

**T.C**

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BENZALDEHİT LİYAZ (BAL) ENZİMİNİN MANYETİK  
NANOPARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU VE  
TEPKİMELERİNİN İNCELENMESİ**

**Bülent ÇELEBİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**

**Haziran 2011**

**T.C**

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BENZALDEHİT LİYAZ (BAL) ENZİMİNİN MANYETİK  
NANOPARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU VE  
TEPKİMELERİNİN İNCELENMESİ**

**Bülent ÇELEBİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman: Doç.Dr.Bilsen TURAL**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DIYARBAKIR**

**Haziran 2011**

T.C  
DİCLE UNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

'Benzaldehit Liyaz (BAL) Enziminin Manyetik Nanoparçacıklara İmmobilizasyonu ve Tepkimelerinin İncelenmesi' konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

	Jüri Üyesinin Ünvanı,	Adı Soyadı
Başkan :	Prof. Dr.	Ayhan Sıtkı DEMİR
Üye :	Doç. Dr.	Bilsen TURAL
Üye :	Prof. Dr.	Giray TOPAL

Tez Savunma Sınavı Tarihi:

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

( MÜHÜR )

*Ayhan S. Demir*  
*Bilsen Tural*  
*Giray Topal*

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca her türlü desteğini gördüğüm, bilgi, beceri ve tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Sayın Doç. Dr. Bilsen TURAL'a sabır ve anlayışından dolayı teşekkür ederim.

Aynı zamanda laboratuvar çalışmalarının bazı evrelerinde Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya bölümü araştırma laboratuvarlarında her türlü imkanı ve bilimsel desteği sağlayan değerli hocam sayın Prof. Dr. Ayhan Sıtkı DEMİR'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteklerini gördüğüm Doç. Dr. Servet TURAL'a ve İlke ŞİMŞEK'e teşekkür ederim

Bütün çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım İbrahim YALINKILIÇ'a ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT. ....	V
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
KISALTMA VE SİMGELER.....	VIII
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>1.1.NANOTEKNOLOJİ</b>	1
1.1.1.Nanoteknolojinin Tanımı ve Amaçları	1
1.1.2 Tarihçe.....	3
1.1.3 Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	5
1.2. Nananoparçacıklar.....	6
1.2.1. Üretim Metotları .....	6
1.2.1.1. Mikroheterojen Sistemlerden Nanopartikül Üretimi. ....	8
1.2.1.2. Sol-Jel Yöntemi.....	10
1.2.2.Nanoparçacıkların Kaplanması .....	11
1.3. Manyetik Nanoparçacıklar .....	12
1.3.1. Demiroksit Nanoparçacıkları .....	12
1.3.2. Biyolojik uygulamalarda manyetik nanoparçacıklar .....	15
1.3.3.Manyetik Özellikler .....	16
1.3.3.1. Paramanyetizma .....	16
1.3.3.2 Ferrimanyetizma .....	16
1.3.3.3 Ferromanyetizma.....	16
1.3.3.4 Antiferromanyetizma .....	17
1.3.3.5. Süperparamanyetizma.....	17
1.4. İmmobilizasyon.....	18
1.4.1. Enzimlerin İmmobilizasyonu .....	18
1.4.2.Metal Afiniti Kromatografi (IMAC).....	21
1.4.2.1. IMAC'ta Enzim immobilizasyonu .....	21
1.4.2.2. IMAC uygulamalarında metal-protein etkileşiminin kullanılması .....	22
1.5. Benzaldehit liyaz .....	22
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>25</b>

<b>3.MATERYAL-METHOD</b> .....	27
3.1. Materyal .....	27
3.2.Metod .....	27
3.3.Manyetik Reçine hazırlanması.....	28
3.3.1. Manyetik Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının sentezlenmesi.....	28
3.3.2. Silika kaplı manyetik Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının .....	28
3.3.3. Epoksi-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının sentezlenmesi.....	28
3.4. Benzaldehid Liyaz Enziminin İmmobilizasyonu .....	29
3.4.1.Recombinant BAL Hazırlanışı.....	29
3.4.2.Benzaldehit Liyaz Enziminin Epoksi Reçineye Bağlanması .....	29
3.4.3.İmmobilizasyona Süre ve pH' ın Etkisi .....	30
3.5.Kovalent Olarak İmmobilize edilen BAL Reaksiyonları.....	31
3.5.1.Substrat Miktarının Optimizasyonu .....	31
3.5.2. (R)-2-hydroxy-1,2-diphenyl-1-one'nin sentezi:.....	32
3.5.3. (R )-2-hydroxy-1-phenyl propanone Sentezi. ....	32
3.5.4. Rac. benzoin and asetaldehiden (R)-2-hidroksi-1-fenilpropanon [(R)-2 HPP]'nın Sentezi.....	33
3.6.Standartlar ve Kalibrasyon.....	34
3.6.1. Bradford Method.....	34
3.6.2.Benzoin Kalibrasyonu.....	35
<b>4.BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	37
4.1. Manyetik Reçinenin Karakterizasyonu.....	37
4.2. Benzaldehid Liyaz Enziminin Yüzeye Tutuklanması.....	39
4.2.1.Benzoin Kondenzasyon Reaksiyonu.....	40
4.2.2. 2-Hidroksipropiyofenon (HPP) Sentezi .....	42
4.2.3. Rac.-Benzoin'in Kinetik Rezolüsyonu.....	43
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	45
<b>6.KAYNAKLAR</b> .....	47
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	55

## ÖZET

# BENZALDEHİT LİYAZ (BAL) ENZİMİNİN MANYETİK NANOPARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU VE TEPKİMELERİNİN İNCELENMESİ

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bülent ÇELEBİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

2011

Epoksi grupları tutturulmuş  $Fe_3O_4-SiO_2$  manyetik nanoparçacıklar, Benzaldehid Liyaz (BAL, EC 4.1.2.38) enziminin immobilizasyonu için 3-glycidylxypropyl trimethoxysilane (GPTMS) ile modifiye edilmiştir. Öncelikle manyetik nanoparçacıklar birlikte çökme yöntemi ile bazik ortamda  $Fe^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$ 'ün çöktürülmesiyle sentezlenmiştir. Daha sonra  $Fe_3O_4-SiO_2$  nanoparçacıklar elde etmek için silika sol-jel metodu kullanılarak  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının üzerine kaplanmıştır. Bu işlemi takiben GPTMS,  $Fe_3O_4-SiO_2$  nanoparçacıklarının yüzeyine immobilize edilmiştir. Epoksi grupları tutturulmuş  $Fe_3O_4-SiO_2$  manyetik nanoparçacıkları karakterize etmek için X-Işını Difraksiyonu (XRD), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın spektroskopisi (FT-IR) yöntemi kullanılmıştır. Silika-kaplı manyetik nanoparçacıkların boyutları Scherrer denkleminde 11,8 nm olarak hesaplanmıştır. TEM görüntüsünden parçacıkların ortalama 10-11 nm boyutunda, homojen bir dağılımda ve Scherrer denkleminde elde edilen sonuçla uyum içinde olduğu tespit edilmiştir. FTIR sonuçları manyetik nanoparçacıkların yüzeyine epoksi gruplarının başarılı bir şekilde tutturulduğunu göstermiştir.

Histidin kuyruklu rekombinant BAL, benzaldehidin açiloin kondenzasyon reaksiyonlarını katalizlemek için yüzeyi değiştirilmiş manyetik nanoparçacıklara kovalent bağlanma yoluyla immobilize edilmiştir. Bu sistem benzaldehitin homo açiloin ve benzaldehit-asetaldehit heteroaçiloin kenetlenme tepkimeleri için denenmiş ve yüksek verim ve enansiyoseçicilik ile ürünler elde edilmiştir (%98-≥99ee, %90 verim). Aynı sistem rasemik benzoinin asetaldehit kinetik ayrıştırma tepkimesinde de denenmiş aynı şekilde ürünler yüksek seçicilik ve verimle elde edilmiştir. Bütün reaksiyonlar da BAL-epoksi destek sistem, yüksek enantioselektivite ve yüksek verim ile hem C-C bağ oluşumu ve hemde kırılması reaksiyonlarını katalizleyebilmiştir. Kesin ürün konfügrasyonları (*R*) olarak belirlenmiştir. Uygulaması basit olan manyetik, heterojen biyokatalizör ile yapılan karboligasyon reaksiyonlarından elde edilen sonuçlar saf enzim katalizli reaksiyonlarla karşılaştırılmıştır.

BAL-epoksi destek sistemin diğer avantajları, kullanım kolaylığı ve tekrar kullanılabilirliğidir.

**Anahtar Kelimeler:** Magnetit, manyetik nanoparçacıklar, yüzey modifikasyonu, immobilizasyon, histidin etiketli benzaldehit liyaz (BAL) enzimi, manyetik saflaştırma

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF BENZALDEHYDE LYASE (BAL, EC 4.1.2.38) IMMOBILIZATION AND REACTIONS ON MAGNETIC NANOPARTICLES

MSC THESIS

Bülent ÇELEBİ

DİCLE UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2011

Epoxy-functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  core-shell magnetic nanoparticles were prepared by modification with glycidyoxypropyl trimethoxysilane (GPTMS) for direct benzaldehyde lyase enzyme (BAL, EC 4.1.2.38) immobilization. First, magnetite nanoparticles were synthesized by co-precipitating  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  in an ammonia solution. Then silica was coated on the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles using a sol-gel method to obtain magnetic silica nanoparticles. The condensation product of 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) was immobilized on them. The epoxy coated magnetic silica were applied for the covalent immobilization of BAL. X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) methods were used to characterize the epoxy-functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  core-shell magnetic nanoparticles. XRD (Scherer's equation) and TEM results indicate that the primary particle size of magnetite was around 11 nm. FTIR results indicate that epoxysilane was attached successfully to the surface of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  core-shell magnetic nanoparticles.

Histidine-tagged recombinant benzaldehyde lyase (BAL, EC 4.1.2.38) was efficiently immobilized to surface-modified magnetic particles with covalent binding that was used to catalyze the self acyloin condensation reaction of benzaldehyde and cross acyloin condensation reaction of benzaldehyde with acetaldehyde. The same system was used for kinetic resolution of racemic benzoin with acetaldehyde and high yield and selectivity was obtained. In all the reactions, the BALepoxy support system was able to catalyze both C-C bond forming and breaking reactions with high yield and high enantioselectivity (98- $\geq$ 99% ee, 90% yield). The absolute configuration of the products is assigned as (*R*). The results obtained from the carboligation reactions that were performed with this simple and convenient heterogeneous biocatalyst were comparable to that of free enzyme-catalyzed reactions.

Additional advantages are its reusability and it is easy to work with.

**Keywords:** Magnetite; magnetic nanoparticles; surface modification, Benzaldehyde lyase (BAL) enzyme, magnetic purification



## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge1.1. Mikroheterjen sisteme ait nanopartikül üretimi	9
Çizelge 1.2. Farklı özellik gösteren manyetik tanecikler	13
Çizelge 3.1. Bradford yöntemi ile enzim-reçine sistemi	31

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1. Nanoteknolojinin uygulama Alanları	6
Şekil 1. 2. Aşağıdan-yukarıya üretim yaklaşımı	7
Şekil 1. 3. Manyetik özellikte nanopartiküllerin sentezlenmesi	10
Şekil 1. 4. Sol-Jel Yöntemi	11
Şekil 1. 5. Manyetitin kristal yapısı	14
Şekil 1. 6. Manyetik dipollerin farklı yönlenmeleri: (a) paramanyetik (b) ferromanyetik (c) antiferromanyetik ve (d) ferrimanyetik	17
Şekil 1.7. Koersivite (H <sub>c</sub> ) ile parçacık boyutu arasındaki ilişki	18
Şekil 1. 8. Enzim immobizasyon yöntemleri (Telefoncu, 1986)	20
Şekil 1. 9. Katalitik BAL mekanizması(Şimşek 2009)	23
Şekil 3. 1. Epoksi-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının yüzey modifikasyonu	29
Şekil 3. 2. BAL enziminin immobilizasyonu	30
Şekil 3. 3. Bovin Serum Albumin Kalibrasyon Grafiği	34
Şekil 3. 4. Benzoin Kalibrasyon Grafiği	35
Şekil 4. 1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -silika parçacıkları için X-Işını deseni	37
Şekil 4. 2. FT-IR Spektrumu	38
Şekil 4. 3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Silika Nanoparçacıkların Aydınlık TEM Resmi	39
Şekil 4. 4. BAL-Manyetik Reçine'nin Manyetik Alanla Etkileşimi	40
Şekil 4. 5. İmmobilize BAL Enziminin Katalizlediği Benzoin Kondenzasyon Reaksiyonu	40
Şekil 4. 6. Benzoin Eldesinin Zamana Karşı Konsantrasyon Grafiği	41
Şekil 4. 7. Benzoin Konsantrasyonunun Deneme Sayısına Karşı Grafiği	42
Şekil 4. 8. (R)-2-hidroksi-1-fenil propanon Sentezi	42
Şekil 4. 9. rac.-benzoin'nin kinetik rezolüsyonu	43

## KISALTMA VE SİMGELER

TTM	:Taramalı tünelleme mikroskobunu
TİM	:Tarayıcı iğne mikroskobu
AKM	: Atomik kuvvet mikroskobu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskopisi
Hc	: Koersivite
IMAC	: Metal afiniti kromatografi
GPTMS	: 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane
TEOS	: Tetraethyl orthosilicate
FT-IR	: Fourier dönüşümlü infrared
XRD	: X-Işını Difraksiyonu
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
PMA	: Fosfomolibdikasit
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
TMS	: Tetrametilsilan
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
BAL	: Benzaldehid Liyaz
LB	: Luria Broth
HPP	: 2-Hidroksipropiyofenon
FM	: Ferrimanyetik
AFM	: Antiferrimanyetik
Tc	: Küri sıcaklığı
S	: Doyum manyetizasyonu

## 1. GİRİŞ

### 1.1.NANOTEKNOLOJİ

#### 1.1.1.Nanoteknolojinin Tanımı ve Amaçları

Nanoteknoloji, atom ve moleküllerle oynayan bir teknolojidir. Atom ve molekülleri tek tek manipüle ederek istenilen yapının oluşturulması ilkesine dayanır. Atomlar ayrı ayrı işleme tabii tutulur. Yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturmaktadır. Nanoteknoloji de bu bağlamda “çok küçük maddelerin teknolojisi” olmaktadır (Özdoğan ve ark, 2006b; Balcı, 2006). 1 nanometre, hidrojen atomunun çapının sadece 10 katıdır. Nanoteknoloji kapsamına giren malzemeler için 100 ile 1 nanometre (nm) (1/10 milyon metre ile 1/1 milyar metre) arasındaki herhangi bir büyüklük (uzunluk, genişlik veya kalınlık) ifade edilmektedir. Sadece bir tek boyutu nanometre mertebesinde olsa da, ultra incelikteki kaplamalar da nanoteknoloji kapsamındadırlar. Örneğin bu durum, seramiklerde (kendi kendini temizleyen seramik taşları), duvar renklerinde (kendi kendini temizleyen ev cepheleri) veya camlarda kendini göstermektedir. (Kut ve Güneşoğlu 2005, Anonymous 2004). Nanoparçacıklar virüslerden yüz defa daha küçüktürler, böylece insan gözü tarafından algılanamamaktadırlar. Aşırı derecede küçük boyutlara sahip bu yapılar için, çevremizdeki nesnelere için fiziksel ve kimyasal yasalar geçerli değildir. Yani belli bir hacim kaplayan bir madde bir veya birden fazla boyutta (uzunluk, genişlik veya kalınlık) nanometre ebatlarında veya bundan daha küçük parçacıklara bölündüğünde, taneciklerin her biri kendi başına en başta belli bir hacmi olan bu maddenin özelliklerinden çok farklı ve beklenmedik özelliklere sahip olmaktadır. Örneğin, nano ölçekteki malzemelerin iletim özellikleri (momentum, enerji ve kütle) artık sürekli olarak değil ancak kesikli olarak tarif edilmektedir. Benzer olarak, optik, elektronik, manyetik ve kimyasal davranışlar klasik değil kuantum olarak tanımlanmaktadır (Anonymous 2004, Qian ve Hinestroza 2004, Özdoğan ve ark 2006b). Normalde kırılma bir malzeme olan seramik, tanecik büyüklüğü nanometre değerine indirildiğinde kolaylıkla deforme olup şekillendirilebilmektedir. 1 nm büyüklüğündeki altın tanesi kırmızı renk göstermektedir. (Kut ve Güneşoğlu 2005).

Nanoteknoloji; oldukça ucuz, oldukça güvenilir, oldukça temiz ve finansal karşılığı oldukça yüksek olduğu için önemlidir (Naschie 2006). Günümüzde maddeyi nanometre seviyesinde işleyerek ve ortaya çıkan değişik özellikleri kullanarak, yeni teknolojik nano-ölçekte aygıtlar ve malzemeler yapmak mümkün olmaktadır. Örneğin, tarama ve atomik kuvvet mikroskoplarını kullanarak yüzey üzerinde atomları iterek birbirinden ayırmak ve istenilen şekilde dizmek mümkün olmaktadır. Nanoteknoloji, her alanda, daha dayanıklı, daha hafif ve doğaya daha az zarar vererek üretim yapılmasını sağlayacak bir teknolojidir. Nanoteknolojinin sağlayacağı imkanlar kısaca şöyle sıralanabilir

- Her atomu tam istenilen yere yerleştirme imkanı
- Fizik ve kimya kurallarının mümkün kıldığı hemen hemen her şeyi atom seviyesinde üretebilme imkanı
- Üretim maliyetlerinin ham madde maliyetlerini geçmediği ekonomik üretim imkanı

Nano boyut, ürüne yeni ve ilginç özellikler kazandırmaktadır. Ancak bunun yanında, güvenlik açısından da tehdit edici bir unsur olmaktadır. Nanobilim ve nanoteknolojinin sağlık ve çevre açısından tehlike unsuru olabileceği endişesi de mevcuttur. Bu endişelerin temel kaynağını, nano ürünlerin çok küçük boyutları nedeniyle beklenmeyen etkileşimlere neden olabilmeleri tehlikesi oluşturmaktadır (Süpüren ve ark 2007b). Büyük nesnelere dağılan/bağlanan nano malzemeler çevreye yayılmadıkları için sağlık ve emniyet açısından bir risk oluşturmazlar. Ancak nano parçaların ve nano tüplerin üretimi esnasında oluşan malzeme, malzeme üzerine bağlanmadığından serbesttir ve etrafa yayılabilir; bu nedenle de zararlı olabilmektedir. Nano parçaların yemesi, solunması veya deri yoluyla vücuda girmesi hücrelere zarar verebilir. (Köse ve ark. 2007). Nanoteknoloji ürünü bir malzemenin üretimi, yeni bir kimyasal maddenin üretimine benzerdir. Nanoteknoloji ürünlerinin, sağlık açısından potansiyel riskleri sebebiyle, bu konudaki mevcut bilginin geliştirilmesine ve toksikoloji (zehir bilim) ve ekotoksikoloji hakkında, nanoteknolojiye özel bir veri tabanı oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Süpüren ve ark. 2007b). Nanoteknoloji, içinde bulunduğumuz yüzyılda hayatın her alanında devrim niteliğinde değişikliklere sebep olacak önemli bir teknolojik alandır. Geçtiğimiz yüzyılda antibiyotik, plastik,

televizyon, nükleer teknoloji ve bilgisayar teknolojisinin sebep olduğu köklü değişimlere benzer şekilde değişimler yaratacağı kabul edilmektedir

Nanoteknolojinin amaçları aşağıda verilmiştir (Bozkaya 2006b)

- Nanometre ölçekli yapıların analizi,
- Nanometre boyutunda yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması,
- Nanometre ölçekli yapıların imalatı,
- Nano hassasiyetli cihazların geliştirilmesi,
- Nano ölçekli cihazların geliştirilmesi,
- Uygun yöntemler bulunarak nanoskopik ve makroskopik dünya arasındaki bağın kurulması,
- Alışıldandan farklı ve üstün malzeme özellikleri /üretim süreçlerinin elde edilmesi,
- Daha dayanıklı, daha hafif, daha hızlı yapılar,
- Daha az malzeme ve enerji kullanımı.

### 1.1.2. Tarihçe

Bilim insanları genellikle, nano-ölçeğin öneminin ilk kabul edilmesini, Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman'ın (1918-1988) 29 Aralık 1959'da, Amerikan Fizik Topluluğu'nun Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde (Caltech) gerçekleştirilen yıllık toplantısında verdiği konuşmaya dayandırır( Feynman 1959.) Özetle, bu tarihi konuşmasında Feynman, şunları öngörmüştür.

- 24 ciltlik Brittanica Ansiklopedisini bir toplu iğne başına neden yazmayalım?
- Küçük ölçekte bilgi
- Daha iyi elektron mikroskobu
- Fevkalade biyolojik yapılar
- Bilgisayarı minyatürleştirme

- Buharlaştırma yolu ile minyatürleştirme
- Sürtünme sorunları
- Yüzlerce minik el
- Atomları aniden organize etme
- Küçük bir dünyada atomlar (Erkoç,. 2007)

“Nanoteknoloji” terimini 1974 yılına kadar kimse kullanmamıştır. 1974 yılında ise Japon Norio Taniguchi adındaki bir araştırmacı kullanmıştır. 1980’lerde, moleküler imalata ait temel fikirler, K. Eric Drexler’in “Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı” adlı makalesinde ortaya koyulmuştur. 1981’de “taramalı tünelleme mikroskobunun” icat edilmesi, bilim insanlarına yapıları nanoölçekte manipüle etme ve bunların görüntülerini alma olanağı sağlamıştır. Bundan sonra, 1985’de “fullerenlerin” keşfi ve 1986’da da “atomik kuvvet mikroskobunun” icat edilmesi, nanobilimle nanoteknolojide asıl dönüm noktaları olmuş ve bunların, bilimle teknolojinin en fazla gelecek vadeden dallarını oluşturmak üzere evrimleşmelerinin önünü açmıştır. Nanoteknoloji alanındaki asıl gelişme, IBM’deki Gerd Binnig ve Heinrich Röhrer’in (1986 Nobel ödülü) 1981’de, hem malzemeleri atomik düzlemde incelemeye hem de bunları atomik ölçekte manipüle etmeye yarayan ilk aygıt olan “taramalı tünelleme mikroskobunu” (TTM) icat etmeleriyle olmuştur. “Tarayıcı iğne mikroskobu” (TİM), “atomik kuvvet mikroskobu” (AKM), “yakın alan mikroskopisi” ya da “taramalı elektron mikroskopisi” (TEM) gibi aygıtlar, atomik bağlanmanın, moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmeleri ve malzemelerin en küçük ölçekteki yapılarının işleyişiyle ilgili görüntüler sağlamışlar ve atomik manipülasyonu kimyanın ‘deney beherinden’ çıkarıp mühendislik dünyasına taşımışlardır (Sharifzadeh 2006). Nanoteknoloji tarihindeki bir diğer dönüm noktası, Curl Kroto ve Smalley’in 1985’teki çalışmalarının sonucu ürettikleri, yeni nano-yapılı karbon modifikasyonu olan, ‘Buckyball’ olarak da adlandırılan, futbol topu biçimindeki “fullerenlerin” keşfidir. 1991’de ise, fullerenlerle ilgili çalışmaların sonucunda, temelde kenarları silindirik oluşturacak şekilde yuvarlanmış grafit tabakalardan oluşan ve olağanüstü özellikleri

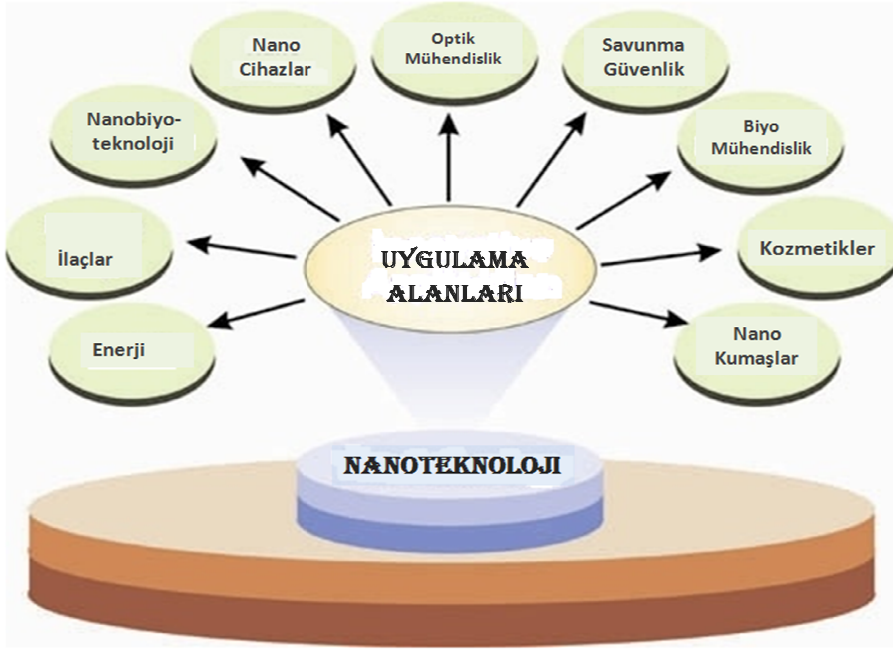
nedeniyle elektronik malzeme mühendisliğinde muazzam uygulama potansiyeli olduğu öngörülen, karbon atomlarının tüpe benzer yapılarının keşfi gerçekleşmiştir.

Şu an nanoteknolojinin 2. devresinin sonlarındayız. Nanoteknoloji hayatımıza girdi diyebiliriz. Dizüstü bilgisayarlarımızdaki çift çekirdekli işlemciler, iPod Nano'da kullanılan hafıza teknolojisi birer nanoteknolojik ürün. **2010** yılı itibari ile **3. nesil**, **2020** yılı itibari ile de **4. nesil** nanoteknolojik ürünlerin çıkması bekleniyor. 2. nesil nanoteknolojik ürünler pasif nanoürünler olarak tanımlanıyor. Pasif nanoürünler malzemelere nanoyapılarla ek özellik (suyu itme, güzel koku salma vs.) katılan ürünler anlamına geliyor. 3. ve 4. nesilde biraz daha farklı ve aktif nanoürünlerle karşılaşacağız (Fanfair ve ark 2007)

### **1.1.3.Nanoteknolojinin Uygulama Alanları**

Nanoteknoloji yavaş yavaş hayatımıza girmektedir. Şu an nanoteknolojinin 3. Devresindeyiz. 2020 yılı itibari ile de 4. nesil nanoteknolojik ürünlerin çıkması bekleniyor. ABD'de de bulunan Project On Emerging Nanotechnologies adlı kurumun internette yayınladığı listede Ocak 2009 itibari ile 803 nanoteknolojik ürün bulunmaktadır.( Rodgers 2006) Listede sağlık, tekstil, elektronik, otomotiv, gıda ürünlerinden örnekler bulunmaktadır. Günümüzdeki nanoürünlerin çoğu var olan bir malzemeye nanoyapılarla suyu itme, güzel koku salma gibi ek özellikler eklenmiş halidir. Nanoteknoloji çeşitli alanlarda uygulanmaktadır. Şekil 1.1. nanoteknolojinin uygulama alanlarını göstermektedir.



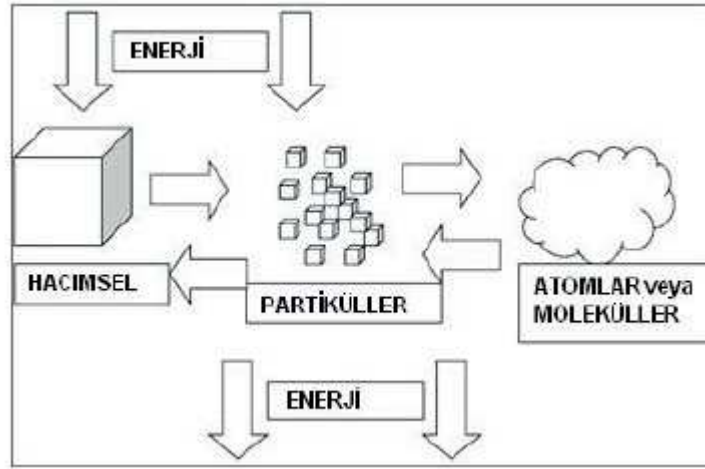


Şekil 1. 1 Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

## 1.2.Nanoparçacıklar

### 1.2.1.Üretim Metotları

Nanoteknoloji çeşitli alanlarda uygulanmaktadır. Nanometre ölçeğinde kontrol sağlamak amacıyla, uygulama alanları için uygun olan teknikler ve özel üretim enstrümantasyonları, kontrol ve ölçümler geliştirilmektedir. Üretim iki ana yol izlenerek yapılabilir “**yukarıdan-aşağıya üretim yaklaşımı**” (özel işleme ve kimyasal aşındırma teknikleriyle -litografi, son derece kusursuz yüzey şekillendirme- mikroskobik elementlerin yapısal boyutlarını nanometre ölçeğine indirmek), “**aşağıdan-yukarıya üretim yaklaşımı**” (atomik ve moleküler agregaların daha büyük sistemler -kümeler, organik örgüler, supramoleküler yapılar ve sentezlenmiş makro-moleküller- oluşturacak şekilde kontrollü olarak bir arada toplanacak şekilde düzenlenmesi).



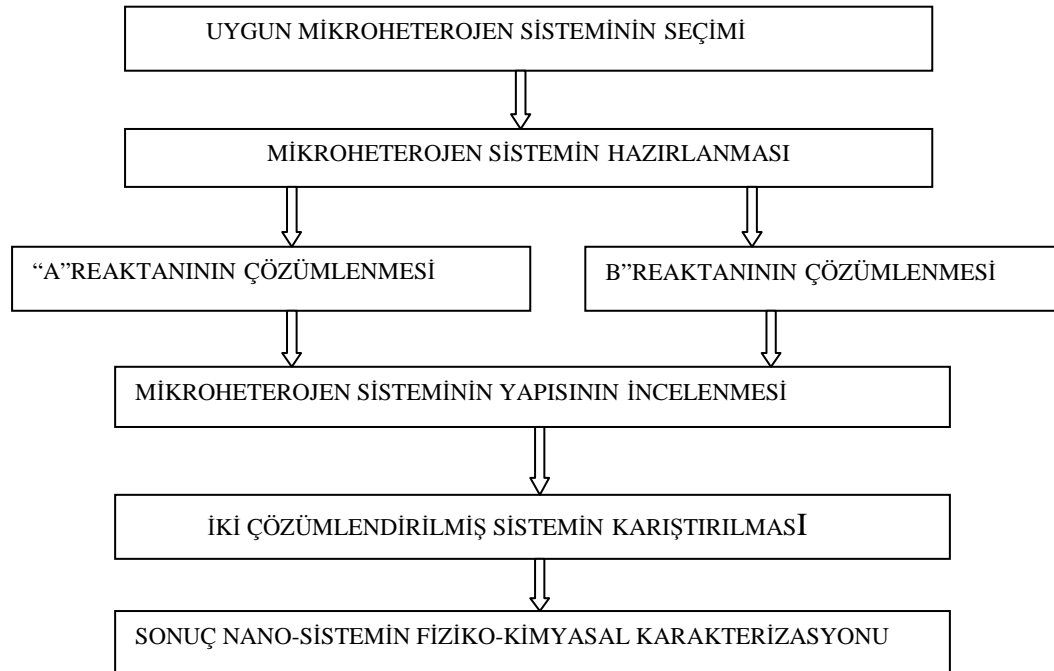
Şekil 1. 2 Aşağıdan-Yukarıya Üretim Yaklaşımı

Yukarıdan aşağıya yaklaşımına dahil olan yöntemlerde hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınmaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı ile çalışan yöntemlere verilebilecek en genel örnekler; mekanik öğütme ve aşındırma olabilir. Bu tekniklerde klasik öğütme işlemlerinden çok daha fazla enerji tüketimi gerçekleştiğinden yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Aşağıdan yukarıya yaklaşımına dahil yöntemler ise; atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütürük partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanokristalin metal ve alaşımlarının üretiminde kullanılan ilk yöntem olan gaz yoğunlaştırma tekniği aşağıdan yukarıya yaklaşımıyla çalışmaktadır. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprey piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleridir. Partikül üretiminde kullanılan yöntemlerin yukarıda açıklanan ayırım dışında fiziksel veya kimyasal temelli olarak da iki ayrı sınıflandırılması mümkündür. Mekanik enerjinin kullanıldığı gibi fiziksel özelliklerin ön plana çıktığı yöntemler fiziksel ve kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği yöntemler ise kimyasal temelli olarak kabul edilmektedir (Luther 2004).

### **1.2.1.1. Mikroheterojen Sistemlerden Nanopartikül Üretimi:**

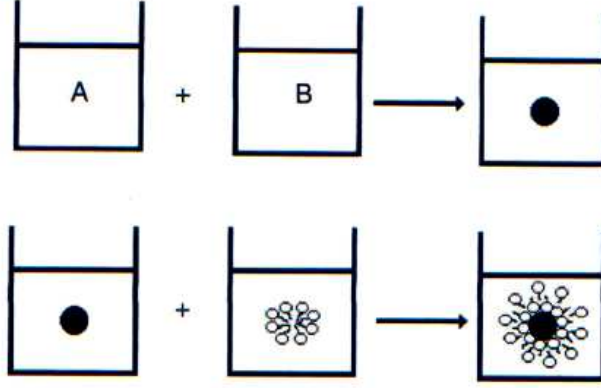
Aşağıdan yukarıya yaklaşımla moleküler seviyeden nanopartikül üretimi için kullanılan sentetik metotlar, farklı mikroheterojen sistemlerin kullanımını temel alır. Bahsedilen mikroheterojen sistemler sıvı kristaller, jeller, misel çözeltileri ve mikroemülsiyonlar formunda olabilirler. Bunlar hızlı ve düşük maliyetli teknikler olup, metaller, oksitler, sülfatlar ve suda çözünmeyen maddeler ile birlikte suda çözünebilir inorganik ve organik malzemelerin nano boyutta sentezlenmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca yöntem, çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç veya poröz nanopartiküllerin üretiminde kolaylıkla kullanılabilir. Mikroheterojen sistemler son ürün olarak pratik uygulamalara sahiptir. Manyetik, elektrik, ısıtma ve/veya yağlayıcı özelliklere sahip olabilen ve günden güne ilginin arttığı bu tür sistemlere nano akışkanlar denmektedir. Özellikle manyetik nano akışkanlar günümüzde medikal sektörden otomotiv sektörüne kadar geniş kullanım alanı bulmuştur. Nanopartiküllerin mikroheterojen sistemler içerisinde sentezlenmesi birbirini takip eden işlemler sonucu gerçekleşmektedir. Yöntemin en önemli adımları istenen nanomalzemeye göre uygun mikroheterojen sistemin seçilmesi, reaktanların çözülmesinden sonra yapılarının incelenmesi ve karıştırma işlemi ve zaman bağımlılığından ortaya çıkan sistemin fiziko-kimyasal özelliklerinin karakterizasyonudur. Aşağıdaki mikroheterojen sisteme ait nanopartikül üretim akış diyagramı verilmektedir.

Çizelge1.1. Mikroheterojen sisteme ait nanopartikül üretimi



Genellikle oda sıcaklığında gerçekleşen sentezlenme işlemi ince boyutu, polidispersiteye ve 1D, 2D ve 3D nanopartikül dizilimlerinin hazırlanmasına izin verir. Ayrıca atomik/moleküler boyuttan nanopartikül sentezi yaklaşımına dayandığı için uygun mikroheterojen sistem seçimiyle nanopartikül boyut ve şekli kontrol edilmektedir. Bu yöntem, metalik nanopartiküllerin ve demir içeren manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi için elverişlidir. Buna en genel örnek olarak manyetik  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanopartiküllerinin mikroheterojen sistem ailesinde bulunan sıvı kristaller içerisinde üretilmesi verilebilir. Bu işlemde, demir oksit tozları Fe (III) ve Fe (II) tuzlarının sulu çözeltilerine alkali ilavesini takiben ferrik nitrat ile asitleştirme ve oksitlenme sonucu sentezlenmektedirler. Sıvı kristaller içerisinde nanopartikül sentezlenebilir. Ayrıca aynı partiküllerin  $\text{FeCl}_3$  ve  $\text{NaOH}$  içeren sulu çözeltilerden farklı bir mikroheterojen sistemi olan tek ve çok katlı katmanlardan sentezlemeleri de mümkündür. Manyetik özellikte ve 10 nm boyutlarına sahip  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  nanopartikülleri sodyum dodesilsülfat çözeltilerinin içerisine  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ve  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  eklenmesini takiben

NaOH ilavesi ile sulu misel çözeltilerinden aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi sentezlenmektedirler.



Şekil 1. 3 Manyetik özellikte nanopartiküllerin sentezlenmesi

Özetle verilen örneklerde olduğu gibi metalik, yarıiletken, manyetik nanopartiküller farklı çözeltiler içerisinde rahatlıkla üretilebilirler.

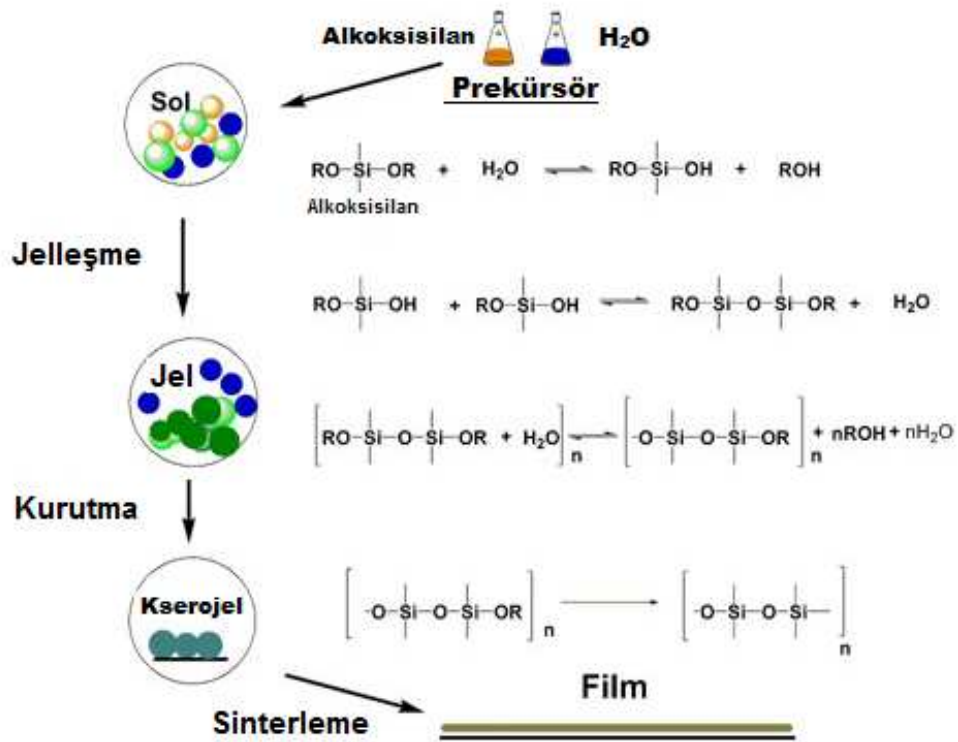
#### 1.2.1.2. Sol-Jel Yöntemi

Sol-jel yöntemi, teknolojik öneme sahip olmasından dolayı birçok alanda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Sahip olduğu avantajlardan dolayı günümüzde kullanımı gittikçe artmaktadır. Sol-jel uygulamalarında kullanılan terimlerin tanımları şöyle yapılabilir. Sol, sıvı içerisinde koloidal katı taneciklerinin kararlı bir süspansiyonudur. Bu katı tanecikleri, yerçekiminden daha büyük dispersiyon kuvvetlerinden sorumlu olduğundan yeterince küçük olmalıdır. Kolloid olarak tanımlanan tanecikler gözle görülemeyecek kadar küçük 500 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) ve daha altındaki boyutlara sahip taneciklerdir. Jel ise Kolloidal parçacıkların çöktürülmesiyle elde edilen ve bol miktarda su içeren çökeklere denir. Jel, katı ve sıvı faz arasında bir ara fazdır (Brinker ve Schere 1990).

Sol-jel prosesinde metal alkoksit çözeltileri veya metal tozları, nitratlar, hidroksitler ve oksitler gibi inorganik bileşiklerin belirli oranlarda su ve asitle birleştirilerek bir solüsyon meydana getirilmesi ve bu solüsyonun belirli sıcaklıklarda karıştırılması neticesinde solüsyon içerisinde birbirini izleyen bir dizi kimyasal

reaksiyon ve taneciklerin sahip olduğu yüzey yüklerinin elektro kimyasal etkileşimleri ile bir ağ meydana gelmesi (jelleşme) ve bu ağın gitgide büyüyüp sistem içerisindeki bütün noktalara ulaşarak komple bir yapı (jel) meydana getirmesidir.

Sol-jel sentezlenmesi, zamana bağlı bir dizi işlem adımı ile oluşur. İlk adım çözelti oluşturma adımıdır. Bu adımda çeşitli başlangıç maddeleri, uygun çözücülerle reaksiyonu neticesinde homojen çözeltiler hazırlanır. Tipik olarak çözelti hazırlama kademesinden sonra nihai yoğun ürüne kadar sol-jel prosesi hidroliz, polimerizasyon, yoğunlaşma, jelleşme, yıkama ve yaşlandırma şeklindedir. Sol-jel yönteminin basamakları Şekil 1.4 de görüldüğü gibi alkoksit hidrolizi, peptidleşme veya polimerizasyon, jel eldesi ve sinterleme şeklindedir.



Şekil 1.4 Sol-Jel Yöntemi

### 1.2.2. Nanoparçacıkların Kaplanması

Alkanetioller, polimerler ve proteinler de olmak üzere, birçok kimyasal bileşik, nanoparçacıkların kaplanmasında kullanılabilecek malzemeler olarak belirlenmiştir. Burada, etkisizleştirici gruplar ve parçacıklar kullanılarak tepkimelerin kontrol edilmesi

temel meseledir, çünkü atomik yapıların kesin ve hassas kimyasal kontrolünü oluşturmak zordur. Metalik parçacıkların oksitlenme potansiyeli oldukça yüksektir ve bu nedenle de normalde bunların, uygun pasif yüzey katmanlarıyla istikrarlaştırılması gereklidir. Gelecek vaat eden bir teknik de, çekirdek/kabuk nanoparçacıklarının, ark-deşarjı vs. çeşitli gaz fazı sentezi metotlarıyla hazırlanması olabilir. Etkisizleştirme işlemi, nanoparçacıkları ortam havasına maruz bırakmadan önce gerçekleştirilmelidir. Nanoparçacıkların çeşitli hidrofilik / fobik maddelerle kaplanması bir diğer önemli konudur. Uzmanların fikirlerine göre, bu alan oldukça gelişme gösteren bir aşamadır.

Nanoparçacıkların kaplanması için nispeten standart olan kimyasal işlemler uygulanabilir. Silikat nanoparçacıklarının kaplanması için, üzerinde düşünülmesi gereken temel konu, silikatları çeşitli polimerlerle uyumlu hale getirmek için uygun olan kimyasalın bulunmasıdır. (Willems and van der Willenberg 2005).

### **1.3. Manyetik Nanoparçacıklar**

#### **1.3.1. Demiroksit Nanoparçacıkları**

Demiroksitler, farklı kimyasal bileşenlere ve manyetik özelliklere sahiptirler. Bulk halde ferrimanyetizma gösteren  $Fe_3O_4$ ,  $\gamma-Fe_2O_3$ ,  $MO.Fe_2O_3$  (M= Co, Ni, Mn vb.) gibi oksitler nanoboyutta süperparamanyetizma gösterirler. Uygun yüzey kimyasına sahip süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları biyoyumlu oldukları için, MRI kontrast arttırıcı, doku tamiri, biyokimyasal testler, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, hipertermia, ilaç salınımı, ve hücre ayırma gibi çeşitli in vivo uygulamalarda kullanılabilirler. Bu biyomedikal uygulamaların tamamında nanoparçacıkların yüksek manyetizasyon değerlerine, 100 nm den küçük bir boyuta ve dar bir parçacık boyut dağılımına sahip olması gerekir.

Çizelge 1.2. Farklı özellik gösteren manyetik tanecikler

Mineral	Bileşim	Manyetik Düzen	T <sub>c</sub> (°C)	S(Am <sup>2</sup> /kg)
Manyetit	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	FM	575-585	90-92
Ulvospinel	Fe <sub>2</sub> Ti O <sub>2</sub>	AFM	-153	
Hematit	α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Canted AFM	675	0,4
Ilmenit	FeTi O <sub>2</sub>	AFM	-233	
Maghemit	γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	FM	600	80
Jacobsit	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	FM	300	77
Thevorit	NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	FM	585	51
Magnesioferrit	MgFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	FM	440	21
Gothit	α-FeOOH	AFM,Zayıf FM	120	<1
Lepidokrokit	γ-FeOOH	AFM	-196	
Feroksihit	δ'-FeOOH	FM	180	<10

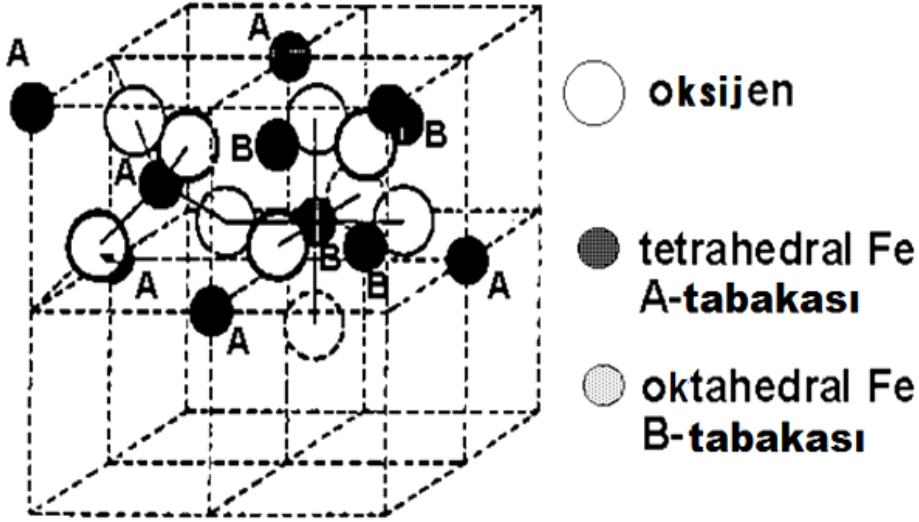
FM: Ferrimanyetik AFM: Antiferrimanyetik , T<sub>c</sub>: Küri sıcaklığı S : Doyum manyetizasyon

Ferrimanyetik demiroksitler, ferromanyetik maddelere göre daha az manyetizasyon göstermelerine rağmen oksidasyona karşı dayanıklı olduklarından daha çok uygulama alanı bulurlar. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (manyetit) ve γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit) en genel ve en



çok araştırılan demiroksitlerdir.  $MO.Fe_2O_3$  tipi metal karışımı ferritler de partikül şekli ve tek domain yapısı nedeniyle elektronik uygulamalar için geliştirilmiştir.

Tabloda görüldüğü gibi manyetit ve maghemit benzer fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir. Her ikisi de ferrimanyetik özellik göstermesine rağmen maghemit daha düşük doyum manyetizasyonuna sahiptir. Bunların manyetizasyonları alt örgü etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Maghemit sadece  $Fe^{+3}$  iyonlarından oluşur ve kristal yapısında  $Fe^{+3}$  iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı da oktahedral düzenlenmiştir. Manyetit ise 1:2 molar oranında  $Fe^{+3}$  ve  $Fe^{+2}$  iyonlarından oluşmaktadır.  $Fe^{+3}$  iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı da oktahedral ve  $Fe^{+2}$  iyonlarının hepsi oktahedral düzenlenmiştir.

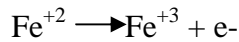


Şekil 1. 5 Manyetitin Kristal Yapısı

Şekil 1.5'de görüldüğü gibi manyetit, oksijen iyonlarının her üç eksen boyunca birbirine karşı gelen pozisyonlarda küp içerisinde düzenli yerleştiği kübik birim hücre merkezi şekil ile ters bir spinel kristal yapısına sahiptir. Birim hücre, 32  $O^{-2}$  anyonu, 16  $Fe^{+3}$  kationu ve 8  $Fe^{+2}$  kationları olmak üzere 56 atomdan oluşmaktadır. Manyetik yapı oksijenlerle ayrılmış iki manyetik alt tabakadan oluşur (A ve B tabakaları). Etkileşimler oksijen anyonları ile sağlanır. Bu etkileşimlere “dolaylı” veya “süper değiş-tokuş etkileşimler” denir. Çok güçlü “süper değiş-tokuş etkileşimler” A ve B tabakaları arasında spinlerin antiparalel düzenlenmesine neden olur. Böylece A ve B manyetik momentleri eşit değildir ve net manyetik moment vardır. Manyetit, açık havada

maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ve daha yüksek sıcaklıklarda (300 °C) ise hematite,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , okside olabilir. Maghemit daha az manyetizasyona sahipken hematit antiferromanyetiktir. Bu nedenle manyetit oksidasyonu pek çok uygulamada göz önünde bulundurulur. Yalnızca havadan kaynaklanan oksidasyon manyetiti maghemite dönüştürmez aynı zamanda süspansiyonun pH'ına bağlı olarak çeşitli elektron veya iyon transferleri de bu dönüşüme neden olur. Asidik ve anaerobik şartlar altında yüzeydeki  $\text{Fe}^{+2}$  iyonları çözeltide hekza-aqua kompleksleri şeklinde desorbe olurken bazik şartlarda manyetit oksidasyonu manyetit yüzeyinde yükseltgenme-indirgenme şeklinde gerçekleşir.  $\text{Fe}^{+2}$ 'nin yükseltgenmesi, her zaman yük dengesini sağlayan katyonik boşlukların oluşturulması, kristal örgüsü boyunca katyonların göçü ve maghemitin yapısıyla ilişkilidir. Maghemitte demir iyonları oktahedral ve tetrahedral konumlara dağılır, fakat maghemitin manyetitten farkı oktahedral konumlarda katyonik boşlukların ( $B_{1/3}$ ) olmasıdır. Örgüde düzenlenen boşluklar numune hazırlama metoduyla yakından ilişkilidir ve simetrisinin azalması ve süper yapıların oluşumuyla sonuçlanır. Boşluklar tamamen rastlantısal veya kısmen ya da toplamda düzenli olabilir.

Nanoparçacıkların yüzey alanı geniş olduğu için,



redoks reaksiyonlarının büyük çoğunluğu maddenin %30 – 50'sini içeren yüzeyde gerçekleşir ve bu nedenle hızlıdır.

([w3.balikesir.edu.tr/~sedacan/demiroksitnanaoparcacik.htm](http://w3.balikesir.edu.tr/~sedacan/demiroksitnanaoparcacik.htm))

### 1.3.2. Biyolojik Uygulamalarda Manyetik Nanoparçacıklar

Manyetik parçacık içeren sıvılara ferrosıvı (ferrofluid) denir ve çok önemli uygulamaları vardır. Değişik ve zengin yeni fiziksel özelliklerinden ötürü, nanomanyetik parçacıkların, biyoloji ve biyotıp alanlarında protein ayrıştırma, vücutta ilaç taşıma ve ısı tedavisi işlemleri gibi önemli birçok alanda başarılı uygulamaları bulunmaktadır. Manyetik nanoparçacıkların biyotıp uygulamaları arasında en göze çarpanı manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kontrastı artırıcı olarak kullanılmalarıdır. MRI ile hücre takibi, manyetik kuvvet aracılığı ile biyomoleküllerin hücreler arası

manipülasyonu ve kanserli hücreleri öldürecek olan ilaçların kaplanması ise hücre içinde nanomanyetik parçacıkların uygulamasına önemli örnekler arasında sayılabilir

Superparamanyetik demir oksitler gibi manyetik parçacıkların kullanımı bazı avantajlar sağlar. Örneğin manyetik parçacıklar basit ekipman istemesinin yanı sıra protein ayrılmasının hızlı ve kolay olmasını sağlar. Santrifüj kullanarak ayırma ile karşılaştırıldığında, pahalı ve enerji sarfiyatı olan ekipman gerektirmemektedir. Ayrıca zamandan da tasarruf sağlamaktadır. İmmobilize enzim sistemler için katı destek olarak uygulandığında enzim seçici olarak ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir (Wilson ve ark. 2004)

### **1.3.3. Manyetik Özellikler**

#### **1.3.3.1. Paramanyetizma**

Paramanyetik durumda, bireysel manyetik momentler gelişmiş rastgele yönlendirilir ve kristalin net manyetik momenti sıfırdır. Şayet manyetik alan uygulanırsa bu manyetik momentlerin bazıları yönlendirilir ve kristal küçük manyetik moment kazanır (Teja ve Koh 2009)

#### **1.3.3.2 Ferrimanyetizma**

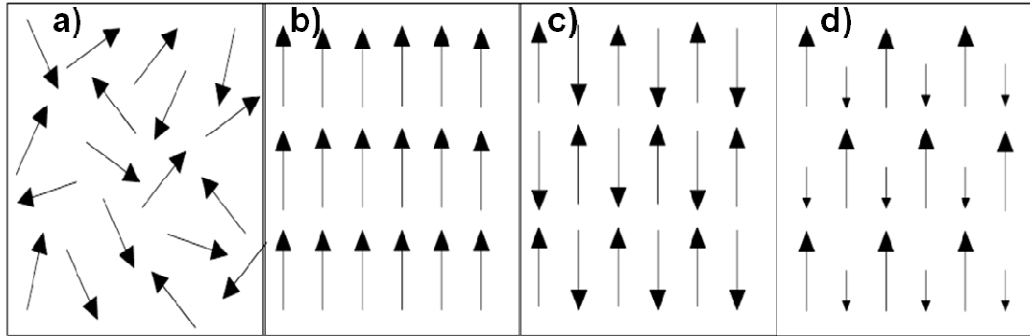
Ferrimanyetik maddelerde spinler antiparalel yönlendirilmiştir. Fakat bu tip manyetik materyallerde spinler eşit momentlere sahip değildir. Net manyetik momentleri vardır (Comell ve Schwertmann 2003)

#### **1.3.3.3 Ferromanyetizma**

Ferromanyetik kristalde bireysel manyetik momentlerin tümü dış manyetik alan olmadan bile yönlendirilir. Demir, nikel, kobalt ve alaşımlarını içeren maddeler bu gruba girer. Uygulanan manyetik alan altında yüksek manyetizasyon ve histeresiz özelliği gösterirler (Teja ve Koh 2009)

### 1.3.3.4 Antiferromanyetizma

Antiferromanyetik olarak adlandırılan materyal net manyetik momenti yoktur. Antiparalel manyetik momentler aynı büyüklüktedir (Teja ve Koh 2009)

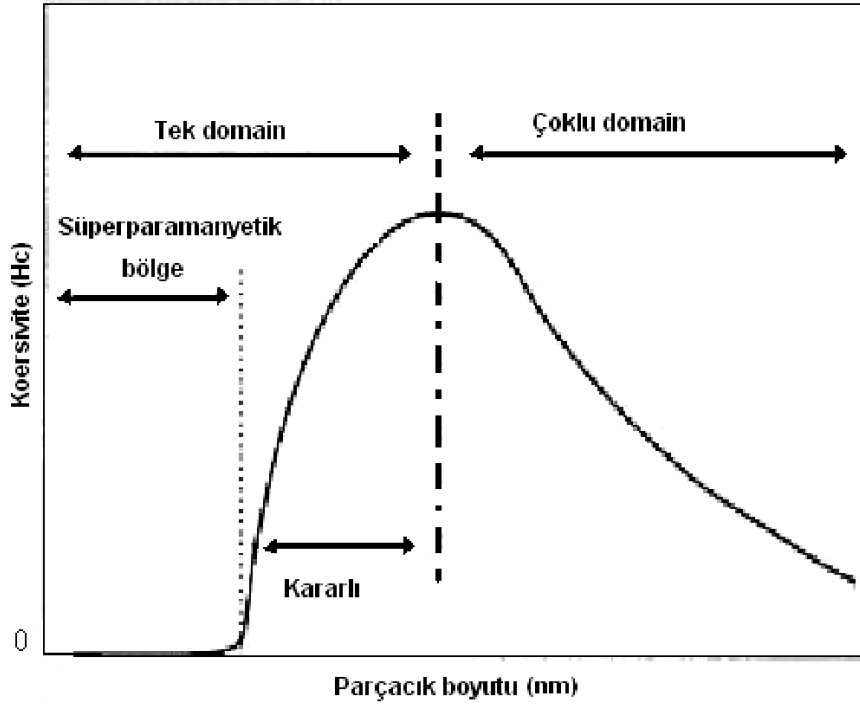


Şekil 1. 6 Manyetik dipollerin farklı yönelimleri: (a) paramanyetik (b) ferromanyetik (c) antiferromanyetik ve (d) ferrimanyetik

### 1.3.3.5. Süperparamanyetizma

Manyetik malzemenin fiziksel ölçüleri her üç boyutta da küçültüldüğünde nanoparçacık denilen yapılara ulaşılır. Bu yapılarda manyetik özelliklerdeki değişim çok daha çarpıcı hale gelir. Örneğin makroskopik boyutlarda ferromanyetik olan bir malzeme belli bir kritik değer altına kadar küçültüldüğünde paramanyetik gibi davranmaya başlar. Aslında atomların spinleri arasındaki etkileşimler hala ferromanyetik olmasına ve bir parçacık içindeki tüm spinler birbirlerine paralel olmalarına rağmen, yani parçacıklar tek başlarına ferromagnetik olmalarına rağmen bu parçacıklardan oluşan tozun makroskopik mıknatıslanması paramanyetik bir malzemenin davranışına çok benzer. Çünkü makroskopik madde parçalanarak küçük parçacık haline getirildiğinde tozlar arasındaki etkileşme kırılır. Böylece komşu spinlerin desteğini kaybeden belli bir parçacığın toplam spinini sıcaklığın bozucu etkisine karşı kendini koruyup manyetik alan yönünde yönelimini sürdüremez. Parçacıkların her birisinin toplam mıknatıslanmasını temsil eden bu dev (etkin) spinlerin ortak davranışı süperparamanyetizma olarak adlandırılır (Teja ve Koh 2009, Comelli ve Schwertmann 2003) (Şekil 1.7). Yani makroskopik olarak ferromanyetik olan bir malzeme nano toz haline getirilip preslense bile paramanyetik gibi davranır. Süperparamanyetik

malzemelerin kendine göre önemli daha birçok kullanım alanları vardır. Çünkü bu parçacıklar ile bilgi depolama kapasitesi mevcut duruma göre birkaç merteye daha artabilecektir. Bu tozlar ferromanyetik bir düzene giremediğinden bir araya getirilseler bile manyetik kuvvetlerinin kaçınılmaz bir sonucu gibi gözükürken bir araya gelip topraklanma olgusundan kurtulurlar. Yani bu manyetik tozlar uygun şartlarda sıvılar içinde homojen olarak dağılabilirler.



Şekil 1.7 Koersivite (Hc) ile parçacık boyutu arasındaki ilişki

## 1.4. İmmobilizasyon

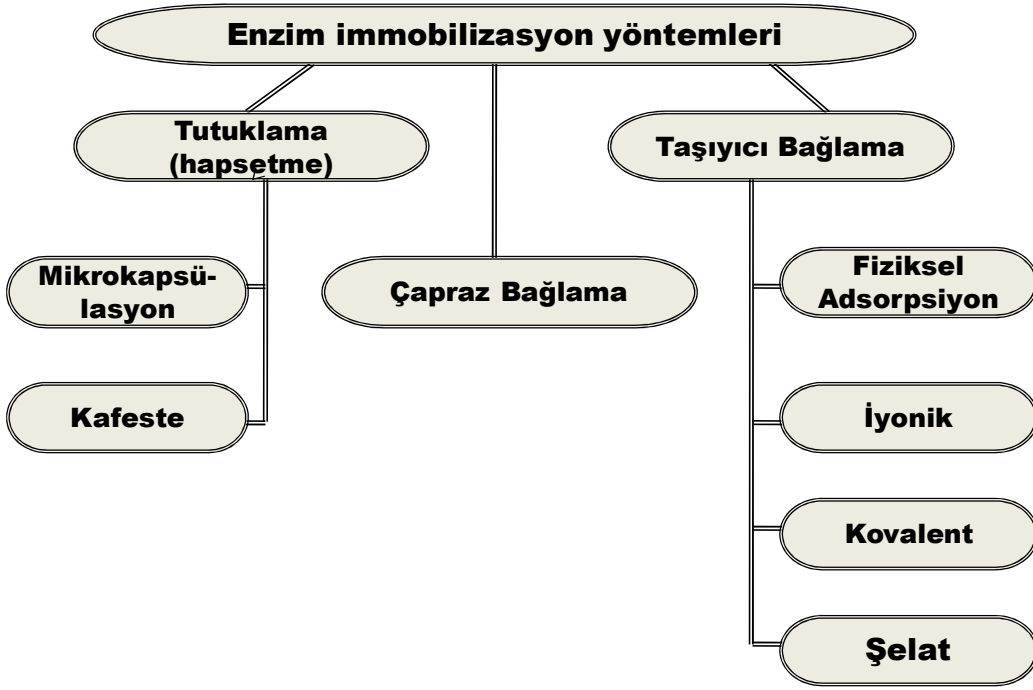
### 1.4.1. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimler, suda çözünen katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiği için serbest enzimlerin katalizör olarak kullanımları önemli sorunlara yol açabilir. Serbest enzim ile gerçekleştirilen bir tepkime durdurulmak istendiğinde, enzim istenilen anda ortamdan uzaklaştırılamadığı için, ancak spesifik inhibitör kullanılarak bu yapılabilir. Bu durumda reaksiyon ürünleri kirlenmiş olur. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması maliyeti yüksek bir işlem gerektirir ve zordur. Ayrıca enzimatik reaksiyonun inhibitör katılarak durdurulması enzimden tam

olarak yararlanılmasını engeller. Tepkime sonunda kullanılan serbest çözünür enzimin, aktivitesini yitirmeden geri kazanılması genellikle olanak dışıdır. Bu durum enzimlerin pahalı olmaları nedeniyle ürün maliyetinin yükselmesine yol açmaktadır. Ayrıca serbest enzimlerin kısmen kararsız olmaları, sürekli sistemlere uygulanamamaları, mekanik dayanıksızlıkları, ürün oluşumunun kontrol zorluğu gibi etkenler enzim immobilizasyonu çalışmalarının artışına neden olmuştur. Enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden, istenilen anda ve kolay bir işlemlerle uzaklaştırmaya olanak sağlayan çözüm yolu enzimlerin immobilizasyonu yöntemidir. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Telefoncu 1986 ).

- ✓ Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, sanrifüleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- ✓ Çevre koşullarına ( pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklıdır.
- ✓ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- ✓ Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- ✓ Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- ✓ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ✓ Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- ✓ Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- ✓ Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- ✓ Mekanistik çarpışmalar için uygundur.

Enzim immobilizasyon yöntemlerini değişik biçimlerde sınıflandırmak mümkündür. Böyle bir sınıflandırma Şekil 1.8.'te gösterilmiştir (Wiesman 1975, Telefoncu 1986).



Şekil 1. 8 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu 1986)

Enzim immobilize edilirken aktif merkezin bu işlemde kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Bu nedenle işlem ılımlı koşullarda gerçekleştirilmelidir. Immobilizasyon sırasında yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz konsantrasyonları ile muamele denetürasyona; dolayısıyla aktivite kaybına neden olur (Telefoncu 1986).

Suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak yada küçük molekül bir veya çok fonksiyonlu reaktiflerle enzim molekülleri arasında bağ yaparak yani çapraz bağlanarak veya polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketin sınırlandırılması olayına immobilizasyon denir. Bağlama derecesi, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime bağlıdır (Telefoncu 1986).

En eski immobilizasyon yöntemi ise enzimin taşıyıcı katı desteğe bağlanmasıdır. Enzimin cinsine göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Bağlanmış enzim miktarı ve enzim immobilizasyonundan sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır (Telefoncu 1986).

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır: Kullanım güvenliği, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık. Özellikle enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılan bazı reaktifler zehirli yan ürünlerin oluşmasına da sebep olabilir. Bu durumda hazırlanan biyokatalizörün kullanım güvenliği yoktur. Gıda ya da ilaç sanayinde bu tür immobilize enzimlerin kullanılması mümkün olmaz. Laboratuvarında gerçekleşen birçok immobilizasyon tekniği endüstride büyük miktarlarda üretim için uygun olmayabilir ya maliyeti çok yüksektir ya da immobilizasyon yöntemi birçok işlem gerektirmektedir. Bir enzimin immobilizasyonu için kullanılacak yöntemin seçiminde en önemli kriter yeterince enzimin immobilize edilmesi ve enzim aktivitesinin korunmasıdır. Genel olarak hem enzimin aktivitesini uzun zaman korumak amacıyla immobilizasyon hem de reaksiyon sırasında aktivitenin çok fazla kaybedilmesi göz önüne alınmalıdır.

#### **1.4.2.Metal Afiniti Kromatografi (IMAC)**

##### **1.4.2.1. IMAC'ta Enzim İmmobilizasyonu**

Enzim katalizli reaksiyonlar, aktivitelerinde küçük bir azalmayla birkaç kez kullanılabilen immobilizasyon prosedürlerinin uygulamasıyla geliştirilmiştir. 1970'lerin ortalarında Porath ve arkadaşları, metal afiniti kromatografi (IMAC) olarak adlandırılan yeni bir kromatografi çeşidini tanıttılar. Kromatografik destek üzerine tutturulan şelatlaştırıcıya bağlı metal iyonlarına afinitelerindeki değişikliklere göre bağlanan proteinlerin izolasyonu ve ayrılması için IMAC kullanılır (Ueda ve ark.2003). Bu alandaki en iyi bilinen gelişme, rekombinant polipeptitlerin ayrılması için rekombinant protein yada polipeptitlerin N-uç yada C-uç'larına histidin kuyruklarının bağlanmasıyla başarılmıştır. IMAC'ta böyle histidin ve diğer metal afiniti kuyrukları protein kazanımı için güçlü bir araç oldu. Özellikle proteinin yüksek üretim ve verimi istendiğinde protein saflaştırma için başlıca metodoloji olarak ortaya çıkar (Ueda ve ark.2003)

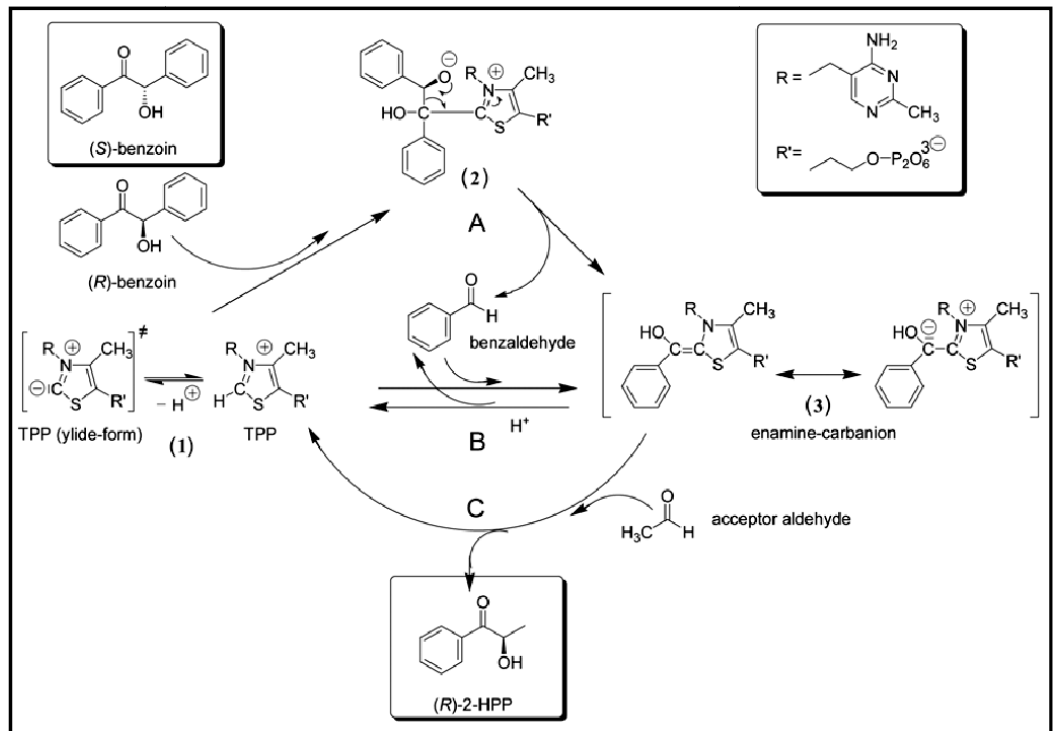


#### **1.4.2.2. IMAC Uygulamalarında Metal-Protein Etkileşiminin Kullanılması**

Protein veya peptitleri metal iyonlarına bağlama, protein yüzeyinde bulunan elektron veren grup ve bir yada daha fazla koordinasyon sayısına sahip olan metal iyonu arasındaki etkileşime dayandırılır. IMAC'ta matrikse sorbent yada metal-şelatlaştırıcı grup kovalent olarak tutturulur. Metal iyonlarını yükledikten sonra çok dişli şelatlaştırıcı ve metal iyonları arasında kompleks oluşur. Bu yapıda metal iyonları katı veya çözücü moleküllerinin bağlanması için serbest koordinasyon dişlerine sahiptir. Protein ve metal iyonları arasındaki etkileşimden sonra bağlı protein imidazol gibi bir yerdeğiştirici kullanılarak yüzeyden sıyrılır. Metal-protein bağının gücü proteinden proteine değişir. Birçok durumda bu özellik spesifik proteinleri ayırma ve saflaştırmada çok etkilidir.

#### **1.5. Benzaldehit Liyaz**

Benzaldehit liyaz (BAL, EC 4.1.2.38) enzimi, benzoinin açil bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehitlerin ve açiloinlerin sentezinde katalizör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bağ kırılma reaksiyonunda, benzaldehit liyaz enzimi yalnız *R*-konfigürasyonundaki benzoin molekülünü katalizleyerek tepkimeyi oluşturmakta; *S*-konfigürasyonundaki benzoin ise tepkimeye girmemekte; açiloin reaksiyonunda da sadece *R*-benzoin oluşmaktadır. BAL'ın katalitik mekanizması aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 1. 9 Katalitik BAL Mekanizması (Şimşek 2009)



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biyomolekülleri nanoparçacıkların yüzeyine tutturma modern biyoteknoloji için oldukça önemli bir konu olmuştur. Yüzey aktivasyonu çalışılmış nanoparçacıkların kullanıldığı prosesler sıvı kromatografisi( Leonard ve Chromatogr 1997) , manyetik ayrılma(Saiyed ve ark.2003) ve biyoçiplerdeki biyosensörlere dayalı olan çoklu tarama(multidetecation) sistemleri( Phelan ve Nock 2003) şeklindedir. Manyetik özellikleri nedeni ile maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ve magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nano kompozitlerinin hazırlanması ve manyetik ayrılma prosesinde kullanılması teknolojik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Magnetit nanoparçacıklarının üretimiyle ilgili çeşitli çalışmalar bildirilmiştir (Neamtu ve ark.2005, Liu ve ark.2004, Kholam ve ark.2002, Zhu ve Wu 1999 ). Bir baz varlığında demir tuzlarının çöktürülmesi, süperparamanyetik nanoparçacıkların sentezi için en çok kullanılan yöntemlerden biridir.( Ghanaprakash ve ark.2006, Lin ve ark.2003, Xu ve ark.2004) Magnetit oksijenli ortamda maghemit ve hematite dönüşür. Ayrıca oluşan parçacıklar arasında kısa mesafeli çekim güçleri olduğundan hazırlanan manyetik nanoparçacıklar kaçınılmaz olarak agregasyon eğilimi gösterirler. Bu yüzden, hem maghemitin oksitlenmesini engellemek hemde agregasyonu önlemek için manyetik parçacıklar silika, dekstran, polietilen glikol(PEG), polimetakrilik asit(PMAA) ve nişasta gibi metaryellerle kaplanır veya bu metaryellerin içinde oluşturulurlar. Kaplama, nanoparçacıkların sterik ve elektrostatik açıdan kararlı olmasını sağlamaktadır (Shen ve ark.2000, Wan ve ark.2006, Wormuth 2001, Guo ve ark.2006)

Biyomolekül immobilizasyonunda, biyomoleküllere bağlanabilen reaktif gruplar oluşturabilmek için yüzey modifikasyonlarıyla silika kaplı manyetik nanoparçacıklar fonksiyonel hale getirilir. silika kaplı manyetik nanoparçacıklar için en yaygın kullanılan yüzey modifikasyonu silanlamadır. Aminosilanlar yüzeye tutturulur ve terminal amino grup glutareldehit ile aktive edilir. Proteinler aktive edilen parçacıklar üzerine tersinmez ve kovalent olarak bağlanır (Nobs ve ark.2004, Vandenberg ve ark.1991, Howarter ve Youngblood 2006)

Alternatif olarak, aminosilan yüzey, karboksilik aside dönüştürülebilir. Süksinik asit anhidrid ile etkileştirildikten sonra NHS/EDC ile aktive edilir. Fakat iki prosedürde

de biyomolekül immobilizasyonundan önce modifikasyon aktivasyonu gerekir. Bu zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca nanoparçacıkların etkileşimi ve aglomerasyonunu engellemek için glutareldiit miktarı ve reaksiyon zinciri dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir.

Epoksi silanlar, polimer/inorganik ara yüzeylerinin integrasyonu ve kararlılığını artırmak için yaygın bir şekilde kullanılırlar (Plueddeman 1991, Shi 2006) Aynı zamanda epoksi silan yüzeyler, kovalent olarak biyomolekül immobilizasyonu için çok çekici sistemlerdir. Epoksi grup, ılımlı deneysel koşullarda tiyol, hidroksil ve amin gibi nükleofil içeren proteinlere kovalent olarak bağlanır. Oluşan kimyasal bağ çok kararlıdır. Ayrıca epoksi ile aktive edilen yüzey normal saklama koşullarında kararlılığını korur. Bundan dolayı epoksi silan ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacıklar ilave aktivasyon basamakları gerektirmedikinden kovalent bağlı protein immobilizasyonu için kimyasal olarak reaktif bir yüzey sağlar.

Saflaştırılması yapılacak BAL (Benzaldehit liyaz ) enzimi TPP bağımlı olup, hem açiloin bağı oluşturma hem de koparmada çok etkin olan bir enzimdir ve reaksiyonlar çok yüksek enansiyoseçicilikte yürümektedir. BAL enziminin katalizlediği reaksiyonların ürünler kiral ilaç ham maddelerinin üretiminde ana bileşikleri oluşturmaktadır. Bunların başında Bupropion (sigara bıraktırıcı ilaç) ve sitoksazon antibiyotikleri gelmektedir (Demir ve ark.2006) Enzimin endüstriyel kullanım araştırmaları devam etmektedir ve saflaştırma bu araştırmaların en önemli aşamalarından biridir.

### 3.MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS), tetraethyl orthosilicate (TEOS), Aldrich'ten satın alınmıştır. Diğer bütün kimyasallar (ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), ferrous chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), ammonium hydroxide (25% [w/w]), imidazole and 2-propanol) analitik saflıkta olup ticari olarak mevcuttur. Recombinant BAL üretimi için kullanılan E. coli BL21 (DE3) pLysS, strain Invitrogen®'den satın alınmıştır. Karboligasyon reaksiyonlarında kullanmak için benzaldehit, asetaldehit, rasemik benzoin ve dimetoksiasetaldehid Sigma'dan satın alınmıştır. Enzim reaksiyonları, Demir (2002, 2003) deki prosedüre göre Orta Doğu Teknik Üniversitesinde Prof. Dr. Ayhan Sıtkı DEMİR'in araştırma laboratuvarlarında yapılmıştır.

#### 3.2. Metod

Silika kaplı nanoparçacıklar 10 sn sonikatör (Sonikatör Vc 505 Model) kullanılarak saf su içinde dağıtılmıştır. Bu süspansiyondan bir damla SPI Double Copper Grids 100/200 üzerine damlatılmıştır. Parçacık boyutu ve morfolojisi Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) (JEOL 2100 F, Japan) kullanılarak aydınlatılmıştır. Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumu, Thermo Scientific Nicolet IS10 FT-IR spektrometre (USA) ile ölçülür (çözünürlük  $4 \text{ cm}^{-1}$  de, 16 tarama). Parçacıkların kristal yapısı Hanawalt methodu kullanılarak X-Işını Difraksiyonu (XRD) ile tespit edilmiştir. Difraktometre olarak, Cu-K $\alpha$  radyasyonlu, Rigaku Ultima X-Ray diffractometer/PW 3710 kullanılmıştır.

BAL katalizli reaksiyonlar, silika jel (E. Merck, Darmstad) üzerine ince tabaka kromatografisi (TLC) ile görüntülenmiştir. Spotları dedekte etmek için hem UV-absorpsiyon hemde fosfomolibdikasit (PMA) kullanılmıştır. Sentezlenen ürünler,  $^1\text{H}$ -NMR ile tanındı ve  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu, iç standart olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak dötero-kloroform kullanılarak BRUKER DPX 400 MHz ile

kaydedilmiştir. Reaksiyonlar HPLC (Agilent 1100 series) analizleri ile izlenmiştir. Yukarıda bahsedilen teknikler ve ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi işbirliği ile yapılmıştır.

### **3.3. Manyetik Reçine hazırlanması**

#### **3.3.1. Manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının sentezlenmesi**

Manyetik nanoparçacıklar birlikte çökme metoduna göre hazırlanmıştır. (Ma 2006) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>' in çöktürülmesi, oksidasyonu önlemek için azot gazı atmosferinde, tuzların molar oranları Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> = 1:2 olacak şekilde ayarlanarak bazik koşullar altında yapılmıştır. 1 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> elde etmek için 0.86 g FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ve 2.36 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> gazı atmosferinde 40 ml oksijensiz deiyonize suyla 1000 rpm de karıştırıldı. Çözelti 80 °C'ye ısıtıldıktan sonra, 5ml NH<sub>3</sub> ilave edildi. 30 dak. sonra Nd-Fe-B mıknatıs kullanılarak manyetik olarak parçacıklar çözülden ayırılmıştır. Reaksiyona girmemiş kimyasallardan arındırmak için parçacıklar, 50 mL deiyonize su kullanılarak altı kez yıkanmıştır.

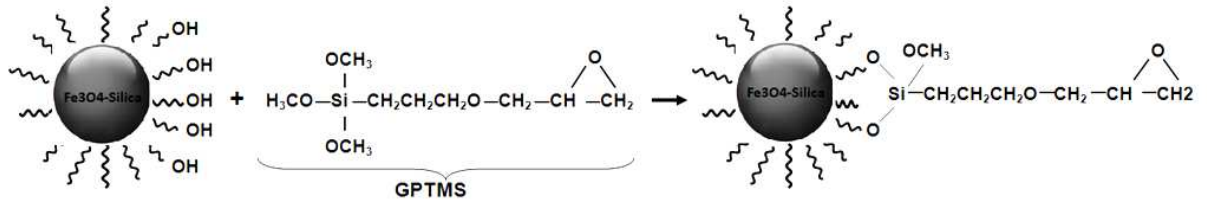
#### **3.3.2. Silika kaplı manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının sentezlenmesi**

Superparamanyetik nanoparçacıklar sol-jel metodu kullanılarak silika ile kaplanmıştır (Ma 2006, Lu 2002) . 30 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanoparçacıklar 80 ml 2-propanol and 6ml deiyonize su içinde sonikatör kullanılarak 10 dak. boyunca dağıtılmıştır. Daha sonra sürekli karıştırılarak 7 ml NH<sub>3</sub> and 1 ml TEOS ilave edilmiş ve 12 saat boyunca oda koşullarında karıştırılmıştır. Ürün mıknatıs yardımıyla ayrılmış ve 50 mL deiyonize su kullanılarak altı kez yıkanmıştır. Ürün Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> olarak adlandırılmıştır.

#### **3.3.3. Epoksi-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının sentezlenmesi**

Toluende %5'lik 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) hazırlanarak bundan 10 ml alınmış ve 1 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> ile gece boyunca karıştırılarak etkileştirilmiştir. Mıknatıs ile manyetik olarak ayrılmış ve fiziksel olarak bağlanmış

silanı uzaklaştırmak için sırayla toluen ve etanol ile yıkanmıştır. Vakumda dondurma (freez-dried) ile kurutulmuştur. Sonuç olarak, Benzaldehid Liyaz (BAL) Enziminin histidin kuyruklarındaki amin gruplarıyla kolayca reaksiyon verebilen epoksi grupları yüzeye tutturulmuştur (Jin ve Qingwei 2007). Epoksi grup tutturulmuş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların hazırlanması şematik olarak Şekil-3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1 Epoksi-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit) nanoparçacıklarının yüzey modifikasyonu

### 3.4. Benzaldehid Liyaz Enziminin İmmobilizasyonu

#### 3.4.1.Recombinant BAL Hazırlanışı

BAL, 2L fermentorda (New Brunswick BioFlo110)'de 37°C'de gerekli antibiyotikler (35 µL/mL Chloramphenicol ve 100 µL/mL Ampiciline) içeren 1.5L Luria Broth (LB) ortamında pUC19-BAL içeren E. Coli BL21(DE3)pLyS strain doğrudan kültür edilerek büyütülmüştür. BAL indüksiyonu Isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside (IPTG)'nin ilave edilmesi ile başlatılmıştır. İndüksiyondan 6 saat sonra, 4°C'de santrifüj edilerek hücreler kırılmıştır. Kırılan hücreler 36 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Enzim ham olarak kullanılmıştır. Ni<sup>2+</sup>-NTA affinitite kromatografi (Invitrogen®) ve Amersham kolondan saf enzim elde edilmiştir.

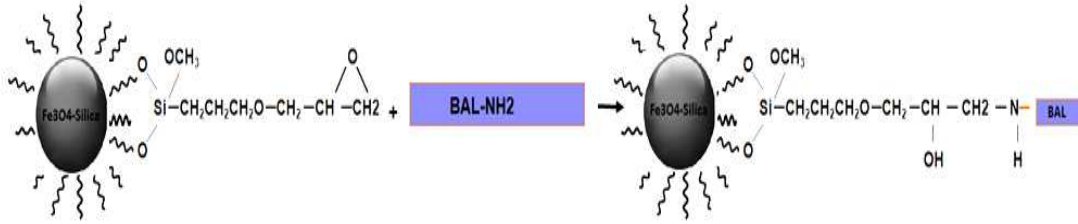
**Aktivite Çalışmaları:** Bir ünite aktif BAL, standart koşullar altında (30°C, pH: 7.5) her dakikada 1µmol benzoin oluşumunu katalizlemek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. BAL katalizli benzoin kondenzasyon reaksiyonları HPLC ile takip edilmiştir.

#### 3.4.2.Benzaldehit Liyaz Enziminin Epoksi Reçineye Bağlanması

200 mg reçine 5 ml liziz tamponunda (50mM pH 7.5 fosfat tamponu, 100mM NaCl and 10mM imidazol) yıkanmış ve 4°C'de silika kaplı nanoparçacıkların şişmesi



için 2 saat süreyle bekletilmiştir. Reçine bir mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra süpernatant bir pipet yardımıyla atılmıştır. 200 mg liyofilize edilmiş ham enzim 10 ml liziz tamponunda çözüldükten sonra hücre çeperi ultrasonik banyo (20% genlikde 1 dak. için 5 sn açık, 10 sn kapalı modunda) yardımı ile parçalanmıştır. Sonike edilen enzimden 2mL örnek alınıp, toplam hacim 5mL olacak şekilde liziz tamponu ile seyreltildikten sonra şartlanmış reçineye yüklenmiş ve reçine-enzim sistemi 37°C, 120rpm de 3 saat süre ile enzimin tutunmasını sağlamak amacıyla çalkalanmıştır. Enzimin tutunması gerçekleştirildikten sonra reçine mıknatıs yardımıyla çöktürülüp ve sıvı faz pipet ile uzaklaştırılmıştır. Bağlanmamış proteinleri uzaklaştırabilmek için reçineye bağlanmış olan enzim iki kez 5 mL liziz tamponu ile yıkanmıştır. Bağlanan protein miktarı bovine serum albuminin standart olarak kullanıldığı Bradford yöntemi ile bağlanmamış protein miktarından yola çıkarak hesaplanmış ve 4mg/100mg reçine olarak belirlenmiştir(Bradford 1976). Benzaldehid Liyazın karboligasyon reaksiyonunda kullanılan BAL'ın hazırlanış şeması Şekil-3.2' de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2 BAL Enziminin İmmobilizasyonu

### 3.4.3.İmmobilizasyona Süre ve pH' ın Etkisi

3 adet 200mg reçine tartılıp, falconlarda hazırlandıktan sonra, falconlardan birinin üzerine 5 ml pH 6.5 liziz tamponundan (50mM Kpi, pH:6.5, 200mM NaCl, 10mM imidazole) eklenmiş, diğerinin üzerine 5ml pH 7.5 liziz tamponundan ve sonuncusunun üzerine de 5 ml pH 8.5 liziz tamponundan eklenmiş ve +4°C de 1-1.5 saat bekletilmiştir. Daha sonra, reçineler santrifujlenip (8000rpm, 10min), süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Reçinelerin üzerine 5 er militre liziz tamponundan eklendikten sonra 10 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir(37°C, 120rpm). 10 dakikanın sonunda santrifujlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Reçinelerin şartlanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

200mg ham BAL enzimi 10ml Liziz tamponunda (50mM Kpi, pH:6.5, 200mM NaCl, 10mM imidazol) çözüldükten sonra, sonike (5sec on, 10sec off, 25% amplitude, 1min) edilmiş ve santrifujlenmiştir (7000rpm, 10min). 200mg ham enzim 10ml pH 7.5 liziz tamponunda çözüldükten sonra sonike edilmiş ve santrifujlenmiştir. 200mg ham enzim 10ml pH 8.5 lysis tamponunda çözüldükten sonra sonike edilip ve santrifujlenmiştir. Enzimlerden 2ml örnek alınıp reçinelerin üzerine eklenmiştir. Toplam hacim 5ml olacak şekilde 3 er ml liziz tamponu eklenmiş ve enzim-reçine sistemi 37°C, 120 rpm de inkübe edilmiştir. 90. dakikada enzim-reçine sistemlerinden örnek alınıp, santrifujlenmiş ve protein bakmak için buz banyosunda bekletilmiştir. Enzim-reçine sistemi aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 3. ve 4,5. saatlerinde numulardan örnekler alınıp santrifujlendikten sonra protein miktarları Bradford metodu ile belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1** Bradford yöntemi ile enzim-reçine sistemi

	pH 6.5	pH 7.5	pH 8.5
1.5 saat	2.35 mg	2.5 mg	3.14 mg
3 saat	2.82 mg	2.95 mg	2.93 mg
4.5 saat	2 mg	2.725 mg	2.57 mg

Enzimin tutturulması için gereken en uygun pH 7.5 seçilmiştir. Çünkü enzim-reçine sistemi bu pH ta en yüksek kararlılığı gösterirken, en iyi bağlanma da bu pH gerçekleşmiştir.

### **3.5.Kovalent Olarak İmmobilize edilen BAL Reaksiyonları**

#### **3.5.1.Substrat Miktarının Optimizasyonu**

Yukarıda belirtilen yöntem ile BAL enzimi reçineye tutturulduktan sonra enzim-reçine sistemi 5mL reaksiyon tamponu (0.15mM TPP, 2.5mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM pH: 7.5 fosfat tamponu, 25% DMSO) kullanılarak iki kez şartlanmıştır. Değişik miktarlarda

alınan benzaldehitin (40mg, 60mg,80mg,100mg, 300mg) eklenmesiyle reaksiyon başlatılmış ve 120 rpm ve 37°C’de inkübe edildikten sonra 30sn, 60sn, 4dk, 16dk, 1saat, 2saat ve 3saat aralıklarında 100µL örnek alınıp 400µL DMSO da reaksiyon durdurulmuştur. Hazırlanan numuneden alınan 200µL örnek, 200 µL mobil faz (45% CH<sub>3</sub>CN, 54.5% H<sub>2</sub>O, 0.5% AcOH) ile seyreltikten sonra HPLC de analiz edilmiştir. (Nucleodur C18, 1mL/min, 254nm).

### 3.5.2. (R)-2-hydroxy-1,2-diphenyl-1-one’nun sentezi:

İmmobilize edilen BAL 5ml tampon (0.15mM TPP, 2.5mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM pH:7.5 fosfat tamponu) ile iki kez yıkanıp dengeye getirilmiştir. Reaksiyon 100 mg (1mmol) benzaldehid ile başlatılmıştır. Reaksiyon, uygun koşullar altında (120rpm, 37°C) gece boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon 40. dakikada durdurulup TLC ile görüntülenmiştir. Karışım etil asetat (3x50mL) ile ekstrakte edilmiştir. Organik tabakalar MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulup ve istenen bileşiği (90% dönüşüm, 99% ee) elde etmek için azaltılmış basınç altında konsantre edilmiştir.  $[\alpha]_D^{22}$  : -112.1 (c 1.5, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> ). HPLC (Chiralpak AD) R<sub>t</sub> (R ):27.1 min, R<sub>t</sub> (S ): 34.5 min. <sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>): δ ppm 7.82 (d, J=7.8 Hz, 2H), 7.44 (t, J= 7.5 Hz, 1H), 7.30 ( t, J= 7.6 Hz, 2H), 7.16-7.23 (m, 5H), 5.73 ( d, J=5.9Hz, 1H), 4.42 (d, J= 5.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>): δ ppm 198.7, 139.1, 133.8, 133.6, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 127.7, 76.2.

### 3.5.3. (R)-2-hydroxy-1-phenyl propanone Sentezi:

İmmobilize edilen BAL 5ml tampon (0.15mM TPP, 2.5mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM pH:7.5 fosfat tamponu) ile iki kez yıkanarak dengeye getirilmiştir. Reaksiyon seçiciliği yakalamak için 100 mg (1mmol) ve 500 mg (10 mmol) benzaldehid ilavesi ile başlatılmıştır. Reaksiyon 24 saatte durdurulup TLC ile görüntülenmiştir. Karışım kloroform (3x50mL) ile ekstrakte edilmiştir. Organik tabakalar MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuş ve istenen bileşiği (90% dönüşüm, 99% ee) elde etmek için azaltılmış basınç altında konsantre edilmiştir.

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>): δ ppm 7.90 (dd, J=1.4, 8.2 Hz, 2H), 7.40-7.60 (m, 3H), 5.13 ( q, J=6.0 Hz, 1H), 3.80 (br.s, 1H), 1.41 (d, J=6.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR

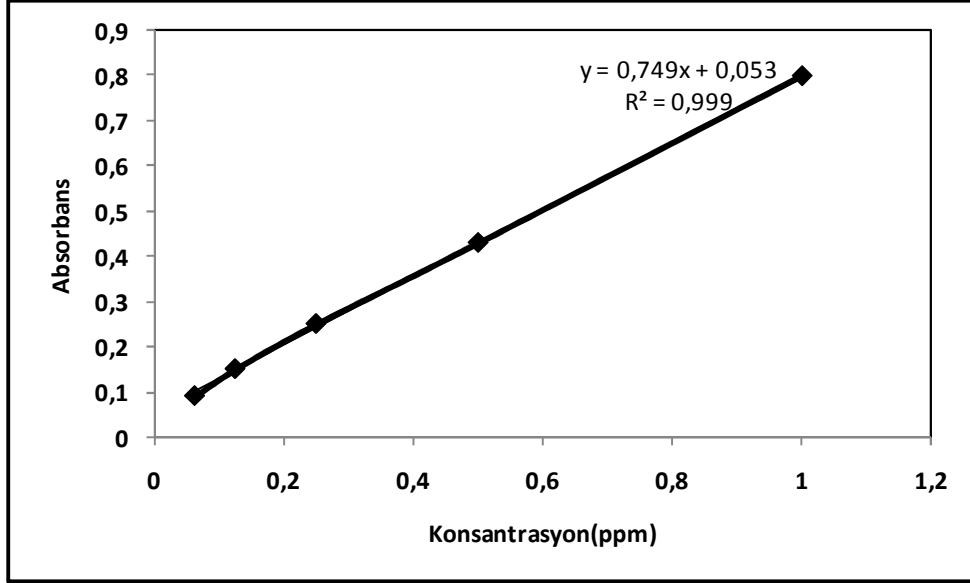
(100MHz, CDCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  ppm 202.7, 134.4, 134.0, 128.9, 128.7, 69.2, 22.0.  $[\alpha]_D^{22}$  : 83.5 (c 2.0, CHCl<sub>3</sub>). Ürünün enantiyomerik aşırılığı AD kiral kolon (90:10/ hegzan:izopropanol, 1 mL/dak., 254 nm, (*R*)-2-hidroksi-1-fenil propanon'un tutunma zamanı: 12.54) ile belirlenmiştir.

#### **3.5.4. *Rac.* benzoin and asetaldehiden (*R*)-2-hidroksi-1-fenilpropanon [(*R*)-2 HPP]'nin Sentezi:**

0.3 mmol *rac.*-benzoin ve 20 mmol asetaldehid 5 mL reaksiyon ortamına ilave edilmiş ve reaksiyon 30°C'de yapılmıştır. Benzaldehid (benzoinin enantiyoselektif hidrolizinden kaynaklanan) ve asetaldehid arasındaki kondenzasyon reaksiyonu için 30'uncu ve 120'inci dakikalarda 4 mM asetaldehid ilave edilmiştir. Reaksiyon 24 saat sonra eşit miktarda kloroform ilave edilerek durdurulup ve TLC ile izlenmiştir. Karışım kloroform ile üç kez ekstrakte edilmiş ve ürünler NMR ile analiz edilmiştir. Benzoinin enantiyomerik aşırılığı HPLC analizleri ile belirlenmiştir (Chiralpak AD, 90:10 hegzan: izopropanol, 1 mL min<sup>-1</sup>, 254 nm, tutunma zamanları (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone için: 12,45, (*S*)- benzoin için: 33,35), 45% dönüşüm, 98% ee).

### 3.6.Standartlar ve Kalibrasyon

#### 3.6.1. Bradford Method



Şekil 3.3. Bovin Serum Albumin Kalibrasyon Grafiği

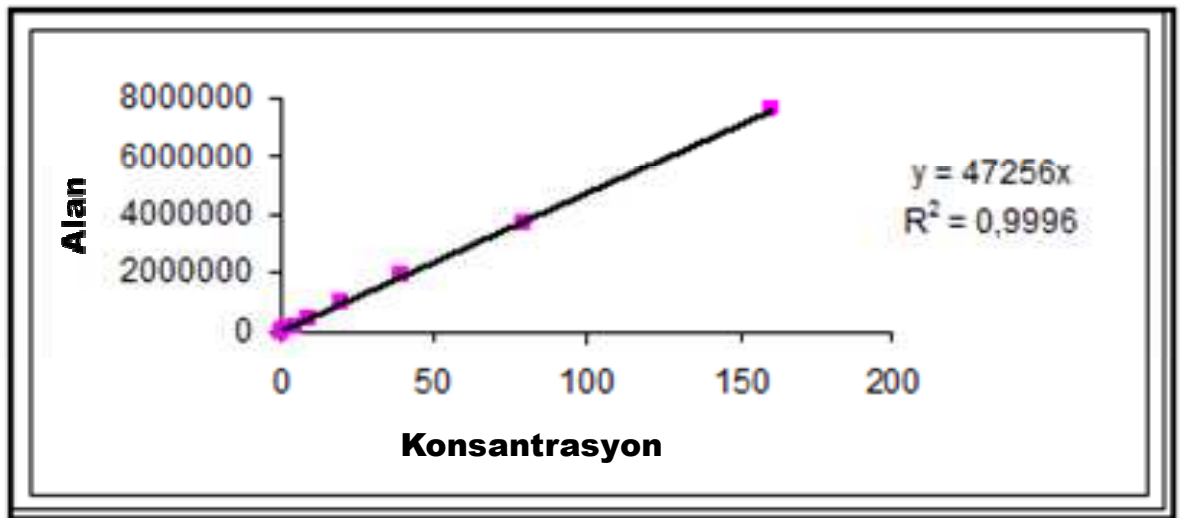
Protein kalibrasyon grafiğinin hazırlanabilmesi için standard proteinimiz olan bovine serum albuminden konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde (10mg protein/10mL H<sub>2</sub>O) hazırlanmıştır. Daha sonra hazırladığımız bu örnekten 0.5mL alıp 2. tüpe aktardıktan sonra konsantrasyonu 0.5mg/ml olabilmesi için üzerine 0.5mL su eklenmiştir. 0.25mg/mL konsantrasyondaki örneğimizi elde edebilmek için 2. örneğimizden (0.5mg/mL) 0.5mL alıp üzerine 0.5mL su eklenmiştir. Bu işlemi tekrar edip konsantrasyonları 0.125 mg/mL ve 0.0625 mg/mL olan örneklerimiz elde edilmiştir.

Proteinleri okuyabilmemiz için hazırladığımız farklı konsantrasyonlardaki 5 örneğimizden, 50µL örnek alıp ve üzerlerine 1.5 er mL bradford reagent eklenmiştir. Hazırladığımız örneklerin UV-visible spektroskopisi yardımıyla 595 nm de absorbans değerleri okunmuştur. Okuduğumuz absorbans ve konsantrasyon değerlerini kullanarak, absorbansa karşı konsantrasyon kalibrasyon grafiği çizilmiş (şekil 3.3.) ve grafiğin denklemin  $y=0.749x+0.053$  olarak belirlenmiştir. Bulduğumuz bu denklemde

yaptığımız deneyler sırasında okuduğumuz absorbans değerlerini yerine koyarak, istediğimiz örneğin konsantrasyonu belirlenmiştir.

### 3.6.2. Benzoin Kalibrasyonu

Reaksiyonlarımızda elde ettiğimiz dönüşümü yani oluşan benzoin miktarını belirleyebilmemiz için benzoin standart grafiğinin hazırlanması gerekmiştir. Bunun için çeşitli konsantrasyonlarda benzoin gerekmiştir. Bunun için ilk önce 160mM benzoin 1mL de DMSO da çözüldükten sonra seri seyreltme yapılarak 80mM, 40mM, 20mM, 10mM, 5mM, 1mM, 0.5mM, 0.25mM, 0.125mM, 0.0625mM konsantrasyonlarında benzoin örnekleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örneklerden 0.5mL alınıp üzerlerine 0.5ml mobil faz eklenerek HPLC örnekleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örnekler HPLC de analiz edildikten sonra konsantrasyona karşı alan grafiği çizilerek (şekil 3.4.), standard denklemi elde edilmiştir. reaksiyonlarda elde edilen benzoin miktarları, denklemde alan değerleri yerine koyularak bulunmuştur.



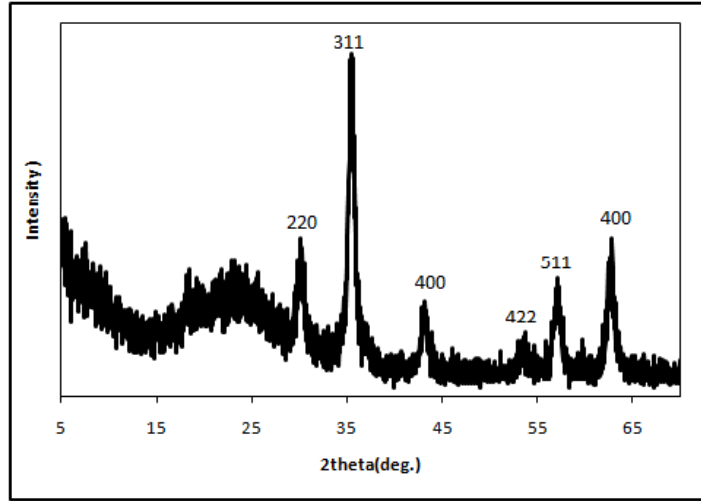
Şekil 3.4. Benzoin Kalibrasyon Grafiği



## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Manyetik Reçinenin Karakterizasyonu

Şekil-4.1 de de görüldüğü gibi silika kaplı magnetit ( $Fe_3O_4$ ) için beklenen X-ışınları desenleri  $2\theta = 30.16^\circ, 35.48^\circ, 42.99^\circ, 52.90^\circ, 56.95^\circ,$  ve  $62.70^\circ$  ((220), (311), (400), (422), (511) ve (440) tekabül eden) ana pikleri sırasıyla meydana gelmiştir. Magnetit ( $Fe_3O_4$ ) ve maghemit( $\gamma-Fe_2O_3$ )'in X-ışınları desenleri birbirine yakındır (Santra ve ark. 2001). X-ışınları desenleriyle bu iki yapıyı birbirinden ayırt etmek zordur. İki yapının manyetik özellikleri birbirine benzerdir. Magnetit'in ( $Fe_3O_4$ ) bir kısmı atmosferdeki oksijenle oksidasyona uğruyarak maghemit'e ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) dönüşmüş olabilir. Bundan dolayı manyetik nanoparçacıkların bu iki fazın karışımı olduğu düşünülmektedir. Silika-kaplı manyetik nanoparçacıkların boyutları Scherrer denkleminde  $(d = 0.9\lambda / \Delta(2\theta) \cos \theta)$   $d$ , kristal alan boyutu,  $\Delta(2\theta)$  en güçlü pikin (311) maksimumunun orta genişliği ve  $\lambda$ , X-ışınları dalga boyu) 11,8 nm olarak hesaplanmıştır (Wan ve li 1998).

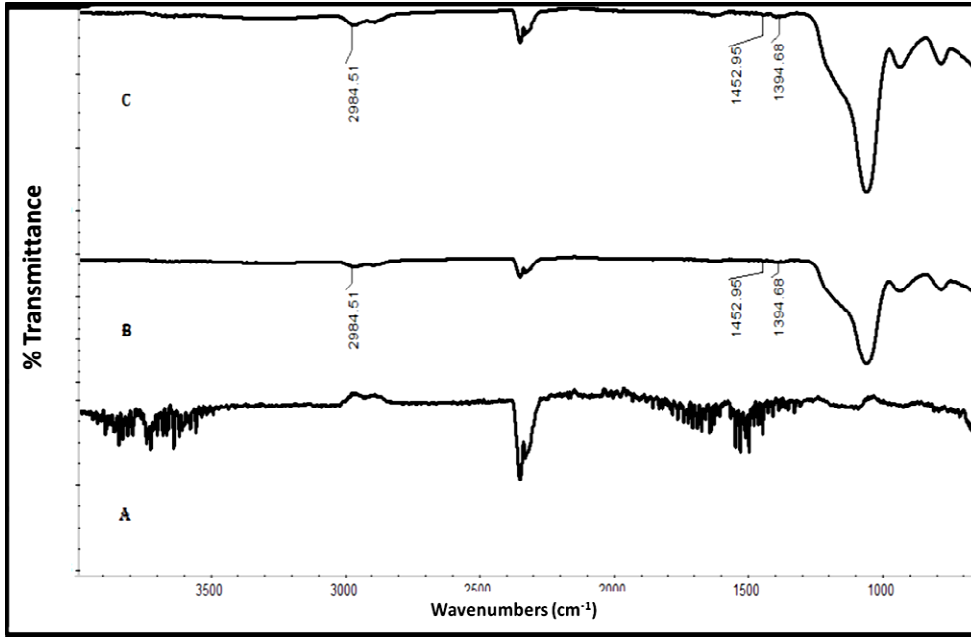


Şekil 4. 1  $Fe_3O_4$ -silika parçacıkları için X-ışını deseni

Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometresi (FTIR) ile yüzey karakteristiği aydınlatılmıştır. Şekil 8 de silika kaplı manyetik nanoparçacıklar (A), epoksi grupları tutturulmuş manyetik parçacıklar (B) ve saf GPTMS (C) için FTIR spektrumu görülmüştür. Epoksi grubu için spesifik olan  $1150\text{ cm}^{-1}$  deki pik, silikanın absorpsiyon piki tarafından kapatılmış olmasına rağmen  $2984.51\text{ cm}^{-1}$  deki alkil C-H esneme piki ve



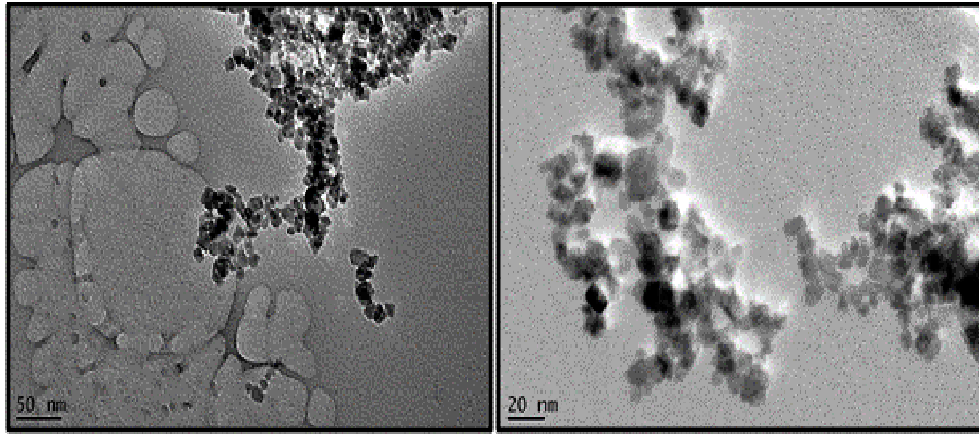
onun  $1394.68 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1452.95 \text{ cm}^{-1}$  deki titreşim pikleri (Tarducci ve ark. 2000, Schottner 2001, Zhang ve ark. 2009, Wanunu ve ark. 2006, Chen ve Kuo 2007) (28-32) saf GPTMS (C) ve modifiye edilmiş nanoparçacıkların (B) spektrumlarında açık bir şekilde görülüyor. FTIR sonuçları manyetik nanoparçacıkların yüzeyine epoksi gruplarının başarılı bir şekilde tutturulduğunu gösteriyor.



Şekil 4.2 FT-IR Spektrumu

Şekil 4.2. FT-IR spektrumu: (A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -silika nanoparçacıklar (B) GPTMS ile yüzeyi değiştirilmiş  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -silika nanoparçacıklar (C) saf 3-Glisidoksi propiltrimetoksisilan (GPTMS).

Şekil 4.3'teki TEM görüntüsünden de görüldüğü gibi, parçacıklar ortalama 10-11 nm boyutunda homojen bir dağılımda elde edilmiştir. Parçacık boyutu, Scherrer denkleminde elde edilen sonuçla uyum içindedir.



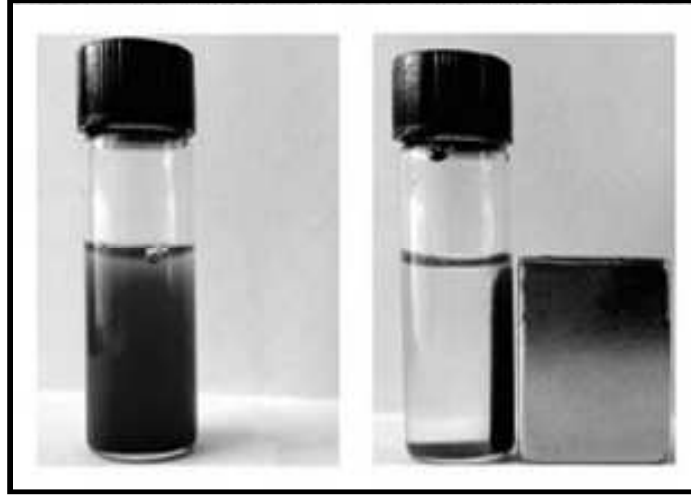
Şekil 4. 3 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Silika Nanoparçacıkların Aydınlık TEM Resmi

#### 4.2. Benzaldehid Liyaz Enziminin Yüzeğe Tutuklanması

Benzaldehid Liyaz, saflaştırma-immobilizasyon adımlarını yapmak için epoksi grupları tutturulmuş Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparçacıklarının yüzeyine immobilize edilmiştir. Enzimin destek üzerine (Ma ve ark., Mateo ve ark. 2006,2001) kolay bir şekilde adsorpsiyonunu sağlamak için 100mM NaCl içeren liziz tamponuyla reçine dengelendikten sonra, HİS-kuyruklu BAL içeren E. Coli BL21 (DE3)pLysS'in hücre serbest ekstraktı kovalent enzim immobilizasyonunu sağlamak için reçineyle inkübe edilmiştir. Enzim-destek sistem başarısı, inkübasyon zamanı, enzim miktarı ve reaksiyon ortamının pH optimizasyonunu gerektirmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalardan BAL enziminin pH 5-9 aralığında çalıştığı bilinmektedir. Enzim-reçine kararlılığı ve epoksi-destek aktivasyonu için gerekli en iyi reaksiyon koşullarının belirlenmesi için pH 6.5, 7.5 ve 8.5'da çalışılmıştır. Enzim-reçine sistemi için uygun pH 7,5 olarak bulunmuştur. Standart BSA protein tahliliyle belirlenen kovalent immobilizasyon için gerekli inkübasyon zamanı 3 saat olarak belirlenmiştir (Bradford 1976, Mateo ve ark. 2001)

Belirlenen koşullarda reçine, liziz tamponunda çözülen hücre serbest ekstraktının farklı miktarları ile inkübe edilmiştir. Örnekler belirli zaman aralıklarında alınmış ve epoksi desteğe immobilize edilen enzim miktarları belirlenmiştir. Enzim-destek sistem manyetik alana güçlü bir şekilde cevap verdiği için (Şekil 4.4), bir mıknatıs kullanılarak reaksiyon ortamı berraklaştıktan sonra örnekler uzaklaştırılmıştır.

İmmobilize edilen maksimum enzim miktarı 4mg BAL/100mg reçine olarak belirlenmiştir.

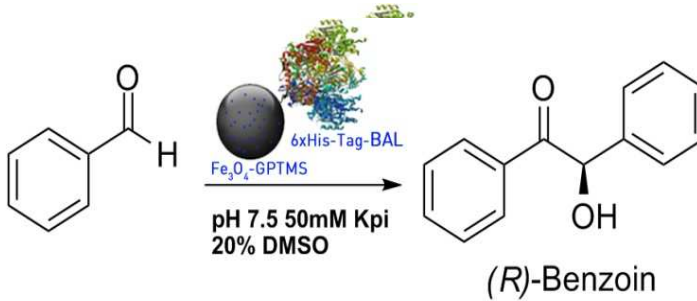


Şekil 4. 4 BAL-Manyetik Reçine'nin Manyetik Alanla Etkileşimi

BAL enziminin kovalent immobilizasyonunu analiz etmek için kovalent olmayan tutunmaları desorbe etmeğe konsantrasyonu yeterli olan 100mM imidazol içeren liziz tamponunda enzim-destek sistem optimize edilen immobilizasyon koşullarında inkübe edilmiştir. (Ma ve ark. 2006). Fakat, inkübasyon sonunda protein miktarı belirlendiğinde kovalent olmayan tutunma tespit edilmemiştir.

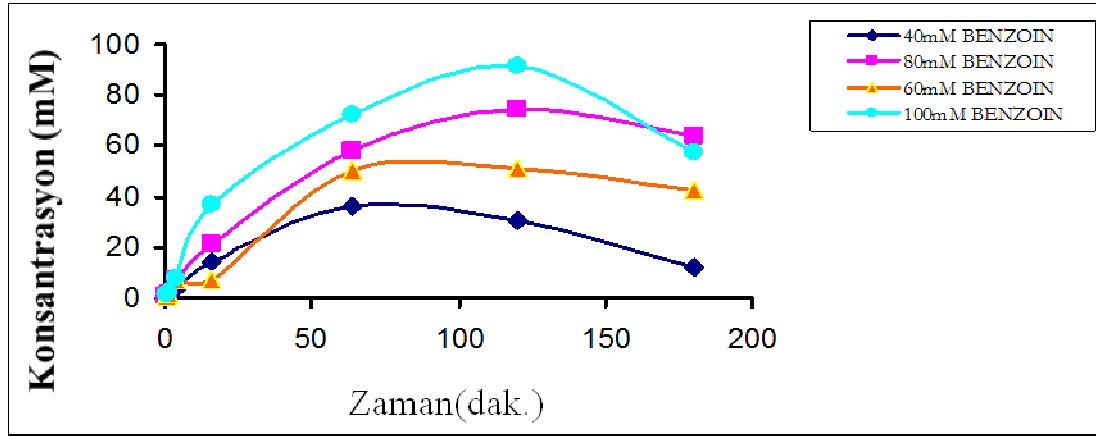
#### 4.2.1. Benzoin Kondenzasyon Reaksiyonu

İmmobilize BAL enziminin benzoin kondenzasyon reaksiyonu yığın(batch) sentezinde yürütülmüştür (Şekil 4.5.).



Şekil 4. 5 İmmobilize BAL Enziminin Katalizlediği Benzoin Kondenzasyon Reaksiyonu

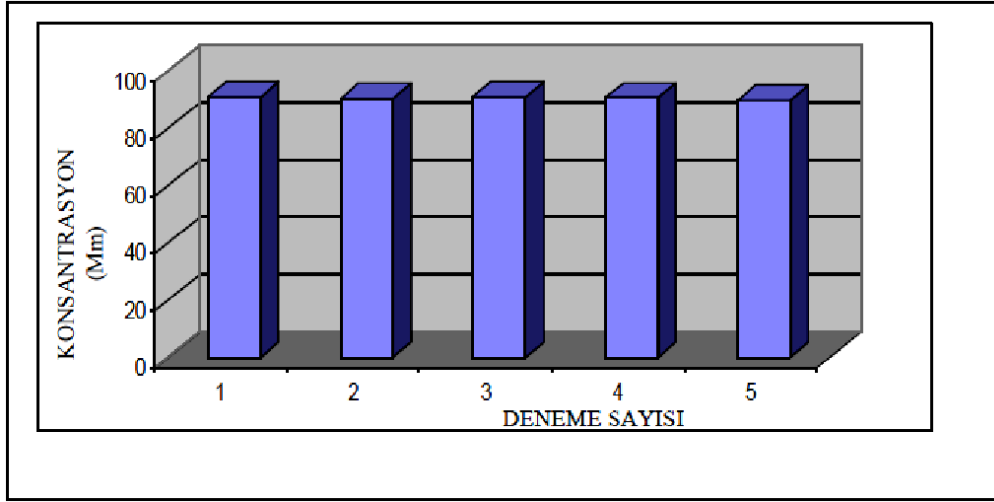
Benzoin kondenzasyon reaksiyonu, literatüre göre (Kurlemann ve Liese 2004, Sopaci ve ark. 2009, Drager ve ark. 2007) belirlenen farklı benzaldehid konsantrasyonlarında yapılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6 Benzoin Eldesinin Zamana Karşı Konsantrasyon Grafiği

Benzaldehid miktarı 40 mg, 60 mg, 80 mg olarak alınmış ve enzim aktiviteleri enzim-epoksi destek sistem için 3.44U, 5.3U ve 7.5U olarak belirlenmiştir. 100 mg benzaldehid konsantrasyonu inhibitör olarak (Drager ve ark. 2007) rapor edilmesine rağmen bizim destek sistemimizde en iyi enzim aktivitesi 100mg benzaldehid kullanıldığı zaman 10U olarak belirlenmiştir. 200 mg ve 300 mg benzaldehid uygulandığında benzaldehidin düşük çözünürlüğü ve ürünün inhibisyonundan dolayı enzim aktivitesi 1U ve 0.7U düştüğü tespit edilmiştir. BAL enzimi ve epoksi reçine arasındaki kovalent bağlanmadan dolayı literatürlerdeki değerlere kıyasla ölçülen enzim aktiviteleri 40 mg benzaldehid kullanılması durumunda bile daha yüksektir ( Sopaci ve ark. 2009).

Enzim aktivitelerini iyileştirmesinin yanı sıra immobilize enzim sistemleri, enzim kararlılığını artırmanın sonucu olan enzimin tekrar tekrar kullanılabilirliğini (Şekil 4.7) sunmuşlardır.

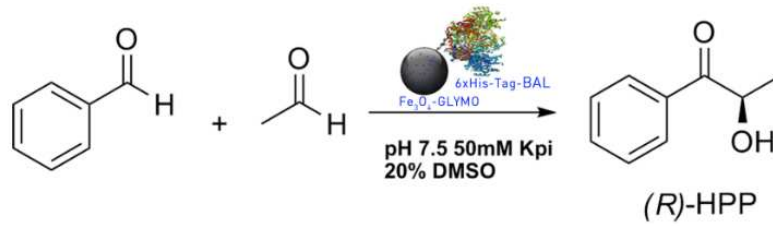


Şekil 4. 7 Benzoin Konsantrasyonunun Deneme Sayısına Karşı Grafiği

Bu kararlılık enzim ve destek arasındaki kovalent bağlanma ile elde edilmiştir. İmmobilizasyon afinitisi destekli olduğunda enzimler kazanılmasına rağmen enzim-destek sistem sınırlı tekrar kullanılabilirlik vermiş ve 4. denemeden sonra enzim aktivitelerinde bir azalma görülmüştür ( Sopaci ve ark. 2009). Fakat BAL enzimi epoksi reçineye kovalent bağlanmayla immobilize edildiği zaman 5. denemeden sonra bile enzim aktivitesinde bir azalma belirlenmemiştir. Aynı zamanda karboligasyon reaksiyonlarında artan dönüşümler ve seçicilikler oluşturmuştur. Sonuç olarak, afinitisi destekli immobilizasyonda enzimler geri kazanılmasına rağmen kovalent bağlanmadaki artan tekrar kullanılabilirlik bunu telafi etmiştir.

#### 4.2.2. 2-Hidroksipropiyofenon (HPP) Sentezi

BAL enziminin liyaz aktivitesi sitokazon, 5-metoksihidrokarpin ve taksol'un yan zincirinin sentezi için önemli bir başlangıç metaryali olan HPP'nin (Şekil 4.8) sentezi için denenmiştir (Demir ve ark. 2003).

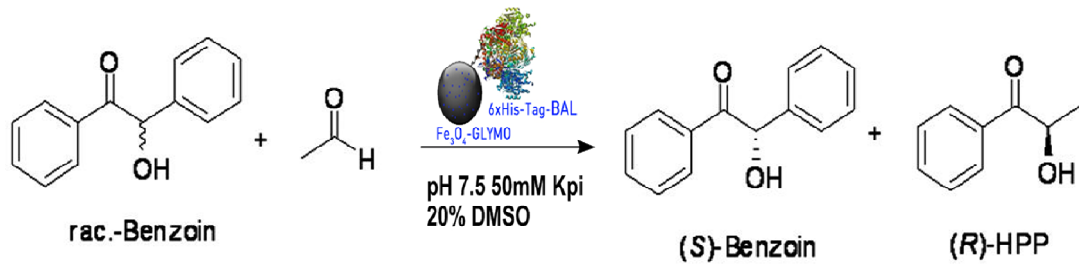


Şekil 4. 8 Şekil 4. 8 (R)-2-hidroksi-1-fenil propanon Sentezi

Benzaldehid ve asetaldehid arasındaki bu çapraz kondenzasyon reaksiyonu hem serbest enzim hemde immobilize enzim sistemlerle yapılmıştır. Immobilize sistem için, aynı miktarda enzim reçineye yüklenmiş ve maksimum dönüşüm elde edilmiştir. Reaksiyon takibi TLC ve HPLC analizleri ile yapılmıştır. Serbest enzim sistemleri için, Ni affinite kromatografisi ile saflaştırılan 20U enzim kullanarak yapılmıştır. 20U serbest enzim ilavesi aynı miktarda ürünün oluşumu için gereklidir.

#### 4.2.3. *Rac.*-Benzoin'in Kinetik Rezolüsyonu

Asetaldehid varlığında karboligasyonu takiben C-C bağının kırılmasını katalizlemek için BAL'ın substratı olarak (*R*)-benzoin kabul edebilir (Demir ve ark. 2002). Buna göre (*R*)-benzoin, asetaldehid varlığında BAL ile etkileştirilmiş ve kiral kolon kullanılarak HPLC ile reaksiyon takip edilmiştir. Asetaldehid ilavesi yüksek verimde HPP'nin oluşumu ile sonuçlanmıştır. *Rac.*-benzoin ile reaksiyonun tekrarlanmasıyla, kolon kromatografisi ile ürünlerin ayrılmasından sonra hemen hemen optik olarak saf (98% ee) (*S*)-benzoin ve HPP meydana gelmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4. 9 *rac.*-benzoin' nin kinetik rezolüsyonu



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Benzaldehit liyaz (BAL, EC 4.1.2.38) enzimi, benzoinin açıl bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehitlerin ve açiloinlerin sentezinde katalizör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bağ kırılma reaksiyonunda, benzaldehit liyaz enzimi yalnız R-konfigürasyonundaki benzoin molekülünü katalizleyerek tepkimeyi oluşturmakta; S-konfigürasyonundaki benzoin ise tepkimeye girmemekte; açiloin reaksiyonunda da sadece R-benzoin oluşmaktadır. Bundan dolayı son derece önem arzeden bir enzim olma özelliğini taşımaktadır.

Katı destek yüzeye afiniti kromatografisiyle BAL enziminin immobilizasyonu daha önce çalışılmıştır (Sopaci ve ark. 2009). Fakat BAL enziminin kataliz reaksiyonları için kovalent olarak immobilizasyonu daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmada, BAL enzimi manyetik reçine üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir.

BAL enziminin kovalent olarak immobilizasyonu enzim aktivitesini en yüksek seviyeye çıkarmıştır. Bu sistem, C-C-bağ kırılması ve oluşumu ile BAL katalizli açiloin reaksiyonlarında kullanılır. Ayrıca sistem, yüksek enzim aktivitesi (10U) , kararlılığı (5 kez kullanımı sonucunda hiçbir aktivite kaybı olmamıştır) ve ham ekstraktan ve reaksiyon ortamından enzimin kolayca ayrılması kolaylığını sağlamıştır.





## 6.KAYNAKLAR

Anonymous, 2004. Trend Belirleyici Yeni Bir Yaklaşım Nano Teknoloji. Tekstil Teknoloji, 9(102):186-187.

Balcı, H. 2006. Akıllı (Fonksiyonel) Tekstiller, Seçilmiş Kumaşlarda Antibakteriyel Apre ve Performans Özellikleri. Ç.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Adana, 251s.

Bozkaya, Y. 2006b. Nanoteknoloji Yüksek Lisans Programı. Anadolu Üniversitesi, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Nanoteknoloji Bilim Dalı (<http://www.itab.anadolu.edu.tr/itab/pdf/nylp.pdf>).

Brinker C.J. Scherer G.W.1990. "Sol-Gel Science", Academic Press, San Diego

Bradford, MM.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.

Celep, Ş. 2007.Nanoteknoloji ve tekstilde uygulama alanları.Yüksek lisans tezi,Adana,

Cornell, R. M. Schwertmann, U.2003. 'The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions,

Chen, WF. Kuo, PL.2007. Covalently cross-linked perfluorosulfonated membranes with polysiloxane framework. Macromolecules, 40:1987-1994.

Drager, G. Kiss, C. Kunz, U. Kirschning, A.2007. Enzyme-purification and catalytic transformations in a microstructured PASSflow reactor using a new tyrosine-based Ni-NTA linker system attached to a polyvinylpyrrolidinone-based matrix. Org Biomol Chem. 5:3657-3664.

Demir, A.S. Şeşenoğlu, Ö. Dünkermann, P. Müller, M. 2003. Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono-and dimethoxy acetaldehyde. *Org Lett.*;5:12, 2047-2050.

Demir, A.S., Şeşenoğlu, Ö. Eren, E. Hosrik, B. Pohl, M. Jansen, E. Kolter, D. Feldmann, R. Dünkermann, P. 2002. Enantioselective synthesis of  $\alpha$ -hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction. *Adv Synth Catal.*, 344: 96-103.

Demir,A.S. Pohl, M. Müller,M. 2006.USA Patent US, 7, 045,334, May. 16, World Patent, WO02002753; EU Patent: 0196275975.

Erkoç, Ş.2007. Nanobilim ve Nanoteknolojide Gelişmeler ve Uygulamalar, Nanobilim ve Nanoteknoloji, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş., Ankara, 2, 7 – 27

Fanfair, Devon, I. Desai, S. and Kelty, C. 2007. The Early History of Nanotechnology. *Connexions*. 6 May 2007 (<http://cnx.org/content/m14504/1.1/>)  
ErişimTarihi:22.01.2009

Feynman, R. P.1959. There is Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics, Adres:( <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>.)

Ghanaparakash ,G. Ayyappan ,S.Jayakumar, T.Philip, J. Raj ,B. 2006. *Nanotechnology* 17: 5851-5857.

Guo, Z. Henry ,L.L. Palshin ,V. Podlaha, E.J. 2006. *J. Mater. Chem.* 16: 1772-1777.

Howarter, J A. Youngblood, J P.2006. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22: 11142- 11147.

Jin, Pan.Qingwei, Yang . 2007. Antibody-functionalized magnetic nanoparticles for the detection of carcinoembryonic antigen using a flow injection electrochemical device, Anal Bioanal Chem 388:279–286

Köse, S. Erdoğan, M. Güneş, İ. 2007. 21. Yüzyılda Nanoteknoloji Dünyası. Makine İhtisas,( <http://www.makineihtisas.com/detay.asp?y=393>)

Kut, D. Güneşoğlu, C. 2005. Nanoteknoloji ve Tekstil Sektöründeki Uygulamaları. Tekstil&Teknik, Şubat, 224-230.

Kurlemann, N. Liese, A.2004. Immobilization of benzaldehyde lyase and its applications as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of a chiral 2-hydroxy ketone, Tetrahedron Asymmetry, 15:2955-2958.

Khollam ,YB. Dhage, SR. Potdar, HS. Deshpande ,SB. Bakare ,PP. Kulkarni, SD. & Date ,SK. 2002. Mater. Lett. 56: 571-577.

Luther, W.2004. International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology, March

Leonard, M. J. Chromatogr, B. 1997.699, 3-27.

Liu, ZL. Wang, X. Yao, KL. Du, GH. Lu, QH. Ding ,Z. Tao, J. Ning ,Q. Luo ,XP. Tian, DY. & Xi ,D. 2004. J. Mater Sci. 39: 2633-2637.

Lin, Y.J. Wang, L. Lin ,JG. Huang, YY. & Chiu ,W-Y. 2003. Synthetic Metals 135-136: 769-770.

Lu Y., Yin Y., Mayers B.T., Xia Y. 2002. Nano Lett. 2 :183.

Mateo, C. Lorente, GF. Abian, O. Garcia , JL. Lafuente, RF. Guisan, JM.2000. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*. 1:739-745.

Mateo ,C. Lorente, GF. Cortes, E. Garcia, JL. Lafuente, RF. Guisan, JM.2001. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-histidine-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnology and Bioengineering*. 76: 3: 269-276.

Ma, Z. Guan, Y. Liu, H.2006. Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption. *J Magn Magn Mater*. 301:(2)469-477.

Namlıgöz, E.S. Hoşaf, E. Çoban, S. Gülümser, T. Tarakçıoğlu, I. 2007. Su, Yağ ve Kir İtici Bitim İşlemlerindeki Son Gelişmeler (Bölüm 2). *Tekstil ve Konfeksiyon*, 17(1):59-64.

Naschie, M.S.E. 2006. Nanotechnology for the Developing World. *Chaos Solitons&Fractals*, 30(4):769-773.

Neamtu, I. Ioanid ,A. Chiriac, A. Nita, LE. Ioanid, GE. & Popescu, M .2005 *Rom. Journ. Phys*. 50 (9–10): 1081-1087.

Özdoğan, E. Demir, A. Seventekin, N. 2006b. Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon* 16(3):159-163.

Plueddemann, E P. 1991.*Silane Coupling Agents*. 2nd Edition. New York : Plenum Press, p118.

Phelan, M. L. Nock, S.2003. *Proteomics* 3, 2123-2134.

Qian, L. Hinestroza, J.P. 2004. Application of Nanotechnology for High Performance Textiles. *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management*, 4(1):1-7.

Rodgers, P. (2006). "Nanoelectronics: Single file". *Nature Nanotechnology* doi:10.1038/nnano.2006.5

Sopaci, B. Şimşek ,İ. Tural, B. Volkan, M. Demir, AS. 2009. Carboligation reactions with benzaldehyde lyase immobilized on superparamagnetic solid support, *Org. Biomol. Chem*, 7:1658-1664.

Schottner, G.2001. Hybrid sol-gel-derived polymers: applications of multifunctional materials. *Chem Mater*. 13:3422-3435.

Santra ,S. Tapeç, R. Theodoropoulou, N. Dobson, J. Hebard ,A. Tan ,WH.2001. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants. *Langmuir* 17:2900-2906

Shi ,D L.2006. *Introduction to Biomaterials*. 1st Edition. 13. *Polymer Matrix Composite Biomaterials*. New Jersey: World Scientific Publishing Co, p198.

Shen, L. Stachowiak, A. Hatton, TA .& Laibinis, PE. 2000. *Langmuir* 16: 9907-9911.

Saiyed, Z. M. Telang, S. D. Ramchand, C. N. 2003. *Biomagn. Res. Technol.* 1, 2.

Songül,Ş.2002. Enzim tutuklanmış polivinilferrosenyum perklorat modifiye elektrodu ile asetil kolin tayini.Yüksek lisans tezi,Fen Bilimleri Enstitüsü,Süleyman Demirel Üniversitesi,11-12-13.

Sharifzadeh, M.2006. *Nanotechnology Sector Report*, Cronus Capital Markets, 1st Quarter

Süpüren,G.Kanat,Z.E.Çay,A.Kırcı,T.Gülümser,T.Tarakçıoğlu,I. 2007b. Nano Lifler (Bölüm 1). Tekstil ve Konfeksiyon, 17(1):15-17.

Şimşek,İ.2009. ‘ Benzaldehyde Lyase Catalyzed Synthesis of Novel Acyloins’ the graduate school of natural and applied sciences of middle east technical university

Tarducci, C. Kinmond, E J. Badyal ,J P S. 2000.Epoxyde-functionalized solid surfaces. Chem Mater. 12: 1884-1889.

Teja, A.S. Koh, P. Y.2009. Prog. Crys. Growth Charac. of Mater. 55, 22.

Uslan A.H.1986. Enzim Kinetiği. Temel ve Uygulamalı Enzimolji. (Telefoncu,A.), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir. 59-91

Ueda, E.K.M. Gout, P.W. and Morganti, L.2003. Journal of Chromatography A, 988, 1-23.

Vandenberg ,E. Elwing ,H. Askendal, A.1991. et al. Protein immobilization to 3-aminopropyl triethoxy silane/glutaradehyde surface: characterization by detergent washing. J Colloid Interf Sci, 143: 327—335.

Xu ,ZZ. Wang, CC. Yang ,WL. Deng ,YH. & Fu, SK. 2004. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 277: 136-143.

Xin, J.H. 2006. Nanotechnology for Textiles and Apparel. The Hong Kong

Zhang, Q. Huang, RF. Guo, LH.2009. One-step and high-density protein immobilization on epoxysilane-modified silica nanoparticles. Chinese Sci Bull. 54: 2620-2626.

Zhiya, Ma. Yueping, Guan. Huizhou, Liu.2006. Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 301: 469–477

Zhu ,Y. & Wu, Q. 1999. *Journal of Nanoparticle Research* 1: 393-396.

Wanunu, M. Livne ,S. Vaskevich ,A.2006. et al. Assembly of coordination nanostructures via ligand derivatization of oxide surfaces. *Langmuir*. 22: 2130-2135.

Wan ,M. Li, J.1998. Synthesis and electrical–magnetic properties of polyaniline composites. *J Polym Sci Polym Chem*.36:2799-2805.

Willems and van der Willenberg (W & W),2005. NRM Nanoroadmap Project: Roadmap Report on Nanoparticles, November

Wiesman, A.(1975. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Halsted press. New York.

Wilson, J. L. Poddar, P. Frey, N. A. Srikanth, H. Mohamed, K. Harmon J. P. Kotha, S. Wachsmuth, J. J.2004. *Appl. Phys.* 95, 1439

Wan, S. Huang ,J. Yan, H. Liu, K. 2006.*J. Mater. Chem*.16: 298-303.

Wormuth, K. 2001. *J. Colloid Interface Sci.* 241: 366-377.

<http://w3.balikesir.edu.tr/~sedacan/demiroksitnanaoparcacik.htm>





## ÖZGEÇMİŞ

Bülent ÇELEBİ 1976 yılında Adıyaman'ın Besni ilçesinde doğdu. Adıyaman'ın Tut ilçesinin Çanakçı köyünde çanakçı ilkokulunda 1986 yılında mezun oldu. Adıyaman'ın Gölbaşı ilçesinde gölbaşı ortaokulunda 1991de mezun oldu. Adıyaman'ın Gölbaşı ilçesinde Gölbaşı lisesinde 1994 te mezun oldu. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği eğitimine 1996 yılında başladı. .Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliğinden 2000 yılında mezun oldu. Dicle Üniversitesi Kimya Bölümü Anabilim Dalında 2009 yılında yüksek lisans eğitimine başladı.