

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERYUM OKSİT ESASLI HİBRİT MATERYALİN PEROKSİDAZ
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Naiba JABIYEVA

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Bilim Dalı

ŞUBAT 2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERYUM OKSİT ESASLI HİBRİT MATERYALİN PEROKSİDAZ
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Naiba JABIYEVA

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdil ÖZDEMİR

ŞUBAT 2024

Naiba JABIYEVA tarafından hazırlanan “SERYUM OKSİT ESASLI HİBRİT MATERYALİN PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması 16.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı **Analitik** Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı :

Jüri Üyesi :

Jüri Üyesi :



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “SERYUM OKSİT ESASLI HİBRİT MATERYALİN PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(21/02/2024).

Naiba Jabiyeva



TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirirken geçirdiğim süreçte bilgisiyle ve tecrübeleriyle yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Abdil ÖZDEMİR'e ve Yüksek Lisans stajı için bulunduğum Grenoble Alpler Üniversitesi'nde Dr. Michael HOLZINGER'e bilgilerini paylaştığı için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda sevgisi ve desteğiyle yanımda olan değerli eşim Dr. Bekir ÇAKIROĞLU'na ve uzakta olmalarına rağmen beni destekleri ile her zaman cesaretlendiren canım aileme en içten şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu çalışma için bütçe sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığına (Proje No: 2023-19-43-56) teşekkür ederim.

Naiba Jabiyeva



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SİMGELER	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Nanozimler	5
2.2. Nanozimlerin Sınıflandırılması	6
2.3. Peroksidaz Enzimleri	6
2.4. Peroksidaz Aktivitesi Gösteren Nanozimler ve Kataliz Mekanizmaları	7
2.5. Nanozimlerin Katalitik Aktivitesinin Ayarlanması	8
2.5.1. Nanozim aktivitesine morfolojinin etkisi	8
2.5.2. Nanozim aktivitesine partikül boyutunun etkisi	8
2.5.3. Nanozim aktivitesine sıcaklık ve pH etkisi	9
2.5.4. Nanozim aktivitesine yüzey modifikasyonunun etkisi	9
2.5.5. Nanozim aktivitesine hibrit malzeme oluşumunun etkisi	10
2.6. Nanozimlerin Kullanım Alanları	10
3. Materyal ve yöntem	13
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	13
3.2. Kullanılan Cihazlar	13
3.3. Yöntem	14
3.3.1. Polistiren kürelerin (PS) sentezi	14
3.3.2. PS şablonunun imalatı ve CeO ₂ IOPC'lerin hazırlanması	14
3.3.3. CeO ₂ IOPC'lerde altın nanopartiküllerin (Au NP'ler) kaplanması	15
3.3.4. Peroksidaz benzeri aktivite ölçümleri	15
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	17
4.1. Nanozim Kaplı Substratının Karakterizasyonu	17
4.2. Nanozimin İki Enzim Benzeri Aktivite Mekanizması	26
4.3. Nanozimin Kararlı Durum Kinetik Analizi	31
4.4. Nanozimin Kolorimetrik Hidrojen Peroksit Tespiti ve Sensör Performansı	32
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	47



KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Au NP	: Altın Nanopartikül
CAT	: Katalaz
CB	: İletim bandı
DS	: Deiyonize su
FESEM	: Emisyon taramalı elektron mikroskobu
GOx	: Glukoz oksidaz
HRP	: Yabanturpu peroksidaz
h^+	: Elektron boşlukları
IOPC	: Ters opal fotonik kristal
$O_2^{\bullet-}$	: Süperoksit anyonları
POD	: Peroksidaz
PS	: Polistiren
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
UV-vis	: UV-görünür alan
VB	: Değerlik bandı
XRD	: X ışını difraksiyonu



SİMGELER

°	: Derece
°C	: Santigrat [derece]
a.u.	: Rastgele birim
C	: Konsantrasyon [mol/L]
dk	: Dakika
E _g	: Yarıiletken bant aralığı [eV]
m	: Metre
nm	: Nanometre
µm	: Mikrometre
L	: Litre
V	: Reaksiyon hızı [mM/dk]
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
s	: Saniye
t	: Zaman [dk]
V	: Potansiyel [V]
ε	: Molar absorbans katsayısı [L/mol/cm]
ξ	: Zeta potansiyeli [mV]
λ	: Işığın dalgaboyu [nm]



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Peroksidaz aktivitesi gösteren nanozimlerin performans karşılaştırması 34





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1. A. Kaplı nanozimin üretimi: a. PS şablonunun kendi kendine birikimi, b. Seryum oksit öncülünün infiltrasyonu, c. Seryum oksitin kalsinasyonu ve PS'nin uzaklaştırılması, d. Au NP kaplama, B. Kaplı nanozim kullanılarak tek adımda kolorimetrik hidrojen peroksit ölçümü, C. CeO ₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin peroksidaz benzeri aktivitesi için varsayılan mekanizma.	18
Şekil 4.2. Nanozim materyalinin üstten FESEM görüntüsü (iç resim: Au NP'lerin kolloidi), B. PS parçacık boyutu dağılım grafiği (iç resim: PS şablonunun opallığı).	19
Şekil 4.3. Cam üzerine kaplı CeO ₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin XRD spektrumu.....	20
Şekil 4.4. CeO ₂ IOPC'lerin Raman spektrumu.	21
Şekil 4.5. CeO ₂ IOPC'lerin UV-vis spektrumu.....	21
Şekil 4.6. CeO ₂ IOPC'lerin ve CeO ₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin UV-görünür alan absorbans spektrumları.....	22
Şekil 4.7. Au NP'lerin UV-görünür alan absorbans spektrumu.	22
Şekil 4.8. Nanozimin pH grafiğine karşı Zeta potansiyeli grafiği	23
Şekil 4.9. CeO ₂ IOPC'ler ve CeO ₂ IOPC'ler/Au NP'lerin yansıma spektrumları.	24
Şekil 4.10. Kubelka-Munk fonksiyonu ve CeO ₂ IOPC'ler ve CeO ₂ IOPC'ler/Au NP'ler için ışık enerjisi grafikleri	24
Şekil 4.11. Optimum reaksiyon süresi.	25
Şekil 4.12. Optimum pH.	25
Şekil 4.13. Optimum sıcaklık	26
Şekil 4.14. Optimum ABTS konsantrasyonu.....	26
Şekil 4.15. H ₂ O ₂ varlığında 9 dakikalık reaksiyondan sonra farklı reaksiyon sistemlerinde ABTS'nin nanozim katalizli oksidasyonunun UV-vis absorbans spektrumları: (a) CeO ₂ IOPC'ler, (b) CeO ₂ IOPC'ler/Au NP'ler, (c) CeO ₂ ince film/Au NP'ler, (d) Optimum koşullar ve ışık altında CeO ₂ IOPC'ler/Au NP'ler.....	27
Şekil 4.16. Hibrit nanozimin çoklu enzim taklit edici aktiviteleri üzerinde süpürücü ve aktivatör etkisi.....	30
Şekil 4.17. Görünür ışık ($\lambda \geq 400$ nm) altında 0,1 M Na ₂ SO ₄ çözeltisinde 0 V potansiyelde (Ag/AgCl'ye karşı) fotoakım oluşumları.	30
Şekil 4.18. 5 mV/s'de CeO ₂ IOPC'lerin katodik LSV ölçümü.....	31
Şekil 4.19. Sabit ABTS konsantrasyonunun aktivite verilerinden Michaelis-Menten eğrisi.....	32
Şekil 4.20. Absorbans spektrumları ve hidrojen peroksit konsantrasyonu eğrisi.	33
Şekil 4.21. Hidrojen peroksit tespiti için kalibrasyon eğrisi.	33
Şekil 4.22. Hibrid nanozimin, glukoz ve glukoz analoglarına maruz bırakıldığında hidrojen peroksit tespiti için seçiciliği	35
Şekil 4.23. Nanozimin stabilitesi.	35
Şekil 4.24. Nanozimin tekrar üretilebilirliği	36



SERYUM OKSİT ESASLI HİBRİT MATERYALİN PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

“Nanozimler” olarak adlandırılan yapay enzimler, enzim benzeri katalitik aktivitelere sahiptirler. Kolay, düşük maliyetli sentez, ayarlanabilir morfoloji ve katalitik aktivite, güçlü stabilite, zorlu koşullar altında yüksek katalitik aktivite ve zengin yüzey kimyası gibi üstün özellikleri nedeniyle biyosensörlerde destek malzemeleri, çevresel kirleticilerin parçalanması, hastalık teşhisi gibi çeşitli alanlarda araştırma yapan bilim insanlarının ilgisini çekmektedir.

Günümüzde gıda endüstrisinde, biyofarmasötikte, çevresel analizlerde ve klinik teşhiste hızlı, stabil ve hassas H_2O_2 tespiti büyük önem taşımaktadır. H_2O_2 analizi için kolorimetri, kemilüminesans/floresan bazlı sistemler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve elektrokimyasal sistemler dahil olmak üzere birçok yöntem kullanılmıştır.

Peroksidazlar, hücre ortamında sitotoksik H_2O_2 'nin parçalanmasını katalize eder. Son zamanlarda, tek adımlı kolorimetrik ölçüm platformları üretmek için peroksidaz benzeri aktivite gösteren malzemeler önerilmektedir. H_2O_2 'in miktar tayini için nanozimlerin kullanılması uygun görülmektedir.

Karbonlu malzemeler, MOF'ler, metal nanomalzemeler, kalkojenitler, metal oksitler dahil olmak üzere çeşitli nanomalzemelerin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Bunlar arasında metal oksitler, morfolojik olarak kontrol edilebilir üretimleri, yüksek stabiliteleri ve üstün peroksidaz benzeri aktivite göstermeleri nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür.

Bu çalışmada, cam slayt üzerinde altın nanopartikülleri kaplı CeO_2 ters opal fotonik kristallerinden (IOPC'ler) oluşan hibrit nanozim, avantajlı bir şekilde gözenekli morfolojiye sahip olarak üretildi. Yüzeydeki seryumun farklı değerlik durumları, yüksek yüzey alanı ve buna bağlı olarak bol miktarda aktif bölge içermesi nanozimin avantajları arasındadır. Nanozimin oksidaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri, H_2O_2 varlığında gözle fark edilebilir bir şekilde kromojenik substrat 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS)'nin katalitik oksidasyonu ile incelenmiştir. Ce^{3+} ve Ce^{4+} 'dan oluşan CeO_2 IOPC'ler ve Au NP'ler peroksidaz benzeri aktivite göstererek H_2O_2 varlığında ABTS'yi oksitlediği gözlemlendi. Nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi, hibritin ışığa duyarlı doğası nedeniyle ışık varlığında büyük ölçüde iyileştirildi. Nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi, $2,7 \mu M$ LOD ile $0,009$ ila $500 \mu M$ aralığında H_2O_2 'nin doğrusal tespitini mümkün kıldı. Kabul edilebilir nanozim aktivitesi muhtemelen H_2O_2 'nin nanozimin aktif bölgelerine kolay erişiminden kaynaklanmaktadır. Gözenekli yapı, reaktanların ve ürünlerin kolayca yönlendirilmesini sağladı. Nanozimin periyodik yapısı aynı zamanda iyi bir tekrarlanabilirliği de mümkün kıldı. İşlevselleştirme olmadan nanozim, hidrojen peroksit ölçümleri için peroksidaz enzimlerine iyi bir alternatif olabilir.



DETERMINATION OF PEROXIDASE ACTIVITY OF CERIUM OXIDE BASED HYBRID MATERIAL

SUMMARY

Enzymes are mostly sophisticated proteins that catalyze biological transformations and have substantial selective catalytic activity towards biologically, forensically, and environmentally important substances.

However, enzymes have some limitations including high-cost purification, labor-intensive preparations, high susceptibility to pH, temperature, ionic strength, organic solvents, surfactants, and low recyclability which hamper their widespread use. Additionally, proteases can digest the enzymes.

Artificial enzymes called “nanozymes” can resemble enzyme-like catalytic activities and have received increasing interest from researchers in various areas, such as support materials in biosensors, degradation of environmental pollutants, and disease diagnosis, owing to their superior properties such as facile, low-cost synthesis, adjustable morphology and catalytic activity, strong stability, high catalytic activity under harsh conditions, and rich surface chemistry.

Nowadays, fast, stable, and sensitive H_2O_2 detection in food industry, biopharmaceutical, environmental analysis, and clinical diagnosis is of great importance. H_2O_2 accumulation in biological fluids leads to biological harm that results in the development of progressive neurodegenerative diseases, Alzheimer's and Parkinson's diseases, cancer, etc.

Different methods have been utilized for H_2O_2 analysis, including colorimetry, chemiluminescence/fluorescence-based systems, high-performance liquid chromatography, and electrochemical systems.

Peroxidases catalyze the breakdown of cytotoxic H_2O_2 in the cellular environment. Recently, peroxidase-mimicking materials have been proposed to fabricate one-step colorimetric sensing applications. H_2O_2 monitoring is likely to be viable by using nanozymes.

Various nanomaterials, including carbonaceous materials (graphene oxide (Das ve ark, 2019), fullerenes, carbon nanotubes), MOFs, metal nanomaterials (Au NPs, Au NCs, Pd NPs, Pd nanosheets, Pt NPs), metal oxides (Fe_3O_4 , Mn_3O_4 , V_2O_5 , CuO, SnO_2 , Co_3O_4 , CeO_2 , CoFe_2O_4 MNPs), chalcogenides (CuS, MoSe_2 nanosheets, PtS_2 nanosheets), hemin etc. have been found to display peroxidase-like activity.

Among them, metal oxides gained more attention due to their controllable fabrication, high stability, and superior peroxidase-mimicking activity.

Nanozymes have integrated the outstanding merits of engineered nanomaterials and natural enzymes since the breakthrough work, which revealed the intrinsic peroxidase-like activity of magnetic Fe_3O_4 NPs.

The nanozymes are promising substitutes for high-cost enzymes due to their substantial catalytic stability and activity.

The catalytic activity of nanozyme can be adjusted by precise morphology engineering, surface functionalization, heterogeneous atom doping, NP size, and surface defects, viz. ledges, kinks, adatoms, and vacancies, which are coordinatively unsaturated and reactive.

The presence of dual oxidation states of the metal ions is favorable and the redox state of metal ions on the surface plays a pivotal role in redox enzyme-like activities.

However, nanozymes cannot catalyze one specific substrate as selectively as enzymes. The potential challenges guide the de novo nanozyme design and synthesis of nanozymes with uniform size and atomically precise structures.

Additionally, the catalytic activity of nanozymes has been boosted by enhancing the surface area, which can expose more active sites and preferential exposure of catalytically active atoms.

Among the oxidase-mimicking nanozymes, CeO₂ with multiple oxidation states has garnered attention due to its low-cost production, substantial catalytic activity, rich chemical versatility, low toxicity, high stability, environmental friendliness, and extraordinary electronic and optical properties.

However, the improvement of enzyme mimicking activity of CeO₂ is one of the potential challenges, and utilization of different morphologies can overcome this problem.

Noble metal nanoparticles such as Au NPs and their alloys have revealed oxidase-like activity owing to their substantial oxygen reduction catalytic activity and peroxidase-like activity. Au NPs have been widely used to catalyze glucose oxidation by molecular oxygen by generating H₂O₂.

Encouragingly, the catalytic performance and/or versatile activity of nanozymes have been significantly improved by functionally assembling several nanozymes, which show the same and/or different enzyme-mimicking activity for concurrent tandem catalysis and more sensitive-selective sensing of analytes.

To our knowledge, there is no report on IOPCs-based nanozyme material. Motivated by above consideration, we modified the morphology to increase the enzyme-mimicking activity, and the resulting hybrid nanomaterial showed promising peroxidase-like activity.

H₂O₂ measurement was successfully carried out with a good sensing performance by using the coupled CeO₂ IOPCs/Au NPs nanozyme as a substitute for oxidase-peroxidase enzymes, and light energy enhanced the nanozyme activity.

Also, enzyme-mimicking behavior was surveyed by putting forward a mechanism of nanozyme activity. The study can give an impetus to develop IOPCs-based nanozymes.

In this study, the hybrid nanozyme gold nanoparticles deposited CeO₂ inverse opal photonic crystals (IOPCs) on the glass slide were fabricated by bestowing the hybrid with the beneficial porous morphology with its unique advantages: its surface valence states, high surface area, and copious active sites.

The oxidase and peroxidase-mimicking activity was studied by observing the catalytic oxidation of chromogenic substrate 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) in the presence of H₂O₂, which can be visualized by the eyes.

Au NPs and CeO₂ IOPCs consisting of Ce³⁺ and Ce⁴⁺ can oxidize ABTS in the presence of H₂O₂ by mimicking peroxidase enzymes. The peroxidase-like activity of nanozyme was substantially improved by introducing light irradiation due to the photosensitive nature of the hybrid. The peroxidase-like activity of nanozyme enabled H₂O₂ linear detection over the range 9 to 500 μM, with a LOD of 2.7 μM.

Since CeO₂ IOPCs and Au NPs exhibit peroxidase-like activity to some extent, the assembly of these nanozymes revealed remarkable H₂O₂ sensing performance.

The use of IOPCs grants access to high number of catalytically active sites and enhanced the catalytic activity. The high accuracy and precision results from the facilitated and rapid access of H₂O₂ to the proximity of the sensor surface. The hybrid nanozyme has been successfully utilized to detect H₂O₂, and the introduction of visible light substantially increased the detection sensitivity.

This work proves the simple and sensitive nanozyme based assays for detection of various analytes and the nanozyme research will find its unique niche in the sensor area.

An outstanding light-assisted nanozyme for hydrogen peroxide detection was fabricated with the distinct merits of simplicity and low cost. The solution-based nanozymes have an undesired interfering effect for measuring light absorption.

On the other hand, the free-standing nanozymes can be removed from the post-reaction medium and negate this interference. While individual CeO₂ and Au NPs have been found to be excellent superoxide dismutase (SOD) and glucose oxidase substitutes, the hybrid of these materials exhibited remarkable peroxidase-like activity.

CeO₂ IOPCs and Au NPs-based materials can also act as photocatalysts, implying that the hybrid can harvest solar energy for photocatalytic reactions. The color generation of chromogenic colorless substrate ABTS was visible to the naked eye, such that the oxidized green product was discernible for hydrogen peroxide concentrations as low as 30 μM.

CeO₂-based nanomaterials have rich redox properties depending on their morphology and multiple enzyme-mimicking activity. CeO₂ nanozymes can catalyze H₂O₂ to generate reactive oxygen species under acidic conditions by showing peroxidase-like activity.

The acceptable nanozyme activity is probably owing to the easy access of H₂O₂ to the active sites of nanozyme. The porous architecture led to the easy channeling of reactants and products.

The periodic architecture of the nanozyme also led to decent reproducibility. Without functionalization, the nanozyme can be a promising alternative to peroxidase enzymes for hydrogen peroxide measurements.



1. GİRİŞ

Enzimler çoğunlukla biyolojik dönüşümleri katalize eden ve biyolojik, adli ve çevresel açıdan önemli maddelere karşı önemli seçici katalitik aktiviteye sahip olan kompleks proteinlerdir (de Jesus ve ark, 2013; Gross ve ark, 2017; Holzinger ve ark, 2021). Bununla birlikte, enzimlerin, yüksek maliyetli saflaştırma, yoğun emek gerektiren hazırlıklar, pH'a, sıcaklığa, iyonik kuvvete, organik çözücülere, yüzey aktif maddelere karşı yüksek duyarlılık ve düşük geri dönüşüm gibi bazı sınırlamaları vardır ve bunlar yaygın kullanımlarını engellemektedir (Bornscheuer, 2003; Çakıroğlu ve ark, 2023; Dicosimo ve ark, 2013). Enzimler, proteazlar tarafından sindirilebilirler (D. Li ve ark, 2010).

“Nanozimler” olarak adlandırılan yapay enzimler, enzim benzeri katalitik aktivitelere sahiptirler. Kolay, düşük maliyetli sentez, ayarlanabilir morfoloji ve katalitik aktivite, güçlü stabilite, zorlu koşullar altında yüksek katalitik aktivite ve zengin yüzey kimyasına sahip olma gibi üstün özellikleri nedeniyle biyosensörlerde destek malzemeleri, çevresel kirleticilerin parçalanması, hastalık teşhisi gibi çeşitli alanlardaki araştırmacıların artan ilgisini çekmektedir (Ganganboina & Doong, 2018; Mou ve ark, 2020; W. Wu ve ark, 2020).

Günümüzde gıda endüstrisinde, biyofarmasötikte, çevresel analizlerde ve klinik teşhiste hızlı, stabil ve hassas H_2O_2 tespiti büyük önem taşımaktadır (J. Zhang ve ark, 2021). Biyolojik sıvılarda H_2O_2 birikmesi, ilerleyici nörodejeneratif hastalıkların, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının, kanserin vb. gelişmesine yol açan biyolojik hasara neden olur (R. Li ve ark, 2023). H_2O_2 analizi için kolorimetri, kemilüminesans/floresan esaslı sistemler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve elektrokimyasal sistemler dahil olmak üzere farklı yöntemler kullanılmıştır (Zou ve ark, 2023). Peroksidazlar hücresel ortamda sitotoksik H_2O_2 'nin parçalanmasını katalize eder (B. Luo ve ark, 2023). Son zamanlarda, tek adımlı kolorimetrik ölçüm platformları üretmek için peroksidaz benzeri aktivite gösteren malzemeler önerilmiştir (J.-Q. Li ve ark, 2023; R. Li ve ark, 2023). H_2O_2 miktarı nanozimler kullanılarak belirlenebilir. Karbon esaslı malzemeler (grafen oksit (Das ve ark, 2019), fullerenler

(Hong ve ark, 2022), karbon nanotüpler (Gallay ve ark, 2020)), MOF'ler (Q. Chen, Zhang, ve ark, 2020), metal nanomalzemeler (Au NP'ler (Siddiqui ve ark, 2021), Au NC'ler (J. Chen ve ark, 2019), Pd NP'ler (R. Li ve ark, 2023), Pd nanotabakaları (Y. Tang ve ark, 2020), Pt NP'ler (H. Wang ve ark, 2021)), metal oksitler (Fe_3O_4 (Gao ve ark, 2007), Mn_3O_4 (Siddiqui ve ark, 2021), V_2O_5 (André ve ark, 2011), CuO (W. Chen ve ark, 2011), SnO_2 (Zou ve ark, 2023), Co_3O_4 (X. Zhang ve ark, 2020), CeO_2 (Amalraj ve ark, 2022), CoFe_2O_4 MNP'ler (Shi ve ark, 2011)), kalkojenitler (CuS (B. Luo ve ark, 2023), MoSe_2 nanotabakaları (X. Wu ve ark, 2018), PtS_2 nanotabakaları (W. Zhang ve ark, 2021)) ve hemin (J. Zhang ve ark, 2021) dahil olmak üzere çeşitli nanomalzemelerin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bunlar arasında metal oksitler, kontrol edilebilir üretimleri, yüksek stabiliteleri ve üstün peroksidaz benzeri aktiviteleri nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür (Shi ve ark, 2011).

Nanozimler, manyetik Fe_3O_4 NP'lerin özgün peroksidaz benzeri aktivitesini ortaya çıkaran çığır açıcı çalışmadan bu yana, tasarlanmış nanomateriyallerin ve doğal enzimlerin işlevlerini entegre etmiştir (Gao ve ark, 2007). Nanozimler, önemli katalitik stabiliteleri ve aktiviteleri nedeniyle, yüksek maliyetli enzimlerin yerine umut vaat eden alternatiflerdir (J. Chen ve ark, 2019; P. Zhang ve ark, 2019). Nanozimin katalitik aktivitesi, morfoloji mühendisliği, yüzey fonksiyonelleştirmesi, heterojen atom katkısı, NP boyutu ve yüzey kusurları (koordinat olarak doymamışlık ve reaktif olan çıkıntılar, kıvrımlar, adatomlar ve boşluklar) gibi faktöre göre ayarlanabilir (Park ve ark, 2021; Z. Wang ve ark, 2020). Metal iyonlarının ikili oksidasyon durumlarının varlığı istenen bir özelliktir ve yüzeydeki metal iyonlarının redoks durumu, redoks enzimi benzeri aktivitelerde çok önemli bir rol oynar (Tian ve ark, 2015). Ancak nanozimler belirli bir substratı enzimler kadar seçici bir şekilde katalize edemezler (Q. Wang ve ark, 2018). Potansiyel zorluklar, özgün nanozim tasarımına, tekdüze ve atomik olarak kusursuz yapılara sahip nanozimlerin sentezine yöneltmiştir (Q. Chen, Li, ve ark, 2020; Lu ve ark, 2021; W. Wu ve ark, 2020).

Ek olarak, nanozimlerin katalitik aktivitesi, daha aktif bölgeleri açığa çıkarabilecek ve katalitik olarak aktif atomların açığa çıkmasını sağlayabilecek yüzey alanının üretilmesiyle artırılmıştır (Mou ve ark, 2020). Peroksidaz aktivitesi gösteren nanozimler arasında ikili oksidasyon durumuna sahip CeO_2 , düşük maliyetli üretimi, önemli katalitik aktivitesi, kimyasal çok yönlülüğü, düşük toksisitesi, yüksek stabilitesi, çevre dostu olması ve olağanüstü elektronik ve optik özellikleri nedeniyle

dikkat çekmiştir (Gordeev ve ark, 2023; Ma ve ark, 2022; G. Tang ve ark, 2022). Ancak CeO₂'nin enzim taklit aktivitesinin geliştirilmesi potansiyel zorluklardan biridir ve farklı morfolojilerin kullanılması bu sorunun üstesinden gelebilir (Gordeev ve ark, 2023).

Au NP'ler ve bunların alaşımları gibi soy metal nanopartikülleri, önemli oksijen indirgeme katalitik aktiviteleri nedeniyle oksidaz (H. Zhang ve ark, 2018) ve peroksidaz (Alle ve ark, 2022) benzeri aktivite göstermiştir. Au NP'ler, H₂O₂ üreterek moleküler oksijenle glukoz oksidasyonunu katalize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (J. Chen ve ark, 2019).

Nanozimlerin katalitik performansı, farklı enzim aktiviteleri, eşzamanlı tandem katalizi ve analitlerin daha hassas-seçici algılanması aynı ve/veya farklı enzim benzeri aktivite gösteren birkaç nanozimin işlevsel olarak kombine edilmesiyle önemli ölçüde iyileştirilmiştir (Q. Chen, Zhang, ve ark, 2020; Mou ve ark, 2020; Siddiqui ve ark, 2021).

Bildiğimiz kadarıyla IOPC esaslı nanozim materyali hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durumdan hareketle, enzim benzeri aktiviteyi artırmak için morfolojiyi değiştirdik ve ortaya çıkan hibrit nanomateryal, oldukça iyi bir peroksidaz benzeri aktivite gösterdi (Şema 1.B). H₂O₂ ölçümü, peroksidaz enziminin yerine hibrit CeO₂ IOPC'ler/Au NP'ler nanozimi kullanılarak iyi bir ölçüm performansı ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildi ve ışık enerjisi nanozim aktivitesini artırdı. Ayrıca, nanozim aktivitesinin olası bir mekanizması ortaya konularak enzim benzeri davranışı araştırıldı. Çalışma, IOPC bazlı nanozimlerin geliştirilmesine ivme kazandırabilir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanozimler

Etkin biyokatalizörler olan enzimler esas olarak proteinlerden oluşurken, birkaçı da katalitik aktivite gösteren RNA moleküllerinden oluşur (Breaker, 1997). Tipik kimyasal katalizörler veya endüstriyel katalizörler sıklıkla yüksek sıcaklık, yüksek basınç, organik çözücüler ve ekstrem pH ortamları gibi zorlu koşullarda kullanılırken, enzimler esas olarak biyomoleküllerin dönüşümünü katalize etmek için kullanılır ve bu reaksiyonlar genellikle ekstrem olmayan koşullar altında gerçekleştirilir (Franssen ve ark, 2013). Yüksek katalitik aktiviteleri ve substrat spesifikliğı nedeniyle enzimler endüstriyel, tıbbi ve biyolojik alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sheldon & Van Pelt, 2013). Enzimler avantajlarına rağmen, genellikle hazırlama ve saflaştırmanın yüksek maliyeti, düşük çalışma stabilitesi, katalitik aktivitenin çevre koşullarına duyarlılığı, geri dönüşüm ve yeniden kullanımdaki zorluklar gibi yapısal eksiklikleri vardır (Rodrigues ve ark, 2013). Bu dezavantajların tümü gıda işleme, biyoalgılama, çevre koruma, biyotıp vb. alanlardaki ileri uygulamalarını sınırlamaktadır (Huang ve ark, 2019).

Bu eksikliklerin üstesinden gelmek için araştırmacılar uzun süredir yapay ve enzim benzeri aktiviteleri olan “nanozimlerin” araştırılmasına odaklanmışlardır. 2007'de Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin yabanturpu peroksidazı (HRP) benzeri aktivitesinin keşfinden bu yana, sürekli olarak nanozimler üzerine çok sayıda çalışma ortaya çıkmıştır (Gao ve ark, 2007). Nanozimler, enzimatik katalitik özelliklere sahip bir tür nanomalzemedir. Doğal enzimlerle karşılaştırıldığında nanozimler, endüstriyel, tıbbi ve biyolojik alanlarda önemli özellikler olan düşük maliyet, yüksek stabilite ve dayanıklılık gibi avantajlara sahiptir (Karim ve ark, 2018).

Geçtiğimiz son yıllarda çalışmalar, geniş bir uygulama yelpazesinde doğal enzimlere basit, kararlı, yüksek performanslı alternatifler olarak enzim benzeri özelliklere sahip nanomalzemeler olan nanozimlere odaklandı. Karbon esaslı nanomalzemeler (Sun ve ark, 2018), CeO_2 (Ma ve ark, 2022), Co_3O_4 (Ma ve ark, 2022), Au (J. Chen ve ark, 2019), Fe_3O_4 (Duan ve ark, 2015a), Mn_3O_4 (Z.-J. Chen ve ark, 2021), Pt (H. Wang ve

ark, 2021), V_2O_5 (Vernekar ve ark, 2014) ve MOF yapılarını (H. Wang ve ark, 2021) içeren çeşitli inorganik nanomalzemeler, doğal enzimlerin aktivitesini göstermek için önemli ölçüde kullanılmıştır. Bu nanomalzemeler büyük ölçüde enzim benzeri aktivite göstermişlerdir ve nano araştırmalardaki büyük gelişmeler nedeniyle bu alanda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

2.2. Nanozimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin doğal yaşamdaki önemi ve eksiklikleri göz önüne alındığında alternatiflerinin araştırılması büyük bir önem taşımaktadır. Çok yoğun araştırmalarla birlikte, çalışılan birçok nanomateriyal pratik uygulamalar için enzimlere iyi bir alternatif olarak görülmektedir. İşleyişlerine göre nanozimleri 2 ayrı kategoriye ayırabiliriz: (1) oksidoredüktaz sınıfı (oksidaz, peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve nitrat redüktaz) ve (2) hidrolaz sınıfı (nükleaz, esteraz, fosfataz, proteaz) (Huang ve ark, 2019).

2.3. Peroksidaz Enzimleri

Peroksidaz enzimlerin birçoğu için en iyi substrat hidrojen peroksittir, ancak lipid peroksitler gibi organik hidroperoksitler de kullanılmaktadır. Peroksidazlar aktif bölgelerinde bir hem kofaktörü bulunur. Alternatif olarak redoks-aktif sistein veya selenosistein grupları içerebilir (Yi ve ark, 2000). Elektron alıcısının doğası enzimin yapısına önemli ölçüde bağlıdır. Örneğin HRP, çeşitli organik bileşikler elektron verici ve alıcı olarak kullanabilir. HRP'nin kolay erişilebilir bir aktif bölgesi vardır ve substrat molekülleri reaksiyon bölgesine kolayca ulaşabilir. Öte yandan sitokrom c peroksidaz için elektron veren bileşikler, aktif bölgesinin yapısından dolayı oldukça spesifiktir (J. Wang ve ark, 2002).

Peroksidaz enzimleri endüstriyel atık suların arıtılmasında kullanılabilir. Örneğin, önemli kirleticiler olan fenoller, HRP kullanılarak enzim katalizli polimerizasyon yoluyla giderilebilir. Sonuç olarak fenoller, fenollerden daha az toksik olan polimerlerin ve oligomerlerin üretildiği reaksiyonlara katılan fenoksi radikallerine oksitlenir (Cooper & Nicell, 1996). Aynı şekilde, peroksidaz enzimleri toksik maddeleri daha az toksik maddelere dönüştürmek için de kullanılabilir. Yapıştırıcılar, bilgisayar çipleri, araba parçaları, varil ve teneke kutu kaplamaları gibi birçok imalat prosesinde peroksidaz enzimlerinin kullanımına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır.

Farklı çalışmalar, peroksidazların organik solvent matrislerinde anilinleri ve fenollerini polimerize etmek için başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir (Dordick ve ark, 1987). Peroksidazlar bazen de histolojik belirteçler olarak kullanılabilir. Sitokrom c peroksidaz, sitokrom c oksidaz için çözünebilen ve kolayca saflaştırılabilen bir model olarak kullanılabilir.

2.4. Peroksidaz Aktivitesi Gösteren Nanozimler ve Kataliz Mekanizmaları

Gao ve ark. (Gao ve ark, 2007) 2007 yılında çığır açıcı çalışmalarında, Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin (MNP'ler) bir dizi substratın oksidasyonunu katalize etmek için peroksidaz enziminin yerine kullanılabileceğini buldular. Kararlı durum kinetik sonuçlarına göre, substrat konsantrasyonuna bağlı Lineweaver-Burk grafikleri paraleldi. Bu deneysel veriler, Fe_3O_4 MNP'lerinin katalitik mekanizmasının pinpon mekanizmasını göre işlediğini doğruladı. Fe_3O_4 , ara ürün olan $\bullet\text{OH}$ radikallerini oluşturmak için birinci substrat H_2O_2 ile birleşir. Üretilen $\bullet\text{OH}$ daha sonra hidrojen elektron vericisinden, örneğin tetrametilbenzidin (TMB)'den bir H^+ koparacaktır. Reaksiyon sırasında oluşan $\bullet\text{OH}$ radikalleri elektron spin rezonans (ESR) analizi ile belirlenmiştir. Nanozimlerin oksidaz, peroksidaz (POD), süperoksit dismutaz (SOD), katalazlar (CAT) gibi enzimlerin aktivitesini gösteren türleri vardır ve bu türlerin her biri kendine özgü reaksiyon mekanizmasına ve kinetiğine sahiptirler.

Şimdiye kadar çok sayıda karbon esaslı nanomalzemelerin üstün peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği bulunmuştur (Mou ve ark, 2020). Grafen oksit ve oksijen grupları içeren karbon nanotüpün, H_2O_2 varlığında TMB ve ABTS gibi kromojenik substratların oksidasyonunu katalize ederek üstün peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Ancak katalitik mekanizmalarını aydınlatan az sayıda çalışma vardır. Bir çalışmada, katalitik mekanizmayı aydınlatmak için model olarak grafen kuantum noktalarını (GQD'ler) kullanıldı. Teorik hesaplamalar deneysel verilerle birleştirildiğinde, $-\text{C}=\text{O}$ ve $-\text{O}=\text{CO}-$ gruplarının sırasıyla katalitik aktivite bölgesi ve substrat bağlanma bölgesi olarak görev yapabileceği ileri sürüldü. Bu grupların GQD'ler üzerine modifikasyonu, katalitik aktiviteyi etkili bir şekilde geliştirebilir. Ayrıca, $-\text{C}-\text{OH}$ gruplarının varlığı katalitik aktiviteyi düşürdüğü bulundu (Sun ve ark, 2015).

Farklı bir çalışmada peroksidaz aktivitesi gösteren nanokarbon oksitlerin doğasını ayrıntılı araştırıldı (Zhao ve ark, 2015). Bu çalışmada yoğunluk fonksiyonel teorisi ile

moleküler seviyedeki araştırmalar yapıldı. Mekanizmaya göre, büyük aromatik bölgelerin, peroksidaz benzeri aktivite için önemli bir rol oynadığı ve karboksil gruplarının, H₂O₂'nin •OH radikallerine katalitik olarak dönüşümü için aktif bölgeler olarak görev alabileceği düşünöldü (Zhao ve ark, 2015). Ayrıca bu çalışmayla, karbon esaslı peroksidaz nanozimlerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlandı.

2.5. Nanozimlerin Katalitik Aktivitesinin Ayarlanması

Enzimler gibi nanozimlerin enzim benzeri aktiviteleri de pH, sıcaklık, ortamdaki metal iyonları gibi birçok faktörle değişebilir. Örneğin, ışıkla birlikte uyarılan sterik etki, nanozimler ve bunların substratları arasındaki teması azaltarak katalitik aktivitenin azalmasına yol açabilir (F. Wang ve ark, 2018). Bununla birlikte, partiköl boyutu, malzemenin morfolojisi, bileşimi, yüzey modifikasyon grupları, pH, sıcaklık, substrat seçiciliği, reaksiyon ortamındaki moleküllerin veya iyonların nanozimlerin aktivitelerine önemli bir etkisi bulunmaktadır (Asati ve ark, 2011).

2.5.1. Nanozim aktivitesine morfolojinin etkisi

Malzemenin morfolojisi nanozimin enzim benzeri katalitik performansı en fazla etkileyen parametreler arasındadır (Z. Wang ve ark, 2020). Morfolojinin aktivite üzerine etkisini incelemek için, iki farklı morfolojiye sahip Pd nano küpler ve Pd oktahedronlar üretildi (Ge ve ark, 2016). ESR analiziyle, daha düşük yüzey enerjisine sahip Pd oktahedronların, Pd nanoküplere göre daha fazla SOD ve CAT benzeri enzim aktivitesine sahip olduğu bulundu. Hücre deneylerinde, aynı koşullar altında Pd oktahedronların, Pd nanoküplere göre daha fazla reaktif oksijen türlerini (ROS) giderebileceği gözlemlendi ve teorik hesaplamalar deneysel verilerle tutarlı bulundu. Bahsedilen çalışma, oksidatif strese karşı yüksek katalitik etkiye sahip nanozimlerin önemini göstermektedir (Ge ve ark, 2016). Nanozim malzemesinin yapımında porlu yapının tercih edilmesi de nanozim aktivitesini artıran en önemli faktörlerden biridir. Porlu malzemelerin dar gözenek boyutu dağılımı, geniş yüzey alanı (>500 m²/g), biyouyumluluk ve düşük toksisitesi gibi birçok istenen özelliği vardır (Çakıroğlu ve ark, 2023).

2.5.2. Nanozim aktivitesine partiköl boyutunun etkisi

Nanozimlerin enzim benzeri katalitik aktiviteleri, materyalin boyutuyla ilişkilidir. 2007 yılında yapılan ilk nanozim çalışmasında farklı boyutlardaki Fe₃O₄ MNP'lerinin

katalitik aktivitesi incelenmiştir ve bunun için 30, 150 ve 300 nm çaplı Fe_3O_4 MNP'leri seçilmiştir (Gao ve ark, 2007). Deneysel veriler, partikül boyutu büyüdükçe katalitik aktivitenin düştüğünü göstermiştir. Bu bulgunun nedeni, nanopartiküllerin boyutunun küçüldükçe yüzey/hacim oranının artmasıdır (Wei & Wang, 2013). Bundan dolayı, nanomateriyallerin katalitik aktiviteleri boyutları değiştirilerek belirlenebilir (Q. Wang ve ark, 2018). Farklı bir çalışmada, Au NP'lerin glukoz oksidaz (GOx) benzeri katalitik aktivitesinin partikül boyutuna bağlı olduğu bulunmuştur. 13, 20, 30 ve 50 nm çaplarındaki Au NP'lerin aynı koşullar altında aktiviteleri karşılaştırarak, Au NP'lerin katalitik aktivitelerinin partikül boyut artışıyla azaldığını bulunmuştur (J. Chen ve ark, 2019; W. Luo ve ark, 2010).

2.5.3. Nanozim aktivitesine sıcaklık ve pH etkisi

Ortamın pH değeri de nanozimlerin katalitik aktivitesini etkileyebilir. Au NP'leri asidik pH'de peroksidaz aktivitesi gösterirken, nötr ve bazik pH'de CAT veya SOD benzeri katalitik aktivite göstermektedir (S. Wang ve ark, 2012). Farklı bir çalışmada, Fe_3O_4 MNP'lerinin, asidik pH'de H_2O_2 'i radikal $\bullet\text{OH}$ 'ye katalize etmek için peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği bulunmuştur (Gao ve ark, 2007). Oluşan $\bullet\text{OH}$ radikalleri, kanser hücrelerini yok edebilir ve tümörün büyümesini etkili bir şekilde engelleyebilir. Bununla birlikte, nötr fizyolojik pH'de, Fe_3O_4 , zararlı H_2O_2 'i su ve oksijene parçalamak için CAT benzeri aktivite göstermektedir. Benzer şekilde ortam sıcaklığı da nanozimlerin katalitik aktivitelerini etkileyebilir.

2.5.4. Nanozim aktivitesine yüzey modifikasyonunun etkisi

Literatüre göre nanomalzeme kaplamanın kalınlığı, fonksiyonel gruplar ve yüzey yükleri gibi yüzey faktörleri nanozimlerin katalitik aktivitelerini etkileyebilir. Bir çalışmada (S. Wang ve ark, 2012), farklı yüzey modifikasyonlarıyla sentezlenen Au NP'lerin peroksidaz benzeri aktivitelerini karşılaştırıldı. Bunun için modifiye edilmeyen, amino ve sitrat ile modifiye edilmiş Au NP'lerden yararlanılmıştır. Deneyler sonucunda, modifiye edilmeyen Au NP'lerin modifiye edilmiş Au NP'lerden daha fazla katalitik aktivite sergilediği bulunmuştur. Substrat olarak TMB kullanıldığında, sitratla modifiye edilmiş Au NP'ler, aminoyla modifiye edilmiş Au NP'lerden daha yüksek peroksidaz benzeri aktivite sergilediği bulunmuştur. Substrat olarak ABTS seçildiğinde bu durum tersine bulunmuştur (S. Wang ve ark, 2012). Sonuçlar için farklı açıklamalar belirtilmiştir. İlk açıklamaya göre, Au NP'lerin yüzeyindeki altın atomları katalitik aktiviteye katkıda bulunabilir. İkinci açıklamaya

göre, yüzey kaplamasının ve substratların elektriksel yük özellikleri katalitik reaksiyon için çok önemli olabilir. Ayrıca, yüzey modifikasyonu, nanozimlerin katalitik merkezleri kapanabilir ve bu da katalitik aktivitenin azalmasına yol açabilir.

2.5.5. Nanozim aktivitesine hibrit malzeme oluşumunun etkisi

Literatüre göre hibrit nanomalzemeler, avantajlı yapıları, gelişmiş performanslarıyla yoğun ilgi görmektedir. Bundan dolayı nanozimler, hibrit malzeme şeklinde de oluşturulmaktadır. Her ne kadar Au NP'leri alternatif bir peroksidaz nanozimi olabilse de, enzim benzeri aktiviteleri ortam pH değeri ile sınırlıdır. Geniş bir pH aralığında katalitik aktiviteyi korumak için, grafen oksit (GO)-Au nanokümleri (NC) hibrit nanozimleri oluşturulmuştur (Tao ve ark, 2013). Hibrit malzemedeki GO, Au nanokümlerinin peroksidaz aktivitesini iyileştirmek için kullanılmıştır. GO'nin yüksek yüzey alanı ve hidrofobik moleküller için güçlü afiniteye sahip olması, TMB gibi kromojenik substratı etkili bir şekilde adsorbe etmesine neden olur (D. Wang ve ark, 2020). Bu durum, Au nanokümlerinin substratla temasını artırır ve bundan dolayı Au nanokümlerinin peroksidaz benzeri aktivitesi artabilir.

2.6. Nanozimlerin Kullanım Alanları

Nanozimlerin tanısal tıpta, hedefe yönelik tedavi ve biyosensör alanlarında önemli bir uygulama alanı vardır (Liu ve ark, 2017). ELISA ile antijen-antikor ve diğer proteinlerin tayininde, Fe_3O_4 nanopartikülleri üstün HRP aktivitesi gösterdiği için HRP yerine kullanılmıştır (Duan ve ark, 2015b). Au NP'leri enzim benzeri aktivitesinden dolayı DNA biyosensörlerinde kullanılmıştır (Wei & Wang, 2013). Nanozimler, kanser hücrelerinin tespiti için de kullanılabilir. Bunun için, asidik ortamda CeO_2 NP'lerinin bazı organik substratların oksidasyonu için oksidaz benzeri aktivite göstermesinden yararlanılmıştır (D. Jiang ve ark, 2019). Birçok nanozimin nöronal hücreleri oksidatif hasardan korumada etkili olduğu ve dolayısıyla bazı nörolojik hastalıkları önleyebildiği veya iyileştirebildiği bulunmuştur. Hücre sisteminde katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, peroksiredoksin gibi çeşitli antioksidan enzim türleri vardır. Birçok nanomalzeme antioksidan enzim benzeri katalitik aktivitelere sahip olduğundan, hücre içi aşırı miktarda salınan ROS'u uzaklaştırmak için nanozimlerin kullanılması uygun olabilmektedir (Vernekar ve ark, 2014).

Atık sulardaki çeşitli kirleticilerin parçalanmasını katalize etmek için yaygın olarak HRP kullanılmıştır. HRP'nin H_2O_2 'yi katalizinden oluşan ara ürünler olan $\bullet OH$ radikalleri, fenoller ve aromatik aminler gibi birçok organik kirleticiyi çökeltilere oksitleyebilmektedir (Q. Chen, Zhang, ve ark, 2020). Bundan dolayı peroksidaz benzeri enzim aktivitesi gösteren nanozimlerin kullanılması, su kirliliğinin giderilmesinde önemli bir yol olarak görülmektedir.





3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Stiren ($\geq 99\%$), etanol (susuz, $\geq 99,8\%$), sodyum dodesil sülfat (SDS), potasyum persülfat, D-(+)-glukoz monohidrat, hidrojen peroksit (30%), sitrik asit, tert-butanol, trisodyum sitrat Merck'ten satın alındı. Seryum (III) nitrat heksahidrat (99%), kloroaurik asit, L (+) askorbik asit, sodyum iyodür, p-benzokinon, sıgır karaciğerinden katalaz (1000 birim/mg protein), sakkaroz, laktoz, maltoz, galaktoz ve ürik asit Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Sodyum piruvat ($\geq 99\%$) Acros Organics'ten satın alındı. 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS), Roche Diagnostics'ten (Almanya) satın alındı. Asetat tampon çözeltisi (ABS), glasiyel asetik asit (Merck) ve sodyum asetat (Sigma-Aldrich) kullanılarak hazırlandı. Tüm kimyasallar alındığı gibi kullanılmış ve Labconco Water Pro BT arıtma sisteminden deiyonize su (DS) elde edildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Morfolojik özellikler, 15 kV hızlanma voltajında çalışan bir FEI Quanta 450 FEG kullanılarak alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile karakterize edildi. Hibrit bileşenlerin kristal yapısı, Cu Ka radyasyonu ile X-ışını kırınımı (XRD, RIGAKU D/Max 2200, 300 kV, 40 mA, Tarama hızı: $3^\circ/\text{dak.}$) ile araştırıldı. Nanozim bileşenlerinin optik özellikleri ve UV-vis absorbans ve reflektans spektrumları, UV-vis reflektans (referans olarak BaSO_4) ve spektrofotometri (Shimadzu UV-2600 Spektrofotometre) ile analiz edildi. Polistiren kürelerin parçacık boyutu dağılımı bir nanopartikül analizöründe (Nano Plus, Micromeritics) izlendi. Nanozimin zeta potansiyeli ölçümleri bir Nano Plus-3 (Micromeritics) kullanılarak gerçekleştirildi. CeO_2 IOPC'lerin Raman spektrumu, 785 nm lazer uyarımında çalışan bir Raman spektrometresi (Kaiser RAMANRXN1) kullanılarak kaydedildi. Fotoelektrokimya ve doğrusal tarama voltametrisi (LSV) ölçümleri, çalışma elektrotu olarak nanozim kaplı indiyum kalay oksit (ITO) cam substrat, karşı elektrot olarak platin tel ve referans elektrotu olarak KCl ile doyurulmuş bir Ag/AgCl'den oluşan üç elektrotlu bir konfigürasyon hücresine sahip Gamry Interphase 1000 potansiyostat üzerinde

gerçekleştirildi. Aydınlatma kaynağı olarak 15 cm mesafede 500 W halojen lamba (dalga boyu aralığı 350 nm'den başlar ve NIR bölgesini içerir) kullanıldı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Polistiren kürelerin (PS) sentezi

PS kürelerini sentezlemek için emülsiyon polimerizasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için, 0,15 g potasyum persülfat ve 0,1125 g SDS, ortam sıcaklığında DS (75 mL) ve etanol (30 mL) karışımı içerisinde çözüldü. 350 rpm'de karıştırıldıktan ve karışımın 20 dakika boyunca havası giderildikten sonra, karışıma 9 mL stirenin eklenmesiyle polimerizasyon başlatıldı ve 70 °C'de 19 saat boyunca kuvvetli manyetik karıştırma altında tutuldu.

3.3.2. PS şablonunun imalatı ve CeO₂ IOPC'lerin hazırlanması

1 cm² yüzey alanına sahip cam slaytlar, 15 dakika boyunca aseton, etanol ve DS içerisinde sonikasyon yoluyla önceden temizlendi, ardından vakumlu bir fırında kurutuldu. PS şablonları dikey biriktirme işlemi kullanılarak kendiliğinden kaplandı. İyi dağılmış PS süspansiyonu içeren bir tankta cam substratlar dikey olarak yerleştirildi. Tank daha sonra cam substratlar üzerinde kendiliğinden birleşmiş bir PS opal fotonik kristal elde etmek amacıyla çözücünün buharlaşması için 24 saat boyunca 70 °C'de bir fırına yerleştirildi.

CeO₂ IOPC'ler daha önce yayımlanan bir çalışmaya göre bazı değişiklikler yapılarak üretildi (Waterhouse ve ark, 2008). Bu amaçla, PS şablonlarındaki boşluklar seryum sol-jel öncü çözeltisi olarak kullanılan etanol (5 mL) içinde Ce(NO₃)₃.6H₂O (0.525 g) ve sitrik asit (0.574 g) ile dolduruldu. Doldurulan şablonlar hidrolize olması ve jelleşmesi için 24 saat boyunca 25 °C'de havada tutuldu. CeO₂/PS kompozitleri daha sonra PS şablonlarını çıkarmak ve kristallendirmek için şu şekilde kalsine edildi: kompozitler havada 2 °C dk⁻¹'de 25'ten 300 °C'ye yükseltildi; 300°C'de 2 saat süreyle tutuldu; 2 °C dk⁻¹'de 300'den 400 °C'ye yükseltildi; 400°C'de 2 saat süreyle tutuldu; ve sonunda oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı. Ayrıca nanozim aktivitesini karşılaştırmak için PS şablonu kullanılmadan aynı yöntemle CeO₂ ince filmi hazırlandı.

3.3.3. CeO₂ IOPC'lerde altın nanopartiküllerin (Au NP'ler) kaplanması

CeO₂ IOPC kaplı slaytlar, 50 mL 0,25 mM kloroaurik asit çözeltisine daldırıldı. Çözeltiyi ısıtırken 2,5 mL 20 mg. mL⁻¹ trisodyum sitrat çözeltisi eklendi ve Au NP'ler CeO₂ IOPC'ler üzerine kaplandı. Hibrit malzeme CeO₂ IOPC'ler/Au NP'ler olarak belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları için Au NP kolloidi de alındı.

3.3.4. Peroksidaz benzeri aktivite ölçümleri

Hidrojen peroksitin tespiti için 0,2 M ABS (pH 3,8) içerisinde 2 mL 1 mM ABTS alikotları hazırlandı. Yukarıdaki çözeltiye 0 ila 1000 µM arasında çeşitli konsantrasyonlarda hidrojen peroksit çözeltileri ilave edildi ve daha sonra reaksiyonun oda sıcaklığında tamamlanmasını için nanozim kaplı substrat ile bir küvet içinde 9 dakika süreyle inkübe edildi. Nanozim kaplı substrat reaksiyon ortamından çıkarıldı ve absorbans ölçümleri maksimum 730 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Her deney en az üç kez tekrarlandı.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

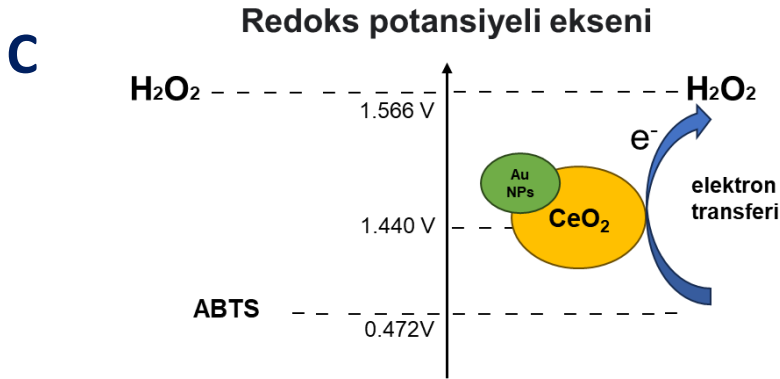
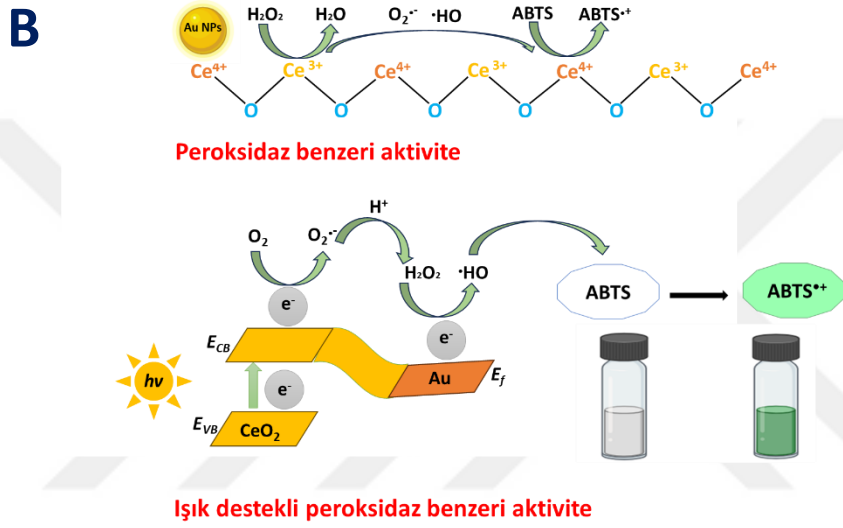
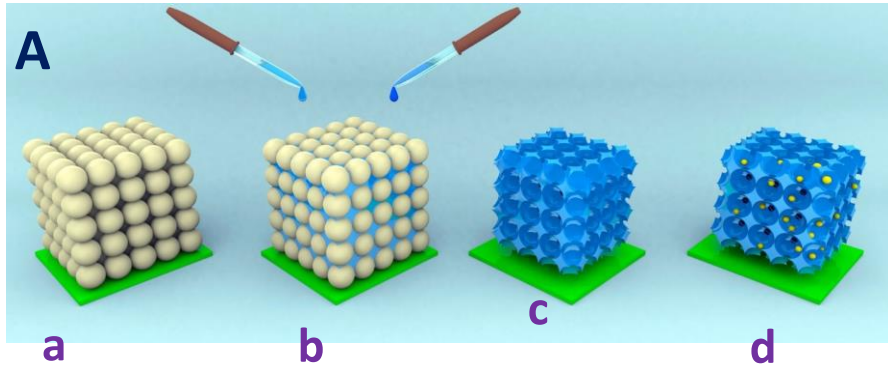
4.1. Nanozim Kaplı Substratının Karakterizasyonu

Hidrojen peroksit tespiti için ışık destekli nanozim, Şekil 4.1.A'da gösterildiği gibi, sadelik ve düşük maliyet gibi bazı avantajlarla üretildi. Çözelti esaslı nanozimler, ışık emiliminin ölçülmesinde istenmeyen bir girişim etkisine sahiptir. Öte yandan, destek materyaline kaplı nanozimler reaksiyon sonrası ortamdan çıkarılabilir ve bu girişimi ortadan kaldıracaktır. Tek olarak CeO_2 ve Au NP'lerin mükemmel SOD (Korsvik ve ark, 2007) ve glukoz oksidaz (H. Zhang ve ark, 2018) aktiviteleri gösterdiği bulunurken, bu malzemelerin hibriti iyi bir peroksidaz benzeri aktivite gösterdi. CeO_2 IOPC'ler ve Au NP bazlı malzemeler aynı zamanda fotokatalizör görevi de görebilir, bu da hibritin fotokatalitik reaksiyonlar için güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürebileceğini gösterir. Kromojenik substrat ABTS'nin renk oluşumu gözle ayırt edilebildi; oksitlenmiş yeşil ürün, 30 μM kadar düşük hidrojen peroksit konsantrasyonları için fark edilebildi.

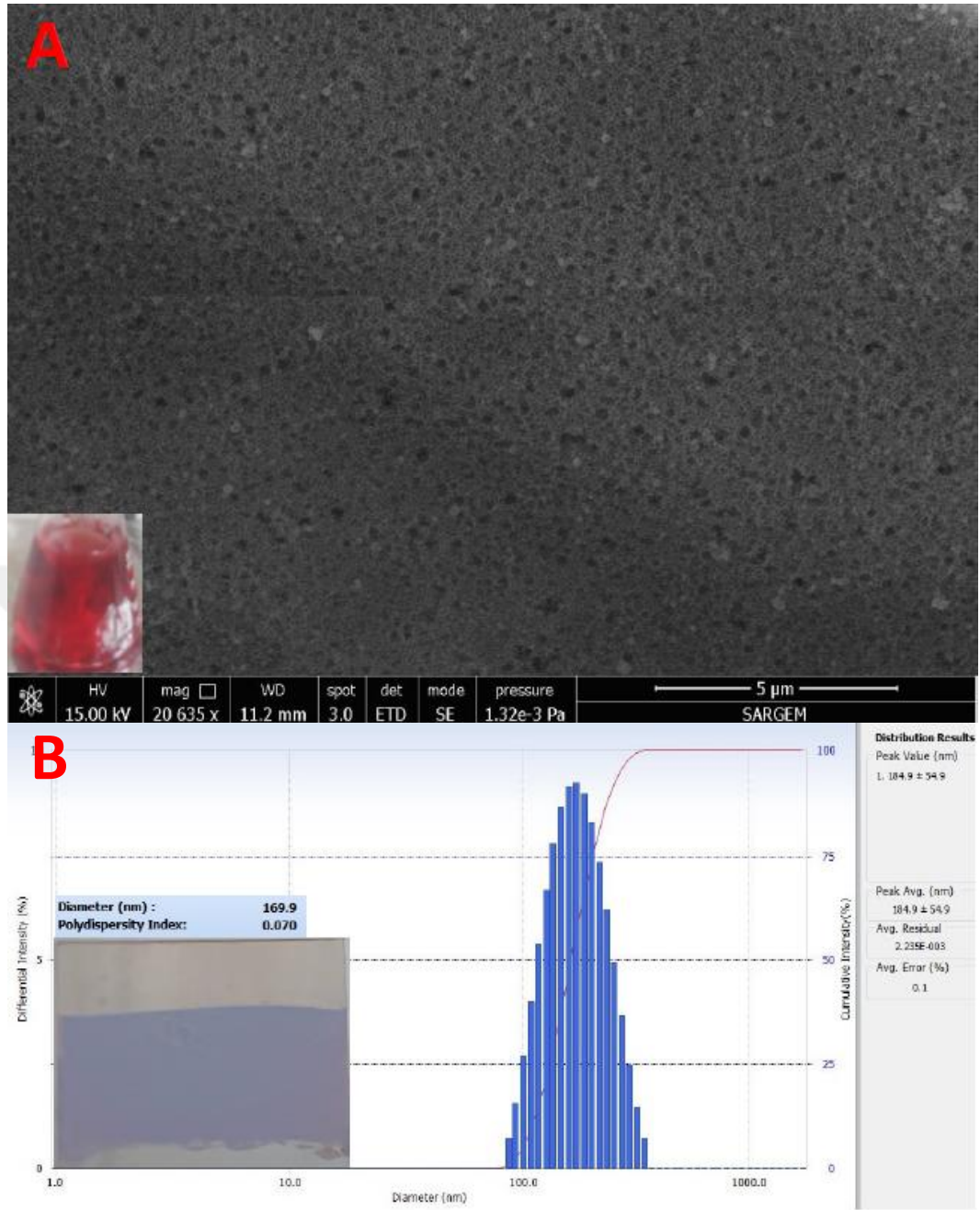
CeO_2 esaslı nanomalzemeler, morfolojilerine ve pH'ye bağlı olarak birden fazla enzim benzeri aktivite göstermeleriyle birlikte zengin redoks özelliklerine sahiptir. CeO_2 nanozimleri, asidik koşullar altında peroksidaz benzeri aktivite göstererek reaktif oksijen türleri oluşturmak için H_2O_2 'yi katalize edebilir (Ma ve ark, 2022).

Nanozim materyalinin FESEM görüntüsü, bol miktarda aktif bölgeye işaret eden gözenekli bir morfolojiyi ortaya çıkardı (Şekil 4.2.A) ve morfoloji ayarlaması, nanozim aktivitesini iyileştirebilmektedir.

PS parçacık boyutu dağılımı Şekil 4.2.B'de verildi. PS'nin ortalama çapı 169,9 nm ve düşük bir parçacık dağılım değeri ile bulundu. Şekil 4.2.B (iç), opal fotonik kristal yapısından dolayı PS şablonunun opallliğini göstermektedir.



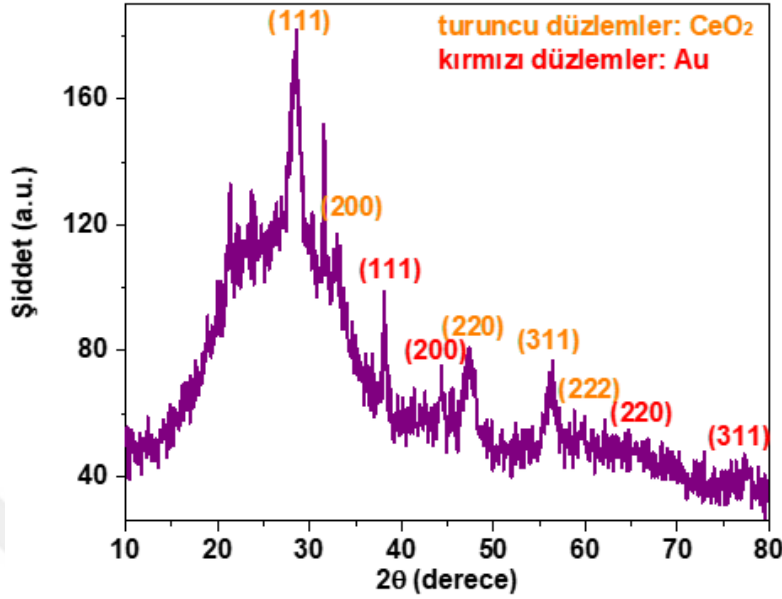
Şekil 4.1. A. Kaplı nanozimin üretimi: a. PS şablonunun kendi kendine birikimi, b. Seryum oksit öncülünün infiltrasyonu, c. Seryum oksitin kalsinasyonu ve PS'nin uzaklaştırılması, d. Au NP kaplama, B. Kaplı nanozim kullanılarak tek adımda kolorimetrik hidrojen peroksit ölçümü, C. CeO_2 IOPC'lerin/Au NP'lerin peroksidaz benzeri aktivitesi için varsayılan mekanizma.



Şekil 4.2. Nanozim materyalinin üstten FESEM görüntüsü (iç resim: Au NP'lerin kolloidi), B. PS parçacık boyutu dağılım grafiği (iç resim: PS şablonunun opallığı)

Şekil 4.3, CeO₂'nin XRD grafiğini göstermektedir. XRD, (111), (200), (220), (311) ve (222) düzlemlerine karşılık gelen $2\theta = 28.38^\circ, 32.9^\circ, 47.31^\circ, 56.26^\circ$ ve 59.2° 'de pikler sergiledi. Bu pikler seryumun kübik florit fazına iyi indekslenmiştir ve standart verilerle aynıdır (JCPDS Kart No. 34-0394). $2\theta=38,1^\circ, 44,3^\circ, 64,5^\circ$ ve $77,7^\circ$ 'deki ek kırınım pikleri, yüz merkezli kübik metal altın yapısının (111), (200), (220) ve (311) düzlemlerine atfedilebilir (ICDD: 04-0784). Geniş kırınım pikleri, yüksek kristallliğe sahip nano boyutlu gözenek duvarlarına atfedilebilecek küçük tane boyutlu CeO₂

ürününün oluşumunu doğrulamaktadır (Patil ve ark, 2006). Belirli bir yüzeydeki iyi bir elektron transferi, nanozim aktivitesini artırmaktadır.

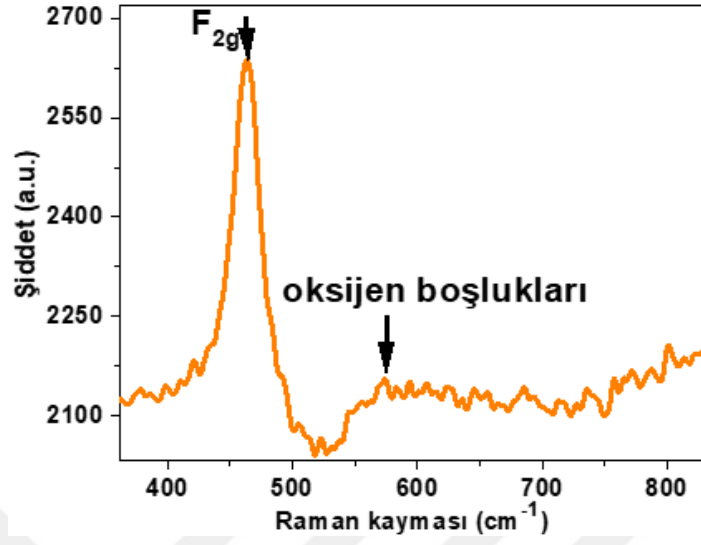


Şekil 4.3. Cam üzerine kaplı CeO₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin XRD spektrumu

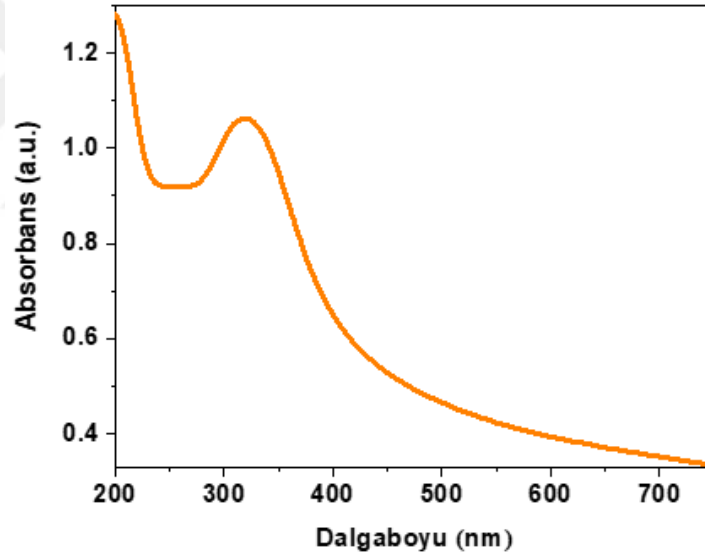
Ce³⁺ yapısal kusurları, pozitif yük eksikliğini telafi eden oksijen boşluklarının oluşmasına yol açar. Seryumun peroksidaz benzeri aktivitesi muhtemelen katalitik bir bölge olarak yüzeydeki Ce³⁺ türlerinden ve Ce³⁺ ile Ce⁴⁺ arasında tersine çevrilebilir hızlı geçişten kaynaklanmaktadır (Tian ve ark, 2015). Gözenekli seryum oksit geniş bir yüzey alanına ve buna bağlı olarak daha fazla Ce³⁺ yüzey bölgelerine ve oksijen boşluklarına sahiptir, bu da peroksidaz benzeri aktiviteyi artırabilir. Böylece CeO₂ yüzeyinin kimyasal özellikleri Raman ve UV-Vis spektroskopisi ile belirlendi. Şekil 4.4, 785 nm uyarma dalga boyunda CeO₂ IOPC'lerin Raman spektrumunu göstermektedir. 463 cm⁻¹'deki yoğun bant F_{2g} moduna atfedilir ve 575 cm⁻¹'de merkezlenen geniş emilim bandı (530-700 cm⁻¹) oksijen boşluklarından kaynaklanır (L. Jiang ve ark, 2021; Y. Yang ve ark, 2016). CeO₂'nin UV-Vis spektrumundaki 250 nm'deki absorpsiyon bandı Ce³⁺'ya, 319 nm'deki keskin absorpsiyon bandı ise Ce⁴⁺'ya atfedilir (Singh & Singh, 2015). CeO₂ IOPC'leri için Ce³⁺ absorpsiyon bandı gözlenmedi (Şekil 4.5), bu da CeO₂'nin kristal yapısındaki düşük Ce³⁺ içeriğini gösterir.

CeO₂ IOPC'ler/Au NP nanoziminin UV-Vis spektrumunda, 516 nm'deki karakteristik yüzey plazmon absorpsiyonu nano ölçekli Au NP kaplamasını gösterirken, CeO₂ IOPC'ler tek başına bu dalga boyunda herhangi bir absorpsiyon bandı göstermedi

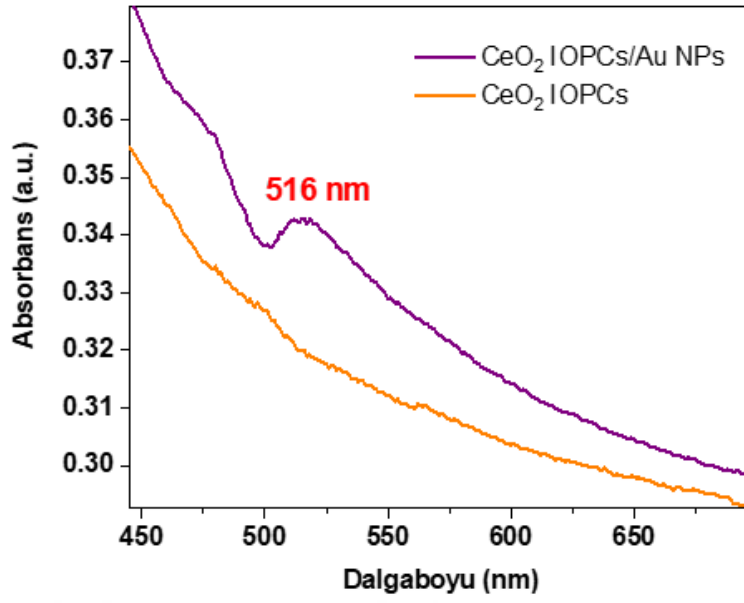
(Şekil 4.6). Bir kontrol olarak, Au NP'lerin kolloidi Şekil 4.1.A'da (iç) gösterilmiş ve absorbands spektrumu Şekil 4.7'de verilmiştir.



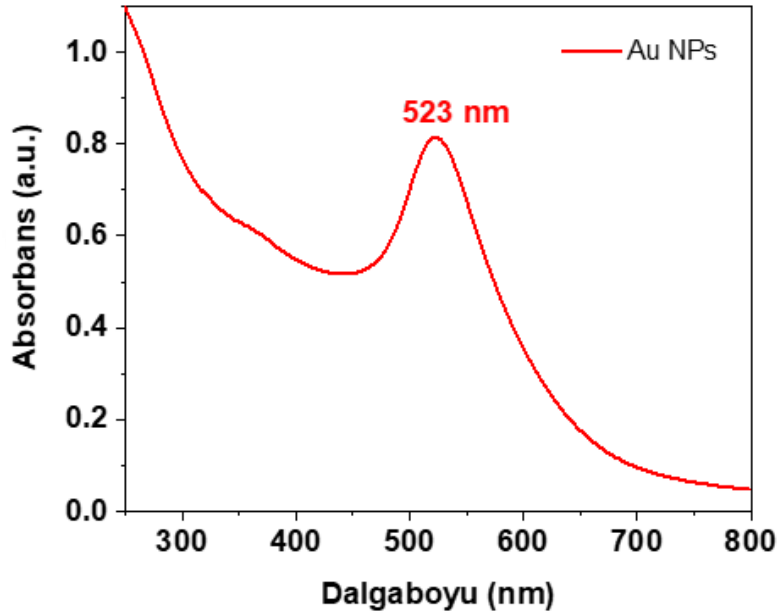
Şekil 4.4. CeO₂ IOPC'lerin Raman spektrumu



Şekil 4.5. CeO₂ IOPC'lerin UV-vis spektrumu

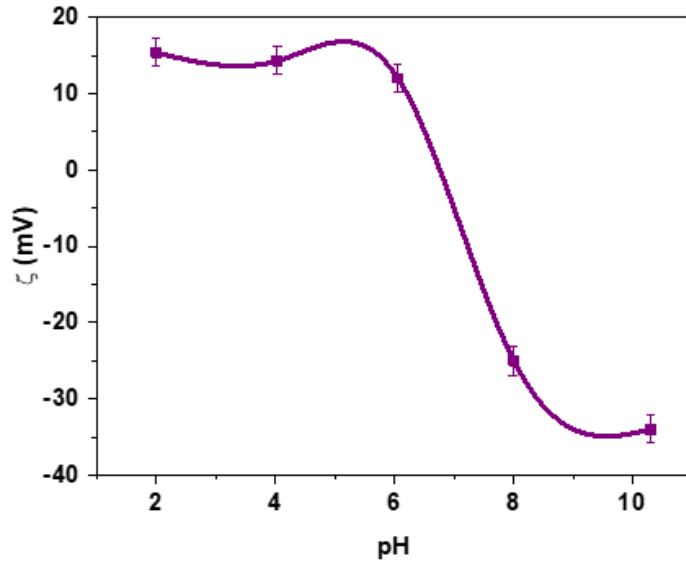


Şekil 4.6. CeO₂ IOPC'lerin ve CeO₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin UV-görünür alan absorbands spektrumları



Şekil 4.7. Au NP'lerin UV-görünür alan absorbands spektrumu

Nanozim yüzeyi ile ABTS arasındaki etkileşimleri açıklamak için pH'ye karşı zeta potansiyeli eğrisi belirlendi. Nanozimin zeta potansiyel eğrisi pH: 6'ya kadar pozitif yüklü bir yüzey gösterdi. Ancak kromojenik substrat ABTS, çalışma pH'si 3.8'de negatif yüklü bir molekül formundadır. Bu nedenle, çalışma koşullarında nanozim ve substrat arasındaki elektrostatik etkileşimler meydana gelir ve bu da daha yüksek katalitik verimle sonuçlanmaktadır (Şekil 4.8).



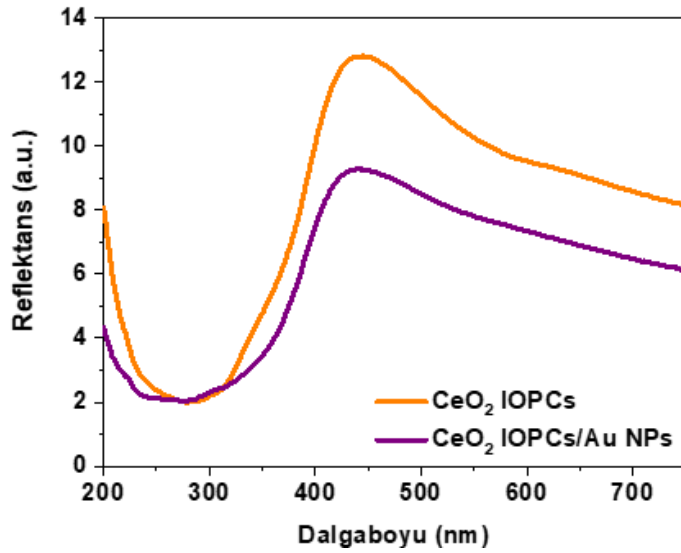
Şekil 4.8. Nanozimin pH grafiğine karşı zeta potansiyeli grafiği

Reflektans bantları, farklı gözenek çaplarına sahip ardışık IOPC yapılarının fotonik durdurma bantlarını (PSB) temsil eder. CeO₂ IOPC'nin 445 nm'deki PSB konumu, nanopartiküller IOPC'nin gözenek boyutlarını daralttığından Au NP'lerin birikmesi üzerine hafifçe 441 nm'ye kaymıştır (Şekil 4.9).

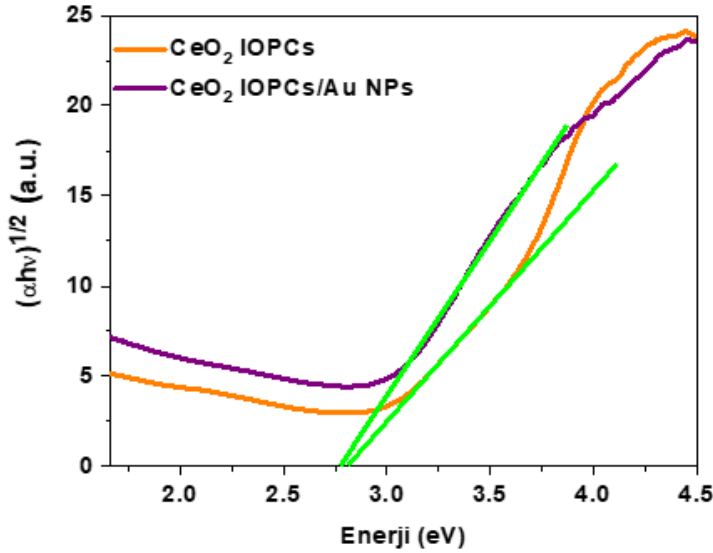
Üretilen malzemelerin optik bant aralıkları Tauc eşitliği kullanılarak belirlendi (denk. 4.1) (C. Yang ve ark, 2017):

$$\alpha h\nu = A. (h\nu - E_g)^n \quad (4.1)$$

burada E_g optik bant aralığını temsil eder, α malzeme tarafından emilen ışık miktarını ifade eden absorplama katsayısıdır, A orantı sabitini temsil eder, hν ışık enerjisini temsil eder ve n üssü geçiş türüne bağlıdır ve CeO₂ için 2'ye karşılık gelir (izinli dolaylı geçiş) (Tiwari ve ark, 2018). α = F(R).s denkleminde Tauc grafiğini elde etmek için reflektans verileri kullanıldı. Burada F(R): Kubelka-Munk fonksiyonu; R: reflektans, s: saçılma katsayısı ve bant aralığı enerjileri, hν'ye karşı (αhν)^{1/n} grafiğinden eğrinin doğrusal kısmının enerji eksenine ekstrapolasyonu ile bulunabilir (Şekil 4.10). Bant boşlukları CeO₂ IOPC'ler ve CeO₂ IOPC'ler/Au NP'ler için sırasıyla E_g = 2,81 eV (~441 nm) ve E_g = 2,77 eV (~447 nm) bulundu. Au NP'lerin birikmesi bant aralığını azalttı, bu da görünür ışıktan daha fazla yararlanma için avantajlıdır.

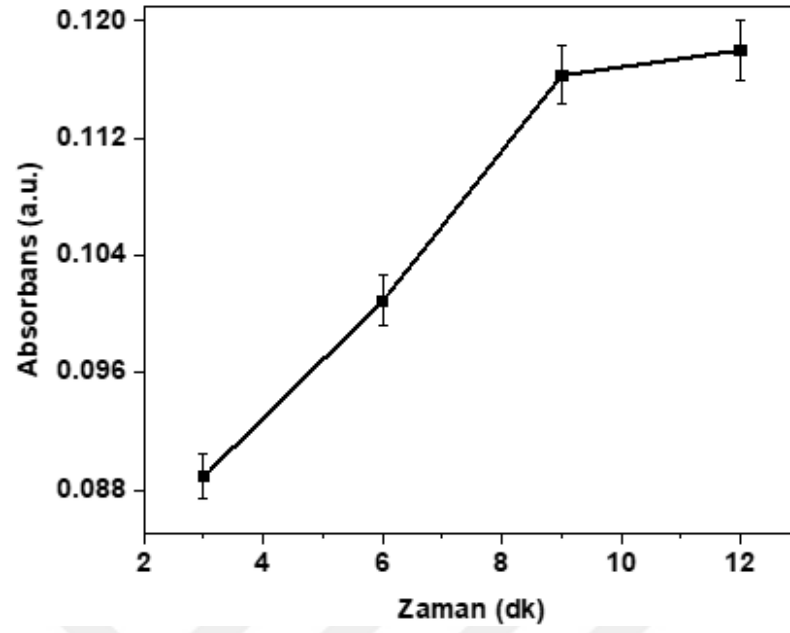


Şekil 4.9. E. CeO₂ IOPC'ler ve CeO₂ IOPC'ler/Au NP'lerin yansıma spektrumları

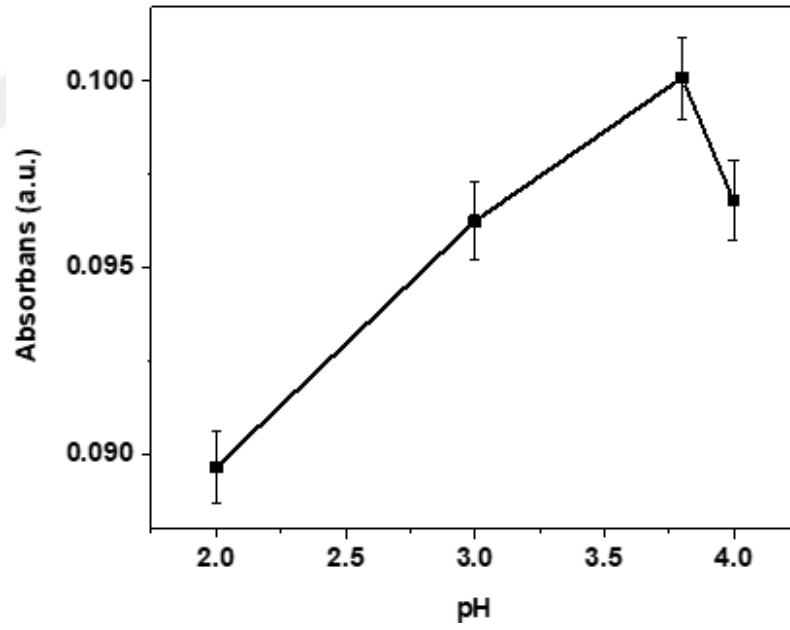


Şekil 4.10. Kubelka-Munk fonksiyonu ve CeO₂ IOPC'ler ve CeO₂ IOPC'ler/Au NP'ler için ışık enerjisi grafikleri

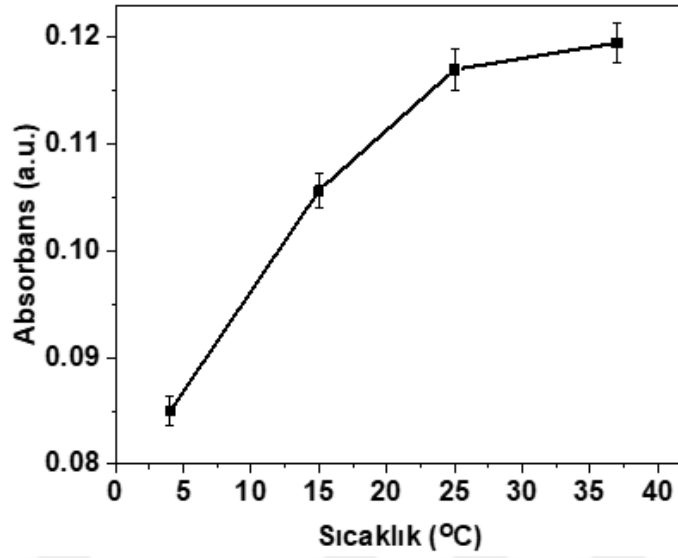
Uygun reaksiyon koşullarının belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları yapıldı. ABTS'nin zamana bağlı absorbans şiddeti, 9 dakikalık inkübasyondan sonra maksimuma ulaştı; bu, ABTS ile nanozim arasındaki redoks işleminin yüzey aracılı bir reaksiyon olduğunu gösterir (Şekil 4.11). Ortam pH etkisi, 200 mM ABS'de pH 2 ile 4 arasında değişen çeşitli pH değerlerinde izlendi ve aktivite, pH'ye volkan şeklinde bağlılık gösterdi (Şekil 4.12). Hibrit nanozim geniş bir sıcaklık aralığında (4-37 °C) stabildi ve peroksidaz aktivitesini optimum pH 3,8 ile pH 2 ila 4 arasında korudu (Şekil 4.13). 1 mM ABTS'den sonra absorbans önemli ölçüde değişmedi, bu nedenle ABTS'nin optimum konsantrasyonu 1 mM seçildi (Şekil 4.14).



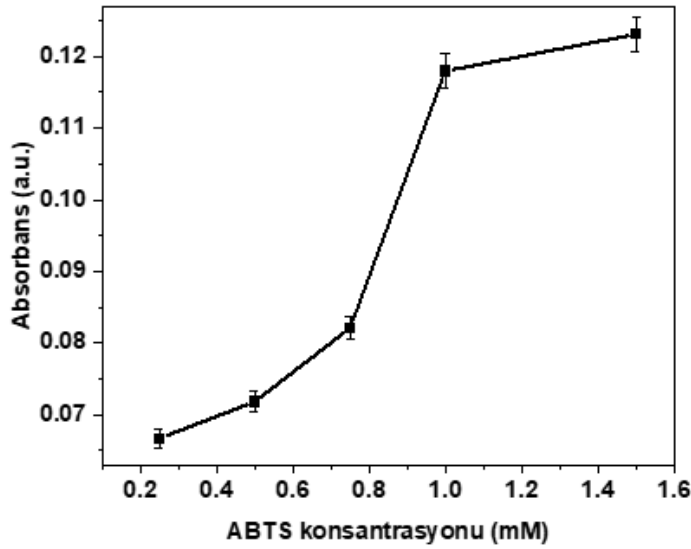
Şekil 4.11. Optimum reaksiyon süresi



Şekil 4.12. Optimum pH



Şekil 4.13. Optimum sıcaklık

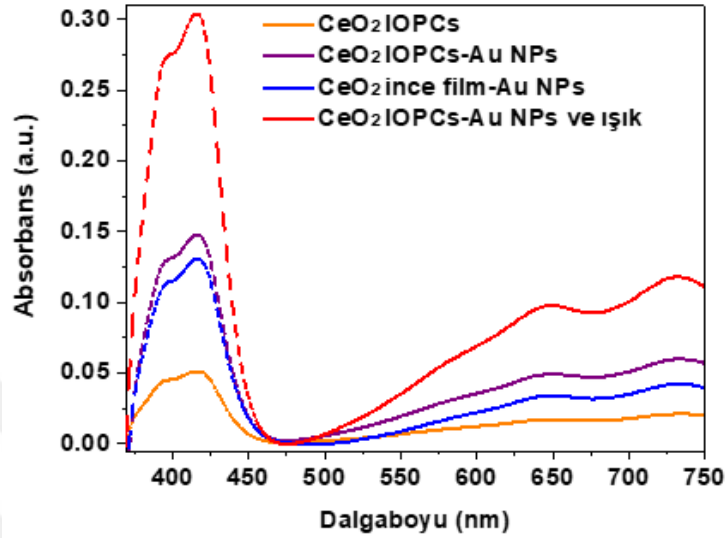


Şekil 4.14. Optimum ABTS konsantrasyonu

4.2. Nanozimin İki Enzim Benzeri Aktivite Mekanizması

Şekil 4.15, farklı sistemlerdeki absorbans spektrumlarını göstermektedir. H_2O_2 varlığında maksimum 730 nm dalga boyunda bir absorbans gözlemlendi, H_2O_2 yokluğunda ise absorbans değeri önemsizdi; bu da CeO_2 IOPC'lerin peroksidaz benzeri aktivitesini doğruladı. Ek olarak hibrit malzeme, yalnız CeO_2 IOPC'lere göre 730 nm'de artan bir absorbans göstermiştir; bu, hem CeO_2 IOPC'lerin hem de Au NP'lerin peroksidaz benzeri aktiviteyi artırdığını göstermektedir (Alle ve ark, 2022). Bu nedenle hem CeO_2 IOPC'ler hem de Au NP'ler peroksidaz benzeri aktivite gösterdi.

Ayrıca gözenekli malzeme ince film malzemesinden daha iyi performans gösterdi. Görünür ışık altında, hibrit materyalin peroksidaz benzeri aktivitesi karanlık koşullar altında gözlemlenen aktiviteden yaklaşık iki kat daha yüksek bulunmuştur, bu da fotokatalizin nanozim aktivitesini önemli ölçüde artırabildiğini doğruladı.

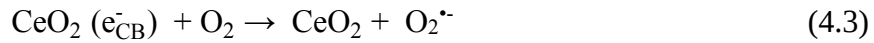


Şekil 4.15. H_2O_2 varlığında 9 dakikalık reaksiyondan sonra farklı reaksiyon sistemlerinde ABTS'nin nanozim katalizli oksidasyonunun UV-vis absorbans spektrumları: (a) CeO_2 IOPC'ler, (b) CeO_2 IOPC'ler/Au NP'ler, (c) CeO_2 ince film/Au NP'ler, (d) Optimum koşullar ve ışık altında CeO_2 IOPC'ler/Au NP'ler

CeO_2 IOPC'ler/Au NP'lerin ışık destekli enzim benzeri aktivite mekanizmasını ortaya çıkarmak ve oluşan reaktif türleri bulmak amacıyla model substrat olarak glukoz içeren reaksiyon ortamına çeşitli süpürücüler eklendi (Şekil 4.16). Peroksidaz benzeri aktivite, H_2O_2 'nin suya ve O_2 'ye ayrışma reaksiyonunu katalize eden bir enzim olan katalazın eklenmesinden sonra dikkate değer şekilde inhibe oldu ve glukoz oksidasyonu sonrası oluşan ara ürün H_2O_2 'nin üretimini bu şekilde belirlendi. Aynı şekilde, H_2O_2 için etkili bir süpürücü olan sodyum pirüvatın varlığı, nanozim aktivitesini etkiledi. Ayrıca, ışığa duyarlı nanozimin aktivitesi sitrik asit, askorbik asit veya KI varlığında azaldı; bu da ışıkla üretilen elektron boşluklarının (h^+) katalitik reaksiyonlar için oksidatif türlerden biri olduğunu doğruladı. Hidroksil radikallerinin ($\bullet OH$) süpürülmesi için tert-bütanol ilavesi (Jin ve ark, 2015), absorbansı bir dereceye kadar azalttı; bu, $\bullet OH$ 'nin kataliz sırasında üretildiğini gösterir. Ek olarak, maksimum dalga boyundaki absorbans, süperoksit anyonlarının ($O_2^{\bullet -}$) etkili bir süpürücüsü olan benzokinonun eklenmesinden sonra önemli ölçüde azaldı; bu, süperoksit anyonlarının aynı zamanda katalitik reaksiyonda oluşan reaktif türler olduğunu ortaya çıkardı.

Enzim benzeri aktiviteyi daha iyi anlamak için kataliz üzerindeki oksijen etkisi araştırıldı. ABTS absorbansı, 10 dakika boyunca O₂ ile doyurulan tampon çözeltisinde yüksek oranda artırılmıştır; bu, oksijenin bir reaktan olarak katalizde yer aldığını gösterir. Ayrıca ABTS^{•+} absorpsiyon yoğunluğu, argon geçirilmiş çözeltide önemli ölçüde %12'ye düştü; bu da önceki ifadeyi doğruluyor.

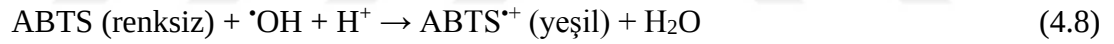
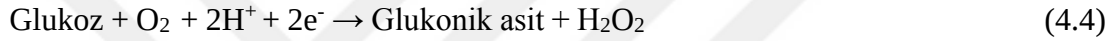
Süpürücü etkisi çalışmalarına dayanarak, hibrit materyalin çoklu enzim benzeri aktivitelerinin mekanizması deneysel olarak açıklandı. Au NP'lerin CeO₂ IOPC'ler üzerinde birikmesi, Au NP'lerin yüzey plazmon rezonansından dolayı hibrit malzemenin görünür bölgedeki ışığı absorbe etmesini sağlar. Görünür ışık uyarımı üzerine, CeO₂ IOPC'lerin değerlik bandı (VB) elektronları, doğrudan CeO₂ IOPC'lerin iletim bandına (CB) aktarılır ve ardından Au NP'lere geçer ve ABTS ile doğrudan reaksiyona girmek için CeO₂ üzerinde elektron boşlukları bırakır (eş.4.2). Bu arada, bir elektron alıcısı olarak çözünmüş oksijen, CeO₂ IOPC'lerin CB'sindeki uyarılmış elektronları ve Au NP'lerin üzerinde oluşan plazmonun indüklediği arayüzey yük-transfer geçişinin sıcak elektronunu yakalayarak O₂^{•-} radikalleri üretir (denk. 4.3) (Jin ve ark, 2015).



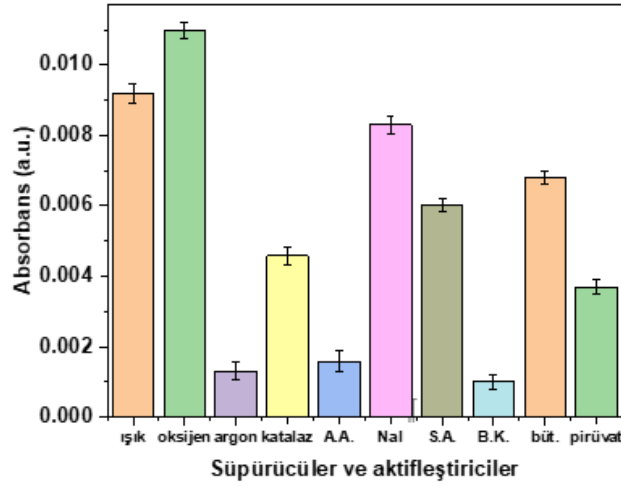
Oksijen ve ABTS'nin ilk adsorpsiyonları, çoklu enzim benzeri aktiviteler için gereklidir. Au NP'ler, O₂'yi H₂O₂'ye (eq.4.4) indirgeyerek glukozu fotokatalitik olarak oksitleyen GOx benzeri bir nanozim olarak görev yapabilir (P. Zhang ve ark, 2019). CeO₂, Ce⁴⁺/Ce³⁺=1,44 V standart indirgeme potansiyeline sahip oksitleyici bir malzemedir (Baltzer ve ark, 1984). CeO₂, ABTS gibi redoks potansiyeli kendi indirgeme potansiyelinin altında olan herhangi bir substrattan bir elektron alabilir (ABTS'nin ABTS^{•+}'ya indirgenme potansiyeli +0,472 V'dir) (Bourbonnais ve ark, 1998). Böylece CeO₂ IOPC'lerdeki Ce⁴⁺, ABTS'den elektronları yakalar ve daha sonra ABTS'yi yeşil bir türeve oksitleyerek Ce³⁺'ya dönüşür. Redoks potansiyeli hidrojen peroksitten daha düşük olan CeO₂ gibi malzemeler termodinamik olarak elektronlarını H₂O₂'ye aktarmaya uygundur. Böylece CeO₂'deki Ce³⁺, elektronları yerinde üretilen H₂O₂'ye aktararak O-O bağlarını parçalar ve HO₂[•] (O₂^{•-}) radikallerini (eşit. 4.5 ve 4.6) üretir (S. Zhang ve ark, 2021), daha sonra ışık altında HRP'yi taklit ederek Ce⁴⁺'ya geri döner. Daha sonra, O₂^{•-} radikalleri hızlı bir şekilde H₂O₂'ye dönüşür ve Ce³⁺ ile

reaksiyona girerek yeşil renk oluşumunu artırarak $\bullet\text{OH}$ üretir (eşitlik 4.6, 4.7 ve 4.8) (S. Zhang ve ark, 2021). Burada fotokatalizden gelen $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikalleri de renk oluşumuna katkıda bulunur. Dolayısıyla nanozimin peroksidaz aktivitesi, ara reaktif oksijen türlerinin yardımıyla ABTS ve H_2O_2 arasında elektron aktarma yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Ek olarak, CeO_2 IOPC'ler/Au NP'ler çoklu enzim benzeri aktivite gösterdi. Denklem 4.4'te Au NP'ler, literatürde bildirilen ve iyi bilinen bir GOx nanozimi olan glukoz oksidasyonunu katalize eder. Ayrıca denklem 4.6'da CeO_2 IOPC'ler, literatürde bildirildiği gibi SOD benzeri aktiviteyi ortaya koymaktadır. Bu öneri doğrultusunda bu çalışma, hibrit nanozimin her bir bileşenin özelliklerini birleştirebildiğini de doğruladı.

Yukarıdaki sonuçlara dayanarak, ışık destekli peroksidaz benzeri aktivite mekanizması aşağıdaki gibi önerildi.

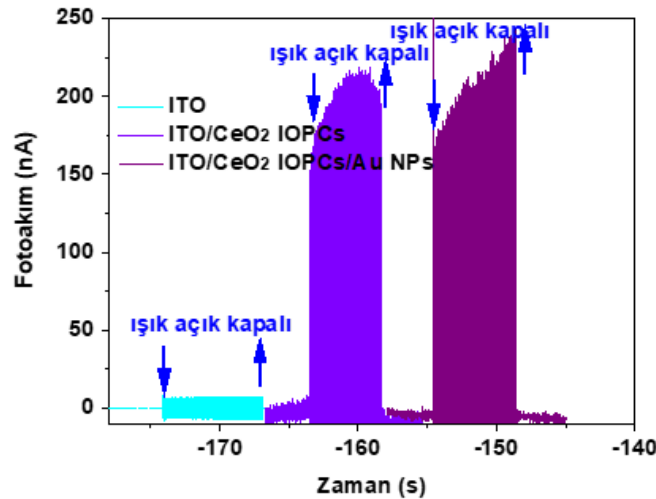


Peroksidaz benzeri aktivite aşağıdaki faktörlere atfedilebilir. Ters opal CeO_2 'nin iyi tanımlanmış iç boşluklara sahip açık gözenekli mimarisi, yüksek yüzey alanını ve bol miktarda katalitik olarak aktif bölgeleri taşır. Gözenekler, enzim benzeri kataliz sırasında substratların erişilebilirliğini kolaylaştırabilir. Kanallarda, glukoz oksidasyonu, metabolik bir ara madde olarak H_2O_2 'yi üretir; bunun, dağılmak yerine ROS oluşumuyla sonuçlanan sıralı bir reaksiyon adımına uğraması daha olasıdır. Ayrıca, hibrit nanozimin emici özelliği, ilgilenilen hedef molekülü nanozimin yakınına getirir ve reaktanların ve ara ürünlerin kütle transfer sürecini iyileştirerek kademeli reaksiyonları birbirine yakınlaştırır. Ayrıca, belirli bir kristal yüzeyde meydana gelen önemli elektron transferi, enzim benzeri aktivitesinin artmasına yardımcı olur.

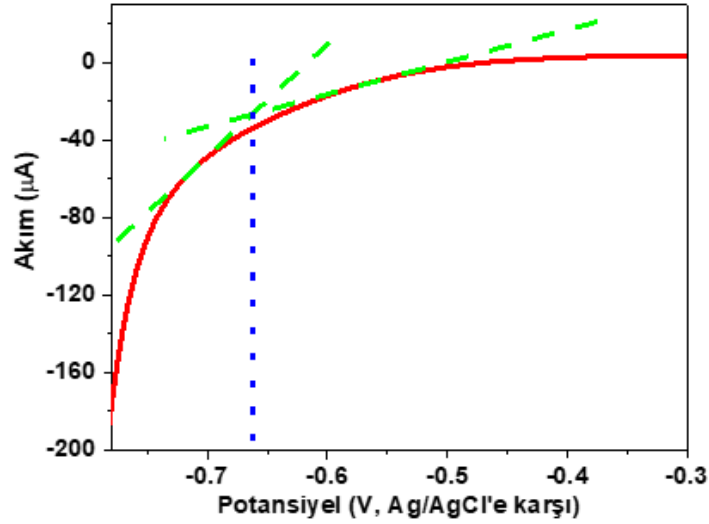


Şekil 4.16. Hibrit nanozimin çoklu enzim taklit edici aktiviteleri üzerinde süpürücü ve aktivatör etkisi

CeO₂ IOPC'lerin ve CeO₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin ışıkla indüklenen elektron transferini araştırmak için foto akımlar, şeffaf ve iletken ITO kaplı elektrotlar kullanılarak alındı. Işığa duyarlı nanozim malzemelerinin foto akımlarının görünür ışık altında hızlı yükselişi, hibrit malzemede hızlı foto-uyarımlı yük oluşumunu ve ayrılmasını gösterir (Şekil 4.17). CeO₂ IOPC'lerin iletim bandı (CB), LSV ile hesaplandı (Şekil 4.18) ve -0,66 V (Ag/AgCl'ye karşı) olarak bulundu; bu, O₂'nin indirgeme potansiyelinden (-0,046 V'ye karşı NHE) daha negatiftir (Jin ve ark, 2015). Bu nedenle, CeO₂ IOPC'lerin CB'sindeki foto-uyarımlı elektronlar, çözünmüş O₂'yi termodinamik olarak yakalayarak reaktif türler olarak O₂⁻ radikallerine indirgeyebilir.



Şekil 4.17. Görünür ışık ($\lambda \geq 400$ nm) altında 0,1 M Na₂SO₄ çözeltisinde 0 V potansiyelde (Ag/AgCl'ye karşı) fotoakım oluşumları



Şekil 4.18. 5 mV/s'de CeO₂ IOPC'lerin katodik LSV ölçümü

4.3. Nanozimin Kararlı Durum Kinetik Analizi

H₂O₂ ölçümleri için tipik Michaelis-Menten eğrisi elde edildi ve Michaelis-Menten sabiti (K_M) ve reaksiyonun maksimum başlangıç hızı (V_{max}) gibi kinetik parametreler, aşağıda denklem 4.9 kullanılarak bulundu:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} + \frac{1}{K_M} \right) \quad (4.9)$$

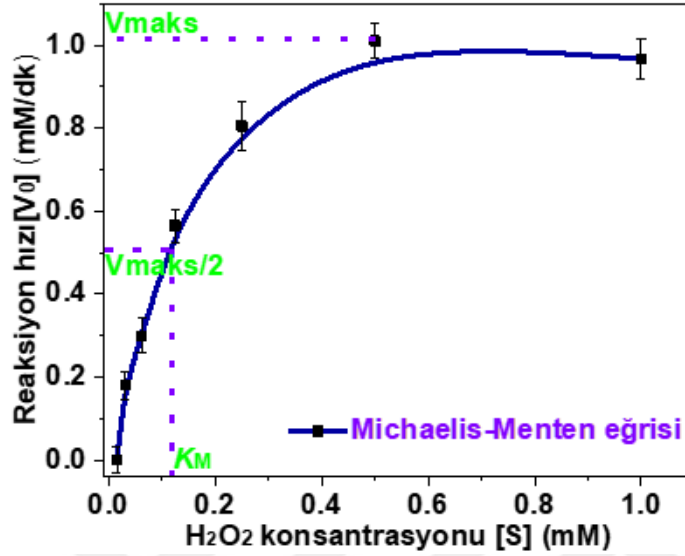
Denklem 4.9'daki başlangıç reaksiyon hızı (V_0), Lambert-Beer yasası (denk. 4.10) ve eşitlik 4.11 kullanılarak bulundu:

$$A = \epsilon lc \quad (4.10)$$

$$V_0 = \Delta c / \Delta t \quad (4.11)$$

burada A absorbanstır, ϵ ABTS ürününün sulu çözeltide 730 nm'de molar absorbanstır katsayısıdır ($12,947 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Cano ve ark, 2000), l küvetin optik yol uzunluğudur (1 cm) ve c ise H₂O₂ konsantrasyonuna eşdeğer olan oksitlenmiş ABTS konsantrasyonudur. Nanozime ait K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,116 mM ve 1,011 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Fig. 4.19). K_M 'nin substrata olan afinitenin bir göstergesi olduğu göz önüne alındığında, daha düşük K_M arzu edilirken V_{max} değerleri reaksiyonun hızını temsil ettiğinden, daha yüksek hız değeri istenir. Doğal HRP'nin K_M değeri H₂O₂ için 3,7 mM'dir (Gao ve ark, 2007), bu da yaklaşık olarak üretilen nanozimden 32 kat daha yüksektir ve nanozimin H₂O₂'ye karşı daha yüksek afinitesine işaret etmektedir. K_M , şu anda üzerinde çalışılan Co₃O₄/MoO₃, (0,134 mM) (X. Zhang ve ark, 2020), MoSe₂ nano tabakaları (0,155 mM) (X. Wu ve ark, 2018)

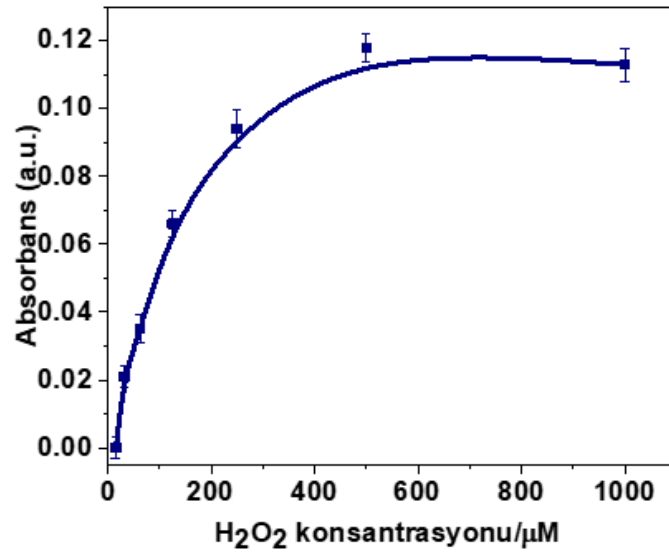
gibi nanomateryallerle karşılaştırılabilir düzeydeydi ve CuO NP'leri (85,6 mM)(W. Chen ve ark, 2011), Fe₃O₄ MNP'lerinden (154 mM) (Gao ve ark, 2007), PVP/PtRu'dan (36 mM) (Park ve ark, 2021) daha düşüktür ve üretilen nanozimin pratik uygulamalar için dikkate değer K_M değerini belirtir.



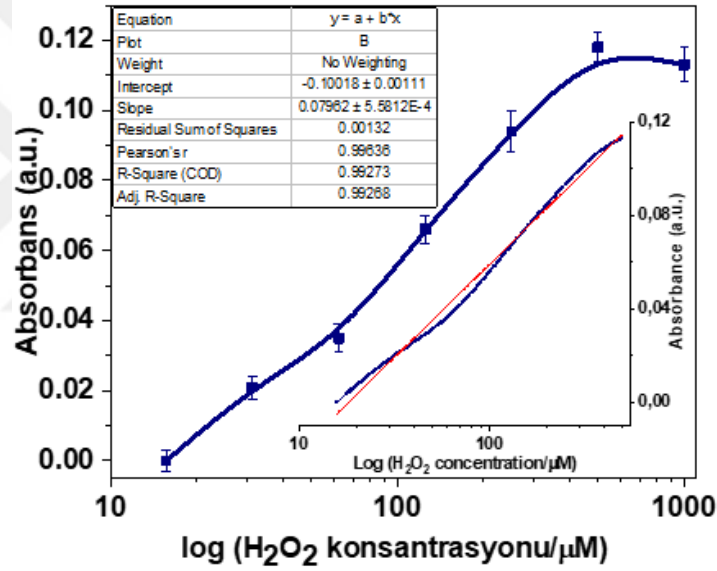
Şekil 4.19. Sabit ABTS konsantrasyonunun aktivite verilerinden Michaelis-Menten eğrisi

4.4. Nanozimin Kolorimetrik Hidrojen Peroksit Tespiti ve Sensör Performansı

H₂O₂'nin belirlenmesi için nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi kullanıldı. Şekil 4.20 absorbansa karşı hidrojen peroksit konsantrasyon eğrisini göstermektedir. Hidrojen peroksit konsantrasyonu, doğrusallığı geliştirmek için logaritmik ölçeğe dönüştürüldü (Şekil 4.21). Cam substrat üzerindeki CeO₂ IOPC'ler/Au NP'ler, H₂O₂ konsantrasyonları için 9 ila 500 μ M ($y=0,08x - 0,1$, $R^2 = 0,9927$) arasında dinamik bir doğrusal aralık sergiledi. Oksitlenmiş ABTS'nin rengi, 0,03 mM H₂O₂ konsantrasyonuna kadar çıplak gözle görülebiliyordu. Tespit sınırı (LOD), $3 \times (20 \text{ boş ölçümün standart sapması/doğrusal aralığın eğimi})$ formülüne göre $2,7 \mu$ M olarak belirlendi. Ölçüm sınırı (LOQ), $10 \times (20 \text{ boş ölçümün standart sapması/doğrusal aralığın eğimi})$ formülüne göre 9μ M olarak hesaplandı. Tablo 4.1'de bildirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında daha düşük LOD, materyallerin sinerjistik etkisi ve yapısal optimizasyondan kaynaklanabilir (Z. Wang ve ark, 2020). Ayrıca gözenekli malzemenin yüksek yüzey alanı muhtemelen dinamik ölçüm aralığını daha yüksek değerlere ulaştırmıştır.



Şekil 4.20. Absorbans spektrumları ve hidrojen peroksit konsantrasyonu eğrisi



Şekil 4.21. Hidrojen peroksit tespiti için kalibrasyon eğrisi

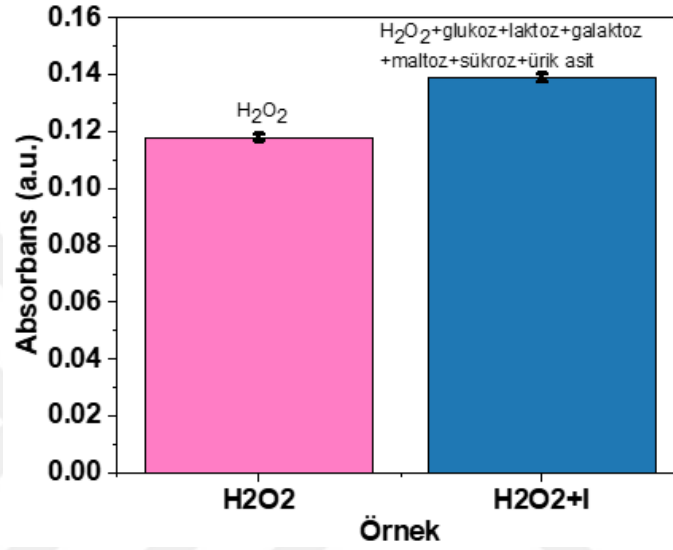
Tablo 4.1. Peroksidaz aktivitesi gösteren nanozimlerin performans karşılaştırması

Nanozim	Metot	LOD (μ M)	Doğrusal aralık (μ M)	Süre (dk)	Ref.
rCSA ¹ -hemin NPs	Kolorimetrik	2.39	2.5–500	30	(J. Zhang ve ark, 2021)
Pd ₂₅ -BGP NPs ²	Kolorimetrik	2.04	20–320	5	(R. Li ve ark, 2023)
Cu–SnO ₂	Elektrokimyasal	0.067	0.2–745 ve 745–5345	a.y.	(Zou ve ark, 2023)
Co ₃ O ₄ @Co-Fe oksit DSNCs ³	Kolorimetrik	20	0.02-600	15	(Q. Chen, Zhang, ve ark, 2020)
Mn ₃ O ₄ –Au SNC ⁴	Raman saçılımı	2	0.005-10	5	(Siddiqui ve ark, 2021)
Co ₃ O ₄ /MoO ₃	Kolorimetrik	0.08	0.1-200	20	(X. Zhang ve ark, 2020)
CoFe ₂ O ₄ MNPs	Kemiluminesans	0.01	0.1–10	a.y. ⁵	(Shi ve ark, 2011)
Au NCs	Kolorimetrik	10	30-5000	40	(J. Chen ve ark, 2019)
	Floresans		0.5-200	60	
MoSe ₂ nanotabakalar	Kolorimetrik	0.408	10-160	a.y.	(X. Wu ve ark, 2018)
PtS ₂ nanotabaka	Kolorimetrik	0.2	0.5–150	10	(W. Zhang ve ark, 2021)
Ultraince Pd	Kolorimetrik/ışıkta	13.4	10-100	15	(Y. Tang ve ark, 2020)
CeO ₂ IOPCs-Au NPs	Kolorimetrik/ışıkta	2.7	9-500	9	Bu çalışma

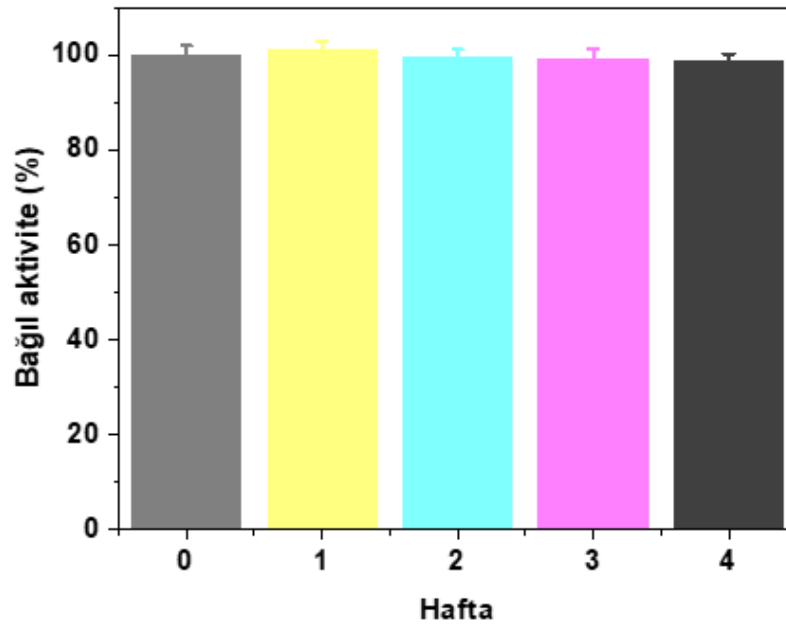
¹ rekombinant deve serum albumin proteini, ² acı kabak polisakkariti, ³ çift kabuklu nanokafes, ⁴ iğ nanokampositi, ⁵ açıklama yok.

Seçicilik, nanozimin 0,5 mM H₂O₂ çözeltisine ve 10 kat daha düşük konsantrasyonda glukoz, laktoz, galaktoz, sükroz, maltoz ve ürik asit gibi analogları ile kombinasyon halinde maruz bırakılmasıyla araştırıldı (Şekil 4.22). Hibrit nanozim bir dereceye

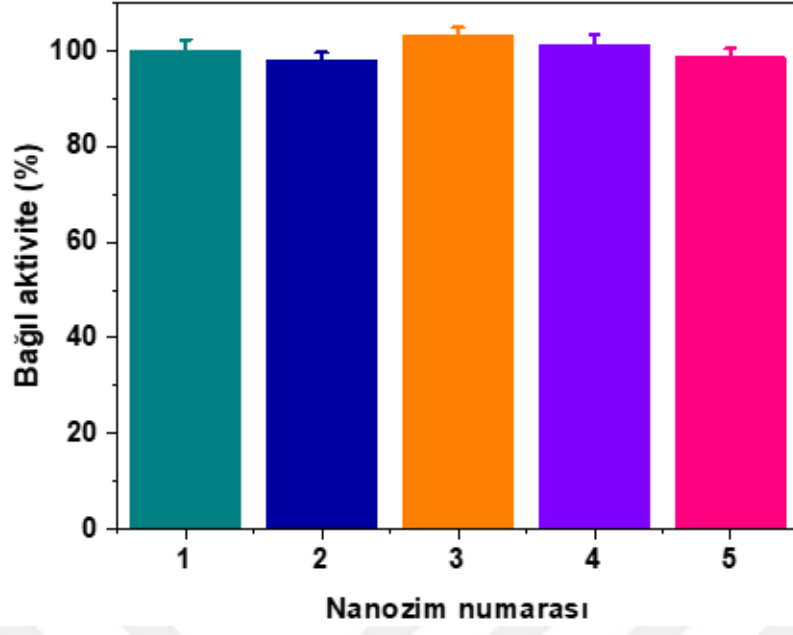
kadar oksidaz aktivitesi gösterebildiği için bağıl standart sapma (RSD) %17,8 olarak bulunmuştur. Nanozim platformunun stabilitesi 4 hafta boyunca 730 nm’de absorbans değeri ölçülerek test edildi. Nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi, ortam koşullarda saklandıktan sonra 1.3'lük bir RSD ile önemsiz bir değişikliğe sahipti; bu, nanozimin doğal enzimlere kıyasla üstün stabilitesini ortaya koyuyor (Şekil 4.23). Aynı koşullar altında bağımsız olarak üretilen beş farklı nanozim platformu grubu, %3,3'lük bir RSD ile iyi bir tekrarlanabilirlik sergiledi (Şekil 4.24).



Şekil 4.22. Hibrid nanozimin, glukoz ve glukoz analoglarına maruz bırakıldığında hidrojen peroksit tespiti için seçiciliği



Şekil 4.23. Nanozimin stabilitesi



Şekil 4.24. Nanozimin tekrar üretilebilirliği

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Özetle, CeO₂ IOPC'lerin/Au NP'lerin cam slayt üzerindeki ışık destekli peroksidaz benzeri aktivitesi, kolorimetrik hidrojen peroksit tespiti için tasarlandı ve araştırıldı. CeO₂ IOPC'ler ve Au NP'ler bir dereceye kadar peroksidaz benzeri aktivite sergilediklerinden, bu nanozimlerin birleştirilmesi olağanüstü H₂O₂ algılama performansı ortaya çıkardı. IOPC'lerin kullanımı, çok sayıda katalitik olarak aktif bölgeye erişim sağlar ve katalitik aktiviteyi artırır. Yüksek doğruluk ve hassasiyet, H₂O₂'nin sensör yüzeyine kolay ve hızlı erişiminden kaynaklanır. Hibrit nanozim, H₂O₂'yi tespit etmek için başarıyla kullanıldı ve görünür ışığın eklenmesi, tespit hassasiyetini önemli ölçüde iyileştirdi. Bu çalışma, çeşitli analitlerin tespiti için basit ve hassas nanozim esaslı analizleri doğrulamaktadır ve nanozim araştırması, sensör alanında kendine özgü bir yer bulacaktır.

Öneri olarak, IOPC farklı çaplarda sentezlenerek çap uzunluğunun nanozim aktivitesine etkisi ayrıntılı incelenebilir.



KAYNAKLAR

- Alle, M., Bandi, R., Sharma, G., Dadigala, R., Lee, S.-H., & Kim, J.-C. (2022). Gold nanoparticles spontaneously grown on cellulose nanofibrils as a reusable nanozyme for colorimetric detection of cholesterol in human serum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 686–697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.158>
- Amalraj, A., Narayanan, M., & Perumal, P. (2022). Highly efficient peroxidase-like activity of a metal–oxide-incorporated CeO₂–MIL(Fe) metal–organic framework and its application in the colorimetric detection of melamine and mercury ions via induced hydrogen and covalent bonds. *Analyst*, 147(14), 3234–3247. <https://doi.org/10.1039/D2AN00864E>
- André, R., Natálio, F., Humanes, M., Leppin, J., Heinze, K., Wever, R., Schröder, H.-C., Müller, W. E. G., & Tremel, W. (2011). V₂O₅ Nanowires with an Intrinsic Peroxidase-Like Activity. *Advanced Functional Materials*, 21(3), 501–509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.201001302>
- Asati, A., Kaftanis, C., Santra, S., & Perez, J. M. (2011). pH-Tunable Oxidase-Like Activity of Cerium Oxide Nanoparticles Achieving Sensitive Fluorogenic Detection of Cancer Biomarkers at Neutral pH. *Analytical Chemistry*, 83(7), 2547–2553. <https://doi.org/10.1021/ac102826k>
- Baltzer, P., Davidson, R. S., Tseung, A. C., Graetzel, M., & Kiwi, J. (1984). Quantitative studies on the paramagnetic behavior of ruthenium dioxide-titanium dioxide (anatase) powders catalytically active in water oxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 106(5), 1504–1506. <https://doi.org/10.1021/ja00317a065>
- Bornscheuer, U. T. (2003). Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. In *Angewandte Chemie - International Edition* (pp. 3336 – 3337). <https://doi.org/10.1002/anie.200301664>
- Bourbonnais, R., Leech, D., & Paice, M. G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1379(3), 381–390. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(97\)00117-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00117-7)
- Breaker, R. R. (1997). DNA enzymes. *Nature Biotechnology*, 15(5), 427–431. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-427>
- Çakıroğlu, B., Jabiyeva, N., & Holzinger, M. (2023). Photosystem II as a chemiluminescence-induced photosensitizer for photoelectrochemical biofuel cell-type biosensing system. *Biosensors and Bioelectronics*, 226, 115133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115133>
- Cano, A., Acosta, M., & Arnao, M. B. (2000). A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5(6), 365–370. <https://doi.org/10.1179/135100000101535933>

- Chen, J., Wu, W., Huang, L., Ma, Q., & Dong, S. (2019). Self-Indicative Gold Nanozyme for H₂O₂ and Glucose Sensing. *Chemistry - A European Journal*, 25(51), 11940–11944. <https://doi.org/10.1002/chem.201902288>
- Chen, Q., Li, S., Liu, Y., Zhang, X., Tang, Y., Chai, H., & Huang, Y. (2020). Size-controllable Fe-N/C single-atom nanozyme with exceptional oxidase-like activity for sensitive detection of alkaline phosphatase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 305, 127511. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127511>
- Chen, Q., Zhang, X., Li, S., Tan, J., Xu, C., & Huang, Y. (2020). MOF-derived Co₃O₄@Co-Fe oxide double-shelled nanocages as multi-functional specific peroxidase-like nanozyme catalysts for chemo/biosensing and dye degradation. *Chemical Engineering Journal*, 395(March), 125130. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125130>
- Chen, W., Chen, J., Liu, A.-L., Wang, L.-M., Li, G.-W., & Lin, X.-H. (2011). Peroxidase-Like Activity of Cupric Oxide Nanoparticle. *ChemCatChem*, 3(7), 1151–1154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cctc.201100064>
- Chen, Z.-J., Huang, Z., Sun, Y.-M., Xu, Z.-L., & Liu, J. (2021). The Most Active Oxidase-Mimicking Mn₂O₃ Nanozyme for Biosensor Signal Generation. *Chemistry – A European Journal*, 27(37), 9597–9604. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.202100567>
- Cooper, V. A., & Nicell, J. A. (1996). Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research*, 30(4), 954–964. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00237-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00237-5)
- Das, P., Borthakur, P., Boruah, P. K., & Das, M. R. (2019). Peroxidase Mimic Activity of Au–Ag/I-Cys-rGO Nanozyme toward Detection of Cr(VI) Ion in Water: Role of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Adsorption. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 64(11), 4977–4990. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00819>
- de Jesus, C. G., Lima, D., dos Santos, V., Wohnrath, K., & Pessôa, C. A. (2013). Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer films of silsesquioxane polyelectrolyte. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 186, 44–51. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.05.063>
- Dicosimo, R., Mcauliffe, J., Poulouse, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(42), 6437–6474. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- Dordick, J. S., Marletta, M. A., & Klivanov, A. M. (1987). Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(1), 31–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260300106>
- Duan, D., Fan, K., Zhang, D., Tan, S., Liang, M., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, P., Liu, W., Qiu, X., Kobinger, G. P., Fu Gao, G., & Yan, X. (2015a). Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 134–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.025>

- Duan, D., Fan, K., Zhang, D., Tan, S., Liang, M., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, P., Liu, W., Qiu, X., Kobinger, G. P., Fu Gao, G., & Yan, X. (2015b). Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 134–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.025>
- Franssen, M. C. R., Steunenberg, P., Scott, E. L., Zuilhof, H., & Sanders, J. P. M. (2013). Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews*, 42(42), 6491–6533. <https://doi.org/10.1039/c3cs00004d>
- Gallay, P., Eguílaz, M., & Rivas, G. (2020). Designing electrochemical interfaces based on nanohybrids of avidin functionalized-carbon nanotubes and ruthenium nanoparticles as peroxidase-like nanozyme with supramolecular recognition properties for site-specific anchoring of biotinylated residues. *Biosensors and Bioelectronics*, 148, 111764. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111764>
- Ganganboina, A. B., & Doong, R. (2018). The biomimic oxidase activity of layered V₂O₅ nanozyme for rapid and sensitive nanomolar detection of glutathione. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 273, 1179–1186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.038>
- Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., Wang, T., Feng, J., Yang, D., Perrett, S., & Yan, X. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2(9), 577–583. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.260>
- Ge, C., Fang, G., Shen, X., Chong, Y., Wamer, W. G., Gao, X., Chai, Z., Chen, C., & Yin, J.-J. (2016). Facet Energy versus Enzyme-like Activities: The Unexpected Protection of Palladium Nanocrystals against Oxidative Damage. *ACS Nano*, 10(11), 10436–10445. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06297>
- Gordeev, A., Kuznetsova, S., Lyutova, E., Khalipova, O., Fedorishin, D., Selyunina, L., & Malchik, A. (2023). Investigation of processes of obtaining cerium dioxide sol with polyvinyl alcohol having bioactive properties. *Ceramics International*, 49(5), 7580–7588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.10.249>
- Gross, A. J., Chen, X., Giroud, F., Abreu, C., Le Goff, A., Holzinger, M., & Cosnier, S. (2017). A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation. *ACS Catalysis*, 7(7), 4408–4416. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00738>
- Holzinger, M., Buzzetti, P. H. M., & Cosnier, S. (2021). Polymers and nano-objects, a rational combination for developing health monitoring biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 348, 130700. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130700>
- Hong, S. J., Chun, H., Hong, M., & Han, B. (2022). N- and B-doped fullerene as peroxidase- and catalase-like metal-free nanozymes with pH-switchable catalytic activity: A first-principles approach. *Applied Surface Science*, 598, 153715. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.153715>
- Huang, Y., Ren, J., & Qu, X. (2019). Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chemical Reviews*, 119(6), 4357–4412. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00672>

- Jiang, D., Ni, D., Rosenkrans, Z. T., Huang, P., Yan, X., & Cai, W. (2019). Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 48(14), 3683–3704. <https://doi.org/10.1039/C8CS00718G>
- Jiang, L., Tinoco, M., Fernández-García, S., Sun, Y., Traviankina, M., Nan, P., Xue, Q., Pan, H., Aguinaco, A., González-Leal, J. M., Blanco, G., Blanco, E., Hungría, A. B., Calvino, J. J., & Chen, X. (2021). Enhanced Artificial Enzyme Activities on the Reconstructed Sawtoothlike Nanofacets of Pure and Pr-Doped Ceria Nanocubes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(32), 38061–38073. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c09992>
- Jin, L. Y., Dong, Y. M., Wu, X. M., Cao, G. X., & Wang, G. L. (2015). Versatile and Amplified Biosensing through Enzymatic Cascade Reaction by Coupling Alkaline Phosphatase in Situ Generation of Photoresponsive Nanozyme. *Analytical Chemistry*, 87, 10429–10436. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02728>
- Karim, M. N., Anderson, S. R., Singh, S., Ramanathan, R., & Bansal, V. (2018). Nanostructured silver fabric as a free-standing NanoZyme for colorimetric detection of glucose in urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 110, 8–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.025>
- Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., & Self, W. T. (2007). Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chemical Communications*, 10, 1056–1058. <https://doi.org/10.1039/B615134E>
- Li, D., Teoh, W. Y., Gooding, J. J., Selomulya, C., & Amal, R. (2010). Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 20(11), 1767–1777. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000188>
- Li, J.-Q., Mao, Y.-W., Zhang, R., Wang, A.-J., & Feng, J.-J. (2023). Fe-Ni dual-single atoms nanozyme with high peroxidase-like activity for sensitive colorimetric and fluorometric dual-mode detection of cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 232, 113589. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113589>
- Li, R., Zhao, Y., Zhang, T., Ju, Z., Ji, X., Cui, Y., Wang, L., & Xiao, H. (2023). Pd nanoparticles stabilized by bitter melon polysaccharide with peroxidase properties for H₂O₂ detection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123513>
- Liu, Y., Ding, D., Zhen, Y., & Guo, R. (2017). Amino acid-mediated ‘turn-off/turn-on’ nanozyme activity of gold nanoclusters for sensitive and selective detection of copper ions and histidine. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 140–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.036>
- Lu, W., Chen, J., Kong, L., Zhu, F., Feng, Z., & Zhan, J. (2021). Oxygen vacancies modulation Mn₃O₄ nanozyme with enhanced oxidase-mimicking performance for L-cysteine detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 333(January), 129560. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129560>

- Luo, B., Cai, J., Xiong, Y., Ding, X., Li, X., Li, S., Xu, C., Vasil'kov, A. Y., Bai, Y., & Wang, X. (2023). Quaternized chitosan coated copper sulfide nanozyme with peroxidase-like activity for synergistic antibacteria and promoting infected wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125651>
- Luo, W., Zhu, C., Su, S., Li, D., He, Y., Huang, Q., & Fan, C. (2010). Self-Catalyzed, Self-Limiting Growth of Glucose Oxidase-Mimicking Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 4(12), 7451–7458. <https://doi.org/10.1021/nn102592h>
- Ma, Y., Tian, Z., Zhai, W., & Qu, Y. (2022). Insights on catalytic mechanism of CeO₂ as multiple nanozymes. *Nano Research*, 15(12), 10328–10342. <https://doi.org/10.1007/s12274-022-4666-y>
- Mou, J., Xu, X., Zhang, F., Xia, J., & Wang, Z. (2020). Promoting Nanozyme Cascade Bioplatfrom by ZIF-Derived N-Doped Porous Carbon Nanosheet-based Protein/Bimetallic Nanoparticles for Tandem Catalysis. *ACS Applied Bio Materials*, 3(1), 664–672. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01012>
- Park, Y., Gupta, P. K., Tran, V.-K., Son, S. E., Hur, W., Lee, H. B., Park, J. Y., Kim, S. N., & Seong, G. H. (2021). PVP-stabilized PtRu nanozymes with peroxidase-like activity and its application for colorimetric and fluorometric glucose detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111783>
- Patil, S., Seal, S., Guo, Y., Schulte, A., & Norwood, J. (2006). Role of trivalent La and Nd dopants in lattice distortion and oxygen vacancy generation in cerium oxide nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 88(24), 243110. <https://doi.org/10.1063/1.2210795>
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, N., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(42), 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>
- Sheldon, R. A., & Van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(42), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Shi, W., Zhang, X., He, S., & Huang, Y. (2011). CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles as a peroxidase mimic mediated chemiluminescence for hydrogen peroxide and glucose. *Chemical Communications*, 47(47), 10785–10787. <https://doi.org/10.1039/c1cc14300j>
- Siddiqui, S., Niazi, J. H., & Qureshi, A. (2021). Mn₃O₄–Au nanozymes as peroxidase mimic and the surface-enhanced Raman scattering nanosensor for the detection of hydrogen peroxide. *Materials Today Chemistry*, 22, 100560. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100560>
- Singh, R., & Singh, S. (2015). Role of phosphate on stability and catalase mimetic activity of cerium oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 78–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.005>

- Sun, H., Zhao, A., Gao, N., Li, K., Ren, J., & Qu, X. (2015). Deciphering a Nanocarbon-Based Artificial Peroxidase: Chemical Identification of the Catalytically Active and Substrate-Binding Sites on Graphene Quantum Dots. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(24), 7176–7180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201500626>
- Sun, H., Zhou, Y., Ren, J., & Qu, X. (2018). Carbon Nanozymes: Enzymatic Properties, Catalytic Mechanism, and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(30), 9224–9237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201712469>
- Tang, G., Wu, Y., Zhao, J., Zhang, H., Zhou, M., & Wang, Y. (2022). Cu₂O/CeO₂ Photo-electrochemical Water Splitting: A Nanocomposite with an Efficient Interfacial Transmission Path under the Co-action of a p–n Heterojunction and Micro-mesocrystals. *Chemistry – A European Journal*, 28(7), e202103459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.202103459>
- Tang, Y., Xiong, X., Xu, C., Yu, D., Huang, Y., Lin, C., Liu, X., & Lin, Y. (2020). Hot-Electron-Activated Peroxidase-Mimicking Activity of Ultrathin Pd Nanozymes. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03388-9>
- Tao, Y., Lin, Y., Huang, Z., Ren, J., & Qu, X. (2013). Incorporating Graphene Oxide and Gold Nanoclusters: A Synergistic Catalyst with Surprisingly High Peroxidase-Like Activity Over a Broad pH Range and its Application for Cancer Cell Detection. *Advanced Materials*, 25(18), 2594–2599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201204419>
- Tian, Z., Li, J., Zhang, Z., Gao, W., Zhou, X., & Qu, Y. (2015). Highly sensitive and robust peroxidase-like activity of porous nanorods of ceria and their application for breast cancer detection. *Biomaterials*, 59, 116–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.039>
- Tiwari, S., Balasubramanian, N., Biring, S., & Sen, S. (2018). Investigation of structural, optical and electronic properties of (Co, Ni) codoped CeO₂ nanoparticles. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 390(1), 12001. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/390/1/012001>
- Vernekar, A. A., Sinha, D., Srivastava, S., Paramasivam, P. U., D'Silva, P., & Mugesh, G. (2014). An antioxidant nanozyme that uncovers the cytoprotective potential of vanadia nanowires. *Nature Communications*, 5(1), 5301. <https://doi.org/10.1038/ncomms6301>
- Wang, D., Song, X., Li, P., Gao, X. J., & Gao, X. (2020). Origins of the peroxidase mimicking activities of graphene oxide from first principles. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(39), 9028–9034. <https://doi.org/10.1039/D0TB01765E>
- Wang, F., Zhang, Y., Du, Z., Ren, J., & Qu, X. (2018). Designed heterogeneous palladium catalysts for reversible light-controlled bioorthogonal catalysis in living cells. *Nature Communications*, 9(1), 1209. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03617-x>
- Wang, H., Zhao, J., Liu, C., Tong, Y., & He, W. (2021). Pt Nanoparticles Confined by Zirconium Metal-Organic Frameworks with Enhanced Enzyme-like Activity for Glucose Detection. *ACS Omega*, 6(7), 4807–4815. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05747>

- Wang, J., Li, M., Shi, Z., Li, N., & Gu, Z. (2002). Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. *Analytical Chemistry*, 74(9), 1993–1997. <https://doi.org/10.1021/ac010978u>
- Wang, Q., Wei, H., Zhang, Z., Wang, E., & Dong, S. (2018). Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 105, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.012>
- Wang, S., Chen, W., Liu, A.-L., Hong, L., Deng, H.-H., & Lin, X.-H. (2012). Comparison of the Peroxidase-Like Activity of Unmodified, Amino-Modified, and Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *ChemPhysChem*, 13(5), 1199–1204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cphc.201100906>
- Wang, Z., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2020). Structure and activity of nanozymes: Inspirations for de novo design of nanozymes. *Materials Today*, 41(December), 81–119. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.08.020>
- Waterhouse, G. I. N., Metson, J. B., Idriss, H., & Sun-waterhouse, D. (2008). Physical and Optical Properties of Inverse Opal CeO₂ Photonic Crystals †. *Chemistry of Materials*, 20(6), 1183–1190.
- Wei, H., & Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(14), 6060–6093. <https://doi.org/10.1039/c3cs35486e>
- Wu, W., Huang, L., Wang, E., & Dong, S. (2020). Atomic engineering of single-atom nanozymes for enzyme-like catalysis. *Chemical Science*, 11(36), 9741–9756. <https://doi.org/10.1039/D0SC03522J>
- Wu, X., Chen, T., Wang, J., & Yang, G. (2018). Few-layered MoSe₂ nanosheets as an efficient peroxidase nanozyme for highly sensitive colorimetric detection of H₂O₂ and xanthine. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(1), 105–111. <https://doi.org/10.1039/C7TB02434G>
- Yang, C., Gao, G., Zhang, J., Liu, R., Fan, R., Zhao, M., Wang, Y., Gan, S., Cdwo, A., & Bi, /. (2017). Surface oxygen vacancy induced solar light activity enhancement of a CdWO₄/Bi₂O₃CO₃ core–shell heterostructure photocatalyst. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(19), 14431–14441. <https://doi.org/10.1039/c7cp02136d>
- Yang, Y., Mao, Z., Huang, W., Liu, L., Li, J., Li, J., & Wu, Q. (2016). Redox enzyme-mimicking activities of CeO₂ nanostructures: Intrinsic influence of exposed facets. *Scientific Reports*, 6(1), 35344. <https://doi.org/10.1038/srep35344>
- Yi, X., Huang-Xian, J., & Hong-Yuan, C. (2000). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteamine-modified gold electrode. *Analytical Biochemistry*, 278(1), 22–28. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4360>
- Zhang, H., Liang, X., Han, L., & Li, F. (2018). “Non-Naked” Gold with Glucose Oxidase-Like Activity: A Nanozyme for Tandem Catalysis. *Small*, 14(44), 1803256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.201803256>

- Zhang, J., Xu, Q., Pei, W., Cai, L., Yu, X., Jiang, H., & Chen, J. (2021). Self-assembled recombinant camel serum albumin nanoparticles-encapsulated hemin with peroxidase-like activity for colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2103–2112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.042>
- Zhang, P., Sun, D., Cho, A., Weon, S., Lee, S., Lee, J., Han, J. W., Kim, D.-P., & Choi, W. (2019). Modified carbon nitride nanozyme as bifunctional glucose oxidase-peroxidase for metal-free bioinspired cascade photocatalysis. *Nature Communications*, 10(1), 940. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08731-y>
- Zhang, S., Liu, Y., Sun, S., Wang, J., Li, Q., Yan, R., Gao, Y., Liu, H., Liu, S., Hao, W., Dai, H., Liu, C., Sun, Y., Long, W., Mu, X., & Zhang, X.-D. (2021). Catalytic patch with redox Cr/CeO₂ nanozyme of noninvasive intervention for brain trauma. *Theranostics*, 11, 2806–2821. <https://doi.org/10.7150/thno.51912>
- Zhang, W., Li, X., Cui, T., Li, S., Qian, Y., Yue, Y., Zhong, W., Xu, B., & Yue, W. (2021). PtS₂ nanosheets as a peroxidase-mimicking nanozyme for colorimetric determination of hydrogen peroxide and glucose. *Microchimica Acta*, 188(5), 174. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04826-w>
- Zhang, X., Lu, Y., Chen, Q., & Huang, Y. (2020). A tunable bifunctional hollow Co₃O₄/MO₃(M = Mo, W) mixed-metal oxide nanozyme for sensing H₂O₂ and screening acetylcholinesterase activity and its inhibitor. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(30), 6459–6468. <https://doi.org/10.1039/d0tb01337d>
- Zhao, R., Zhao, X., & Gao, X. (2015). Frontispiece: Molecular-Level Insights into Intrinsic Peroxidase-Like Activity of Nanocarbon Oxides. *Chemistry – A European Journal*, 21(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201580361>
- Zou, G., Sun, L., Huo, L., & Zhao, H. (2023). Oxygen-vacancy enhanced peroxidase-like activity of Cu–SnO₂ for dual-mode sensing of hydrogen peroxide. *Ceramics International*, 49(11, Part A), 17331–17339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.02.100>

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Naiba Jabiyeva

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2017, Bakü Devlet Üniversitesi, Kimya Fakülte
- **Yükseklisans** : Sakarya Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı

DİĞER ESERLER:

- Çakıroğlu, B., Jabiyeva, N., Holzinger, M. 2023. Photosystem II as a chemiluminescence-induced photosensitizer for photoelectrochemical biofuel cell-type biosensing system, *Biosensors and Bioelectronics*, 226, 115133.