

**T.C.  
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**ALKOL DEHİDROGENAZ BAĞLI  
MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN  
KİRAL ALKOL ÜRETİMİNDE  
KULLANILMAK ÜZERE GELİŞTİRİLMESİ**

**BETÜL GENÇ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI  
DOÇ. DR. AYHAN ÇELİK**

**GEBZE**

**2011**



## YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ..... tarihinde tez savunma sınavı yapılan .....'ın tez çalışması ..... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ayhan ÇELİK

ÜYE

: Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Doç. Dr. Melek ÖZKAN

### ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../20... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

### TEZ KONU BAŞLIĞI: ALKOL DEHİDROGENAZ BAĞLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN KİRAL ALKOL ÜRETİMİNDE KULLANILMAK ÜZERE GELİŞTİRİLMESİ

YAZAR ADI: BETÜL GENÇ

Özgün özellikleri ve biyomoleküllerle aynı boyutta olma durumları gibi çeşitli özelliklerinden dolayı nanopartiküllere ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bu özelliklerle birlikte manyetik nanopartiküller nanokatalizör olarak enzim-nanopartikül konjuge sistemi olarak hazırlanabilmektedir.

Bu çalışmada hem katekol grubu ile modifiye hem de modifiye olmamış manyetik demir oksit nanopartikülleri sentezlenmiştir. Süperparamanyetik özellikte oldukları belirlenmiş ve çeşitli metotlarla yüzey karakterizasyonları yapılmıştır.

Biyokatalizör olarak kullanılacak alkol dehidrogenaz enzimi mezofilik olan *Staphylococcus saprophyticus* bakterisinden pET14b vektör sistemine klonlanmıştır. Tahmini alkol dehidrogenaz genini taşıyan pET14b plazmidi *E. Coli* BL21(DE3) ekspresyon kompetent hücrelerine aktarılmıştır. Hem IPTG indüksiyonu ile hem de oto-indüksiyon besiyerinde eksprese edilen alkol dehidrogenaz enzimi inklüzyon cisimciği olarak elde edilmiştir. *in vivo* doğru katlanma veya *in vitro* tekrar katlanma çalışmaları sonucu alkol dehidrogenaz enzimi saf olarak elde edilmiş ancak aktif formda elde edilememiştir. Bu proteinle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu nedenle çalışmalarda *Bacillus thuringiensis* kaynaklı alkol dehidrogenaz enzimi kullanılmıştır.

İmmobilizasyon sisteminin ekonomik olmasını sağlamak için kofaktör rejenerasyonunda *Candida methylica* kaynaklı format dehidrogenaz kullanılmış ve tüm immobilizasyon sistemleri bu enzim ile optimize edilmiştir.

Manyetik nanopartiküllere OXDC ve *cm*FDH koimmobilizasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir. Kiral alkol üretiminde kullanılmak üzere dizan edilen alkol dehidrogenaz ve format dehidrogenaz birlikte immobilizasyon çalışmaları geliştirilmektedir.

## SUMMARY

### **TITLE OF THESIS: DEVELOPMENT OF ALCOHOL DEHYDROGENASE CONJUGATED MAGNETIC NANOPARTICLES FOR PRODUCTION OF CHIRAL ALCOHOL**

**AUTHOR NAME: BETUL GENC**

Nanomaterials have attracted great interest because of specific properties such as magnetic behavior and conductivity and various attributes, including the similar size of biomolecules. Nanoparticles have designed enzyme-nanoparticles conjugate system as nanocatalyst with this properties.

In this study, both catechol modified and unmodified magnetic iron oxide nanoparticles were synthesized and surface characterizations were analyzed with various methods.

Alcohol dehydrogenase as biocatalyst was cloned into pET14b vector system from *Staphylococcus saprophyticus*. pET14b vector containing putative alcohol dehydrogenase gene was transformed into *E.Coli* BL21(DE3) expression competent cells. Alcohol dehydrogenase was expressed as inclusion bodies with IPTG induction and in auto-induction medium. Alcohol dehydrogenase enzyme was purified as pure but not in active form with *in vivo* and *in vitro* refolding applications. Therefore alcohol dehydrogenase from *Bacillus thuringiensis* was used in this study.

Formate dehydrogenase from *Candida methylica* was used for cofactor regeneration that makes immobilization system economic and all systems were optimized with formate dehydrogenase.

Oxalate decarboxylase and formate dehydrogenase coimmobilization was carried out successfully. Alcohol dehydrogenase and formate dehydrogenase coimmobilization have been developed for chiral alcohol synthesis.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle danışman hocam Doç. Dr. Ayhan ÇELİK'e, maddi ve manevi desteklerinden dolayı Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN ve Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a teşekkür ederim.

Tez savunma jüri üyem Doç.Dr. Melek ÖZKAN'a, tez çalışmamı destekleyen GYTE Bilimsel Araştırma Projesi Proje yürütücüsü Yrd. Doç. Dr. Nil Saydan'a, analizlerin gerçekleşmesini sağlayan Dr. Uzman Serpil Harbeck, Yrd. Doç. Dr. Numan AKDOĞAN, Arş. Gör. Mustafa ÖZTÜRK, Uzman Ahmet NAZIM ve Adem ŞEN'e teşekkür ederim.

Laboratuar arkadaşlarım Pınar AKKUŞ, Aişe ÜNLÜ, Derya GÜNAL, Fatih AKTAŞ, Fatma ERTAN, Gülden AŞÇI, Hamdi YILDIZ, İlknur AKSOY, Neslihan Gezer, Şaban KALAY, Zehra Ölçer'e ve Betül KALAY'a tüm desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana inanan ve katlanan canım aileme sonsuz teşekkürler...

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                    |      |
|----------------------------------------------------|------|
| ÖZET                                               | iv   |
| SUMMARY                                            | vi   |
| TEŞEKKÜR                                           | vii  |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ                                 | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                    | xi   |
| EK ŞEKİLLER DİZİNİ                                 | xv   |
| ÇİZELGE DİZİNİ                                     | xvi  |
| KISALTMALAR DİZİNİ                                 | xvii |
| 1. GİRİŞ VE TEZİN AMACI                            | 19   |
| 2. LİTERATÜR TARAMASI                              | 22   |
| 2.1. Nanopartiküller ve Kullanım Alanları          | 22   |
| 2.2. Manyetik Nanopartikül Hakkında Genel Bilgi    | 23   |
| 2.3. Manyetik Nanopartikül Sentezi                 | 25   |
| 2.3.1. Birlikte Çöktürme ile Klasik Sentez         | 25   |
| 2.4. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu   | 26   |
| 2.4.1. Boyut ve Yüzey Karakterizasyonu             | 27   |
| 2.4.2. Manyetik Özelliğinin Belirlenmesi           | 28   |
| 2.5. Manyetik Nanopartikül Modifikasyonu           | 30   |
| 2.6. Manyetik Nanopartikül-Enzim Konjuge Sistemler | 33   |
| 2.6.1. Bağlanma Kimyası                            | 35   |
| 2.7. Enzim Sistemleri                              | 38   |
| 2.7.1. Alkol Dehidrogenaz Hakkında Genel Bilgi     | 39   |
| 2.7.2. Format Dehidrogenaz Hakkında Genel Bilgi    | 39   |
| 3. MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ                   | 42   |
| 3.1. Giriş                                         | 42   |
| 3.2. Materyal                                      | 43   |
| 3.3. Metot                                         | 44   |

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.1. Manyetik Nanopartikül Sentezi                                        | 44  |
| 3.4. Sonuç                                                                  | 48  |
| 3.4.1. Modifiye Olmamış Manyetik Nanopartikül Sentezi                       | 48  |
| 3.4.2. Modifiye Manyetik Nanopartikül Sentezi                               | 53  |
| 4. ADH ENZİMLERİ İÇİN REKOMBİNANT SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ                | 74  |
| 4.1. Materyal ve Metot                                                      | 74  |
| 4.1.1. Materyal                                                             | 74  |
| 4.1.2. Metot                                                                | 75  |
| 4.1.2.1. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Kaynaklı ADH Enzimi            | 75  |
| 4.1.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> Kaynaklı ADH Enzimi                  | 85  |
| 4.2. Sonuç                                                                  | 87  |
| 4.2.1. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Kaynaklı ADH Enzimi              | 87  |
| 4.2.1.1. ssADH Enziminin <i>in vitro</i> Tekrar Katlanma Çalışmaları        | 95  |
| 4.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> Kaynaklı ADH Enzimi                    | 97  |
| 5. <i>C. methylica</i> KAYNAKLI FDH ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU              | 100 |
| 5.1. Materyal ve Metot                                                      | 100 |
| 5.1.1. Materyal                                                             | 100 |
| 5.1.2. Metot                                                                | 100 |
| 5.2. Sonuç                                                                  | 102 |
| 6. MANYETİK NANOPARTİKÜL-ENZİM KONJUGE SİSTEMLERİ                           | 107 |
| 6.1. Materyal ve Metot                                                      | 107 |
| 6.1.1. Materyal                                                             | 107 |
| 6.1.2. Metot                                                                | 107 |
| 6.1.2.1. Katekol Modifiye Manyetik Nanopartiküllere Protein İmmobilizasyonu | 107 |
| 6.1.2.2. Modifiye Olmamış Manyetik Nanopartiküllere Protein İmmobilizasyonu | 108 |
| 6.1.2.3. İmmobilize <i>cmFDH</i> Çalışmaları                                | 109 |
| 6.1.2.4. İmmobilize <i>btADH</i> Çalışmaları                                | 112 |
| 6.1.2.5. Okzalit Dekarboksilaz Enziminin İmmobilizasyon Çalışmaları         | 112 |
| 6.1.2.6. <i>btADH</i> ve <i>cmFDH</i> Koimmobilizasyonu                     | 114 |

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 6.1.2.7. OXDC ve <i>cm</i> FDH Koimmobilizasyonu          | 114 |
| 6.2. Sonuç                                                | 115 |
| 6.2.1. Manyetik Nanopartiküllere Enzim Bağlanma Özgüllüğü | 115 |
| 6.2.2. İmmobilize <i>cm</i> FDH Çalışmaları               | 116 |
| 6.2.3. İmmobilize <i>bt</i> ADH Çalışmaları               | 133 |
| 6.2.4. İmmobilize OXDC Çalışmaları                        | 136 |
| 6.2.5. <i>bt</i> ADH ve <i>cm</i> FDH Koimmobilizasyonu   | 139 |
| 6.2.6. OXDC ve <i>cm</i> FDH Koimmobilizasyonu            | 145 |
| 7. GENEL SONUÇ VE TARTIŞMA                                | 148 |
| 8. EKLER                                                  | 152 |
| 8.1. Ek 1                                                 | 152 |
| 8.2. Ek 2                                                 | 159 |
| 8.3. Ek 3                                                 | 162 |
| 9. KAYNAKLAR                                              | 166 |
| 10. ÖZGEÇMİŞ                                              | 173 |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u>                                                                                            | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.1. (A) Ferromanyetik maddenin mıknatıslanma $M(H)$ histeresis eğrisi; (B) ZFC-FC mıknatıslanma ölçümü | 28           |
| 2.2. (a) Termal enerji diyagramı ve (b,c) boyutlara göre histeresis eğrileri                            | 29           |
| 2.3. (a) Sürfaktan ilavesi ve (b) sürfaktan değişimi ile yüzey fonksiyonlandırılması                    | 32           |
| 2.4. OA COO <sup>-</sup> grubu ve Fe atomu arasındaki şelatlayıcı bidentat etkileşimi                   | 32           |
| 2.5. OA kaplı demir oksit nanopartikül sentezi                                                          | 33           |
| 2.6. Elektrostatik bağlanma                                                                             | 35           |
| 2.7. Kofaktör ile protein bağlanması                                                                    | 36           |
| 2.8. Amino asit ile direk bağlanma                                                                      | 36           |
| 2.9. Karbodiimid aktivasyonu ile nanopartiküllere enzim bağlanması                                      | 37           |
| 2.10. Glutaraldehit ile nanopartiküllere enzim bağlanması                                               | 38           |
| 2.11. ADH katalizli asimetrik indirgenme reaksiyonu                                                     | 39           |
| 2.12. Kofaktör rejenerasyonu                                                                            | 40           |
| 3.1. DOP ile modifiye nanopartikül sentezi                                                              | 42           |
| 3.2. CAF ile modifiye nanopartikül sentezi                                                              | 42           |
| 3.3. Ligant değişimi ile DOP ve CAF bağlı nanopartikül sentezi                                          | 43           |
| 3.4. Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-OH                                             | 48           |
| 3.5. MN-OH FTIR spektrumu                                                                               | 48           |
| 3.6. MN-OH SEM görüntüsü                                                                                | 49           |
| 3.7. MN-OH SEM görüntüsü                                                                                | 49           |
| 3.8. MN-OH histeresis eğrisi                                                                            | 50           |
| 3.9. MN-OH histeresis eğrisinde Hc ve Mr değerleri                                                      | 50           |
| 3.10. MN-OH TGA eğrisi                                                                                  | 51           |
| 3.11. Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-NH <sub>2</sub>                               | 51           |
| 3.12. MN-NH <sub>2</sub> FTIR spektrumu                                                                 | 52           |
| 3.13. MN-NH <sub>2</sub> SEM görüntüsü                                                                  | 52           |
| 3.14. MN-NH <sub>2</sub> TGA eğrisi                                                                     | 53           |
| 3.15. Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-CA                                            | 53           |

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 3.16. MN-CA SEM görüntüsü                                     | 54 |
| 3.17. MN-CA boyut analizi                                     | 54 |
| 3.18. MN-CA FTIR spektrumu                                    | 54 |
| 3.19. CA molekül yapısı                                       | 55 |
| 3.20. Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-PVA | 55 |
| 3.21. PVA molekül yapısı                                      | 55 |
| 3.22. MN-PVA FTIR spektrumu                                   | 56 |
| 3.23. MN-PVA SEM görüntüsü                                    | 56 |
| 3.24. MN-PVA boyut analizi                                    | 56 |
| 3.25. MN-PVA TGA eğrisi                                       | 57 |
| 3.26. MN-DX FTIR spektrumu                                    | 57 |
| 3.27. MN-DX SEM görüntüsü                                     | 58 |
| 3.28. MN-OA FTIR spektrumu                                    | 58 |
| 3.29. OA molekül yapısı                                       | 58 |
| 3.30. Saf OA TGA eğrisi                                       | 59 |
| 3.31. MN-NH <sub>2</sub> -OA TGA eğrisi                       | 59 |
| 3.32. MN-OH-OA FTIR spektrumu                                 | 60 |
| 3.33. MN-OH-OA FTIR spektrumu                                 | 61 |
| 3.34. MN-OH-OA TGA eğrisi                                     | 61 |
| 3.35. MN-DOP-MT1 FTIR spektrumu                               | 62 |
| 3.36. MN-DOP-MT2 FTIR spektrumu                               | 62 |
| 3.37. MN-DOP-MT3 FTIR spektrumu                               | 63 |
| 3.38. MN-DOP-MT3 SEM görüntüsü                                | 63 |
| 3.39. MN-DOP-MT3 histeresis eğrisi                            | 64 |
| 3.40. MN-DOP-MT3 histeresis eğrisinde Hc ve Mr değerleri      | 64 |
| 3.41. MN-DOP-MT3 TGA eğrisi                                   | 65 |
| 3.42. Ligant değişiminden önce ve sonra MNler                 | 65 |
| 3.43. MN-DOP-MT4 FTIR spektrumu                               | 66 |
| 3.44. MN-DOP-MT4 TGA eğrisi                                   | 67 |
| 3.45. MN-DOP-MT5 FTIR spektrumu                               | 67 |
| 3.46. MN-CAF-MT1 FTIR spektrumu                               | 68 |
| 3.47. MN-CAF-MT1 histeresis eğrisi                            | 69 |
| 3.48. MN-CAF-MT1 histeresis eğrisinde Hc ve Mr değerleri      | 69 |
| 3.49. MN-CAF-MT1 TGA eğrisi                                   | 70 |

|                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.50. Ligant değişiminden önce ve sonra MNler                                                     | 70  |
| 3.51. MN-CAF-MT2 FTIR spektrumu                                                                   | 71  |
| 3.52. OA TLC ile belirlenmesi                                                                     | 71  |
| 3.53. MN-CAF-MT2 TGA eğrisi                                                                       | 72  |
| 4.1. ssADH geni PCR reaksiyon ürününe ait agaroz jel görüntüsü                                    | 87  |
| 4.2. ssADH PCR ürünü ve pET 14b plazmidinin restriksiyon enzimleriyle kesimi                      | 88  |
| 4.3. Restriksiyon analizi                                                                         | 88  |
| 4.4. Oto-indüksiyon besiyerinde ssADH ekspresyonu                                                 | 89  |
| 4.5. ssADH saflaştırılması                                                                        | 89  |
| 4.6. IPTG indüksiyon yöntemiyle ssADH enziminin ekspresyonu                                       | 90  |
| 4.7. Liziz işleminden sonra ssADH ve kontrolün SDS-PAGE görüntüsü                                 | 91  |
| 4.8. Isı şokunun ssADH enzim ekspresyonuna etkisi                                                 | 92  |
| 4.9. ssADH Ekspresyonuna Benzil Alkolün Etkisi (0-4mM)                                            | 92  |
| 4.10. ssADH Ekspresyonuna Benzil Alkolün Etkisi (5-10mM)                                          | 93  |
| 4.11. ssADH ekspresyonuna betain monohidratın etkisi                                              | 93  |
| 4.12. ADHss ve şaperon koekspresyonu (IPTG sonrası 2. Saat alınan pellet)                         | 94  |
| 4.13. ADHss ve şaperon koekspresyonu (IPTG sonrası 4. Saat alınan pellet)                         | 94  |
| 4.14. ssADH enziminin saflaştırılması                                                             | 95  |
| 4.15. ssADH <i>in vitro</i> tekrar katlanma işlemi                                                | 95  |
| 4.16. ssADH <i>in vitro</i> tekrar katlanma işlemi                                                | 96  |
| 4.17. ssADH <i>in vitro</i> tekrar katlanma işlemi                                                | 97  |
| 4.18. Oto-indksiyon ile <i>btADH</i> ekspresyonu ve saflaştırılması                              | 98  |
| 5.1. Oto-indksiyon ile <i>cmFDH</i> ekspresyonu ve saflaştırılması                               | 102 |
| 5.2. <i>cmFDH</i> Michaelis-Menten grafiği                                                        | 103 |
| 5.3. <i>cmFDH</i> aktivitesine sıcaklığın etkisi                                                  | 103 |
| 5.4. <i>cmFDH</i> aktivitesine pH'nın etkisi                                                      | 104 |
| 5.5. <i>cmFDH</i> termal kararlılığı                                                              | 104 |
| 5.6. <i>cmFDH</i> pH kararlılığı                                                                  | 105 |
| 6.1. Bağlanma özgüllüğü                                                                           | 116 |
| 6.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> SEM görüntüleri                         | 117 |
| 6.3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cmFDH</i> SEM grntleri                             | 117 |
| 6.4. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> histeresis eğrisi                       | 118 |
| 6.5. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> histeresis eğrisinde Hc ve Mr değerleri | 118 |
| 6.6. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> TGA eğrisi                              | 119 |

|                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.7. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cm</i> FDH TGA eğrisi                                       | 119 |
| 6.8. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CAF- <i>cm</i> FDH histeresis eğrisi                               | 120 |
| 6.9. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CAF- <i>cm</i> FDH histeresis eğrisinde Hc ve Mr değerleri         | 121 |
| 6.10. BSA standart eğrisi                                                                               | 123 |
| 6.11. Enzim miktarının immobilizasyona etkisi                                                           | 124 |
| 6.12. (A) EDA ve (B) GLY yapısı                                                                         | 125 |
| 6.13. Glisin ve EDA etkisi (1.gün)                                                                      | 126 |
| 6.14. GLY ve EDA etkisi (2.gün)                                                                         | 126 |
| 6.15. Tekrarlı kullanım kararlılığı                                                                     | 127 |
| 6.16. Saklama tamponu etkisi                                                                            | 128 |
| 6.17. Saklama kararlılığı                                                                               | 129 |
| 6.18. Saklama kararlılığı                                                                               | 130 |
| 6.19. Sıcaklık profili                                                                                  | 131 |
| 6.20. pH profili                                                                                        | 131 |
| 6.21. Termal kararlılık                                                                                 | 132 |
| 6.22. pH kararlılığı                                                                                    | 133 |
| 6.23. Tekrarlı kullanım kararlılığı                                                                     | 135 |
| 6.24. Saklama kararlılığı                                                                               | 135 |
| 6.25. IPTG ile OXDC ekspresyonu ve saflaştırılması                                                      | 136 |
| 6.26. Oto-indüksiyon ile OXDC ekspresyonu ve saflaştırılması                                            | 136 |
| 6.27. OXDC reaksiyonu                                                                                   | 137 |
| 6.28. Kalibrasyon eğrisi                                                                                | 138 |
| 6.29. <i>bt</i> ADH reaksiyonu ve kofaktör rejenerasyonu                                                | 139 |
| 6.30. BZA HPLC kromatogramı                                                                             | 140 |
| 6.31. BA HPLC kromatogramı                                                                              | 140 |
| 6.32. <i>bt</i> ADH ve <i>cm</i> FDH beraber reaksiyonu                                                 | 141 |
| 6.33. Serbest <i>bt</i> ADH ve <i>cm</i> FDH sisteminin HPLC kromatogramı                               | 141 |
| 6.34. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>bt</i> ADH+ <i>cm</i> FDH sisteminin HPLC kromatogramı | 142 |
| 6.35. Serbest <i>bt</i> ADH reaksiyonunun HPLC kromatogramı                                             | 143 |
| 6.36. <i>bt</i> ADH ve <i>cm</i> FDH beraber reaksiyonu                                                 | 143 |
| 6.37. Serbest <i>bt</i> ADH ve <i>cm</i> FDH sisteminin HPLC kromatogramı                               | 144 |
| 6.38. BA ve reaksiyon karışımının HPLC kromatogramı                                                     | 145 |
| 6.39. OXDC ve <i>cm</i> FDH koimmobilizasyon aktivite verimi                                            | 146 |

## EK ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Sekil</u></b>                                        | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. ssADH MALDI-TOF kütle spektrumu                         | 152                 |
| 2. DOP ile modifiye nanopartiküllere enzim immobilizasyonu | 153                 |
| 3. CAF ile modifiye nanopartiküllere enzim immobilizasyonu | 154                 |
| 4. Mıknatıslanma eğrileri                                  | 155                 |
| 5. Mıknatıslanma eğrileri                                  | 156                 |
| 6. Doygun mıknatıslanma                                    | 157                 |
| 7. Nanopartiküllerin doyurma işlemi                        | 158                 |

## ÇİZELGE DİZİNİ

| <b><u>Cizelge</u></b>                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. Metal ve yarı-iletken çekirdek materyalleri                                       | 23                  |
| 2.2. Demir oksit nanopartikül stabilizasyonunda kullanılan materyaller ve uygulamaları | 31                  |
| 5.1. <i>cm</i> FDH kinetik parametreleri                                               | 102                 |
| 6.1. Bağlanma özgülüğü                                                                 | 115                 |
| 6.2. İmmobilizasyon sistemlerinde <i>cm</i> FDH bağlanma kapasitesi                    | 122                 |
| 6.3. İmmobilize <i>cm</i> FDH miktarı                                                  | 123                 |
| 6.4. <i>cm</i> FDH aktivite verimi                                                     | 124                 |
| 6.5. <i>bt</i> ADH bağlanma kapasitesi                                                 | 134                 |
| 6.6. İmmobilize <i>bt</i> ADH aktivite verimi                                          | 134                 |
| 6.7. OXDC bağlanma kapasitesi                                                          | 137                 |
| 6.8. Format konsantrasyonu                                                             | 138                 |
| 6.9. OXDC spesifik aktivitesi ve immobilize OXDC aktivite verimleri                    | 139                 |
| 6.10. Koimmobilize <i>bt</i> ADH ve <i>cm</i> FDH aktivite verimleri                   | 142                 |

# KISALTMALAR DİZİNİ

|                                              |                                                                              |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| ss                                           | <i>S. saprophyticus</i>                                                      |
| pADHss                                       | ssADH genini taşıyan pET14b plazmid                                          |
| ADH                                          | Alkol dehidrogenaz                                                           |
| FDH                                          | Format Dehidrogenaz                                                          |
| Ms                                           | Doygun mıknatıslanma                                                         |
| Mr                                           | Kalan mıknatıslanma                                                          |
| Hc                                           | Zorlayıcı alan                                                               |
| OA                                           | Oleik asit                                                                   |
| EDC                                          | N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid                                   |
| NADH                                         | Nikotinamid adenin dinükleotid                                               |
| NADPH                                        | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat                                        |
| MN                                           | Manyetik nanopartikül                                                        |
| MN-OH                                        | NaOH çöktürmesiyle elde edilen nanopartikül                                  |
| MN-NH <sub>2</sub>                           | NH <sub>4</sub> OH çöktürmesiyle elde edilen nanopartikül                    |
| CA                                           | Sitrik asit                                                                  |
| MN-CA                                        | Sitrik asit ile modifiye nanopartikül                                        |
| PVA                                          | Polivinilalkol                                                               |
| MN-PVA                                       | Polivinilalkol ile modifiye partikül                                         |
| DX                                           | Dekstran                                                                     |
| MN-DX                                        | Dekstran ile modifiye partikül                                               |
| MN-NH <sub>2</sub> -OA                       | Oleik asit ile modifiye partikül                                             |
| MN-OH-OA                                     | Oleik asit ile modifiye partikül                                             |
| DOP                                          | Dopaminhidroklorür                                                           |
| MN-DOP-MT1, MT2, MT3, MT4, MT5               | Dopamin ile modifiye partikül                                                |
| CAF                                          | Kafeik asit                                                                  |
| MN-CAF-MT1, MT2                              | Kafeik asit ile modifiye partikül                                            |
| SEM                                          | Taramalı elektron mikroskobu                                                 |
| FTIR                                         | Fourier Transform Infrared Spektroskopisi                                    |
| PPMS                                         | Fiziksel Özellik Ölçüm Sistemi                                               |
| TGA                                          | Termal gravimetrik analiz                                                    |
| TLC                                          | İnce tabaka kromatografisi                                                   |
| OD <sub>600</sub>                            | 600nm'de optiksel yoğunluk                                                   |
| BSA                                          | Bovine serum albumin                                                         |
| cmFDH                                        | <i>Candida methylica</i> kaynaklı FDH                                        |
| btADH                                        | <i>Bacillus thuringiensis</i> kaynaklı ADH                                   |
| OXDC                                         | Okzalal dekarboksilaz                                                        |
| ssNTR                                        | <i>S. saprophyticus</i> kaynaklı nitroredüktaz                               |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA-enzim | Dopamin ile modifiye manyetik nanopartiküllere immobilize enzim              |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-enzim     | Modifiye olmamış nanopartiküllere immobilize enzim                           |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CAF-enzim    | Kafeik asit ile modifiye manyetik nanopartiküllere immobilize enzim          |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -enzim        | Modifiye olmamış manyetik nanopartiküllere immobilize enzim                  |
| EDC                                          | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid                                  |
| GLY                                          | Glisin                                                                       |
| EDA                                          | Etilendiamin                                                                 |
| PCR                                          | Polimer Zincir Reaksiyonu                                                    |
| SDS-PAGE                                     | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi                        |
| MALDI-TOF                                    | Matriks-yardımlı lazer desorbsiyonu/ionizasyonu-Time off flight kütle ölçümü |
| HPLC                                         | Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi                                        |
| BZA                                          | Benzaldehit                                                                  |
| BA                                           | Benzil alkol                                                                 |
| N-N'-DMF                                     | N-N'-dimetilformamid                                                         |

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ VE TEZİN AMACI

*Dünyada herşey için, medeniyet için, hayat için, başarı için, en hakiki mürşit  
bilimdir, fendir.*

*Mustafa Kemal ATATÜRK*

# 1. GİRİŞ VE TEZİN AMACI

Nanoteknoloji ve biyoteknoloji 1990’larda bağımsız olarak çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır. Zaman geçtikçe bu iki teknoloji arasındaki sinerjik etkileşimler yeni avantajlar sağlamıştır. Bu gelişmelere örnek “Nanobiyokataliz”dir. Nanobiyokatalizin ilk dönemlerinde enzimler adsorpsiyon veya kovalent bağlanma ile çeşitli nanoboyuttaki materyallere immobilize edilmiştir. Oldukça geniş yüzey alanına sahip nanoyapılı materyallere daha fazla enzim bağlanmış ve klasik matrikslere immobilize enzimlere nazaran enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (Kim, Grate et al. 2008).

İletkenlik veya mıknatıslanma gibi özellikleri ile homojen boyut dağılımı ve enzimlerle benzer boyuta sahip olmaları nanopartiküllerin enzim teknolojisinde birçok alanda kullanılmasını sağlamıştır. Bu özellikler, nanobiyokatalitik sistemlerdeki enzimin kararlılığına ve yüksek aktiviteye sahip enzim eldesine olanak sağlar. Böylece teknik ve ekonomik sonuçlar için enzimlerin katalizlediği kimyasal işlemlerde uzun süre kullanılabilen veya aralıklı kullanılabilen biyokatalizörler elde edilmiş olur.

Nanobiyokatalitik sistemler ticari değeri yüksek kimyasalların sentezi için geliştirilmelidir. Örnek olarak endüstride optik bileşiklerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan katalitik asimetric indirgenme reaksiyon verilebilir (Jacobsen 1999; Knowles 2002; Noyori 2002). Ketonların asimetric indirgenmesi sonucu oluşan kiral alkoller, yapı özelliklerinden dolayı farmasötik ve tarım kimyasalları gibi önemli bileşiklerin sentezinde kullanılırlar (DJ 1999; Liese A 2000). Günümüzde ilaç sentezinin yaklaşık %10’u biyokatalizörler kullanılarak gerçekleştirilir. Çünkü biyokatalizörleri kimyasal katalizörlerden ayıran özelliklerin başında seçicilik, reaksiyon güvenliği ve doğal olmaları gelmektedir. Enzimin substratına olan seçiciliğinden dolayı çok yüksek enantiyo- ve kemoseçicilik sağlanır.

Çevre dostu reaksiyonları ve immobilizasyon tekniği ile kararlı olabilmelerine rağmen oksidoredüktaz sınıfı enzimler pahalı kofaktör moleküllerine (NAD(P)H)

ihtiyaç duyarlar. Kofaktör moleküllerinin, çoğu kez sentezlenmek istenilen üründen daha maliyetli olması, oksidoredüktazların uygulamalarını sınırlandırabilmektedir. Bu sorunun aşılmasına yönelik olarak çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. En önemli strateji, kofaktörün ortamda rejenerasyona tabi tutulmasıdır. Bu amaca yönelik olarak, kofaktör mühendisliği çalışmaları (fotokimyasal, elektrokimyasal, kofaktör immobilizasyonu) olmakla birlikte, en avantajlı ve tercih edileni, enzimatik kofaktör rejenerasyon yöntemidir.

Bu tezin amacı ticari değeri yüksek kiral alkol üretimine yönelik ikili enzim sistemlerinin geliştirilmesidir. Kiral alkol sentezini gerçekleştirecek alkol dehidrogenaz enzimi mezofilik mikroorganizma olan *Staphylococcus saprophyticus*'dan klonlanacaktır. Rekombinant sistemleri geliştirilecek ve karakterizasyonuna yönelik araştırmalar yapılacaktır.

Endüstriyel kullanımını kolaylaştırmak ve aktif bir şekilde sıralı kullanımını sağlamak için immobilizasyon tekniği kullanılacaktır. Immobilizasyon matrisi olarak kullanılmak üzere manyetik nanopartikül sentezlenecektir. Manyetik nanopartiküllerin kararlılığının az olması sebebiyle yüzey modifikasyonu yapılacak ve enzimler kovalent olarak matrikse bağlanacaktır. Kofaktör bağımlı *S. saprophyticus*'dan klonlanacak alkol dehidrogenaz enzimi için ekonomik bir nanobiyokataliz sisteminde kofaktör rejenerasyonu gereklidir. Bu sebeple *Candida methyllica* kaynaklı format dehidrogenaz kofaktör rejenerasyonu için ikinci enzim olarak kullanılacaktır. Her iki enzimin uygun sitokiyometride hazırlanması sonucu elde edilecek olan immobilizasyon sistemiyle enzim kararlılığının artırılması ve uzun süren aktivite eldesi hedeflenmektedir.

## **BÖLÜM 2**

### **LİTERATÜR TARAMASI**

*Az şey bilirsek bir şeyin doğruluğuna emin olabiliriz, bilgi artınca kuşku da artar.*

*Goethe*

## 2. LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Nanopartiküller ve Kullanım Alanları

Nanomateriyaller, özel boyut, elektronik, optik, manyetik ve katalitik özellikleri dolayısıyla bilgi saklama, biyomedisin, biyolojik işaretleme, elektrokataliz gibi farklı alanlarda kullanılır. Nanomateriyallerin biyoteknolojide kullanımı, materyal bilimi ile biyolojiyi birleştirmektedir. Nanopartiküller tedavi edici uygulamalarda özgün özellikler sunarak özellikle kullanışlı bir platform sağlamaktadır (Gao, Cui et al. 2004). Nanopartiküllerin biyoloji ve tıpta uygulama alanları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Salata 2004);

- Floresan biyolojik etiketleme
- İlaç ve gen iletimi
- Patojen belirleme
- DNA probu geliştirilmesi
- Doku mühendisliği
- Hipertermi
- Biyolojik molekül ve hücre ayrılması, saflaştırılması
- MRI kontrast geliştirilmesi
- Fagokinetik çalışmalar

Özgün özellikleri ve protein ve polinükleik asitler gibi biyomoleküllerle yakın boyutta olma durumları gibi çeşitli özelliklerinden dolayı nanopartiküllere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Salata 2004). Proteinlerle benzer boyutta olmaları nanopartikülleri biyoetiketleme için uygun kılar. Ancak boyut nanopartiküllerin birçok özelliğinden sadece bir tanesidir. Biyolojik hedef ile etkileşmesi için biyolojik veya moleküler kaplama veya biyoinorganik arayüzey nanopartiküle uygulanmalıdır. Biyolojik kaplama antikorları, kollajen gibi biyopolimerleri veya biyouygun kılacak tek katmanlı molekülleri içerebilir. Ek olarak nanopartiküller floresan ve manyetik davranışları gibi kullanışlı özellikleri sağlayan metal ve yarı iletken çekirdek materyali ile biçimlendirilebilir (Ferrari 2005). Çizelge 2.1’de uygun özellikleriyle

bazı bilinen çekirdek materyalleri, yüzey modifikasyonunda kullanılan ligantları ve uygulamaları verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Metal ve yarı-iletken çekirdek materyalleri.

| Çekirdek Materyali                 | Özellikleri                                              | Ligant (lar)                  | Uygulamalar                             |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Au</b>                          | Optik absorpsiyon, floresan ve floresan sönüm, stabilite | Tiyol, fosfin, disülfid, amin | Biyomolekül tanıma                      |
| <b>Ag</b>                          | Yüzey-artan floresan                                     | Tiyol                         | Algılayıcı                              |
| <b>Pt</b>                          | Katalitik                                                | Tiyol, amin, izosiyanid       | Biyokatalizör, algılayıcı               |
| <b>CdSe</b>                        | Işıma, foto-stabilite                                    | Tiyol, fosfin, piridin        | Görüntüleme, algılayıcı                 |
| <b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> | Manyetik                                                 | Diol, dopamin türevleri, amin | MR görüntüleme, biyomolekül saflaştırma |
| <b>SiO<sub>2</sub></b>             | Biyouyumluluk                                            | Alkoksisilan                  | Yüzey kaplama ile biyouyum              |

## 2.2. Manyetik Nanopartikül Hakkında Genel Bilgi

Nanopartiküller metalik, yarı iletken ve polimerik olmak üzere materyal çeşidine göre sınıflandırılabilir. Metalik olan manyetik nanopartiküller kuvvetli mıknatıslanabilen materyallerden meydana gelir (Ito, Shinkai et al. 2005; Tanaka, Ito et al. 2005). Bu materyaller demir, nikel, kobalt ve manyetik metallerin karışımından oluşan alaşımları içerir.

Nanoboyuttaki manyetik nanopartiküller biyomedikal uygulamalarda birçok avantaja sahiptir. Öncelikle istenilen çalışmaya uyum sağlayabilmesi için boyutlarının optimizasyonu yapılabilir ve özellikleri kolayca kontrol edilebilir. İkinci olarak nanopartiküller dış manyetik alan uygulaması ile hareket edebilirler. Manyetik nanopartiküller genellikle ayırma, saflaştırma ve farklı biyomoleküllerin konsantre edilmesinde kullanılır. Antikor ve oligonükleotid proplar manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilebilir. Hedef moleküller böylece ya yüzeye bağlanır ya da çözelti içinde yakalanır. Manyetik alan uygulamasıyla bu partiküller etkileşir, sadece bir bölgeye toplanır ve çözeltiden ayrılır. Biyolojik çalışmalarda bu manyetik nanopartiküllerin ya da mikroküreciklerin uygulamaları mevcuttur. Bu çalışmalar **(1)** *in vivo* progenitör hücrelerin izlenmesi ve geri kazanılmasını (Lewin, Carlesso et al.

2000); **(2)** antijenlerin belirlenmesini (Perrin, Theretz et al. 1999); **(3)** nanokatalizör olarak enzim-nanopartikül konjuge sisteminin hazırlanmasını (Yang, Zhang et al. 2004); **(4)** su örneklerinden bakterilerin ayrılmasını (Ho, Tsai et al. 2004); **(5)** bakteriyel kültürden yüksek verimle ultra saf plazmid DNA saflaştırılmasını içerir (Chiang, Sung et al. 2005).

Son yıllarda manyetik nanopartiküller, manyetik depolama ortamı (Sun, Murray et al. 2000), biyosensör uygulamaları (Miller, Prinz et al. 2002), hedefli ilaç iletimi (Chourpa, Douziech-Eyrolles et al. 2005; Jain, Morales et al. 2005) gibi tıbbi uygulamalar, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kontrast ajanları (Babes, Denizot et al. 1999; Burtea, Laurent et al. 2005; Modo, Hoehn et al. 2005; Sonvico, Mornet et al. 2005; Boutry, Laurent et al. 2006; Bulte 2006; Corot, Robert et al. 2006; Modo and Bulte 2007) ve jet yazıcı manyetik mürekkep üretimini (Charles and Popplewell 1982) içeren birçok teknolojik uygulamalar için geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin özellikleri en çok boyutuna bağlı olduğu için boyutlarının kontrolü çok önemlidir. Manyetik sıvı (ferrofluid) özelliklerinin anlaşılması ve uygulamalarının yenisinin geliştirilmesi veya var olanın iyileştirilmesi için sürfaktanların kontrolü, partikül boyutu, maddeler ve fiziksel davranışları önemlidir.

Uygun yüzey kimyası ile süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller MRI kontrast artışı, doku onarımı, immünoassay, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, hipertermi, ilaç iletimi ve hücre ayrımı gibi çeşitli *in vivo* çalışmalarda kullanılabilir (Gupta and Gupta 2005). Tüm bu biyomedikal uygulamalarda 100nm'den küçük ve sınırlı partikül boyut dağılımına sahip nanopartiküller gereklidir. Ayrıca hedefli iletme izin verebilecek toksik olmayan ve biyouyumlu özel yüzey modifikasyonları gereklidir. Manyetik nanopartiküller ilaç, enzim, protein, antikor ve nükleotidlere bağlanabilir ve manyetik alan uygulanarak organ, doku veya tümörlere yönlendirilebilir (Chastellain, Petri et al. 2004).

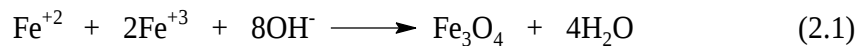
## 2.3. Manyetik Nanopartikül Sentezi

Çok sayıda kimyasal metot manyetik nanopartikül sentezi için kullanılmıştır. Bu metotlar; mikroemülsiyon (Chin and Yaacob 2007), sol-jel sentezi (Albornoz and Jacobo 2006), sonokimyasal reaksiyonlar (Hee Kim, Sook Lee et al. 2005), hidrotermal reaksiyonlar (Wan, Chen et al. 2005), öncü maddelerin hidroliz ve termolizi (Kimata, Nakagawa et al. 2003), akış enjeksiyon sentezi (Salazar-Alvarez, Muhammed et al. 2006) ve elektrosprey'dir (Basak, Chen et al. 2007).

Süperparamanyetik nanopartiküllerin sentezi koloidal yapılarından dolayı kompleks bir işlemdir (Sophie Laurent 2008). İlk dikkat edilmesi gereken uygun boyutta manyetik taneciklerden oluşan bir populasyon elde etmektir. İkinci kritik nokta ise ultrasantrifüj, jel filtrasyon kromatografisi, manyetik filtrasyon veya akış alan gradiyenti gibi kompleks saflaştırma basamakları olmaksızın tekrar uygulanabilir proses seçmektir. Magnetit nanopartikül üretiminde en yaygın kullanılan metot ise demir tuzlarını birlikte çöktürme tekniğidir (Lee, Jeong et al. 2004; Sun, Ma et al. 2004; Morrison, Cahill et al. 2005; Qiu, Yang et al. 2005; Martínez-Mera, Espinosa-Pesqueira et al. 2007).

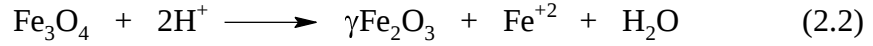
### 2.3.1. Birlikte Çöktürme ile Klasik Sentez

Birlikte çöktürme tekniği manyetik partikül elde etmek için en kolay ve en verimli kimyasal yoldur. Demir oksitler (hem  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  hem de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) genellikle sulu ortamda  $\text{Fe}^{+3}$  ve  $\text{Fe}^{+2}$  tuzlarının sitokiyometrik karışımı ile hazırlanır. Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) oluşum kimyasal reaksiyonu Eşitlik 2.1'deki gibidir.



Bu reaksiyonun termodinamğine göre oksijensiz ortamda 2:1 ( $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ ) sitokiyometrik oranla  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllerin tamamının çökmesi pH 8-14

aralığında beklenmektedir (Jolivet, Chaneac et al. 2004). Ancak  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  kararlı değildir ve oksijene karşı duyarlıdır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  oksijen varlığında maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) dönüşür.



Hava ile oksidasyon  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  dönüşümü için tek yol değildir. Eşitlik 2.2'ye göre süspansiyonun pH değerine bağlı olarak çeşitli elektron veya iyon transferleri mümkündür. Asidik ve anaerobik şartlar altında, yüzey  $\text{Fe}^{+2}$  iyonları çözeltide hekza-su kompleksleri gibi desorbe edilebilir (Sophie Laurent 2008).

Nanopartiküllerin boyut ve yapısı pH, iyonik kuvvet ve sıcaklığa, tuzların varlığına (perklorat, klorid, sülfat ve nitratlar) veya  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  konsantrasyon oranına bağlıdır. Magnetit sentezi sırasında şelatlayıcı organik anyonların (sitrik, glukonik veya oleik asit gibi  $\alpha$ -hidroksi karboksilat veya karboksilat iyonları) veya polimer yüzey kompleksleyici ajanların (dekstran, karboksidedekstran, nişasta veya polivinilalkol) ilavesi nanopartiküllerin boyut kontrolüne yardımcı olabilir. Organik ve demir tuzları arasındaki molar orana göre demir oksit yüzeyinde bu organik iyonların şelasyonu hem daha büyük parçaları oluşturan çekirdeklenmeyi hem de küçük partikülleri oluşturan kristal çekirdeğinin büyümesini engeller (Sophie Laurent 2008).

## 2.4. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri boyutuna, şekline, mikroyapısına ve kimyasal fazlarını içeren fiziksel yapısına bağlıdır. Ayrıca biyolojik davranışları dağılma, yük, kaplama doğasının yanı sıra boyut ve yapısına da bağlıdır. Birçok fizikokimyasal teknik bu parametrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

### 2.4.1. Boyut ve Yüzey Karakterizasyonu

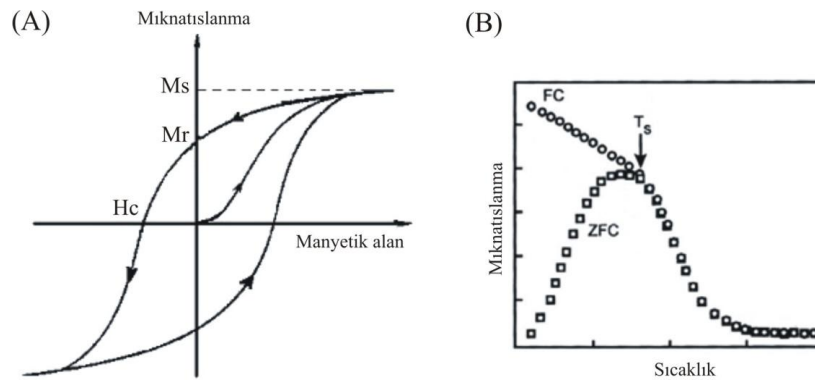
Nanopartiküllerin boyutlarını belirlemek için farklı metotlar kullanılmaktadır. Ancak “boyut” belirsiz bir tanımdır. İlk önce nanopartikül farklı bölümlerle tanımlanmalıdır: çekirdeğin kristal bölümü, tüm demir çekirdeği (kristal ve amorf), çekirdek ve kabuk.

Partikül çekirdeği Geçirmeli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy, TEM) ile görüntülenebilir (Kaiser and Miskolczy 1970). Bu teknik çekirdeğin toplam partikül boyutunu (kristal ve amorf kısım) verebilmektedir. Yüksek Çözünürlükte TEM (HR-TEM) ise kristal nanopartiküllerin yüzeydeki atomik düzenlenmesi hakkında bilgi verebilmektedir. XRD, partiküllerin kristal yapısını elde etmek için kullanılabilir. Burada deneysel ve referans piklerin yoğunluğu karşılaştırılarak karışımdaki demir oksit oranı belirlenebilir (Inouye, Endo et al. 1982). SANS (Small-angle neutron scattering) boyut, dağılma, şekil ve yapısı hakkında bilgi verebilen çok güçlü bir tekniktir (Lindner and Zemb 2002). Dinamik Işık Saçılım spektroskopisi olarak da bilinen Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) de nanopartikül boyutunu belirlemek için kullanılan genel bir tekniktir.

Atomik ve kimyasal kuvvet mikroskobu (AFM ve CFM), termogravimetrik analizi (TGA), Diferansiyel Taramalı Kalorimetrisi (DSC), X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi, Kızılötesi Spektroskopisi (IR), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), kondüktometri, potansiyometri yüzeyi modifiye demir oksit nanopartiküllerinin yüzey özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Di Marco, Guilbert et al. 2007). Bu teknikler demir oksit yüzeyi ve kaplama arasındaki bağlanma doğasını ve kuvvetini tanımlar. Ayrıca nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin modifikasyonla etkilenip etkilenmediği anlaşılabilmektedir.

## 2.4.2. Manyetik Özelliğinin Belirlenmesi

Demir oksit nanopartiküllerinin manyetik özelliğinin karakterizasyonu için iki ana ölçüm yapılır. Birinci uygulama olan  $M(H)$ , verilen sıcaklıkta uygulanan alan fonksiyonu olarak mıknatıslanma (histeresis eğrisi) ve diğer bir uygulama olan  $M(T)$ , sabit manyetik alanda sıcaklık fonksiyonu olarak mıknatıslanma zero-field-cooled ve field cooled mıknatıslanma eğrileri Şekil 2.1’de verilmiştir.



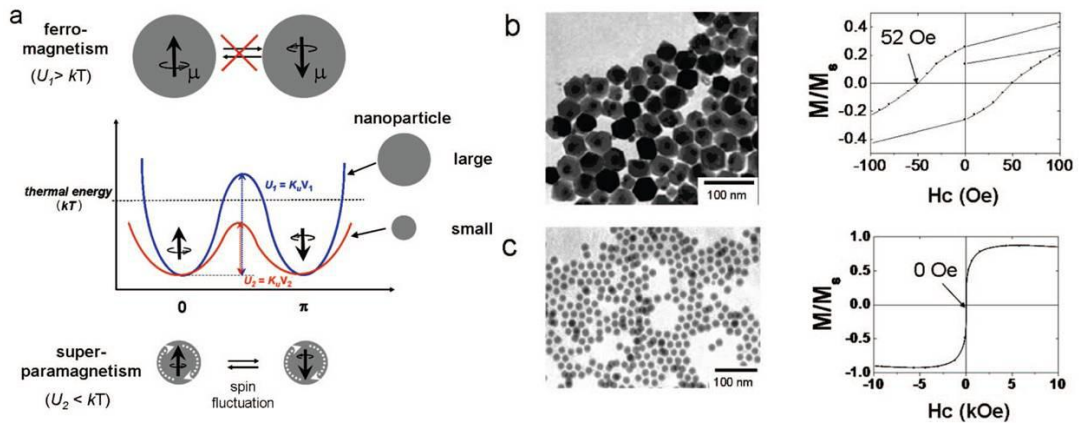
**Şekil 2.1. (A)** Ferromanyetik maddenin mıknatıslanma  $M(H)$  histeresis eğrisi; **(B)** ZFC-FC mıknatıslanma ölçümü.

Şekil 2.1. A’da verilen eğriye göre madde mıknatıslanma doygunluk değerine,  $\pm M_s(T)$ , ulaştığında  $M(H)$  simetrik histeresis davranışını göstermektedir. Eğriler kalan mıknatıslanmada,  $\pm M_r(T)$ , sıfır dış alandan geçer ve mıknatıslanma zorlayıcı alanda,  $\pm H_c(T)$ , sıfır olur.  $H_c$ , doygun mıknatıslanmadan sonra mıknatıslanmayı sıfıra indirmek için gerekli olan manyetik alan yoğunluğudur. Dış alanın ilk uygulanması sıfır noktasında başlar ve ham eğriyle sonuçlanır. Kalan mıknatıslanmanın doygun mıknatıslanmaya oranı  $M_r/M_s$ , artık mıknatıslanma olarak adlandırılır ve 0’dan 1’e değişir.

Zero-field-cooled (ZFC) ve field cooled (FC) prosedürlerine göre ölçülen sıcaklık bağımlı mıknatıslanma genellikle enerji bariyerleri hakkında bilgi edinmek için kullanılır (Şekil 2.1, B). ZFC eğrisi için nanopartiküller süperparamanyetik ise sınırlayıcı sıcaklığın (TB) altındaki düşük sıcaklığa soğutulur, nanopartiküller

ferromanyetik ise TB üstündeki bir sıcaklığa getirilir. Sonra manyetik alan uygulanır ve mıknatıslanma sıcaklık fonksiyonu olarak ölçülür. FC eğrisi aynı alanda örneğin düşük sıcaklığa soğutulduğunda oluşan mıknatıslanmanın ölçülmesiyle elde edilir. ZFC ve FC ölçümlerinde manyetik alan anizotropi alanına kıyasla yeterince zayıf olmalıdır. Böylece ZFC-FC eğrisi gerçek enerji bariyer dağılımını yansıtır (Liu 2006).

Mutlak sıcaklık altında yığın halindeki maddeler termal enerjiden ( $kT$ ) daha fazla manyetik anizotropik enerjiye sahiptirler (Şekil 2.2 (a), büyük nanopartikül). Nanopartikülün termal enerjisi manyetik spin yönünü değiştirmek için yeterli değildir. Bu nedenle madde ferromanyetiktir.



**Şekil 2.2. (a)** Termal enerji diyagramı ve **(b,c)** boyutlara göre histeresis eğrileri.

Ancak küçük partiküller termal enerjiye kıyasla daha düşük anizotropik enerjiye sahiptir ve bu enerji spin yönünü değiştirmek için yeterlidir (Şekil 2.2 (a), küçük nanopartikül). Manyetik dalgalanma sıfırda net mıknatıslanmaya neden olur ve bu nanopartiküllerin süperparamanyetik olduğunu gösterir. Örneğin, 55nm  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  300K'de 52 Oe artık mıknatıslanma ile ferromanyetik özellik gösterir ama 12nm boyutlu  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  partiküller histeresis davranışı olmadan süperparamanyetizma özelliği gösterir (Şekil 2.2 (b,c)).  $H_c$  ve  $M_r$  değeri ferromanyetikler için sıfırdan büyüktür ve süperparamanyetikler için sıfırdır (Vassiliou, Mehrotra et al. 1993).

## 2.5. Manyetik Nanopartikül Modifikasyonu

Demir oksit nanopartiküller hem biyolojik ortamda hem de manyetik alan uygulandığında agregat oluşumuna karşı dayanıklı olmalıdırlar. Demir oksit nanopartiküllerin süspansiyondaki kararlılığı üç ana kuvvetle kontrol edilir: **(a)** hidrofobik-hidrofilik, **(b)** manyetik ve **(c)** van der Waals. Demir oksit nanopartiküller hidrofobik etkileşimlerden dolayı mikron boyutta küme oluşturarak bir arada toplanmaya meyillidirler. Mikron boyuttaki kümeler daha ileride manyetik dipol-dipol etkileşimlerinden dolayı bir araya gelirler. Manyetik alan varlığında bu kümelerin mıknatıslanması bir araya gelmelerini arttırabilir (Hamley 2003). Genellikle nanometre boyuttaki partiküller toplam yüzey enerjisini azaltmak için çekici van der Waals kuvvetlerinden dolayı süspansiyonda bir araya toplanırlar. Sonuç olarak bir araya gelerek küme oluşturan demir oksit nanopartiküllerinin düşük yüzey alanı ve büyük boyutlarından dolayı kullanım alanındaki etkileri (ilaç iletim sistemlerinde düşük ilaç yüklenmesi gibi) azalmış olur. Bundan dolayı süspansiyonda demir oksit nanopartiküllerin stabilizasyonu için yüzey modifikasyonu çok önemlidir.

Yüzey modifikasyonu demir oksit nanopartiküllerinin sentezi esnasında veya sentezden sonra gerçekleştirilebilir. Çizelge 2.2’de demir oksit nanopartiküllerin stabilizasyonunda kullanılan maddeler bulunmaktadır (Mahmoudi, Sant et al. 2010).

Demir oksit nanopartiküller biyomedikal uygulamalarda kullanılmak için sterik olarak seyrelticilerle kararlı hale getirilirler. Ancak dekstran gibi yüksek afiniteyle bağlanma grubundan yoksun seyrelticiler, demir oksit çekirdek çapından oldukça büyük hidrodinamik çaplarla geniş nanopartikül boyutlarına neden olur. Böylece etkili bağlanma engellenir (Sun, Lee et al. 2008). Sterik kararlılık manyetik demir oksit nanopartiküllerinin yüzeyine güçlü bağlanan düşük molekül ağırlıklı seyrelticiler kullanılarak da sağlanabilir. Katekoller gibi enediol-ligantlar yüksek afinite ile metal oksit nanopartiküllerin yüzeyine bağlanırlar (Rajh, Chen et al. 2002). Yüksek afiniteyle bağlanma grubuna sahip dopamin su (Gu, Yang et al. 2004) ve fizyolojik tamponlarda (Xu, Xu et al. 2004; Xie, Xu et al. 2006; Xie, Xu et al. 2007) nanopartiküllerin kararlılığını arttırmak için kullanılır. Ancak dopaminin

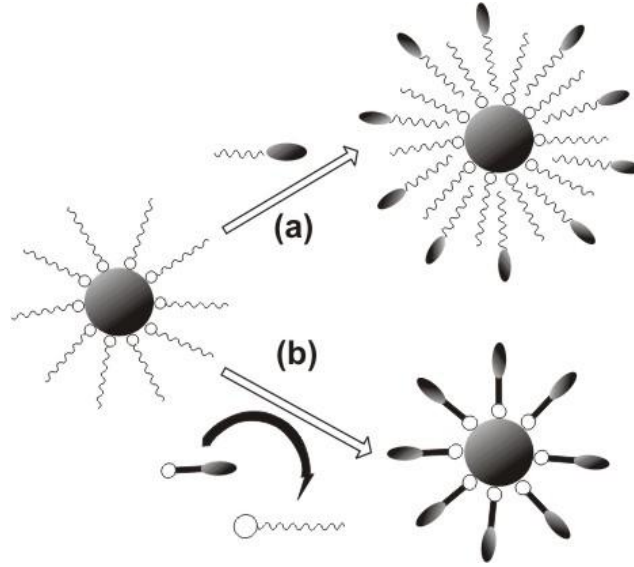
nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olduğu iddia edilmiştir (Zürcher, Wäckerlin et al. 2006; Shultz, Reveles et al. 2007). Bundan başka çökmüş dopamin bileşiğinin oksidasyona meyilli olduğu gösterilmiştir (Amstad, Gillich et al. 2009). Bu durumu önlemek için molekül ağırlığı 5kDa olan polietilenglikol ile dopamin arasında farklı bağlayıcılar kullanılmış ve nanopartiküllerin çökmesi engellenmiş ve kararlı olmaları sağlanmıştır (Y. Sahoo 2001).

**Çizelge 2.2.** Demir oksit nanopartikül stabilizasyonunda kullanılan materyaller ve uygulamaları.

| <b>Kullanılan Materyal</b> | <b>Uygulamaları</b>                                             |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Amorf Silika               | Biyomolekül izolasyonu                                          |
| Mezopor Silika             | İlaç iletimi, İmmobilizasyon, Genomik ve plazmid DNA izolasyonu |
| Polietilen glikol (PEG)    | NMR görüntüleme                                                 |
| Polivinil alkol (PVA)      | Görüntüleme ve ilaç iletimi                                     |
| Polivinilpirolidon         | İlaç iletimi                                                    |
| Poliakrilik asit           | Rekombinant doku plazminojen aktivatörü ile hedef tromboliziz   |
| Polistiren                 | Hücrel görüntüleme ve DNA hibridizasyonu,                       |
| Polimetilmetaakrilat       | DNA ayırma ve amplifikasyonu                                    |
| Polidipirrol/bikarbazol    | DNA hibridizasyonu                                              |
| Etil selüloz               | İlaç kimyasallarının ekstraksiyonu                              |
| Kitosan                    | Doku mühendisliği ve hipertermi                                 |
| Dekstran                   | <i>E.Coli</i> izolasyonu, görüntüleme ve ilaç iletimi           |
| Nişasta                    | Görüntüleme                                                     |
| Lipozom                    | Görüntüleme, ilaç iletimi ve hipertermi                         |
| Albumin                    | Hücre ayırma                                                    |
| Jelatin                    | Genomik DNA izolasyonu ve ilaç iletimi                          |
| Yağ Asitleri               | Görüntüleme ve ilaç iletimi                                     |

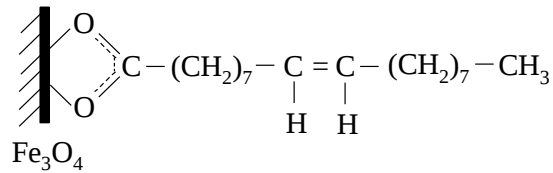
Nanopartiküllere bağlı ligant molekülleri hem partikül boyutlarını kontrol eder hem de nanopartiküllerin agregat oluşturmalarını engeller. Nanopartiküllerin çekirdek maddesine ve hangi çözücü içinde olacağına bağlı olarak doğru ligant seçimi ile nanopartiküller kararlı hale gelebilir. Yüzey fonksiyonlandırılmasında sürfaktan ilavesi ve sürfaktan değişimi olarak iki yaklaşım vardır (Şekil 2.3). Sürfaktan ilavesi hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşenden oluşan amfifilik moleküllerinin adsorpsiyonu ile gerçekleşir (Şekil 2.3, (a)). Hidrofobik kısım hidrokarbon zinciri ile

çift katman yapı oluştururken hidrofilik gruplar nanopartiküllerin dış kısmında kalırlar ve nanopartiküllerin suda çözünür hale gelmesini sağlarlar.

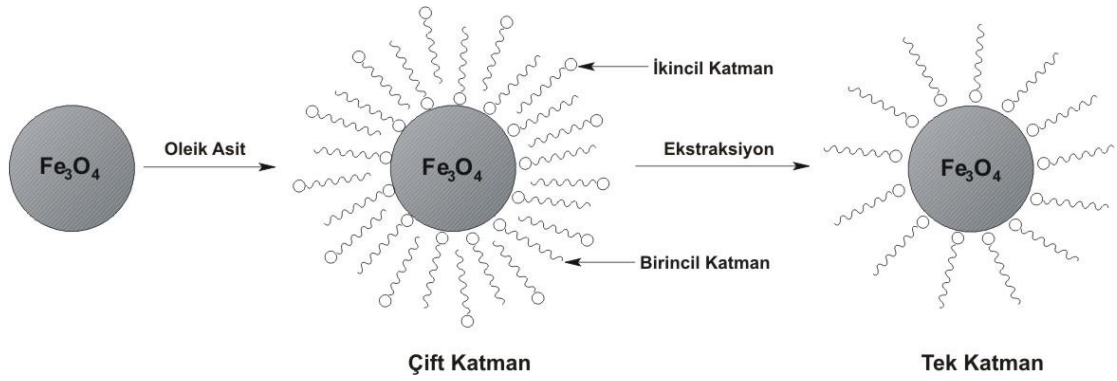


**Şekil 2.3. (a) Sürfaktan ilavesi ve (b) sürfaktan değişimi ile yüzey fonksiyonlandırılması.**

Örnek olarak oleik asit (OA) ya da oleilamin ya da bu sürfaktanların birleşimi kullanılarak kararlı hale getirilen nanopartiküller verilebilir. Metal karboksilat (Şekil 2.4) ve/veya metal-amin bağının oluşumu ile nanopartiküller hidrofobik özellik kazandıran hidrokarbon tabakasıyla kaplanır (Şekil 2.5).



**Şekil 2.4. OA COO<sup>-</sup> grubu ve Fe atomu arasındaki şelatlayıcı bidentat etkileşimi.**



**Şekil 2.5.** OA kaplı demir oksit nanopartikül sentezi.

Süfaktan değişimi ise demir çekirdeğinin esas özellikleri değişmeden yüzeydeki grupların özgün ligantlarla yer değiştirdiği yeni bir metottur (Şekil 2.3, (b)). Bu metotla elde edilen manyetik nanopartiküller oldukça kararlıdır. Çünkü süfaktan değişim reaksiyonu esnasında daha güçlü bağlar meydana gelir (Xu and Sun 2007). Ligant değişim metodu ile hidrofilik nanopartikül hazırlamak için Polielektrolit- (Zhang, Ge et al. 2007) ve PEG-merkezli hidrofilik polimerler kullanılmıştır (Liu, Guo et al. 2008; Young, Xu et al. 2009). Bu lineer polimerlerle bir araya gelerek nanopartiküllerin çökmesi engellenebilir ancak boyut kontrolünün yapılması çok zordur.

Ligant değişimi ortama eklenen yeni ligandın nanopartikül yüzeyine ilgisinin yüzeydeki hidrofobik liganttan daha fazla olması durumunda gerçekleşir. Dopamin merkezli ligantlar örnek olarak verilebilir. Dopamin demir oksit nanopartiküllerin yüzeyine çok kuvvetli bağlandığı için ligant değişimi başarılı olur (Nagesha, Plouffe et al. 2009).

## 2.6. Manyetik Nanopartikül-Enzim Konjuge Sistemler

Son yıllarda birçok manyetik ayırma prosedürleri biyomoleküllerin izolasyonu ve saflaştırılmasında kullanmak için geliştirilmiştir (Saiyed 2003). Bu tekniklerle kompleks karışımdan biyomolekül kolay, hızlı ve yüksek özgüllükle saflaştırılır. Son

yıllarda uygun stabilizörle kaplanmış mikrometre veya submikrometre boyutlu manyetik partikülleri içeren sistemler protein, enzim ve ilaç bağlanması için destek olarak kullanılmıştır. Örnek olarak, heparin bağlı magnetitler kanda hücrelere bağlamak, dekstran kaplı magnetitler ilaç taşımak ve silan kaplı demir partiküller radyoimmün deneyleri için kullanılmıştır (Ramchand 2001).

Manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı sistemler enzimlerin ayrılmasında afinite matrisi olarak da kullanılmıştır. At karaciğer alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında 5'-AMP bağlı manyetik Sepharose® beadler başarıyla kullanılmıştır (Mosbach 1977). Manyetik alginat mikroküreciklerde  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır (Safarikova 2003).

Proteinlere (Protein A ve streptavidin gibi) ve antikorlara bağlı süperparamanyetik mikrokürecikler, immün uygulamalarında, nükleik asit çalışmalarında ve hücre ayırma-görüntüleme dahil birçok alanda katı-faz desteği olarak kullanmaya başlanmıştır. Birçok şirket farklı kimyasal fonksiyonel grupları ile çeşitli boyutta partikül sağlamaktadır. Örneğin, Polysciences, Inc., inert silan kaplı demir oksit çekirdeği içeren Biomag® magnetik beadleri pazarlamaktadır. Partikül yüzeyi, protein, glikoprotein ve diğer ligantların kovalent bağlanması için amin veya karboksil grupları ile fonksiyonlandırılır. Biomag partikülleri keçi antifare, keçi antitavşan ve kuzu antifloresan ikincil antikorlar veya insan hücre yüzeyine özgül birçok monoklonal antikor ile kovalent olarak bağlanmayı sağlar.

Manyetik taşıyıcılara immobilize olmuş ve biyolojik olarak aktif bileşikler, hedef molekül veya hücreleri yakalamak veya modifiye etmek için afinite ligantları olarak veya biyodenemelerde direk olarak kullanılabilir. Örnek olarak Abudiyab ve Beitle (Abudiyab and Beitle Jr 1998) kompleks karışımdan protein izolasyonu için manyetik immobilize metal afinite ortamı geliştirmişlerdir. Bu metot manyetik agaroz yüzeyine iminodiasetik asit (IDA) bağlanmasını içerir. Bu madde metal iyonları ( $\text{Cu}^{+2}$  veya  $\text{Zn}^{+2}$ ) ile kompleks oluşturduğunda proteinlerle bağlanmaya uygun hale gelir. Aynı şekilde Qiagen Inc., Germany Ni-NTA (nitriloasetik asit) manyetik agaroz beadlerinin kullanıldığı protein saflaştırma metotları da geliştirmiştir. Ni-NTA bağlı manyetik beadler, 6xHis-taşıyan proteinlerin manyetik olarak yakalama deneylerinde kullanılmıştır (Sinclair 2000).

### 2.6.1. Bağlanma Kimyası

Nanopartiküllere proteinlerin bağlanmasında dört yaklaşım bulunur: Bunlar, **(1)** elektrostatik adsorpsiyon; **(2)** nanopartikül yüzeyindeki liganda bağlanması; **(3)** proteinin tanıdığı ve bağlandığı kofaktör molekülüne bağlanması; **(4)** nanopartikül yüzeyine direk bağlanma şeklindedir.

#### *Elektrostatik Adsorpsiyon*

Yaygın olarak kullanılan bağlanma yaklaşımı elektrostatik adsorpsiyondur (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6.** Elektrostatik bağlanma.

Kimyasal reaksiyonun gerek olmadığı en kolay yoldur. Nanopartikül ve protein yan zincirlerinin etkileşmesi için uygun şartlar belirlenmelidir. Etkileşim, pH veya ortamın iyonik kuvvetinin kontrolüyle ayarlanabilir. Özgül olmayan etkileşimler olacağından protein birçok yönlenme ile nanopartiküllerle etkileşir. Ancak nanopartikül yüzey modifikasyonu ile bölgesel-özel etkileşimler sağlanabilir (Bayraktar H 2007). Sitokrom c için yapılan çalışmada nanopartikül ligandın uç yükü veya ligant hidrofobikliği değiştirildiğinde, protein yüzeyi nanopartikül yüzeyine hedeflendirilmiştir. Nanopartiküller L-fenilalanin ile fonksiyonlandırıldığı zaman sitokrom c birçok polar rezidü içeren *hem* grubu yakınından bağlanır. Ligant L-aspartik asit olduğunda nanopartiküller katyonik olan sitokrom c büyük bölümüne bağlanır.

### ***Proteine Özgül Kofaktör ile Bağlanma***

Nanopartikül-protein bağlanması özgül etiketleme yolu ile yapılabilmektedir (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7.** Kofaktör ile protein bağlanması.

Biyoetiketlemede kullanılan klasik bağlanma biyotin-streptavidin bağlanmasıdır. Nanopartiküllerin biyotin ile etiketlenmesi streptavidin ile bağlanmasını sağlar ve biyotin-streptavidin etkileşimi kovalent bağ kadar kuvvetlidir (Green 1990). Biyotin ile fonksiyonlandırılan çeşitli bağlayıcıların var olması nedeniyle özgül bağlanmanın sağlandığı çok yönlü bir yoldur.

Başka bir yol ise özgül proteinin nanopartiküle bağlanması için antikor kullanımıdır (Ackerson, Jadzinsky et al. 2006; Bagalkot, Zhang et al. 2007). Antikorlar hedef proteine bağlandıkları için nanopartikül etiketleme için uygundur. Aptamer kimyasındaki son gelişmeler aptamerlerin proteine bağlanmada kullanılmasını sağlar. Antikorlar gibi aptamerlerde hedef proteine özgül dizayn edilebilir ve nanopartikül protein bağlanması için bağlayıcı olarak kullanılırlar.

### ***Nanopartikül Yüzeyine Direk Bağlanma***

Bağlayıcı kullanmadan proteindeki grupların direk reaksiyonu nanopartikül biyosensör olarak kullanılacak ise tercih edilir (Şekil 2.8).

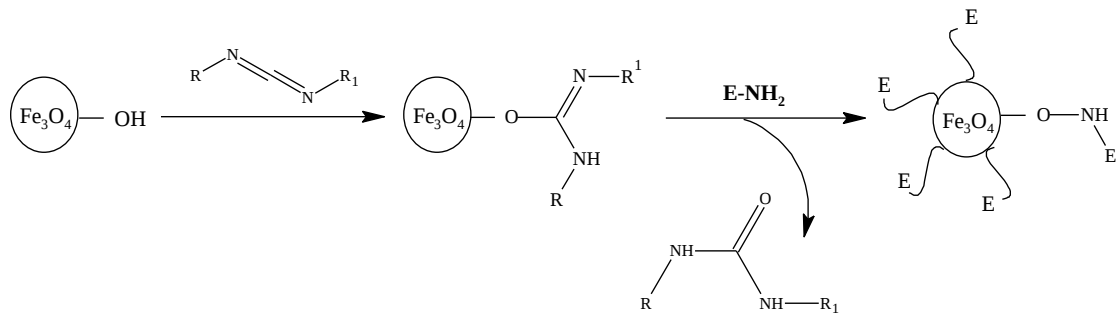


**Şekil 2.8.** Amino asit ile direk bağlanma.

Örnek olarak Au-tiyol kimyası verilebilir. Altın nanopartikülleri proteindeki sistein rezidülerine kovalent bağ ile bağlanır. Bağlanma sadece protein ve nanopartiküllerin inkübasyonu ile gerçekleşir ve kuvvetli Au-S bağı oluşur.

### ***Nanopartikül Ligant Bağlanma***

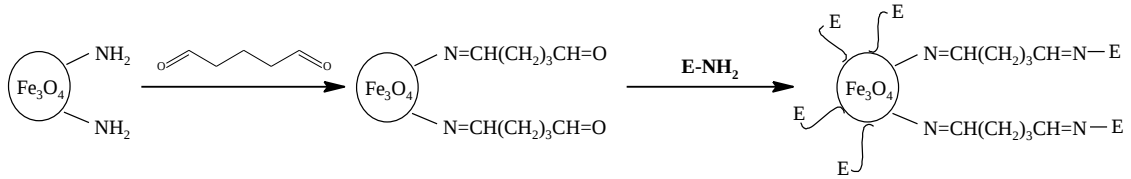
Nanopartikül-protein birleşmesi için bir diğer metot nanopartikül ile proteinin kovalent bağlanmasıdır. En çok kullanılan yöntemlerden biri sülfon-NHS esterleri veya R-COOH gruplarının karbodiimid ile aktivasyonu ile birincil amin gruplarının kovalent bağlanmasıdır. Metha ve ark. (Mehta, Upadhyay et al. 1997) karbodiimid varlığında demir oksit nanopartiküllerine protein ve enzimlerin kovalent olarak bağlanabildiğini göstermiştir (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** Karbodiimid aktivasyonu ile nanopartiküllere enzim bağlanması.

BSA, streptokinaz, kimotripsin, dispaz ve glukoz oksidaz gibi birçok klinik olarak önemli enzim ve proteinler bu metotla immobilize edilmiştir. Hazırlanan immobilize enzimlerle %50-80 arasında aktivite verimi elde edilmiştir. Enzim ve biyoaktif moleküller için manyetik nanopartiküllere direk bağlanma manyetik nanopartiküllerin üzerindeki hidroksil gruplarıyla gerçekleşir. Bacri ve ark. (Bacri, Perzynski et al. 1990) pH 6-10 aralığında partiküllerin üzerinde hidroksil gruplarının var olduğunu göstermiştir ve nanopartikül yüzeyindeki bu serbest hidroksil grupları enzimlerin bağlanmasından sorumludur.

Sentez metoduna göre demir oksit manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde az miktarda amino grubu var olabilir. Bu amino grupları ile enzim amino grupları arasında kovalent bağlanma glutaraldehit ile gerçekleştirilir (Hong, Zhang et al. 2008) (Şekil 2.10).



**Şekil 2.10.** Glutaraldehit ile nanopartiküllere enzim bağlanması.

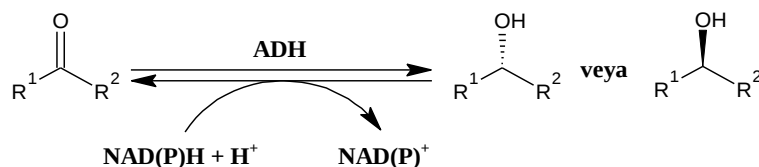
Direk bağlanma metodunun birçok potansiyel avantajı vardır. Bu partiküller herhangi bir polimerle kaplı olmadığı için boyutları küçüktür ve hacmin yüzey alanına oranı artar. Bu durumda manyetik alanla daha fazla etkilenirler. Küçük manyetik partiküllerin özgülülüğüne sahiptirler çünkü agregat oluşturma meyili olmayan dayanıklı koloidal süspansiyon halinde bulunurlar ve reaksiyon karışımına homojen dağılma sağlanır (Koneracká, Kopcanský et al. 2002).

## 2.7. Enzim Sistemleri

Endüstride en çok kullanılan hidroliz reaksiyonunda, yüksek kararlılığına ve temin edilmesindeki kolaylığa bağlı olarak hidrolazlar kullanılır. İkinci olarak kullanılan reaksiyon ise yükseltgenme-indirgenme reaksiyonudur. Bu sebeple ticari olarak uygun ve temini kolay oksidoredüktazların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu sınıfın en önemli üyelerinden biri alkol dehidrogenaz enzim ailesidir. Bu çalışmada fonksiyonel enzim olarak alkol dehidrogenaz (ADH) ve kofaktör rejenerasyonu için yardımcı enzim olarak format dehidrogenaz (FDH) kullanıldığından dolayı çalışmanın odak noktası bu iki enzim olacaktır.

### 2.7.1. Alkol Dehidrogenaz Hakkında Genel Bilgi

ADH, NAD(P)H kofaktörü yardımıyla aldehit ve keton gibi karbonil grubu taşıyan bileşiklerin indirgenmesini ve alkollerin oksidasyonunu katalizleyen bir metaloenzimdir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. ADH katalizli asimetrik indirgenme reaksiyonu.

ADHlar özellikle kiral farmasötiklerin (Tschaen DM 1995; Hussain W 2008) ve diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretimi için gerekli olan kiral alkollerin organik sentezinde önemli role sahiptirler. *Lactobacillus kefir* (Metrangolo-Ruiz De Temin~o D 2005), *L. Brevis* (Hummel W 1997) ve *Thermoanaerobicum sp.* gibi birçok ADH organik sentezde kullanılmaktadır. Bunlar genetik mühendisliği ile üretilmektedir ve böylece büyük miktarda elde edilmeleri mümkündür. Enzimatik olarak sentezlenen bileşiklere örnek olarak alkil (R)-veya (S)-3-hidroksibütirat, (R)-veya (S)-1-asetoksi-2-propanol (Pfaller R 2007), (S)-2-bütanol (Pfaller R 2007) veya (S)-2-pentanol (Peschko C 2005) gibi alifatik (S)-alkoller verilebilir.

ADH endüstriyel kullanımına örnek olarak, *Neurospora crassa* kaynaklı ADH ile glukom hastalığı için aktif olarak uygulanan karbonik anhidraz enzim inhibitörü Trusopt (MK0507) sentezindeki ara ürün eldesi verilebilir (Holt and Rigby ; R.A and Rigby ; Blacklock, Sohar et al. 1993; Blacker and Holt 1997; Dodds 1997).

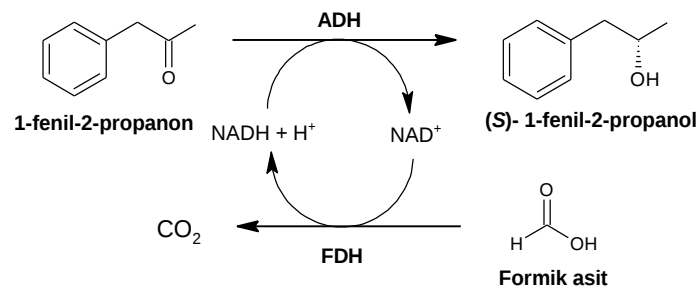
### 2.7.2. Format Dehidrogenaz Hakkında Genel Bilgi

NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH (EC 1.2.1.2) format iyonunun karbon dioksit oksidasyonunu katalizler (Eşitlik 2.3):



$\text{NAD}^+$ -bağımlı dehidrogenazlarla kiral bileşiklerin sentezlerinde  $\text{NADH}$  rejenerasyonu için  $\text{FDH}$  enziminin kullanımı üzerine yoğun çalışmalar mevcuttur (Hummel and Kula 1989; Wichmann, Wandrey et al. 2000) ve birçok çalışma  $\text{FDH}$  enziminin indirgenmiş kofaktör rejenerasyonunda en iyi enzimlerden biri olduğunu göstermiştir (Kula and Wandrey 1987; Hummel and Kula 1989; Liese and Villela Filho 1999; Burton 2003). İlk ticari işlem, *Candida boidinii*'den elde edilen  $\text{FDH}$  kullanımı ile *tert*-L-lösin kiral sentezidir (Bommarius, Schwarm et al. 1995). Dehidrogenazlarla optikçe aktif bileşiklerin üretimi için kullanılan diğer işlemler arasında üretim hacmi olarak bu işlem hala en iyisidir.

$\text{ADH}$  enzimi ile biyokataliz sisteminde amfetamin, amfetamin fosfat ve amfetaminilin öncül maddesi olan (S)-1-fenil-2-propanol sentezindeki Format/Format dehidrogenaz sistemi ile kofaktör rejenerasyonu Şekil 2.12'de görülmektedir (Liang ; Mori ; Johnston 1979; Bracher 1994; Kragl 1996; Kruse 1996; Kruse 1998). (S)-1-fenil-2-propanol %72 verim ve >%99 enantiyomer saflığı ile elde edilmiştir.



**Şekil 2.12.** Kofaktör rejenerasyonu.

## **BÖLÜM 3**

# **MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ**

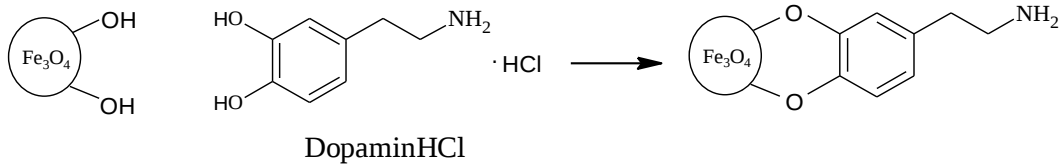
*Olayların senin istediğin gibi gelişmesini bekleme! Geliştiği gibi kabul etmeye çalış!*

*Epictete*

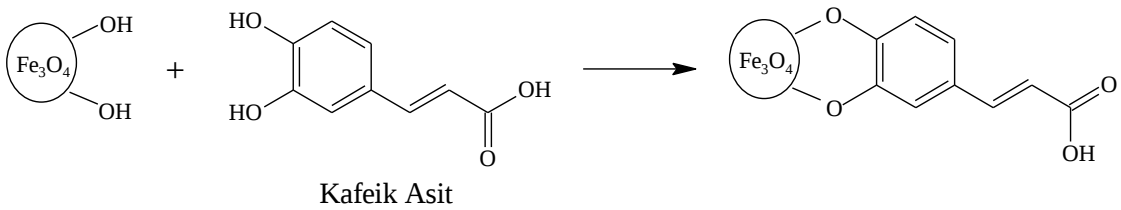
### 3. MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ

#### 3.1. Giriş

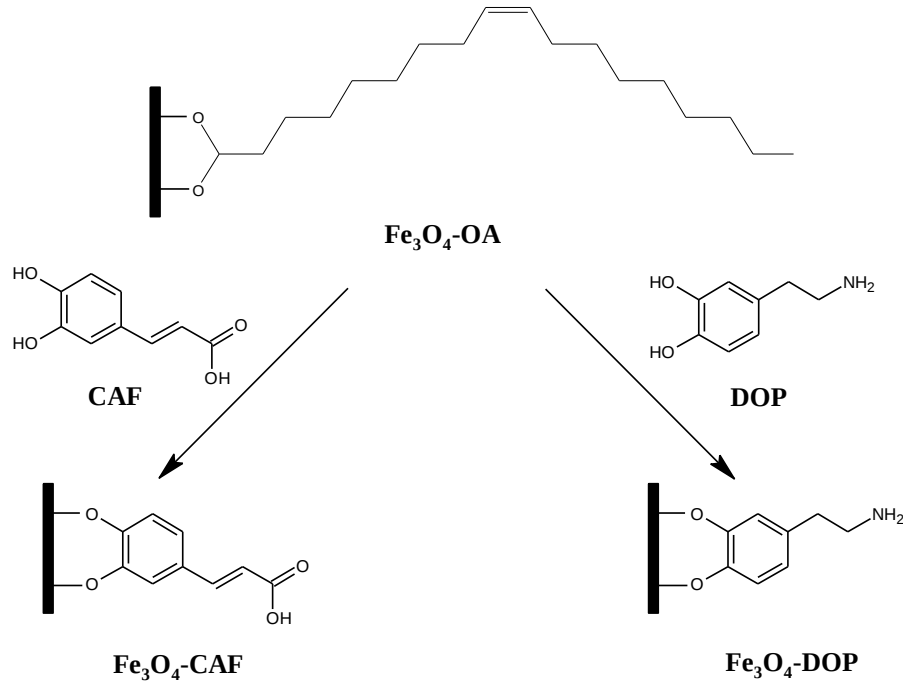
Bu bölümde modifiye edilmemiş manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesine yönelik çalışmalara yer verilmiştir. Farklı yüzey modifikasyonlarıyla nanopartiküller elde edilip karakterize edilmiştir. Hem modifiye edilmemiş manyetik nanopartiküllerin yüzeyine dopamin (DOP) ve kafeik asit (CAF) bağlanmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2) hem de sentezlenen oleik asit (OA) kaplı nanopartiküllerle ligant değişimi sonucu katekol grubu ile modifiye manyetik nanopartiküller elde edilmiştir (Şekil 3.3). Organik fazdaki hidrofobik manyetik nanopartiküller DOP ve CAF kullanılarak sulu ortamda kullanılabilir hale getirilmiştir.



**Şekil 3.1.** DOP ile modifiye nanopartikül sentezi.



**Şekil 3.2.** CAF ile modifiye nanopartikül sentezi.



**Şekil 3.3.** Ligant değişimi ile DOP ve CAF bağlı nanopartikül sentezi.

### 3.2. Materyal

Demir (II) klorür tetrahidrat, demir (III) klorür hekzahidrat, sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum fosfat mono bazik, hidroklorik asit, N,N'-dimetil formamid, oleik asit vegetable, metanol, glutaraldehit ve kloroform Merck firmasından satın alındı. Amonyum hidroksit, etanol ve sitrik asit monohidrat Riedel de Haen firmasından satın alındı. Sodyum fosfat dibazik, diyaliz membranı, dekstran (from *L.M.*, 41000Da), dopaminhidroklorür, kafeik asit, polivinilalkol (MW 13-23kDa) Sigma firmasından satın alındı. Hekzan ve toluen Lab-Scan firmasından satın alındı. Argon gazı (yüksek saflıkta) Habaş A.Ş.'den temin edilmiştir. Elma® marka ultrasonik banyo, IKA-Labortechnik marka manyetik karıştırıcı, Heidolph marka çalkalayıcı ve manyetik karıştırıcı, Beckman marka santrfüj, Sartorius marka tartı kullanılmıştır.

### 3.3. Metot

#### 3.3.1. Manyetik Nanopartikül Sentezi

##### *Modifiye Olmamış Manyetik Nanopartikül Sentezi*

**Metot 1.** Argon gazı ile 30 dakika oksijeni uzaklaştırılmış 25ml deiyonize suya 1ml 12N HCl eklendi. 5.2g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve 2g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  karışımında çözüldü. Argon gazı altında demir çözeltisi hızlıca karıştırılan 250ml 1.5M NaOH'e damla damla eklendi. Siyah çökelti meydana geldi. 15 dakika hızlıca karıştırıldıktan sonra balonun dibine çökmesi beklendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 4 kez oksijeni uzaklaştırılmış su ile yıkandı. Nanopartiküllerin yüzeyindeki anyonik yükleri nötralize etmek için 250ml 0.01M HCl çözeltisi eklendi. Santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Oksijeni uzaklaştırılmış su ile süspanse edilerek  $+4^\circ\text{C}$ 'de daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklandı (MN-OH).

**Metot 2.** Argon gazı ile oksijeni uzaklaştırılmış 40ml deiyonize suda 0.86g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve 2.35g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözüldü. Üç boyunlu balona alınan demir tuzları çözeltisi argon gazı altında mekanik karıştırıcı ile hızlıca karıştırılarak  $80^\circ\text{C}$ 'ye ısıtıldı. Karıştırma devam ederken 5ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  damla damla eklendi. Siyah çökelti meydana geldi. Yarım saat ısıtılmaya ve karıştırılmaya devam edildi. Yarım saat sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve oksijeni uzaklaştırılmış su ile yıkandı. Oksijeni uzaklaştırılmış su ile süspanse edilerek  $+4^\circ\text{C}$ 'de daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklandı (MN- $\text{NH}_2$ ).

##### *Modifiye Manyetik Nanopartikül Sentezi*

**Metot 3.** Argon gazı ile oksijeni uzaklaştırılmış 40ml deiyonize suda 0.86g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve 2.35g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözüldü. Üç boyunlu balona alınan demir tuzları çözeltisi argon gazı altında mekanik karıştırıcı ile hızlıca karıştırılarak  $80^\circ\text{C}$ 'ye

ısıtıldı. Karıştırma devam ederken 5ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  damla damla eklendi. Siyah çökelti meydana geldi. Yarım saat ısıtılmaya ve karıştırılmaya devam edildi. Yarım saat sonunda 2ml sitrik asit (CA) çözeltisi (1g) eklendi ve sıcaklık  $95^\circ\text{C}$ 'ye çıkarıldı. Bir buçuk saat karıştırıldı. Reaksiyon ürünü, aşırı CA uzaklaştırmak üzere 44 saat destile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonunda  $+4^\circ\text{C}$ 'de daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklandı (MN-CA).

**Metot 4.** 1g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve 1.35g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi 10ml oksijeni uzaklaştırılmış deiyonize suda hazırlandı. 0.2g PVA 10ml suya azar azar eklenerek ve ısıtılarak çözüldü. Demir tuzlarının çözeltisine polimer çözeltisi eklendi. Karışım  $60^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika hızlıca karıştırıldı. Damla damla 10ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  eklendi ve kahverengi çökelti meydana geldi.  $60^\circ\text{C}$ 'de hızlıca karıştırıldı. Yarım saat sonra alınan reaksiyon karışımı destile suya karşı 1 gün diyaliz edildi. Diyaliz sonunda  $+4^\circ\text{C}$ 'de daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklandı (MN-PVA).

**Metot 5.** 0.64g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve 1.5g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi oksijeni uzaklaştırılmış 10ml deiyonize suda hazırlandı. Balona alınan karışıma 10ml %25'lik dekstran çözeltisi eklendi. Argon gazı altında hızlıca karıştırıldı. Karıştırılan çözeltiye damla damla 4.5ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  eklendi. Kahverengi çökelti meydana geldi. Karışım  $60^\circ\text{C}$ 'ye ısıtıldı ve 15 dakika karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon ürünü oda sıcaklığında 15 dakika sonike edildi. Diyaliz membranına alınan reaksiyon ürünü destile suya karşı diyaliz edildi (MN-DX).

**Metot 6a.** 0.81g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve 0.42g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20ml oksijeni uzaklaştırılmış deiyonize suda çözüldü. Manyetik karıştırıcı ile karıştırılan demir tuzları çözeltisine oda sıcaklığında azar azar 5ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  eklendi. Siyah çökelti meydana geldi. 10 dakika hızlıca karıştırılmaya devam edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 5 dakika oda sıcaklığında sonike edildi. Reaksiyon balonu  $76-77^\circ\text{C}$  üzerine alındı ve 1ml OA eklendi. Yarım saat hızlıca karıştırıldı. Elde edilen karışıma 25ml toluen eklenerek aşırı tuz ilave edildi ve ayırma hunisine alındı. Faz ayrılmasından sonra toluen

fazındaki OA kaplı manyetik nanopartiküller daha sonra kullanılmak üzere +4°C’de saklandı (MN-NH<sub>2</sub>-OA).

**Metot 6b.** 20ml deiyonize su içindeki MN-OH manyetik nanopartiküle 5ml OA eklendi ve oda sıcaklığında 140rpm’de çalkalandı. Yarım saat sonra karışıma 25ml hekzan veya kloroform eklendi. Ayırma hunisine alınan karışımda faz ayrımı beklendi. Organik fazdaki OA kaplı manyetik nanopartiküller +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-OH-OA).

**Metot 7a.** Yaklaşık 10mg MN-OH manyetik nanopartikül, 50mg DOP ve 5ml N,N'-DMF ile 25°C’de 1 saat sonike edildi. Sonikasyon sonunda nanopartiküller 4500 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Destile su ile 2 kez yıkanıp santrifüjlenen nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-DOP-MT1).

**Metot 7b.** Yaklaşık 10mg MN-OH manyetik nanopartikül, 50mg DOP ve 5ml metanol ile 45 dakika oda sıcaklığında sonike edildi. Sonikasyon sonunda nanopartiküller 4500 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Metanol ile 2 kez yıkanan nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-DOP-MT2).

**Metot 7c.** Yaklaşık 10mg MN-OH manyetik nanopartikül, 80mg DOP ve 10ml 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) 0.2M NaCl içinde buzda yarım saat sonike edildi. Sonikasyon sonunda manyetik nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponuyla (pH 7) yıkanarak 5000 rpm’de 5 dakika çöktürüldü ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-DOP-MT3).

**Metot 7d.** Kloroform içindeki oleik asit ile MN-OH manyetik nanopartikül süspansiyonundan 2ml alınıp fazla etanol ile 4500 rpm’de 5 dakika çöktürüldü. 1ml

kloroform ile süspanse edilip 100mg DOP eklenen manyetik nanopartiküllere ve oksijeni uzaklaştırılmış 5ml deiyonize su ve etanol ilave edildi. Karışım 25°C’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda su fazı ile eşit miktar olacak şekilde kloroform eklendi. Karışım ayırma hunisinde faz ayırımına bırakıldı. Su fazına geçen dopamin ile modifiye manyetik nanopartiküller 4500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-DOP-MT4).

**Metot 7e.** Kloroform içindeki OA ile MN-OH manyetik nanopartikül süspansiyonundan 2ml alınıp fazla etanol ile 4500 rpm’de 5 dakika çöktürüldü. 10ml etanol ile süspanse edilen nanopartiküller 100mg DOP ile oda sıcaklığında yarım saat sonike edildi. Sonikasyon sonunda 4500rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüjlendi. Etanolle yıkanan nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-DOP-MT5).

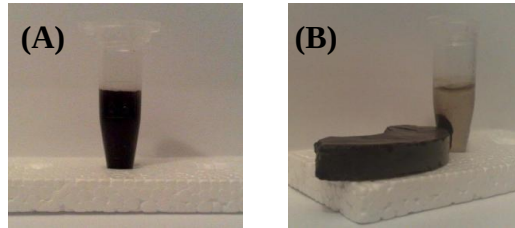
**Metot 8a.** 80mg CAF ve 10ml 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) 0.2M NaCl içinde 55°C’de ısıtılarak çözündü. Yaklaşık 4mg MN-OH manyetik nanopartikül CAF çözeltisine eklenerek 30°C’de yarım saat sonike edildi. Sonikasyon sonunda manyetik nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponuyla (pH 7) yıkanarak 5000 rpm’de 5 dakika çöktürüldü ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-CAF-MT1).

**Metot 8b.** Kloroform içindeki OA ile MN-OH manyetik nanopartikül süspansiyonundan 2ml alınıp fazla etanol ile 4500 rpm’de 5 dakika çöktürüldü. 1ml kloroform ile süspanse edilip 100mg CAF eklenen manyetik nanopartiküllere ve oksijeni uzaklaştırılmış 5ml deiyonize su ve etanol ilave edildi. Karışım 30°C’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda su fazı ile eşit miktar olacak şekilde kloroform eklendi. Karışım ayırma hunisinde faz ayırımına bırakıldı. Su fazına geçen CAF ile modifiye manyetik nanopartiküller 4500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile süspanse edilip +4°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı (MN-CAF-MT2).

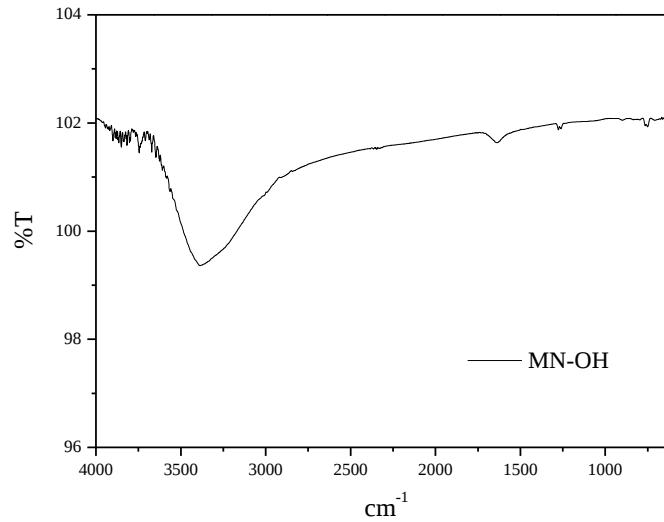
### 3.4. Sonuç

#### 3.4.1. Modifiye Olmamış Manyetik Nanopartikül Sentezi

**Metot 1** ile elde edilen süspanse haldeki nanopartiküller manyetik alan uygulandığında etkilenmektedir (Şekil 3.4). Sentezlenen MN-OH partikülleri 70°C vakum fırında kurutuldu. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile kurutulan nanopartiküllerin yüzey grupları hakkında bilgi edinilmiştir (Şekil 3.5).

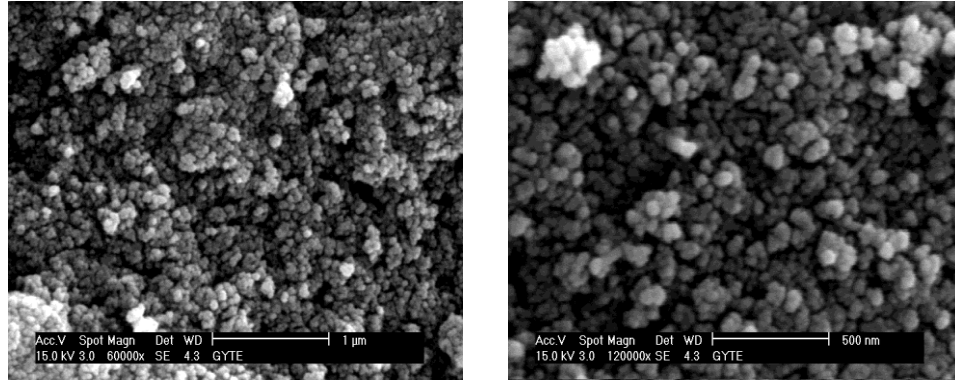


**Şekil 3.4.** Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-OH.



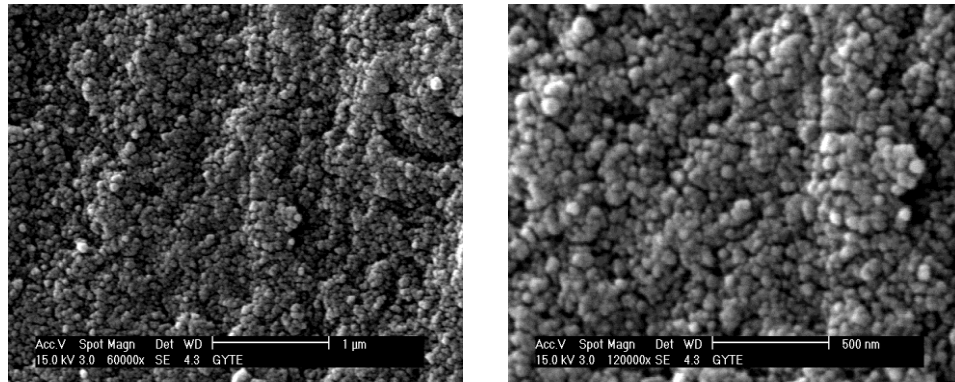
**Şekil 3.5.** MN-OH FTIR spektrumu.

Spektruma göre 3500-3000cm<sup>-1</sup> arasındaki yayvan pik hem numunede kalan sudan hem de yüzeydeki -OH grupları arasındaki hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. SEM ile elde edilen görüntü Şekil 3.6'daki gibidir.



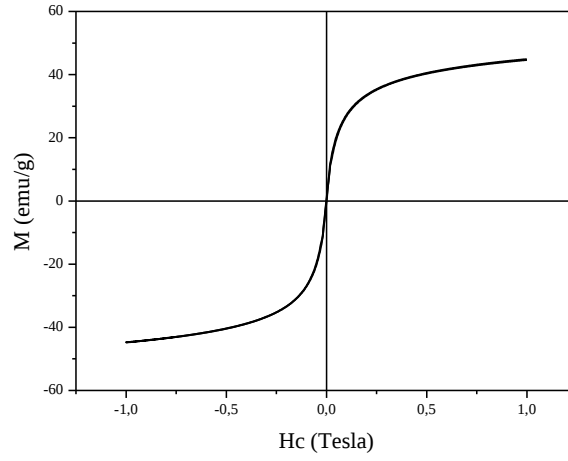
**Şekil 3.6.** MN-OH SEM görüntüsü.

Bu görüntülerdeki nanopartiküller manyetik karıştırıcı kullanılarak sentezlenmiştir. Şekil 3.7’de ise mekanik karıştırıcı kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin görüntüsü bulunmaktadır. Görüntülere göre hızlı karıştırmanın nanopartikül boyutuna olan etkisi görülmektedir. Mekanik karıştırıcı ile elde edilen nanopartiküllerin boyutları daha küçüktür. Ayrıca sentez esnasında manyetik alan da uygulanmamış olur.

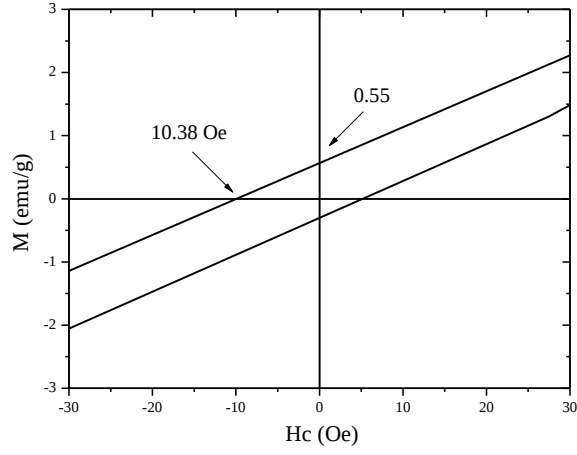


**Şekil 3.7.** MN-OH SEM görüntüsü.

Manyetik özelliğini belirlemek için Fiziksel Özellik Ölçüm Sistemi (Physical Property Measurement System, PPMS) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında elde edilen manyetik histeresis eğrisi Şekil 3.8’dedir.  $M_s$  değeri 44.65 emu/g,  $M_r$  değeri 0.55 emu/g ve  $H_c$  değeri 10.38 Oe’dir. Şekil 3.9’da belirtilen  $H_c$  değerine göre 0 Oe değerine yakın olduğu için bu eğri nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik taşıdığını ve nanoboyutta olduğunu belirtmektedir.

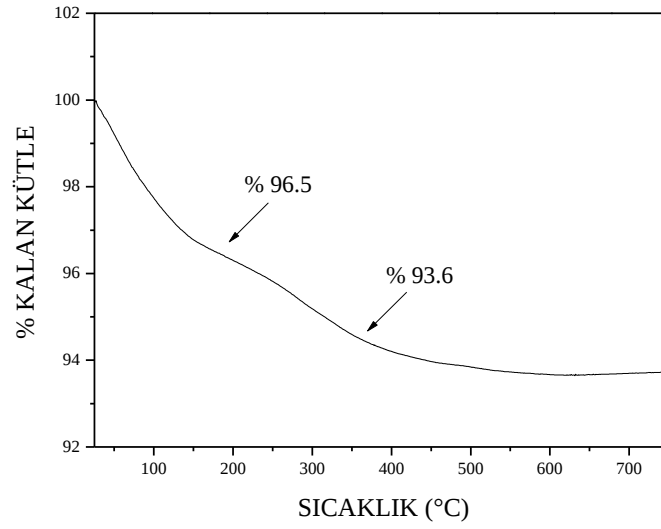


**Şekil 3.8.** MN-OH histeresis eğrisi.



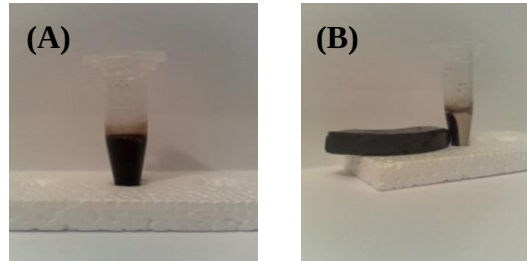
**Şekil 3.9.** MN-OH histeresis eğrisinde  $H_c$  ve  $M_r$  değerleri.

MN-OH nanopartiküllerin Termogravimetrik analiz eğrisi (TGA, Thermal gravimetric analysis) Şekil 3.10'da verilmiştir. Analize göre uygulanan tüm sıcaklık aralığında kütesinin sadece %7'sini kaybetmiştir. Bu kütle kaybı nanopartiküllere absorbe olan sudan kaynaklanabilir.

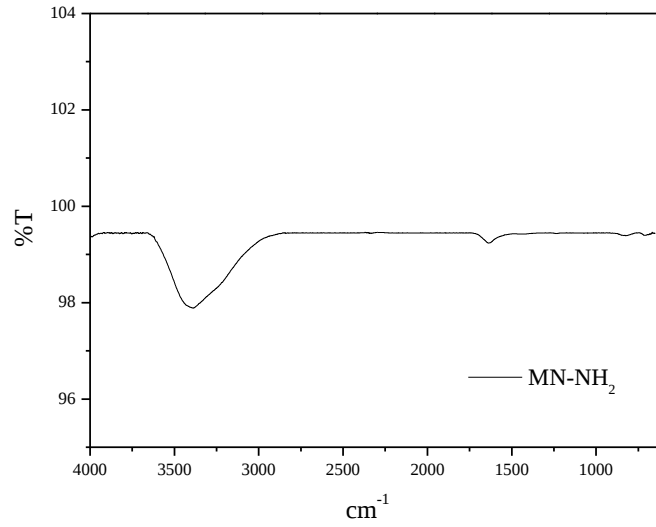


**Şekil 3.10.** MN-OH TGA eğrisi.

**Metot 2** ile elde edilen süspanse nanopartiküller manyetik alan uygulandığında etkilenmektedir (Şekil 3.11). Sentezlenen MN-NH<sub>2</sub> partikülleri 70°C vakum fırında kurutuldu. Kurutulan nanopartiküllerin FTIR spektrumu Şekil 3.12’de verilmiştir.

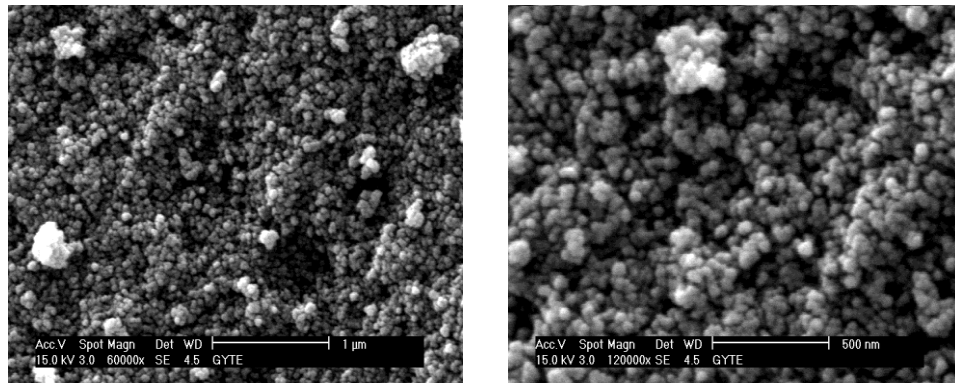


**Şekil 3.11.** Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-NH<sub>2</sub>.



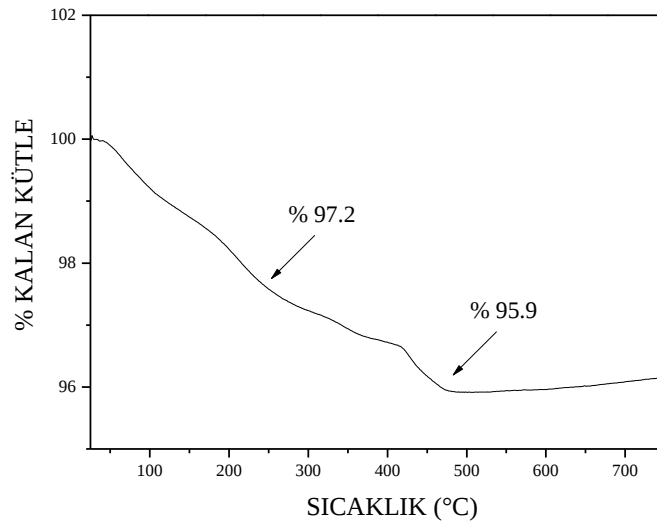
**Şekil 3.12.** MN-NH<sub>2</sub> FTIR spektrumu.

Spektruma göre MN-OH nanopartiküllerine ait spektrumda olduğu gibi 3500-3000cm<sup>-1</sup> arasındaki yayvan pik hem numunede kalan sudan hem de yüzeydeki –OH ve –NH<sub>2</sub> grupları arasındaki hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. MN-NH<sub>2</sub> SEM ile elde edilen görüntüleri Şekil 3.13’teki gibidir.



**Şekil 3.13.** MN-NH<sub>2</sub> SEM görüntüsü.

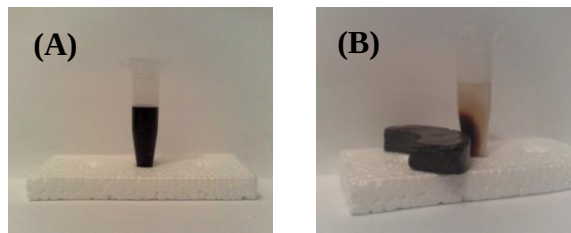
MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerinin TGA eğrisi Şekil 3.14’te verilmiştir. Analize göre tüm sıcaklık uygulamasında nanopartiküller kütlelerinin sadece %4’ünü kaybetmiştir. Bu kütle kaybı nanopartiküllere absorbe olan sudan kaynaklanabilir. 500°C’den sonra geri kalan yaklaşık %96 kütle demir okside aittir.



**Şekil 3.14.** MN-NH<sub>2</sub> TGA eğrisi.

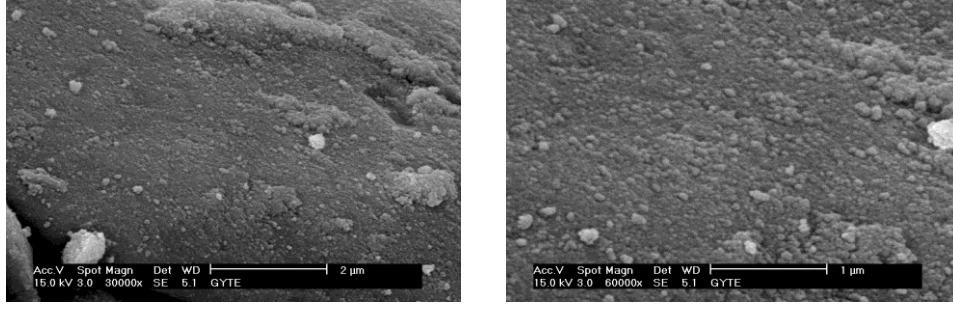
### 3.4.2. Modifiye Manyetik Nanopartikül Sentezi

**Metot 3** ile elde edilen CA ile modifiye nanopartiküller manyetik alan uygulandığında etkilenmektedir (Şekil 3.15). Sentezlenen CA ile modifiye manyetik demir oksit nanopartikülleri 70°C vakum fırında kurutuldu.

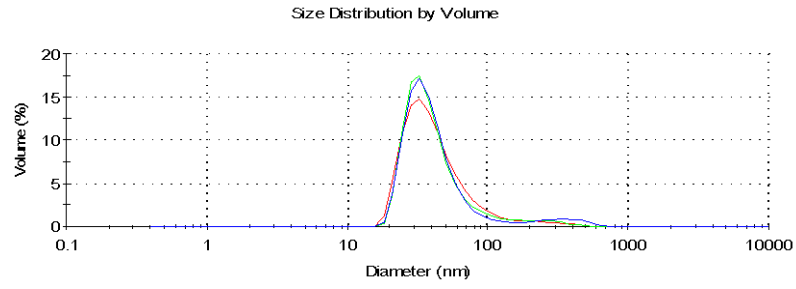


**Şekil 3.15.** Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-CA.

SEM ile elde edilen görüntüleri Şekil 3.16'daki gibidir ve Zetasizer ile boyut analizi Şekil 3.17'de verilmiştir. Boyut analizine göre sentezlenen CA ile modifiye manyetik nanopartiküllerin  $75 \pm 2$  nm olduğu belirlenmiştir.

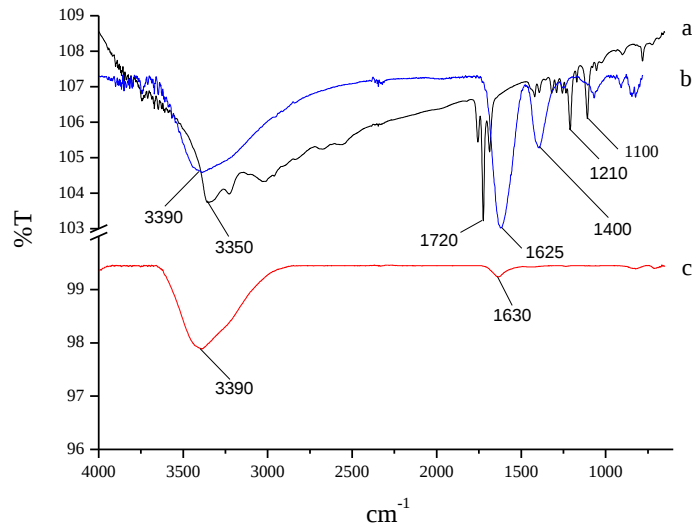


**Şekil 3.16.** MN-CA SEM görüntüsü.



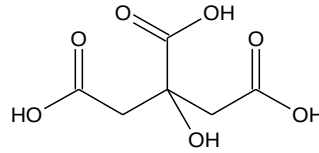
**Şekil 3.17.** MN-CA boyut analizi.

Kurutulan MN-CA partiküllerin FTIR spektrumu Şekil 3.18’de ve CA molekül yapısı Şekil 3.19’da verilmiştir.



**Şekil 3.18.** MN-CA FTIR spektrumu.

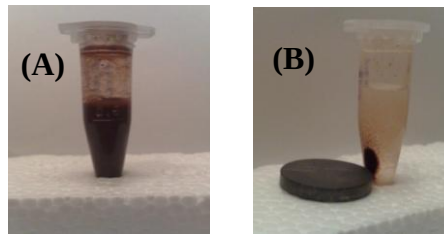
(a) Saf CA; (b) MN-CA; (c) MN-NH<sub>2</sub>.



**Şekil 3.19.** CA molekül yapısı.

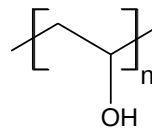
MN-CA FTIR spektrumunda  $1720\text{ cm}^{-1}$  piki C=O titreşimine aittir. CA'ın manyetik nanopartikül yüzeyine bağlanmasıyla bu pik  $1625\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. CA'ın karboksilat grubu Fe atomları ile kompleks oluşturmuştur ve C=O bağı kısmi tek bağ karakterine dönüşmüştür ve daha düşük değerli gerilme frekansına kaymıştır.

**Metot 4** ile elde edilen PVA ile modifiye nanopartiküller manyetik alan uygulandığında etkilenmektedir (Şekil 3.20).



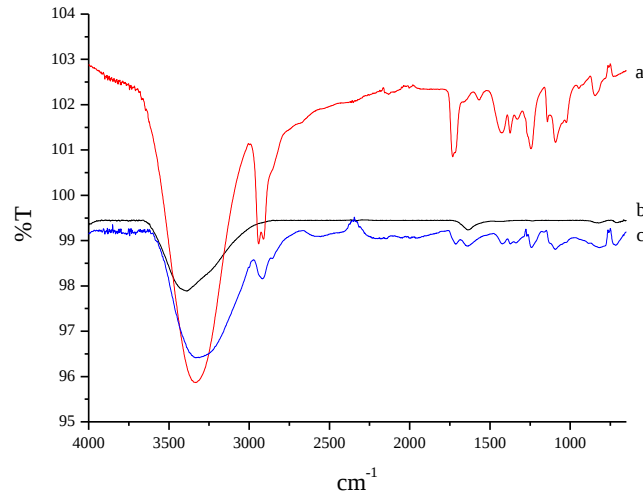
**Şekil 3.20.** Manyetik alan uygulanmadan önce (A) ve sonra (B) MN-PVA.

Sentezlenen MN-PVA  $70^{\circ}\text{C}$  vakum fırında kurutuldu. PVA molekül yapısı Şekil 3.21'de kurutulan nanopartiküllerin FTIR spektrumu Şekil 3.22'de verilmiştir.



**Şekil 3.21.** PVA molekül yapısı.

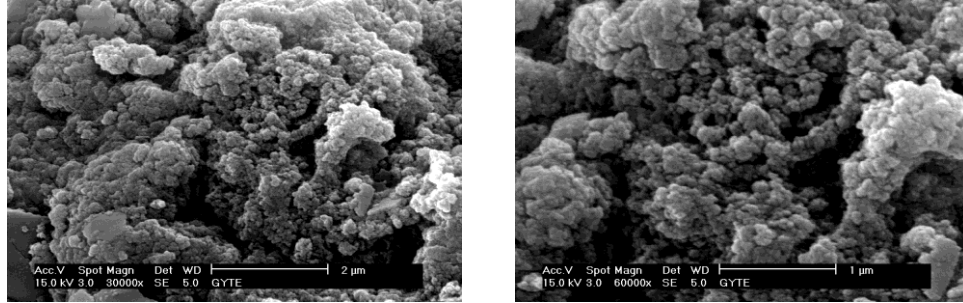
PVA spektrumunda  $1000\text{ cm}^{-1}$  piki C-O titreşimine aittir. Alkan C-H gerilmesi  $3000\text{ cm}^{-1}$  civarındadır.  $3300\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş yuvarlak uçlu pik, OH bağının gerilmesidir.  $1200\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikler C-C bağı gerilmesidir. Saf PVA pikleri zayıfta olsa MN-PVA spektrumunda mevcuttur. Yüzeyde PVA varlığını göstermektedir.



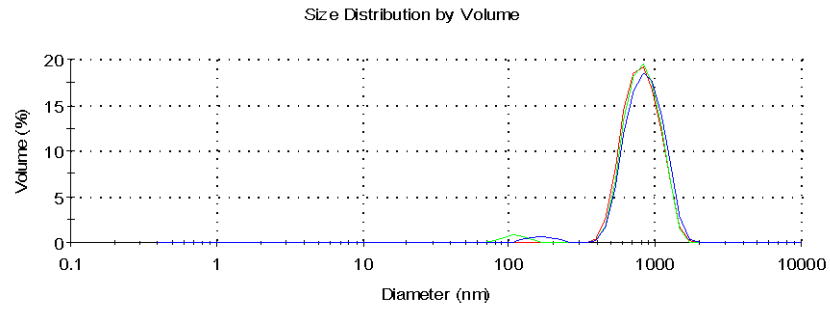
**Şekil 3.22.** MN-PVA FTIR spektrumu.

(a) Saf PVA; (b) MN-NH<sub>2</sub>; (c) MN-PVA.

MN-PVA partiküllerinin SEM görüntüsü Şekil 3.23'te verilmiştir ve Şekil 3.24'teki boyut analizine göre boyutları 1100 nm civarında olduğu görülmektedir.

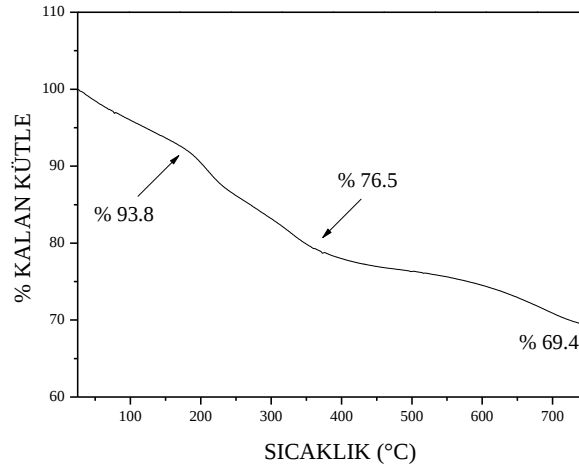


**Şekil 3.23.** MN-PVA SEM görüntüsü.



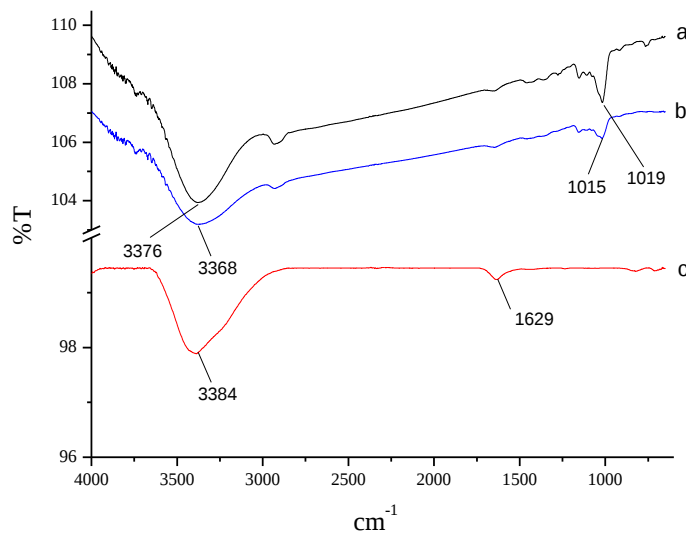
**Şekil 3.24.** MN-PVA boyut analizi.

MN-PVA partiküllerine ait TGA eğrisi Şekil 3.25'te verilmiştir. Analize göre ilk kütle kaybı %7'dir. Bu kayıp yüzeye absorbe sudan kaynaklanmaktadır. Yaklaşık %24'lük kütle kaybı polivinilalkole ait olabilir. Tüm kütle kaybından sonra kalan %70 kütle demir okside aittir.



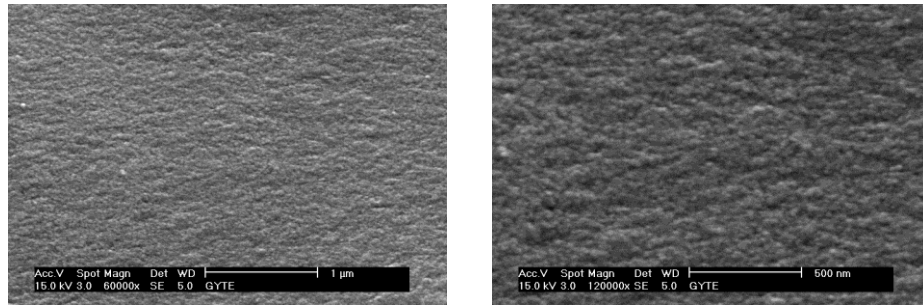
Şekil 3.25. MN-PVA TGA eğrisi.

**Metot 5** ile elde edilen MN-DX partiküller 70°C vakum fırında kurutuldu. Kurutulan nanopartiküllerin FTIR spektrumu Şekil 3.26'da verilmiştir. Saf dekstrana ait özgül pik MN-DX partiküllerinde de mevcuttur. Bu pikler yüzeyde dekstran olduğunu göstermektedir. Şekil 3.27'de ise SEM görüntüsü mevcuttur.



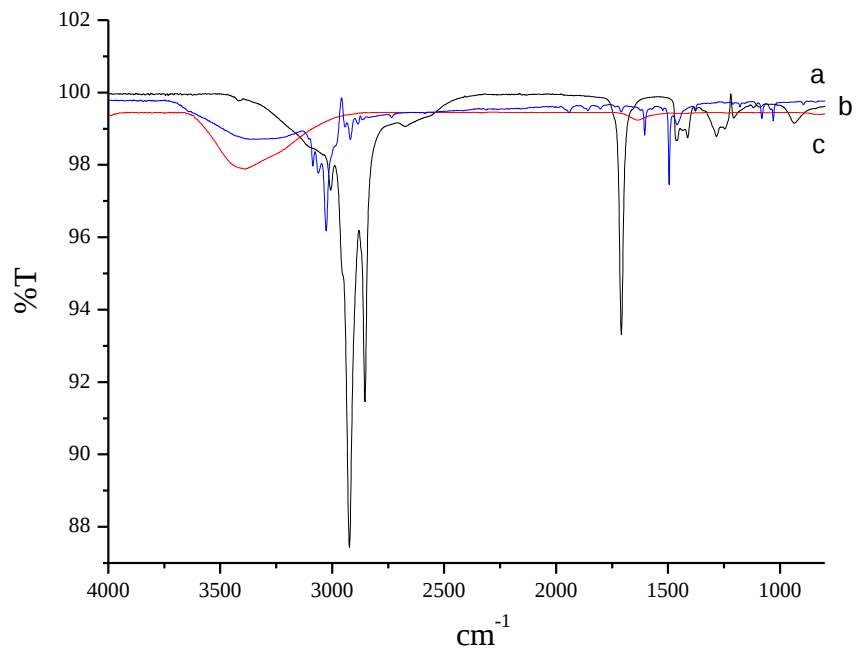
Şekil 3.26. MN-DX FTIR spektrumu.

(a) Saf DX; (b) MN-DX; (c) MN-NH<sub>2</sub>.



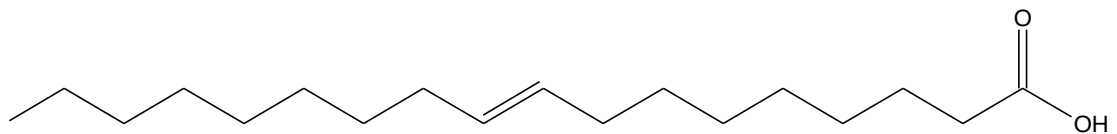
Şekil 3.27. MN-DX SEM görüntüsü.

**Metot 6a** ile sentezlenen OA kaplı manyetik demir oksit nanopartiküllerin (MN-NH<sub>2</sub>-OA) FTIR spektrumu Şekil 3.28’de ve OA molekül yapısı Şekil 3.29’da verilmiştir.



Şekil 3.28. MN-OA FTIR spektrumu.

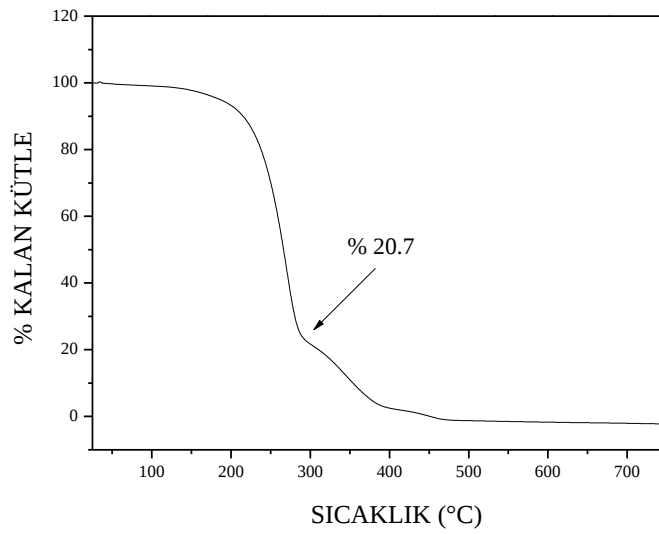
(a) MN-NH<sub>2</sub>-OA; (b) Saf OA; (c) MN-NH<sub>2</sub>.



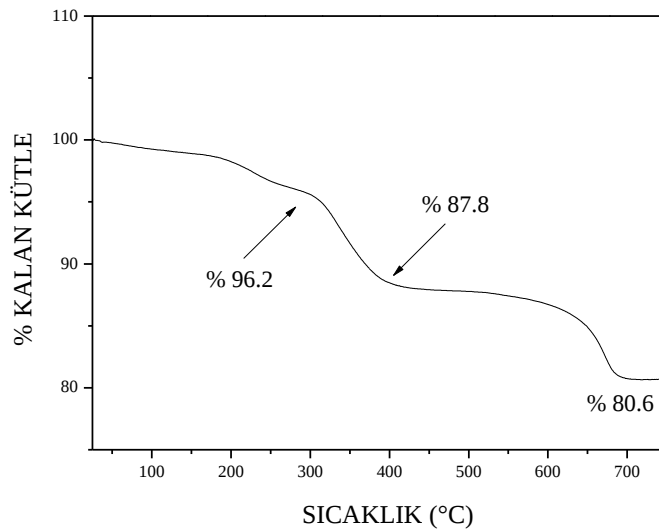
Şekil 3.29. OA molekül yapısı.

Alkan C-H gerilmesi  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındadır.  $1700\text{cm}^{-1}$  civarında karboksilik asit C=O bağ gerilmesi mevcuttur.  $1200\text{cm}^{-1}$ 'de C-C bağ gerilmesi görülmektedir. Yüzeyde OA varlığı spektrumdan anlaşılmaktadır.

Saf OA TGA eğrisi Şekil 3.30'da verilmiştir. Analize göre  $300^\circ\text{C}$ 'ye kadar olan kütle kaybı %50'dir. İkinci kütle kaybı  $300\text{-}400^\circ\text{C}$  aralığındadır ve kalan kütle %2'dir. MN-NH<sub>2</sub>-OA nanopartiküllerine ait TGA eğrisi Şekil 3.31'de verilmiştir.  $375^\circ\text{C}$ 'ye kadar olan kütle kaybı yaklaşık %13'tür. Bu kayıp OA'ten kaynaklanmaktadır.  $650^\circ\text{C}$ 'den sonra kalan %80 kütle demir okside aittir.

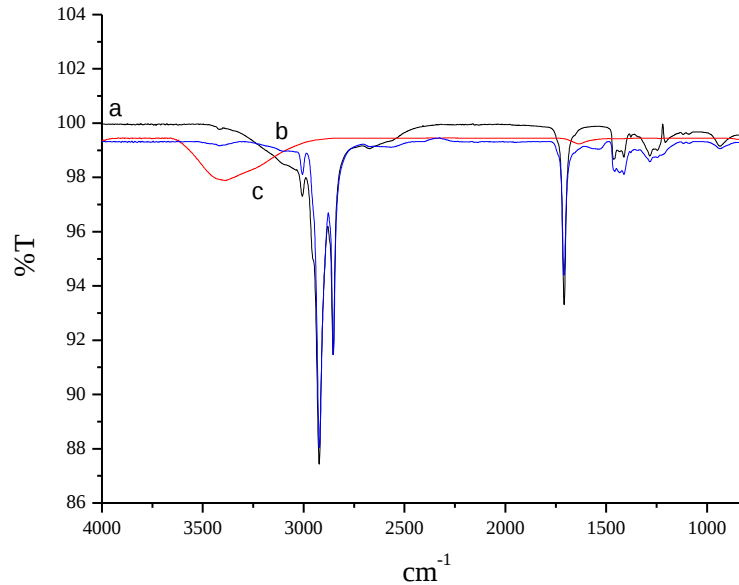


**Şekil 3.30.** Saf OA TGA eğrisi.



**Şekil 3.31.** MN-NH<sub>2</sub>-OA TGA eğrisi.

**Metot 6b** ile sentezlenen ve hekzan ile ekstrakte edilip saklanan OA kaplı manyetik demir oksit nanopartiküllerin (MN-OH-OA) FTIR spektrumu Şekil 3.32’de verilmiştir. Yüzeyde OA varlığı spektrumdan anlaşılmaktadır.



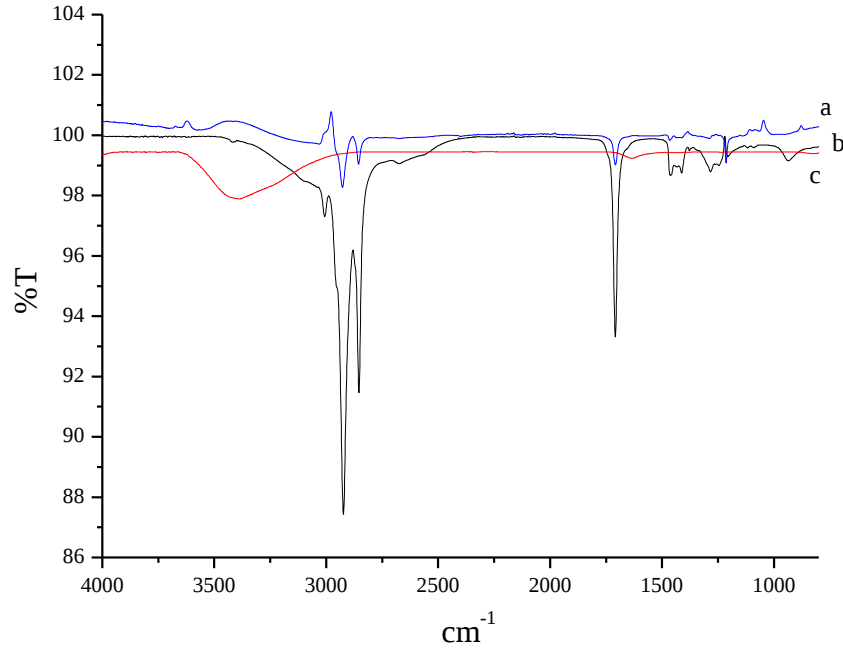
**Şekil 3.32.** MN-OH-OA FTIR spektrumu.

(a) Saf OA; (b) MN-OH-OA; (c) MN-OH.

Alkan C-H gerilmesi  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındadır.  $1700\text{cm}^{-1}$  civarında karboksilik asit C=O bağ gerilmesi mevcuttur.  $1200\text{cm}^{-1}$ ’de C-C bağ gerilmesi görülmektedir. Saf OA ait pektrumda gözlenen özgül pikler MN-OH-OA partiküllerinde de mevcuttur. Bu pikler yüzeyde OA varlığını göstermektedir.

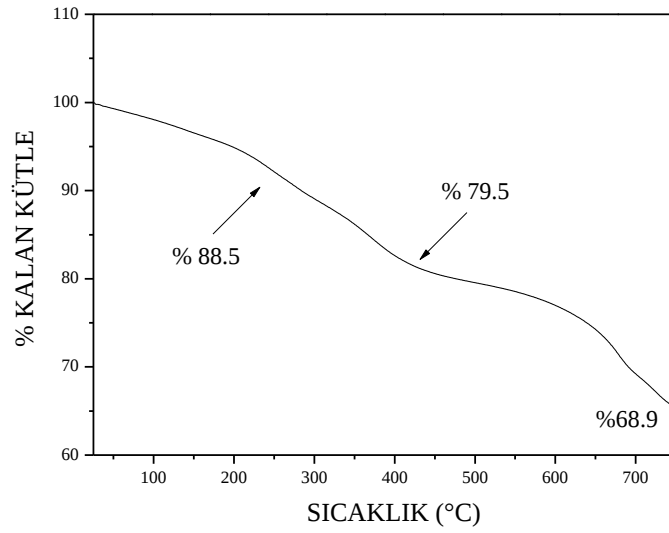
**Metot 6b** ile sentezlenen ve kloroform ile ekstrakte edilip saklanan OA kaplı manyetik demir oksit nanopartiküllerin (MN-OH-OA) FTIR spektrumu Şekil 3.33’te verilmiştir.

MN-OH-OA nanopartiküllerinin TGA eğrisi Şekil 3.34’te verilmiştir. Analize göre  $200^{\circ}\text{C}$ ’ye kadar olan kütle kaybı yaklaşık %10’dur. Bu kütle kaybı absorbe olan sudan kaynaklanmaktadır.  $200-375^{\circ}\text{C}$  arasındaki kütle kaybı yaklaşık %20’dir ve bu fiziksel olarak yüzeye bağlı oleik asidin kütle kaybıdır.  $375-650^{\circ}\text{C}$  aralığındaki yaklaşık %10’luk ikinci kütle kaybı kimyasal olarak yüzeye bağlı OA’in kaybıdır. Geri kalan %65’lik kütle demir okside aittir.



**Şekil 3.33.** MN-OH-OA FTIR spektrumu.

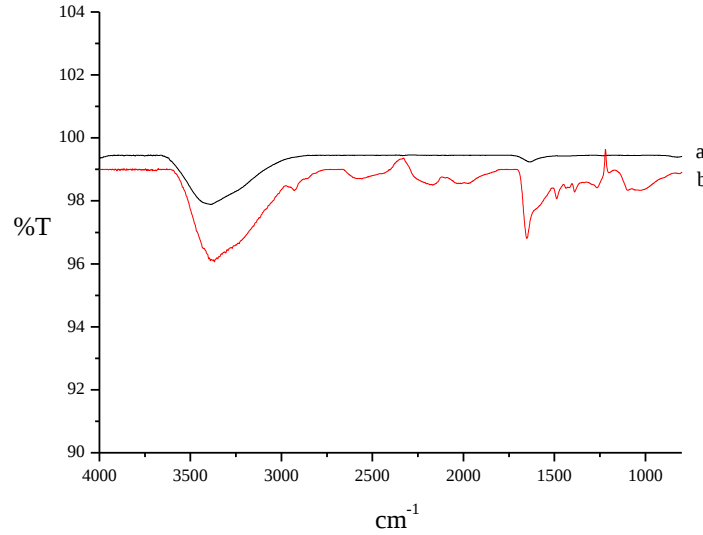
(a) MN-OH-OA; (b) Saf OA; (c) MN-OH.



**Şekil 3.34.** MN-OH-OA TGA eğrisi.

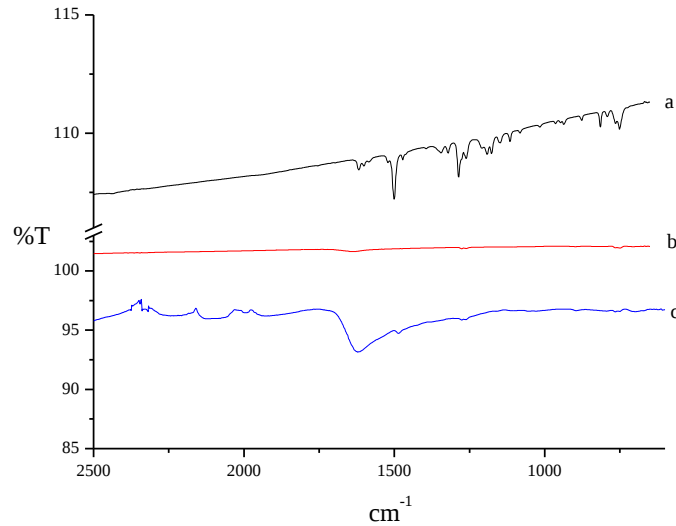
**Metot 7a** ile elde edilen MN-DOP-MT1 partiküllerine ait FTIR spektrumu Şekil 3.35'te bulunmaktadır. FTIR spektrumunda  $1600\text{cm}^{-1}$ 'den  $1550\text{cm}^{-1}$ 'e uzanan bir pik görülmektedir. Bu pikten aromatik C=C bağ gerilmesi bulunmaktadır. Yüzeyde dopamin varlığını göstermektedir.

**Metot 7b** ile elde edilen MN-DOP-MT2 partiküllerine ait FTIR spektrumu Şekil 3.36’da bulunmaktadır. FTIR spektrumunda  $1600\text{cm}^{-1}$ ’den  $1550\text{cm}^{-1}$ ’e uzanan bir pik görülmektedir. Bu pikten aromatik C=C bağ gerilmesi bulunmaktadır. Bu yayvan pik yüzeyde dopaminin bağlı olduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.35.** MN-DOP-MT1 FTIR spektrumu.

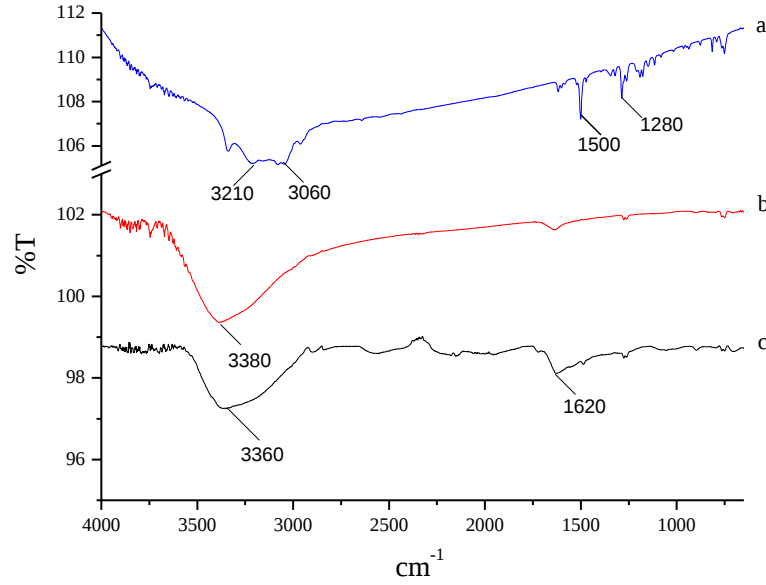
(a) MN-OH; (b) MN-DOP-MT1.



**Şekil 3.36.** MN-DOP-MT2 FTIR spektrumu.

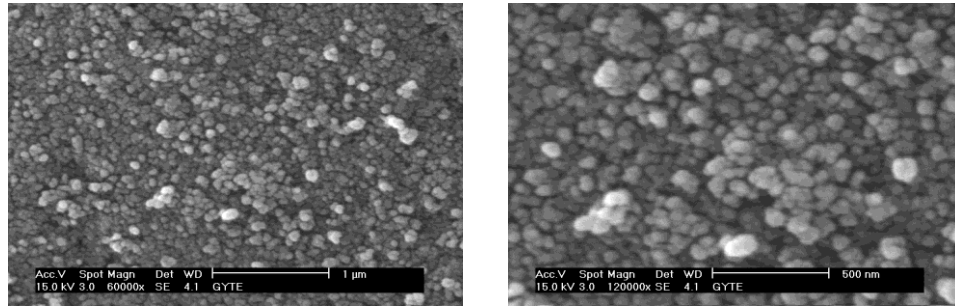
(a) Saf DOP; (b) MN-OH; (c) MN-DOP-MT2.

**Metot 7c** ile elde edilen MN-DOP-MT3 partiküllerine ait FTIR spektrumu Şekil 3.37’de bulunmaktadır. FTIR spektrumunda  $1600\text{cm}^{-1}$ ’den  $1550\text{cm}^{-1}$ ’e uzanan bir pik görülmektedir. Bu pikten aromatik C=C bağ gerilmesi bulunmaktadır. SEM ile elde edilen MN-DOP-MT3 görüntüsü Şekil 3.38’de verilmiştir.



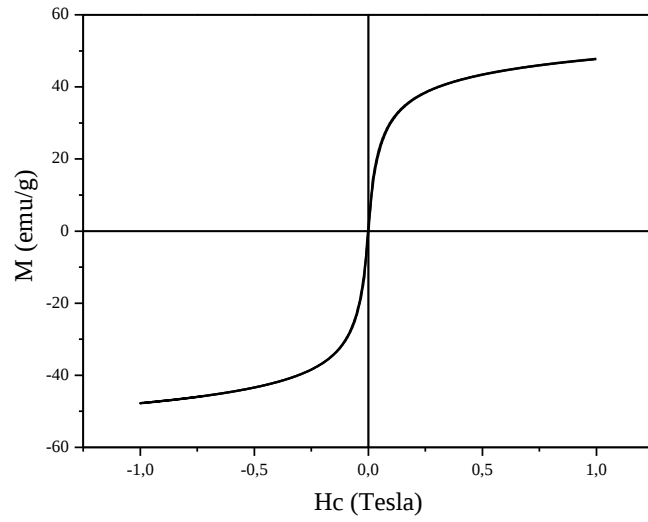
**Şekil 3.37.** MN-DOP-MT3 FTIR spektrumu.

(a) Saf DOP; (b) MN-OH; (c) MN-DOP-MT3.

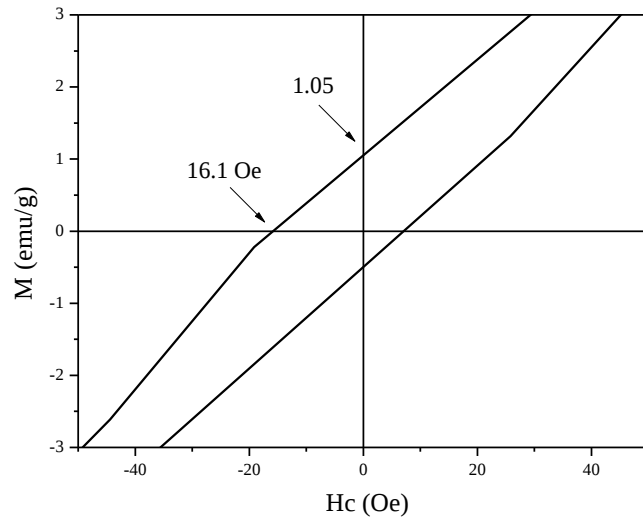


**Şekil 3.38.** MN-DOP-MT3 SEM görüntüsü.

Fiziksel Özellik Ölçüm Sistemi (PPMS) ile oda sıcaklığında elde edilen manyetik histeresis eğrisi Şekil 3.39’da verilmiştir.  $M_s$  değeri  $47.70 \text{ emu/g}$ ,  $M_r$  değeri  $1.05 \text{ emu/g}$  ve  $H_c$  değeri  $16.1 \text{ Oe}$ ’dir. Şekil 3.40’ta belirtilen  $H_c$  değerine göre  $0 \text{ Oe}$  değerine yakın olduğu için bu eğri nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik taşıdığını ve nanoboyutta olduğunu belirtmektedir.

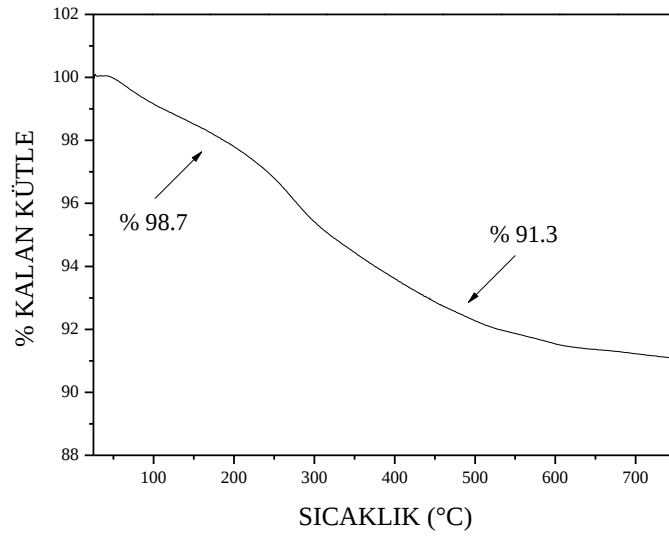


**Şekil 3.39.** MN-DOP-MT3 histeresis eğrisi.



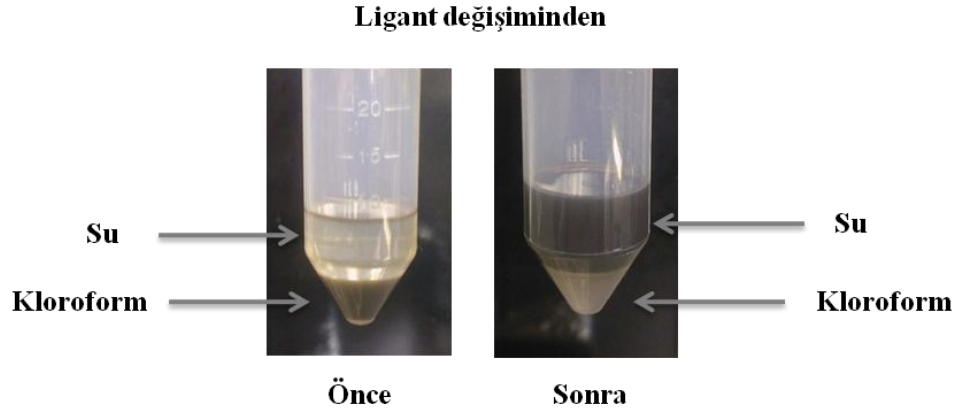
**Şekil 3.40.** MN-DOP-MT3 histeresis eğrisinde  $H_c$  ve  $M_r$  değerleri.

MN-DOP-MT3 TGA eğrisi Şekil 3.41’de verilmiştir. Analize göre 125°C’ye kadar yaklaşık %2’lik kütle kaybı mevcuttur. Bu kütle kaybı absorbe olan sudan kaynaklanmaktadır. 500°C’ye kadar yaklaşık %9 kütle kaybı mevcuttur. Bu kütle kaybı yüzeydeki dopaminden kaynaklanabilir. Kalan %90 kütle demir okside aittir.

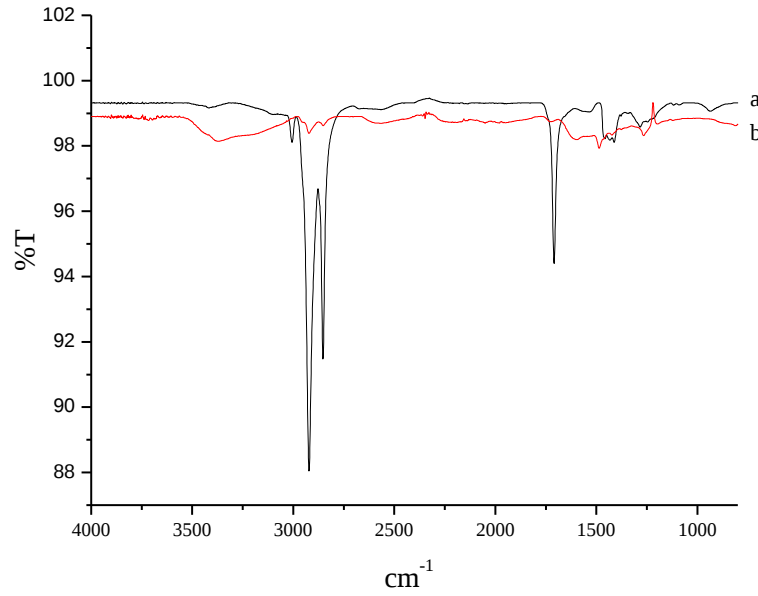


**Şekil 3.41.** MN-DOP-MT3 TGA eğrisi.

*Metot 7d* ile elde edilen dopamin ile modifiye olan nanopartiküller (MN-DOP-MT4) uygulama sonunda Şekil 3.42’de görüldüğü gibi organik fazdan su fazına geçmiştir. MN-DOP-MT4 ait FTIR spektrumu Şekil 3.43’te bulunmaktadır.



**Şekil 3.42.** Ligant değişiminden önce ve sonra MNler.

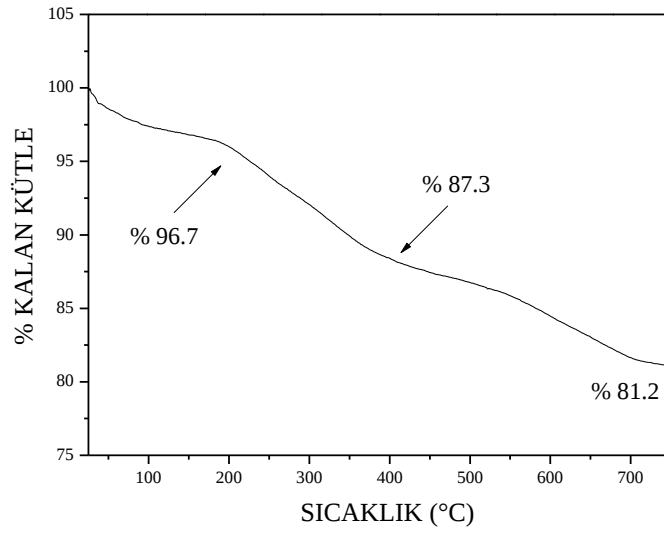


**Şekil 3.43.** MN-DOP-MT4 FTIR spektrumu.

(a) MN-OA-OH; (b) MN-DOP-MT4.

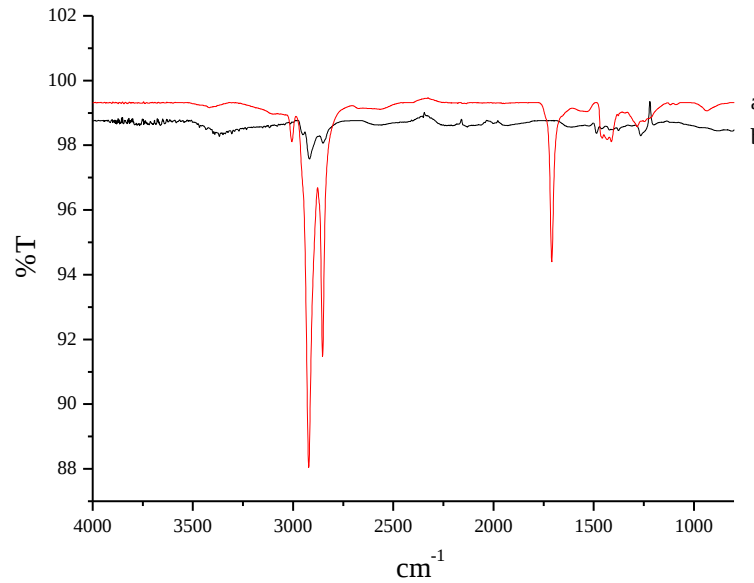
Alkan C-H gerilmesi  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındadır.  $1700\text{cm}^{-1}$  civarında karboksilik asit C=O bağ gerilmesi mevcuttur.  $1200\text{cm}^{-1}$ 'de C-C bağ gerilmesi görülmektedir. Ligant değişiminden sonra elde edilen spektrumda  $1600\text{cm}^{-1}$  civarında uzanan bir pik görülmektedir. Bu pikten aromatik C=C bağ gerilmesi bulunmaktadır.  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındaki zayıf pik ise hala yüzeyde OA'ın bulunduğunu göstermektedir.

MN-DOP-MT4 nanopartiküllerine ait TGA eğrisi Şekil 3.44'te verilmiştir. Analize göre  $300^\circ\text{C}$ 'ya kadar olan kütle kaybı yaklaşık %13'tür. Bu kütle kaybı yüzeye bağlı olan dopaminden kaynaklanabilir.  $600^\circ\text{C}$ 'ye kadar olan ikinci kütle kaybı kimyasal olarak yüzeye bağlı olan OA'ten kaynaklanabilir. Geri kalan yaklaşık %80'lik kütle demir okside aittir.



**Şekil 3.44.** MN-DOP-MT4 TGA eğrisi.

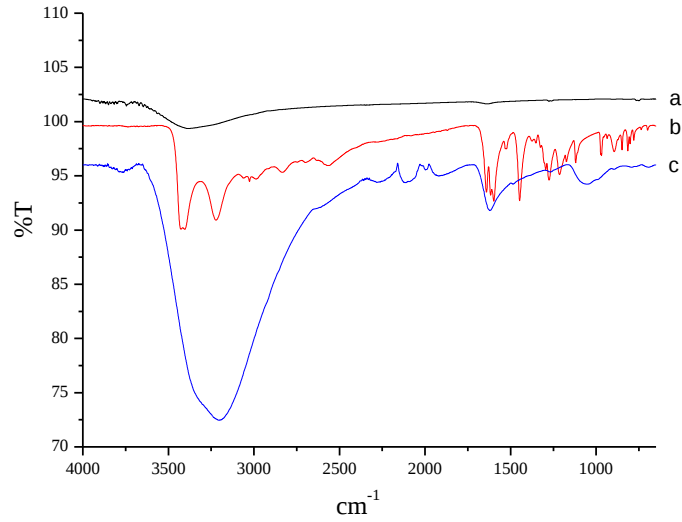
**Metot 7e** ile elde edilen DOP ile modifiye olan nanopartiküllere (MN-DOP-MT5) ait FTIR spektrumu Şekil 3.45'te bulunmaktadır. Alkan C-H gerilmesi  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındadır.  $1700\text{cm}^{-1}$  civarında karboksilik asit C=O bağ gerilmesi mevcuttur.  $1200\text{cm}^{-1}$ 'de C-C bağ gerilmesi görülmektedir. Sonikasyon sonunda elde edilen partiküllerde bulunan  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındaki zayıf pik ise hala yüzeyde OA'in bulunduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.45.** MN-DOP-MT5 FTIR spektrumu.

(a) MN-OA-OH; (b) MN-DOP-MT5.

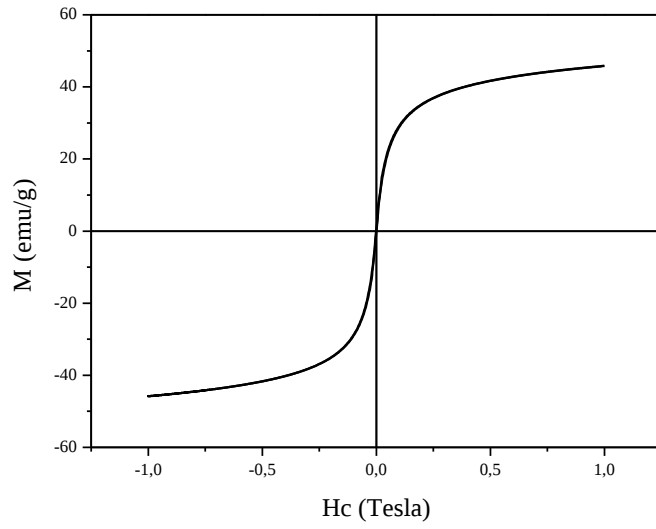
**Metot 8a** ile elde edilen MN-CAF-MT1 partiküllerine ait FTIR spektrumu Şekil 3.46'da bulunmaktadır. Spektruma göre  $3400\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan pik  $=\text{C-H}$  gerilmesine aittir.  $3200\text{cm}^{-1}$ 'deki pik ise alkan C-H gerilmesine aittir.  $1500\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik karbonil grubu ( $\text{C=O}$ ) gerilmesidir. MN-CAF-MT1 spektrumundaki  $1600\text{cm}^{-1}$  civarındaki yayvan pik aromatik C=C bağı gerilmesine aittir.



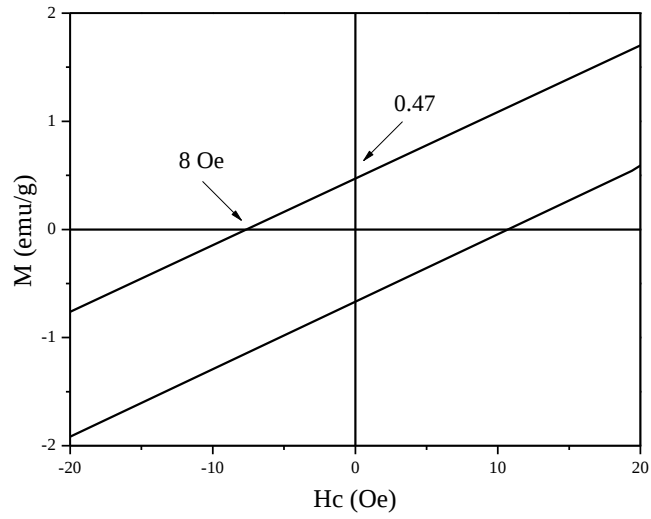
**Şekil 3.46.** MN-CAF-MT1 FTIR spektrumu.

(a) MN-OH; (b) Saf CAF; (c) MN-CAF-MT1.

PPMS ile oda sıcaklığında elde edilen manyetik histeresis eğrisi Şekil 3.47'de verilmiştir. Ms değeri  $45.80 \text{ emu/g}$ , Mr değeri  $0.47 \text{ emu/g}$  ve Hc değeri  $8 \text{ Oe}$ 'dir. Şekil 3.48'de belirtilen Hc değerine göre  $0 \text{ Oe}$  değerine yakın olduğu için bu eğri nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik taşıdığını ve nanoboyutta olduğunu belirtmektedir.

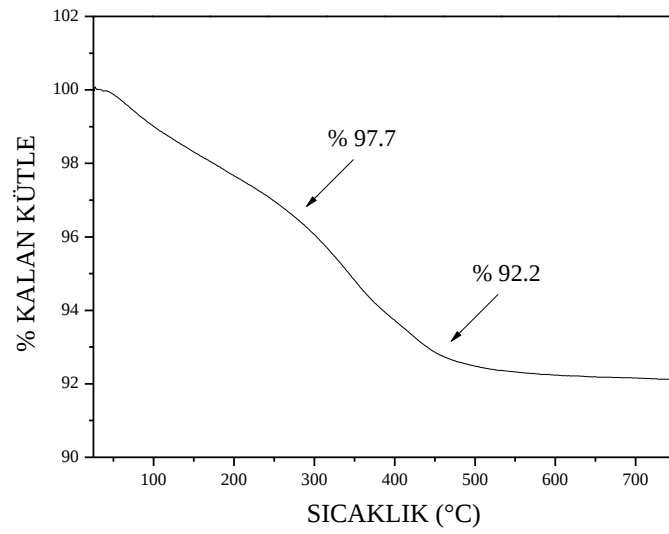


**Şekil 3.47.** MN-CAF-MT1 histeresis eğrisi.



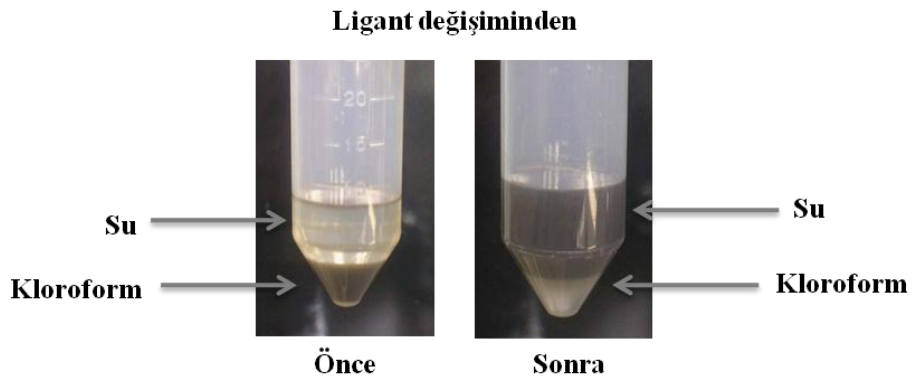
**Şekil 3.48.** MN-CAF-MT1 histeresis eğrisinde  $H_c$  ve  $M_r$  değerleri.

MN-CAF-MT1 partiküllerine ait TGA eğrisi Şekil 3.49’da verilmiştir. Analize göre %3’lük ilk kütle kaybı absorbe olan sudan kaynaklanabilir. 500°C’ye kadar olan %5’lik kütle kaybı yüzeye bağlı olan kafeik asitten kaynaklanabilir. Geri kalan %92’lik kütle ise demir okside aittir.

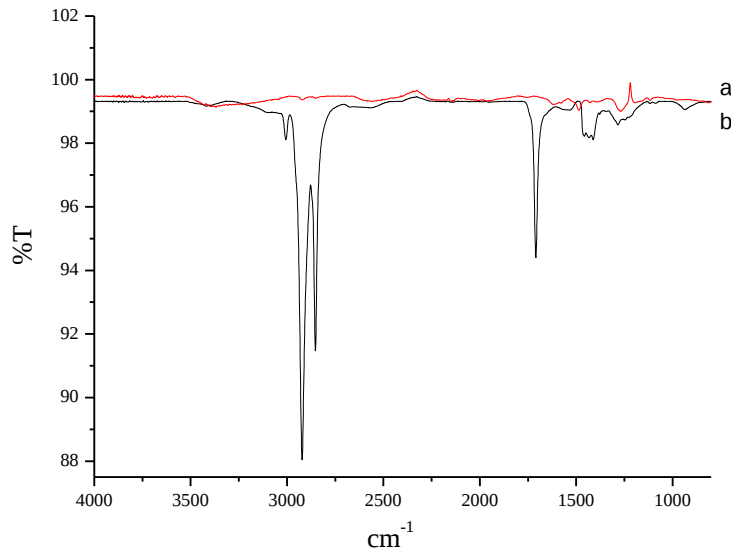


**Şekil 3.49.** MN-CAF-MT1 TGA eğrisi.

**Metot 8b** ile elde edilen MN-CAF-MT2 partikülleri uygulama sonunda Şekil 3.50’de görüldüğü gibi organik fazdan su fazına geçmiştir. MN-CAF-MT2 partiküllerine ait FTIR spektrumu Şekil 3.51’de bulunmaktadır.



**Şekil 3.50.** Ligant değişiminden önce ve sonra MNler.

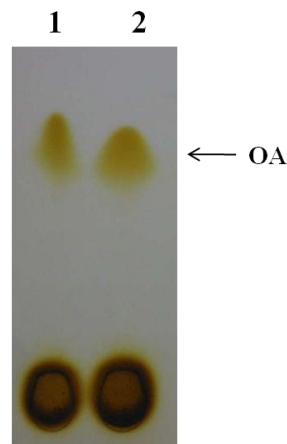


**Şekil 3.51.** MN-CAF-MT2 FTIR spektrumu.

(a) MN-CAF-MT2; (b) MN-OH.

Alkan C-H gerilmesi  $3000\text{cm}^{-1}$  civarındadır.  $1700\text{cm}^{-1}$  civarında karboksilik asit C=O bağ gerilmesi mevcuttur. Ligant değişimi sonunda  $1500\text{cm}^{-1}$  civarında aromatik C=C bağ gerilmesi bulunmaktadır.

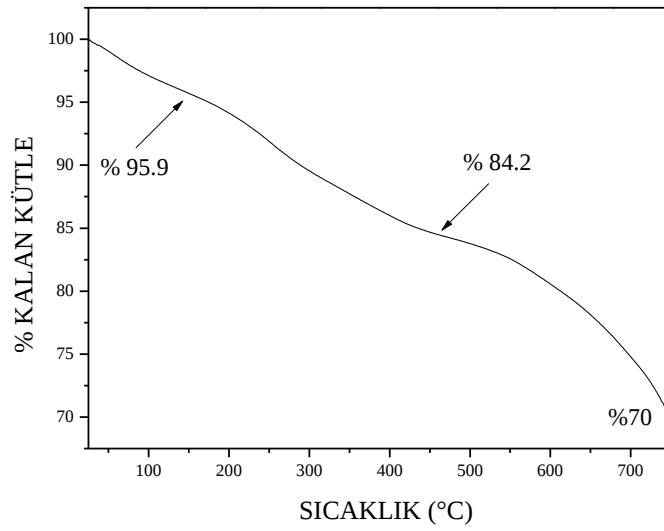
TLC ile ligant değişimi sonrası süpernatanta geçen OA varlığına bakılmıştır (Şekil 3.52). Yürütücü faz olarak hekzan:dietileter:%100'lük asetik asit (7:3:0.1) kullanılmıştır. Ligant değişiminden sonra OA süpernatantta belirlenmiştir.



**Şekil 3.52.** OA TLC ile belirlenmesi.

1: Saf OA; 2: Ligant değişiminden sonra organik fazda kalan OA.

MN-CAF-MT2 partiküllerine ait TGA eğrisi Şekil 3.53'te verilmiştir. Analize göre 150°C'ye kadar olan yaklaşık %5'lik ilk kütle kaybı absorbe olan sudan kaynaklanabilir. İkinci kütle kaybı 500°C'ye kadar gerçekleşmiştir ve %84 kütle geriye kalmıştır. Kütle kaybı yüzeye bağlı kafeik asitten kaynaklanabilir. Üçüncü kütle kaybı 600°C'ye kadar gerçekleşmiş ve %70 kütle geriye kalmıştır. Bu kütle kaybı ise yüzeye kimyasal olarak bağlı OA'ten kaynaklanabilir. %70 kalan kütle demir okside aittir.



**Şekil 3.53.** MN-CAF-MT2 TGA eğrisi.

## **BÖLÜM 4**

# **ALKOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İÇİN REKOMBİNANT SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

*Nasıl bu küçük şamdanın ışığı ta uzaklara yayılıyorsa, bu hain dünyada yapılan  
iyi bir iş de öyle parıldar.*

*Shakespeare*

## 4. ADH ENZİMLERİ İÇİN REKOMBİNANT SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

### 4.1. Materyal ve Metot

#### 4.1.1. Materyal

**Kimyasal ve Cihazlar-** Maya ekstraktı, pepton, sodyum klorür, agar, glukoz, laktoz, gliserol,  $\beta$ -merkaptoetanol, akrilamid, bis-akrilamid, hidroklorik asit, kalsiyum klorür dihidrat, tetrametiletilendiamin (TEMED), üre, sodyum fosfat mono bazik, Triton X-100, imidazol, Tris(hidroksimetil)-aminometan ve L-arabinoz Merck firmasından satın alındı. İzopropil- $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG), QIAGEN firmasından satın alındı. Ampisilin (Ampisina) Mustafa Nevzat firmasından satın alındı. Fenilmetansülfonilflorit (PMSF), sodyum dodesil sülfat, guanidinhidroklorür ve sodyum fosfat dibazik Sigma firmasından satın alındı. Kloramfenikol Fluka firmasından satın alındı. Magnezyum klorür heksahidrat, Atabay Kimya firmasından satın alındı. Banlin elektronik marka sonikatör, BioRad marka mikropate okuyucu, Shimadzu marka Uv-vis spektrofotometre, Heidolph marka çalkalayıcı, Beckman marka santrifüj, Sartorius Basic marka tartı ve Heidolph marka manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

**Plazmidler ve Bakteri Suşları-** *E.coli* BL21(DE3), *E.coli* Top10 (Invitrogen) ve diğer kullanılan bakteri suşları, pET14b (Invitrogen) vektörü Doç. Dr. Ayhan ÇELİK tarafından sağlanmıştır. pGro7 şaperon plazmidi Doç. Dr. Ali TÜRKAN tarafından sağlanmıştır. *Bacillus thuringiensis* kaynaklı ADH genini taşıyan pET14b plazmidi bölümümüz doktora öğrencisi Fatih AKTAŞ ve *E.coli* BL21(DE3) GOLD bakteri suşu Doç. Dr. Duran ÜSTEK tarafından sağlanmıştır.

#### 4.1.2. Metot

##### 4.1.2.1. *Staphylococcus saprophyticus* Kaynaklı ADH Enzimi

***Staphylococcus saprophyticus* Kaynaklı Alkol Dehidrogenaz Enziminin Klonlanması-** *Staphylococcus saprophyticus* bakterisinin varsayılan alkol dehidrogenaz geninin DNA baz dizileri incelenmiş ve geni çoğaltacak DNA baz dizileri belirlenmiştir. PCR ürününün vektöre ligasyonunu kolaylaştırmak amacı ile yapışkan uç açığa çıkacak şekilde primerlerle 5' ucuna *NdeI* endonükleaz, 3' ucuna *XhoI* endonükleazına ait tanıma dizileri (*NdeI* için, 5'-CATATG-3'; *XhoI* için, 5'-CTCGAG-3') ilave edilmiştir. Kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir.

İleri (*NdeI*) 5'-C GGT GTC **CAT ATG** AAA GCA GTT ACT TAT C

Geri (*XhoI*) 5'-CAC **CTC GAG** TTA TGG TTT TAG AAT TAC

0.5 ml'lik PCR tüpüne uygun hacimde 1µl genomik DNA (270ng/µl) konularak tüp ağzı kapalı şekilde buz üzerine alındı. 7.5µl destile su ve 2'şer µl ileri ve geri yöndeki primerlerden (40pmol) PCR tüpüne pipetlenerek ilave edildi. Reaksiyon karışımı 2X Taq master PCR mix (NEB) ile 25µl'ye tamamlandı. Tüp spin edildi ve tekrar buz üzerine koyuldu. Tüp PCR cihazına yerleştirildi ve uygun PCR programı çalıştırıldı. PCR karışımı 5 dakika 95°C'ye ısıtıldı ve daha sonra (95°C, 1 dakika; 57°C, 1 dakika; 68°C, 1.5 dakika) 29 döngülük çoğaltım sonrasında 68°C'de 10 dakika son uzatma işlemi gerçekleştirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra tüp vortekslendi, spin edildi ve buz üzerine bırakıldı. ssADH PCR ürünü %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü.

Elde edilen 1.2 kbp ssADH PCR ürününün agaroz jelden geri kazanımı QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi.

**Kompetent Hücre Hazırlanması ve Plazmid Transformasyonu-** TOP10 hücre stoğundan 5µl, 5ml'lik Luria Broth (LB) kültürüne (Atlas 2004) ekim yapıldı. 37°C'de 180rpm'de gecelik büyümeye bırakıldı. TOP10 gecelik kültüründen alınan 1ml, 100ml LB besiyerine ekildi. OD<sub>600</sub> 0.3 olana kadar 37°C'de 180rpm'de büyütüldü. OD<sub>600</sub> istenilen değere ulaştığında kültür, steril 50'lik falkona alınarak 9000rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Elde edilen hücre pelletleri, 4ml soğutulmuş MgCl<sub>2</sub> çözeltisi ile süspanse edildi. 5000rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet 2ml soğutulmuş CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile süspanse edildi ve buzda yarım saat bekletildi. İnkübasyon sonunda 4000rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pellet, 1ml 85mM CaCl<sub>2</sub> (%15 gliserol içeren) çözeltisi ile süspanse edildi. 50'er µl mikrotüplere alındı ve sıvı azotta donduruldu ve -70°C'de saklandı (Metot K).

3 µL pET14b plazmidi, -72°C stoktan alınan ve buz üstünde bekletilen kompetent *E.coli* TOP10 hücresine aktarıldı ve buz üstünde 30 dakika bekletildi. Bekleme sonrasında tüp, 42°C'deki su banyosunda 50 sn tutularak tekrar buz üstüne alındı. 200 µL SOC besiyeri (Atlas 2004) ilavesiyle mikrotüp, 230 rpm'de 37°C'de 1 saat süreyle çalkalanmaya bırakıldı. İnkübasyon sonunda 100 µg/ml ampisilin içeren LB/agar petrilere cam boncuklar yardımıyla ekim yapıldı ve 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı (Metot T).

**Plazmid İzolasyonu-** pET14b plazmidini taşıyan TOP10 petrisinden alınan tek koloni, 5 ml'lik LB besiyerinde 180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. Küçük kültürden elde edilen hücreler 10000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre pelletlerinden QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge (QIAGEN) ile üretici firmanın talimatlarına göre plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

**ssADH PCR Ürünü ve pET14b Plazmidinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi-** Restriksiyon kesim karışımı; ssADH PCR ürünü (35µl) ve pET 14b plazmid DNA (50 µL), BSA (30X, 2 µL, New England BioLab), NEB 2 tampon (6 µL, New England BioLab), NdeI (1 µL, New England BioLab) ve XhoI (1 µL, New England BioLab) kesim enziminden oluşmaktadır. Eppendorf tüpüne PCR ürünü ve pET 14b plazmid DNA ilave edildikten sonra BSA ve NEB tamponu pipetlenerek dikkatlice

ilave edildi ve karışım buz üzerinde alındı. Restriksiyon enzimleri de ilave edildikten sonra karıştırıldı ve spin edildi. 37°C’de 2 saat inkübe edildi.

**Bağlanma İşlemi ve Transformasyonu-** Bağlama işlemi üretici firmanın (New England BioLab) talimatlarına göre T4 DNA ligaz (Quick Ligation Kit) kullanılarak gerçekleştirildi. Restriksiyon kesimleri yapılmış ssADH PCR ürünü ve pET 14b plazmidi (molar oran 3:1) eppendorf tüpüne alındı. Üzerine Quick Ligation tamponu (10 µL) ve T4 DNA ligaz (1 µL) ilave edilerek karıştırıldı, spin edildi. Oda 25°C’de 15 dakika inkübe edildi.

5 µL bağlanma karışımı, Metot T’de belirtildiği gibi -72°C stoktan alınan ve buz üstünde bekletilen kompetent *E.coli* TOP10 hücrelerine aktarıldı ve 100 µg/ml ampicilin içeren LB/agar petrilere cam boncuklar yardımıyla ekim yapıldı ve 37°C’de gecelik inkübasyona bırakıldı. TOP10 petrisinden alınan tek koloni, 5 ml’lik LB besiyerinde 180 rpm’de 37°C’de gecelik inkübasyona bırakıldı. Küçük kültürden elde edilen hücreler 10000 rpm’de 4°C’de 5 dakika santrifüjlendi. Plazmid DNA saflaştırılması için QIAGEN (Qiaprep spin miniprep kit and microcentrifuge) kit kullanıldı. Vektöre ssADH geninin başarılı bir şekilde bağlandığını doğrulamak için *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak restriksiyon analizi gerçekleştirildi.

### ***ssADH Ekspresyonu***

***ssADH plazmid Transformasyonu-*** 3 µL pADHss plazmidi, Metot K’da belirtildiği gibi hazırlanan kompetent *E.coli* BL21(DE3) ekspresyon strainine Metot T’de belirtildiği gibi transforme edildi ve 100 µg/ml ampicilin içeren LB/agar petrilere cam boncuk yardımıyla ekim yapıldı ve 37°C’de gecelik inkübasyona bırakıldı.

***ssADH Enziminin Oto-İndüksiyon Besiyerinde Ekspresyonu ve Saflaştırılması-*** pADHss plazmidini içeren *E.coli* BL21(DE3) petrisinden alınan tek koloni, 100 µg/ml ampicilin içeren 5 ml’lik LB besiyerinde 180 rpm’de 37°C’de gecelik inkübasyona bırakıldı. pADHss plazmidini içeren gecelik BL21(DE3) kültüründen

alınan 500 µl, 100 µg/ml ampicilin ihtiva eden 50ml oto indüksiyon besiyerine (Studier 2005) eklendi. Gece boyu 30°C’de 180 rpm’de inkübe edildi.

Oto-indüksiyonu ile elde edilen pellet 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl ve 5mM imidazol (pH 7.8) tamponu ile süspanse edildi. 80µl Lizozim ve 4µl PMSF çözeltisinden eklendikten sonra yarım saat buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 6 kez uygulandı ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi (Metot S). Elde edilen hücre özütü Ni-affinite kolona yüklendi ve 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl ve 25mM imidazol (pH 7.8) ile yıkandı. Daha sonra 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 100mM, 200mM ve 400mM imidazol (pH 7.8) geçirilerek elüsyonlar toplandı (Metot N).

***ssADH Enziminin IPTG İndüksiyonu ile Ekspresyonu-*** pADHss plazmidini içeren gecelik BL21(DE3) kültüründen alınan 500µl, 50 ml LB besiyeri içeren (100 µg/ml ampicilin ihtiva eden) flaska aktarıldı. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana dek 37°C 180 rpm’de hücreler büyütüldü. İstenilen OD<sub>600</sub> değerine ulaştığında son konsantrasyonda 0.1mM IPTG ilave edildi. 4 saat 22°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda flasklardaki bakteri kültürleri, 50 ml’lik falkon tüplere aktararak +4°C’de santrifüj edildi. IPTG indüksiyonu ile elde edilen pellet Metot S’deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH Enziminin Terrific Broth Ekspresyonu-*** pADHss plazmidini içeren gecelik BL21(DE3) kültüründen alınan 100µl, 100 µg/ml ampicilin içeren 10ml TB besiyerine eklendi (Hirakawa, Kamiya et al. 2004). Hücreler 30°C’de gecelik büyümeye bırakıldı (16 saat). TB ile elde edilen pellet Metot S’deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH M9 Tuzları Minimal Medium Ekspresyonu-*** pADHss plazmidini içeren gecelik BL21(DE3) kültüründen alınan 100µl, 10 ml M9-MM besiyeri içeren (100 µg/ml ampicilin ihtiva eden) falkona aktarıldı. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana dek 37°C’de 180 rpm’de hücreler büyütüldü ve 0.5 mM IPTG ilave edildi. 6 saat 25°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 9000rpm’de 10 dakika +4°C’de santrifüjlendi. M9-MM besiyeri ile elde edilen pellet, Metot S’deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

### ***ssADH Plazmidinin Farklı Hücrelere Transformasyonu ve Ekspresyonu***

***Rosetta(DE3) ve TOP10-*** 4µl ssADH geninini taşıyan pET14b plazmidi Metot T'deki gibi Metot K'da belirtildiği gibi hazırlanan kompetent Rosetta(DE3) ve TOP10 hücrelerine transfer edildi. 100µg/ml ampisilin içeren LB/agar petrilere ekim yapıldı ve 37°C'de gecelik büyümeye bırakıldı. pADHss plazmidini içeren *E.coli* Rosetta(DE3) ve TOP10 petrisinden alınan tek koloni, 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml'lik LB besiyerinde 180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. pADHss plazmidini içeren gecelik *E.coli* Rosetta(DE3) ve TOP10 kültürlerinden alınan 1ml, 100 µg/ml ampisilin ihtiva eden 100ml oto-indüksiyon besiyerine aktarıldı. Gece boyu 30°C'de 180 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda flasklardaki bakteri kültürleri, 50 ml'lik falkon tüplere aktararak 4°C'de santrifüj edildi. Rosetta(DE3) ve TOP10 hücre pelletleri Metot S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***Rosetta (DE3) pLysS-*** 4µl pADHss plazmidi, Metot K'da belirtildiği gibi kompetent *E.coli* Rosetta(DE3) pLysS ekspresyon strainine Metot T'deki gibi transforme edildi. 100µg/ml ampisilin ve 20µg/ml kloramfenikol içeren LB/agar petrilere cam boncuklar yardımıyla ekilerek, 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. pADHss plazmidini içeren *E.coli* Rosetta(DE3) pLysS petrisinden alınan tek koloni, 100 µg/ml ampisilin ve 20 µg/ml kloramfenikol içeren 5 ml'lik LB besiyerinde 180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. pADHss plazmidini içeren gecelik *E.coli* Rosetta(DE3) pLysS kültüründen alınan 1 ml, 100 µg/ml ampisilin ve 20µg/ml kloramfenikol ihtiva eden 100 ml LB besiyerine eklendi. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana dek 37°C'de 180 rpm'de hücreler büyütüldü ve 0.1mM IPTG ilave edildi. 2.5 saat 25°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda flasklardaki bakteri kültürleri, 50 ml'lik falkon tüplere aktararak +4°C'de santrifüj edildi. Ekspresyon sonunda elde edilen pellet Metot S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH Ekspresyonuna Tuz Etkisi-*** pADHss plazmidini içeren *E.coli* BL21(DE3) petrisinden alınan tek koloni, 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml'lik LB besiyerinde

180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. pADHss plazmidini içeren gecelik *E.coli* BL21(DE3) kültüründen alınan 500 µl, 100 µg/ml ampicilin ihtiva eden 50 ml farklı tuz konsantrasyonları içeren LB besiyerlerine ekildi. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana dek 37°C 180 rpm'de hücreler büyütüldü ve son konsantrasyonda 0.1mM IPTG ilave edildi. 4 saat 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda flasklardaki bakteri kültürleri, 50 ml'lik falkon tüplere aktararak +4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen pelletler Metot 1S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH Ekspresyonuna Isı Şokunun Etkisi-*** pADHss plazmidini içeren *E.coli* BL21(DE3) petrisinden alınan tek koloni ile büyütülen gecelik *E.coli* BL21(DE3) kültüründen alınan 500µl, 100 µg/ml ampicilin ihtiva eden 50 ml LB besiyerine ekildi. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana dek 37°C 180 rpm'de hücreler büyütüldü. İndüksiyondan yarım saat önce 42°C'de 20 dakika 140rpm'de inkübe edildi. Inkübasyon sonunda son konsantrasyonda 0.1mM IPTG ilave edildikten sonra 4 saat 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda flasklardaki bakteri kültürleri, 50 ml'lik falkon tüplere aktararak 4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen pellet Metot S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH Ekspresyonuna Benzil Alkolün Etkisi-*** pADHss plazmidini içeren *E.coli* BL21(DE3) petrisinden alınan tek koloni ile büyütülen gecelik *E.coli* BL21(DE3) kültüründen alınan 300µl, 100 µg/ml ampicilin ihtiva eden 20ml LB besiyerine ekildi. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana dek 23°C'de hücreler büyütüldü. İndüklemenden önce farklı konsantrasyonlarda BA ilave edildi ve 20 dakika 23°C'de inkübe edildi. 20 dakika sonunda son konsantrasyonu 0.1mM IPTG ilave edildi. 23°C'de 20saat inkübasyona bırakıldı. 20 saat sonunda da OD<sub>600</sub> değeri bakıldıktan sonra hücreler santrifüjlendi. Elde edilen pelletler, Metot S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH Ekspresyonuna Betain Monohidrat Etkisi-*** pADHss plazmidini taşıyan *E.coli* BL21(DE3) GOLD petrisinden alınan tek koloni ile büyütülen gecelik *E.coli* BL21(DE3) GOLD kültüründen alınan 400µl, 100 µg/ml ampicilin ihtiva eden 20ml 0.5M NaCl içeren LB besiyerine ekildi. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana kadar 37°C'de

180rpm'de büyümeye bırakıldı. İndüklemeyen yarım saat önce son konsantrasyonu 5mM olacak şekilde betain monohidrat eklendi ve yarım saat sonra son konsantrasyonu 0.1mM olacak şekilde IPTG eklendi. 30°C'de 180rpm'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültür, 9000rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen pellet Metot S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

### ***ssADH ve Şaperon Koekspresyonu***

***BL21(DE3) GOLD Kompetent Hücre Hazırlanması ve pGro7 Plazmid Transformasyonu-*** BL21(DE3) GOLD hücre stoğundan 5µl, 100µg/ml ampicilin içeren 5ml'lik LB kültürüne ekim yapıldı. 37°C'de 180rpm'de gecelik büyümeye bırakıldı. BL21(DE3) GOLD gecelik kültüründen alınan 1ml, 100ml LB besiyerine ekildi ve Metot K'da belirtildiği gibi kompetent hücre hazırlandı. Kompetent hücreler -70°C'de saklandı.

3µl GroES ve GroEL şaperon genlerini içeren pGro7 plazmidi, -70°C'deki stoktan alınan ve buz üstünde bekletilen kompetent *E.coli* BL21(DE3) GOLD hücrelerine Metot T'deki gibi transfer edildi. 20µg/ml kloramfenikol içeren LB/agar petrilere ekim yapıldı. 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı.

***pGro7 Plazmidi içeren BL21(DE3) GOLD Kompetent Hücre Hazırlanması ve pADHss Transformasyonu-*** GroES ve GroEL genlerini taşıyan pGro7 plazmidini taşıyan *E.coli* BL21(DE3) GOLD petrisinden alınan tek koloni, 20 µg/ml kloramfenikol içeren 5 ml'lik LB besiyerinde 180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. pGro7 plazmidini içeren BL21(DE3) GOLD gecelik kültüründen 1ml, 20µg/ml kloramfenikol içeren 100ml LB besiyerine ekilerek Metot K'da belirtildiği gibi kompetent hücre hazırlandı.

3µl pADHss plazmidi, pGro7 plazmidini taşıyan kompetent *E.coli* BL21(DE3) GOLD hücrelerine Metot T'deki gibi transfer edildi. 100µg/ml ampicilin ve 20µg/ml kloramfenikol içeren LB/agar petrilere ekim yapıldı. 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı.

***ADHss ve Şaperonların Koekspresyonu-*** pADHss ve pGro7 plazmidlerini taşıyan BL21(DE3) GOLD petrisinden alınan tek koloni, 100µg/ml ampisilin ve 20µg/ml kloramfenikol içeren 5ml'lik LB besiyerine ekildi ve 37°C'de 180rpm'de gecelik büyümeye bırakıldı.

pADHss ve pGro7 plazmidlerini taşıyan BL21(DE3) GOLD gecelik kültüründen alınan 1ml, 100µg/ml ampisilin, 20µg/ml kloramfenikol ve 0.5mg/ml L-arabinoz içeren 100ml LB besiyerine ekildi. OD<sub>600</sub> değeri 0.4 olana kadar 37°C'de 180rpm'de büyümeye bırakıldı. OD<sub>600</sub> değeri istenilen değere ulaştığında son konsantrasyonu 0.1mM olacak şekilde IPTG ilave edildi ve 30°C'de 4 saat 180rpm'de inkübe edildi. 2 ve 4 saat sonunda kültürden alınan 50ml, 9000rpm'de +4°C'de 10dakika santrifüjlendi. 2 ve 4. saat sonunda elde edilen pelletler, Metot S'deki gibi liziz edildi ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi.

***ssADH Enziminin İnküzyon Cisimciği Olarak Saflaştırılması-*** Oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen pellete (1.46g) gram başına 4ml 20mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5NaCl, 5mM imidazol, 4µl PMSF ve 80µl lizozim çözeltisi ilave edildi. Buz üzerinde yarım saat inkübe edildi ve tekrar buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 6 kez uygulandı. 9000rpm'de yarım saat çöktürüldü. Sonikasyon sonrası elde edilen pellet 20mM Tris-HCl, 5mM imidazol, 0.5M NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), %0,5 Triton X-100 (gram pellet başına 10ml) ile süspanse edildi ve bir kez 15 saniye sonike edildi. Buz üstünde 20 dakika inkübe edildikten sonra +4°C'de 30 dakika santrifüjlendi. Bu işlem iki kez uygulandı. Santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet, 20mM Tris-HCl, 8M üre, 0.5M NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0) (gram pellet başına 10ml) ile süspanse edildi ve bir kez 15 saniye sonike edildi. Buz üstünde 20 dakika inkübe edildikten sonra +4°C'de 30 dakika santrifüjlendi. Ni<sup>+2</sup> afinite kolonu 20mM Tris-HCl, 8M üre, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0) ile dengelendi. 8M üre ile çözünür hale gelen protein kolona yüklendi. Kolon hacminin 5 katı hacimde (5ml) 20mM Tris-HCl, 20mM imidazol, 8M üre, 0.5M NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0) geçirilerek zayıf bağlanan proteinler uzaklaştırıldı. Doğrusal olarak 8-0M üre gradienti ile kolondan üre uzaklaştırıldı. En son kolon hacminin 5 katı hacminde (5ml) 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0) geçirildi. 20mM Tris-HCl, 400mM imidazol, 0.5M NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) ile kolondan protein alındı. 400mM imidazol

ile kolondan çıkan elüsyon konsantre edildi ve PD10 kolondan geçirilerek tamponu 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) ile değiştirildi.

### ***ssADH Enziminin in vitro Tekrar Katlanma Çalışmaları***

**Metot 1-** Oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen pellete (1.3) gram başına 4ml 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol (pH 7.8) tamponu, 4µl PMSF ve 80µl lizozim çözeltisi ilave edildi. Buz üzerinde yarım saat inkübe edildi ve tekrar buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 5 kez uygulandı. 9000rpm’de yarım saat santrifüjlendi. Elde edilen pellet 2M üre, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, %2 Triton X-100 (pH 8) (gram başına 10ml) ile süspanse edildi ve bir kez 15 saniye sonike edildi. 20 dakika buzda inkübe edildikten sonra yarım saat santrifüjlendi. Elde edilen pellet 6M guanidin HCl, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 1 mM  $\beta$ -merkaptotanol (pH 8.0) ile süspanse edildi. +4°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yarım saat santrifüjlendi. Ni<sup>+2</sup> afinite kolonu bağlanma tamponu olan 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 1mM  $\beta$ -merkaptotanol (pH 8.0) tamponu ile dengelendi. Guanidin HCl ile soluble hale gelen protein kolona yüklendi. Doğrusal olarak 6-0M üre (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 1 mM  $\beta$ -merkaptotanol (pH 8.0)) gradienti uygulandı. Üre uzaklaştırıldıktan sonra 10 kolon hacmi (10ml) tekrar katlanma tamponu (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 1mM  $\beta$ -merkaptotanol (pH 8.0)) geçirildi. 5-400mM imidazol, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1 mM  $\beta$ -merkaptotanol (pH 8.0) ile kolondan fraksiyonlar alındı. 100 ve 400mM imidazol ile kolondan çıkan elüsyonlar konsantre edildi ve PD10 kolondan geçirilerek tamponu 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) ile değiştirildi.

**Metot 2-** Oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen pellete (1.18g) gram başına 4ml 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol (pH 7.8), 4µl PMSF ve 80µl lizozim çözeltisinden ilave edildi. Buz üzerinde yarım saat inkübe edildi ve tekrar buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 5 kez uygulandı. 9000rpm’de yarım saat santrifüjlendi. Elde edilen pellet 2M üre, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, %2 Triton X-100 (pH 8) ile süspanse edildi ve bir kez 15 saniye sonike

edildi. 20 dakika buzda inkübe edildikten sonra yarım saat santrifüjlendi. Yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Elde edilen pellet 6M guanidin HCl, 20mM Tris-HCl, 20mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 8.0) (bağlanma tamponu) ile süspanse edildi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yarım saat santrifüjlendi.  $\text{Ni}^{+2}$  afinite kolonu bağlanma tamponu ile dengelendi. Süpernatant 1:1 oranında seyreltilip kolona yüklendi. 5 kolon hacmi 20mM Tris-HCl, 10mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 8.0) ile yıkandı. 5 kolon hacmi 20mM Tris-HCl, 10mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 20mM imidazol (pH 8.0) ile yıkandı. 10 kolon hacmi %0.1 Triton X-100, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 10mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 7.5) ile yıkandı. 10 kolon hacmi 5mM  $\beta$ -siklodekstrin, 20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 10mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 7.5) ile yıkandı. En son 10 kolon hacmi 20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 10mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 7.5) ile yıkandıktan sonra elüsyon 400mM imidazol 20mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 10mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 7.5) tamponu ile yapıldı. Kolondan çıkan elüsyon konsantre edildi ve PD10 kolondan geçirilerek tamponu 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) ile değiştirildi.

**Metot 3-** Oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen pellete (1.18g) gram başına 4ml 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol (pH 7.8), 4 $\mu$ l PMSF ve 80 $\mu$ l lizozim çözeltisinden ilave edildi. Buz üzerinde yarım saat inkübe edildi ve tekrar buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 5 kez uygulandı. 9000rpm'de yarım saat santrifüjlendi. Elde edilen pellet 2M üre, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, %2 Triton X-100 (pH 8) ile süspanse edildi ve bir kez 15 saniye sonike edildi. 20 dakika buzda inkübe edildikten sonra yarım saat santrifüjlendi. Yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Elde edilen pellet 6M guanidin HCl, 20mM Tris-HCl, 20mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 8.0) (bağlanma tamponu) ile süspanse edildi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Son konsantrasyonu 10 $\mu$ M olacak şekilde  $\text{ZnCl}_2$  eklendi (Rudolph, Gerschitz et al. 1978) ve yarım saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yarım saat santrifüjlendi.  $\text{Ni}^{+2}$  afinite kolonu bağlanma tamponu ile dengelendi. Guanidin HCl ile soluble hale gelen protein kolona yüklendi. Doğrusal olarak 6-0M üre (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 1mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 8.0)) gradienti uygulandı. Üre uzaklaştırıldıktan sonra 10 kolon hacmi (10ml) katlanma tamponu (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 5mM imidazol, 1mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 8.0)) geçirildi. 5-400mM imidazol, 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1mM  $\beta$ -merkaptoetanol (pH 8.0) ile kolondan fraksiyonlar alındı.

400mM imidazol ile kolondan çıkan elüsyonlar konsantre edildi. Son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde  $ZnCl_2$  eklendi. Buz üzerinde yarım saat inkübe edilen enzim PD10 kolondan geçirilerek tamponu 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) ile değiştirildi.

**Protein Miktarının Belirlenmesi-** Protein konsantrasyonu Bradford metodu ile belirlenmiştir (Bradford 1976). 0.05-0.5 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda BSA standartları hazırlandı. Hazırlanan standartlardan ve ssADH enziminden 10µl ve 200 µl Bradford reaktifi [Bradford reaktifi + destile su 1:4 (v/v)] ilavesiyle 96 kuyucuklu Mikroplate okuyucuda, standartlara ve örneklerle ait absorbans değerleri 595 nm’de okundu.

**MALDI-TOF ile Kütlenin Belirlenmesi-** *in vitro* tekrar katlanma işlemlerinden Metot 3 ile elde edilen ssADH enzimine (50µl, 0.125mg) 500µl %20’lik TCA eklendi. Yarım saat buzda bekletildi. 12000rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 500µl soğutulmuş aseton ile yıkandı. 5 dakika buzda bekletildi. Tekrar 10 dakika santrifüjlendi. Pellet 20dakika oda sıcaklığında kurutuldu. kurutulan pellet 50µl formik asit/su/izopropanol (1:3:2) ile süspanse edildi. 4mg sinapinik asidin 200µl izopropanol/suda (1:1) doymuş çözeltisi hazırlandı. farklı oranlarda protein ve matriks karışımları hazırlandı. Numuneler hedefe damlatıldı ve kurutulmaya bırakıldı.

**ssADH Aktivitesinin Belirlenmesi-** Saflaştırılan ve *in vitro* tekrar katlandığı düşünülen ssADH enziminin keton ve etanole karşı aktivitesine bakıldı. Doğru katlanmanın gerçekleştiğini anlamak için başka bir yol olan substrat gibi davranan elektron alıcısı  $K_3[Fe(CN)_6]$  kullanıldı (Roberts, Celik et al. 2003).

#### 4.1.2.2. *Bacillus thuringiensis* Kaynaklı ADH Enzimi

**pADHbt Plazmidinin Transformasyonu-** 3 µL pADHbt plazmidi, Metot K’da belirtildiği gibi hazırlanan kompetent *E.coli* BL21(DE3) ekspresyon suşuna Metot

T'de belirtildiği gibi aktarıldı ve 100 µg/ml ampicilin içeren LB/agar petrilere cam boncuk yardımıyla ekim yapıldı ve 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı.

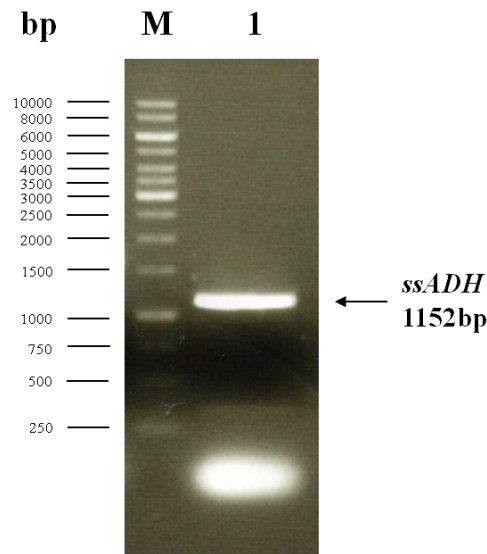
***btADH Enziminin Oto-İndüksiyon Besiyerinde Ekspresyonu ve Saflaştırılması-***  
pADHbt plazmidini içeren *E.coli* BL21(DE3) petrisinden alınan tek koloni, 100 µg/ml ampicilin içeren 5 ml'lik LB besiyerinde 180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. pADHbt plazmidini içeren gecelik BL21(DE3) kültüründen alınan 500 µl, 100 µg/ml ampicilin ihtiva eden 50ml oto indüksiyon besiyerine eklendi. Gece boyu 30°C'de 180 rpm'de inkübe edildi.

Oto-indüksiyonu ile elde edilen pellet 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl ve 5mM imidazol (pH 7.8) tamponu ile süspanse edildi. 80µl Lizozim ve 4µl PMSF çözeltisinden eklendikten sonra yarım saat buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 6 kez uygulandı ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi. Elde edilen hücre özütü Ni-affinite kolona yüklendi ve 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl ve 25mM imidazol (pH 7.8) ile yıkandı. Daha sonra 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 100mM, 200mM ve 400mM imidazol (pH 7.8) geçirilerek elüsyonlar toplandı. Kolondan çıkan elüsyonlar konsantre edildi ve PD10 kolondan geçirilerek tamponu 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) ile değiştirildi.

## 4.2. Sonuç

### 4.2.1. *Staphylococcus saprophyticus* Kaynaklı ADH Enzimi

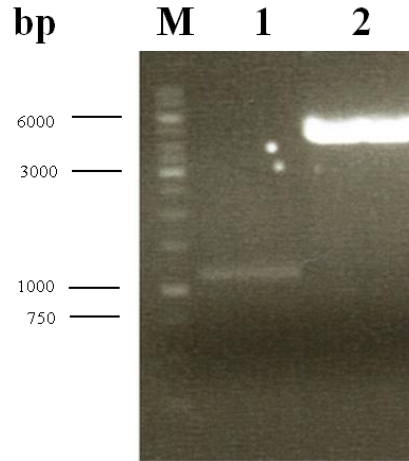
ssADH genine ait PCR ürününün agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir. ssADH genine ait PCR ürünü beklenildiği gibi 1.2 kbp’lik bir bant vermiştir.



**Şekil 4.1.** ssADH geni PCR reaksiyon ürününe ait agaroz jel görüntüsü.

**M:** 1 kbp’lik DNA marker; **1:** ssADH genine ait PCR ürünü.

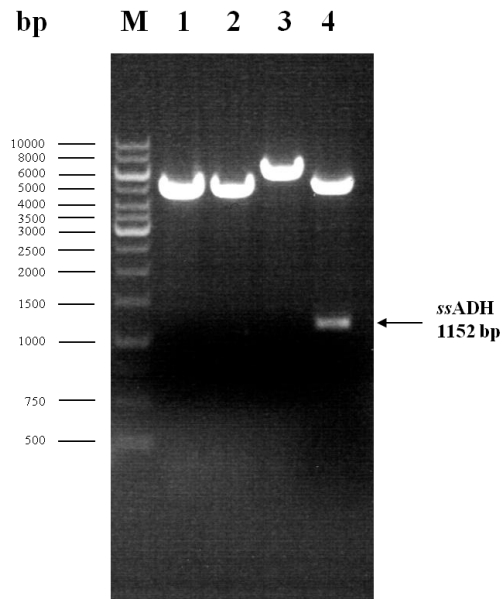
ssADH geni PCR ile çoğaltıldıktan sonra klonlama vektörü olarak kullanılacak olan pET 14b plazmidinin hazırlanması gerçekleştirilmiştir. ssADH genine ait PCR ürünü ve klonlama vektörü olarak kullanılan pET 14b plazmidinin *NdeI/XhoI* restriksiyon enzimleriyle kesimleri gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonunda elde edilen ürünlere ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir. Kesim işlemi sonunda ssADH genine ait PCR ürünü ve pET 14b plazmid DNA’sı tek bant vermiştir.



**Şekil 4.2.** ssADH PCR ürünü ve pET 14b plazmidinin restriksiyon enzimleriyle kesimi.

**M:** 1 kbp'lik DNA marker; **1:** ssADH geni PCR ürünü; **2:** pET 14b plazmidi.

*NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak pADHss ve pET14b plazmidi restriksiyon analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.3).

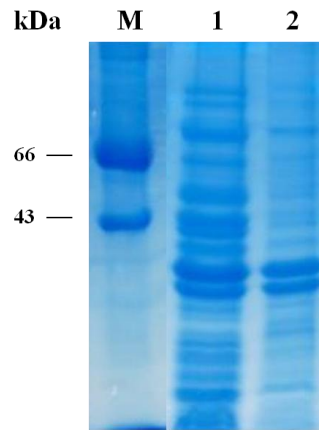


**Şekil 4.3.** Restriksiyon analizi.

**M:** 1 kbp'lik DNA marker; **1:** *NdeI* kesimi sonrası pET14b plazmidi; **2:** *NdeI/XhoI* kesimi sonrası pET 14b plazmidi; **3:** *NdeI* kesimi sonrası pADHss plazmidi; **4:** *NdeI/XhoI* kesimi sonrası pADHss plazmidi.

### ***ssADH Ekspresyonu***

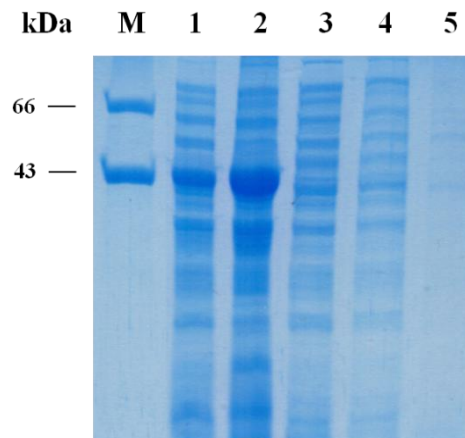
***ssADH Enziminin Oto-indüksiyon Besiyerinde Ekspresyonu-*** Oto-indüksiyon besiyerinden sonikasyon sonrası elde edilen ssADH geni içeren plazmidi taşıyan BL21(DE3) hücre özütü SDS-PAGE yöntemi ile görüntülendi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Oto-indüksiyon besiyerinde ssADH ekspresyonu.

**M:** Marker; **1:** Ekspresyon pelleti; **2:** Hücre özütü.

Elde edilen hücre özütü Ni-afinite kolona yüklendikten sonra elüsyonlardan alınan örnekler SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 4.5).

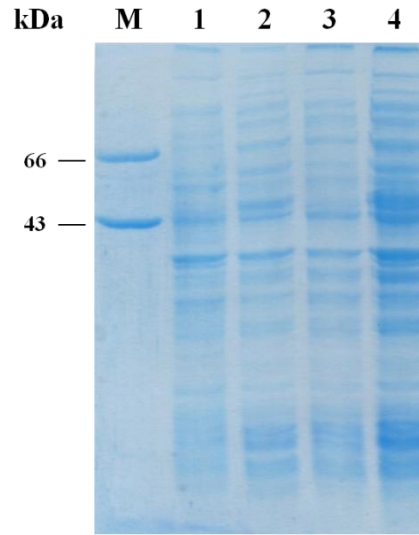


**Şekil 4.5.** ssADH saflaştırılması.

**M:** Marker; **1:** Ekspresyon pelleti; **2:** Sonikasyon sonrası pellet; **3:** Sonikasyon sonrası hücre özütü; **4:** Hücre özütü kolon çıkışı; **5:** Hücre özütü 400mM imidazol ile kolon çıkışı.

SDS-PAGE görüntüsü ile kolondan herhangi bir protein alınmadığı anlaşılmıştır. ssADH enziminin oto-indüksiyon besiyerinde uzun süre 30°C’de inkübe edildiği için (18 saat) çok fazla eksprese olduğu ve inklüzyon cisimciği olarak hücre tarafından inaktif forma dönüştüğü düşünülmüştür. Bu yüzden IPTG indüklemesiyle sıcaklığı ve süreyi azaltarak ssADH enzimi eksprese edilmiştir.

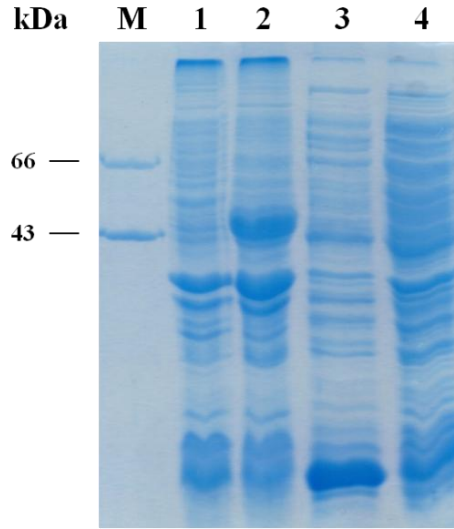
***ssADH Enziminin IPTG İndüksiyonu ile Ekspresyonu-*** Kontrol grubu olarak pET14b vektörünü ve IPTG indüksiyon esnasında pADHss plazmidini içeren BL21(DE3) bakteri kültürlerinden alınan örneklerde SDS-PAGE ile ssADH enziminin ekspresyonuna bakıldı (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** IPTG indüksiyon yöntemiyle ssADH enziminin ekspresyonu.

**M:** Marker; **1:** IPTG sonrası 3 saat kontrol; **2:** IPTG sonrası 3 saat ssADH; **3:** IPTG sonrası 4 saat kontrol; **4:** IPTG sonrası 4 saat ssADH.

IPTG indüklemesiyle elde edilen pelletler, liziz edildikten sonra hem kontrol ve pADHss plazmidini taşıyan BL21(DE3) hücre pelletlerinden hem de hücre özütlerinden alınan örnekler SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 4.7).



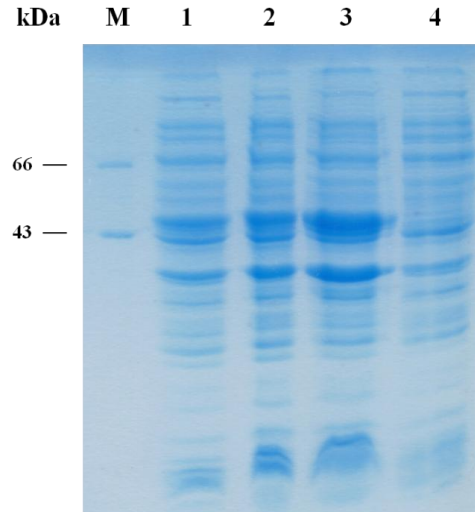
**Şekil 4.7.** Liziz işleminden sonra ssADH ve kontrolün SDS-PAGE görüntüsü.

**M:** Marker; **1:** Sonikasyon sonrası kontrol pellet; **2:** Sonikasyon sonrası ssADH pellet; **3:** Kontrol hücre özütü; **4:** ssADH hücre özütü.

IPTG indüklemesiyle elde edilen sonuç, oto-indüksiyon besiyeri ile elde edilen sonuçla aynıdır. ssADH enziminin inklüzyon cisimciği olarak eksprese olduğu anlaşılmıştır. Ekspresyon için farklı besiyerleri denenmiştir.

**ssADH Enziminin Farklı Şartlarda Ekspresyonu-** ssADH enzimi farklı sıcaklık, besiyeri ve suşlarda ekspresyonu sonucu inklüzyon cisimciği olarak elde edilmiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan LB besiyerlerinde ssADH enzimi bu şartlar altında da inklüzyon cisimciği olarak eksprese olmuştur.

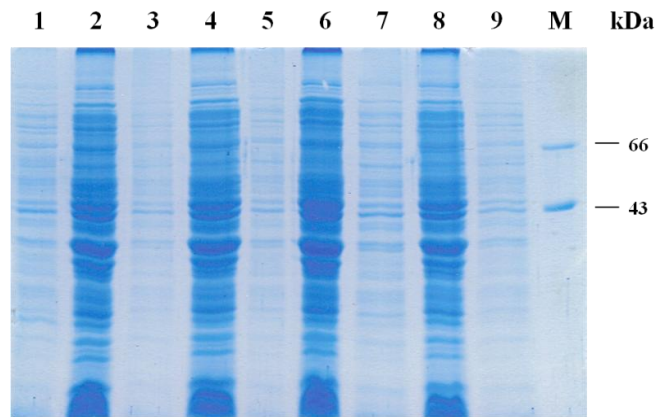
**ssADH Ekspresyonuna Isı Şokunun Etkisi-** Isı şoku uygulanan pADHss plazmidini içeren BL21(DE3) hücre kültüründen alınan örnekler SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 4.8). ssADH proteinin sonikasyon sonrasında pellette kaldığı *in vivo* doğru katlanma gerçekleşmemiştir.



**Şekil 4.8.** Isı şokunun ssADH enzim ekspresyonuna etkisi.

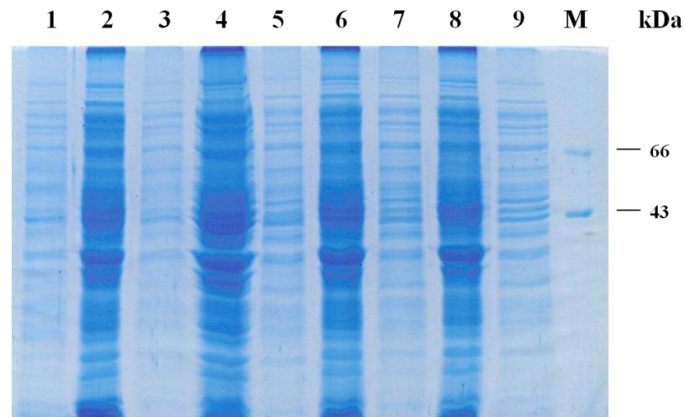
**M:** Marker; **1:** IPTG öncesi; **2:** IPTG sonrası 4 saat; **3:** Sonikasyon sonrası pellet; **4:** Hücre özütü.

**ssADH Ekspresyonuna Benzil Alkolün Etkisi-** Sonikasyon sonrası kontrol grubu hücre özütü ve farklı konsantrasyonlarda benzil alkol ilave edilmiş pADHss plazmidini içeren BL21(DE3) pellet ve hücre özütü SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 4.9 ve 4.10).



**Şekil 4.9.** ssADH Ekspresyonuna Benzil Alkolün Etkisi (0-4mM).

**M:** Marker; **1:** Kontrol hücre özütü; **2:** ssADH pellet 0 mM BA; **3:** ssADH hücre özütü 0 mM BA; **4:** ssADH pellet 2 mM BA; **5:** ssADH hücre özütü 2 mM BA; **6:** ssADH pellet 3 mM BA; **7:** ssADH hücre özütü 3 mM BA; **8:** ssADH pellet 4 mM BA; **9:** ssADH hücre özütü 4 mM BA.

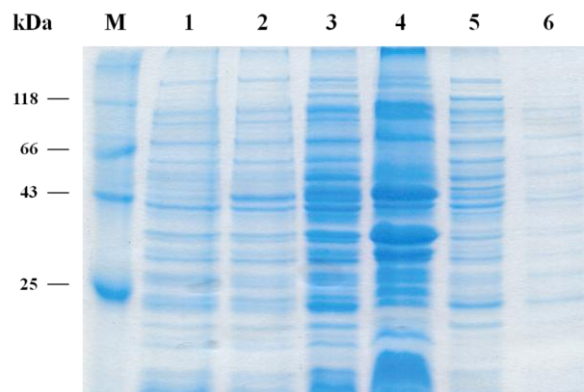


**Şekil 4.10.** ssADH Ekspresyonuna Benzil Alkolün Etkisi (5-10mM).

**M:** Marker; **1:** Kontrol hücre özütü; **2:** ssADH pellet 5 mM BA; **3:** ssADH hücre özütü 5 mM BA; **4:** ssADH pellet 6 mM BA; **5:** ssADH hücre özütü 6 mM BA; **6:** ssADH pellet 8 mM BA; **7:** ssADH hücre özütü 8 mM BA; **8:** ssADH pellet 10 mM BA; **9:** ssADH hücre özütü 10 mM BA.

6,8 ve 10mM benzil alkolün ilave edildiği besiyerlerinde ssADH özütünde kontrol hücre özütünde olmayan bant gözlenmesi nedeniyle bu hücre özütleri birleştirilip konsantre edildi ve Ni-afinite kolona yüklendi. Ancak elüsyonlardan alınan örnekler SDS-PAGE ile görüntülendiğinde kolondan herhangi bir proteinin alınmadığı anlaşıldı.

**ssADH Ekspresyonuna Betain Monohidrat Etkisi-** Betain monohidrat ilave edilmiş kontrol grubu hücre özütü ve pADHss vektörünü içeren BL21(DE3) pellet ve hücre özütü SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 4.11).

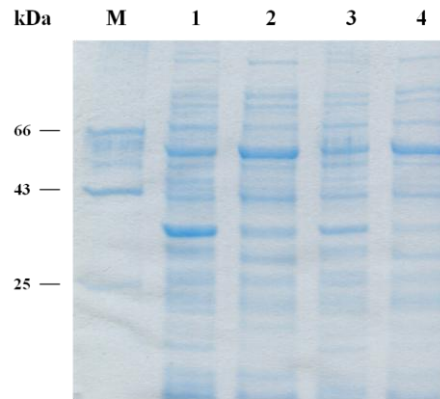


**Şekil 4.11.** ssADH ekspresyonuna betain monohidratın etkisi.

**M:** Marker; **1:** IPTG öncesi kontrol; **2:** IPTG öncesi ADHss; **3:** IPTG sonrası 2 saat ADHss; **4:** Sonikasyon sonrası ADHss pellet; **5:** ADHss hücre özütü; **6:** Hücre özütü kontrol.

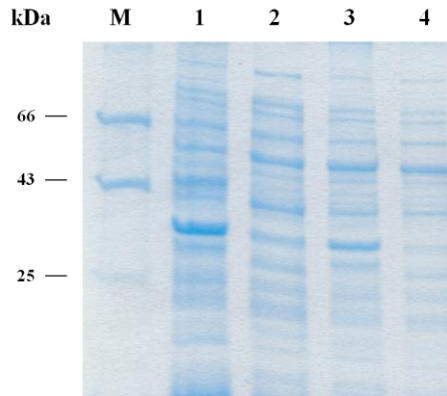
ssADH proteinin *in vivo* doğru katlanması betain monohidrat ile sağlanamamıştır. SDS-PAGE görüntüsüne göre ssADH inklüzyon cisimciği olarak eksprese olmuştur.

**Şaperon ve ssADH Koekspresyonu-** Kontrol grubu olarak pET14b ve GroES ve GroEL genlerini taşıyan pGro7 ile pADHss plazmidlerini içeren koekspresyon sistemine ait SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.12 ve 4.13'te verilmiştir.



**Şekil 4.12.** ADHss ve şaperon koekspresyonu (IPTG sonrası 2. Saat alınan pellet).

**M:** Marker; **1:** Sonikasyon sonrası ADHss pellet; **2:** ADHss hücre özütü; **3:** Sonikasyon sonrası kontrol; **4:** Hücre özütü kontrol.

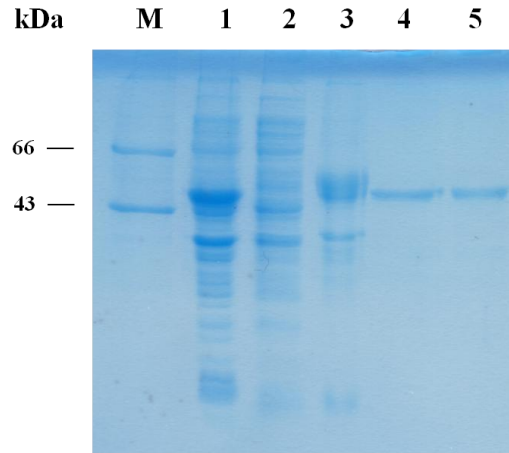


**Şekil 4.13.** ADHss ve şaperon koekspresyonu (IPTG sonrası 4. Saat alınan pellet).

**M:** Marker; **1:** Sonikasyon sonrası ADHss pellet; **2:** ADHss hücre özütü; **3:** Sonikasyon sonrası kontrol; **4:** Hücre özütü kontrol.

Şaperon koekspresyonu ile ssADH *in vivo* doğru katlanma çalışması gerçekleşmemiştir. SDS-PAGE görüntüsüne göre ssADH inklüzyon cisimciği olarak sonikasyon sonrası pellette kalmıştır.

**ssADH Enziminin İnküzyon Cisimciği Olarak Saflaştırılması-** Üre ile çözünür hale getirilen ssADH proteini, üre gradient sonunda Ni-afinite kolondan 400mM imidazol elüsyonu ile alındı (Şekil 4.14).

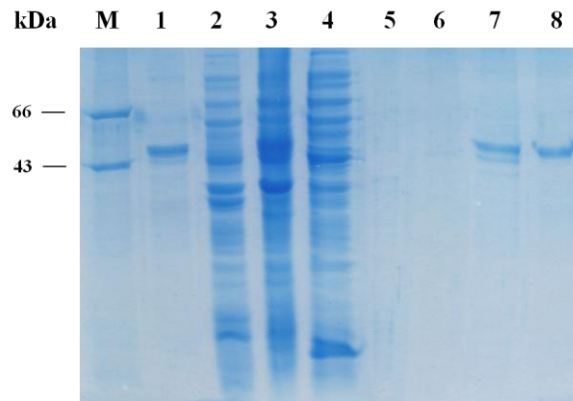


**Şekil 4.14.** ssADH enziminin saflaştırılması.

**M:** Marker; **1:** Sonikasyon sonrası pellet; **2:** Hücre özütü; **3:** Kolon çıkışı; **4 ve 5:** 400mM imidazol ile kolon çıkışı.

#### 4.2.1.1. ssADH Enziminin *in vitro* Tekrar Katlanma Çalışmaları

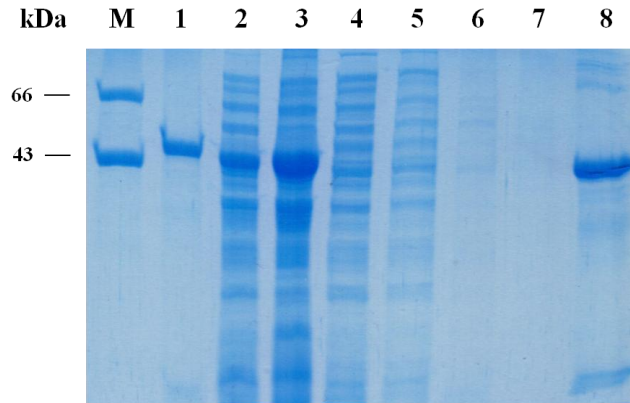
**Metot 1-** Ni-afinite kolona yüklenen guanidin HCl ile çözünür hale getirilen ssADH proteini üre gradient uygulanarak kolondan alındı (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** ssADH *in vitro* tekrar katlanma işlemi.

**M:** Marker; **1:** Konsantre enzim; **2:** Hücre özütü; **3:** Sonikasyon sonrası pellet; **4:** 6M guanidin HCl ile soluble fraksiyonun kolon çıkışı; **5:** 5mM imidazol; **6:** 20mM imidazol; **7:** 100mM imidazol; **8:** 400mM imidazol ile kolon çıkışı.

**Metot 2-** Ni-afinite kolona yüklenen guanidin HCl ile çözünür hale getirilen ssADH proteini, üre gradient uygulanarak ve yapay şaperon olan  $\beta$ -siklodekstrin içeren *in vitro* tekrar katlanma tamponu ile yıkandıktan sonra 400mM imidazol ile kolondan alındı (Şekil 4.16).

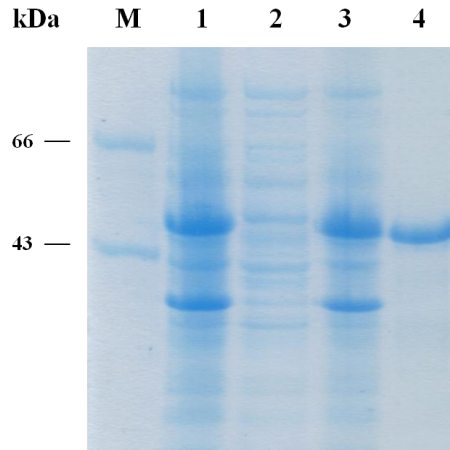


**Şekil 4.16.** ssADH *in vitro* tekrar katlanma işlemi.

**M:** Marker; **1:** Konsantre enzim; **2:** Ekspresyon pelleti; **3:** Sonikasyon sonrası pellet; **4:** Hücre özütü; **5:** Hücre özütü kolon çıkış; **6:** Hücre özütü 400mM imidazol ile kolon çıkış; **7:** Üre gradient sonunda 20mM imidazol; **8:** 400mM imidazol ile kolon çıkış.

Üre gradient uygulandıktan sonra  $\beta$ -siklodekstrin uygulaması ile deterjan uzaklaştırılması ve doğru katlanma sağlanması amaçlanmıştır. ssADH proteini kolondan saf olarak alındı.

**Metot 3-** Guanidin HCl ile çözünür hale getirilen, aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  varlığı düşünülerek  $Zn^{+2}$  ilave edilmiş Ni-afinite kolona yüklenen ssADH proteini 400mM imidazol ile kolondan saf olarak alındı (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** ssADH *in vitro* tekrar katlanma işlemi.

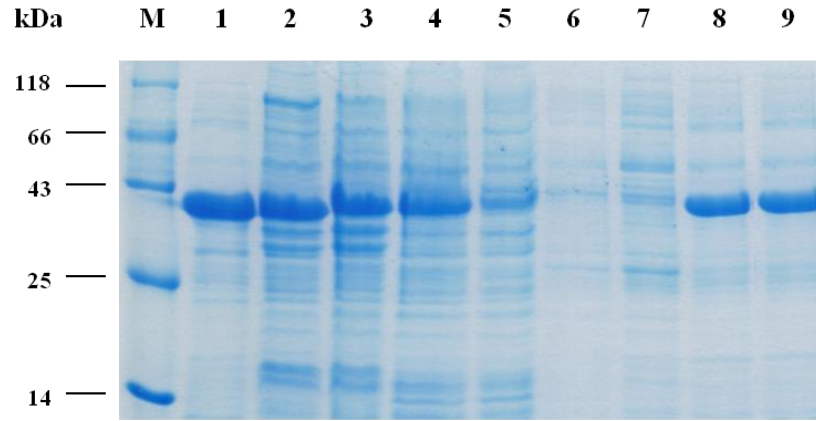
**M:** Marker; **1:** Ekspresyon pelleti; **2:** Sonikasyon sonrası hücre özütü; **3:** Sonikasyon sonrası pellet; **4:** 400mM imidazol ile kolon çıkış.

**MALDI-TOF ile Kütlenin Belirlenmesi-** MALDI-TOF kütle spektrumuna göre ssADH enzimi 43914Da olarak belirlenmiştir (Ek 1.1).

**ssADH Aktivitesinin Belirlenmesi-** 50mM fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanan 1mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  12.5µg ssADH ile 3 dakika inkübe edildi. Son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde kofaktör ilave edildi. Kofaktör olarak hem NADH hem de NADPH kullanıldı. Reaksiyon 340nm’de takip edildi. Her iki kofaktör içinde herhangi bir azalma gözlenmedi. Herhangi bir ketona ve etanole karşı da aktivite gözlenmedi.

#### 4.2.2. *Bacillus thuringiensis* Kaynaklı ADH Enzimi

**btADH Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması-** Oto-indüksiyon besiyerinde büyütülen btADH genini taşıyan pET14b plazmidini içeren BL21(DE3) hücrelerinde ekspresyon SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 4.18). Liziz edilen BL21(DE3) hücrelerinden Ni-afinite kromatografisi ile saflaştırılan btADH enzimi SDS-PAGE ile görüntülendi. 200mM ve 400mM imidazol (pH 7.8) geçirilerek toplanan elüsyonlar konsantre edilerek PD-10 kolondan geçirildi ve 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) ile tamponu değiştirildi. Aynı hacim gliserol eklenerek -20°C’de kullanılmak üzere saklandı.



**Şekil 4.18.** Oto-indüksiyon ile *btADH* ekspresyonu ve saflaştırılması.

**M:** Marker; **1:** Konsantre *btADH*; **2:** Pellet *btADH* in *E.coli* BL21(DE3); **3:** Sonikasyon sonrası pellet; **4:** Hücre özütü; **5:** Kolon çıkış; **6:** 25mM imidazol ile kolon çıkış; **7:** 50mM imidazol ile kolon çıkış; **8:** 200mM imidazol ile kolon çıkış; **9:** 400mM imidazol ile kolon çıkış.

1L oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen *btADH* konsantrasyonu Bradford yöntemiyle 0.82mg/ml (100ml gliserol stok) olarak belirlenmiştir. 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) içinde hazırlanan 0.5M izopropil alkol ile 25°C’de son konsantrasyonu 1mM olan  $\text{NAD}^+$  kullanılarak 340nm absorbans artışına bakılmıştır. Spesifik aktivitesi 1.8 U/mg olarak hesaplanmıştır.

## BÖLÜM 5

### ***Candida methylica* KAYNAKLI FDH ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

*Gelecek, düzene konması gereken Şimdi'den başka bir şey değildir. Yapman gereken onu öngörmek değil, ona müsaade etmektir.*

*Antoine de Saint Exupéry*

## 5. *C. methylica* KAYNAKLI FDH ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

### 5.1. Materyal ve Metot

#### 5.1.1. Materyal

Maya ekstraktı, pepton, sodyum klorür, agar, glukoz, laktoz, gliserol,  $\beta$ -merkaptoetanol, akrilamid, bis-akrilamid, hidroklorik asit, kalsiyum klorür dihidrat, tetrametiletilendiamin (TEMED), sodyum fosfat mono bazik ve imidazol Merck firmasından satın alındı. Tris(hidroksimetil)-aminometan Fluka firmasından satın alındı. Ampisilin (Ampisina) Mustafa Nevzat firmasından satın alındı. Fenilmetansülfonilflorit (PMSF), lizozim, sodyum dodesil sülfat, guanidinhidroklorür ve sodyum fosfat dibazik Sigma firmasından satın alındı. Magnezyum klorür hekzahidrat, Atabay Kimya firmasından satın alındı. Banlin elektronik marka sonikatör, Biorad marka mikropate okuyucu, Shimadzu marka Uv-vis spektrofotometre kullanılmıştır.

#### 5.1.2. Metot

***cmFDH Plazmidinin Transformasyonu-*** 3 $\mu$ l *cmFDH* genini taşıyan plazmid, Metot T'de belirtildiği gibi kompetent Rosetta(DE3) hücrelerine aktarıldı. 100  $\mu$ g/ml ampisilin içeren LB/agar petrilere cam boncuklar yardımıyla ekim yapıldı ve 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı.

***cmFDH Ekspresyonu ve Saflaştırılması-*** *cmFDH* genini taşıyan plazmidi taşıyan Rosetta(DE3) petrisinden alınan tek koloni, 5 ml'lik LB besiyerinde 180 rpm'de 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. *cmFDH* plazmidini içeren gecelik Rosetta (DE3) kültüründen alınan 1 ml, 1L oto-indüksiyon besiyerini içeren (100  $\mu$ g/ml ampisilin ihtiva eden) flaska aktarıldı. Gece boyu 30°C'de 180 rpm'de inkübe edildi.

Oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen pellet 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl ve 5mM imidazol (pH 7.8) tamponu ile süspanse edildi. Lizozim ve PMSF eklendikten sonra yarım saat buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 8 kez uygulandı ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi. Hücre özütü Ni-affinite kolona yüklendi ve 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl ve 25mM imidazol (pH 7.8) ile yıkandı. Daha sonra 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 50mM-400mM imidazol (pH 7.8) geçirilerek elüsyonlar toplandı.

### ***cmFDH Karakterizasyonu***

***Kinetik Çalışmaları-*** 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 0.2M sodyum format ile 37°C'de son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesi ile cmFDH aktivitesi 340nm'de ölçüldü. 5-300mM sodyum format konsantrasyonlarına karşı cmFDH spesifik aktivite grafiği çizildi. V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> ve k<sub>cat</sub> değerleri hesaplandı.

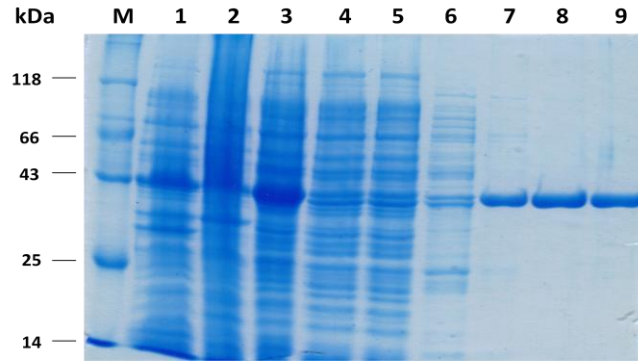
***cmFDH Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi-*** 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 0.2M sodyum format ile 20-70°C aralığında son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesi ile cmFDH aktivitesi 340nm'de ölçüldü.

***cmFDH Aktivitesine pH'nın Etkisi-*** 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 6-10) içinde 0.2M sodyum format ile 37°C aralığında son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesi ile cmFDH aktivitesi 340nm'de ölçüldü.

***Termal ve pH Kararlılığı-*** 20-70°C aralığında 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) içinde cmFDH 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 0.2M sodyum format ile 37°C aralığında son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesi ile cmFDH aktivitesi 340nm'de ölçüldü. 50mM fosfat tamponu (pH 6-7.5) ve 50mM Tris-HCl tamponu (pH 8-10) içinde cmFDH 20°C'de yarım saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 0.2M sodyum format ile 37°C aralığında son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesi ile cmFDH aktivitesi 340nm'de ölçüldü.

## 5.2. Sonuç

***cmFDH Ekspresyonu ve Saflaştırılması-*** Oto-indüksiyon besiyerinde büyütülen *cmFDH* genini taşıyan plazmidi içeren Rosetta(DE3) hücrelerinde ekspresyonu ve liziz edilen Rosetta(DE3) hücrelerinden Ni-afinite kromotografisi ile saflaştırılan *cmFDH* enzimi SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 5.1).



**Şekil 5.1.** Oto-indüksiyon ile *cmFDH* ekspresyonu ve saflaştırılması.

**M:** Marker; **1:** Pellet *cmFDH* in Rosetta(DE3); **2:** Sonikasyon sonrası pellet; **3:** Hücre özütü; **4:** Kolon çıkış; **5:** 25mM imidazol; **6:** 50mM imidazol; **7:** 100mM imidazol; **8:** 200mM imidazol; **9:** 400mM imidazol ile kolon çıkış.

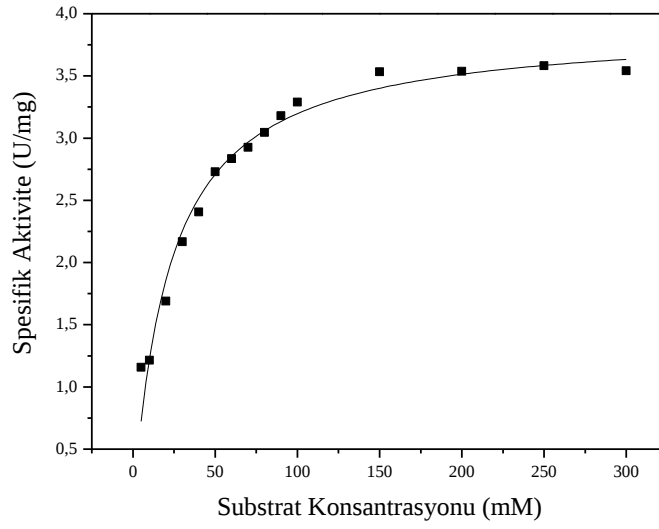
1L oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen *cmFDH* konsantrasyonu Bradford yöntemiyle 0.6mg/ml (100ml gliserol stok) olarak belirlenmiştir.

### ***cmFDH Karakterizasyonu***

***Kinetik Çalışmaları-*** 5-300mM sodyum format konsantrasyonlarına karşı *cmFDH* spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 5.2’de verilen Michaelis-Menten grafiğine göre  $V_{max}$ ,  $K_m$  ve  $k_{cat}$  değerleri hesaplandı (Çizelge 5.1).

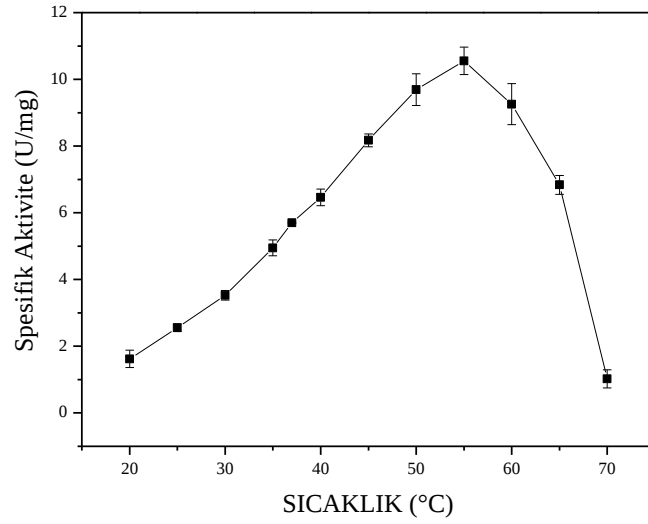
**Çizelge 5.1.** *cmFDH* kinetik parametreleri.

| $V_{max}$ (U/mg) | $K_m$ (mM) | $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ ) |
|------------------|------------|------------------------|-----------------------------------|
| 3.8              | 21.9       | 0.02                   | 0.87                              |

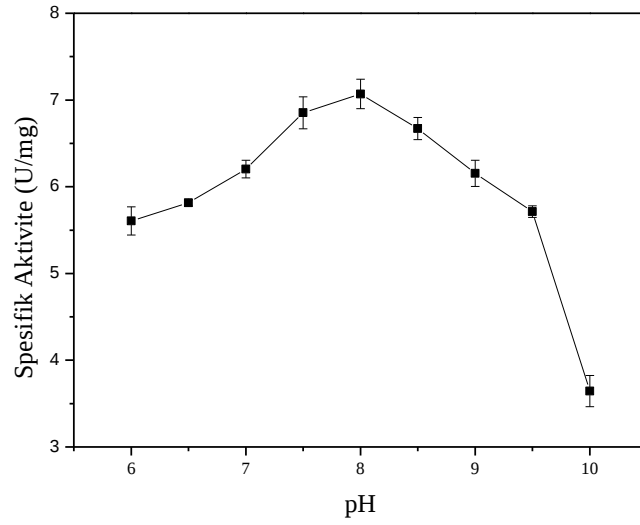


**Şekil 5.2.** *cmFDH* Michaelis-Menten grafiği.

***cmFDH* Aktivitesine Sıcaklığın ve pH'nun Etkisi-** *cmFDH* sıcaklık profili Şekil 5.3'te verilmiştir. *cmFDH* pH profili de Şekil 5.4'te verilmiştir. Optimum sıcaklığı 55°C ve optimum pH değeri 8 olarak belirlenmiştir.

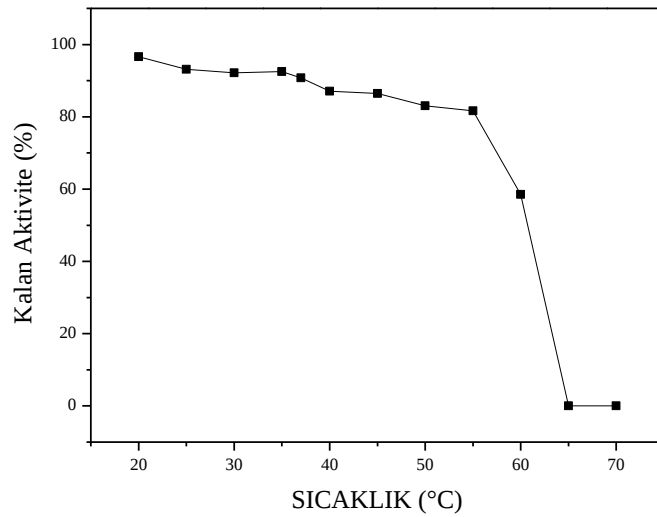


**Şekil 5.3.** *cmFDH* aktivitesine sıcaklığın etkisi.



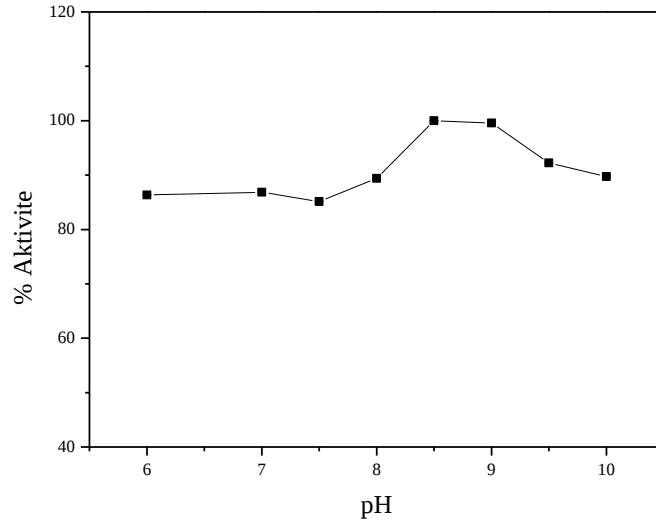
**Şekil 5.4.** *cmFDH* aktivitesine pH'nın etkisi.

**Termal ve pH Kararlılığı-** *cmFDH* termal stabilite Şekil 5.5'te verilmiştir. *cmFDH* pH kararlılığı da Şekil 5.6'da verilmiştir. *cmFDH* enzimi 55°C'de 1saat beklemesine rağmen aktivitesinin yalnızca %20'sini kaybetmiştir. 60°C'den sonra aktivitede ani düşüş gözlenmiş ve 65-70°C'de aktivite gözlenmemiştir.



**Şekil 5.5.** *cmFDH* termal kararlılığı.

pH kararlılık grafiğine *cmFDH* enzimi geniş bir pH aralığında aktivitesini korumaktadır. pH 6-10 aralığında enzim bekletildikten sonra tüm pH değerleri için geçerli olacak şekilde aktivitesinin sadece %10'unu kaybetmiştir.



**Şekil 5.6.** *cmFDH* pH kararlılığı.

## **BÖLÜM 6**

# **MANYETİK NANOPARTİKÜL-ENZİM KONJUGE SİSTEMLERİ**

*Dans eden bir yıldız doğurmak isteyen,  
önce kendi içinde büyük taşkınlıklar ve kaos yaşamak zorundadır.*

*Friedrich Wilhelm Nietzsche*

## 6. MANYETİK NANOPARTİKÜL-ENZİM KONJUGE SİSTEMLERİ

### 6.1. Materyal ve Metot

#### 6.1.1. Materyal

Sodyum klorür, gliserol, hidroklorik asit ve sodyum fosfat mono bazik Merck firmasından satın alındı. Glutaraldehit, Tris(hidroksimetil)-aminometan, glisin ve N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid Merck firmasından satın alındı. Bovine serum albumin Fluka, lizozim Sigma firmasından satın alındı.

*Candida methylica* format dehidrogenaz genini taşıyan plazmidi ve *Bacillus subtilis*'den okzalat dekarboksilaz genini taşıyan pET32a plazmidi Doç. Dr. Ayhan ÇELİK tarafından sağlanmıştır.

#### 6.1.2. Metot

##### 6.1.2.1. Katekol Modifiye Manyetik Nanopartiküllere Protein İmmobilizasyonu

Her enzim için geliştirilen metot aynıdır. Sadece her enzim için çalışma tamponu farklıdır. Modifiye nanopartiküllere immobilizasyon şeması Ek 1.2 ve 1.3'te gösterilmiştir.

***Dopamin Modifiye Manyetik Nanopartiküllere Protein İmmobilizasyonu-*** Dopamin ile modifiye nanopartikül sentezlerinden Metot 3 ile elde edilen dopamin bağlı 4mg manyetik nanopartikül (MN-DOP-MT3), 50µl %25 glutaraldehit çözeltisi ve 5ml 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) 0.2M NaCl ile 10 dakika buzda sonike edildi.

Sonikasyon sonunda 5000 rpm'de 5 dakika çöktürülen nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile 2 kere yıkandı. Nanopartiküllere kullanılacak enzim ve uygun tampon eklenerek +4°C'de immobilizasyona bırakıldı. Yarım saat sonra konsantrasyonu 0.5M olacak şekilde glisin eklendi ve 1.5 saat +4°C'de immobilizasyona devam edildi. Süre sonunda uygun tampon ile yıkanan immobilizasyon sistemi kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

***Kafeik Asit ile Modifiye Manyetik Nanopartiküllere Protein İmmobilizasyonu-*** Kafeik asit ile modifiye nanopartikül sentezinde Metot 1 ile elde edilen kafeik asit bağlı 4mg manyetik nanopartikül (MN-CAF-MT1), 5ml 50mM sodyum fosfat (pH 6.3) tamponu içinde 20mg EDC ile 25°C'de 15 dakika sonike edildi. Sonikasyon sonunda 5000 rpm'de 5 dakika çöktürülen nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile 2 kere yıkandı. Nanopartiküllere kullanılacak enzim ve uygun tampon eklenerek +4°C'de gece boyu immobilize edildi. Yarım saat sonra konsantrasyonu 0.5M olacak şekilde glisin eklendi ve 1.5 saat +4°C'de immobilizasyona devam edildi. Süre sonunda uygun tampon ile yıkanan immobilizasyon sistemi kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

#### **6.1.2.2. Modifiye Olmamış Manyetik Nanopartiküllere Protein İmmobilizasyonu**

***Glutaraldehit ile Protein İmmobilizasyonu-*** Modifiye olmamış nanopartikül sentezinde kullanılan Metot 2 ile elde edilen 4mg modifiye edilmemiş manyetik nanopartikül (MN-NH<sub>2</sub>) 50µl %25 GA çözeltisi ve 5ml 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) 0.2M NaCl ile 10 dakika buzda sonike edildi. Sonikasyon sonunda 5000 rpm'de 5 dakika çöktürülen nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile 2 kere yıkandı. Nanopartiküllere kullanılacak enzim ve uygun tampon eklenerek +4°C'de immobilizasyona bırakıldı. Yarım saat sonra 0.5M olacak şekilde glisin eklendi ve 1.5 saat +4°C'de immobilizasyona devam edildi. Süre uygun tampon ile yıkanan immobilizasyon sistemi kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

**Karbodiimid Aktivasyonu ile Protein İmmobilizasyonu-** Nanopartikül sentezinde kullanılan Metot 1 ile elde edilen 4mg modifiye edilmemiş manyetik nanopartikül (MN-OH) 2ml 50mM sodyum fosfat (pH 6.3) tamponu içinde 20mg EDC ile oda sıcaklığında 15 dakika sonike edildi. Sonikasyon sonunda 5000 rpm’de 5 dakika çöktürülen nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile 2 kere yıkandı. Nanopartiküllere kullanılacak enzim ve uygun tampon eklenerek +4°C’de immobilizasyona bırakıldı. Yarım saat sonra konsantrasyonu 0.5M olacak şekilde glisin eklendi ve 1.5 saat +4°C’de immobilizasyona devam edildi. Süre uygun tampon ile yıkanan immobilizasyon sistemi kullanılmak üzere +4°C’de saklandı.

### 6.1.2.3. İmmobilize *cm*FDH Çalışmaları

**Bağlanma Kapasitesi-** MN-DOP-MT3, MN-CAF-MT1, MN-NH<sub>2</sub> ve MN-OH nanopartiküllerine 0.5mg *cm*FDH, 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl içinde gece boyu +4°C’de immobilize edildi. Gece boyu inkübasyondan sonra süzüntüde protein miktarı hem Bradford yöntemi ile hem de UV-vis spektrofometre ile 280nm’de absorbans değeri ölçüldü.

**İmmobilize Enzim Miktarının Belirlenmesi-** MN-NH<sub>2</sub> ve MN-OH partiküllerine genel metot ile 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. İmmobilize *cm*FDH miktarı BCA metodu ile belirlendi (Smith, Krohn et al. 1985). Bu metotta kullanılan reaktifler Ek 2’de verilmiştir.

### **Doyurma İşlemi**

**Metot 1.** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine 0.15mg *cm*FDH ve 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl tamponu ilave edildi. +4°C’de immobilizasyona bırakıldı. Yarım saat sonra son konsantrasyonu 0.5M olacak şekilde glisin eklendi ve 1.5 saat +4°C’de inkübe edildi. Yıkanan nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH7.5) içinde +4°C’de aktivitesine bakılmak üzere saklandı.

**Metot 2.** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine 0.15mg *cm*FDH ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl tamponu ilave edildi. +4°C’de immobilizasyona bırakıldı. Yarım saat sonra 4500rpm’de nanopartiküller santrifüjlendi ve 2ml %2 etilendiamin çözeltisi (pH 8.5) eklendi ve 1.5 saat +4°C’de immobilizasyona bırakıldı. Yıkanan nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH7.5) içinde +4°C’de aktivitesine bakılmak üzere saklandı.

**Aktivitesinin Belirlenmesi-** Nanopartiküllere immobilize *cm*FDH, 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 200mM sodyum format ve 5mM NAD<sup>+</sup> ile 37°C’de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonunda nanopartiküller 4500rpm’de santrifüjlendi. Süzüntünün 340nm’de absorbands değeri belirlendi.

**Enzim Miktarının Aktivite Verimine Etkisi-** MN-NH<sub>2</sub> ve MN-OH partiküllerine 0.05-0.4mg aralığındaki miktarlarda *cm*FDH genel metot ile immobilize edildi. İmmobilizasyon sonunda yıkanan nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 200mM sodyum format ve 5mM NAD<sup>+</sup> ile 37°C’de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonunda 4500rpm’de santrifüjlendi. Süzüntünün 340nm’de absorbands değeri ölçüldü.

**Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine 0.15mg *cm*FDH ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl tamponu ilave edildi. Genel immobilizasyon metodu uygulandı. Yıkanan nanopartiküllerle 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.1) 5-300mM sodyum format konsantrasyonlarına karşı *cm*FDH spesifik aktivite grafiği çizildi. V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> ve k<sub>cat</sub> değerleri hesaplandı.

**Tekrarlı Kullanım Kararlılığı-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine 0.15mg *cm*FDH ve 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl tamponu ilave edildi. Genel immobilizasyon metodu uygulandı. İmmobilizasyon sonunda yıkanan nanopartiküllerle aktivite ölçüldü. Reaksiyon işlemi üst üste 10 kez tekrarlandı.

**Saklama Tamponu Optimizasyonu-** MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine genel metot uygulanarak 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. Immobilize *cm*FDH, 0.1mg BSA, 0.1mg *cm*FDH ve %25 gliserol içeren 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) içinde +4°C’de saklandı. Gün aktiviteleri ölçüldü.

**Saklama Kararlılığı-** Katekol modifiye MN-DOP-MT3, MN-DOP-MT4, MN-CAF-MT1, MN-CAF-MT2 ve modifiye edilmemiş nanopartiküllere MN-NH<sub>2</sub>, MN-OH partiküllerine genel metot ile 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. Gün aktiviteleri ölçüldü. Immobilizasyon sistemleri %25 gliserol içeren 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) içinde +4°C’de saklandı.

**Sıcaklık Etkisi-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine genel metot ile 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. 20-70°C aralığındaki sıcaklıklarda yıkanan nanopartiküller 50mM fosfat tamponu (pH 7.1) içinde 200mM sodyum format ve 5mM NAD<sup>+</sup> ile reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonunda 4500rpm’de santrifüjlendi. Süzüntünün 340nm’de absorbans değeri ölçüldü.

**pH Etkisi-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine genel metot ile 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. Yıkanan nanopartiküller pH 6-10 aralığındaki tamponların içinde 200mM sodyum format ve 5mM NAD<sup>+</sup> ile 37°C’de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonunda 4500rpm’de santrifüjlendi. Süzüntünün 340nm’de absorbans değeri ölçüldü.

**Termal Kararlılık-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine genel metot ile 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. 20-70°C aralığındaki sıcaklıklarda 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) içinde immobilize sistemler 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda nanopartiküller 4500rpm’de santrifüjlendi. Yıkanan nanopartiküller ile aktivite ölçüldü.

**pH Kararlılık-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine genel metot ile 0.15mg *cm*FDH immobilize edildi. Yıkanan nanopartiküller pH 6-10 aralığındaki tamponların içinde yarım saat 20°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yıkanan nanopartiküllerle aktivite ölçüldü.

#### 6.1.2.4. İmmobilize *btADH* Çalışmaları

*btADH* enzimi hem modifiye hem de modifiye edilmemiş nanopartiküllere immobilize edildi. Bağlanma kapasitesi iki immobilizasyon sistemi için belirlendi. İmmobilizasyon sonunda yıkanan nanopartiküller 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) içinde 500mM izopropil alkol ve 5mM NAD<sup>+</sup> ile 25°C’de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonunda 4500rpm’de santrifüjlendi. Süzüntünün 340nm’de absorbansı ölçüldü ve aktivite verimi hesaplandı. Tekrarlı kullanım ve saklama kararlılığı belirlendi.

#### 6.1.2.5. Okzalit Dekarboksilaz Enziminin İmmobilizasyon Çalışmaları

##### *Okzalit Dekarboksilaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması*

***IPTG İndüksiyonu ile Ekspresyonu ve Saflaştırılması-*** 3 µL okzalit dekarboksilaz (OXDC) genini taşıyan pET32a plazmidi Metot K’da belirtildiği gibi hazırlanan kompetent *E.coli* BL21(DE3) ekspresyon suşuna Metot T’deki gibi transfer edildi. 100 µg/ml ampisilin içeren LB/agar petrilere cam boncuklar yardımıyla ekim yapıldı ve 37°C’de gecelik inkübasyona bırakıldı.

OXDC genini taşıyan pET32a plazmidi taşıyan *E.coli* BL21(DE3) petrisinden alınan tek koloni, 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml’lik LB besiyerinde 180 rpm’de 37°C’de gecelik inkübasyona bırakıldı. OXDC genini taşıyan pET32a plazmidini içeren gecelik *E.coli* BL21(DE3) kültüründen alınan 0.5 ml, 100 ml LB besiyeri içeren (100 µg/ml ampisilin ihtiva eden) flaska aktarıldı. OD<sub>600</sub> değeri 0.3 olana dek 37°C 180 rpm’de hücreler büyütüldü. 42°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra ve 5mM olacak şekilde MnCl<sub>2</sub> ve 0.04mM olacak şekilde IPTG eklenerek 30°C’de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda flastaki bakteri kültürü, 50 ml’lik falkon tüpe aktararak 4°C’de santrifüjlendi.

IPTG indüksiyonu ile elde edilen pellet 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl ve 5mM imidazol (pH 7.8) tamponu ile süspanse edildi. Lizozim ve PMSF eklendikten sonra yarım saat buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerinde 15 saniye sonikasyon

45 saniye soğutma işlemi 6 kez uygulandı ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi. Hücre özütü Ni-affinite kolona yüklendi ve 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl ve 25mM imidazol (pH 7.8) ile yıkandı. Daha sonra 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 100mM, 200mM ve 400mM imidazol (pH 7.8) geçirilerek elüsyonlar toplandı.

***Oto-İndüksiyon ile Ekspresyonu ve Saflaştırılması-*** OXDC plazmitini içeren gecelik *E.coli* BL21(DE3) kültüründen alınan 1 ml, 1L studier besiyeri içeren (100 µg/ml ampisilin ve 5mM olacak şekilde  $MnCl_2$  ihtiva eden) flaska aktarıldı. Gece boyu 30°C’de 180 rpm’de inkübe edildi.

Oto-indüksiyon besiyerinden elde edilen pellet 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl ve 5mM imidazol (pH 7.8) tamponu ile süspanse edildi. Lizozim ve PMSF eklendikten sonra yarım saat buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye soğutma işlemi 6 kez uygulandı ve santrifüjlenerek hücre özütü elde edildi. Hücre özütü Ni-affinite kolona yüklendi ve 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl ve 25mM imidazol (pH 7.8) ile yıkandı. Daha sonra 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 100mM, 200mM ve 400mM imidazol (pH 7.8) geçirilerek elüsyonlar toplandı.

***Bağlanma Kapasitesi-*** Bu deney *cmFDH* enziminde belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

***Aktivitesinin Belirlenmesi-*** MN-DOP ve MN-CAF ile MN-NH<sub>2</sub> ve MN-OH nanopartiküllerine genel metot ile 0.15mg OXDC immobilize edildi. İmmobilizasyon sonunda nanopartiküllerle aktivite bakıldı. 2ml 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 6) içinde 0.2M potasyum okzalat ile nanopartiküller 25°C’de 40 dakika 140rpm’de inkübe edildi. Süre sonunda nanopartiküller 4500rpm’de santrifüjlendi. Süzüntü alındı ve doymuş Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisi ile pH değeri 7’ye getirildi. OXDC reaksiyonu *cmFDH* enzimi ile 37°C’de 1 dakika inkübe edildi ve NAD<sup>+</sup> ilavesi ile reaksiyon 340nm’de 2 dakika takip edildi. Aynı *cmFDH* miktarı ile aynı şartlarda 0-10mM sodyum format ile kalibrasyon grafiği elde edildi.

#### 6.1.2.6. *btADH* ve *cmFDH* Koimmobilizasyonu

MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine 0.1mg *btADH* ve 0.05mg *cmFDH* 50mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl tamponu içinde genel immobilizasyon metodu uygulanarak bağlandı.

**Aktivite Belirlenmesi ve Ürün Analizi-** İmmobilizasyon sistemleri 100mM benzaldehit, 200mM sodyum format içeren 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) içinde süspanse edildi. Son konsantrasyonda 10mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. 27°C'de 140rpm'de çalkalandı. Alınan örneğe anı hacimde metanol eklendi. -74°C'de yarım saat bekletilen örnek 13000rpm'de 5dk santrifüjlendi. Süpernatant HPLC analizi için kullanılmak üzere +4°C'de saklandı. Ürün analizi HPLC ile yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril:0.05M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:triethylamin (22:100:0.15) ve kolon olarak C8 kolonu kullanıldı. Akış hızı 0.8ml/dk olarak ayarlandı. Analiz süresi 30 dakikadır. Kolon sıcaklığı 25°C'dir. Analiz 254nm'de takip edildi. Serbest enzimler içinde aynı reaksiyon şartları kullanılmıştır.

#### 6.1.2.7. *OXDC* ve *cmFDH* Koimmobilizasyonu

MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine 0.25mg *OXDC* ve 0.05mg *cmFDH* 50mM fosfat tamponu (pH 7.5) 0.2M NaCl tamponu içinde genel immobilizasyon metodu uygulanarak bağlandı.

**Aktivite Belirlenmesi-** İmmobilizasyon sistemleri 50mM fosfat tamponu (pH 6) ile süspanse edildi. Konsantrasyonu 50mM olacak şekilde potasyum okzalit ilavesinden sonra son konsantrasyonu 3mM olacak şekilde NAD<sup>+</sup> ilavesi ile 30°C'de 140rpm'de inkübe edildi. Saat başı örnek alınıp 340nm'de absorbans değeri ölçüldü.

## 6.2. Sonuç

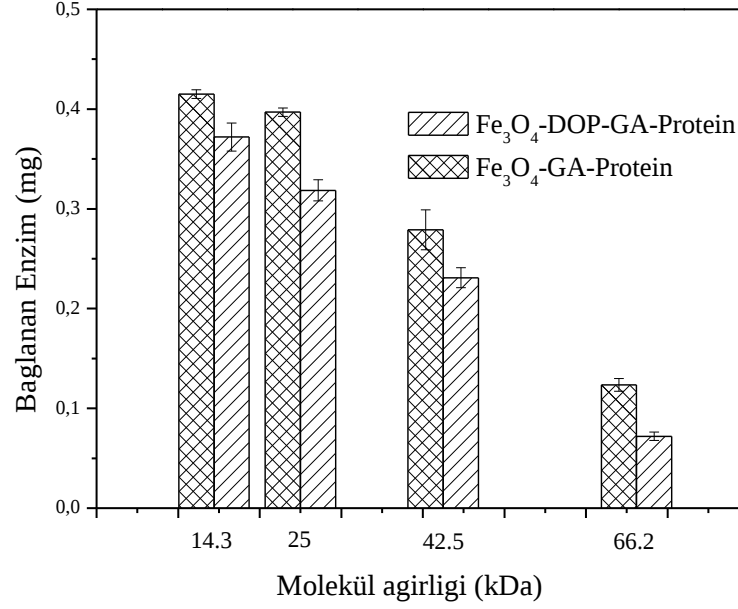
### 6.2.1. Manyetik Nanopartiküllere Enzim Bağlanma Özgüllüğü

Proteinin manyetik nanopartiküle bağlanmasının proteinin molekül ağırlığı ile doğru orantılı olup olmadığını belirlemek için farklı enzimler MN-DOP ve MN-NH<sub>2</sub> sistemlerine immobilize edilmiştir. Ayrıca kullanılan bağlanmanın proteine bağlı olup olmadığı belirlenmiştir. Hem MN-DOP hem de MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine BSA, *cmFDH*, ssNTR ve lizozim immobilize edilmiştir. BSA immobilizasyonu esnasında 50mM Tris-HCl (pH 8) 0.2M NaCl, ssNTR immobilizasyonunda 50mM fosfat tamponu (pH 7.8) 0.2M NaCl, lizozim immobilizasyonunda 50mM Tris-HCl tamponu (pH 8) 0.2M NaCl kullanılmıştır. Proteinler eklendikten sonra +4°C’de gece boyu immobilizasyona bırakılmıştır. Süzüntüde kalan ve yıkama tamponlarında protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Çizelge 6.1’de bağlanma miktarları verilmiştir. Yıkama tamponlarında protein belirlenememiştir. Bradford metodunun hassasiyeti göz önünde bulundurularak yıkama tamponlarında *cmFDH* aktivitesi bakılmış ve aktivite gözlenmemiştir.

**Çizelge 6.1.** Bağlanma özgüllüğü.

| İmmobilize Sistem                                    | Molekül Ağırlığı (kDa) | Bağlanan Protein (mg) |
|------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA-BSA           | 66,2                   | 0,07±0,004            |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-BSA               |                        | 0,12±0,01             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> | 42,5                   | 0,21±0,01             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cmFDH</i>     |                        | 0,27±0,02             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA-ssNTR         | 25                     | 0,32±0,01             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-ssNTR             |                        | 0,4±0,004             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA-Lizozim       | 14,3                   | 0,37±0,01             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lizozim           |                        | 0,4±0,004             |

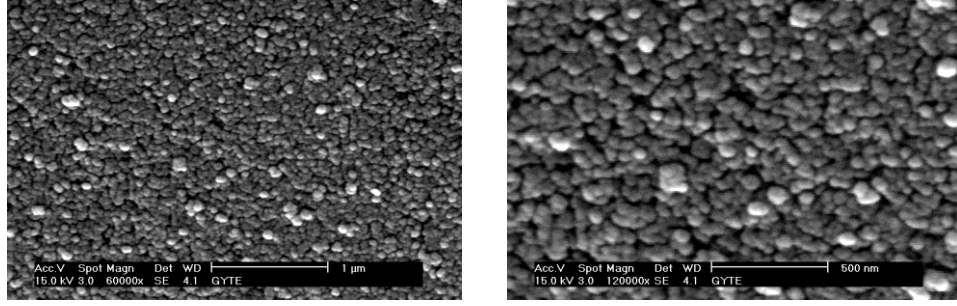
Şekil 6.1'e göre enzim molekül ağırlığı arttıkça bağlanma kapasitesi azalmaktadır. Ancak her enzimin bağlanma olasılığı mevcuttur. Enzime özgül bağlanma söz konusu değildir. Her protein için MN-NH<sub>2</sub> bağlanma, MN-DOP nanopartiküllere göre biraz daha fazladır. Çünkü yüzeyde -NH<sub>2</sub> grupları az olmasına rağmen MN-DOP nanopartiküllere nazaran direk bağlanma daha fazla olabilir.



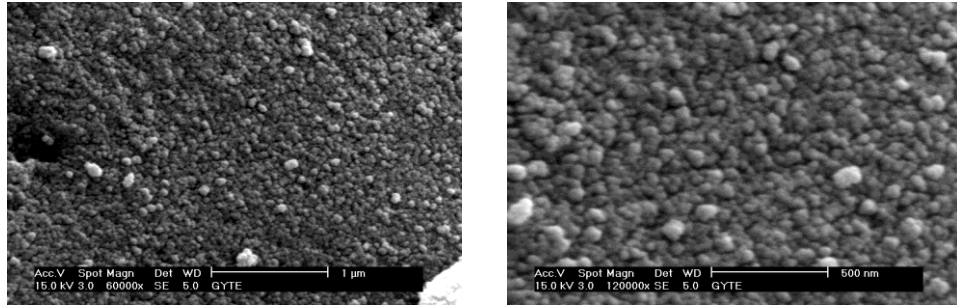
Şekil 6.1. Bağlanma özgülüğü.

### 6.2.2. İmmobilize *cm*FDH Çalışmaları

**Karakterizasyon-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize *cm*FDH SEM görüntüleri Şekil 6.2 ve 6.3'te verilmiştir.

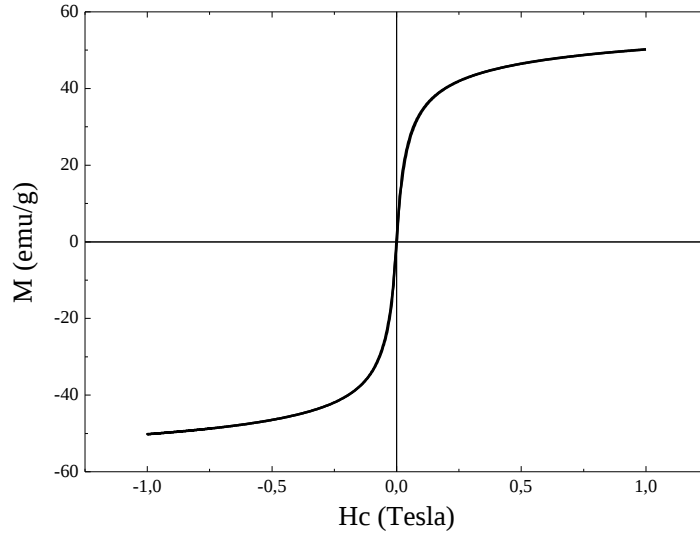


**Şekil 6.2.**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-*cmFDH* SEM görüntüleri.

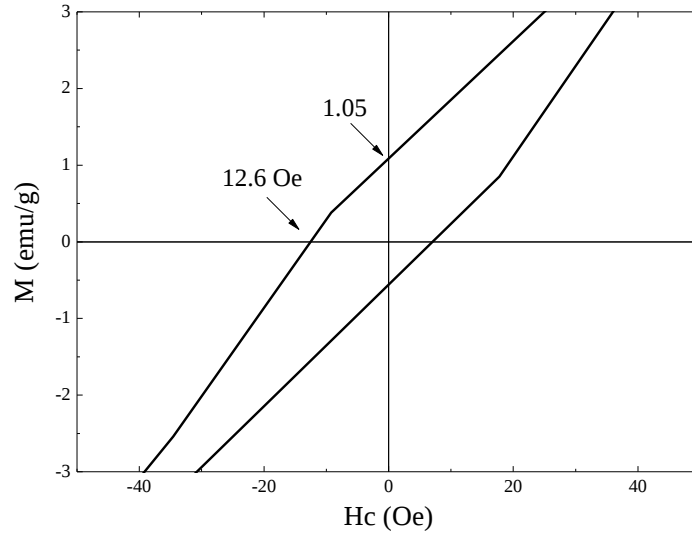


**Şekil 6.3.**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -GA-*cmFDH* SEM görüntüleri.

MN-DOP-MT3 nanopartiküllerine immobilize *cmFDH* için oda sıcaklığında elde edilen mıknatıslanma eğrisi Şekil 6.4'te verilmiştir.  $M_s$  değeri 50.2 emu/g,  $M_r$  değeri 1.05 emu/g ve  $H_c$  değeri 12.6 Oe'dir. Şekil 6.5'te belirtilen  $H_c$  değerine göre 0 Oe değerine yakın olduğu için bu eğri nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik taşıdığını ve nanoboyutta olduğunu belirtmektedir.



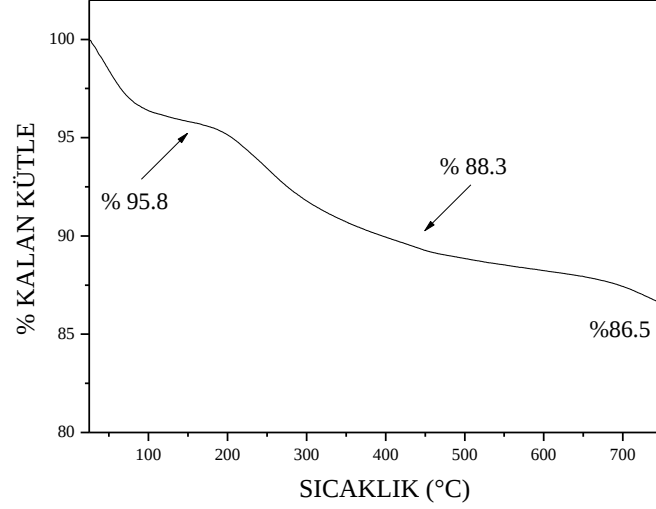
**Şekil 6.4.**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-*cm*FDH histeresis eğrisi.



**Şekil 6.5.**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-*cm*FDH histeresis eğrisinde  $H_c$  ve  $M_r$  değerleri.

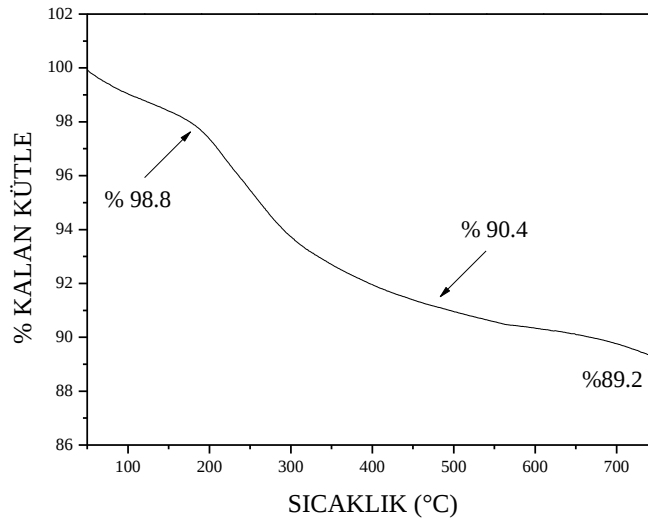
MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize *cm*FDH sistemlerine ait TGA eğrileri Şekil 6.6 ve 6.7'dedir.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-*cm*FDH TGA eğrisindeki 150°C'ye kadar olan ilk %5'lik kütle kaybı absorbe olan su yüzünden olabilir. 550°C'ye kadar olan ikinci kütle kaybı %7'dir. Bu kayıp yüzeye bağlı enzimden ve glutaraldehitten kaynaklı olabilir. En son kütle kaybı dopaminden kaynaklı olabilir. Geri

kalan %86'lık kütle demir okside aittir. Elde edilen TGA eğrisi, MN-DOP-MT3 TGA eğrisinden farklıdır. Bu durum yüzeyde farklı bağlanmaların olduğunu göstermektedir.



**Şekil 6.6.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-cmFDH TGA eğrisi.

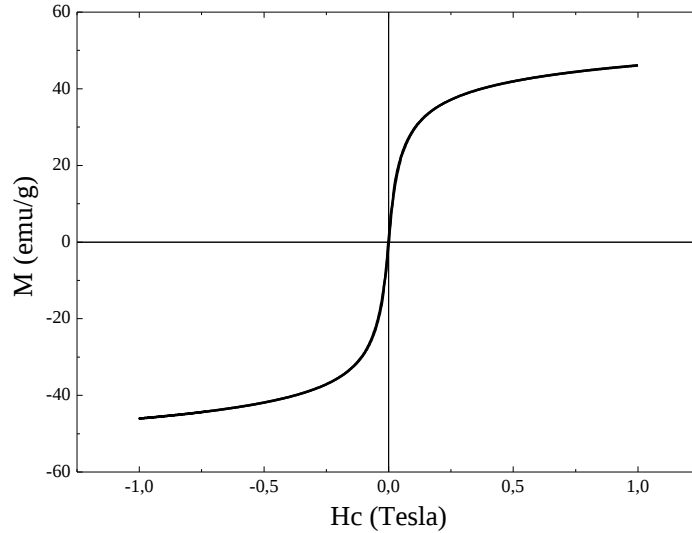
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-cmFDH TGA eğrisinde ise ilk kütle kaybı 150°C'ye kadar %2'dir. Buda yüzeydeki sudan kaynaklanabilir. 550°C'ye kadar olan ikinci kütle kaybı %8'dir. Bu enzim ile glutaraldehidin kütle kaybı olabilir. Geri kalan yaklaşık %90'lık kütle demir okside aittir.



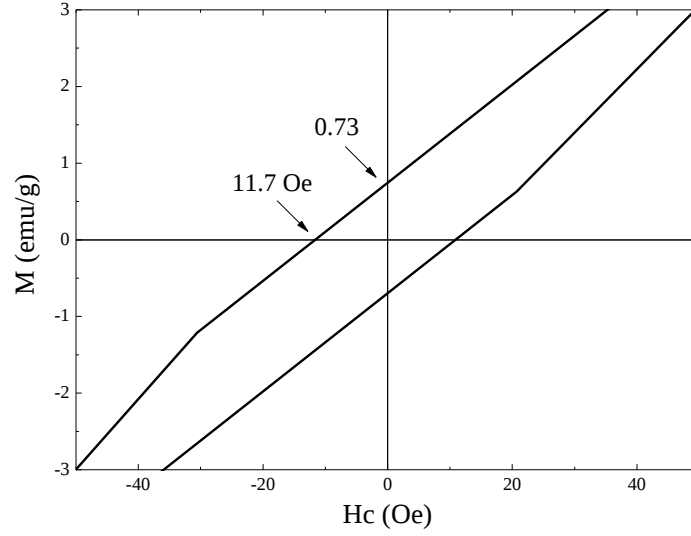
**Şekil 6.7.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-cmFDH TGA eğrisi.

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-*cm*FDH, MN-DOP-MT3 ve MN-OH sistemlerinin toplam histeresis eğrisi Ek 1.4'te verilmiştir. Eğrilerden en yüksek doygun mıknatıslanma değerinin immobilize sisteme ait olduğu görülmektedir.  $M_s$  değerlerindeki artış, yüzeye bağlanmalar gerçekleştikçe boyutun arttığını göstermektedir. Ancak MN-DOP-MT3 sisteminde  $H_c$  değeri (16.1Oe)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-*cm*FDH sisteminden daha fazladır. Oe değeri sıfıra yaklaştıkça boyutun küçük olduğu ve süperparamanyetik özellikte nanopartiküllerin var olduğu bildirilmiştir. MN-DOP-MT3 partikülleri arası etkileşimler ve agregat oluşturmuş olmaları  $H_c$  değerini arttırmış olabilir. İmmobilizasyonla nanopartiküllerin süspanse olma eğilimi daha fazla olabileceğinden  $H_c$  değeri düşük olabilir.

MN-CAF-MT1 partiküllerine immobilize *cm*FDH için oda sıcaklığında elde edilen mıknatıslanma eğrisi Şekil 6.8'de verilmiştir.  $M_s$  değeri 46.12 emu/g,  $M_r$  değeri 0.73 emu/g ve  $H_c$  değeri 11.7 Oe'dir. Şekil 6.9'da belirtilen  $H_c$  değerine göre 0 Oe değerine yakın olduğu için bu eğri nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik taşıdığını ve nanoboyutta olduğunu belirtmektedir.



**Şekil 6.8.**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CAF-*cm*FDH histeresis eğrisi.



**Şekil 6.9.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-*cm*FDH histeresis eğrisinde Hc ve Mr değerleri.

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-*cm*FDH, MN-CAF-MT1 ve MN-OH sistemlerinin toplam histeresis eğrisi Ek 1.5'te verilmiştir. Eğrilerden en yüksek Ms değerinin immobilize sisteme ait olduğu görülmektedir. Ancak üç sisteminde Ms değeri birbirine yakındır. Oe değerlerinin sıfıra yakın olması süperparamanyetik karakterli olduklarını göstermektedir. Az da olsa Ms değerlerindeki artış, yüzeye bağlanmalar gerçekleştikçe boyutun arttığını göstermektedir. Ek 1.6'da tüm sistemlerin Ms değerlerinin grafiği mevcuttur.

**Bağlanma Kapasitesi-** Hem MN-DOP ve MN-CAF hem de MN-OH ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine aşırı miktarda *cm*FDH enzimi immobilize edildiğinde immobilizasyon sonunda süzüntüde kalan ve yıkama tamponunda protein miktarı hem Bradford yöntemi hem de UV-vis spektrofometre ile 280nm'de absorbans değeri ölçüldü ( $\epsilon=51450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Yıkama tamponlarında protein belirlenememiştir. Bradford metodunun hassasiyeti göz önünde bulundurularak yıkama tamponlarında *cm*FDH aktivitesi gözlenmemiştir.

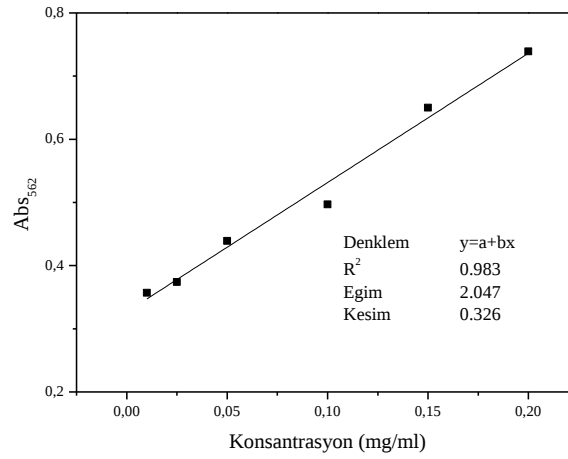
**Çizelge 6.2.** İmmobilizasyon sistemlerinde *cmFDH* bağlanma kapasitesi.

| Yöntem                   | İmmobilize Sistem                                    | Bağlanan <i>cmFDH</i> (mg) |
|--------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Bradford</b>          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> | 0,211±0,01                 |
|                          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cmFDH</i>     | 0,269±0,02                 |
|                          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CAF- <i>cmFDH</i>    | 0,114±0,01                 |
|                          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - <i>cmFDH</i>        | 0,269±0,1                  |
| <b>Abs<sub>280</sub></b> | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> | 0,228±0,01                 |
|                          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cmFDH</i>     | 0,285±0,02                 |
|                          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CAF- <i>cmFDH</i>    | 0,116±0,02                 |
|                          | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - <i>cmFDH</i>        | 0,332±0,1                  |

Çizelge 6.2’de belirtildiği gibi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-*cmFDH* ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-*cmFDH* immobilizasyon sistemlerinde bağlanan protein miktarı birbirine yakındır. Bunun nedeni MN-OH nanopartiküllerinin yüzeyindeki –OH gruplarıyla dopamin bağ yapar. İlave –NH<sub>2</sub> grupları sağlayan MN-DOP partiküllerindeki GA ile bağ yapacak grup sayısı, MN-NH<sub>2</sub> yüzey –NH<sub>2</sub> grup sayısına yakın olabilir.

Ancak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-*cmFDH* ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-*cmFDH* sistemlerinde durum farklıdır. MN-OH partiküllere direk bağlanma –OH gruplarından gerçekleşir. Yüzeyde de sadece –OH grupları olduğu için daha fazla enzim bağlanır. Ancak MN-CAF nanopartiküllerde yüzeyde daha az karboksil grubu mevcuttur ve direk yüzeydeki –OH gruplarının da CAF ile perdelendiği düşünülürse daha az enzim bağlanması olasıdır.

**İmmobilize Enzim Miktarının Belirlenmesi-** 0.01-0.2mg BSA standartları ile elde edilen standart eğrisi Şekil 6.10’da verilmiştir.



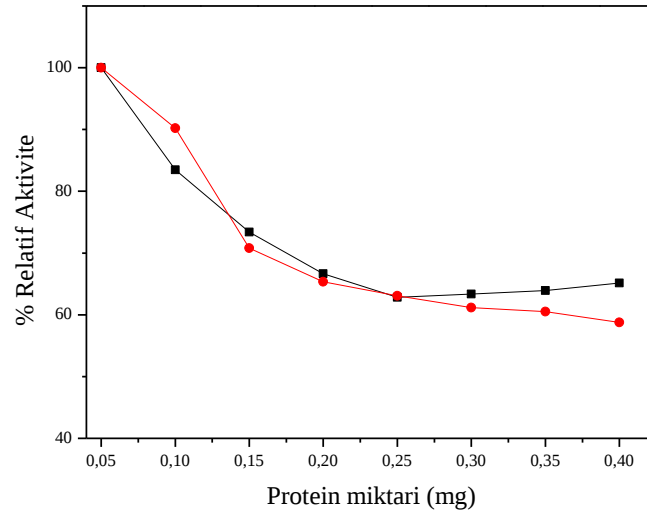
**Şekil 6.10.** BSA standart eğrisi.

Çizelge 6.3'te serbest enzim, MN-NH<sub>2</sub> ve MN-OH partiküllerine immobilize *cmFDH* miktarları verilmiştir. Modifiye nanopartiküllere bağlı immobilize enzim miktarı belirlenememiştir. Çünkü Cu<sup>+1</sup>-BCA kompleksi sonucu oluşan mor renk katekolamin varlığında da gözlenmektedir (BCA™).

**Çizelge 6.3.** İmmobilize *cmFDH* miktarı.

| İmmobilize Sistem                                | Protein miktarı (mg) |
|--------------------------------------------------|----------------------|
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cmFDH</i> | 0,138±0              |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - <i>cmFDH</i>    | 0,121±0,03           |

**Enzim Miktarının İmmobilizasyon Aktivite Verimine Etkisi-** 0.05-0.4mg arasında değişen miktarlarda *cmFDH* enzimi MN-OH ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize edilmiş ve aktivitelerine bakılmıştır (Şekil 6.11).



**Şekil 6.11.** Enzim miktarının immobilizasyona etkisi.

(■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-cmFDH; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-cmFDH)

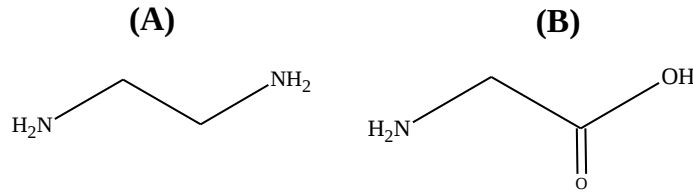
En iyi aktivitenin olduğu 0.05mg *cmFDH* enzim miktarı ile yapılan immobilizasyonda hem üst üste aktivitelerde hem de gün aktivitelerinde azalma mevcuttur (Çizelge 6.4). Enzim miktarı azaldıkça aktivitenin artması sonucu kararlı bir sistem elde edilmemiştir.

**Çizelge 6.4.** *cmFDH* aktivite verimi.

| İmmobilize Sistem                                    | 1.gün | 2.gün |
|------------------------------------------------------|-------|-------|
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA- <i>cmFDH</i> | 22±2  | 13±1  |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA- <i>cmFDH</i>     | 7±0.4 | 4±0.2 |

**Doyurma İşlemi-** Bağlanma kapasitesi deneyinden alınan sonuçlara göre nanopartiküllerin yarım doyurulmasına karar verilmiştir. 0.15mg protein kullanılarak yapılan immobilizasyonda protein bağlanmayan gruplarında doyurulması gerekir. Aksi takdirde aktivitede azalmaya neden olabilir. Ayrıca GA kullanılan sistemlerde proteinler

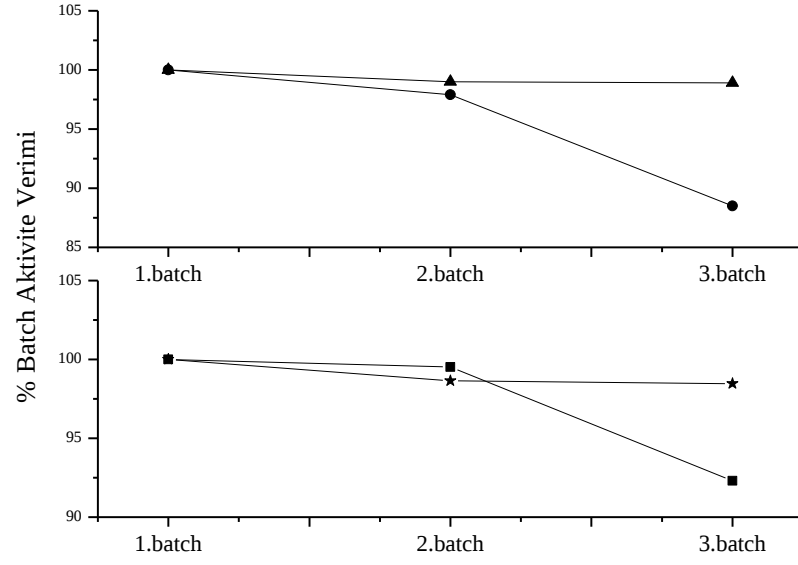
arası çapraz bağlanma gerçekleşebilir ve aktivite azalabilir. Grupları doyurma işlemi amino asit olan doygun konsantrasyonda GLY ile (Metot 1) ve EDA ile (Metot 2) gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.12).



**Şekil 6.12. (A) EDA ve (B) GLY yapısı.**

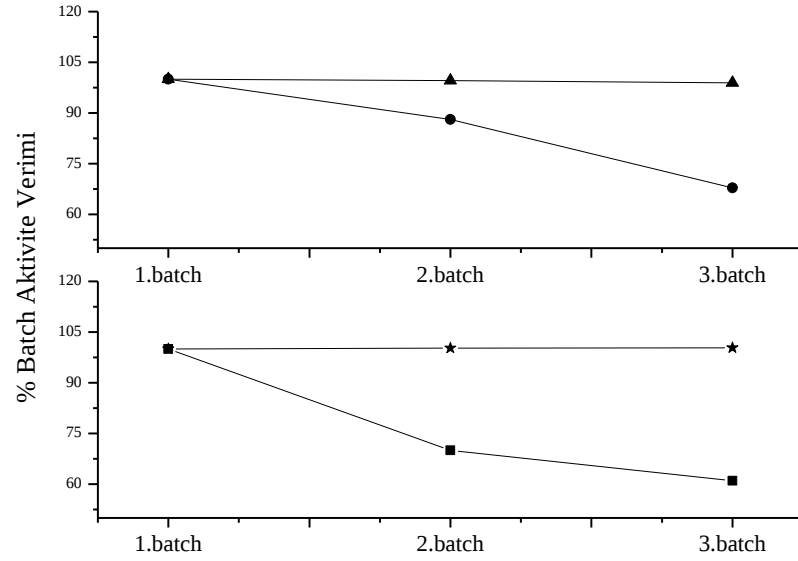
Tüm immobilizasyon sistemlerinden alınan örneklerle immobilizasyon esnasında ne kadar sürede enzimin bağlandığı bakılmıştır. Yarım saat sonra alınan örneklerle aktivite gözlenmemiştir. Bu süre sonunda sisteme direk GLY eklenmiştir. EDA ilavesi nanopartiküller yıkandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Bir buçuk saat sonra yıkanan nanopartiküllerle aktivite bakılmıştır. Doyurma işleminin akış şeması Ek 1.7’de verilmiştir.

EDA muamelesi ile doyurulan nanopartiküllerde ard arda kullanıldığında aktivitesinde azalma gözlenmiştir (Şekil 6.13 ve 6.14). Nedeni EDA yapısındaki  $-NH_2$  gruplarının diğer bir glutaraldehit ile bağ yapma olasılığı olabilir. Bu olası çapraz bağlanmalar enzim hareketini kısıtlayıp aktivitede azalmaya neden olabilir. GLY ile doyurma sonunda kalan glutaraldehit bağlı gruplar doyurulur ve hem ard arda yapılan reaksiyon aktiviteleri hem de gün aktiviteleri korunmaktadır.



Şekil 6.13. Glisin ve EDA etkisi (1.gün).

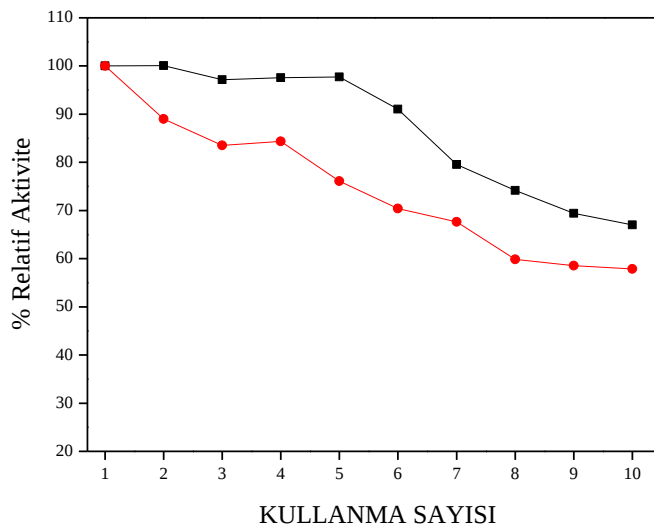
(▲ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-GLY; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-EDA; ■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-EDA; ★ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-GLY)



Şekil 6.14. GLY ve EDA etkisi (2.gün).

(▲ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-GLY; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-EDA; ■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-EDA; ★ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-GLY)

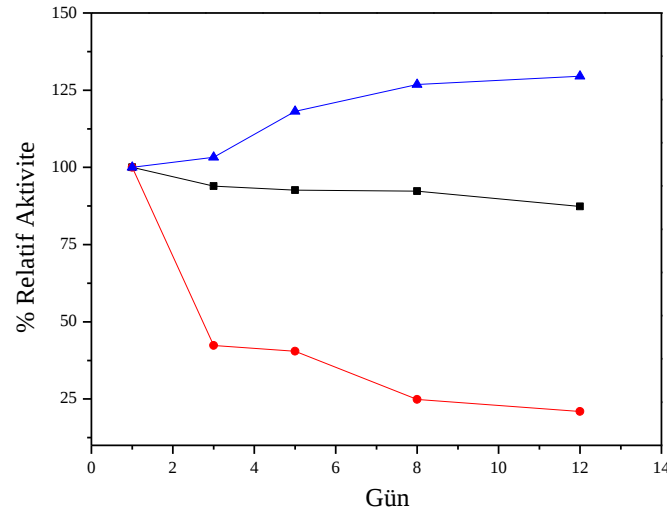
**Tekrarlı Kullanım Kararlılığı-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize *cmFDH* ard arda kullanma sonucunda elde edilen grafik Şekil 6.15'te verilmiştir. MN-DOP-MT3 partiküllerine immobilize enzimin ard arda 10 kez kullanıldıktan sonra aktivitesinin yaklaşık %70'i kalmıştır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize enzimin ise yaklaşık %60'i kalmıştır. Bu sonuçlara göre modifiye nanopartiküllerin modifiye olmamış partiküllere göre enzime kararlılık kazandırdığı anlaşılmıştır.



**Şekil 6.15.** Tekrarlı kullanım kararlılığı.

(■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-*cmFDH*; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-*cmFDH*)

**Saklama Tamponu-** 0.1mg BSA, 0.1mg *cmFDH* ve %25 gliserol içeren 50mM sodyum fosfat tamponları (pH 7.5) içinde saklanan immobilize *cmFDH* gün aktivite grafiği Şekil 6.16'da verilmiştir.

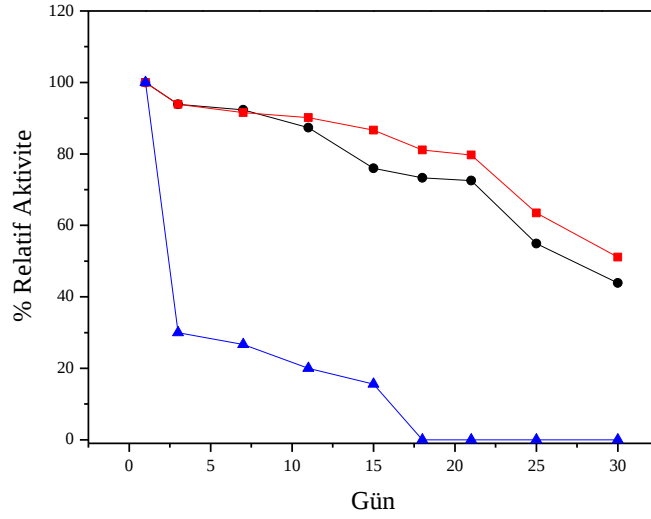


**Şekil 6.16.** Saklama tamponu etkisi.

(▲: Serbest *cmFDH*; ■: Gliserol; ●: BSA)

Grafiğe göre serbest enzim içinde saklanan immobilize sistemde aktivite artmaktadır. Doyurulmayan gruplara *cmFDH* bağlanması veya yüzeye enzimin adsorbe olması mümkündür. Çoğunlukla enzim kararlılığını sağlamak için kullanılan BSA içinde immobilize enzimin saklanması da enzime kararlılık sağlamamıştır. Ancak gliserol içinde saklanan sistem kararlılığını korumaktadır.

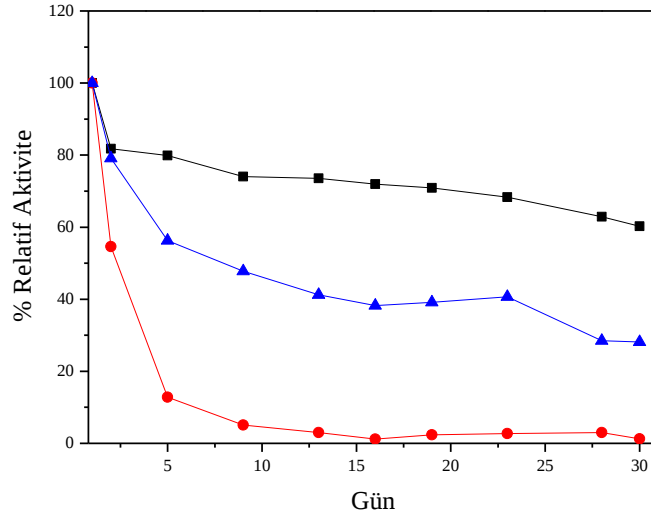
**Saklama Kararlılığı-** MN-DOP-MT3, MN-DOP-MT4 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize edilen *cmFDH* gün aktivitesi Şekil 6.17’de verilmiştir. MN-DOP-MT4 sistemine immobilize enzim aktivitesini 15. günden sonra kaybetmiştir. MN-DOP-MT3 sistemine immobilize enzim 30. gün sonunda aktivitesinin yaklaşık %50’sini korumaktadır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize edilen *cmFDH* aktivitesinin yaklaşık %40’ını korumaktadır. İlk 10 gün oldukça kararlı olan bu iki sistem 20. günden sonra aktivitelerini hızla kaybetmeye başlamıştır.



**Şekil 6.17.** Saklama kararlılığı.

(■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3-GA-cmFDH; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-cmFDH; ▲ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT4-GA-cmFDH)

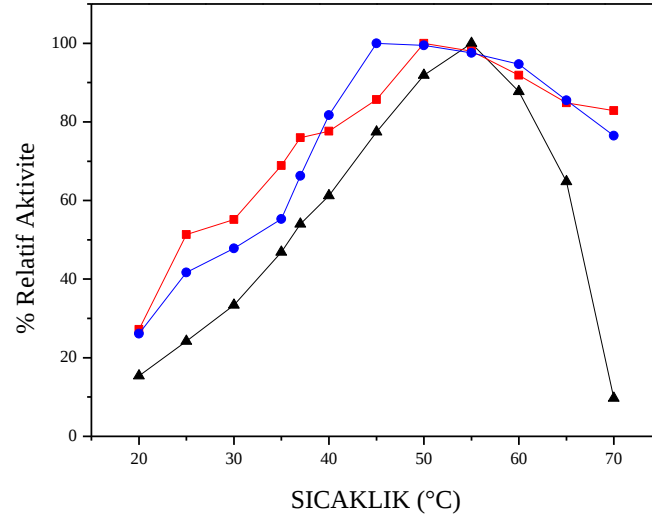
MN-CAF-MT1, MN-CAF-MT2 ve MN-OH nanopartiküllerine immobilize edilen *cmFDH* gün aktivitesi Şekil 6.18’de verilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-MT2 sistemine immobilize enzim aktivitesini 5. günden sonra ani düşüşle kaybetmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-MT1 sistemine immobilize enzim 30. gün sonunda aktivitesinin yaklaşık %30’unu korumaktadır. MN-OH partiküllerine immobilize edilen *cmFDH* aktivitesinin yaklaşık %60’ını korumaktadır. Modifiye edilmemiş partiküllere immobilize enzimin bu kadar kararlı olmasının nedeni yüzeyde oldukça fazla –OH grubunun olması ve bu gruplara enzimin direk bağlanmasıdır. Bağlanma kapasitesi yapılan deneylerde daha fazladır. Bu nedenle hem aktivite verimi yüksektir hem de fazla enzimin bağlanmasıyla enzimler birbirini korumaktadır.



**Şekil 6.18.** Saklama kararlılığı.

(▲: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-MT1-cmFDH; ■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-cmFDH; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-MT2-cmFDH)

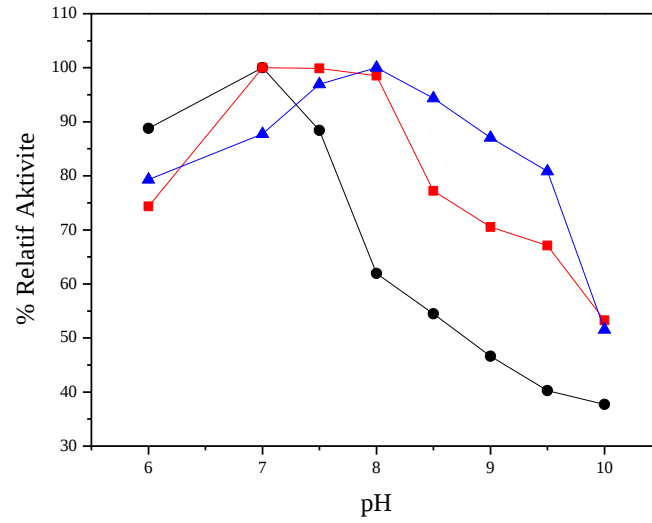
**Sıcaklık Etkisi-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize edilen cmFDH ve serbest cmFDH sıcaklık profili Şekil 6.19’da verilmiştir. Sıcaklık profiline göre serbest enzimin optimum sıcaklığı 55°C’dir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3 sistemine immobilize cmFDH optimum sıcaklığı 50°C’dir. Ancak aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık aralığı 50-60°C’dir. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize edilen cmFDH optimum sıcaklığı 45°C’dir. Ancak aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık aralığı 45-60°C’dir. İmmobilizasyonla cmFDH optimum sıcaklık aralığı genişlemiştir.



Şekil 6.19. Sıcaklık profili.

(▲ : Serbest *cmFDH*; ■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3-GA-*cmFDH*; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-*cmFDH*)

**pH Etkisi-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize edilen *cmFDH* ve serbest *cmFDH* pH profili Şekil 6.20’de verilmiştir.

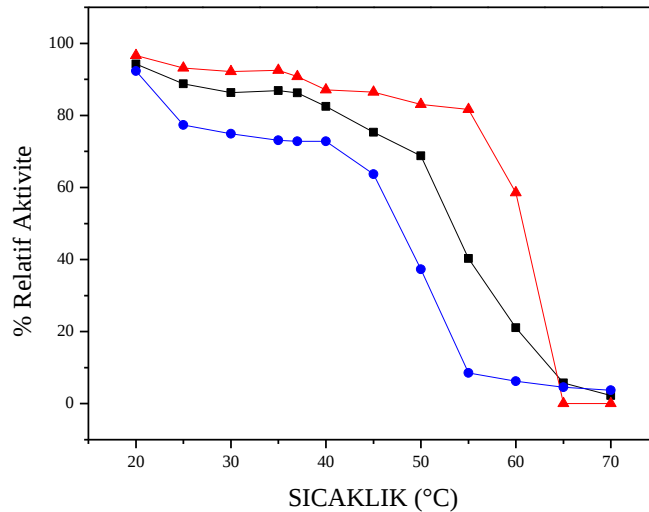


Şekil 6.20. pH profili.

(▲ : Serbest *cmFDH*; ■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3-GA-*cmFDH*; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-*cmFDH*)

Deneyin pH 6 değerinin altında yapılmama nedeni glutaraldehid reaksiyonunun asidik pH değerinde geri dönüşümlü olmasıdır. Bu nedenle deneyler en düşük pH 6 değerinde yapılmıştır. pH profiline göre serbest enzim optimum pH değeri 8’dir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3 sistemine immobilize *cm*FDH optimum pH değeri 7-8 arasındadır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize edilen *cm*FDH optimum pH değeri 7’dir.

**Termal Kararlılık-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize edilen *cm*FDH ve serbest *cm*FDH termal kararlılık grafiği Şekil 6.21’de verilmiştir. Serbest enzime göre immobilize enzimin termal kararlılıkları düşüktür. MN-DOP-MT3 sistemine immobilize enzim sıcaklığa karşı daha karardır. Serbest enzime göre aktivitenin düşmesine immobilizasyon sisteminde bulunan bağların kopması neden olabilir. Immobilizasyon sistemlerinin sıcaklıkla bozulması mümkündür.

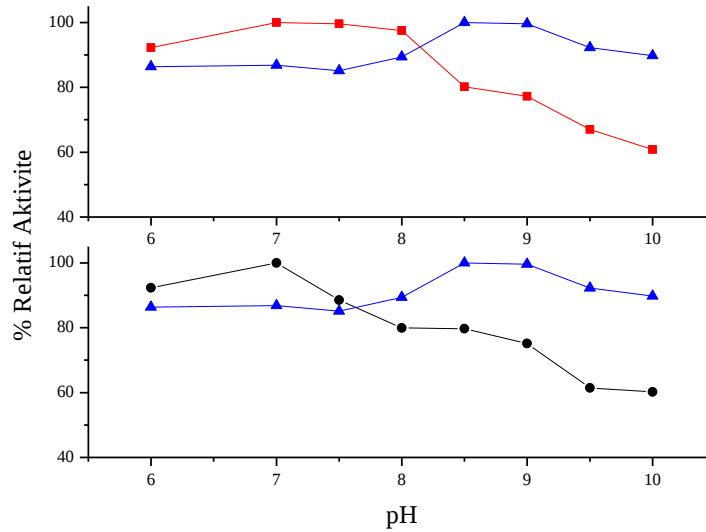


**Şekil 6.21.** Termal kararlılık.

(▲ : Serbest *cm*FDH; ■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3-GA-*cm*FDH; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-*cm*FDH)

**pH Kararlılığı-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize edilen *cm*FDH ve serbest *cm*FDH pH kararlılık grafiği Şekil 6.22’de verilmiştir. Serbest enzimin pH kararlılığı oldukça yüksektir. MN-DOP-MT3 sistemine immobilize enzim pH 8 değerine kadar oldukça karardır. Ancak pH 8’den sonra aktivite azalmıştır. Aynı

durum MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize edilen *cmFDH* için de geçerlidir. Çünkü farklı pH değerlerinde inkübasyon sonunda bekletilen immobilize sistemler santrifüjlendiğinde partiküller çökmemiştir. Bazı ortamlarda partiküller süspanse hale gelmiştir. Çökmeyen partiküller uzaklaştırıldığı için aktivite daha az olarak hesaplanmıştır.



Şekil 6.22. pH kararlılığı.

(▲ : Serbest *cmFDH*; ■ :  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DOP-MT3-GA-}cmFDH$ ; ● :  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GA-}cmFDH$ )

### 6.2.3. İmmobilize *btADH* Çalışmaları

**Bağlanma Kapasitesi-** Hem MN-DOP-MT3 ve MN-CAF-MT1 hem de MN-OH ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine aşırı miktarda *btADH* immobilize edildiğinde immobilizasyon sonunda süzültüde kalan ve yıkama tamponunda protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Çizelge 6.5). Yıkama tamponlarında protein belirlenememiştir. Bradford metodunun hassasiyeti göz önünde bulundurularak yıkama tamponlarında *btADH* aktivitesi bakılmış ve aktivite gözlenmemiştir. MN-DOP ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine bağlanma miktarı hemen hemen aynıdır. Ancak MN-OH partiküllerine bağlanma MN-CAF sistemine bağlanmadan daha fazladır. Çünkü yüzeyde daha fazla -OH grubu olduğu için kafeik aside göre daha fazla enzim bağlanmıştır.

**Çizelge 6.5.** *btADH* bağlanma kapasitesi.

| İmmobilize Sistem                                      | Molekül ağırlığı (kDa) | Bağlanan Protein (mg) |
|--------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-<i>btADH</i></b> | 39                     | 0,34±0,01             |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-<i>btADH</i></b>     |                        | 0,36±0,003            |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF-<i>btADH</i></b>    |                        | 0,27±0,003            |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-<i>btADH</i></b>        |                        | 0,38±0,003            |

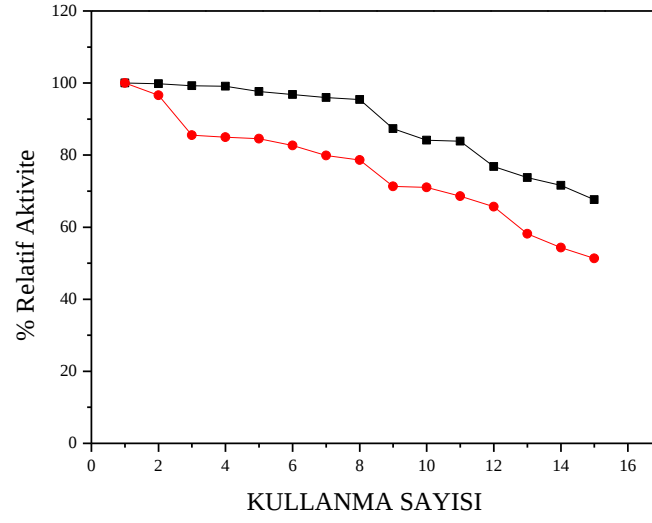
MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize *btADH* enziminin aktivite verimi hesaplandı (Çizelge 6.6).

**Çizelge 6.6.** İmmobilize *btADH* aktivite verimi.

| İmmobilize Sistem                                      | Aktivite verimi (%) |
|--------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-<i>cmFDH</i></b> | 53±0,4              |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-<i>cmFDH</i></b>     | 54±0,2              |

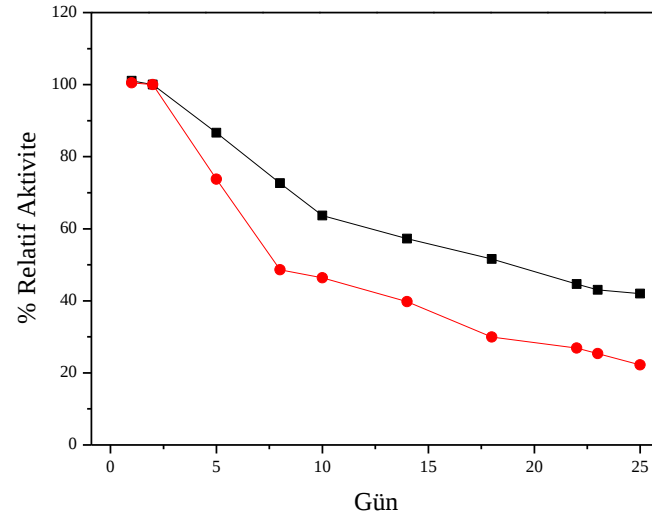
**Tekrarlı Kullanma Kararlılığı-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize *btADH* ard arda kullanma sonucunda elde edilen grafik Şekil 6.23'te verilmiştir. MN-DOP-MT3 partiküllerine immobilize enzimin ard arda 15 kez kullanıldıktan sonra aktivitesinin yaklaşık %70'i kalmıştır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize enzimin ise yaklaşık %50'si kalmıştır. Bu sonuçlara göre modifiye nanopartiküllerin modifiye olmamış partiküllere göre enzime kararlılık kazandırdığı anlaşılmıştır.

**Saklama Kararlılığı-** MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine immobilize *btADH* saklama kararlılık grafiği Şekil 6.24'te verilmiştir. 25.gün MN-DOP-MT3 sistemine immobilize *btADH* aktivitesinin yaklaşık %40'ını korumaktadır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize *btADH* ise aktivitesinin yaklaşık %20'sini korumaktadır. Bu sonuçlara göre modifiye edilmiş partiküller enzime kararlılık sağlamaktadır.



**Şekil 6.23.** Tekrarlı kullanım kararlılığı.

(■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3-GA-btADH; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-btADH)

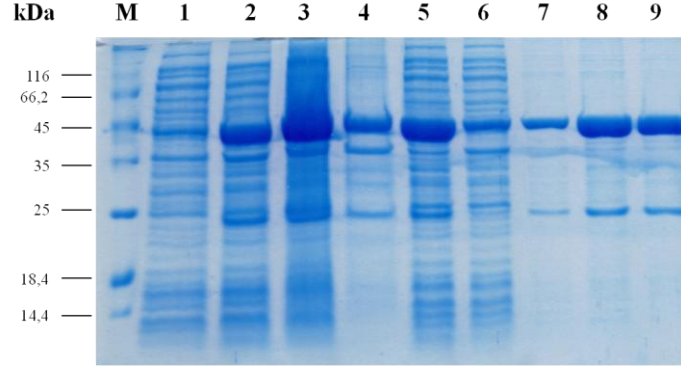


**Şekil 6.24.** Saklama kararlılığı.

(■ : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-MT3-GA-btADH; ● : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-btADH)

#### 6.2.4. İmmobilize OXDC Çalışmaları

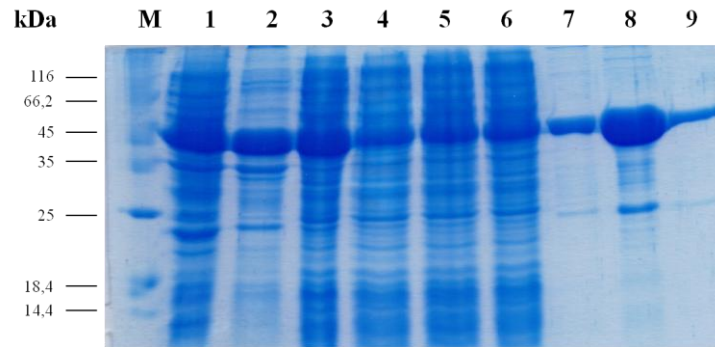
IPTG indüksiyonu ile OXDC ekspresyonu ve Ni-afinite kromatografisi ile saflaştırılan OXDC enzimi SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 6.25).



**Şekil 6.25.** IPTG ile OXDC ekspresyonu ve saflaştırılması.

**M:** Marker; **1:** IPTG öncesi; **2:** IPTG sonrası 2.saat; **3:** IPTG sonrası 4. saat; **4:** Sonikasyon sonrası pellet; **5:** Hücre özütü; **6:** Kolon çıkış; **7:** 100mM imidazol; **8:** 200mM imidazol; **9:** 400mM imidazol ile kolon çıkış.

Oto-indüksiyon besiyerinde büyütülen OXDC genini taşıyan pET32a plazmidini içeren BL21(DE3) hücrelerinde ekspresyon ve Ni-afinite kromatografisi ile saflaştırılan *btADH* enzimi SDS-PAGE ile görüntülendi (Şekil 6.26).



**Şekil 6.26.** Oto-indüksiyon ile OXDC ekspresyonu ve saflaştırılması.

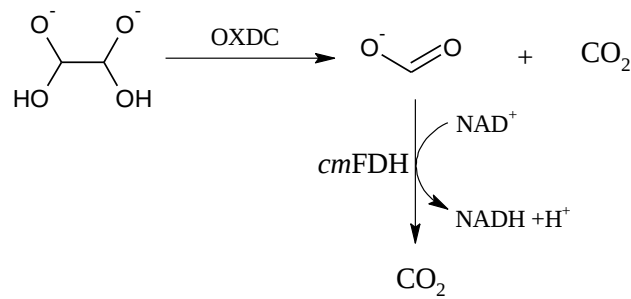
**M:** Marker; **1:** Ekspresyon pelleti; **2:** Sonikasyon sonrası pellet; **3:** Hücre özütü; **4:** Kolon çıkış; **5 ve 6:** 25mM imidazol; **7:** 100mM imidazol; **8:** 200mM imidazol; **9:** 400mM imidazol ile kolon çıkış.

**Bağlanma Kapasitesi-** Hem MN-DOP-MT3 ve MN-CAF-MT1 hem de MN-OH ve MN-NH<sub>2</sub> nanopartiküllerine aşırı miktarda OXDC immobilize edildiğinde immobilizasyon sonunda süzüntüde kalan protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Çizelge 6.7). MN-DOP ve MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine bağlanma miktarı hemen hemen aynıdır. Ancak MN-OH partiküllerine bağlanma MN-CAF sistemine bağlanmadan daha fazladır. Çünkü yüzeyde daha fazla -OH grubu olduğu için kafeik aside göre daha fazla enzim bağlanmıştır.

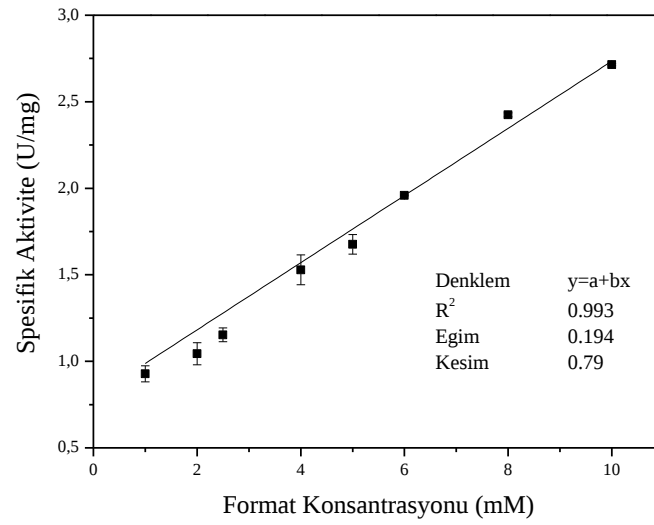
**Çizelge 6.7.** OXDC bağlanma kapasitesi.

| İmmobilize Sistem                           | Molekül ağırlığı (kDa) | Bağlanan Protein (mg) |
|---------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOP-GA-OXDC | 43,4                   | 0,32±0,02             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-OXDC     |                        | 0,35±0,04             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CAF-OXDC    |                        | 0,22±0,02             |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -OXDC        |                        | 0,32±0,04             |

**Aktivitesinin Belirlenmesi-** OXDC enziminin katalizlediği reaksiyon ve aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan *cmFDH* kullanımı Şekil 6.27’de verilmiştir. OXDC aktivitesinin belirlenmesi için 1-10mM format konsantrasyonuna karşı çizilen *cmFDH* spesifik aktivite grafiği Şekil 6.28’de verilmiştir.



**Şekil 6.27.** OXDC reaksiyonu.



**Şekil 6.28.** Kalibrasyon eğrisi.

Grafikten elde edilen değerlerle yapılan hesaplamalarla immobilize ve serbest OXDC reaksiyonu sonucu elde edilen format miktarı belirlendi (Çizelge 6.8).

**Çizelge 6.8.** Format konsantrasyonu.

|                     | <i>cm</i> FDH Spesifik Aktivite (U/mg) | Format C (mM) |
|---------------------|----------------------------------------|---------------|
| <b>Serbest OXDC</b> | 1,2±0,01                               | 1,98          |
| <b>DOP-OXDC</b>     | 1,0±0,02                               | 1,26          |
| <b>GA-OXDC</b>      | 0,9±0,02                               | 0,56          |
| <b>CAF-OXDC</b>     | 1,0±0,01                               | 1,16          |
| <b>EDC-OXDC</b>     | 0,9±0,02                               | 0,73          |

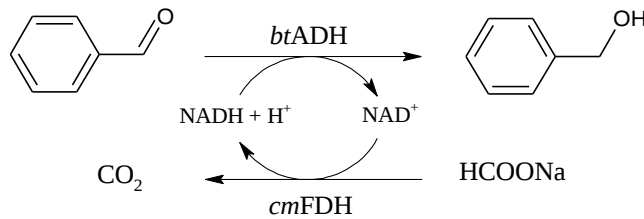
OXDC için 1 Unit dakikada ürüne dönüşen  $\mu$ mol substrat olarak tanımlanır. Çizelge 6.9’da serbest OXDC spesifik aktivitesi ve immobilize OXDC için aktivite verimleri verilmiştir.

**Çizelge 6.9.** OXDC spesifik aktivitesi ve immobilize OXDC aktivite verimleri.

|              | Format ( $\mu\text{mol/dk}$ ) | OXDC Spesifik Aktivite<br>(U/mg) | Aktivite Verimi (%) |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Serbest OXDC | $0,1\pm0,01$                  | 0,82                             |                     |
| DOP-OXDC     | $0,06\pm0,02$                 | 0,52                             | $63\pm0,02$         |
| GA-OXDC      | $0,03\pm0,02$                 | 0,23                             | $28\pm0,02$         |
| CAF-OXDC     | $0,06\pm0,012$                | 0,48                             | $59\pm0,01$         |
| EDC-OXDC     | $0,036\pm0,02$                | 0,30                             | $58\pm0,02$         |

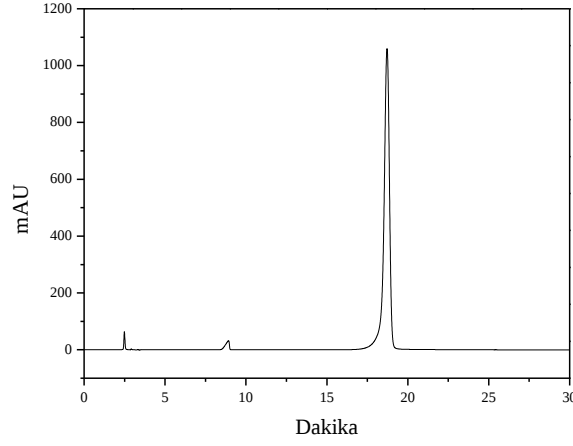
### 6.2.5. *btADH* ve *cmFDH* Koimmobilizasyonu

*btADH* ve *cmFDH* koimmobilizasyonunda substrat olarak benzaldehit (BZA) kullanılmıştır. *btADH* katalizli reaksiyon ve kofaktör rejenerasyonu Şekil 6.29’da verilmiştir.

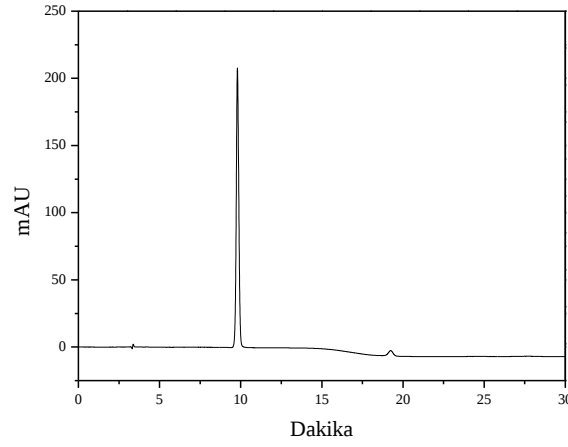


**Şekil 6.29.** *btADH* reaksiyonu ve kofaktör rejenerasyonu.

Substrat olan BZA ve standart olarak kullanılacak benzil alkol (BA) HPLC kromatogramları Şekil 6.30 ve 6.31’de verilmiştir. Analizlere göre BZA alıkonma zamanı 18 dakika, BA alıkonma zamanı 10 dakikadır.

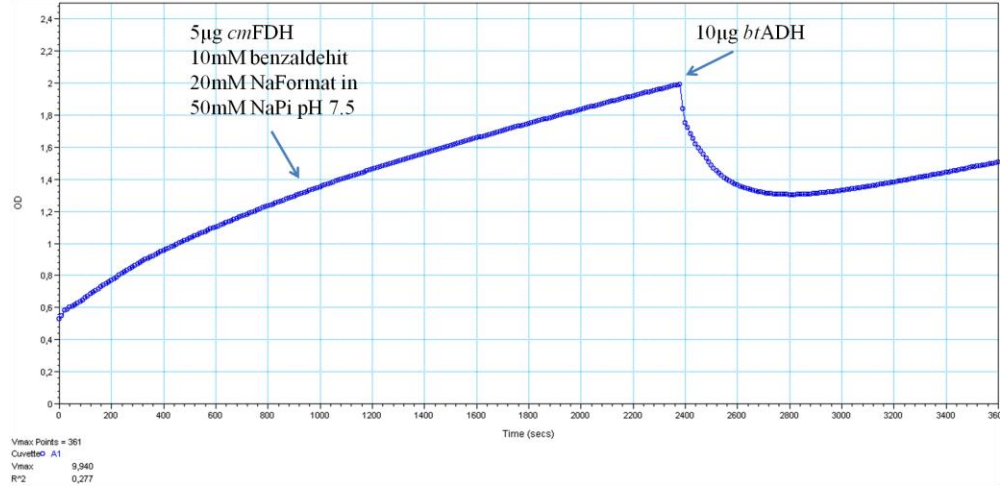


**Şekil 6.30.** BZA HPLC kromatogramı.



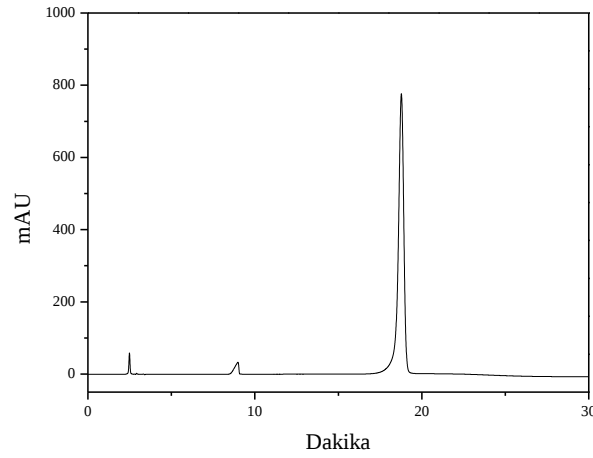
**Şekil 6.31.** BA HPLC kromatogramı.

İlk önce serbest *btADH* ve *cmFDH* enzimlerinin beraber çalışıp çalışmadığına bakılmıştır. Şekil 6.32'ye göre her iki enziminde reaksiyon şartlarında beraber çalışabildiği anlaşılmıştır. Sadece reaksiyonda kullanılan *btADH* miktarı *cmFDH*'e göre azdır (2:1). Çünkü reaksiyon *cmFDH* tarafına çalışmaktadır.



**Şekil 6.32.** *btADH* ve *cmFDH* beraber reaksiyonu.

Bu reaksiyonun HPLC kromatogramı Şekil 6.33'te verilmiştir. Analize göre ürün belirlenememiştir.



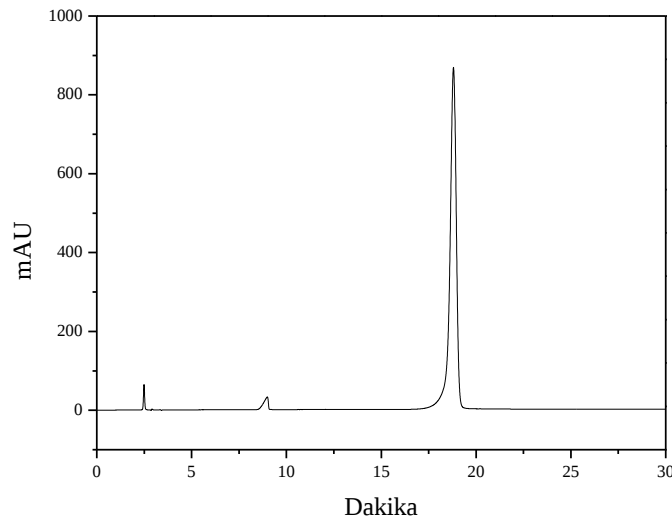
**Şekil 6.33.** Serbest *btADH* ve *cmFDH* sisteminin HPLC kromatogramı.

MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> pariküllerine beraber immobilize edilen *btADH* ve *cmFDH* enzimlerinin aktivitelere ayrı ayrı bakılmıştır. *btADH* aktivitesinde substrat olarak izopropil alkol, *cmFDH* aktivitesinde substrat olarak sodyumformat kullanılmıştır. Aktivite verimleri Çizelge 6.10'da verilmiştir. Beraber immobilize edilen her iki enzimin reaksiyon sonucu aktivite gözlenmiştir.

**Çizelge 6.10.** Koimmobilize *btADH* ve *cmFDH* aktivite verimleri.

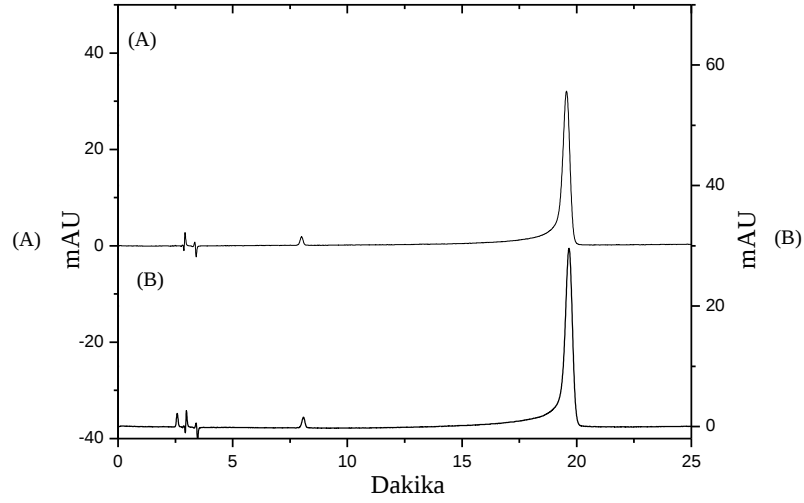
| İmmobilize Sistem                                                 | <i>btADH</i> için Aktivite Verimi (%) | <i>cmFDH</i> için Aktivite Verimi (%) |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP -<i>btADH</i>+<i>cmFDH</i></b> | 81±3                                  | 65±3                                  |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA -<i>btADH</i>+<i>cmFDH</i></b>  | 95±4                                  | 85±3                                  |

MN-DOP-MT3 partiküllerine beraber immobilize edilen *btADH* ve *cmFDH* (2:1) reaksiyonundan 4 saat sonunda alınan örneğin HPLC kromatogramı Şekil 6.34'te verilmiştir. Analize göre immobilize sistemde de ürün belirlenememiştir.



**Şekil 6.34.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-*btADH*+*cmFDH* sisteminin HPLC kromatogramı.

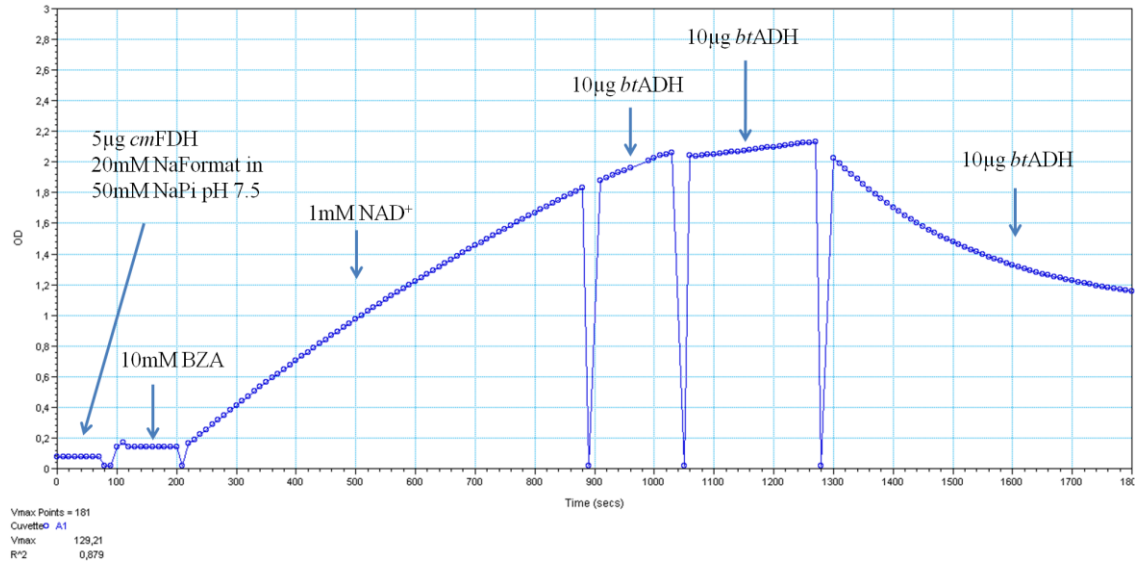
Sadece *btADH* reaksiyonunda ürün analizi için HPLC kromatogramı Şekil 6.35'te verilmiştir. Kontrol olarak kofaktör ilave edilmemiş reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Bu analize göre ürün belirlenememiştir.



**Şekil 6.35.** Serbest *btADH* reaksiyonunun HPLC kromatogramı.

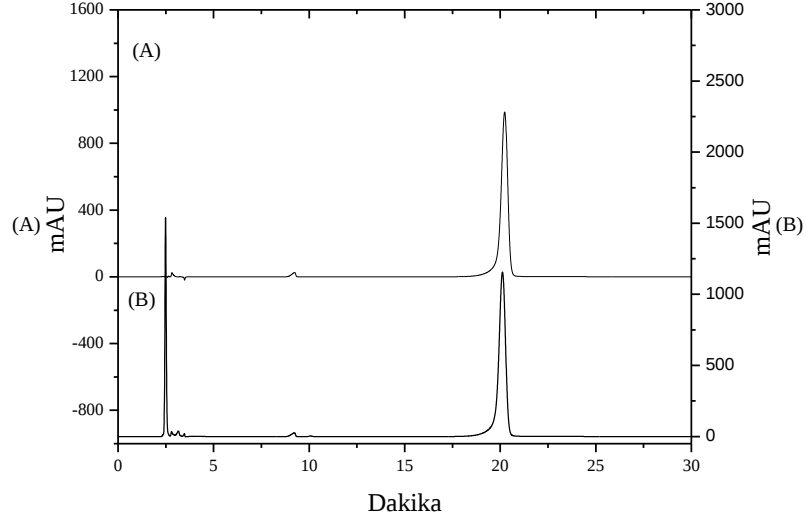
(A) Kontrol; (B) Reaksiyon.

Her iki enzimin miktarı aynı hızla çalışmaları için optimize edilmiştir. Şekil 6.36’da belirtildiği gibi *cmFDH* miktarının 6 kat fazlası *btADH* ilavesi ile reaksiyon *btADH* lehine dönmektedir.



**Şekil 6.36.** *btADH* ve *cmFDH* beraber reaksiyonu.

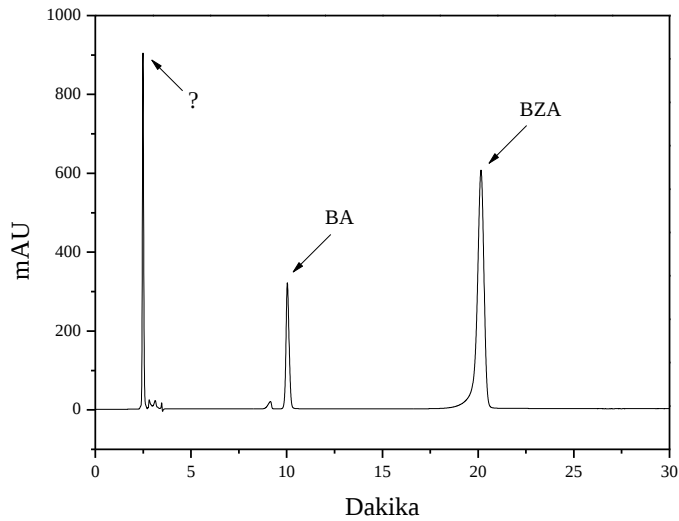
Bu reaksiyonun HPLC kromatogramı Şekil 6.37’de verilmiştir. Kofaktör ilave edilmeden reaksiyon ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Analize göre kontrolde olmayan ve alıkonma zamanı 2.5 dakika olan bir pik mevcuttur.



**Şekil 6.37.** Serbest *btADH* ve *cmFDH* sisteminin HPLC kromatogramı.

(A) Kontrol; (B) Reaksiyon.

BA alıkonma zamanı 10 dakika olmasına rağmen alıkonma zamanı 2.5 dakika olan bu pikin analizi için BA standardı ile reaksiyon karışımı karıştırılmıştır. Herhangi bir etkileşimle BA alıkonma zamanının değişme olasılığı göz önünde bulundurulmuştur. Şekil 6.38’de verilen HPLC kromatogramına göre 2.5 dakika da gelen bu pik BA değildir. Çünkü reaksiyon karışımına eklenen BA alıkonma zamanı hala 10. dakikada görülmektedir.

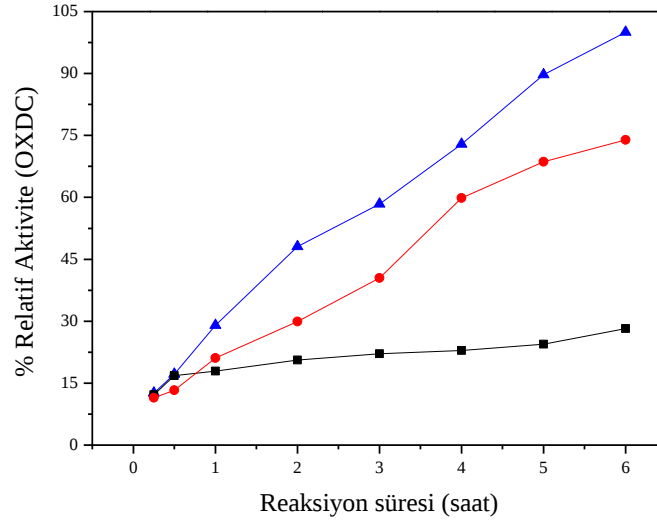


**Şekil 6.38.** BA ve reaksiyon karışımının HPLC kromatogramı.

Bu pik analiz esnasında toplanmış etilasetat ile ekstrakte edilmiş ve MALDI-TOF kütle spektrometresi ile ürün analizi yapılmıştır. Ancak herhangi bir kütle belirlenememiştir.

#### 6.2.6. OXDC ve *cm*FDH Koimmobilizasyonu

İmmobilize OXDC ve *cm*FDH sisteminin reaksiyonundan saat başı alınan örneklerin 340nm’de absorbens değeri ölçüldü. *cm*FDH aktivite hesabından sonra Şekil 6.28’de bulunan kalibrasyon eğrisinden oluşan format konsantrasyonu hesaplandı ve OXDC aktivitesi hesaplandı. Şekil 6.39’da ise 6. saat elde edilen OXDC aktivitesi 100 olarak kabul edilerek çizilen grafik mevcuttur. MN-DOP-MT3 ve MN-NH<sub>2</sub> sistemlerine immobilize enzimlerin % aktivitesi de serbest enzimlerin 6. saatinde elde edilen aktiviteye göre hesaplanmıştır.



**Şekil 6.39.** OXDC ve *cmFDH* koimmobilizasyon aktivite verimi.

(▲: Serbest OXDC+*cmFDH*; ■: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-OXDC+*cmFDH*; ●: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-OXDC+*cmFDH*)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-OXDC+*cmFDH* sistemi ile elde edilen OXDC aktivite verimi, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-OXDC+*cmFDH* sisteminden yaklaşık 2,5 kat fazladır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-OXDC+*cmFDH* sistemi aktivite verimi %73'tür. Modifiye olmamış nanopartiküllere immobilizasyonların tümünde olduğu gibi bu koimmobilizasyonda da modifiye olmamış nanopartiküllere immobilize enzim aktivitesi daha yüksektir.

*Şimdilik soruları yaşayın.*

*Bu şekilde belki ileride adım adım ve fark etmeden cevabın içine girebiliriz.*

*Rainer Maria Rilke*

## 7. GENEL SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kiral alkol sentezi için enzim-nanopartikül konjuge sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İmmobilizasyon matriksi olarak manyetik özelliği nedeniyle geniş kullanım alanı olan manyetik nanopartiküller kullanılmıştır. Biyokatalizör olarak endüstride birçok ticari değeri yüksek kimyasalın sentezinde kullanılan oksidoredüktaz enzimi olan alkol dehidrogenaz kullanılmıştır. Ekonomik immobilizasyon sistemlerinin geliştirilebilmesi için gerekli olan kofaktör rejenerasyonunda ikinci enzim olarak format dehidrogenaz kullanılmıştır.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan hem modifiye olmamış hem de katekol grupları ile modifiye manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Katekol grubuna sahip dopamin ve kafeik asit modifikasyonda kullanılmıştır. Manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri belirlenmiş ve yüzey modifikasyonları hakkında bilgi edinilmiştir. Her sistem için alınan FTIR spektrumları yüzeyde istenilen modifikasyonların olduğunu göstermiştir. TGA analizleri ile sıcaklık arttıkça meydana gelen kütle kayıplarından yüzey modifikasyonu hakkında bilgi edinilmiştir. PPMS ile elde edilen histeresis eğrilerinden manyetik nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik gösterdikleri anlaşılmıştır. Sahip oldukları Hc değerleri sıfıra yakın olduğu için partikül boyutlarının küçük olduğu ve süperparamanyetik özellikte olduğu belirlenmiştir (Vassiliou, Mehrotra et al. 1993). Yüzey bağlanmaları gerçekleştikçe Hc değerinde artış gözlenmiştir. Buda nanopartikül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokatalizör olarak kullanılacak *Staphylococcus saprophyticus*'dan ADH geni PCR metodu ile çoğaltılıp pET14b vektöründeki *NdeI* ve *XhoI* klonlama bölgelerine aktarıldı. Aktarılan gen *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzim kesimleri ile doğrulandı. Tahmini ADH genini içeren pET14b plazmidi BL21(DE3) hücrelerine aktarıldı ve protein ekspresyonu hem IPTG indüksiyonu ile hem de oto-indüksiyon besiyerinde gözlemlendi. Ancak hücre liziz edildikten sonra ADH proteinin hücre özütüne geçmediği sonikasyon sonrası pellette kaldığı anlaşılmıştır. *in vivo* doğru katlanmanın sağlanması için ozmolit etkisi, ısı şoku ile şaperon ekspresyonu, GroEL ve GroES şaperonları ile

ssADH proteinin koekspresyonu gibi birçok yol denenmiştir. Ancak yapılan tüm çalışmalar sonucu ADH proteininin inklüzyon cizimciği olarak eksprese olduğu anlaşılmıştır. *in vitro* tekrar katlanma çalışmalarından biri olan kromatografik yöntemlerden Ni-afinite kromatografisi kullanılmıştır. Kolonda tekrar katlanma işlemleri uygulandıktan sonra çözünür formda ssADH proteini elde edilmiştir. *in vivo* doğru katlanma ve *in vitro* tekrar katlanma çalışmalarıyla ilgili literatür bilgisi Ek 2’de verilmiştir. Elde edilen ssADH proteini ile etanol ve ketonlara karşı herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Substrat gibi davranan elektron alıcısı  $K_3[Fe(CN)_6]$  kullanılmıştır. Doğru katlanmanın söz konusu olduğu bir durumda kofaktörün bağlanma bölgesine bağlanması ve elektronları  $K_3[Fe(CN)_6]$  molekülüne aktarılması gerekir. *in vitro* doğru katlanma çalışmalarından elde edilen ssADH proteini bu substratla muamele edildiğinde 340nm kofaktör takibinde bir azalma gözlenmemiştir.

ssADH proteinin inklüzyon cisimciği olmasından dolayı *Bacillus thuringiensis* bakterisinden bölümümüz doktora öğrencisi Fatih AKTAŞ tarafından klonlanan ADH enzimi ikili enzim sistemiyle kiral alkol sentezi için kullanılacaktır. *btADH* genini içeren pET14b plazmidini BL21(DE3) hücrelerine transforme edilerek protein oto-indüksiyon besiyerinde eksprese edilmiş ve saflaştırılmıştır.

Ekonomik immobilizasyon sistemlerinin geliştirilebilmesi için gerekli olan kofaktör rejenerasyonunda kullanılacak olan *Candida methylica* kaynaklı format dehidrogenaz enzimi Rosetta (DE3) hücrelerinde eksprese edilmiş ve saflaştırılmıştır. *cmFDH* enziminin karakterizasyonu yapılmıştır. Michaelis-Menten grafiği çizilerek  $V_{max}$  değeri 3,8U/mg,  $K_m$  değeri 21,9mM olarak belirlenmiştir. Optimum çalışma sıcaklığı 55°C ve pH değeri 8 olarak yapılan deneyler sonucu belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda bir saat bekletildikten sonra aktivitesine bakılan *cmFDH* enziminin 55°C’ye kadar aktivitesini koruduğunu ve bu sıcaklıktan sonra ani bir düşüşle aktivitesini kaybettiği anlaşılmıştır. pH kararlığında ise geniş bir pH aralığında (pH 6-10) aktivitesini koruduğunu sadece %20 aktivite kaybı olduğu görülmüştür.

Katekol grubu ile modifiye ve modifiye olmamış manyetik nanopartiküllere kovalent olarak *cmFDH* enzimi bağlanmış ve çalışma şartları optimize edilmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesine bakılarak MN-DOP partiküllerine immobilize enzimin aktivite verimi  $74 \pm 4$  MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize enzimin aktivite verimi  $91 \pm 3$  olarak hesaplanmıştır. MN-DOP partiküllerine immobilize enzimin ard arda 10 kez kullanıldıktan sonra aktivitesinin yaklaşık %70'i kalmıştır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize enzimin ise yaklaşık %60'i kalmıştır. Bu sonuçlara göre modifiye nanopartiküllerin modifiye olmamış partiküllere göre enzime kararlılık kazandırdığı anlaşılmıştır. MN-DOP sistemine immobilize enzim 30. gün sonunda aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumaktadır. MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize edilen *cmFDH* aktivitesinin yaklaşık %40'ını korumaktadır. İlk 10 gün oldukça kararlı olan bu iki sistem 20. günden sonra aktivitelerini hızla kaybetmeye başlamıştır. Enzimin optimum sıcaklık ve pH aralığı genişlemiştir. Termal kararlılığı serbest enzimin daha fazladır. İmmobilize sistemlerin sıcaklığa karşı dayanıksız olması doğasından kaynaklanabilir ve yüzey modifikasyonları ile bağlayıcıların kopması aktivitede azalmaya neden olmuş olabilir.

Diğer immobilizasyon sistemi olan MN-CAF partiküllerine immobilize enzimin aktivite verimi %63 MN-OH partiküllerine immobilize enzimin aktivite verimi %92 olarak hesaplanmıştır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CAF sistemine immobilize enzim 30. gün sonunda aktivitesinin yaklaşık %30'unu korumaktadır. MN-OH partiküllerine immobilize edilen *cmFDH* aktivitesinin yaklaşık %60'ını korumaktadır. Modifiye edilmemiş partiküllere immobilize enzim aktivite veriminin yüksek olmasının nedeni yüzeyde oldukça fazla –OH grubunun olması ve bu gruplara daha fazla enzimin direk bağlanmasıdır.

OXDC ve *cmFDH* enzimleri hem MN-DOP-MT3 hem de MN-NH<sub>2</sub> partiküllerine immobilize edilmiştir. Bu enzimlerin koimmobilizasyonunda *cmFDH* reaksiyonu sonucu elde edilen 340nm'deki absorbans artışı takip edilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-OXDC+*cmFDH* sistemi ile elde edilen OXDC aktivite verimi, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOP-GA-OXDC+*cmFDH* sisteminden yaklaşık 2,5 kat fazladır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-OXDC+*cmFDH* sistemi aktivite verimi %73'tür. Modifiye olmamış nanopartiküllere immobilizasyonların tümünde olduğu gibi

bu koimmobilizasyonda da modifiye olmamış nanopartiküllere immobilize enzim aktivitesi daha yüksektir.

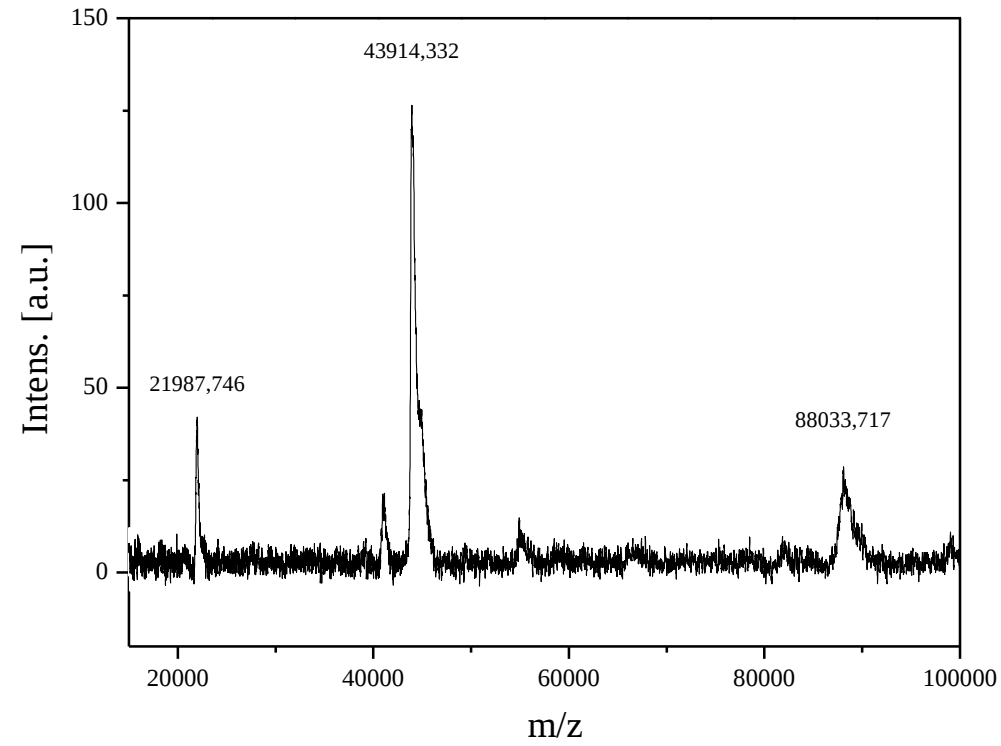
*btADH* enziminde substrat olarak benzaldehit kullanılmıştır. Ancak bu substratın ürünü olan benzil alkol HPLC ile belirlenememiştir. Bu nedenle *btADH* enziminin *cmFDH* ile koimmobilizasyonu yapılmasına rağmen ürün analizi yapılamamıştır.

İleriki çalışmalarda serbest enzimle yapılan çalışmalarda ürün analiz edilemediği için farklı substrat kullanımları ve analiz yöntemleri ile *btADH* ve *cmFDH* koimmobilizasyon sistemi optimize edilecektir.

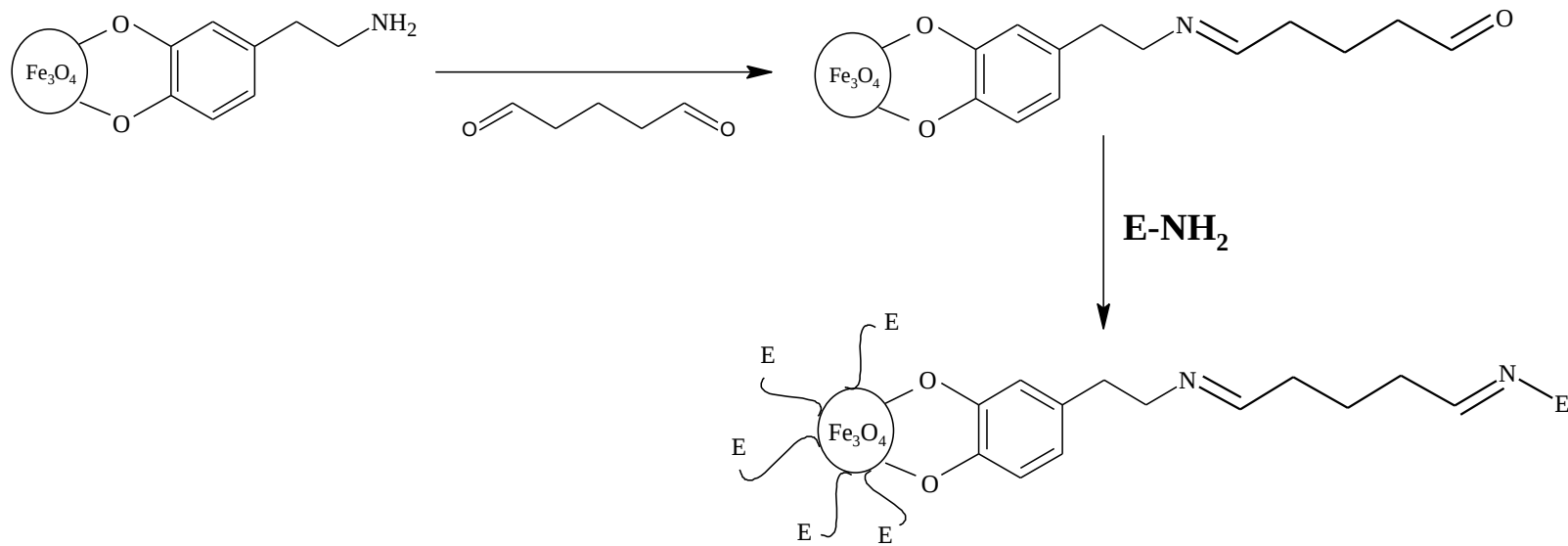
Çoklu enzim sistemlerinin nanopartiküllerle olan konjuge sistemlerinin geliştirilme çalışmalarının neticesinde birden fazla enzimin rol aldığı sistemlerin yaygın kullanımı sağlanmış olacaktır. Bu sayede özellikle endüstriyel kullanımları oldukça yaygın olan oksidoredüktazlar gibi nikotinamid kofaktörüne sitokiyometrik olarak ihtiyaç duyan enzimlerin endüstriyel kullanımı için bir engel aşılmış olacaktır.

## 8. EKLER

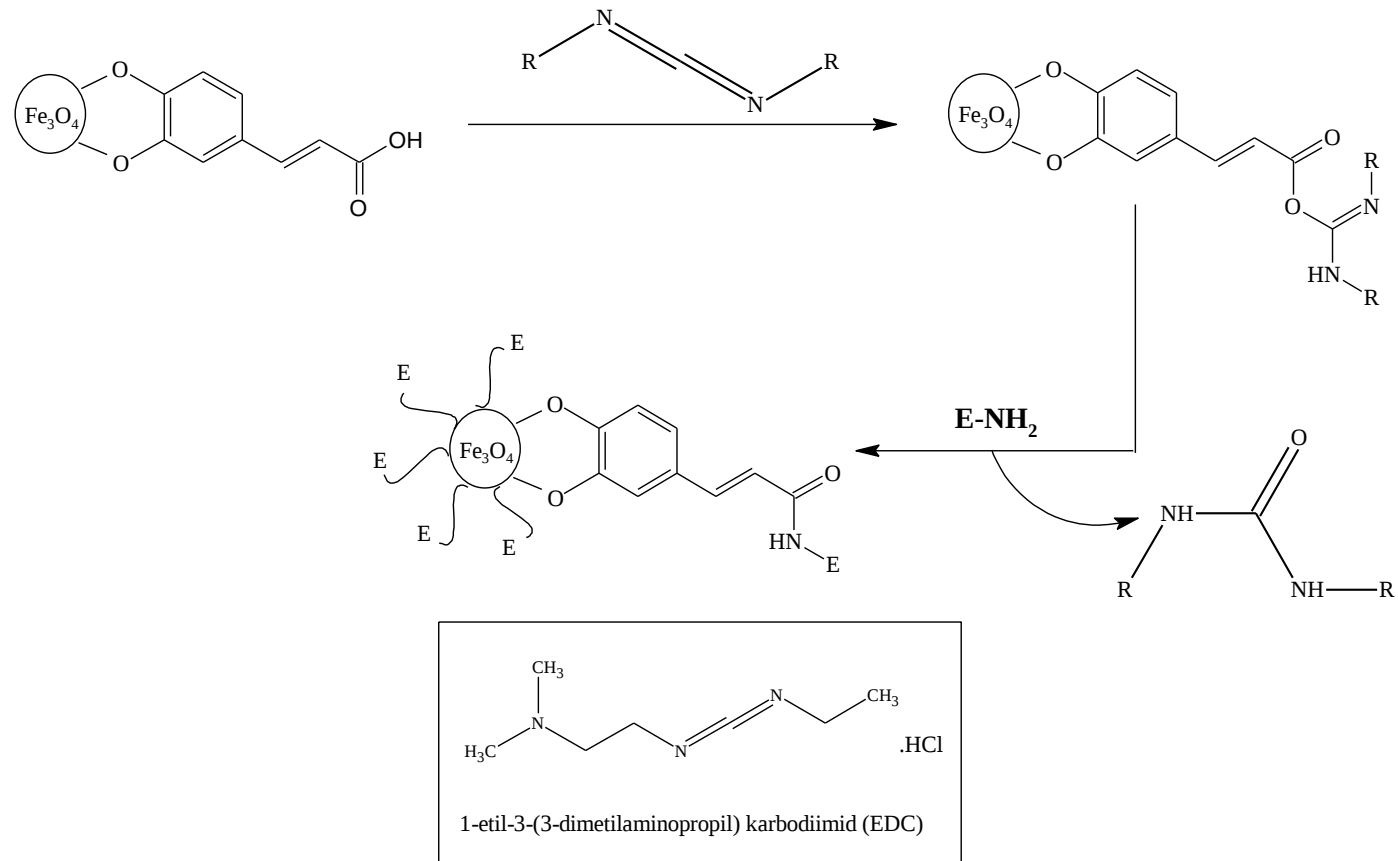
### 8.1. Ek 1



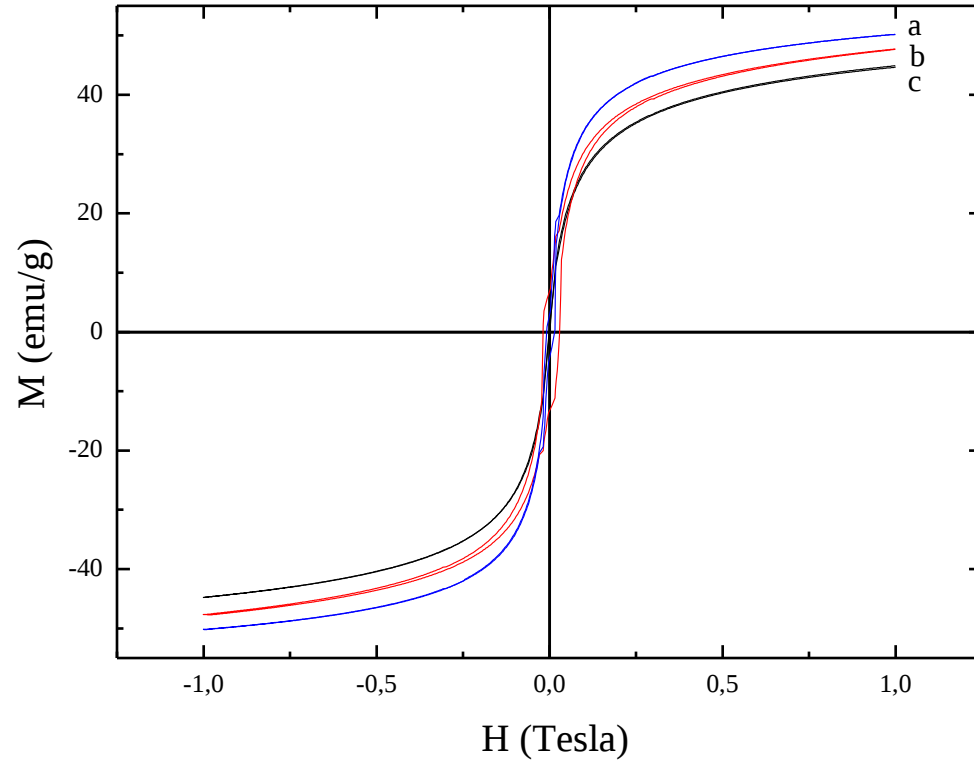
Şekil 1. ssADH MALDI-TOF kütle spektrumu.



Şekil 2. DOP ile modifiye nanopartiküllere enzim immobilizasyonu.

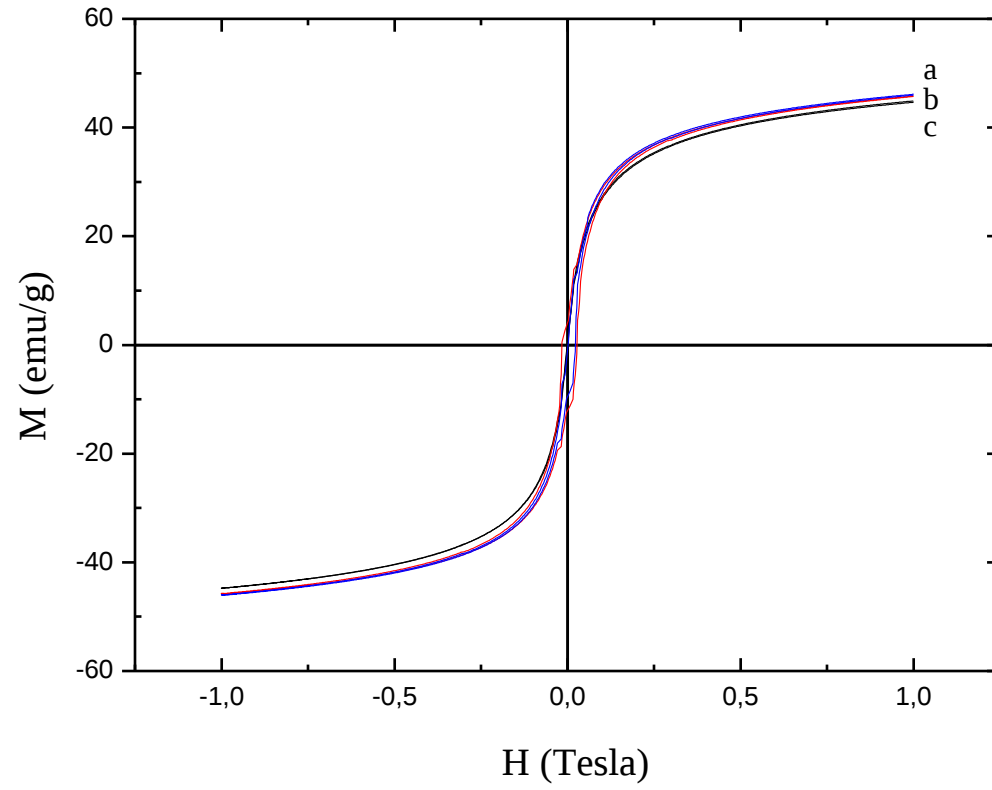


Şekil 3. CAF ile modifiye nanopartiküllere enzim immobilizasyonu.



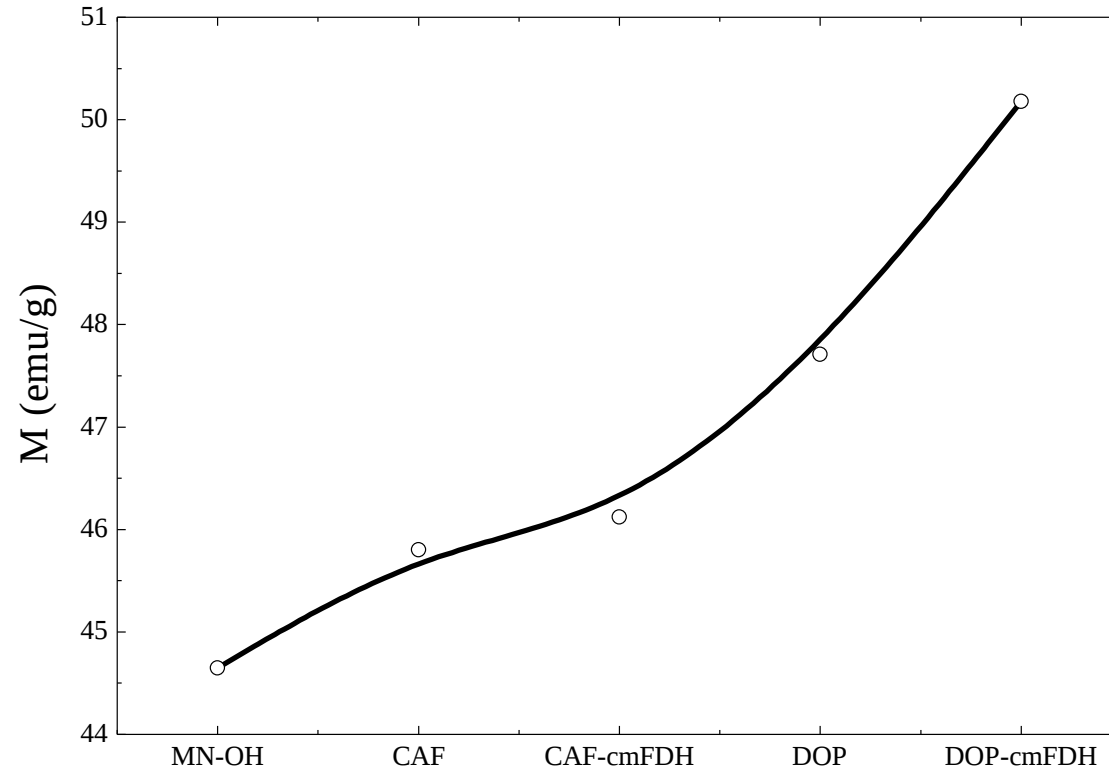
**Şekil 4.** Mıknatıslanma eğrileri.

**(a)**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP-GA-cmFDH; **(b)**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DOP; **(c)** MN-OH.

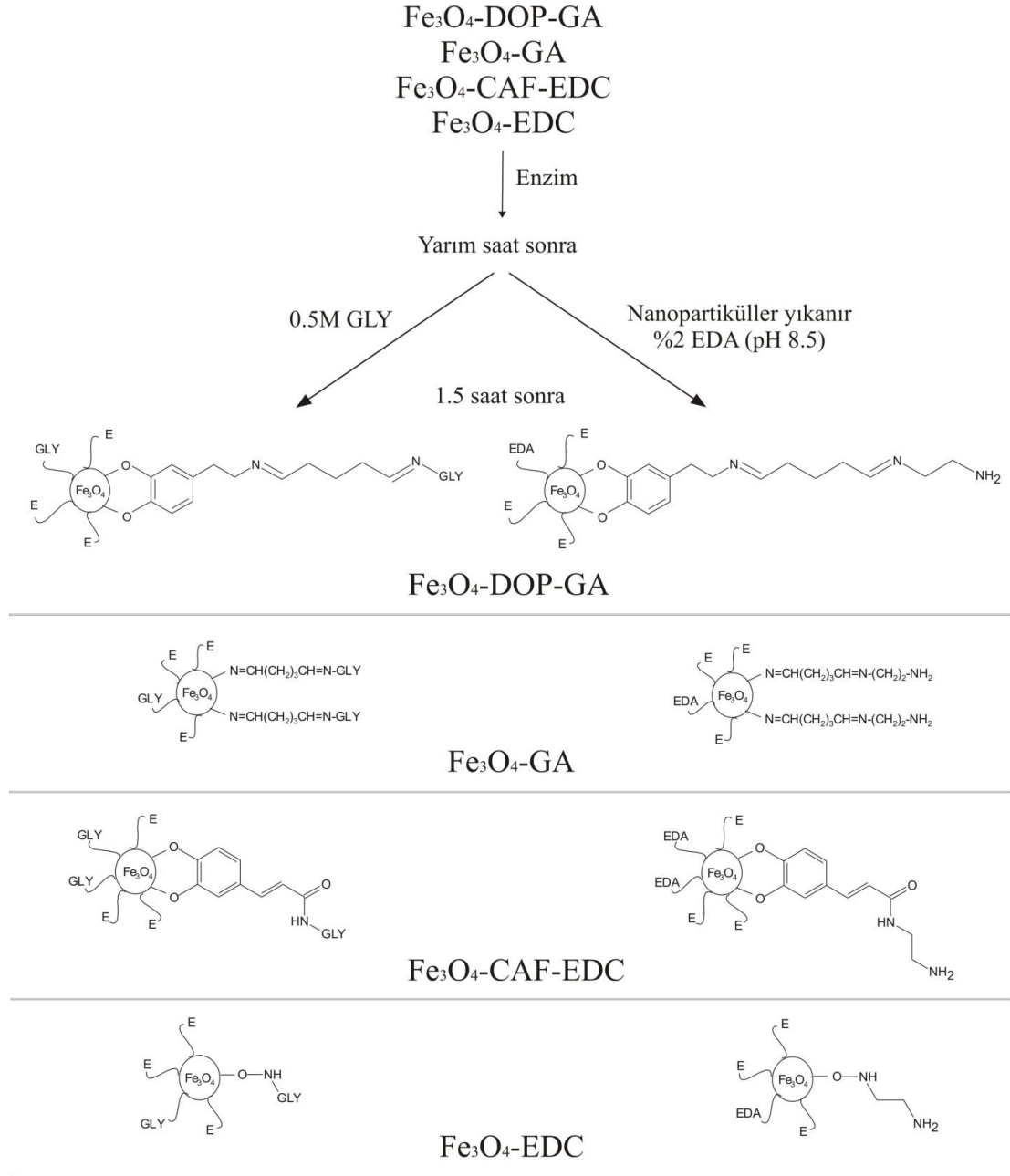


**Şekil 5.** Mıknatıslanma eğrileri.

**(a)**  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CAF-cmFDH}$ ; **(b)**  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CAF}$ ; **(c)** MN-OH.



Şekil 6. Doygun mıknatıslanma.



**Şekil 7.** Nanopartiküllerin doyurma işlemi.

## 8.2. Ek 2

### *İnklüzyon Cisimcikleri Hakkında Genel Bilgi*

Proteinlerin fonksiyonel esnekliği ve yapısal katılığı arasında hassas bir denge vardır. Bu yüzden doğal konformasyonlarını inaktif agregat konformasyonuna dönüştüren dış stresler veya mutasyonlar tarafından kolaylıkla etkilenebilirler. Biyolojik aktivitelerini kaybetmelerine ek olarak, çözünmeyen hidrofobik agregatlar membran fonksiyonlarına karışabilirler, diğer kararsız proteinlerin agregat oluşturmaya neden olabilirler (C, E et al. 1997; Ben-Zvi and Goloubinoff 2002; Kim, Nollen et al. 2002).

Ayrıca rekombinant proteinlerin *E.coli*'de yüksek miktarda ekspresyonu proteinin çökerek inklüzyon cisimciği oluşturmaya sebep olur (Bajoranaite, Sereikaite et al. 2007). İnklüzyon cisimcikleri protein ekspresyonu sırasında doğru katlanmamış ara ürünlerin sitoplazmada çökmesiyle meydana gelmektedir. *E.coli*'de eksprese edilen pek çok proteinin inklüzyon cisimciği oluşturmada proteinin kaynağı, kullanılan promotor ve hedef proteinin hidrofobik olmasıyla bir ilişkisi olmadığı bilinmektedir. Bu sebeple hangi proteinlerin *E.coli*'de ekspresyonu sırasında inklüzyon cisimciği oluşturup oluşturmayacağı ile ilgili bir genelleme yapılamaz (Choi, Keum et al. 2006).

Sitoplazmada doğru katlanmanın gerçekleştirilerek inklüzyon cisimciği oluşumunu önlemek için izlenebilecek çeşitli ekspresyon stratejileri geliştirilmiştir. Moleküler şaperonlarla birlikte ekspresyonun gerçekleştirilmesi, tercih edilen redoks potansiyelini sağlamak için tiyoredoksin içeren taşıyıcı hücre kullanımı, protein sentezinin azaltılması, daha etkili *E.coli* (Origami(DE3), Rosetta-gami (DE3), C41(DE3) ve C43(DE3) (Sorensen and Mortensen 2005) vb.) suşlarının kullanımı, hücrelerin daha düşük sıcaklıklarda büyütülmesi ve çözünebilen polipeptidlerin kullanımı gibi stratejiler mevcuttur (Choi, Keum et al. 2006).

Peptidil prolil izomerazlar gibi foldazlar ve IbpA/B, DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES ve ClpB moleküler şaperonlar aktif olarak geri dönüşümlü protein

yanlış katlanmasını ve agregasyonu geri döndürürler, pasif olarak da engellerler (Baneyx and Mujacic 2004).

Ayrıca Hsp70 (*E.coli*'deki DnaK, DnaJ, GrpE (KJE)) ve Hsp100 (*E.coli*'deki ClpB) moleküler şaperonları arasındaki ağ etkili olarak aktif çözünürlükte birlikte çalışırlar ve kararlı protein agregatlarını reaktif ederler (Glover and Lindquist 1998; Goloubinoff, Mogk et al. 1999; Ben-Zvi and Goloubinoff 2001; Diamant, Eliahu et al. 2001). Farklı kimyasal şaperonlar şaperon ağına etkileri farklıdır. ClpB ve KJE şaperonları tarafından protein disagregasyonunu ve tekrar katlanmasını betain fazlasıyla aktive ederken, trehaloz fazlasıyla inhibe eder (Diamant, Eliahu et al. 2001). Böylece çeşitli doğal organik bileşiklerin arasındaki konsantrasyon ve denge, şaperon aktivitesini doğrudan ayarlar ve birleşmiş tuz ve ısı stresi altında hücrelerdeki doğal proteinlerin termal kararlılığını etkiler (Diamant, Eliahu et al. 2001).

Membran akışkan olmasını sağlayan ısı şok-indükleyici benzil alkol, *E.coli* ve diğer organizmalarda, düşük sıcaklıklarda güçlü ısı-şoku gibi etki yaratır (Horváth, Glatz et al. 1998; Saidi, Finka et al. 2005; Shigapova, Török et al. 2005). Yapılan bir çalışmada BA, 20 dakikada DnaK ve GroEL şaperon protein seviyesini arttırdığı ve endojen şaperon ağ ekspresyonunu indükleyici olarak davrandığı bildirilmiştir (De Marco, Vigh et al. 2005). DnaK ve aynı kökenli moleküler şaperonlar hücrelere yüksek sıcaklık uygulandığında veya yüksek tuz konsantrasyonu gibi çevresel etkenlerle geçici olarak overeksprese olurlar (Gross, Straus et al. 1990). Farklı tuz konsantrasyonlarıyla DnaK aracılı üre ile denatüre edilmiş *Lactococcus lactis* kaynaklı laktat dehidrogenazın tekrar katlanması çalışılmıştır (Sugimoto, Nakayama et al. 2003).

Ekspresyon esnasında doğru katlanması sağlanamayan proteinlerin *in vitro* şartlarda doğal formunu kazanması sağlanır. Protein *in vitro* tekrar katlanması, proteinin denatüre edilirken molekül içi disülfid bağlarının indirgenmesi ve katlanma tamponuna oksitleyici kimyasalların ilavesiyle disülfid bağlarının tekrar oluşumu sonucunda denatüre edici kimyasalın uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilir (Berdichevsky, Lamed et al. 1999). Proteinin *in vitro* ortamda doğru şekilde katlanarak aktivitesinin geri kazanımı gerçekleştirilmeden önce saf haldeki inklüzyon

cisimcikleri 6M guanidyum hidroklorür veya 8M üre kullanılarak denatüre hale getirilir (Lilie, Schwarz et al. 1998). Ditiyoeritrol veya  $\beta$ -merkaptotanol kullanılarak sistein gruplarının indirgenmiş halde kalması ve disülfid bağları oluşumu için hazır hale getirilmesi sağlanır (Lilie, Schwarz et al. 1998). Çözünür hale getirilen inklüzyon cisimciklerinin *in vitro* ortamda doğru olarak katlanmasını sağlamak için denatüre edicilerin gradient uygulanarak diyaliz, seyreltme ve kromatografik yöntemlerle uzaklaştırılması gereklidir (Vallejo and Rinas 2004).

Tekrar katlanma sıcaklık, kullanılan tampon pH'sı ve iyon şiddeti gibi şartların optimizasyonu ile daha etkin hale getirilebilir. Renatürasyonu gerçekleştirecek protein disülfid bağları içeriyorsa renatürasyon tamponu redoks sistemini dengede tutabilmelidir. Bunun için düşük molekül ağırlığındaki indirgenmiş ve yükseltgenmiş formdaki glutatyon, sistein ve sisteamin gibi tiyol bileşiklerinin bir karışımı kullanılabilir (Lilie, Schwarz et al. 1998). Refolding verimini arttırmak için düşük molekül ağırlıklı bazı kimyasallar veya deterjanlar kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasalların bir kısmı katlanmayı arttırırken bir kısmı da çökelmeyi baskılayıcı olarak etki etmektedir (Bajorunaite, Sereikaite et al. 2007). L-Arjinin çökelmeyi baskılayıcı, siklodekstrinler (Rozema and Gellman 1996) ise proteinlerde çökelmeyi önleyici olarak kullanılmaktadır.  $\beta$ -siklodekstrin kromatografik olarak His-tag rekombinant proteinlerin *in vitro* tekrar katlanma çalışmalarında kullanılmıştır. Doğru katlanmanın sağlanması için proteinden hem denatüre edicinin hem de deterjanın uzaklaşması gerekir.  $\beta$ -siklodekstrin deterjanın uzaklaşmasını sağlayarak doğru katlanmaya yardımcı olur (Oganesyan, Kim et al. 2004).

### 8.3. Ek 3

#### **Agaroz jel elektroforezde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması**

##### **50XTAE**

242 gr Tris Base, 57.1 ml Asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA destile su içerisinde çözülerek 1 litreye tamamlanır.

##### **Agaroz jel (% 0.8)**

Agaroz (0.4 g) tartılır ve 1XTAE (50 ml) ile karıştırılır ve mikrodalga fırında ısıtılarak çözülür. Yaklaşık 55°C’de 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edilir. Hazırlanan çözelti kasete dökülür ve taraklar yerleştirilerek jelin donması beklenir. Donduktan sonra tarak çıkarılarak içerisinde 1XTAE (300 ml) ve etidyum bromür (12.5 µl, 10 mg/ml) bulunan elektroforez tankına yerleştirilir.

##### **Etidyum bromür (10 mg/ml)**

100 mg Etidyum bromür distile su içerisinde çözülerek 10 ml’ye tamamlanır. Filtre edilerek koyu renkli bir şişe içerisinde oda ısısında saklanır.

##### **6XDNA yükleme tamponu**

%0.15 Bromofenol mavisi, %30 Sükroz. Distile su içerisinde çözülerek 10 ml’ye tamamlanır. Koyu renkli bir şişe içerisinde oda ısısında saklanır.

#### **Besiyerler ve Hazırlanması**

##### **LB (Luria-Bertani) broth besiyeri**

Pepton (10 g/l), maya ekstrakt (5 g/l), NaCl (5 g/l) distile su içerisinde çözülerek pH 7’ye ayarlanır ve 1 litreye tamamlanır. Otoklavda 121°C’te 15 dakika sterilize edilir.

##### **LB (Luria-Bertani) agar besiyeri**

Pepton (10 g/l), maya ekstrakt (5 g/l), NaCl (5 g/l), agar (15 g/l) distile su içerisinde çözülerek pH 7’ye ayarlanır ve 1 litreye tamamlanır. Otoklavda 121°C’te 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra 55-60°C’ye soğutulduktan sonra gereken antibiyotik ilavesi yapıldıktan sonra temiz petrilere dökülerek katılaşmaya

bırakılır. Katılaşılan petrilere besiyerinin adı ve hazırlanış tarihi yazılarak 4°C’de muhafaza edilir.

### **SOC besiyeri**

%2 Pepton, %0.5 maya ekstrakt, 10 mM NaCl (2.92 g), 2.5 mM KCl (3.73 g), 20 mM MgCl<sub>2</sub> (20.2 g), 20 mM MgSO<sub>4</sub> (24.6 g), 20 mM glukoz (9.0 g). Distile su içerisinde çözülerek 100 ml’ye tamamlanır. 0.45’lik steril filtreden geçirilerek -20°C’de 200 µl’lik stoklar halinde saklanır.

### **Oto-indüksiyon besiyeri**

5 g maya ekstraktı, 20 g pepton, 5 g sodyum klorür, 6 g sodyum fosfat dibazik, 3 g potasyum fosfat monobazik tartılır; % 10’luk glukoz çözeltisinden 5 ml, % 60’lık gliserol çözeltisinden 10 ml ve % 8’lik laktoz çözeltisinden 25 ml eklenir. pH 7’ye ayarlanır ve hacim 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan besiyeri, 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

### **TB-Besiyeri**

24g maya ekstraktı, 12g pepton, 4ml gliserol 900ml deiyonize su içinde hazırlanır. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. 2.3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100ml deiyonize suda hazırlanır. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Besiyeri kullanılacağı zaman K tuzları çözeltisi eklenir.

### **M9 Tuzları Minimal Besiyeri**

#### **5xM9 Tuzları**

6.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25g NaCl, 0.5g NH<sub>4</sub>Cl deiyonize su ile 100ml hazırlanır.

Besiyeri kullanılacağı zaman;

20ml M9 tuzları çözeltisine steril 1M MgSO<sub>4</sub>, 1M CaCl<sub>2</sub>, 2ml %20 Glukoz çözeltisinden eklenir. Steril deiyonize su ile 100ml’ye tamamlanır.

### **SDS-PAGE’de Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması**

#### **% 10’luk APS Çözeltisi**

Amonyum persülfat (0.1 g) tartılarak 1 ml saf suda çözülür. Çözelti taze hazırlanmalıdır.

### **% 10'luk SDS Çözeltisi**

Sodyum dodesil sülfat (5 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve hacim 50 ml'ye tamamlanır.

### **% 30'luk Akrilamid Çözeltisi**

Akrilamid (30 g ) ve bis-akrilamid (0.8 g) tartılarak ve hacim 100 ml'ye tamamlanır.

### **1.5 M Tris Tampon (pH 8.9)**

Tris (36.34 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve pH'sı 8.9'a ayarlanır. Destile suyla hacim 200 ml'ye tamamlanır.

### **1 M Tris Tampon (pH 6.8)**

Tris (12.11 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve pH'sı 6.8'e ayarlanır. Destile suyla hacim 100 ml'ye tamamlanır.

### **SDS Yürütme Tamponu**

Tris (3.03 g), glisin (14.04 g) ve SDS (1 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür, hacim saf su ile 1 litreye tamamlanır.

### **6XÖrnek Yükleme Tamponu**

Bromophenol blue (6 mg), Tris tampon (0.9 ml, 1 M, pH 6.8), gliserol (3.75 ml) , SDS (4.5 ml, % 10 (wt/vol)), destile su (2.1 ml) karıştırılarak hazırlanır. Hazırlanan çözeltiden 375 µl tüplere aktarılır. Kullanılacağı zaman mikrotüpe, 125 µl β-merkaptoetanol ilave edilir.

### **Jel Boyama Çözeltisi**

250ml metanol, 50ml asetik asit ve 0.5g Coomassie brilliant blue destile su ile 500ml'ye tamamlanır.

### **Çözeltiler**

#### **Lizozim Çözeltisi**

10mg lizozim 1ml 50mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda hazırlanır.

#### **100mM PMSF Çözeltisi**

0.17g PMSF 10ml izopropil alkol içinde hazırlanır. -20°C'de saklanır.

**100 mM IPTG Çözeltisi:**

0.12 g IPTG steril su ile 5 ml'ye tamamlanır. -20°C'de saklanır.

**100 mM CaCl<sub>2</sub> Çözeltisi**

1.5 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

**100 mM MgCl<sub>2</sub> Çözeltisi**

2g MgCl<sub>2</sub> deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

**85mM CaCl<sub>2</sub> %15 Gliserol Çözeltisi**

1.2 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 15ml gliserol deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

**BCA Deneyi**

**Reaktif A-** 1g bicinchoninic acid, 2g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.16g sodyum tartarat, 0.4g NaOH, 0.95g NaHCO<sub>3</sub> 100ml deiyonize suya eklenir. Çözelti pH'sı NaOH ile 11.3'e ayarlanır.

**Reaktif B-** 4g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi 100ml deiyonize suda hazırlanır.

**Reaktif C-** Reaktif A ve B'nin (1:1) karıştırılması ile hazırlanır.

0.01-0.2mg/ml konsantrasyonlarda BSA standartları hazırlanır. Analiz edilecek örnekler ve standartlardan 100µl alınır ve 100µl Reaktif C ile karıştırılır. Örnekler 37°C'de yarım saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda örnekler 562nm'de okunur. Standart grafiği çizilir ve bilinmeyen konsantrasyon grafikten belirlenir.

## 9. KAYNAKLAR

"Polysciences Inc. Available at [www.polysciences.com](http://www.polysciences.com)."

- Abudiab, T. and R. R. Beitle Jr (1998). "Preparation of magnetic immobilized metal affinity separation media and its use in the isolation of proteins." Journal of Chromatography A **795**(2): 211-217.
- Ackerson, C. J., P. D. Jadzinsky, et al. (2006). "Rigid, specific, and discrete gold nanoparticle/antibody conjugates." Journal of the American Chemical Society **128**(8): 2635-2640.
- Albornoz, C. and S. E. Jacobo (2006). "Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **305**(1): 12-15.
- Atlas, R. M. (2004). Handbook of microbiological media, CRC.
- Babes, L., B. Denizot, et al. (1999). "Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study\* 1." Journal of Colloid and Interface Science **212**(2): 474-482.
- Bacri, J.-C., R. Perzynski, et al. (1990). "Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **85**(1-3): 27-32.
- Bagalkot, V., L. Zhang, et al. (2007). "Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer." Nano letters **7**(10): 3065-3070.
- Bajorunaite, E., J. Sereikaite, et al. (2007). "L-Arginine suppresses aggregation of recombinant growth hormones in refolding process from E-Coli inclusion bodies." Protein Journal **26**(8): 547-555.
- Bajorunaite, E., J. Sereikaite, et al. (2007). "l-Arginine Suppresses Aggregation of Recombinant Growth Hormones in Refolding Process from E. coli Inclusion Bodies." The Protein Journal **26**(8): 547-555.
- Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli." Nature biotechnology **22**(11): 1399-1408.
- Basak, S., D.-R. Chen, et al. (2007). "Electrospray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law." Chemical Engineering Science **62**(4): 1263-1268.
- Bayraktar H, Y. C.-C., Rotello V M and Knapp M J (2007). "Facial control of nanoparticle binding to cytochrome c." J. Am. Chem. Soc. **129**: 2732–2733.
- BCA™, M. "Protein Assay Reagent Kit."
- Ben-Zvi, A. P. and P. Goloubinoff (2001). "Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones." Journal of structural biology **135**(2): 84-93.
- Ben-Zvi, A. P. and P. Goloubinoff (2002). "Proteinaceous infectious behavior in non-pathogenic proteins is controlled by molecular chaperones." Journal of Biological Chemistry **277**(51): 49422.
- Berdichevsky, Y., R. Lamed, et al. (1999). "Matrix-assisted refolding of single-chain Fv-cellulose binding domain fusion proteins." Protein expression and purification **17**(2): 249-259.
- Blacker, A. and R. Holt (1997). Development of a multi-stage chemical and biological process for an optically active intermediate for an anti-glaucoma drug, John Wiley & Sons: Chichester: 245.

- Blacklock, T. J., P. Sohar, et al. (1993). "An enantioselective synthesis of the topically-active carbonic anhydrase inhibitor MK-0507: 5,6-dihydro-(S)-4-(ethylamino)-(S)-6-methyl-4H-thieno[2,3-b]thiopyran-2-sulfonamide 7,7-dioxide hydrochloride." The Journal of Organic Chemistry **58**(7): 1672-1679.
- Bommarius, A. S., M. Schwarm, et al. (1995). "Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine." Tetrahedron: Asymmetry **6**(12): 2851-2888.
- Boutry, S., S. Laurent, et al. (2006). "Specific E selectin targeting with a superparamagnetic MRI contrast agent." Contrast Media & Molecular Imaging **1**(1): 15-22.
- Bracher, F., Litz, T (1994). "Building blocks for the preparation of enantiomerically pure drugs containing a phenylalkylamine moiety." Arch. Pharm. **327**: 591-593.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Bulte, J. W. M. (2006). "Intracellular endosomal magnetic labeling of cells." Methods in molecular medicine **124**: 419.
- Burtea, C., S. Laurent, et al. (2005). "C-MALISA (cellular magnetic-linked immunosorbent assay), a new application of cellular ELISA for MRI." Journal of inorganic biochemistry **99**(5): 1135-1144.
- Burton, S. G. (2003). "Oxidizing enzymes as biocatalysts." Trends in Biotechnology **21**(12): 543-549.
- C, H., T. E, et al. (1997). "Inhibition of the electrostatic interaction between  $\beta$ -amyloid peptide and membranes prevents  $\beta$ -amyloid induced toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(17): 9412-9416.
- Charles, S. W. and J. Popplewell (1982). "Properties and applications of magnetic liquids." Endeavour **6**(4): 153-161.
- Chastellain, M., A. Petri, et al. (2004). "Superparamagnetic Silica Iron Oxide Nanocomposites for Application in Hyperthermia." Advanced Engineering Materials **6**(4): 235-241.
- Chiang, C. L., C. S. Sung, et al. (2005). "Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells." Journal of Chromatography B **822**(1-2): 54-60.
- Chin, A. B. and I. I. Yaacob (2007). "Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure." Journal of materials processing technology **191**(1-3): 235-237.
- Choi, J. H., K. C. Keum, et al. (2006). "Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli." Chemical Engineering Science **61**(3): 876-885.
- Chourpa, I., L. Douziech-Eyrolles, et al. (2005). "Molecular composition of iron oxide nanoparticles, precursors for magnetic drug targeting, as characterized by confocal Raman microspectroscopy." Analyst **130**(10): 1395-1403.
- Corot, C., P. Robert, et al. (2006). "Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging." Advanced Drug Delivery Reviews **58**(14): 1471-1504.
- De Marco, A., L. Vigh, et al. (2005). "Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in Escherichia coli by osmolytes, plasmid-or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones." Cell stress & chaperones **10**(4): 329.

- Di Marco, M., I. Guilbert, et al. (2007). "Colloidal stability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles with different coatings." International Journal of Pharmaceutics **331**(2): 197-203.
- Diamant, S., N. Eliahu, et al. (2001). "Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses." Journal of Biological Chemistry **276**(43): 39586.
- DJ, A. (1999). "Handbook of chiral chemicals Dekker, Inc., New York, United States of America."
- Dodds, A. Z. a. D. R. (1997). "Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals." Elsevier **2**: 513-531.
- Ferrari, M. (2005). "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges." Nature Reviews Cancer **5**(3): 161-171.
- Gao, X., Y. Cui, et al. (2004). "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots." Nature biotechnology **22**(8): 969-976.
- Glover, J. R. and S. Lindquist (1998). "Hsp104, Hsp70, and Hsp40:: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins." Cell **94**(1): 73-82.
- Goloubinoff, P., A. Mogk, et al. (1999). "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network." Proc Natl Acad Sci U S A. **96**(24): 13732–13737.
- Green, M. (1990). "[5] Avidin and streptavidin." Methods in Enzymology **184**: 51-67.
- Gross, C. A., D. B. Straus, et al. (1990). "The Function and Regulation of Heat Shock Proteins in Escherichia coli." Cold Spring Harbor Monograph Archive **19**(0): 167-189.
- Gupta, A. K. and M. Gupta (2005). "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications." Biomaterials **26**(18): 3995-4021.
- Hamley, I. (2003). "Nanotechnology with soft materials." Angewandte Chemie International Edition **42**(15): 1692-1712.
- Hee Kim, E., H. Sook Lee, et al. (2005). "Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **289**: 328-330.
- Hirakawa, H., N. Kamiya, et al. (2004). "Properties of an alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix K1." Journal of bioscience and bioengineering **97**(3): 202-206.
- Ho, K. C., P. J. Tsai, et al. (2004). "Using biofunctionalized nanoparticles to probe pathogenic bacteria." Analytical chemistry **76**(24): 7162-7168.
- Holt, R. A. and S. R. Rigby "International Patent WO94/05802."
- Horváth, I., A. Glatz, et al. (1998). "Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in Synechocystis PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene"." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(7): 3513.
- Hummel, W. and M.-R. Kula (1989). "Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds." European Journal of Biochemistry **184**(1): 1-13.
- Hummel W, R. B. (1997). "Alkohol-dehydrogenase und deren Verwendung zur enzymatischen Herstellung chiraler Hydroxyverbindungen. DE Patent 19610984 25 Sep 1997."
- Hussain W, P. D., Truppo M, Lye GJ (2008). "Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents." J Mol Catal B: Enzym **55**: 19-29.

- Inouye, K., R. Endo, et al. (1982). "Oxygenation of ferrous ions in reversed micelle and reversed microemulsion." *The Journal of Physical Chemistry* **86**(8): 1465-1469.
- Ito, A., M. Shinkai, et al. (2005). "Medical application of functionalized magnetic nanoparticles." *Journal of bioscience and bioengineering* **100**(1): 1-11.
- Jacobsen, E. N. P., A.; Yamamoto, H., Eds. (1999). *In Comprehensive Asymmetric Catalysis; Springer: Berlin* **1-3**.
- Jain, T. K., M. A. Morales, et al. (2005). "Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents." *Molecular Pharmaceutics* **2**(3): 194-205.
- Johnston, B., Slessor, K. (1979). "Facile synthesis of the enantiomers of sulcatol." *Can. J. Chem.* **57**: 233-235.
- Jolivet, J.-P., C. Chaneac, et al. (2004). "Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks." *Chemical Communications*(5): 477-483.
- Kaiser, R. and G. Miskolczy (1970). "Magnetic Properties of Stable Dispersions of Subdomain Magnetite Particles." *Journal of applied physics* **41**(3): 1064-1072.
- Kim, J., J. W. Grate, et al. (2008). "Nanobiocatalysis and its potential applications." *Trends in Biotechnology* **26**(11): 639-646.
- Kim, S., E. A. A. Nollen, et al. (2002). "Polyglutamine protein aggregates are dynamic." *Nature cell biology* **4**(10): 826-831.
- Kimata, M., D. Nakagawa, et al. (2003). "Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide." *Powder Technology* **132**(2-3): 112-118.
- Knowles, W. S. A. (2002). *Chem., Int. Ed.* **41**: 1998.
- Koneracká, M., P. Kopcanský, et al. (2002). "Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **18**(1-3): 13-18.
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., Wandrey, C. (1996). "Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example." *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 309-319.
- Kruse, W., Hummel, W., Kragl, U. (1996). "Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process." *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **115**: 239-243.
- Kruse, W., Kragl, U., Wandrey, C. (1998). "Process for the continuous enzymatic extraction of hydrophobic products and device suitable therefor." *Forschungszentrum Jülich GmbH, Germany, US 5,795,750*.
- Kula, M.-R. and C. Wandrey (1987). Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods in Enzymology*. M. Klaus, Academic Press. **Volume 136**: 9-21.
- Lee, S.-J., J.-R. Jeong, et al. (2004). "Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **282**: 147-150.
- Lewin, M., N. Carlesso, et al. (2000). "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells." *Nature biotechnology* **18**(4): 410-414.
- Liang, S. P., L.A. "Biocatalytic-based synthesis of optically pure (C-6)-functionalized 1-(tert-butyl)dimethyl-silyloxy-2-methyl-(E)-2-heptenes." *Tetrahedron Asym.* **1**: 445-452.
- Liese A, S. K., Buchholz A, Haberland J (2000). "Processes In: Industrial biotransformations." *Wiley-VCH, Weinheim, Germany*.: 93-392.

- Liese, A. and M. Villela Filho (1999). "Production of fine chemicals using biocatalysis." Current Opinion in Biotechnology **10**(6): 595-603.
- Lilie, H., E. Schwarz, et al. (1998). "Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*." Current Opinion in Biotechnology **9**(5): 497-501.
- Lindner, P. and T. Zemb (2002). Neutrons, X-rays, and light: scattering methods applied to soft condensed matter, Elsevier Amsterdam.
- Liu, H., J. Guo, et al. (2008). "Fabrication and Functionalization of Dendritic Poly(amidoamine)-Immobilized Magnetic Polymer Composite Microspheres." The Journal of Physical Chemistry B **112**(11): 3315-3321.
- Liu, Y. S., D.; Sellmyer, D. J. (2006). "Handbook of advanced magnetic materials." Springer; Tsinghua University Press: New York.
- Mahmoudi, M., S. Sant, et al. (2010). "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy." Advanced Drug Delivery Reviews.
- Martínez-Mera, I., M. E. Espinosa-Pesqueira, et al. (2007). "Synthesis of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles without surfactants at room temperature." Materials Letters **61**(23-24): 4447-4451.
- Mehta, R. V., R. V. Upadhyay, et al. (1997). "Direct binding of protein to magnetic particles." Biotechnology Techniques **11**(7): 493-496.
- Metrangolo-Ruiz De Temin˜o D, H. W., Ansorge Schumacher MB (2005). "Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* in polyvinylalcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents." Enzyme Microb Technol **36**: 3-9.
- Miller, M. M., G. A. Prinz, et al. (2002). "Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor." Applied Physics Letters **81**(12): 2211-2213.
- Modo, M., M. Hoehn, et al. (2005). "Cellular MR imaging." Molecular imaging: official journal of the Society for Molecular Imaging **4**(3): 143.
- Modo, M. M. J. J. and J. W. M. Bulte (2007). Molecular and cellular MR imaging, CRC.
- Mori, K. "Synthesis of optically active forms of sulcatol – The aggregation pheromone in the scolytid beetle, *Gnathotrichus sulcatus*." Tetrahedron Asym. **31**: 3011–3012.
- Morrison, S. A., C. L. Cahill, et al. (2005). "Atomic engineering of mixed ferrite and core-shell nanoparticles." Journal of nanoscience and nanotechnology **5**(9): 1323-1344.
- Mosbach, K., and Andersson, L. (1977). "Magnetic ferrofluids for preparation of magnetic polymers and their application in affinity chromatography." Nature **270**: 259–261.
- Nagesha, D. K., B. D. Plouffe, et al. (2009). "Functionalization-induced improvement in magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for biomedical applications." Journal of applied physics **105**(7): 07B317-307B317-313.
- Noyori, R. A. (2002). Chem., Int. Ed. **41**: 2008.
- Oganesyan, N., S. H. Kim, et al. (2004). "On-column chemical refolding of proteins." PharmaGenomics **4**: 22-26.
- Perrin, A., A. Theretz, et al. (1999). "Immunomagnetic concentration of antigens and detection based on a scanning force microscopic immunoassay." Journal of immunological methods **224**(1-2): 77-87.

- Peschko C, S. J. (2005). "Enzymatic method for the enantioselective reduction of keto compounds. EP Patent 1568780, 10 Feb 2005."
- Pfaller R, S. C. (2007). "Production of (S)-2-Butanol by oxidative racemate resolution. US Patent 0207529 A1, 23 Feb 2007."
- Pfaller R, S. J. (2007). "Method for the enzymatic production of chiral alcohols. US Patent Application 0212766 A1, 13 Sep 2007."
- Qiu, J., R. Yang, et al. (2005). "Preparation and characterization of porous ultrafine Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles." Materials Research Bulletin **40**(11): 1968-1975.
- R.A, H. and S. R. Rigby "US Patent 5,580,764."
- Ramchand, C. N., Pande, P., Kopcansky, P., and Mehta, R. V. (2001). "Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology." Indian J. Pure Appl. Phys. **39**: 683–686.
- Roberts, G. A., A. Celik, et al. (2003). "A self-sufficient cytochrome P450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center." Journal of Biological Chemistry **278**(49): 48914.
- Rozema, D. and S. H. Gellman (1996). "Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B." Journal of Biological Chemistry **271**(7): 3478.
- Rudolph, R., J. Gerschitz, et al. (1978). "Effect of Zinc(II) on the Refolding and Reactivation of Liver Alcohol Dehydrogenase." European Journal of Biochemistry **87**(3): 601-606.
- Safarikova, M., Roy, I., Gupta, M. N., and Safarik, I. (2003). "Magnetic alginate microparticles for purification of  $\alpha$ -amylases." J. Biotechnol. **105**: 255–260.
- Saidi, Y., A. Finka, et al. (2005). "Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology." Plant molecular biology **59**(5): 697-711.
- Saiyed, Z. M., Telang, S. D., and Ramchand, C. N. (2003). "Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine." BioMagn. Res. Technol. **1**(2).
- Salata, O. (2004). "Applications of nanoparticles in biology and medicine." Journal of nanobiotechnology **2**(3): 177-182.
- Salazar-Alvarez, G., M. Muhammed, et al. (2006). "Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution." Chemical Engineering Science **61**(14): 4625-4633.
- Shigapova, N., Z. Török, et al. (2005). "Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*." Biochemical and biophysical research communications **328**(4): 1216-1223.
- Sinclair, B. (2000). "Honing your cloning: new cloning systems give protein expression studies a boost." Scientist **14**(16): 29.
- Smith, P., R. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry **150**(1): 76-85.
- Sonvico, F., S. Mornet, et al. (2005). "Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments." Bioconjugate chemistry **16**(5): 1181-1188.
- Sophie Laurent, D. F., Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, and Robert N. Muller (2008). "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications." Chem. Rev. **108**: 2064–2110.
- Sorensen, H. and K. Mortensen (2005). "Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*." Microbial Cell Factories **4**: 1.

- Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures." Protein expression and purification **41**(1): 207-234.
- Sugimoto, S., J. Nakayama, et al. (2003). "Effect of heterologous expression of molecular chaperone DnaK from *Tetragenococcus halophilus* on salinity adaptation of *Escherichia coli*." Journal of bioscience and bioengineering **96**(2): 129-133.
- Sun, S., C. Murray, et al. (2000). "Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices." Science **287**(5460): 1989.
- Sun, Y.-k., M. Ma, et al. (2004). "Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **245**(1-3): 15-19.
- Tanaka, K., A. Ito, et al. (2005). "Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma." Journal of bioscience and bioengineering **100**(1): 112-115.
- Tschaen DM, A. L., Cai D, Desmond R, Dolling U-H, Frey L, Karady S, Shi Y-J, Verhoeven TR (1995). "Asymmetric synthesis of MK-0499." J Org Chem **60**: 4324-4330.
- Vallejo, L. F. and U. Rinas (2004). "Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins." Microbial Cell Factories **3**(1): 11.
- Vassiliou, J. K., V. Mehrotra, et al. (1993). "Magnetic and optical properties of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocrystals." Journal of applied physics **73**(10): 5109-5116.
- Wan, J., X. Chen, et al. (2005). "A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanorods." Journal of Crystal Growth **276**(3-4): 571-576.
- Wichmann, R., C. Wandrey, et al. (2000). "Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration." Biotechnology and Bioengineering **67**(6): 791-804.
- Xu, C. and S. Sun (2007). "Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications." Polymer international **56**(7): 821-826.
- Yang, H. H., S. Q. Zhang, et al. (2004). "Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations." Analytical chemistry **76**(5): 1316-1321.
- Young, K. L., C. Xu, et al. (2009). "Conjugating Methotrexate to magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles via trichloro-s-triazine." Journal of Materials Chemistry **19**(35): 6400-6406.
- Zhang, T., J. Ge, et al. (2007). "A General Approach for Transferring Hydrophobic Nanocrystals into Water." Nano letters **7**(10): 3203-3207.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

Betül GENÇ 21.02.1986 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında lisanstan mezun olduktan sonra Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaya başladı.