

¹ LİPAZ ENZİMİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU*

*Immobilization and Characterization of Enzyme on Magnetic Nanoparticles Through Different Intermediate Arms **

Müge ŞENGÜL
Kimya Anabilim Dalı

Güzide YÜCEBİLGİÇ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada lipaz enziminin immobilizasyonu için yeni bir destek materyali olarak manyetik özellikte ve nanoboyutta Fe_3O_4 tanecikleri sentezlenmiş ve lipaz enziminin Fe_3O_4 manteyik nanopartiküllere farklı arakollar üzerinden (GA: Glutaraldehit ve ECH: Epiklorohidrin) immobilizasyonu ve Karakterizasyonu araştırılmıştır. Fe_3O_4 nanopartikülünün karakterizasyonu için SEM, FTIR, XRD kullanılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin yaklaşık 158,2 nm çapında olduğu gözlemlenmiştir. Serbest ve immobilize lipazların ortam koşullarına göre aktivite ölçümleri yapılarak, optimum sıcaklık, optimum pH, depolama kararlılığı, termal kararlılığı ve tekrar kullanım kararlılığı incelenmiş ve kinetik sabitler belirlenmiştir. Serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH 7,0 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize lipazlar için optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize lipazların farklı sıcaklıklarda belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve immobilize enzimlerin dayanıklılığının serbest haline göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda serbest lipaz için K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg protein, $2,82 \times 10^4 dk^{-1}$, $58,8 \times 10^3 dk^{-1} mM^{-1}$, immobilize lipaz (GA) için sırasıyla 1,3 mM, 33,6 U/mg protein, $2,25 \times 10^3 dk^{-1}$, $1,73 \times 10^3 dk^{-1} mM^{-1}$, immobilize lipaz (ECH) için sırasıyla 9,4 mM, 51,7 U/mg protein, $3,47 \times 10^3 dk^{-1}$, $0,37 \times 10^3 dk^{-1} M^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Immobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği kesikli reactor modelinde araştırılmıştır ve 20 kullanım sonrası immobilize lipazların başlangıç aktivitelerini sırasıyla % 71 (GA) ve % 63 (ECH) 'ünü koruduğu belirlenmiştir. Serbest lipazın 5°C ve 25°C' de 30 gün depolama süresi sonunda kalan aktivitesi sırasıyla başlangıç aktivitesinin %37 ve %23' üdür. Bununla birlikte immobilize lipazların 5°C ve 25°C'de 30 gün depolama süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %50 (GA), %44 (ECH) ve %44 (GA), %28 (ECH)' ini korumuştur.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, Magnetik nanopartikül, Epiklorohidrin, Glutaraldehit.

ABSTRACT

In this study, magnetic nano sized Fe_3O_4 particles were synthesized and covalent immobilization and characterization of lipase enzyme on magnetic nanoparticles by various intermediate arms (GA and ECH) are researched. Characterization of Fe_3O_4 nanoparticles was conducted using FTIR, SEM and

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

XRD. The size of prepared nano particles was found approximately 158,2 nm diameter. Activity measurements of free and immobilized lipases were conducted in order to determine optimum temperature, optimum pH, storage stability, heat stability and reusability as well as kinetic parameters (K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m). Optimum pH was determined as 7,0 for free and immobilized lipases. Optimum temperature was determined 40 °C for free and immobilized lipases. The thermal stabilities of free and immobilized lipases have been improved greatly. For free lipase at optimum conditions K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m values were calculated as sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg protein, $2,82 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}$, $58,8 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, the same values of immobilized lipase (GA) were calculated as respectively 1,3 mM, 33,6 U/mg protein, $2,25 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$, $1,73 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and for immobilized lipase (ECH) calculated as sırasıyla 9,4 mM, 51,7 U/mg protein, $3,47 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$, $0,37 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Reusability of immobilized lipases was investigated in a batch type reactor. After 20 reuses, residual activities of immobilized lipase were about %71 (GA) and %63 (ECH) of its initial activity. The residual activity for free lipase stored at 5°C and 25°C for 30 days were %37 and %23 of its initial activity, respectively. However, the immobilized lipases protected %50 (GA), %44 (ECH) and to %44 (GA), %28 (ECH) of its original activities at 5°C and 25°C, respectively for 30 days.

Keywords: Lipase, Magnetic nanoparticles, Epichlorohydrin, Glutaraldehyde.

Giriş

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen, farklı maddeler içeren, belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen ya da kolaylaştıran, kendisi reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen protein molekülleridir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Enzimler biyokimyasal reaksiyonların hızını kimyasal katalizli reaksiyonlara kıyasla 1 milyon kez artırır.

Enzimler, özgülükleri sayesinde pek çok uygulama alanına sahiptirler, fakat kısa ömürleri yüzünden kullanımları sınırlı kalmaktadır. Enzim kararlılığındaki gelişmeler pek çok pratik uygulamalara olanak sağlamaktadır. Gereksinim duyulan enzim miktarı azaltılabilir, enzim reaktörlerinin ömrü uzatılabilir, enzimin tekrar kullanılabilirlik potansiyeli artırılabilir, biyosensörler için mükemmel sinyaller sağlanabilir. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden en yüksek oranda faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Geliştirilen farklı immobilizasyon yöntemlerinin uygulanması ile; enzimler tekrar kullanılabilirliklerinin ve kararlılıkları artırılması, sürekli sistem çalışmalarına uygulanabilir olması, kısa işlem süresi, işletim maliyetinin azaltılmış olması ve ürünlerin saflık derecesi artırılabilmesi mümkün hale gelmektedir. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

Materyal ve Metod

Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma, Fluka ve Merck firması tarafından sağlanacaktır.

Araç ve Gereçler:

UV-Vis Spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA 8417), Magnetik karıştırıcı, Santrifüj, Analitik terazi, Isıtıcı, Derece, Otomatik pipet, Su banyosu kullanılacaktır.

Kimyasallar

Lipaz, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Amonyum Hidroksit, Sodyum Hidroksit, HCl, Etanol, Glutaraldehit, 3-APTES, Fosfat Tamponu, *p*-nitrofenil palmitat, Epiklorohidrin, Sodyum Karbonat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sodyum Sitrat, Folin-Ciocalteu, NaCl, Etilendiamin.

Metod

Magnetik Nanopartiküllerin Hazırlanması

Magnetik nanopartiküller birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Valenzuela ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 300 mL 0,1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisiyle, 300 mL 0,05 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlanıp bir beherde 25°C'de 250 devir/dak hızla karıştırarak ısıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltinin sıcaklığı 36°C'ye ulaştığında üzerine damla damla 1 N NaOH siyah bir çökelti oluşturuncaya kadar eklenmiştir. Bu işlem süresince çözelti karıştırılmış ve ısıtılmaya devam edilmiştir. Çözeltinin sıcaklığı 52°C'ye ulaştığında ısıtıcı kapatılmıştır. Daha sonra çözeltinin üzerine damla damla 3 N NaOH eklenerek siyah çökeltinin yoğunluğu artırılmıştır. Elde ettiğimiz çökelekler etanol ile yıkanarak süzölmüş ve bir gece boyunca 74°C'de etüvde kurutulmuştur.

Magnetik Nanopartiküllere APTES Ara Kolunun Bağlanması:

Lipaz enziminin immobilizasyonunda kullanılacak olan magnetik nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktive edilmesi ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Magnetik nanopartiküllerin aktive edilmesinde Weethall (1976) tarafından bildirilen yöntem esas alınmış ve 3-APTES ile desteğin alkilamin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. Magnetik nanopartikülün 2,0 gramı %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltisine eklenerek 45°C'de 24 saat bekletilerek aktive edilmiştir. Daha sonra aktive edilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115°C'de 1 gece kurutulmuştur. 3-APTES ile aktive edilen magnetik nanopartikül desteğindeki serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesinde Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

Magnetik Desteğin Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi:

1 g destek üzerine 50 mM pH=7.0 fosfat tamponunda %25 (W/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılır (Cho ve Rhee, 1993). Destek saf suyla, süzültüde Glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanır ve 50°C de 1 gece boyunca kurutulur.

Magnetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini

Magnetik nanopartiküller silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino (-NH₂) grubunun miktarı Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Aynı yöntem silanlanan desteklerin glutaraldehit ile etkileştirilmesinden sonra glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest -NH₂ grubu tayini içinde kullanılmıştır. Yöntemin esası, -NH₂ grubunun ninhidrinle verdiği reaksiyon sonucunda oluşan kompleksin etanol fazına alınarak spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

***Candida rugosa* Lipazının Manyetik Nanopartiküller Üzerine Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu**

1 g manyetik destek üzerine 1 mg /mL olacak şekilde 50 mM pH =7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış lipaz çözeltilerinin 4 mL si oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılır.İmmobilizasyon süresi sonrasında magnet yardımıyla ayrılmaları sağlanır ve kendi tampon çözeltileriyle yıkanır. Süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve Ark.(1951) önerdiği yöntemle göre yapılır ve başlangıçta ortama ilave edilen protein miktarından süzültüde bulunan bağlanmayan protein miktarı çıkarılarak desteğe bağlanan protein miktarı hesaplanır.

Magnetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin İle Aktifleştirilmesi

Magnetik nanopartiküllere 1-kloro-2,3-epoksipropan'ın (epiklorohidrin) bağlanmasında Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,0 g destek üzerine 50 mL 2 M'lık NaOH olacak şekilde hazırlanmış çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra NaOH ile muamele edilen magnetik nanopartiküllerin üzerine 3,9 mL 0,05 mol epiklorohidrin eklenerek oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Epiklorohidrin ile aktifleştirilen magnetik nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Epoksi gruplarının olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,5 g destek alınarak üzerine 2,6 mL 1,3 M'lık sodyum tiyosülfat (Na₂S₂O₃) ve bir damla fenolftalein eklenmiştir ve 0,1 M'lık HCl ile titrasyon yapılmıştır.

Lipaz Enziminin Epiklorohidrin Üzerinden Magnetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu

Lipaz enziminin magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin üzerinden kovalent immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yöntemle göre

yapılmıştır. Yukarıda bahsedildiği şekilde modifiye edilen magnetik nanopartiküllerden 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış derişimi 0,25 mg/mL olan lipaz çözeltisinin 8 mL'si 2,0 g desteğe ilave edilmiştir. Karışım 12 saat boyunca 4°C'de karıştırılmıştır. Bu şekilde desteğe bağlanmayan serbest lipazın ortamdaki tamamen uzaklaştığını anlamak için süzütünün 280 nm'deki absorbanları ölçülmüştür. Süzüntülerdeki protein miktarı tayini Lowry ve ark., (1951) önerdiği yöntemle yapılmıştır.

Candida rugosa Lipazının Aktivitelerinin Ölçümü:

Lipaz aktivitesinin ölçümü Wu ve Ark.(2004) önerdiği yöntem kullanılır. 0.9 mL fosfat tamponu (50mM, pH=7,0)içerisine derişimi 1mg/mL olacak şekilde hazırlanmış lipaz çözeltisinin 0,1 mL si veya 10 mg immobilize lipaz ilave edilir. Reaksiyon derişimi 0.2 mg/mL olacak şekilde etanol içerisinde hazırlanmış *p*-nitrofenil palmitat (*p*-*NNP*) çözeltisinin 1 mL sinin ilavesiyle 35 °C de başlatılmıştır. 5 dakika reaksiyon süresi sonunda reaksiyon 2 mL, 0.5N Na₂CO₃ ilavesiyle durdurulduktan sonra açığa çıkan *p*-nitrofenolün absorbanı 410 nm de ölçülmüştür.

Candida rugosa Lipazının Glutaraldehit ve Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu İçin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

En uygun immobilizasyon pH sını belirlenmesi için pH; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 da immobilizasyonlar yapılır.En uygun tampon derişimin belirlenmesi için belirlenen uygun pH da 25, 50, 75, 100 mM tampon derişimlerinde immobilizasyon yapılır. En uygun immobilizasyon sıcaklığının belirlenmesinde belirlenen pH ve tampon derişiminde 5, 15, 25 °C de immobilizasyon yapılır.En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesinde 1, 2, 3, 6, 12 ve 24 saat süresi için immobilizasyonlar yapılır.En uygun enzim derişimlerinin belirlenmesinde 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL enzim derişimlerinde immobilizasyonlar yapılır. Desteğe bağlanan lipaz miktarı, gram desteğe bağlanan lipazın immobilizasyon sırasında ortama eklenen toplam lipaz miktarına oranı (%) şeklinde verilir.

Serbest ve İmmobilize Candida rugosa Lipazlarının Karakterizasyonu

Serbest ve immobilize lipaz için optimum pH ın belirlenmesinde pH 5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; da aktiviteler ölçülür. Serbest ve immobilize lipaz örnekleri için en uygun tampon derişiminin belirlenmesinde optimum pH da 25, 50, 75 ve 100 mM tampon derişiminde lipaz aktivitesi ölçülür. Serbest ve immobilize lipaz örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 °C de lipaz aktiviteleri ölçülür. Belirlenmiş olan optimum koşullarda, 0,1-16 mM *p*-nitrofenil palmitat derişimleri için serbest ve immobilize lipaz aktiviteleri ölçülür. Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, $1/V$ ye karşı $1/[S]$ değerlerinin çizilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılır. Ayrıca serbest ve immobilize lipaz için geri dönüşüm sayısı ($K_{cat}=V_{max}/[E]_t$) ve katalitik etkinlik (K_{cat}/K_m) hesaplanır.Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin

termal kararlılığının belirlenmesi için serbest ve immobilize lipazlar maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıkta ve 60°C de belli süre bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülür. Serbest ve immobilize lipazların depolama kararlılığının belirlenmesinde lipaz örnekleri 4°C ve oda sıcaklığında bekletilerek belli aralıklarla belli günlerde kalan aktiviteleri ölçülür.

Araştırma Bulguları ve Tartışma Bulgular

Bu çalışmada *Candida rugosa* lipazının aktive edilmiş magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) belirlenen optimum koşullardaki aktiviteleri ölçülerek yapılmıştır.

Magnetik Nanopartikül Sentezi İle İlgili Bulgular **Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit ve Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak Immobilize Edilen Lipazlarla İlgili Bulgular**

Çizelge 1. Serbest ve Immobilize Enzimlerle İlgili pH, Tampon Derişimi, Sıcaklık Bulguları

Enzimler	pH	Tampon Derişimi	Sıcaklık
Serbest Lipaz	7,0	50 mM	40°C
İmmobilize (Glutaraldehit)	7,0	50 mM	40°C
İmmobilize (Epiklorohidrin)	7,0	50 mM	40°C

Çizelge 2. Serbest ve Immobilize Enzimlerle İlgili Termal Kararlılık Bulguları

Termal Kararlılık Bulguları		
Kalan Bağlı Aktiviteler		
	40°C	60°C
Serbest Lipaz	%49	%47
İmmobilize (GLU)	%50	%67
İmmobilize (EPI)	%57	%42

Çizelge 3. Serbest ve Immobilize Enzimlerle İlgili Depolama Kararlılık Bulguları

Depolama Kararlılıkları ile ilgili Bulgular		
	4°C(30 GÜN)	25°C(30 GÜN)

Serbest Lipaz	%37	%23
immobilize(GLU)	%50	%44
Immobilize(EPI)	%44	%28

Çizelge 4. Immobilize Enzimlerle İlgili Tekrar Kullanım Bulguları

	Tekrar Kullanım Kararlılıkları		
	25 mg	50 mg	100 mg
immobilize(GLU)	%49	%61	%71
Immobilize(EPI)	%33	%51	%63

Çizelge 5. Serbest ve Immobilize Enzimlerle İlgili Kinetik Parametre Bulguları

	Kinetik Parametreler			
	K_m (mM)	V_{max} (U/mgprotein)	K_{cat} (dk ⁻¹)	K_{cat}/K_m (dk ⁻¹ mM ⁻¹)
Serbest Lipaz	0,48	420,7	$2,82 \times 10^4$	$58,8 \times 10^3$
Immobilize(GLU)	1,3	33,6	$2,25 \times 10^3$	$1,73 \times 10^3$
Immobilize(EPI)	9,4	51,7	$3,46 \times 10^3$	$0,37 \times 10^3$

Tartışma

Çalışmamızda magnetik nanopartiküller 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve yüzeyinde primer amin grupları oluşturulmuştur. Magnetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda 1 g destekte bulunan $-NH_2$ grubu miktarının 270 μ mol/g destek olup ve aktive edilen desteğin glutaraldehit ile muamelesi sonrasında primer amin grubunun %78'i glutaraldehit ile modifiye edilebilmektedir. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %63,7 mg prot./g olduğu belirlenmiştir. Yanjun ve ark., (2010), *Candida Rugosa* lipazını silanlanmış magnetik nanopartiküller üzerine kovalent bağlama metoduyla glutaraldehit ara kolu yardımıyla immobilize etmişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin pH, Tampon Derişimleri ve Sıcaklığa bağlı değişimleri Çizelge 1'de birlikte gösterilmiştir. Sonuçlar lipazın magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilizasyonu ile maksimum aktivitenin nötral pH'da (7,0) olduğunu göstermektedir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir. Literatürlerde tampon derişiminin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Lin Lei ve ark., (2008); yaptıkları çalışmalarda 0,1 M 'lık fosfat tamponu, Chia-Hung ve ark., (2012); ise yaptıkları araştırmalarında 0,05 M 'lık fosfat tamponu kullanmışlardır. Çizelge 1'de görüldüğü gibi optimum sıcaklıklar üç enzim için de 40°C olarak belirlenmiştir. Yang ve ark., (2008); yaptıkları çalışmalarda serbest lipaz ve manyetik kürelere immobilize ettikleri *Candida Rugosa* lipazı için optimum sıcaklığın serbest ve immobilize lipazlar için 35-40 °C arasında olduğunu saptamışlardır.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5). Çizelge incelendiğinde görülebileceği gibi K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla (0,48 mM, 420,7 U/mg prot., $2,82 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}$, $58,8 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), (1,3 mM, 33,6 U/mg prot., $2,25 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$, $1,73 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), (9,7 mM, 51,7 U/mg prot., $3,46 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$, $0,37 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) olarak belirlenmiştir. Iram ve ark., (2012); yaptıkları çalışmada serbest enzimin K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1,45 mM ve 190 mmol/mg/min., GAMNP üzerine immobilize edilen lipazın K_m ve V_{max} değerleri 0,35 mM ve 297 mmol/mg/min. ile kıyaslamışlar ve sonuçta immobilize edilen değerlerinde bir düşüş gözlemişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın farklı sıcaklıklardaki (40 ve 60°C) ve inkübasyon süresinde kalan aktivite miktarları arasındaki ilişki incelenmiştir (Çizelge 2). Yang ve ark., (2008); yaptıkları çalışmalarında serbest ve magnetik küreler üzerine immobilize ettikleri lipazların 25-80 °C arasındaki ternal kararlılıklarını incelemişlerdir. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın depolama kararlılıklarını belirlemek amacıyla 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür (Çizelge 3). Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların tekrar kullanım kararlılıkları Çizelge 4'de verilmiştir. 25, 50 ve 100 mg için 20 kullanımdan sonra kalan aktiviteleri başlangıç aktivitesinin yaklaşık sırasıyla (%49, %61, %71), (%33, %51, %63) olarak belirlenmiştir. Chia-Hung ve ark., (2012); yapıları araştırmalarda kitosan- Fe_3O_4 destek materyaline immobilize ettikleri lipazın tekrar kullanım kararlılığını incelemişler ve 5, 10, 20 kullanımdan sonra kalan aktiviteleri sırasıyla %98, %88 ve %83 olarak ölçmüşlerdir.

Sonuçlar

Lipaz enziminin Fe_3O_4 magnetik nanopartiküllerine farklı ara kollar üzerinden kovalent olarak immobilizasyonunu hedefleyen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Magnetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumları alınarak fonksiyonel grupların varlığı araştırılmış, XRD kullanılarak yapı analizi yapılmıştır. Sentezlenen maddenin büyük ölçüde Fe_3O_4 'den oluştuğu ancak diğer bazı demir oksit türlerini de kısmen içerdiği tespit edilmiştir. SEM mikroskopu kullanılarak nano yapıların boyut analizi yapılmış ve ortalama boyutun 158,2 nm olduğu bulunmuştur.
2. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların maksimum aktivite gösterdikleri pH 7,0 olarak belirlenmiştir.

3. Serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir.
4. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların optimum sıcaklıkları 40°C olarak belirlenmiştir.
5. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri serbest enzim için sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg prot., $2,82 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}$, $58,8 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, glutaraldehit ara kolu için 1,3 mM, 33,6 U/mg prot., $2,25 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$, $1,73 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, epiklorohidrin ara kolu için 9,7 mM, 51,7 U/mg prot., $3,46 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$, $0,37 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
6. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipaz farklı sıcaklıklarda (40 ve 60°C) inkübe edilmiş ve 24 saat sonundaki kalan aktiviteleri serbest enzim için sırasıyla (%69 ve %48), glutaraldehit ara kolu için (%65 ve %46) ve epiklorohidrin ara kolu için (%66 ve %44) olarak belirlenmiştir.
7. İmmobilize enzimlerin serbest enzimle karşılaştırıldığında daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği, glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize olan lipazın epiklorohidrin ara koluna kıyasla daha iyi depolama karlılığına sahip olduğu belirlenmiştir.
8. Yapılan çalışmada glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilize edilen lipazların tekrar kullanım kararlılıklarının birbirine yakın olduğu saptanmıştır.

Kaynaklar

- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., ve ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and Properties of Catalase Immobilized onto Controlled Pore Glass and Its Application in Batch and Plug-Flow Type Reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58:124-131.,
- ALPTEKİN, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 219s.
- AXEN, R., DREVIN, H., CARLSSON, J., 1975. Preparation of Modified Agarose Gels Containing Thiol Groups. *Acta Chemica Scandinavica B*, 29:471-474
- CHIA-HUNG, K., YUNG-CHUAN, L., CHIEH-MING, J., JIANN-HWA, C., CHENG, C., CHWEN-JEN, S., 2012. Optimum Conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Carbohydrate*
- CHO, S.W., and RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. *Biotechnology and*

- IRAM, M., ISHFAQ, A., GUO, C., LIU, H., 2013. A Surfactant Coated Lipase Immobilized In Magnetic Nanoparticles For Multicycle Ethyl Isovalerate
- LEI, L., BAI, Y., LI, Y., YANG, Y., XIA, C., 2008. Study On Immobilization Of Lipase Onto Magnetic Microspheres With Epoxy Groups. Journal Of
- LOWRY, O.H., ROSENBAUGH, N., FARR, L., and RANDALL, R., 1951. Protein Measurement with Theophyllin-Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 183:265–275.
- LUISI, P.L. and MAGID, L.J., 1986. Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. Critical Reviews in Biochemistry, 20(4):409–474.
- SAHOO, B., KUMAR SAHU, S., and PRAMANIK, P., 2011. A Novel Method for The Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide
- WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. Methods of Enzymology, 44:134-148.
- VALENZUELA, R., FUENTESA, M.C., PARRAA, C., BAEZAB, J., DURANC, N., SHARMAD, S.K., KNOBELD, M., FREERB, J., 2009. Influence of Stirring Velocity on The Synthesis of Magnetite Nanoparticles (Fe_3O_4) by The Co-Precipitation Method. Journal of Alloys and Compounds, 488: 227-231.
- YANG, Y., BAI, Y., LI, Y., LIN, L., CUI, Y., XIA, C., 2008. Characterization Of Synthesis Of Amino-Silane Modified Superparamagnetic Fe_3O_4 Nanoparticles And Biochemistry, 43: 1179-1185.
- YANJUN, C., YANG, Y., LIU, X., LEI, L., ZHOU, L., PAN, F., 2010. Facile Application For Lipase Immobilization. Journal Of Biotechnology, 150: 171-

**MANYETİK NANOPARTİKÜLLER ÜZERİNE DESTEKLENMİŞ SCHİFF BAZI
TÜREVİ METAL KOMPLEKSLERİNİN SENTEZLERİ VE KATALİTİK
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ***

*The Synthesis of Magnetic Nanoparticle Supported Schiff Bases Metal Complexes
and the Analysis of Their Catalytic Activity**

Hande SAKALLIOĞLU
Anorganik Kimya Anabilim Dalı

Bilgehan GÜZEL
Anorganik Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada manyetik nanopartiküllerle ve çeşitli schiff bazları ile yeni geri dönüştürülebilir Mn metal kompleksi sentezlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak Fe₃O₄ manyetik nanopartikülleri sentezlenmiştir. Daha sonra dopamine hidroklorür ile katı destek sentezlenmiştir. Ardından schiff bazları ile ligantlar sentezlendi. Son olarak Mn(II)asetat ile Mn metal kompleksleri sentezlendi. Sentezlenen katalizörler FT-IR (fourier transformer infrared spectroscopy) ve X-Ray diffraction cihazları ile karakterize edildi.

Sentezlenen bu manyetik nano katalizörler epoksidasyon reaksiyonu için kullanıldı.

Bu yeni manyetik nano katalizörlerin, homojen katalizörler gibi yüksek aktiviteye ve seçiciliğe sahip olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak reaksiyon ortamında dağıldığı ve reaksiyon sonrasında da kolayca ayrılabilirdiği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Schiff Bazı, Manyetik Nanopartikül, Katı Destek, Katalizör, Epoksidasyon.

ABSTRACT

In this study, novel magnetically recyclable Mn nanocatalysts have been synthesized with magnetic nanoparticles and various Schiff bases. Nanoparticles of magnetic Fe₃O₄ were first synthesized. Then a solid support was synthesized with dopamine hydrochloride and Schiff base ligands were synthesized. Finally, Mn metal complexes were synthesized using Mn(II)acetate. These catalysts were characterized by FT-IR (fourier transformer infrared spectroscopy) and X-Ray diffraction.

The prepared magnetic nanocatalysts were tested as catalysts in epoxidation reactions.

The prepared novel magnetic nanocatalysts showed high activity and selectivity as in a homogeneous system. It was also well dispersed in solution. The catalyst was easily separable.

Key words: Schiff Base, Magnetic Nanoparticles, Solid Support, Catalyst, Epoxidation.

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

Giriş

Son birkaç yılda katalizörler ve katalitik reaksiyonlar farmakoloji ve yeşil kimyada önemli derecede dikkat çekmektedir. Organik reaksiyonlarda kullanılmak üzere çok sayıda homojen katalizörler sentezlenmektedir. Fakat homojen katalizörün, maliyeti bakımından endüstriyel olarak kullanımı pek uygun değildir. Bu katalizörleri endüstriyel proseslerde reaksiyon ortamından ayırmak zordur. Ayrıca homojen katalizörler geri dönüştürülebilir değildir.

Endüstride genellikle, takip eden reaksiyonu etkileyen ve son ürünü bozan metal kalıntılarının izlerini silmek gerekmektedir. Bu nedenle geri dönüşümlülüğü yüksek heterojen katalizör sistemlerinde araştırmalar artmaktadır.

Katı destekli heterojen katalizörler kolay ayrılabilir özelliği ile organik reaksiyonlarda saflaştırma proseslerinde kolaylık sağlar. Kimya ve farmakolojinin uygulamalarında heterojen katalizörün katı destek üzerine immobilizasyonu proses olarak kolaydır. Fakat yüzey alanının katalitik aktivitesi normal sonuçlara göre düşüktür ayrıca seçiciliğini ve reaktivitesini kaybeder.

Özellikle enzimlerin katı destek üzerine direkt immobilizasyonunda kullanılan biokatalizörlerin katalitik aktiviteleri değişmekte seçiciliği ve reaktivitesi azalmaktadır. Bu nedenle kimyasal reaksiyonlarda yüksek aktiviteye sahip, kolay ayrılabilir, reaktif katalitik sistemler için gelişmiş materyaller gerekmektedir. Bu amaçla nanopartiküller sentezlenmiştir. Nanometre boyutlarındaki bu inorganik bileşikler diğer maddelerden farklıdır çünkü elektron tutucu etki gibi yapısal boyutlarına özgül özelliklere sahiptirler. Bu nanopartiküller geniş yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle katalitik aktivitenin ve seçiciliğin artmasını sağlar. Partikül boyutunun küçülmesi ile daha büyük fraksiyonlu aktif metal atomları yüzeyde kalır ve nanopartiküllerin metale geçişi genellikle moleküler katalizörler gibi yüksek aktiviteye sahiptir. Diğer bir yandan daha küçük nanopartiküllerin çözücü ortamında ayrılması ve geri dönüştürülmesi zordur. Buda endüstriyel proseslerde kullanımını engellemektedir.

Geri dönüşüm ve ayırma problemlerini engellemek için, süperparamanyetik nanopartiküller kullanılarak, bir manyetik ürün ile kontrol edilebilir.

Ferrimanyetik ve ferromanyetik materyaller yüksek manyetik özellikleri ile süperparamanyetik davranışları gösterirler. Dıştan bir manyetik ürünün etkisi olmadığı zaman, manyetik nanopartiküller reaksiyon ortamında kolayca dağılır. Substrat tarafından kolayca erişilebileceği geniş yüzey alanına sahiptir. (Lim, 2010.)

Materyal ve Metod

Materyal

Kimyasallar

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fe_3O_4 nano partikül, Dopamine hidroklorür ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$), 2-hidroksi-5-metilisofthalaldehit ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$), o-fenilendiamin ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$), Salisilaldehit ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$), Mangan(II) asetat (CH_3COO)₂ Mn), Stiren (C_8H_8), Stirenoksit ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$), Etil benzen (C_8H_{10}), Hidrojenperoksit (%30) (H_2O_2), Diklorometan (CH_2Cl_2), Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), Azot (N_2).

Araç ve Gereçler

Magnetik karıştırıcılar, Ultra sonic banyo, FT-IR (Perkin Elmer Mattson 1000), ATR (Smart ITR diamond attenuated total reflection), XRD (Rigaku Miniflex), SEM (Coxem CX-200), GC (Agilent Technologies) cihazları deneysel aşamalarda kullanılmıştır.

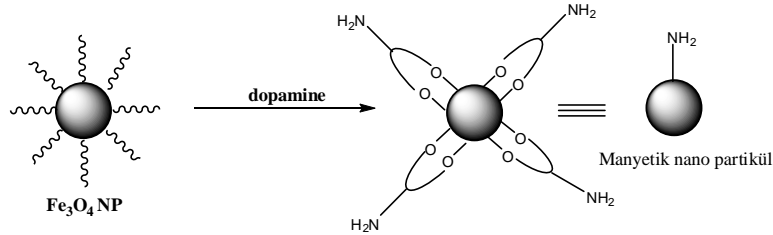
Metod

Manyetik nanopartikül sentezi (Fe_3O_4)

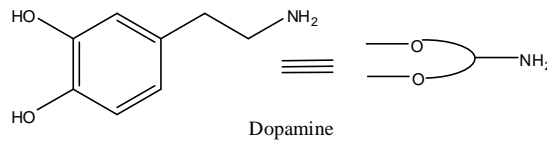
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,324g) ve $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,278g) belirtilen miktarlarda alınır. 40ml suda çözünür. Daha sonra 30 dakika $70^\circ C$ 'de ısıtılır. 5ml 1N NaOH ve ardından 5ml 3N NaOH eklenir. Ortamda siyah partiküller oluşur. Bu aşama bittikten sonra süzülür. 5 kez suyla yıkanır. $70^\circ C$ 'de vakum altında kurumaya bırakılır.

Manyetik desteğin hazırlanması

Sentezlenen manyetik nanopartikülden (Fe_3O_4) 2g alınarak ultrasonic banyoda 25ml su içerisinde 30 dakika bekletilir. Dopaminehidroklorür'ün 2g'ı alınarak 5ml suda çözülerek bu çözeltiliye eklenir ve 2 saat ultrasonic banyoda bekletilir. Nanomateryalin fonksiyonel amin kısmı aseton kullanılarak çöktürülür ve magnetin üzerinden izole edilir ve vakumda $50^\circ C$ 'de 2 saat kurutulur. (Polshettiwar, 2009)



Şekil 1. Fe_3O_4 nanopartikül sentezi

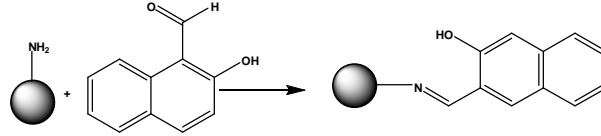


Şekil 2. Dopamine hidroklorür'ün yapısı ve tepkimelerdeki kısa gösterimi

Ligantların sentezlenmesi

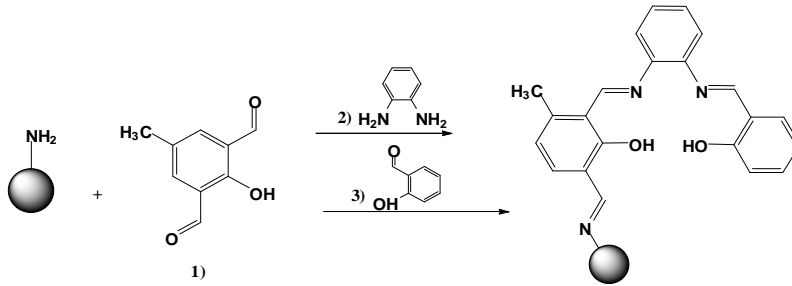
NML₁ (nano manyetik ligant 1) sentezi

0,9552g manyetik destek, 0,6850g 2-hidroksi-1-naftaldehit, 100ml etanolde çözülür. Geri soğutucu altında 24 saat azot atmosferi altında bekletilir. Vakumda kurutulur.



Şekil 3. NML₁ sentez tepkimesi

NML₂ (nanomanyetik ligant 2) sentezi



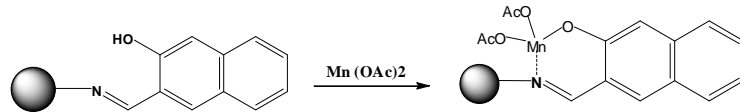
Şekil 4. NML₂ sentez tepkimesi

1. aşamada; Önceden manyetik nanopartikül ile hazırlanan katı desteğin 1g'ı alınarak balona konuldu. 0,3g (2-hidroksi-5metilisobutyraldehit) eklendi ve 100ml etanolde çözüldü. 24 saat azot gazı atmosferi altında geri soğutucuda bekletildi. Yıkama yapılarak desikatörde kurutuldu. 2.aşama; 1.aşamada sentezlenen üründen 0,5g alınarak balona konuldu. 0,3g o-fenilendiamin eklendi ve 50ml etanolde çözüldü. 24 saat azot gazı atmosferinde reflaks yapıldı. Yıkama yapılarak desikatörde kurutuldu. 3.aşamada ise; 2.aşama sonunda sentezlenen ürünün 0,5g'ı ile 1g salisilaldehit, 50ml etanolde çözümlenerek 24 saat azot gazı atmosferinde reflaks yapıldı. Yıkama yapılarak desikatörde kurutuldu.

Metal komplekslerin sentezlenmesi

NMK₁ (nanomanyetik katalizör 1) sentezi

1g ligant 100ml etanolde çözüldü .0,5g Mn(OAc)₂ 50ml etanolde çözüldü ve ligantın bulunduğu çözeltiliye eklenerek karıştırıldı. 18 saat reflaks yapıldı. Ürün diklorometan ile yıkandı .Desikatörde kurutuldu.

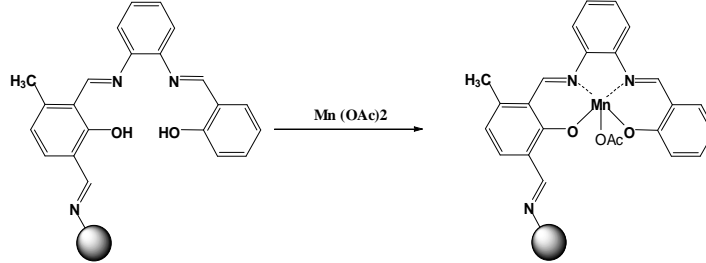


Şekil 5. NMK₁ sentez tepkimesi

NMK₂ (nano manyetik katalizör 2) sentezi

3.aşama sonunda elde edilen manyetik nanopartikül destekli ligantın 0,3g'ı tartılarak 50ml etanolde çözüldü.0,15g Mn(OAc)₂ metal tuzu tartılarak 30ml etanolde çözüldü.Oluşturulan bu iki çözeltili karıştırılarak 6 saat geri soğutucuda

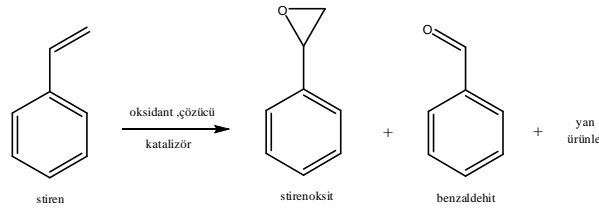
bekletildi. desikatörde kurutuldu. bağlanmayan fazla Mn^{2+} miktarını yardımcı ile sentezlenen manyetik katı destekli metal kompleksinden ayrıştırıldı.



Şekil 6. NMk_2 sentez tepkimesi

Sentezlenen Komplekslerin Katalitik Etkinliklerinin Belirlenmesi

Sentezlenen NMk_1 ve NMk_2 nolu katalizörlerin katalitik etkinlikleri model bileşik olarak seçilen stiren (vinilbenzen), üzerinde denenmiştir. Bu katalizörlerin epoksidasyon tepkimesinde katalitik etkinlikleri klasik yöntem olan organik çözücü içerisinde incelenmiştir.



Şekil 7. Stirenin epoksidasyon reaksiyonu

GC-Ölçüm programı

Kolon	: 5% Phenyl Methyl Siloxane
Enjeksiyon Sıcaklığı	: 250 °C
Mode	: Split
Taşıyıcı Gaz	: 23,0 mL/dk He sabit akış hızında
Dedektör Sıcaklığı	: 300 °C
Kuru Hava	: 400 mL/dk
H ₂	: 30 mL/dk

H₂O₂ ile yapılan denemeler

Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan 20 ml çözücü (diklorometan) üzerine 20 mmol (2,08g) stiren, iç standart olarak 20 mmol (2,24 g) etil benzen ve stiren miktarının yaklaşık %1'i kadar katalizör eklendi. Üzerine oksidant olarak önce 2 ml 30 dakika sonrada 2 ml olmak üzere toplamada 4ml H₂O₂ ilave edildi. Belirli bir sıcaklıkta (oda sıcaklığında) belirli bir süre (1, 3 ve 6 saat) karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon ortamından dekante edildi. Elde edilen ürün karışımlarından alınan örneklerin tamamı GC cihazında analiz edildi.

Tersiyer bütül hidrojen peroksit (TBHP) ile yapılan denemeler

Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan 10 ml çözücü (diklorometan) ve 0.1 g metal kompleks üzerine ilk önce substrat olarak 1ml stiren, 15 dk. Sonra da 2.0 ml oksidant (TBHP) ilave edildi ve belirli bir sıcaklıkta (25 °C) belirli bir süre (1, 3 ve 6 saat) karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon ortamından dekante edildi. Elde edilen ürün karışımlarından alınan örneklerin tamamı GC cihazında analiz edildi.

Bulgular, Sonuçlar ve Tartışma

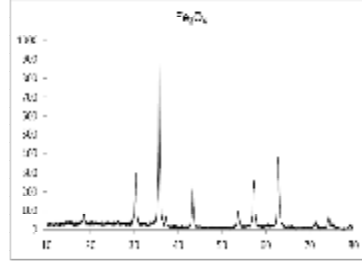
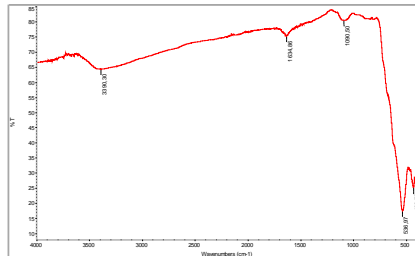
Bulgular

Tez kapsamında hedeflenen ligand ve bu ligandların metal komplekslerinin sentezleri başarıyla gerçekleştirilmiş olup sentezlenen ligandların karakterizasyonunda: FT-IR, XRD ve SEM gibi spektroskopik yöntemlerden yararlanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin FT-IR spektrumları ile yapıların aydınlatılması sağlanmış, XRD sonuçları ve SEM görüntüleri ile bileşiklerin yapısı ve boyutları hakkında bilgi edinilmiştir. Tez kapsamında, sentezlenen metal komplekslerinin katalitik aktivitesi epoksidasyon reaksiyonu üzerinde araştırılmıştır. Epoksidasyon reaksiyonu için stiren kullanılmış olup dönüşüm oranları gaz kromatografi cihazıyla incelenmiştir.

Tez kapsamında ilk olarak Fe₃O₄ nanopartikülleri sentezlenmiştir. Farklı Fe tuzları ile nano boyutta Fe₃O₄ nanopartikülleri sentezlenebilmektedir. Bu çalışmada ise FeCl₃.6H₂O ve FeSO₄.7H₂O tuzları kullanılmıştır. Sentezlenen Fe₃O₄'ün karakterizasyonu için ; FT-IR ve XRD cihazları kullanılmıştır. FT-IR sonuçları literatürde incelenmiş ve birebir sonuçlar gözlenmiştir. ≈536'de bulunan Fe-O titreşimine ait pik, ≈1634 Fe₃O₄'ün yüzeyine adsorplanan COO-, ≈3390'da OH gerilmelerine ait piktir.

XRD sonuçları incelendiğinde 2θ: 30° (220), 36° (311), 44° (400), 55° (422), 58° (511), 63° (440), 74° (622) pikleri literatürdeki sonuçlar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. XRD sonuçları Fe₃O₄ bileşiğinin kübik yapısına ait fikirler vermiştir.

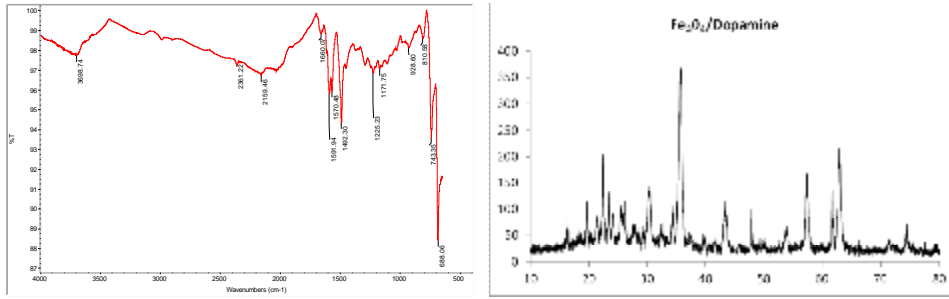
Ayrıca XRD cihazı kullanılarak sentezlenen Fe₃O₄ bileşiğinin boyutları hakkında bilgi edinilmiştir. Sonuçlara göre katı Fe₃O₄'ün boyutu maksimum 13nm'dir.



Şekil 8. Fe₃O₄'ün a)FT-IR b)XRD görüntüleri

Bu aşamada dopamine hidroklorür bir ara kol gibi kullanılarak Fe_3O_4 'ün ile schiff bazının bağlanabilmesi için bir amin ucu oluşturulmuştur. Sentezlenen katı desteğin karakterizasyonunda; FT-IR ve XRD gibi spektroskopik yöntemlerden yararlanılmıştır. FT-IR sonuçları göre ≈ 3600 'de görülen OH titreşimlerine ait pikdir. ≈ 1660 - ≈ 1590 karboksil piki gözlenmektedir.

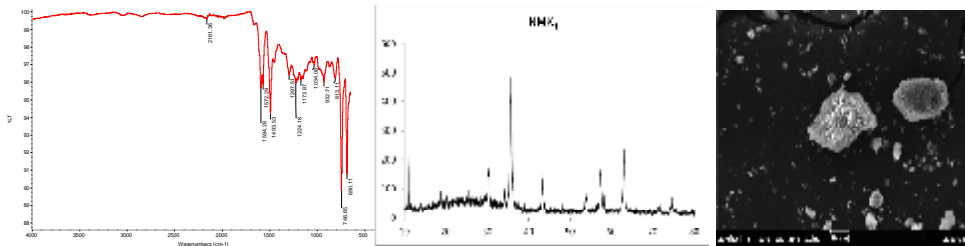
XRD sonuçları; 2θ : 20° (111) 30° (220), 36° (311), 44° (400), 55° (422), 58° (511), 63° (440), 74° (622) şeklindedir. Bu sonuçlara göre 20° (111)'de görülen pik dopaminin bağlandığını göstermektedir. Ayrıca XRD sonuçlarına göre Fe_3O_4 'ün boyutları 13nm iken Fe_3O_4/DA 'nın boyutları ≈ 15 nm civarında olup bu da dopaminin bağlandığını işaret edebilir.



Şekil 9. Fe_3O_4/DA 'nin a)FT-IR b)XRD görüntüleri

NMK₁'in karakterizasyonu

FT-IR sonuçlarına göre; ≈ 3214 'de görülen OH piki manganın bağlanması ile kaybolmuştur. Yapıya ait keskin C=N piki ≈ 1600 'de gözlenmektedir. Aromatik yapıya ait olan C-H eğilmelerine ait pikler ise ≈ 1200 - 1400 arasında gözlenmektedir. Mangan piki ≈ 746 'da bulunmaktadır. XRD sonuçları incelendiğinde 2θ ; 36° (311)'de bulunan pikin şiddetinin arttığı gözlenmektedir. Ayrıca boyutları ≈ 19 nm civarında olduğu saptanmıştır.

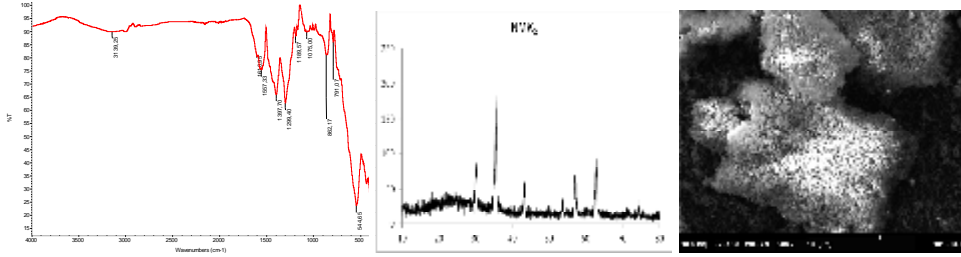


Şekil 10. NMK₁'in a)FT-IR b)XRD c)SEM görüntüleri

NMK₂'nin karakterizasyonu

FT-IR sonuçlarına göre; ≈ 3245 'de görülen OH piki manganın bağlanması ile kaybolmuştur. Yapıda gözlenmesi gereken ≈ 1600 'deki C=N bağına ait pik NML₂'de olduğu gibi ≈ 1560 ' da gözlenmiştir. Bunun sebebi tautomeri oluşumu

olabilir. Tautomeri oluşumunda C=N bağı açılmaktadır. Mn metali bağlandığında ise oluşan mangan kompleksinde ise; normalde Mn-N arasında olması gereken kesikli bağ Mn-O arasında oluşur. Mangan piki ise $\approx 790^\circ$ 'da bulunmaktadır. Ayrıca $\approx 544^\circ$ 'de bulunan pik manyetik katı desteğe ait olan Fe_3O_4 pikidir. XRD sonuçlarına göre; NMK_2 'nin boyutunu 19nm olduğu saptanmıştır.



Şekil 11. NMK_2 'in a)FT-IR b)XRD c)SEM görüntüleri

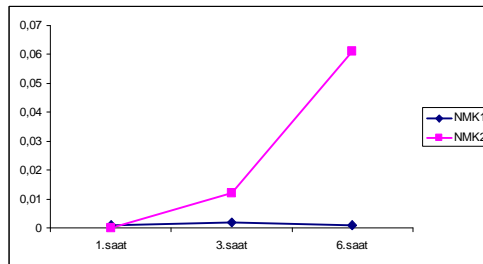
Sentezlenen Nano Manyetik Katalizörlerin Katalitik Aktivitesinin İncelenmesi

Sentezlenen NMK_1 ve NMK_2 nolu katalizörlerin katalitik etkinlikleri model bileşik olarak seçilen stiren (vinilbenzen), üzerinde denenmiştir. Bu katalizörlerin epoksidasyon tepkimesinde katalitik etkinlikleri klasik yöntem olan organik çözücü içerisinde incelenmiştir. Sentezlediğimiz katalizörlerin epoksidasyonu için iki farklı oksidant kullanılmıştır. Bunlar hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tersiyer bütül hidrojen peroksit (TBHP) kullanılmıştır.

Sonuçlar

H_2O_2 ile yapılan çalışmalar

Katalizörlerimizin katalitik aktivitesi, stirenin epoksidasyon reaksiyonunda incelenmiş olup, ilk denemelerde H_2O_2 'nin oksidant olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda ayrıca iç standart olarak etil benzen kullanılmıştır. 1., 3., 6. saatlerde alınan örnekler GC cihazında analiz edilmiştir.



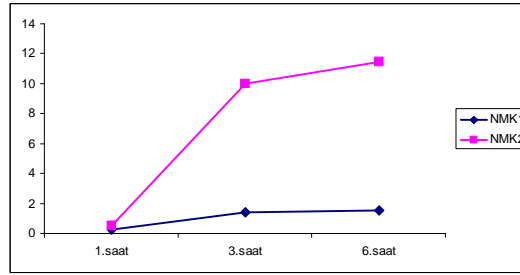
Şekil 12. H_2O_2 ile yapılan epoksidasyon reaksiyonlarında %S-zaman grafiği

Analiz sonuçlarına göre; H_2O_2 'nin kullanıldığı epoksidasyon reaksiyonlarında, stirenoksit oluşum yüzdesi NMK_1 'de sıfır iken NMK_2 'de ise dönüşüm %0,1 kadardır. Buda sentezlediğimiz nano manyetik katalizörlerin stirenin epoksidasyon reaksiyonunda katalitik etkinliğinin olmadığını göstermektedir.

TBHP ile yapılan çalışmalar

H_2O_2 'nin oksidant olarak kullanıldığı denemelerde yüzde dönüşümün çok düşük, yüzde stirenoksit oluşumunun ise neredeyse sıfır olması nedeniyle alternatif bir oksidant denenmiştir. Literatür araştırmaları sonucunda TBHP'nin oksidant olarak kullanıldığı denemelerde ise aktivitenin çok daha yüksek olduğu gözlenmesi nedeniyle TBHP kullanılmıştır. Bu denemeler için iç standart kullanılmamıştır.

1.saatte yüzde dönüşüm oldukça düşüktür. Stirenoksit oluşumu ise neredeyse gözlenmemektedir. 3.saatte ise katalizörlerin aktivitesi artmaktadır. 6.saatte yüzde dönüşüm azalırken, stirenoksit oluşumunda ise artma gözlenmiştir. Epoksidasyon reaksiyonunda stirenoksit dışında bir miktar da benzaldehit oluşmuştur.



Şekil 13. TBHP ile yapılan epoksidasyon reaksiyonlarında %S-zaman grafiği

Tartışma

Tez kapsamında manyetik nanopartikül destekli bir schiff bazı türevi metal kompleks sentezlenmiştir. Katalizör olarak kullanılan bu metal kompleks, homojen ve heterojen katalizörlerin farklı avantajlarını sunan alternatif bir katalizördür. Heterojen katalizörlerden farklı olarak nanopartikül oldukları için yüzey alanları geniştir buna bağlı olarak aktivitesi yüksektir. Homojen katalizörlerden farklı olarak da ortamda çözünmez, reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilir ve etkinliklerini kaybetmeden geri dönüşümlü olarak tekrar tekrar kullanılabilir.

Çalışmamızda hem sentez aşamasında hemde katalitik aktivite araştırmaları sırasında katalizörümüzün manyetikliğinden faydalanılarak bir miktaris yardımı ile katalizör reaksiyon ortamından kolayca ayrılmıştır.

Çalışmamızda nanomanyetik katalizörlerimizin katalitik aktivite araştırması için epoksidasyon yapılmış substrat olarak stiren kullanılmıştır. Oda koşullarında, diklorometan ile yapılan epoksidasyon reaksiyonunda oksidant olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tersiyer bütül hidrojen peroksit (TBHP) denenmiştir. Sonuçlara

göre iki farklı oksidant ile yapılan epoksidasyon çalışmalarında stiren oksit miktarı oluşumu katalizöre göre farklılık göstermektedir. H_2O_2 'nin oksidant olarak kullanıldığı denemelerde NML₁'de stiren oksit dönüşümü neredeyse gözlenmezken çok az miktarda benzaldehit ve yan ürün oluşumu gözlenmiştir. NMK₂'de ise çok az stiren oksit oluşumu gözlenmektedir. TBHP ile yapılan denemelerde de; NMK₁'de yüzde dönüşüm ve stirenoksit yüzdesi çok düşüktür. NMK₂'de ise diğer çalışmalara göre çok daha yüksek miktarda stiren oksit dönüşümü gözlenmektedir. Bu sonuçlara göre katalizörlerin katalitik aktiviteleri sıralanırsa NMK₂ > NMK₁ olarak sıralanabilir.

Katı destekli nano manyetik katalizörler farklı avantajlarıyla reaksiyonlarda kolaylık sağlamaktadır. Sentezlediğimiz bu katalizörler farklı manyetik nanopartiküller, farklı katı destekler ve farklı schiff bazları ile geliştirilebilir.

Kaynaklar

- LİM,C.W.,LEE,I.S.,2010. Magnetically recycable nanocatalyst systems for the organic reactions.
- POLSHETTİWAR,V., VARMA,R.S.,2009.CHEM.EUR. Nanoparticle-Supported and Magnetically Recoverable Ruthenium Hydroxide Catalyst: Efficient Hydration of Nitriles to Amides in Aqueous Medium

MANYETİK NANOPARTİKÜL DESTEKLİ KATALİZÖR SENTEZİ*

*The Synthesis of Magnetic Nanoparticles Supported Catalyst **

Duygu KÖSE
Anorganik Kimya Anabilim Dalı

Bilgehan GÜZEL
Anorganik Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, reaksiyon ortamlarından kolay ayırabilme amacıyla manyetik demir oksit üzerine desteklenmiş Schiff bazı ligantlarının Pd ve Mn kompleksleri sentezlenmiştir. Bu amaçla ilk aşamada Fe₃O₄ silikat ile kaplanmış, sonrasında silikat üzerine 3(2-aminoetilamin)propil-tri metoksisilan bağlanmıştır. Fe₃O₄ destekli silanın amin grubunun 2 asetil piridin ile kondenzasyonu sonucu elde edilen manyetik Fe₃O₄ destekli Schiff bazının Pd kompleksi hazırlanmıştır. Mn kompleksinin hazırlanmasında ise 3(aminoetil amin)propiltrimetoksi silan ile 2-hidroksi naftaldehit mangan asetat eşliğinde kalıp etkiden yararlanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşik silikat kaplı Fe₃O₄'e bağlanarak Fe₃O₄ destekli Schiff bazı Mn kompleksi oluşturulmuştur. Sentezlenen bileşik ve ara ürünlerin yapıları FT-IR, XRD ve SEM analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Sentezlenen Pd kompleksinin katalitik etkinliği Suzuki tepkimesinde, Mn kompleksinin ise epoksidasyon tepkimesi üzerinde belirlenmiştir. Manyetik nano tanecik üzerine destekli katalizörler reaksiyon sonrası mıknatısla sabitlenerek dekantasyon yoluyla kolaylıkla reaksiyon ortamından ayrılmıştır.

Anahtar kelimeler: Manyetik Nanopartikül, Katalizör, Fe₃O₄, Suzuki Reaksiyonu, Epoksidasyon

ABSTRACT

In this study, novel Pd and Mn complexes with Schiff base ligands were synthesized and supported on magnetic iron oxide for the purpose of easy removal of the catalyst from the reaction media. This was accomplished by first coating the Fe₃O₄ with silicate and then attaching 3(2-aminoethylamine)propyl-tri metoxysilane to the silicate. The Fe₃O₄ supported Schiff base Pd complex was obtained as a result of the condensation of the imine group of the supported silane and 2-acetyl pyridine. The Mn complex was prepared by first reacting 3(aminoethylamine)propyl-tri metoxysilane, 2-hydroxy naphthaldehyde and manganese acetate. Then the product of this reaction was attached to the silicate coated Fe₃O₄, resulting in the Schiff base Mn complex. All synthesized complexes were characterized by FT-IR, XRD and SEM. The catalytic activities of the Pd complex in a Suzuki reaction and of the Mn complex in an epoxidation reaction were observed. The magnetic nanoparticle supported catalysts were removed from the reaction media easily via decantation with magnets.

*Yüksek Lisans Tezi- MSc. Thesis

Key words: Magnetic Nanoparticles, Catalyst, Fe₃O₄, Suzuki Reaction, Epoxidation.

Giriş

Demir bilindiği gibi sahip olduğu yüksek doyum mıknatıslanma değeri nedeni ile teknolojik pek çok alanda vazgeçilmez bir yapıdır. Demir nano parçacıkları özellikle, karbon-karbon bağlarının oluşumu ve parçalanmasında etkin bir rol almaktadır. Fakat nano boyutta demirin teknolojik uygulamasında karşılaşılan en önemli dezavantaj, sahip olduğu yüksek reaktivitesidir. Su veya hava ortamında bulunduğu zaman çok hızlı bir şekilde oksitlenerek, sahip olduğu ferromanyetik karakteristiği kaybedip antiferromanyetik yapıya dönüşmektedir. Bu da, yüksek oranda oksijen içeren veya sulu ortamlarda demirin kullanılmasını engelleyici bir etken olarak karşımıza çıkıyor. Literatürlerde bu sebeple, demirin yüzey reaktivitesinin azaltılıp, kullanılan sistem içerisinde kararlı olarak uzun süreler kalabilmesi için çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların en önemlileri, farklı element matrisleri içerisinde tutularak, polimer ile kaplanarak veya istenilen şekilde oksitlendirilerek yapının antiferromanyetik yapıya dönüşmeyip, net bir mıknatıslanma değeri olan kararlı ferrimanyetik yapıya dönüşmesi veya ferromanyetik halde tutma çalışmalarıdır. Bu şekilde, demirin teknolojik uygulamalarda kararlı olarak uzun süreler pasifleşerek kullanılması sağlanmıştır. Yapılan tez çalışmasında, Fe₃O₄ nano partikülü sentezlenerek SiO₂ ile kaplanarak pasifleşmesi sağlandı.

Materyal ve Metod

Materyal

Kimyasallar

Demir (III) klorür heksahidrat, Demir (II) sülfat heptahidrat, sodyum hidroksit (NaOH), Amonyum Hidroksit (NH₄OH), Saf Su, [3-(2- Amino Etil Amin) Propil] Trimetoksi Silan, n-Hekzan, Dietileter, Dimetilformamid (DMF), 2- Asetil Piridin, Benzen, Metanol, Etil Asetat, Aseton, Fe₃O₄ Nano Partikül, Etanol (CH₃CH₂OH), Diklorometan (CH₂Cl₂), Mangan(II) Asetat (CH₃COO)₂ Mn, Tetra Etil Orto Silikat (TEOS), Paladyum(II) Asetat (Pd(OAc)₂), 3 Amino Propil tri Metoksi Silan, 2 Hidroksi 1 Naftaldehit, 4-Bromo Asetofenon, Fenil Boronik Asit, K₃PO₄, n-Hekzadekan, Na₂SO₄, Stiren, Stiren Oksit, Benzaldehit, TBHP(Tersiyer Bütil Hidrojen Peroksit)

Araç ve Gereçler

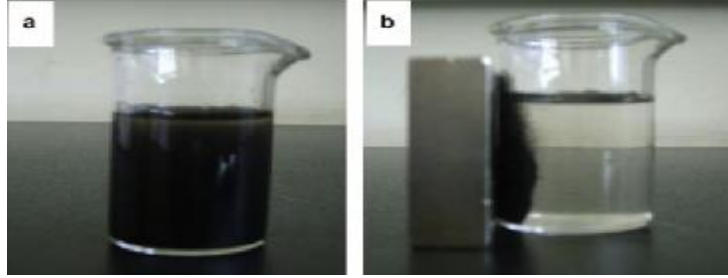
FT- IR Spektroskopisi (Perkin-Elmer RX-1, KBr disk; 4000-400cm⁻¹), Tek Kristal X-ray Difraktometresi (XRD), SEM, GC, Karıştırıcı, Etüv, Ultrasonic banyo

Metod

Manyetik Nano Partikül Fe₃O₄ Sentezi

FeCl₃.6H₂O (1.62 g), FeSO₄.7H₂O (1.39 g) belirtilen miktarlarda alındı, 40 ml suda çözüldü. Daha sonra 30 dk 70 °C' de 5 ml 1 N NaOH ilave edildi.

Ortamda siyah partiküller oluştu. Bu aşama bittikten sonra 5 ml 3 N NaOH eklendi. Çökme tamamlandıktan sonra partiküller 5 kez suyla yıkandı. Mıknatısla ayrılması sağlandı. Son olarak partiküller vakum altında kurumaya bırakıldı.



Şekil 1. Oluşturulan manyetik nano partiküllerin mıknatıs yardımıyla ayrılması

Katı Destek Sentezi

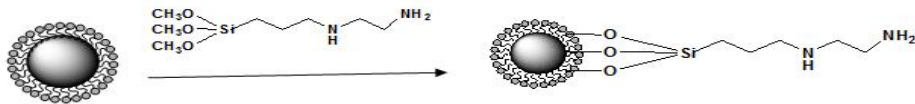
Fe_3O_4 nano partikülü (0.590 g), etanol (160 ml) içerisine eklendi. 10 dk azot atmosferinde ultrasonik banyoda bekletildi. İçerisine NH_4OH (12ml), H_2O (24ml), TEOS (1.6ml) eklenir. 5 saat ultrasonik banyoda bekletildi. Manyetik partiküller mıknatıs yardımıyla çekilerek dekantasyon yardımıyla ayrıldı. Etanol ve su ile yıkandı, kurutuldu.



Şekil 2. SiO_2 kaplanmış manyetik katı destek

ML₁ Kompleksinin Sentezi 1. Basamak

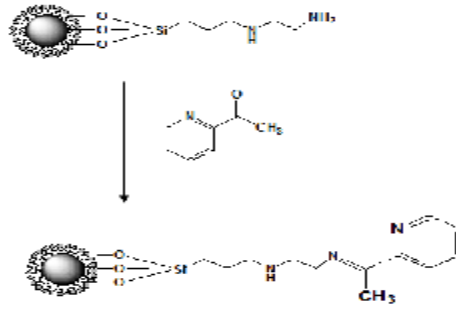
SiO_2 kaplı Fe_3O_4 nano partikülü (0.2 g), 3(2-aminoetilamin)propil tri metoksi silan (6ml) ve etanol (10 ml) alınıp, 2 saat ultrasonik banyoda karıştırıldı. Daha sonra 50 °C' de 1.5 saat geri soğutucu altında ısıtıldı. Oluşturulan madde manyetik dekantasyon yardımıyla ayrıldı. Desikatörde kurumaya bırakıldı.



Şekil 3. ML₁ kompleksinin oluşum reaksiyonu 1. Basamak

ML₁ Kompleksinin Sentezi 2. Basamak

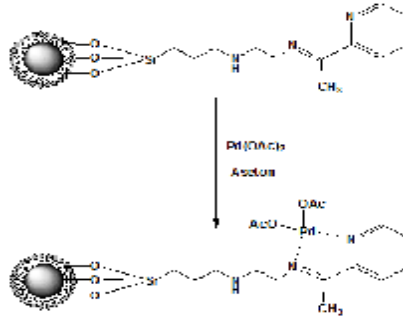
1. basamakta sentezlenen madde (0.2171 g), 2-asetil piridin (2.2 ml), etanol (33 ml) alındı. 30 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra azot gazı atmosferinde 36 saat kaynama sıcaklığında geri soğutucu altında bekletildi. Oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve manyetik dekantasyonla ürün ayrıldı. Manyetik katı etanol ve hekzan karışımında yeniden dağıtıldı ve oda sıcaklığında 30 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Ürün manyetik dekantasyonla ayrıldı ve vakum altında oda sıcaklığında kurutuldu.



Şekil 4. ML₁ Kompleksinin oluşum reaksiyonu

MK₁ Kompleksinin Sentezi

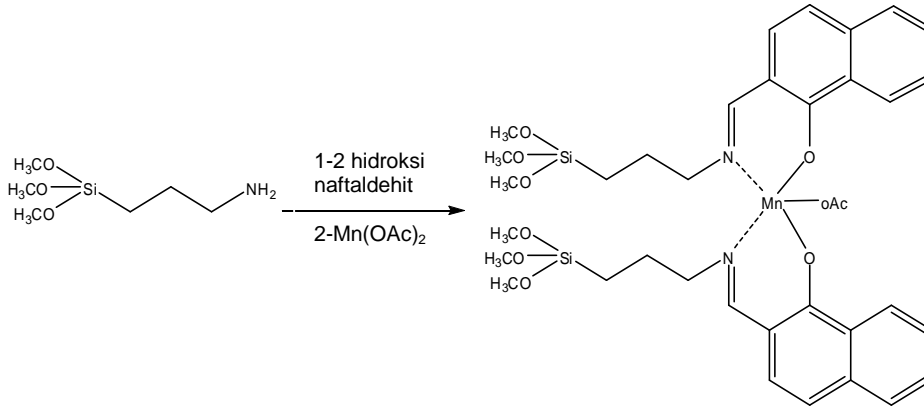
Sentezlenen ML₁ kompleksi (0.1241 g), Pd(OAc)₂ (0.0136 g), aseton (21 ml) kaynama sıcaklığında azot gazı atmosferinde 36 saat geri soğutucu altında kaynama sıcaklığında bekletildi. Daha sonra oluşan ürünün katı desteğinde kullanılan silikat kaplı Fe₃O₄ nano partikülünün manyetik özelliğinden faydalanarak mıknatıs yardımıyla reaksiyon ortamından çekildi, dekantasyon ile çözücü ortamından ayrıldı. Aseton ile yıkandı ve kurutuldu.



Şekil 5. MK₁ kompleksinin oluşum reaksiyonu

ML₂ Kompleksinin sentezi

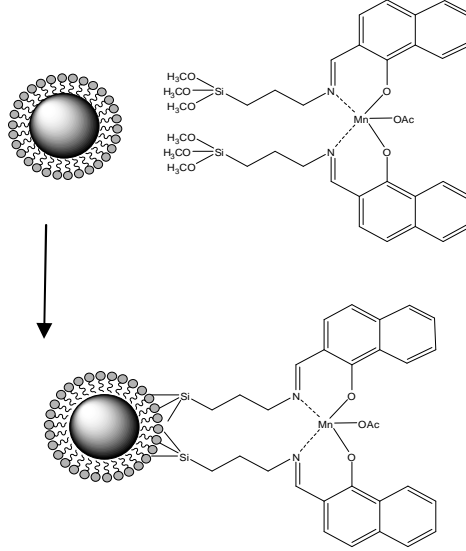
3-aminopropiltrimetoksisilan 0.1745 ml (1mmol), 25 ml etanol içerisinde çözüldü. 2-hidroksinaftaldehit 0.172 ml (1mmol), 25 ml etanol içerisinde çözüldü. Çözeltiler damla damla birbirlerine eklendi, oda sıcaklığında 6 saat karıştırıldı. Daha sonra içerisinde kalıp etki yapmak için Mn(OAc)₂ (1.038 g) ilave edildi. Çözelti 24 saat geri soğutucu altında kaynama sıcaklığında bekletildi. Çözelti 24 saat sonunda alındı, süzüldü ve etanol yardımıyla yıkanıp desikatörde kurutuldu.



Şekil 6. ML₂ Kompleksinin oluşum reaksiyonu

MK₂ Kompleksinin Sentezi

Oluşturulan ML₂ kompleksinden 0.719 g (1mmol) alındı, 10 ml etanol içerisinde çözüldü. Bu çözelti içerisinde 2 g Fe₃O₄/SiO₂ manyetik nano partikül eklendi. 12 saat kaynama sıcaklığında geri soğutucu altında ısıtıldı. Böylece oluşturulan ML₂ kompleksinin daha önceden elde edilen manyetik desteğe bağlanması sağlandı. Çözelti ortamından manyetik özelliğinden faydalanarak mıknatıs yardımıyla dekantasyon yapılarak alındı. Etanol ve su ile yıkandı, kurutuldu.



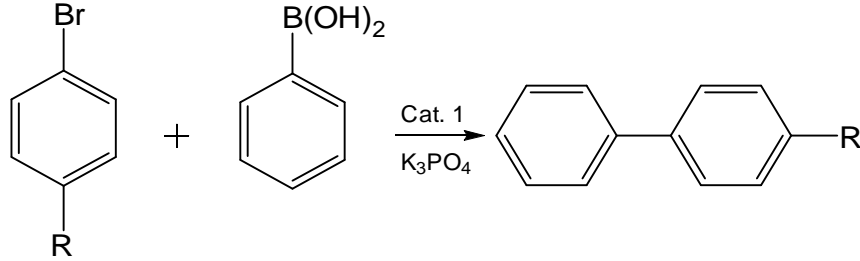
Şekil 7. MK₂ kompleksinin oluşum reaksiyonu

Metal Komplekslerinin Katalizör Etkilerinin İncelenmesi

Sentezlenen MK₁(Pd) katalizörünün Suzuki reaksiyonundaki aktivitesi incelenirken, MK₂(Mn) katalizörünün stirenin epoksidasyonundaki katalitik etkinliği incelenmiştir.

MK₁ (Pd) Katalizörünün Suzuki Reaksiyonundaki Katalitik Çalışmaları

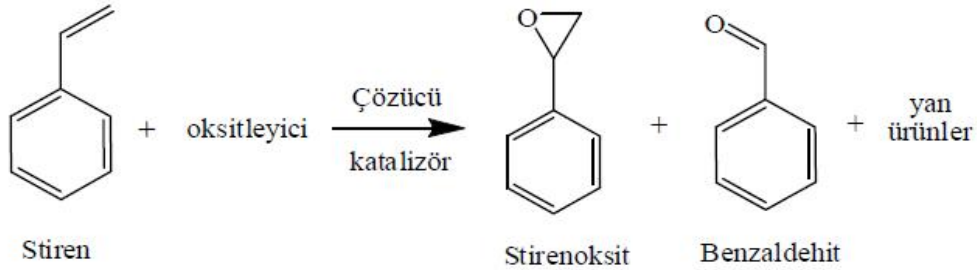
Suzuki reaksiyonunu gerçekleştirmek için 4-bromoasetofenon (0.2149g), fenil boronik asit (0.1975 g), baz olarak K₃PO₄ (0.8628 g), iç standart olarak n-hekzadekan (0.12 ml) ve çözücü olarak DMF (5 ml) balon içerisine konuldu. (Nam T.S. Phan,2010) İçerisine 0.01 g elde ettiğimiz MK₁(Pd) katalizöründen eklendi. 100 °C de geri soğutucu altında karıştırıldı. Reaksiyon ortamından 20 dk aralıklarla 0,1 ml numune alınarak içerisine reaksiyonu durdurmak için 1 ml H₂O eklendi. Ayırma hunisine alınarak üzerine 2 ml dietileter eklendi ekstrakte edildi ve tekrar 2 ml dietileter ile ekstraksiyon yapıldı. İçerisine kurutma ajanı Na₂SO₄ eklendi. 20 dk da bir alınan örnekler viallere konularak GC analizleri yapıldı.



Şekil 8. Suzuki reaksiyonu

MK₂ (Mn) Katalizörünün Stirenin Epoksidasyonundaki Katalitik Çalışmaları

Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan 10 ml DCM çözeltisi içerisine 0.1 g oluşturulan Mn katalizörü ilave edilir. Üzerine ilk önce substrat olarak 1ml stiren, 15 dk. sonra da 2.0 ml oksidant TBHP ilave edildi ve oda sıcaklığında belirli bir süre (1, 3 ve 6 sa) karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon ortamından dekante edildi. Elde edilen ürün karışımlarından alınan örneklerin tamamı GC cihazında analiz edildi.



Şekil 9. Stirenin epoksidasyon reaksiyonu

Tartışma

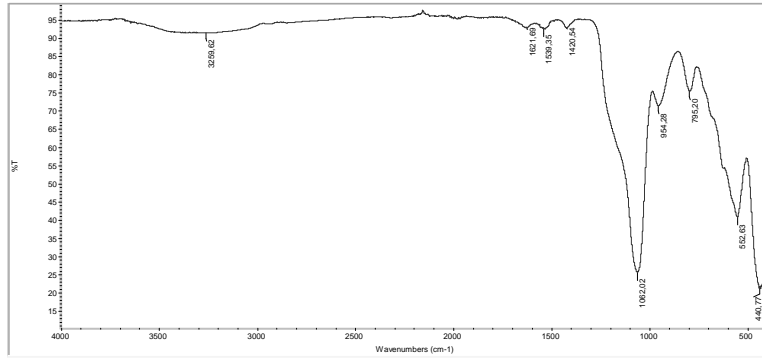
Tez çalışmaları kapsamında hedeflenen ligand ve bileşiklerin sentezleri başarıyla gerçekleştirilmiş olup, yapısal karakterizasyonları, FT-IR, SEM ve XRD gibi spektroskopik yöntemlerden yararlanılarak aydınlatılmıştır. Ayrıca oluşturulan katalizörlerin; MK₁(Pd) için Suzuki reaksiyonundaki, MK₂(Mn) için ise stirenin epoksidasyonundaki katalitik etkinliği incelenmiştir. Suzuki reaksiyonu için 4-bromoasetofenon ve fenilboronik asit kullanılmıştır, katalitik aktivite sonucunda 4-asetilbifenil oluşturulmuştur. GC analiz cihazında, reaksiyon başlangıcından itibaren 20 dakikada bir numune verilerek dönüşen ürün yüzdesi tespit edilmiştir. MK₁ katalizörü kullanılarak yapılan Suzuki reaksiyonları genellikle fosfin içeren Pd katalizörleri ile gerçekleştirilirken bu çalışma sayesinde fosfin içermeyen gruplarla da reaksiyonun gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Böylece fosfin bileşiklerinin çevreyi ve insanları etkileyen zararlarından kaçınılmış olmaktadır. MK₂ katalizörü ise stirenin epoksidasyonu için kullanıldı. Reaksiyon sonucunda stiren oksit ve

benzaldehit oluşumu gözlemlendi ve dönüşüm yüzdesi GC analiz cihazına verilerek tespit edildi.

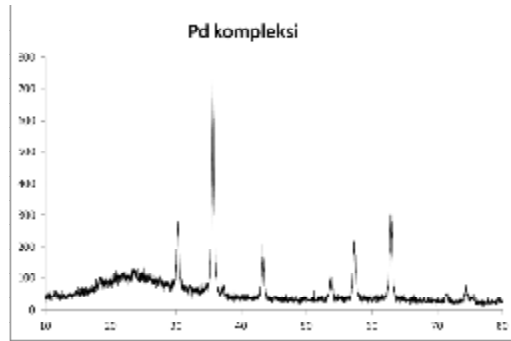
Ayrıca sentezlenen katalizörler sayesinde hem homojen katalizörlerin hem de heterojen katalizörlerin etkin olan özellikleri bir araya getirilmiştir. Yani homojen katalizörler gibi reaksiyon ortamında daha etkin yüzey alanı oluşturup, heterojen katalizör olarak da ortamdan kolayca manyetik dekantasyon yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

Sentezlenen Bileşiklerin Karakterizasyonu MK₁ Katalizörü

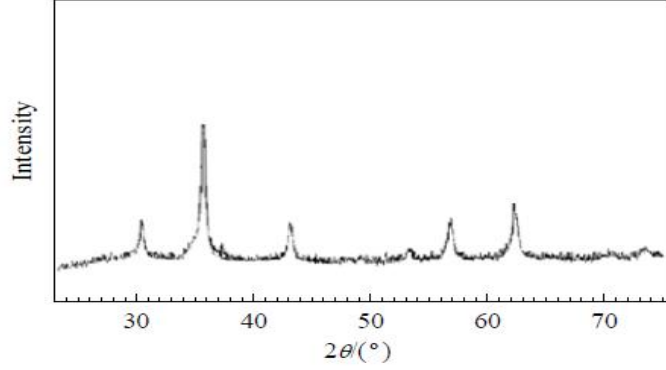
Metal komplekslerinin IR spektrumları incelendiğinde MK₁ katalizörü için; kompleksin spektrumuna (EK 1) 1622 cm⁻¹ aralığında C=N imin grubu , 1567 cm⁻¹ aralığında aromatik C=C, 1062 cm⁻¹ aralığında görülen Si-O piki, 552 cm⁻¹ aralığında Fe-O piki varlığı sentezlenen ligantların olduğunu doğrulamaktadır. (Nghia, 2011).



Şekil 10. MK₁ Katalizörünün FT-IR Spektrumu



Şekil 11. MK₁ Katalizörü için XRD Spektrumu



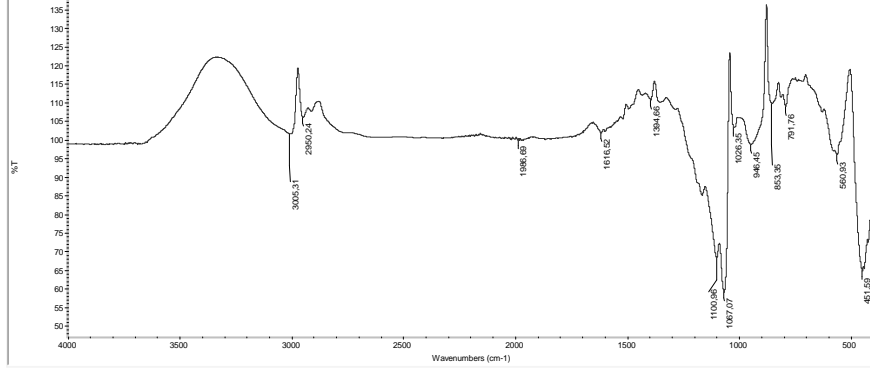
Şekil 12. Pd Katalizörü için XRD Spektrumu (Nghia T.,2011)

MK₁ katalizörü için XRD sonuçlarına şekil 11. ve şekil 12.'ye bakıldığında literatürdeki sonuçlarla örtüştüğü görülmektedir. XRD görüntülerinden paladyumun metalik halde olduğu tespit edilmiştir. XRD ölçümleri 2θ açıları $10-80^\circ$ aralığında olacak şekilde yapılmış ve metallere ait pikler ölçülmüştür. Buna göre XRD grafiklerinde gözlenen piklere bakıldığında; SiO₂ kaplı Fe₃O₄ nanopartikülü için 2θ : 30.1° , (220) ; 35.4° , (311) ; 43.1° , (400) ; 53.4° , (422) ; 57° , (511) ; 62.6° , (440) değerleri bulunmuştur. MK₁ katalizörü için 2θ : 38.8 , Pd(111); 45 , Pd(200) değerleri bulunmuştur. Alınan XRD sonuçlarına bakıldığında Fe₃O₄ nanopartikülü ile MK₁ katalizörünün XRD sonuçlarının çakıştığı görülmektedir bu nedenle XRD spektrumunun yorumlanması zorlaşmıştır. Ayrıca XRD sonuçlarından yola çıkılarak molekül boyutunun 22 nm civarında olduğunu söyleyebiliriz.

MK₁ katalizörü için altın kaplama yapılarak çekilen SEM görüntüleri incelendiğinde elde edilen katalizörün manyetik özelliğe sahip olmasından ötürü net görüntü almakta zorluk çekilmiştir. Fakat boyut olarak bakıldığında XRD sonuçlarını doğrular nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

MK₂ Katalizörü

Metal komplekslerinin IR spektrumları incelendiğinde MK₂ katalizörü için; kompleksin spektrumuna (EK1) 2950 cm^{-1} aralığında $-\text{CH}_2$ ve aromatik C-H gerilmeleri, 1616 cm^{-1} aralığında C=N imin grubu , 1067 cm^{-1} aralığında görülen Si-O piki, 560 cm^{-1} aralığında Fe-O piki varlığı sentezlenen ligantların olduğunu doğrulamaktadır (M. Esmailpour, 2012).

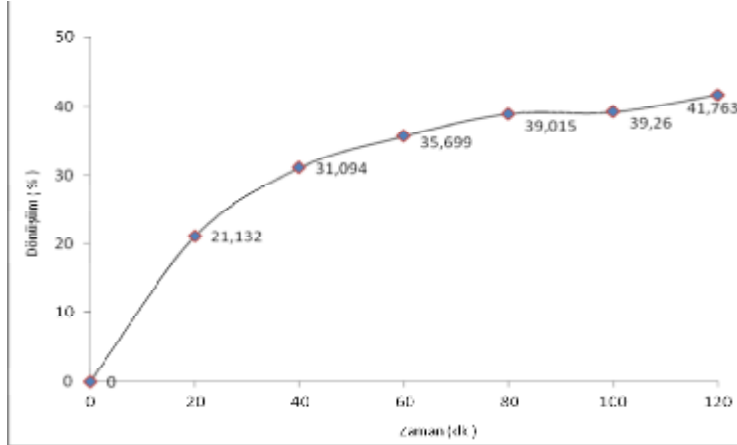


Şekil 13. MK₂ Katalizörünün FT-IR Spektrumu

MK₂ katalizörü için XRD sonuçlarına bakıldığında literatürdeki sonuçlarla örtüştüğü görülmektedir. XRD ölçümleri 2θ açıları $10-80^\circ$ aralığında olacak şekilde yapılmış ve metallere ait pikler ölçülmüştür. Fe₃O₄ nanopartikülü ile MK₂ katalizörünün XRD sonuçlarının çakıştığı görülmektedir. Bu nedenle XRD spektrumunun yorumlanması zorlaşmıştır. XRD sonuçlarından yola çıkılarak molekül boyutunun 20 nm civarında olduğunu söyleyebiliriz.

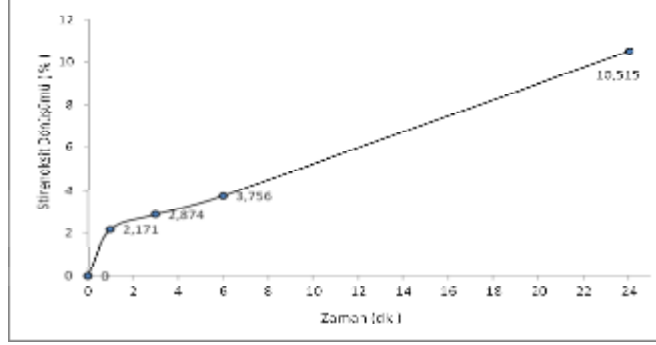
MK₂ katalizörü için altın kaplama yapılarak çekilen SEM görüntüleri incelendiğinde elde edilen katalizörün manyetik özelliğe sahip olmasından ötürü net görüntü almakta zorluk çekilmiştir. Fakat boyut olarak bakıldığında XRD sonuçlarını doğrular nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 1. MK₁ Katalizörünün Suzuki Reaksiyonundaki Aktivitesi

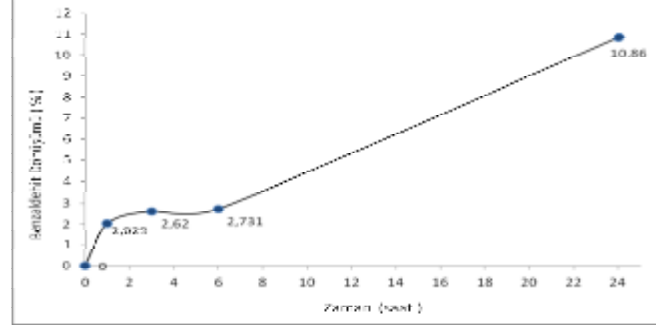


Suzuki reaksiyonları genellikle organoboran bileşikleri veya fosfin kullanılarak yapılan reaksiyonlardır. Fakat bizim tez çalışmamız kapsamında yaptığımız manyetik nanopartikül destekli katalizör sayesinde fosfin kullanılmadan Suzuki reaksiyonu gerçekleştirilmiş oldu. Ayrıca katalizörümüzün hem manyetik hemde nano boyutta olması sayesinde homojen ve heterojen katalizörlerin üstünlüklerini bir araya getirmiş olduk. Hem homojen katalizörler gibi etkin yüzey alanına sahip ve reaksiyon ortamının her bölgesine eşit bir şekilde dağılmaktadır hemde heterojen katalizör olarak reaksiyon ortamından kolayca ayrılıp tekrar tekrar kullanılabilen manyetik özellikte nano boyutta Suzuki reaksiyonunda 120 dakika boyunca yapılan reaksiyon sonucunda % 42 dönüşün aktivitesi gösteren MK₁ katalizörü tez kapsamında elde edilmiştir.

Çizelge 2. MK₂ Katalizörünün Stirenoksit Oluşumundaki Katalitik Aktivitesi



Çizelge 3. MK₂ Katalizörünün Benzaldehit Oluşumundaki Katalitik Aktivitesi



Oda koşullarında, diklorometan ile yapılan epoksidasyon reaksiyonunda oksidant olarak tersiyer bütül hidrojen peroksit (TBHP) kullanılmıştır. 24 saat sürdürülen reaksiyon sonucunda MK₂ katalizörü stirenoksit dönüşümü % 10.5 aktivite göstermiştir. Ayrıca benzaldehit dönüşümü 24 saat sonunda % 10.8 gözlenmiştir. 24 saat sonunda katalitik aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Kaynaklar

- ESMAEİLPOUR M.,2012. Schiff Base Complex Of Metal Ions Supported On Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles: An Efficient, Selective And Recyclable Catalyst For Synthesis Of 1,1-Diacetates From Aldehydes Under Solvent-Free Conditions
- MYUNG- JONG JIN AND DONG- HWAN LEE,2010. A practical heterogeneous catalyst for the suzuki, sonogashira and stille coupling reactions of unreactive aryl chlorides
- NAM T.S. PHAN, HA V. Le,2010. Superparamagnetic nanoparticles-supported phosphine- free palladium catalyst for the sonogashira coupling reaction
- NATALIA J.S. COSTA, PEDRO K. KIYOHARA,2010. A single-step procedure for the preparation of palladium nanoparticles and a phosphine-functionalized support as catalyst for Suzuki cross-coupling reactions
- NGHIA T. BUI, TRUNG B. DANG, HA V. LE, NAM T.S. PHAN, 2011. Suzuki Reaction of Aryl Bromides Using A Phosphine –Free Magnetic Nanoparticle- Supported Palladium Catalyst

LİPOKSİJENAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARININ OLUŞTURULMASI VE ÇEŞİTLİ KİNON SENTEZLERİNDE KULLANILMASI *

*Preparation of Crosslinked Enzyme Aggregates of Lipoxygenase and Its Use in
The Synthesis of Various Quinones**

Ali TOPRAK
Kimya Anabilim Dalı

S.Seyhan TÜKEL
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada soya fasülyesi tohumlarından (*Glycine max (L.) Merr. Cv. Atakişi*) kısmi olarak saflaştırılan lipoksijenaz (LOX) çapraz bağlı lipoksijenaz agregatları (LOX-CLEA) oluşturularak immobilize edilmiştir. Immobilizasyon için en uygun glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılarak sırasıyla %20 (w/v), %55 (w/v) ve 10 saat olarak belirlenmiştir. Serbest LOX ve LOX-CLEA örneklerinin hidroperoksidaz aktivitesi 1,4-benzokinon ve timokinon sentezleri için incelenmiştir. En yüksek 1,4-benzokinon verimi 15 dakika reaksiyon süresi sonrasında serbest LOX ve LOX-CLEA için sırasıyla %24 ve 33 olarak, buna karşın en yüksek timokinon verimleri serbest LOX ve LOX-CLEA için sırasıyla %12 ve 15 olarak elde edilmiştir. LOX-CLEA kesikli reaktörde 1,4-benzokinon sentezi için 15 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %39'u korunmuştur.

Anahtar kelimeler: Lipoksijenaz, RSM, CLEA, immobilizasyon, kinon

ABSTRACT

In this study, lipoxygenase (LOX) partially purified from soybean seeds (*Glycine max (L.) Merr. Cv. Atakişi*) was immobilized as crosslinked enzyme aggregates (LOX-CLEA). The optimal glutaraldehyde and ammonium sulfate concentrations and immobilization time for the immobilization were determined as 20% (w/v), 55% (w/v) ve 10 h, respectively by using response surface methodology (RSM). The hydroperoxidase activities of free lipoxygenase and LOX-CLEA were investigated for the synthesis of 1,4-benzoquinone and thymoquinone. After 15 min reaction time the highest 1,4-benzoquinone yield was obtained as 24 and 33%, respectively for the free LOX and LOX-CLEA whereas the highest 1,4-benzoquinone and thymoquinone yields were obtained as 12 and 15%, respectively for the free LOX and LOX-CLEA. After 15 reuses, LOX-CLEA protected 39% of its initial activity for the synthesis of 1,4-benzoquinone in a batch type reactor.

Key Words: Lipoxygenase, RSM, CLEA, Immobilization, Quinone

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

Giriş

Lipoksijenazlar (LOX; EC 1.13.11.12) iki veya daha fazla doymamış yağ içeren yağ asitlerine oksijen katarak onları yağ asidi hidroperoksitlerine dönüştüren, Hem grubu içermeyen demir taşıyıcı dioksijenazlardır. Axelrod ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada enzimin üç izoenzimi olduğunu bildirilmiştir (Axelrod ve ark., 1972). Lipoksijenaz enzimi, optimum pH, substrat özgünlüğü, ürün oluşumu ve kararlılık bakımından LOX-1, LOX-2, LOX-3, olarak adlandırılan üç izoenzime sahiptir.

Lipoksijenazlar endüstride farklı kullanım alanlarına sahiptirler. Soya fasulyesinden elde edilen lipoksijenaz enzimi doğal bitkisel yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerine spesifik olarak oksijen ekleyebilmektedir. Bu sayede elde edilen maddeler risinoleik asite dönüştürülebilmektedir. Risinoleik asit ve onun türevleri ise sabunun, boyanın, verniğin, reçinenin, plastiğin ve yağlayıcı maddelerin asıl bileşenidir. Ekmek yapımında da lipoksijenazın kullanımı oldukça yaygındır. Bu iki sebepten kaynaklanmaktadır. Birincisi; lipoksijenaz karateonidleri oksitleyerek ekmek içinin daha beyaz olmasını sağladığı için tercih edilen bir beyazlatıcıdır. İkincisi ise; hamuru iyileştirici yönde etki edip, hamurun yoğrulma toleransını artırmaktadır.

Lipoksijenaz enzimi H_2O_2 li ortamda Fenton reaksiyonu yolu ile ksenobiotiklerin oksidasyonu, epoksidasyon, desülfürasyon, *N*-demetilasyon ve sülfoksidasyon reaksiyonlarında kullanılabilir.

Yanıt yüzey yöntemi, "Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması" ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. İlk olarak kimya endüstrisine uygulanmıştır. Myers ve Montgomery (1995) yanıt yüzey yöntemini, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlamıştır. Bu yöntem, birçok deney türü için ortaya çıkan problemleri eş zamanlı olarak çözmek ve cevapları da eş zamanlı olarak optimize etmekte faydalanan kullanışlı ve etkili bir metottur (Chen, 1994).

Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA), çözünür enzim moleküllerinin çözünmez agregatlar oluşturmasına dayanmaktadır. Uygun agregat oluşturucular eklenmesiyle enzim çözeltisinin elektrostatik sabitlerinin değişmesi ile ya da enzim çözeltisinin hidrasyon durumunun değiştirilmesi ile çözünmez enzim agregatları oluşturulabilmektedir.

Kinonlar, aromatik bir halka üzerinde, iki tane keton karbonili içeren bileşiklerdir ve karbonil grubu halkanın bir parçası haline gelmiştir. Kinonlar aromatik bileşik olmamalarına karşın bir indirgenme-yükseltgenme dönüşüm sistemi sağlarlar. Bu indirgenme-yükseltgenme sistemi sayesinde fotosentez ve solunum gibi biyolojik redoks tepkime zincirlerinde önemli rol oynarlar. Bunun yanı sıra kinon bileşikleri konjuge olmaları nedeniyle renkli bileşiklerdir ve doğal boyar maddesi olarak kullanılırlar. Tedavi edici kinon bileşikleri olduğu gibi herbisit, fungusit, insektisit vb. özellikler gösterenlerde bulunmaktadır (Astreitwieser ve Heatcock, 1976).

Materyal ve Metod

Materyal

Araç ve Gereçler: UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), HPLC (Shimadzu, Classs Vp serisi), magnetik karıştırıcı, inkübatör, elektrikli terazi, otomatik pipet (Eppendorf, Mikrolit), girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcı su banyosu (Memmert).

Kimyasallar:Linoleik asit, hidrokinon, 1,4-Benzokinon, fenol, timol, timokinon, hidrojen peroksit, tert-bütül hidroperoksit, kümen hidroperoksit, glutaraldehit (%50, w/w) amonyum sülfat, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat, folin-ciocalteu çözeltisi, polietilenglikol (PEG), dimetil sulfoksit (DMSO), t-bütanol, *N*-sikloheksil-*N'*-(2-morfolinoetil) karbodiimid-meto-p-toluensülfonat, sodyum sitrat, siğır serum albümin, aseton, metil alkol, sodyum hidroksit, glasiyel asetik asit, fosforik asit (%85,v/v), hidroklorik asit (%37,v/v), borik asit.

Metot

Örneklerin Homojenizasyonu

Soya fasulyesi tohumlarının her 100 gramı için 200 mL önceden -20 °C'ye kadar soğutulmuş aseton eklenerek örnekler blender ile homojenize edilmiştir. Sonrasında homojenat su trompu yardımıyla vakum altında süzülerek ve filtre kağıdının üstünde kalan kısım tekrar blender haznesine alınarak işlem yukarıda anlatıldığı şekilde 2 kez tekrarlanmıştır. Son süzme işlemi sonunda elde edilen toz halindeki katı ekstrakt 24 saat 5 °C'de bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Aseton ekstraksiyonu işlemi ile elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 30 mL borat tamponunda (50 mM, pH 9,0) çözüldükten sonra elde edilen çözelti, 10000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanta farklı doyunlukta %20-60'lık amonyum sülfat çöktürmeleri uygulanmıştır. Protein miktarı tayinleri Lowry (1951) yöntemiyle belirlenmiştir.

Lipoksijenazın CLEA Oluşturarak İmmobilizasyonu

LOX 'ın CLEA oluşturarak immobilizasyonu için Sheldon ve ark. (2006) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Katı ekstraktın her 1 gramına 5 mL 50 mM borat tamponu (pH 9,0) eklenmiş ve 60 dk karıştırıldıktan sonra 12000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanta %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve çökelti 2,5 mL tampon ile (50 mM pH 9 borat tamponu) çözülmüştür. Bu çözelti içerisine 5 mL kimyasal aminasyon çözeltisi (10 mM *N*-sikloheksil-*N'*-(2-morfolinoetil) karbodiimid-meto-p-toluensülfonat içeren pH 4,7'ye ayarlanmış 1 M etilendiamin) ilave edilip 1 saat oda koşullarında (25 °C) bekletilmiştir. Elde edilen lipoksijenaz çözeltisine derişimi %60 olacak şekilde katı amonyum sülfat eklenmiş, 5 °C'de 20 dk bekletilmiş ve lipoksijenazın çöktürülmesi sağlanmıştır. Çöktürme işlemi sağlandıktan sonra 0,6 mL glutaraldehit

(%50'lik, v/v) eklenerek 5 °C'de 10 saat boyunca çalkalayıcı su banyosunda bekletilmiştir. Oluşan CLEA örnekleri üzerine 4 mL soğuk aseton eklenerek iyice çalkalandıktan sonra aseton fazı dökülmüştür. Daha sonrasında CLEA örneklerine 2 mL eter eklenmiş ve çalkaladıktan sonra süzölmüştür. Elde edilen immobilize LOX-CLEA'lar süzöntüde glutaraldehit kalmayınca kadar saf su ile yıkanmıştır.

Lipoksijenazın İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Lipoksijenazın CLEA şeklinde immobilizasyonunda, uygun immobilizasyon koşulları RSM kullanılarak belirlenmiştir. Literatür taraması ve ön çalışmalar yapılarak CLEA hazırlanmasına etki eden önemli faktörler çapraz bağlayıcının derişimi, çöktürücünün derişimi ve immobilizasyon süresi olarak belirlenmiştir.

Bu amaçla 3-faktör ve 3-düzye BBD immobilizasyon çalışmalarında uygulanmış ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi Design-Expert 8.0.7 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Serbest Lipoksijenazın ve LOX-CLEA Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipoksijenaz aktivitesi ölçümünde Axelrod ve ark. (1972) ve Baracat-Pereira ve ark. (2001) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Enzim aktivitesi linoleik asitin enzim ile etkileşmesi sonucu oluşan konjuge çift bağların 234 nm'de artan absorbansı 3 dakika boyunca izlenerek ölçölmüştür.

Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Karakterizasyonu

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri farklı pH'larda (7,0, 7,5, 8,0 fosfat, 8,5, 9,0, 9,5 ve 10,0 borat) 50 mM derişimindeki tampon çözeltiler kullanılarak 25 °C'de belirlenmiştir.

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri daha önceden belirlenmiş optimum pH için farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ve 70 °C) belirlenmiştir.

Serbest LOX ve LOX-CLEA örneklerinin termal kararlılığını belirlemek için enzim iki farklı sıcaklıkta (35 ve 60 °C) 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest LOX ve LOX-CLEA aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçölmüş ve Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

Serbest LOX ve LOX-CLEA ile Kinon Sentezi

Yöntemde 2,75 mL pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponu üzerine 50 µL serbest LOX veya 40 mg LOX-CLEA ilave edilmiştir. Karışım 40 °C'de 2 dakıda inkübe edilmiş ve reaksiyon 100 µL H₂O₂ (200 mM) ve 100 µL p-hidrokinon (200 mM) çözeltilerinin eklenmesi ile başlatılmıştır. 10 dakika reaksiyon süresi sonunda oluşan p-Benzokinon miktarı spektrofotometrik olarak 410 nm'de belirlenmiştir.

LOX-CLEA' ın *p*-Benzokinin Sentezi İçin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

LOX-CLEA örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesinde, çapı 1,5 cm uzunluğu 6,0 cm olan kolon kullanılmıştır. LOX-CLEA örneğinden 1 g tartılarak üzerine 5,6 mL pH'sı 6,5 olan 50 mM fosfat tamponu ilave edilmiş ve reaksiyon 200 mL kümen hidroperoksit (200 mM) ve 200 mL *p*-hidrokinon (200 mM) ilavesi ile 60 °C'de başlatılmıştır. 15 dk sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılarak, oluşan ürünün 410 nm'deki absorbanası ölçülmüştür. LOX-CLEA'nın tekrar kullanımına bağlı aktivite değişimini incelemek amacıyla aynı işlemler 15 kez tekrarlanmıştır.

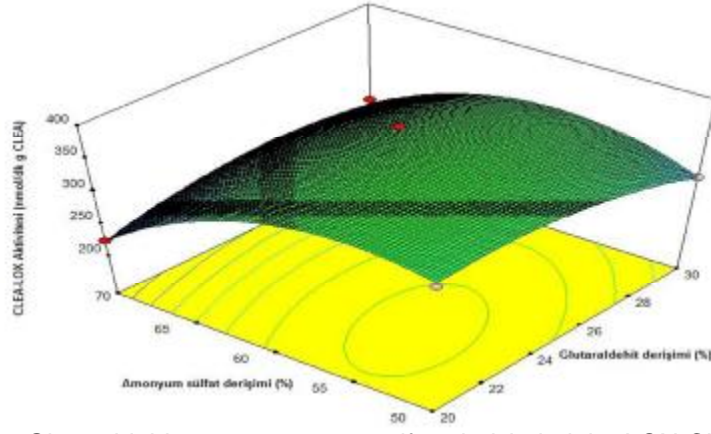
Araştırma Bulguları ve Tartışma

Lipoksijenazın CLEA Oluşturarak İmmobilizasyonu

Box-Behnken dizaynı ile oluşturulan deneysel setin yanıtları (LOX-CLEA aktiviteleri) hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu en yüksek ve en düşük LOX-CLEA aktiviteleri sırasıyla 510 ve 224 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir (Çizelge 1.1). İmmobilizasyon için en uygun glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılarak sırasıyla %20 (w/v), %55 (w/v) ve 10 saat olarak belirlenmiştir. Şekil 1.1 sabit immobilizasyon süresi için (15 saat) glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisini göstermektedir. Şekil 1.1'den görüldüğü gibi amonyum sülfat ve glutaraldehit derişimindeki artışlar LOX-CLEA aktivitesi azaltmaktadır. Glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresi sırasıyla %20, %50 ve 15 saat olduğunda LOX-CLEA aktivitesi 338 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat derişimi %70'e çıkartılıp diğer iki faktör sabit tutulduğunda LOX-CLEA aktivitesi 224 nmol/dk. g CLEA olarak elde edilmiştir.

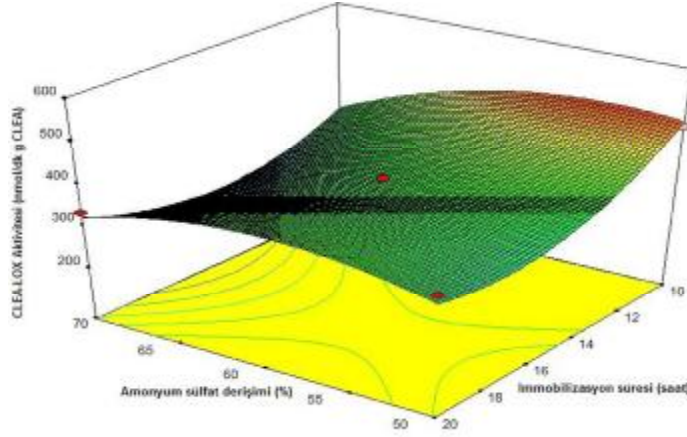
Çizelge 1.1. Deneysel ve hesapsal LOX-CLEA aktiviteleri.

Glutaraldehit derişimi (%)	Amonyum sülfat derişimi (%)	İmmobilizasyon süresi (saat)	LOX-CLEA aktivitesi (nmol/dk. g CLEA) (Deneysel)	LOX-CLEA aktivitesi (nmol/dk. g CLEA) (Hesapsal)
30	50	15	285	338
20	60	10	510	506
25	60	15	380	356
20	60	20	323	350
30	60	10	410	429
25	60	15	353	356
25	70	20	335	323
20	70	15	224	260
20	50	15	338	338
30	60	20	376	427
25	50	20	358	339
25	50	10	468	480
25	60	15	335	356
30	70	15	256	260
25	70	10	321	340



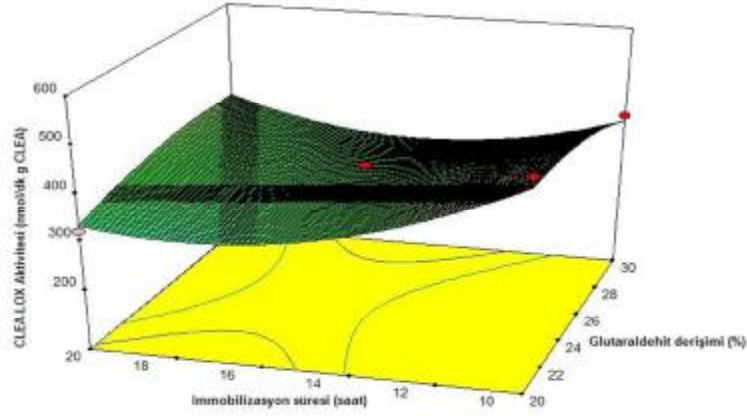
Şekil 1.1. Glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

Şekil 1.2'de ise sabit glutaraldehit derişimi için (%25) amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresindeki derişimlerinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisini görülmektedir. Glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresi sırasıyla %25, %50 ve 20 saat olduğunda LOX-CLEA aktivitesi 358 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat derişimi %70'e çıkartılıp diğer iki faktör sabit tutulduğunda LOX-CLEA aktivitesi 335 nmol/dk. g CLEA olarak elde edilmiştir. Glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri sırasıyla %25 ve %50'de sabit tutulup immobilizasyon süresi 10 saate düşürüldüğünde ise LOX-CLEA aktivitesi 468 nmol/dk. g CLEA olarak ölçülmüştür.



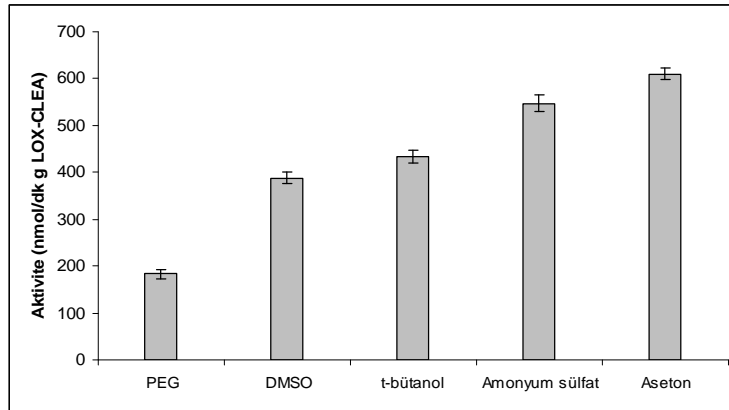
Şekil 1.2. Amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

Şekil 1.3 sabit amonyum sülfat derişimi için (%60) glutaraldehit derişimi ve immobilizasyon süresindeki değişimlerin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisini göstermektedir. Glutaraldehit derişimi, amonyum sülfat derişimi ve immobilizasyon süresi sırasıyla %20, %60 ve 10 saat olduğunda LOX-CLEA aktivitesi 510 nmol/dk. g CLEA olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon süresi 20 saate çıkartılıp diğer iki faktör sabit tutulduğunda LOX-CLEA aktivitesi 323 nmol/dk. g CLEA olarak elde edilmiştir.



Şekil 1.3. Glutaraldehit derişimi ve immobilizasyon süresinin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

Farklı çöktürücülerin LOX-CLEA aktivitesine etkileri Şekil 1.4'te verilmiştir. En yüksek LOX-CLEA aktivitesi 610 nmol/dk. g CLEA olarak asetonun çöktürücü olarak kullanıldığı çalışmada elde edilmiştir.



Şekil 1.4. Farklı çöktürücülerin LOX-CLEA aktivitesi üzerine etkisi.

Serbest Lipoksijenaz ve LOX-CLEA'nın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

Serbest LOX ve LOX-CLEA'nın optimum aktivite gösterdiği pH değerleri her ikisi içinde 8,5 olarak bulunmuştur.

Serbest LOX ve LOX-CLEA için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 35 °C ve 60 °C olarak bulunmuştur.

Serbest LOX için iki farklı sıcaklıkta (35 ve 60 °C) termal kararlılık çalışması yapılmıştır. Serbest LOX 35 ve 60 °C' de 24 saat inkübe edildiğinde, başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %85 ve %47'sini korumuştur. LOX-CLEA 35 ve 60 °C' de 24 saat inkübe edildiğinde, başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %90 ve %73'ünü korumuştur.

Serbest LOX için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 28 mM ve 1593 nmol/dk mg protein olarak belirlenmiştir (Şekil 1.2.). Immobilize enzim için ise bu değerler sırasıyla 4,4 mM ve 1046 nmol/dk g CLEA olarak belirlenmiştir.

Serbest LOX ve LOX-CLEA ile Kinon Sentezi İle İlgili Bulgular

Serbest LOX'un 1,4-benzokinon sentezi için pH 7,0'de maksimum aktivitesini gösterdiği belirlenmiştir ve 1,4-Benzokinon verimi %22 olarak ölçülmüştür. LOX-CLEA ise 1,4-Benzokinon sentezinde maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 6,5 olarak belirlenmiş ve bu pH'da LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezini %11,8 verimle gerçekleştirdiği belirlenmiştir.

Serbest LOX kullanılarak gerçekleştirilen 1,4-Benzokinon sentezi için en yüksek verim %22 olarak 40 °C'de ölçülmüştür. LOX-CLEA için ise 1,4-Benzokinon sentezinde en yüksek verim %18,1 olarak 60 °C'de ölçülmüştür.

1,4-Benzokinon sentezleri her bir preparat için belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde hidrojen peroksit, tert-butil hidroperoksit ve kümen hidroperoksit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Serbest LOX için en yüksek 1,4-Benzokinon verimi %24, LOX-CLEA için ise %33 olarak kümen hidroperoksit varlığında elde edilmiştir.

Kullanılan LOX-CLEA miktarının 1,4-Benzokinon verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla sentez işlemi farklı miktarda LOX-CLEA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 10 mg LOX-CLEA kullanıldığında elde edilen 1,4-Benzokinon verimi %22 olarak elde edilmiş LOX-CLEA miktarı 40 mg'a çıkartıldığında ise reaksiyon %33 verim ile gerçekleştirilmiştir. LOX-CLEA miktarının daha fazla artırılmasının ise sentez verimine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Substrat olarak hidrokinon yerine, fenol ve timol kullanıldığında ürün verimleri hesaplanmıştır. Fenol, hidrokinon ve timolün substrat olarak kullanıldığı reaksiyonda ürün verimleri serbest LOX için sırasıyla %22, 24 ve 12 olarak elde edilmiştir. LOX-CLEA için ise bu verim değerleri sırasıyla %23, 33 ve 15 olarak elde edilmiştir.

LOX-CLEA'un 1,4-Benzokinon sentezi için tekrar kullanım kararlılığı kesikli reaktörde incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de verilmiştir. LOX-CLEA'un 15 arda arda kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %39'unu koruduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar

Lipoksijenaz enzimi, soya fasulyesi tohumundan (*Glycine max (L.) Merr. Cv. Atakişi*) amonyum sülfat ile çöktürme yöntemiyle kısmi saflaştırılıp CLEA yöntemiyle immobilize edilmiştir.

Optimum glutaraldehit ve amonyum sülfat derişimleri ve immobilizasyon süresi yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak sırasıyla %20, %55 ve 10 saat olarak belirlenmiştir.

Serbest LOX için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,5, 35 °C, 28 mM ve 1593 nmol/dk mg protein olarak belirlenmiştir.

LOX-CLEA için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,5, 60 °C, 4,4 mM ve 1046 nmol/dk g CLEA olarak belirlenmiştir.

Serbest LOX için en yüksek 1,4-Benzokinon ve timokinon verimleri sırasıyla %24 ve 12 olarak elde edilmiştir.

LOX-CLEA için en yüksek 1,4-Benzokinon ve timokinon verimleri sırasıyla %33 ve 15 olarak elde edilmiştir.

Kaynaklar

- ASTREITWIESER, A., HEATCOCK, C.H., 1976. Introduction to Organic Chemistry, Collier Mac Millan International Editions U.S.A Sy, 1024.U.S.A
- AXELROD, B., CHRISTOPHER, J.P., PİSTORIUS, E.K., 1972. Isolation of a Third Isoenzyme of Soybean Lipoxygenase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology, 284:54-62.
- BARACAT-PEREIRA, M.C., OLIVERIA, M.G.D.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., SANTORO, M.M., 2001. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenase: Presence of soluble and membrane-bound forms. Plant Physiology and Biochemistry, 39:91-98.
- BOX, G.E.P., and WILSON, K.B., 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (with discussion). Journal of the Royal Statistical Society Series B, 13(1):1-45
- CHEN, H., 1994. Response-surface methodology for optimizing citric acid fermentation by *Aspergillus foetidus*, Proses Biochemistry, 29: 399-405.
- KARTAL, F., JANSSEN, M.H.A., HOLLMANN, F., SHELDON, R.A., KILINÇ, A., 2011. Improved Esterification Activity of *Candida Rugosa* Lipase in Organic Solvent by Immobilization as Cross Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 71:85-89.
- LOWRY, O., Rosebrough A., Farr A., Randall R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265-275.
- MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C., 1995. Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.
- SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., VAN LANGEN, L.M., 2006. Cross-Linked Enzyme Aggregates, Immobilization of Enzymes and Cells Second Edition, ed: Guisan J.M., Humana Press, New Jersey, pp:31.

Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Yıl 2015 Cilt: 33-4

SULEK, F., FERNANDEZ, D.P., KNEZ, Z., HABULIN, M., SHELDON, R.A., 2011.
Immobilization of Horseradish Peroxidase as Crosslinked Enzyme
Aggregates (CLEAs). Process Biochemistry, 46: 765-769.

¹ YENİ FLORLU VIC-DİOKSİM TÜREVİ METAL KOMPLEKSLERİN SENTEZİ VE SÜPERKRİTİK KARBONDİOKSİT ÇÖZÜCÜ ORTAMINDA DEPOZİSYON İŞLEMLERİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ*

*The Synthesis of Novel Fluorous Vic-dioxime Derivatives and Their Metal Complexes, the Determination of Their Solubility in a ScCO₂ Medium and Their Use as Precursors in Deposition **

Fatma ULUSAL
Kimya Anabilim Dalı

Bilgehan GÜZEL
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma kapsamında süperkritik karbondioksit çözücü ortamında yapılan depozisyon işlemlerinde kullanılabilir nitelikte vic-dioksım türevi metal kompleksleri (öncül) sentezlenmiş, yapıları aydınlatılmış, süperkritik karbondioksit ortamında silikajel ve γ -alümina üzerine depozisyon işlemine kullanılabilirliği denenmiştir. Bu amaçla anilin türevleri ile anti-monokloro glioksimin ile vic-dioksım ligandları ve bu ligandların Pd(II), Cu(II) kompleksleri sentezlenmiştir. Ligand sentezinde süperkritik karbondioksitte çözünürlüğü arttırmak amacıyla uzun zincirli anilin türevleri seçilmiştir. Bu metal öncüllerin süperkritik çözücü ortamındaki çözünme miktarları belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları FT-IR, ¹H, ¹⁹F NMR, elementel analiz, manyetik süsseptibilite ve UV-Vis ile aydınlatılmıştır. Elde edilen metal kompleksleri scCO₂ ortamında katı destek üzerine metal depozisyonunda öncül olarak kullanılmış olup nano boyutta metal katalizörler elde edilmiştir. Elde edilen katalizörlerin boyutları TEM ve XRD ile analiz edilmiştir. Buna göre Pd taneciklerinin boyutu 2-16nm ve Cu taneciklerinin boyutu 3-20nm arasında değişmektedir. Bu katalizörlerin olefinlerin hidrojenasyon reaksiyonundaki katalitik aktiviteleri belirlenmiş ve bu amaçla GC kullanılmıştır.

Anahtar kelimeler: Vic-dioksım, Öncül, Katalizör, Depozisyon, Süper kritik karbondioksit

ABSTRACT

Vic-dioxime derivative metal complexes were synthesized in order to determine their solubility in a scCO₂ medium and their use as precursors in the deposition of metal nanoparticles. Their structures were determined and their use in deposition onto silicagel and γ -alumina in scCO₂ was tested in this study. Pd(II) and Cu(II) metal complexes with vic-dioxime ligands and were synthesized for this purpose. The ligands were made by reacting various aniline derivatives with anti-monochloro glyoxime. In order to increase the solubility of the complexes in scCO₂, some of the ligands were synthesized from aniline derivatives with long fluororous chains. All ligands and complexes were synthesized and characterized via various analyses including FT-IR, ¹H, ¹⁹F NMR, UV-Vis and magnetic

* Yüksek Lisans Tezi- MSc. Thesis

susceptibility. The solubility of the metal complexes in supercritical medium was also determined. The synthesized metal complexes were used as precursors for the deposition of the metals on solid supports in a scCO₂ medium resulting in the synthesis of nano-sized metal catalysts. The size of the synthesized nanocatalysts was analyzed by TEM and XRD. The Pd particles ranged from 2-16nm and the Cu nanoparticles ranged from 3-20nm. The activity of these catalysts in a hydrogenation reaction of olefins was analyzed using GC.

Keywords: Vic-dioxime, Precursor, Catalyst, Depositin, Supercritical carbon dioxide

Giriş

Homojen ve heterojen katalizörlerin birbirlerine göre üstünlükleri vardır ve bu üstünlükleri bir arada toplamak amacıyla nano boyutta katalizörler kullanılmaktadır. Bu katalizörler, homojen özellik gösterip aynı zaman da ortamdan kolaylıkla ayrılmaktadırlar. Ayrıca, nano katalizörler normal boyutlardaki katalizörlere göre daha geniş yüzey alanına sahip olmalarından dolayı kimyasal tepkimeler için ideal katalizör olmaktadır. Depozisyon işlemi için; mikroemüsyon yöntemi, doyurma, sonokimyasal yöntem, modifiye poliol indirgenmesi ve depozisyon-çöktürme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra son zamanlarda süper kritik ortamda depozisyon tekniği, katı destekli katalizör hazırlamada önem kazanmıştır. Süper kritik karbon dioksit (scCO₂) çevresel olarak kabul edilir olması ve ekonomik uygulanabilirliği, alışılmamış toksik ve yanıcı organik çözücüler yerine kullanılabilmesi nedeniyle, yeni nesil reaksiyon ortamı olarak büyük ilgi kazanmaktadır. Bu teknik Pt, Pd, Ru ve Rh gibi metallerin katı desteğe depozisyonu için en çok kullanılan yöntemdir.

ScCO₂ çözücü ortamında yapılan metal nano partikül-katı destek nano yapıları oluşturma işlemlerinde, öncül olarak isimlendirilen metal komplekslerin CO₂ ortamındaki davranışları oldukça önemlidir (Erkey, C. 2009). Yükleme işleminin yapılabilmesi için metal komplekslerinin scCO₂ çözücü ortamında çözünürlük göstermesi gerekmektedir. Literatürler incelendiğinde scCO₂'de çözünürlüğü düşük öncüllerle yapılan yükleme işlemlerinde metal/destek oranının genellikle düşük olduğu bildirilmiştir (Erkey C., 2009).

ScCO₂ ortamında karbon nanotüp destekli metal nano partiküllerin sentezlenmesi işlemi üç basamakta gerçekleştirilmektedir,

1. Metalik öncülün süper kritik karbondioksit içerisinde çözünmesi veya iyi dağılım göstermesi,
2. Oluşan çözeltideki (veya homojene yakın karışım) öncülün substrat (destek) tarafından adsorplanması,
3. Öncül yapısında bulunan metalin metalik forma indirgenmesidir.

Öncülün yapısındaki metalin metalik forma indirgenmesi için de çeşitli metodlar bulunmaktadır. Bunlar;

1. Hidrojen veya alkoller gibi indirgeyici ajanlar varlığında ScCO₂'de kimyasal indirgeme,
2. ScCO₂ ortamında termal indirgeme,
3. İnert atmosfer ortamında ve atmosferik basınçta termal indirgeme,
4. İnert atmosfer ortamında termal bozunma,
5. Basınç düşürülmesinden sonra hidrojen veya hava ile yapılan kimyasal dönüşümdür.

Bu çalışmada H₂ gazı ile ScCO₂'de kimyasal indirgeme yöntemi tercih edilmiştir.

Katı destekli metal nanopartiküller birçok reaksiyonda katalizör olarak kullanılmaktadır. Bu katalizörlerden katı destekli Pd ve Cu genellikle organik tepkimelerde oksidasyon ve hidrojenasyonun yanı sıra Suzuki reaksiyonları ve elektrovoltametrik reaksiyonlarda da önemli rol oynar. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda scCO₂ ortamında depozisyon işlemlerinde öncül olarak sadece asetilasetonat, heksametiltrieterilen, tetrametilenglikol dimetileter, tetrametil heptadionat, siklooktadien ve türevleri gibi ligantlarla hazırlanan metal kompleksleri kullanılmıştır. Bu çalışmada; florlu oksim türevi metal kompleksleri scCO₂ çözücü ortamında ilk kez öncül olarak denenmiştir.

Materyal ve Metod

Materyal

FT- IR Spektroskopisi: Elde edilen ligand ve komplekslerin karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Kimyasallar:Dimetil glioksim, 4-(triflorometil) anilin, 3-(heptadekafloro oktil) anilin , 4-(heptadekafloro oktil) anilin, γ-Alümina kullanılmıştır.

Pencereli yüksek basınç rektörü: 50 mL hacimli reaktör çözünürlük deneylerinde kullanılmıştır.

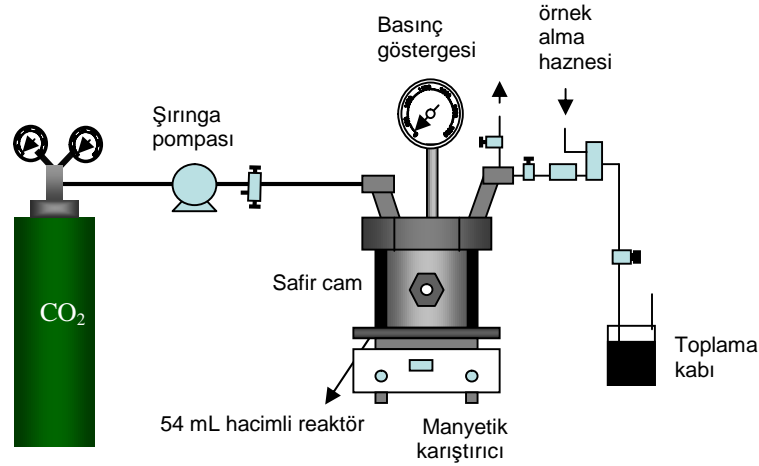
Batch tipi yüksek basınç reaktörü:100 mL hacimli reaktör depozisyon işlemlerinde kullanılmıştır.

Metod

Bu çalışmada 3-(heptadekafloro oktil) anilin, 4-(heptadekafloro oktil) anilin ve 4(triflorometil) anilinin oksim ligandları sentezlenerek elde edilen ligandların bakır(II) ve paladyum(II) kompleksleri hazırlandı. Elde edilen kompleksler, metallerin alümina ve silikajel üzerine süper kritik karbon dioksit çözücü ortamında depozisyonunda öncül olarak kullanıldı. Sentezlenen tüm bileşiklerin yapıları; FT-IR, ¹H, ¹⁹F NMR, elementel analiz, kütle spektroskopisi, manyetik süseptibilite, UV-görünür bölge spektroskopisi yöntemleriyle belirlendi. Depozisyon işlemi ise FT-IR, XRD, TEM ve diğer yöntemlerle analiz edildi. Son olarak elde edilen depozisyon ürünlerinin aktivitesi stirenin hidrojenasyonu tepkimesinde test edildi ve ürün miktarı GC-FID de belirlendi.

Sentezlenen öncüllerin scCO₂ içerisinde çözünürlüklerinin belirlenmesi

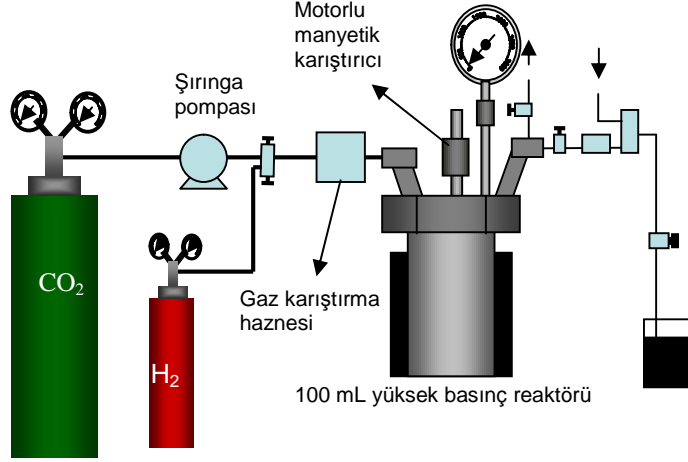
Sentezlenen öncüllerin scCO₂ içerisinde çözünürlüklerini belirleme işlemi Şekil 1'de verilen yüksek basınç düzeneğinde takip eden metot uyarınca yapıldı. Öncülden alınan 45-50 mg'lık örnek pencereless reaktör içerisinde yerleştirilip içerisinde tüp basıncına ulaşıncaya dek CO₂ gönderildi daha sonra sıcaklık 90°C a yükseltildi. Sıcaklığın 90°C erişmesini takiben yüksek basınç pompası yardımıyla basınç 2200 psi ye çıkarılıp bu basınçta 1 saat karıştırıldı ve çözünme kalitatif olarak gözle ve ortamdan alınan örneğin UV de incelenmesiyle ve ara hazneye sıkıştırılması sonucunda kantitatif olarak belirlendi. Çözünmüş madde miktarı (g madde/mL scCO₂ gazı) cinsinden hesaplandı.



Şekil 1. Metal komplekslerin çözünürlüğünde kullanılan düzenek

Katı destek üzerinde metalik nano partiküllerin oluşturulması

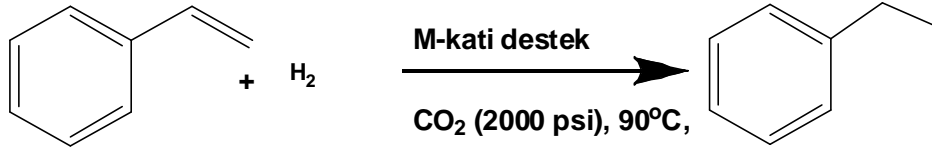
Katı destek üzerinde metalik nano partikül oluşturma reaksiyonu Şekil 2'deki akım diyagramı verilen yüksek basınç düzeneğinde takip eden yöntem uyarınca yapıldı. Tasarlanan öncül ve destek olarak düşünülen silikajel ve alümina oda sıcaklığında katı halde reaktör içerisine yerleştirilip reaktör kapatıldı. Sonra birkaç kez ortam vakumlanıp CO₂ basılarak oksijen ve içerisinde daha önceki kullanımdan kalan safsızlıklar uzaklaştırılarak sıcaklık 60°C a getirilip yüksek basınç pompası yardımıyla CO₂ basıncı 1200 psi ye getirildi. Daha sonra sıcaklık 90°C a yükseltildi, ısıtmanın etkisiyle yaklaşık 1700-1800 psi'ye yükselen basınç 2200 psi ye ulaşıncaya dek tekrar CO₂ basıldı. Bu koşullarda 1 saat karıştırılıp öncülün çok kanallı nanotüp üzerine tutunması sağlanacak daha sonra 145 psi basınçta 10 ml H₂ bulunduran hücrenin vanası açılıp ortama H₂ geçmesi sağlanarak 1 saat süreyle indirgeme işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 2. Katı destek üzerine metal nano partikül oluşturmada kullanılacak düzenek

Katı destek üzerinde oluşturulan nano partiküllerin katalitik özelliklerinin araştırılması

Katalitik etkinlikler model bileşikler olarak seçilen stirenin (veya benzer bir olefin) hidrojenasyon tepkimesi üzerinde incelendi. Hidrojenasyon deneyleri blok diyagramı verilmiş olan yüksek basınç düzeneğinde 80oC sıcaklık 2000 psi CO₂ basıncında gerçekleştirildi.



Şekil 3. Hidrojenasyon reaksiyonu

Bu çalışma kapsamında hidrojenasyon tepkimelerinde katalizörlerin etkinliklerini etkileyen parametrelerden sadece süre ve katalizör/substrat oranı incelendi. Diğer parametreler için literatürlerdeki benzer çalışmalarda belirlenen ideal koşullar göz önüne alınarak ideal şartlar belirlendi. (2000 psi basınç, 90°C sıcaklık 363,2 K sıcaklık, 10 bar H₂ basıncı, Pd; 1/200, Cu; 1/50).

Araştırma Bulguları ve Tartışma Elementel Analiz Sonuçları

Elementel analiz bir maddenin yapısı hakkında çok önemli bilgiler sunar. Sentezlenen ligand ve metal komplekslerinin elementel analizleri yapılmış ve hesaplanan C,H,N miktarlarının cihazın ölçtüğü değerlerle uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. Buna göre ligand ve metal kompleksleri hedeflenen şekilde sentezlenmiştir.

Çizelge.1 Elementel Analiz Sonuçları

Bileşik	M.A., g/mol	Bileşimi (bulunan/hesaplanan), %		
		C	N	H
AMCG	122.51	19.75/19.61	21.05/22.87	2.88/2.47
4PFVD	597.03	31.06/32.18	6.11/7.04	1.29/1.35
[Cu(4PFVD) ₂]	1254,98	31.41/30.60	5.73/6.69	1.16/1.12
[Pd(4PFVD) ₂]	1297.96	28.88/29.59	6.25/6.47	1.05/1.09
3PFVD	597.03	31.54/32.18	6.20/7.04	1.24/1.35
[Cu(3PFVD) ₂]	1254,98	28.75/30.60	5.52/6.69	1.39/1.12
[Pd(3PFVD) ₂]	1297.96	28.46/29.59	6.17/6.47	1.02/1.09
4TFVD	283.5	43.51/43.73	16.41/17.00	3.14/3.26
[Cu(4TFVD) ₂]	628.5	37.94/38.89	14.41/15.12	1.95/2.54
[Pd(4TFVD) ₂]	671.4	34.90/36.11	13.08/14.04	2.47/2.36
DMG	116.12	41.37	24.12	6.94
[Cu(DMG) ₂]	293.77	31.22/32.71	17.75/19.07	4.5/4.8
[Pd(DMG) ₂]	336.64	26.13/28.54	14.56/16.64	3.80/4.19

Fiziksel Bulgular

Sentezlenen ligand ve metal komplekslerinin erime noktaları belirlenmiştir. Maddelerin termal olarak kararsız olduğu ve bozunarak eridiği gözlenmiştir.

Çizelge 2. Ligand ve metal komplekslerinin fiziksel özellikleri

Kompleks	Renk	% Verim	Bozunma Sıcaklığı (°C)
<i>Amfi</i> -MCG	beyaz	38	162
<i>Anti</i> -MCG	sarı	99	151.99
[4PFVD]	Sarı	84.0	205.32
[3PFVD]	Açık sarı	66.1	200
[4TFVD]	Açık sarı	63.0	85
[Cu(4PFVD) ₂]	Koyu yeşil	78.0	>330
[Cu(3PFVD) ₂]	Koyu yeşil	80.0	>330
[Cu(4TFVD) ₂]	Koyu yeşil	52.0	197
DMG	beyaz		240-241
[Cu(DMG) ₂]	Koyu yeşil	89.2	213
[Pd(4PFVD) ₂]	Koyu sarı -turuncu	70.0	>330
[Pd(3PFVD) ₂]	Koyu sarı -turuncu	80.0	258
[Pd(4TFVD) ₂]	Sarı	98	225
[Pd(DMG) ₂]	Sarı-kahverengi	98.0	>300

FT-IR Spektrumları

Ligandların IR spektrumu incelendiğinde 3408 cm⁻¹ (N-H), 3255 cm⁻¹ (-OH), 1608cm⁻¹ (C=N), 1527 cm⁻¹ (C=C,ar), 1299cm⁻¹ (N-O), 1144-1196 cm⁻¹ (C-F) ve 953 cm⁻¹(N-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın sentezlendiğini gösteren en önemli veri, 1608cm⁻¹'de -C=N gerilmelerine ait piklerdir. Bunun yanında 3408 cm⁻¹' de gözlenen -NH gerilimine ait pikin bu bileşikte ortaya çıkması, anti-klorogliksim bileşiğinde 746 cm⁻¹ 'de gözlenen C-Cl gerilimine ait pikin kaybolması, 1144-1196 cm⁻¹' de C-F gerilimine ait pikin çok keskin bir şekilde ortaya çıkması ve 1527 cm⁻¹' deki C=C gerilmesine ait keskin piklerin varlığı, florlu anilin bileşiğinin anti-monoklorogliksim bileşiğine bağlandığını açık bir şekilde göstermektedir (Yıldırım, B., Özcan, E., Kurtoğlu, M., 2007; Özkan ve ark,2005).

Ligandın ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde 11.5 ppm 'de yayvan olarak gözlenen ikili -OH pikleri anti konumunda kimyasal çevreleri birbirinden farklı iki -OH' a ait piklerdir. 8.5 ppm 'de -NH 'a ait singlet pik ; 7.6-6.8 ppm 'de benzen halkalarına ait multipler pikler gözlenmiş ve 3.3 ppm 'de oksim karbonuna bağlı =CH hidrojeni gözlenmiştir. Bu veriler incelendiğinde ligandın sentezlendiği düşünülmektedir. Bu değerler literatürle uyum içerisindedir (Özkan ve ark,2005).

Cu komplekslerinin IR spektrumu incelendiğinde 3396 cm⁻¹ (N-H), 3000cm⁻¹(C-H(ar)), 1660(O•••H-O), 1520cm⁻¹ (C=N), 1297cm⁻¹ (N-O), 1196-1144 cm⁻¹ (C-F) ve 951 cm⁻¹(N-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Kompleksleşme sırasında iki oksim ligandı hidrojen köprüsü oluşturarak birer tane H+ iyonu verirler. FT-IR spektrumunda bu O--H-O bağı, fonksiyonel grup bölgesinde pik vermez. FT-IR spektrumu incelendiğinde kompleksin -OH gerilme piki kaybolmuştur. Bunun yanı sıra metal komplekslerinde oluşan 1660 cm⁻¹ aralığındaki zayıf pik O--H-O gerilme pikine ait olduğu benzer çalışmalardaki makalelerden faydalanılarak belirlenmiştir (Yıldırım, B.; Özcan, E., Kurtoğlu, M.,2007). Kuvvetli π alıcı olan CN 'un geri bağlanma ile metale elektron aktarımında bulunması ve bu sayede IR spektrumunda gözlenen C-N piklerini daha düşük frekanslara kaydırır.

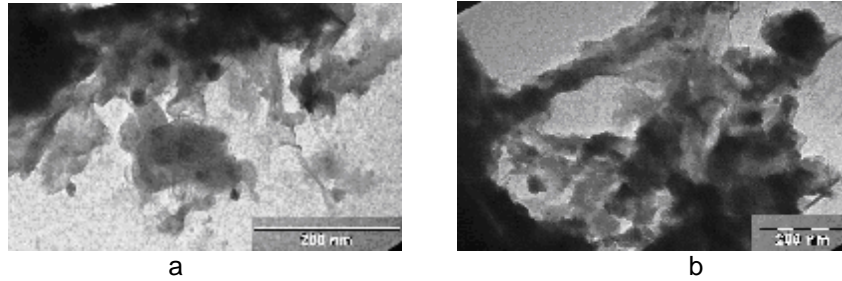
Pd komplekslerinin IR spektrumu incelendiğinde 3218 cm⁻¹ (N-H), 3058 cm⁻¹(C-C,ar), 1678cm⁻¹(O--H-O), 1543 cm⁻¹ (C=N), 1297cm⁻¹ (N-O), 1196-1144

cm^{-1} (C-F) ve 955 cm^{-1} (N-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Kompleksleşme sırasında iki oksim ligandı hidrojen köprüsü oluşturarak birer tane H^+ iyonu verirler. FT-IR spektrumunda bu O--H--O bağı, fonksiyonel grup bölgesinde pik vermez. FT-IR spektrumu incelendiğinde kompleksin OH gerilme piki kaybolmuştur. Ayrıca metal komplekslerinde oluşan 1678 cm^{-1} aralığındaki zayıf pik O--H--O gerilme pikine ait olduğu benzer çalışmalarda makalelerden faydalanılarak belirlenmiştir.(Yıldırım, B.; Özcan, E., Kurtoğlu, M., 2007). Kuvvetli Π alıcı olan CN 'un geri bağlanma ile metale elektron aktarımında bulunmasına ve bu sayede IR spektrumunda gözlenen C-N piklerini daha düşük frekanslara kaydırır.

Pd kompleksinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde 7.9 ppm 'de $-\text{NH}'$ a ait singlet pik ; $7.6-6.8 \text{ ppm}$ 'de benzen halkalarına ait multipl pikler gözlenmiş ve 3.9 ppm 'de oksim karbonuna bağlı $=\text{CH}$ hidrojeni gözlenmiştir. Yapıda ligandın $^1\text{H NMR}$ 'ında 11.5 ppm 'de gözlenen $-\text{OH}$ kaybolmuştur. Bu veriler incelendiğinde Pd kompleksinin sentezlendiği belirlenmiştir. Bu değerler literatürle uyum içerisindedir.

TEM Görüntülerinin Analizleri

Sentezlenen silikajel ve alümina destekli nano metallerin belirli koşullar altındaki görüntülerinin (morfoloji) incelenmesinde geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda farklı büyütme oranları kullanarak nano katalizörler görüntülenmiştir. Şekil 4 'de dimetilgliksim komplekslerinin öncül olarak kullanılmasıyla elde edilen alümina destekli Pd (a) ve Cu (b) verilmiştir. Çalışmalarımızda TEM görüntüleri nano taneciklerin homojen dağıldığını görebilmek için kullanılır. Görüntüler incelendiğinde metaller alümina destek üzerine nano boyutta homojen dağıldığı görülebilmektedir.



Şekil 4. Alümina destekli Pd (a) ve Cu (b) nano partiküllerinin TEM görüntüleri

Sonuçlar

Florlu anilin bileşikleri ve anti-mono klorogliksimden florlu oksim ligandları sentezlenmiş ve sentezlenen maddeler FT-IR, elementel analiz, ^1H ve ^{19}F NMR ile analiz edilmiştir. Elde edilen florlu ligandların ve dimetilgliksimin Cu(II) ve Pd(II) metal kompleksleri sentezlenmiştir. Bu kompleksler FT-IR, elementel analiz, ^1H , ^{19}F NMR ve UV-Vis ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürler ile uyum içerisinde olup tüm analiz sonuçları tüm maddelerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir. Bu maddelerin süper kritik ortamdaki

çözünürlükleri incelenmiş ve benzer çalışmalardaki çözünürlüklerle uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen öncüller silikajel ve γ -alümina üzerine metal depozisyonunda öncül olarak kullanılmıştır. Elde edilen katı destekli nano katalizörler XRD, SEM ve TEM ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürlerdeki depozisyon sonuçları ile uyum içerisinde. Sonuçta silikajel ve γ -alümina üzerine homojen bir şekilde ve tanecik boyutları 5-30 nm aralığında değişen metaller adsorplanmıştır. Depozisyon miktarı %10 ile %20 arasında gerçekleşmiştir. Elde edilen nano katalizörler olefinlerin hidrojenasyonu reaksiyonunda katalizör olarak kullanılmıştır. % dönüşüm GC'de belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen analizler ve incelemeler nano katalizörlerin termal açıdan kararlı, organik çözücüler, asidik ve bazik çözeltilerde çözünmeyen, açık ortamlarda mevcut formunu (metalik) koruyan ve heterojen katalizör özelliği gösteren maddeler olduğunu ortaya koymuştur.

Sentezlenen nano katalizörler sadece olefinlerin hidrojenasyonu reaksiyonunda katalizör olarak denenmiştir. Ancak başka reaksiyonlar için de kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Öncül olarak hedeflenen tüm oksim kompleksleri depozisyon işleminde başarılı sonuçlar vermiştir. Bu çalışmada sadece Pd ve Cu metalleri kullanılmıştır. Ancak oksimlerin metallerle çok kolay tepkime verebilme yeteneğinden yola çıkarak özellikle de nikel gibi depozisyonunda öncül bulma sıkıntısı olan metallerin depozisyonunda öncül olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Tez kapsamında öncül olarak kullanılan bu kompleksler süper kritik ortamda depozisyon işleminde başarılı sonuçlar vermiştir. Buna göre literatürlerde var olan az sayıda öncüllere yeni bir öncül sınıfı daha eklenmiştir. Bu nedenle de çalışmamız çok büyük bir öneme sahiptir.

Tez kapsamında kullanılan oksimler anti- formundaki vic-dioksimlerdir. Sonraki çalışmalarda *amfi-vic* dioksim ligandları ile elde edilen öncüller ile depozisyon çalışması yapılacaktır. Ayrıca bu çalışmada Pd ve Cu metalleri kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sonraki çalışmalarda, katalizde önemli yer tutan Co, Rh... gibi metaller çalışılması planlanan metallerdir.

Kaynaklar

- A.Y. Atta, B.Y. Jibril, T.K. Al-Waheibi, Y.M. Al-Waheibi, Microwave-enhanced catalytic degradation of 2-nitrophenol on alumina-supported copper oxides, *Catalysis Communications*, 26 (2012) 112–116
- B. Cangül, L.C. Zhang, M. Aindow, C. Erkey, Preparation of carbon black supported Pd, Pt and Pd–Pt nanoparticles using supercritical CO₂ deposition, *J. of Supercritical Fluids*, 50 (2009) 82–90
- B. Yıldırım, E. Özcan, and P. Deveci, New Glyoxime Derivatives and Their Transition Metal Complexes, ISSN 1070-3284, *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 33 (2007)b 417–421.
- Brintzinger, H. and Titzmann, R., *Chem. Ber.*, 1952, vol. 85, p. 344, Ponzio and F. Baldracco. *Gazz. Chim. Ital.*, 60 (1930), p. 429. 32

- Cabanas A., Blackburn J., Watkins J., Deposition of Cu films from supercritical fluids using Cu(I) β -diketonate precursors, *Microelectronic Engineering* 64(2002)53-61
- Can Erkey, Preparation of metallic supported nanoparticles and films using supercritical fluid deposition, *The Journal of Supercritical Fluids*, Issue 3, January 2009, Pages 517–522
- Chandima Abeywickrama and Arthur David Baker, Efficient Synthesis of 1,4,5,12-Tetraazatriphenylene and Derivatives, *American Chemical Society*, 69 (2004) 7741-7744
- Charles A. Bishop, 18 – Chemical Vapor Deposition/Polymerization onto Webs, Vacuum Deposition onto Webs, Films and Foils (Second Edition) 2011, Pages 319–330
- Eşref Taş, Alaaddin Çukurovalı and Mehmet Kaya, The Synthesis and Characterization of 10,11-Bis(hydroxyimino)-4,8,12,17-Tetraaza 1,2,19,20-o-Dicyclo-hexylideneoctacosene and Some Transition Metal Complexes, *Journal of Coordination Chemistry*, 48(1999) 411-423
- Hui-Xia Wu, Cui-Xia Zhang, Lei Jin, Hong Yang, Shi-Ping Yang, Preparation and magnetic properties of cobalt nanoparticles with dendrimers as templates, *Materials Chemistry and Physics*, 121(2010) 342-348
- Lam F., Hu X., A new system design for the preparation of copper/activated carbon catalyst by metal-organic chemical vapor deposition method, *J. of Chemical Engineering Science* 58 (2003) 687 – 695.
- Paul Worn Park1, Jeffrey S. Ledford, The influence of surface structure on the catalytic activity of alumina supported copper oxide catalysts. Oxidation of carbon monoxide and methane, *Applied Catalysis B: Environmental*, 15 (1998)221–231
- S.E. Bozbaga, N.S. Yasara, L.C. Zhangb, M. Aindowb, C. Erkeya, Adsorption of Pt(cod)me₂ onto organic aerogels from supercritical solutions for the synthesis of supported platinum nanoparticles, *J. of Supercritical Fluids*, 56 (2011) 105–113
- Sami-ullah Rather, Renju Zacharia, Sang Woon Hwang, Mehraj-ud-din Naik, Kee Suk Nahm, Hydrogen uptake of palladium-embedded MWCNTs produced by impregnation and condensed phase reduction method, *Chemical Physics Letters*, 441 (2007) 261–267
- Walid M. Daoushb, Byung K. Lima, Chan B. Moea, Dong H. Nama, Soon H. Honga, Electrical and mechanical properties of carbon nanotube reinforced copper nanocomposites fabricated by electroless deposition process, *Materials Science and Engineering: A*, 513–514 (2009) 247–253
- Ying Zhang, Can Erkey, Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids: A review, *J. of Supercritical Fluids* 38 (2006) 252–267

¹ KATOT ÜZERİNDE OKSİJEN GAZI İNDİRGENMESİ İÇİN MOO₃ KATALİZÖRÜNÜN KULLANILMASI*

*Use of Moo₃ Catalyst on The Cathode to Reduction of Oxygen Gas **

Fatih TEZCAN
Kimya Anabilim Dalı

Gülfeza KARDAŞ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmadaki amaç, lityum hava pilli için katalitik etkinliği yüksek gözenekli katot oluşturmaktır. Katot katalizörü, glisin, gliserol, ve karbon ile hazırlanan jel karışımına değişik sürelerde 500°C kül fırınında aktive edilmiş MoO₃ eklenerek hazırlanmıştır. Jel karışımı, paslanmaz çelik tabanlı üzerine sürülerek elektrokimyasal ölçümlerde çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Hazırlanan elektrotların oksijen indirgenmesine katalitik etkisi lityum perklorat (%10), etilen karbonat (%45), dimetil karbonat (%45) çözeltisinde oksijenli ortamda dönüşümlü voltamogramlar (DV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve katodik polarizasyon eğrileri ile belirlenmiştir. Elektrotların karakterizasyonu taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak yapılmıştır. Farklı sürelerde hazırlanmış katalizörlü jeller içerisinde oksijen indirgenmesi için en etkin katot sekiz saat 500°C bekletilen MoO₃ katalizörü olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksijen İndirgenmesi, Jel, Katalizör, Dönüşümlü Voltametri

ABSTRACT

The aim of this study is to produce a porous cathode has high catalytic efficiency for lithium air battery. Catalyst of the cathode was prepared addition of MoO₃, which activate different duration at 500°C of a muffle furnace in gel occurs glycine, glycerol and carbon. Gel mixture was applied over the stainless steel base was used electrochemical measurements as the working electrode. The catalytic efficiencies of prepared electrodes for oxygen reduction process were determined at oxygen atmosphere in lithium perchlorate (10%), ethylene carbonate (45%), dimethyl carbonate (45%) solution by using cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cathodic polarization techniques. Surface images of prepared electrodes were examined with scanning electron microscope (SEM). The effective catalyst for oxygen reduction inside of prepared gel includes the catalyst has different duration time is MoO₃ catalyst at 8 h 500 °C.

Key Words: Oxygen Reduction, Gel, Catalyst, Cyclic Voltammetry

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

Giriş

Piller, kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çeviren elektrokimyasal aygıtlardır. Pil hücresi, anot ve katot ile iki elektrot arasında kimyasal reaksiyonu sağlayan elektrolitten oluşan galvanik hücrelerdir. Piller günlük yaşantımızda elektrik ihtiyacı duyulan her alanda kullanılabilir. Özellikle de taşınabilir cihazlar, taşıtlar, yenilenebilir enerji kaynaklarında üretilen elektriğin depolanmasında oldukça önemli aygıtlardır. Taşınabilir piller, cep telefonlarında, radyolarda, diz üstü bilgisayarlarda, hesap makinelerinde, saatlerde, barkod okuyucularında, oyuncaklarda, diş fırçalarında, küçük ev aletlerinde, uzaktan kumandalarda kullanılmakta; okullar, mağazalar, hava limanları, ofisler, hastaneler gibi yaşamın her alanında karşımıza çıkmaktadır.

Günümüzde pil hücrelerinin geliştirilmesi geniş kullanım alanları nedeniyle ve günümüzde piyasaya yeni çıkan elektrik ile çalışan taşıtların yaygınlaşması açısından önemlidir. Piller özellikle lityum piller son yıllarda ve gelecekte birim kütle başına enerji kapasitesi açısından öne çıkmaktadır. Lityum piller, lityum iyon piller, lityum polimer piller ve lityum hava pilleri olarak sınıflandırılmaktadır. Lityum hava pilleri depoladığı enerjiyi anotta kullanması, katot da ise dışarıdan hava gönderilerek enerji üretmesi açısından ilgi çekici sistemleri oluşturmaktadır. Lityum hava pillerinin ticari kullanımı için gözenekli katot katalizörü geliştirilmelidir.

Enerji üretimi ve enerjinin depolanması, günümüzde teknolojik öneme sahip araştırma konularındandır. Verimli, ucuz enerji üretimi, enerjinin ekonomik olarak depolanması bu tür çalışmaların ana hedefini oluşturmaktadır. Temiz ve güvenli enerji ihtiyacı, araştırmaları ileri düzeyde enerjisi depolama sistemlerine yöneltmektedir. Bu tür sistemler elektrik üretimi ve talebi için önemli rol oynamaktadır, özellikle yenilenebilir ve sürdürülebilir kaynaklardan enerji üretimi için gerekmektedir. Günümüzde ve gelecekte piller en önemli elektrik enerjisi depolama sistemlerini oluşturmaktadır. 1800 lü yıllarda Volta tarafından oluşturulan ilk pilden bu yana değişik tür ve özelliklerde piller üretilmiştir. Son yıllarda hafif ve güç yoğunluğu yüksek piller tercih edilmektedir. Piyasada taşınabilir elektronik cihazların çoğunluğunda lityum iyon piller kullanılmaktadır.

Teknolojinin çok hızlı ilerlemesine paralel olarak daha fazla güç yoğunluğuna sahip pil geliştirme çalışmaları da ilgi odağı haline gelmiştir. Lityum iyon pillere kıyasla aynı çalışma prensibine sahip lityum hava pilleri daha fazla enerji depolayan sistemlerdir. Lityum hava pillerinde güç yoğunluğunun artması daha hafif katot malzemesi kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Lityum hava pilinde katot olarak oksijen geçişi sağlayacak gözenekli karbon kullanılmaktadır. Bu elektrotlar lityum ve değişik metal oksitler ile katılanarak hazırlanmaktadır.

Lityum hava pillerinin verimini birkaç kat arttırabilmek için katot materyalinin kapasitesi oldukça yüksek olması gerekir (Linden, 2001). Gözenekli karbon katot elektrodu üzerine eklenen Fe_2O_3 katalizörü başlangıç kapasitesinden daha yüksektir. Fe_3O_4 , CuO , $CoFe_2O_4$ katalizörleri kapasiteyi sabit tutarken Co_3O_4 katalizörü 4 V'dan daha düşük olmasını sağlamaktadır (Zhang, 2010).

Verimli lityum-hava pil oluşturmak için geliştirme çalışmaları sürmektedir. Lityum-hava pili tarafından sağlanan enerji yoğunluğunda lityum temelli pillere göre

belirgin bir artış mevcuttur. Lityum-hava pili gelişmesinde en önemli itici güç, otomotiv sektöründe hafif ve güç yoğunluğu yüksek pillere olan ihtiyaçtır. Gaz emisyonu düşük ya da sıfır olan elektrikli arabalar büyük şehirlerde oluşan hava kirliliği içinde önemli bir çözüm olacaktır. Bu nedenle gelişmiş pil teknolojisi için talep her zaman için fazla olacaktır. Bu çalışmadaki amaç, lityum hava pilleri için MoO_3 kullanarak katalitik etkinliği yüksek gözenekli katot oluşturmaktır.

Materyal ve Metod

Materyal

Elektrokimyasal Analiz Cihazı: AC impedans, dönüşümlü voltametri ve katodik polarizasyon ölçümleri için Gamry (interface 1000) cihazı kullanılmıştır.

Kimyasallar: Molibden (IV) Oksit, glisin, gliserol, amonyak, lityum nitrat, aktif karbon, dimetil karbonat, etilen karbonat, lityum perklorat kullanılmıştır.

Karşı elektrot: 2 cm^2 yüzey alanına sahip platin levha karşı elektrot olarak kullanılmıştır.

Referans Elektrot: $\text{Ag} | \text{AgCl}_{(k)}, \text{Cl}^-_{(\text{doygun})}$ elektrot kullanılmıştır.

SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu): Elektrotların yüzeyini analiz etmek için kullanılmıştır.

Metod

Çalışma Elektrotların Hazırlanması

Glisin, lityum nitrat, aktif karbon ve molibden (VI) oksit kullanılarak yoğun bir jel oluşturulmuştur. Bu jel, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'deki etüvde 6 saat bekletilerek içindeki su uzaklaştırılmıştır. Böylece temel elektrot yapısı olan LiCMoO_2 elde edilmiştir.

Çalışma elektrotları silindirik paslanmaz çelik çubuklardan yaklaşık 5 cm uzunlukta kesilip bir ucuna iletkenliği sağlamak için bakır tel geçirildikten sonra sadece ölçüm yapılacak diğer ucu açıkta kalacak şekilde polyester içerisine gömülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan jel, kesilen paslanmaz çelik çubuk üzerine sürüldükten sonra 4 gün boyunca etüvde $125 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de kurutulmuştur.

Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümlerde hazırlanan elektrot çalışma elektrodu olarak, Pt karşı elektrot, Ag/AgCl (3,00 M) referans elektrot olarak kullanılmıştır.

Dönüşümlü Voltamogramlar

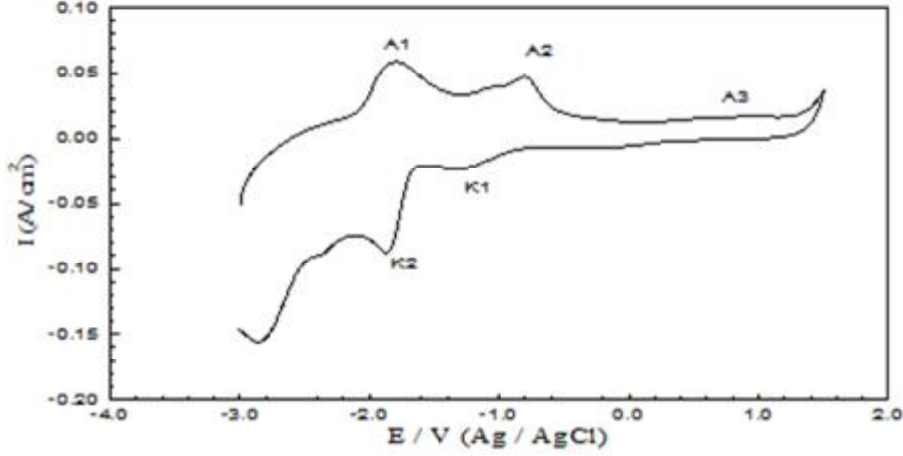
Dönüşümlü voltamogramlar üç elektrot tekniğiyle Gamry (interfaca 1000) elektrokimyasal analiz cihazı ile oksijen atmosferinde $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 100 mV/s tarama hızında, platin karşı elektrot ve $\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{Cl}^-$ referans elektrot olacak şekilde kullanılarak elektrotların karakterizasyonu yapılmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Dönüşümlü Voltamogramlar

Paslanmaz çelik (PÇ, tabanlı) elektrot için, lityum perklorat (% 10) , etilen karbonat (% 45), dimetil karbonat (% 45) çözeltisinde (LED) oksijen atmosferinde

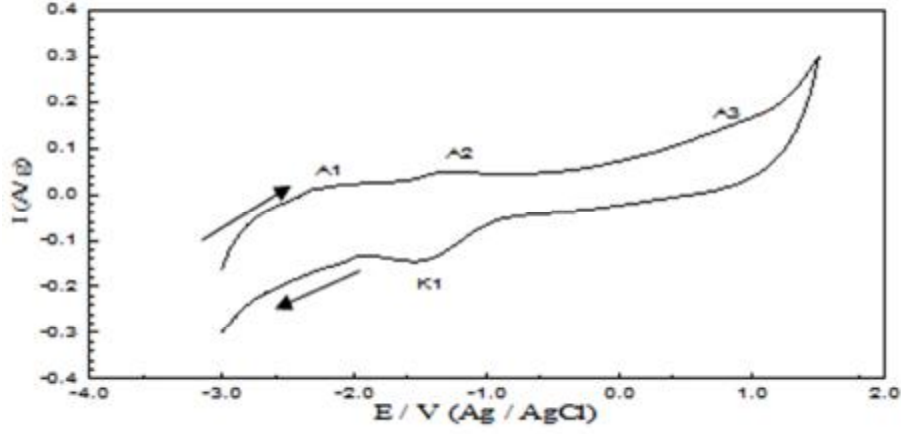
100 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil 4.1. de verilmektedir. Şekil 4.1. de anodik yönde üç pik ve katodik yönde iki pik görülmektedir.



Şekil 4.1. LED çözeltisinde paslanmaz çelik tabanlılığının oksijen atmosferinde 100 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramı.

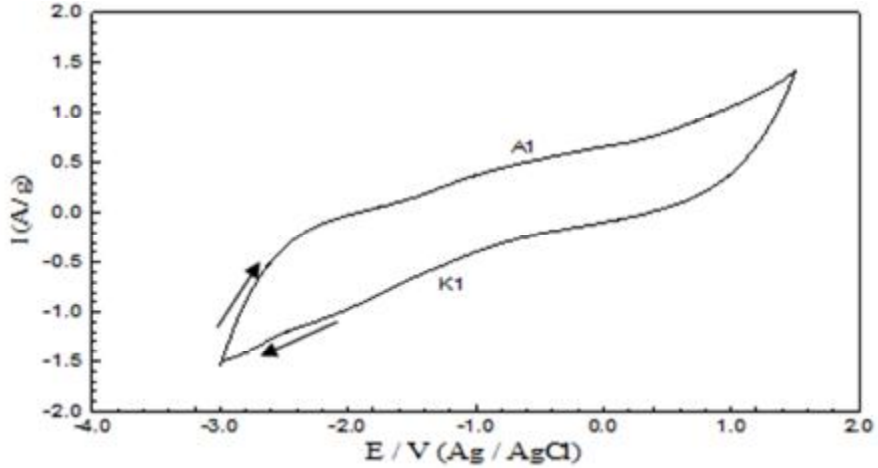
Şekil 4.1. de görülen pikleri ifade eden tepkimeler aşağıda verilmektedir.

Anodik yönde oluşan (A1), (A2) ve (A3) pikleri, (4.1.), (4.2.) ve (4.3.) tepkimelerine karşılık gelmektedir. Bu tepkimeler Li_xO_x türlerinin oksijen gazına yükseltgenmesi ve Li^+ iyonlarının oluşumu ile ilgilidir (Soavi, 2013). Katodik yöndeki K1 piki süperoksit oluşumu, K2 piki oksijen gazının süperoksit anyonuna indirgenmesi ve Li_xO_x türlerinin oluşumu ile ilgili olduğu belirtilmektedir (Lacey, 2013).



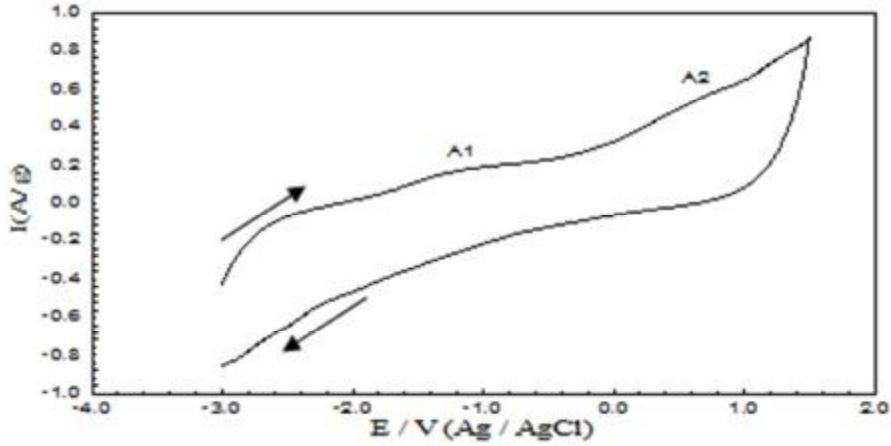
Şekil 4.2. LED çözeltisinde jel elektrotta oksijen atmosferinde 100 mV / s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogram.

LED çözeltisinde, glisin ve LiNO_3 tuzundan hazırlanan jel ile oluşturulan elektrotta ait dönüşümlü voltamogram Şekil 4.2.'de verilmektedir. Anodik yönde oluşan pikler lityum oksitlerin yükseltgenmesi, katodik yönde oluşan pikler oksijen gazının indirgenmesi sonucu lityum peroksit, lityum süperoksit ve lityum oksitlerin oluşumuna karşılık gelmektedir. Şekil 4.2. den görüldüğü gibi jel elektrotta yüzey alanı genişlediğinden dolayı PÇ tabanlığa göre anodik ve katodik yöndeki akım değerlerinin arttığı ve piklerin genişlediği görülmektedir.



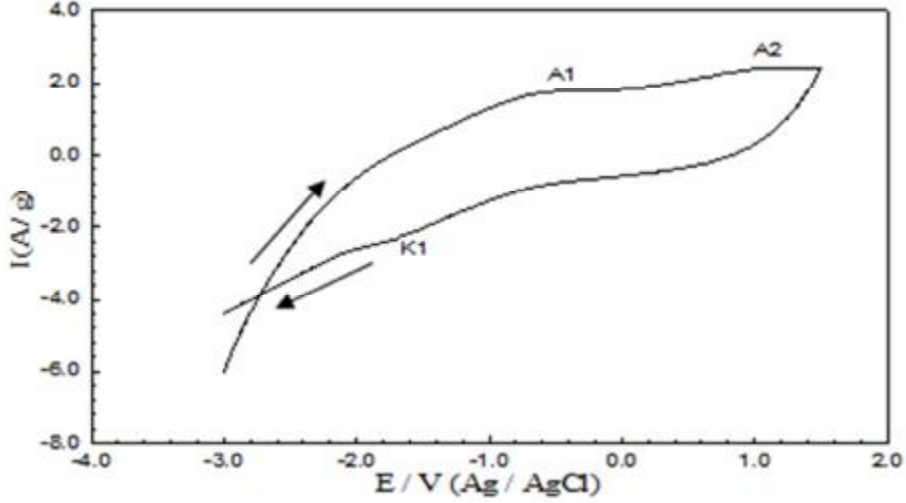
Şekil 4.3. LED çözeltisinde jel/ MoO_3 elektrotta oksijen atmosferinde 100 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogram

Şekil 4.3' de jel/MoO₃ elektrotun oksijen atmosferinde LED çözeltisinde 100 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramı verilmektedir. Şekil 4.3. de jel/MoO₃ elektrota ait voltamogram incelendiğinde anodik ve katodik yöndeki akımlar jel elektrotu göre daha yüksek olmaktadır. Jel içerisine eklenen MoO₃ un katalitik etkisi ile açıklanabilir. Akım artışına bağlı olarak pikler genişlemekte ve pik potansiyelleri anodik yönde taramada pozitif potansiyele, katodik taramada ise negatif potansiyele kaymaktadır (Soavi, 2013).



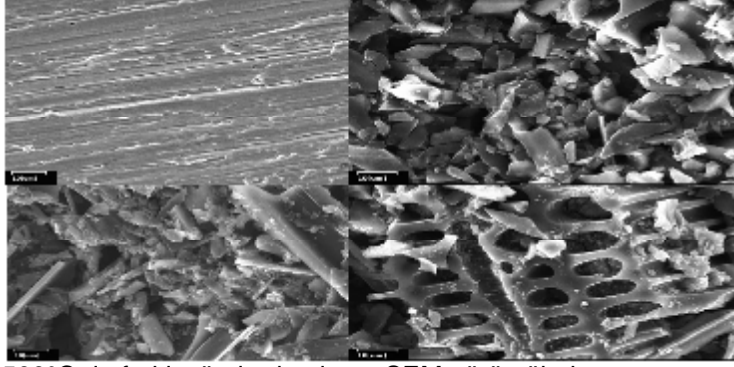
Şekil 4.4. LED çözeltisinde jel/MoO₃ (500 °C, 5 saat) oksijen ortamında 100 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogram.

Jel/MoO₃ elektrotun 500 °C de 5 saat bekletilerek LED çözeltisinde oksijenli ortamda elde edilen dönüşümlü voltamogramı Şekil 4.4. de verilmektedir. Elde edilen voltamogramdan görüldüğü gibi anodik yönde \sim -2,00 V ile \sim -0,50 V aralığında A1 piki ve \sim 0,00 V ile \sim 1,00 V aralığında A2 piki oluşmaktadır. Katodik yönde 0,80 V ile 1,20 V aralığında belirgin bir pik meydana gelmemekte katodik akım artmaktadır. Jel/MoO₃ elektrotun 500°C de 5 saat bekletilmesiyle elde edilen pik akımlarıyla aynı elektrotun sıcaklık uygulaması yapılmadan elde edilen pik akımlarında çok büyük bir artış gözlenmemektedir. Bu durum jel/MoO₃ 500°C de 5 saat bekletilmesiyle yeterince aktifleştirilememesinden kaynaklanabilir.



Şekil 4.5. LED çözeltisinde jel/MoO₃ (500 °C, 8 saat) oksijen atmosferinde 100 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogram.

Şekil 4.5. de 500 °C de 8 saat bekletilen jel/MoO₃ elektrotun oksijen atmosferinde elde edilen dönüşümlü voltamogramı verilmektedir. Şekil 4.5. de --2,00 V ile ~-0,50 V ve ~-0,60 V ile ~1,50 V aralığında anodik yönde geniş pikler oluşurken, ~-1,50 V ile ~-1,80 V aralığında katodik yönde bir pik(K1) görülmektedir. Lityum oksit, lityum peroksit ve lityum süperoksit bileşikleri anodik yönde oksijen gazı oluştururken, katodik yönde ise oksijen gazı indirgenmesi ve çözeltide bulunan lityum iyonuyla birlikte Li_xO_x türleri oluşmaktadır. Jel/MoO₃ (500 °C, 8 saat) elektrotta, 500 °C de farklı sürelerde bekletilen diğer jel/MoO₃ elektrotlara göre akımların daha yüksek olduğu ve dolayısıyla etkinliğin yüksek olduğu voltamogramlardan görülmektedir (Şekil 4.3 ve 4.4.). Daha iyi elektrot performansına ulaşabilmek için katot aktif maddelerin homojen tek faza, küçük tanecik boyutuna, gözenekli bir yapıya ve büyük yüzey alanına sahip olması istenmektedir (Chen ve ark., 2002, Bates ve ark., 2000, Abraham ve ark., 2004).



Şekil 4.6. 500°C de farklı sürelerde alınan SEM görüntüleri.

Şekil 4.6. da jel/MoO₃ (500°C, 8 saat), elektrotunun SEM görüntüsü verilmektedir. Jel/MoO₃ (500°C, 8 saat) elektrotunun yüzeyin homojen şekilde oluşmuş gözenekli yapı SEM görüntüsünden görülebilmektedir. Jel/MoO₃ (500°C, 8 saat) elde edilen gözenekli yapı sayesinde Li_xO_x türlerin yüzeyde diğer elektrotlara göre daha fazla oluşmasına katkı sağladığı söylenebilir. Jel/MoO₃ (500°C, 8 saat) elektrotunun SEM görüntülerinden elde edilen gözenekli yapısı dönüşümlü voltametri ölçümleriyle uyumaktadır. MoO₃ kül fırınında 500°C de 8 saat bekletilerek hazırlanan jel elektrotların gözenekli yapı oluşturduğu, artan ve azalan bekleme sürelerinde ise gözenekli yapının değiştiği SEM görüntülerinden belirlenmiştir. Hazırlanan elektrotlarda uygulanan işlemlerin MoO₃ in katalitik özelliğinin ve elektrotun gözenekliliğini etkilediği görülmektedir.

Sonuçlar

Bu çalışmada, Lityum hava pillerinde katodik tepkime oksijen indirgenmesi için katot katalizörü olarak paslanmaz çelik tabanlı MoO₃ katalizörü oluşturulmuştur. Hazırlanan elektrotların katalitik etkinlikleri, oksijen atmosferinde LED çözeltisi içerisinde dönüşümlü voltametri elde edilmiştir. Elektrotların yüzey görüntüleri taramalı elektron mikroskopu kullanılarak alınmıştır. Elde edilen deney sonuçlarına göre;

Paslanmaz çelik tabanlı üzerine sürülen jel elektrotta katodik tepkimede akım değerleri artmıştır. Jel içerisine eklenen MoO₃ katalizörünün etkisini artırmak için 500 °C de 5, 8 saat bekletilmiştir. Jel/MoO₃ (8 saat) elektrotun katalizör içermeden hazırlanan elektroda göre voltamogramlarında daha yüksek pik akımı elde edilmiştir. SEM ile görüntülerinde, paslanmaz çeliğin yüzeyi düz bir yapıya sahip iken, hazırlanan katalizörlü ve katalizörsüz elektrotlarda gözenekli yapılar oluşmuştur. Farklı sıcaklıklarda hazırlanan katalizörlü elektrotlarda ise homojen ve gözenekli yüzeyin MoO₃ 500°C de 8 saat bekletilerek hazırlanan elektrot olduğu görülmektedir.

Verimi ve kapasitesi yüksek lityum hava pilli elde etmek için katot materyalinin elektro katalitik etkisi ve gözenekli yapısı önemlidir. MoO₃ 500°C de 8

saat bekletilerek hazırlanan jel elektrotun gözenekli yapısı ve oksijen indirgenmesinde gösterdiği katalitik etki nedeniyle lityum hava pil hücrelerinde katot olarak kullanılması önerilebilir.

Kaynaklar

- ABRAHAM K.M., JIANG Z., 1996. A polymer electrolyte-based rechargeable lithium/oxygen battery. *Journal of the Electrochemical Society*,143:1–5.
- ARUMUGAM D., KALAIĞNAN G.P., 2010. Synthesis and electrochemical characterization of nano- CeO_2 -coated nanostructure LiMn_2O_4 cathode materials for rechargeable lithium batteries. *Electrochemical Acta*, 55: 8709-8716.
- ARUMUGAM D., KALAIĞNAN G.P., 2011. Electrochemical characterizations of surface modified LiMn_2O_4 cathode materials for high temperature lithium battery applications. *Thin Solid Films* 520: 338-343.
- BEATTIE S.D., MANOLESCU D.M., BLAIR S.L., 2009. High capacity lithium-air cathodes. *Journal of the Electrochemical Society*, 156: A44–A47.
- BERNANDES, A.M., ESPINOSA, D.C.R., TENORIO, J.A.S., 2004. Recycling of batteries:a review of current processes and technologies. *Journal of Power Sources*, 130: 291-298.
- CHITHAMBARAJ A., BOSE C.A., 2011 Investigation on structural, thermal, optical and sensing properties of meta-stable hexagonal MoO_3 nanocrystals of one dimensional structure. *Beilstein Journal of Nanotechnology*,2:585-592.
- DENG C., ZHANG S., GAO Y., WU B., MA L., SUN Y.H., FU B.L., WU Q., LIU F.L., 2012. Synthesis and improved properties of nanostructured $\text{Li}_2\text{MnSO}_4/\text{C}$ via a modified sol-gel method. *International Journal of Electrochemical Science*,7: 4559-4566.
- DOBLEY A., DICARLO J., ABRAHAM K.M., 2004. Non-aqueous lithium–air batteries with an advanced cathode structure. *The Proceedings of the 41st Power Sources Conference*.
- ERBİL, M., 1987. Alternatif akım (a.c) yöntemiyle korozyon hızı belirlenmesi. *Doğa*, 3: 100–111.
- ERBİL, M., 2004. Korozyon hızının ac impedans tekniği ile ölçümü ve uygulamaları. *Korozyon*, 12: 25–30.
- GLUSHENKOV A.M., HASSAN M.F., STUKACHEV V.I., GUO Z., LIU H.K., KIERKEGAARD, S., 2007. Eu battery directive, charging up the batteries: squeezing more capacity and power into the new eu battery directive. *Computer Law & Security Report*, 23: 357-364.
- HAMLEN R.P., ATWATER T.B., LINDEN D., REDDY T., 2001. *Handbook of Batteries*, third ed. McGraw Hill, New York, USA, 38.
- KICHAMBAREA P., KUMARB J., RODRIGUESA S., KUMARB B., 2011. Electrochemical performance of highly mesoporous nitrogen doped carbon cathode in lithium- oxygen batteries. *Journal Power Sources*, 196: 3310-3314.

- KİM, D.S., SOHN, J.S., LEE, C.K., LEE, J.H., HAN, K.S., LEE, Y.I., 2004. Simultaneous separation and renovation of lithium cobalt oxide from the cathode of spent lithium ion rechargeable batteries. *Journal of Power Sources*, 132, 145-149.
- KİM H.U., SONG J., MUMM D.R., SONG M.Y., 2011. Effects of Zn or Ti substitution for Ni on the electrochemical properties of LiNiO₂. *Ceramics Internation*, 37: 779-782.
- KUBOKI T., OKUYAMA T., OHSAKI T., TAKAMI N., 2005. Lithium- air batteries using hydrophobic room temperature ionic liquid electrolyte. *Journal Power Sources*, 146: 766–769.
- LAOIRE C.Ó., MUKERJEE S., ABRAHAM K.M., PLICHTA E.J., HENDRICKSON M.A., 2010. Influence of nonaqueous solvents on the electrochemistry of oxygen in the rechargeable lithium-air battery. *Journal of Physical Chemistry C* 114: 9178-9186.

¹ β-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KAYISI (*PRUNUS ARMENIACA*) ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU*

Purification and Characterization of β-Glucosidase From Prunus Armeniaca Seeds

Gözde ERGÖÇEN
Kimya Anabilim Dalı

S.Seyhan TÜKEL
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Malatya ili ve çevresinde bol miktarda yetiştirilen ve şimdiye kadar β-glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış olan *Prunus armeniaca* (kayısı) çekirdeklerinden β-glukozidaz enziminin saflaştırılması, kinetik özellikleri (K_m , V_{max}), termal ve depolama kararlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Saflaştırılan β-glukozidaz'ın molekül ağırlığının 107 kDa olduğu ve herbiri birbirinin aynı 23 kDa kütleli 5 alt birimden oluştuğu belirlenmiştir. *Prunus armeniaca* β-glukozidaz'ının optimum pH değeri 5,0 ve optimum sıcaklığı 45°C'dir. β-glukozidaz'ın 5°C'deki termal kararlılığı ve 5°C'deki depolama kararlılığı denenilen diğer sıcaklıklara (25 ve 50°C) göre daha yüksek bulunmuştur. K_m ve V_{max} kinetik parametreleri *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranozit substratı için sırasıyla 1,95 mM ve 77,5 U/mg prot. bulunmuştur. **Anahtar kelimeler:** β-Glukozidaz, saflaştırma, karakterizasyonu, kinetik, *Prunus armeniaca*

ABSTRACT

In this study, we aimed to purify β-glucosidase from *Prunus armeniaca* (apricot) seeds which are abundant in Malatya (Turkey) and its surroundings and have not been used as β-glucosidase source up to now as well as, to determine kinetic parameters (K_m , V_{max}), thermal and storage stabilities of the purified β-glucosidase. The molecular weight of the purified enzyme was estimated as 107 kDa and the enzyme was consist of five identical subnits with the molecular weight of 23 kDa each. The optimal pH value of β-glucosidase was 5.0 and its optimal temperature was 45°C. β-Glucosidase preparations showed better thermal and storage stabilities at 5°C than those of other temperatures (25 and 50°C). K_m and V_{max} values were 1.95 mM and 77.5 U/mg prot., respectively towards *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyronoside.

Key Words: β-Glucosidase, purification, characterization, kinetic, *Prunu armeniaca*

Giriş

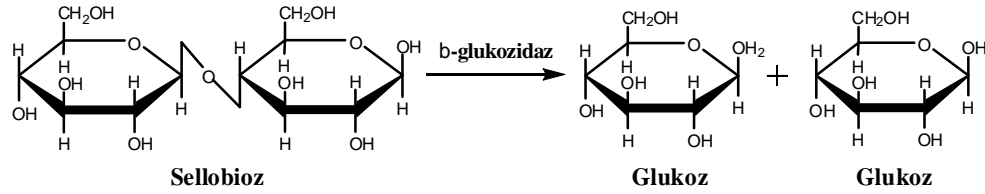
Enzimler, metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran, protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Bununla beraber enzimler doğal ortamları dışında da uygun koşullar sağlandığında etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu durumda enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

reaksiyonlardaki işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Sistemik adı β -D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β -glukozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki β -glukozid bağlarını hidroliz edebilen enzimlerdir. β -Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak buldukları ve biyolojik yollarda üç önemli görevlerinin olduğu bildirilmektedir.

Bu görevlerden birisi, bakteri ve mantarlarda bulunan β -glukozidazların selüloz enzim sisteminin (selobiohidrolaz, endo- β -glukonaz ve β -glukozidaz) bir parçası olarak selüloz ve sellobioz yıkılmasındaki rolüdür (Şekil 1).



Şekil 1. Sellobiozun β -glukozidaz tarafından hidrolizi.

İkincisi; endojen siyanojenik glikozitlerdeki β -glukozidik bağın hidrolizi ile aglikan ve siyanohidrinlerin oluşumunu katalizlemesidir. Doğada siyanohidrinler siyanojenik glikozitlerin aglikan kısmı olarak bulunurlar. Bu bileşikler HCN kaynağı olarak görev alırlar ve ayrıca azot transport metabolizmasında rol oynarlar. Bu olayın tümü siyanojenez olarak bilinmektedir. Siyanojenezde oluşan HCN herbivoral ve fungal ataklar sonucu oluşan doku yaralanmalarında bitkiyi koruduğu, L-asparajinin biyosentezinde azot kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Bitki β -glukozidazların diğer önemli bir fonksiyonları da inaktif hormon-glukozid bileşiklerinden aktif hormon formlarını serbestleştirerek; sitokinin, giberellin ve oksin gibi bitki hormonlarının biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesi ile ilgilidir.

Materyal ve Metod

Materyal

Araç ve Gereçler: UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), HPLC (Shimadzu, Class Vp serisi), Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu (7,8x300 mm), HiPrep 16/10 Butil FF kolonu (1x20 cm) hidrofobik etkileşim kolonu.

Kimyasallar: Amonyum sülfat, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, Coomassie Brilliant Blue G 250, elektroforez için standart proteinler (Fermantes, SM 1811), etil alkol, sığır serum albümin, fosforik asit (%85, v/v), hidroklorik asit (%37, v/v), glasiyel asetik asit, metanol, 2-merkaptometanol, 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozid, TEMED, akrilamid, N'N'-bis-metilen-akrilamid, amonyum persülfat, SDS, gliserol, bromofenol mavisi, bütanol.

Metod

Çekirdeklerin Homojenizasyonu

Sert kabuklarından çıkartılan çekirdek içlerinin her 1 gramına 8 mL-20°C'ye kadar soğutulmuş aseton eklenerek örnekler homojenize edilmiş ve homojenat su trompu yardımıyla vakum altında süzölmüştür. Böylece aseton ile birlikte fenolik bileşikler ve bazı lipitler de süzöntü ile birlikte uzaklaştırılmış olmaktadır. Filtre kağıdının üstünde kalan kısım tekrar blender haznesine alınarak işlem yukarıda anlatıldığı şekilde 3 kez tekrarlanmıştır. Son süzme işlemi sonucunda süzgeç kağıdında kalan katı ekstrakt asetonun uçurulması amacıyla 24 saat 5°C bekletildikten sonra amonyum sülfat çöktürmesi için kullanılmış veya daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır..

Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Aseton ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 5 mL sitrik asit-Na₂HPO₄ (50 mM, pH:5,5) içerisinde çözüldükten sonra elde edilen çözelti, 10000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta %20-60'lık amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmeleri sonucunda elde edilen her bir çökelti ve süpernatantın β-glukozidaz aktiviteleri ve protein miktarları Bradford (1976) yöntemiyle ölçölmüştür.

Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi

β-Glukozidaz'ın hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi (HEK) ile ayrıştırılmasında dolgu maddesi olarak butil sefaroze içeren HiPrep 16/10 Butil FF kolonu (1x20 cm) kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökelti, 50 mM sitrik asit-Na₂HPO₄ (pH:5,5) içerisinde çözümlenerek hidrofobik etkileşim kromatoğrafisine uygulanmıştır. β-Glukozidaz'ın kolondan alınması için %60-0 (w/v) aralığında farklı derişimlerde amonyum sülfat içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) kolondan geçirilmiş ve toplanan eluatların 280 nm'deki absorpsan değerlerine bakılmıştır. Protein içeren örneklerde β-glukozidaz aktivitelerine bakılarak, β-glukozidaz içeren eluatlar bir araya getirilmiştir.

Protein Tayini

Saflaştırılma işlemleri sırasında β-glukozidaz örneklerinin protein miktarları Bradford yöntemi (1976) ile belirlenmiştir. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorpsan göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı (2 dk) gelişmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 mikrogram arasında değişmektedir.

Tayin işlemleri şöyle yapılır; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisi tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınır. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanır. 5 mL Coomassie Blue reaktif tüplere ilave edilir ve vorteks ile karıştırılır. 10 dk sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorpsan değerleri okunur. 0,1 mL saf su ve 5 mL

Coomassie Blue reaktifinden oluşan karışım kör olarak kullanılır. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri ile standart grafik çizilir.

β-Glukozidaz Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi

β-Glukozidazın aktivitesinin belirlenmesinde Chen ve ark. tarafından önerilen ve ön çalışmalarda tarafımızca modifiye edilen yöntem kullanılacaktır. Bu yöntemde göre; bir deney tüpüne sitrat-fosfat (pH 5,5) tamponundan hazırlanmış ve aktivitesi ölçülecek enzimin substrat çözeltisinden (4-nitrofenil-β-D-glukopiranozid) 2,95 mL ve enzim çözeltisinden 50 µL ilave edilecektir. Karışım 10 dakika süreyle 37°C'deki su banyosunda bırakılacak ve bu sürenin sonunda tüplere, reaksiyonu durdurmak için 3 mL 0,2 M Na₂CO₃ ilave edilecektir. Oluşan çözelti 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, berrak olan kısım alınıp UV spektrofotometresin de 410 nm dalga boyunda absorbansı ölçülecektir. Enzim aktivitesi 37°C'de dakikada açığa çıkan µmol 4-nitrofenol (µmol 4-nitrofenol/dk) olarak; spesifik aktivite ise 37°C'de dakikada 1 mg enzim proteinin açığa çıkardığı µmol 4-nitrofenol (µmol 4-nitrofenol/dk/mg protein) olarak belirtilmektedir.

Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

β-Glukozidaz'ın moleküler ağırlığı HPLC ile Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu (5µm, 7,8x300 mm) kullanılarak Diyot Array Dedektör (DAD) ile 220 nm'de belirlenmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 1 mL/dk olan 300 mM NaCl içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0) kullanılmış ve analiz boyunca kolon sıcaklığı 30°C'de sabit tutulmuştur. Standart protein grafiğinin çizilmesinde moleküler ağırlıkları 26,6 kDa olan triozfosfat izomeraz, 36,5 kDa olan laktat dehidrojenaz, 48,5 kDa olan fumaraz, 58,5 kDa olan piruvat kinaz, 90 kDa olan laktoferrin, 116 kDa olan β-galaktozidaz ve 180 kDa olan α₂-makroglobulin standart proteinleri kullanılmıştır.

SDS-PAGE Elektrofrezisi

Laemli'nin önerdiği yöntemde göre yapılmıştır.

Aktiviteye pH'nın Etkisinin İncelenmesi

β-Glukozidazın aktivitesine pH'nın etkisini araştırmak için pH 4,0, 4,5, 5,0 ve 5,5 (50 mM asetat tamponu), pH 6,0 (50 mM sitrat tamponu), pH 6,5 ve 7,0 (50 mM fosfat tamponu) tampon çözeltileri içerisinde β-glukozidazın aktivitesine bakılarak optimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenecektir.

Aktiviteye Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

β-Glukozidazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla enzim aktivitesi 10-60°C arasında değişen sıcaklıklarda her seferinde sıcaklık 10°C arttırılarak ölçülecektir.

Aktiviteye Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Farklı derişimlerde hazırlanan substrat (4-nitrofenil-β-D-glukopiranozid)

çözeltisi kullanılarak enzim aktivitesi ölçülecek ve Sigma-Plot Enzim Kinetik Modül yazılımı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilecektir.

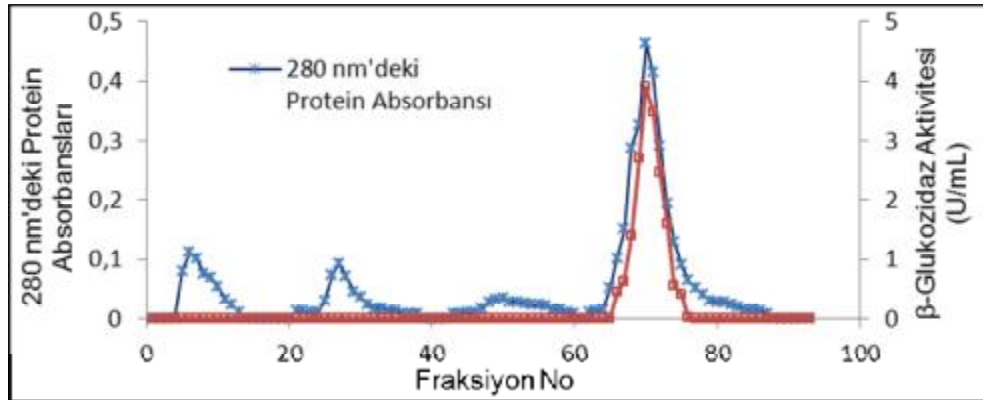
Araştırma Bulguları ve Tartışma Bulgular

Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme Bulguları

Çekirdeklerin -20°C 'ye soğutulmuş aseton ile homojenizasyonu, asetonun uçurulması ve tampon ile çözülmesiyle elde edilen ham ekstrakta β -glukozidaz aktivitesi ve protein miktarı belirlenmiştir (Çizelge 1). Aseton ekstraksiyonu sonrası elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 5 mL sitrik asit- Na_2HPO_4 (50 mM, pH:5,5) tamponunda çözülmüştür. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yapıldığında ise en yüksek β -glukozidaz aktivitesinin %50'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeltide olduğu belirlenmiştir.

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Bulguları

%50'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen çökeltinin 50 mM sitrik asit- Na_2HPO_4 tamponu (pH 5,5) içerisindeki çözeltisi hidrofobik etkileşim kromatografisine uygulanmış ve %60-0 amonyum sülfat içeren fosfat tamponu ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'deki protein absorbanlarına bakılmıştır. Absorbans veren eluatlarda β -glukozidaz aktivitesi ölçülerek, β -glukozidaz'ın tampon çözelti ile elüe edildiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2'de grafik üzerinde gösterilmiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi dört önemli protein bandının olduğu ancak 60-80 nolu fraksiyonlar arasında β -glukozidaz aktivitesinin gözlemlendiği bulunmuştur.



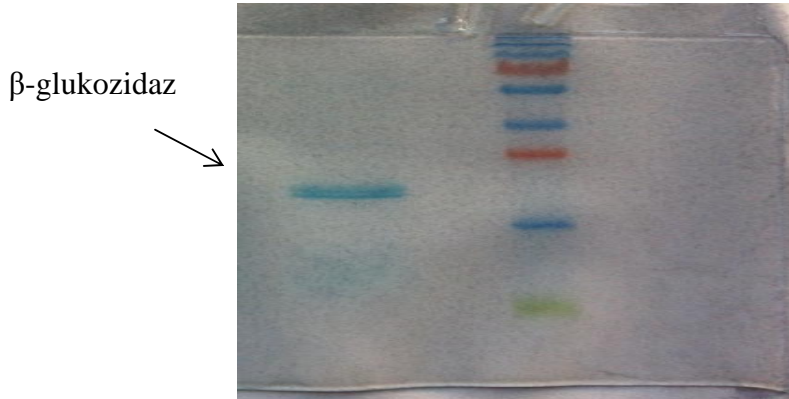
Şekil 2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.

Çizelge 1. Kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeği β -glukozidaz için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top. Prot. (mg)	Top. Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mL prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham β -glukozidaz ekstraktı	43	4	0,86	34,4	172	5	100	1
%50 Amonyum sülfat çöktürmesi	10	13,6	0,9	9	136	15	79	3
Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonrası	28	3,9	0,14	3,9	112	29	59	6

β -Glukozidaz'ın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi Sonuçları

β -Glukozidaz'ın moleküler ağırlığının belirlenmesinde Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu kullanılmış, β -glukozidaz için alıkonma zamanı bulunmuş ve standart protein grafiği kullanılarak moleküler ağırlığı yaklaşık 107 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçların SDS-PAGE sonuçları ile birlikte değerlendirilmesiyle saflaştırılan β -glukozidaz'ın yaklaşık 23 kDa ağırlığında özdeş 5 alt üniteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. β -Glukozidaz için örnek bir SDS-PAGE sonucu.

β-Glukozidaz'ın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

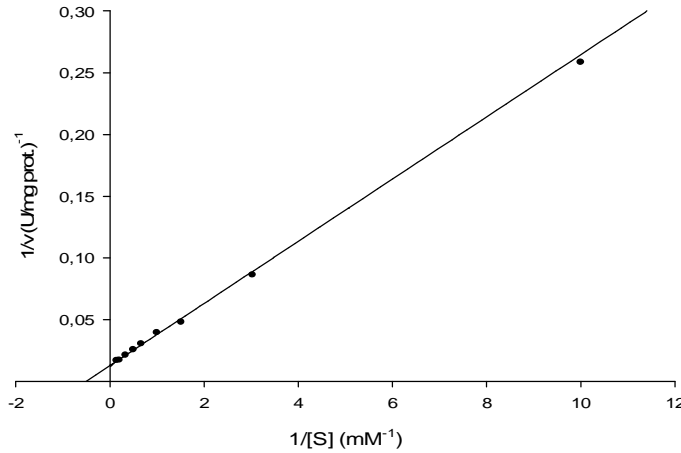
β-Glukozidaz aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi pH:4-8 aralığında incelenmiştir. β-Glukozidaz'ı için maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 5,0'dir. pH 4,0'da maksimum aktivitenin ancak %56'sını göstermektedir. Diğer taraftan pH 6'da gözlenen aktivite maksimum aktivitesinin %80'i kadardır. pH 8'de enzim maksimum aktivitesinin ancak %36'sını gösterebilmektedir.

β-Glukozidaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

β-Glukozidaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 10-60°C aralığında incelenmiş bulgular incelenmiştir. Kayısı β-glukozidaz'ı için maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 45°C olarak belirlenmiştir. 20°C olduğunda maksimum aktivitenin ancak %42'sini göstermektedir. Diğer taraftan 60°C'de gözlenen aktivitenin maksimum %60'ı kadardır.

β-Glukozidaz'ın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta (5,0 ve 45°C) 0,01-7,0 mM p-nitrofenil-β-D-glukopiranozit derişimleri kullanılarak ölçülen aktiviter için Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,95 mM ve 77,5 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. β-Glukozidaz için Lineweaver-Burk grafiği.

β-Glukozidaz'ın Termal Kararlılığı İle İlgili Bulgular

β-Glukozidaz örneği 5, 25 ve 50°C'de 2, 4, 8 ve 16 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteri ölçülmüş ve % bağıl aktiviter hesaplanmıştır. Sonuçlar tüm inkübasyon süreleri için en yüksek kalan aktivite değerleri 5°C'de bekletilen örnekler için elde edilmiştir. 16 saat inkübasyon süresi sonunda 5°C'de aktivitenin

%72'sini koruduğu gözlenmiştir. 25°C'de ve 50°C'de ise sırasıyla aktivitesinin %67 ve %54'ünü koruduğu bulunmuştur.

β-Glukozidaz'ın Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular

β-Glukozidaz örneğini oda sıcaklığında ve 4°C'de 50 Mm pH 5,5 fosfat tamponunda bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Kayısı β-glukozidaz örneğinin depolama süresine bağlı aktivite değişimleri 25°C'de 15. gün sonunda aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenirken; 4°C'de ise 30. günün sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin kaybolduğu belirlenmiştir.

Tartışma

Literatürde β-glukozidazın *Prunus* familyasına ait bazı bitkilerin çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ancak *Prunus armeniaca* çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. β-Glukozidaz'ın saflaştırılması için yapılan ön çalışmalarda sırasıyla aseton ekstraksiyonu, (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi denenmiştir. Şimdiye kadar β-glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış olan kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeğinden β-glukozidaz enzimi %59 verimle 6 kat saflaştırılmıştır. Gerardi ve ark., (2001) *Prunus avium* L. (olgun kiraz) meyvesinden kromatografi yöntemleriyle β-glukozidaz'ı %26 verimle 6,8 kat saflaştırmışlardır. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* (vanilya) tohumundan %8,4 verimle 7,2 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β-glukozidaz'ı %5,4 verimle 59,2 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Prunus armeniaca (kayısı) çekirdeklerinden saflaştırdığımız β-glukozidaz'ın her birinin yaklaşık 23 kDa ağırlığında özdeş 5 alt üniteye sahip oldukları belirlenmiştir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* β-glukozidaz'ın 61 kDa ağırlığında ve tek bir alt birime sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Saflaştırılan β-glukozidaz'a pH'nın etkisinin araştırılması ile ilgili çalışmalarımızda maksimum aktivitenin ölçüldüğü pH değeri 5,0 (50 mM asetat tamponu) bulunmuştur. Literatürde *Prunus domestica* ve *Prunus avium* L. gibi *Prunus* türü meyvelerin çekirdeklerinden saflaştırılan β-glukozidaz'lar için maksimum aktivitenin ölçüldüğü pH değerinin 5,0-5,5 arasında olduğu bildirilmiştir (Gerardi ve ark., 2001; Chen ve ark., 2012).

Çalışmamızda saflaştırılan β-glukozidaz için en uygun sıcaklığı 45°C olarak belirlenmiştir. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* tohumundan saflaştırılan β-glukozidaz için en uygun sıcaklık pH 7,0'de 40°C'dir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β-glukozidaz için optimum sıcaklığı 55°C olarak rapor etmişlerdir.

Saflaştırılan β-glukozidaz aktiviteleri için yapılan kinetik çalışmaların sonucunda K_m - V_{max} değerleri sırasıyla 1,95 mM ve 77,5 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* tohumundan saflaştırılan β-glukozidaz için yapılan kinetik çalışmalar sonucunda K_m - V_{max} değerleri sırasıyla 1,1

mM ve $4,5 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ olarak hesaplandığı rapor edilmiştir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β -glukozidaz için K_m ve V_{\max} değerleri sırasıyla 3,09 mM ve 122,1 $\mu\text{mol/dk mg}$ bulunmuştur.

Sonuçlar

Daha önceden β -glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış *Prunus armeniaca* çekirdeklerinden saflaştırılan β -glukozidaz'ın molekül ağırlığı 107 kDa olan 5 özdeş alt birimden oluştuğu belirlenmiştir.

Prunus armeniaca (kayısı) çekirdeklerinden β -glukozidaz %59 verimle 6 kat saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan β -glukozidaz K_m değeri 1,95 mM ve V_{\max} 77,5 U/mg prot. olarak belirlenmiştir.

Saflaştırılan β -glukozidaz için en yüksek aktivitenin gözlemlendiği optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 5,0 ve 45°C olarak belirlenmiştir.

Kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeklerinden saflaştırılan β -glukozidaz'ın termal kararlılıkları karşılaştırıldığında; 5°C'de 16 saat sonunda β -glukozidaz aktivitesinin %72'sini, 25°C'de %67'si ve 50°C'de ise %54'ünü koruduğu belirlenmiştir.

Saflaştırılan β -glukozidaz farklı koşullarda depolandıklarında; 4°C'de bekletilen β -glukozidaz 30 günün sonunda aktivitesinin tamamını kaybederken oda sıcaklığında bekletilen 15 günün sonunda tüm aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Kaynaklar

- AKIYAMA, T., HANAE, K., and NATAO, S., 1997. Acell Wall-Bound β -Glucosidase From Germinated Rice: Purification And Properties. *Phytochemistry*, 48: 49-54.
- BRADFORD, 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: 248-254..
- CHEN, L., LI, N., ZONG, MH., 2012. A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus Domestica* seeds: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 47: 127-132.
- CHINCHETRU, M.A., CABEZAS, J.A., CALVO, P., 1989. Purification and characterization of a broad specificity β -glucosidase from sheep liver. *International Journal of Biochemistry*, 21:469-476.
- COMPOS, N., BAKO, L., BRZOBOHATY, B., FELDWISCH, J., ZETTL, R., BOLAND, W., PALME, K., 1993. Identification and characterization of a novel phytohormone conjugate specific β -glucosidase activity from maize. *American Chemical Society*, 533: 205-213.
- ERARSLAN, A., 2000. Enzim Kinetiği Notları. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli, 84.
- ESEN, A., 1993. β -Glucosidases, overview. In: ESEN, A. (Ed), β -Glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1-13.

- GERARDI, C., FEDERICA, B., ANGELO, S., GIUSEPPE. Z., 2001. Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science*, 160:795-805.
- LAEMLI, U.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 22: 680-685.
- MASAYUKI, S., ATSUSHI, I., HAJIME, I., 2000. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant Science*, 155: 67-74.
- ODOUX, E., CHAUWIN, A., BRILLOUET, J.M., 2003. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-glucosidase. *J Agric Food Chemistry*, 51: 3168-3173.
- PATEL, V., TAPPEL, A.L., 1969. B-Glucosidase and β -xylosidase of fat kidney. *Biochemistry Biophysics Acta*, 191:653-662.
- PONTOH, J., LOW, N.H., 2002. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 679-690.
- TURNER, B.L., HOPKINS, D.W., HAYGARTH, P.M., OSTLE, N., 2002. β -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20: 157-162.
- YANG, L., NING, Z.S., SHI, C.Z., CHANG, Z.Y., HUAN, L.Y., 2004. Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic bacterium. *Journal Agric Food Chemistry*, 52: 1940-1944.

YENİ AMİNOMETİLFOSFİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN SENTEZİ BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ *

*Synthesis of New Water Soluble Aminomethylphosphine and Their Metal
Complexes and Investigation of Their Biological Activity**

Tuğba Keleş
Kimya Anabilim Dalı

Osman Serindağ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada suda çözünebilir aminometilfosfin ligandları, (N,N-bis-(dihidroksimetil-fosfinometil)-amino-metil, [(CH₂OH)₂PCH₂]₂NCH₃), N,N-bis-(dihidroksimetil-fosfinometil)amino-bütül, [(CH₂OH)₂PCH₂]₂NBu)) uygun fosfin hidridlerin formaldehit varlığında etanol içerisinde inert azot atmosferinde formillenmesiyle sentezlenmiştir. Bu ligandların suda çözünebilir Pt(II), Pd(II), Co(II), Au(I) metal kompleksleri Schlenk metoduna göre sentezlenmiş, sentezlenen metal komplekslerin ve ligandların karakterizasyonu için termogravimetrik analiz, elementel analiz teknikleri ve kütle, FT-IR, NMR spektroskopisi (¹H, ¹³C, ³¹P) kullanılmıştır. Sentezlenen metal komplekslerin akciğer kanser hücreleri A549 üzerinde sitotoksik etkisi ve bazı bakteri türleri üzerinde antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Uygulanan derişimlerde [PdCl₂(CH₂OH)₂PCH₂]₂NCH₃] kompleksinin sitotoksik etki gösterdiği. Au(I) (10) metal kompleksinin de diğer metal komplekslerine göre daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Suda Çözünebilir Fosfin, Aminometilfosfin,

ABSTRACT

In this study the water soluble aminomethylphosphine ligands (N,N-bis(hydroxymethylphosphinomethyl)aminomethyl, (CH₂OH)₂PCH₂]₂NCH₃), N,N-bis(hydroxymethylphosphinomethyl)amino-butyl, (CH₂OH)₂(PCH₂]₂NBu)) were synthesized by the formylation appropriate phosphine hydrides in the presence of formaldehyde in ethanol under nitrogen atmosphere using the Schlenk method. The water soluble Pt(II), Pd(II), Co(II), Au(I) metal complexes of the aminomethylphosphine ligands have been synthesized. All the metal complexes and the ligands have been characterized by, FT-IR, NMR (¹H, ¹³C, ³¹P) spectroscopic and elemental analysis techniques. These complexes were tested as cytotoxic agents against human epithelial adenocarcinoma cell line A549 and antimicrobial activity were studied on some bacteria. [PdCl₂(CH₂OH)₂PCH₂]₂NCH₃] complex has been shown cytotoxic effect for the applied concentration. The Au(I) metal complex has shown the best antimicrobial activity in comparison with the other metal complexes.

Keywords: Water Soluble Phosphine, Aminomethylphosphines

* Doktora Tezi-Phd. Thesis

Giriş

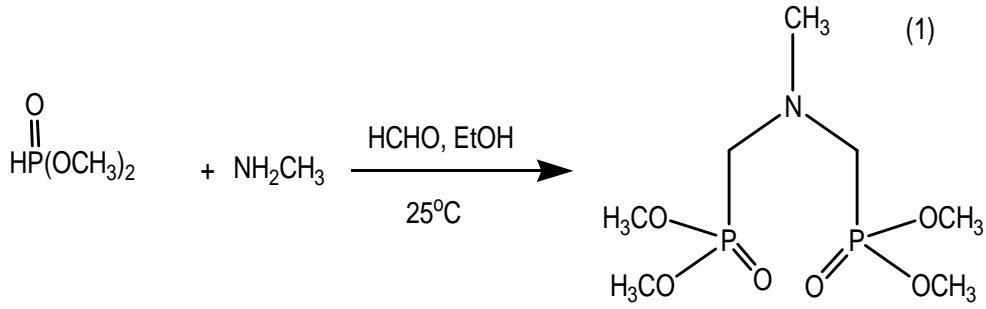
Su çevresel ve biyolojik bir çözücüdür. Bu yüzden sulu ortam kimyacılar için caziptir. Özellikle suda çözünebilir geçiş metali kompleksleri, iki fazlı kataliz (organik –sulu) ve bio-tıp uygulamalarındaki yararlarından dolayı son yıllarda ön plana çıkmıştır (Higham ve ark. 1998). Bunun yanısıra spesifik bazı metal kompleksleri belirli bazı hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu durum in vivo ortamda kararlı ve suda çözünebilir metal komplekslerin sentezine olan ilgiyi arttırmaktadır (Kattesh ve ark. 1999). Çeşitli ligandlar geçiş metallerinin belirli oksidasyon basamaklarında kararlı bileşikler oluşturmak ve sulu koordinasyon bileşikleri oluşturmaları açısından uygundur. Bu sınıf ligandlar içinde çok yönlü kimyasıyla en etkin olan ligand fosfinlerdir (Li ve ark 1997). Tersiyer fosfin ligandlarının ve geçiş metali komplekslerinin antitümör ve antibakteriyel etki gösterdiğinin deneysel olarak saptanması bu tür bileşiklerin sentezine ve farmakolojik özelliklerinin incelenmesine olan ilgiyi son yıllarda daha da artırmıştır. Suda çözünebilir di veya tri-sülfoarilfosfinler örneğin $P(m-C_6H_4SO_3Na)_3$ yüksek aktiviteye sahip suda çözünebilir metal katalizörlerin gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar (Komiya ve ark. 1994). Hidrofilik alkil fosfinler spesifik yapı avantajları ile hem katalitik hem de bio-tıp uygulamalarda kullanıldığı için daha fazla tercih edilmektedir (Kalck 1992 ve ark.). Değişik fonksiyonel gruplara sahip fosfin ligandlarından elde edilen metal kompleksleri nükleer tıpta da oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Higley ve ark. 1993). Örneğin tek dişli ve iki dişli hidroksimetilfosfin ligandlarından çıkılarak sentezlenen Tc-99m temelli radyofarmakolojik ilaçlar olan tetrafosmin, technecard in-vivo kalp görüntüleyici ajan olarak kullanılmaktadır (Vanderheyden ve ark. 1985). Teknetyum ve renyumun fosfin komplekslerinin in-vivo ortamda kararlı olduğunun gözlenmesi üzerine yeni suda çözünebilir hidroksimetilfosfin ligandlarının ve bunların metal komplekslerinin sentezine olan ilgi artmıştır (Lewis ve ark. 2000). Fosfin içeren metal kompleksleri arasında aminometilfosfin (R_2P-CH_2-N) komplekslerinin anti kanser özelliklerinin incelenmesine yönelik çalışmalar yetersiz sayılabilecek durumdadır. Suda çözünebilir komplekslerin ilaç olarak kullanılması hedef bölgeye dağılımının artması ve ilacın toksisitesini minimuma indirmesi bakımından yarar sağlayabilmektedir. Fosfinlere ve metal komplekslerine suda çözünebilme özelliği polar fonksiyonel grup eklenmesi ile kazandırılabilir.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada N,N-bis(dihidroksimetilfosfinometil)aminometil (dhpam) $(CH_2OH)_2PCH_2NCH_3$ ve N,N-bis(dihidroksimetilfosfinometil)aminobütül (dhpabu) $(CH_2OH)_2PCH_2NCH_2CH_2CH_2CH_3$ ligandları ve bu ligandların Pt(II), Pd(II), Au(I), Co(II) geçiş metali kompleksleri Schlenk metoduna göre azot atmosferinde sentezlendi. Sentezlenen ligand ve komplekslerin yapıları (FT-IR, ^1H-NMR , ^{13}C ve $^{31}P-NMR$), spektrometrik cihazları kullanılarak aydınlatıldı ve biyolojik etkinlikleri incelendi.

[(CH₂OH)₂PCH₂]₂NCH₃)](dhpam) Ligandının Sentezi 1. Aşama;

1.7 mL dimetilfosfit (18 mmol) 20 mL etanol içerisinde alındı 2 mL(20 mmol) formaldehit ve 0.8 mL metil amin (9.09 mmol) varlığında 24 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ortamdaki etanol uçuruldu, viskoz turuncu renkte % 92 verimle ürün elde edildi (Şekil 1). Elde edilen bileşik elementel analiz termogravimetrik analiz, kütle spektrumu ¹H, ¹³C, ³¹P NMR ve IR kullanılarak karakterize edildi. Bileşik su, etanol, metanol, gibi çözücülerde çözünürken diklorometan, dietil eter gibi çözücülerde çözünmemektedir (m/z :273.1 g/mol).

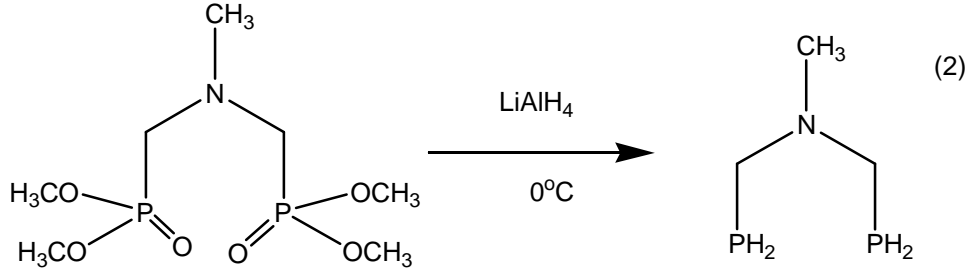


Şekil 1. (PO (OCH₃)₂)₂NCH₃) Bileşiğinin Sentezi (1)₂

Elementel Analiz Sonuçları; Bulunan: % 27.5 C , % 7.2 H, %5.09 N, Hesaplanan: %30.5 C, %6.9 H, %5.1 N)

2. Aşama (H₂PCH₂NCH₃CH₂PH₂) Bileşiğinin Sentezi(2);

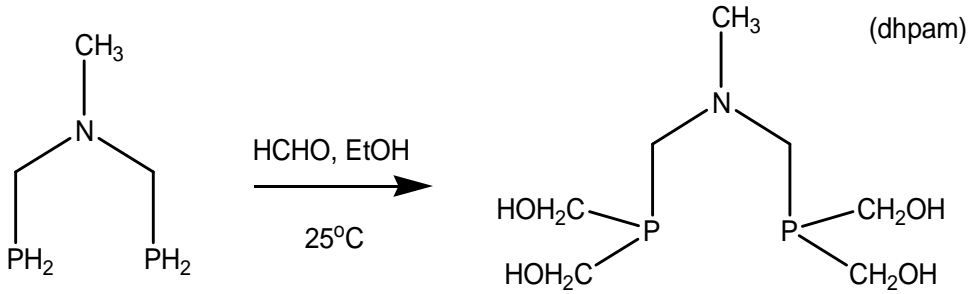
8.4 mmol (PO (OCH₃)₂)₂NCH₃) 1 no'lu bileşik 20 mL etanol içerisinde çözülerek yandan boyunlu balon içerisinde belirli bir süre azot gazı geçirilerek degaze edildi. Bu çözeltinin sıcaklığı buz banyosu kullanılarak 0°C ye düşürüldü. 20mmol (20 mL) 1.0 M LiAlH₄ eter çözeltisi damlatma hunisi yardımıyla Schlenk sistemi kullanılarak azot altında yavaş yavaş eklendi (Şekil 2). Reaksiyon tamamlandığında turuncu renkteki çözeltinin renksiz olduğu gözlemlendi. Oluşan beyaz renkteki lityum tuzu Glovebox'ta süzülerek ayrıldı. Ortamda kalan LiAlH₄ fazlası için 10 mL degaze edilmiş 6M HCl(aq) çözeltisi ilave edildi. Azot altında dietil eter –su fazı ayrılarak eter fazı alındı. Dietil eter uçurularak ürün beyaz renkte viskoz bir sıvı olarak elde edildi. ³¹P NMR ve FT-IR spektroskopisi kullanılarak karakterize edildi. Elde edilen bileşik havada çok kısa sürede oksitlenmektedir.



Şekil 2. $(\text{H}_2\text{PCH}_2\text{NCH}_3\text{CH}_2\text{PH}_2)$ Bileşiğinin Sentezi (2).

3. Aşama $[(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{PCH}_2)_2\text{NCH}_3]$ (dhpam) Bileşiğinin Sentezi(3);

36 mmol formaldehit 20 mL etanol içerisinde alındı. 2 saat azot altında karıştırılarak degaze edildi. 2. Aşamada elde edilen 2 nolu bileşik ayırma hunisi yardımıyla azot altında yavaş yavaş bu çözeltiye eklenerek 12 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. 12 saat sonunda bulanık bir çözelti elde edildi (Şekil 3). Çözücü azot altında uzaklaştırılarak dhpam ligandı renksiz viskoz bir sıvı olarak % 51 verimle elde edildi. Elde edilen bileşik elementel analiz, kütle spektrumu ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR ve FT-IR kullanılarak karakterize edildi. Bileşik su, etanol ,metanol, gibi çözücülerde çözünürken diklorometan, dietil eter gibi çözücülerde çözünmemektedir. Elde edilen bileşik havada çok kısa sürede oksitlenmektedir. m/z: 243 g/mol

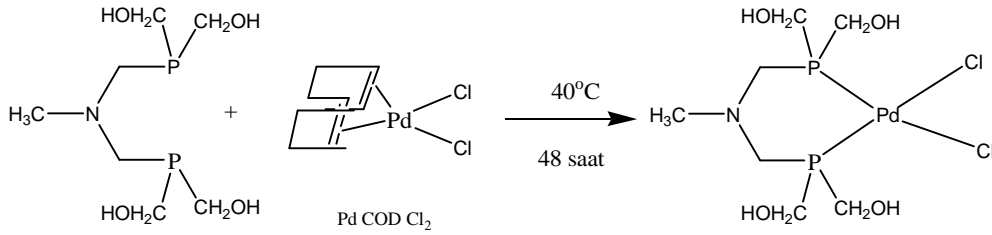


Şekil 3. $[(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{PCH}_2)_2\text{NCH}_3]$ (dhpam) Bileşiğinin Sentezi

Metal Komplekslerinin Sentezi;

1 mmol, 0.243 g dhpam $[(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{PCH}_2)_2\text{NCH}_3]$ ligandı 10 mL degaze edilmiş etanolde çözülerek azot altında yandan boyunlu bir balon içerisinde alındı. Bu çözelti içerisinde 10 mL diklorometanda çözülerek degaze edildi (0.95mmol, 0.27g) $[\text{Pd}(\text{COD})\text{Cl}_2]$ Schlenk tekniği kullanılarak ilave edildi (Şekil 4). Karışım Azot altında 40°C de 24 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Diklorometan etanol fazı ayrıldı. Etanol fazı uçurularak sarı renkte kompleks elde edildi. Oluşan katı süzülüp, diklorometan ile birkaç kez yıkanarak vakumda kurutuldu. Verim (% 61). (M_A : 419.42 g/mol), Kompleks kloroform, diklorometan ve dimetilsülfoksit gibi organik çözücülerde çözünmezken; su, etanol, metanol gibi

çözücülerde çözünmektedir. Elde edilen bileşik elementel analiz, ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR ve IR kullanılarak karakterize edildi.



Şekil 4. [Pd((CH₂OH)₂PCH₂)₂NCH₃]Cl₂ Kompleksinin Sentezi

Araştırma Bulguları

Sentezlenen bileşiklerin karakterizasyonu FT-IR ve ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR spektrumları alınarak incelenmiştir

FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Sentezlenen bileşiklerin FT-IR spektrumlarına bakıldığında 3300 cm⁻¹ frekansı civarında keskin amin piklerinin olmadığı görülmüştür. Spektrumlarda -OH ve -NH soğurma bölgeleri üst üste çıkışabilir. -NH soğurması orta şiddette bir veya iki keskin pik olarak görüldüğü halde -OH soğurması geniş bir soğurma bandı olarak görülür (Erdik, 1993) dhpam ve dhpabu ligandalarının sentezlerinin birinci aşaması olan 1 ve 4 no'lu bileşiklerin FT-IR spektrumlarında keskin primer amin piklerinin olmaması ayrıca yine bu bileşiklerde P-H için karakteristik olan 2200-2300 cm⁻¹ arasında çıkan gerilme pikinin olmaması Mannich reaksiyonun gerçekleştiğinin göstergesidir. dhpam ve dhpabu ligandalarının sentezlerinin ikinci aşamasındaki 2 ve 5 no'lu bileşiklerin FT-IR spektrumlarında P=O gerilme piklerinin yanında 2260 cm⁻¹ ve 2263 cm⁻¹ de P-H gerilme piklerinin olması LiAlH₄ ile yapılan indirgeme tepkimesinin gerçekleştiğinin göstergesidir. FT-IR spektrumları incelendiğinde sonuç olarak ligand ve metal komplekslerin spektrumlarının azda olsa farklı olduğu ve fonksiyonel gruplara ait piklerin elde edilen spektrumlar sonucunda ortaya çıktığı gözlenmiştir

^1H NMR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Sentezlenen ligand ve komplekslerde FT-NMR spektrumları DMSO-d⁶ + D₂O çözücüsü kullanarak 25°C de alınmıştır. Çizelge 4.2 de verilen proton sayıları hesaplanan integrasyon değerleriyle uyumludur. ^1H -NMR spektrumunda 1 ve 4 no'lu bileşik için (P-OCH₃) deki 12 protona ait çoklu pikler δ = 4.7 ppm de gözlenmektedir. dhpam ve dhpabu ligandlarında (O-CH₃) grubunun (-CH₂OH) grubuna dönüşmesiyle dhpam ve dhpabu bileşiğindeki fosfor üzerindeki ortaklanmamış elektronlar perdeleme etkisi yaparak bu değer 8 proton için δ = 4.7 ppm den daha düşük alana kaymış ve δ = 3.6 ppm de görünmüştür. Sentezlenen

bileşiklerde $\delta = 3.3-3.1$ ppm arasında 4 protona ait $-N\text{CH}_2\text{-P}$ singlet piki görünmektedir. dhpam ligandı ve sentezinin birinci basamağındaki 1 no'lu bileşikteki $\delta = 2.4$ ppm de 3 proton ait $(N\text{-CH}_3)$ singlet piki görünmektedir. dhpam ve dhpabu ligandında $\delta = 1.2$ ppm de 4 protona ait $(P\text{-CH}_2\text{OH})$ multiple pikler $-\text{PH}_2$ grubunun PCH_2OH dönüştüğünün göstergesidir. dpabu ligandı ve sentezinin birinci basamağındaki 4 no'lu bileşikteki $\delta = 2.4$ ppm de 2 protona ait $\delta = 2.4$ ppm $(N\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3)$ singlet pik ve $\delta = 1.1-1.4$ ppm arasında 7 protona ait $(N\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3)$ çoklu pikler görünmektedir.(Çizelge 1) Bu değerler literatür verileri ile uyumludur (Smitth 1996).

Çizelge 1. Sentezlenen Ligand ve Komplekslerin ^1H NMR Spektrum Değerleri

Bileşikler	^1H -NMR (δ ,ppm) d-DMSO + D ₂ O 25 °C,
1	δ 4.7(m, 12H, OCH ₃), δ 3.2(s,4H,PCH ₂ N), δ 2.4(s,3H,NCH ₃)
3	δ 3.6(m, 8H, -CH ₂ OH), δ 3.2(s,4H,PCH ₂ N), δ 2.4(s,3H,NCH ₃)
7	δ 3.7(m, 8H, PCH ₂ OH), δ 3.2(s,4H,PCH ₂ N), δ 2.4(s,3H,NCH ₃)

^{31}P NMR Spektrumlarının Değerlendirilmesi;

Aminometilfosfin içeren ligandların ^{31}P -NMR spektrumu incelendiğinde metale koordine olmamış liganddaki fosfor atomunun üzerindeki elektron çiftinin perdeleme etkisi yaparak ligandın kimyasal kayma değerini negatif alana kaydıracağı gözlenmiştir. dhpam ve dhpabu serbest fosfin ligandının ^{31}P -NMR sonucu beklenildiği gibi negatif bölgede, $\delta = -17.3$ ve -17.4 ppm'de, çıkmıştır.dhpam ligandının sentezinin birinci basamağında elde edilen $(\text{O}=\text{P}(\text{OCH}_3)_2)_2\text{NCH}_3(1)$ grubundaki fosfora ait pikler $\delta = 29.5$ ppm ve $\delta = 21.4$ ppm de görünmektedir (EK1.4). Sentezin ikinci basamağında $-\text{OCH}_3$ grubunun indirgenmesiyle oluşan $(\text{H}_2\text{PCH}_2\text{NCH}_3\text{CH}_2\text{PH}_2)(2)$ bileşiğin oksitine ait piklerde $(\text{O}=\text{PH}_2)$ $\delta = 4.3$ ppm ve $\delta = 11.2$ ppm de görünmektedir. Burada beklenildiği gibi fosfor oksit ($\text{P}=\text{O}$) üzerindeki elektro negatif O-CH_3 gruplarının indirgenip hidrojen gruplarına dönüşmesiyle fosfor üzerindeki perdeleme etkisi artarak kimyasal kayma değeri $\delta = 29.5$ ppm den daha yüksek alana kaymış ve $\delta = 4.3$ ppm de görünmüştür.

^{31}P -NMR verileri aminometilfosfinin metale fosfor üzerinden koordine olduğunu gösteren önemli bir kanıttır. Metal komplekslerinin ^{31}P -NMR spektrumları incelendiğinde bağlı olan her ikiliganda ait ^{31}P -NMR pikinin -17.3 ppm ve -17.4 ppm'de görüldüğü bu ligandların metal komplekslerinin ise ^{31}P -NMR piklerinin negatif bölgeden pozitif bölgeye kaydığı gözlenmiştir (EK.1.11-1.28) (Çizelge 4.3.). elektronegatif fosfor atomu, elektropozitif olan metal iyonuna koordine olup ortaklanmamış elektron çiftini metal iyonuna sunar, d-orbitallerindeki boşluğa metalden geri bağlanma etkisi ile metalin etrafındaki elektron yoğunluğu azalır ve kimyasal kayma değeri daha düşük alana kayar. ^{31}P -NMR spektrumları

incelendiğinde ligandın metale koordine olduğu ve literatürde belirlenen değerlerle uyum içinde oldukları görülmektedir.(Çizelge 2)

Çizelge 2 Sentezlenen Ligand ve Komplekslerin ³¹P NMR Spektrum Değerleri

Bileşikler	³¹ P{ ¹ H}-NMR (δ,ppm) (DMSO- d ⁶ ,D ₂ O 25 °C)	Δδ = δ _{kompleks} - δ _{ligand}
(1)	d=29,5	-----
(2)	d=4,3	-----
(3)	d=-17,3	-----
(7)	d= 37,1	Δd=54.4

Komplekslerin Biyolojik Aktiviteleri

Antibakteriyel Aktivite(Disk Difüzyon Testi);

Metal komplekslerinin antibakteriyel etkilerini araştırmak için (Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, MRSA, VRE) gibi patojenik bakteriler Çukurova üniversitesi Balcalı Araştırma Hastanesi Merkez Lab. dan tanımlanmış ve tedarik edilmiştir. , Bacillus subtilis B-354ve Lactobacillus sakei (ATCC 15521) suşu ise Su ürünleri fak. Lab. Koleksiyonundan tedarik edilmiştir. Bütün Bakteri türleri -80°C 20% glycerol Stoktan 37 °C -16 sa.Nutrient sıvısında canlandırılarak kullanılmıştır.

Metal kompleksleri sterilize saf suda derişim olarak hazırlanmıştır. 0.22 µm membran filtre ile sterilize edilerek sterilize edilmiş disklerle 20 µL sonuç derişimi (500-1000 mg/L) olacak şekilde emdirilmiştir. Patojenik bakteriler Nutrient sıvıda canlandıktan sonra 0.1 mL yaklaşık 15 mL Muller hinton agar (sterilize edilmiş ve su banyosunda yaklaşık 45°C -40°C e soğutulmuş) eklenerek dökme yöntemi ile petrilere yayılmış, donması beklenmiştir. Donmuş olan petrilere her bir komplekse ait diskler 3 tekerrürlü olarak yerleştirilmiş bir gece 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan zonlar kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür. Zon oluşturan komplekslerin ilgili bakteriye antibakteriyel etkisi var yorumu yapılmıştır

Çizelge 3. dhpam -Metal Komplekslerin Antimikrobiyal Aktiviteleri(mm)

Bakteri Türleri	10	9	8	7	TE	S	N
Staphylococcus aureus	13,05	8,3	11,5	8,5	10	19,5	10
VRE	18,5	12	9,5	18,5	NT	7	7
Enterococcus faecalis	15,2	NT	9,5	NT	NT	NT	NT
MRSA	15	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Pseudomonas putida	13,5	9,5	10,5	9,5	10	11	15,5
Escherichia coli	13,8	NT	NT	NT	NT	13,5	16
Klebsiella spp	13,1	10,3	10,3	9	NT	9	NT
Pseudomonas aeruginosa	16,5	10,5	11	7,5	12	NT	16
Lisrea monocytoges	15,1	NT	NT	NT	NT	16	NT
Salmonella paratyphi	13,5	9,5	9,5	18,5	NT	11	11
yersinia enterolitica	19,1	9	11	8	17	11	11,5
Campylobacter jejuni	14,7	8,5	9,8	17,8	11,5	NT	7
Bacillus subtilus	15,5	NT	10,5	7,9	11	15	15

Tartışma ve Sonuçlar

N,N-bis(dihidroksimetilfosfinometil)aminometil $[(CH_2OH)_2PCH_2)_2NCH_3]$ (dhpam) *N,N*-bis(dihidroksimetilfosfinometil)amino-bütül $[(CH_2OH)_2PCH_2)_2NBu]$ (dhpabu) ligandı ve bu ligandların Pt (II), Pd (II), Co(II), Au(I) metal kompleksleri sentezlenmiştir. Sentezlenen ligandlar ve kompleksler; FT-IR, 1H , ^{13}C , ^{31}P -NMR teknikleri ve elementel analiz cihazları kullanılarak karakterize edilmiştir. (3) ve (6) No'lu aminometilfosfin ligandlarının ^{31}P -NMR spektrumlarında incelendiğinde $\delta = -17.3$ ve $\delta = -17.4$ ppm'de çıkmıştır. Metal komplekslerinde ise bu değerlerin pozitif bölgeye kaydıkları ve literatürlerle uyum içinde oldukları belirlenmiştir.

dhpam ve dhpabu ligandalarının sentezlerinin birinci aşaması olan 1 ve 4 no'lu bileşiklerin FT-IR spektrumlarında keskin primer amin piklerinin olmaması ayrıca yine bu bileşiklerde P -H için karakteristik olan $2200-2300\text{ cm}^{-1}$ arasında çıkan gerilme pikinin olmaması mannich reaksiyonun gerçekleştiğinin göstergesidir.

Sentezlenen ligand ve komplekslerin 1H NMR spektrumlarındaki kimyasal kayma değerleri ve verilen proton sayıları ile hesaplanan integrasyon değerlerinin uyumlu olması beklenen ligand ve komplekslerin sentezlendiğini göstermiştir.

Aminometil fosfin ligandının oluşumu sırasında ikinci ve üçüncü sentez aşamasında spesifik fosfin kokusu ve komplekslerin sentezi sırasındaki ani renk

değişimleri gibi fiziksel değişimler de literatürler incelendiğinde komplekslerin ve liganların sentezlendiğini göstermiştir

Bu komplekslerin bazı bakteri türleri üzerinde (500-1000 mg/L) derişimde disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel özellikleri incelenmiş dhpam liganının Au(I) (4) kompleksinin bütün bakteri türleri üzerinde diğer metal komplekslerinin de incelenen çoğu bakteri türü üzerinde etkinlik gösterdiği görülmüştür.

Bu tezde sentezlenen kompleksler *in vivo* olarak, yani canlı ortamında antimikrobiyal veya antitümoral aktivitelerinin incelenmesi gibi uygulamaya yönelik olan ve araştırılan konulardır. Bunun yanı sıra bu kompleksler suda çözünür özellik göstermesine bağlı olarak organik reaksiyonlarda iki fazlı sistemlerde katalitik uygulamaları araştırılabilecek komplekslerdir.

Metal komplekslerinin daha düşük derişimlerde de antibakteriyel aktivite göstereceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- ELLIS, J. W.; HARRISON, K. N.; HOYE, P. A. T.; ORPEN, A. G.; PINGLE, P. G.; SMITH, M. B. Water-Soluble Tris- (hydroxymethyl)phosphine Complexes with Nickel, Palladium, and Platinum. Crystal Structure of [Pd-(P(CH₂OH)₃)₄]. CH₃OH. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*,3026-3033
- ERDİK E., 1998. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Gazi Kitabevi, 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, 82-385
- HIGHAM, L., POWELL, A. K., WHITTLESEY, M. K., WOCADLO, S., WOOD, P. T. Formation and X-ray Structure of a Novel Water-Soluble Tertiary-Secondary Phosphine Complex of Ruthenium (II): [Ru-P(CH₂OH)₃)₂□P(CH₂OH)2H)₂Cl₂]. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1998, 1107-1108.
- HIGLEY, B.; SMITH, F. W., SMITH, T., GEMMELL, H. G.; GUPTA, P. D.,GVOZDANOVIC, D. V.; GRAHAM, D.; HINGE, D.; DAVIDSON, J.; LAHIRI, A. J. *Nucl. Med.* 1993, *34*, 30.
- KALCK, P.; MONTEIL, F. *Adv. Organomet. Chem.* 1994, *34*, 219
- KATTESH V., KATTI, HARIPRASAD GALI, CHARLES J. SMITH, VE DOUGLAS E. BERNING," Design and Development of Functionalized Water-SolublePhosphines: Catalytic and Biomedical Implications *Acc. Chem. Res.* 1999, *32*, 9-17
- KOMIYA, S.; AWATA, H.; ISHIMATSU, S.; FUKUOKA, A.Synthesis of Water-Soluble (Tri(hydroxymethyl)-phosphine)gold(I) Complexes Containing a Nucleoside Ligand. *Inorg. Chim. Acta* 1994, *217*, 201-202.
- LEWIS, J. S., DEARLING, J. L. J., SOSABOWSKI, J. K., ZWEIT, J., CARNOCHAN,P.; KELLAND, L. R.; COLEY, H. M.; BLOWER, P. J. Copper bis(diphosphine) complexes: radiopharmaceuticals for the detection of multi-drug resistance in tumours by PET. *Eur. J. Nucl. Med.* 2000, *27*,638–646.

Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Yıl 2015 Cilt: 33-4

SMITH C. J., LI N., KATTI K. V., HIGGINBOTHAM C. AND VOLKERT W. A. In vitro and in vivo characterization of novel water-soluble Dithio bisphosphine ^{99m}Tc complexes. J. Nuc. Biol. Med. 24, 685–691. (1997)

TEKSTİL SANAYİ İÇİN EKONOMİK VE ÇEVRECİ YIKAMA MADDESİ ÜRETİMİ*

Economical and Enviromental Washing off Agent Production for Textile Industry

Zeynep Nihan KIR
Kimya Anabilim Dalı

Osman SERİNDAĞ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada yağ asidi alkil hidroksietil imidazolin, yağ asidi alkil aminoetil imidazolin ve yağ asidi alkil amido etil imidazolin yapıları sentezlenmiştir. Sonrasında bu yapıların oleik-DETA diamid monopropionat amfoter formlarının sentezi yapılmıştır. Oluşturulan kimyasal türevlerin yıkama özellikleri ve boyarmadde hidrolizati ile olan reaksiyonları incelenerek; ürünlerin enerji ve su tüketimini azaltma eğilimleri geliştirilerek banyo yıkama suları ve atık su miktarlarını azaltması incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kromofor grup, Haslık değerleri, Hidroliz, Yıkama Maddeleri, Reaktif Boya

ABSTRACT

In this study, fatty acid alkyl hydroxyl imidazoline, fatty acid alkylaminoethyl imidazoline, fatty acid alkyl amidoethyl imidazoline derivatives have been synthesized and then these intermediates have been derived to amphoteric oleic –DETA diamide monopropionate .The products that are synthesized have been analyzed in the sense of their reactions with the dyestuff hydrolyzate and their soaping effects to improve saving their energy and water consumption during the washing process.

Keywords: Chromophore group, Fastness Values, Hydrolysis, Washingoff agents, Reactive Dye

Giriş

Reaktif boyalarının başlangıç tarihi 1950 yıllar olmasına karşın, geniş şekilde tüketimi 1970 'lerden sonra başlamıştır. Reaktif boyalar, difüzyon sistemine göre çalışan direkt boyaların aksine, selülozla kovalent bağ oluşturarak yıkama haslığı yüksek boyama sağlar. Işık ve yıkama haslıkları bakımından küp boyar maddelerden daha düşük, direkt boyalardan daha üstündür. Küp boyar maddelerin renk gamı dar ve tonları mat, boyaması zor ve fiyatları yüksek olduğundan, reaktif boyar maddelerin tüketimi devamlı artmaktadır.

Bir bileşiğin üzerine düşen ışınların absorbe edilmesi ; enerjisinin bileşiğin moleküllerindeki elektronların aktifleşmesi için gerekli enerjiye tekabül etmesi ile mümkündür. Yani elektronlar, aktifleşmeleri için gerekli enerjiye tekabül eden ışınları (renği) absorbe ederler geri kalanını yansıtırlar.Çift bağlardaki π elektronlarının kolaylıkla aktifleşebilmeleri nedeniyle, görülen spektrum bölgesinde

* Doktora Tezi-Phd. Thesis

(400-700) bir absorpsiyon için bileşikte çift bağların bulunmasını arttır. Bugün kullanılan sentetik boyarmaddelerin çoğunda çift bağ içeren molekül olarak; benzen, naftalin, antrasen gibi aromatik çekirdekler kullanılmaktadır. İnsan gözünün bunların rengini fark edebilmesi "kromofor (renk meydana getirici)" denilen ve aromatik çekirdeklerin mor ötesi ışınlar bölgesinde olan absorpsiyonu görünür spektrum bölgesine kaydıran belirli grupların moleküle bağlanması ile mümkündür. Kromofor, organik bir molekül içinde renkli görünümü sağlayan atom, atom grubu veya elektronlardır.

Selülozun bazik ortamda reaksiyona girme isteği daha fazladır. Baz, reaktif grup olarak, klor türevli heterosiklik halkalar içeren boyarmaddelerin liflerle reaksiyon sırasında, açığa çıkan HCl nötürleştirmek için kullanılır. Reaktif boyar maddelerin selülozun hidroksil grupları ile kovalent bağ oluşturması sırasında, vinil grubu dolayısı ile ortamda HCl oluşur. Bu da elyafa zarar verdiğinden, ortam bazik olarak hazırlanır. Yani baz, HCl'i nötralize ederek ortamdaki uzaklaştırmanın yanı sıra, kimyasal denge açısından reaksiyon hızını arttırarak dengeyi boyar madde elyaf bağlantısı yönüne çevirir.

Selüloz elyafı su içine girdiği zaman yüzeyi negatif yüklerle kaplanır. Reaktif boya da, suda eritildiği zaman anyonik yüklüdür. İki negatif yüklü madde birbirini iteceğinden, boyar madde pamuğa yaklaşamaz. Bu nedenle ortama tuz verilir. Tuzun artı yüklü sodyum iyonları, selülozun eksi yüklü hidroksil iyonlarını çevreler ve yüzeyin pozitif yüklü olmasını sağlar. Bu durumda, boyar madde elyafa doğru hareket eder. Bu ilginin hızını kontrol edebilmek için, tuz eklemesi yavaş yavaş ve her boyamada aynı porsiyonlarda yapılır. Sodyum sülfat sodyum klorüre göre sodyum iyonu itibarı ile yarı yarıya zayıftır. Bu nedenle kumaşın yüzeyi daha zayıf pozitif yüklerle kaplanır, dolayısı ile boya daha yavaş bir hızla elyafa doğru hareket eder ve daha düzgün bir boyama olur. Bu nedenle açık renk boyamalarda, sodyum sülfat tercih edilir. Ayrıca Blue R ve Turku Blue HF-G gibi büyük moleküllü boyalarda sülfat eklemesi yapılır.

Kumaşın banyo hacmine oranının (Flote) değişmesi durumunda, tuz miktarının değiştirilmesi gerekir. Düşük flote oranında, boya elyafa daha yakın olduğundan tuz gramaj miktarında düşürülmemesi durumunda boya tanecikleri elyafa daha fazla itilir. Selüloz yüzeyine yaklaşan tüm boya tanecikleri elyafa kimyasal reaksiyona girmez, aksine fiziksel bir bağla tutunur. Bu fiziksel bağ, yıkama ile tamamen sökülüp alınmadığından, boyamanın sürtme ve yıkama haslıkları düşük çıkar.

Reaktif boyar maddeler; herhangi bir kromofor grubun bağlı olduğu reaktif grup üzerinden liflere kovalent bağlarla bağlanabilen boyar maddelerdir. Bu reaksiyon için ortam pH değeri, yaklaşık 11 olmalıdır. Boyama işleminde kullanılan tuz, boyar maddeyi pamuk lifine çekmek için gereklidir. Boyama sonrası, iyi yapılan yıkama işlemleri ile boyanmış kumaşta, uygun yaş haslık özellikleri elde edilmektedir. Burada, yıkama adımı önemlidir. Çünkü life ilgisi olmayan ve alkali ortamda su ile reaksiyona giren ve uzaklaştırılması gereken reaktif boya miktarı %10-40 kadardır. Hidroliz olmuş boyar madde kumaş üzerine alınır, fakat fikse olmaz. Hidroliz olmuş ve fikse olmamış boyar maddeyi kumaş üzerinden

uzaklaştırarak iyi haslık değerleri elde etmek için; zaman, enerji ve işçilik kaybına neden olan, yüksek maliyetli yıkama işlemleri gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı, banyo sularını azaltarak su sarfiyatını en aza indirmek, enerji kullanımını azaltmak ve atık sudaki boyarmadde miktarını düşürmek amacıyla, yeni teknoloji yıkama maddelerinin kullanımlarının yaygınlaşacağı ve ticari önemlerinin giderek artacağı düşünülmektedir.

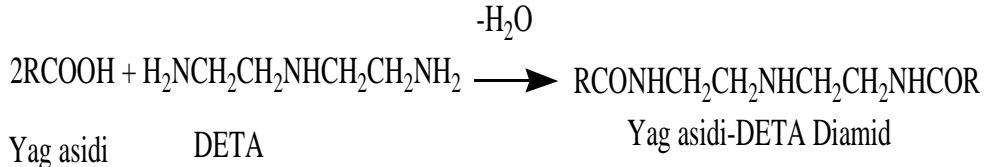
Farklı karbon zincir uzunluklarında olan yağ asitleri ve türevlerinin farklı aminlerle reaksiyonlarının sonucu öncelikle; yağ asidi alkil hidroksietil imidazolin, yağ asidi alkil aminoetil imidazolin ve yağ asidi alkil amido etil imidazolin yapıları sentezlenecektir. Sonrasında da bu yapıların dioleil-imidazolinamid propionat, oleik-DETA diamid monopropionat (Perella ve arkadaşları, 1999) ve diğer amfoter formlarının sentezi yapılacaktır

Materyal ve Metod

Bu çalışmada tekstil sektöründe reaktif boyama yapan boyahanelere yıkama banyolarında, yıkama maddesi olarak kullanılabilen, Oleik-DETA diamid monopropionat geliştirilmiştir. Amin olarak dietilentriamin (DETA) kullanılmıştır. Türevlendirme için akrilik asit kullanılarak amfoter hale dönüştürülmüştür .

Yağ asidi –DETA Diamid Monopropionat Eldesi Sentezi 1

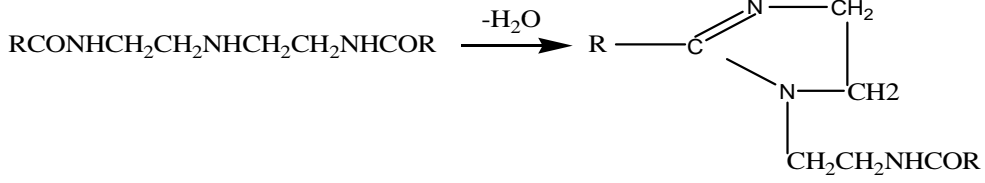
İlk adımda yağ asidi ile dietilentriamin (DETA) oleik asit amid formuna dönüştürülmüştür. Oleik asit -DETA diamid propionat eldesi için 3 boyunlu balon, manyetik karıştırıcı, termometre ve geri soğutucu kullanılmıştır. 3 boyunlu balona 76,31 g oleik asit sıcaklık 50°C'ye geldiğinde yavaş yavaş 13,94 g DETA verilir. Sıcaklık 160°C'ye ayarlanır. Bu sıcaklıkta vakum altında reaksiyona devam edilir. Reaksiyon takibi asit indisi ve FT-IR kontrolünde yapılır.



Şekil 1. Yağ asidi-deta diamid Eldesi

Yağ asidi –DETA Diamid Monopropionat Eldesi Sentezi 2

Amidoamin reaksiyonu sonrası halkalı yapıda imidazolin eldesi ve sonrasında imidazolin çevrimi için reaksiyon takibi Fourier Tranfer İnfrared Spektrofotometre (FT-IR) ile yapılmıştır. Reaksiyondaki ilerleme takibi belli aralıklarla alınan yüksek sıcaklıktaki numunelerin FT-IR'da 1560 cm⁻¹ ve 1638 cm⁻¹'de gözlenen amidoamin pikinin kaybolarak, 1600 cm⁻¹'de imidazolin pikinin oluşması ile sonlandırılmıştır. Ayrıca bu aşamada asit indisi 10 dan küçük oluncaya kadar reaksiyona devam edilmiştir.

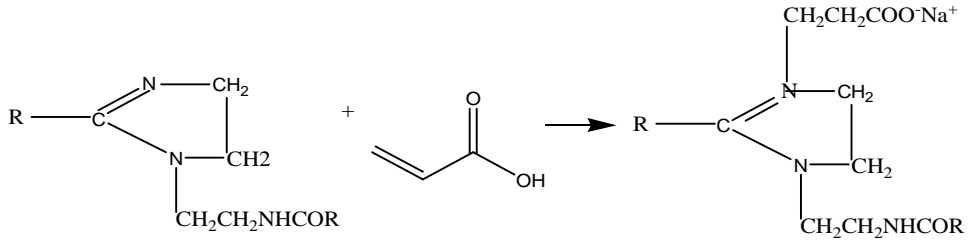


Yağ asidi-DETA Diamid
Şekil 2. Alkil Amidoetil İmidazolin

Alkil amidoetil imidazolin

Yağ asidi –DETA Diamid Monopropionat Eldesi Sentezi 3

Oleik alkil amidoetil imidazolin eldesi sonrası, sıcaklık 95 °C -105 °C'ye düşürülür ve 9,76 g akrilik asit balona yavaş yavaş ilave edilir. Reaksiyon takibi asit indisi testi ve % anyonik madde tayini ile takip edilir.



Alkil amidoetil imidazolin Akrilik asit
Şekil 3. Yağ Asidi-Deta Diamid Monopropionat

Yağ asidi-DETA
Diamid monopropionat

Kullanım Özelliklerinin İncelenmesi

Reaksiyonlar sonucu elde edilen imidazolin ve türevlerinin performansını değerlendirmek ve yıkama özelliklerini belirlemek için farklı boya grupları ile reaktif boyama işlemi yapılmıştır. Boyama işlemlerinde yıkama etkisinin net görülmesi için koyu renk boyamalar tercih edilmiştir. Yapılan denemelerde vinil sulfon ve bifonksiyonel boya gruplu reaktif boyalar kullanılmıştır. Boyama işleminde %100 pamuklu örgü kumaş kullanılmıştır. Boya yüzdesine göre uygun soda ve sodyum sülfat kullanılmıştır. Boyama işlemi termal boyama makinesinde yapılmıştır. Boyama sonrası fular makinesinden sıkılan kumaşlar, mini ramda kurutulup yıkama işlemine geçilmiştir.

Reaktif boyama sonrası kumaşlar mevcut reaktif yıkama prosesine göre yapılmıştır. Bu işlemde yıkama maddesi olarak Poliakrilat bazlı yıkama maddesi kullanılmıştır. Çevreci proses olarak belirlenen proseste sentezlediğimiz Oleik – DETA Diamid monopropionat kullanılmıştır. Mevcut işletmelerde yaygın olarak kullanılan reaktif boyama prosesi, boyama %'sine bağlı olarak değişmekte olup

genelde 7 adımdan oluşmaktadır. Oleik-DETA Diamid Monopropionat ile tasarladığımız çevreci proses ile reaktif yıkama işlemi 4 adımda yapılarak tüm haslık testleri uygulanmıştır.

Araştırma Bulguları

Sentezlenen bileşiklerin karakterizasyonu FT-IR spektrumu alınarak incelenmiştir.

FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Sentezlenen Yağ asidi-Deta Diamid Monopropionatın FT-IR spektrumu incelendiğinde imidazoline ait pikler görülmüştür. FT-IR'da 1560 cm^{-1} ve 1638 cm^{-1} 'de gözlenen amidoamin pikinin kaybolarak, 1600 cm^{-1} 'de güçlü imidazolin pikinin oluşması ile sonlandırılmıştır.

Haslık Özelliklerinin İncelenmesi

Farklı boya grupları ile yapılan rektif boyama sonrası 7 adımdan oluşan normal işletme prosesi poliakrilat bazlı yıkama maddesi ile yapılmıştır. Sentezi yapılan Yağ Asidi-Deta Diamid Monopropionat ile de 4 adımdan oluşan çevreci yıkama prosesi uygulanarak yıkama yapılmıştır. Sonrasında yıkama , su ,sürtme ve ışık haslıkları incelenmiştir.

Çizelge 1. Yıkama ve su haslık değerleri

	YIKAMA HASLIĞI(M&S C4A)							SU HASLIĞI(C6)						
	Y	AK	PES	NY	PM	AS	Renk	Y	AK	PES	NY	PM	AS	Renk
İŞLEM GÖRMEMİŞ	3+	4	4	2	3	3+	4/5	3	4	4	2	3	3+	4/5
NORMAL İŞLETME PROSESİ	4	4/5	4/5	4-	4-	4	4/5	3/4	4+	4/5	4	3/4	4	4/5
ÇEVRECİ PROSES	4	4/5	4/5	4+	4+	4+	4/5	4	4/5	4/5	4+	4	4	4/5

Çizelge 2. Sürtme ve ışık haslık değerleri

	SÜRTME HASLIĞI C8		IŞIK HASLIĞI ISO 105 B02
	KURU	YAŞ	
İŞLEM GÖRMEMİŞ	3/4	2/3	3/4
NORMAL İŞLETME PROSESİ	4	3	4
ÇEVRECİ PROSES	4/5	3/4	4/5

Kimyasal Oksijen İhtiyacının Değerlendirilmesi

Normal yıkama maddesi olarak poliakrilat bazlı yıkama maddesi , 7 adımdan oluşan normal işletme prosesinde uygulanmıştır. Yağ Asidi-Deta Diamid Monopropionat yıkama maddesi olarak kullanımında 4 adımdan oluşan çevreci

yıkama prosesi uygulanmıştır.Sonrasında her yıkama adımı sonrası KOİ test edilmiştir. KOİ sonuçları paralellik göstermiştir.

Tartışma ve Sonuçlar

Oleik asit-DETA Diamid Monopropionat eldesi çalışmalarda başarı ile tamamlanmıştır. 3 adımdan oluşan reaksiyon sırasında asit indisi, Infared ile reaksiyon adımlarının takibi yapılmış ve reaksiyon süreleri standardize edilmiştir. Son adımda elde edilen alkil amidoetil imidazolin akrilik asit ile amfoter yapıya dönüştürülmüştür. Amfoter yapıya çevrim asit indisi ve zeta kontrolü ile yapılmıştır. Reaksiyon % 95 verimle elde edilmiştir.

Sentez sonrası ürünün reaktif yıkama sabun maddesi olarak uygulamadaki tüm özellikleri irdelenmiştir. Yıkama özellikleri ve boyarmadde hidrolizatı ile olan etkileşimler, yıkama işlemi sırasında banyo sularının incelenerek normal işletme prosesine göre Oleik Asit-DETA Diamid Monopropionat kullanımı ile çevreci prosesine sağlayacağı avantajlar irdelenmiştir. Yıkama banyo sularının KOİ Değerleri ve yıkama sonrası yıkama, su, sürtme ve ışık haslıkları da gözden geçirilmiştir.Farklı boya kombinasyonları uygulanarak yapılan toplam 6 reaktif boyama reçetesi uygulanarak yapılan boyama işlemi sonrası, boyalı kumaşlara poliakrilat bazlı yıkama maddesi uygulanarak normal işletme prosesine göre ve Oleik asit-DETA Diamid Monopropionat ile çevreci yıkama prosesine göre yıkama yapılmıştır . Poliakrilat bazlı yıkama maddesi ile 7. yıkama işleminde elde edilen uygun yıkama banyosu, çevreci yıkama maddesi ile 4. yıkama adımında elde edilmiştir. Böylece normal işletme prosesine göre toplamda 3 banyo kısaltılmıştır. Bu da su, enerji, buhar ve zaman tasarrufu sağlamıştır.

Kaynaklar

- AKÇAKOCA, E.P., OZGUNEY, A.T., ATAV, R., 2007. The efficiency of washing agents in the post-dyeing removal of hydrolyzed reactive dye. *Dyes and Pigments* 72:23-27.
- FEKETE, L., 2008. Reactive Dyes, a Process for Their Preparation and Their use. *Espacenet*, 1902100 A2.
- PERELLA, J., KOMOR, J.A., KATSTRA, R.D., 1999. Amphoteric derivatives of aliphatic polyamines with yağ asidi acids, esters or triglycerides, which are useful for various consumer products and industrial applications. *United States Patent* 6,004,914.
- PUJOL, E., PUJADAS, F., PRAT, A., OKABE, K., 1995. Detergent composition comprising a mono, di and tri ester mixture and method of manufacturing same. *United States Patent* 5,403,509.
- SHORE, J., 1995. *Cellulosics Dyeing*. Society of Dyers and Colourists, 408s.
- YAKARTEPE, M., YAKARTEPE, Z., 1995. *Tekstil Terbiye Teknolojisi* cilt:4. T.K.AM.basımevi, İstanbul, s.941-128

SELÜLAZ ENZİMİNİN RELİZİME VE SEPABEADS DESTEKLER ÜZERİNE İMMOBİLİZASYON VE KARAKTERİZASYONU*

Immobilization And Characterization of Cellulase on Sepabeads And Relizyme

Mustafa Serkan YALÇIN
Kimya Anabilim Dalı

Ramazan BİLGİN
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, *Trichoderma reesei* selülazının Resindion Sepabeads ve ReliZyme destekleri üzerine kovalent immobilizasyonu araştırılmıştır. Enzimin bu desteklere immobilizasyonunun optimal şartları yanıt yüzey metodu kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize selülazın optimum çalışma koşulları ve kinetik parametreleride belirlenmiştir. Immobilizasyon çalışmalarında 3 faktör ve 3 seviyeli Box-Behnken deneysel dizaynı uygulanmıştır. Secilen faktörler immobilizasyon pH'sı, immobilizasyon zamanı ve başlangıç enzim derişimidir. Immobilize selülazlar için de yanıt olarakta spesifik aktivite seçilmiştir. Selülazın sepabeads desteğe en uygun immobilizasyon koşullarının 25 °C'de pH 6,5 , 6 saat immobilizasyon zamanında ve enzim derişiminin 1,8 mg/ml, relizyme desteğe en uygun immobilizasyon koşullarının 25 °C'de pH 6,5, 2 saat immobilizasyon zamanında ve enzim derişiminin 1,8 mg/ml olduğu belirlenmiştir.

Optimal pH, tampon konsatrasyonu ve sıcaklık serbest enzim için 4,0, 100 mM ve 45 °C olarak, sepabeads desteğe immobilize selülaz için pH 4,0 50 Mm, 50 °C olarak, relizyme desteğe immobilize selülaz için pH 3,5 25 Mm, 60 °C olarak belirlenmiştir. Serbest, sepabeads ve relizyme desteğe immobilize selülazların Vmax ve Km değerleri sırasıyla 1,05 U/mg prot ve % 0,47, 1,1 U/mg prot ve % 1,5, 3,78U/mg prot ve % 0,27 dir. 70 °C'deki yarı ömürleride sırasıyla 8,19-7,8-17,8 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Selülaz, Immobilizasyon, Sepabeads, Relizyme, RSM.

ABSTRACT

In this study, the covalent immobilizations of cellulase from *Trichoderma reesei* onto Sepabeads and ReliZyme commercial supports were studied. The optimal immobilization conditions of the cellulase onto the mentioned supports were investigated using response surface methodology. The optimal working conditions and kinetic parameters of free and immobilized cellulase preparations were also determined.

A 3-factor and 3-level Box-Behnken design was applied for the immobilization studies. The selected factors were the immobilization pH , immobilization time and initial enzyme concentration. The response was specific activity of each immobilized cellulase preparation. The optimal immobilization pH, immobilization time and cellulase concentration onto Sepabeads were determined

* Doktora Tezi-PhD. Thesis

as 6.5, 6 h and 1.8 mg/mL, respectively. The corresponding immobilization values onto ReliZyme were 6.5, 2 h and 1.8 mg/mL.

The optimal pH, buffer concentration and temperature were determined as 4.0, 100 mM and 45 °C, respectively for the free cellulase; 4.0, 50 mM and 50 °C, respectively for the cellulase immobilized onto Sepabeads and 3.5, 25 mM and 60 °C, respectively for the cellulase immobilized onto ReliZyme. K_m , V_{max} values were estimated as 0.47% \pm 1.05 U/mg prot. for the free cellulase, 1.5% \pm 1.1 U/mg prot. for the cellulase immobilized onto Sepabeads and 0.27% \pm 3.78U/mg prot. for the cellulase immobilized onto ReliZyme.

Key Words : Cellulase, Immobilization, Sepabeads, Relizyme, RSM.

Giriş

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki en basitinden en kompleksine kadar birçok kimyasal reaksiyonu, canlılığa ve çevreye zarar vermeyecek ılımlı koşullar altında katalizleme yeteneğine sahip çoğu protein yapısında olan spesifik biyokatalizörlerdir. Yeterli in vitro koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, substratlarına karşı yüksek seçicilik göstermeleri, ılımlı reaksiyon koşullarında yüksek aktivite gösterebilmeleri ve yüksek geri dönüşüm sayılarına sahip olmaları nedeniyle enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Buna rağmen enzimler temel kimya, gıda kimyası, analiz, tedavi amaçlı gibi biyolojik olmayan uygulamalarda kullanılırken şartlar uygun değilse düşük aktivite göstermeleri, stabil olmamaları, sentetik substratlarına karşı zayıf seçiciliğe sahip olmaları gibi sınırlayıcı faktörlere sahiptir. Bu nedenle endüstriyel amaçlı kimyasal proseslerin, enzimler tarafından kataliz edilmesi amacıyla laboratuvarından endüstriye olan dönüşüm biyoteknolojinin en kompleks ve bir o kadar da heyecan verici yönüdür. Bu hedefe ulaşmak amacıyla da enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilmesi çalışmaları hızlanmıştır (Guisan, 2006).

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar. Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımı ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör kullanılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest

enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle endüstriyel uygulamalar için enzimlerin basit ve uygun maliyetli protokoller ile uzun süreli ve tekrar tekrar kullanılabilirliği amacıyla immobilize etme gerekliliği doğmaktadır (Katchalski-Katzir, 1993; Bickerstaff, 1995). Bu nedenlerle bilimsel literatüre girmiş çok sayıda enzim immobilize etme tekniği bulunmaktadır. Fakat kullanılacak enzimin seçiciliğinin, aktivitesinin ve stabilitesinin en yüksek olacağı şartları sağlayan yöntemlerin seçilmesi en uygundur. Enzim immobilizasyonu, enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanması işlemidir (Klibanov, 1983). Immobilize enzimin serbest enzime göre bazı üstünlükleri aşağıda sıralanmıştır.

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

Enzim immobilizasyonu yöntemleri için çok farklı sınıflandırmalar olmakla beraber şu şekilde bir sınıflandırma yapmak mümkündür.

- Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; kovalent bağlama, adsorpsiyon, iyonik bağlama, affinite, metal bağlama ve olmak üzere beş gruba ayrılır (Woodward, 1985; Solas ve ark., 1994; Cao, 2005).
- Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük moleküllü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006).
- Tutuklama yönteminde enzim moleküllerinin, substrat ve reaksiyon ürünlerinin geçişine izin veren ancak enzim moleküllerinin dışarıya çıkmasını önleyen bir matriks içerisinde tutuklanması esasına dayanmaktadır (Şekil 1.9) (O'Driscoll, 1976).

Selülozlar, selülozu glikoza parçalayabilme kapasitesindeki hidrolitik enzim grubudurlar. Memeliler hariç mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen selüloz sistemi birden fazla farklı enzimden oluşur (Emert ve ark., 1974; Whitaker, 1971). Dünya üzerinde en bol bulunan doğal organik kaynak olan selüloz bitkisel kaynaklı olup, glukoz rezidülerinin β -1,4-glikozidik bağlar ile lineer bir

şekilde bağlanması ile oluşan bir polisakkarittir. Selüloz enzim sistemi bileşenleri, başlangıçta katalitik etki şekillerine göre sınıflandırılırken, günümüzde sınıflandırma yapısal özellikler dikkate alınarak yapılmaktadır. Üç ana enzimatik aktivite tipi söz konusudur. Bunlar:

a) Endoglukanazlar (endo-1,4-β-glucanases, ya da 1,4-β-D-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.4).

b) Ekzoglukanazlar (Sellodekstrinazlar, 1,4-β-D-glucan glucanohydrolases) (EC 3.2.1.74) ve Sellobiyohidrolazlar (exo-1,4-β-glucanases, ya da 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolases, EC 3.2.1.91).

c) Sellobiyazlar (β-glucosidases, ya da β-D-glucoside glucohydrolases, EC 3.2.1.21).

Selülozu hidrolize eden selüloz enzimleri büyük ölçüde fungus ve bakterilerden elde edilmekte ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Selüloolitik enzimler, alkol üretiminde sıvı kazancını arttırmak ve iyi bir renk elde etmek için kullanılmaktadır. Selülozın diğer kullanım alanları, selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini arttırmak, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik olarak daha basit bileşenlere parçalanmasını sağlamaktadır (Niehaus ve ark., 1999). Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde atık materyallerinin geriye dönüşümünü arttırmada kağıtlarla muamele edilen farklı selüloz sistemleri kullanılmaktadır (Yu, 1996).

Yanıt yüzey yöntemi (RSM) sahip olduğu avantajlardan dolayı günümüzde uygulamalı bilim ve mühendislik dallarında kullanılan matematiksel ve istatistiksel bir yöntemdir (Box ve Wilson, 1951). Yanıt yüzey oluşturmadaki amaç deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkili olan çok sayıdaki parametreden oluşan bir tasarım düzleminde belirli özellikleri sağlayan bir bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmektir.

Amino ve epoksid fonksiyonel gruplar bağlı destekler, proteinlerin ve enzimlerin immobilizasyonu amacı ile hem laboratuvar hem de sanayi alanlarında kullanılan oldukça ideal matrislerdir. Bu destekler hem depolama hem de nötral sıvı ortamlarda bekletilme esnasında oldukça stabildirler. Bundan dolayı immobilizasyon amaçlı kullanımları oldukça caziptir.

Bu çalışmanın amacı; bir çok kullanım alanına sahip selülozların ticari olarak satılan ve son yıllarda enzim immobilizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Sepabeads ve ilk kez olarak ReliZyme destekler üzerine immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi ve en uygun immobilizasyon koşullarının yanıt yüzey metodunu (RSM) kullanılarak belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Materyal

Trichoderma reesei selüloz, immobilizasyon desteği olarak Resindion Sepabeads EC-EP/M (partikül büyüklüğü 200-500 µm) ve Resindion ReliZyme HA403/M (partikül büyüklüğü 200-500 µm) destekleri. Design Expert 8.0.6 bilgisayar programı, UV-Vis spektrofotometre.

Metot

Serbest ve immobilize enzimin protein içeriklerini tespit etmek amacıyla protein tayini yapılmıştır. Protein tayini için Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

ReliZyme desteğinin fonksiyonel grubu amino grubu olduğundan enzim immobilizasyonundan önce glutaraldehitte aktifleştirme işlemi yapılmıştır. Glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Sepabeads desteğinin fonksiyonel grubu epoksid grubu olduğundan enzim immobilizasyonundan önce herhangi bir aktifleştirme işlemine gerek duyulmamıştır. Selülazın ReliZyme ve Sepabeads destekler üzerine kovalent immobilizasyonunda Alptekin ve ark. (2010) önerdiği yöntem kullanılmıştır.

Selülazın aktivite tayini için, selülozun hidrolizi sonucu açığa çıkan β-D gluloz miktarı dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi ile belirlenmiştir. DNSA yöntemi ilk kez Sumner ve ark. (1921) tarafından uygulanmıştır. Bu amaçla standart glukoz eğrisi çizilmiştir.

Selülazın immobilizasyon koşullarının optimizasyonu amacıyla Response Surface Metodology (RSM) yani yanıt yüzey modelinin oluşturulması için bir istatistiksel bilgisayar programı olan Design Expert 8.0.6 kullanılmıştır. Bu yöntemden yararlanmak için öncelikle enzimi immobilize ettiğimiz her destek için 3 farklı bağımsız değişken bir de sabit bağımsız değişken belirlenmiştir. Bu bağımsız değişkenler pH, süre ve enzim derişimi parametreleridir ve sıcaklık parametresi de sabit bağımsız değişken olarak belirlenmiştir. Belirlediğimiz bu parametreler belli aralıklar içinde programa uygulanmış ve Box-Benkem deneysel dizaynı seçilmiştir. Design Expert bilgisayar programı kullanılarak oluşturulan Box-Behnken dizaynının matematiksel ifadesi Eşitlik 3.1'de verilmiştir.

$$y = b_{k0} + \sum_{i=1}^k b_{ki} c_i + \sum_{i=1}^k b_{kii} c_i^2 + \sum_{i < j=2}^k b_{kij} c_i c_j \quad \text{Eşitlik.1}$$

Bu eşitlikte y spesifik aktivite verimi, Xi, Xj, Xij,, sırasıyla pH, zaman, enzim derişimi dir. βko, βki, βkii ise programdan bulunan katsayıları göstermektedir.

Araştırma Bulguları

Selülazın sepabeads desteğe immobilizasyonu için optimizasyon şartlarının RSM metodu kullanarak belirlenmesi amacıyla Design Expert programına önceden belirlediğimiz farklı bağımsız değişken parametrelerimiz olan pH (5-8), immobilizasyon zamanı (6-24 saat), enzim derişimi (0,2-1,8 mg/ml) ve sabit bağımsız değişken olan sıcaklık (25 °C) şeklinde uygulanmıştır. Değişkenlerin programa uygulanmasının sonrasında Box-Benkem deneysel dizaynı seçildiğinde Çizelge 1'de gösterilen deney setlerine ulaşılmıştır. Bu 15 deney setinde verilen şartlarda ayrı ayrı immobilizasyonlar yapılmış ve spesifik aktivite sonuçları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Elde edilen spesifik aktivite değerleri Design Expert bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiş Eşitlik 1'de verilen

β_{ko} , β_{ki} , β_{kii} katsayıları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır. Bu eşitlik kullanılarak elde edilen tahmini değerlerde Çizelge 1'de görülmektedir.
 $Y=18-3,075.A+2,25.B+11,025.C+3,15.AB+1,2.AC-14,55.BC-5,25.A^2$
 $+8,1.B^2+14,85.C^2$

Çizelge 1. Selülazın sepabeads desteğe immobilizasyonda RSM kullanılarak elde edilen deney setlerinin aktivite değerleri ve tahminlenen değerler.

Deneme sayısı	pH	Zaman (saat)	Enzim Derişimi (mg/ml)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite	Tahminlenen Aktivite
1	6,5	15	1	25	17,4	18
2	8	15	1,8	25	38,4	36,75
3	6,5	6	1,8	25	54	64,28
4	5	24	1	25	14,4	23,03
5	6,5	24	0,2	25	57	46,73
6	5	15	0,2	25	19,2	20,85
7	8	24	1	25	15,6	23,18
8	6,5	15	1	25	18	18
9	5	6	1	25	32,4	24,83
10	8	15	0,2	25	9,6	12,3
11	6,5	24	1,8	25	45,6	39,68
12	8	6	1	25	21	12,38
13	6,5	6	0,2	25	7,2	13,13
14	5	15	1,8	25	43,2	40,5
15	6,5	15	1	25	18,6	18

Bu sonuçlara göre selülazın sepabeads destek üzerine immobilizasyonu için en uygun şartlar Çizelge 1'de deneme sayısı 3 olan deneyin şartlarıdır yani pH 6,5 50 Mm fosfat tamponunda, 6 saat immobilizasyon zamanında, 25 °C sıcaklıkta ve enzim derişiminin 1,8 mg/ml olduğu şartlardır. Her nekadarda Çizelge 1' deki deneme sayısı 5 olan deneyin aktivitesi en yüksek görünsede bu yüksek sonucun nedeninin enzimin desteğe bağlanmasının çok az olmasından kaynaklandığı ve bu nedenle spesifik aktivite değerinin büyüdüğü belirlenmiştir.

Selülazın relizyme desteğe immobilizasyonu için optimizasyon şartlarının RSM metodu kullanarak belirlenmesi amacıyla Design Expert programına önceden belirlediğimiz farklı bağımsız değişken parametrelerimiz olan pH (5-8), immobilizasyon zamanı (2-8 saat), enzim derişimi (0,2-1,8 mg/ml) ve sabit bağımsız değişken olan sıcaklık (25 °C) şeklinde uygulanmıştır. Değişkenlerin programa uygulanmasının sonrasında Box-Benkem deneysel dizaynı seçildiğinde Çizelge 2'de gösterilen deney setlerine ulaşılmıştır. Bu 15 deney setinde verilen şartlarda ayrı ayrı immobilizasyonlar yapılmış ve spesifik aktivite sonuçları Çizelge 2' de gösterilmiştir. Elde edilen spesifik aktivite değerleri Design Expert bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiş Eşitlik 1'de verilen β_{ko} , β_{ki} , β_{kii} katsayıları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır. Bu eşitlik kullanılarak elde edilen tahmini değerlerde Çizelge 2'de görülmektedir.

$$Y=16,6+0,2625.A-1,09.B+9,15.C-0,325.AB-1,6.AC-4,85.BC+1,66.A^2+5,76.B^2+7,29.C^2$$

Çizelge 2. Selülazın relizyme desteğe immobilizasyonunda RSM kullanılarak elde edilen deney setlerinin aktivite değerleri ve tahminlenen değerler.

Deneme sayısı	pH	Zaman (saat)	Enzim Derişimi (mg/ml)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite	Tahminlenen Aktivite
1	8	5	0,2	25	16,2	18,26
2	6,5	5	1	25	16,2	16,6
3	5	5	0,2	25	12,6	14,54
4	8	2	1	25	27,1	25,7
5	6,5	2	1,8	25	41,4	44,74
6	5	2	1	25	25,8	24,53
7	6,5	8	1,8	25	32,2	32,86
8	6,5	5	1	25	16,5	16,6
9	5	8	1	25	21,6	23
10	6,5	2	0,2	25	17,4	16,74
11	8	5	1,8	25	35,3	33,36
12	8	8	1	25	21,6	22,87
13	5	5	1,8	25	38,1	36,04
14	6,5	5	1	25	17,1	16,6
15	6,5	8	0,2	25	27,6	24,26

Bu sonuçlara göre selülazın relizyme destek üzerine immobilizasyonu için en uygun şartlar Çizelge 4.6'da deneme sayısı 5 olan deneyin şartlarıdır yani pH 6,5 50 Mm fosfat tamponunda, 2 saat immobilizasyon zamanında, 25 oC sıcaklıkta ve enzim derişiminin 1,8 mg/ml olduğu şartlardır.

Tartışma ve Sonuçlar

Her iki desteğe selülağın immobilizasyonunun optimum koşullarını belirlemek amacıyla yanıt yüzeğ metodu kullanılmıştır. Yaptığımız ön çalışmalarda ve literatürlerde, kullandığımız desteklere enzimin immobilizasyonu için uygun inkübasyon sıcaklığının 25 °C olduğu bulunmuştur (Mateo ve ark.,2006). Sıcaklık sabit tutulup yanıt yüzeğ metodu kullanarak elde ettiğimiz deney şartlarına uygun olarak deneyler uygulandığında sepabeads desteğe selülağ enziminin immobilizasyonu için en uygun bağlanma pH'sı 6,5, immobilizasyon süresi 6 saat ve selülağ enzim derişimi ise 1,8 mg/ml olarak bulunmuştur. Relizyme desteğe selülağ enziminin immobilizasyonu için en uygun bağlanma pH'sı 6,5 immobilizasyon süresi 2 saat ve selülağ enzim derişimi ise 1,8 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar heriki destek için immobilizasyon süresi haricinde diğer parametrelerin benzer olduğunu göstermektedir. Enzim immobilizasyon çalışmalarının en önemli basamağı olan pH parametresi için serbest ve immobilize selülağın geniş bir pH (3,5-6.5) aralığında aktivitesinin çok düşüşe uğramaması bazik bölgelere göre asidik bölgelerde aktivitenin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Asidik pH da immobilizasyonun verimli olması uzun süreli çalışmalardaki mikrobiyal kontaminasyonların engellenmesi açısından avantajlı bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Diñer ve ark., 2007; Kubitzki ve ark., 2008; Okutucu ve ark.,2010; Bayraktar ve ark.,2011). Serbest ve immobilize selülağın aktivitelerinin tampon derişimine bağlı değişimleri incelendiğinde aktivitelerinin denenen aralıklardaki tampon derişiminden etkilendiği gözlemlenmiştir. Serbest enzimin maksimum aktivite gösterdiği tampon derişiminin immobilize enzime oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Immobilize selülağın maksimum aktivite gösterdiği reaksiyon ortamının iyonik şiddetinin düşük olması enzimin desteğe daha hızlı ve verimli şekilde bağlandığını göstermektedir (Kubitzki ve ark., 2008; Bayraktar ve ark.,2011). Yüksek sıcaklık değerleri reaksiyon sistemine fazladan enerji sağlayabilir ve immobilizasyon prosesini hızlandırabilir fakat aynı zamanda proteini denatüre edebilir ve selülağ enziminin aktivitesini düşürür (Hung ve ark.,2011). 25-65 oC arası deneysel çalışmalarımız sonunda serbest selülağ için optimum sıcaklık 45 oC, sepabeads desteğe immobilize selülağ için 50 °C, relizyme desteğe immobilize selülağ için ise 60 °C olduğu belirlenmiştir. şekil 4.12'de görüldüğü gibi 45 °C'den yüksek sıcaklıklarda serbest enzimin aktivitesi azalmıştır. Bu sonuç protein denatürasyonunun olabileceğini göstermektedir (Yięitoęlu ve ark.,2010). Selülađ enziminin immobilizasyonu sonucunda maksimum aktivitenin alındığı sıcaklığın 50-60 °C aralığı olabileceği sonuçlarımıza göre söylenebilir. Immobilizasyon sonucunda yüksek sıcaklıklarda enzimin stabil kalabilmesinin nedeni enzim ve destek arasında rijit bir yapının oluşması nedeni ile açıklanabilir (Bayramoğlu ve ark.,2002). Serbest selülağ için $V_{MAX}=1,05$ U/mg prot., $K_m=0,47$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=4,06$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur.

Sepabeads desteğe immobilize selülağ için $V_{MAX}=1,1$ U/mg prot. $K_m=1,5$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=4,25$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur. Sepabeads desteğe immobilize selülağın serbest enzime göre K_m değerinin yaklaşık 3 kat artmış olması

sübstrata olan ilgisinin azalmış olduğunu göstermektedir. Relizyme desteğe immobilize selülaz enzimi için $V_{MAX}=3,78$ U/mg prot., $K_m=0,27$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=14,62$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur. Relizyme desteğe immobilize selülazın serbest enzime göre K_m değerinin yaklaşık yarısı kadar azalmış olması sübstrata olan ilgisinin artmış olmasını göstermektedir. Serbest, sepabeads ve relizyme desteklere immobilize selülazların 70 °C'deki yarı ömürleri sırasıyla 8,19, 7,8, 17,8 saat olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre serbest selülaz ile sepabeads desteğe immobilize selülazın termal kararlılıkları arasında önemli bir fark tespit edilememişken relizyme desteğe immobilize selülazın termal kararlılığının arttığı belirlenmiştir. Literatürde çeşitli enzimlerin çeşitli desteklere immobilize edilmesi sonucunda termal kararlılığın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Prlainovic ve ark., 2011; Bayraktar ve ark.,2011; İnce ve ark., 2012). İmmobilizasyon amaçlı kullanılan desteklerin enzimleri termoinaktivasyona karşı koruduğu literatürden ve bizim sonuçlarımızdan da anlaşılmaktadır. Serbest ve immobilize enzimlerimizi 30 gün süreyle 5 ve 25 °C'de depo edip belli sürelerde kalan aktivitelerini incelediğimizde serbest enzimin aktivitesinin fazlaca bir düşüşe uğramadığı, sepabeads desteğe immobilize enzimin ise 5 °C' de depo edilmiş olanın % 74 oranında başlangıç aktivitesini koruduğu ancak oda sıcaklığında depo edilen ve diğer desteğimiz olan relizyme desteğimize immobilize olmuş enzimde hem 5 hem de 25 °C'de başlangıç aktivitesini dramatik bir şekilde kaybettiği belirlenmiştir. İmmobilize selülaz örnekleri tekrar kullanım kararlılıklarının tespit edilmesi amacıyla kesikli reaktör sisteminde incelenmiş 3 kullanım sonunda sepabeads desteğe immobilize selülaz başlangıç aktivitesinin % 8'ini, relizyme desteğe immobilize selülaz ise yine 3 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 10'unu koruyabilmiştir. Meydana gelen bu aktivite kaybının nedeni birkaç faktörden kaynaklanabilir bunlar; enzimin ilk kullanım sonucunda bağlandığı yerden kopması, protein denatürasyonu, son ürün inhibisyonu veya bir enzim sistemi olan selülaz kompleksini oluşturan bir veya daha fazla enzimin kaybı olabilir. Ayrı enzimlerin oluşturduğu selülaz enzim kompleksi aynı zamanda çok sayıda fonksiyonel grup içermektedir ve bu fonksiyonel gruplar enzimin aktif bölgesinde yer alır ve her birisi selülozu oluşturan glukoz monomerlerini farklı yerlerden parçalar. İmmobilizasyon sırasında enzimin aktif bölgesinde yer alan bu fonksiyonel gruplardan birinin etkinliğini kaybetmesi enzimin stabilitesinin kaybolması ile sonuçlanmış olabilir (Hilterhaus ve ark., 2008; Jordan ve ark., 2011)

Kaynaklar

- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S, YILDIRIM, D., and ALAGÖZ D., 2010. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010) 177–183.
- BAYRAKTAR, H., SERİLMEZ, M.,KARKAS, T., CELEN, E.B., and ONAL, S.,2011. Immobilization and stabilization of α -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA,*International Journal of Biological Macromolecules*,49:855-860.
- BAYRAMOĞLU,G., KACAR, Y., DENİZLİ, A., and ARICA,M.Y.,2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobicgroup incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix, *Journal of Food Engineering*, 52:367–374
- BICKERSTAFF, G. F., 1995. Impact of genetic technology on enzyme technology, *Genetic Engineering Biotechnologist*, 15:13-30.
- BOX, G. E. P., and WILSON, K.B., (1951) On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 13(1):1–45
- CAO, L., 2005. Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design. Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kгаа, Weinheim.
- CHO, S.W., and RHEE, J.S., 1993. Immobilization of lipase for effective interestification of fats and oils in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, 41:204-210.
- DİNÇER, A., and TELEFONCU, A., 2007. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45 (2007) 10–14
- EMERT, G., GUM, E., and LANG, J.,1974.Cellulases, in food related enzymes, (Whitaker, J., ed.) , *Advances in Chemistry Series 136*, Amer. Chem. Soc., Washington, DC
- GUISAN, M., 2006. Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, Humana Press.
- HILTERHAUS, L., MINOW, B., MULLER, J., BERHEIDE, M., QUITMANN, H., KATZER, M., THUM, O., ANTRANIKIAN, G., ZENG, A.P., and LIESE, A., 2008. Practical application of different enzymes immobilized on sepabeads, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 31:163–171.
- HUNG, T.C., FU, C.C., and SU. C.H., 2011. Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its application to the reducing sugar production from microalgae, *Enzyme and Microbial Technology*, 49 (2011) 30–37.
- İNCE, A.,BAYRANOĞLU,G., KARAGOZ, B.,ALTINTAS,B.,BİCAK,N., and ARICA M.Y., 2012.A method for fabrication of polyaniline coated polymer microspheres and its application for cellulase immobilization,*Chemical Engineering Journal*,189-190:404-412
- JORDAN, J., KUMAR, C.S.S.R., THEEGALA,C., 2011.Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*,68:139-146.

- KATCHALSKI-KATZIR, E., 1993. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures, *Trends of Biotechnology*, 11:471-478.
- KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. *Science*, 219:722-727.
- KUBITZKI, T., NOLL, T., and LUTZ, S., 2008. Immobilisation of bovine enterokinase and application of the immobilised enzyme in fusion protein cleavage, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 31:173–182
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- MATEO, C., PESSELA, B.C.C., GRAZU, V., GALLEGO, F.L., TORRES, R., FUENTES, M., HÍDALGO, A., PALOMO, J.M., BETANCOR, L., LORENTE, G.F., ORTÍZ, C., A BÍAN, O., GUÍSAN, J.M., and LAFUENTE, R.F., 2006. Immobilization and Stabilization of Proteins by Multipoint Covalent Attachment on Novel Amino-Epoxy-Sepabeads® Immobilization of Enzymes and Cells: *Methods in Biotechnology*, 22:153-162
- NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KAHLER, M., and ANTRANIKIAN, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Microbiology Biotechnology*, 51: 711-729.
- O'DRISCOLL, K. F., 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels, *Methods in Enzymology*, 44:169-183.
- OKUTUCU, B., CELEM, E.B., and ONAL S., 2010. Immobilization of α -galactosidase on galactose containing polymeric beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 200–205
- PRLAINOVIC, N.Z., KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.D., MIJIN D.Z., and BEZBRADICA, D.I., 2011. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads: the effect of lipase oxidation by periodates. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 34:803–810
- SHAH, S., SHARMA, A, and GUPTA, M.N., 2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Analytical Biochemistry*, 351:207-213.
- SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., and VAN LANGEN, L.M., 2005. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization a review, *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3/4):141-147.
- SOLAS, M.T, VICENTE C, XAVIES L, and LEGAZ M.E, 1994. Ionic adsorption of catalase on bioskin: Kinetic and ultrastructural studies, *Journal of Biotechnology*, 33:63-70.
- SUMNER, J.B., 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* 47:5-9.
- WHITAKER, D., 1971. Cellulases, in the enzymes. V, (Boyer, p., ed.), Academic Press, NY, 273.

- WOODWARD, J., 1985. Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling, Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, IRL, Oxford, UK, pp: 3-17.
- YIGİTOĞLU, M., TEMOCIN, Z.,2010. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66:130–135
- YU, P. 1996. Analysis of a municipal recyclable material recycling program. Resour. Conserv.Recy., 17: 47-56.

ÜREAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLERE FARKLI ARA KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU*

Immobilization and Characterization of Urease Enzyme over Magnetic Nanoparticles Through Different Intermediate Arms

Nuri GÜLEŞCİ
Kimya Anabilim Dalı

Güzide YÜCEBİLGİÇ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği koşullar (pH, tampon derişimi ve sıcaklık) belirlenerek kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m) bulunmuştur. Üreaz enziminin glutaraldehit (GA) ve epiklorhidrin (ECH) ara kolları üzerinde magnetik nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu K_m ve V_{max} değerlerinin arttığı görülmektedir. GA ara kolu üzerinden immobilize üreazın k_{cat}/K_m ($2,746dk^{-1}M^{-1}$) ve ECH ara kolu üzerinden immobilize üreazın k_{cat}/K_m ($2,761 dk^{-1}M^{-1}$) oranları serbest üreazın k_{cat}/K_m ($4,139 dk^{-1}M^{-1}$) oranına göre yaklaşık 1,5 kat azalmıştır. Serbest ve immobilize üreazın farklı sıcaklıklarda belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve immobilize enzimlerin aktivitesini daha fazla koruduğu bulunmuştur. Tekrar kullanılabilirliği kesikli reaktör modelinde araştırılmış ve 20 kullanımdan sonra immobilize enzimlerin aktivitelerini sırasıyla %57 (GA) ve %61 (ECH)'ini koruduğu belirlenmiştir. Serbest üreazın 5°C'de ve 25°C'de 30 gün depolanma süresi sonunda kalan aktivitesi sırasıyla başlangıç aktivitesinin %30 ve %23'üdür. İmmobilize enzimler için 5°C'de ve 25°C'de 30 gün depolanma süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesini %72, %71'ini (GA) ve %60, %57'sini (ECH) koruduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Üreaz, glutaraldehit, epiklorhidrin, magnetik nanopartikül.

ABSTRACT

In this study, the conditions which free and immobilized enzymes showed maximum activity (pH, buffer concentration, and temperature) have been determined and their kinetic parameters (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m) were found. As a result of the immobilization to magnetic nanoparticles of the enzyme urease GA and ECH on the intermediate arms values of K_m and V_{max} increased. Immobilized urease level on GA intermediate arm and immobilized urease level k_{cat}/K_m ($2,746dk^{-1}M^{-1}$) has decreased by approximately 1,5 times according to the level of free urease k_{cat}/K_m ($4,139 dk^{-1}M^{-1}$). The thermal stability of free and immobilized urease were compared at different temperatures and it has been found out that at high temperature and time immobilized enzymes have protected their activity for a longer time compared with free enzymes. The re-usability of immobilized enzymes activities has been investigated by batch reactor model and it has been found out

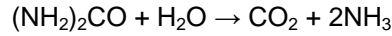
* Doktora Tezi-PhD. Thesis

that after 20 usage 57% GA and 61% ECH of immobilized enzymes activities were maintained respectively. At the end of storage period for 30 days at 5°C and 25°C the remaining activity of free urease was 30% and 23% of the initial activity. It has been find out that at the end of the storage period for 30 days at 5°C and 25°C the activity of immobilized enzymes were 72%, 71% GA, and 60% ,57% ECH of the initial activity respectively has been found preserved.

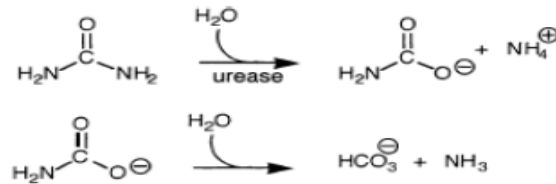
Key words : Urease, glutaraldehyde, epichlorohydrin, magnetic nanoparticles.

Giriş

1926 yılında James B. Sumner tarafından fasulye (*Canavalia ensiformis*) tohumundan ilk defa kristalleştirilen enzim olarak enzimolojide önemli bir yere sahiptir ve James B. Sumner 1946 yılında kimya alanında Nobel barış ödülünü almıştır (Balasubramanian ve ark., 2010). Enzimlerin en önemli özellikleri, substratı aktive etmek ve reaksiyona su sağlamak için aktif bölgelerinde metal iyonları bulundurmalarıdır. Bu grup içindeki diğer dinükleer metalloenzimler arasında üreazlar, aktif bölgelerinde nikel iyonu bulundurmaları açısından tektirler (Krajewska ve ark., 2001). Fasulye (*Canavalia ensiformis*) kaynaklı üreaz enzimi, 90.770 kDa molekül ağırlığına sahip birbirinin aynı alt birimleri içeren bir heksamerdir (Takishima ve ark., 1988). Toplam molekül ağırlığı 590.000 kDa'dur. Üreaz, ürenin amonyum ve karbondioksite dönüşmesini sağlayan bir enzimdir (Krajewska ve ark., 2001).



Normalde üre hidrolizi yavaş gerçekleşen bir reaksiyondur. Katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyonda meydana gelen ürünler amonyak ve siyanürük asittir. Katalizör varlığında gerçekleşen reaksiyonlarda ise oluşan ürünler amonyak ve karbonik asittir. Son basamakta karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür (Blakeleyand ve ark., 1984). Üreazın kataliz reaksiyonu şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Üreazın kataliz reaksiyonu (Ciurci ve ark., 1999)

Kimya, atomların ve moleküllerin düzenlenmesi üzerine kurulmuş bir bilim dalıdır ve nano yapıları da içeren materyallerin sentezinde oldukça uzun bir tarihe sahiptir. Kolloidler ve katalizörler bunlara örnek olarak gösterilebilir. Nano bilimin bugünkü popülaritesi, kullanılan birçok eski (kullanılmayan) kimyasal metodun

yeniden kullanılmasına olanak sağlamış ve aynı zamanda nano yapıli materyallerin sentezi için yeni ve modifiye kimyasal metotların devamlı olarak gelişmesine yol açmıştır. Nano yapıli materyallerin kimyasal sentezlerinin ve proseslerinin kapsamı çok geniş olup optik, elektronik, magnetik, biyolojik, katalitik ve biyomedikal materyaller gibi birçok uygulama alanına sahiptir (Koch, 2000).

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck veya Sigma-Aldrich firmalarından sağlanmıştır.

Metot

Magnetik nanopartiküller birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Valenzuela ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 300 mL 0,1 M FeCl₃.6 H₂O çözeltisiyle, 300 mL 0,05 M FeSO₄.7H₂O çözeltisi hazırlanıp bir beherde 25°C'de 250 devir/dak hızla karıştırarak ısıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltinin sıcaklığı 36°C'ye ulaştığında üzerine damla damla 1 N NaOH siyah bir çökelti oluşturuncaya kadar eklenmiştir. Bu işlem süresince çözelti karıştırılmış ve ısıtılmaya devam edilmiştir. Çözeltinin sıcaklığı 52°C'ye ulaştığında ısıtıcı kapatılmıştır. Daha sonra çözeltinin üzerine damla damla 3 N NaOH eklenerek siyah çökeltinin yoğunluğu artırılmıştır. Elde ettiğimiz çökelekler etanol ile yıkanarak süzölmüş ve bir gece boyunca 74°C'de etüvde kurutulmuştur.

Üreaz enziminin immobilizasyonunda kullanılacak olan magnetik nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktifleştirilmesi ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Magnetik nanopartiküllerin aktifleştirilmesinde Weethall (1976) tarafından bildirilen yöntem esas alınmış ve 3-APTES ile desteğin alkilamin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. Magnetik nanopartikülün 2,0 gramı %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltisine eklenerek 45°C'de 24 saat bekletilerek aktifleştirilmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra aktifleştirilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115°C'de 1 gece kurutulmuştur. 3-APTES ile aktifleştirilen magnetik nanopartikül desteğindeki serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesinde Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve ark., (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

Magnetik nanopartiküller silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino (-NH₂) grubunun miktarı Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Magnetik nanopartiküllere 1-kloro-2,3-epoksipropan'ın (epiklorhidrin) bağlanmasında Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorhidrin üzerinden kovalent immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Protein tayini için Lowry ve ark., (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Serbest ve immobilize üreaz enzim aktivitesi Nessler's metoduna göre ölçölmüştür (Rao ve ark., 1995). Üreaz etkisi ile

açığa çıkan amonyak Nessler ayıracağı ile tepkimeye sokulmakta oluşan renkli bileşiğin renk şiddeti 505 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Araştırma Bulguları

Sentezlenen Fe_3O_4 magnetik nano yapılarının boyut analizi, Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile ölçülmüş ve karakterizasyonu SEM (Zeiss) mikroskopunda yapılmıştır. Ortalama spesifik ağırlığı $0,843 \text{ m}^2/\text{g}$, ortalama yüzey ağırlığı $7,113 \text{ um}$ ve ortalama hacim ağırlığı $30,262 \text{ um}$ olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan nano yapıların ortalama boyutunun $158,2 \text{ nm}$ olduğu bulunmuştur.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri Şekil 2.'de birlikte gösterilmiştir. Sırasıyla pH'lar 7,5-5,5 ve 5,5 olarak belirlenmiştir.

Serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir.

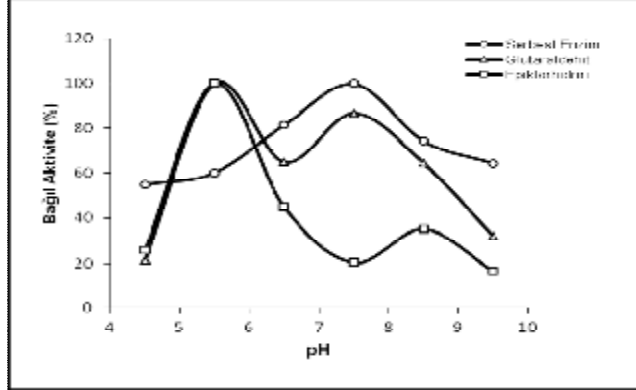
Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri Şekil 3.'de birlikte gösterilmiştir. Sırasıyla sıcaklıklar $50, 70$ ve 70°C olarak belirlenmiştir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik parametreleri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

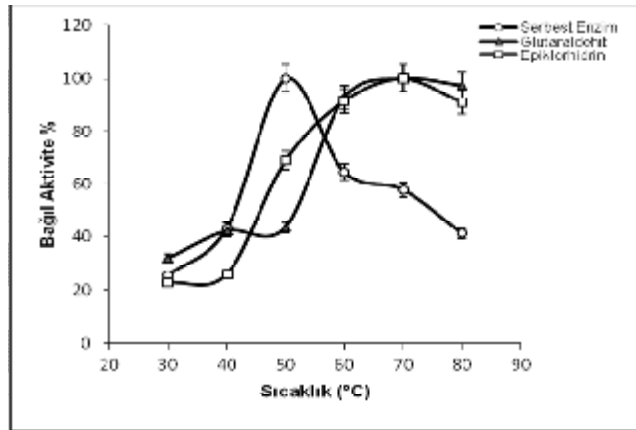
Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz farklı sıcaklıklarda ($60, 70$ ve 80°C) inkübe edilmiş ve 15 saat sonundaki kalan aktiviteleri belirlenmiş ve Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağız kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında kalan üreaz aktiviteleri ölçülmüştür. Kalan aktiviteleri Çizelge 3'de gösterilmiştir.

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorhidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların tekrar kullanım kararlılıkları $25, 50$ ve 100 mg için sırasıyla ($\%37, \%53, \%57$), ($\%36, \%52, \%61$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorhidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri



Şekil 3. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri

Çizelge 1. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m değerleri

	K_m (mM)	V_{max} (U/mg prot.)	k_{cat} (dk ⁻¹)	k_{cat}/K_m (dk ⁻¹ M ⁻¹)
Serbest Enzim	0,5925	4,5	2,4525	4,139
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	5,2	26,2	14,279	2,746
İmmobilize Enzim (Epiklorhidrin Ara kolu)	1,5	7,6	4,142	2,761

Çizelge 2. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin termal kararlılıkları

	Sıcaklık (°C)	% Bağıl Aktivite
Serbest Enzim	60	%77
	70	%48
	80	%29
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	60	%67
	70	%74
	80	%64
İmmobilize Enzim (Epiklorhidrin Ara kolu)	60	%65
	70	%67
	80	%56

Çizelge 3. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depolama kararlılıkları

	30 gün sonunda kalan aktiviteler	
	4°C	25°C
Serbest Enzim	%30	%23
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit Ara kolu)	%72	%71
İmmobilize Enzim (Epiklorhidrin Ara kolu)	%60	%57

Tartışma ve Sonuçlar

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan enzimlerin başında üreaz gelir. Bu enzimin bağıl olarak ucuzluğu, dayanıklılığı ve kolay izlenebilmesinin yanı sıra kanda ve idrarda ürenin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılması bu seçimde göz önünde bulundurulmaktadır. Klinik uygulamalarda üre ölçümü renal ve metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Baysal, 2000). İmmobilize üreazın diğer uygulamaları ise, bioreaktör sistemi içerisinde atık sulardan ürenin amonyak ve karbondioksit dönüşümü (George ve ark., 1997) ya da gıda endüstrisinde meşrubat ve yiyeceklerden ürenin uzaklaştırılması için kullanıldığı bildirilmiştir (Elçin, 1995; Amine ve ark., 2006). Bu nedenle bu çalışmada üreazın kovalent immobilizasyonunda farklı kimyasal yapıya, partikül büyüklüğüne ve yüzey alanına sahip olan magnetik nanopartiküller ve farklı yapı ile uzunluğa sahip ara kollar kullanılarak kovalent immobilizasyon yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır.

Magnetik nanopartiküller birlikte çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda sentezlenen maddenin büyük ölçüde Fe₃O₄'den oluştuğu ancak diğer bazı demir oksit türlerini de kısmen içerdiği tespit

edilmiştir. Ayrıca nano yapıların ortalama boyutunun 158.2 nm olduğu saptanmıştır.

Gabrovska ve ark., (2007) poli(akrilonitril)kitosan kompozit membranlara üreaz enzimini glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişler ve amino gruplarının miktarının kitosan konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Magnetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda destekte bulunan $-NH_2$ grubu miktarının 231 $\mu\text{mol/g}$ destek olup ve aktive edilen desteğin glutaraldehit ile muamelesi sonrasında primer amin grubunun %78'i glutaraldehit ile modifiye edilmiştir. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %63,7 mg prot./g olduğu belirlenmiştir. Axen ve ark., (1975) modifiye agaroz jeli epiklorhidrin ile aktifleştirmiş ve 0,15 mL/3 g jel süspansiyon içerisinde 310 $\mu\text{mol/g}$ epoksi grubu bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu miktarı 400 $\mu\text{mol/g}$ destek olarak bulunmuştur. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %87,5 mg prot./g olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri sırasıyla 7,5-5,5 ve 5,5 olarak belirlenmiştir. Farklı taşıyıcılarda gerçekleştirilen üreaz immobilizasyon çalışmalarının yer aldığı literatürlere bakıldığında, bu sonuçlarla da benzer olduğu görülmektedir. Poli(hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat) filmde yapılan üreaz immobilizasyon çalışmalarında serbest üreazın optimum pH'sının 7,0 olduğu ve immobilize üreazın optimum pH'sının asidik bölgeye doğru (pH 6,0) kaydığı veya optimum pH'ın değişmediği çalışmalar bulunmaktadır (Chellapandian ve Krishnan, 1998; Bayramoğlu ve ark., 2003).

Serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir. Literatürlerde tampon derişiminin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı derişimlerde tampon çözeltiler kullanılmıştır. Sahoo ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada 0,01 M'lık fosfat tamponu, Mulagalapalli ve ark., (2007) ise 0,05 ve 0,025 M'lık tris asetat tamponu kullandıklarını bildirmişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla 50, 70 ve 70°C olarak belirlenmiştir. Serbest üreaz ve immobilize üreazın optimum sıcaklıklarındaki bu farklılıklar diğer literatürlerde bildirilmiştir. Bayramoğlu ve ark., (2005), yaptığı poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-N-metakrilol-L-histidinmetilester) mikrokürelere üreaz immobilizasyonunda serbest üreaz için optimum sıcaklık 40°C iken immobilize enzimlerde bu değer 50°C'ye çıkmıştır.

K_m değerlerinin karşılaştırılması enzim ve taşıyıcı arasındaki etkileşim hakkında önemli bilgiler verir. Immobilize enzimin K_m değerindeki artış, aktif bölgeye substrat afinitesindeki azalışı ifade etmektedir. Substrat afinitesindeki bu düşüşün sebepleri, immobilizasyon sonrası substratı bağlayan enzimin

konformasyonel esnekliğinin azalışı, taşıyıcının yarattığı sterik engeller ve difüzyonel dirençtir. Baran Teke, (2008), serbest enzimle karşılaştırıldığında aljinata immobilize olan üreazın K_m değerinde bir artış gözlemlenmiştir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz farklı sıcaklıklarda (60, 70 ve 80°C) inkübe edilmiş ve 15 saat sonundaki kalan aktiviteleri serbest enzim için sırasıyla (%77, %48, %29), glutaraldehit ara kolu için (%67, %74, %64) ve epiklorhidrin ara kolu için (%65, %67, %56) olarak belirlenmiştir. Enzimin konformasyonel yapısı immobilizasyondan etkilenir. Bu konformasyonel sınırlamalardan dolayı, immobilize enzim serbest enzimden daha yüksek termal kararlılığa sahiptir. Immobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir yada hiç değişmez. Genellikle kovalent bağlı suda çözünmez enzimlerin ısıya ve denatüre edici ajanlara karşı serbest forma göre daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Yapılan diğer immobilize üreaz termal kararlılık çalışmalarında, 40°C'ye kadar % bağlı aktivitenin korunduğu, 65°C gibi yüksek sıcaklıklarda ise serbest enzim %87 aktivite kaybederken, immobilize enzimin %48 aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Bayramoğlu ve ark., 2003).

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorhidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağız kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür. Kalan aktivitelerin sırasıyla (%30, %23), (%72, %71), (%60, %57) olduğu belirlenmiştir. Immobilizasyonun enzimin depolama kararlılığını genellikle iyileştirdiği bilinmektedir. Immobilize üreazın çok iyi depolama kararlılığına sahip olduğunu bildirmiştir (Krajewska ve Leszko, 1990).

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorhidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların tekrar kullanım kararlılıkları 25, 50 ve 100 mg için sırasıyla (%37, %53, %57), (%36, %52, %61) olarak belirlenmiştir. Immobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesi enzimin endüstride kullanılması açısından önemli bir faktördür. Artan kararlılık immobilize enzimi serbest enzimden daha avantajlı hale getirmektedir (Lei ve ark., 2007).

Kaynaklar

- AMINE, A., MOHAMMADI, H., BOURAIS, I., PALLESCHI, G., 2006. Enzyme Inhibitionbased Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:1406-1423.
- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and Properties of Catalase Immobilized onto Controlled Pore Glass and Its Application in Batch and Plug-Flow Type Reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58:124-131.
- AXEN, R., DREVIN, H., CARLSSON, J., 1975. Preparation of Modified Agarose Gels Containing Thiol Groups. *Acta Chemica Scandinavica B*, 29:471-474.

- BALASUBRAMANIAN A., PONNURAJ K., 2010. Crystal Structure of The First Plant Urease From Jack Bean: 83 Years of Journey From Its First Crystal to Molecular Structure. *Journal of Molecular Biology*, 400:274–283.
- BARAN TEKE, A., 2008. Farklı Yöntemlerle Üreaz/Alanindehidrogenaz Enzim Çiftinin İmmobilizasyonu ve Sistemin Kan Üre Düzeyini Düşürebilme Olanaklarının Araştırılması. E.Ü. Doktora Tezi, İzmir, 162s.
- BAYSAL, H., 2000. Üreaz İçeren Enzim Komplekslerinin Hazırlanması ve Kullanım Olanaklarının Araştırılması. E.Ü. Doktora Tezi, İzmir, 110s.
- BAYRAMOĞLU, G., ALTINOK, H., BULUT, A., 2003. Preparation and Application of Spacer-Arm-Attached Poly(hydroxyethyl Methacrylate-co-Glycidyl methacrylate) Films for Urease Immobilization. *Reactive & Functional Polymers*, 56:111-121.
- BAYRAMOĞLU, G., YALÇIN, E., ARICA, M.Y., 2005. Immobilization of Urease Via Adsorption onto L-histidine-Ni (II) Complexed Poly (HEMA-MAH) Microspheres: Preparation and Characterization. *Process Biochemistry*, 40:3505-3513.
- BLAKELEYAND, R. L., ZERNER, B., 1984. Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme. *Journal of Molecular Catalysis*, 23:263-292.
- CHELLAPANDIAN, M., KRISHNAN, M.R.V., 1998. Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) Copolymer for Immobilization of Urease. *Process Biochemistry*, 33:595-600.
- CHO, S.W., RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:204-210.
- CIURCI, S., BENINI, S., MANGANA, S., 1999. Structural Properties of Nickel Ions in Urease. *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192:331-335.
- ELÇİN, Y.M., 1995. Encapsulation of Urease Enzyme in Xanthan-Alginate Spheres. *Biomaterials*, 16:1157-1161.
- GABROVSKA, K., GEORGIEVA, A., GODJEVARGOVA, T., STOILOVA, O., MANOLOVA, N., 2007. Poly(acrylonitrile)chitosan Composite Membranes for Urease Immobilization. *Journal of Biotechnology*, 129:674–680.
- GEORGE, S., CHELLAPANDIAN, M., SIVASANKAR, B., JAYARAMAN, K., 1997. A New Process for The Treatment of Fertilizer Effluent Using Immobilized Urease. *Bioprocess Engineering*, 16:83-85.
- KRAJEWSKA, B., LESZKO, M., 1990. Urease Immobilization on Aminated Butyl Acrylate Ethylenedimethacrylate Copolymer. *Die Angewandte Makromolekularen Chemie*, 179:21-33.
- KRAJEWSKA, B., ZABORSKA, W., LESZKO, M., 2001. Inhibition of Chitosan-Immobilized Urease by Slow-Binding Inhibitors: Ni²⁺, F⁻ and Acetohydroxamic Acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14:101-109.
- KOCH, C.C., 2000. Nanostructured Materials. Processing, Properties and Potential Applications. Noyes Publications William Andrew Publishing: New York, 612p.

- LEI, Z., BI, S., HU, B., YANG, H., 2007. Combined Magnetic and Chemical Covalent Immobilization of Pectinase on Composites Membranes Improves Stability and Activity. *Food Chemistry*, 889-896.
- LOWRY, O.H., ROSENBAUGH, N., FARR, L., RANDALL, R., 1951. Protein Measurement with Theophillin-Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 183:265–275.
- MULAGALAPALLI, S., KUMAR, S., KALATHUR, R.C.R., KAYASTHA, M.A., 2007. Immobilization of Urease from Pigeonpea (*Cajanus cajan*) on Agar Tablets and Its Application in Urea Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142:291–297.
- RAO, M.S., CHELLAPANDIAN, M., KRISHNAN, M.R.V., 1995. Immobilization of Urease on Gelatin-Poly(HEMA) Copolymer Preparation and Characterization. *Bioprocess Engineering*, 13:211–214.
- SAHOO, B., KUMAR SAHU, S., PRAMANIK, P., 2011. A Novel Method for The Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69:95–102.
- TAKISHIMA, K., SUGA, T., MAMIYA, G., 1988. The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *European Journal of Biochemistry*, 175:151-165.
- WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. *Methods of Enzymology*, 44:134-148.
- VALENZUELA, R., FUENTESA, M.C., PARRAA, C., BAEZAB, J., DURANC, N., SHARMAD, S.K., KNOBELD, M., FREERB, J., 2009. Influence of Stirring Velocity on The Synthesis of Magnetite Nanoparticles (Fe_3O_4) by The Co-Precipitation Method. *Journal of Alloys and Compounds*, 488:227-231.

**SODYUM MOLIBDAT (Na_2MoO_4) KATKISININ, 7075 ALUMINYUM
ALAŞIMININ SÜLFÜRİK ASİT İÇERİSİNDEKİ ELOKSAL İŞLEMINE VE
KOROZYON DAVRANIŞLARINA ETKİSİ***

*The Effect of Sodium Molybdate (Na_2MoO_4) Additives on Anodizing Process of
7075 Aluminum Alloy in Sulfuric acid (H_2SO_4) And Corrosion Behavior**

Rasiha Nefise MUTLU
Kimya Anabilim Dalı

Birgül YAZICI
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, 7075 alüminyum alaşımının 0,4 M sülfürik asit (H_2SO_4) içerisindeki,eloksal işlemine farklı derişimlerde (0,1-0,6 M) sodyum molibdat (Na_2MoO_4) katkısının etkisi incelenmiştir. Eloksal işleminde uygulanacak en etkili katkı derişimi (0,5 M) ve en uygun potansiyel (2V) belirlenmiştir.Eloksal işlemi sırasında katotta indirgenerek farklı mavi, mor renkli molibden oksitleri, molibdat konsantrasyonuna bağlı olarak oluşmuştur. Yüzeyde oluşan alüminyum oksite ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3$) ait korozyon davranışları %3,5'luk NaCl içerisinde alınan elektrokimyasal impedans (EIS) ve Tafel ölçümleriyle değerlendirilmiştir.Bu ölçümler taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleriyle desteklenmiştir.Elde edilen bulgulara göre, molibdat katkısı, elektrolit/oksit ara yüzeyinde Al^{+3} iyonlarının çözeltiye geçmesine engel olmuş ve yüzeydeki oksit tabakasının kalitesini (homojen,düzgün ve koruyucu) arttırmıştır .

Anahtar Kelimeler: Sodyum molibdat (Na_2MoO_4), alüminyum, korozyon, eloksal

ABSTRACT

In this study, The effect of different sodium molybdate (Na_2MoO_4) concentration (0.1-0.6 M) as additives, on anodizing process of 7075 aluminum alloy in sulfuric acid (0.4 M H_2SO_4) has been investigated. The most effective concentration of additives (0.5M) and optimal potential (2V) were determined for anodizing process.During anodizing process, different blue ,purple molybdenum oxides were formed by reduced at the cathode ,depending on the concentrations of molybdate.The corrosion behavior of the aluminum oxide formed on the surface ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3$) has been evaluated with electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and Tafel measurement in 3,5 % NaCl.This measurement has been supported with scanning electron microscope (SEM) images.According to results obtained, passage of aluminum ions into the solution has been hampered with molybdate additives at electrolyte/oxide interface and additive has improved the quality (homogeneous, uniform and protective) of the surface oxide layer.

Key Words: Sodium molybdate (Na_2MoO_4), aluminum, corrosion, anodizing process

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

Giriş

Aluminyum ve alaşımları, ticari olarak bir çok alanda (havacılık, mimarlık, ulaşım, imalat sanayi vb.) kullanılmaktadır. Bu malzemenin kullanımını kısıtlayan en önemli sorun korozyondur. Aktif bir metal olan aluminyum yüzeyinde kendiliğinden oluşan doğal oksit filmi korozif ortamlarda etkili bir koruma sağlamaz. Bu nedenle kullanılan anodizing yöntemi, yüzeydeki oksit filminin korucu özelliklerinin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılır. Aluminyum anodize edildiğinde, direnç oluşturan bir oksit tabakası kontrollü olarak oluşturulur. Bu tabakanın kalitesi (düzgün, homojen ve koruyucu) anodizing sırasında kullanılan elektrolit türüne, potansiyele, sıcaklığa vb. bağlıdır. Bu amaçla ilk başta kromik asit elektrolit olarak kullanılmıştır. Ancak +6 değerlikli krom türleri toksik ve tehlikelidir. Bu nedenle oluşturduğu sağlık ve çevre sorunları nedeniyle, başka anodizing banyolarının bulunmasını zorunlu hale gelmiştir. Kromik asite, alternatif olarak sülfürik asit, okzalik asit ve fosforik asit elektrolitlerine ait birçok çalışma mevcuttur. Teknikte en yaygın sülfürik asit elektroliti kullanılmaktadır. Bu asitler tek kullanıldığı gibi, belirli oranlarda karıştırılarak elde edilen çözeltilerinin etkinliği de geniş çapta araştırmacılar tarafından araştırılmaktadır (Shih ve ark. 1999). Günümüzde teknikte sodyum hidrokstitten geçirmeden direk asitle anodizing yapmak için çalışmalar mevcuttur. Bu elektrolitlerin içerisine katkı olarak ilave edilerek umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin Moutarlier ve ark. molibdat ve permanganat anyonlarının sülfürik asit çözeltisine katkı olarak ilave edildiğinde oluşan anodik filmin karakterizasyonunu incelemişler ve düşük derişimlerde permanganatın, molibdattan daha etkin olduğunu belirlemişlerdir. Tsangarakı-Kaplanoglou ve ark., elde edilen anodik tabakanın kalitesine kullanılan anodizasyon banyosunun yanı sıra, kullanılan aluminyum alaşımının da etkisi olduğunu görmüşlerdir. Anodizing sırasında porların yeniden düzenlenerek kapanması sonucu akım azalmasının, AA5083 alaşımında AA 6111'dan daha iyi olduğunu saptanmıştır. Ayrıca Moutarlier ve ark. aluminyum 2024 alaşımı için sülfürik asit içerisine yapılan molibdat katkısının film gelişimi ve korozyon dayanımı üzerine etkisini incelemiş ve molibdat konsantrasyonuna bağlı olarak anodik tabakanın olumlu etkilendiğini ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada, aluminyum 7075 alaşımının yüzeyinde, sülfürik asit elektroliti içerisine ilave edilen molibdat katkısının en etkili derişiminin, yüzeyde kontrollü bir şekilde oluşturulan anodik tabakanın kalitesine etkisi incelenmiştir.

Materyal ve Metod

Materyal

Çalışma Elektrotları: Çalışma elektrotu olarak; çıplak aluminyum (ÇAl) elektrotlar kullanılmıştır. Aluminyumun kimyasal bileşimi aşağıda verilmektedir;

Aluminyum 7075 alaşımı : 0,40 % Si , 1,60 % Cu , 0,30 % Mn , 5,60 % Zn , 0,50 % Fe , 0,20 % Ti , 2,5 % Mg , 0,30 % Cr.

Karşı Elektrot: Platin levha.

Referans Elektrot: Gümüş-gümüş klorür elektrot; Ag/AgCl,Cl⁻ (3,0 M KCl).

Anodizing Çözeltisi: Anodizing işlemi ve AC impedans ile akım-potansiyel ölçümleri için 0,4M H₂SO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. Anodizing işlemi için 0,4M H₂SO₄ + X M Na₂MoO₄.2H₂O (X;0,1-0,5) çözeltisi hazırlanmıştır.

Korozyon testlerinde kullanılmak üzere; %3,5'luk NaCl çözeltisi hazırlanmıştır.

Elektrokimyasal Analiz Cihazı: Anodizing işlemi ve AC impedans eğrileri ile akım-potansiyel eğrilerinin elde edilmesi CHI 604d Electrochemical Analyzer cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Leo 440 SEM Instrument, COXEM CX 200): Elektrotların yüzey yapılarının analizi için kullanılmıştır.

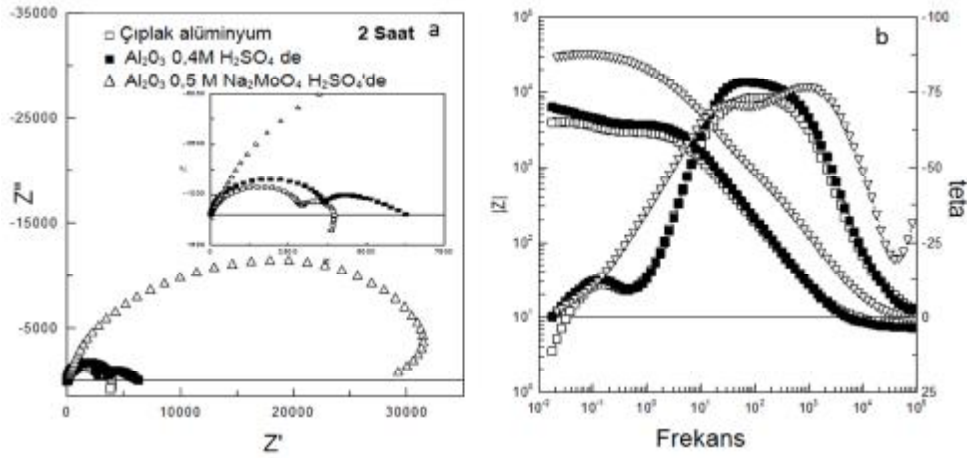
Mekanik parlatıcı: Elektrot yüzeylerinin parlatılmasında kullanılmıştır.

Metod

Çalışma elektrotları; silindirik alüminyum çubuklardan 5 cm uzunluğunda kesilerek, taban alanlarından bir tanesi delinmiş ve iletkenliği sağlamak için bakır tel geçirilmiştir. Sadece çalışma yüzeyi açıkta kalacak şekilde polyster blok ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan elektrotların yüzey alanları; alüminyum : 0,785 cm²'dir. Alüminyum çalışma elektrotlarının yüzeyine mekanik parlatma işlemi uygulanmıştır. CHI 604d Electrochemical Analyzer cihazında alüminyum elektrotlar anot, platin katot olacak şekilde bağlanmış ve gümüş-gümüş klorür elektrot (Ag,AgCl/Cl⁻) referans olarak kullanılmıştır. Uygun potansiyeli belirlemek için; oda sıcaklığında, atmosfere açık koşullarda 0,4 M H₂SO₄ elektroliti içerisinde farklı potansiyeller (0,5,1,1,5,2V) 30 dakika boyunca uygulanarak anodizing işlemi uygulanmıştır. En uygun potansiyel 2 V olarak belirlenmiştir (impedans ve tafel eğrileriyle). Uygun katkı derişimini belirlemek için; aynı koşullarda belirlenen 2 V potansiyelde 0,4M H₂SO₄ elektroliti içerisine farklı derişimlerde (0,1-0,5 M) Na₂MoO₄ katkısı yapılarak anodizing işlemi uygulanmıştır. En uygun derişim 0,5 M olarak belirlenmiştir (impedans ve tafel eğrileriyle). Elektrokimyasal ölçümler üç elektrot tekniğinden yararlanılarak, atmosfere açık koşullarda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Sistemde çalışma elektrotu olarak anodizing işlemi uygulanmış (Al/Al₂O₃) ve uygulanmamış (ÇAL) olan alüminyum elektrotlar kullanılmıştır. Karşı elektrot Pt, referans elektrot olarak gümüş-gümüş klorür elektrotudur (Ag,AgCl/Cl⁻). % 3,5 NaCl çözeltisi içerisinde bekletilen anodizing uygulanmamış, katkısız ortamda ve katkılı ortamda anodizing uygulanmış elektrotlar 2,96 saat boyunca bekletildikten sonra 2 ve 96 saatler sonunda açık devre potansiyelleri değerinde 10⁵ – 10⁻³ Hz frekans aralığında 5 mV genlik uygulanarak elektrolit karıştırılmadan, AC impedans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Polarizasyon dirençleri (R_p) belirlendikten sonra 96 saatin sonunda açık devre potansiyelinden +1,8 V'a kadar 5 mV tarama hızı ile akım-potansiyel eğrileri elde edilmiştir. Anodizing uygulanmamış, katkısız ortamda ve katkılı ortamda anodizing uygulanmış elektrotlara ait SEM görüntüleri alınmıştır. Ayrıca aynı koşullarda oluşturulan elektrotların 2 saat ve 96 saat % 3,5'luk NaCl çözeltisi içerisinde bekletildikten sonraki sem görüntüleri alınmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma Koruyon davranışları

Anodizing işlemi için en uygun potansiyel (2 V) ve Na_2MoO_3 derişimi (0,5 M) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda anodizing ile oluşturulan oksitin korozyon davranışları elektrokimyasal yöntemler kullanılarak, çıplak alüminyum ve katkısız ortamda oluşturulan oksit tabakasının korozyon davranışları ile kıyaslanmıştır. % 3,5'luk NaCl içerisinde 2 ve 96 saat bekletildikten sonra elde edilen Nyquist -Bode diagramları her saatteki ölçümler kendi içinde olacak şekilde karşılaştırılmıştır.

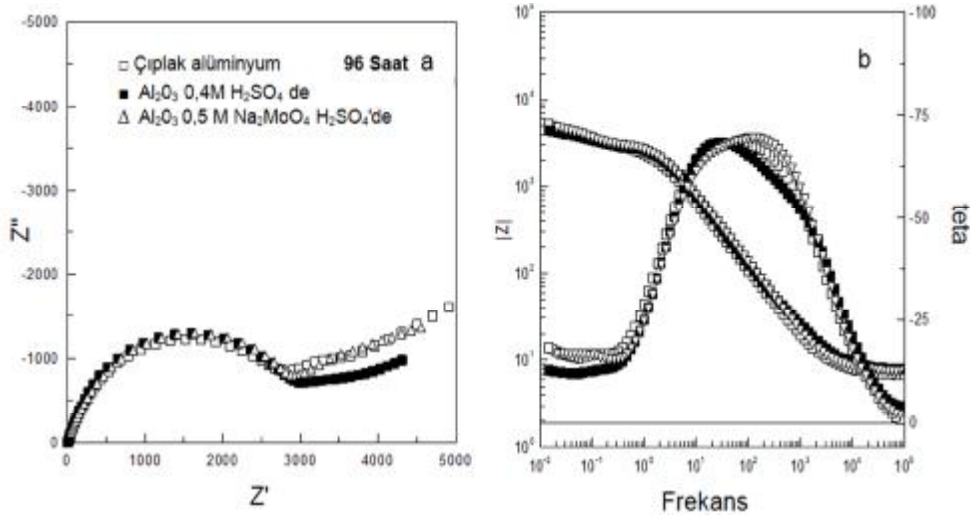


Şekil 1. Çıplak (□) ile katkısız (■) ve katkılı (Δ) ortamda işlem gören alüminyum elektrotların % 3,5 NaCl içerisinde 2 saat bekleme süresi sonunda elde edilen (a) Nyquist ve (b) Bode eğrileri.

Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi çıplak alüminyum (□) ile elektrotların yüzeyinde sülfürik asit elektrolitinde Na_2MoO_4 katkılı ve katkısız olarak oluşturulan anodik tabakanın korozyon davranışını incelemek için, elektrotlar NaCl içerisinde 2 saat bekletildikten sonra elde edilen impedans eğrileri kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Çıplak alüminyumun (□), yüksek frekans bölgesinden başlayıp orta frekans bölgesinde devam eden yarım daire şeklinde bir lup ile düşük frekans bölgesinde kapanan yarım daire şeklinde ikinci lup görülmektedir. Oluşan ilk lupun yatay eksene ekstrapole edilmesiyle elde edilen direnç değeri $\sim 3000 \Omega$ olup bu değer por direncine (R_{po}) karşılık gelmektedir. Bu direnç filmin porları içinde meydana gelen elektrokimyasal tepkimelerle ve difüzyonla ilişkilidir. İkinci lup ise $\sim 3972 \Omega$ 'da kapanmaktadır. Düşük frekans bölgesinde oluşan ikinci yarım daire metal üzerindeki bariyer tabakaya ait bilgiler verir. Şekil 3.1.b'deki Bode diyagramında oluşan bu iki ayrı lup yüksek (10^2 Hz) ve düşük (10^{-1} Hz) frekans bölgesinde görülmektedir. Faz açıları sırasıyla $73,5^\circ$ ve $10,2^\circ$ dir. Çıplak alüminyum için eğrinin başlangıç noktası çözelti direncini karşılar (R_s) ve bu değer $\sim 8,00 \Omega$ dur. 0,4M H_2SO_4 (■) içerisinde oluşan anodik tabakanın, NaCl içerisinde 2 saat bekletildikten sonra alınan impedans eğrisi çıplak alüminyumda olduğu gibi iki lup şeklindedir. İlk lupun

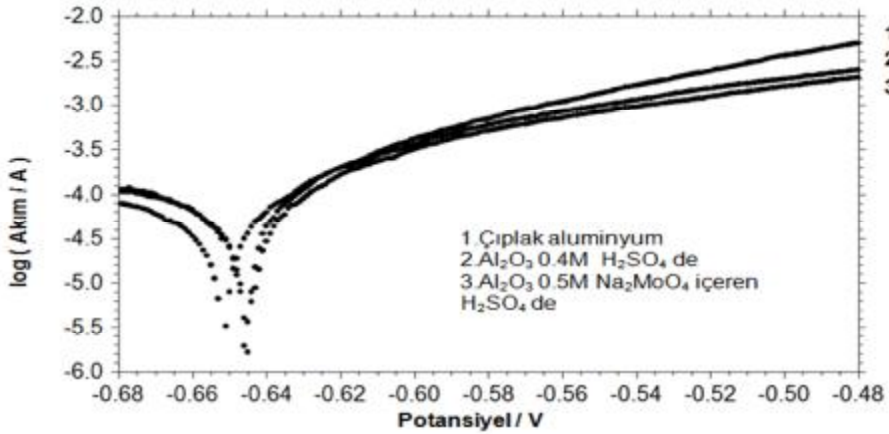
ekstrapole edilmesiyle elde edilen por direnci $\sim 3645 \Omega$ dur ve ikinci lup $\sim 6241 \Omega$ direnç değerinde kapanmaktadır. Şekil 3.1.b'deki bode diyagramında oluşan bu iki ayrı lup yüksek (10^2 Hz) ve düşük (10^{-1} Hz) frekans bölgesindedir. Faz açıları sırasıyla $78,08^\circ$ ve $12,01^\circ$ dir. Eğrinin başlangıç noktasındaki çözelti direnci $\sim 7,287 \Omega$ dur. Alüminyumun ince oksit filmi gerçek bir kondansatöre yakın özellik göstermektedir. Hem çıplak alüminyumun hem de katkısız sülfürik asit içerisinde anodizing işlemine tabi tutulan alüminyumun NaCl içerisinde elde edilen diyagramları yarım daireye çok yaklaşmaktadır.

NaCl'li ortamda 2 saat beletildikten sonra $0,4 \text{ M H}_2\text{SO}_4 + 0,5 \text{ M Na}_2\text{MoO}_4$ 'de (Δ) oluşan anodik tabakaya ait impedans eğrisi yüksek frekans bölgesinde başlayıp, orta frekans bölgesinde devam eden ve düşük frekans bölgesinde kapanan yarım elips şeklindedir. Diğer eğrilerden farklılık gösteren yarım elips şekli, iki ayrı lupun odak noktalarının birleşmesi sonucu oluşan tek bir luptan meydana gelmektedir. Bu eğrinin yatay eksene ekstrapole edilmesiyle elde edilen direnç değeri $\sim 31350 \Omega$ ve bu değer bariyer tabaka direnci (R_b) ve por direncini (R_{po}) içine alan polarizasyon direncidir. Bu eğri için şekil 3.1.'de gösterilen eşdeğer devre modeli düşünülebilir. Eğrinin başlangıç noktasından belirlenen çözelti direnci $\sim 10,260 \Omega$ dur. çözelti direnci $\sim 10,260 \Omega$ dur. Şekil 3.1.b. deki bode diyagramında tek lupu oluşturan iki ayrı lup 10^1 ve 10^3 Hz frekanslarında görülmektedir. Faz açıları sırasıyla $80,2^\circ$ ve $75,1^\circ$ dir. İki lupa ait faz açılarının diğer iki eğriye kıyasla oldukça arttığı görülmektedir. Çıplak alüminyum ile $0,4 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ (\blacksquare) elektoliti içerisinde oluşan anodik tabakanın impedans eğrileriyle kıyaslandığında oldukça yüksek bir polarizasyon direncine sahiptir.



Şekil 2. Çıplak (\square) ile katkısız (\blacksquare) ve katkılı (Δ) ortamda işlem gören alüminyum elektrotların % 3,5 NaCl içerisinde 96 saat bekleme süresi sonunda edilen (a) Nyquist ve (b) Bode eğrileri.

Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi çıplak alüminyum ile sülfürik asit ve $H_2SO_4 + Na_2MoO_4$ içerisinde oluşan anodik tabakanın korozyon davranışı, NaCl içerisinde 96 saat beklendikten sonra elde edilen impedans eğrileri kendi içerisinde karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Çıplak (\square) alüminyumun impedans eğrisindeki ilk lupun yatay eksen ile extrapole edilmesi sonucu elde edilen R_{po} değeri $\sim 2885 \Omega$ dur. Çözelti direnci ise $\sim 6,907 \Omega$ dur. Şekil 3.2.b.'deki bode diyagramında oluşan lup yüksek ($10^2 Hz$) frekans bölgesindedir ve faz açısı $67,8^\circ$ dir. İkinci lup $16,2^\circ$ lik bir açıyla oluşmaktadır. $0,4 M H_2SO_4$ (\blacksquare) katkısı içerisinde oluşan anodik tabakanın, NaCl içerisinde 96 saat beklendikten sonra alınan impedans eğrisinin ilk lupundan elde edilen R_{po} değeri $\sim 2993 \Omega$ dur ve çözelti direnci $\sim 6,972 \Omega$ dur. Şekil 3.2.b'deki bode diyagramında oluşan lup yüksek ($10^2 Hz$) frekans bölgesindedir ve faz açısı $68,4^\circ$ dir. İkinci lup $12,6^\circ$ lik bir açıyla oluşmaktadır. NaCl elektrolitinde 96 saat beklentilen $0,4 M H_2SO_4 + 0,5 M Na_2MoO_4$ (Δ) katkısı içerisinde oluşan anodik tabakaya ait impedans eğrisinin yatay eksen ile extrapole edilmesi sonucu elde edilen R_{po} değeri $\sim 3093 \Omega$ dur ve çözelti direnci $\sim 7,484 \Omega$ dur. Şekil 3.2.b'deki bode diyagramında oluşan lup yüksek ($10^2 Hz$) frekans bölgesindedir ve faz açısı $70,01^\circ$ dir. İkinci lup $17,1^\circ$ lik bir açıyla oluşmaktadır. 96 saat NaCl ortamında beklentilen bu 3 elektrota ait eğrinin özelliği yaklaşık birbiriyedir.



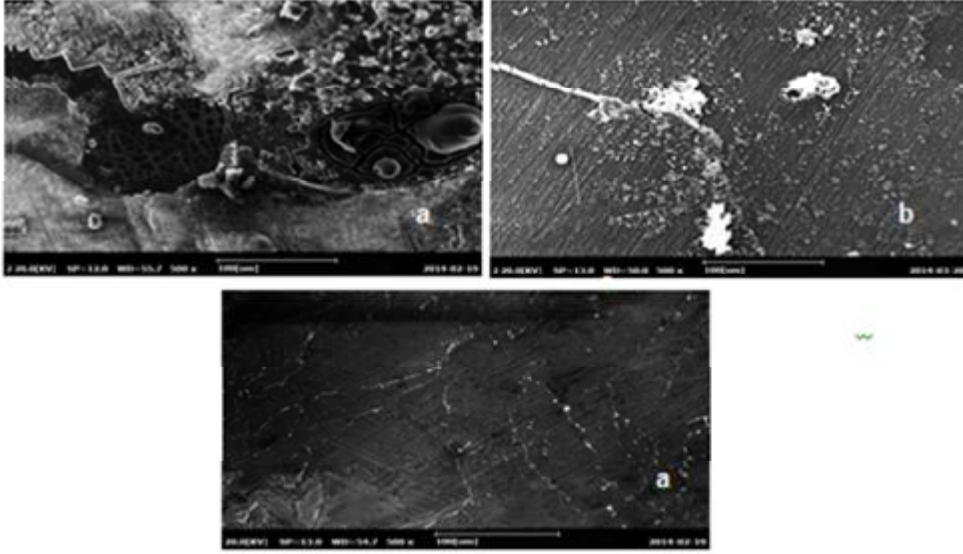
Şekil 3. Çıplak (1) ile katkısız (2) ve katkılı (3) ortamda işlem gören alüminyum elektrotların % 3,5 NaCl içerisinde 96 saat bekleme süresi sonunda elde edilen akım-potansiyel eğrileri.

Şekil 3.3' de çıplak alüminyum ile sülfürik asit ve sülfürik asit + molibdat katkısı içerisinde oluşan anodik tabakanın korozyon davranışını karşılaştırmak için, NaCl içerisinde 96 saat beklendikten sonra elde edilen akım-potansiyel eğrileri birlikte verilmiştir. Çıplak alüminyumun eğrisine ait (1) denge potansiyeli $-0,655 V$ dur. Bu potansiyelden daha pozitif potansiyellere gidildikçe akım giderek artmıştır. $-0,5 V$ da akım $5,0118 \times 10^{-3} A$ değerindedir. $0,4 M H_2SO_4$ (2) içerisinde

anodizing işlemi uygulanan elektrota ait akım-potansiyel eğrisinin denge potansiyeli -0,651 V dur. Akım daha pozitif potansiyelerde artmıştır. -0,5 V da akım $2,4479 \times 10^{-3}$ A değerindedir. 0,5 M Na_2MoO_4 içeren H_2SO_4 de (3) anodizinge tabi tutulan elektrota ait eğrinin denge potansiyeli -0,645V dur. Bu potansiyelden daha pozitif potansiyel olan -0,5 V da akım değeri $1,3947 \times 10^{-3}$ A dir. Denge potansiyeli çok fazla değişmemekle birlikte -0,5 V civarındaki akım değerleri kıyaslandığında en yüksek akım çıplak alüminyumun eğrisine aittir. En düşük akım ise katkılı elektrolit içerisinde anodizing işlemine uğratılan elektrotun eğrisine aittir.

Karakterizasyon

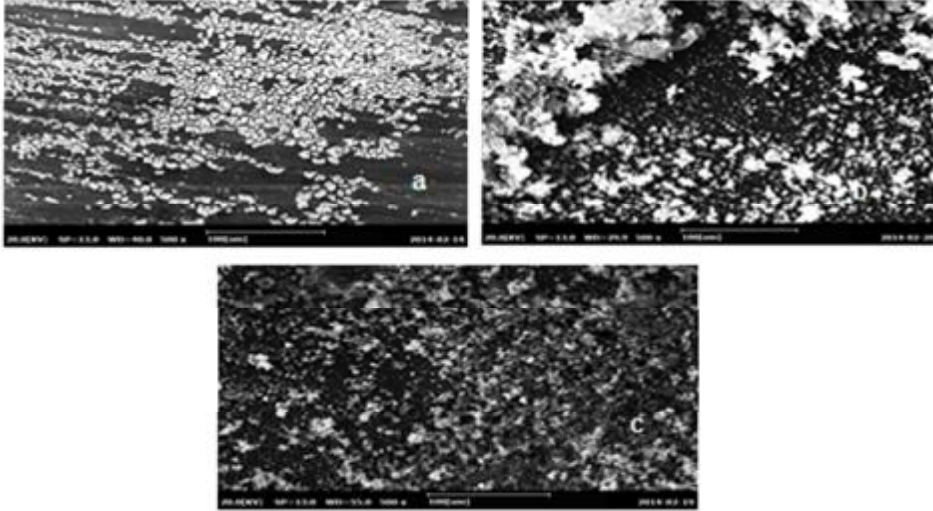
Çıplak alüminyumun katkılı ve katkısız elektrolite anodizing uygulanan çalışma elektrotuna ait SEM görüntüleri ile bu üç elektrotun NaCl çözeltisi içerisinde 2 ve 96 saat bekletildikten sonraki sem görüntüleri alınmıştır.



Şekil 4. %3,5 NaCl çözeltisi içerisinde 2 saat bekletilen çıplak (a), katkısız (b) ve katkılı (c) alüminyuma ait 100µm boyutunda SEM görüntüleri.

Şekil 3.4.a.'da Çıplak alüminyum elektrotun % 3,5'luk NaCl çözeltisi içerisinde 2 saat bekletildikten sonraki SEM görüntüleri verilmektedir. Çıplak alüminyum yüzeyinde doğal oksit tabakası bulunmaktadır. Oksit tabakası üzerinde belirli bir bozuk bölgede adsorplanan klorür (Cl^-) gibi aktifleyici bir iyon çukur korozyonunu başlatır. Klorür iyonları oksit tabakasının içerisine difüzyonlanır. Çukur içerisinde AlCl_3 , HCl oluşumu metalin çözünmesini hızlandırır. Çukurun içerisindeki metal anot kalan kısımlar katot görevini üstlenir ve çukur oluşumu otokatalitik olarak devam eder. Korozyon sonucu çukur gittikçe büyüyerek metalin o noktadan kısa sürede delinmesine neden olur. Bu nedenle çukur korozyonu tehlikelidir. Şekilde

görüldüğü gibi çıplak alüminyum yüzeyinde çukur ve çatlaklar görülmektedir. Şekil 3.4.b.'de 0,4M H₂SO₄ içerisinde oluşturulan Al/Al₂O₃'ün % 3,5'luk NaCl içerisinde 2 saat bekletildikten sonraki SEM görüntüleri verilmektedir. Şekil 3.4.'deki Çıplak alüminyuma ait sem görüntüleri ile karşılaştırıldığında yüzeyde oluşan hasar daha az olmasına rağmen yüzeyde çukur oluşumu görülmektedir. Bozulan Al/Al₂O₃ tabakası kendisini tamir etme yeteneğine sahip olmasına rağmen çukur oluşum hızı, Al₂O₃ oluşum hızından daha fazladır ve çukur oluşumunun başlaması alüminyumun aşınmaya devam edeceğini göstermektedir. Şekil 3.4.c.'de 0,4 M H₂SO₄ elektroliti içerisinde yapılan 0,5 M Na₂MoO₄ katkısı ile oluşturulan Al/Al₂O₃'ün % 3,5'luk NaCl içerisinde 2 saat bekletildikten sonraki SEM görüntüleri verilmektedir. Görüldüğü gibi yüzey yapısı korunmakta ve Şekil 3.4.a. ile Şekil 3.4.b.'deki görülen çukur ve çatlaklar görülmemektedir. Yüzey bozulmamıştır. Çukur oluşumunun olmaması yüzeydeki oksit tabakasının homojen, koruyucu ve yüzeyin tamamını kapladığını göstermektedir. NaCl içerisinde 2 saat bekletildikten sonra alınan Nyquist - Bode diagramları ve akım-potansiyel eğrilerinden alınan sonuçları desteklemektedir.



Şekil 5. %3,5 NaCl çözeltisi içerisinde 96 saat bekletilen çıplak (a), katkısız (b) ve katkılı (c) alüminyuma ait 100µm boyutunda SEM görüntüleri.

Şekil 3.5.a'da çıplak alüminyumun % 3,5'luk NaCl içerisinde 96 saat bekletildikten sonraki SEM görüntüleri görülmektedir. 96 saatte NaCl alüminyum yüzeyine 2 saatten daha fazla hasar vermiştir . Yüzeydeki çatlak ve çukurların sayısı artmış ve çatlak ve çukurların çevresinde NaCl kristalleri oluşmuştur. 0,4 M H₂SO₄ içerisinde oluşturulan Al/Al₂O₃'ün % 3,5'luk NaCl içerisinde 96 saat bekletildikten sonraki SEM görüntüleri Şekil 3.5.b.'de verilmiştir. Yüzeyde aşınmalar artmakta ve oksit tabakasının hasar gören yerleri NaCl kristallerinin

oluşması için uygun alanlar oluşturmaktadır. Bu kristaller çıplak alüminyuma kıyasla daha iri taneli ve belirli noktalarda yoğunlaşmaktadır. Şekil 3.5.c'de 0,4 M H₂SO₄ içerisinde yapılan 0,5 M Na₂MoO₄ katkısı ile oluşturulan Al/Al₂O₃'ün % 3,5'lük NaCl içerisinde 96 saat bekletildikten sonraki SEM görüntüleri verilmektedir. 96 saatin sonunda yüzeydeki oksit tabakasını klorür iyonları aşındırmaya başlayarak aşınan bölgelerde zayıflayan oksit tabakasının üzerinde küçük taneli NaCl kristalleri görülmektedir. Yüzey yapısı 2 saate kıyasla tahrip olmuştur. NaCl içerisinde 96 saat bekletildikten sonra alınan Nyquist - Bode diagramları ve akım-potansiyel eğrilerinden alınan sonuçları desteklemektedir.

Sonuçlar

Katkılı elektrota ait ölçümde Şekil 3.1.'de de görüldüğü gibi her iki tabakaya da ait faz açıları çıplak (R_p ~3972 Ω) ve katkısız elektrota (R_p ~6241 Ω) ait ölçümlerle kıyasla oldukça artmıştır. Bu aynı zamanda yüksek bir polarizasyon direnci demektir (R_p ~31350 Ω). 96 saatlerde ise ilk luplara ait faz açıları birbirine yakın olmasına karşılık ikinci luplara ait faz açıları katkılı elektrota ait faz açısı daha fazladır. Bu da por direnci yakın olmasına rağmen katkılı elektrottaki yüzeydeki oksite ait bariyer tabakasının daha koruyucu olduğunu göstermektedir. En son günde alınan (96 saat) akım-potansiyel eğrilerdeki anodik yöndeki akımları kıyaslamak için -0,5 V'daki akımlara bakıldığında, en yüksek akım çıplak alüminyuma, sonraki katkısız sülfürik asit içerisinde anodizing işlemi gören elektrota ve en düşük akım ise katkılı sülfürik asit içerisinde anodizing işlemi gören elektrota aittir. Bu da bariyer tabakanın etkinliğini göstermektedir. Alınan SEM görüntüleri içerisinde çıplak, katkısız ve katkılı elektrolit içerisinde anodizing işlemi görmüş elektrot yüzeyleri kıyaslandığında katkılı olana ait, homojen, düzgün ve yüzeyi tamamen kaplayan oksit tabakası, Nyquist- Bode diagramları ve akım-potansiyel eğrilerinden alınan sonuçları desteklemektedir. Klorür (Cl⁻) iyonları içeren ortamda alınan görüntüler ile kıyaslandığında 2 saat'lik ölçüm içerisinde, çıplak alüminyum ve katkısız ortamda anodizing işlemi görmüş alüminyumun yüzeyindeki, doğal yada kontrollü ortamda oluşturulan oksit yapısı bozularak çukurların ve çatlakların oluştuğu görülmektedir. Katkılı ortamda anodizing işlemi görmüş alüminyumun yüzeyinde ise çukur ve çatlak oluşumu görülmemektedir. 96 saatlik bekleme sonucunda üç elektrotunda yüzeyinin bozulduğunu Nyquist- Bode diagramları ve akım-potansiyel eğrilerinden alınan sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde korozyona karşı bariyer tabakanın koruyuculuğunun katkılı olana nispeten daha iyi olduğu söylenebilir.

Kaynaklar

MOUTARLIER, V., GIGANDET, M.P., PAGETTI, J., RICQ, L., 2003. Molybdate/ Sulfuric Acid Anodizing of 2024-Aluminium Alloy: Influence Of Inhibitor Concentration On Film Growth And On Corrosion Resistance. Surface and Coatings Technology, 173: 87-95.

- MOUTARLIER ,V., GIGANDET, M., P., NORMAND, B., PAGETTİ, J., 2005. EIS characterisation of anodic films formed on 2024 aluminium alloy, in sulphuric acid containing molybdate or permanganate species. *Corrosion Science* 47, 937–951.
- ONO, S., MASUKO, N., 2003. Evaluation of pore diameter of anodic porous films formed on aluminum. *Surface and Coatings Technology*, 169 – 170 , 139–142.
- SHIH, H.H., TZOU, S.L., 1999. Study of anodic oxidation of aluminum in mixed acid using a pulsed current. *Surface and Coatings Technology*,124: 278–285.
- TSANGARAKI-KAPLANOGLU, I., THEOHARI, S., DIMOGERONTAKIS, TH., WANG, Y.M., KUO, H.H., KIA, S., 2006. Effect of alloy types on the anodizing process of aluminum. *Surface and Coatings Technology*, 200: 2634 – 2641.
- THOMPSON, G., E., WOOD, G., C., 1983. *Treatise on Materials Science and Technology, Anodic Films on Aluminium*. J.C. Scully (Ed.), vol. 23. US Patent 4894127, 1990.
- YOUNG, L., 1961. *Anodic Oxide Films* Academic Press.

**GLİKOL+SÜLFÜRİK ASİT İÇERİSİNDE ANODİZİNG UYGULANMIŞ 7075
ALUMİNYUM ALAŞIMININ % 3,5 NaCl İÇERİSİNDEKİ KOROZYON
DAVRANIŞLARI***

*Corrosion behaviours of 7075 aluminum alloy anodized glycol+sulfuric acid in 3,5%
NaCl*

Sevgi ATEŞ
Kimya Anabilim Dalı

Birgül YAZICI
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, anodizing yöntemiyle alüminyum yüzeyinde oksit filminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için 7075 alüminyum alaşımının yüzeyinin anodizing işlemiyle Glikol+ H₂SO₄ çözeltilerinde en iyi kaplandığı ortam koşulları belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; en uygun Glikol derişimi 0,5 M, en uygun potansiyel 2 V olarak saptanmıştır. Bu şekilde kaplanan 7075 alüminyum alaşımının korozyon davranışları % 3.5 NaCl içerisinde araştırılmıştır. Bu amaçla, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), Akım-Potansiyel eğrileri ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 0,5 M glikol+0,4 M H₂SO₄ ortamında anodizing uygulanan alaşımlarda Al₂O₃ filminin korozyon dayanımı, çıplak 7075 alüminyuma göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca SEM görüntülerinden de yüzeyin en iyi korunduğu ve homojen olarak en iyi film gelişiminin glikol içeren koşuldaki oksit kaplamasına ait olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Anodizing, glikol, korozyon, alüminyum.

ABSTRACT

In this study, The development of oxide film on the aluminium surface was aimed with anodizing method. For this, the surface of 7075 aluminum alloys was determined which the conditions coated with anodizing process in Glycol + H₂SO₄ solution. According to the results obtained; the most suitable concentration of Glycol (0,5 M) ,the most suitable potential (2 V) was determined. The corrosion behavior of 7075 aluminum alloy which the thus-coated was investigated in 3.5% NaCl. This purpose, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) curves, the current-potential curves, and scanning electron microscope (SEM) images were obtained. The results show that; The corrosion performance of Al₂O₃ film (which have anodizing in 0,5 M Glycol +0,4 M H₂SO₄ containing) much better than bare 7075 aluminium alloy. In addition, the best films development of the most well-preserved and homogeneous morphology was found to be SEM images of the surface from of the oxide coating on the condition of the glycol.

Key Words: Anodizing, glycol, corrosion, aluminium

* Yüksek Lisans Tezi- M. Sc. Thesis

Giriş

Günümüzde teknolojinin gelişimine bağlı olarak, alüminyum ve alaşımları yeni kullanım alanları bulmakta ve alüminyum tüketimi diğer metallere göre daha fazla artmaktadır. Özellikle son yıllarda uçak'tan otomobile ve trene kadar tüm ulaşım sektöründeki araçların üretiminde en önemli malzemeler arasında yer almaktadır. Metal olarak hafif olan alüminyum, taşıt araçlarının daha az enerji ile hareket etmesinin sağlar. Bu nedenle daha ekonomik, çevreyi en az kirleten ve daha az enerji tüketen özelliklerinden dolayı imalat sektöründe alüminyum diğer malzemelere göre daha çok tercih edilmektedir. Alüminyum ve alaşımlarının hafifliği yanısıra sağlamlığı da uçakların ve dolayısı ile havacılık sektörünün gelişmesine en büyük katkıyı yapmaktadır. Endüstri ve teknoloji alanında alüminyum kullanımı günden güne artış göstermektedir. Uzay araçları dahil olmak üzere hava taşıtları, daha sağlam binalar ve köprüler, elektrik nakil hatları, diğer mühendislik uygulamaları için alüminyum vazgeçilmez bir malzemedir (TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası, Alüminyum Raporu, Erişim Tarihi Haziran 2014).

Bilindiği gibi sanayileşme ile birlikte yaşanan çevre sorunları dünyamızdaki yaşamı tehdit eder boyutlara erişmiştir. Dünya enerji kaynaklarının ve ekolojik dengenin korunması için en sağlıklı yol yakıt tasarrufuna yönelerek enerji tüketimini, dolayısıyla enerji üretimini azaltmaktır. Bu amaca yönelik en etkili yöntemlerden birisi hafif ve geri dönüşümlü malzeme kullanımudur. Bu nedenle alüminyumun, bu ihtiyacı karşılayacak özellikte çevre dostu bir metal olarak, kullanım alanları ve tüketimi sürekli artmaktadır.

Günümüze kadar alüminyum alaşımları, değişik kompozisyonlarda ve farklı ısıl işlemler ile farklı özelliklerde bir çok kullanım sahası bulmuştur. Ancak gelişen teknolojinin ihtiyacı daha mukavemetli, sert, düşük yoğunluklu, üstün özelliklere sahip malzemeler geliştirilmekte ve bunların başında da anodizing işlemi ile dayanımları artırılmış alüminyum kaplamalar gelmektedir.

Son zamanlarda alüminyum ve alaşımlarının yüzeyindeki oksit tabakasının anodizing işlemi ile geliştirilmesi amacıyla çeşitli elektrolitler kullanılmıştır. Kromik asit, sülfürik asit ve oksalik asit en çok kullanılanlardır (Jiang, 2007). Fakat kromik asit çevreye zararlı elektrolitler arasında olduğundan tercih edilmemektedir. Maliyet açısından ise en yaygın olarak sülfürik asit elektroliti kullanılmaktadır. Anodizing işleminde oluşturulan oksit filminin kalitesini etkileyen en önemli etkenlerde biri de uygulanan potansiyeldir. Anodizing potansiyelinin alaşımlar üzerindeki etkisi saf alüminyuma kıyasla daha düşüktür. Alüminyum oksit yüzeyindeki por büyüklüğünün yalnızca uygulanan anodizing potansiyeli ile değiştirilebileceği ileri sürülmüştür (Tsangarakı-Kaplanoglou, 2006). Anodizing uygulamasında etkili olan diğer etmen elektrolit cinsi ve derişimidir (Ren, 2012).

Bu çalışmanın amacı; glikol ve sülfürik asit çözeltisinde alüminyum yüzeyindeki alüminyum oksit (Al_2O_3) tabakasının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Anodizing işleminde glikol ilavesiyle oluşturulan Al_2O_3 tabakasının dayanımı % 3,5 NaCl içerisinde korozyon testleri ile araştırılarak, çıplak ve glikol içermeyen ortamdaki oksit tabakası ile kıyaslanmıştır.

Materyal ve Metod

Materyal

Çalışma Elektrotları: 7075 Alüminyum alaşımından hazırlanan; Çıplak alüminyum (CAI), Yüzeyi oksit ile kaplı alüminyum (Al/Al_2O_3) çalışma elektrotları kullanılmıştır. 7075 Alüminyum alaşımının Kimyasal bileşimi aşağıda verilmektedir; 7075 Alüminyum alaşımı: 0,40 %Si, 0,60 %Cu, 0,30 % Mn, 5,6 % Zn, 0,50 % Fe, 0,20 % Ti, 2,5 % Mg, 0,3 % Cr.

Karşı Elektrot: Platin levha

Referans Elektrot: Gümüş-gümüş klorür elektrot; $Ag/AgCl, Cl^-$ (3,0 M KCl).

Çözeltiler: 0,4 M H_2SO_4 çözeltisi anodizing işlemi ve AC İmpedans ile Akım-Potansiyel ölçümleri için kullanılmıştır. 0,4 M $H_2SO_4 + X$ M Glikol (0,1 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 M) çözeltisi anodizing işlemi için kullanılmıştır.

Korozyon testlerinde kullanılmak üzere; % 3,5 NaCl çözeltisi hazırlanmıştır.

Referans Elektrot: $Ag|AgCl_{(k)}, Cl^-_{(doygun)}$ elektrot kullanılmıştır.

Elektrokimyasal Analiz Cihazı: Anodizing işlemi ve AC İmpedans eğrileri ile akım-potansiyel eğrilerinin elde edilmesi CHI 604 D Electrochemical Analyzer cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Leo 440 SEM Instrument, COXEM CX 200): Elektrotların yüzey yapılarının analizi için kullanılmıştır.

Metal parlatici: Elektrot yüzeylerinin parlatılmasında kullanılmıştır.

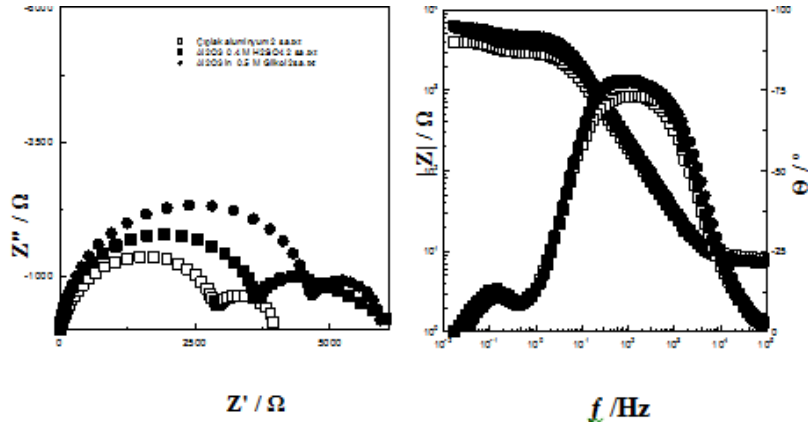
Metod

Çalışma elektrotlarını hazırlamak amacıyla; 7075 alüminyum alaşımından 1 cm çapında silindirik çubuklar 5 cm uzunluğunda kesilerek, taban alanlarından bir tanesi delinmiş ve iletkenliği sağlamak için bakır tel geçirilmiştir. Sadece çalışma yüzeyi açıkta kalacak şekilde polyester ile kaplanmıştır. Çalışma elektrotlarının yüzey alanı $0,785 \text{ cm}^2$ dir. Alüminyum yüzeyinde Al_2O_3 oksit kaplaması anodizing işlemi ile oluşturulmuştur. Sistemde çalışma elektrotu olarak alüminyum elektrot; karşı elektrot olarak platin elektrot; referans elektrot olarak ise; gümüş-gümüş klorür elektrot ($Ag, AgCl/Cl^-$) kullanılmıştır. Uygun potansiyeli belirlemek için ; oda sıcaklığında, atmosfere açık koşullarda 0,4 M H_2SO_4 elektroliti içerisinde farklı potansiyeller (0,5-2 V) 30 dakika boyunca uygulanarak anodizing işlemi uygulanmıştır. Uygun katkı derişimini belirlemek için; aynı koşullarda belirlenen 2 V potansiyelde 0,4 M H_2SO_4 elektroliti içersine farklı derişimlerde (0,1 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 M) glikol katkısı yapılarak anodizing işlemi uygulanmıştır. Anodizing işleminde en uygun katkı derişimi 0,5 M, en uygun potansiyel 2 V olarak belirlenmiştir (İmpedans ve Tafel eğrileriyle). Böylece anodizing işlemiyle kaplanan elektrotlar, %3,5 NaCl çözeltisine daldırılarak, korozyon dayanımları belirlenmiştir. Sistemde çalışma elektrotları olarak; anodizing işlemi uygulanmış (Al/Al_2O_3) ve uygulanmamış (CAI) olan alüminyum elektrotlar; karşı elektrot olarak Pt, referans elektrot olarak gümüş-gümüş klorür elektrot ($Ag, AgCl/Cl^-$) kullanılmıştır. %3,5 NaCl çözeltisine daldırılan elektrotlara açık devre potansiyelleri değerinde, $10^5 - 10^{-3}$ Hz frekans aralığında 5 mV genlik uygulanarak, farklı saatlerde (2,96 saat) EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Açık devre potansiyellerinden başlayarak -1,8 V

aralığında 5 mV tarama hızı ile Akım-Potansiyel eğrileri 96 saat süre sonunda elde edilmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma Al/Al₂O₃'in %3,5 NaCl İçerisinde Korozyon Davranışları AC İmpedans Ölçümleri

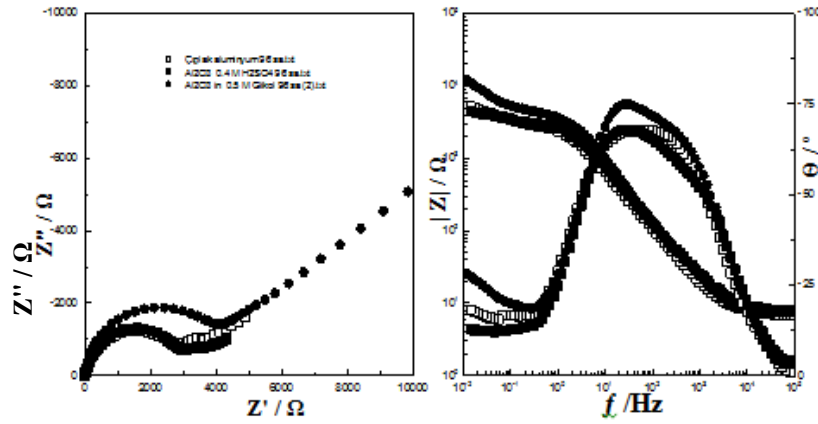
Çıplak, Glikol içeren (0,5 M) ve içermeyen koşullarda 0,4 M H₂SO₄ içerisinde 2 V'da anodizing işlemi uygulanan alüminyum elektrotların, %3,5 NaCl içerisinde sabit sıcaklıkta (295 K), atmosfere açık koşullarda, karıştırılmadan, kararlı açık devre potansiyeline ulaştıktan sonra, 5 mV sinüzoidal genlik uygulanarak 10⁵ – 10⁻³ Hz frekans aralığında 2 ve 96 saat sonunda alınan ölçümlerle Nyquist ve Bode Eğrileri elde edilmiştir.



Şekil 1. Çıplak, Glikol içeren ve içermeyen 0,4 M H₂SO₄ içerisinde anodizing işlemi uygulanan alüminyum elektrotların %3,5 NaCl içerisinde 2 saat bekleme süreleri sonunda elde edilen (a) Nyquist ve (b) Bode eğrileri

Şekil 1 incelendiğinde Çıplak (CAI) alüminyum elektrotu için elde edilen Nyquist diagramında iki farklı bölge gözlenmiştir. Eğride yüksek frekans bölgesinde başlayan orta frekans bölgesinde devam ilk lup'un varlığı görülmektedir. Bu bölge (10⁵ Hz ile 10⁰ Hz aralığında) doğal oksit tabakasının direncini göstermektedir. Eğrilerin çapından belirlenen direnç, polarizasyon direncine (R_p) karşılık gelmekte olup, bu direnç değeri; düşük frekans bölgesinde bariyer tabakaya ait film direnci R_f , yüksek frekans bölgesinde poröz oksit tabakasının porlarının korozyona karşı gösterdiği R_{po} direnci, yük transfer direnci (R_t) ve difüzyon tabaka direnci R_d dirençlerinin toplamına karşılık gelir. İkinci bölge de ise düşük frekans bölgesinde oluşan ikinci lup varlığı görülmektedir. 10⁰ -10⁻² Hz aralığında yer alan bu bölgede eğrinin kuyruk kısmı yer alarak, bariyer tabaka davranışı hakkında bilgi vermektedir. Glikol içeren ve içermeyen ortamlarda anodizing işlemiyle oluşturulan Al/Al₂O₃'a ait eğrilere bakıldığında; yüksek frekans bölgesinden başlayan orta frekans bölgesinde devam eden ilk lup ile düşük frekans bölgesinde son bulan

ikinci lup'un varlığı görülmektedir. Düşük frekans bölgesinde film direnci ve metal/çözelti ara yüzeyinde oluşan koruyucu (Al_2O_3) oksit tabakasının direncinin toplamına karşılık gelen (R_f) ve yüksek frekans bölgesi, poröz tabakanın porlarının direncine karşılık gelen bölge (R_{po}) direncidir. Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi toplam direnç değeri glikol ortamında arttığı gözlenirken, çıplak ve glikol olmayan ortamda azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu durum neticesinde; glikol'un olduğu koşullarda anodizing işlemi ile oluşturulan oksit filminin, metale etkin bir koruma sağladığı söylenebilir.



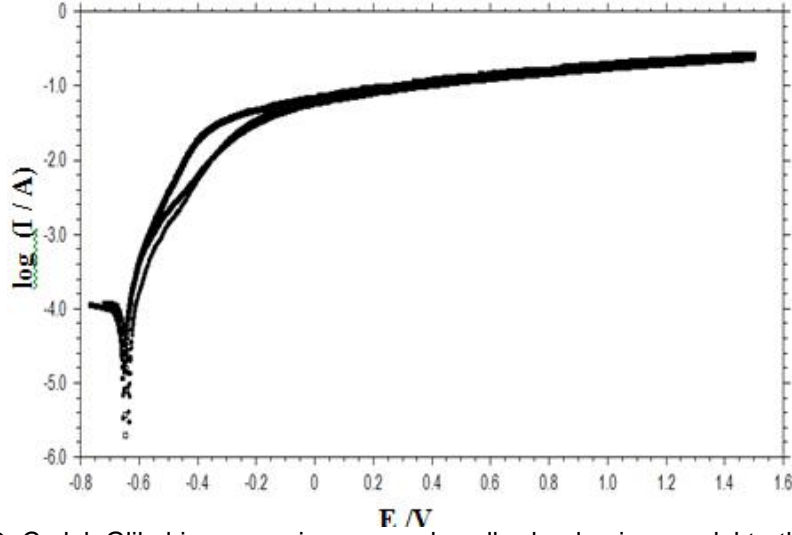
Şekil 2. Çıplak, Glikol içeren ve içermeyen koşullarda alüminyum elektrotların %3,5 NaCl içerisinde 96 saat sonunda elde edilen (a) Nyquist ve (b) Bode eğrileri

Şekil 2.'de 96 saat sonunda çıplak(CAI), glikol içeren ve içermeyen koşullarda anodizing işlemiyle oluşturulan Al/Al_2O_3 elektrotlara ait eğriler görülmektedir. Üç ortamda'da yüksek frekans bölgesinde oluşan bir lup ile, düşük frekans bölgesinde oluşan açılal kısımların varlığı görülmektedir. Düşük frekans bölgesinde oluşan bu açılal kısım, örtünün yavaş yavaş daha kararlı ve daha sıkı bir konum oluşturmaya başladığını göstermektedir. Örtünün sıkı ve koruyucu olması ölçüsünde oluşan kuyruk dik bir konum alır (Erbil, 2012). Şekil 4.2.'den de görüldüğü gibi 45 dereceye en yakın konum, glikol ortamında elde edilen eğriye aittir. Böylece glikol ortamında anodizing uygulanarak oluşturulan oksit tabakasının diğer ortamlara (çıplak ve glikol içermeyen) kıyasla en kararlı, sıkı ve koruyucu bir yapı oluşturduğu söylenebilir. θ faz açıları incelendiğinde, glikol ortamında faz açısının en yüksek değerinde ($\sim 75^\circ$) olduğu görülmektedir.

Akım-Potansiyel Eğrileri

Şekil 4.3.'de Çıplak, Glikol içeren ve içermeyen ortamda 0,4 M H_2SO_4 içerisinde anodizing işlemine tabi tutulan alüminyum elektrotların, % 3,5 NaCl içerisinde sabit sıcaklıkta (295 K), atmosfere açık koşullarda, karıştırılmadan, açık

devre potansiyeli ile 1,5 V'luk potansiyel aralığında, 5mV/s tarama hızıyla, 96 saat bekleme sürecinin sonunda, elde edilen Akım-Potansiyel Eğrileri verilmektedir.

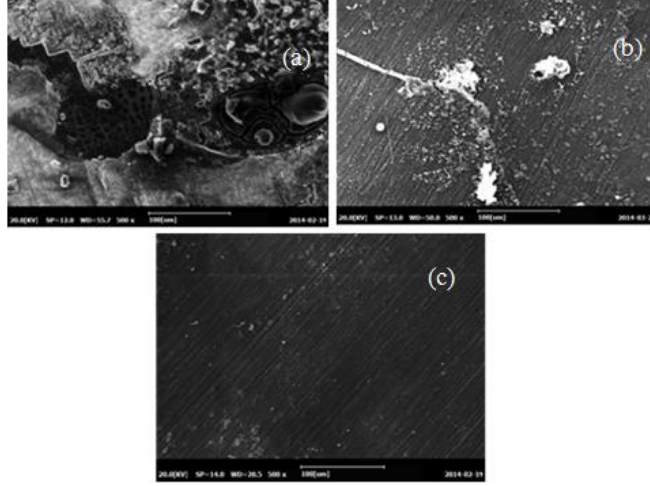


Şekil 3. Çıplak, Glikol içeren ve içermeyen koşullarda alüminyum elektrotların %3,5 NaCl içerisinde 96 saat sonunda elde edilen Akım-Potansiyel Eğrileri

Şekil 3. incelendiğinde 96 saat bekleme süresi sonunda elde edilen Akım-Potansiyel eğrileri incelendiğinde; glikol olduğu koşullarda elde edilen eğriden belirlenen denge potansiyelinin, çıplak ve glikol içermeyen ortamda oluşturulan eğriden bulunan denge potansiyellerine kıyasla daha soy potansiyellere kaymış olması, bu ortamda oluşturulan oksit tabakanın daha etkin ve daha koruyucu olduğunu gösteren önemli bir kanıttır. Glikol içeren ortamda'ki eğrinin diğer durumlardaki eğrilere kıyasla akım değerinin düşük olduğu görülmektedir. Bu da glikol varlığında oluşturulan kaplamanın yüzeyde daha kararlı olduğunu göstermektedir.

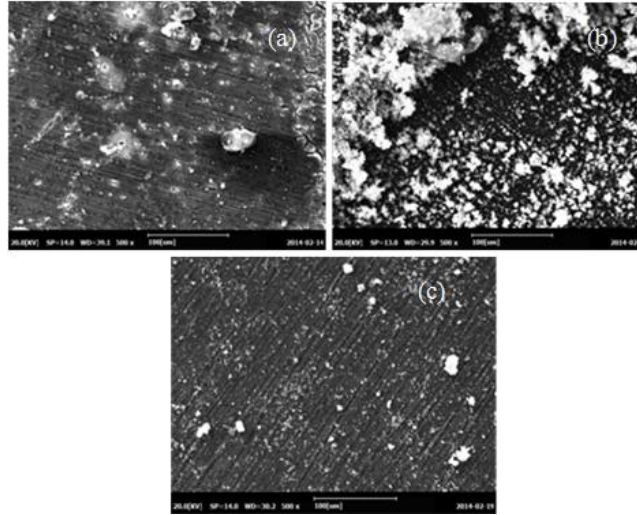
SEM Görüntüleri

(a) çıplak(CAl),(b) glikol içermeyen ortamda anodizing işlemi uygulanan ve (c) glikol olduğu koşullarda anodizing işlemine tabi tutulan Al/Al₂O₃ elektrotların, % 3,5 NaCl içerisinde, 2 saat bekletildikten sonra, yüzey yapılarının Taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri alınarak incelenmiştir.



Şekil 4. (a) Çıplak(CAI), (b) glikol içermeyen ortam ,(c) glikol olduğu koşullarda anodizing işlemi uygulanan Al/Al₂O₃ elektrotların %3,5 NaCl içerisinde 2 saat sonunda elde edilen SEM görüntüleri.

Şekil 4'de görüldüğü gibi NaCl içerisinde 2 saat bekleme süresinden sonra alınan yüzey görüntüleri incelendiğinde, glikol ortamında elde edilen yüzey görünümü, çıplak ve glikol içermeyen koşullardaki yüzeye kıyasla daha homojen ve daha sıkı taneli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5. (a) çıplak(CAI), (b) glikol içermeyen ortam ,(c) glikol olduğu koşullarda anodizing işlemi uygulanan Al/Al₂O₃ elektrotların %3,5 NaCl içerisinde 96 saat sonunda elde edilen SEM görüntüleri.

Şekil 5'de görüldüğü gibi %3,5 NaCl içerisinde 96 saat bekleme süresinden sonra alınan yüzey görüntülerinde, glikol ortamında elde edilen yüzey görünümü, çıplak ve glikol içermeyen koşuldaki yüzeylere göre en az tahribata sahiptir. Çıplak ve glikol olmayan koşullarda elde edilen yüzey görüntüsünde farklı tanecik boyutunda yumrulu yapılar gözlenmektedir. Glikol yüzeyinin daha homojen ve daha sıkı taneli olduğu tespit edilmiştir. Üç ortamda da elde edilen yüzey görüntülerinde daldıran tuz çözeltisinden kalıntılar görülmektedir.

Sonuçlar

Bu çalışmada, korozyona karşı uygulamalarda daha ekonomik, daha verimli yöntem olan anodizing işlemiyle; alüminyum üzerinde oluşan doğal oksit tabakasının geliştirilerek dayanımının artırılması hedeflenmiştir. Bu çalışma ile 7075 alüminyum alaşımının yüzeyinde, anodizing işlemiyle glikol içeren ortamda oluşturulan Al/Al₂O₃'ün, %3,5 NaCl çözeltisinde korozyon dayanımı araştırılmıştır. Glikol ortamında oluşturulan oksit tabakasının dayanımı, çıplak ve glikol içermeyen ortamlardaki oksit filmlerine göre kıyaslanmıştır. Anodizing işlemine glikol ilavesiyle oluşturulan oksit filminin diğer ortamlara kıyasla en kararlı, sağlam ve homojen özellikte olduğu gözlemlenerek, metale daha etkin bir koruma sağlandığı tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- ERBİL, M., 2012. Korozyon İlkeler ve Önlemler. Poyraz Ofset, Ankara, 373 s
- JIANG, X.Q., MISHRA, N., TURNER, J.N., SPENCER, M.G. , 2007. Freestanding Alumina Membrane By Double-Layer Anodization. Ieee Transactions On Nanotechnology, 6(3): 328-333.
- REN, J., ZUO, Y., 2012. The anodizing behavior of aluminum in malonic acid solution and morphology of the anodic films. Applied Surface Science, 261: 193– 200.
- TSANGARAKI-KAPLANOĞLU, I., THEOHARI, S., DIMOGERONTAKIS, T.H., KALLITHRAKAS-KONTOS, N., MING-WANG, Y., HONGHSIANG KUO, H., KIA, S., 2006. An Investigation Of Electrolytic Coloring Process Of Anodized Aluminium Coatings. Surface and Coatings Technology, 201: 2749-2759
- TMMOB METALURJİ MÜHENDİSLER ODASI-ALUMİNYUM RAPORU. Alüminyum Komisyonu, <http://www.metalurji.org.tr/arsiv/05> sektörel rapor/alüminyum raporu.pdf (Erişim Tarihi : Haziran 2014).

KARBOKSİLİK ASİT TÜREVLERİ VE POLİMERLERİNİN ANTİFRİZLERDE İNHİBİTÖR OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ*

*Of the Carboxylic Acid Derivatives and Their Polymers Investigation of Usability As Inhibitors in Antifreezes **

Esra ERGİN PEKMEZ
Kimya Anabilim Dalı

Selahattin SERİN
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Tez kapsamında, Yüksek metal iyonu bağlama kapasitesi ve korozyon inhibitörleri olarak kullanılabilir niteliklere sahip polikarboksilik asit polimerleri sentezlenmiştir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanılarak polimerlerin molekül ağırlıkları belirlenmiş ve IR, erime noktası tayini ile karakterize edilmiştir. Polimerlerin (Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Ni^{2+}) iyonlarını tutma kapasitesi "hamphshire" testine göre yapılmıştır.

Sentezlenen polimerlerin ve sodyum benzoatın İnhibitör etkinliği 0,1 M hidroklorik asit çözeltisi ve 0,1 M sodyum hidroksit çözelti ortamında incelenmiştir. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) tekniği ile deneyler açık devre potansiyelinde, 10^5-10^{-3} Hz frekans aralığında 5 mV genlik uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Nyquist, Bode ve Faz Açısı diyagramları şeklinde gösterilmiş ve polimerlerin polarizasyon direncileri piyasada inhibitör olarak kullanılan sodyum benzoatla karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnhibitör etkinliği, Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), Metal iyonu bağlama kapasitesi

ABSTRACT

Scope of the thesis, polymers of polycarboxylic acids which not only have high metal ion binding capacity but also used as inhibitor in corrosion were synthesized. Molecular weight of the polymers was determined by using Gel permeation chromatography (GPC). With detecting of melting point and IR are characterized. Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} ions holding capacity of polymers "hamphshir" according to the test was made.

The inhibitor effectiveness of the polymers synthesized and sodium benzoate was investigated in the environment of 0.1 M hydrochloric acid solution. Experiments, by using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) the technique, were performed 105-10-3 Hz frequency range by applying a 5 mV amplitude in the open circuit potential. The resulting data Nyquist, Bode and Phase angle on diagrams was shown and polarization resistances of the polymers are compared with sodium benzoate used as inhibitors in the market.

Key words: The inhibitor effectiveness, Gel permeation chromatography (GPC), Metal ion binding capacity

* Yüksek Lisans Tezi- MSc. Thesis

Giriş

Karboksilik asitler, Yapısında karboksil grubu (-COOH) bulunduran ve R-COOH veya Ar-COOH genel formülü ile gösterilebilen organik bileşiklerdir. Zayıf asitler olarak kabul edilen karboksilli asitlerde asitlik, karboksil grubuna bağlı alkil veya aril gruplarının niteliklerine büyük ölçüde bağlıdır (Başkan, 2009). Küçük molekülü karboksilik asitler suda çok çözümler ve kaynama noktaları alkollerden daha yüksektir.

Bazı karboksilik asitler gıda ve ilaç ürünleri, yüzey aktif maddeler, deterjanlar ve yeşil çözücü üreten sanayilerde çeşitli uygulamaları vardır. Şu anda, karboksilik asitler, biyolojik olarak ayrışabilen(geri dönüşebilen) polimerler için ham madde olarak ilginç bir hale gelmiştir. (Hong ve ark., 2001) .

Polimerler Hakkında Genel Bilgiler

Polimer

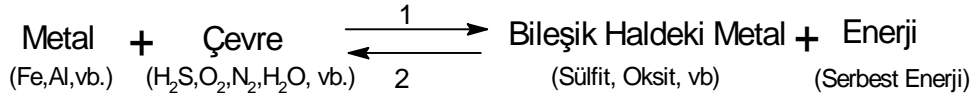
Polimer, çok sayıda küçük molekülün kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu makromoleküldür. Monomer adı verilen küçük moleküller uygun koşullarda polimerizasyon tepkimesi sonucu birbirleriyle kimyasal bağ yaparlar ve polimer moleküllerine dönüşürler (Kazancı, 2010).

Yapılarına göre sınıflandırıldığında Polimerler, homopolimer, kopolimer ve terpolimer olarak üç sınıfa ayrılır. Bir polimer tek bir monomer biriminin tekrarlanmasından oluşuyor ise "homopolimer" denir.

Eğer polimer molekülleri iki farklı monomerin birleşmesinden oluşuyorsa buna "kopolimer" denir.

Üç farklı cins monomerden oluşan polimerlere terpolimer denir.

Korozyon metalik malzemelerin içinde buldukları ortamla reaksiyona girmeleri sonucu, dışarıdan enerji vermeye gerek olmadan, tabii olarak meydana gelen bir olaydır. Yani Korozyon, metalik malzemelerin kimyasal ve elektrokimyasal reaksiyonları sonucu bozunmasıdır.



Şekil 1. Metallerin çevresel korozyonu

Ortama az miktarda katıldığında korozyon hızını azaltan maddelere korozyon inhibitörü denir. Korozyona karşı dayanıklı fakat pahalı olan bir malzeme kullanmak yerine bazı halde ortama inhibitör katılarak daha ucuz malzemelerin kullanılması yoluna gidilir. İnhibitör kullanımı çukur korozyonuna karşı en ekonomik çözüm yoludur.

MATERYAL VE METOD

Materyal

FT- IR Spektroskopisi (Thermo FT-IR spectrophotometer; Smart ITR diamond attenuated total reflection (ATR); 4000-400cm⁻¹)

GPC; Shimadzu cihaz ve A2500, Aq GPC/SEC viskoteke marka sulu faz kolonu

DSC cihazı; Pelkin Elmer DSC 4000

Elektrokimyasal Analiz Cihazı; (CHI 604A Electrochemical Analyzer, Seri No. 6A721A): EIS ölçümü alınmıştır.

Metod

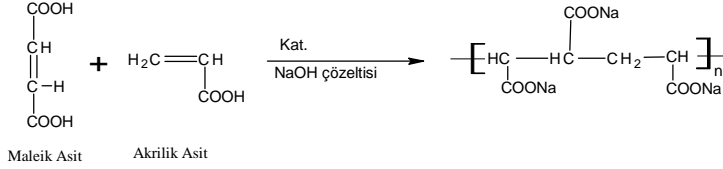
Bu çalışmada;

- Ø %97 Akrilik Asit, %3 Maleik Anhidrit kopolimeri (AMKP),
- Ø %94.76 Akrilik Asit, %4,99 Maleik Anhidrit ve %0,25 Sodyum Vinil Sülfonat terpolimeri(AMVSTP-1),
- Ø %90 Akrilik Asit ve % 10 Sodyum Vinil Sülfonat kopolimeri(AVSKP-6),
- Ø %85 Akrilik Asit ve % 15 Sodyum Vinil Sülfonat kopolimeri(AVSKP-5),
- Ø %80 Akrilik Asit ve % 20 Sodyum Vinil Sülfonat kopolimeri(AVSKP-4),
- Ø %75 Akrilik Asit ve % 25 Sodyum Vinil Sülfonat kopolimeri (AVSKP-3),
- Ø %70 Akrilik Asit ve % 30 Sodyum Vinil Sülfonat kopolimeri(AVSKP-2) kısaltmaları ile verilen poli karboksilik asit ko-ve ter-polimerler kullanıldı.

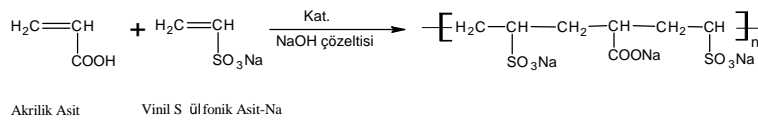
Farklı monomer yapılarına sahip polimerler sentezlenmiş ve polimerlerin Demir(III), Kobalt (II), Nikel (II) ve Bakır (II) metal iyonu bağlama kapasiteleri belirlenerek korozyon inhibitör etkisi incelendi. Tüm polimerlerin sentez yöntemleri verilmiş ve yapıları; FT-IR, GPC ile molekül ağırlıkları ve yumuşama noktası tayini DSC yöntemleriyle karakterize edildi.

Polimerinin Sentezi

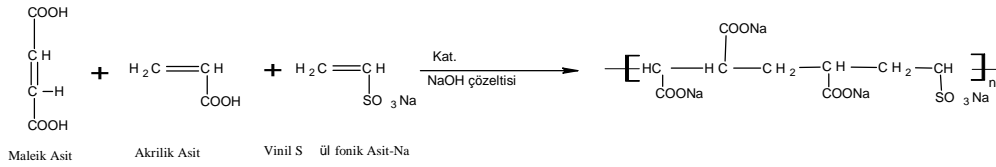
Sentezde; maleik anhidriti sulu ortamda hidroliz edilmek suretiyle maleik aside dönüştürülüp A fazı oluşturuldu ve A fazına % 24 – 26 akrilik asit, % 0,5 – 1,0 g maleik anhidrit, B fazına % 25 – 30 saf su ve % 1 – 2 amonyumperoksidisülfat alındı. B fazı 85- 90 °C arası sıcaklığa getirildi. A fazı B fazına 3 saat süresince eşit miktarlarda ilave edildi. Reaksiyon izotermal koşullarda yürümelidir. 3 saat bittikten sonra 15 dk. karıştırıldı. % 0,04 – 0,07 sodyumbisülfat polimer sonlandırıcı olarak verildi. Son ilaveden sonra reaksiyon sıcaklığı 45 °C' ye getirilir. % 40 – 50 NaOH (%32'lik sulu çözeltisi) yavaşça soğutma devam ederken eklenerek pH 8,5-9,0 arasına ayarlandı. Reaksiyon kapalı kapta ve azot gazı altında gerçekleştirildi. (Toplam ağırlık yüz olacak şekilde yüzdeler hesaplandı.)



Şekil 2. "Akrilik Asit- Maleik Asit Sodyum Tuzu" Ko-polimerlerin olası monomer yapıları (Monomer Molekül Ağırlığı: 254g/mol)



Şekil 3. "Akrilik Asit-Vinil Sülfonat Sodyum Tuzu" Ko-polimerlerin olası monomer yapıları (Monomer Molekül Ağırlığı: 224g/mol)



Şekil 4. "Akrilik Asit-Maleik Asit-Vinil Sülfonat Sodyum Tuzu" Terpolimerlerin olası monomer yapıları (Monomer Molekül Ağırlığı: 352g/mol)

Polimerlerin GPC Analiz Ölçümü

Polimerlerin ortalama molekül ağırlığı jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) schimadzu marka cihaz ile A2500, Aq GPC/SEC viskoteck marka sulu faz kolonu ve 35°C'de refraktif-indeks (RI) dedektör kullanılarak yürütücü faz olarak ultra saf su ile 1mL/dk. çözücü akış hızında ölçüldü. 4000, 6000, 8000, 10000, 12000 molekül ağırlığına sahip PEG (Poli etilen glikol) Standartları 300 ppm olacak şekilde sulu çözeltileri hazırlanmış ve çözücü olarak da deiyonize saf sudan New Human Power-1 ultra safsu cihazı ile hazırlanan ultra saf su kullanıldı.

Polimerlerin Korozyon Davranışının İncelenmesi

Elektrotların Hazırlanması

Yumuşak Çelik: Analiz edildiğinde 0,17 C; 0,59 Si; 1,6 Mn; 0,040 P ve Fe bileşenlerinden oluşan çalışma elektrodu kullanıldı.

Referans Elektrot: Gümüş - gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl)

Karşı Elektrot: 2 cm² yüzey alanına sahip platin elektrot karşı elektrot olarak kullanıldı.

Çalışma elektrotları silindirik metal çubuklardan 7 cm uzunluğunda kesilmiş, taban alanlarından bir tanesi delinerek iletkenliği sağlamak için bakır tel ile monte edildi. Sadece çalışma yüzeyi açıkta kalacak şekilde polyester ile

kaplandı. Hazırlanan yumuşak çelik elektrotunun yüzey alanı 0,50 cm²'di. Çalışma elektrotlarının yüzeyleri bütün ölçümlerden önce mekanik parlaticıda değişik tanecik boyutlu (320-1200) zımpara kâğıtları ile parlatıldıktan sonra sırasıyla saf su ile yıkanmış, etanolden geçirilmiş ve saf su ile tekrar yıkandıktan sonra filtre kâğıdı ile kurutulup çözeltilere daldırıldı.

Korozif ortam olarak 0,1 M HCl çözelti ortamında hazırlandı. Hazırlanan çözeltisi içerisinde 300 ppm'lik sodyum benzoat ve farklı monomer dizilişine sahip polimerler ayrı ayrı eklenerek elektrokimyasal ölçümler alındı. Tüm veriler bulgu ve tartışmalar bölümünde ele alındı.

Elektrokimyasal Ölçümler

Tüm elektrokimyasal ölçümler, üç elektrot tekniği kullanılarak atmosfere açık koşullarda 1 saat bekleme süresinin sonunda gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS): EIS tekniğinde, deneyler açık devre potansiyelinde, 10⁵-10⁻³ Hz frekans aralığında 5 mV genlik uygulanarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Nyquist, Bode ve Faz Açısı diyagramları şeklinde gösterildi.

Inhibitör etkinliği aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplandı:

$$\%IE = \frac{R_p' - R_p}{R_p'} \times 100$$

Eşitlikte R_p' inhibitörlü, R_p inhibitörsüz ortamdaki polarizasyon direncidir.

Polimerlerin (Fe³⁺, Co²⁺, Cu²⁺ Ve Ni²⁺) İyonlarını Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi:

1 gram inhibitör olarak sentezlenen polimerlerin Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺ ve Cu²⁺ metal iyonlarını bağlama kapasitesi "hamphshire" testine göre saptanması işlemidir.

1 gram sentezlenen polimer tartıldı ve 50 ml saf suda çözüldü. pH sı (0,25M NaOH çözeltisi ile 10-11 aralığına ayarlandı (pH Ölçümü pH metre ile sürekli kontrol edildi). Hazırlanan polimer çözeltisine önceden hazırlanmış 0,25 M (mol/lit) FeCl₃.6H₂O, 0,25 M CoCl₂.6H₂O, 0,25 M CuSO₄.5H₂O ve 0,25 M NiCl₂.6H₂O çözeltileri ile kalıcı partiküller oluşana kadar büretten damla damla ilave edildi. pH devamlı kontrol edilmeli ve pH düştüğünde 0,25 M NaOH çözeltisi ile tekrar pH: 10-11'e ayarlandı.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

FT-IR Analiz Verilerinin Değerlendirilmesi

AMKP'nin FT-IR (ATR) spektrumu incelendiğinde; 3500-3200 cm⁻¹'de O-H, 2935 cm⁻¹'de C-H, 1544 cm⁻¹'de C=O gerilme titreşimlerine ait piklerin görülmesi bu polimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Bu değerler literatürlerle uyum içerisinde (S'wita1a-Zeliazkow M., 2006.). AMVSTP-1'nin FT-IR (ATR)

spektrumu incelendiğinde; 3500-3200 cm^{-1} ' de O-H, 2947 ve 2877 cm^{-1} ' de C-H, 1557 cm^{-1} ' de C=O, 1109 cm^{-1} ' de $-\text{SO}_3\text{H}$ gerilme titreşimlerine ait piklerin görülmesi bu polimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Bu değerler literatürlerle uyum içerisindedir (S'wita1a-Zeliazkow M., 2006,). AVSKP-(2-6) polimerlerinin FT-IR (ATR) spektrumu incelendiğinde; 3500-3200 cm^{-1} ' de O-H, 2948 cm^{-1} ' de C-H, 1556 cm^{-1} ' de C=O, 1043 ve 1118 cm^{-1} ' de $-\text{SO}_3\text{H}$ gerilme titreşimlerine ait piklerin görülmesi bu polimerlerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Aşırı nem bağladığı için FT-IR piklerinde su titreşimleri görülmektedir. Bu değerler literatürlerle uyum içerisindedir (S'wita1a-Zeliazkow M., 2006,).

DSC Analiz bulgularının Değerlendirilmesi

DSC grafiklerinden edinilen veriler incelendiğinde polimerlerin yumuşama noktası değerleri Çizelge 1'da verilemiştir. Birden fazla yumuşama ısı değişimlerinin görülmesi tez kapsamında sentezlenen polimerlerin farklı molekül ağırlıklarında oluşmuş olabileceğinden kaynaklanmaktadır.

Sentezlenen polimerler önce 60-70°C arasında vakum etüvünde kurutulmuş ve DSC analiz metodu dakikada 20 °C artış 30 °C'den 450 °C'ye kadar ısıtma ve 450 °C'de 1 dakika bekleyerek yumuşama ısıları belirlenmiştir.

Çizelge 1. (AMKP), (AMVSTP-1) ve (AVSKP-2-6) Polimerlerinin DSC Yumuşama Sıcaklık Verileri

Polimer	DSC Sonuçları		
	1.Yumuşama	2.Yumuşama	3.Yumuşama
(AMKP)	Pik:127,9°C End:178,9°C ΔH :612,3764J/g	Pik:269,27°C End:280°C ΔH :304,057J/g	Pik: 269,27°C End: 280,94°C ΔH : 304,05 J/g
(AMVSTP-1)	Pik: 43,59°C End: 68,36°C ΔH :266,14 J/g	Pik:161,23°C End:200,75°C ΔH : 1225,21J/g	
(AVSKP-2)	Pik:137,71°C End:169,95°C ΔH :1323,79J/g	Pik:307,84°C End:323,88°C ΔH :69,5730J/g	Pik:393,35°C End:411,89°C ΔH :594,03J/g
(AVSKP-3)	Pik:149,78°C End:181,31°C ΔH :32,30 J/g	Pik:265,08°C End:284,97°C ΔH :397,58J/g	Pik:392,50°C End:406,22°C ΔH :163,5859J/g
(AVSKP-4)	Pik:162,22°C End:167,24°C ΔH :73,6982J/g	Pik:252,64°C End:269,79°C ΔH :831,03J/g	Pik:396,97°C End:405,70°C ΔH :580,3748J/g
(AVSKP-5)	Pik:158,34°C End:193,07°C ΔH :205,70J/g	Pik:292,20°C End:329,53°C ΔH :351,5544J/g	Pik:394,58°C End:404,83°C ΔH :132,3169J/g
(AVSKP-6)	Pik:158,48°C End:193,15°C ΔH :966,1588J/g	Pik:255,25°C End:279,04°C ΔH :381,8277J/g	Pik:400,57°C End:410,98°C ΔH :104,5967J/g

GPC Analiz bulgularının Değerlendirilmesi

Birleşmeyle veya ayrı-ayrı sonlanmayla ilerleyen radikalik polimerizasyonlarda teorik olarak heterojenlik indisi değerleri 1.0-1.5 arasındadır. Polimerizasyonda heterojenlik indisi aynı zamanda zincir transfer reaksiyonlarına da bağlıdır (Soykan, 2001).

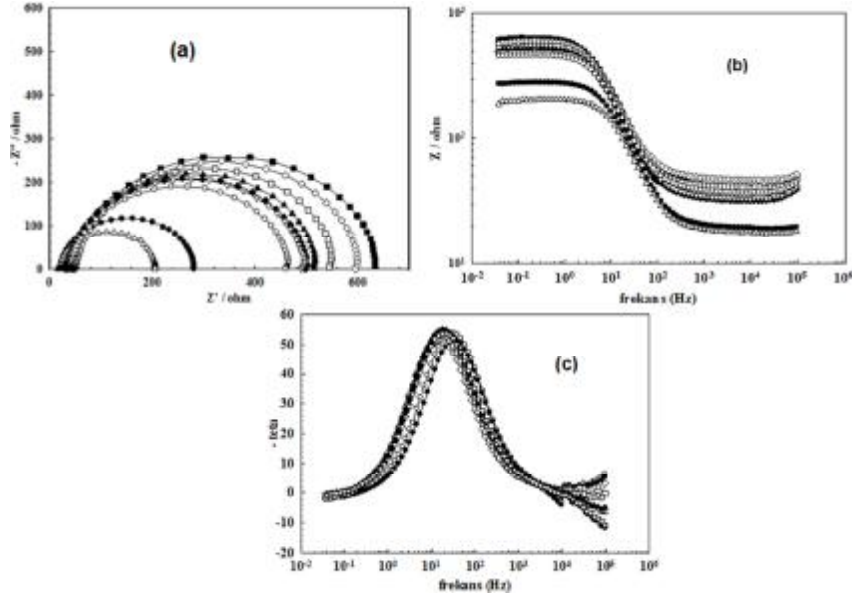
Çizelge 2. (AMKP), (AMVSTP-1) Ve (AVSKP-2-6) Polimerlerinin Ortalama Molekül Ağırlıkları

Polimer	Mn 10 ³	Mw 10 ³	Mz x 10 ³	Mz1	Mw/Mn Heterojenlik indisi
(AMKP)	20,252	21,778	23,786	26,425	1,075
(AMVSTP-1)	22,088	24,315	27,391	31,531	1,100
(AVSKP-2)	26,423	29,003	32,497	36,921	1,098
(AVSKP-3)	26,712	29,190	32,318	35,995	1,093
(AVSKP-4)	19,890	22,450	26,044	30,920	1,129
(AVSKP-5)	19,863	24,245	32,836	50,034	1,221
(AVSKP-6)	26,194	29,283	33,295	38,114	1,118

Çizelge 2'de verilen değerler incelendiğinde polimerlerin molekül ağırlıkları değişken olup 21,778x10³ ile 29,283x10³ aralığında değişmiştir ve heterojenlik indisi (Mw/Mn) değerlerinin 1 değerine yaklaşması bulunan molekül ağırlığının polimerin neredeyse tamamının hesaplanan molekül ağırlığı değerinde polimer moleküllerinden oluştuğunu belirtmektedir. Sentezlenen polimerlerin bulunan molekül ağırlıklarında olduğu ve heterojenlik indisi (Mw/Mn) değerlerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (Soykan, 2001).

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Ölçümleri

Elektrokimyasal impedans ölçümleri 1 saat boyunca dengeye gelmesi beklenmiş ve sonra ölçümler alınmıştır. Tüm ölçümler açık devre potansiyelinde 10⁵-10⁻³ Hz aralığında 5 mV genlik uygulanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. Yumuşak çelik elektrotun 0,1 M HCl ve 0,1 M HCl + farklı polimerlerin 25°C de 1 saat sonunda elde edilen (a)Nyquist eğrileri, (b)Bode eğrileri, (c)Faz Açısı

Frekans eğrileri (HCl: ●, HCl+Na-Benzoat: Δ, HCl+(AMKP):■, HCl+(AMVSTP-1): ◇, HCl+(AVSKP-2): ○, HCl+(AVSKP-3): Ñ, HCl+(AVSKP-4): ◆, HCl+(AVSKP-5): ▲, HCl+(AVSKP-6): □)

Şekil 5'de 0,1 M HCl, 0,1 M HCl + Na-benzoat, 0,1 M HCl + farklı polimerlerin Nyquist, Bode ve Faz Açısı-Frekans eğrileri görülmektedir. Yüksek frekans bölgesinde başlayan ve orta frekans bölgesinde kapanan yarım dairelerin olduğu Nyquist eğrilerinden anlaşılmaktadır. Yumuşak çeliğin farklı ortamlardaki polarizasyon dirençleri (R_p) aşağıdaki Çizelge 4.4'da verilmiştir. HCl çözeltisine Sodyum benzoat eklenmesi Bode eğrilerinden okunan R_p değeri azalmasına karşın bu HCl çözeltisine polimerlerin eklenmesi sonucunda ise R_p değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum ortama eklenen polimerlerin metal yüzeyi ile etkileşen moleküllerin metal yüzeyini koruyucu bir film tabakası ile kapattığı söylenebilir (Bentiss ve Ark., 1999, Lagrenee ve Ark., 2002).

Çizelge 3. 0,1M HCl elektrolit çözeltisi ortamında polimerlerin Rp, inhibitör etkinliği (% IE), EOCP ve Rs değerleri

Polimer	Rp (Ω)	% IE	EOCP (V)	Rs (Ω)
HCl	263	-	0,517	19
HCl + (Na-Benzoat)	189	-	0,527	17
HCl + (AMKP)	596	56	-0,515	40
HCl + (AMVSTP-1)	552	52	-0,519	46
HCl + (AVSKP-2)	420	37	-0,521	37
HCl + (AVSKP-3)	464	43	-0,520	33
HCl + (AVSKP-4)	468	44	-0,519	32
HCl + (AVSKP-5)	484	46	-0,517	33
HCl + (AVSKP-6)	508	48	-0,516	41

Metal İyonu Tutuculuk Bulgularının Değerlendirilmesi

Sentezlenen akrilik asit, maleik asit ve vinilsülfonik asit girdi maddelerinden oluşan polimerlerin yaklaşık %30'luk çözeltilerinden 1 gram tartılarak yapılan analizler sonucunda elde edilen Fe₂O₃, CoO, NiO, CuO metal iyonu tutuculukları karşılaştırıldığında Ni²⁺ ve Co²⁺ iyonlarının tutuculukları Fe³⁺ ve Cu²⁺ iyonlarına kıyasla çok daha az olduğu görülmüştür.

Çizelge 4. Polimerlerin Metal İyonu Tutuculukları

Polimer	Fe ₂ O ₃ bağlama Kapasitesi mg/1g polimer	CoO bağlama Kapasitesi mg/1g polimer	NiO bağlama Kapasitesi mg/1g polimer	CuO bağlama Kapasitesi mg/1g polimer
(AMKP)	767,17	204,08	341,97	420,00
(AMVSTP-1)	998,59	224,08	352,37	458,60
(AVSKP-2)	554,07	117,25	251,12	332,02
(AVSKP-3)	606,25	141,51	273,92	344,40
(AVSKP-4)	608,23	176,95	321,40	444,76
(AVSKP-5)	619,60	198,83	350,52	485,50
(AVSKP-6)	710,06	204,81	365,10	525,37

Sentezlenmiş olan bu polimerlerin zincir yapısındaki metal bağlayıcı donör grupların azlığı veya çokluğu ile ilgilidir.

Ayrıca Çizelge 4. deki polimerlerin metaller arasında en yüksek metal bağlama kapasitesi gösterdiği metalin demir olduğu görülmektedir. Sentezlenen polimerlerin demir metal iyonlarına karşı güçlü bir seçicilik gösterdiği yukardaki çizelgeden anlaşılmaktadır.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında polimerler sentezlenerek bu polimerlerin FT-IR, GPC ve DSC ile yapıları karakterize edilmiştir. GPC sonuçları incelendiğinde polimerlerin molekül ağırlıkları değişken olup $21,778 \times 10^3$ ile $29,283 \times 10^3$ aralığında değişmiştir ve heterojenlik indis (Mw/Mn) değerlerinin 1 değerine yaklaşması bulunan molekül ağırlığının polimerin neredeyse tamamının hesaplanan molekül ağırlığı değerinde polimer moleküllerinden oluştuğunu belirtmektedir.

Polimerler vakum desikatöründe 60-70 °C de kurutularak DSC analizleri alındı ve polimerlerin yumuşama sıcaklıkları belirlenmiş ve polimer türüne göre iki veya üç farklı yumuşama sıcaklıklarına sahip olduğu görülmüştür.

Bu polimerlerin metal iyonu bağlama kapasiteleri incelenmiş ve Çizelge 4.'de görülmekte olan değerler polimer zinciri üzerinde metal tutuculuğu bulunan ve oluşturulmak istenen karboksilat (donör) gruplarının zincir üzerinde artması ile metal tutuculuğunun da artması sentez yöntemimizin ve tez çalışmamızın amacı doğrultusunda sonuçlanmıştır.

Yüksek frekans bölgesinde başlayan ve orta frekans bölgesinde kapanan yarım dairelerin oluştuğu Nyquist eğrilerinden anlaşılmaktadır. Yumşak çeliğin farklı ortamlardaki polarizasyon dirençleri (Rp) Çizelge 3'da verilmiştir. HCl çözeltisine Sodyum benzoat eklenmesi Bode eğrilerinden okunan Rp değeri azalmasına karşın bu HCl çözeltisine polimerlerin eklenmesi sonucunda ise Rp değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum ortama eklenen polimerlerin metal yüzeyi ile etkileşen moleküllerin metal yüzeyini koruyucu bir film tabakası ile kapattığı, Bode eğrilerinden okunan Rp değerlerindeki artış korozyonun azaltıldığını ve sodyum benzoata karşın daha iyi bir inhibisyon özelliği sergilediğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- AKSOY D., ARAS D., BATAR B., 2010 "Korozyon" Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü
- BAŞKAN M. H. ,2009. "The Properties of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) of Carboxylic Acids", *Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi*, 12, 197-201 197
- BEREKET G., VE PINARBAŞI A., 2008; "Inhibition Effect Of Some Heterocyclic Compounds On Pure Aluminium In 0.1m Hydrochloric Acid Solution", *Corosion Sience And Engineering*, 16 (1-2)-17.

- ÇAVUŞ S., GÜRDAĞ G., YAŞAR M., GÜRKAYNAK M. A., 1983, "Selüloz-G-Poli(Akrilik Asit) Ve Hidroksietil Selüloz-G-Poli(Akrilik Asit) Kopolimerleri İle Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} İyonlarının Uzaklaştırılması" İstanbul Üniversitesi, Müh. Fak. Kimya Müh. Bölümü.
- DENZINGER W., HARTMANN H., HETTICHE A., KALUZA U., PERNER J., VAMVAKARIS C., 1987, "Copolymers For Detergents And Cleaning Agents" United States Patent, Patent Number: 4,647,396.
- ERBİL, M., 1984. Korozyon İnhibitörleri. SEGEM, Ankara, 148.
- HONG W. H., HONG Y. K. AND HAN D. H., 2001, "Application of Reactive Extraction to Recovery of Carboxylic Acids", *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 6: 386-394
- GALE D. J., 1972, "Copolymers Of Maleic Acid And Acrylic acid" Patent 3,635,915 United States Patent Office
- GERSHUN A.V., MERCER W. C. , WOYCİESJES P. M., (1998), "Antifreeze Concentrates And Compositions Comprising Neodecanoic Acid Corrosion İnhibitors" United States Patent, Patent Number: 5,741,436.
- KAZANCI A., 2010, "Polimer Schiff Bazları Ve Metal Komplekslerinin Sentezi Ve Katalizör Özelliklerinin İncelenmesi" Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- KILINÇÇEKER G., VE ERBİL M., 2008, "The Influence Of Temperature, Ph And Phosphate Ion (PO_4^{-3}) On Dissolution And Passivation Of Brass Korozyon", *Corosion Sience And Engineering* 16 (1-2)-8.
- LIANG X., SU Y., YANG Y., QIN W., 2012, "Separation and recovery of lead from a low concentration solution of lead(II) and zinc(II) using the hydrolysis production of poly styrene-co-maleic anhydride" *Journal of Hazardous Materials* 203–204 (183–187).
- LEE W., LEE T.G., AND KOH W., 2007, "Grafting of Poly(acrylic acid) on the Poly(ethylene glycol) Hydrogel Using Surface-initiated Photopolymerization for Covalent Immobilization of Collagen" Department of Chemical Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749,
- OKAY O., İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 80626 Maslak, İstanbul,
- ÖZCAN M., 2005, "Tiyöüre Ve Türevlerinin Yumuşak Çeliğin Asidik Ortamda Korozyonuna Sistematik Etkilerinin Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi" Çukurova Üniv. Doktora Tezi.
- QIU Y., MAO L., 2013, "Removal of heavy metal ions from aqueous solution by ultrafiltration assisted with copolymer of maleic acid and acrylic acid" *Desalination* 329 (78–85).
- POMOGAILO A.D., 2010, "Macromolecular Metal Carboxylates and Their Nanocomposites", Springer Series in Materials Science 138, DOI 10.1007/978-3-642-10574-6 2,

- RIVAS B. L., SEGUÉL G.V., (1999), "Poly(acrylic acid-co-maleic acid)-metal complexes with copper(II), cobalt(II), and nickel(II) Synthesis, characterization and structure of its metal chelates" *Polyhedron* 18 (2511-2518).
- SHI W., DING C., YAN J., HAN X., LV Z., LEI W., XIA M., WANG F., 2012, "Molecular dynamics simulation for interaction of PESA and acrylic copolymers with calcite crystal surfaces" *Desalination* 291 (8-14).
- SENTHILMURUGAN B., GHOSH B., KUNDU S.S., HAROUN M., KAMESHWARI B., 2010, "Maleic acid based scale inhibitors for calcium sulfate scale inhibition in high temperature application" *Journal of Petroleum Science and Engineering* 75 (189-195).
- SOYKAN C., İLTER Z., 2001, " Alkil Metakrilatların Glisidilmetakrilat İle Kopolimerlerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu" *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17 (1-2), 103-110,
- STOYANOVA, A.E., PEYERIMHOFF, S.D., 2002. On the Relationship between Corrosion Inhibiting effect and Molecular Structure. *Electrochimica Acta*, 47: 1365-1371.
- S'WİTA1A-ZELIAZKOW M., 2006, "Thermal degradation of copolymers of styrene with dicarboxylic acids - II: Copolymers obtained by radical copolymerisation of styrene with maleic acid or fumaric acid" *Polymer Degradation and Stability* 91, (1233-1239).
- YADLA S. V., SRIDEVI V., LAKSHMI M.V.V.C., KUMARI S.P.K., 2012, "A Review On Corrosion Of Metals And Protection" *International Journal Of Engineering Science & Advanced Technology* Vol.-2, Issue-3, 637 – 644.

FOSFİN METAL KOMPLEKSLERİNİN SENTEZLENMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ *

Synthesis of Phosphine Metal Complexes and Investigation of Electrochemical Properties

Gurbet Yerlikaya
Kimya Anabilim Dalı

Osman Serindağ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

N,N-bis(difenilfosfinometil)aminoter-bütül, $dppa^t_b$, ve *N,N*-bis(difenilfosfinometil)aminometil, $dppam$, ligandları ile Pt(II) ve Pd(II) metal kompleksleri, *N,N*-bis(difenilfosfinometil)aminobütül, $dppab$, ligandı ile Heteroleptik Cu(I) ve Pt(II) metal kompleksleri Schlenk tekniği ile sentezlenmiştir. $Dppa^t_b$, $dppam$ ligantları ile sentezlenen Pt(II) ve Pd(II) komplekslerinin nükleobazlarla (timin, urasil, teofilin) reaksiyonu ile nükleobaz içeren heteroleptik metali kompleksleri sentezlenmiştir. Sentezlenen komplekslerin yapıları spektrometrik teknikler kullanılarak aydınlatılmış, termal kararlılıkları ve elektrokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aminometilfosfin, Heteroleptik Metal Kompleksleri,

ABSTRACT

N,N-bis(diphenylphosphinomethyl)aminoter-butyl, $dppa^t_b$, and *N,N*-bis(diphenylphosphinomethyl)aminomethyl, $dppam$ ligands were prepared and its Pd (II), Pt (II) complexes were synthesized. Likewise, *N,N*-bis(diphenylphosphinomethyl)aminobutyl, $dppab$ ligands were prepared and its heteroleptic Cu (I), Pt (II) metal complexes were synthesized by Schlenk Technique under nitrogen atmosphere. Heteroleptic metal complexes were synthesized by the interaction of palladium and platinum metal complexes with nucleobases. All the metal complexes have been characterized by spectroscopic techniques and Their electrochemical properties and thermal stabilities have been investigated.

Keywords: Aminomethylphosphines Heteroleptic Metal Complexes,

Giriş

Spesifik bazı metal kompleksleri belirli bazı hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır (Kattesh 1999). Çeşitli ligandlar geçiş metallerinin belirli oksidasyon basamaklarında kararlı bileşikler oluşturmaları açısından uygundur. Bu sınıf ligandlar içinde çok yönlü kimyasıyla en etkin olan ligandlar fosfinlerdir (Li 1997). Tersiyer fosfin ligandlarının ve geçiş metali komplekslerinin antitümör ve antibakteriyel etki gösterdiğinin deneysel olarak saptanması bu tür bileşiklerin sentezine ve farmakolojik özelliklerinin incelenmesine olan ilgiyi son yıllarda daha da artırmıştır (Komiya 1994). Birçok organik molekülün yanı sıra

* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

geçiş metali komplekslerinin de kemoterapide kullanıldığı bilinmektedir. *Cis*-platin olarak da bilinen diamindikloroplatin(II) kompleksi, kemoterapide en fazla kullanılan geçiş metali komplekslerindedir (Cucciolo 2010). Ancak *cis*-platinin yan etkileri bilim adamlarını yeni metal kompleksleri araştırmaya ve özellikle çeşitli amin türevlerini kullanarak *cis*-platine benzer yapılar üzerinde çalışmaya itmiştir. Fosfin içeren metal kompleksleri arasında aminometilfosfin (R_2P-CH_2-N) komplekslerinin anti kanser özelliklerinin incelenmesine yönelik çalışmalar yetersiz sayılabilecek durumdadır (Okama, Gali 1986).

Bu kompleksler tek dişli ligandlara göre daha kararlı kompleksler olup belirli bir ürünün katalizlenmesi açısından stereogenik ve stereospesifik katalizörlerdir. Ancak katalizörlerin hem çevresel hem de ekonomik anlamda sorun olması nedeniyle ilginin suda çözünebilir iki fazlı sistemlere kaymasına sebep olmuştur. Ayrıca tıp alanında tedavilerde insan vücuduna kolay alınabilmesi ise yine önemli bir avantajdır.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada literatüre göre *N,N* bis(difenilfosfinometil)aminoter-bütül ligandı $[(Ph_2PCH_2)_2NC(CH_3)_3]$, *N, N* bis(difenilfosfinometil)aminometil ligandı $[(Ph_2PCH_2)_2NCH_3]$, bu ligandların Pt(II), Pd(II) kompleksleri, *N,N* bis(difenilfosfinometil)aminobütül $[(Ph_2PCH_2)_2N(CH_2)_3CH_3]$ ligandı ve bu ligandın Cu(I) ve Pt(II) metal kompleksleri Schlenk tekniği ile sentezlendi. Daha sonra Dppam, Dppa^b ligandlarını içeren Pt(II) e Pd(II) komplekslerinin nükleobazlar (timin, urasil, teofilin) ile etkileştirilmesiyle komplekslerin klor uçlarının kopması ve klorların yerine nükleobazların metale koordine olması ile nükleobaz içeren heteroleptik metal kompleksleri elde edildi. Sentezlenen komplekslerin yapıları spektrometrik teknikler kullanılarak aydınlatıldı ve elektrokimyasal özellikleri incelendi.

$[Ph_2P(CH_2OH)_2]Cl$ Sentezi (1)

Schlenk düzeneği içerisinde azot atmosferinde karışan difenilfosfin (10 g, 54mmol) üzerine formaldehit (9 cm³, %40) ve hidroklorik asit (5 cm³, %36) eklendi. Bulanık renkte ekzotermik bir karışım elde edildi. Oluşan karışım oda şartlarında soğurken beyaz katı kristaller oluştu ve süzülüp kaynar metanolde tekrar kristallendirildi.



Şekil 1. Fosfonyum Tuzu Eldesi (1).

$(Ph_2PCH_2)_2NBu$, (dppa^b) Sentezi (2)

Yandan boyunlu balon içerisinde fosfonyum tuzu, $[Ph_2P(CH_2OH)_2]Cl$, (1g, 3,537 mmol), 30 mL etilalkol-su (1:2) karışımında çözüldü, bazik ortam oluşturmak için 1mL trietilamin (% 99) eklendi. Beyaz bulanık çözeltiye azot atmosferinde 1.8 ml *ter*-bütülinin eklendi (Şekil.3.4). Karışım geri soğutucu altında 1 saat kaynatıldıktan sonra oda koşullarına soğutuldu ve 15 mL diklormetan ile ekstrakte

edildi, Na₂SO₄ ile kurutuldu. Diklorometan fazına geçen yağimsı fosfin ligandı elde edildi (MTeorik: 449 g/mol), Verim 1,21 g (% 80). (Serindag, 1993)



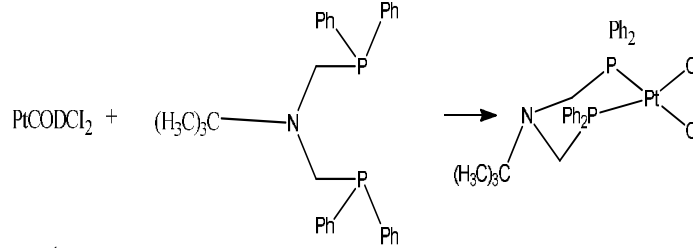
R = -C(CH₃)₃

Şekil 2. Ligand (dppa^tb) Sentezi

Metal Komplekslerinin Sentezlenmesi

[PtCl₂(Ph₂PCH₂)₂NBu] Kompleksinin Sentezi (3)

Yandan boyunlu balon içerisindeki 10 mL CH₂Cl₂ de bulunan (0,383g 0,186 mmol) dppa^tb ve (0,305g 0,816 mmol) 10 mL CH₂Cl₂ [Pt(COD)Cl₂] metal tuzu çözeltisi azot gazı ortamında karıştırıldı (Şekil 3.5). Karışım 2 saat boyunca azot atmosferinde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözücü hacmi sıvı azot altındaki vakum ile 5 mL' ye azaltılarak üzerine dietileter ilave edilip metal kompleksinin katı halinde çökmesi sağlandı. Oluşan katı süzülüp, dietileter ile birkaç kez yıkanarak vakumda kurutuldu. Beyaz-sarı renkte katı elde edildi (Mteorik: 735,08 g/mol), Verim (% 78). Kompleks; su, etil alkol, dietil eter ve petrol eterinde çözünmezken; kloroform, diklorometan ve dimetilsülfoksitte çözünmektedir (Serindağ, 1993).



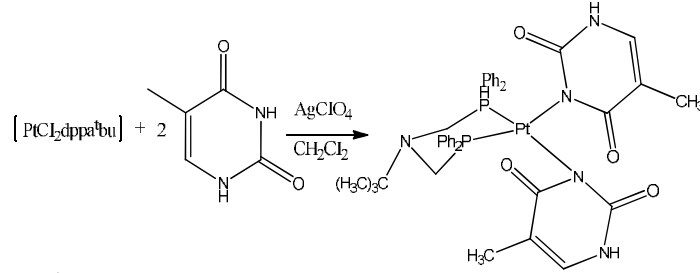
Şekil 3. Pt(dppa^tb)Cl₂ Metal Kompleksi Sentezi

Nükleobaz İçeren heteroleptik Metal Kompleksinin Sentezi

[Pt(dppa^tb)(timin)₂] Kompleksinin Sentezi (4)

Yandan boyunlu balon içerisine [PtCl₂(dppa^tb)] metal kompleksi (0,24 g, 0,32 mmol) ve 20 mL diklorometan eklendi, üzerine (132mg, 0,64 mmol) AgClO₄ eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Bu karıştırma sonucu beyaz renkli AgCl çökmesi sağlandı ve bu karışım celite'den geçirilerek süzme işlemi tamamlandı. Süzüntü tek boyunlu balon içerisine alındı, üzerine 10 ml etanol ve aseton(1:1) karışımı içerisinde çözünen timin (80,72 mg 0,64 mmol) ilave edildikten sonra karışım oda sıcaklığında 10 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırıldı. Daha sonra süzüntünün hacmi döner buharlaştırıcı ile 15 mL'ye düşürüldü. Süzüntü dietil eter ile çöktürüldü ve çökelek beyaz bantlı Whatman kağıdı ile süzüldü. Dietil eter ile yıkama işlemi tekrarlandı. Beyaz renkli ürün elde edildi (MTeorik: 925,11 g/mol). Verim: %50 Kompleks 277°C de erimektedir. Kompleks

su, alkol, dietil eter ve petrol eterinde çözünmezken diklorometan, dimetilsülfoksitte çözünmektedir (Ruiz, 2006).



Şekil 4. Pt(dppa'b)(timin)₂ Kompleksinin Sentezi

Araştırma Bulguları

Sentezlenen bileşiklerin karakterizasyonu FT-IR ve ¹H, ¹³C, ³¹P NMR spektrumları ile yapılmış elektrokimyasal özellikleri ve termal kararlılıkları incelenmiştir.

FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

FT-IR spektrumlarında komplekslerin tersiyer butil grubu için C-N bağ gerilmesi 1395-1302 cm⁻¹ aralığında olup. 1162, 1120 ve 1040 cm⁻¹ civarlarında ise piklerin (C-N-C gerilmesi) görülmesi metal komplekslerinin sentezlendiğini göstermektedir. P -H için karakteristik olan 2200-2300 cm⁻¹ arasında çıkan gerilme pikinin olmaması Mannich reaksiyonun gerçekleştiğinin göstergesidir. Spektrumlarda dikkat edilmesi gereken diğer önemli kısım ise; fosforu ait piklerdir. Sentezlenen komplekslerin FT-IR spektrumlarında 1430 cm⁻¹ civarlarında görülen keskin pik P-aril'in varlığını ispatlamaktadır. Fonksiyonel grup bölgesindeki; 2000-1800 cm⁻¹ aralığında görülen zayıf pikler monosubstitüe benzen C-H düzlem dışı eğilmesinin katlı ve bileşik tonları ve 742-666 cm⁻¹ keskin pik monosubstitüe benzendeki düzlem dışı gerilmeleridir. FT-IR spektrumundaki diğer önemli bölgeler; 3010-3100 cm⁻¹ aromatik C-H gerilmesi orta şiddette, 2965-2915 cm⁻¹ alifatik C-H gerilmesi görülür. Primer aminler 3500-3300 cm⁻¹ frekansında keskin dublet pik, sekonder aminler aynıfrekansta keskin singlet bir pik verirler ancak tersiyer aminler fonksiyonel grup bölgesinin bu frekansında keskin pikler vermez. nükleobazların sekonder amin (R₂NH) piki 3500 -3300 cm⁻¹ aralığında görülmüştür. Sekonder aminlerin(-NH gerilmesi) soğurması zayıf şiddette keskin bir pik olarak görülür ve 1580-1490 arasında (-NH) zayıf bir soğurma bandı olarak ortaya çıkar. FT-IR spektrumunun orta bölgesinde, 1700 cm⁻¹ civarında, güçlü bir soğurma, C=O grubuna karşılık gelir ki keskindir; aynı bölge de gözlenebilecek C=C piki ise orta şiddette veya zayıftır. Aralarındaki fark; C=O bandının daha güçlü soğurmasıdır (Erdik, 1993). Sentezlenen komplekslerde C=O 1730 cm⁻¹ ve C=C pikleri 1600 cm⁻¹ civarında görülmüştür. Nükleobaz içeren heteroleptik metal fosfin kompleksinin FT-IR spektrumunda 1280-1210 cm⁻¹ arasında (Ar-N) aromatik

yapıya bağlı azottan dolayı oluşan C-N bağı eğilme titreşim piki görülür, bu da yapılardaki nükleobazın varlığını göstermektedir. Parmak izi bölgesinde bulunan Pt- N ise 580 cm^{-1} civarında pik verir.

¹H NMR Spektrumlarının İncelenmesi

Sentezlenen komplekslerde FT-NMR spektrumları FT-NMR spektrumları DMSO-d⁶ + CDCl₃ çözücüsü kullanarak 25°C de alınmıştır. Verilen proton sayıları hesaplanan integrasyon değerleriyle uyumludur heteroleptik metal fosfin kompleksleri için için $\delta = 7,43-7,91$ ppm civarında monosüstitüe benzen çoklu pikleri gözlenmektedir. Yaklaşık 3,8 ppm civarındaki doublet piklerin varlığı ise P-CH₂-N grubuna ait pikler olduğunun göstergesidir. Komplekslerde hem liganda ait grupların piklerinin hemde sonradan bağlanan gruplara ait piklerin görülmesi komplekslerin sentezlendiğini göstermektedir. (Wei Wu 2003). Nükleobaz içeren heteroleptik metal fosfin komplekslerinde ise $\delta = 7.3$ ppm civarındaki singlet pik timin nükleobazındaki Ar- C-H pikidir. $\delta = 5.8$ ppm deki singlet pik ise N-H protonlarına aittir komplekslerde $\delta = 3,7$ ppm de N- CH₂- P singlet piki, $\delta = 10$ ppm civarında ise eşdeğer protonlara ait pikler gözlenmiştir.

¹³C NMR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Nükleobaz içeren heteroleptik komplekslerin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde bütün bileşiklerde $\delta = 134 -128$ ppm monosüstitüe benzenin çoklu pikleri gözlenmektedir. Nükleobaz içeren Pt komplekslerde $\delta = 165,3$ ppm'de görülen singlet pik (C4) timin bazına aittir. Nükleobazların metal kompleksine koordine olması ¹³C NMR piklerini daha düşük alana kaydırmaktadır. Bunun sebebi ise nükleobazın metale koordine olduktan sonra elektronegatif grupların elektron yoğunluğunun azalmasıdır bu da literatürdeki değerlerle uygunluk göstermektedir (Longato Bruno, 2006) Bileşiklerde 25,5 ppm deki (-ter-C-N) piki elektronegatif atoma bağlanmasıyla düşük alana doğru kaymakta ve 16,6 ppm de (-CH₃)₃ pikleri gözlenmektedir.

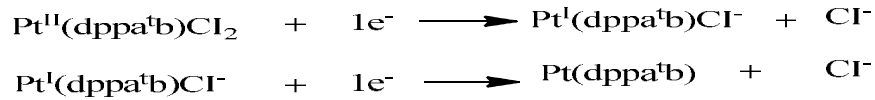
³¹P NMR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

³¹P-NMR verileri aminometilfosfinin metale fosfor üzerinden koordine olduğunu gösteren önemli bir kanıttır. Spektrumlar incelendiğinde, metale dppab ligandının azot üzerinden bağlandığı görülmektedir. Pt-metal komplekslerinde metalin NMR aktif olması sebebiyle fosfor P-Pt yarılması gerçekleşir. Timin nükleobazı içeren Pt kompleksi için spektrum incelendiğinde, metale dppa'b ligandının yanısıra ikinci bir ligand olarak timinin azot üzerinden bağlandığı gözlenmektedir. Literatürlere göre [Ptdppa'bCl₂] metal kompleksinin monosüstitüe benzene bağlı olan elektronegatif fosfor atomu, elektropozitif olan Pt(II) metal iyonuna koordine olup ortaklanmamış elektron çiftini metal iyonuna sunar, d-orbitallerindeki boşluğa metalden geri bağlanma etkisi ile metalin etrafındaki elektron yoğunluğu azalır ve kimyasal kayma değeri $\delta = -8,5$ ppm de görülür. Komplekste nükleobazın metal iyonuna koordine olması ile bu değer daha negatif değere doğru kayar bunun nedeni Pt ile heterosiklik sekonder aminin bir protonunu

atıp Pt(II) metaline elektron çifti sunarak sigma bağı yapması ve elektronegatifliği yüksek olan N ile Pt(II) arasında p geri bağlanmasının gerçekleşmesi şeklinde yorumlanabilir. (Lakomska Iwona,2008). Komplekste P-Pt-N hem P hem de N π geri bağlama etkisi birbirini zayıflatır ve kompleks daha negatif alana doğru bir kayma gösterir. ($\delta = -13,1$ ppm) J (P-Pt)= 2230.8 Hz (Julia, 2006) Nükleobaz içeren Pt-metal komplekslerinde metalin NMR aktif olması sebebiyle fosfor P-Pt yarılması gerçekleşir. J(P-Pt) değerleri incelendiğinde tek bir yarıma gözlenmiştir Bu da metale koordine olan nükleobazın (1:2) şeklinde bağlandığının kanıtıdır. Ayrıca arjentometrik titrimetri yöntemi ile yapıda klorun olmadığı gözlenmiştir. Eğer kompleks (1:1) şeklinde olsaydı fosfor; Cl ve nükleobazın N ile trans durumda olup iki farklı fosfor çevresine sahip olacaktı ve iki tane J(P-Pt) değeri olacaktı (Serindag 1995; Montagner Diego, 2008)

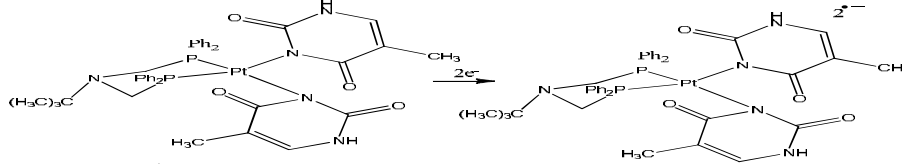
Dönüşümlü Voltamogramların Değerlendirilmesi

Dönüşümlü voltametri de elektrot reaksiyonlarının oluşabileceği potansiyel sınırlarını belirlemek çok önemlidir (Çekirdek, 2005). Bunun için önce oksidasyon ve redüksiyon bölgeleri belirlenmelidir. Bu bölgeleri en iyi belirten tarama hızında (25-500 mV/s) bu esnada belirlenmesi gerekir. Sentezlenen bileşikler için 25-500 mV/s aralığında yapılan çalışmalarda en uygun tarama hızı 100 mV/s olarak belirlenmiş ve voltamogramlar bu tarama hızında verilmiştir. Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak metal kompleksinin elektrokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için kompleksin yanı sıra kompleksin sentezinde kullanılan metal ya da komplekste metale koordine olmuş ligandın voltamogramı da alınmalıdır. Böylelikle metale koordine olmuş ligandın anodik ve katodik pik potansiyellerinde meydana getirdiği değişiklik gözlenmelidir. Bunun için komplekslerin voltamogramının yanı sıra komplekslerin sentezinde kullanılan metallerin de voltamogramı alınmıştır. PtCODCl₂ 'ün voltamogramında zayıf bir anodik pik ve bir katodik pik görülmüştür. Katodik pik -0,77V da oluşurken anodik pik -0,23V da oluşmuştur. PtCODCl₂ deki Pt⁺² anodik yöndeki tarama ile Pt⁺⁴, e yükseltgenirken katodik yöndeki tarama sonucu +4 yüklü Pt metali geniş bir pik ile Pt⁺⁰ a indirgenmiştir. Pt(dppa⁴b)Cl₂ kompleksinde anodik pik potansiyelleri zayıf olduğundan Pt(dppa⁴b)Cl₂ kompleksinin katodik pik potansiyelleri ile PtCODCl₂'ün katodik pik potansiyellerinin kıyaslaması yapılmıştır. PtCODCl₂'ün katodik pik potansiyeli -0,77V da oluşurken Pt(dppa⁴b)Cl₂ kompleksinin katodik pik potansiyeli -1,60V'da olup negatife doğru bir kaymanın olduğu görülmektedir. Pt komplekslerinde katodik pikler net olduğundan PtCODCl₂ 'e ait katodik pik oluşmayabilmektedir.



Pt(dppa⁴b)(timin)₂ kompleksinin anodik pik potansiyelleri zayıf olduğundan Pt(dppa⁴b)(timin)₂ kompleksinin katodik pik potansiyelleri ile PtCODCl₂'ün katodik

pik potansiyellerinin kıyaslaması yapılmıştır. PtCODCl₂'ün katodik pik potansiyeli -0,77V da oluşurken Pt(dppa^tb)(timin)₂ kompleksinin katodik pik potansiyeli -0,82V'da olup negatife doğru bir kaymanın olduğu görülmektedir -0,12V daki katodik pik ise PtCODCl₂'e ait piktir.



Şekil 5. Pt(dppa^tb)(timin)₂ Kompleksinin Elektron Alma Mekanizması

TG Eğrilerinin Değerlendirilmesi

Komplekslerin 30-950 °C sıcaklık aralığında termal davranışları incelenmiş, tarama yapılan aralıkta TG eğrileri alınmıştır. Komplekslerin TG eğrilerinden sıcaklık aralıklarına göre kütle kayıpları baz alınarak ayrılan gruplar tespit edilmiştir. Taramalar sonunda elde edilen TG eğrilerinden komplekslerin çoğunlukla iki aşamada bozunduğu gözlenmiştir. Isınma sırasında DTG'de endotermik pikler elde edilmiştir. Komplekslerde P-C bağı ısısal olarak C-C bağı kadar karardır ve bu yüzden P-C bağı kırılmak normalde enerji gerektirir (Balabanovich, 2004). Bu yüzden endotermik piklerin oluşumu beklenen bir durumdur.

Tartışma ve Sonuçlar

Bu çalışmada literatüre göre *N, N*-bis(difenilfosfinometil)aminoter-bütül ligandı [(Ph₂PCH₂)₂NC(CH₃)₃], *N, N*-bis(difenilfosfinometil)aminometil ligandı [(Ph₂PCH₂)₂NCH₃], bu ligandların Pt(II), Pd(II) kompleksleri sentezlenmiştir Daha sonra bu komplekslerin nükleobazlar(timin, urasil, teofilin) ile etkileştirilmesiyle komplekslerin klor uçlarının kopması ve klorların yerine nükleobazların metale koordine olması ile karışık ligandlı metal kompleksleri elde edilmiştir Ayrıca *N, N* bis(difenilfosfinometil)aminobütül [(Ph₂PCH₂)₂N(CH₂)₃CH₃] ligandı (Wei Wu, 2003) ve bu ligandın Cu(I) ve Pt(II) metal kompleksleri Schlenk metoduna göre azot atmosferinde sentezlenmiştir. Sentezlenen komplekslerin yapıları spektrometrik cihazlar kullanılarak aydınlatılmış, termal kararlılıkları ve elektrokimyasal özellikleri incelenmiştir. FT-IR spektrumlarında keskin primer amin piklerinin olmaması ayrıca yine bu bileşiklerde P -H için karakteristik olan 2200-2300 cm⁻¹ arasında çıkan gerilme pikinin olmaması manich reaksiyonun gerçekleştiğinin göstergesidir.

Ligantların ³¹P-NMR spektrumlarında incelendiğinde yaklaşık δ= -27 ppm'de çıkmıştır. Metal komplekslerinde ise bu değerlerin pozitif bölgeye kaydıkları ve literatürlerle uyum içinde oldukları belirlenmiştir. Sentezlenen ligand ve komplekslerin ¹H NMR spektrumlarındaki kimyasal kayma değerleri ve verilen proton sayıları ile hesaplanan integrasyon değerlerinin uyumlu olması beklenen ligand ve komplekslerin sentezlendiğini göstermiştir Elektrokimyasal özellikleri incelenen komplekslerin uygun tarama hızları ve uygun potansiyel aralıkları belirlenerek Cv leri alınmış, anodik ve katodik pik potansiyelleri belirlendikten sonra

ΔEdeğerleri hesaplanmış ve Literatürler göz önünde bulundurularak komplekslere ait elektron aktarım mekanizması önerilmiştir. Termal Kararlılıkları Tg eğrileri ile değerlendirilmiş ve sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen kopmaların teorik hesaplara uygun olduğu belirlenmiştir.

Kaynaklar

- AKKUŞ B, "Synthesis of transition metal complexes with mixed ligands and characterization" ,MSc Thesis, Department of Chemistry, University of Çukurova,2009
- ALİSON J. DOWNARD, ALAN M. BOND, ANDREW J. CLAYTON, LYALL R. HANTON, DAVID A.MCMORRAN, 1996. "Cyclic Voltametry of Palladium(II) Complexes with Tridentate Arsine Ligands. Separation of the Two Single- Electron Transfer Steps of the Pd(II) – Pd(0) Interconversion Based on Thermodynamic and Kinetic Discrimination", Inorg. Chem. 1996, 35, 7684-7690
- BRUNO LONGATO, LUCIA PASQUATO, ADELE MUCCI, LUISA SCHENETTI, ENNIO ZANGRANDO, "Complexes of Platinum(II) Containing Neutral and Deprotonated 9-Methyladenine. Synthesis, X-ray Structures, and NMR Studies on the Cyclic Trimer cis-[L₂Pt(9-Methadenine)]₃(NO₃)₃ and the Dinuclear cis-[L₂Pt(ONO₂) 9-Methadenine(H)PtL₂](NO₃)₂ (L) PMePh₂ Inorganic Chemistry, (2003), Vol. 42, No. 24
- ERDİK E., 1998. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Gazi Kitabevi, 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, 82-385
- GABRIELLA BUSCEMI, MARINO BASATO, ANDREA BIFFIS, ARMANDO GENNARO, ABDİRİSAK AHMED ISSE, MARTA MARIA NATILE, CRISTINA TUBARO, Journal of Organometallic Chemistry , 695(2010) 2395-2365
- KELES M., ALTAN O., SERINDAG O., " Synthesis and Characterization of Bis(diphenylphosphinomethyl)amino Ligands and Their Ni(II), Pd(II) Complexes : Application to Hydrogenation of Styrene" , Heteroatom Chemistry, Volume 19, Number 2, 2008
- KELES M., AYDIN Z, OSMAN SERINDAG;" Synthesis of palladium complexes with bis(diphenylphosphinomethyl)amino ligands: A catalyst for the Heck reaction of aryl Halide with methyl acrylate"
- MIRABELLI, C.K., JOHNSON, R.K., SUNG, C., FAUCETTE, L.F., MUIRHEAD, K., CROOKE, S.T., Cancer Res., 45, (1985), 32.
- NAİL M. SHAVALEEV, HARRY ADAMS, JONATHAN BEST, JULIA A. WEINSTEIN, "Platinum(II) phosphine complexes with acetylene Ligands containing 1, 4, 5, 8- naphthalenediimide: Synthesis, crystal structure and electrochemistry", journal of Organometallic Chemistry 692 (2007), 921-925
- URUS, S., SERINDAG, O., DIGRAK, M., "Synthesis characterization and antimicrobial activities of Cu(I), Ag(I), and Co(II) complexes with ligand dppam", Heteroatom Chemistry, 16, (2005), 6.