

Horseradish Peroksidaz Nano Biyokatalizörü İle Hidrokinon'un Polimerleştirilmesi

Ersen GÖKTÜRK^{1*}

ÖZET: Bu çalışmada, Fe^{2+} iyonlarının horseradish peroksidaz (HRP) enzimiyle oluşturduğu çiçek şekilli hibrit nano biyokatalizörün (HRP- Fe^{2+}), hidrokinon'un polimerleşmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; HRP- Fe^{2+} biyokatalizörü ve hidrojen peroksit (H_2O_2) başlatıcısı kullanılarak gerçekleştirilen polimerleşmeler, serbest HRP enziminin kullanıldığı koşullara kıyasla yüksek sıcaklıklarda oldukça yüksek katalitik kararlılık göstermiştir. Poly(hidrokinon), pH 7.4 tamponu içerisinde 60 °C sıcaklıkta ve ağırlıkça %5 oranında HRP- Fe^{2+} biyokatalizörü eklenmesiyle %44 verimle sentezlenmiştir. HRP- Fe^{2+} biyokatalizörü, serbest HRP enziminin denatüre olduğu 70 °C gibi yüksek sıcaklıklarda bile bozunmaya uğramadan katalitik aktivite göstermiştir. HRP- Fe^{2+} biyokatalizörünün ayrıca serbest HRP enzime kıyasla az da olsa daha düşük katalitik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bu iki katalizörle gerçekleştirilen polimerleşmelerde verimlerin birbirine yakın olduğu, ancak serbest HRP enzimi kullanılarak elde edilen polimerlerin HRP- Fe^{2+} kullanılarak elde edilen polimerlere kıyasla daha yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu gözlenmiştir. Buradan da HRP- Fe^{2+} biyokatalizörünün katalitik aktivitesinin, serbest HRP enzime kıyasla azaldığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Horseradish peroksidaz, nano biyokatalizör, hidrokinon, enzimatik polimerleşme

Polymerization of Hydroquinone Using Horseradish Peroxidase Nanobiocatalyst

ABSTRACT: In this study, the effects of flower shaped hybrid nanobiocatalyst (HRP- Fe^{2+}) containing horseradish peroxidase (HRP) enzyme and Fe^{2+} ions on the polymerization of hydroquinone were investigated. According to the obtained results, HRP- Fe^{2+} hybrid nanobiocatalyst in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) initiator has shown enhanced catalytic stability at high reaction temperatures compared to that of free HRP enzyme. Poly(hydroquinone) was successfully synthesized with 44% of yield in pH 7.4 buffer at 60 °C reaction temperature with 5 weight % HRP- Fe^{2+} catalyst loading. HRP- Fe^{2+} nanobiocatalyst also showed some degree of catalytic activity even at 70 °C reaction temperature without having denaturation, in which free HRP enzyme denatures. On the other hand, HRP- Fe^{2+} also showed lower catalytic activity in the polymerization of hydroquinone compared to that of the free HRP enzyme. It was observed that both polymerizations resulted in polymer product with almost the same yields, but the polymers obtained from using the free HRP enzyme had higher molecular weights in contrast with the polymers obtained from HRP- Fe^{2+} biocatalyst. It was concluded that the catalytic activity of the HRP- Fe^{2+} nanobiocatalyst slightly decreased compared to the free HRP enzyme.

Keywords: Horseradish peroxidase, nanobiocatalyst, hydroquinone, enzymatic polymerization

¹Ersen GÖKTÜRK (Orcid ID: 0000-0001-6742-2847), Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Hatay, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ersen GÖKTÜRK, e-mail: ersengokturk@gmail.com

GİRİŞ

Horseradish ya da yaban turpu dünyanın ılıman bölgelerinde yetiştirilen çevre şartlarına dayanıklı bir bitkidir. Horseradish peroksidaz (HRP) ise bu bitkinin kökünden elde edilen, yüzyılı aşkın bir süredir üzerinde çalışılan ve yapısında heme grubu içeren önemli bir enzimdir. Heme grubu dört pirol halkasından oluşan bir porfirin halkasının ortasında sıkıca tutulan demir atomuna sahip düzlemsel bir yapıdır (Vietch, 2004).

HRP enzim katalizörü eşliğinde anilin ve fenol türevleri polimerleştirilerek farklı türlerde çevreye dost poliaromatik yapılar yüksek verimlerde sentezlenebilmektedir. İlave olarak, değişik organik ve inorganik elektron verici bileşikler; fenoller, aminler, indoller, fenolik asitler ve sülfatlar peroksidaz enzimi eşliğinde yükseltgenmişlerdir. Fenollerin enzimatik polimerleştirilmesi ilk olarak Dordick ve ark. (1987), tarafından literatüre kazandırılmıştır. Yapılan çalışmada HRP enzimi kullanılarak sulu organik çözücü içerisinde fenollerin enzimatik polimerleşmesi rapor edilmiştir. Fenol bileşiklerinin peroksidaz katalizörü eşliğinde polimerleştirilmesi toksik formaldehit komonomeri kullanmadan polifenol reçinesinin sentezi için alternatif bir yol sağlamaktadır (Tonami ve ark., 1999; Goretzki ve ark., 1998; Kumbul ve ark., 2016). Fenolik polimerlerin sentezi sulu ortamda gerçekleştiğinden dolayı çevreye dost bir üretim yolu olarak kabul görmektedir. Peroksidaz enzimi ile gerçekleştirilen polimerleşmede, fenolik monomerler *orto-* ve *para-* pozisyonlarından kovalent bağ ile karbon-oksijen (C-O) ve karbon-karbon (C-C) bağlanma yaparak oksifenilen ve fenilen tekrarlanan birimlerini oluşturmaktadırlar (Isci ve ark., 2016; Kocak ve ark., 2016).

Laboratuvar ortamında başarıyla uygulanabilen enzimatik polimerleşme metodunun endüstriyel uygulamalarda kullanılmasında ise bazı problemler karşımıza çıkmaktadır. Enzimlerin yüksek maliyetli oluşlarının yanında, sulu çözeltilerde kararsız oluşları ve katalitik aktivitelerinin azalması enzimatik polimerleşme reaksiyonları için bir dezavantajdır (Gross ve ark., 2001). Bu problemler enzimlerin immobilizasyonu ile çözümlenmeye çalışılmış ve kısmen de olsa başarılı olunmuştur.

Enzimlerin katı bir destek üzerine immobilizasyonu basit ve tek basamakta gerçekleşen alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmıştır. Katı bir destek üzerine immobilize edilmiş enzimler; genellikle artan kararlılığa, tekrar kullanılabilirliğe, daha verimli ve ekonomik özelliklere sahip olmuşlardır. Enzim immobilizasyonu için genel olarak evrensel bir metot yoktur. Esas amaç, uygun bir taşıyıcı (genellikle katalitik olmayan kısım olarak tarif edilir) ve reaksiyon koşullarını (pH, sıcaklık, vb.) seçerek kullanılacak enzimin immobilizasyonunu sağlamaktır. Immobilizasyon; kovalent, non-kovalent, tuzaklama ve çapraz bağlanma gibi değişik etkileşimlerle gerçekleştirilmiştir (Mateo ve ark., 2007; Rana ve ark., 2010; Wang, 2009; Sheldon, 2007; Fernandez-Lafuente, 2009). Nanomateryaller yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olduklarından dolayı fazla miktarda enzimi immobilize edebilme yeteneği gösterirler (Kim ve ark., 2004; Avnir ve ark., 1994; Luckarift ve ark., 2004). Enzimlerin immobilizasyonu genellikle kararlılığı arttırmaktadır, çünkü katı destek üzerine daha fazla enzim bağlanmakta ve enzimin hareketi kısmen de olsa azalmaktadır. Ancak artan katalitik aktivite, enzim ve substrat arasındaki kütle transferi ve enzimdeki konformasyonel değişikliklerden dolayı kısıtlanmaktadır (Wu ve ark., 1998; Lee ve ark., 2009; Somturk ve ark., 2015). Bu nedenle, enzimlerin immobilizasyonu ile katalitik aktiviteyi ve kararlılığı arttırmak üzerine halen yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda; nano çiçek formunda enzimlerin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve yüksek katalitik aktivite elde etmişlerdir (Ge ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2013). Yapılan diğer bir çalışmada fenolün tespiti amacıyla lakkaz nano çiçeklerini içeren bir membran sentezlenmiştir (Wang ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada Wang ve ark. (2013), benzer stratejiyi uygulayarak CaHPO₄- α -amilaz esaslı nano çiçek sentezlemişlerdir. Lin ve ark. (2014), organik nano çiçeklerdeki enzimi, fenol ve H₂O₂ tespiti amacıyla sensör olarak kullanmışlardır. Tüm

bu çalışmalara rağmen, nano çiçeklerin oluşumu ve katalitik etkiyi ve kararlılığı arttırması halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bu sebeple nano çiçeklerin yapısını, enzim benzeri aktivite göstermelerini ve kararlılığını arttırmasını daha iyi açıklayabilmek için yeni çalışmaların yapılması zorunludur.

Öçsoy ve ark. (2015), tarafından gerçekleştirilen çalışmada; Fe^{2+} iyonları ile HRP enziminin oluşturduğu hibrit nano biyokatalizörün (HRP- Fe^{2+}) fenol türevi guaiacol bileşiğinin oksidasyonu üzerindeki katalitik aktivitesinin, serbest HRP enziminin yalnız kullanıldığı koşullara göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Nano çiçek yapılı bu katalizörün serbest HRP enzimine kıyasla oldukça yüksek kararlılığa sahip olduğu da bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada hibrit nano biyokatalizörün sadece katalitik aktivite ve kararlılıkları incelenmiş olup, polimerleşme reaksiyonlarında kullanımı araştırılmamıştır.

Bu çalışmada; HRP- Fe^{2+} hibrit nano biyokatalizörünün katalitik aktivitesinin ve kararlılığının, fenol türevi bir bileşik olan hidrokinon'un polimerleşmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; HRP- Fe^{2+} biyokatalizörü, serbest HRP enzimine kıyasla oldukça yüksek kararlılık ve az da olsa daha düşük katalitik aktivite göstermiştir.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Kimyasallar

Metanol (İsolab, katalog# 947046), hidrokinon (Merck, katalog# 822333), pH 7.4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, MP biomedicals, katalog# 2810305), hidrojen peroksit (Merck, katalog# 1.08597), demir (II) sülfat ($FeSO_4$, Sigma-Aldrich, katalog#F8263), horseradish peroksidaz (HRP) enzimi (Sigma-Aldrich, 77332, lyophilized, powder, beige, ~150 U/mg).

Kullanılan Alet ve Cihazlar

Sentezlenen polimerlerin 1H ve ^{13}C nükleer manyetik rezonans (NMR) karakterizasyonu için Bruker-Instruments-NMR Spectrometer (DPX-400) kullanılmıştır. Elde edilen polimerlerin Termogravimetrik analizleri (TGA) Mettler-Toledo TGA/DSC 1 Star system termal analiz cihazı ile azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Analizler için yaklaşık 5-10 mg numune alınmış ve oda sıcaklığı ile 900 °C sıcaklık aralığında dakikada 10 °C sıcaklık artış hızı ile termal bozunma sıcaklıkları tespit edilmiştir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizleri için Shimadzu LC-20AD cihazı kullanılmış ve analizler Agilent PLgel mixed-B kolonu kullanılarak HPLC saflıkta N,N'-dimetilformamit (DMF) hareketli faz ile 1 mL/dakika akış hızında 40 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon için polistiren (PS) standardı kullanılmıştır.

Fe^{2+} iyonu ve HRP ile elde edilen hibrit nano biyokatalizörün (HRP- Fe^{2+}) sentezi

$FeSO_4$ çözeltisi hazırlanır ve bu çözelti üzerine pH 7.4 PBS fosfat tamponu içerisindeki HRP enzimi eklenir. Genel olarak Fe^{2+} iyonunun ve HRP enziminin son çözeltideki konsantrasyonlarının sırasıyla 0,1 mg mL⁻¹ ve 0,8 mM olmasına dikkat edilir. Elde edilen çözelti homojenliği sağlamak amacıyla bir süre karıştırılıp, +4 °C sıcaklıkta 3 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra sarı renkte çökelti elde edilir. Karışım daha sonra santrifüj edilir ve çökelek suyla dağıtılarak tekrar santrifüj edilir. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak reaksiyona girmeyen kısımlar uzaklaştırılır. Daha sonra elde edilen nano çiçekler oda sıcaklığında vakum altında kurutulur ve polimerleşme için kullanılır (Ocsoy ve ark., 2015; Gokturk ve ark., 2020).

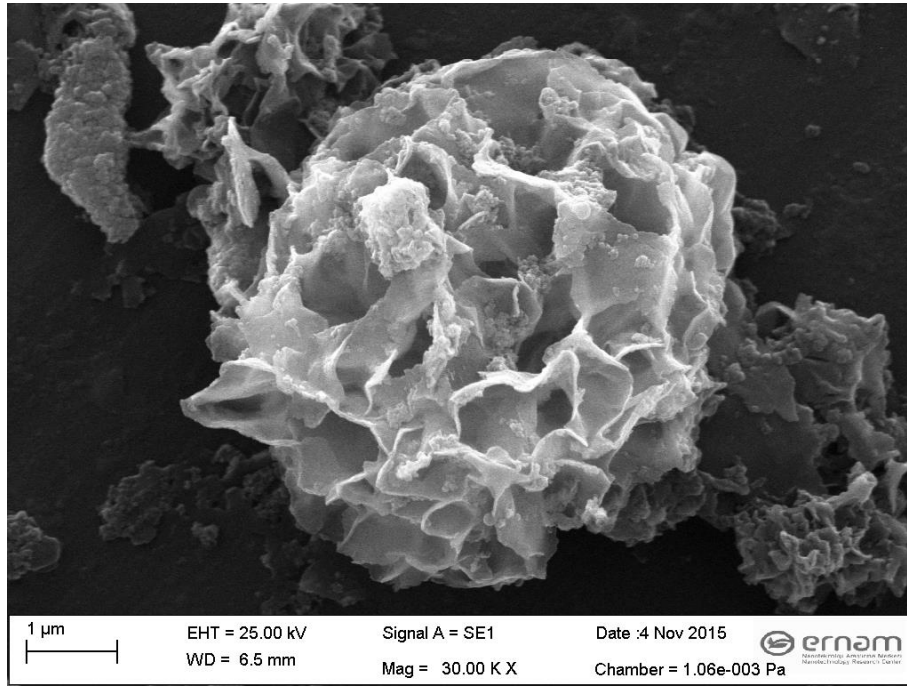
Hidrokinon'un polimerleşme yöntemi

Hidrokinon ve HRP- Fe^{2+} katalizörü 5 mL tampon çözelti içerisine konulur ve reaksiyon istenilen sıcaklığa ayarlanır. Elde edilen karışım üzerine 15 dakika arayla, 15 defa 70 µL H_2O_2 eklenir.

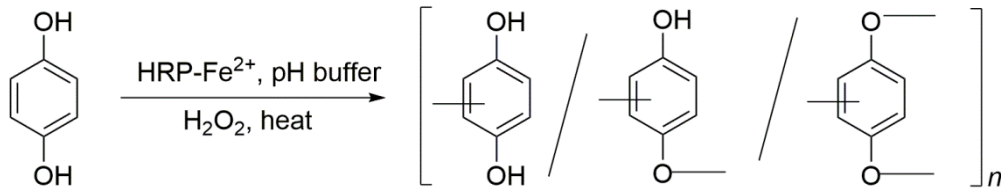
Reaksiyonun tamamlanmasının ardından, çökmüş durumdaki polimer santrifüj edilerek ayrılır. Elde edilen polimer su ve metanol ile yıkanarak 60 °C sıcaklıkta kurutulur (Topal ve ark., 2017).

BULGULAR VE TARTIŞMA

HRP enzimi ile Fe^{2+} iyonunun kompleksleşmesi neticesinde hibrit nano çiçek yapılı biyokatalizör (HRP- Fe^{2+}) elde edilmiştir. HRP- Fe^{2+} katalizörünün oluşum basamakları literatürde detaylı bir şekilde verilmiştir (Ocsoy ve ark., 2015). Bu çalışmadaki metot uygulanarak elde edilen HRP- Fe^{2+} biyokatalizörünün morfolojisi Şekil 1'de verilen SEM görüntüsünde görülmektedir.



Şekil 1. Çiçek şekilli hibrit HRP- Fe^{2+} biyokatalizörünün SEM görüntüsü.



Şekil 2. Hidrokinon'un HRP- Fe^{2+} nano biyokatalizörü ile H_2O_2 eşliğinde polimerleştirilmesi.

Hidrokinon monomerinin HRP- Fe^{2+} biyokatalizörü ile polimerleşme davranışının incelenmesi amacıyla öncelikli olarak optimum polimerleşme koşulu belirlenmiştir (Şekil 2). Bunun için hidrokinon monomerinin HRP- Fe^{2+} ile farklı pH, farklı sıcaklık ve farklı oranlardaki katalizör konsantrasyonları ile polimerleşme davranışındaki değişim gözlenmiş ve optimum polimerleşme koşulu bulunmuştur (Çizelge 1). Genel olarak polimerleşmeler üç farklı pH tamponu (pH 7.0, 7.4 ve 8.0) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, HRP- Fe^{2+} hibrit biyokatalizörü kullanılarak gerçekleştirilen hidrokinonun polimerleşme deneyleri pH 7.4'de en yüksek verimde polimer ürünü vermiştir (Çizelge 1, deney no 3). pH 7.0 ve 8.0 de gerçekleştirilen denemelerde ise, pH 7.4'e kıyasla daha düşük verimde polimer elde edilmiştir (Çizelge 1, deney no 5 ve 6).

Çizelge 1. Hidrokinon'un HRP-Fe²⁺ nano biyokatalizörü ile polimerleştirilmesi

Deney No*	Katalizör miktarı (mg)	pH	T _p (°C)	Verim (%)	T ₅₀ (°C)	900 °C'deki Kalıntı (%)	M _n (g mol ⁻¹)	DI
1	10	7.4	40	13	468	13	5700	.05
2	10	7.4	50	25	538	13	6000	.04
3	10	7.4	60	44	592	26	6900	.11
4	10	7.4	70	42	515	19	6200	.06
5	10	7.0	60	25	530	13	4700	.18
6	10	8.0	60	37	676	40	5300	.06
7	20	7.4	60	43	521	10	6600	.09
8	5	7.4	60	36	574	14	2900	.13
9	15	7.4	60	43	556	26	6300	.08

*reaksiyonlar 200 mg hidrokinon kullanılarak H₂O₂ eşliğinde gerçekleştirilmiştir. T_p : polimerleşme sıcaklığı, T₅₀ : numunenin %50' sinin bozunmuş olduğu sıcaklık, M_n: sayıca ortalama molekül ağırlığı, PDI: polidispersite (heterojenlik) indeksi.

Optimum reaksiyon pH'sı belirlendikten sonra sıcaklık optimizasyonu denemelerine başlanmış ve dört farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen (40, 50, 60 ve 70 °C) optimizasyon denemelerine göre HRP-Fe²⁺ ile pH 7.4 tamponu içerisinde 60 °C sıcaklıkta en yüksek verimde poli(hidrokinon) elde edilmiştir (Çizelge 1, deney no 3). Bu bulgu son derece önemlidir, çünkü serbest HRP enziminin 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda termal olarak aktivitesini kaybettiği ve denatüre olduğu bilinmektedir (Kumbul ve ark., 2015; Yildirim ve ark., 2016). Buna karşın kullanılan HRP-Fe²⁺ biyokatalizörü ise 70 °C gibi sıcaklıklarda dahi aktivite göstermektedir. Bu sonuç HRP-Fe²⁺ biyokatalizörünün yüksek sıcaklık gerektiren reaksiyonlarda da kullanılabilme imkânını sağlamaktadır.

Optimum reaksiyon sıcaklığı belirlendikten sonra, HRP-Fe²⁺ biyokatalizörünün reaksiyondaki konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Monomer miktarının %5 ağırlığınca HRP-Fe²⁺ eklenmesi (Çizelge 1, deney no 3) ile en yüksek verimde (%44) polimer sentezlenmiştir. Katalizör miktarının %2.5'a düşürülmesi (Çizelge 1, deney no 8) veya %7.5 ile %10'a artırılması ile (Çizelge 1, deney no 7 ve 9) polimerleşme verimlerinde artış gözlenmemiştir.

Çizelge 2. Hidrokinon'un serbest HRP enzimi ile polimerleştirilmesi

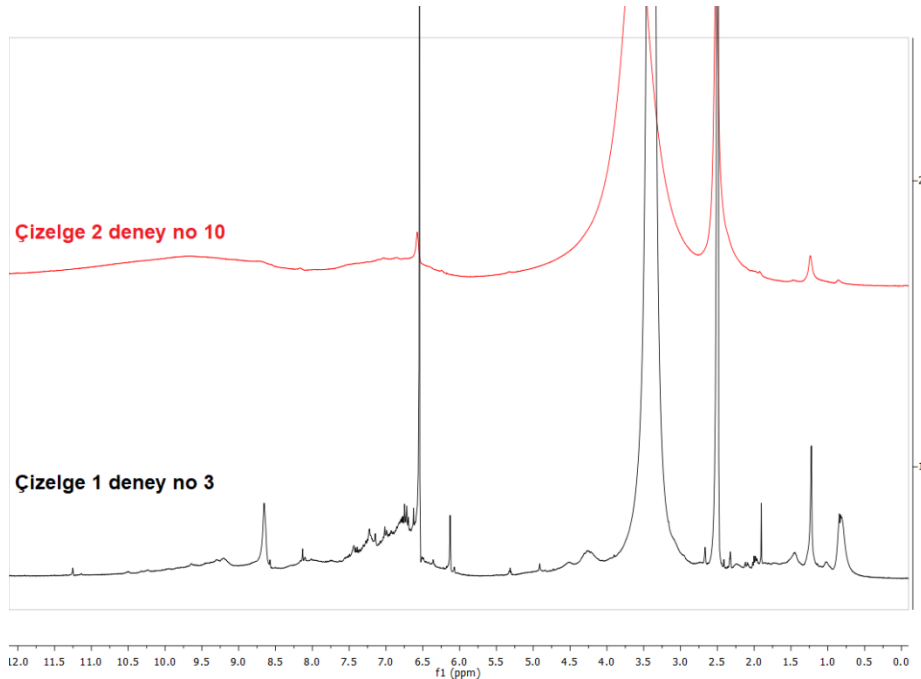
Deney No*	Katalizör miktarı (mg)	T _p (°C)	Verim (%)	T ₅₀ (°C)	900 °C'deki Kalıntı (%)	M _n (g mol ⁻¹)	PDI
10	5	25	49	676	44	50000	1.15
11	5	30	35	779	40	49000	1.16
12	5	40	28	740	35	39000	1.17
13	10	25	51	776	42	63000	1.11
14	15	25	54	801	42	69000	1.08

*Tüm polimerleşmeler 200 mg hidrokinon kullanılarak H₂O₂ eşliğinde pH 7.4 PBS tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. T_p : polimerleşme sıcaklığı, T₅₀ : numunenin %50 sinin bozunmuş olduğu sıcaklık, M_n: sayıca ortalama molekül ağırlığı, PDI: polidispersite (heterojenlik) indeksi.

HRP-Fe²⁺ biyokatalizörünün serbest HRP enzimine kıyasla aktivitesinin ve kararlılığının ne ölçüde değiştiğini kıyaslamak amacıyla, hidrokinon ile gerçekleştirilen polimerleşme denemeleri serbest HRP enzimiyle de gerçekleştirilmiştir. Böylece HRP' nin Fe²⁺ ile koordinasyonunun enzimin serbest haline kıyasla polimerleşme verimine ve elde edilen polimerlerin molekül ağırlıklarına etkisi gözlemlenmiştir. Hidrokinon'un serbest HRP enzimi ile polimerleştirilmesi ile elde edilen veriler Çizelge 2' de gösterilmektedir. Çizelge 2'de görüldüğü gibi, serbest HRP enzimi ile gerçekleştirilen hidrokinon'un polimerleşmesi, pH 7.4 koşulunda 25 °C reaksiyon sıcaklığında ve hidrokinon'un ağırlıkça %2.5 oranında serbest HRP enzimi eklenmesi ile en yüksek verimde poli(hidrokinon) elde

edilmiştir (Çizelge 2, deney no 10). 25 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda polimerleşme verimi düşmektedir (Çizelge 2, deney no 11 ve 12). Literatürden bilindiği üzere yüksek sıcaklıklarda HRP enzimi denatürasyona uğradığı için polimerleşme verimi düşmektedir (Kumbul ve ark., 2015; Yildirim ve ark., 2016). Yapılan çalışmada HRP-Fe²⁺ biyokatalizörü ile gerçekleştirilen polimerleşmelerde katalizörün 60 °C gibi yüksek sıcaklığa dayanıklılık gösterip aktivitesini kaybetmemesi ve en yüksek verimde ürün vermesi sentezlediğimiz HRP-Fe²⁺ biyokatalizörünün, serbest HRP enzime kıyasla daha yüksek kararlılığa sahip olduğunu kanıtlamaktadır. HRP enzim konsantrasyonunun polimerleşme üzerine etkisini görmek amacıyla ağırlıkça %5 ve %7.5 oranlarında enzim eklenmesiyle de polimerleşmeler gerçekleştirilmiş (Çizelge 2, deney no 13 ve 14) ancak elde edilen ürünlerin verimlerinin %2.5 oranında katalizör eklenmesiyle elde edilen ürünün verimiyle yaklaşık olarak aynı olduğu gözlenmiştir. Katalizör maliyeti de düşünülerek serbest HRP enzimi ile gerçekleştirilen polimerleşmelerde optimum katalizör konsantrasyonunun ağırlıkça %2.5 oranında olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 2, deney no 10).

Çizelge 1 ve 2 dikkatlice incelendiğinde, HRP-Fe²⁺ nano biyokatalizörü ile gerçekleştirilen polimerleşmelerin, serbest HRP enzimi kullanılarak gerçekleştirilen polimerleşmelere kıyasla hemen hemen benzer verimlerde polimer ürünü verdiği görülmektedir. Ayrıca elde edilen polimerlerin molekül ağırlıkları incelendiğinde; HRP-Fe²⁺ biyokatalizörü ile gerçekleştirilen polimerleşmelerde elde edilen polimerlerin, serbest HRP enzimi kullanılarak elde edilen polimerlere kıyasla daha düşük sayıca ortalama molekül ağırlığına sahip oldukları görülmektedir. Bu sonuç HRP-Fe²⁺ biyokatalizörünün serbest HRP enzime kıyasla az da olsa daha düşük katalitik aktivite gösterdiği ancak serbest HRP enzime kıyasla oldukça yüksek termal kararlılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.

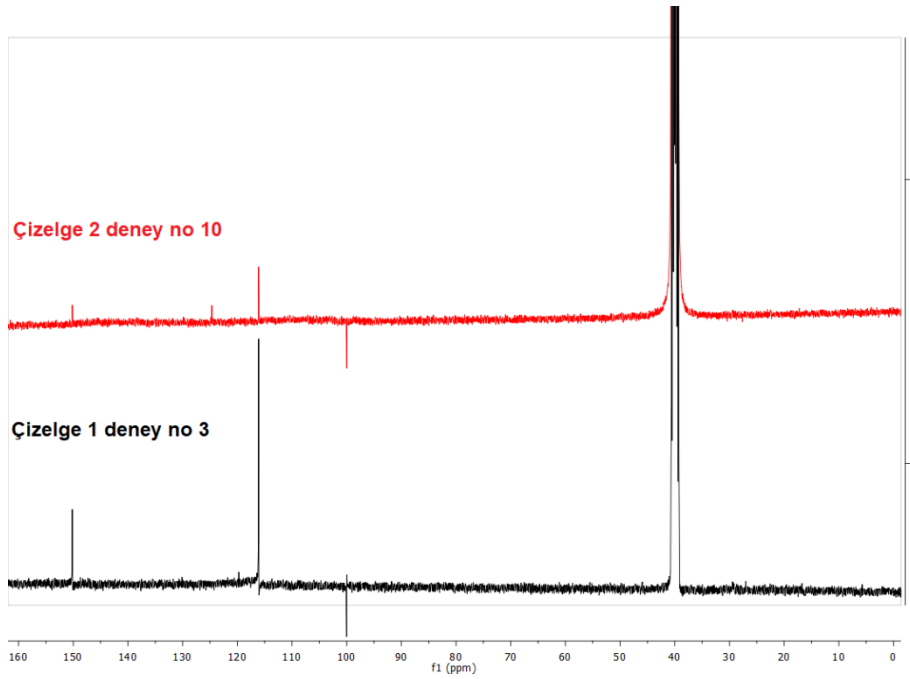


Şekil 3. HRP-Fe²⁺ (Çizelge 1, deney no 3) ve serbest HRP enzimi (Çizelge 2, deney no 10) kullanılarak sentezlenen polimerler için ¹H NMR spektrumları.

HRP-Fe²⁺ (Çizelge 1, deney no 3) ve serbest HRP enzimi (Çizelge 2, deney no 10) kullanılarak sentezlenen ürünlerin yapıları ¹H ve ¹³C NMR analizleriyle belirlenmiştir. Şekil 3'de her iki katalizörle elde edilen ürünlerin ¹H NMR spektrumları görülmektedir. Her iki spektrumda da 6.0 ile 11.0 ppm kimyasal kayma değerleri arasında gözlenen pikler yapıdaki aromatik protonlardan kaynaklanmaktadır. Serbest

HRP enzimi kullanılarak elde edilen ürünün ^1H NMR spektrumunda yayvanlaşma görülmektedir. Bu durum muhtemelen serbest HRP enzimi ile elde edilen ürünlerin daha yüksek molekül ağırlığına sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

HRP- Fe^{2+} (Çizelge 1, deney no 3) ve serbest HRP enzimi (Çizelge 2, deney no 10) kullanılarak sentezlenen ürünlerin ^{13}C NMR spektrumları Şekil 4'te verilmektedir. Her iki spektrumda da 100 - 150 ppm arasında gözlemlenen ^{13}C kimyasal kayma değerleri elde edilen poli(hidrokinon)'un aromatik karbon atomlarını göstermektedir. Her iki polimer üründe de ^{13}C NMR analizlerinde tüm ^{13}C pikleri net olarak gözlenmemektedir. Polimer ürünlerin ^{13}C NMR analizlerinde gözlemlenen bu problem muhtemelen daha yüksek frekansa sahip cihazların kullanılması veya durulma zamanının daha uzun olmasını sağlayarak aşılabilir.



Şekil 4. HRP- Fe^{2+} (Çizelge 1, deney no 3) ve serbest HRP enzimi (Çizelge 2, deney no 10) kullanılarak sentezlenen polimerler için ^{13}C NMR spektrumları.

Elde edilen polimerlerin termal kararlılıkları karşılaştırıldığında; serbest HRP enzimi kullanılarak sentezlenen polimerler, HRP- Fe^{2+} kullanılarak sentezlenen polimerlere kıyasla azda olsa daha yüksek termal kararlılık göstermektedir. Örneğin serbest HRP enzimi ile gerçekleştirilen polimerleşme için optimum koşul olan Çizelge 2 deney no 10 koşulundan elde edilen ürünün T_{50} sıcaklığı $676\text{ }^\circ\text{C}$ ve $900\text{ }^\circ\text{C}$ 'deki kalıntı yüzdesi de %44 olarak bulunurken, HRP- Fe^{2+} biyokatalizörü ile gerçekleştirilen polimerleşme için optimum koşul olan Çizelge 1 deney no 3 koşulunda bu değerler sırasıyla $592\text{ }^\circ\text{C}$ ve %26 olarak bulunmuştur. Serbest HRP enzimi kullanılarak sentezlenen polimerlerin daha yüksek molekül ağırlıklarına sahip olması sebebiyle termal kararlılıklarının daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Son olarak polimerleşmelerde kıyasladığımız en önemli parametrelerden biri olan elde edilen polimerlerin molekül ağırlıklarını inceleyecek olursak; ilginç bir şekilde HRP- Fe^{2+} hibrit nano katalizörü kullanılarak elde edilen ürünlerin molekül ağırlıklarının düşük oldukları ve genel olarak $3000 - 7000\text{ g mol}^{-1}$ aralığında değişim gösteren oligomer formunda oldukları sonucu karşımıza çıkmaktadır. Serbest HRP enzimi kullanılarak gerçekleştirilen polimerleşmelerde ise, HRP- Fe^{2+} hibrit biyokatalizörü kullanılarak elde edilen ürünlerin aksine oldukça yüksek molekül ağırlığına sahip ürünler elde edilmiştir. Tüm bu sonuçlar, her ne kadar HRP- Fe^{2+} hibrit biyokatalizörün kararlılığının

serbest HRP enzimine kıyasla fazla olduğunu gösterse de, aktivitesinin serbest HRP enzimine kıyasla azalma gösterdiği sonucunu ortaya koymaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak; Fe^{2+} iyonlarının HRP enzimiyle kompleksleşmesi neticesinde oluşturduğu HRP- Fe^{2+} hibrit nano biyokatalizörü ile gerçekleştirilen hidrokinon'un polimerleşmesi deneylerinin serbest HRP enzimi kullanılarak gerçekleştirilen polimerleşmelerle benzer verimlerde ürün verdiği görülmüştür. Ancak serbest HRP kullanılarak elde edilen polimerlerin molekül ağırlıkları ve termal kararlılıkları, HRP- Fe^{2+} kullanılarak sentezlenen polimerlere kıyasla oldukça yüksektir. Ayrıca; HRP- Fe^{2+} biyokatalizörleriyle gerçekleştirilen polimerleşmeler 60 °C gibi yüksek sıcaklıklarda denatürasyona uğramadan yüksek verimde ürün vermiştir. Poli(hidrokinon), pH 7.4 tamponu içerisinde 60 °C sıcaklıkta ve ağırlıkça %5 oranında HRP- Fe^{2+} nano biyokatalizörü eklenmesiyle %44 verimle sentezlenmiştir. Ancak serbest HRP enzimi kullanılarak yapılan denemelerde 25 °C sıcaklıkta %49 verimle poli(hidrokinon) elde edilmiştir. Çalışma sonuçları; HRP- Fe^{2+} nano biyokatalizörünün, serbest HRP enziminin denatüre olduğu 60 °C ve üzeri yüksek sıcaklıklarda bile bozunmaya uğramadan katalitik aktivite göstermesi, sentezlenen katalizörlerin serbest HRP enzimine kıyasla termal kararlılıklarının oldukça arttığını ancak katalitik aktivitelerinin ise daha düşük olduğunu göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "18.M.011" numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Avnir D, Braun S, Lev O, Ottolenghi M, 1994. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chemistry of Materials*, 6: 1605–1614.
- Dordick JS, Marletta MA, Klivanov AM, 1987. Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*, 30 (1): 31–36.
- Fernandez-Lafuente R, 2009. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45: 405–418.
- Ge J, Lei J, Zare RN, 2012. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology*, 7: 428–432.
- Gokturk E, Ocoy I, Turac E, Sahmetlioglu E, 2020. Horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers with enhanced catalytical activities for polymerization reactions of phenol derivatives. *Polymers for Advanced Technologies*, 1-7. Doi: 10.1002/pat.4956
- Goretzki C, Ritter H, 1998. Enzymatic oxidative polymerization of aminochalcones by use of horseradish peroxidase. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 199 (6): 1019–1024.
- Gross RA, Kumar A, Kalra B, 2001. Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chemical Reviews*, 101 (7): 2097–2124.
- Isci I, Gokturk E, Turac E, Sahmetlioglu E, 2016. Chemoenzymatic polymerization of hydrazone functionalized phenol. *Polymer Science Series B*, 58 (4): 411–420.
- Kim J, Park J, Kim H, 2004. Synthesis and characterization of nanoporous silica support for enzyme immobilization. *Colloids and Surfaces A*, 241: 113–117.
- Kocak A, Kumbul A, Gokturk E, Sahmetlioglu E, 2016. Synthesis and characterization of imine-functionalized polyphenol via enzymatic oxidative polycondensation of a bisphenol derivative. *Polymer Bulletin*, 73 (1): 163–177.

- Kumbul A, Gokturk E, Turac E, Sahmetlioglu E, 2015. Enzymatic oxidative polymerization of para-imine functionalized phenol catalyzed by horseradish peroxidase. *Polymers for Advanced Technologies*, 26 (9): 1123–1129.
- Kumbul A, Gokturk E, Sahmetlioglu E, 2016. Synthesis, characterization, thermal stability and electrochemical properties of ortho-imine-functionalized oligophenol via enzymatic oxidative polycondensation. *Journal of Polymer Research*, 23 (52).
- Lee C, Chiang H, Li K, Ko F, Su C, Yang Y, 2009. Surface Reaction Limited Model for the Evaluation of Immobilized Enzyme on Planar Surfaces. *Analytical Chemistry*, 81: 2737–2744.
- Lin Z, Xiao Y, Yin Y, Hu W, Liu W, Yang H, 2014. Facile Synthesis of Enzyme-Inorganic Hybrid Nanoflowers and Its Application as a Colorimetric Platform for Visual Detection of Hydrogen Peroxide and Phenol. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6: 10775–10782.
- Luckarift HR, Spain JC, Naik RR, Stone MO, 2004. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology*, 22: 211–213.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1451–1463.
- Ocsoy I, Dogru E, Usta S, 2015. A new generation of flowerlike horseradish peroxidases as a nanobiocatalyst for superior enzymatic activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 75–76: 25–29.
- Rana S, Yeh Y, Rotello VM, 2010. Engineering the nanoparticle–protein interface: applications and possibilities. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14 (6): 828–834.
- Sheldon RA, 2007. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advances Synthesis and Catalysis*, 349: 1289–1307.
- Somturk B, Hancer M, Ocsoy I, Ozdemir N, 2015. Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. *Dalton Transactions*, 44: 13845–13852.
- Tonami H, Uyama H, Kobayashi S, Rettig K, Ritter H, 1999. Chemoenzymatic synthesis of a poly(hydroquinone). *Macromolecular Chemistry and Physics*, 200 (9): 1998–2002.
- Topal Y, Tapan S, Gokturk E, Sahmetlioglu E, 2017. Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of ortho-imino-phenol: synthesis, characterization, thermal stability and electrochemical properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21 (6): 731–740.
- Vietch NC, 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65 (3): 249–259.
- Wang P, 2009. Multi-scale Features in Recent Development of Enzymic Biocatalyst Systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152: 343–352.
- Wang L, Wang Y, He R, Zhuang A, Wang X, Zeng J, Hou JG, 2013. A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Enzymatic Performance. *Journal of the American Chemical Society*, 135: 1272–1275.
- Wang R, Zhang Y, Lu D, Ge J, Liu Z, Zare RN, 2013. Functional protein–organic/inorganic hybrid nanomaterials. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5: 320–328.
- Wu CW, Lee JG, Lee WC, 1998. Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27: 225–230.
- Yildirim P, Gokturk E, Turac E, Demir HO, Sahmetlioglu E, 2016. Chemoenzymatic polycondensation of para-benzylamino phenol. *Chemical Papers*, 70 (5): 610–619.
- Zhu L, Gong L, Zhang Y, Wang R, Ge J, Liu Z, Zare RN, 2013. Rapid Detection of Phenol Using a Membrane Containing Laccase Nanoflowers. *Chemistry- An Asian Journal*, 8: 2358–2360.