

**FOTOSİSTEM II TABANLI BİYONANOENERJETİK
GELİŞTİRİLMESİ
VE BİYOBELLEK UYGULAMALARI**

Fatma YEDİYILDIZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Eylül 2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fatma YEDİYILDIZ' ın “**Fotosistem II Tabanlı Biyonanoenerjetik Geliştirilmesi ve Biyobellek Uygulamaları**” başlıklı Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 27/08/2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Rıdvan SAY

.....

Üye : Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK

.....

Üye : Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ

.....

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FOTOSİSTEM II TABANLI BİYONANOENERJETİK GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOBELLEK UYGULAMALARI

Fatma YEDİYILDIZ

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

**Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2015, 56 sayfa**

Bu çalışmada öncelikle fotosistem II (FS II) kompleksinin ıspanak bitkisinden kimyasal parçalama yöntemiyle izolasyonu sağlanmış ve saflaştırmasında kullanılmak üzere kriyoyel tabanlı katı destek materyalleri geliştirilmiştir. Bu bağlamda çalışmanın ilk aşamasında fenilalanin içerikli hidroksi etilmetakrilat (HEMA) monomeri ile çapraz bağlayıcı N,N' metilenbisakrilamid (MBA) polimerleştirilerek kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. Daha sonra sentezlenen kriyojel katı desteğin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca; saflaştırılan FS II'lerin molekül ağırlığı SDS PAGE analizi ile protein içeriği ise Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, saflaştırılan FS II yapısından yola çıkılarak biyoenerjetikler sentezlenmiştir. Bunun için fotoduyarlı mikro-emülsiyon polimerizasyon yöntemi uygulanmış olup biyonanoenerjetikler floresan spektrofotometresi, circular dichroism (CD) spektroskopisi ve zetametre ile karakterize edilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında, dönüşümlü voltametri ve kronoamperometri kullanılarak sentezlenen bu biyonanoenerjetiklerin biyobellek ve redox özellikleri incelenerek nanoFSII kompleksine yeni yönelimler getirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotosistem II (FS II), kriyojel, fotoduyarlı mikro-emülsiyon polimerizasyonu, biyobellek

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DEVELOPMENT OF PHOTOSYSTEM II BASED BIONANOENERGETIC AND BIOMEMORY APPLICATIONS

Fatma YEDİYILDIZ

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

**Supervisor: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2015, 56 pages**

In this study, firstly, isolation of the photosystem II (PS II) complex from spinach by using chemical degradation method has been provided and cryogel based solid support material has been developed for purification. For this purpose, cryogel columns have been prepared by polymerization of hydroxy ethylmethacrylate (HEMA) monomer including phenylalanine and cross-linker N,N' methylenebisacrylamide (MBA) in the first step of the study. Then, characterization of the synthesized cryogel solid support has been performed. In addition, the determination of molecular weight and protein content of the purified PS II by using prepared column has been also carried out by SDS-PAGE and Bradford method, respectively.

In the second step of the study, bioenergetics have been synthesized by using purified FS II. For this purpose, photosensitive micro-emulsion polymerization method has been applied. The prepared bionanoenergetics have been characterized by fluorescence spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy and zetameter.

In the last step of the study, new approaches have been developed to nano PS II complex investigating biomemory and redox properties of the bionanoenergetics by cyclic voltammetry and chronoamperometry.

Keywords: Photosystem II (PS II), cryogel, photosensitive polymerization, biomemory

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan SAY ' a

Deneysel çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her zaman destekleyen Prof. Dr. Arzu Ersöz'e, Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ'e, Arş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e

Teorik ve deneysel her konuda desteğini yanımda hissettiğim, sabır ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Uzm. Dr. Rüstem KEÇİLİ'ye

Elektrokimyasal çalışmalarımdeki desteğinden dolayı Yard. Dr. Remziye GÜZEL'e

Kimyasal desteğinden dolayı Türkiye Bilimler Akademisi TÜBA'ya

Deneysel çalışmalarımda yardımlarından dolayı Sevgi MİL, Özlem KALABAK ve Burak YILDIZ'a

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan Biyokimya Lab. ekibine ve o ekipten olan sevgili arkadaşlarım Yasemin UYMAZ, Berfu ENGİN, Ayça BAKIR, Burcu YAZICI, Derya KARAASLAN, Gözde YAVUZ ve Halil İbrahim AKBAŞ'a

Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ilgilerini, desteklerini, güvenlerini benden esirgemeyen başta biricik ablam Tülin YEDİYILDIZ YILMAZ olmak üzere en değerli varlığım Aileme'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma YEDİYILDIZ

Eylül 2015

İÇİNDEKİLER

<u>ÖZET</u>	i
<u>ABSTRACT</u>	ii
<u>TEŞEKKÜR</u>	iii
<u>İÇİNDEKİLER</u>	iv
<u>SEKİLLER DİZİNİ</u>	vii
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ</u>	ix
<u>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</u>	x
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİ	3
2.1. Fotosentez.....	3
2.1.1. FS II Reaksiyon Merkez Yapısı	8
2.1.2. Biyoenerjetikler	10
2.2. Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi.....	11
2.2.1. Nanopartikül Üretim Yöntemleri	13
2.3. Rutenyum Tabanlı Amino Asit Monomeriyle Fotosentetif Çapraz Bağlama Ve Anadoluca Yöntemi.....	14
2.4. Kromatografik Yöntemler	15
2.4.1. İyon Kromatografisi	17
2.5. Kriyojeller	20
2.6. Kaynak Seçimi ve FS II Saflaştırma Uygulamaları	22
2.7. Elektrokimyasal Yöntemler.....	22
2.7.1. Dönüşümlü Voltametri.....	23
2.7.2. Kronoamperometri	24
2.8. Biyobellek Uygulamaları ve Elektrokimyasal Uygulamalar	25
3. MATERYAL VE METOD	26

3.1. Materyal	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	26
3.2. Metod	27
3.2.1. Kriyojel Temelli Ayırma Kolonlarının Hazırlanması	27
3.2.1.1. N-metakriloil amino-(L)- tirozin (MATyr) sentezi.....	27
3.2.1.2. bis(2-2'-bipiridil) (MATyr) ₂ Rutenyum (II) sentezi	28
3.2.1.3. FS II Nanopartikül Sentezi.....	28
3.2.1.4. Fenilalanin Çapraz Bağlı Kriyojel Sentezi.....	29
3.2.2. Kriyojel Temelli Ayırma Kolonunun Karakterizasyonu	29
3.2.2.1. Şişme Testi.....	29
3.2.2.2. FT-IR Analizi.....	30
3.2.2.3. Yüzey Alanı Ölçümü	30
3.2.2.4. Yüzey Morfolojisi	30
3.2.3. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	30
3.2.3.1. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi.....	30
3.2.3.2. Zeta Boyut Analizi	31
3.2.3.3. Floresans Spektroskopisi Analizi.....	31
3.2.3.4. Döngüsel Voltametri ve Kronoamperometri Analizi.....	31
3.2.4. FS II İzolasyon Prosedürü	31
3.2.5. SDS-PAGE Analizi	32
4. BULGULAR	34
4.1. İzolasyon ve Saflaştırma Yöntemleri.....	34
4.1.1. Fenilalanin Gömülü Kriyojel Kolon Şişme Testi.....	34
4.1.2. Poli(HEMA- Fenilalanin)' in FT-IR Spektrumu.....	34
4.1.3. Fenilalanin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü	35

4.1.4. Fenilalanin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi	35
4.1.5. FS II Saflaştırılması	36
4.1.5.1. Sürekli Sistem Çalışması	36
4.1.5.2. SDS-PAGE Analizi	38
4.1.5.3. Protein İçeriğinin Belirlenmesi	38
4.2. Biyonanoenerjetik Partiküller ve Karakterizasyonları	39
4.2.1. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi	39
4.2.2. Zeta Boyut Analizi	40
4.2.3. Floresans Ölçümleri	41
4.3. NanoFSII'nin Biyobellek Özelliği ve Elektrokimyasal Davranışı	42
5. SONUÇ VE YORUM	49
KAYNAKLAR	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fotosistem I ve fotosistem II birleşmesi, Z şeması	3
Şekil 2.2. Fotosentetik organizmalarda enerji döngüsü	4
Şekil 2.3. Kloroplast, tilakoit zar demetleri	5
Şekil 2.4. Yüksek bitkilerde FS II yapısında yer alan dimerik proteinlerin elektron mikroskopunda incelenmiş yapısı	9
Şekil 2.5. Nanoteknolojik Boyutlar	12
Şekil 2.6. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	16
Şekil 2.7. İyon kromatografisi anyon değiştirici kolon etkileşim mekanizması.....	18
Şekil 2.8. Jellerin sınıflandırılması	20
Şekil 2.9. Kriyojelasyon.....	21
Şekil 2.10. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması	23
Şekil 2.11. a)Uygulanan gerilim programı, b) Elde edilen zaman-akım eğrisi	25
Şekil 3.1. N-metakriloil amino-(L)- tirozin sentezi	27
Şekil 3.2. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr) ₂ -Rutenyum (II) molekül yapısı	28
Şekil 3.3. Kriyojelin şişme ve esneklik özelliği.....	30
Şekil 4.1. Poli(HEMA-Fenilalanin)'in FT-IR spektrumu.....	34
Şekil 4.2. Poli(HEMA-Fenilalanin) ve Poli(HEMA)'nın FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.3. Poli(HEMA-Fenilalanin)' in SEM görüntüleri.....	36
Şekil 4.4. Sürekli Sistem Mekanizması	37
Şekil 4.5. Absorbans değişim grafiği.....	37
Şekil 4.6. SDS-PAGE görüntüsü	38
Şekil 4.7. FS II nanopartiküllerdeki protein miktarı tayini için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 4.8. a)NanoFSII CD spektrumu, b)İzole edilen FS II CD spektrumu	40

Şekil 4.9. NanoFSII zeta boyut analizi	41
Şekil 4.10. NanoFSII floresan spektrumu.....	42
Şekil 4.11. NanoFSII üç boyutlu floresan spektrumu.....	42
Şekil 4.12. NanoFSII biyobelleklerle donanmış altın elektrodun fosfat tamponu içindeki (pH:4.7) döngüsel voltamogramı	43
Şekil 4.13. NanoFSII donanmış altın elektrotun 10 mM fosfat tamponundaki (pH: 4.7) kronoamperometrik davranışı (Yükseltgenme ve indirgenme akımları 0.6 saniyede elde edilmiştir).....	44
Şekil 4.14. NanoFSII kaplı altın yüzeyinde rutenyum kompleksi.....	45
Şekil 4.15. NanoFSII kaplı altın yüzeyinde sitokrom b.....	45
Şekil 4.16. NanoFSII kaplı altın yüzeyinde NADH'a ait açık devre potansiyelleri	45
Şekil 4.17. Fotosistem II kokteylinden elde edilen biyonanoenerjiğinin nanobellek aygıt fonksiyonu. nanoFSII kaplı altın yüzeyin (10 mM fosfat tamponu pH: 4.7) açık devre potansiyel amperometrik davranışı.....	46
Şekil 4.18. NanoFSIIbellek kaplı altın yüzeyin (10 mM fosfat tamponu pH: 4.7) çoklu döngüsel kronoamperometrik davranışı.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanopartiküllerin başlangıç fazlarına göre sentez yöntemleri	14
Çizelge 3.1. Jel hazırlamada kullanılan çözelti miktarları.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
CA	: Kronoamperometri
CD	: Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi
CV	: Döngüsel voltammetri
FS I	: Fotosistem I
FS II	: Fotosistem II
HEMA	: Hidroksietilmetakrilat
kDa	: Kilodalton
MBA	: N'N, Metilenbisakrilamit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükteotid
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
PVA	: Polivinil alkol
SDS	: Sodyum n-dodesil sülfat
TEMED	: Tetraetilmetilendiamin

1. GİRİŞ

Enerjinin bir formdan diğere bir forma dönüşümü gelişmiş organizmalarda kimyasal reaksiyonlar ile gerçekleşmektedir. Biyoenerjetik, enerji dönüşümleri ile ilgili genel bir fizik bilimi olan termodinamiğin özel bölümünü oluşturmaktadır (Harris, 2009). Yani biyoenerjetikler, doğada, canlılarda ve enerji çevrimlerinin temelini oluşturan kimyasal olayların işlevleri sırasında meydana gelen enerji döngülerinin nicel bir ölçüsüdür (Nicholls ve Ferguson, 2013). Biyoenerjetikler kanser tanısı (Cuezva, 2002), reseptör moleküllerin aktivasyonu (St Pierre, 2003), enerji döngülerinin aydınlatılması (Cramer ve Knaff, 2012), yaşamsal sürecin incelenmesi gibi (Oren, 1999) bir çok uygulama alanına sahiptir.

Biyo veya organik moleküller, moleküler elektronik alanında alternatif bir teknoloji olarak ticari alanda karşılaşılan sorunların üstesinden gelebilecek maddeler olarak düşünülmektedir (Heath ve Ratner ,2003). Spin tabanlı ve ferromanyetizm tabanlı cihazlar dahil olmak üzere yeni nesil hafıza cihazları geliştirilmek için anahtar unsur olarak protein kullanılarak depolama ve bilginin çoklu durum okuması yönünde çalışmalar mevcuttur (Lee, 2010). Ayrıca, grafen modifiye edilmiş biyofilm yük depolamada ve grafen ile elektrokimyasal olarak aktif modifiye biyofilm arasındaki sinerjik etkileri nedeniyle serbest özellikleri önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ayrıca biyomalzeme-kombine biyobellek cihazları tasarlanmıştır (Yuan, 2013).

Fotosistem II bitkilerin en önemli yaşamsal faaliyeti olan fotosentezin tamamlayıcı bir bölümüdür. FS II'de bir biyoenerjetik sistem olarak incelenebilir. Biyoteknolojinin gelişimi ile birlikte canlı organizmalardan izole edilen biyolojik moleküller klinik uygulamalar başta olmak üzere bir çok alanda kullanılmaktadır (Pundir, 2010). Enerji kaynaklarının zamanla tükenmesi yeni nesil enerji kaynaklarına yönelimi arttırmaktadır. Biyolojik kaynakların sahip olduğu üstün biyoenerjetik özelliklerden yararlanılarak yeni nesil enerji kaynakları geliştirilmeye başlamıştır (Smith ve Venter, 2003).

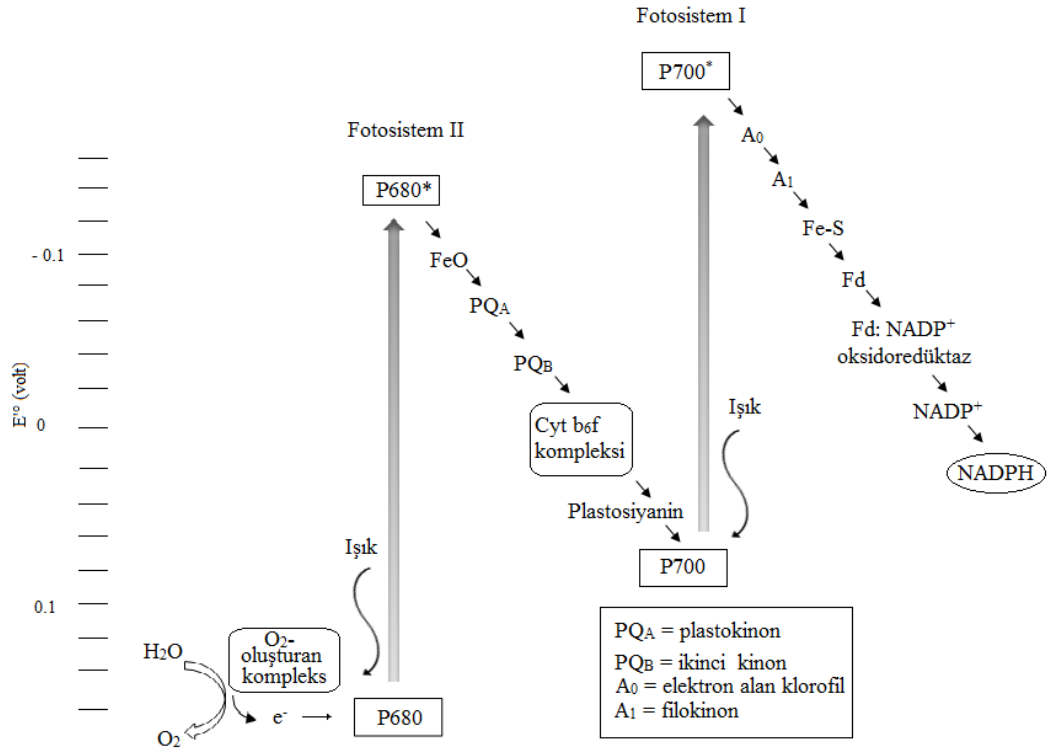
Bu çalışmada ıspanak bitkisinden FS II izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen sistem fenil alanin çapraz bağlı kriyojel kolonlar kullanılarak iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Çalışmanın devamında izole edilen FS II'nin, Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile protein miktarı belirlenmiş,

saflaştırılan FS II'nin SDS-PAGE analizi ile moleköl ağırlığı ortaya konularak ve buradan yola çıkılarak sentezlenen biyoenerjetiklerin karakterizasyonları yapılmıştır. Bu biyonanoenerjetiklerin döngüsel voltametri (CV) ve kronoamperometri (CA) elektroanalitik yöntemleri uygulanarak, nanobiyobellek özellikleri ortaya konulmuştur.

2. TEORİK BİLGİ

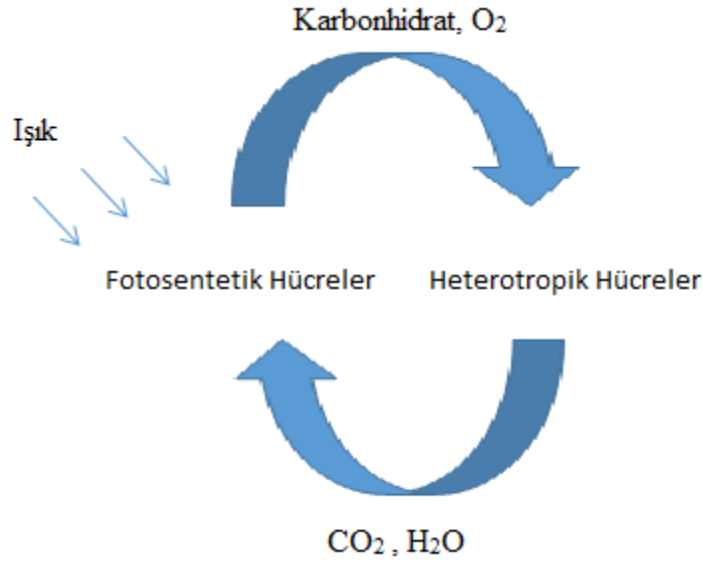
2.1. Fotosentez

Fotosentez kelimesi “ışık kullanılarak sentezlenme” anlamına gelmektedir. Işık enerjisini kullanabilen tek biyolojik olaydır. Fotosentez, ışık enerjisi kullanılarak kloroplastlarda bulunan suyu oksijene yükseltirken, havadan alınan karbondioksitin karbon moleküllerine indirgendiği kimyasal tepkimelerin bütünüdür (Şekil 2.1).

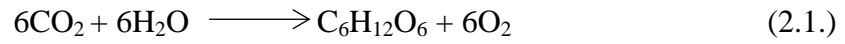


Şekil 2.1. Fotosistem I ve fotosistem II birleşmesi, Z şeması

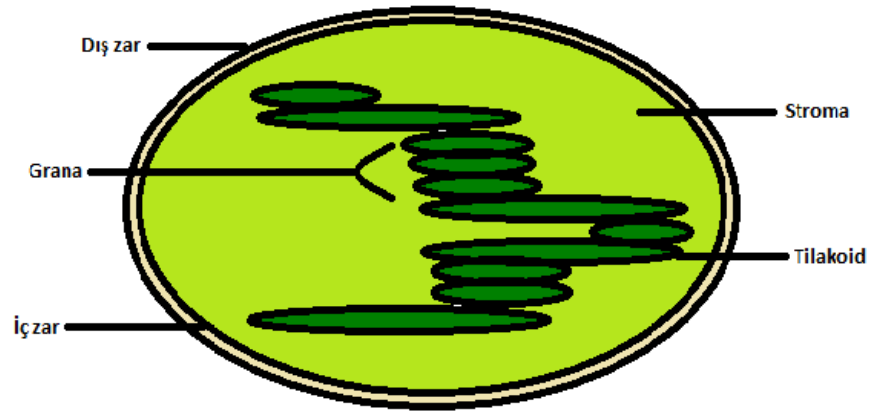
Fotosentetik organizmalar tarafından güneş enerjisinin kimyasal enerjiye dönüşümü biyolojik enerjilerin en büyük kaynağıdır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Fotosentetik organizmalarda enerji döngüsü



Bitkilerdeki fotosentez olayında en aktif role sahip doku yaprakların mezofil tabakasıdır. Fotosentezin gerçekleştiği yer kloroplasttır ve mezofil hücreleri çok miktarda kloroplasta sahiptir. Kloroplast organelinde tilakoidler, iç zar, küçük molekül ve iyonlara karşı geçirgen dış zar, stromalar, enzimler, DNA, RNA, ribozom gibi yapılar mevcuttur. İç zar “tilakoid” olarak adlandırılan katlanmış zarla çevrili vezikül yapıları içerir ve grana adı verilen demetler içerir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kloroplast, tilakoit zar demetleri

DNA, RNA ve fotosentezde görev alan enzimler stroma sıvısında yer alıp ribozomlarla hem kendilerini çoğaltıp hemde protein üretimini gerçekleştirirler.

Fotosentezin en büyük etkeninin ışığın dalgaboyu olduğu 1882 yılında T.W. Englemann tarafından yapılan deneylerle belirlenmiştir. Fotosentetik su yosunu hücrelerini mikroskop altında inceleyen Englemann, filamentleri prizmadan gelen ışıkla aydınlatığında hücrelerin mavi, sarı ve kırmızı ışığı kullandığını gözlemiştir. Englemann hücrelerden aktif fotosentez yapanı bulmak için O₂ derişimi bölgesine hareket eden bakterileri mikroskop plağına koymuş ve aydınlatma süresinin sonunda menekşe ve kırmızı ışıkla aydınlatılan alanda maximum O₂ düzeyini belirlemiştir. Modern teknik olarak oksijen elektrodu kullanarak benzer bir deney yapıldığında da aynı sonuca ulaşılmıştır. Bu bağlamda fotosentezin etki spektrumuna sahip olduğu ve ışığın pigmentlere tutunmasında etkili olduğu yorumlanmıştır.

Fotosentezin ilk aşaması ışığın soğurulmasıdır. Kloroplastta yer alan pigmentler soğurulmayı sağlar. Fotosentetik organizmalardaki tipik pigmentler klorofillerdir. Klorofiller polisiklik düzlemsel yapıda olup merkezinde Mg⁺² iyonu bulundurulur. Fakat organizmalar birden fazla pigmente sahiptir. Klorofil a ve b yeşil bitkilerde, c ve d ise bazı protistlerde ve siyanobakterilerde bulunmaktadır.

Siyanobakteriler ve kırmızı su yosunlarında ışık toplayıcı molekül olarak fikobilinler bulunur. Tetrapoller ve polien sistemler halinde merkezinde Mg⁺² iyonu bulundurmazlar.

Tilakoit zarfa klorofiller dışında ikinci ışık tutan pigment karotenoidlerdir. Karotenoidler genellikle yağda ozünen asiklik, monosiklik ve bisiklik yapılarfa bulunan, lipofilik yapıda bileşiklerdir (Mınguez-Mosquera,2002). Karotenoidlerin molekuler iskeletini oluşturan karbon zincirindeki karbon atomları birbirlerine, tek-çift bağlar, konjuge çift bağlarla bağlanırlar. Karotenin doğada α , β ve γ olmak üzere u izomeri bulunmaktadır. İzomerler A vitamininin öncul yapıları olup organizmalarda A vitaminine dönüşürler. Karotenoidlerin en önemli özellikleri, ışığı absorbe edebilmeleri, uygun şartlarda izomerize ve okside olmaları, hidrofobik yüzeylerle etkileşebilmeleri ve singlet oksijen yatıştırıcısı olmalarıdır. Karotenoidler klorofilden sonra doğada en yaygın olarak bulunan renk pigmenti olup doğada yaklaşık 100.000.000 kadar farklı tonu bulunmaktadır. Karotenoidler, hücre içinde kromoplastlarda bulunur ve bitkilerdeki görevi ışığı absorbe etmektir. Karotenoidler bitkiler, fotosentetik bakteriler, algler ve çeşitli mantar türleri tarafından sentezlenir (Frank, 1996). Lipokrom olarak da adlandırılan karotenoidler oksijen ve ışık olmaksızın yüksek sıcaklıklarda dayanıklıdırlar. Özellikle gıda sektöründe katkı maddesi olarak kullanımı yaygındır (Breithaupt, 2004).

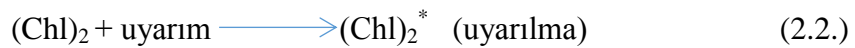
Yüksek bikilerdeki fotosentetik merkez tek-merkezli bakteri sistemlerinden çok daha karmaşıktır. Tüm ökaryotik fotosentetik organizmaların tilakoid zarlarında iki farklı fotosistem ve iki farklı fotokimyasal tepkime merkezi bulunmaktadır. Bunlar fotosistem I ve fotosistem II olarak adlandırılır. Fotosistem I yapısal ve işlevsel olarak ferrodoksin tipi sistemlerdir. Tepkime merkezi P700, klorofil a oranı klorofil b'ye oranla yüksektir. Fotosistem II feofitin-kinon tipi sistem olup P680 tepkime merkezine sahip ve eşit oranda a, b klorofili içermektedir.

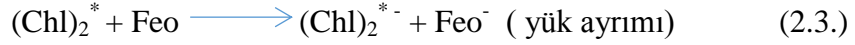
FS II ve FS I reaksiyon merkezlerinde bulunan klorofiller farklı dalga boyunda ışığı absorbe ederler. Reaksiyon merkezindeki klorofil elektron kaybettikten sonra ve tekrar indirgenmeden önce geçici olarak oksitlenmiş durumdadır. Bu durum söz konusu iken klorofilin karakteristik özelliği olan kırmızı bölgedeki spektrumun ışık absorpsiyonu azalır veya etkisini tamamen kaybeder. Absorpsiyon ölçümleri kullanılarak klorofilin redox durumundaki değişim incelenmiş ve FS I in reaksiyon merkezinin maximum 700nm de absorbe

ettiği bulunmuştur (Bonner ve Varner, 2012). Bu durumu karşılık olarak FS II nin de maksimum absorbansı 680nm olarak belirlenmiştir. Reaksiyon merkezindeki klorofiller oksitlenmiş halde iken eşleşmemiş elektron barındırır. Eşleşmemiş elektronların spektroskopik olarak belirlenmesinde Elektron Spin Rezonans (ESR) kullanılır. ESR çalışmaları fotosentezin döngüsel elektron aktarımı hakkında ve elektron taşıyıcı moleküllerin belirlenmesinde önemli yere sahiptir (Lendzian, 2003; Deligiannakis, 1994)

Louis Duysens fotosentetik bakterilerde yaptığı çalışmada fotosentetik zarların belirli dalga boyunda uyarılmasında, ışığın aynı dalga boyundaki absorblamada azalma-renksizleşme olduğunu belirlemiştir. İlerleyen zamanlarda Bessel Kok ve Horst Witt tarafından 680 ve 700 nm de bitki kloroplastlarında da benzer sonuçlar gözlemiştir. Söz konusu renksizleşme P870, P680, P700 dalgaboylarında fotokimyasal tepkime merkezindeki elektron kaybı nedeniyle gerçekleşmektedir (Knox, 1994). Fotosentetik bakteriler iki tepkime merkezinden birini içerirken siyanobakteriler ve yüksek bitkiler birbirini tamamlayan tarzda iki sistemi de barındırır (Abrol, 2012).

- ❖ Tip I Tepkime Merkezi (Fe-S Tepkime Merkezi) :Yeşil sülfür bakterilerinde uyarım tepkime merkezinden bir elektronun sitokrom bc₁ kompleksine geçirilmesi ile başlar. Elektron akışı ATP sentezi için gerekli proton tansferini sağlar. Elektronların NAD⁺'yi indirgemesi , H₂S'in H₂SO₄⁻²'e yükseltgemesiyle yer değiştirir. Aynı metabolizma H₂O oksidasyonunun kimyasal olarak benzeridir.
- ❖ Tip II Tepkime Merkezi (Feofitin-Kinon Tepkime Merkezi) : Mor bakterilerde görülen bu sistem üç temel kısım içerir. Bunlar bir tepkime merkezi, sitokrom bc₁ ve ATP sentazdır. Bir çift bakterioklorofil (Chl)₂ tepkime merkezindeki fotokimyasal olayların başlangıcıdır. Anten klorofiller tarafından algılanan uyarı birbiri üzerine binmiş bu iki klorofil molekülünden birinin elektronunu diğer klorofil üzerinden feofitine geçirerek, pozitif ve negatif yüklü iki radikal oluşturur (Denklem 2.2, Denklem 2.3).





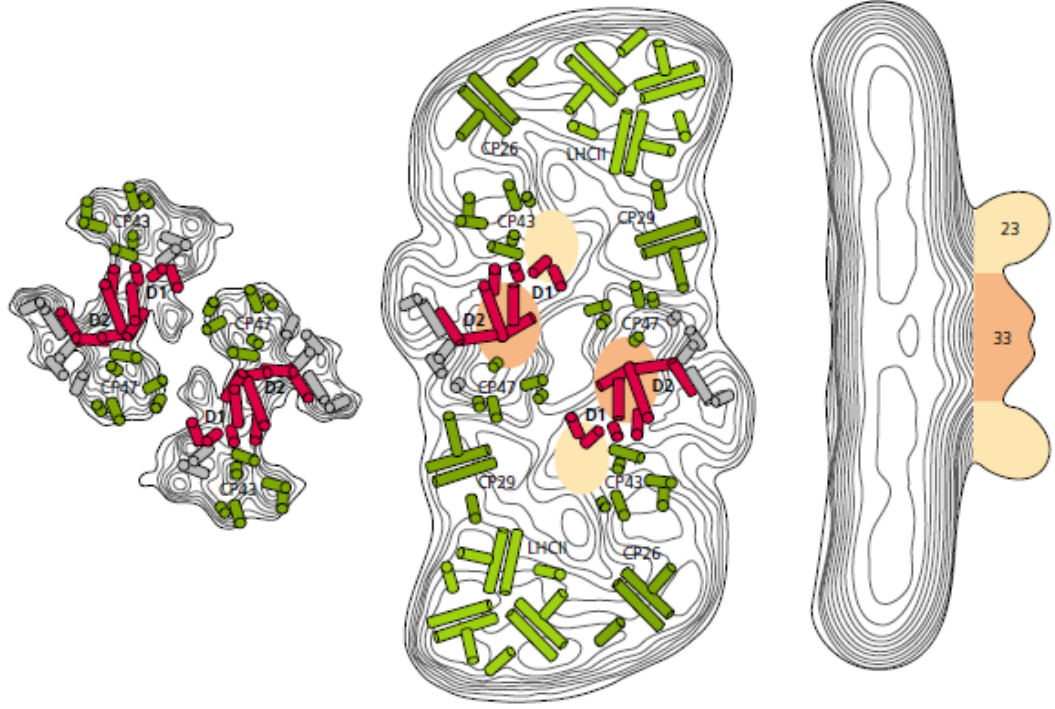
Tepkimenin devamında feofitin radikali, feofitine ve tam indirgenmiş kinon molekülünü ($\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$) oluşur. $\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$ lipit fazdaki bc_1 kompleksine ulaşarak proton hareket gücünü sağmada görev alır. Elektronlar bc_1 kompleksinden P870'e geçerken c-tipi sitokrom c_2 formunu alır. Böylece döngü tamamlanır ve anten klorofil bir diğer uyarıya elverişli durumu alır.

FS I ve FS II sistemleri Z şeması ile birbirini tamamlayan reaksiyonlar bütünü oluşturur. FS II ışıkla uyarıldıktan sonra yapısındaki elektronu feofitine aktarır. Öncelikle Q_A ve Q_B olarak adlandırılan plastokinonlara transfer edilen elektron plastosiyonine elektronu aktararak FS I'i uyarır. Stromada bulunan ferrodoksin (Fd) ve flavoprotein ferrodoksin NADP redüktaz (FNR), FS I yardımıyla NADP^{+} 'yi NADPH 'ye indirgenir.

FS II' de su toplayıcı komplekte yer alan mangan molekülü süperoksitdismutazın bir bileşeni olup metabolik faaliyette önemli yere sahip enzimlerde etkindir (Marshner, 1995).

2.1.1. FS II Reaksiyon Merkez Yapısı

FS II reaksiyon merkezi birden fazla alt birime sahip pigment protein kompleksini içeren kompleks bir sistemdir (Barber, 1999; Bohnert, 2012). FS II'nin reaksiyon merkezinin anlaşılmasında bakteriyel sistemler çok etkili olmuştur (Hou ve Mauzerall, 2011). Reaksiyon merkezi D_1 ve D_2 olmak üzere iki zar proteinine sahiptir (Zouni, 2001). Birincil elektron verici klorofiller (P680), diğer klorofiller, karotenoidler, sitokrom b559, feofitinler ve plastokinonlar zar proteinlerine bağlanmış konumda yer alırlar (Şekil 2.4).



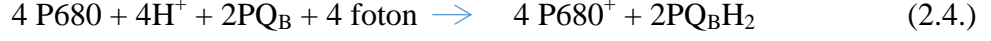
Şekil 2.4. Yüksek bitkilerde FS II yapısında yer alan dimerik proteinlerin elektron mikroskopunda incelenmiş yapısı (Barber, 1999; Taiz ve Zeiger, 2006)

Sitokrom b559, fotosistem II reaksiyon merkezi kompleksinin bir heme proteindir (Stewart ve Brudvig 1998). Birincil yük ayırma yeteneğine sahip olan ve minimum düzeyde izole edilen reaksiyon merkezi kompleksinin bir parçası olan sitokrom b559 α (9 kDa) ve β (4.5 kDa) alt birimlere sahiptir. Yapılan çok sayıda çalışmaya karşın tam işlevi hala belirsiz olsa da FS II'yi fotoinhibisyon karşısında koruma (Heber ve Boardman, 1979; Thompson ve Brudvig, 1988), elektron transfer reaksiyonlarına (Knaff ve Arnon, 1969; Cox ve Bendall, 1972) ve su-ayırma sisteminde (Cramer, 1986; Purchase, 2015) katılım ile bir dizi farklı redoks formları olduğu bilinmektedir.

Bir çift elektron ile redüklenen plastokinon güçlü bir elektron verici olup uyarılan elektron çiftini tilakoid membran çiftine gömülü olan b6-f kompleksine aktarır. Feofitinler magnezyum içermeyen klorofil a ve b olarak tanımlanır. Feofitinlerin enzimatik parçalanması halinde feoforbite-a ile feoforbite-b oluşmaktadır.

Fotosistem II kompleksinde (Şekil 2. 6) P680'nin uyarılması ile P680* oluşur. P680*'nin yüksek kapasiteli elektron verme eğilimi elektronu feofitine

aktararak negatif yükler (Feo^-) P680^* 'daki elektron kaybı radikal bir katyon oluşumuna neden olur. Feo^- fazla gelen elektronları plastokinon (PQ_A)'ya, devamında elektronu (PQ_B)'a aktarır. Böylece PQ_B , PQ_A 'dan gelen iki elektron ve sudan gelen iki proton ile indirgenmiş kinol bileşiğine dönüşür (Denklem 2.4.).



Fotosistem II'nin muazzam yapısı ve işleyişi evrendeki en önemli biyoenerjetik sistem olan fotosentezin yapı taşlarından birini oluşturur. Eski tarihlerden başlayarak günümüze kadar uzanan FS II'nin kinetik ve yapısal analiz çalışmaları mevcuttur (Babcock, 1976; Schlodder, 2015).

2.1.2. Biyoenerjetikler

Enerji çevriminin kimyasal mekanizması geçmişten günümüze bir çok bilimsel çalışmanın odak noktası olmuştur. Antonio Lavouisier solunum olarak tanımlanan, bazı türlerin kimyasal yakıtları ısıya dönüştürdükleri olayın yaşamın temel yapısını oluşturduğunu savunmuştur (Weiss).

Biyoenerjetikler biyolojik sistemlerin enerji formlarını termodinamik yasalar doğrultusunda incelendiği sistemlerdir. Biyoenerjetikler başlangıç ve sonuç enerji durumlarıyla ilgilidirler, mekanizma ve hız ile ilgilenmezler. Biyolojik sistemler izotermal yapıdadır. Hücreler tarafından mutlak kullanılan enerji Gibbs serbest enerjisidir.

Biyoenerjetik = Biyokimyasal termodinamik

Kimyasal enerji değişimlerini tanımlayan üç nicel ölçüt vardır. Bunlardan ilki Gibbs serbest enerjisi (G) sabit basınç ve sıcaklıktaki bir tepkime sırasında enerji miktarını tanımlar. Bu enerji türü kimyasal tepkimelerin denge durumunu, sabit sıcaklık ve basınçtaki teorik iş miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. İkincisi entalpi (H), tepkime sistemindeki ısıyı kapsar. Entalpi tepkimeye giren bileşiklerin ve ürünlerin kimyasal bağ çeşidine ve sayısına bağlı olarak pozitif ve negatif değer almaktadır. Son nicel ölçüt olan entropi (S) ise sistemdeki düzensizliği tanımlar. Biyolojik sistem şartlarında serbest enerji, entalpi ve entropi değişimi aşağıdaki denklem ile ilişkilendirilir (Denklem 2.5).

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2.5.)$$

Biyokimyasal şartlar altında ürünlerin serbest enerji içerikleri ile girenlerin serbest enerji içerikleri arasındaki fark negatif ise kendiliğinden gerçekleşmekte pozitif ise dışarıdan enerji alması gerekmektedir.

Hücrelerde metabolik iş yapmanın gerçek değeri ATP hidrolizidir. ATP, ADP ve P_i derişimleri hücrelerde farklılık gösterdiği için ATP hidroliz serbest enerji düzeyleri değişkendir. Ancak tüm tepken ve ürünlerin derişimleri ile etkili olan diğer faktörler biliniirse serbest enerji değişikliği hesaplanabilir.

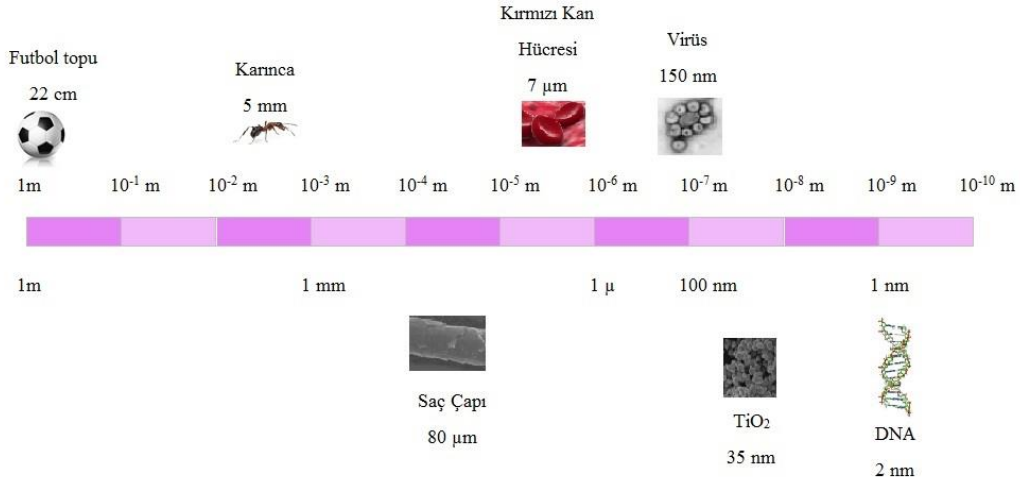
Biyoeenerjetikler metabolizma ile bir bütün halinde incelenen glikoliz, sitrik asit döngüsü, amino asit oksidasyonu, karbondiratlarn biyosentezi, oksidatif fosforilasyon ve fotofosforilasyon gibi bir çok alt başlığın içinde yer alan geniş bir kavramdır. Bu tez çalışmasında bir biyoeenerjetik sistem olan fotosistem II üzerinde çalışılmıştır.

2.2. Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi

Nano kelimesi, Yunanca ve Latince'den gelmekte olup cüce anlamı taşımaktadır. Nanometre 'milyarda bir' ölçüsünün kısaltması olarak tanımlanmaktadır (Tevfik, 2005).

Nanobilim ve nanoteknolojinin genel bir tanımı yapılması gerekirse; 100 nanometreden küçük boyuttaki maddelerin atomik boyutlarının incelenmesi, karakterize edilmesi ve işlevsel hale getirilmesi olarak tanımlanan kapsamlı bir terimdir (Bergeson, 2004). Nanoteknolojinin hedefi yeni özellikler ve işlevlere sahip malzemeler ve sistemler üreterek maddenin nano ölçekte işlenmesi ve üretilmesidir (Wiesner, 2007).

Makro boyuttaki bir malzemenin nanoboyuttaki özellikleri incelendiğinde birçok özelliğinde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Nanoboyutu somut olarak canlandırmak gerekirse on tane yanyana konulmuş hidrojen atomu bir nanometre, DNA molekülleri yaklaşık olarak 2 nm, virüs 150 nm, biyolojik hücrelerin çapı ise bin nanometredir (Erkoç, 2012). Nanoboyutların kıyaslanması Şekil 2.5 de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Nanoteknolojik Boyutlar

Nanoteknoloji tarihsel olarak incelemeye başlandığında ilk akla gelen isim ünlü fizikçi Richard Feynman'dır. 29 Aralık 1959 tarihinde Amerikan Fizik Topluluğu'nun Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü 'ndeki konferansta "Aşağıda daha çok yer var" başlıklı konuşmasında atom ve molekül büyüklüğündeki materyallerle yeni keşiflerin yapılabileceğine değinmiştir. Nanoboyuttaki malzemelerin üretim ve karakterizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi nanoteknoloji ve nanobilime milat olarak kabul edilmiştir. Feynman nanoteknoloji kelimesini kullanmasa da ilerleyen zamanlarda bundan bahsettiği anlaşılmıştır. Japon araştırmacı Norio Tanuguchi'nin "Temel Nanoteknoloji Konseptleri" isimli makalesinde ilk kez nanoteknoloji kelimesi geçmiştir.

İlk moleküler elektronik patent 1974 yılında Aviram ve Seiden tarafından alınmıştır (Forrest, 2001). ve 1993'de ilk nanoteknoloji laboratuvarı Rice Üniversitesinde kurulmuştur.

Nanoteknoloji tüm sektörlere entegre edilecek kullanım alanı geniş bir bilim dalıdır. Başta teknolojik cihazlar olmak üzere sağlık, tekstil, iletişim, gıda, savunma sanayisi olmak üzere çok çeşitli kullanım alanları mevcuttur (Ramsden, 2013). Nanoteknoloji yeni uygulamaları ile uzun raf ömrüne sahip, dayanıklı,

hafif ve miyatürleşebilecek ürün olanağı sağlaması endüstriyel boyutta ürünler için önemli bir yere sahiptir (Özkan, 2006).

Nanopartiküllerin üstünlükleri kuantum boyut etkinliği, yüzey atomlarının benzersiz bağımlılığı, yüzey/hacim oranı bunlardan birkaçıdır (Hartland, 2006). Nanopartiküller yapılarındaki olağanüstü özellikler sayesinde katalizör (Cuenya,2010), gıda ve tarım sektöründe (Handford, 2015), ilaç taşıyıcı sistemler (Safari ve Zarnegar, 2014) gibi biyoteknolojik uygulamaları vardır.

2.2.1. Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Nanoboyut herhangi bir uzaysal boyutu 0.1 ile 1000 nm arasındaki parçacıkları tanımlar. Nanopartikül üretim yöntemleri yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı olmak üzere iki farklı yaklaşıma sahiptir. Yukarıdan aşağıya yaklaşım mekaniksel malzeme üzerine mekaniksel ve kimyasal baskı yapılarak nanoboyut kazandırılmasıdır. Bu yaklaşım öğütme, mekanokimyasal ve mekanik aşındırma yöntemlerini içermektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda, atom yada moleküllerin büyütülerek nanoboyutta malzemeler elde edilmesidir (Narayanan, 2010).

Nanopartikülleri başlangıç fazlarına ve hazırlanma metodlarına göre sınıflandırılması Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Nanopartiküllerin başlangıç fazlarına göre sentez yöntemleri

Başlangıç Fazı	Üretim Tekniği
Gaz	Asal Gaz Yoğunlaştırma
	Fiziksel Faz Biriktirme
	Kimyasal Buhar Biriktirme
Sıvı	Alev Sentezi
	Hızlı Katılaştırma
	Sol-Jel
	Elektrodepolama
Katı	Mikroemülsiyon Polimerizasyon
	Püskürtmeli Dönüşüm Prosesi
	Manyetik Aşındırma
	Devitrifikasyon

Bu tezin içeriğinde sentezlenen biyonomalzemeler, R. Say ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş “Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlanma ve ANADOLUCA yöntemi” ile sentezlenmiştir.

2.3. Rutenyum Tabanlı Amino Asit Monomeriyle Fotosensitif Çapraz Bağlama Ve Anadoluca Yöntemi

ANADOLUCA yöntemi (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach), rutenyum tabanlı, fotosensitif (ışığa duyarlı), amino asit monomer ve oligomerlerinin sentezleri, proteinlerin konjugasyonu ve çapraz bağlanması işlemlerini kapsamaktadır (ABD Patent No. WO/2011/070402 , 2011).

ANADOLUCA, tasarlanması ve hazırlanma metodu ile silika materyallerine, süperparamanyetik partiküllere, nanokristallere, kuantum noktalara, karbon nanopartiküllere, Ag/Au nanopartiküllere ve Au yüzeyine, polimerik malzemelerde kolayca kullanım olanağı sağlar. Yöntem, protein konformasyonu ve işlevselliğine zarar vermeden sistein, triptofan, tirozin amino

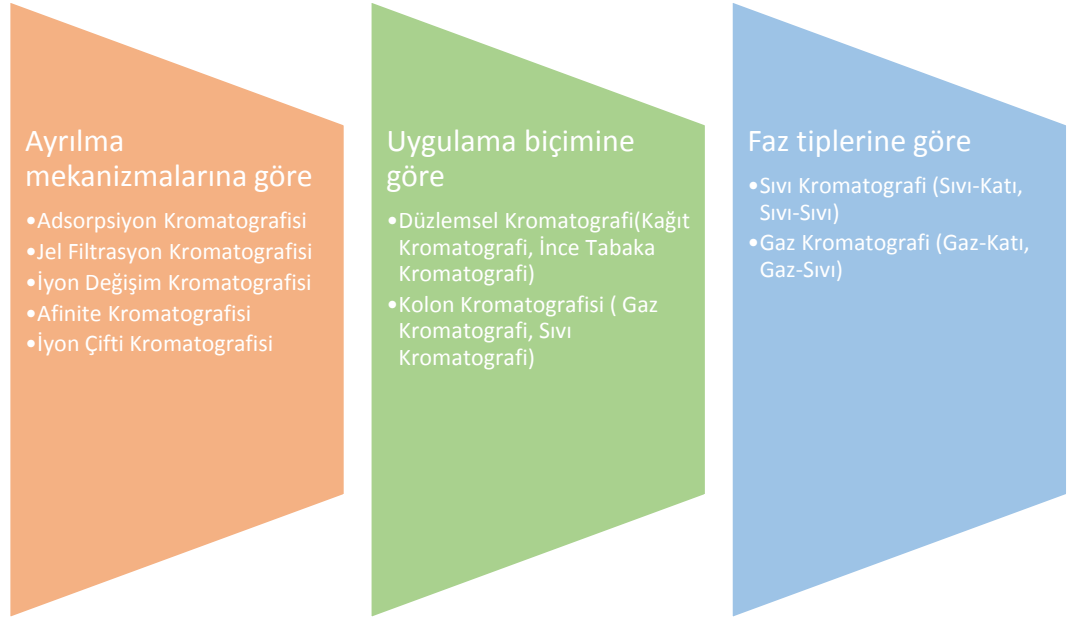
asitlerine rutenyum tabanlı monomerler tarafından çapraz bağlı konjugasyon yapılarak gerçekleştirilmektedir. Sentezlenen fotosensitif monomerler çeşitli nano ve mikro yapılarda kullanılarak denatürasyon olmaksızın çalışılmaya imkan sağlamaktadır.

ANADOLUCA, tekrar kullanılabilir, nanoprotein içerikli “Say (2011)”, biyosensör ve biyokataliz uygulamaları bulunan nanobiyokonjugatların sentezlendiği (Say 2014) bir yöntemdir. Yöntem biyouyumlu, sıcaklık ve pH’dan bağımsız nanobiyokonjugatların sentezine imkan sağlamakla beraber tayin ve teşhis amaçlı sistemlerde kullanılabilirliği nedeniyle avantajlıdır.

Diğer taraftan bu tez kapsamında bir ilk olarak kompleks sistemden (FS II) biyonanopartikül formatında üretimi, ANADOLUCA ile gerçekleştirilmiştir.

2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi moleküllerin birbiri ile karışmayan sabit ve hareketli faz arasındaki etkileşimlere dayanarak ayrılması prensibiyle çalışan ayırma ve saflaştırma yöntemidir. İlk kez botanik alanında bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanılmış ve kromatografi ismini almıştır. Kromatografi kendi içerisinde ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Kromatografik yöntemlerde türler kolonda dağılma sabiti (K_D) değerine göre farklı hızlarda kolonu terk eder. Kolondan çıkan tür dedektör yardımıyla sinyale dönüştürülür ve hareketli faz yada zamana bağlı olarak kromatogram elde edilir. Kolonda ilerleyen bileşenlerin göç hızları alıkonma faktörü, kapasite faktörü ve kolon uzunluğuna bağlıdır. Kolon uzunluğu aşağıdaki aşağıdaki formüle göre hesaplanır (Denklem 2.6).

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.6.)$$

Alıkonma faktörünün (Denklem 2.7) küçük olması elüsyonun hızlı olduğunu yavaş olması ise çok yavaş olduğunu belirticidir. İdeal bir ayırım için alıkonma faktörünün en düşük 2 en yüksek 10 olması istenir.

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o} \quad (2.7.)$$

Kolondaki türlerin göç hızlarının diğer bir ifadesi olan seçicilik faktörü, alıkonma faktörlerinin oranı ile bulunur (Denklem 2.8).

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_o}{t_{r1} - t_o} \quad (2.8.)$$

Bir kromatogramın verimliliğinin göstergesi piklerin birbirinden ayrı ve keskin olmasıdır. Türler için bantlarda genişleme gözlenmesi difüzyon ve fazlar

arası kütle aktarımı gibi nedenlerden kaynaklıdır. Belirli parametrelerin değiştirilmesi ile bahsi geçen genişleme giderilebilir. Kolon verimliliğinin nicel ölçüsü kuramsal tabaka sayısıdır (Denklemler 2.9).

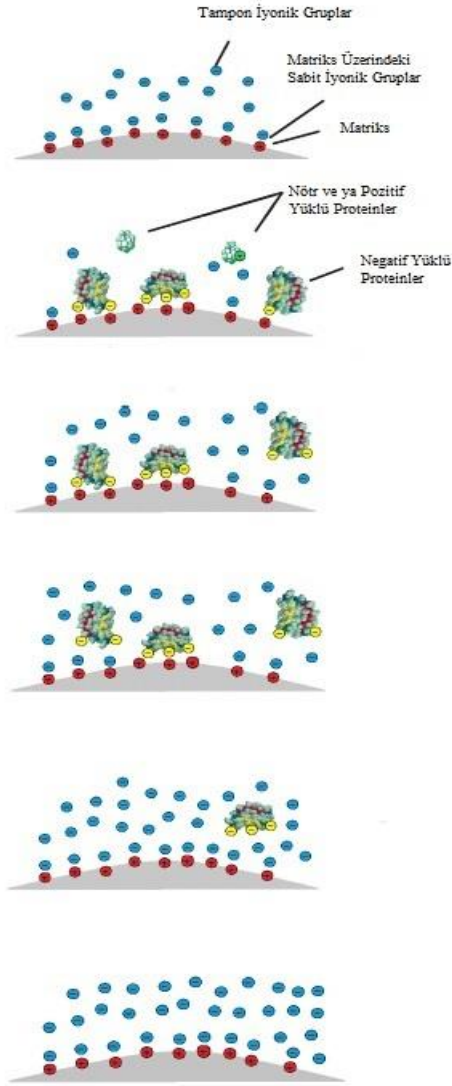
$$N = 16x \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (2.9)$$

Bir numunede bulunan türlerin birbirinden ayrılmasının nicel ölçütü rezolüsyon (R_s) değeridir. Bir kromatografik yöntemde yüksek verimlilik ve seçicilikte ayırım yapılabilmesi için R_s , N , α ve k' değerlerinin büyük olması istenir.

2.4.1. İyon Kromatografisi

İyon değişim benzer türdeki iyonların yer değiştirilmesidir. İyon değişiminin yer aldığı kromatografik yöntemde iyon kromatografisi denir. İyon kromatografisi katyonların ve anyonların ayrılması ve kantitatif olarak belirlenmesinde klasik yöntemlerden daha avantajlıdır. Klasik yöntemlerde her bir iyon türü için farklı analitik yöntemlere ihtiyaç vardır. Ancak iyon kromatografisinde, klasik yöntemlerde karşılaşılan matriks sorunları, düşük derişimlerde (ppb) negatif sonuç alınması, spesifik analitik yöntemlere ihtiyaç duyulması gibi sorunlar ortadan kaldırılmaktadır (Gjerde ve Fritz, 1987).

İyon kromatografisi sıvı kromatografisinin alt birimlerinden birisidir. İyon kromatografisinde kolon içerisine yerleştirilen malzemeye sabit faz, kolondan sürekli geçirilen sıvıya hareketli faz denir. Yöntemde genel olarak sıvı örneklerle çalışılır, katı örnekler için ise çözme, süzme gibi ön işlemler uygulanarak sulu çözeltisi oluşturulup analiz gerçekleştirilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İyon kromatografisi anyon değişirici kolon etkileşim mekanizması (Cummins, 2011)



Small ve arkadaşları 1975 yılında iyon kromatografisinde yöntem geliştirerek modern hale getirmiştir. Anyon ve katyonların belirlenmesinde cihaza iletkenlik dedektörü bağlamış ve eluentten gelecek sinyalleri önlemek için suppressor kolon geliştirmişlerdir. Suppressor analit iyonlar değişmeden kalırken diğer iyonik türlerin moleküler türlere dönüşünün yapıldığı kolon tipidir.

İyon kromatografisinin en yaygın kullanımı atık sulardaki kirliliğin giderilmesi olmakla beraber adli tıp, gıda analizleri, endüstriyel alanda kalite kontrol çalışmaları, iyonik safsızlıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca biyoteknoloji alanında enzim, amino asit, nükleik asitlerin saflaştırılması gibi kullanım alanlarına sahiptir. (Statler 1997; Smith ve Chang 1991; Scopes, 1981)

Kullanılacak kromatografik yöntem ayırma yada saflaştırma amacına bağlı olarak seçilir. Uygun sabit faz seçiminden sonra kolona dengeleme işlemi uygulanır. Dengeleme işlemi uygun tampon çözeltilerin kolondan belirli akış hızında geçirilmesidir. İlgili numunenin enjeksiyonundan sonra kolonda etkileşim başlar. İyon türlerine bağlı olarak ayırım ve saflaştırılma gerçekleşir.

İyon kromatografisinde sabit faz olarak kullanılan malzemeler sentetik organik polimer, silika ve hidröz oksitler olarak üçe ayrılır. Silika-bazlı iyon değiştiriciler polistiren, silikon veya florokarbon gibi polimerik yapıli silikalardır.

İyon kromatografisinde sabit faz olarak kullanılan polimerik desteklere reçine denir. Reçineler uygun polimerin sentezlenmesinin ardından sentetik organik polimerlerin kimyasal türevlendirilmesi ile elde edilir.

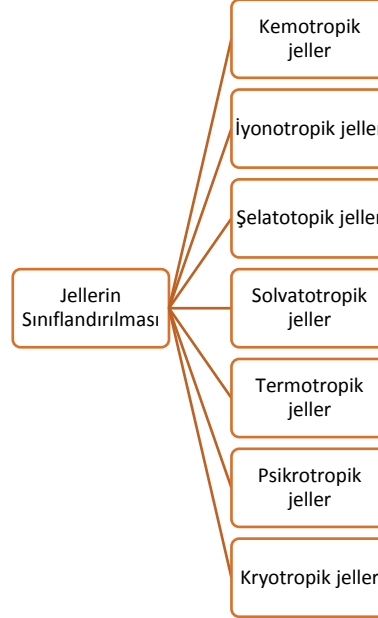
İyon değişim reçineleri stiren, divinilbenzen yada oluşturduğu kopolimerler, akrilik veya metakrilik kapolimerlerinden oluşmaktadır. Bir diğer sabit faz türü ise alümina silikatlarıdır. Alümina, silika veya zirkonyum gibi mineraller ve metal oksitler iyon değişici özellik gösterirler (Shulamit 2002).

Sistemdeki hareketli faz türleri non-suppressed ve suppressed iyon değişim kromatografisi için birbirinden farklıdır.

Non-suppressed iyon değişim kromatografisinde anyonlar için kullanılan eluentler; aromatik karboksilik asitler ve tuzları, alifatik karboksilik asitler, aromatik ve alifatik sülfonik asitler, potasyum hidrokist borat kompleksleri, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve inorganik tuzlar katyonlar için organik bazlar ve inorganik asitlerdir. Suppressed iyon değişim kromatografisinde ise zayıf asitlerin sodyum tuzları (karbonat borat), klor, nitrat iyonları içeren çözeltiler kullanılabilir.

2.5. Kriyojeller

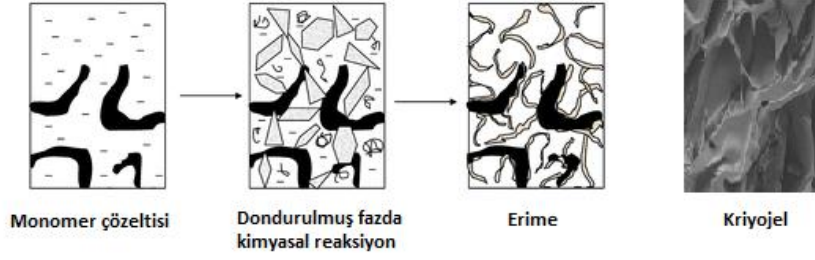
Jel makromoleküllerin üç boyutlu yapıda kimyasal bağlarla polimer gömülü çözücü sistemlerdir. Polimerleşme koşullarına ve yapısal farklılıklarına göre jeller yedi şekilde sınıflandırılır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Jellerin sınıflandırılması

Kriyojeller polimerik yapıda malzemeler olup uygun başlatıcı ve monomerler eşliğinde çözeltinin dondurulması ile elde edilen geniş gözenekli jel matrislerdir. Kriyojellerin en önemli özelliği süpermakrogözenek yapısına sahip olmalarıdır. Bu özellik nano ve mikro boyutlarda difüzyon sorununu ortadan kaldırır. Kriyojellerin gözenek yapıları ve süngerimsi özelliği biyomalzemelerle çalışma olanağı sunmaktadır. Örneğin kromatografik çalışmalarda kolon malzemesi olarak kriyojellerin avantajı elastik yapısı sayesinde sistemde oluşacak geri basıncı önleyerek biyoteknolojik alanda kullanıma olanak sağlar. Kriyojellerin bu alandaki kullanımına bakıldığında protein (Daoud-Attieh, 2013), nükleik asit (Çimen, 2015) ve enzimlerin saflaştırılmasında (Keçili, 2006) kullanılmıştır.

Kriyojellerin sentezlenme süreci kriyojelasyon olarak adlandırılan üç ana basamakta incelenebilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Kriyojelasyon (Plieva, 2008)

Kriyojelasyon dondurma ve eritme süreciyle aşamalı olarak gerçekleşen işlemlerdir. Jel çözeltisi kullanılan çözücünün kristallenme noktasının altındaki sıcaklıklarda dondurulur. Kriyojelasyonda en önemli faktör sıcaklığın kademeli olarak düşürülmesidir. Elde edilen donmuş sistem heterojendir ve sıvı mikro faz içerir. Çözücünün donması sonucu jel oluşturacak ajanlar sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır, bu işleme kriyoderiştirme denir. Jel haline gelecek karışımın sıvı mikrofazda yoğunlaşması jelleşmeyi hızlandırır. Çözücünün donmuş kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev alır. Eritme işlemi tamamlandığında çözücü ile dolu boşluklar ve makro gözenekler oluşur. Çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey gerilimi gözenek yüzeyinin pürüzsüz, gözenek yapısının ise yuvarlaklaşmasını sağlar.

Kriyojellerin fiziksel özellikleri sıcaklık, çapraz bağlayıcı ve monomer miktarına bağlı olarak farklılık gösterir. Düşük sıcaklıklara inildikçe küçük kristal oluşumunun farklı yerlerden başlaması gözenek boyutunu azaltır ve yoğun gözenek yapısı oluşur. Yüksek sıcaklıklarda ise büyük gözenek yapısı oluşurken, çözeltinin donmama riski söz konusudur. Bir başka etken olan çapraz bağlayıcı oranı ise kriyojelin suda şişme oranı ile ters orantılıdır. Monomer derişimi yüksek ise kırılğan ve yoğun matris yapısı gözlenir. Kriyojeller kullanım alanlarına göre kolon yada disk yapısında sentezlenebilir.

2.6. Kaynak Seçimi ve FS II Safılaştırma Uygulamaları

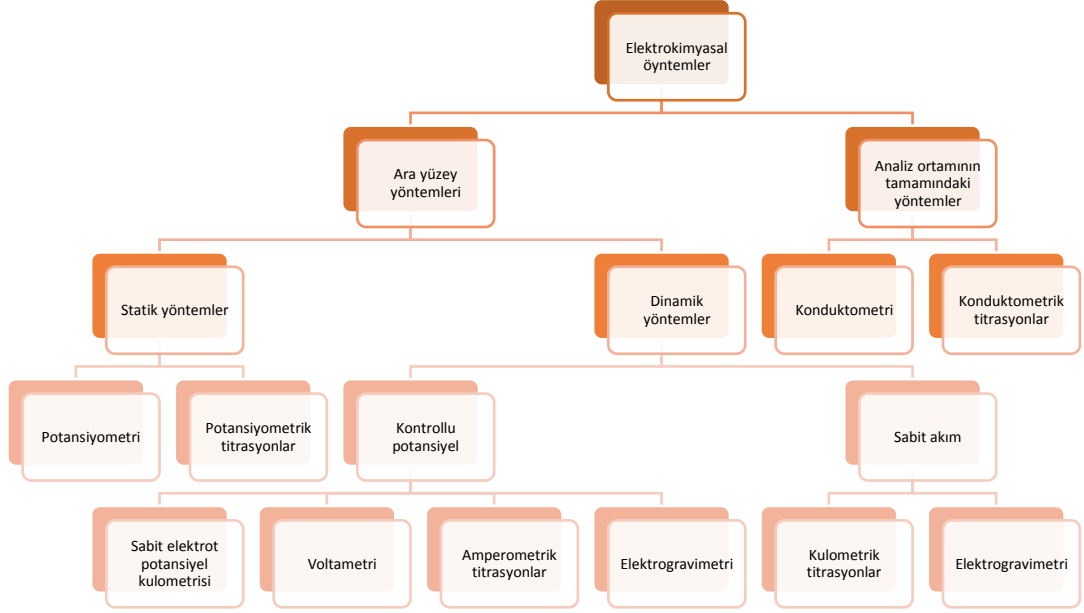
FS II sisteminin izole edileceği kaynağın ucuz ve kolay yollarla temin edilebilmesi ve bol miktarda bulundurması oldukça önemlidir. Buna ek olarak çevreye zarar vermemesi, izolasyon koşullarına dayanıklı olması etken faktörlerdendir. İzole edilecek maddeye göre kaynak seçimi farklılık göstermektedir. FS II izolasyonunda mikroorganizmal olarak mavi yeşil-algler kullanılacağı gibi yeşil bitkilerin tamamı bu koşullara elverişlidir (Kuhl, 2000).

2.7. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, kimyasal tepkimelerdeki indirgenme ve yükseltgenme (redox) olaylarını inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimyasal yöntemlerin kullanım alanları reaksiyon hız ve denge sabitlerinin incelenmesi, piller, redox titrasyonları, eser miktarda analizler, yükseltgenme ve indirgenme basamaklarının incelenmesi şeklinde sıralanabilir. Elektrokimyasal işlemler elektrolit, ölçüm devresi ve elektrottan oluşan üç ana bölüme sahip hücrelerde gerçekleştirilir.

- ❖ Elektrolit su veya organik çözücülerde iyonlaşarak elektriğin iletimini sağlayan bileşenlerdir. Organik veya sulu fazda %100 iyonlaşan elektrolitlere kuvvetli elektrolit, kısmen iyonlaşanlar ise zayıf elektrolit olarak ayrılır. Organik çözücülerde elektrolit olarak tersiyer amonyum tuzları kullanılırken sulu ortamda HCl, KCl, NaOH vb. elektrolitler kullanılır.
- ❖ Ölçüm devresi, elektrokimyasal ölçümlerin yapıldığı cihazdır. Akım kaynağı olarak potansiyostat, gerilim kaynağı olarak galvanostat, iletkenlik kaynağı olarak kondüktometre kullanılır.
- ❖ Elektrotlar, indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinde kullanılan elektriksel iletkenliğe sahip malzemelerdir. Kullanım amaçlarına göre ölçüm, referans ve karşıt olmak üzere üçe ayrılır.

Elektrokimyasal hücrelerde akım farklılığına göre de sınıflandırılır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması

Tez çalışmasının son aşamasında sentezlenen biyonanoenerjetiklerin biyobellek özelliği dönüşümlü voltametri ve kronoamperonetric yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

2.7.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri tekniği elektrokimyasal teknikler arasında en yaygın kullanıma sahip üç elektrotlu bir sistemdir. Potansiyel zamanla değiştirilerek tarama yapılır. Belirli potansiyel değerler arasında önce artan sonrasında azalan bir gerilim uygulanarak başlangıç potansiyeline dönülür. İleri ve geri yönde bir potansiyel tarama yapılmasında dolayı bu teknik dönüşümlü voltametri olarak adlandırılmıştır. Dönüşümlü voltametri maddenin yükseltgenme ve indirgenme özellikleri aynı voltamogramda incelenmesine imkan sağlar. İleri yöndeki gerilim taramasında indirgenme tepkimesi gerçekleşiyorsa, geri yönde yapılan taramada yükseltgenme ilgisi gözlenir. Dönüşümlü voltametride bir

tepkimenin tersinir, yarı tersinir veya tersinmez olduğu pik akım değerleri karşılaştırılarak anlaşılabilir. Randles-Sevcik eşitliği (Denklem 2.12) kullanılarak elektrotlara uygulanan farklı tarama hızlarının karekökü ölçülen pik akımlarına karşı grafiğe geçirilir.

$$\dot{I}_p = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \text{ (Randles-Sevcik Eşitliği)} \quad (2.12.)$$

\dot{I}_p : pik akımı (amper)

C : derişim (molcm^{-3})

A: elektrot alanı (cm^2)

D : difüzyon sabiti (cm^2s^{-1})

v : gerilim tarama hızı (Vs^{-1})

Eğer elde edilen grafik doğrusal ile tepkime tersinir, doğrusal değil ise tersinmezdir. Bu yöntem genellikle elektrokimyasal tepkimelerin mekanizmalarının belirlenmesinde kullanılır. Dönüşümlü voltametrinin uygulama alanlarından biri de çalışma elektrodu yüzeyinde madde birikiminin incelenmesidir. Elektrot yüzeyinde ince film oluşturulması ve elektrokimyasal özelliklerin incelenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir (Mohamed, 2015).

2.7.2. Kronoamperometri

Sabit bir gerilim değerinde akım ölçümüne dayanan yöntem amperometrik yöntemler denir. Yöntemde, duyarlılık uygulanacak gerilim değerine bağlıdır. Gerilim değeri ise maddenin polarogramının veya voltamogramının incelenmesi ile belirlenir. Belirlenen sabit bir gerilimde akımın zamanla ölçüldüğü bu yöntem kronoamperometri denir. Akım zaman ilişkisi Cottrell eşitliği (Denklem 2.13) ile incelenir ve grafiğe geçirilir (Şekil 2.11).

$$\dot{I}_{s,k} = (n F A C D^{1/2}) / (\pi^{1/2} t^{1/2}) \text{ (Cottrel Eşitliği)} \quad (2.13.)$$

$\dot{I}_{s,k}$: difüzyon akımı (mikroamper)

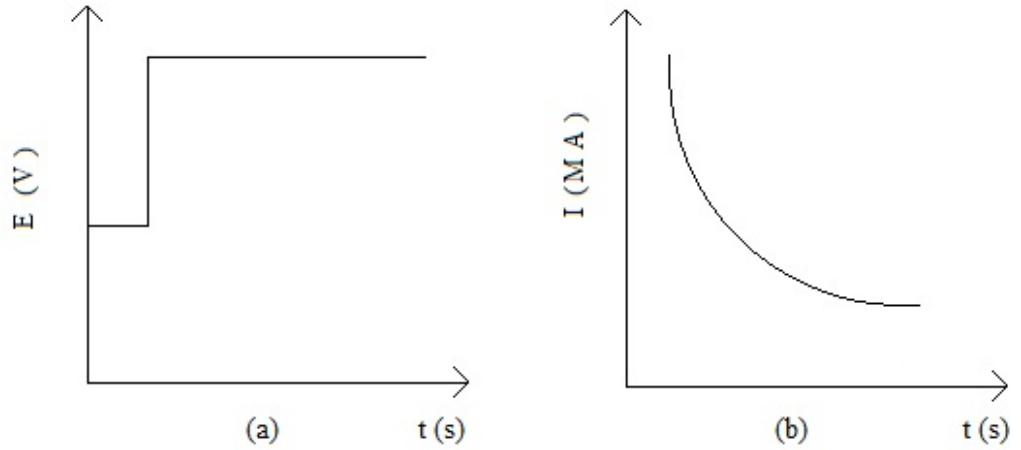
n: tepkimeden aktarılan elektron sayısı

F: faraday sabiti (96500 C)

A: elektrot alanı (cm^2)

C: derişim (cm^2s^{-1})

t: zaman (s)



Şekil 2.11. a)Uygulanan gerilim programı, b) Elde edilen zaman-akım eğrisi

2.8. Biyobellek Uygulamaları ve Elektrokimyasal Uygulamalar

Günümüzde biyomalzeme-kombine bellek çalışmaları, silikon tabanlı bellek cihazlarındaki fiziki ve teknik sınırlamalar nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir (Yuan, 2013). Biyomalzeme-kombine bellekler redox özellikleri ve elektron taşıma kapasiteleri nedeniyle tercih edilmektedirler. Elektrokimya kullanılarak biyobellek özellikleri rahatlıkla incelenebilmektedir (Min, 2010).

Biyo hafıza cihazları “yazma”, “okuma”, “silme” yeteneğine sahiptir. Bu basit prensipten esinlenerek, karmaşık bellek özelliklerine sahip protein tabanlı biyo hafıza cihazları geliştirilmiştir (Lee,2011; Choi, 2007). Ancak tasarımında ve işletiminde, protein yapıların kısa ömürle sonuçlanan, katı ara yüzeylerde denatürasyonu olmaktadır. Protein ve katı ara yüzey arasında doğrudan verimli bir elektron transferini sağlamak için, elektron bağlantı yaklaşımları genellikle protein oryantasyonunu kontrol etmek için kullanılır ve bu da karmaşık üretim süreçlerini içerir. Protein kullanılarak depolama ve bilginin çoklu durum okuması süreçleri geliştirilmektedir (Kim, 2009). Biyoenerjetiklerin rekombinant proteinler ve nano yapı kombinasyonları ile ilgili çalışmalarda mevcuttur (Yagati, 2013; Yagati, 2014).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada FS II izolasyonu için gerekli ıspanak Eskişehir'den temin edilmiştir. Enzim örneklerinin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan Bradford Belirteci Amresco'dan, Bovine Serum Albumin (BSA) Sigma' dan alınmıştır. Kriyojel kolon sentezleme işlemlerinde kullanılan N,N' Metilenbisakrilamid (MBA) Sigma Aldrich' den, Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros' dan, Amonyum persülfat (APS), Tetraetilmetilendiamin (TEMED) ve fenilalanin, Sigma' dan, jel elektroforezde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar' dan, Coomassie Blue Appli Chem' den, Akrilamid Merck' den temin edilmiştir. Hazırlanan tampon çözeltiler için Asetik asit (CH₃COOH) ve Sodyum hidroksit (NaOH), Metanol (CH₃OH), Etanol (C₂H₅OH), Sodyum fosfat monobasic, Potasyum fosfat dibasic Sigma' dan, Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) Panreac'dan Sodyum klorür (NaCl) Kimetsan'dan, Hidroklorik asit (HCl) Sigma-Aldrich' den alınarak kullanılmıştır. Nanomalzeme sentezi aşamasında kullanılan nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve polivinil alkol (PVA) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Saf su Thermo Scientific Barnstead™ Smart2Pure™ marka saf su cihazından elde edilen iletkenliği 18 megaohmcm⁻¹ olan saf su kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada sentezlenen ve katı destek materyali olarak kullanılan polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometresi, yüzey morfolojisinin incelenmesinde Zeiss Ultra Plus SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı kullanılmıştır. Polimerlerin yüzey alanının incelenmesinde ise Quantachrome Nova 2200E model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır. Çalışma sürecinde UV absorpsiyon ölçümleri için Shimadzu UV-3150 cihazından yararlanılmıştır. SDS PAGE analizi ise Thermo Scientific elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon ve analizler sırasında kullanılan tampon çözeltilerin pH' ları OHAUS Starter 3000 pH-metre ile ölçülmüştür. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunda Malvern

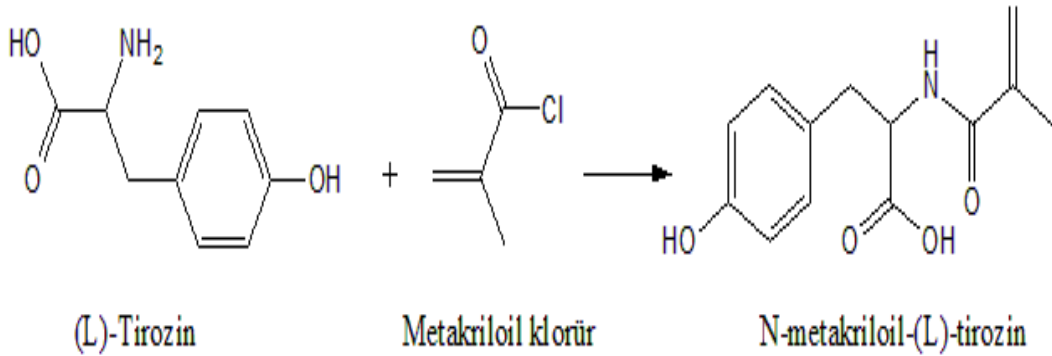
Insturement Nano ZS zetasizer cihazı kullanılmıştır. Döngüsel voltammetri (CV) ve kronoamperometri (CA) elektroanalitik uygulama çalışmalarında üç elektrot sistemli C3 standına sahip Gamry Referans 3000 elektrokimyasal analizör kullanılmıştır. BAS MF-2072 marka ve model çalışma elektrodu kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Kriyojel Temelli Ayırma Kolonlarının Hazırlanması

3.2.1.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin (MATyr) sentezi

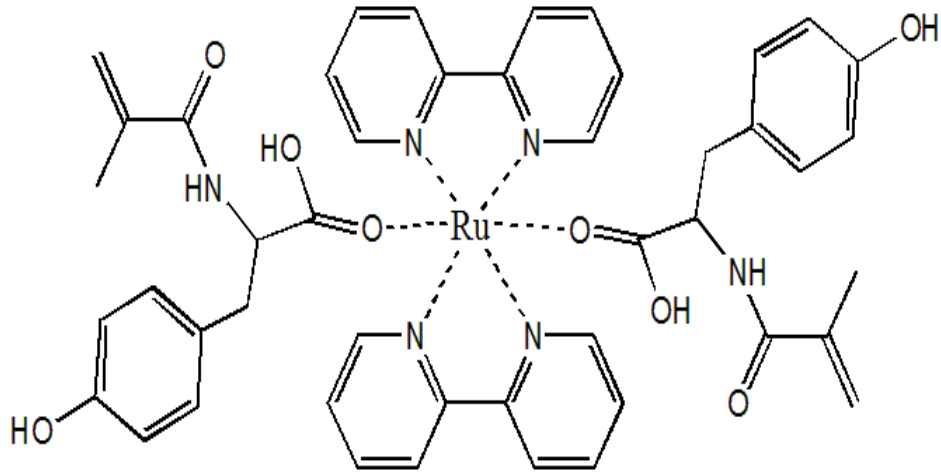
3-(4-hidroksifenil)-2-[(2-metakriloil) amino] propanoik asit (metakriloil amino tirozin, (MATyr)) sentezinde 0.5 g L-tirozin metilester ve 0.2 g hidrokinon, 100 ml diklorometan çözücüsü içerisinde çözülmüş, çözelti 0 °C a soğutulduktan sonra 12.7 g trietilamin çözeltiye ilave edilmiştir. Çözelti üzerine 5 ml metakriloil klorür yavaşça eklenmiştir ve azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda, hidrokinon ve reaksiyona girmeyen metakriloilin fazlası %10 luk NaOH çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Daha sonra su fazı rotary kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MATyr), eter-sikloheksan karışımı ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Sentez reaksiyonu Şekil 3.1’de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin sentezi

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

Rutenyum merkezli bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂ Rutenyum(II) aminoasit-monomerin (Şekil 3.3) sentezi için uygulanan yöntemde, 1g diklorobis(2-2'-bipiridil) rutenyum(II) (RuCl₂(bipy)₂) saf su içinde çözülmesinin ardından, çözelti 0 °C' a soğutulmuştur. Trietilamin ve 1g MATyr sulu çözeltisi yavaş yavaş RuCl₂(bipy)₂ çözeltisine eklenerek oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 80 °C' da 24 saat reflaks edilip, kompleks süzölmüştür. Kahverengi kompleks eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutma işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.2. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) molekül yapısı

3.2.1.3. FS II Nanopartikül Sentezi

FS II nanopartiküller literatürde yer alan R. SAY ve ark. yapmış oldukları polimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Sentezin ilk aşamasında saflaştırılan FS II ve fotoduyarlı rutenyum tabanlı aminoasit monomeri-NADH yapısının PVA ortamında 24 saat etkileşimi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan prosedürün devamında nanopartiküller santrifüjlenerek yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Ultra saf su içerisinde dispers edilen partiküller +4 derecede saklanmıştır.

3.2.1.4. Fenilalanin Çapraz Bağlı Kriyojel Sentezi

520 µL HEMA monomeri ve 113.2 mg çapraz bağlayıcı MBA suda çözülerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Fenilalanin çözeltisinden 2500 ppm olacak şekilde ilk çözeltiliye ilave edilerek homojen bir karışım olması için 1 saat karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 10 mL' lik şırınga içine alınarak buz banyosunda soğutma işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon başlatıcı ajanlar (APS ve TEMED) karışıma ilave edilmiş ve karışım -20 °C' de 18 saat bekletilmiş böylece polimerleşme tamamlanmıştır. Kopolimer tabanlı hazırlanan kolon 18 saat sonunda oda sıcaklığında hacminin 10 katı kadar saf su ile yıkanmış sonrasında +4 derecede muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Kriyojel Temelli Ayırma Kolonunun Karakterizasyonu

3.2.2.1. Şişme Testi

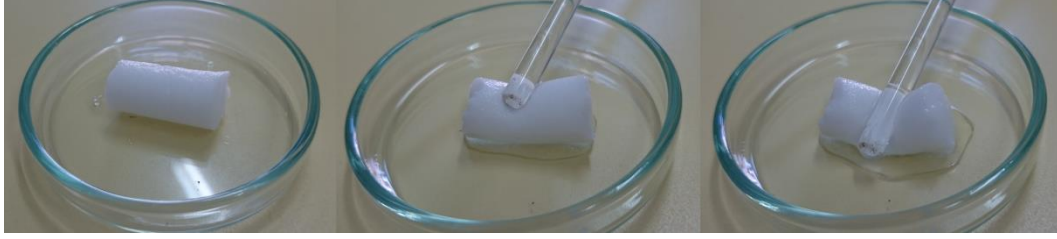
Bir önceki çalışmada sentezlenen kriyojel kolonun [poli(HEMA-Fenilalanin)] şişme kapasitesi aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir (Şekil 3.3).

Kuru kriyojel ± 0.0001 duyarlıkla tartılmış ve 24 saat boyunca, oda sıcaklığında, 100 mL saf su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra sudan çıkarılan polimerin yüzeyindeki su süzgeç kağıdı yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra polimer tartılmıştır. Denklem (3.1) kullanılarak poli(HEMA-Fenilalanin)' in su tutma kapasitesi hesaplanmıştır.

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

W_i : Kriyojellerin şişmeden önceki ağırlığı

W_s : Kriyojellerin şişmeden sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.



Şekil 3.3. Kriyojelin şişme ve esneklik özelliği

3.2.2.2. FT-IR Analizi

Poli(HEMA-Fenilalanin) kolon, poli(HEMA) kriyojel kolon ve katı KBr vakum etüvünde 50°C sıcaklığında kurutulmuştur. Numunelerden 0.1-0.2g alınarak pellet oluşturulup her bir numunenin FT-IR spektrumu alınmıştır.

3.2.2.3. Yüzey Alanı Ölçümü

Poli(HEMA-Fenilalanin) monolitinin spesifik yüzey alanı BET cihazı kullanılarak belirlenmiştir. BET metoduna göre -198 °C' deki sıvı azot ortamında azot (N₂) gazı adsorpsiyonu tekniği kullanılarak katıların m²/g olarak yüzey alanları ölçülmektedir.

3.2.2.4. Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-Fenilalanin) kriyojel kolonun yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Oda sıcaklığında kurutulan kriyojel SEM cihazına yerleştirilmeden önce vakum ortamında altın ile kaplanmıştır. Sonrasında polimerin yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

3.2.3. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.3.1. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi

CD spektroskopisi proteinlerin peptit omurgasını, ikincil ve üçüncül yapısının analiz edilebildiği bir yöntemdir. Saflaştırılan FS II'lerin ikincil ve üçüncül yapılarının analizi CD Spektroskopi cihazı kullanılarak incelenmiştir. 2000ppm dispers çözeltisi hazırlanarak spektrum taraması yapılmıştır.

3.2.3.2. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen FS II nanopartiküllerin boyut analizi Zetametre kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3.3. Floresans Spektroskopisi Analizi

Nano FS II çözelti ortamında dispers edilerek floresan özellikleri incelenmiştir. Numune 300nm’de uyarılarak analiz yapılmıştır.

3.2.3.4. Döngüsel Voltammetri ve Kronoamperometri Analizi

Döngüsel voltammetri (CV) ve kronoamperometri (CA) elektroanalitik uygulama çalışması yapılmıştır. Altın elektrotlar, Buehler P-4000 zımpara kağıdı ile zımparalandıktan sonra sırasıyla 0.1 µm ve 0.05 µm tanecik boyutuna sahip alümina süspansiyonu ile parlatılmıştır. Sonra saf su ve aktif karbonla muamele edilmiş asetonitril-izopropil alkol (1:1) karışımı ile 5’er dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Temizlenen elektrot, Fotosistem II biyoenerjetik kokteylinin fotoduyarlı nano-örgülenmesiyle elde edilen, NanoFSII nanobiyobelleklerinin dispers edildiği çözeltiye daldırılarak kendiliğinden düzenlenme tekniğiyle etkileştirilmiştir.

CA ve CV çalışmalarında, türlerin elektrokimyasal davranış mekanizmaları incelenirken fosfat tampon (pH: 4) çözelti sistemi kullanılmıştır. CA çalışmalarında elektroaktif türlerin önce CV voltamogramları alınmış ve tespit edilen indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri temel alınarak elektrot reaksiyonu henüz başlamamışken bir potansiyel değeri ve elektrot reaksiyonunun maksimum değere ulaşmasından hemen sonra bir potansiyel değeri, CA çalışmalarında potansiyel adımları olarak seçilmiştir.

3.2.4. FS II İzolasyon Prosedürü

Oda sıcaklığında gerçekleştirilen prosedürde; ıspanağın parçalanması ve süzülmesi işlemleri gün ışığında, diğer basamaklarda ise karanlık ortamda çalışılmıştır. 500 gr ıspanak küçük parçalar haline getirildikten sonra 2000 rpm’ de santrifüj işlemi uygulanmış daha sonra adi süzgeç kağıdı ile süzülmüştür. Supernatant, pelletten ayrılıp uygun büyüklükteki corning tüplere alınarak 10000

rpm hızda 25 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonraki işlemde süpernatant ortamdan uzaklaştırılıp, pellet küçük hacimde T-1 (100 mM sükröz ve 200mM NaCl içeren 50 mM Na/K posfat tamponu pH 7.4) tamponu ile süspansiyon yapılmıştır. T-2 (300 mM sükröz ve 50mM NaCl içeren 50 mM Na/K posfat tamponu pH 6.9) tamponunda, %20 oranında Triton X-100 (w/v) çözeltisi son hacim 25:1 olacak şekilde buz banyosunda 7 dakika inkübe edilmiştir. 13000 rpm'de 45 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı, pellet T-3 (40 mM Na/K posfat tamponu pH 6.9) tamponunda homojen hale getirilmiştir. 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Pellet T-4 (400 mM sükröz, 15mM NaCl ve 5 mM MgCl₂ içeren 20 mM Na/K Mes-NaOH tamponu pH 6.5) tamponunda iel süspansiyon edilerek homojen hale getirildi ve -80 °C muhafaza edilmiştir (Seibert, 2004).

3.2.5. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi için öncelikli olarak akrilamid-bis monomerleri ile, APS, TEMED, SDS pH 8.8 ve pH Tris tamponları kullanılarak % 10' luk ayırma ve yükleme poliakrilamid jel çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Tank haznesine dökülen jel, tarak yardımıyla eşit kuyucuklara ayrılmıştır. Numuneler jele yüklenmeden önce 1:1 oranında Coomassie Blue G boyası ile karıştırılmış ardından homojen bir karışım ve denatürasyon için ısıtma ön işlemi uygulanmıştır. Tank, tampon çözeltisi ile doldurularak, numuneler kuyucuklara yüklenmiştir. Analitlerin jelde yürütülmesi işlemi için 25-45 mA akım kullanılmıştır. Sonrasında jel tanktan ayrılarak önce %50'lik metanol çözeltisinde 1 saat bekletilmiş ve deiyonize su ile yıkanıp %50'lik metanol çözeltisinde 1 saat karıştırılmıştır. Hazırlanan gümüş boyama tamponunda 30 dakika bekletilip deiyonize su ile yıkanmıştır. Son olarak görüntüleme çözeltisine alınan jel, bantlar belirginleştikten sonra %50'lik metanol çözeltisinde saklanmıştır. İzole edilen PS II sisteminin içindeki moleküllerin ağırlıkları, marker bantları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

- ❖ Örnek Hazırlama Tamponu: 0.5M Tris-HCl pH 6.8 2.5ml, %10 SDS 4ml , 2ml gliserol, 1ml 2-merkaptetanol, 0.02g bromofenol

mavisi ve 500µl deiyonize su çözeltisi karıştırılarak -20 derecede saklanmıştır.

- ❖ Tank Tamponu: 0.12M Tris, 0.95M glisin, 0.017M SDS 5:1 oranda seyreltilerek kullanılır.
- ❖ Çözelti A: 4.108M akrilamid, 0.051M N,N'-methilenbis akrilamid
- ❖ Çözelti B: 1.5M Tris-HCl pH 8.8
- ❖ Çözelti C: 0.5M Tris-HCl pH 6.8
- ❖ Çözelti D: %10 SDS
- ❖ Çözelti E: %10 APS
- ❖ Gümüş Boyama Tamponu Hazırlanması: 0.8g AgNO₃ deiyonize suda çözülerek 21 ml %36 NaOH eklenmiştir. Oluşan çökelek berraklaşana kadar NH₄OH ile titre edilerek 50 ml deiyonize su ilave edilmiştir.
- ❖ Görüntü Oluşturma Çözeltisi: 2.45ml %1'lık sitirik asit, 0.25ml %36'lık formaldehit, 500ml deiyonize su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Jel hazırlamada kullanılan çözelti miktarları

Çözeltiler	Yükleme Jeli %5	Ayırma Jeli %10
A	1600µl	9975 µl
B		7500 µl
C	2500 µl	
D	100 µl	300 µl
Deiyonize su	5630 µl	11925 µl
TEMED	5 µl	15 µl
E	150 µl	250 µl

4. BULGULAR

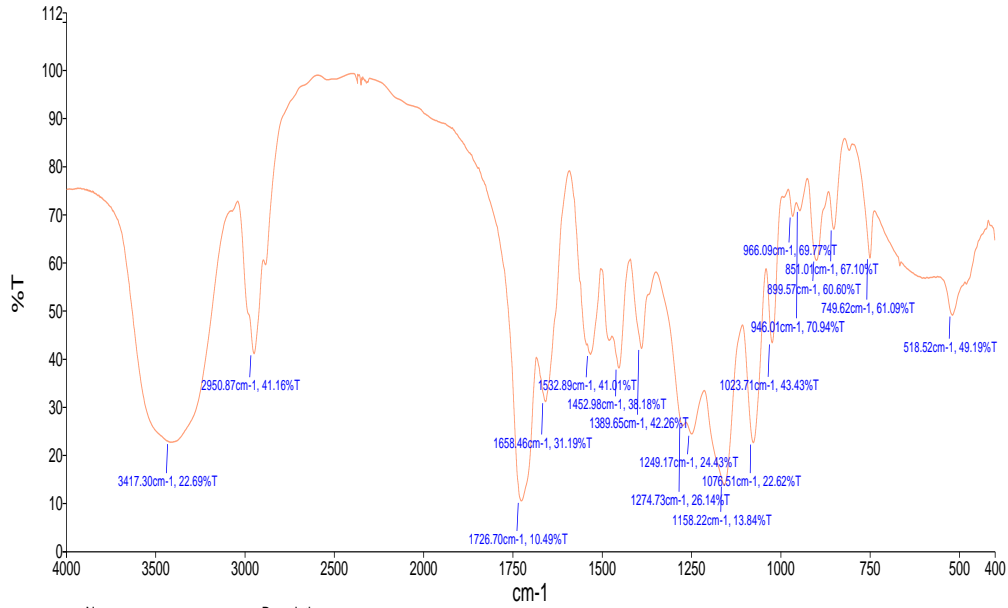
4.1. İzolasyon ve Saflaştırma Yöntemleri

4.1.1. Fenilalanin Gömülü Kriyojel Kolonun Şişme Testi

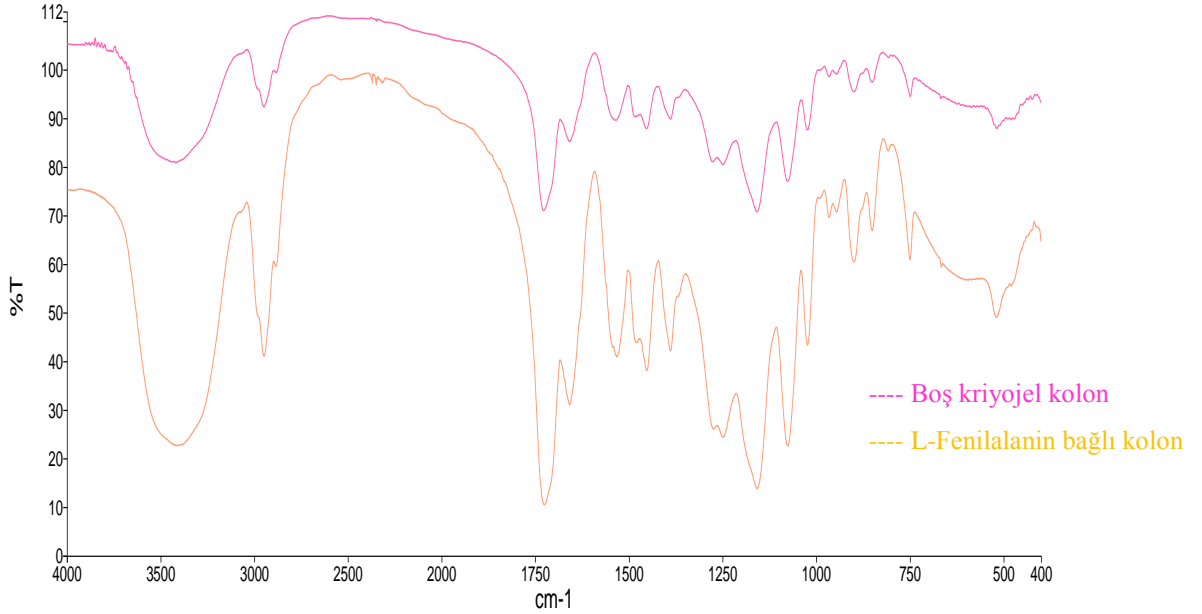
Poli(HEMA-Fenilalanin) kriyojel kolon hidrofilik özelliğe sahip polimer matriksidir. Polimerik yapıda olması nedeniyle suda çözünmeyen, poröz yapısı nedeniyle yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Bu çalışmada sentezlenen kriyojel kolonun su tutma kapasitesi % 750.2 olarak hesaplanmıştır.

4.1.2. Poli(HEMA- Fenilalanin)'in FT-IR Spektrumu

Poli(HEMA- Fenilalanin) (Şekil 4.1) ve Poli(HEMA) (Şekil 4.2) katı destek materyalinde kriyojel kolonun karakteristik piki olan HEMA'daki fonksiyonel gruplara ait 3417 cm^{-1} (-OH) ve 1151 cm^{-1} (-CO-O-C) frekanslarında pikler görülmektedir. 2950 cm^{-1} civarında gözlenen pik kolon dolgu maddesi olarak kullanılan fenilalaninin yapısında bulunan amin grubuna aittir. 1249 cm^{-1} civarından gözlenen pikin ise aromatik halkadan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.1. Poli(HEMA-L-Fenilalanin)'in FT-IR spektrumu



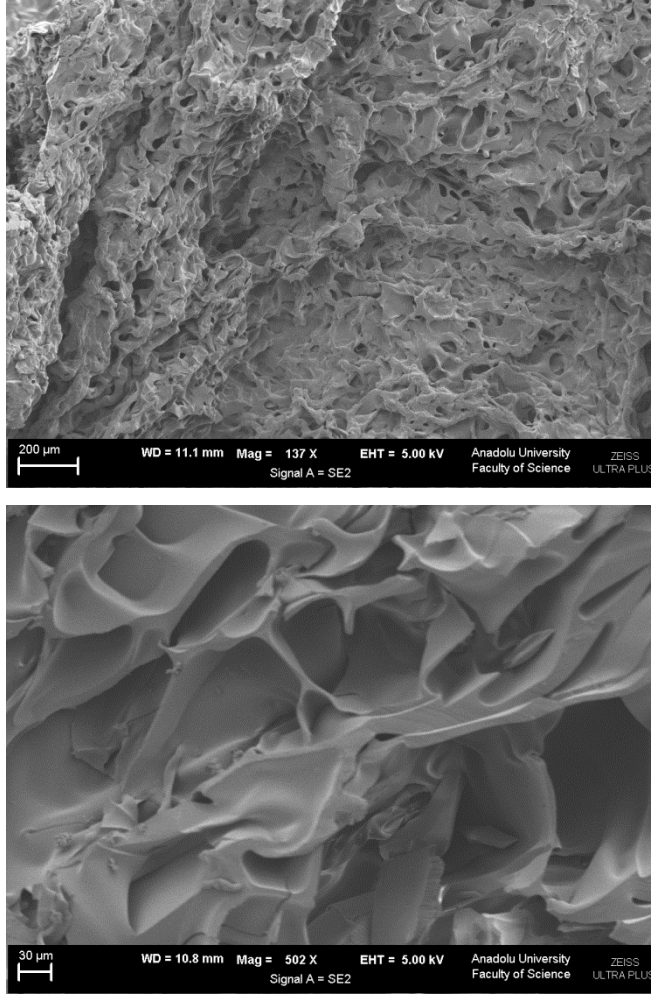
Şekil 4.2. Poli(HEMA-L-Fenilalanin) ve Poli(HEMA)'nın FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması

4.1.3. Fenilalanin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Alanı Ölçümü

Poli(HEMA-Fenilalanin) kriyojel kolonunun spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile analiz edilmiştir. 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı ölçümü sonucu kolonun spesifik yüzey alanı $83.17 \text{ m}^2/\text{g}$ polimer bulunmuştur.

4.1.4. Fenilalanin Gömülü Kriyojel Kolonun Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-Fenilalanin) kolonunun yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. SEM görüntüleri verilen çapraz bağlı polimer yapısı geniş gözeneklere ve büyük yüzey alanına sahiptir (Şekil 4.3). Kriyojel kolonun sahip olduğu geniş gözenek yapısı difüzyon direncini azaltmakta, analit ile etkileşimin artmasını sağlamakta, düşük basınç sayesinde yüksek oranda adsorpsiyon ile ayırma imkanı sağlamaktadır.



Şekil 4.3. Poli(HEMA-Fenilalanin)' in SEM görüntüleri

4.1.5. FS II Saflaştırılması

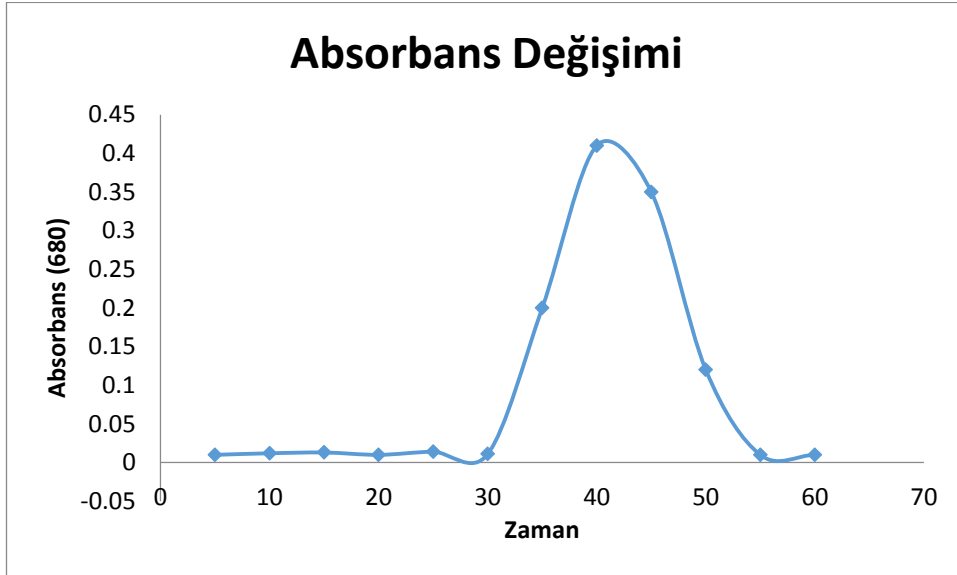
4.1.5.1. Sürekli Sistem Çalışması

Ispanak bitkisinden izole edilen FS II afinite kromatografisi ile sürekli sistem kullanılarak saflaştırılmıştır. Temel prensipte saflaştırılmak istenen numunedeki maddeye uygun bir molekül ligand olarak matrikse tutturulmuş ve numunenin bu kolon üzerinden uygun tampon çözelti ile geçirilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada fenilalanin bağlı kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. Hidrofobik etkileşimlerden ve iyon etkileşimlerinden yararlanılarak FS II'ye karşı gösterdiği ilgi ile kolonda ayırım yapılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sürekli sistem mekanizması

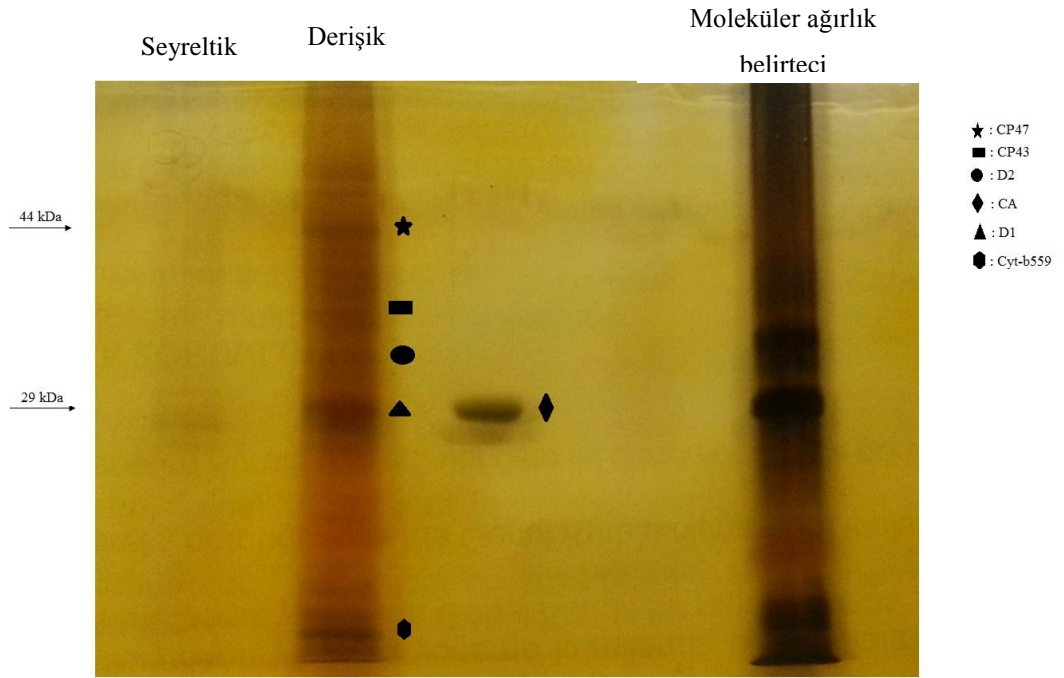
Öncelikle hazırlanan kolon fosfat tamponu pH 5 ile dengelenmiştir. Daha sonra peristaltik pompa yardımıyla kolondan 5rpm hızda numune geçirilmiştir. Belli aralıklarda kolondan çıkan numunelerin UV-absorbans ölçümleri 680 nm’de incelenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Absorbans değişim grafiği

4.1.5.2. SDS-PAGE Analizi

İspanaktan izole edilen FS II örneklerinin içeriği ve saflaştırılan FS II' nin saflığı SDS-PAGE analizi yapılarak belirlenmiştir. Hazırlanan %10' luk poliakrilamid jelde, denatüre edici ajan olarak SDS kullanılmıştır. Numuneler jel üzerinde yürütülmüş ve birçok bant gözlenmiştir. Kimyasal parçalama uygulanan ıspanak bitkisinde bir çok protein yapısının bulunması nedeniyle anten proteinler, zar proteinleri ve sitokrom b'ye ait bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.6).

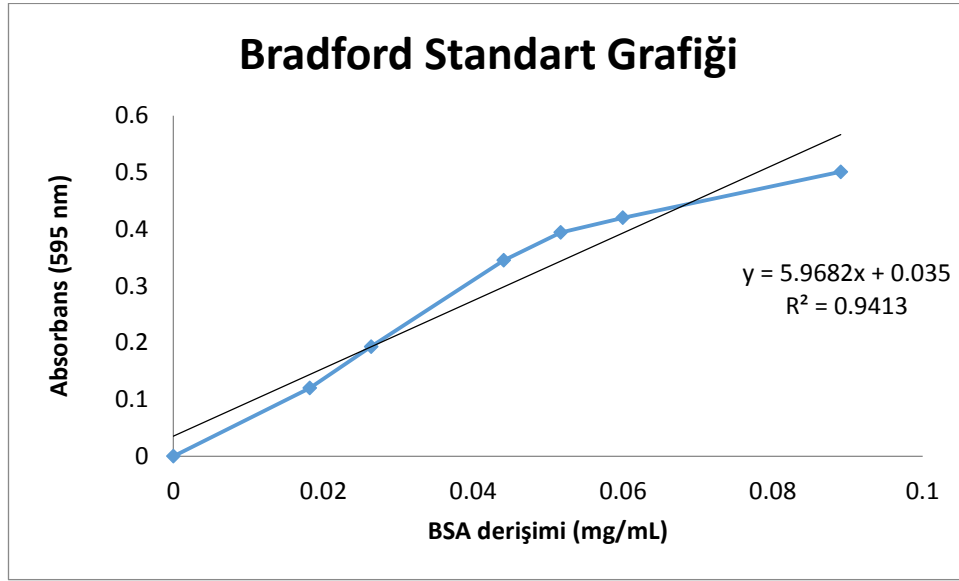


Şekil 4.6. SDS-PAGE görüntüsü

4.1.5.3. Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Bradford metodu bir numunede bulunan protein miktarının belirlenmesi için kullanılan nicel yöntemlerden biridir. Commassie Brilliant Blue G-250 boyasının Bradford ayıracağı olarak kullanılması ile ölçüm yapılmaktadır. Yöntemin temeli maximum absorbands dalgaboyu 465 nm olan boyanın proteinlerle bağlanması sonucu absorbandsın 595 nm'ye kaymasına dayanmaktadır. Metodun ilk aşamasında örneklere boya belirteci eklenerek 10 dakika sonrasında 1 saat boyunca kararlılığa sahip renk oluşumu izlenir.

Yapılan çalışmada, pH 7.7 fosfat tamponu içinde farklı derişimlerde standart protein (bovin serum albumin) içerikli örnekler hazırlanmıştır. Örnekler 1:5 oranında reaksiyona sokularak absorbans (595 nm) ölçümü incelenmiştir. Standart protein verileri kullanılarak Şekil 4.7’de kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. İzole edilen ham ekstraktın 1000 µg ve saflaştırılan numunedeki protein içeriğı ise 210 µg olarak hesaplanmıştır.

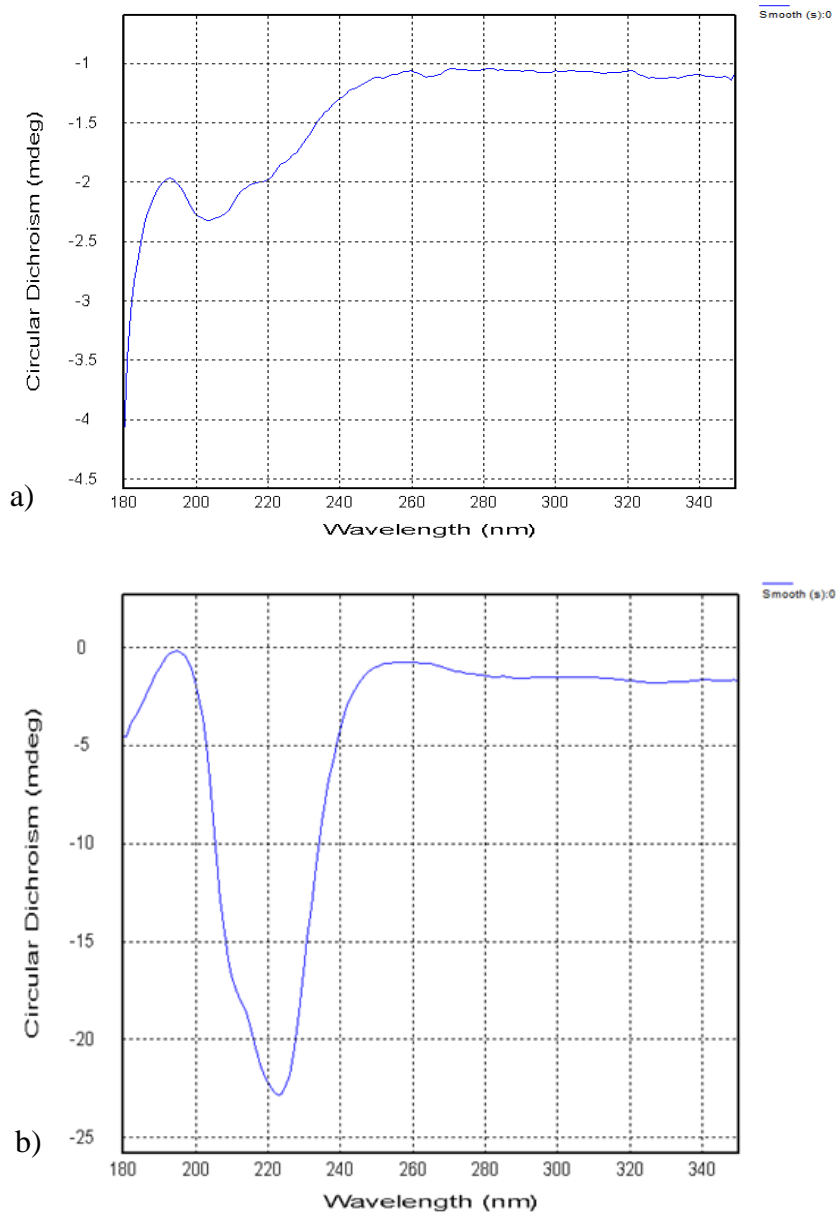


Şekil 4.7. FSII nanopartiküllerdeki protein miktarı tayini için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

4.2. Biyonanoenerjetik Partiküller ve Karakterizasyonları

4.2.1. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi

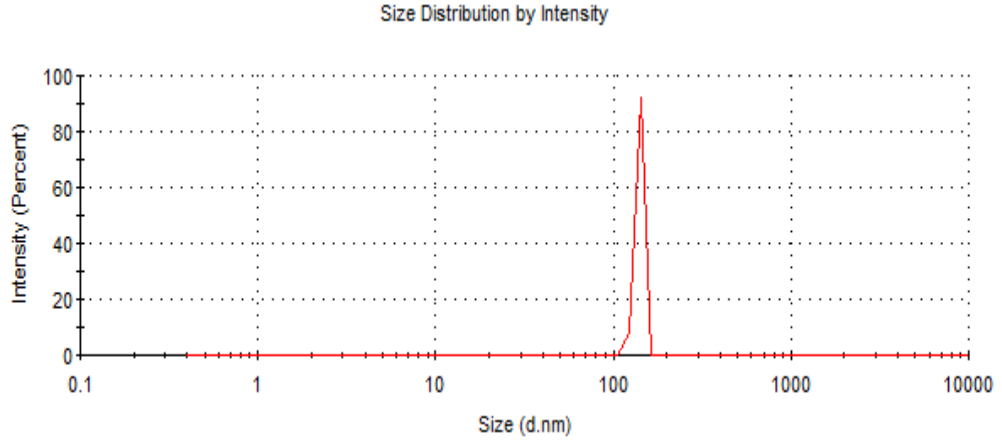
NanoFS II’lerin ve sitokrom b çözeltilerinin CD spektrumları Şekil 4.8’te incelenmiştir. İzole edilen FS II kompleksinin, matriks etkisinden ve izolasyon sonrasında ortamdaki uzaklaştırılmadan kalan maddelerden kaynaklı barındırdığı protein yapılarının net olarak gözlenemediğinden spektrum alınamadığı, fakat daha kararlı nanoFSII’lerin alfa heliks yapısında moleküller içerdiği belirlenmiştir. Sitokrom b’nin ve nanoFSII’lerin CD spektrumları karşılaştırıldığında yapıların benzer olduğu yorumlanmıştır.



Şekil 4.8. a) NanoFS II CD spektrumu, b) Sitokrom b CD spektrumu

4.2.2. Zeta Boyut Analizi

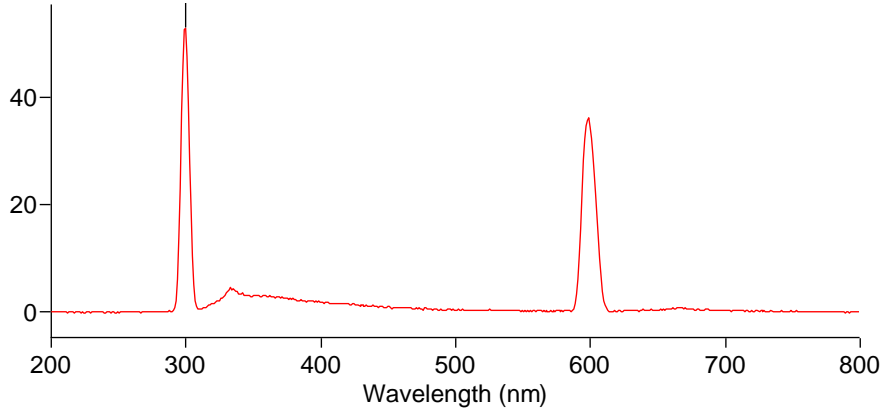
Nano FS II'lerin parçacık boyutları Zetametre ile ölçülmüştür (Şekil 4.9). Ultra saf su dispers edilen biyoneoenerjetiklerin boyutları 140.2 nm olarak belirlenmiştir. FS II kompleks bir sisteme sahip olması ve NADH ilavesi nedeniyle parçacık boyutu 100 nm'nin üzerinde bulunmuştur.



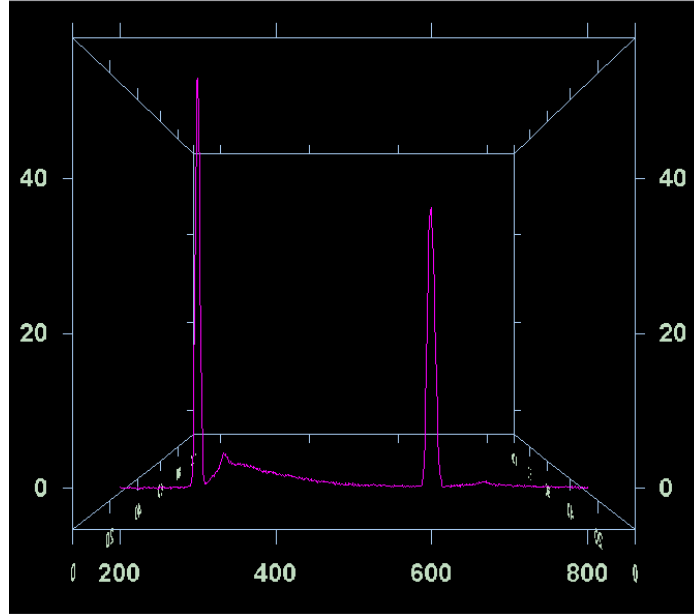
Şekil 4.9. NanoFSII zeta boyut analizi

4.2.3. Floresans Ölçümleri

Sentezlenen nano partiküllerin floresans özellikleri Şekil 4.8’de incelenmiş olup 333.52 nm’de yüksek absorbans gözlenmiştir. NanoFSII yapısında bulundurduğu feofitin ve plastokinon yapılar ışığa karşı duyarlı olmaları nedeniyle 500 nm’ye yayvanlaşarak devam eden floresan görülmesine neden olmuştur (Şekil 4.10). 300 ve 600 nm’de gözlenen şiddetli pikler ise rezonans ve saçılma sonucu oluşan floresansa aittir. Floresans spektrumunun üç boyutlu görüntüsü Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.10. NanoFSII floresan spektrumu



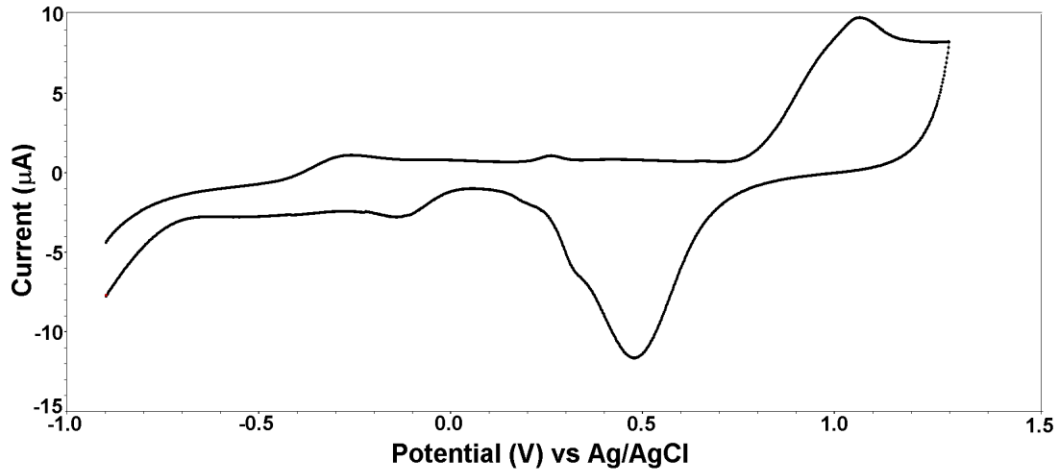
Şekil 4.11. Nan FSII üç boyutlu floresan spektrumu

4.3. NanoFSII'nin Biyobellek Özelliği ve Elektrokimyasal Davranışı

NanoFSII biyonanoenerjetiklerin bellek yetenekleri; redoks özelliği döngüsel voltametri ve kronoamperometri teknikleri kullanılarak ortaya konulmuştur. Bu NADH entegre edilmiş, enerjetik biyanobelleklerin voltamogramı fosfat tamponunda (pH: 4) -1 V - +1.3 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızı kullanılarak alınmıştır. Voltamogramda bileşenlere ait redoks durumu geri dönüşümlüdür. Şekil 4.12 incelendiğinde üç (3) çift yükseltgenme-

indirgenme piki görülmektedir. 1.06 V da görülen yükseltgenme piki ve 0.48 V da görülen indirgenme piki, biyonomoenerjetik yapısını fotoduyarlı olarak örgüleyen rutenyum kompleksinden ileri gelmektedir. -0.25 V daki yükseltgenme piki ile -0,14 V'daki indirgenme pikleri, fotosistem II biyonomoenerjetik kokteylde yer alan sitokrom -b nin merkezindeki demirin redoks davranışına işaret etmektedir. Ek olarak, 0.26 V – 0.18 V da görülen yükseltgenme ve indirgenme pikleri de nanoFSII'ye entegre edilmiş NADH'dan kaynaklanmaktadır (Nelson, 2008).

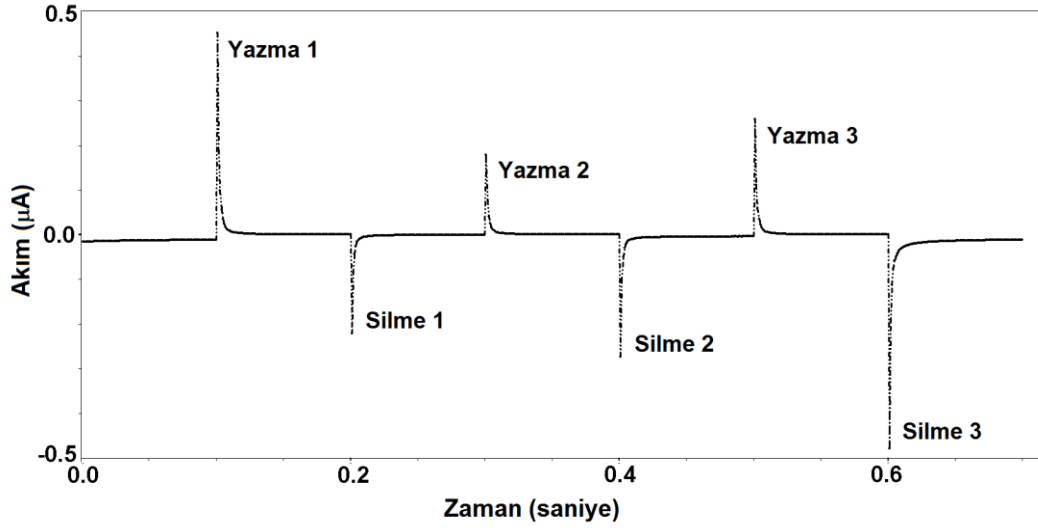
Bu üç çift redoks potansiyeli protein molekülündeki yükleri doymak ve silmek için kullanılmıştır. Hücreye yükseltgenme potansiyeli uygulandığında elektronlar altın elektrottan nanoFSII yapısının nano-biyo-arayüzeyine (interface) göç eder, bunun sonucunda nanoboyuttaki-protein kokteyli, pozitif yükçe doymun hale gelir. Diğer taraftan, bu biyonomobellek sistemi NanoFSII tabakasındaki elektronları, yüzeye geri transfer etmek için indirgenme potansiyeli uygular, ve böylece doymunulan yük silinir. Bu şekilde FSII biyonomoenerjetikliğinin nanobellek aygıtı şeklinde çalıştırılması sağlanmış olur.



Şekil 4.12. NanoFSII biyobelleklerle donanmış altın elektrodun fosfat tamponu içindeki (pH:4.7) dögüsel voltamogramı

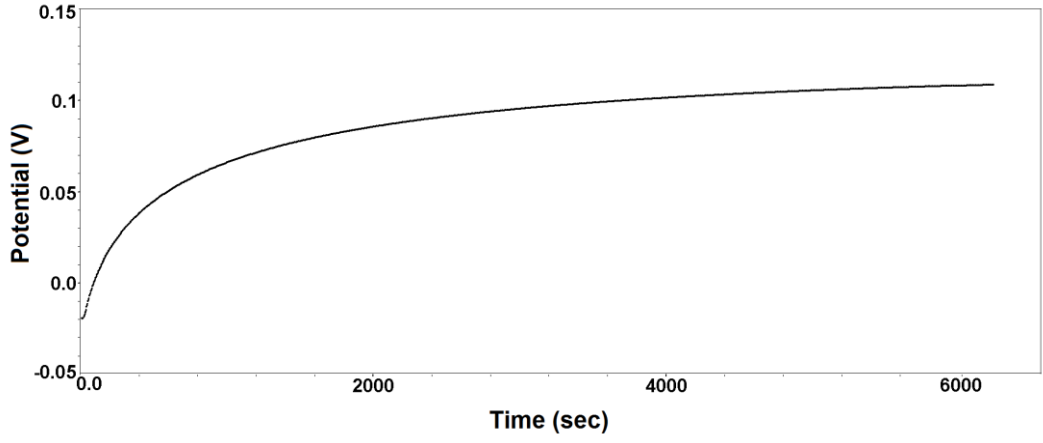
Şekil 4.13, NanoFSII biyobelleklerle donanmış altın elektrodun kronoamperometrik cevabını göstermektedir. Yükseltgenme ve indirgenme potansiyeli tekrarlanarak uygulandığı zaman; kararlı akımlar nanoFSII tabakasının içine ve dışına akış gösterir. Kısacası, yükseltgenme potansiyelleri uygulandığı zaman elektronlar nanoFSII biyonomobelleklerin içine akarken, indirgenme potansiyeli uygulandığı zaman nanoFSII tarafından tutulan yükler geri yayılır.

Açık devre potansiyeli bu durum yüklerini okumak ve kaydetmek için kullanılmış olup açık devre potansiyeli uygulandığında; nanoFSII bellekleri ve elektrolit arasında kararlı denge durumu başarılmıştır.

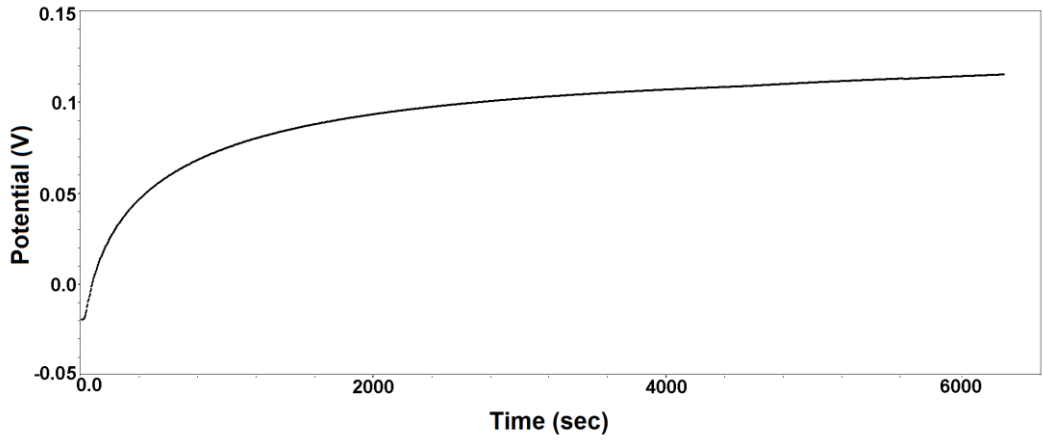


Şekil 4.13. NanoFSII donanmış altın elektrotun 10 mM fosfat tamponundaki (pH: 4.7) kronoamperometrik davranışı (Yükseltgenme ve indirgenme akımları 0.6 saniyede elde edilmiştir)

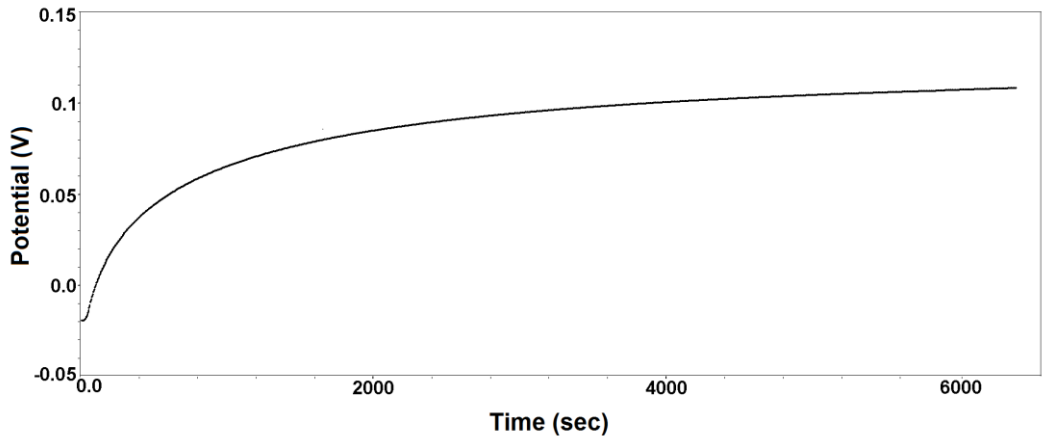
Ayrıca, biyonanobelleklerin voltamogramda tespit edilen 3 çift redoks potansiyeli için, durum yüklerini okumak üzere 3 farklı açık devre potansiyeli belirlenmiştir. Bu açık devre potansiyelleri sırasıyla; rutenyum kompleksi, sitokrom-b ve NADH için sırasıyla 0.11 V, 0.14 V ve 0.13 V olarak bulunmuştur (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).



Şekil 4.14. NanoFSII kaplı altın yüzeyinde rutenyum kompleksi



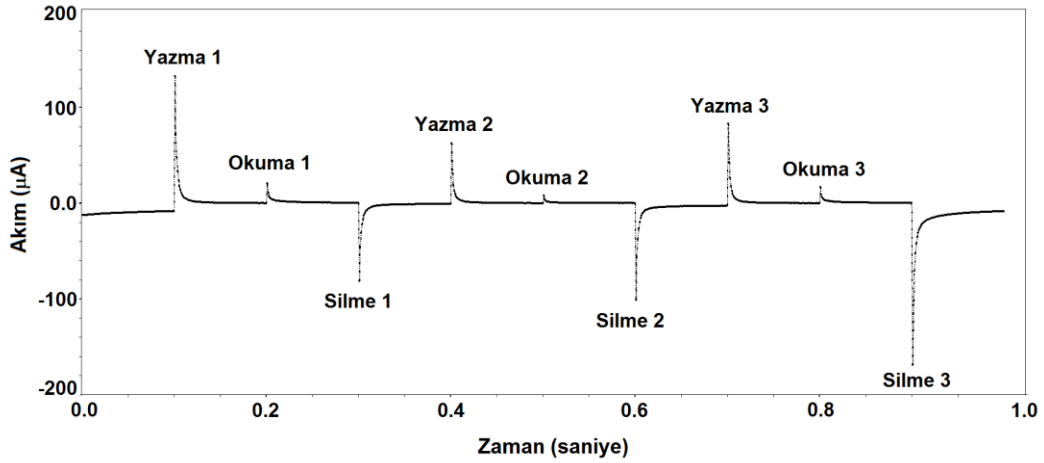
Şekil 4.15. NanoFSII kaplı altın yüzeyinde sitokrom b



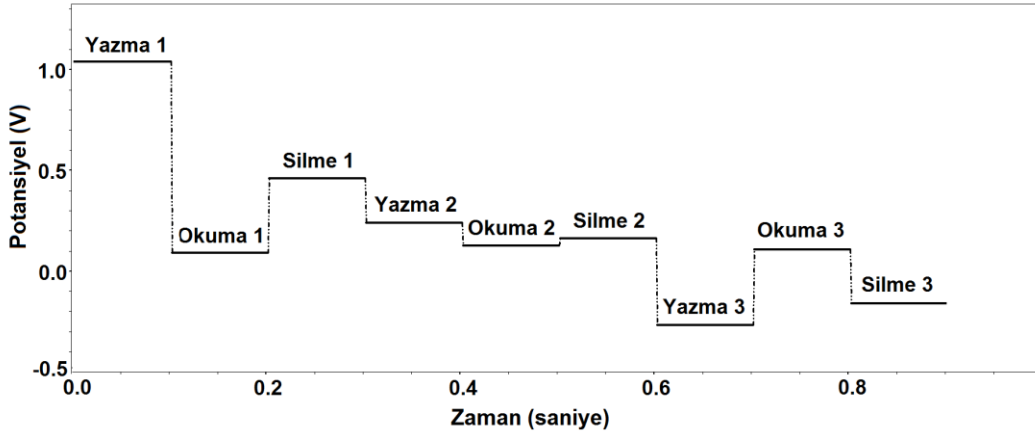
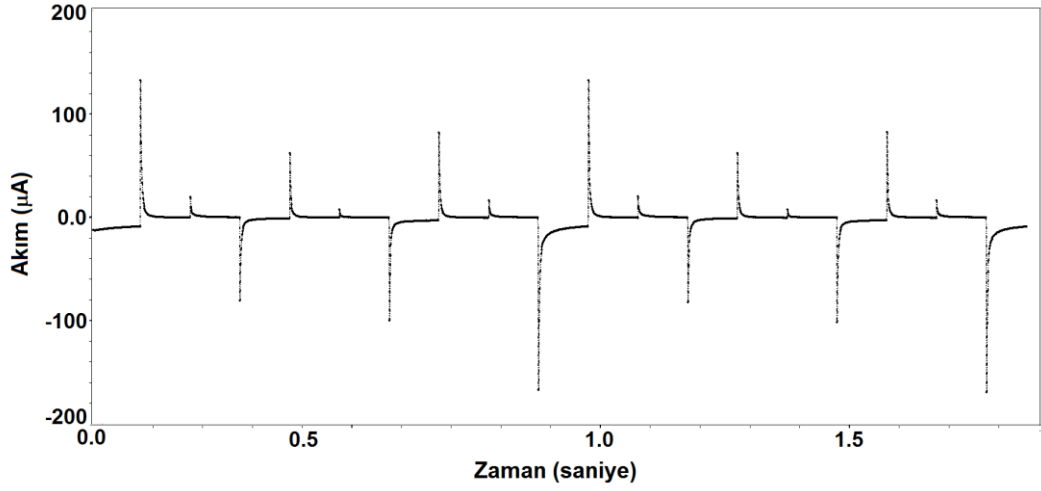
Şekil 4.16. NanoFSII kaplı altın yüzeyinde NADH'a ait açık devre potansiyelleri

Fotosistem II kokteylinden elde edilen biyonomoenerjetinin nanobellek aygıt fonksiyonu nanoFSII kaplı altın yüzeyin (10 mM fosfat tamponu pH: 4.7) açık devre potansiyel amperometrik davranışı ortaya konularak da gözlenmiştir. Bunun için yükseltgenme potansiyeli (yazma), indirgenme potansiyeli (silme) ve açık devre potansiyeli (okuma) akımları 1 saniyede elde edilmiştir.

Şekil 4.17’da görüldüğü gibi her hafıza döngüsünde bir yükseltgenme, indirgenme ve açık devre potansiyeli, nanobiyoçip içindeki yükleri doyumak, silmek ve okumak için uygulanmıştır. Açık devre potansiyeli uygulandığı zaman, nanoFSII kaplı yüzey ve elektrolit arasında kararlı denge durumu elde edilmiştir. Açık devre potansiyeli, amperometri deneylerinin temelinde üç durum mevcuttur. Bunlar; yükseltgenme potansiyelinin uygulanmasıyla elde edilen akım yazma basamağını belirler. Açık devre potansiyelinin uygulanmasıyla elde edilen akım okuma basamağını belirlerken, indirgenme potansiyelinin uygulanmasıyla elde edilen akım birikmiş yüklerin tümünü siler.

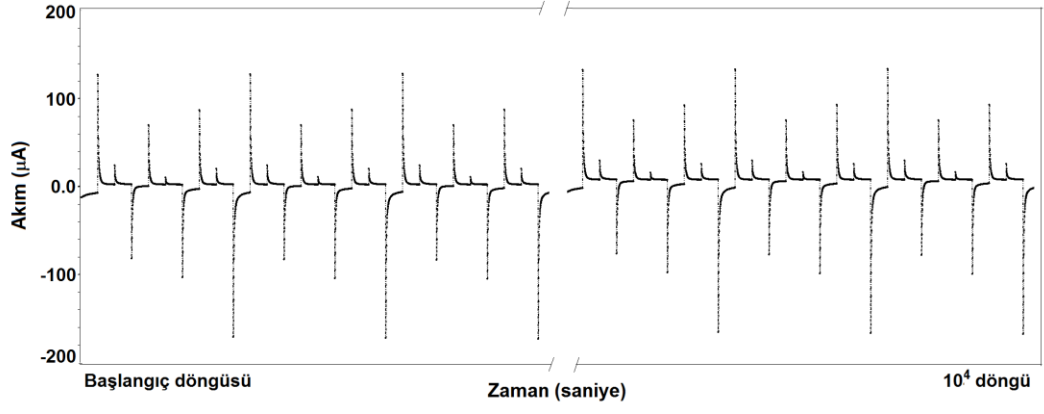


Şekil 4. 17. Fotosistem II kokteylinden elde edilen biyonomoenerjetinin nanobellek aygıt fonksiyonu. nanoFSII kaplı altın yüzeyin (10 mM fosfat tamponu pH: 4.7) açık devre potansiyel amperometrik davranışı



Şekil 4.17.(Devam) Fotosistem II kokteylinden elde edilen biyoinerji aygıtının nanobellek aygıt fonksiyonu. nanoFSII kaplı altın yüzeyin (10 mM fosfat tamponu pH: 4.7) açık devre potansiyel amperometrik davranışı

Diğer taraftan; kendi tilakoid membranı dışında oldukça kararsız olan fotosistem II kokteylinden sentezlenen biyoenerjetik-nanoaygıtın kararlılığını belirlemek için, altın yüzey üzerindeki biyobellek filmin yükseltgenme ve indirgenme davranışı 10^4 döngüye kadar devamlı tekrarlanmıştır. Akımda azalma meydana gelmemesi, yüzeyin kararlı ve tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. NanoFSIIbellek kaplı altın yüzeyin (10 mM fosfat tamponu pH: 4.7) çoklu döngüsel kronoamperometrik davranışı

5. SONUÇ VE YORUM

İyon kromatografisi anyon ve katyonların uygun katı destek yardımıyla ayrılması ve saflaştırılmasını kapsar. Özellikle endüstride atık su arıtımında kullanımı yaygın olan iyon kromatografisi biyoteknolojik alanda da kullanımı ile göze çarpmaktadır (Nanba ve Satoh, 1987).

Biyoeenerjetik, termodiğın özel bir bölümü olmakla birlikte canlı sistemlerdeki enerji döngüsünü ve transferini tanımlamaktadır. Bu tez kapsamında biyoeenerjetik sistemlere yeni bir yaklaşımla farklı formlar kazandırılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında fotosistem II kompleksinin literatürdeki izolasyon yöntemlerinden yararlanılmıştır (Shibamoto ve Watanabe, 2008). Ispanak bitkisinden kimyasal parçalama yöntemi ile izole edilen FS II'lerin Bradfort yöntemi ile 1000 µg protein içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında FS II saflaştırılmasında kullanılmak üzere kriyojel tabanlı kolonlar tasarlanmıştır. Monomer olarak HEMA, ligand olarak ise fenilalanin kullanılması ile iyon değişim kriyojel kolonları hazırlanmıştır. Ligand molekülünün yapısı FS II kompleksindeki hidrofobik etkileşimlerden yararlanılmasına, kriyojelin sahip olduğu makro gözenek boyutu ise kolon içerisindeki basıncı azaltarak biyomoleküllerin bozulmadan ayırımına olanak sağlamıştır. Saflaştırılan FS II'nin ultraviyole ışık altında 680 nm'de absorbans özelliği ve 210 µg protein içerdiği belirlenmiştir. Saflaştırma işleminden sonra ANADOLUCA konsept yöntemi kullanılarak nanoFSII sentezlenmiştir. NanoFSII'lerin 333.52 nm'de floresan özellik gösterdiği ve boyutunun 140.2 nm olduğu bulunmuştur. Üç boyutlu yapısı CD spektrumu ile incelenmiştir.

Poli(HEMA-Fenilalanin) kriyojel kolonunun SEM görüntüleri incelendiğinde birbiriyle bağlantılı makro gözenekler rahatlıkla görülmektedir. Kriyojellerin denge şişme oranı % 750.2 olarak bulunmuştur. Ayrıca FT-IR spektrumları incelendiğinde kriyojele ait karakteristik piklerin olduğu ve liganta ait spesifik piklerin bulunduğu gözlenmiştir. Kriyojelin spesifik yüzey alanı BET yöntemiyle 83 m²g⁻¹olarak bulunmuştur.

FS II literatür çalışmalarına bakıldığında farklı biyolojik kaynaklardan saflaştırılması, kristal yapısının incelendiği görülmektedir (Nagao, 2010; Adachi, 2009; Najafpour, 2014). FS II, suyu parçalamasındaki biyomimik özelliği üzerine

yapılan çalışmalarla da ön plana çıkmaktadır (Barber, 2012). Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda literatürden farklı olarak FS II ıspanak bitkisinden izole edilmiş ve spesifik ligand içerikli kriyojel kolonlar geliştirilmiştir. Günümüzde hafıza sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur (Busby, 2015). Son aşamada geliştirilen biyonanoenerjiğin biyobellek özelliği voltametrik ve kronoamperometrik yöntemler kullanılarak yükseltgenme-indirgenme potansiyeli uygulamaları ile incelenmiştir.

İlk kez Fotosistem II kokteyl sistemler nanoboyutta sıkıştırılmış ANADOLUCA yöntemiyle sürekliliğinin sağlanması ve dışarıdan ekstra NADH eklemekten 10^4 döngüye kadar okuma-yazma-silme bellek işlemlerinin tekrarlanabilirliğinin yolu açılmıştır. Rutenyum kompleksi, NADH ve sitokrom b'ye ait açık devre potansiyelleri incelendikten sonra biyobellek özellikleri belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda biyoenerjetik nano aygıtın biyobellek özelliğinden yararlanılarak sensör yakıt hücreleri, sensör (Varsamis, 2008) sistemleri gibi uygulama alanlarının oluşturulması hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abrol, Y. P., & Mohanty, P. (Eds.). (2012). *Photosynthesis: photoreactions to plant productivity*. Springer Science & Business Media.
- Adachi, H., Umena, Y., Enami, I., Henmi, T., Kamiya, N., & Shen, J. R. (2009). Towards structural elucidation of eukaryotic photosystem II: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of photosystem II from a red alga. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(2), 121-128.
- Babcock, G. T., Blankenship, R. E., & Sauer, K. (1976). Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast photosystem II. *FEBS letters*, 61(2), 286-289.
- Barber, J., Nield, J., Morris, E. P. and Hankamer, B., "Subunit Positioning in Photosystem II Revisited", *Trends Biochem Sci*, Vol. 24: (2) 43-45 (1999).
- Barber, J. (2012, January). Photosystem II: The water-splitting enzyme of photosynthesis. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 77, pp. 295-307). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bergeson, L. L. (2004). The regulatory implications of nanotechnology. *Environmental Quality Management*, 14(1), 71-82.
- Bohnert, H., Bottomley, W., Bryant, D. A., Mullet, J. E., Ogren, W. L., Pakrasi, H., & Somerville, C. R. (Eds.). (2012). *Molecular Biology of Photosynthesis*. Springer Science & Business Media.
- Bonner, J., & Varner, J. E. (Eds.). (2012). *Plant biochemistry*.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
- Breithaupt, D. E. (2004). Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chemistry*, 86(3), 449-456.
- Busby, Y., Crespo-Monteiro, N., Girleanu, M., Brinkmann, M., Ersen, O., & Pireaux, J. J. (2015). 3D imaging of filaments in organic resistive memory devices. *Organic Electronics*, 16, 40-45.
- Choi, J. W., Oh, B. K., Kim, Y. J., & Min, J. (2007). Protein-based biomemory device consisting of the cysteine-modified azurin. *Applied Physics Letters*, 91(26), 263902.

- Cox, R. P., & Bendall, D. S. (1972). The effects on cytochrome b-559 HP and P546 of treatments that inhibit oxygen evolution by chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 283(1), 124-135.
- Cramer, W. A., & Knaff, D. B. (Eds.). (2012). *Energy transduction in biological membranes: a textbook of bioenergetics*. Springer Science & Business Media.
- Cramer, W. A., Theg, S. M., & Widger, W. R. (1986). On the structure and function of cytochrome b-559. *Photosynthesis research*, 10(3), 393-403.
- Cuenya, B. R. (2010). Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. *Thin Solid Films*, 518(12), 3127-3150
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaría, G., Kim, H., ... & Reed, J. C. (2002). The bioenergetic signature of cancer a marker of tumor progression. *Cancer research*, 62(22), 6674-6681.
- Cummins, P. M., Dowling, O., & O'Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. In *Protein Chromatography* (pp. 215-228). Humana Press.
- Çimen, D., Yılmaz, F., Perçin, I., Türkmen, D., & Denizli, A. (2015). Dye affinity cryogels for plasmid DNA purification. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 318-324.
- Daoud-Attieh, M., Chaib, H., Armutcu, C., Uzun, L., Elkak, A., & Denizli, A. (2013). Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels. *Separation and Purification Technology*, 118, 816-822.
- Deligiannakis, Y., Petrouleas, V., & Diner, B. A. (1994). Binding of carboxylate anions at the non-heme Fe (II) of PS II. I. Effects on the Q⁻ A Fe²⁺ and Q A Fe³⁺ EPR spectra and the redox properties of the iron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1188(3), 260-270.
- Erkoç, Ş. Nanobilim ve Nanoteknoloji, Ankara, ODTÜ Yayıncılık, 2010, s.7
- Forrest, D. R. (2001). Molecular nanotechnology. *Instrumentation & Measurement Magazine, IEEE*, 4(3), 11-20.
- Frank, H. A., & Cogdell, R. J. (1996). Carotenoids in photosynthesis. *Photochemistry and photobiology*, 63(3), 257-264.
- Gjerde, D. T., & Fritz, J. S. (1987). *Ion chromatography*. A. Hüthig.

- Handford, C. E., Dean, M., Spence, M., Henchion, M., Elliott, C. T., & Campbell, K. (2015). Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. *Food Control*, 57, 24-34.
- Harris, D. A. (2009). *Bioenergetics at a glance: an illustrated introduction* (Vol. 88). John Wiley & Sons.
- Hartland, G. V. (2006). Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems By Vincenzo Turco Liveri (University of Palermo, Italy). from the Series: Nanostructure Science and Technology. Edited by David J. Lockwood. Springer Science+ Business Media Inc.: New York. 2006. xviii+ 168 pp. \$79.95. ISBN 0-387-26427-2. *Journal of the American Chemical Society*, 128(18), 6267-6268.
- Heath, J. R., & Ratner, M. A. (2003). Molecular electronics.
- Heber, U., Kirk, M. R., & Boardman, N. K. (1979). Photoreactions of cytochrome b-559 and cyclic electron flow in photosystem II of intact chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 546(2), 292-306.
- Hou, H. J., & Mauzerall, D. (2011). Listening to PS II: enthalpy, entropy, and volume changes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1), 357-365.
- Keçili, R., Say, R. ve Yavuz, H.,(2006) “Synthesis and characterization of pseudoaffinity ligand for penicillin acylase purification” *Int. J.Biol.Macromol.*, **39**, 250-255.
- Kim, S. U., Yagati, A. K., Min, J., & Choi, J. W. (2009). Biomemory device composed of mutant azurin thin films modified by site-directed mutagenesis. *Thin Solid Films*, 518(2), 682-687.
- Knaff, D. B., & Arnon, D. I. (1969). Light-induced oxidation of a chloroplast b-type cytochrome at-189 C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(3), 956-962.
- Knox, R. S. (1994). Review of Breton and Verméglio, The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy, and Dynamics. *Biophysical journal*, 67(2), 939.
- Kuhl, H., Kruip, J., Seidler, A., Krieger-Liszakay, A., Bünker, M., Bald, D., ... & Rögner, M. (2000). Towards Structural Determination of the Water-splitting Enzyme Purification, Crystallization, And Preliminary Crystallographic Studies Of Photosystem II From A Thermophilic Cyanobacterium. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20652-20659.

- Lee, T., El-Said, W. A., Min, J., & Choi, J. W. (2011). Multifunctional DNA-based biomemory device consisting of ssDNA/Cu heterolayers. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2304-2310.
- Lee, T., Kim, S. U., Min, J., & Choi, J. W. (2010). Multilevel biomemory device consisting of recombinant azurin/cytochrome c. *Advanced Materials*, 22(4), 510-514.
- Lenzian, F., Bittl, R., Telfer, A., & Lubitz, W. (2003). Hyperfine structure of the photoexcited triplet state 3 P680 in plant PS II reaction centres as determined by pulse ENDOR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1605(1), 35-46.
- Min, J., Lee, T., Oh, S. M., Kim, H., & Choi, J. W. (2010). Electrochemical biomemory device consisting of recombinant protein molecules. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1), 30-39.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Hornero-Méndez, D., & Pérez-Gálvez, A. (2002). Carotenoids and provitamin A in functional foods. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, 101-157.
- Mohamed, R. G., Elantabli, F. M., Helal, N. H., & El-Medani, S. M. (2015). New group 6 metal carbonyl complexes with 4, 5-dimethyl-N, N-bis (pyridine-2-yl-methylene) benzene-1, 2-diimine Schiff base: Synthesis, spectral, cyclic voltammetry and biological activity studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 141, 316-326.
- Nagao, R., Tomo, T., Noguchi, E., Nakajima, S., Suzuki, T., Okumura, A., ... & Enami, I. (2010). Purification and characterization of a stable oxygen-evolving Photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(2), 160-166.
- Najafpour, M. M., Ghobadi, M. Z., Haghghi, B., Eaton-Rye, J. J., Tomo, T., Shen, J. R., & Allakhverdiev, S. I. (2014). Nano-sized manganese-calcium cluster in photosystem II. *Biochemistry (Moscow)*, 79(4).
- Nanba, O., & Satoh, K. (1987). Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(1), 109-112.
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in colloid and interface science*, 156(1), 1-13.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

- Nicholls, D. G., & Ferguson, S. (2013). *Bioenergetics*. Academic Press. Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 334-348.
- Özkan, İ., 2006, Nanoteknolojik yöntemler ile malzemenin yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi, Y. Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi.
- Plieva, F. M., Ekström, P., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2008). Monolithic cryogels with open porous structure and unique double-continuous macroporous networks. *Soft Matter*, 4(12), 2418-2428.
- Pundir, C. S., Chauhan, N., Kumari, G., Vandana (2010). Immobilization of farthrobacter sarcosine oxidase onto alkylamine and arylamine glass and its application in serum sarcosine determination. *Indian Journal of Biotechnology*, 10, 219-223.
- Purchase, R. L., & de Groot, H. J. M. (2015). Biosolar cells: global artificial photosynthesis needs responsive matrices with quantum coherent kinetic control for high yield. *Interface Focus*, 5(3), 20150014.
- Ramsden, J. (2013). *Applied nanotechnology: the conversion of research results to products*. William Andrew.
- Safari, J., & Zarnegar, Z. (2014). Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(2), 85-99
- Say, R. (2011). Photosensitive amino acid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology. World Intellectual Property Organization–Patent Scope.
- Say, R., Çınar, E., Ünlüer, O. B., & Ersöz, A. (2014). Resuable Pectinase Nano Polymeric Particles. *J Biocatal Biotransformation* 3: 1. of, 5, 2.
- Say, R., Keçili, R., Biçen, Ö., Şişman, F. Y., Hür, D., Denizli, A., & Ersöz, A. (2011). A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. *Process Biochemistry*, 46(8), 1688-1692.
- Schlodder, E., Çetin, M., & Lenzian, F. (2015). Temperature Dependence of the Oxidation Kinetics of Tyr Z and Tyr D in Oxygen-Evolving Photosystem II Complexes throughout the Range from 320K to 5K. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
- Scopes, R. K. (1981). Quantitative studies of ion-exchange and affinity elution chromatography of enzymes. *Analytical biochemistry*, 114(1), 8-18.

- Seibert, M., Yruela, I., & Picorel, R. (2004). Isolation of photosystem II reaction center complexes from plants. In *Photosynthesis Research Protocols* (pp. 53-62). Humana Press.
- Shibamoto, T., Kato, Y., & Watanabe, T. (2008). Spectroelectrochemistry of cytochrome b559 in the D1–D2–Cyt b559 complex from spinach. *FEBS letters*, 582(10), 1490-1494.
- Smith, H. O., Friedman, R., & Venter, J. C. (2003). Biological solutions to renewable energy. *BRIDGE-WASHINGTON*, 33(2), 36-40.
- Tevfik, H. (2005). *Pamuk Prenses ve Katrilyonlarca Cüce*. İstanbul: Can Matbaacılık.
- Thompson, L. K., & Brudvig, G. W. (1988). Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 27(18), 6653-6658.
- Varsamis, D. G., Touloupakis, E., Morlacchi, P., Ghanotakis, D. F., Giardi, M. T., & Cullen, D. C. (2008). Development of a photosystem II-based optical microfluidic sensor for herbicide detection. *Talanta*, 77(1), 42-47.
- Weiss, W. P. ENERGETICS FOR THE PRACTICING NUTRITIONIST.
- Wiesner, M. R., & Bottero, J. Y. (2007). Environmental nanotechnology. *Applications and Impacts of Nanomaterials*, 395-517.
- Yagati, A. K., Lee, T., Min, J., & Choi, J. W. (2013). A robust nanoscale biomemory device composed of recombinant azurin on hexagonally packed Au-nano array. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 283-290.
- Yagati, A. K., Min, J., & Choi, J. W. (2014). Recombinant protein-based nanoscale biomemory devices. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), 433-446.
- Yuan, Y., Zhou, S., Yang, G., & Yu, Z. (2013). Electrochemical biomemory devices based on self-assembled graphene–*Shewanella oneidensis* composite biofilms. *RSC Advances*, 3(41), 18844-18848.
- Zouni, A., Witt, H. T., Kern J., Fromme P., Krauss N., Saenger W. and Orth P., “Crystal Structure of Photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å Resolution”, *Nature*, 409:739-743 (2001).