

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**GLİSİN VE ALANİN GİBİ AMFİPROTİK AMİNO ASİTLERDEN
ORGANİK-İNORGANİK HİBRİT NANO YAPILARIN SENTEZ
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Proje No: FLO-2016-6928

Proje Türü: Lisans Öğrencisi Katılımlı Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. İsmail Öçsoy
Eczacılık Fakültesi/Analitik Kimya

Araştırmacı:
Çağla Çelik
Eczacılık Fakültesi

05/2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

FLO-2016-6928 numaralı Lisans Öğrencisi Katılımlı Araştırma Projesi Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Projemize finansal desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkürü bir borç bilirim. Projenin çalışma süresince proje yürütücüsü olarak önemli katkıları olan, Doç. Dr. İsmail Öçsoy'a teşekkürlerimi sunarım. Projemiz kapsamında hizmet alımı Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ERÜ-TAUM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
Amino Asit-İnorganik Çiçek Benzeri Hibrit Nano Yapıların Sentezi	
Sentezlenecek Amino Asit-İnorganik Hibrit Nano Yapıların	
Karakterizasyonu	
4. BULGULAR	11
Amino Asit-İnorganik Çiçek Benzeri Hibrit Nano Yapıların	
Karakterizasyonu	
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	13
6.KAYNAKLAR	14

ÖZET

Enzimler oldukça etkili olan ve geniş kullanım alanına sahip biyokatalizörlerdir. Ancak serbest enzimlerin birçoğunun düşük stabiliteye, sınırlı yeniden kullanılabilirliğe sahip olması endüstriyel kullanımına engel olur. Bu dezavantajdan dolayı kimyasal modifikasyon ve immobilizasyon enzimleri daha etkin kullanmak için geliştirilmiş tekniklerdendir. Yakın zamanda yeni bir immobilizasyon yöntemi olarak çiçek şekilli organik-inorganik hibrit nano yapıların ‘nanoflowers’ sentezi gerçekleştirildi. Bu yeni immobilizasyon yönteminde inorganik komponent olarak metal iyonları, organik komponent olarak protein molekülleri kullanılmıştır. Amino asitler doğada bulunan tüm proteinleri ve peptidleri oluşturan en küçük birimlerdir. Organik komponent olarak proteinlerin kullanılmasıyla çiçek şekilli organik-inorganik hibrit nano yapıların (nanoflowers) sentezinden sonra yakın zamanda aminoasitlerin organik kısım olarak kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma; inorganik kısım olarak metal iyonlarının (Cu^{2+}) organik kısım olarak da doğal aminoasitlerin kullanılmasıyla oluşan hibrit nano yapıların senteziyle ilgili basit bir yöntem üzerinedir. Bu projede ise Glisin ve Alanin gibi amfiprotik amino grup asitlerden çiçek şekilli hibrit nano yapıların sentezi incelenmesi amaçlanmıştır. Amfiprotik olmaları sebebiyle izoelektrik noktaları dışında farklı pH değerlerinde sentez gerçekleştirilecektir. Bununla birlikte diğer sentez koşullarının (amino asit konsantrasyonu, inkübasyon süreleri) da değiştirilerek hibrit nano yapıların oluşumuna olan etkisinin incelenmesi ve ayrıca amin gruplarının uzaklaştırılıp amin gruplarının bu yapıların oluşumuna olan etkisinin araştırılması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glisin, Alanin, Hibrit Nanoyapılar, Formaldehit

ABSTRACT

Enzymes are highly effective and widely used biocatalysts. However, many of the free enzymes have low stability and limited reusability, which hinders industrial use. Due to this disadvantage, chemical modification and immobilization techniques were developed for more efficient use of enzymes. Recently 'nanoflowers' synthesis of flower-shaped organic-inorganic hybrid nano structures was performed as a new immobilization method. In this new immobilization method, metal ions are used as inorganic component and protein molecules are used as organic component. Amino acids are the smallest units that make up all the proteins and peptides found in nature. After the synthesis of flower-shaped organic-inorganic hybrid nanostructures (nanoflowers) by using proteins as organic component, a study has recently been carried out in which amino acids are used as the organic part. This work is based on the synthesis of hybrid nano-structures consisting of metal ions (Cu^{2+}) as inorganic part and natural amino acids as organic part (5). In this project, it is aimed to investigate the synthesis of flower shaped hybrid nano structures from amphoteric amino group acids such as Glycine and Alanine. Due to their being amphoteric, synthesis was carried out at different pH values except isoelectric points. However, it is aimed to investigate the effect of other synthesis conditions (amino acid concentration, incubation times) on the formation of hybrid nano structures and also to investigate the effect of amine groups on the formation of these structures by removing amine groups.

Keywords: Glycine, Alanine, Hybrid Nanostructures, Formaldehyde

1.GİRİŞ

Enzimler, biyoteknoloji, ilaç ve kimya endüstrilerinde yıllardır kullanılan güçlü biyokatalizörlerdir. Enzimlerin düşük stabilite, sınırlı yeniden kullanılabilirlik gibi dezavantajlara sahip olmaları nedeniyle çeşitli kimyasal modifikasyon ve stabilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Kimyasal modifikasyonda ise enzimler artmış katalitik aktiviteye rağmen düşük stabilite gösterirler. Ayrıca uzun zaman ve uzmanlık gerektirir, pahalı ve düşük verime sahiptir. Bu nedenlerden dolayı immobilizasyon yöntemi kimyasal modifikasyona göre tercih edilen yöntemdir. Genellikle immobilize enzimler tekrar kullanılabilirlik gösterirler ve ekonomiktirler. Ayrıca yüksek stabilite ve verimlilik gösterirler (1-3).

Enzimin çeşitli alanlarda kullanımını arttırmak ve verimini yükseltmek amacıyla Dr. Zare ve arkadaşları tarafından yeni bir immobilizasyon tekniği geliştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada organik kısım olarak BSA proteini inorganik kısım olarak da metal iyonu kullanılarak çiçek şekilli hibrit nano yapılar sentezlenmiştir. Geliştirilen bu yöntem enzim kullanılarak tekrarlandığında yüksek katalitik aktivite ve stabilite gözlenmiştir (6). Enzimlerin kullanıldığı bu immobilizasyon yöntemi peptid yapıların yapı taşı olarak kabul edilen amino asitlere de uygulanmıştır. Yakın zamanda yapılan bu çalışmada organik kısım ve inorganik kısım olarak sırasıyla doğal amino asitler ve metal iyonları kullanılmıştır. Bu çalışmada yapılan tipik bir deneyde; metal iyonu olarak Cu^{2+} iyonları, organik kısım olarak da Asparajin (Asn) amino asidinin fosfat tamponu içerisinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda çiçek şekilli nano yapılar elde edilmiştir. Oluşan nano yapıların yüzey-hacim ilişkileri incelendiğinde hiyerarşik bir oluşum meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca amino asitlerin farklı yan zincirlere sahip olması onların oluşturacağı nano yapılarda farklı morfolojik oluşumlara yol açabilir, metal iyonlarının oluşturacağı kompleks yapıların geometrisini etkileyebilir. Nanoflowers yapılarının oluşumu ve devamında gerçekleşen gelişme aşamaların en muhtemel mekanizmayla şu şekilde olduğu ileri sürülmektedir:

- 1- İlk olarak karboksil ve amid grupları arasında gerçekleşen koordinasyon bağlarının varlığında, kullanılan metal iyonu olan Cu^{2+} iyonu ile amino asit arasında kompleks oluşur. Aynı zamanda çözelti içinde asılı kalan veya çöken bakır fosfat yapıları da oluşur.
- 2- Bu aşamada metal iyonu ve amino asitten meydana gelen kompleksler yeni bir koordinasyon çekirdeği oluşturmak amacıyla çözeltide bulunan metal-fosfat çekirdeğinin etrafını sarar.

- 3- Metal-amino asit kompleksleri moleküler etkileşim yoluyla metal-amino asit ve metal-fosfattan oluşmuş çekirdeklenme bölgelerine atakta bulunmaya devam eder. Bu gelişim aşamasında küçük çiçek şekilli yapıların gözlemlenebileceği topaklar oluşup büyüyebilir.
- 4- Son aşamada metal-amino asit kompleksindeki amino asidin yan zincirinin sterik etkisi ve kompleksteki ligand-ligand etkileşimleri sonucu doğan yaprakların oluşturduğu çiçek şekilli gelişim aşamasını tamamlamış organik-inorganik hibrit yapılar gözlemlenebilir.(5)

2.GENEL BİLGİLER

Enzimler substratlarına özgüllük gösteren ve reaksiyon hızını arttıran biyokatalizörlerdir. Ayrıca canlı hücrelerde aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime için gerekli enerjiyi en düşük düzeye çeker. Enzimler günümüzde tıp, eczacılık, kimya alanlarında çok geniş kullanım alanına sahiptir (7-9). Bu geniş kullanım alanına sahip olması nedeniyle enzimleri daha verimli ve etkin şekilde kullanmak için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. İmmobilizasyon yöntemi en yaygın olarak kullanılan tekniklerdendir. Bu yöntemde nano malzemeler destek görevi görür ve enzim kovalent, kovalent olmayan, kapsülleme ve çaprazlama gibi bağlama yöntemleriyle bu destek üzerine tutturulur (10). Son zamanlarda çiçek şekilli nano yapılar sentezlenmiştir yeni bir immobilizasyon tekniği olarak. Böylece enzimlerin katalitik aktivite ve stabilitelerinde artış gözlenmiştir. Bu çalışmada organik kısım olarak enzimler kullanılmıştır. Çok yakın bir zamanda yapılan başka bir çalışma ise organik kısım olarak amino asitlerin kullanılması üzerinedir. Organik kısım olarak doğal amino asitler ve inorganik kısım olarak metal iyonları kullanılmıştır ve çiçek şekilli hibrit nano yapılar elde edilmiştir (5). Önerilen proje ise bu çalışmayı bir adım ileriye götürmeyi amaçlamaktadır. Projenin konusu Glisin ve Alanin gibi amfiprotik amino asitlerden organik-inorganik hibrit nano yapıların sentez mekanizmasının incelenmesi üzerinedir. Bu amino asitlerin amfiprotik olması nedeniyle izoelektrik noktalarının altında ve üstünde oluşabilecek nano yapılarda oluşan morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca sentez için bırakılan inkübasyon süresi, nano yapıların sentezinde kullanılacak amino asit konsantrasyonları değiştirilerek yine morfolojik çıktıları incelenmiştir. Ayrıca amino asitlerdeki amin gruplarının amino asitin organik hibrit nano yapılar üzerine etkisi araştırılması hedeflenmiştir. Projedeki bu uygulamalardaki amaçları, yüksek katalitik aktivite ve kararlılık gösterebilecek en uygun yapıdaki amino asit-inorganik hibrit nano yapıları keşfetmek ve amin gruplarının etkisini araştırarak diğer moleküller için öngörü oluşturması şeklinde sıralanabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

1.Amino Asit-İnorganik Çiçek Benzeri Hibrit Nano Yapıların Sentezi

Çalışmada hibrit yapıların hazırlanmasında organik kısım olarak Glisin ve Alanin gibi amfiprotik amino asitler; inorganik kısım olarak CuSO_4 kullanılmıştır. İlk olarak PBS çözeltisine (50 mL) 60 ml amino asit çözeltisi (1 mg mL^{-1}) eklenip karıştırılır ve devamında 20 mL CuSO_4 (0,08 mM) eklenir. Hazırlanan bu çözelti oda sıcaklığında 3 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi bitiminde oluşan çökelti santrifüj edilir ve 3 kez deiyonize suyla yıkanır.(5) Glisin ve Alanin amino asitlerinin izoelektrik noktalarının altında ve üstünde organik-inorganik hibrit nano yapıların sentezinin araştırılması için farklı pH'larda hazırlanan PBS tamponları (pH 1-3-5-7-9) kullanılmıştır. Glisin ve Alanin amino asitlerinin farklı konsantrasyonlarının ve reaksiyon zamanının organik-inorganik hibrit nano yapılarının oluşumuna etkisinin incelenmesi için sentezde kullanılan amino asit çözeltileri farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Reaksiyon zamanının etkisini araştırmak için inkübasyon süreleri (1-3-6-12-24-48-72 saat) değiştirilmiştir.

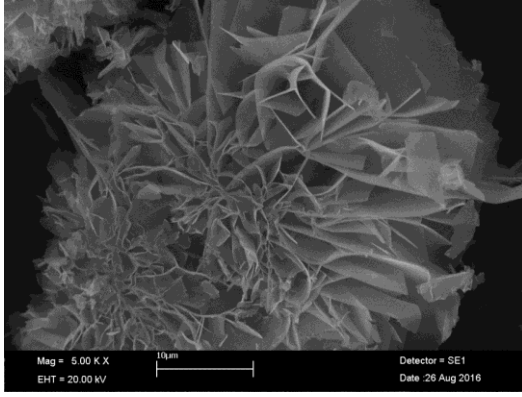
2. Sentezlenen Amino Asit-İnorganik Hibrit Nano Yapıların Karakterizasyonu

Glisin ve Alanin amino asitlerinden sentezlenecek organik-inorganik hibrit nano yapıların morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. X-ışını kırınım (XRD) ile amino asit içeren hibrit nano yapıların kristal yapıları aydınlatılırken, XRD ile hibrit nano yapıların oluşları incelenmiştir.

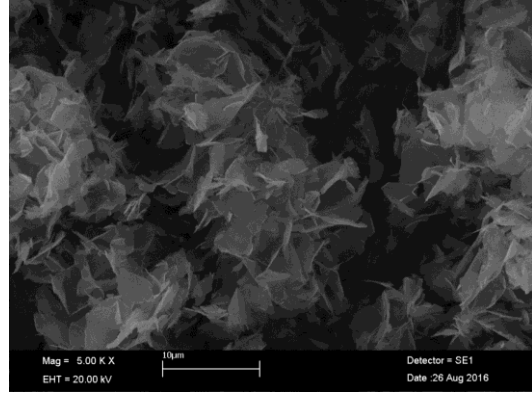
4. BULGULAR

4.1. Amino Asit-İnorganik Çiçek Benzeri Hibrit Nano Yapıların Karakterizasyonu Glisin- Cu^{2+} ve Alanin- Cu^{2+} hibrit nano yapıların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 1’de gösterilmiştir.

A)



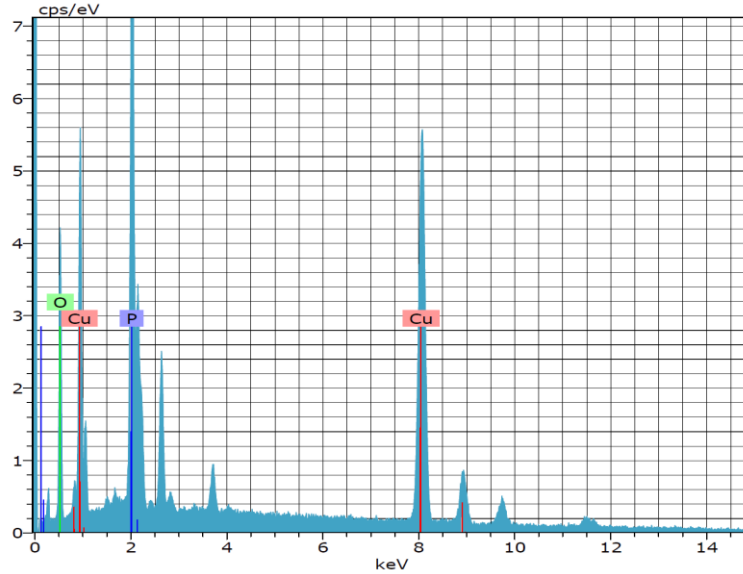
B)



Şekil 1. Hibrit nano yapıların SEM fotoğrafları. A) Glisin- Cu^{2+} , B) Alanin- Cu^{2+}

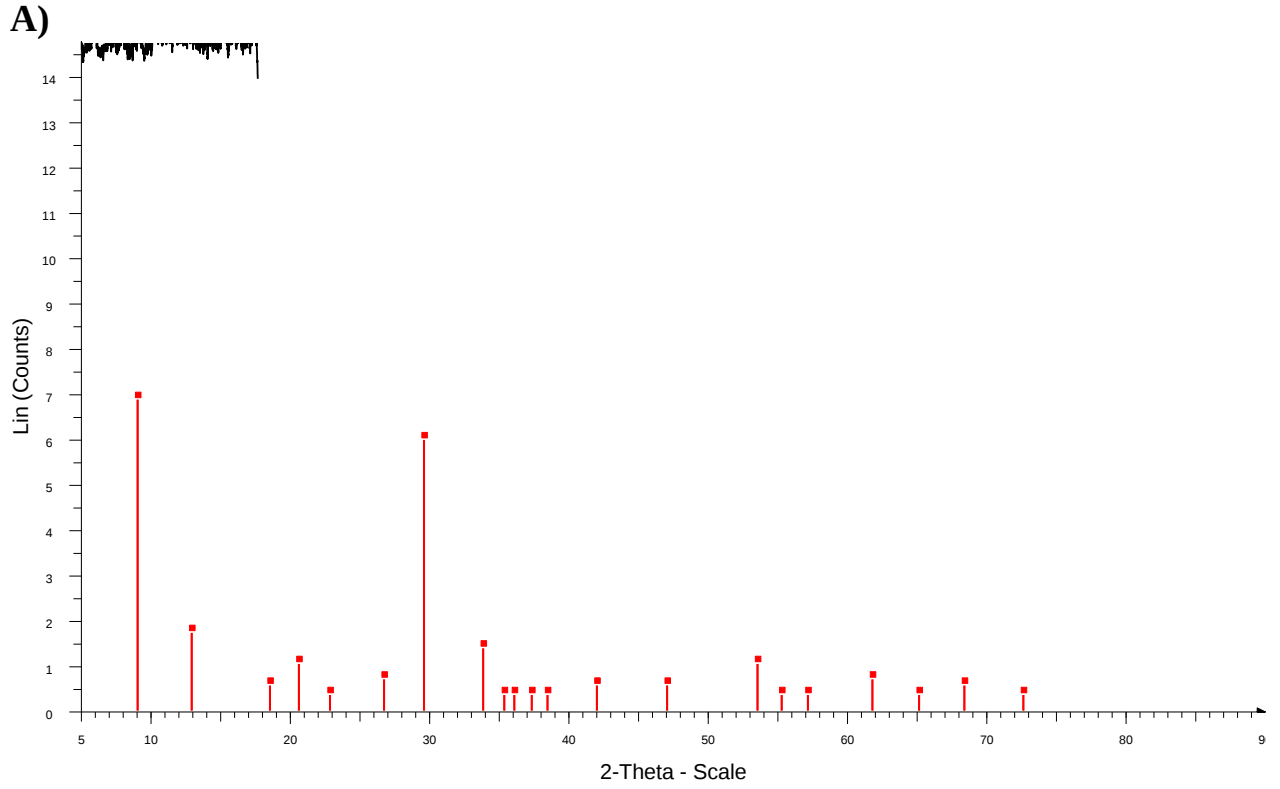
Şekil 2’ de Cu metalinin amino asit-metal hibrit nano yapıları üzerine depozit olduğunu kanıtlanması için EDX analizi yapılmış olup, Glisin- Cu^{2+} hibrit nano yapı (şekil 2A) gösterilmektedir.

A)



Şekil 2. Amino asit-inorganik hibrit nano yapılarda Cu metalinin varlığı. A) Glisin-Cu.

Şekil 3'te amino asit-inorganik hibrit nano yapıların kristal yapıları X-Işını Kırınım yöntemi (XRD) sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3. Amino asit- inorganik hibrit nano yapıların XRD sonuçları. Glisin- Cu²⁺.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimlerin stabilite ve aktivitelerini arttırmaya yönelik çeşitli immobilizasyon teknikleri uygulanmıştır. Yeni bir immobilizasyon tekniği olarak enzim-inorganik hibrit nano yapılar sentezlenmiştir. Yakın zamanda yapılan yeni bir çalışmada ise amino asit-inorganik hibrit nano yapıların sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu projede ise organik kısım olarak amfiprotik özellikteki Glisin ve Alanin amino asitleri ve inorganik kısım olarak bakır metali kullanılmıştır. Amfiprotik olmaları nedeniyle izoelektrik noktalarının üzerindeki ve altındaki pH değerlerinde çalışılmıştır. Ayrıca oluşan kompleks yapının mekanizmasını aydınlatmak amacıyla farklı sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. SEM, EDX ve XRD ile karakterizasyonun gerçekleştirilmesi sonucu en iyi sonuçlar pH 7,4'te ve 3 günlük inkübasyon süresi sonucu elde edilmiştir. Ayrıca formaldehit ile uzaklaştırılan amin gruplarının yapıyı bozduğu görülerek hibrit nano yapı için amin grubunun kesinlikle bulunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cui J, Zhao Y, Liu R, Zhong C & Jia S. Surfactant-activated lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzymatic performance *Biomaterials–proteins Biotechnology Sci Rep* 201, 6, 27928.
2. Davis BG, Shang X, DeSantis G, Bott RR, Jones JB. The controlled introduction of multiple negative charge at single amino acid sites in subtilisin *Bacillus lentus*. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 2293–301.
3. Gron H, Bech LM, Branner S, Breddam K. A highly active and oxidation-resistant subtilisin-like enzyme produced by a combination of site-directed mutagenesis and chemical modification. *Eur J Biochem.* 1990,194, 897–901.
4. Cevahir A, Sureyya T, Nalan Ö, Ismail O. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93–94, 105-112.
5. Zhuo-Fu W, Zhi W, Ye Z, Ya-Li M, Cheng-Yan H, Heng L, Le, Qi-Sheng H, Lei W & Zheng-Qiang L. Amino acids-incorporated nanoflowers with an intrinsic peroxidase-like activity *Sci Rep* 2016, 16, 22412.
6. Jun G, Jiandu L and Richard N. Z. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology* 2012, 7, 428–432.
7. Ping W. Nanoscale biocatalyst systems, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 574–579.
8. B. Krajewska, Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2004) 126–139
9. Matsumoto K, Davis BG, Jones JB. Chemically modified “polar patch” mutants of subtilisin in peptide synthesis with remarkably broad substrate acceptance: designing combinatorial biocatalysts. *ChemEur J* 2002;8:4129–37.
10. Davis BG, Shang X, DeSantis G, Bott RR, Jones JB. The controlled introduction of multiple negative charge at single amino acid sites in subtilisin *Bacillus lentus*. *Bioorg MedChem* 1999, 7, 2293–301.