoleküler manyetik katmanlı çift hidroksit nano tabakalı yapıya fisin enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzimin geniş bir pH aralığında genel stabilitesinin aktivite gösterdiği ve termal stabilitesinin arttığı rapor edilmiştir (Tahsiri vd., 2022).



2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneysel Çalışma Planı

Çalışma basamakları:



Şekil 2.1 Deneysel çalışma planı

2.2 Araştırma araçları

Çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda verilmiştir.

Manyetik Karıştırıcı	Chiltren, Isıtıcı HS 31 (İngiltere)
Destile Su Cihazı	Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)
Orbital Karıştırıcı	IKA-Werke, OS 10 B (Almanya)
Hassas Terazı	SartoriusAnalytic, A200S $\pm$ 0,0001 (Almanya)
Spektrofotometre	Thermo Scientific Helios Zeta (İngiltere)
Etüv	Genlab, Midi/2/AL (0-100) (İngiltere)
pH Metre	ToledoMettler (İsviçre)
Otomatik Pipetler	Rainin, Pipetman (USA)
ATR-FTIR	Perkin-Elmer Spectrum100 ATR-FTIR

2.3. Kimyasallar

Fisin (İncir ağacı lateksinden elde edilmiş) enzimi, kitosan (orta molekül ağırlıklı, deasetilasyon derecesi: %85), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2-metil-imidazol, hidroksietil metakrilat (HEMA), polietilen glikol metakrilat (PEGMA), metanol, amonyak, sodyum hidrojen fosfat, di sodyum hidrojen fosfat, asetik asit, $\text{N}\alpha$ -benzoil-L-arginin 4-nitroanilid (BAPA), Dimetil sülfoksit (DMSO), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), p-nitroanilin, asetik asit Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

2.4. Deneyisel Yöntemler

2.4.1. Zeolit İmidazol Kafes (ZIF) Sentezi ve Amin modifikasyonu

Metanolde hazırlanan 100'er mL $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol) ve 2-metil-imidazol (80 mmol) çözeltileri bir biri üzerine eklendi ve karışım oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat süre ile karıştırıldı. İşlem sonunda karışım santrifüj edilerek beyaz renkli çökelti toplandı ve iki kez metanolde yıkanarak 80 °C de 6 saat vakum etüvünde kurutuldu. 1 g MOF üzerine 25 ml amonyum hidroksit (%25v/v) ve 10 mL distile su eklendi 60°C'de 24 saat karışmaya bırakıldı. Amin grupları ile modifiye olan parçacıklar santrifüjle alındı ve birkaç defa metanol ile yıkandı ve ZIF-8/ NH_2 80 °C'de 6 saat boyunca vakum etüvünde kurutuldu (Cenik 2024).

2.4.2. Kitosan Film

0,1 g kitosan, 100 mL %1 (v/v) asetik asit çözeltisi içinde çözüldü. Üzerine 0,5 g hidroksietil metakrilat (HEMA), 0,1 g polietilen glikol metakrilat (PEGMA) eklendi ve karışım kalıba dökülerek 40 °C'de bir gece bekletildi.

2.4.3. ZIF8-Kitosan Film

Kitosan filmde anlatıldığı şekilde hazırlanan karışıma 0,1 g ZIF8 eklendi ve karışım kalıba dökülerek 40 °C'de bir gece bekletildi.

2.4.4. Enzim İmmobilizasyonu

Kitosan ve ZIF8-Kitosan filmlerinin tartımı alındı ve üzerlerine 0,1 g/1 mL fisin enzim çözeltisi konuldu ve orbital karıştırıcıda 8 saat inkübe edildi. İmmobilize olan enzim konsantrasyonu Bradford protein tayinine göre hasaplandı (Bradford, 1976). İmmobilizasyon öncesi ve sonrası protein konsantrasyon değerlerinden immobilize olan protein miktarı hesaplandı.

2.4.5. Karakterizasyon

Perkin–Elmer Spectrum100 ATR- Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre cihazı ile filmler karakterize edildi.

2.4.6 Aktivite Çalışması

43 mg Na-benzoil-L-arginin 4-nitroanilid (BAPA), 100 ml'lik balon jodede 1 ml DMSO içerisinde çözüldü, ardından 60 mg sistein ve 74 mg EDTA ilave edildi ve 10mM pH 7 fosfat tamponu ile hacim tamamlandı. Enzim aktivitesini belirlemek için, 200 µL fisin (1mg/1mL) ve tartımı alınmış immobilize enzim örnekleri üzerine 1mL substrat çözeltisi eklendi ve 20 dakika inkübe edildi, reaksiyon 1 mL asetik asit (%30 v/v) çözeltisi ile durduruldu. Serbest kalan p-nitroanilinden kaynaklanan absorbans miktarı 410 nm'de ölçüldü. Ürün miktarı farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış p-nitroanilin standart grafiğine karşı hesaplandı (Rojas-Mercado vd. 2018).

Enzim aktivitesi serbest ve immobilize enzim için değişen pH (4-9) ve sıcaklıklar (40-90°C) için yapıldı.

2.4.7.Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

0,25-0,45µg/mL aralığında değişen substrat konsantrasyonlarında miktarları bilinen serbest ve immobilize enzim kullanılarak optimal şartlarda aktivite tayinleri yapıldı. Lineweaver–Burk grafiğine göre Km ve Vmaks değerleri hesaplandı.

2.4.8. Tekrar Kullanılabilirlik

Kitosan-enzim 0,5 µg ve ZIF8-Kitosan-enzim 4 µg enzim konsantrasyonunda tartımlar alındı. Optimum koşullarda her defasında immobilize enzimler ortamdan alınarak

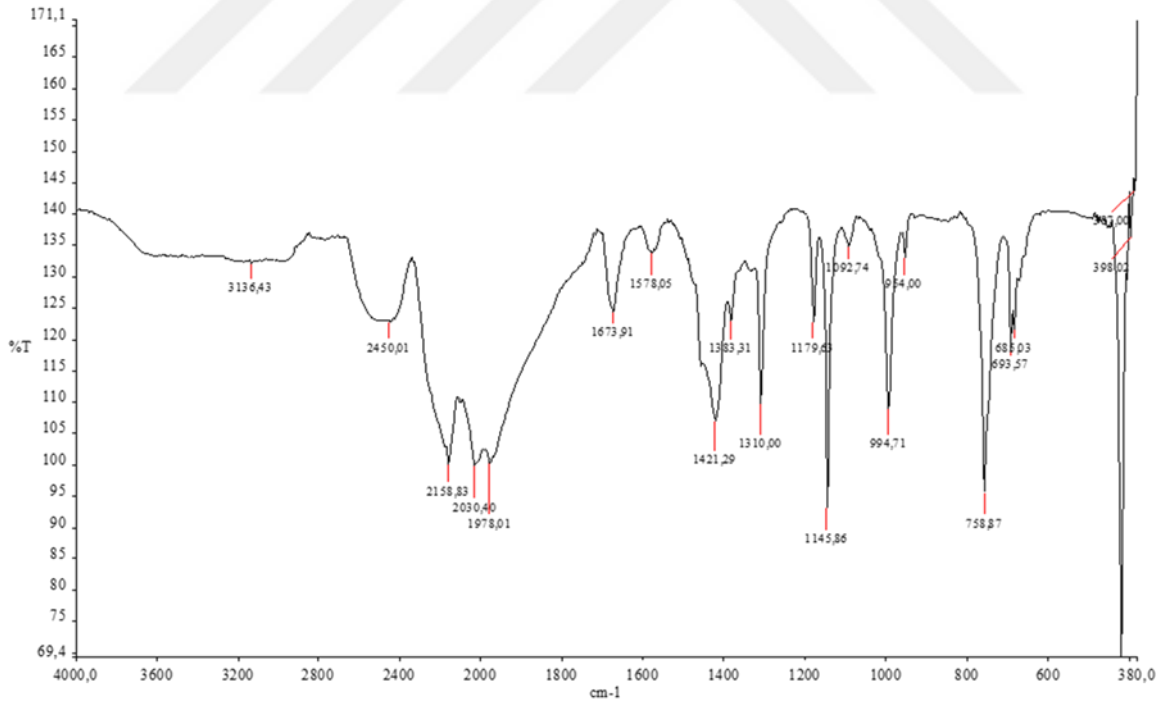
tamponla yıkandı ve taze substrat ilavesi ile aktivite deneyleri tekrar edildi. İlk tekrardaki bağıl aktivite %100 olarak alındı ve diğer tekrarlar buna göre hesaplandı.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

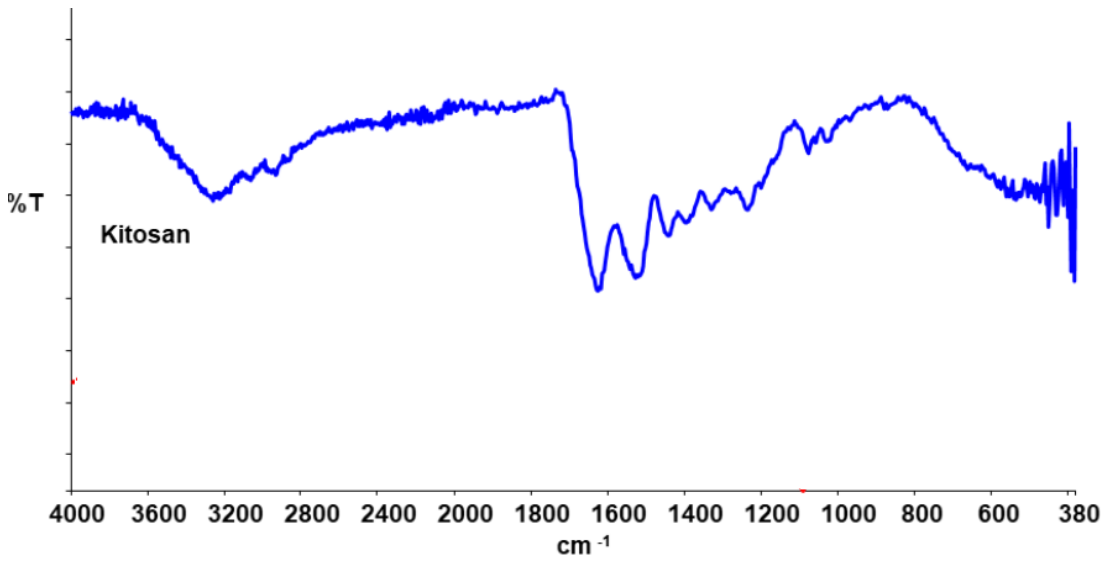
3.1.Filmlerin Yapısal Analizi

ZIF-8'in imidazol grubunun ve bir Zn-N etkileşiminin varlığı Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektrumu ile doğrulandı. ZIF-8 için 2450-3136 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla imidazol halkasının alifatik ve aromatik C-H'sinin gerildiğini göstermektedir. İmidazol halkasının düzlem dışı ve düzlem içi bükülme bölgeleri sırasıyla 800 cm^{-1} 'in altında ve 900-1310 cm^{-1} civarındadır. 1600 cm^{-1} civarındaki pik noktası C=N gerilme modundan kaynaklanırken, 1300-1600 cm^{-1} civarındaki keskin pik noktaları tüm halkanın gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Son olarak 400 cm^{-1} 'deki pik, ZIF-8 sentezi sırasında ZIF-8'deki çinko atomları 2-metilimidazol bağlayıcının nitrojen atomlarına bağlandığında Zn-N bağının gerildiğini gösterir (Bergaoui vd., 2021).



Şekil 3.1 ZIF ATR-FTIR grafiği

Kitosan için -OH ve -NH gruplarının gerilme titreşimleriyle ilgili 3000 ile 3700 cm^{-1} arasındaki bölgede geniş bir bant görülmektedir. 1600 cm^{-1} 'deki bant, amid I grubunun C—O gerilme titreşimlerine ve amid II grubunun 1500 cm^{-1} -NH bükülme titreşimindeki bantlara karşılık gelmektedir. 1400 cm^{-1} -OH grubunun bükülme titreşimlerine, 1150 ile 1000 cm^{-1} arasındaki bölgedeki bantlar C-O-C köprüsünün ve C—O grubunun antisimetrik gerilme titreşimleriyle ilişkilidir (Cabrera-Barjas vd.,2024)



Şekil 3.2 Kitosan grafiği

3.2.Enzim immobilizasyonu

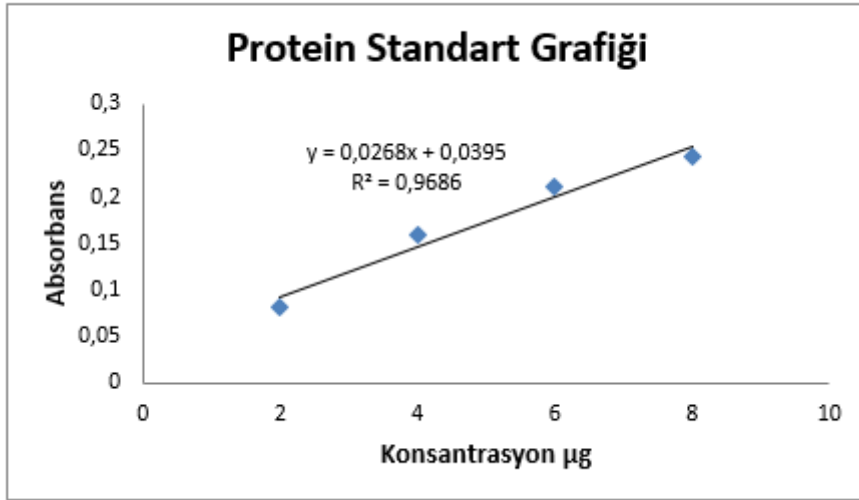
Enzim immobilizasyonunun başlangıçtaki ana amacı, enzimlerin çok pahalı biyokatalizörler olması sebebiyle sulu ortamda enzim çözünürlüğü problemini çözmektir. Günümüzde bazı ticari enzimlerin fiyatları düşmüştür ve bazı firmalar biyodizel üretimi gibi proseslerde kullanılmak üzere enzimleri serbest formda tedarik etmektedir. Ancak enzim immobilizasyonu, enzimlerin yeniden kullanılmasından çok daha fazla uygulamaya sahip bir araç haline gelmiştir. Uygun bir immobilizasyon, birçok enzim özelliğini büyük ölçüde geliştirebilir. Enzim stabilitesi, immobilizasyon yoluyla geliştirilebilir. Immobilizasyon için gözenekli bir destek kullanıldığında çoğu enzim,

herhangi bir immobilizasyon protokolü (örneğin, agregasyon veya proteoliz) kullanılarak dış arayüzlerden veya moleküller arası olaylardan korunur. Bu özellikle fisin gibi proteazlar için tercih edilebilir, çünkü proteoliz, enzim inaktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Morellon-Sterling vd., 2020).

ZIF biyoyumlulukları, geniş yüzey alanları, ayarlanabilirlikleri ve iyi tanımlanmış gözenekleri nedeniyle enzimler için taşıyıcı olarak yaygın şekilde kullanılır. Aynı şekilde toksik olmayan, biyobozunur, biyoyumlu ve biyo-yenilenebilir bir polisakkarit olan kitosan, enzimlerin anyonik kalıntılarıyla kolayca iyonik bağlar oluşturan reaktif amino gruplarına sahiptir ve enzim immobilizasyonu potansiyelini arttırmaktadır. Fisin sulu tampon çözelti içinde basit bir şekilde karıştırılarak Kitosan ve ZIF8-Kitosan filmlere immobilize edildi. HEMA ve PEGMA'daki akrilat grupları ile ZIF ve kitosandaki NH₂ grupları birbirlerine Aza-Micheal reaksiyonu ile bağlanmıştır. Kalan -NH₂ gruplarından fisin enzimi -COOH gruplarından kovalent olarak immobilize olmuştur. Ayrıca ZIF'in gözenekli yapısından dolayı enzimin bir kısmı bu gözeneklere girerek ZIF'e bağlanmıştır. 1 gram polimere immobilize olan enzim miktarları karşılaştırıldığında ZIF8-Kitosan filme daha fazla enzim immobilize olduğu görülmektedir.

Tablo 3.1. İmmobilizasyon verimi

Polimerik film	Yüklenen miktar (g polimere bağlanan mg enzim)	İmmobilizasyon %
Kitosan Fim	0,486	61,7
ZIF8-Kitosan Film	0,666	72,5



Şekil 3.3. Protein Standart Grafiği

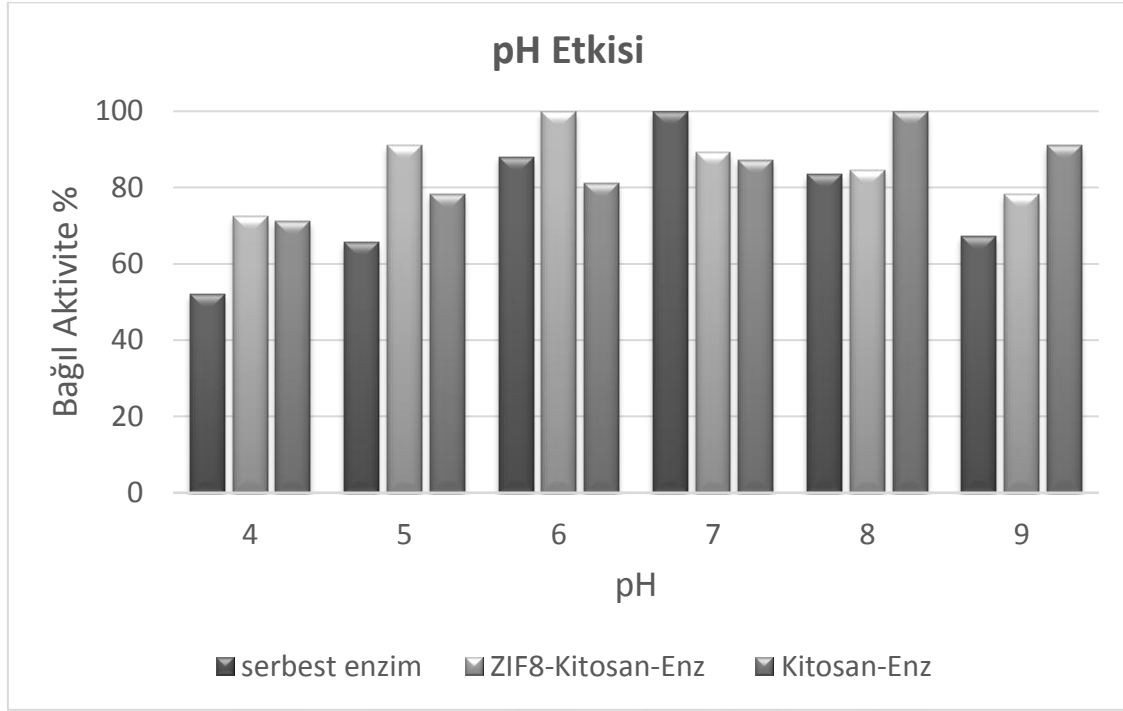
3.3. pH Etkisi

Enzimlerin üç boyutlu yapısı, reaksiyon ortamındaki pH değişikliklerinden kolayca etkilenebilen hidrojen bağlarına sahiptir. Aşırı pH'ların neden olduğu geri dönüşü olmayan yapısal deformasyonlar nedeniyle enzim etkisiz hale gelebilir. Ayrıca bu, çözeltideki enzimin aktif merkezlerini iyonize edebilir ve böylece enzimin katalitik verimliliğini etkileyebilir.

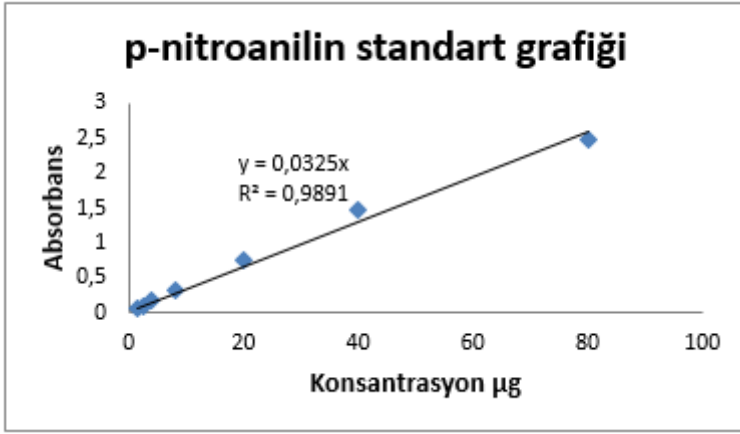
Çalışmamızda fisin aktivitesi üzerindeki pH etkisi 4 ila 9 aralığında araştırıldı (Şekil 3.4). Serbest fisin pH 7'de maksimum aktivite gösterirken, immobilize Kitosan-Enzim pH 8'de ve ZIF8-Kitosan-Enzim pH 6'da maksimum aktivite göstermişlerdir.

Gözlenen fark, ortam ile enzim arasındaki iyon değişiminden kaynaklanmış olabilir. pH aktivite profili genellikle H⁺ ve OH⁻ konsantrasyonlarının immobilize enzimi çevreleyen mikro ortam ile toplu çözelti arasında eşit olmayan şekilde bölünmesinden etkilenebilir. Kitosan-Enzim için pH 8'de maksimum aktivite göstermesini taşıyıcı yüzeyin yakınındaki katyonların konsantrasyonu çözeltininkini aştığında, enzimin optimal pH'ı yüklü taşıyıcılar tarafından daha yüksek bir pH'a kaydırılmış olabileceği şeklinde açıklayabiliriz. Ayrıca alkali koşullar altında Kitosan-Enzim, serbest enzime göre göre

çok daha yüksek derecede pH stabilitesi sergilediği gözlemlendi. ZIF8-Kitosan-Enzim pH 6'da maksimum aktivite vermesini tersi durumla açıklayabiliriz.



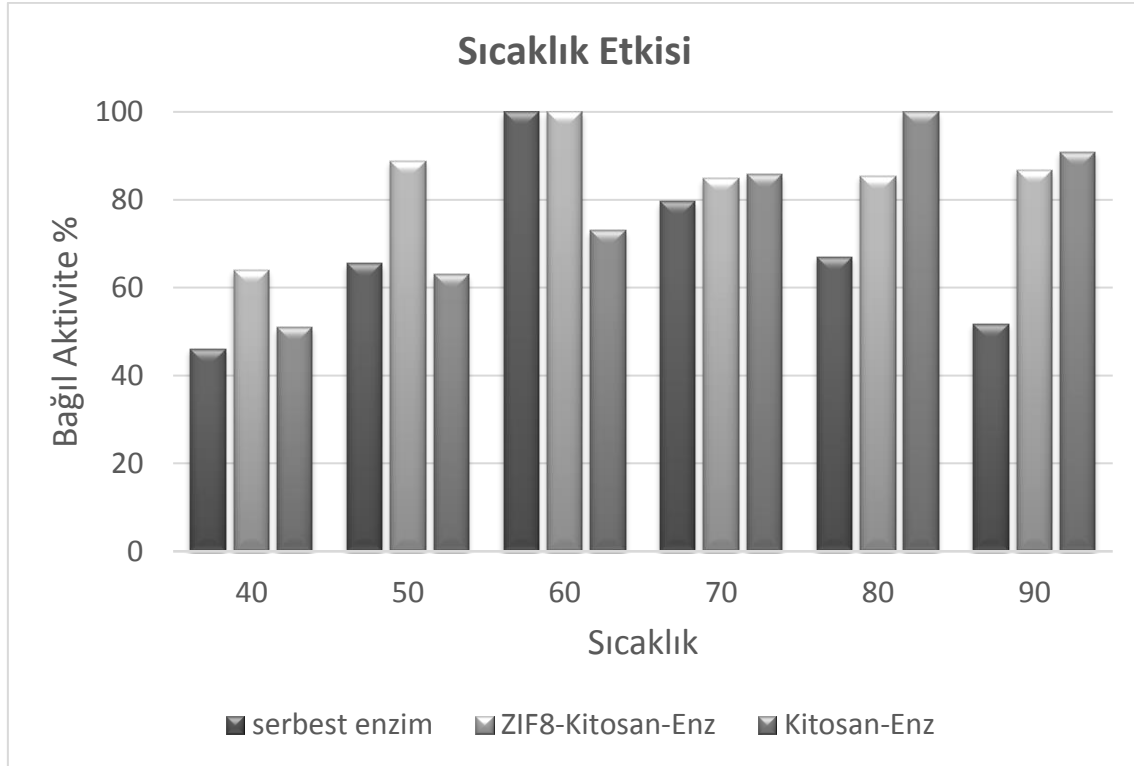
Şekil 3.4. pH etkisi



Şekil 3.5. Ürün standart grafiği

3.4. Sıcaklık Etkisi

Fisinin immobilizasyon öncesi ve sonrası aktivitesi üzerindeki sıcaklık etkisi 40 ila 90 °C arasındaki sıcaklıklarda araştırıldı (Şekil 3.6). Serbest fisin 60 °C'de maksimum aktivite gösterirken, immobilize Kitosan-Enzim ve ZIF8-Kitosan-Enzim 80°C'de maksimum aktivite göstermişlerdir. Enzimin immobilizasyonu, serbest enzime kıyasla enzimin termal stabilitesini arttırmıştır. Bu durum immobilizasyon sonrası enzim hareketinin kısıtlanmış olması ve polimerik desteğin fonksiyonel yan gruplarının enzimin aktif bölgesini korumuş olabileceği şeklinde açıklanabilir.



Şekil 3.6. Sıcaklık etkisi

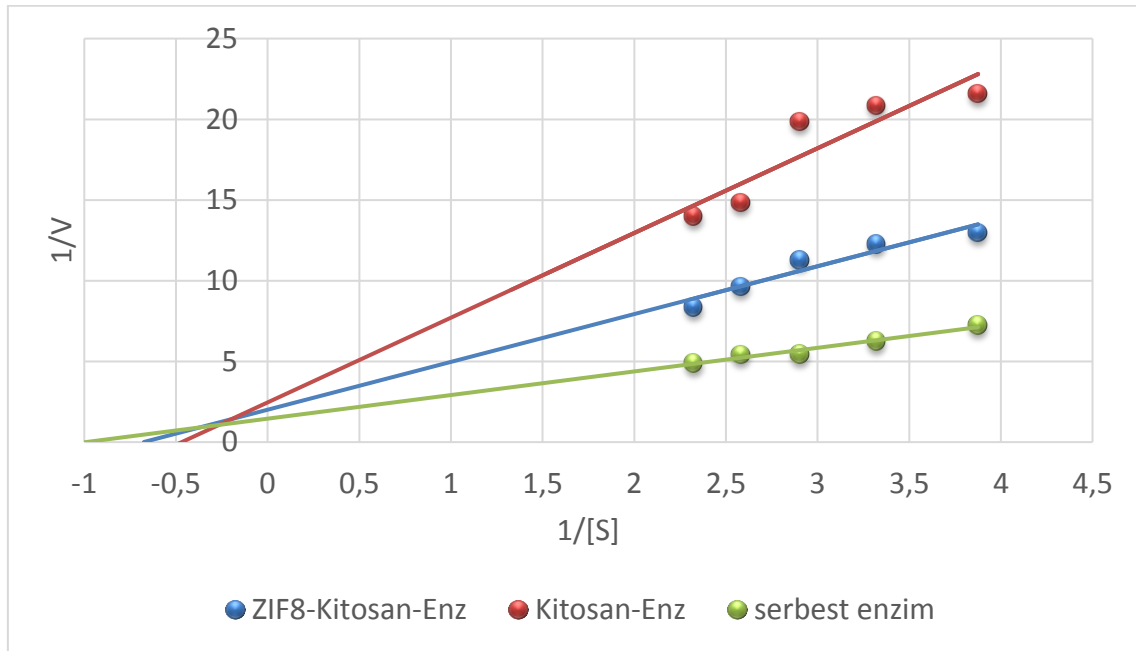
3.5. Kinetik Değerler

V_{maks} , enzimin tüm aktif bölgeleri substrat tarafından işgal edildiğinde, istenen ürüne substrat dönüşümünün maksimum katalitik hızını gösterir. V_{max} değerinin yarısındaki substrat konsantrasyonu afinite sabiti (K_m) değeri olarak kabul edilir. Yüksek K_m hem substrat türünün difüzyon etkilerine hem de pH, sıcaklık ve iyonik güç gibi çevresel koşullara bağlı olarak enzimin substratına olan zayıf afinitesini ifade eder (Mohammadi vd., 2019). Tez çalışmamızda immobilize enzimin V_{maks} değerleri, serbest formunkinden daha düşük K_m değerleri ise daha yüksek bulunmuştur. Bu durum substratın hidroliz oranının immobilizasyondan sonra azaldığı şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca substratın enzimin aktif bölgesine difüzyonel kısıtlaması ve muhtemelen

substratın destek üzerindeki fonksiyonel gruplarla etkileşimi ve enzimin substrata karşı afinitesinin azalması nedeniyle olabilir.

Tablo 3.2. Km ve Vmaks değerleri

	Serbest enzim	Kitosan-Enzim	ZIF8-Kitosan-Enzim
Km (mg/mL)	1	2,08	1,47
Vmax (mg/mL.dakika)	1,5	0,4	0,5

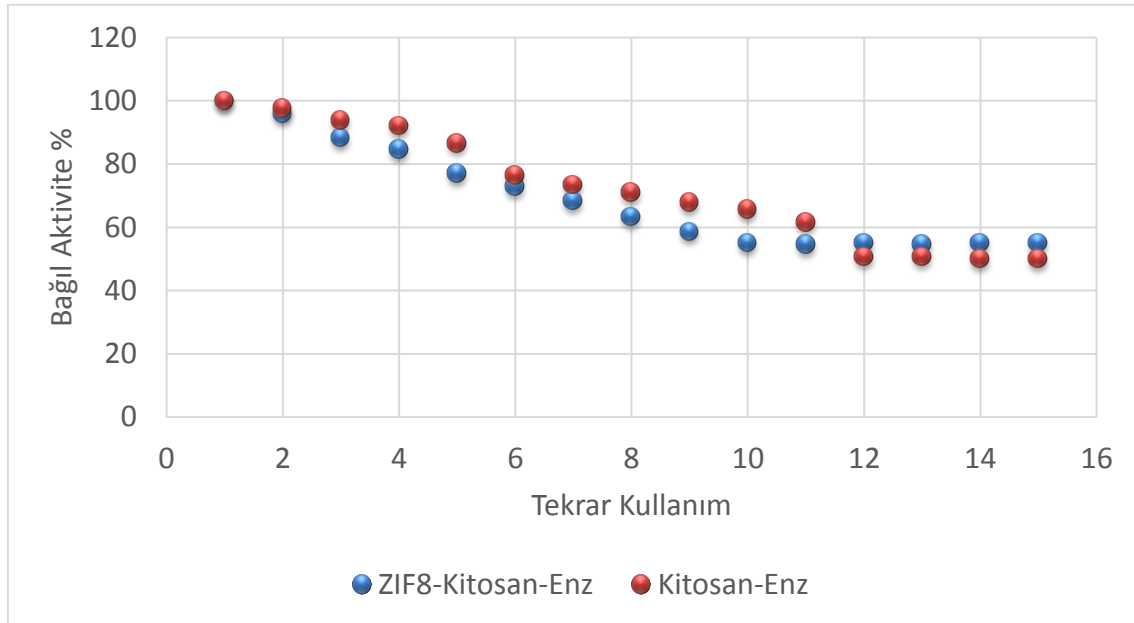


Şekil 3.7. Kinetik çalışmaya ait grafikler

3.6.Tekrar Kullanılabilirlik

Endüstriyel uygulamalar için immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve kaç döngüyü sürdürebileceğinin kontrol edilmesi enzimlerin ekonomik açıdan değerlendirilmesi açısından çok önemlidir.

Şekil 3.8'de gösterildiği gibi, birbirini takip eden 15 döngüden sonra immobilize Kitosan-Enzim ve ZIF8-Kitosan-Enzim aktiviteleri, başlangıç aktivitelerinin yaklaşık %50 ve 45 oranında azalmıştır. İmmobilize enzimlerde, enzim aktivitelerinde gözlemlenen kayıp, muhtemelen yeniden kullanım deneyi sırasında enzimin mekanik hasarı ve denatürasyonundan ve her döngünün sonunda yıkama adımları sırasında taşıyıcı yüzeyden immobilize enzimin salınmasından kaynaklanmış olabilir (Kharazmi vd., 2020; Mohammadi vd., 2019).

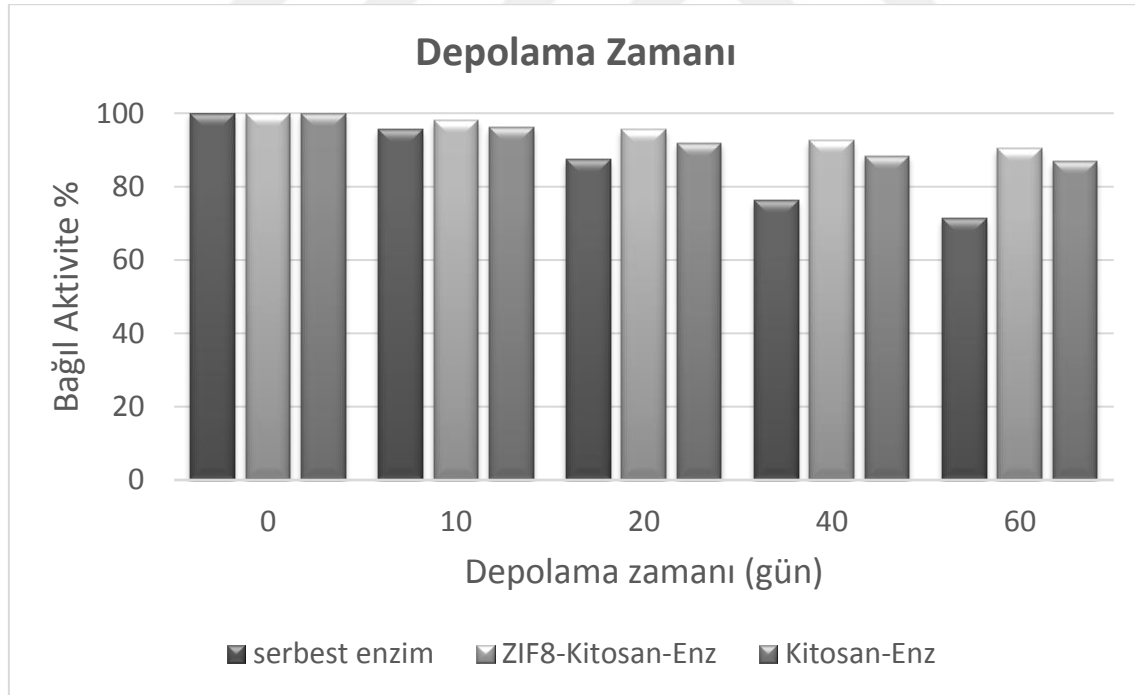


Şekil 3.8. Tekrar Kullanılabilirlik

3.7. Depolama Zamanı

Endüstriyel uygulamalarda immobilize edilmiş enzimlerin yeniden kullanılabilirliği maliyeti düşüren bir yaklaşımdır. Literatür incelendiğinde özellikle serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, destek materyali üzerine immobilize edilmiş bazı enzimlerin uzun vadeli stabilitesi ve katalitik aktivitesinin arttığına dair sonuçlar bulunmuştur (Tahsiri vd., 2022).

Serbest enzim ve immobilize enzimlerin ilk aktiviteleri tayin edildikten sonra buzdolabında +4 °C de muhafaza edilmişlerdir. Buzdolabında saklanan enzimlerin aktiviteleri 2 ay boyunca çeşitli zaman aralıklarında tayin edilmiş ve ilk aktiviteleri ile kıyaslanmıştır (Şekil 3.9). Serbest ve immobilize enzimlerde (Kitosan-enzim ve ZIF8-Kitosan-enzim) 60 gün sonunda depolama stabilitelelerinde, sırasıyla ??, yaklaşık %30, %14 ve %10 aktivite kaybı gözlenmiştir.



Şekil 3.9. Depolama kararlılığı

4.SONUÇLAR

Çalışmada fisin enzimi Kitosan ve ZIF8-Kitosan filmlere immobilize edildi. Öncelikle ZIF sentezlendi ve amin fonksiyonu kazandırıldı. HEMA ve PEGMA'daki akrilat grupları ile ZIF ve kitosandaki NH₂ grupları birbirlerine Aza-Micheal reaksiyonu ile bağlandı. Kalan -NH₂ gruplarından fisin enzimi -COOH gruplarından kovalent olarak immobilize edildi. Ayrıca ZIF'in gözenekli yapısından dolayı enzimin bir kısmı bu gözeneklere girerek ZIF'e bağlanmıştır. Kitosan ve ZIF8-Kitosan filme sırasıyla gram polimere 0,486 mg ve 0,666 mg enzim bağlandığı ve enzim bağlanma yüzdeleri 61,7 ve 72,5 şeklinde bulundu. ZIF8-Kitosan filme daha fazla enzim immobilize olduğu tayin edildi.

Serbest fisin pH 7 ve 60 °C'de maksimum aktivite gösterirken, immobilize Kitosan-Enzim pH 8 ve 80°C ve ZIF8-Kitosan-Enzim pH 6 ve 80°C'de maksimum aktivite göstermişlerdir. Optimum pH'taki kaymalar polimerik destekteki fonksiyonel grupların dağılımı ve enzimin bu gruplarla etkileşimi ile açıklanabilir. İmmobilizasyon ile enzimin termal stabilitesi artmıştır.

Tez çalışmamızda immobilize enzimin V_{maks} değerleri, serbest formunkinden daha düşük K_m değerleri ise daha yüksek bulunmuştur. Substratın hidroliz oranının immobilizasyondan sonra azaldığı ve substratın enzimin aktif bölgesine difüzyonel kısıtlaması ve muhtemelen substratın destek üzerindeki fonksiyonel gruplarla etkileşimi ve enzimin substrata karşı afinitesinin azalması nedeniyle olabilir.

Endüstriyel uygulamalar için immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve kaç döngüyü sürdürebileceğinin kontrol edilmesi ekonomik açıdan önemlidir. Çalışmamızda birbirini takip eden 15 döngüden sonra immobilize Kitosan-Enzim ve ZIF8-Kitosan-Enzim başlangıç aktivitelerini yaklaşık %50 ve 55 oranında korumuştur.

Çalışmamızda serbest fisinin, Kitosan-enzim ve ZIF8-Kitosan-enzim üzerinde 60 günlük bir süre boyunca depolama stabilitesi, sırasıyla serbest fisinde %30, Kitosan-enzim için %14 ve ZIF8-Kitosan-enzim için %10 aktivite kaybı gözlenmiştir. Serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, destek materyali üzerinde immobilize edildiğinde bazı enzimlerde

uzun vadeli stabilite ve katalitik aktivitenin artması istenen bir durumdur. Çalışmamızda immobilize enzimlerin depolama sürelerinin serbest enzime göre arttığı gözlenmiştir.

Fisin, yükleme kapasitesi nedeniyle ZIF8-kitosan filmine daha iyi immobilize olmuştur. Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin geri kazanılması ve yeniden kullanılabilirliği başarılı operasyonlar için anahtar faktörler olarak kabul edildiğinden, bu çalışmada fisinin immobilizasyonu ile 15 kez yeniden kullanılabildiği, aynı zamanda enzimin termal stabilitesini arttığı görülmüştür. Çalışmamızdaki sonuçlar dikkate alındığında ZIF-Kitosan ve kitosan-filmlere fisin immobilizasyonu başarılı olmuştur.



KAYNAKLAR

Aider M. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates JDS Communications 2021; 2: 233–237

Alvarado-Ramírez L., Machorro-García G., L'opez-Legarrea A., Trejo-Ayala D., Rostro-Alanis M.J., S'anchez-S'anchez M., Blanco M.R., Rodríguez-Rodríguez J., Parra-Saldívar R. Metal-organic frameworks for enzyme immobilization and nanozymes: A laccase-focused review Biotechnology Advances 70 (2024) 108299

Baidamshina, D.R., Trizna, E.Y., Holyavka, M.G., Bogachev, M.I., Artyukhov, V.G., Akhato, F.S., Rozhina, E.V., Fakhrullin, R.F., Targeting Microbial Biofilms Using Ficin, Nonspecific Plant Protease, 2017

Bergaoui M., Khalfaoui M., Awadallah A., Al-Muhtaseb S., A review of the features and applications of ZIF-8 and its derivatives for separating CO₂ and isomers of C₃- and C₄-hydrocarbons Journal of Natural Gas Science and Engineering 96 (2021) 104289

Bilal M., Adeel M., Rasheed T., Iqbal H.M.N., Multifunctional metal–organic frameworks-based biocatalytic platforms: recent developments and future prospects Mater. J. Res. Technol. 8 (2019) 2359–2371.

Blanco, A., Blanco, G. 2017. Chapter 8 – Enzymes, Medical Biochemistry

Bolivar J.M., Woodley J.M., Fernandez-Lafuente R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization Chem. Soc. Rev., 2022, 51, 6251–6290

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Analytical Biochemistry Volume 72, Issues 1–2, 1976, 248-254

Cabrera-Barjas G., Albornoz K., Belchi M.D.L, Giordano A., Bravo-Arrepol G., Moya-Elizondo E., Martin J.S., Valdes O., Nesic A. Influence of chitin nanofibers and gallic acid on physical-chemical and biological performances of chitosan-based films. International Journal of Biological Macromolecules 263 (2024) 130159

Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2019). Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI insight*, 4(15).

Feijoo-siota, L., Villa, T.G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases With Industrial Applications, 2011 1066–1088, <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0431-4>.

Feng Y., Xu Y., Liu S., Wuc D., Su Z., Chen G., Liu J., Li G., Recent advances in enzyme immobilization based on novel porous framework materials and its applications in biosensing *Coordination Chemistry Reviews* 459 (2022) 214414

Hansler, M., Ullmann, G., Jakubke, H. The application of papain, ficin and clostripain in kinetically controlled peptide synthesis in frozen aqueous solutions, 1 (1995) 283–287.

Howarth A.J., Liu Y., Hupp J.T., Farha O.K.J.C., Enzyme encapsulation in metal–organic frameworks for applications in catalysis. *CrystEngComm* 17 (2015) 7245–7253.

Huang J., Pan J., Song Y., Lin Q., Xu Y., Dai Z., Liu S.Y. MOF-functionalized paper-based biosensors: Fabrications, mechanisms and applications *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 173 (2024) 117619.

Huang, L., QU, H. zhi, ZHANG, L., DU, S. Shan, YANG, S., HAO, D. yun, & WANG, X. ping. (2008). Purification and Characterization of a Proteolytic Enzyme from Fig Latex. *Chemical Research in Chinese Universities*, 24(3), 348–352.

Ji L., Chen M., Zhang W., Nian B., Hu Y. Comprehensive applications of ionic liquids in enzyme immobilization: Current status and prospects *Molecular Catalysis* 552 (2024) 113675

Kharazmi, S., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A. 2020. Efficient immobilization of pectinase on trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol-grafted magnetic nanoparticles: A stable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 325, 126890.

Long Y., Pan Y., Zheng W., Yi D., Zheng H. Supramolecular hydrogel-immobilized enzyme ficin as peroxidase mimics for colorimetric detection of glucose *Microchemical Journal* 158 (2020) 105276

McDonald A.G., Tipton K.F. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art
The FEBS Journal 290 (2023) 2214–2231 ^a 2021 Federation of European Biochemical Societies

Mohammadi, M., Mokarram, R.R., Shahvalizadeh, R., Sarabandi, K., Lim, L., Hamishehkar, H., 2020. Immobilization and stabilization of pectinase on an activated montmorillonite support and its application in pineapple juice clarification. Food Bioscience, 36, 100625.

Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O.L., Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R., Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis
International Journal of Biological Macromolecules 162 (2020) 394–404

Nainggolan I., Martina S.J., Alva S., Li B., Nasution T.I., Sembiring A., Duha A.S., Saisa S., Rahman R., Asrosa R. Sensitivity of chitosan/reduced graphene oxide/manganese dioxide modified electrodes for cholesterol detection using cyclic voltammetry
South African Journal of Chemical Engineering 48 (2024) 329–336

Pang, Y., Huang, Z., Yang, Y., Long, Y., Zheng, H, Colorimetric detection of glucose based on ficin with peroxidase-like activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 189 (2018) 510–51

Raskovic, B., Lazic, J., Polovic, N. Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of Ficus carica latex during fruit ripening, J. Sci. Food Agric. 96 (2016) 576–582.

Raskovic, B.G., Polovic, N.D., Collagenase activity in fig latex could contribute to its efficacy in ethnomedicinal preparations, Perspect. Med. 6 (2016) 73–78.

Rodenas T., Luz I., Prieto G., Seoane B., Miro H., Corma A., Kapteijn F., Xamena F.X.L.I., Gascon J.J.N.M., Metal–organic framework nanosheets in polymer composite materials for gas separation Nature Materials 14 (2015) 48–55.

Rojas-Mercado A.S., Moreno-Cortez, I.E., Lucio-Porto, R., López Pavón, L. Encapsulation and immobilization of ficin extract in electrospun polymeric nanofibers. International Journal of Biological Macromolecules 118 (2018) 2287–2295.

- Rojas-Mercado, A. S., Moreno-Cortez I. E., Lucio-Porto,R., López Pavón L., Encapsulation and immobilization of ficin extract in electrospun polymeric nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules* 118 (2018) 2287–2295
- Roskoski, R. 2015. Michaelis-Menten Kinetics Blue Ridge Institute for Medical Research, Horse Shoe, NC, USA, Elsevier Inc.
- Siar, E. H., Zaak, H., Kornecki, J. F., Zidoune, M. N., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. 74 (2017). Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 58, 98–104.
- Song J., He W., Shen H., Zhou Z., Li M., Su P., Su P., Construction of multiple enzyme metal–organic frameworks biocatalyst via DNA scaffold: A promising strategy for enzyme encapsulation *Chem. Eng. J.* 363 (2019) 174–182.
- Sullivan, G.A., Calkins, C.R. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and lowconnective tissue, 85 (2010) 730–734.
- Tahsiri, Z., Niakousari, M., Hosseini, S.M.H., Majdinasab M. Magnetic layered double hydroxide nanosheet as a biomolecular vessel for enzyme immobilization *International Journal of Biological Macromolecules* 209 (2022) 1422–1429.
- Vunain, E., Mishra, A.K., Mamba, B.B. 2017. 1-Fundamentals of chitosan for biomedical applications *Chitosan Based Biomaterials Volume 1 Fundamentals*, Pages 3-30.
- Xiang Y.L., TangD.Y., Yan L.L., Deng L.L., Wang X.H., Liu X.Y., Zhou Q.H. Poly-l-lysine modified MOF nanoparticles with pH/ROS sensitive CIP release and CUR triggered photodynamic therapy against drug-resistant bacterial infection *International Journal of Biological Macromolecules* 266(2024) 131330
- Xiao T., Geng L., Dai Y., Zhao J., Liu C. UV-cured polymer aided phase change thermal energy storage: Preparation, mechanism and prospects. *Journal of Energy Storage.* 64 (2023) 107066
- Yao, J., Xiao, Y., Zuo, Q., Zhang, Y. Effectiveness of cysteine proteases on protein/pigment film removal, 8 (2013).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Merve Kadal

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Yıldız Teknik Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 2007-2011
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce
Bilimsel Faaliyetleri : Lisans Bitirme Tezi, Besinlerdeki Antioksidan Özelliklerin İncelenmesi, 2011

İş Deneyimi

Çalıştığı Kurumlar : VSY Biyoteknoloji- Kalite Kontrol Operasyon Sorumlusu, 2013-2015
APS Ambalaj, Temizlik ve Kozmetik Ürünler-Ar-Ge
Mühendisi, 2015-2017
Atomizer Kozmetik- Ar-Ge Uzmanı, 2019-2020
Rebul Kozmetik- Ar-Ge Teknik Proje Lideri, 2020-halen