



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
KİM-DR-2008-0001**

**PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MAGNETİK NANO
YAPILARIN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Deniz AKTAŞ UYGUN

**DANIŞMANLAR
Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
Doç. Dr. Sinan AKGÖL**

AYDIN-2008

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
KİM-DR-2008-0001**

**PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MAGNETİK NANO
YAPILARIN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Deniz AKTAŞ UYGUN

**DANIŞMANLAR
Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
Doç. Dr. Sinan AKGÖL**

AYDIN-2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Ana Bilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Deniz AKTAŞ UYGUN tarafından hazırlanan “Protein Safılaştırılması için Magnetik Nano Yapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu” başlıklı tez, 31.07.2008 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan: Prof. Dr. Adil DENİZLİ	Hacettepe Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. Sinan AKGÖL	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Emin GÜNAY	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulununsayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Deniz AKTAŞ UYGUN

İmza :

ÖZET

Doktora Tezi

**PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MAGNETİK NANO YAPILARIN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Deniz AKTAŞ UYGUN

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim DalıDanışman: Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
İkinci Danışman: Doç. Dr. Sinan AKGÖL

Son on yıldır, protein immobilizasyonu ve saflaştırılması için magnetik nano partiküllerin kullanılmasına olan ilgi oldukça artmıştır. Bu çalışmada lizozim enziminin immobilizasyonu ve saflaştırılması için yeni bir destek maddesi olarak magnetik özellikte ve nano boyutta mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri sentezlenmiştir. Ligand olarak kullanılan MAPA komonomeri, metakrilolilklorür ve fenilalanin amino asidinin uygun koşullarda tepkimeye girmesi ile sentezlenmiştir. Hidrofobik bir yapı olan MAPA'nın polimerik yapıya girmesi, polimerin hidrofobik özellik göstermesini sağlayarak lizozim adsorpsiyonunda hidrofobik etkileşimleri baskın hale getirmiştir. Ayrıca, mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin magnetik özellikte olması, uygulamada çeşitli avantajlar sağlamıştır. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin karakterizasyonu için FTIR, ESR, SEM, AFM, TEM, Zeta Potansiyel, Elementel Analiz ve MALDI-TOF ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen partiküllerin küresel yapıda ve yaklaşık 386 nm çapında olduğu gözlenmiştir. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) partiküllerinin spesifik yüzey alanı 580,0 m²/g olarak bulunmuştur. Polimerik yapıda magnetit partiküllerinin varlığı ESR ile araştırılmış ve g faktörü 2,2128 olarak saptanmıştır. Elementel analiz ile polimerik yapıdaki MAPA içeriği 4,30 x 10⁻³ mmol/g polimer olarak tespit edilmiştir. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine lizozim adsorpsiyonu farklı ortam koşullarında (pH, iyonik şiddet, lizozim derişimi, sıcaklık) kesikli sistemde incelenmiştir. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine maksimum lizozim adsorpsiyonu 1,0 mg/mL lizozim derişiminde ve 1,0 M Na₂SO₄ içeren ortamda 517 mg/g polimer, nano-p(HEMA)'ya non-spesifik lizozim adsorpsiyonu değeri ise 24,0 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Desorpsiyon deneyleri ile polimerin tekrar kullanılabilceğı gösterilmiştir. İlaveten serbest ve immobilize lizozimin ortam koşullarına göre aktivite ölçümleri yapılarak, optimum sıcaklık, optimum pH, depo kararlılığı, ısıl kararlılığı ve işlemsel kararlılığı incelenmiş ve kinetik sabitler belirlenmiştir. Sentezlenen polimerin bir uygulaması olarak yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır. Saflaştırma işlemleri sonunda lizozim enzimi % 78,57 aktivite geri kazanımı ile 657 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile görüntülenmiş Bio-LC ile saflık oranı % 96 olarak bulunmuştur.

2008, 153 sayfa**Anahtar sözcükler:**

Mag-nano-p(HEMA-MAPA), lizozim, adsorpsiyon, magnetik nano partikül, hidrofobik etkileşim

ABSTRACT
Ph.D Thesis

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MAGNETIC NANO
STRUCTURES FOR PROEIN PURIFICATION**

Deniz AKTAŞ UYGUN

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sinan AKGÖL

During the past decade, much attention has been paid toward synthesis of magnetic nano sized particles and their use for immobilization and purification of proteins. In this work, magnetic nano sized mag-nano-p(HEMA-MAPA) polymer was synthesized and used as support for lysozyme immobilization and purification. MAPA comonomer was synthesized from methacryloylchloride and phenylalanine under suitable reaction conditions and was used as ligand. Being a hydrophobic structure, incorporation of MAPA to the polymer renders the polymer hydrophobic and provides a hydrophobic medium for lysozyme adsorption. Additionally, magnetic property of mag-nano-p(HEMA-MAPA) polymer provides several advantages on application. Characterization of mag-nano-p(HEMA-MAPA) polymer was conducted using FTIR, ESR, SEM, AFM, TEM, Zeta potential, Elemental Analysis and MALDI-TOF. Particles synthesized were found to be spherical in shape with approximately 386 nm diameter. Specific surface area of mag-nano-p(HEMA-MAPA) particles was calculated to be 580.0 m²/g. ESR was used for the detection of magnetite existence in the polymeric structure and g factor was measured to be 2.2128. Elemental analysis resulted 4.3 x 10⁻³ mmol MAPA per gram polymer. Adsorption of lysozyme onto mag-nano-p(HEMA-MAPA) polymer was investigated in batch system under various medium conditions (i.e. pH, ionic strength, lysozyme concentration, temperature). Maximum lysozyme adsorption on mag-nano-p(HEMA-MAPA) polymer was measured to be 517 mg/g polymer at 1.0 mg/mL and 1.0 M concentrations of lysozyme and Na₂SO₄, respectively. Non-specific adsorption of lysozyme on nano-p(HEMA) was calculated to be 24.0 mg/g polymer. Desorption assays indicated that polymer was reusable. Additionally, activity measurements of free and immobilized lysozyme were conducted in order to determine optimum temperature, optimum pH, storage stability, heat stability and operational stability as well as kinetic parameters. Purification of egg white lysozyme using the polymer synthesized was achieved with a high yield of 78.57 % recovery and 657 purification fold. Purity of enzyme was demonstrated using SDS-PAGE and measured as 96 % using Bio-LC.

2008, 153 pages

Key Words:

Mag-nano-p(HEMA-MAPA), lysozyme, adsorption, magnetic nano particle, hydrophobic interaction

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve akademik hayatım süresince engin bilgilerinden yararlandığım, daima örnek aldığım, çok sevgili danışman hocam Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e; tezimin gerçekleşmesindeki bilimsel, maddi ve manevi destekleriyle ve akademik yaşantımın oluşmasındaki sonsuz özverilerinden dolayı, şükranlarımı sunarım.

Hayata ve bilime olan sevgisiyle akademik yaşantımda bana örnek olan çok sevgili ikinci danışman hocam, Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e; tezimin konu seçiminden yürütülmesine kadar her aşamada büyük bir içtenlikle gösterdiği emek ve desteklerinden dolayı, sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana laboratuvarlarında çalışma fırsatını ve mutluluğunu sunan, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam, Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye; bilimsel katkılarından, maddi ve manevi desteklerinden dolayı, teşekkürü bir borç bilirim.

Tez izleme komitemde yer alan, Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e; laboratuvarlarından yararlanma şansını bana sundukları, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaştıkları için, ayrıca bölüm hocalarımdan Yrd. Doç. Dr. M. Emin GÜNAY'a da tez izleme komitemdeki katkılarından dolayı, minnet duyduğumu belirtmek isterim.

Laboratuvar çalışmalarında ve deneylerimdeki yardımlarından dolayı sevgili arkadaşım, Kimya Bölümü Arş. Grv. Nevra ÖZTÜRK'e; FTIR analizlerindeki yardımlarından dolayı, Kimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Tülin TAŞ'a; tezimin elektroforez uygulama basamağındaki yardımlarından dolayı, Biyoloji Bölümü Arş. Grv. Öznur KOÇ (ARAT)'a ve Arş. Grv. Z. Burcu BAKIR ATEŞLİER'e; fotoğraf çekimlerinden dolayı, Biyoloji Bölümü Arş. Grv. Gamze BAŞBÜLBÜL'e ve Arş.Grv. Ferhat KİREMİT'e ve ayrıca Kimya Bölümü Arş. Grv. Ö. Barış ÜZÜM'e, teşekkür ederim.

Tez çalışmamda sentezlediğim polimerin karakterizasyonu ile ilgili yardımlarından dolayı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Arş. Grv. Lokman UZUN'a; Bio-LC uygulamaları sırasındaki yardımlarından dolayı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Arş. Grv. Müge ANDAÇ'a ve doktora öğrencisi Nilay BERELİ'ye; MALDI-TOF analizlerindeki yardımlarından dolayı, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi elemanlarından Uzman Sibel BÜYÜKTİRYAKI'ye, teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya FBE-08031 No'lu araştırma projesi olarak maddi destek veren, Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü'ne, teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleştirilmesinde ve yazımındaki yardımlarından dolayı hakkını asla ödeyemeyeceğim çok sevgili eşim ve değerli meslektaşım, Kimya Bölümü Arş. Grv. Murat UYGUN'a ve gerektiğinde hayatlarını bana göre düzenleyen, meşguliyetlerimi anlayışla karşılayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deniz AKTAŞ UYGUN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
SİMGELERİN DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇEZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoteknoloji	1
1.1.1. Nanoteknolojinin Başlıca Uygulama Alanları	4
1.1.1.1. Tıp	4
1.1.1.2. Kimya ve Çevre	5
1.1.1.3. Enerji	5
1.1.1.4. Enformasyon ve İletişim	6
1.1.1.5. Günlük Tüketim Malzemeleri	6
1.2. Nanobiyoteknoloji	7
1.3. Nanopartiküller	9
1.4. Magnetik Ayırma	10
1.4.1. Magnetik Polimerler	11
1.4.2. Magnetik Polimerlerin Kullanım Alanları	12
1.4.2.1. Magnetik Toplama	13
1.4.2.2. Magnetik Çökeltme	13
1.4.2.3. Magnetik Yüzdürme	13
1.4.2.4. Magnetik Kararlılık	13
1.4.2.5. Magnetik Aktarım	14
1.4.2.6. Magnetik Taşıma	14
1.4.3. Magnetik Nanopartiküller	15
1.4.4. Magnetik Olarak Kararlı Hale Getirilen Akışkan Yataklar (MSFB) ...	15
1.5. Biyomolekül Ayırma ve Saflaştırılması	17
1.5.1. Enzim Uygulamaları	19
1.6. Lizozim	21
1.6.1. Lizozim Enziminin Hikayesi	21
1.6.2. Lizozim Enziminin Yapısı	22
1.6.3. Lizozim Enziminin Katalitik Mekanizması	27
1.6.4. Lizozim Enzimi İçin Önerilen Phillips Mekanizması	28
1.7. Enzimlerin İmmobilizasyonu	30
1.7.1. Desteklerin Seçimi	31
1.7.2. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri	33
1.7.3. Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri	33
1.7.3.1. Kovalent Bağlanma	34
1.7.3.2. Tutuklanma (Entrapment)	36
1.7.3.3. Membranda Tutuklama (Enkapsülasyon)	37
1.7.3.4. Çapraz Bağlama	37
1.7.4. Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri	37
1.7.4.1. Adsorpsiyon (Nonkovalent Etkileşimler)	38

1.7.4.2. Şelatlaşma veya Metal Bağlanması	40
1.7.4.3. Disülfid Bağlarının Oluşumu	41
1.8. Adsorpsiyon İzotermi ve Kinetikleri	42
1.9. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	46
1.9.1. Amino Asit ve Protein Hidrofobisitesi	48
1.9.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde Proteinin Kromatografik Davranışını Etkileyen Temel Faktörler	50
1.9.2.1. Mobil Fazın Etkisi	50
1.9.2.2. Sabit Fazın Etkisi	52
1.9.2.3. Sıcaklık Etkisi	53
1.10. Polimerler	53
1.10.1. Polimerlerin Sınıflandırılması	55
1.10.2. Polimerlerin Polimerizasyon Mekanizmasına Göre Kimyasal Sınıflandırılması	56
1.10.2.1. Katılma Polimerleri	56
1.10.2.2. Basamaklı Polimerler	56
1.10.2.3. Zincir Uzaması Polimerizasyonu	57
1.10.2.4. Adım-Uzaması Polimerizasyonu	57
1.10.3. Polimer Sentezleme Teknikleri	57
1.10.3.1. Kütle (Bulk) Polimerizasyonu	58
1.10.3.2. Çözelti Polimerizasyonu	59
1.10.3.3. Heterojen Polimerizasyon	59
1.10.4. Destek Maddesi Olarak Poli(2-hidroksietil metakrilat): p(HEMA) ...	65
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	66
3. MATERYAL VE YÖNTEM	73
3.1. Materyal	73
3.2. Yöntem	74
3.2.1. Nano-p(HEMA) Polimerinin Sentezlenmesi	74
3.2.2. Metakriloilamidofenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezi	75
3.2.3. Mag-Nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinin Sentezlenmesi	76
3.3. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinin Karakterizasyonu	77
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	77
3.3.2. ESR (Elektron Spin Resonans) Ölçümleri	78
3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	78
3.3.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri	78
3.3.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	78
3.3.6. Yüzey Alanının Hesaplanması	78
3.3.7. Yüzey Yükü Analizi (Zeta Potansiyel Ölçümü)	79
3.3.8. Elementel Analiz	79
3.3.9. MALDI-TOF (Matriks-Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) Ölçümleri	79
3.4. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerine Lizozim Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	80
3.4.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi	80
3.4.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Farklı Tuzların ve İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi	81
3.4.3. Adsorpsiyona Lizozim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi ...	81
3.4.4. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	81

3.4.5. Lizozim Adsorpsiyonuna Zamanın Etkisinin İncelenmesi	82
3.4.6. Mag-Nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinden Lizozimin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	82
3.5. Lizozim Aktivitesi Tayini	83
3.5.1. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi	83
3.5.2. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	84
3.5.3. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	84
3.5.4. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Depo Kararlılığının İncelenmesi	84
3.5.5. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi	85
3.5.6. İmmobilize Lizozimin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi	85
3.6. Yumurta Akından Lizozim Saflaştırılması	85
3.6.1. Protein Tayini	86
3.6.2. SDS-PAGE Elektrofrezinin Uygulanması	87
3.6.3. Bio-LC'nin Uygulanması	88
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	90
4.1. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinin Fotoğrafi	90
4.2. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinin Karakterizasyonu	91
4.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	91
4.2.2. ESR (Elektron Spin Resonance) Ölçümleri	93
4.2.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) Ölçümleri	94
4.2.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopu) Ölçümleri	95
4.2.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskopu) Ölçümleri	96
4.2.6. Yüzey Alanının Hesaplanması	97
4.2.7. Yüzey Yükü Analizi (Zeta Potansiyel Ölçümü)	98
4.2.8. Elementel Analiz	99
4.2.9. MALDI-TOF (Matriks-Destekli Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon- Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) Ölçümleri	99
4.3. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerine Lizozim Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	105
4.3.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi	105
4.3.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Farklı Tuzların ve İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi	106
4.3.3. Adsorpsiyona Lizozim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	108
4.3.4. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	109
4.3.5. Adsorpsiyon İzotermi ve Kinetikleri	110
4.3.6. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinden Lizozimin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	116
4.4. Lizozim Aktivitesi Ölçümü	117
4.4.1. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi	117
4.4.2. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	119
4.4.3. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	120

4.4.4. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Depo Kararlılığının İncelenmesi	123
4.4.5. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi	124
4.4.6. İmmobilize Lizozimin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi	125
4.5. Yumurta Akından Lizozim Enziminin Saflaştırılması	126
4.5.1. SDS-PAGE Elektroforezi Sonucu	127
4.5.2. Bio-LC ile Lizozim Miktarı Tayini	128
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	132
KAYNAKLAR	136
ÖZGEÇMİŞ	151

SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Asp	Aspartik asit
ATCC	American Type Culture Collection
Bio-LC	Biyo-sıvı kromatografisi
BSA	Sığır serum albümin
CD	Circular dichroism
CEW	Tavuk yumurtası akı
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinnamik asit
CMC	Kritik misel derişimi
CM-selüloz	Karboksimetil selüloz
Con A	Konkavalin A
DEAE	Dietilaminoetil
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Esherichia coli</i>
EGDMA	Etilenglikoldimetakrilat
ESR	Elektron spin rezonans
FPLC	Hızlı protein sıvı kromatografisi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
Glu	Glutamik asit
HEW	Tavuk yumurtası akı
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
His	Histidin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IgM	Immunoglobulin M
KPS	Potasyum persülfat
LED	Işık yayan diod
Lys	Lizin
<i>M. lysodeikticus</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>
Mag-nano-p(HEMA-MAPA)	Magnetik-nano-poli(2-hidroksietil metakrilat-ko-metakriloilamidofenilalanin)
Magnetit	Fe ₃ O ₄
MALDI-TOF	Matriks-Destekli Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MAPA	Metakriloilamidofenilalanin
Met	Methionin
MSFB	Magnetik olarak kararlı hale getirilen akışkan yatak
MWCO	Molecular weight cut-off
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
nano-p(HEMA)	Nano-poli(2-hidroksietil metakrilat)
p(HEMA)	poli(2-hidroksietil metakrilat)
PET	Polietilen tereftalat
PVA	Polivinil alkol

PVDF	Polivinilidin florür
QCA	Kuantum kafes atomları
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
STM	Taramalı tünelleme mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-tetraetilmetilendiamin
Tyr	Tirozin
U	Ünite
WCX	Zayıf katyon değiştirici

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Mikro ve nanobileşenlerin büyüklük skalası ve örnekleri	2
Şekil 1.2 Soldan sağa doğru nanoteknolojinin dolaylı, direkt ve yaklaşımsal uygulama alanları	7
Şekil 1.3 Magnetik partiküllerin değişik uygulama alanları	14
Şekil 1.4 MSFB sisteminin şematik gösterimi	16
Şekil 1.5 Bakteri hücre duvarlarının NAM-NAG polisakkarit birimleri	22
Şekil 1.6 Gram pozitif ve negatif bakteri hücre duvarlarının şematik gösterimi ...	23
Şekil 1.7 HEW lizoziminin birincil yapısı	24
Şekil 1.8 Lizozimin substrat bağlama bölgesinin şematik gösterimi	25
Şekil 1.9 Kitinin NAM birimleri	26
Şekil 1.10 HEW lizoziminin X-ışını yapısı	26
Şekil 1.11 Bir asetalin bir hemiasetale enzimatik olmayan asit katalizli hidrolizinin mekanizması	27
Şekil 1.12. Lizozim reaksiyonu için Phillips mekanizması	29
Şekil 1.13 Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyon yöntemleri	34
Şekil 1.14 Taşıyıcıya enzimin kovalent bağlanması	35
Şekil 1.15 Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri	38
Şekil 1.16 Farklı hidrofobisite skalaları kullanılarak amino asit hidrofobisitelerinin karşılaştırılması	49
Şekil 1.17 Polimer sentezleme teknikleri	57
Şekil 1.18 Emülsiyon polimerizasyonundaki mevcut türlerin şematik gösterimi ..	64
Şekil 3.1 Nano-p(HEMA) polimerinin sentezinin şematik gösterimi	75
Şekil 3.2 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin sentezinin şematik gösterimi	77
Şekil 3.3 Bradford yöntemi ile protein tayini için kalibrasyon grafiği	87
Şekil 4.1 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin fotoğrafı	90
Şekil 4.2 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin kimyasal formülü	91
Şekil 4.3 Nano-p(HEMA) polimerinin FTIR spektrumu	92
Şekil 4.4 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin FTIR spektrumu	92
Şekil 4.5 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın ESR spektrumu	93

Şekil 4.6 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın SEM fotoğrafı	94
Şekil 4.7 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın AFM fotoğrafı	95
Şekil 4.8 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın üç boyutlu AFM fotoğrafı	96
Şekil 4.9 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın TEM fotoğrafı	97
Şekil 4.10 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) partiküllerinin hacim-kütle grafiği	98
Şekil 4.11 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu	101
Şekil 4.12 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu	102
Şekil 4.13 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu	103
Şekil 4.14 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu	104
Şekil 4.15 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna pH ve tuzun etkisi	106
Şekil 4.16 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna farklı tuzların ve iyonik şiddetin etkisi	108
Şekil 4.17 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna lizozim derişiminin etkisi	109
Şekil 4.18 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	110
Şekil 4.19 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi	111
Şekil 4.20 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi	112
Şekil 4.21 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun zamana bağlı olarak farklı lizozim derişimlerinde incelenmesi	114

Şekil 4.22 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun birinci dereceden kinetiğinin incelenmesi	115
Şekil 4.23 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetiğinin incelenmesi	115
Şekil 4.24 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonu için tekrar kullanılabilirliği	117
Şekil 4.25 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim aktivitesine pH'ın etkisi	118
Şekil 4.26 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim aktivitesine sıcaklığın etkisi	120
Şekil 4.27 <i>M. lysodeikticus</i> substratı derişimine karşılık absorbans grafiğı	121
Şekil 4.28 Serbest lizozim için Lineweaver-Burk grafiğı	122
Şekil 4.29 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim için Lineweaver-Burk grafiğı	122
Şekil 4.30 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozimin depo kararlılığı	124
Şekil 4.31 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim aktivitesinin 55 °C'de zamana bağılı olarak değışimi ..	125
Şekil 4.32 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozimin işlemsel kararlılığı	126
Şekil 4.33 Yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılmasına ilişkin SDS-PAGE analizi	127
Şekil 4.34 25 ppm ticari lizozim içeren örneğın Bio-LC kromatogramı	129
Şekil 4.35 250 ppm ticari lizozim içeren örneğın Bio-LC kromatogramı	129
Şekil 4.36 500 ppm ticari lizozim içeren örneğın Bio-LC kromatogramı	130
Şekil 4.37 250 ppm protein içeren yumurta akı örneğının kromatogramı	130
Şekil 4.38 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri ile yumurta akından saflaştırılan lizozim örneğının kromatogramı	131

ÇİZELGELER DİZİNİ

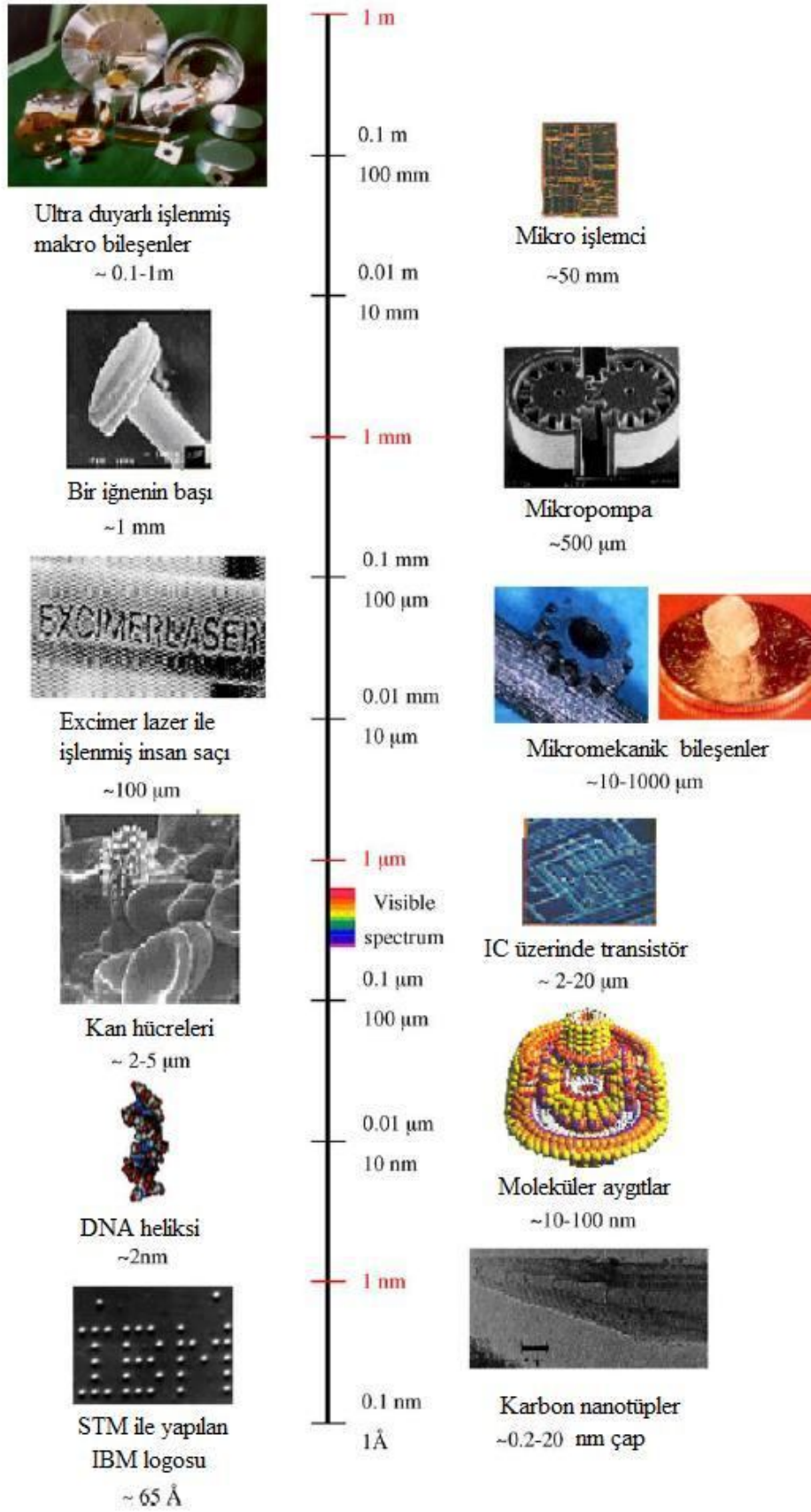
Çizelge 1.1 Magnetik tekniklerle saflaştırılan enzim örnekleri	20
Çizelge 1.2 Enzim immobilizasyonunda kullanılan desteklerin sınıflandırılması	32
Çizelge 2.1 CEW’de bulunan temel proteinler	67
Çizelge 4.1 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun birinci ve ikinci dereceden kinetik sabitleri	116
Çizelge 4.2 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim için kinetik sabitler	123
Çizelge 4.3 Yumurta akı lizozim enziminin mag-nano-p(HEMA-MAPA) ile saflaştırılması	128

1. GİRİŞ

1.1. NANOTEKNOLOJİ

Richard Feynman 1959'daki bir konferansında atomik blokların moleküler düzeyde düzenlenmesini tartışarak ilk kez maddenin nano düzeyde kullanılma olasılığını ortaya attı. Feynman meşhur söyleminde “Görebildiğim kadarıyla, fizik prensipleri nesnelerin atom düzeyinde manupule edilmesine karşı değildir. Bu, herhangi bir yasayı ihlal girişimi olmayıp, prensipte yapılabilir olan fakat biz çok büyük olduğumuz için pratikte şimdiye kadar yapılmamış olan bir şeydir” demiştir (Feynman, 1959; <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>). Feynman'ın bu önerisinden sonraki yıllarda nanoteknoloji alanı Eric Drexler ve Richard Smalley; biyonanoteknoloji alanı da Chad Mirkin'in çalışmalarıyla başlamış kabul edilebilir. Rice Üniversitesinde bir kimya profesörü olan Richard Smalley nanoteknoloji alanının öncülüğünü yapmış ve 1996 yılında Nobel ile ödüllendirilmiştir. Eric Drexler 1991'de MIT'de Moleküler Nanoteknoloji alanındaki ilk doktorayı yapmıştır. Bir araştırmacı ve yazar olarak gelişen teknolojiler ve bunların gelecekteki etkileri üzerine odaklanan öncülerden birisi olmuştur. Chad A. Mirkin ise nanosistemlerde kimyasal modifikasyon üzerine yaptığı çalışmalar ile biyonanoteknoloji alanına yeni açılımlar getiren öncü kimyacılarından birisidir.

Günümüzde nanoteknoloji “benzersiz olağanüstülüğün çok özel uygulamalara izin verdiği 1-100 nanometre arasındaki boyutlara sahip maddenin anlaşılması ve kontrolü” olarak tanımlanabildiği gibi (<http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>); “atomik veya moleküler boyut hassasiyetindeki aygıtların olduğu kadar 100 nm'den küçük tüm aygıtların üretilmesini içeren bir alan” olarak da (Mamalis, 2007) tanımlanmaktadır. Şekil 1.1'de mikro ve nano bileşenlerin örnekleri ve büyüklük skalaları görülmektedir (Mamalis, 2007). Nanoteknoloji, maddenin atom veya molekülleri üzerinde yapılan uygulamalarla makinalaşmada hassasiyetin teorik sınırlarına ulaşması nedeniyle, günümüzün en ileri üretim teknolojisi olarak kabul edilmektedir.



Şekil 1.1 Mikro ve nanobuildinglerin büyüklük skalası ve örnekleri (Mamalis, 2007)

Fizikçi Richard Feynman'ın Amerikan Fizik Derneğinde 1959'da yaptığı 'Dipte çok miktarda boşluk var (There's Plenty of Room at the Bottom)' başlıklı konuşmasında ilk kez nanoteknoloji yaklaşımları konusu gündeme gelmiştir. Bununla birlikte, "nanoteknoloji" terimi ilk kez Tokyo Science Üniversitesi'nden Profesör Norio Taniguchi'nin 1974'de yayımladığı makalede 'Nanoteknoloji, maddenin tek bir atom veya tek bir molekül düzeyinde ayrılması, birleştirilmesi ve deforme edilmesi süreçlerinden oluşur' şeklinde tanımlanmıştır.

1980'lerde Dr. K. Eric Drexler nanoboyutlu olayların ve aygıtların teknolojik önemi üzerinde duran ilk araştırmacılarından olmuştur. 1980'lerde iki önemli gelişme: cluster (küme) biliminin doğuşu ve taramalı tünelleme mikroskop (scanning tunneling microscope: STM)'un icadı nanoteknoloji ve nanobilimin başlamasına öncülük etmiştir. Bu gelişmeler 1986'da fullerenlerin ve birkaç yıl sonra da karbon nanotüplerin keşfine neden olmuştur. Daha sonra yarı iletken nanokristallerin sentezi ve özelliklerinin incelenmesi ve atomik force mikroskopun (AFM) icadı bu gelişmelere çok önemli katkılarda bulunmuştur.

Nanoteknoloji uygulamalarının temelinde materyal boyutlarının küçültülmesi sonucu fiziksel özelliklerin değişmesi vardır. Örneğin nanopartiküller çok büyük yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Buna bağlı olarak floresans gibi optik özellikler partikül çapının bir fonksiyonu haline gelirler. Nanopartiküller kullanılarak yapılan malzemelerde sertlik ve elastikiyet özellikleri değişir. Geleneksel polimer yapıların nanopartiküller kullanılarak güçlendirilmesi mümkündür. Böyle nanoteknolojik olarak güçlendirilmiş materyallerin ağırlığı azalırken dayanıklılık ve fonksiyon çeşitliliği artmaktadır (Papazoglou ve Parthasarathy, 2007).

1.1.1. Nanoteknolojinin Başlıca Uygulama Alanları

1.1.1.1. Tıp

Biyoloji ve tıp alanındaki çeşitli uygulamalarda nanomateryallerin benzersiz özelliklerinden yararlanılmaktadır. Nanomateryallerin biyolojik molekül veya yapılarla birlikte kullanılması uygulamaları da giderek artmaktadır. Nanomateryallerin boyutları pek çok biyolojik molekül ve yapıların boyutları ile benzerlik gösterdiğinden nanomateryaller *in vivo* ve *in vitro* biyomedikal araştırmalarda da kullanılabilirlerdir.

Medikal tanı uygulamalarında “bir çipe sığdırılmış laboratuvar” teknolojisinin bir ileri uygulaması “bir çipe sığdırılmış nanoteknoloji”dir. Bu teknoloji ile seçilmiş bir maddenin varlığı veya aktivitesi daha hızlı, daha duyar ve belli nanoboyuttaki partiküller etiket olarak kullanıldığında, daha kesin olarak tayin edilmektedir.

İlaç iletimi için nanoteknoloji uygulamaları ile ilaç tüketimi ve yan etkiler azaltılabilmekte, yüksek seçicilik nedeniyle daha iyi uygulamalar yapılabilmektedir. Hedeflenmiş veya kişiye özel ilaç üretimleri de nanoteknoloji sayesinde mümkün olabilmektedir.

Doku mühendisliği alanında da zarar görmüş dokunun tamiri veya yeniden üretilmesi konusunda nanoteknolojiden yararlanılmaktadır. Nanogözenekli membranlar 10 nm’den daha küçük gözenek yapıları nedeniyle mekanik filtrasyon işlemleri için uygunluk göstermektedirler. Nanofiltrasyon genellikle iyonların uzaklaştırılması veya farklı suşların ayrılması için kullanılmaktadır. Daha büyük ölçeklerde membran filtrasyon tekniği ultrafiltrasyon olarak isimlendirilir ve 10-100 nm boyutlarında uygulanır. Ultrafiltrasyonun önemli bir uygulama alanı da böbrek diyalizi için kullanımındır (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_nanotechnology_applications).

1.1.1.2. Kimya ve Çevre

Kimyasal kataliz ve filtrasyon teknikleri nanoteknolojinin şimdiden öne çıkan uygulamalarıdır. Belirli bir kimyasal çevreye (ligandlar) veya spesifik optik özelliklere sahip nanopartiküller gibi yapıların sentezlenmesi, istenen kimyasal özelliklere ulaşılmasını mümkün kılmaktadır. Bu anlamda bakıldığında kimya nanobilimin temelini oluşturmaktadır ve tüm kimyasal sentez olaylarına nanoteknoloji açısından bakılabilir.

Çok yüksek yüzey/hacim oranı sağlanması nedeniyle nanoteknolojiden kimyasal kataliz alanında çok yararlanılmaktadır. Nanopartiküllerden katalizde yararlanma potansiyeli yakıt pillerinden katalitik dönüştürücü ve fotokatalitik aygıtlara kadar geniş bir alanı kapsamaktadır.

Atık-su arıtılması, hava temizlenmesi ve enerji depolama aygıtlarının geliştirilmesi üzerine de nanokimyanın önemli katkıları olmaktadır. Magnetik nanopartiküller magnetik ayırma tekniklerini kullanarak atık sudan ağır metal kirleticilerini uzaklaştırmak için etkili ve güvenilir bir yöntem oluştururlar. Nanoboyuttaki partiküllerin kullanılması kirleticilerin absorblanmasındaki verimi artırdığı gibi geleneksel çöktürme ve filtrasyon yöntemleri ile kıyaslandığında daha ucuz çözüm sunmaktadır (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_nanotechnology_applications).

1.1.1.3. Enerji

Nanoteknolojinin enerji ile ilgili uygulamaları başlıca enerji depolanması, dönüşümü, tasarrufu ve yenilenebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesi konularında yoğunlaşmaktadır. Örneğin, enerji tüketiminin azaltılması ışık-yayan diodların (LED) veya kuantum kafes atomların (QCA) üretilmesinde nanoteknolojiden yararlanılması şeklinde olmaktadır. Ayrıca nanopartiküllerin, yüzey alanını büyütmesi nedeniyle daha verimli güneş pillerinde (solar cells) kullanılması veya çevre dostu enerji sistemlerinin üretilmesinde kullanılması da son zamanlardaki uygulamalarıdır (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_nanotechnology_applications).

1.1.1.4. Enformasyon ve İletişim

Yarı iletken aygıtların üretiminde de nanoteknolojiden yararlanma çabaları vardır. Modern iletişim teknolojilerinde klasik analog elektriksel aygıtların yerini çok geniş bant aralıkları ve kapasiteleri nedeniyle optik veya optoelektronik aygıtlar almaktadır. Fotonik kristaller ve kuantum dotlar bu uygulamalara örnek olarak verilebilir (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_nanotechnology_applications).

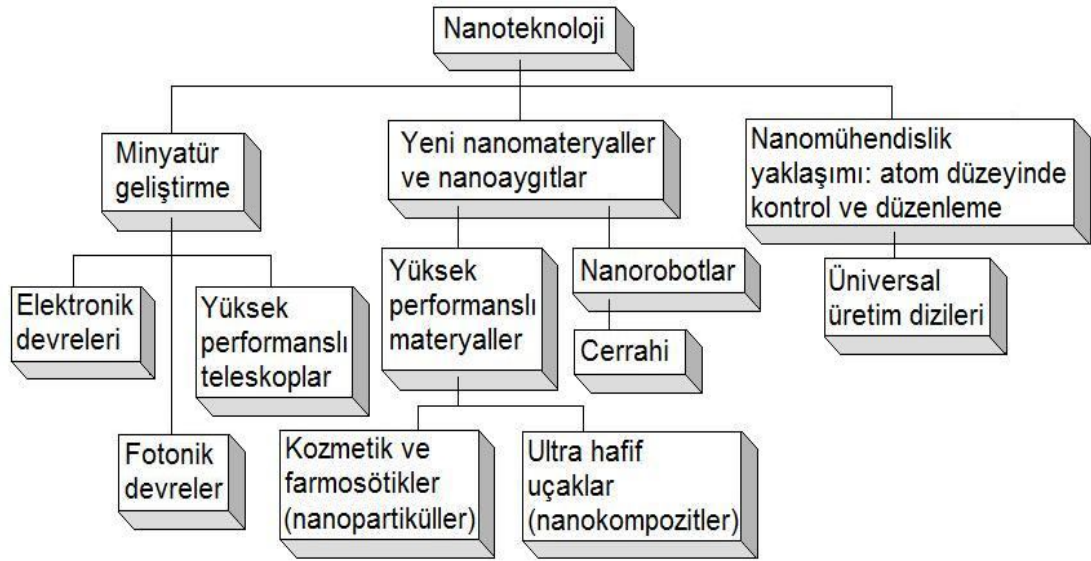
1.1.1.5. Günlük Tüketim Malzemeleri

Yiyeceklerin üretimi, işlenmesi, güvenliği ve paketlenmesinde nanoteknolojiden yararlanılmaktadır. Nanokompozit materyaller anti-mikrobiyal ajanların kaplama filmlerine yerleştirilmesinde, ürünün ihtiyacına göre gaz geçirgenliğinin azaltılması veya artırılmasında, oksijen aktarım hızının azaltılmasında, ısıya dayanma özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılabilmektedir.

Seramik veya cam yüzeylere kendi kendini temizleme veya kolay temizlenebilir olma özelliklerinin kazandırılmasında da nanoteknolojiden yararlanılmaktadır. Nanoseramik partiküller günlük ev gereçlerinin yüzey düzgünlüğünün ve ısıya dayanıklılığının artırılmasında kullanılmaktadır.

Tekstilde suya, lekeye, kırışmaya dayanıklı nanolif üretimi giderek artmaktadır. Kozmetik üretiminde ise güneş kremlerinde nanopartiküllerin kullanılması yaygınlaşmıştır.

Yukarıda kısaca özetlenen nanoteknolojinin uygulama alanları Şekil 1.2'deki gibi genelleştirilebilir (Ramsden, 2005).



Şekil 1.2 Soldan sağa doğru nanoteknolojinin dolaylı, direkt ve yaklaşımsal uygulama alanları (Ramsden, 2005)

1.2. NANOBIYOTEKNOLOJİ

Nanoteknolojinin biyolojik ve biyokimyasal uygulamalarını içeren alt dalına nanobiyoteknoloji adı verilir. Nanoteknoloji ile hücre biyolojisi arasındaki ilişki önemli olup iki yönlü bir ilişkidir. Nanoteknoloji, biyolojinin sağladığı muazzam nano-makina ve aygıtların oluşturulması için yaşayan sistemlerde bulunan nanoboyuttaki bileşenlerin biyologlar tarafından anlaşılabilmesi ve açıklanabilmesi için yeni araçlar sunar. Bunun tersine olarak, hücre biyolojisi mekanizmaları üzerindeki çalışmalar yeni sentetik nanoaygıtların yapılmasında yol gösterici olur. Evrim süreci, doğanın nanoboyuttaki mühendislik problemlerine etkili çözümler bulunmasını sağlamıştır ve nanoteknolojistler, biyolojik sistemleri nanoaygıtlara doğrudan inkorpore ederek ya da biyolojik analoglarının prensiplerini taklit eden sentetik sistemler oluşturarak bu çözümleri üretmektedirler.

Nanoteknolojinin biyoloji için sunduğu en önemli olanak biyomoleküler yapı, fonksiyon ve özelliklerin araştırılması için yeni araçlar oluşturmasıdır. Bu yeni araçlar kullanıldığında hücrenin yapısal elemanlarının ve moleküler ilişkilerin doğrudan ölçümü mümkün olabilmektedir.

Biyonoteknolojinin gelişiminde biyolojik mekanizmaları taklit ederek nanoboyutlu aygıtların yapımı önemli rol oynamaktadır. Bu, çok büyük potansiyeli olan bir alan olup gelecek yıllarda daha da gelişmesi beklenmektedir. Bu çalışmalara örnek olabilecek bazı biyolojik olaylara aşağıda değinilmiştir.

DNA nanoteknoloji yapı taşı olarak kullanılabilir bir moleküldür. DNA'nın kendiliğinden düzenlenebilme ve doğada daima komplementer bir çift zincir olarak bulunma özelliği vardır. Bununla birlikte gelişigüzel baz sekansından oluşan DNA'nın yapılmasına izin veren sentetik metodolojiler de vardır. Böyle sentetik DNA sarmalları uygun düzenlemelerle üç boyutlu ağ oluşturacak hale getirilirse; öncelikle nanopartiküllerin büyümesi ve interaksyonu, ikinci olarak moleküler elektronik için bir kalıp olarak, üçüncüsü de nanomakina ve motorların üretilmesinde kullanılabilir.

Biyolojide bulunan en çarpıcı nanoboyutlu makinalar kimyasal enerjiyi dikkat çekici bir verimlilikle mekanik enerjiye dönüştüren, nanoboyutlu protein topluluklarından oluşan moleküler motorlardır. Bu moleküler motorların moleküler biyoloji ve biyofizik açısından önemi büyüktür. Nanoteknoloji açısından ise önemi iki kat daha fazladır: Birinci olarak taklit edilecek olağanüstü modeller oluştururlar. İkinci olarak, bize sentetik ve biyolojik nanoteknolojiyi birleştirerek hibrid yapıların ortaya çıkmasını sağlayacak çalışan, hazır hücre bileşenlerini sunarlar. Bir başka örnek de yapay fotosentezin gerçekleştirilmesidir. Fotosentezin verimi ışık toplayan kompleksler kullanılması durumunda çok artar. Bu kompleksler pek çok boya moleküllerinin (10-100) hassas bir ilişki içinde proteinlerle bağlanması ile oluşurlar. Farklı boya molekülleri farklı dalga boyunda ışığı absorblar ve fotosentezin verimliliği böylece çok artmış olur. Fotosentez, güneş enerjisini elektrik ve kimyasal enerjiye dönüştürmek için çok önemli bir model oluşturur. Bu nedenle sentetik moleküllerle fotosentezi taklit etme çalışmaları devam etmektedir (Leggett ve Jones, 2005).

1.3. NANOPARTİKÜLLER

Katalizörün yeniden kullanılması, sürekli işlemlere olanak vermesi ve ürün saflaştırılmasındaki kolaylıklar nedeni ile enzim immobilizasyonu büyük ölçekli uygulamalarda çok kullanılan bir stratejidir. Bununla birlikte, immobilize enzimlerin biyokatalitik etkinliğindeki zayıflık onların büyük ölçekli işlemlerde geleneksel kimyasal proseslerle yarışmalarını engeller. Biyokatalitik etkinliğin artırılması, enzim immobilizasyonu için taşıyıcı maddelerin yapısının değiştirilmesi ile sağlanabilir. Yüzeylerine enzim bağlanmış gözeneksiz materyaller birim destek kütlesi başına genellikle düşük enzim miktarı ile yüklenirken minimum difüzyon sınırlamasına maruz kalırlar. Diğer taraftan gözenekli materyallere yüksek miktarda enzim yüklemesi yapılabilir fakat substrat çok daha büyük difüzyonel kısıtlanmaya maruz kalır.

Enzim taşıyıcı materyallerin boyutlarındaki küçülme genelde immobilize enzimlerin etkinliğini artırabilir. Yüzeğe bağlanma durumunda, daha küçük partiküller enzimlerin bağlanması için daha geniş yüzey alanı sunar ve partiküllerin birim kütlesi başına daha fazla enzim yüklenmesi mümkün olur. Gözenekli materyallere enzim immobilizasyonu durumunda, büyük boyutlu gözenekli materyaller ile karşılaştırıldığında küçük gözenekli partiküllerden substratın difüzyon yolunun kısa olması nedeni ile daha az kütle-transfer direnci beklenir. Enzim immobilizasyonu için mikrometre büyüklüklü partiküllerin kullanımı üzerinde kapsamlı çalışmalar vardır. Son zamanlarda ise, enzim immobilizasyonu için taşıyıcı olarak nanopartiküllerin kullanılmasına olan ilgi oldukça artmıştır. Geniş yüzey alanı nedeni ile nanopartiküllere etkili enzim yüklemesinde birim kütlesi başına % 10'luk (kütlece) bir orana ulaşılmıştır. Özet olarak, immobilize enzimlerin optimizasyonunda sıklıkla rastlanan çelişkili meseleler olan minimum difüzyonel sınırlama, birim kütle başına maksimum yüzey alanı ve yüksek miktarda enzim yüklenebilmesi gibi konularda nanopartiküller ideal çözüm sunarlar.

Umut verici performans özelliklerine ilaveten nanopartiküllerin eşsiz çözelti davranışları heterojen ve homojen kataliz arasında ilginç bir geçiş bölgesini işaret eder. Teorik ve deneysel çalışmalar, tanecik büyüklüğü ve çözelti viskozitesi ile

belirlenen tanecik hareketliliğinin taneciğe bağlı enzimlerin gerçek aktivitesini etkileyebileceğini göstermiştir (Kim *et al.*, 2006).

1.4. MAGNETİK AYIRMA

Magnetik ayırma magnetik olan veya magnetiklik kazanabilen bir partikülün bir gradient magnetik alanda transportunu içeren bir teknolojidir. Bu teknoloji süspanse katı tanecikleri içeren sıvılardan mikron altı boyutlardaki istenen türleri veya diğer biyolojik tanecikleri ayırmak için kullanılır. 1970’li yılların ortalarındaki başlangıcından beri magnetik ayırma immobilize enzim, hücre ayırma, protein saflaştırma, nükleik asit ayırma ve immunolojik analizler gibi biyoteknolojinin çeşitli alanlarında hızla uygulama bulmuştur. Magnetik ayırma teknolojisini tamamen yararlı kılmak için iyi fizikokimyasal özellikli destekler veya magnetik ortamlar gereklidir. Bu sebeple magnetik ayırmaların anahtar elementi olarak magnetik desteklerin sentezi son yıllarda araştırmacıların oldukça dikkatini çekmiştir (Tong *et al.*, 2001). Kesikli magnetik ayırmada temel prensip çok basittir. Ayrılacak yapıya afinitesi olan magnetik biyopolimer tanecikler veya immobilize afinite veya hidrofobik ligandlar veya iyon değiştirici gruplar taşıyan magnetik taşıyıcılar hedef bileşiği içeren örnek ile karıştırılır. Örnekler ham hücre lizatları, tam kan, plazma, karın boşluğu sıvısı, süt, idrar, kültür ortamı, gıda ve fermantasyon endüstrisinden gelen atıklar ve diğerleri olabilir. Bir inkübasyon periyodundan sonra hedef molekül magnetik taneciklere bağlandığında, tüm magnetik kompleks uygun magnetik ayrıştırıcı kullanılarak hızlı ve kolayca uzaklaştırılır. Kirliliklerin yıkanmasından sonra ayrılan hedef molekül elue edilir ve sonraki çalışmalar için kullanılır (Safarik ve Safarikova, 2004). Magnetik ayırma teknikleri standart ayırma teknikleriyle karşılaştırıldığında çeşitli avantajlara sahiptir. Bu işlem genellikle çok basittir ve yalnızca birkaç adımda gerçekleştirilir. Saflaştırma işleminin tüm adımları tek bir test tüpü veya başka bir kaptaki yapılabilir. Pahalı sıvı kromatografi sistemlerine, santrifüjlere, filtrelere ve diğer ekipmanlara ihtiyaç yoktur. Ayırma işlemi süspanse katı materyali içeren ham ekstraktta doğrudan gerçekleştirilebilir. Bazı durumlarda (örneğin intraselüler proteinlerin izolasyonu gibi) çözme ve ayırma adımlarını birleştirmek bile mümkündür ve böylece toplam ayırma zamanı kısaltılır. Magnetik adsorbanlar magnetik özellikleri nedeniyle örnekten kolayca ve seçici

olarak uzaklaştırılabilirler. Gerçekte magnetik ayırma, yalnızca biyolojik bir artıktaki küçük magnetik taneciklerin (çapları 0,1-1 μm) ve benzer büyüklükteki diğer tortu maddelerin ayrılması için uygun bir metottur. Dahası, magnetik ayırma prosedürlerinin gücü ve etkinliği büyük ölçekteki uygulamalarda özellikle yararlıdır. Magnetik ayırma teknikleri aynı zamanda çeşitli otomatikleştirilmiş işlemlerin temelini oluşturur. Özellikle, aralarında protein ve peptidlerin de bulunduğu pek çok analitin tayini için kullanılan magnetik-tanecik temelli immuno analiz sistemleri bu uygulamaların içine girer. Proteinler ve nükleik asitlerin ayrılması için çeşitli otomatikleşmiş sistemler son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Safarik ve Safarikova, 2004).

1.4.1. Magnetik Polimerler

Magnetik polimerler birkaç nanometreden milimetre boyutlarına kadar değişik çap ve boy dağılımlarında, gözenekli veya gözeneksiz farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen partiküllerdir.

Magnetik polimerler birçok ayırma işlemlerinde az kirlilik, iyi kütle aktarımı ve az aşınma göstermesi vb. kolaylıkları yanında basınç düşmesi, substrat dönüşümü ve enzim kararlılığı için daha iyi bir performans göstermeleri nedeniyle akışkan yatak reaktörlerde kullanılmaktadır. Diğer ayırma işlemlerinde yer alan santrifüjleme ve filtrasyon süreçleri enzimin ve/veya proteinin üçüncül yapısını bozarak aktivitesinde düşüşe neden olurken, bu tür problemler magnetik partiküllerin kullanımı ile ortadan kalkmakta ve işletme maliyeti azalmaktadır. Magnetik partiküllerin kullanıldığı akışkan yatak reaktörler atık suların arıtımında, enzim tutuklanmasında ve afinite ayırımında önemli rol oynamaktadır. İnsanoğlunun kullandığı ilk magnetik maddenin doğal magnetit olması nedeniyle uygulamalarda demir oksitlerin önemi büyüktür. Bu demir oksitlerin en önemlileri: Fe_xO (vustit), Fe_3O_4 (magnetit), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit), $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit)'dir. Fe_3O_4 kullanımı en yaygın olan magnetik materyallerden biridir. Biyoteknoloji ve tıptaki uygulamalarında güçlü magnetik özelliklerinden dolayı oldukça önem kazanmıştır. Enzimler, proteinler, antikorlar ve antikanser ajanları gibi birçok biyoaktif madde Fe_3O_4 'e bağlanmıştır (Mandal *et al.*, 2005).

1.4.2. Magnetik Polimerlerin Kullanım Alanları

Genelde magnetik polimerler seçimli ayırma ve iyi kütle transferi gibi başlıca iki amaç için kullanılmaktadır. Magnetik polimerlerin kullanıldığı ilk/başlıca enzim immobilizasyon ve saflaştırma amaçlı işlemlere verilebilecek örnekler şunlardır:

Tutuklanmış enzimler için magnetik desteklerin kullanımı ilk olarak Robinson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Robinson *et al.*, 1973). Magnetik destekler, asıltı halindeki katıların sıvılardan seçici olarak uzaklaştırılması, magnetik ayırma ile kolay toplanılması ve gözeneksiz olmalarından dolayı çeşitli avantajlara (az kirlilik, iyi kütle aktarımı ve az aşınma göstermesi gibi) sahiptir (Kennedy *et al.*, 1990; Burns ve Graves, 1988; Lochmüller ve Wigman, 1987). Dunnill ve Lilly (1974), L-asparaginaz ve β -galaktozidaz enzimlerinin *Escherichia coli* hücre protoplazmasından saflaştırılmasında, Mosbach ve Andersson (1977) ise karaciğerden alkol dehidrogenaz enziminin kazanımı için bu tür magnetik polimerleri kullanmışlardır. Küçük ölçekli uygulamalarda kullanılan magnetik polimerler, katalizörün geri kazanımı için hem hızlı hem de kolay ayırma sağlamaktadır. Diğer taşıyıcı polimerler için bu işlem çok sayıda basamak gerektirdiğinden, geniş ölçekli endüstriyel uygulamalarda enerji ve verimlilik açısından magnetik ayırma tercih edilebilir. Munro *et al.* (1977), gözeneksiz magnetik partiküllerin ortama getirdiği kirliliği araştırmak için nikel-kimotripsin partiküllerini soğuk süt ortamında 48 saat tutarak aktivite tayini yapmışlardır. Sonuçta ciddi bir kirlilik oluşturan selüloz desteklere göre aktivitede çok az bir düşüş gözlenmiştir.

Gözeneksiz magnetik destek ile enzim arasındaki difüzyonun önemini araştıran ilk çalışmalar Halling ve Dunnill (1980) tarafından yapılmış ve birim yüzey alanı başına kütle aktarım kat sayılarının değişimleri incelendiğinde, birim katalizör ağırlığı başına kütle aktarım hızlarının azalan partikül boyutu ile birlikte sürekli arttığı saptanmıştır. Çalışmada hem küçük çaplı hem de gözeneksiz magnetik desteklerin diğer desteklere göre kütle aktarımı açısından daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Magnetik partiküllerin kullanıldığı ayırma amaçlı prosesler aşağıdaki gibidir.

1.4.2.1. Magnetik Toplama

Bu tür prosesler maden endüstrisinde ve kimyasal proseslerde demir ve demir parçacıklarının geri kazanılmasında kullanılırlar. Partiküle etkiyen net magnetik kuvvet pozitifdir. Maddenin boyutlarına ve magnetik duyarlılıklarına göre ayırma işlemi gerçekleşir. Magnetik alan yüklenmesi ile organik maddelerin, alglerin ve virüslerin endüstriyel atık sulardan magnetik malzemeler eklenerek geri kazanılması mümkündür (Şekil 1.3a).

1.4.2.2. Magnetik Çökeltme

Partiküllere uygulanan net pozitif kuvvetin, yerçekimi ile olan çökeltmeyi ivmelendirmek için tankın altına yerleştirilmiş sarım ile oluşturulduğu sistemlerdir. Genelde kullanılan araçlar çok basittir. Magnetik çökeltme ve magnetik topaklanma bir arada kullanılarak çökeltme hızını arttırmak mümkündür (Şekil 1.3b).

1.4.2.3. Magnetik Yüzdürme

Sistem elektromagnet tarafından sarılmış bir kolondan ibarettir. Parçacıklar kolona girdiğinde akışkanın yoğunluğu artar ve magnetik olmayan malzemeler, yüzeyde serbest kalırlar. Gerekli olan alan yoğunluğu ayrıştırılacak malzemelerin magnetik duyarlılığı ve partiküller arasındaki yoğunluk oranı ile değişir (Şekil 1.3c).

1.4.2.4. Magnetik Kararlılık

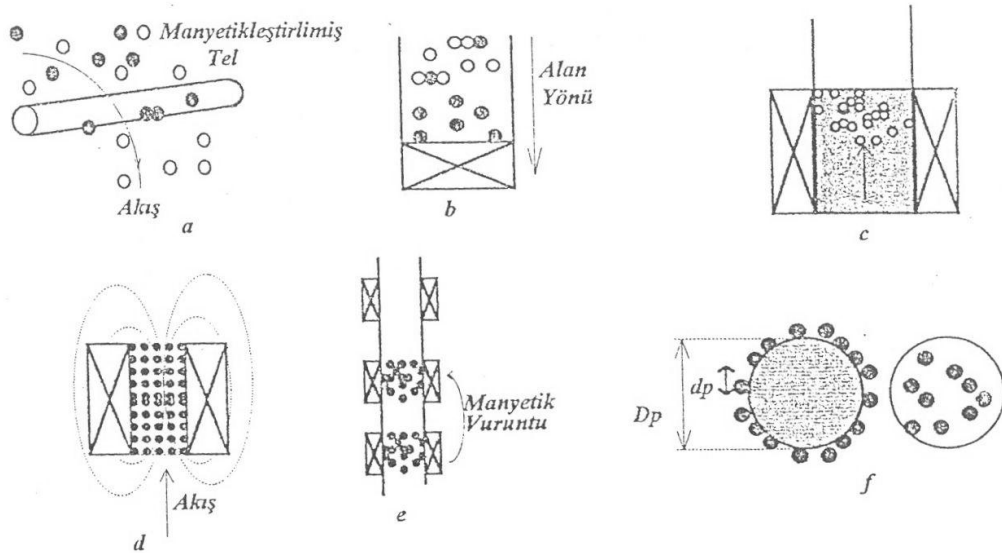
Magnetik duyarlılığı olan partiküllerin oluşturduğu akışkan yatak dışarıdan uygulanan magnetik alan ile kararlı hale getirilebilir. Sürekli yüksek debide partikül taşınması olmaksızın kolloid yapıdaki malzemelerin toplanmasını mümkün kılar. Bu tür sistemler, akışkan yatak reaktörlerin akıcılık avantajı ile birlikte, sabit yatak sistemlerin bütün üstünlüklerine sahiptir (Şekil 1.3d).

1.4.2.5. Magnetik Aktarım

Katz ve Sears (1969), yüksek magnetik alan yoğunluğunda magnetik partiküllerden oluşan yatağın kolon boyunca taşınabileceğini ispatlamışlardır. Katıların taşınmasında magnetik alan kullanımı hareketli sistemlere olan ihtiyacı kaldırmıştır. Reaktör kolonu veya boru boyunca akan katıların kuvvetli magnetik alan yoğunluğunda kontrol altına alınması mümkündür (Şekil 1.3e).

1.4.2.6. Magnetik Taşıma

Klasik ayırıştırma teknikleri ile zor ve yavaş olan koloidal parçacıkların ayırıştırılmasında giderek artan bir kullanıma sahiptir. Fakat magnetik duyarlılığı olan partiküller gerektirdiğinden, uygulamaları sınırlıdır. Partiküllerin yüzey karakteristikleri değiştirilerek kolloid ve makromolekül parçacıkların geri kazanımı, istenilen parçacığın partikül yüzeyine tutturulması veya partikül içine hapsedilmesi ile mümkündür (Şekil 1.3f).



Şekil 1.3 Magnetik partiküllerin değişik uygulama alanları

1.4.3. Magnetik Nanopartiküller

Hem temel hem de teknolojik bakımdan incelendiğinde nanoyapıların büyüklük ve şekillerinin kontrol edilebilmesi önemlidir. Uzun zamandan beridir çeşitli büyüklük ve şekillerdeki nanopartikülleri hazırlamak için çeşitli gayretler vardır. Aslında büyüklüğün nanopartiküllerin kimyasal özellikleri (reaktivite ve kataliz) kadar fiziksel özelliklerini (magnetik ve optik) belirlemede de temel bir değişken olduğu çok iyi bilinmektedir. Nanoölçekte boyutlu magnetik sistemlerin temeli ve uygulamaları çok iyi bilinir. Günümüzde magnetik nanopartiküller proteinlerin ve enzimlerin immobilizasyonu, biyoayırma, immunoanalizler, ilaç dağılımı, biyosensörler ve buna benzer geniş uygulamaları nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir (Mandal *et al.*, 2005).

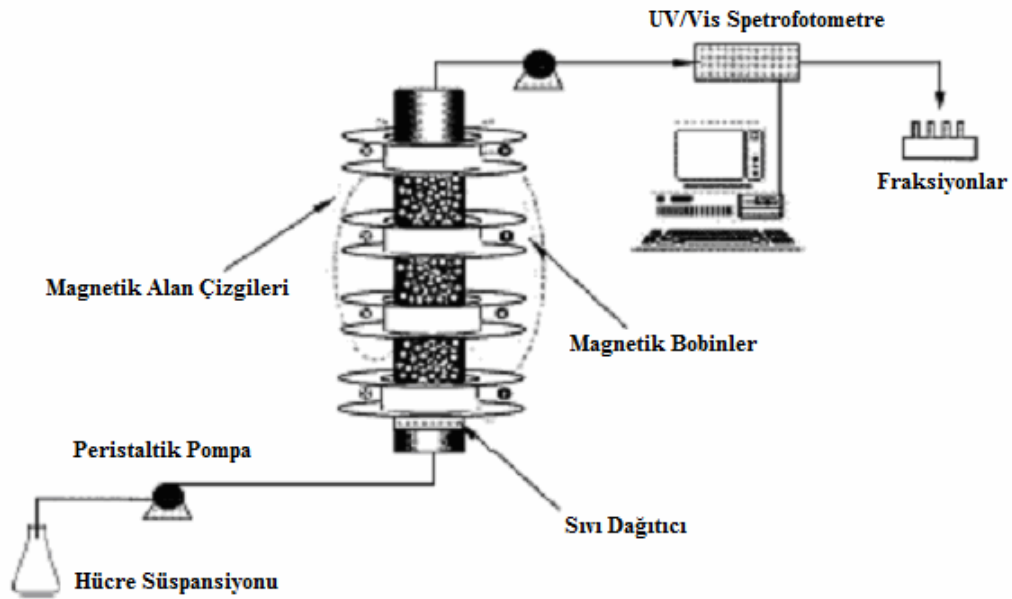
Magnetik nanopartiküller ticari olarak önemli oldukları kadar analitik kimyada da özel bir öneme sahiptirler. Çünkü herhangi bir analitik protokolün başında veya sonunda magnetik alanlar kullanılarak magnetik nanopartikülleri ele geçirme olasılığı ile analitlerin tek bir adımda hızlı saflaştırılmasına izin verir (Fuentes *et al.*, 2005). Magnetik nanopartiküller bir destek materyali olarak çeşitli avantajlara sahiptir. Bunlar: 1) İyi kütle transfer özellikleri 2) Kolay ayırmaya ve immobilize enzimlerin tekrar kullanılmasına olanak 3) Enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan geniş spesifik yüzey alanı olarak sıralanabilir. Magnetik nanopartiküller şimdiye kadar lipazların, proteazların ve diğer enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmıştır (Kuroiwa *et al.*, 2008).

1.4.4. Magnetik Olarak Kararlı Hale Getirilen Akışkan Yataklar (MSFB)

Magnetik tanecikler içeren bir akışkan yatak reaktörüne bir magnetik alan uygulanırsa tanecikler magnetik alandan etkilenecek ve yatağın hidrodinamik özellikleri, magnetik alan şiddeti ve tanecik özellikleri değişecektir. Bu yeni özellikler akışkan yatak reaktörlere bazı avantajlar sağlar. Genellikle küçük tanecikler yüksek immobilizasyon alanları nedeniyle enzim immobilizasyonu için

kullanırlar fakat küçük tanecikli sabit yatak reaktörler endüstriyel uygulamalar için basınç düşmeleri ve yetersiz akış hızları sergiler. Aynı zamanda akışkan yatak reaktörlerde kullanıldıklarında akışkanlık ve stabilizasyon problemleri olabilir. Bu tip problemler magnetik partikülleri içeren akışkan yatak reaktörlere bir magnetik alan uygulanarak önlenabilir. İmmobilize enzim reaksiyonları için magnetik alan kullanılan akışkanlaştırılmış yatak reaktörleri (MSFB) ile ilgili bir çok çalışma literatürde rapor edilmiştir (Bahar ve Çelebi, 2000).

Bir kromatografik araç olarak MSFB'nin gelişimi, dolgulu yataklar ve geleneksel akışkan yatak sistemlerdeki kromatografik ayırmalarda karşılaşılan bir çok problemi çözmek için umut vericidir. Şekil 1.4'de tipik bir MSFB sistemi görülmektedir. MSFB'ler akışkan yatakların (düşük basınç düşmeleri ve yüksek besleme akışlı katılara tolerans) ve dolgulu kolonların (karışık taneciklerin yokluğu, yüksek kütle transfer hızları ve iyi sıvı-katı teması) en iyi özelliklerinden bazılarını bir araya getirir. İlaveten, MSFB sistemlerinde karışan eksensel ve yarıçapsal taneciklerin bastırılmasına karşılık bu katılar süreklilik, yüksek alıkonma ve karşıt akım temasına izin veren bir tıpa akışındaki kolon boyunca aşağıya doğru hareket etme kabiliyetine sahiptir.



Şekil 1.4 MSFB sisteminin şematik gösterimi

Kromatografide MSFB'lerin kullanılmasını engelleyen temel faktörler magnetik ve fiziksel özelliklerin, bağlanma kapasitesinin ve kütle transfer özelliklerinin uygun kombinasyonuna sahip küre oluşturacak materyallerin eksikliğidir. Kromatografik ayırmayı etkileyen küre özellikleri; kürenin şekli, büyüklüğü ve büyüklük dağılımı; porun çapı, hacmi ve büyüklük dağılımı; kürenin bağlama kapasitesi, kürenin yüzey alanı ve yüzey aktivitesinin tipidir (spesifik veya non-spesifik bağlanma bölgelerinin mevcut olup olmadığı). Akışkanlık ve kararlılığı etkileyen temel parametreler kürelerin büyüklüğü ve yoğunluğu ile onların magnetik elverişliliğidir. Küreler magnetikliğe duyarlı olmalı fakat çok az veya hiç kalıcı magnetiklik taşımamalıdır. Aksi halde, küre topaklaşması katı akışını ve uygulanan magnetik alan kuvvetinde değişiklikler yapmak sureti ile MSFB'nin kararlılık halinin kontrolünü sağlayan operatorün bu yeteneğini engeller. Bir magnetik alan şiddetinde verilen küre magnetizasyonu, kordon hassasiyetiyle (chord susceptibility) karakterize edilir ve kürelerin kararlılık davranışını etkiler. MSFB kromatografi küreleriyle ilgili literatürde rapor edilen çalışmalardan bu kürelerin bir takım dezavantajlara sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar 1) Rapor edilen türevlendirme metotlarından sadece birkaç tanesi küreleri üretmek için kullanılan maddelere uygundur 2) Küreler sıklıkla ticari olarak kullanılmayan maddeler veya metotlar yoluyla üretilmektedir. 3) Bazı durumlarda materyaller pratikte karşılaşılması muhtemel biyolojik sıvıların geniş çeşitlilik aralığına uygun değildir. 4) Küreler sıklıkla bağlanma kapasitesini sınırlayan düşük yüzey alanı veya zayıf kütle transfer özelliklerini sunan yüzey parçalanması gibi zayıf fiziksel özelliklere sahiptir (Cocker *et al.*, 1997).

1.5. BİYOMOLEKÜL AYIRMA VE SAFLAŞTIRILMASI

Diğer spesifik moleküllerin olduğu kadar çeşitli tipteki proteinlerin ve peptidlerin izolasyonu, ayrılması ve saflaştırılması biyobilimler ve biyoteknolojinin hemen hemen tüm dallarında kullanılmaktadır. Bu sebeple ayırma bilimi ve teknolojisi biyoyönlenmiş araştırma ve teknolojilerin gelecekteki gelişmeleri için oldukça önemli bir alandır. Hem dar hem de geniş skalalı işlemlerde çok miktarda bulunan maddelerin varlığında hedef molekülün yalnızca çok az miktarlarını içeren çözeltiler veya seyreltik çözeltilerle muamele edilecek yeni ayırma teknolojileri gerekmektedir.

Biyobilim ve biyoteknoloji alanında proteinler ve peptidlerin izolasyonu genellikle kromatografik, elektroforetik, ultrafiltrasyon, çöktürme ve diğer işlemlerle gerçekleştirilmektedir ve bunların arasında afinite kromatografisi en önemli tekniklerden biridir. Afinite kromatografisi iyon değişim ve büyüklük dışlama gibi genel kromatografi metotlarına ve filtrasyon tekniklerine alternatif olarak tek bir maddeye spesifik olma avantajını taşır. Afinite kromatografisi enzim-substrat etkileşimi ve enzim inhibisyonu modellerine benzer olarak spesifik biyolojik etkileşimlere dayanır. Afinite kromatografisinde ayırmalar biyoaktiviteyi korumak ve denaturasyonu minimize etmek için ılımlı koşullar altında sulu çözeltilerde gerçekleştirilir ve bu nedenle afinite kromatografisi büyük oranda aktif formdaki biyokimyasalların elde edilmesini sağlar. Bu yüksek aktivite/mg, afinite ile saflaştırılan biyokimyasalların analiz işlemleri ve kinetik çalışmalarda primer standartlar olarak kullanılmasını olanaklı kılar (Lochmüller ve Wigman, 1987).

Afinite ligand teknikleri, seçiciliği ve geri kazanımı açısından mevcut yöntemler arasındaki en güçlü araçtır. Afinite kolonunun gücü binlerce başarılı uygulamada özellikle laboratuvar ölçeğinde gösterilmiştir. Bununla birlikte, standart sıvı kolon kromatografisi işlemlerinin dezavantajı bu kolonların partiküllü materyal içeren örneklerle başa çıkmalarının imkansızlığı ve bu nedenle örnekte asılı katı ve istenmeyen bileşenlerin mevcut olduğu başlangıç izolasyon/saflaştırma süreçlerinde kullanmaya uygun olmayışlarıdır. Bu durumda magnetik afinite, iyon değişim, hidrofobik veya adsorpsiyon batch ayırma işlemleri, magnetik olarak kararlı akışkanlaştırılmış yataklar veya magnetik olarak modifiye iki fazlı sistemlerin yararlı olduğu gösterilmiştir (Safarik ve Safarikova, 2004).

İlaveten protein moleküllerinin yapısının partikül yüzeyi ile etkileştiğinde az yada çok değişikliğe uğradığı genellikle bilinmektedir. Protein yapısının bir ölçüsü olarak α -heliks içeriği hidrofilik yüzeylere (örneğin silika partiküller) adsorplandığında azalır fakat hidrofobik yüzeylere (teflon partiküller gibi) adsorplandığında artar. Belli desorpsiyon koşulları altında bu değişim önemli oranda geri dönüşümlü olabilir. Yapısal değişimin tahmini, adsorpsiyon/desorpsiyon işlemleriyle protein saflaştırılması için önemli bir kriterdir. Proteinin konformasyonel değişimi, circular

dichroism (CD), floresans spektroskopisi ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) gibi farklı metotlarla ölçülebilir. Silika, polistiren ve gümüş iyodür gibi partiküller üzerine adsorplandığında proteinlerin (BSA, lizozim, hemoglobin, ovalbumin gibi) yapısal değişikliği üzerindeki çalışmalar literatürde rapor edilmiştir (Peng *et al.*, 2004).

Genelde magnetik afinite ayırmaları iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Direkt metotlarla uygun bir afinite ligandı magnetik partiküllere veya hedef moleküllere karşı afinite sergileyen biyopolimere doğrudan bağlanır ve magnetik afinite partiküllerin hazırlanması sırasında kullanılır. Bu partiküller örnek ve hedef bileşiklere eklenir ve daha sonra onlara bağlanır. İndirekt metotta serbest afinite ligandı (çoğu durumda uygun bir antikor), hedef molekül ile etkileşimi sağlamak için çözelti veya süspansiyona eklenir. Oluşan kompleks daha sonra uygun partiküllerle çevrelenir. Bu durumda antikorlar, serbest afinite ligandları olarak kullanılır ve protein A ve protein G ikincil afinite ligandlarının immobilize edildiği magnetik partiküller kompleksleri çevrelemek için kullanılırlar. Her iki durumda, hedef molekülü izole eden magnetik partiküller, magnetik olarak ayrılır ve daha sonra bir seri yıkama adımı kirletici bileşikleri ve partikülleri uzaklaştırmak için kullanılır. Hedef bileşikler genellikle elue edilir fakat özel uygulamalarda partiküllere bağlı kalabilirler. Bağlı protein ve peptidlerin elüsyonu çoğu durumda pH değişimi, iyonik şiddet değişimi, polarite azaltıcı ajanların kullanımı veya katotropik tuzları içeren deforme edici eluentlerin kullanımı gibi standart elüsyon metotlarıyla sağlanabilir (Safarik ve Safarikova, 2004).

1.5.1. Enzim Uygulamaları

Enzimlerin saflaştırılması durumunda magnetik afinite ayırma stratejileri çok basit değildir. Çeşitli afinite ligandları (inhibitörler, kofaktörler, boyalar gibi) magnetik partiküllere immobilize edilebilir veya magnetik partiküller hedef enzimler için afinite sergileyen biyopolimerlerden hazırlanabilir. Magnetik teknikler kullanılarak saflaştırılan enzim örnekleri Safarik ve Safarikova (2004) tarafından derlenmiştir. Bu çalışmalar, Çizelge 1.1'de görülmektedir.

Çizelge 1.1 Magnetik tekniklerle saflaştırılan enzim örnekleri (Safarik ve Safarikova, 2004)

Saflaştırılan Enzim	Kaynağı	Magnetik Taşıyıcı	Afinite Ligandı
Alkol dehidrogenaz	Maya homojenatı	Magnetik çapraz bağlı polivinil alkol	Cibacron Blue 3GA
Aldolaz (rekombinant histidin etiketli)	Bezelye	Magnetik çekirdek ve nikel-silika kompozit matriksi	Ni ²⁺
Asparaginaz	<i>E. coli</i> homojenatı	Magnetik poliakrilamid jel partikülleri	D-asparajin
Karbonik anhidraz	Model karışım	Magnetik agaroz küreleri	Sülfonilamid
Katalaz	Sığır karaciğeri	Magnetik poli(EGDMA-MAH) küreleri	Fe ³⁺
Sitokrom c	<i>At, Candida krusei</i>	Amin uçlu demir oksit partikülleri	Cu ²⁺ ile yüklenmiş iminodiasetik asit
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ekstraktı	Ferrofluid ile modifiye edilmiş Sepharoz 4B	ADP
Laktat dehidrogenaz	Sığır kalbi	Ferrofluid ile modifiye edilmiş Sepharoz 4B	AMP
Lusiferaz (histidin etiketli)	<i>E. coli</i> homojenatı	MagneHis TM sistem	Ni ²⁺
Alkalın fosfataz	İnsan plasentası	Dynaküreleri M-450	Spesifik antikor
6-fosfoglukonat dehidrogenaz thioeredoksin (rekombinant histidin etiketli)	<i>E. coli</i>	Magnetik agaroz	Ni-NTA
Ürikaz	<i>Bacillus</i>	İyon şelatlayıcı magnetik agaroz küreler	Ni ²⁺

1.6. LİZOZİM

1.6.1. Lizozim Enziminin Hikayesi

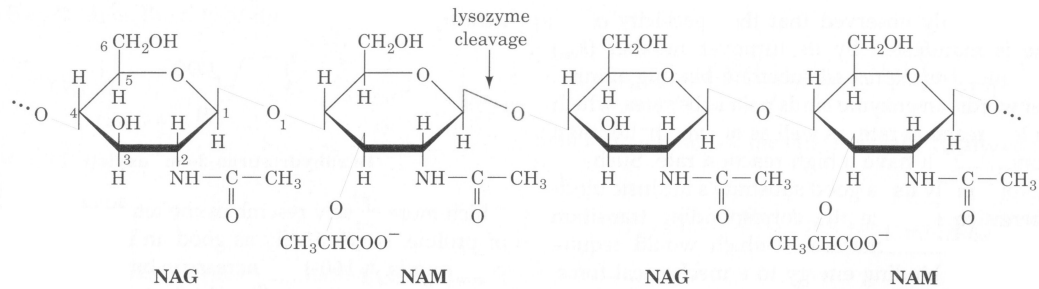
Enzimlerin antibakteriyel özelliğine ilk olarak 1922 yılında Alexander Fleming şahit olmuştur. O, kendi burun mukozasındaki örneklerle petri kültüründeki bakteriyi muamele etmiş ve bir süre sonra mukusun etrafındaki bakterinin dağılmaya başladığını görmüştür. Bakteri hücreleri dağılmaya başlamıştır çünkü hücreler parçalanmaya veya patlamaya başlamıştır. Böylece o, enzimi lizozim olarak adlandırmıştır. Lizozimin tamamen antibiyotik amaçlı kullanılması ispatlanmamasına rağmen, sonradan lizozimin bakteriyofajları, bakterileri, bitkileri ve hayvanları içeren çok çeşitli organizmalarca üretildiği bulunmuştur. Alexander Fleming, 1945 yılında penisilini keşfinden dolayı Fizyoloji ve Tıp alanındaki Nobel ödülünü almıştır.

Lizozim küçük boyutu nedeniyle, daha ileri analizler için uygun bir molekül olarak düşünülmüş ve X-ışını kristolografisinin ilk örnekleri arasında olmuştur. Lizozimin amino asit sekansı belirlenmiş ve kristalleri X-ışını difraksiyonu çalışmaları için çöktürülmüştür. 1966 yılında David Phillips, tavuk yumurta akından ekstrakte edilen lizozimin üç boyutlu yapısını tanımlamıştır. Lizozim, X ışını kristografisi kullanılarak yapısı aydınlatılan üçüncü (1962'de won John Kendrew'in miyoglobin ve Max Perutz'un hemoglobini tanımlayarak Nobel ödülleri almasından sonra), karbohidrat bağlayan bir protein ve enzim olması açısından ilk proteindir. Lizozim, Protein Veri Bankasında depolanan en yaygın proteindir.

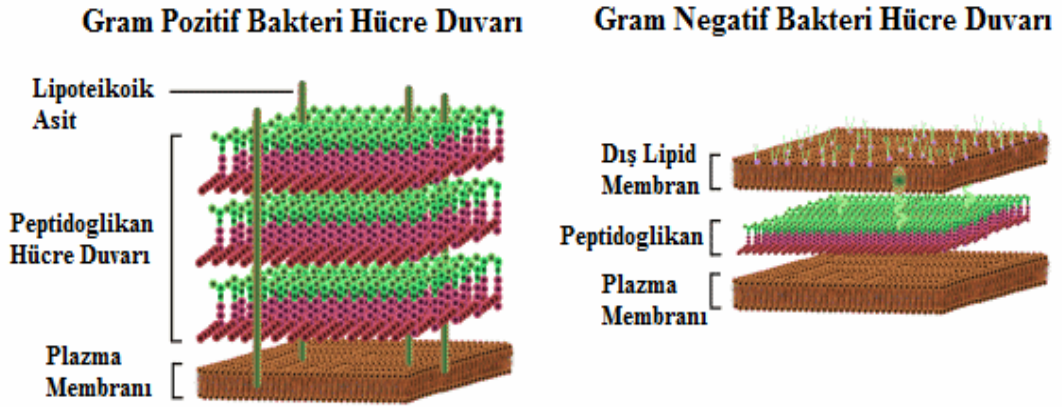
Lizozim moleküler genetiğin gelişmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Watson ve Crick DNA'nın yapısını aydınlatarak bir dönüm noktası oluşturmalarından sonra DNA ve proteinler ile moleküler biyoloji ve genetik arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelmişlerdir (<http://www.bv229.k12.ks.us/biophilia/lysozyme.htm>).

1.6.2. Lizozim Enziminin Yapısı

Lizozim (EC 3.2.1.17) bakteri hücre duvarlarını parçalayan bir enzimdir. N-asetilmuramik asit (NAM) ile N-asetilglukozamin (NAG) arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağımlı hidrolizleyerek, hücre duvarı peptidoglikanlarının NAM-NAG polisakarit bileşenini değiştirerek bunu yapar (Şekil 1.5). Lizozim, hücrelerde ve omurgalıların salgılarında yaygın olarak bulunur. Lizozim, bakterileri öldürebildiğinden dolayı sıkça insanın kendi antibiyotiği olarak da adlandırılan bir enzimdir. Biyolojik sıvıların ve dokuların yaygın bileşenidir, yumurta akında, gözyaşında, terde, geviş getiren hayvanların sindirim sisteminde bulunur. Bakteri hücre duvarları gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki tiptir. Gram pozitif bakteriler, teikoik asidin ince bir tabakasıyla sarılmış kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşmuş bir hücre duvarına sahiptir. Gram negatif bakteriler, ikinci bir lipid tabakasıyla kaplı olan ince bir peptidoglikan tabakaya sahiptir (Şekil 1.6). Lizozim, peptidoglikan tabakaya ulaşılabilirliğinden dolayı gram pozitif bakterilere karşı çok etkilidir. İlâveten lizozimin bazı gram negatif bakterilere ve virüslere karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Baker *et al.*, 2007).

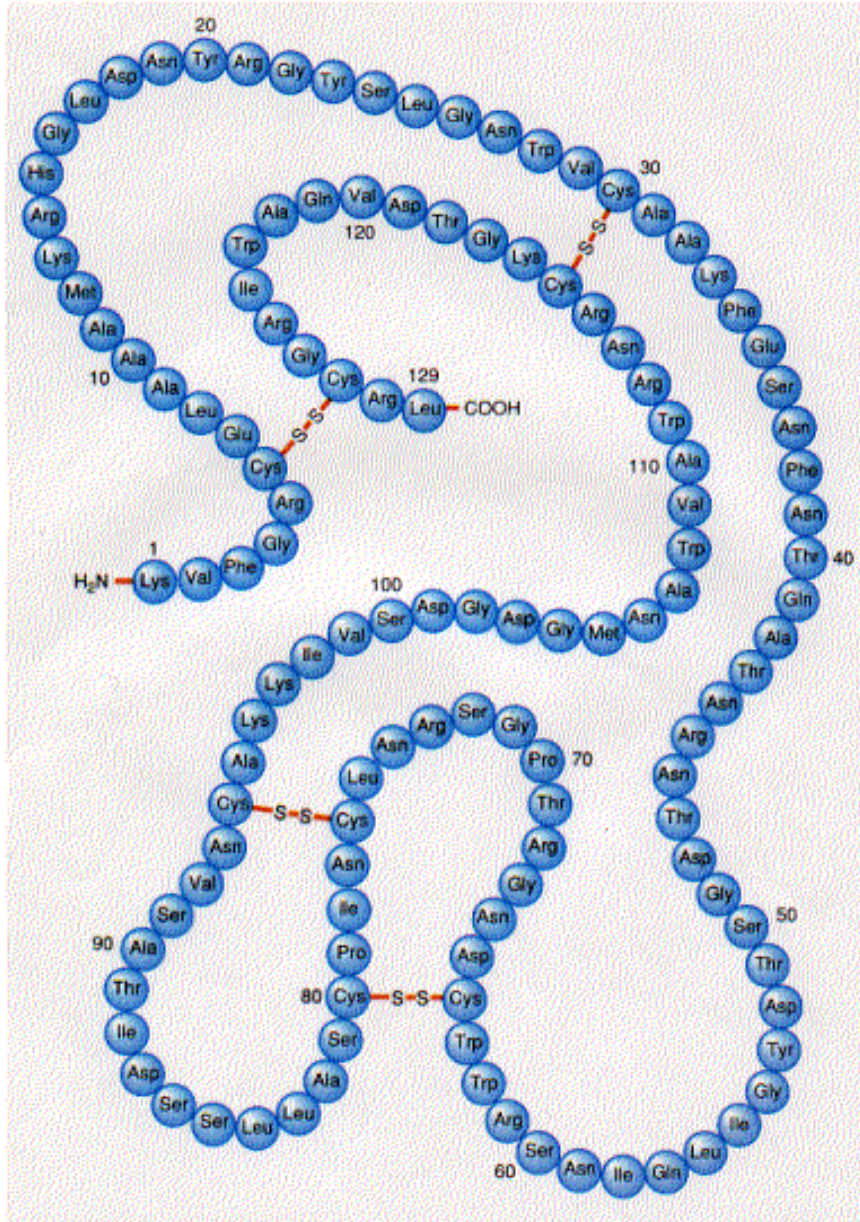


Şekil 1.5 Bakteri hücre duvarlarının NAM-NAG polisakarit birimleri (Voet ve Voet, 1990)



Şekil 1.6 Gram pozitif ve negatif bakteri hücre duvarlarının şematik gösterimi

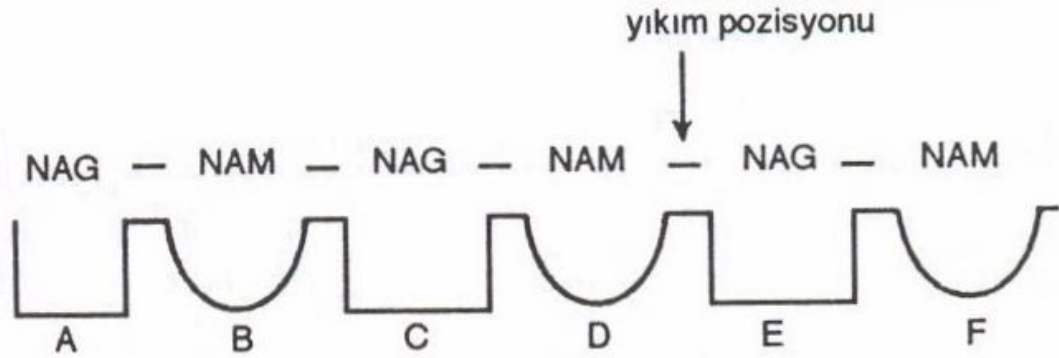
Tavuk yumurtası akı (HEW) lizozimi, lizozimin çok yaygın çalışılmış türlerinden biridir ve mekanistik olarak en iyi anlaşılmış enzimlerden biridir. İçte çapraz bağlı 4 disülfid bağı ve 129 amino asit birimi içeren (Şekil 1.7) tek polipeptid zincirinden oluşmuş oldukça küçük bir proteindir (14,6 kD). HEW lizozimi, substratının hidrolizini katalizlenmemiş reaksiyonunkinden 10^{10} kat daha büyük bir hızda hidrolizler.



Şekil 1.7 HEW lizoziminin birincil yapısı (Voet ve Voet, 1990)

1965’de David Phillips tarafından HEW lizoziminin X-ışını yapısı aydınlatıldığında bu, yüksek rezolüsyonda yapısı aydınlatılan ikinci protein, birinci enzimdi. Bu protein molekülü 30x30x45 Å’luk boyutları ile kabaca elipsoidal bir şekildeydi. Yapının en dikkat çekici özelliği, molekülün bir yüzünü boydan boya yaran substrat bağlanma bölgesiydi. Polipeptid zinciri bağlı olarak küçük düzenli sekonder yapıya sahipti: Yapı bir çok az veya fazla helikal yapı gösteren kısımlara, bunun yanında da bağlanma bölgesinin bir duvarını oluşturan üç sarmallı anti paralel β tabakaları bulundurmaktaydı. Beklendiği gibi nonpolar yan zincirlerinin çoğu sulu çözgenle temas etmeksizin molekülün içindedir (Voet ve Voet, 1990).

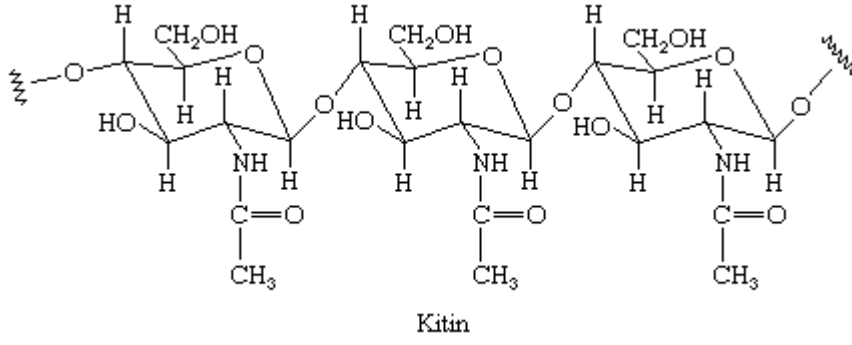
Lizozimin sahip olduğu substrat bağlama bölgesi, amino-şeker birimlerinden ibaret substratların altısını bağlayabilecek şekildedir (Palmer, 1994). Bu durum aşağıdaki gibi şematize edilebilir (Şekil 1.8)



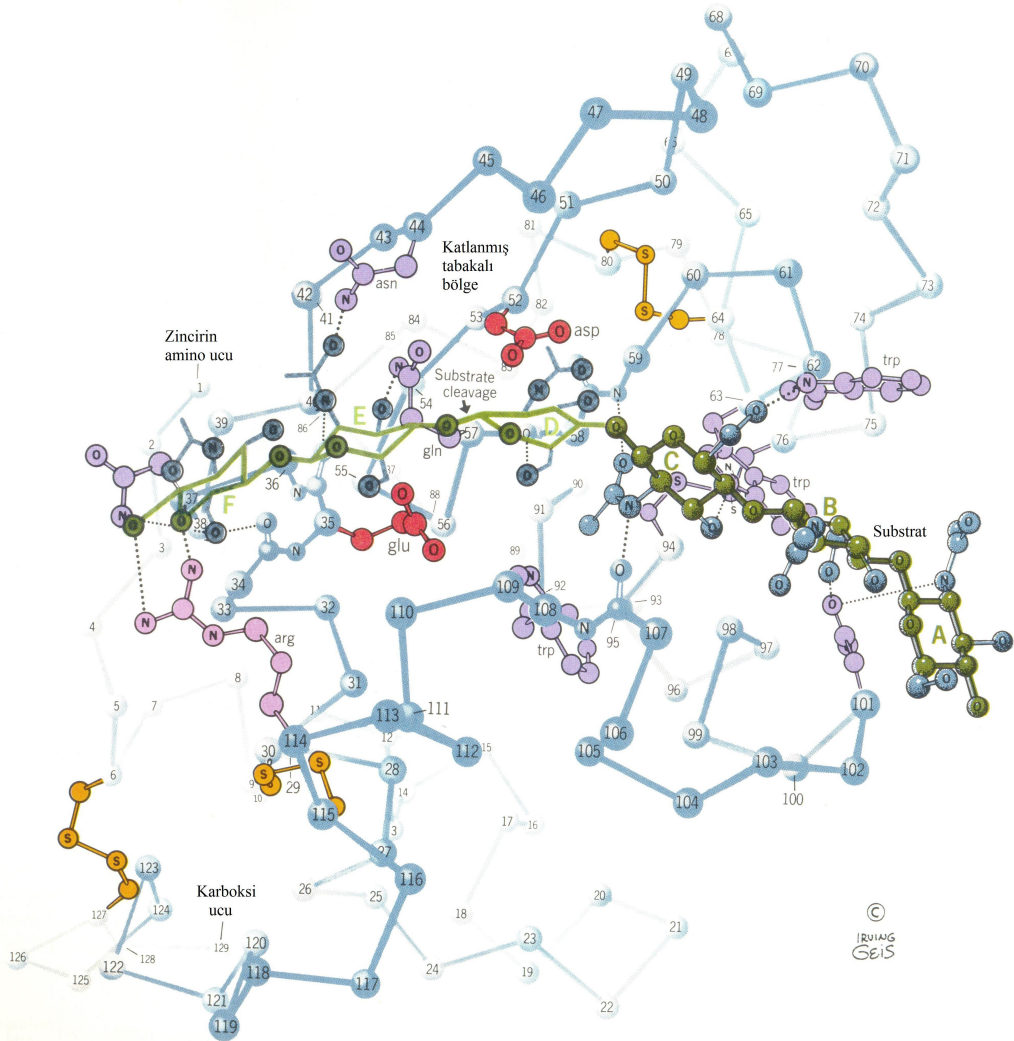
Şekil 1.8 Lizozimin substrat bağlama bölgesinin şematik gösterimi (Palmer, 1994)

Altı amino şekerin her biri, enzime hidrojen bağlarıyla bağlıdır; örneğin B ve C bölgelerinde aspartat-101'e, B bölgesinde triptofan-62'ye ve triptofan 63'e ve F bölgesinde asparajin-37'ye bağlanırlar. NAM, büyük laktil yan zinciri nedeniyle yer sınırlı olduğundan A, C ve E bölgelerine bağlanamaz ve D bölgesine bağlandıktan hemen sonra veya bağlanma sırasında heksoz halkası, koltuk şeklinden daha az kararlı şekli olan yarı-koltuk konformasyonuna dönüşür. Hidroliz, D ve E bölgeleri arasında yer alır ve NAM'ın C(1) (indirgenen uç) ve NAG'in C(4) bölgesi arasında daima $\beta(1\rightarrow4)$ glikozid bağına içermelidir.

HEW lizozimi, doğal peptidoglikan substratları kadar poli(NAG) birimleri içeren kitini de hidrolizler. Kitin $\beta(1\rightarrow4)$ N-asetilglukozamin birimleri içeren bir lineer homopolisakkarittir (Şekil 1.9). Bununla birlikte lizozim 5 birimden daha az olan NAG oligosakkaritlerini çok yavaş hidrolizlemesine rağmen bu substrat analogları enzimin aktif bölgesine bağlanır ve dolayısıyla lizozimin kompetitif inhibitörleridir. (NAG)₃-lizozim kompleksinin X ışını yapısı, (NAG)₃'ün A, B ve C substrat birimleri için Şekil 1.10'da gösterildiği gibi enzimatik bağlanma bölgesinin sağ tarafına bağlandığını göstermektedir.



Şekil 1.9 Kitinin NAM birimleri

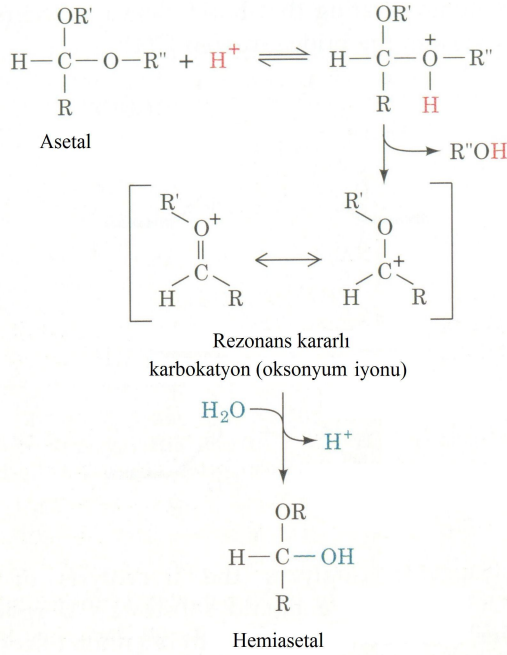


Şekil 1.10 HEW lizoziminin X-ışını yapısı (Voet ve Voet, 1990)

Bu inhibitör enzime bazıları A ve C birimlerinin asetamido gruplarını içeren hidrojen bağı ile olduğu kadar sıkı sıkıya uyan hidrofobik ilişkilerle sağlanan bağlarla bağlanır.

1.6.3. Lizozim Enziminin Katalitik Mekanizması

Lizozim tarafından katalizlenen bir glikozidin hidrolizi reaksiyonu, bir asetalin bir hemiasetale dönüşümüdür. Nonenzimatik asetal hidrolizi, C-O bağının kırılmasıyla oluşan bir reaktif oksijenin protonlanmasını içeren asit-katalizli bir reaksiyondur (Şekil 1.11). Bu, oksonyum iyonu olarak adlandırılan bir rezonans kararlı karbokatyonun oluşumu ile sonuçlanır. Maksimum orbital çakışmasını ve böylece stabilizasyonu kazanmak için oksonyum iyonlarının R ve R' grupları C, O ve H atomlarıyla aynı düzlemde olmalıdır. Bu oksonyum iyonu daha sonra hemiasetal vermek üzere suya eklenir ve asit katalizörünü yeniden üretir.



Şekil 1.11 Bir asetalin bir hemiasetale enzimatik olmayan asit katalizli hidrolizinin mekanizması (Voet ve Voet, 1990)

Lizozimin aktif merkezinin yakın civarında katalitik özellikler için gerekli olan fonksiyonel gruplar yalnızca Glu 35 ve Asp 52'dir. Bu birimler kırılacak $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağının her iki tarafına dağılmıştır. Asp 52 ve Glu 35'in yan zincirleri önemli oranda farklı çevrelere sahiptir. Asp 52 polar gruplarla çevrilir ve kompleks hidrojen bağı ağına katılır Dolayısıyla Asp 52'nin normal bir pK'ya sahip olması, deprotonlanması ve böylece lizozimin aktif olduğu pH 3 ile 8 aralığı boyunca negatif

yüklü olması gerekir. Aksine, Glu 35'in karboksil grubu yoğun bir nonpolar bölgededir ve karboksil gruplarının oldukça yüksek pH'larda protonlanması muhtemeldir. Hem Asp 52 hem de Glu 35'in karboksil grupları ve D-NAG biriminin C(1)-O(1) bağı arasındaki en yakın temaslar yaklaşık 3 Å'dur ve bu onları sırasıyla elektrostatik ve asit katalizörleri için birincil aday yapar (Voet ve Voet, 1990).

1.6.4. Lizozim Enzimi İçin Önerilen Phillips Mekanizması

Phillips, lizozim için aşağıdaki enzimatik mekanizmayı önermiştir (Şekil 1.12).

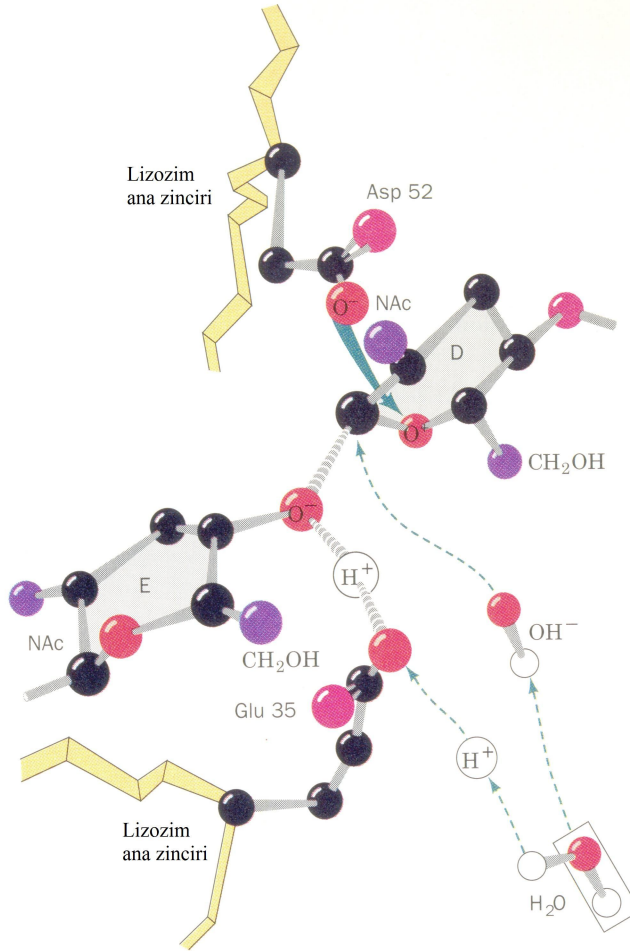
1) Lizozim, bir hekzasakkarit birimine bağlanarak bir bakteriyel hücre duvarına yapışır. Bu işlemde D birimi, $-C(6)H_2OH$ grubunun, proteinle başka şekilde yapılabilecek istenmeyen etkileşimlere karşılık olarak yarım koltuk konformasyonuna karşı isteksizdir.

2) Glu 35, civardaki tek polar gruplu D halkasının 1 nolu oksijenine protonunu transfer eder (genel asit katalizi). C(1)-O(1) bağı böylece 1 nolu C'daki rezonans-kararlı oksonyum iyonunu üreterek parçalanır.

3) Asp 52'nin iyonlaşmış karboksil grubu, yük-yük etkileşimleri (elektrostatik kataliz) vasıtasıyla oksonyum iyonu gelişimini stabilize etmek için hareket eder. Asp 52'nin C(1) ve karboksil O atomu arasındaki yaklaşık 3 Å'luk fark nedeniyle kovalent bağ oluşmaz. Bağ yarıma reaksiyonu, D halkasında onu düzlemsel yarım-koltuk konformasyonuna zorlayan mevcut gerilme ile kolaylaştırılır. Bu, oksonyum iyonunun istenen düzlemselliğinin bir sonucudur yani D halkasının başlangıç bağlanma konformasyonu, reaksiyonun geçiş halinin konformasyonuna benzer.

4) Bu noktada enzim, bir glikozil-enzim araürünü veren bağı polisakkarit ile hidrolizlenmiş E halkasını serbest bırakır. Bu oksonyum iyonu, ardından ürün oluşturmak ve Glu 35'i yeniden protonlamak için önceki adımların tersine çözeltiden gelen H_2O 'ya bağlanır. Bu reaksiyonun konfigürasyonunun muhafazası, oksonyum iyonlarından birinin enzimatik parçalanmayla karşılaştığında korunmasını gerektirir.

Enzim daha sonra katalitik döngüyü tamamlamak üzere D halkası ile ona bağlı sakkarit ürününü serbest bırakır.



Şekil 1.12 Lizozim reaksiyonu için Phillips mekanizması (Voet ve Voet, 1990)

Phillips mekanizması, lizozimin yapısal araştırmalarının temeliyle ve enzimatik olmayan asetal hidrolizinin mekanizmasının bilinmesiyle formüle edilmiştir. Bu mekanizmanın geçerliliğinin dayanaklarını sunan kanıtlar çeşitlidir.

Lizozimin önemli katalitik grupları olan Asp 52 ve Glu 35, grup spesifik reaksiyonların kullanımını vasıtasıyla deneysel olarak tanımlanmıştır.

Ayrıca, lizozimin pH hızı profilinin analizi, bu enzimin pK'ları 3,8 ve 6,7 olan katalitik olarak önemli 2 iyonlaşabilir gruba sahip olduğunu göstermiştir. Bu ikinci

iyonlaşma, bir karboksil grubu için anormal derecede yüksek olmasına rağmen, bu iyonlaşmanın lizozimin I₂ oksidasyonu ile yok olması nedeniyle Glu 35'e atfedilir. Bu iyonlaşma için diğer tek mantıklı olasılık, bu pK'nin lizozimin tek olan Histidin biriminin olmasıdır fakat bu birim aktif bölgeden oldukça uzakta bulunmaktadır. Trietoksonyum floroborat ile muamele edilmiş enzimde pK 3,8'deki iyonlaşmanın gözlenmemesi bu iyonlaşmanın Asp 52 nedeniyle olduğunu gösterir. Bu gözlem, lizozimin yalnızca Asp 52 iyonlaştığında ve Glu 35 iyonlaşmadığında aktif olduğu mekanistik kabulünü doğrular.

Glu 35 ve Asp 52 yanında lizozimin diğer karboksil grupları, substratın varlığında karboksile özgü ajanlarla lizozimi reaksiyona sokarak gösterildiği üzere katalitik işleme katılmazlar. Bu muamele, Glu 35 ve Asp 52 dışındaki tüm karboksil grupları türevlendirildiğinde enzimin neredeyse tamamen aktif olduğu sonucunu verir. Diğer grup spesifik ajanlarla modifiye olan örneğin His, Lys, Met veya Tyr birimleri, temel protein yapısı bozulmalarına hiç neden olmaz fakat lizozimin katalitik etkinliğinde biraz değişikliğe sebep olur (Voet ve Voet, 1990).

1.7. ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU

Enzimler, canlı sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hızını artıran biyolojik katalizörlerdir. Belli bir düzendeki binlerce atomdan oluşan bu moleküller, biyolojik hücreleri oluşturan farklı kimyasal reaksiyonların pek çoğunu katalize etme kabiliyetindedir. Enzimlerin biyolojik süreçlerde ve sağlık ve hastalık durumlarındaki rolleri ayrıntılı bir şekilde araştırılmaktadır. Enzimler yüksek substrat özgüllükleri ile oldukça ılımlı koşullar altında reaksiyonları katalizleme kabiliyetine sahiptirler ve bunun sonucu olarak yan ürün oluşumu azalır. Katalizledikleri reaksiyonlar arasında biyolojik moleküllerin organik kimyadaki alışılmış metotlarla başarılabilen pek çok kompleks dönüşümleri bulunmaktadır. Bu durum enzimleri biyoteknolojik kullanımlar için çok ilgi çekici yapmaktadır. Yirminci yüzyılın başlarında enzimlerin fermantasyon işlemlerinden sorumlu olduğu gösterilmiştir ve yapıları ile kimyasal bileşimleri incelenmeye başlanmıştır. Ortaya çıkan bilgiler, biyolojik katalizörlerin tekstil, farmosotik ve kimya endüstrileri gibi diğer çeşitli alanlarda yaygın teknolojik kullanımına yol açmıştır. Bununla birlikte çoğu enzim

göreceli olarak oldukça kararsızdır, saflaştırma maliyetleri oldukça fazladır ve kullanımdan sonra reaksiyon karışımından aktif enzimi geri kazanmak teknik olarak zordur. Bu problemlerin olası çözümü enzim immobilizasyonu olabilir.

Enzimlerin immobilizasyonu, enzimleri katalitik aktivitelerinin korunması şartıyla belli bir alan içerisinde fiziksel olarak hapsetmek veya sınırlamak ve bu şekilde tekrar ve sürekli olarak kullanılabilmesi işlemi olarak tanımlanabilir. Doğal formları ile karşılaştırıldığında immobilize enzimler artan kararlılık, daha kolay ürün ve enzim kazanımı ve saflaştırması, enzimin tekrar kullanılabilme olasılığı, reaksiyonun hızlı sonlanması gibi avantajlara sahiptir. Endüstriyel uygulamalarının yanında, immobilizasyon teknikleri tanı, biyoafinite kromatografisi ve biyosensörlerdeki uygulamaları ile sayısız biyoteknolojik ürünün üretilmesine temel oluşturmuştur. Başlangıçta yalnızca tek enzim immobilizasyonu söz konusu iken 1970'lerde kofaktör rejenerasyonunu sağlayan iki enzimli reaksiyonların veya tam hücrelerin kullanıldığı daha kompleks sistemler geliştirilmiştir. Bir immobilize enzim sisteminin temel bileşenleri enzim, matriks ve bağlanma şeklindedir.

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımları sentetik rasemik D-L amino asitlerin ayrılması için *Aspergillus oryzae* aminoaçilazının immobilizasyonunu geliştiren Tosa *et al.* (1966) tarafından rapor edilmiştir. İmmobilize enzimlerin diğer temel uygulamaları şekerler, amino asitler ve farmosotiklerin endüstriyel uygulamalarıdır. Bazı endüstriyel işlemlerde istenen enzimi içeren tam mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak kullanılır (Brena ve Batista-Viera, 2006).

1.7.1. Desteklerin Seçimi

Matrikslerin özellikleri, immobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde başlıca önem taşır. İdeal destek özellikleri başlıca fiziksel dayanıklılık, hidrofilitate, inertlik, kolay türevlendirilebilme, biyoyumluluk, mikrobiyal atağa karşı dayanıklılık ve düşük maliyetle elde edilebilirliktir.

Destekler kimyasal bileşimlerine göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılabilirler. Organik destekler doğal ve sentetik polimerler olarak iki kısımda incelenebilirler (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Enzim immobilizasyonunda kullanılan desteklerin sınıflandırılması (Brena ve Batista-Viera, 2006)

Organik
<p><i>Doğal polimerler</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Polisakkaritler, selüloz, dekstranlar, agar, agaroz, kitin, alginat ❖ Proteinler, kollajen, albumin ❖ Karbon <p><i>Sentetik polimerler</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Polistiren ❖ Diğer polimerler: Poliakrilat polimetakrilatlar, poliakrilamid, poliamidler, vinil ve allil-polimerler
İnorganik
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Doğal polimerler: Bentonit, silika ❖ İşlenmiş Materyaller: Cam (gözeneksiz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler

Matrikslerin fiziksel özellikleri (ortalama tanecik çapı, şişme davranışı, mekanik gücü ve basınç davranışı) immobilize sistemlerin performansı için temel önem taşır ve teknik koşullar (karıştırmalı tank, akışkan ve sabit yataklar) altında kullanılacak reaktör tipini belirlerler. Özellikle gözenek parametreleri ve tanecik büyüklüğü toplam yüzey alanını belirler; bu sebeple enzimlerin bağlanma kapasitesini önemli bir şekilde etkiler. Gözeneksiz destekler az miktarda difüzyonel sınırlamalar gösterir fakat düşük yükleme kapasitesine sahiptirler. Daha fazla geniş yüzey alanı daha fazla

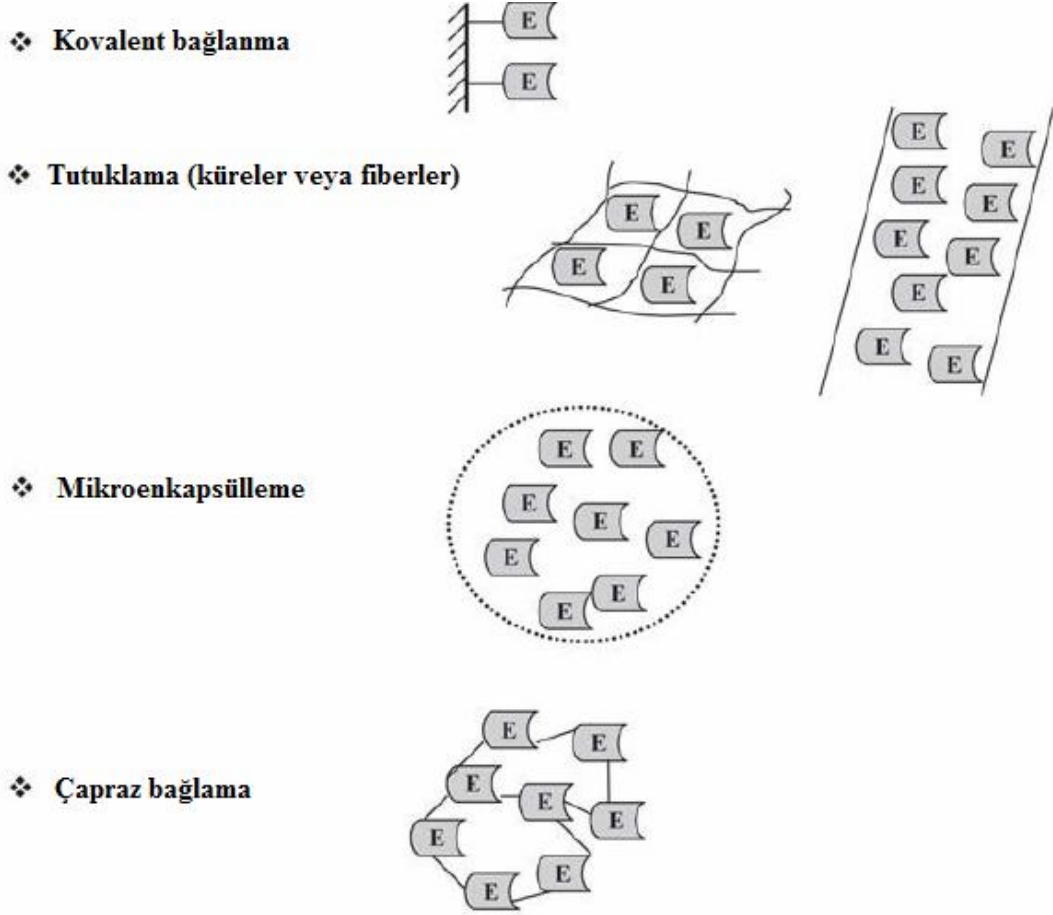
enzimin yüklenmesine izin verdiğinden gözenekli destekler genellikle tercih edilir ve bu şekilde immobilize edilmiş enzim çevre etkilerinden daha fazla korunur. Gözenekli desteklerin, kapasite ve akış özelliklerini optimize etmek için kontrollü gözenek dağılımına sahip olması gerekir. İnorganik taşıyıcıların bir çok avantajına rağmen (fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal parçalanmaya karşı yüksek dayanıklılık gibi), endüstriyel uygulamaların çoğu organik matrikslerle gerçekleştirilir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

1.7.2. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu yöntemleri geri dönüşümsüz ve geri dönüşümlü olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir.

1.7.3. Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

Geri dönüşümsüz immobilizasyon kavramı, bir biyokatalizörün bir desteğe bağlandıktan sonra enzimin veya desteğin biyolojik aktivitesini kaybetmeden ayrılmayacağı anlamına gelir. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonunun en yaygın işlemleri kovalent bağlama, tutuklanma (entrapment), mikrokapsülleme ve çapraz bağlamadır. Bu yöntemlerin şematik gösterimi Şekil 1.13'deki gibidir.



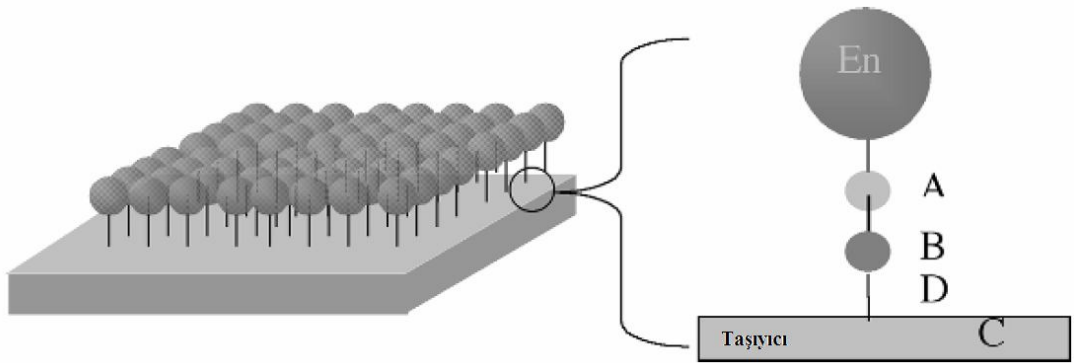
Şekil 1.13 Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera, 2006)

1.7.3.1. Kovalent Bağlanma

Kovalent bağların oluşumuna dayanan metotlarla proteinlerin immobilizasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metodun avantajı enzim ve matriks arasında oluşan bağların kararlı doğası nedeniyle enzimin kullanılan çözeltiliye sızmasıdır. Bununla birlikte yüksek düzeyde bağlanmanın sağlanması amacıyla katalitik aktivite için gerekli amino asit birimlerinin desteğe kovalent bağlanmaması gerekir. Ancak, bu bazen önlenmesi zor bir durum olmaktadır. Matrikste bulunan fonksiyonel gruplara bağlı olarak çok çeşitli reaksiyonlar geliştirilmektedir. Genelde bağlanma metotları iki temel sınıfa ayrılır. (1) Bir polimere reaktif bir fonksiyonel grubu ilave ederek matriksin aktivasyonu ve (2) Aktive edilmiş bir grubu oluşturmak için polimer iskeletinin modifikasyonu. Bu aktivasyon işlemleri genellikle bağlanma

sırasında proteinler üzerindeki güçlü nükleofillerle destek üzerinde reaksiyona girebilecek elektrofilik grupları üretmek için tasarlanmaktadır. Matrislere kovalent bağlama işlemini kontrol eden temel prensipler proteinlerin kimyasal modifikasyonları için kullanılanlara benzerdir. En sık kullanılan reaksiyonlar lizin (ϵ -amino grubu), sistein (tiol grubu) ve aspartik ve glutamik asit (karboksilik grubu) yan zincirlerini içerir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

Bir taşıyıcıya enzimin kovalent bağlanması, enzim yüzeyinde bulunan aktif amino asit birimleri ve taşıyıcı yüzeyine bağlanmış olan aktif fonksiyonel gruplar arasındaki kimyasal reaksiyon veya bunun tersine dayanır (Şekil 1.14). Etkili bir bağlanmaya ulaşmak için taşıyıcının ve/veya enzimin fonksiyonelliği immobilizasyondan önce aktive edilmelidir.



Şekil 1.14 Taşıyıcıya enzimin kovalent bağlanması: (A) aktif amino asit birimi; (B) taşıyıcının bağlayıcı fonksiyonel grubu; (C) taşıyıcı; (D) uzatıcı kol (Cao, 2005)

Kovalent bağlı immobilize bir enzimin performansı, taşıyıcının fiziksel özellikleri (gözenek büyüklüğü, tanecik büyüklüğü, şekil gibi), taşıyıcının kimyasal özellikleri (iskeletin kimyasal bileşimi, aktif fonksiyonel grupları), bağ veya bağlanma kimyasının doğası, immobilize olduğu anda veya immobilizasyondan sonra enzimin konformasyonu, enzimin yönlendiği, uzatıcının uzunluğu ve doğası, enzimin bağlanması için kullanılan ortamın özellikleri, enzim ve taşıyıcı arasında oluşan bağların sayısı ve taşıyıcı içinde veya üzerinde enzimin dağılımı gibi faktörlere bağlıdır (Cao, 2005).

1.7.3.2. Tutuklanma (Entrapment)

Tutuklanma, enzimin çapraz bağlanma veya jelleşme gibi kimyasal veya fiziksel yollarla oluşturulan bir matriks içinde gömülmesi işlemine verilen addır. Genellikle tutuklama matriksi immobilizasyon işlemi sırasında oluşturulur. Bu nedenle jel matriksi bileşenlerinin ve kullanılan koşulların, enzimin özellikleri ile uyumlu olması gerekmektedir. Enzim molekülleri matrikse fiziksel veya kovalent bağlanmayla tutuklanabilirler. Bu sebeple tutuklama fiziksel tutuklanma ve kimyasal tutuklanma olarak da sınıflandırılabilir. Seçilen metoda bağlı olarak matriksin hazırlanması için kullanılan bileşenler de farklı olabilir. Polimerizasyon tutuklaması durumunda doymamış monomerler ve komonomerler çapraz bağlayıcı olarak kullanılırlar. Polimerizasyon işlemi ışınlama ile veya kimyasal olarak başlatılabilir. Fiziksel jelleşmede enzimi (veya tam hücreyi) içeren bir çözelti ve çözünmüş polimer genellikle poli(vinil alkol)-kriyojel küreleri veya tuzlar (örneğin alginat-Ca²⁺ sistemi) kullanılarak ya da çözgen uzaklaştırılmasıyla düşük sıcaklıklar altında jelleştirilir.

Hidrofilik veya hidrofobik bir çok enzim çeşitli jel matrikslerinde tutuklanmıştır. Örneğin: alginat veya kitosanda *Candida rugosa* lipazı, jelatin veya poliakrilamid jelinde penisilin G açılaz aktivitesiyle tam hücre, pH cevaplı hidrojellerde glukoz oksidaz, poli(akrilamid-ko-hidroksietilmetakrilat)ta maya alkol dehidrogenazı, selüloz kürelerde tam hücre glukoz izomerazı tutuklanmıştır.

Tutuklama metoduna ve uygulamaya bağlı olarak tutuklanan enzimlerin geometrik özellikleri küre, film, fiber ve köpük gibi çeşitli formlara kolayca adapte olabilir. Tutuklama yöntemindeki önemli bir dezavantaj, difüzyonel sınırlamalar nedeniyle enzimin görünür aktivitesindeki azalmadır. Ancak bir matrikste tutuklandığında diğer immobilizasyon yöntemlerindeki (örneğin kovalent immobilizasyondaki) kadar veya daha yüksek aktivite gösteren enzim örnekleri de bulunmaktadır. Bu sebeple kovalent bağlanma durumunda kolayca deaktive olan enzimler için tutuklama yöntemini kullanmak oldukça yararlıdır (Cao, 2005).

1.7.3.3. Membranda Tutuklama (Enkapsülasyon)

Enkapsülasyon katalizörü por ağız boyutunun por boşluğu çapından daha küçük olduğu bir gözenekte hapsetme yöntemidir. Küçük por girişi, enkapsule katalizörün reaksiyon ortamına salınmasını önlerken, aynı zamanda reaksiyon ve ürün için güçlü bir kütle transfer direncinin oluşmasını sağlar (Zhao *et al.*, 2006). Genellikle por büyüklüğü 1'den 100 nm'ye kadar değişen membranlar enzimin sızmasını önlemek ve membrandan substratın geçmesine izin vermek için yeterlidir (Romanskevic *et al.*, 2006). Küçük por büyüklüğü, yüksek molekül kütleli substratlar için dezavantaj olabilir. Enkapsülasyon basit membran içinde, küresel veya şekilsiz bir membran veya duvar içinde, benzer veya değişken duvarlardan oluşan çoklu-duvar yapısı içinde veya tek bir duvar yapısında çoklu çekirdek içinde gerçekleştirilebilir (Gibbs *et al.*, 1999).

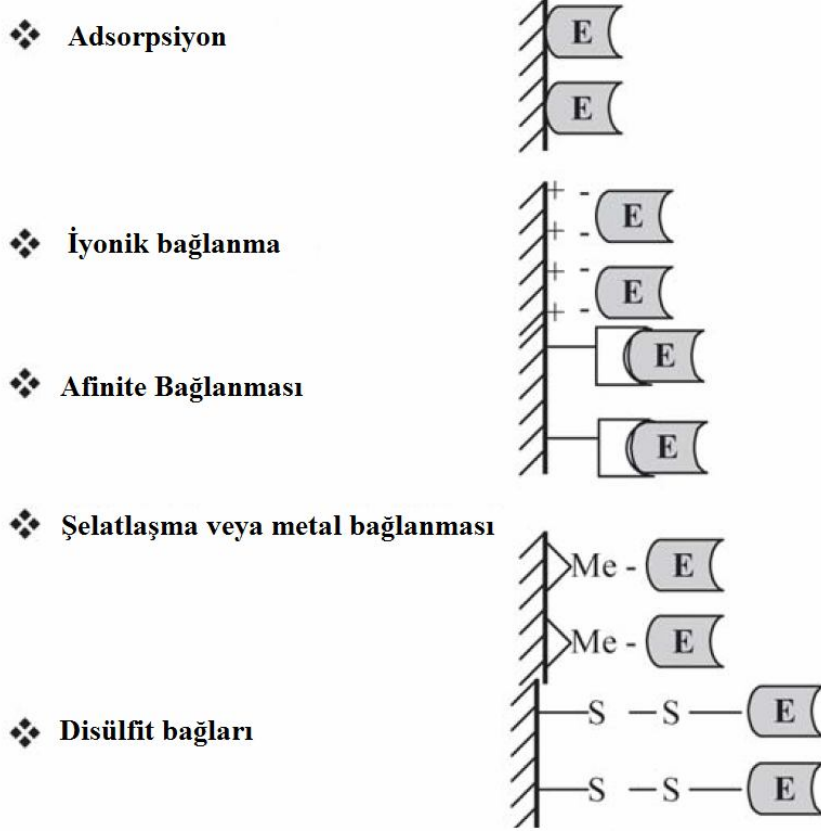
1.7.3.4. Çapraz Bağlama

Multifonksiyonel ajanlarla enzimin çapraz bağlanması, kovalent bağlar yoluyla bir enzim molekülünün diğerine bağlanmasını içerir. Enzimin immobilizasyonu, glutaraldehit, bisdiazobenzidin ve heksametilen diizosiyanat gibi bifonksiyonel veya multifonksiyonel ajanlar sayesinde enzim molekülleri arasında moleküller arası çapraz bağların oluşumuyla gerçekleştirilir. Bu immobilizasyon metodu basitliği nedeniyle çekicidir fakat çözünmüş enzimin çapraz bağlanmasının kontrolü zordur (Romanskevic *et al.*, 2006).

1.7.4. Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

Enzim-substrat bağlanmasının özelliği nedeniyle geri dönüşümlü immobilize enzimler ılımlı koşullar altında destekten ayrılabilir (Şekil 1.15). Enzim immobilizasyonunda geri dönüşümlü metotların kullanımı ekonomik sebepler nedeniyle önemlidir çünkü destek yeniden kullanılabilir ve taze enzimle yüklenebilir. Gerçekten de desteğin maliyeti, immobilize katalizörlerin tamamının maliyetinde genellikle temel faktördür. Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonu, kararsız enzimlerin immobilizasyonu ve biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalar için oldukça

önemlidir. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri aşağıdaki alt başlıklarda incelenebilir.



Şekil 1.15 Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera, 2006)

1.7.4.1. Adsorpsiyon (Nonkovalent Etkileşimler)

a) Nonspesifik Adsorpsiyon

En basit immobilizasyon metodu, fiziksel adsorpsiyona veya iyonik bağlanmaya dayanan nonspesifik adsorpsiyondur. Fiziksel adsorpsiyonda enzimler hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri veya hidrofobik etkileşimlerle matrikse bağlanırlar buna karşılık iyonik bağlanmada enzimler tuz bağları vasıtasıyla bağlıdır. Nonkovalent immobilizasyonla ilgili kuvvetlerin şiddeti, etkileşimin gücünü belirleyen koşulların (pH, iyonik şiddet, sıcaklık veya çözünenin polaritesi) değiştirilmesiyle değişebilir. Adsorpsiyonla immobilizasyon ılımlı, gerçekleştirilmesi kolay bir işlemdir ve genellikle enzim katalitik aktivitesini korur. Böylesi metotlar

ekonomik olarak çekicidirler fakat etkileşim göreceli olarak zayıfladığında matriksten enzimin sızması gibi problemler oluşabilir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

b) İyonik Bağlanma ile Adsorpsiyon

Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonunda bilinen bir yaklaşım protein-ligand etkileşimlerini kromatografide kullanılan prensiplere dayandırmaktır. Örneğin enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonundaki kromatografik prensiplerin ilk uygulamalarından biri iyon değiştiricilerin kullanılması olmuştur. Bu metot basit ve geri dönüşümlüdür fakat genelde enzimin hem güçlü bağlandığı hem de tamamen aktif olduğu koşulları bulmak zordur. Yakın bir geçmişte, immobilize polimerik-iyonik ligandların kullanımı protein-matriks ilişkilerinin ayarlanmasına izin vermiş ve böylelikle türevin özelliklerinin optimizasyonu mümkün olmuştur. Çok sayıda patent, çok çeşitli enzimleri veya tam hücreleri bağlamak için polietileniminin kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, substrat veya ürünlerin kendileri yüklü olduklarında yüksek yük içeren desteklerin kullanılması, dağılma ve difüzyon olayları nedeniyle kinetiğin bozulması sonucu, problem yaratabilir. Bunun sonucunda, optimum pH ve pH stabilitesi gibi enzim özellikleri değişebilir. Bu durum bir problem gibi görülse de, uygulamaya bağlı olarak, belli bir enzimin optimum koşullarının daha alkali veya daha asidik koşullara kaydırılması yararlı olabilir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

c) Hidrofobik Adsorpsiyon

Hidrofobik adsorpsiyon, enzimler üzerindeki hidrofobik bölgeler veya alanlar ile taşıyıcı üzerindeki hidrofobik kısımlar arasındaki etkileşimlere dayanır. Enzimlerin hidrofobik adsorpsiyonu için kullanılan taşıyıcılar genellikle hazır olan taşıyıcıların türevlendirilmesiyle hazırlanır. Örneğin selüloz, agaroz küreler, sepharoz gibi doğal polimerler bu amaçla kullanılabilir. Alternatif olarak silika gibi inorganik taşıyıcılar ya da Eupergit C ve poli(vinil alkol) küreleri gibi sentetik taşıyıcılar da enzim immobilizasyonu için hidrofobik adsorbanları hazırlamakta kullanılabilir. Hidrofobik fonksiyonel grup, genellikle hazır alınan taşıyıcılara kovalent bağlanır. Bununla birlikte nadiren hidrofobik bileşik taşıyıcı üzerine basitçe kaplanabilir. Taşıyıcıların

adsorpsiyon kapasitesi taşıyıcı yapısı, fonksiyonel grubun bağlanma derecesi, fonksiyonel grubun bağlanma özellikleri, aktivatörlerin veya inhibitörlerin varlığı, proteinin doğası ve etkileşimin olduğu ortam gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca hidrofobik etkileşimlerle adsorplanan enzimlerin aktiviteleri, enzim yüklemesi, taşıyıcının hidrofobisitesi, substratın büyüklüğü, hidrofobik uçların uzunluğu, difüzyonel kısıtlamalar ve bağlanma yoğunluğu faktörlerine bağlıdır. İmmobilize enzimlerin kararlılığı, hidrofobik adsorpsiyonla artabilir, azalabilir veya değişmeyebilir (Cao, 2005).

d) Biyospesifik Adsorpsiyon

Biyospesifik adsorpsiyon enzim ve taşıyıcının özel fonksiyonel grupları arasındaki etkileşimlere dayanır. Bu teknoloji başlangıçta adsorpsiyonun geri dönüşümlülüğü ve seçiciliği nedeniyle enzimlerin ayrılması ve saflaştırılması için tasarlanmıştır. İmmobilize Con A gibi biyoafinite adsorbanları üzerine immobilize edilmiş enzimler, muhtemelen düzenli yönlendirilmiş immobilizasyon (bölge spesifik immobilizasyon) nedeniyle olağanüstü yüksek aktiviteye sahiptirler. Depolama ve işlemsel stabilite ile termal stabilite, immobilize biyo ligandlar ile enzimin komplementer etkileşimi nedeniyle genellikle artmaktadır. İmmobilize substratlar, substrat analogları veya inhibitörler yaygın olarak enzimleri saflaştırmak için kullanılırken taşıyıcıya bağlı substratlar, substrat analogları veya inhibitörler üzerine immobilize edilmiş enzimler nadiren biyokatalizör olarak kullanılırlar. Bunun sebebi taşıyıcı ile enzimin zayıf etkileşimleridir (Cao, 2005).

1.7.4.2. Şelatlaşma veya Metal Bağlanması

Organik taşıyıcıların yüzeyinde bulunan geçiş metal tuzları veya hidroksitler matriks üzerindeki nükleofilik gruplara koordinasyon yoluyla bağlanır. Başlıca titanyum ve zirkonyum tuzları kullanılmaktadır ve bu metot metal bağlı immobilizasyon olarak bilinmektedir. Bu metal tuzları veya hidroksitleri ısıtma veya nötralizasyon ile destek (selüloz, kitin, alginik asit ve silika bazlı taşıyıcılar) üzerine çöktürülürler. Sterik etkiler nedeniyle metalin tüm koordinasyon pozisyonlarına oturması matriks için imkansızdır, bu nedenle bazı pozisyonlar enzimlerden gelen gruplarla koordine

olmak üzere serbest kalır. Bu metot oldukça basittir ve bu şekilde immobilize olmuş enzimlerle elde edilen spesifik aktiviteler göreceli olarak yüksektir (% 30-80). Bununla birlikte elde edilen işlemsel kararlılık oldukça değişkendir ve sonuçlar kolayca tekrar edilebilir değildir. Tekrar edilememenin nedeni muhtemelen özdeş olmayan adsorpsiyon bölgeleri ve destekten önemli oranda metal iyonu sızması ile ilgilidir. Adsorpsiyon bölgelerinin oluşumunun kontrolünü artırmak için şelatlayıcı ligandlar, kararlı kovalent bağlar yardımıyla katı destekler üzerine immobilize edilirler. Daha sonra metal iyonları koordinasyon yoluyla bağlanır ve oluşan kararlı kompleksler proteinlerin alıkonması için kullanılır. Bağlı proteinin elüsyonu çözümlü ligandların yarışmasıyla veya pH'ı düşürülerek kolayca sağlanır. Destek eğer istenirse EDTA gibi güçlü bir şelatlayıcı ile yıkanarak rejenere edilir. İmmobilize metal iyonu afinite adsorbanları, protein kromatografisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonu için destek olarak farklı immobilize metal iyonu afinite jelleri kullanma yaklaşımları *E.coli* β -galaktozidazı model olarak kullanılarak araştırılmıştır (Brena ve Batista-Viera, 2006).

1.7.4.3. Disülfid Bağlarının Oluşumu

Bu enzim immobilizasyonu yaklaşımı, destek ile enzim arasında disülfid (S-S) bağlarının oluşumuna dayanır. Bu nedenle, açık tiol (-SH) grupları taşıyan enzimler, ılımlı koşullar altında reaktif disülfür veya disülfür oksitlerle sağlanan reaktif tiol destekleri üzerine immobilize edilirler. Bu yaklaşımın temel potansiyel avantajı, tiol grubu taşıyan enzim ve aktive edilmiş katı destek arasında oluşan bağların geri dönüşümlülüğüdür çünkü bağlı protein, düşük molekül kütleli tiollerin (örneğin dithiothreitol, DTT) aşırısında serbest kalır. Enzim adsorbandan oldukça hızlı bir şekilde ayrılır ve destek tekrar yüklenebilir. Enzimin inaktivasyonundan sonra polimerik desteğin yeniden kullanılabilme imkanı, destek materyalinin yüksek maliyeti nedeni ile kullanımının kısıtlı olduğu endüstrilerde immobilize enzimlerin pratik kullanımlarına izin verir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

1.8. ADSORPSİYON İZOTERMLERİ ve KİNETİKLERİ

Adsorpsiyon sürecinin değerlendirilmesinde iki önemli fizikokimyasal faktör adsorpsiyonun dengesi ve kinetiğidir. Denge çalışmaları adsorbanın kapasitesini açıklar (Ho, 1995). Adsorban ile adsorplanan arasındaki denge ilişkileri, genellikle sabit sıcaklıkta denge durumunda, adsorplanan miktar ile çözültide kalan arasındaki oranı veren adsorpsiyon izotermi ile tanımlanır. Langmuir ve Freundlich olarak iki çeşit adsorpsiyon izotermi kullanılır.

1932'de yüzey kimyası alanındaki keşifleri ve araştırmaları ile Nobel ödülüne layık görülen Amerikalı kimyacı Irving Langmuir yüzeye adsorplanan gaz miktarı ile o gazın basıncı arasında bir bağıntı geliştirdi (Mohann *et al.*, 2006). 1916'da gazların adsorpsiyonu için geliştirdiği bu ilk kantitatif teori aşağıdaki kabuller üzerine kurulmuştu (Moore, 1972).

- 1) Katı yüzeyi, belirli sayıda adsorpsiyon bölgeleri içerir. Herhangi bir sıcaklık ve gaz basıncındaki denge durumunda bu bölgelerin θ kadarı adsorplanan moleküller tarafından tutulurken, $1 - \theta$ kadarı boştur.
- 2) Her bağlanma bölgesi bir tane adsorplanan molekül tutabilir.
- 3) Tüm bölgeler için adsorpsiyon ısısı aynı olup, kaplanan θ bölgesi ile bağıntılı değildir.
- 4) Farklı bağlanma bölgelerindeki moleküller arasında ilişki yoktur. Bir molekülün boş bir bölgeye bağlanma veya dolu bir bölgeden ayrılma olasılığı komşu bölgelerin dolu veya boş olmasına bağlı değildir.

Langmuir adsorpsiyon izotermi genellikle bir sıvı çözültiden çözünen maddenin adsorpsiyonu için kullanılır. Langmuir adsorpsiyon izotermi adsorpsiyonu tanımlayan izotermi içinde en iyi bilinendir ve genellikle aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$Q_e = X_m KC_e / (1 + KC_e)$$

Eşitlik 1.1

Burada Q_e çözünen maddenin denge derişimindeki adsorpsiyon yoğunluğu (g adsorban başına mg adsorplanan madde), C_e çözüntideki adsorplanan maddenin derişimi (mg/L), X_m tek tabakalı tam kaplamaya ilişkin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (g adsorban başına mg adsorplanan madde), K adsorpsiyon enerjisi ile ilgili Langmuir sabitidir (mg adsorplanan madde başına adsorbannın litresi).

Yukarıdaki eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{X_m K} + \frac{C_e}{X_m} \quad \text{Eşitlik 1.2}$$

C_e 'ye karşı C_e/Q_e grafiğinin çizilmesi ile elde edilen doğrunun eğiminden X_m ve kesiminden K bulunabilir (Muhammad *et al.*, 1998).

1906'da Alman fizikokimyacı Herbet Max Finley Freundlich ideal olmayan sistemler için bir ampirik adsorpsiyon izotermi önermiştir. Freundlich izotermi adsorpsiyon denklemini tanımlayan bilinen en eski bağıntıdır ve aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$Q_e = K_f C_e^{1/n} \quad \text{Eşitlik 1.3}$$

Burada Q_e adsorpsiyon yoğunluğu (g adsorban başına mg adsorplanan madde), C_e çözüntideki adsorplanan maddenin derişimi (mg/L), K_f ve n pek çok çevresel faktöre bağlı ampirik sabitler olup n , 1'den büyüktür.

Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak lineerleştirilebilir:

$$\ln Q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_e \quad \text{Eşitlik 1.4}$$

$\ln C_e$ 'ye karşı $\ln Q_e$ grafiği bir doğru verir ve bu adsorpsiyon için Freundlich izoterminin uygunluğunu gösterir. Sabitler eğim ve kesimden belirlenebilir (Muhammad *et al.*, 1998).

Adsorpsiyon, adsorplanacak türün çözültiden adsorban yüzeyine kütle transferini içeren bir fizikokimyasal işlemdir. Çözelti ile adsorban arasında adsorplanan maddenin konsantrasyonunun termodinamik dengesi kurulduğunda artık daha ileri net adsorpsiyon gerçekleşmez. Bu denge adsorban ve adsorplananın derişimleri, sıcaklık, viskozite ve pH koşulları ile tanımlanır. Adsorban-adsorplanan ilişkisinin en temel özelliği adsorpsiyon dengesidir. O halde, tersinir adsorpsiyonu tanımlayan teorik ve ampirik modeller termodinamik denge temeline dayandırılarak geliştirilmiştir.

1924'de Freundlich bir sulu çözültideki tek bir adsorplananın adsorpsiyonunu sabit sıcaklıkta birkaç saniye veya dakikada kurulan bir tersinir denge olarak tanımlamıştır.

Freundlich eşitliğinin önemli bir sınırlaması adsorpsiyon kapasitesine bir sınır koymamasıdır. Yani teorik olarak çözünen derişimi arttıkça adsorplanan miktar sonsuz olarak artar. Öte yandan, eşitlik tersinir adsorpsiyonu tanımladığı için tersinir olmayan bir işlem olmasına rağmen yağların kil ile adsorpsiyon yolu ile temizlenmesine başarı ile uygulanmıştır. Freundlich eşitliğinin yağ rengi açma ve diğer endüstriyel işlemlerde geniş olarak kullanılması üç nedene dayanmaktadır (Proctor ve Toro-Vazquez, 1996):

- 1) Pratik olarak dar bir adsorplanan derişim aralığında eşitlik lineer olmayan adsorpsiyonu tanımlamak için yeterlidir.
- 2) Eşitliğin matematiksel basitliği kolayca kullanılmasını sağlar.
- 3) Freundlich modeli enerji açısından heterojen olan yüzey adsorpsiyon bölgeleri üzerindeki adsorpsiyonu tanımlar ki bu durum adsorpsiyon sistemlerinde sıklıkla görülen bir durumdur. Tersine olarak Langmuir modeli, enerji açısından özdeş olan adsorpsiyon bölgeleri üzerinde adsorpsiyonun gerçekleştiği varsayımına dayanır ki bu durum yağ temizleme sistemlerinde ender olarak görülür.

Adsorpsiyon için çeşitli kinetik modeller önerilmiştir. Pseudo birinci dereceden kinetik ve pseudo ikinci dereceden kinetik modelleri bir adsorban ve adsorplanan madde arasındaki adsorpsiyon mekanizmasını anlamak için kullanılmaktadır (Hsieh *et al.*, 2006).

Lagergren'in pseudo birinci dereceden kinetik modeli aşağıdaki gibidir:

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t) \quad \text{Eşitlik 1.5}$$

k_1 , pseudo birinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (dak^{-1}); q_{eq} (mg/g) ve q_t (mg/g) sırasıyla dengede ve t zamanında adsorplanan türün miktarıdır.

$t=0$ 'da $q_t=0$ ve $t=t'$ 'de $q_t=q_t$ olarak alındığında aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\log q_{eq}/q_{eq} - q_t = k_1 \cdot t / 2,303 \quad \text{Eşitlik 1.6}$$

Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log q_{eq} - k_1 \cdot t / 2,303 \quad \text{Eşitlik 1.7}$$

t' 'ye karşı $\log(q_{eq} - q_t)$ karşı grafiğe geçirildiğinde eğim $k/2,303$ 'ü; y eksenini kesim noktası $\log q_{eq}$ 'i verir.

Ho *et al.* (2000) tarafından önerilen pseudo ikinci dereceden kinetik modeli aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$dq_t/dt = k_2 \cdot (q_{eq} - q_t)^2 \quad \text{Eşitlik 1.8}$$

Burada k_2 ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{dak}^{-1}$), pseudo ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti; q_{eq} (mg/g) ve q_t (mg/g) sırasıyla dengedeki ve t anındaki adsorplanan türün miktarıdır.

$t=0$ 'da $q_t=0$ ve $t=t'$ 'de $q_t=q_t$ olarak alındığında aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$1/q_{eq} - q_t = 1/q_{eq} + k_2 t \quad \text{Eşitlik 1.9}$$

Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$t/q_t = 1/k_2 \cdot q_{eq}^2 + t/q_{eq} \quad \text{Eşitlik 1.10}$$

t' 'ye karşı t/q_t grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun eğim ve kesiminden q_{eq} (mg/g) ve k_2 elde edilir (Öncel, 2004).

1.9. HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ (HIC)

Biyolojik araştırmalardaki son gelişmelerin bir çoğu proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması için teknikler ve metotların geliştirilmesini gerektirir. Bir proteinin saf olarak elde edilmesi, daha sonra yapılacak yapı ve fonksiyon çalışmaları için bir ön gereksinimdir. İstenen saflık düzeyi proteinin kullanım amacına bağlıdır. Yapı aydınlatması çalışmaları veya terapotik amaçlar için yüksek saflık derecesi; gıda endüstrisi veya evsel deterjanlar ya da endüstriyel uygulamalar için düşük saflık dereceleri tercih edilmektedir.

Bir proteinin saflaştırma işleminin temel amacı yalnızca istenmeyen kirliliklerin uzaklaştırılması değil aynı zamanda istenen proteinin deriştirilmesi ve istenen uygulamalar için hazır bir forma sokulup kararlı olduğu bir çevreye transfer edilmesidir.

Günümüzde pek çok protein saflaştırma teknikleri mevcut olmakla birlikte farklı kromatografi tipleri yüksek ayırma güçleri nedeniyle baskın olmaya başlamıştır. Jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde proteinlerin ayrılması sırasıyla proteinlerin moleküler büyüklük, net yük, biyospesifik özellikleri ve hidrofobisite gibi biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (Queiroz *et al.*, 2001).

1948'de basılan "Adsorption Separation by Salting Out" başlıklı yayınında, Tiselius artık popüler olarak bilinen hidrofobik etkileşim kromatografisi adlı ayırma metodunu tanımlamıştır. Tiselius bu yayınında, proteinler ve diğer nesnelerin, çökmeleri için gerekli yüksek tuz derişimlerinden daha az tuz içeren çözeltilerde

sıklıkla oldukça kuvvetli adsorbe olduklarını ve bazı adsorbanların bir dereceye kadar yüksek tuz derişimlerinde mükemmel davranırlarken tuzsuz çözeltiler içinde proteinler için hiç veya çok az afinite gösterdiklerini belirtmiştir. 1948’de temeli belirlenmiş olan bu metot, kromatografik destek malzemelerin ve destek malzemelerine ligandların immobilize edilmesindeki yöntemlerin gelişmesine paralel olarak 1970’lerden itibaren çeşitli hidrofobik adsorbanların senteziyle günümüze kadar hızlı bir gelişim göstermiştir (Özkara-Yavuz, 2007).

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinlerin yüzeyindeki apolar bölgeler ve immobilize hidrofobik ligandlar arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayanır. Adsorpsiyon mobil fazdaki yüksek tuz derişimi ile artar ve elüsyon, eluentin tuz derişiminin azaltılmasıyla sağlanır. Bu yüzden “tuz teşvikli adsorpsiyon” terimi kromatografinin bu tipi için kullanılabilir (Queiroz *et al.*, 2001).

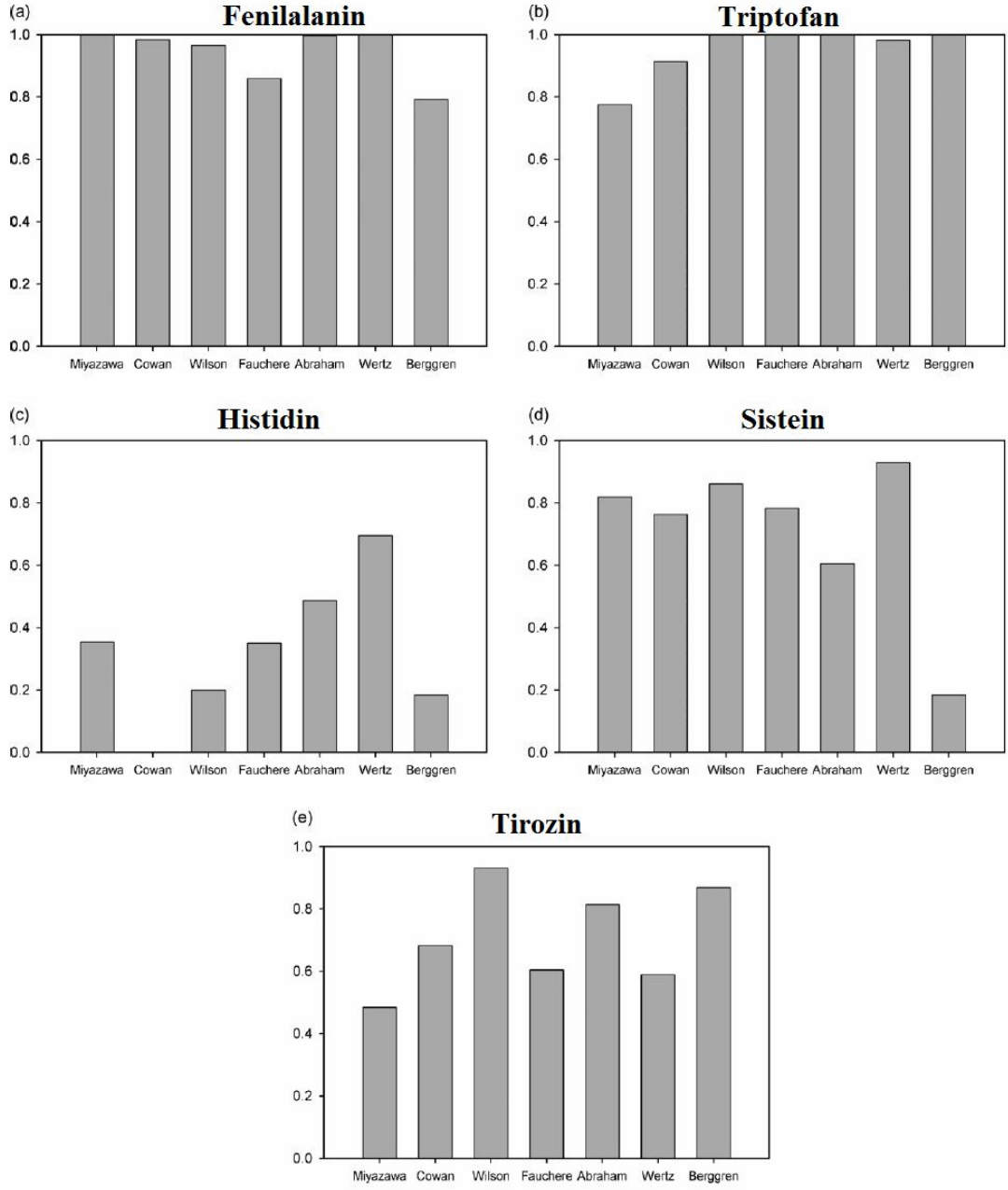
Hidrofobik etkileşim kromatografisi ve ters faz kromatografisi teorik olarak biyomolekül üzerindeki nonpolar gruplarla (hidrofobik) jel matriksine kovalent bağlı hidrofobik ligandlar (alkil veya aril grupları) arasındaki etkileşimlere dayanmakla birlikte pratikte farklıdır. Ters faz kromatografide kullanılan adsorbanlar hidrofobik etkileşim kromatografisi adsorbanlarına göre daha hidrofobiktir ve daha fazla ligand içermektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi adsorbanları genellikle 10-50 µmol/mL C₂-C₈ alkil veya basit aril ligand jeli içerirken ters faz kromatografi adsorbanları birkaç yüz µmol/mL C₄-C₁₈ alkil ligandı içerirler. Sonuç olarak ters faz adsorbanlarına proteinler çok kuvvetli bağlanırlar ve desorpsiyon için nonpolar çözücülerin kullanılması gerekir. Ters faz kromatografideki yüksek hidrofobik yüzey ve desorpsiyon işleminin zorluğu proteinin denatürasyonuna sebep olabilir. Temel olarak ters faz kromatografi sulu-organik çözücülerdeki protein moleküllerinin ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerin analitik ve preparatif ayırımında yaygın kullanım alanı bulmuştur. Hidrofobik etkileşim kromatografisi, daha az hidrofobik yüzey ve daha ılımlı protein ligand etkileşimi nedenleriyle proteinlerin doğal konformasyonlarında ve biyolojik aktivitelerini kaybetmeden saflaştırılmasına izin vermektedir (Özkara-Yavuz, 2007).

Son yıllarda hidrofobik etkileşim kromatografisi bir çok araştırmacı tarafından geliştirilmektedir ve günümüzde proteinlerin endüstriyel ölçekte saflaştırılması için olduğu kadar laboratuvar ölçeğinde güçlü bir biyoayırma tekniği olarak da kullanılmaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan sabit fazların çeşitliliğinin artması serum proteinleri, çekirdek proteinleri, hormonlar, rekombinant proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulamalarının önemli ölçüde artmasını sağlamıştır (Queiroz *et al.*, 2001).

1.9.1. Amino Asit ve Protein Hidrofobisitesi

Amino asitlerin hidrofobisitesi, farklı yollarla değerlendirilebilmektedir bu nedenle amino asit hidrofobisitesini tahmin etmede kullanılan çeşitli skalalar vardır. Şekil 1.16'da gösterildiği gibi özel bir amino asidin hidrofobisite derecesindeki farklılık bazen önemlidir. Bu farklılık çeşitli faktörler nedeniyle ortaya çıkabilir, örneğin aromatik amino asitlerin (fenilalanin, triptofan ve tirozin) amfifil karakterleri, metoda ve seçilen çözülmüş maddeye bağlı olarak hidrofobisiteye farklı bağıl katkılarda bulunurlar. Histidinin yüklü veya yüksüz olması hidrofobisite derecesini etkilerken sistein birimleri disülfid bağlarını oluşturduklarında daha hidrofobik görünürler.

Protein hidrofobisitesi incelendiğinde ise, protein hidrofobikliği açığı ve gömülmüş amino asitlerin hidrofobisitesine bağlı olarak “hidrofobisite derecesi” veya yalnızca açığı amino asitlerin hidrofobisitesine bağlı olarak “ortalama yüzey hidrofobisitesi” olarak ifade edilir (Lienqueo *et al.*, 2007).



Şekil 1.16 Farklı hidrofobisite skalaları kullanılarak amino asit hidrofobisitelevlerinin karşılaştırılması. (a) Fenilalanin, (b) triptofan, (c) histidin, (d) sistein, (e) tirozin (Lienqueo *et al.*, 2007)

1.9.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde Proteinin Kromatografik Davranışını Etkileyen Temel Faktörler

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde protein alıkonması, temel olarak protein hidrofobisitesi ve özellikle bu saflaştırma tekniğinin seçiciliğinin önemli bir kısmını oluşturan proteinin yüzey hidrofobisitesindeki dağılımdan etkilenir. Bununla birlikte işlem koşulları, proteinin hidrofobik etkileşim kromatografisindeki kromatografik davranışını önemli bir oranda etkiler. Hidrofobik etkileşim kromatografisi performansı üzerinde önemli etki gösteren faktörler mobil fazın özellikleri (tuz tipi, iyonik şiddet, pH), sabit fazın özellikleri (kimyasal doğası, hidrofobik ligandın tipi, reçinenin substitusyon düzeyi) ve kromatografik sistemin sıcaklığıdır (Lienqueo *et al.*, 2007).

1.9.2.1. Mobil Fazın Etkisi

Mobil fazı karakterize eden başlıca faktörler, iyonik şiddet, tuz tipi ve tamponun pH'ıdır.

a) İyon Şiddetinin Etkisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ortamında proteinlerin adsorpsiyonu, yüksek tuz derişimlerinde artar fakat adsorban ve farklı proteinler arasındaki etkileşimlerin gücü arasındaki farklılıklara bağlı olarak adsorpsiyon için gereken tuz derişimi önemli oranda değışir. Bununla birlikte kullanılan tuzun derişimi, farklı proteinleri çöktüren derişimin altında olmalıdır. Tuz derişimi genellikle amonyum sülfat ile 0,75-2,0 M, sodyum klorür ile 1,0-4,0 M arasındadır. Protein alıkonması üzerinde tuz etkisi, proteinlerin klasik elektrostatik teorilerle yeterince açıklanamayan kompleks doğaları nedeniyle geniş bir şekilde araştırılmaktadır (Lienqueo *et al.*, 2007).

Tsai *et al.* (2002) adsorpsiyonun ikincil işlemlerini önererek adsorpsiyon entalpilerinin, hidrofobik etkileşim kromatografisindeki etkileşim mekanizmasını yorumlamakta kullanılabildiğini göstermiştir. Ede edilen veriler tuzların ilavesinin

sadece proteinler ve hidrofobik adsorbanlar arasındaki etkileşimleri artırmadığını, aynı zamanda dehidratasyon için gereken ısıyı azalttığını göstermiştir.

b) Tuz Tipinin Etkisi

Protein alıkonması üzerine tuz tipinin etkisi ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır ve sulu çözeltilerden proteinlerin çökmesinin Hofmeister serisini izlediği gösterilmiştir.

Anyonlar: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-

Kasyonlar: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}

Hofmeister iyotropik serisinde, katotropik tuzlar (magnezyum sülfat ve magnezyum klorür), sıvı suyun yapısını rasgele dağıtır ve bu sebeple hidrofobik etkileşimin gücünü azaltma eğilimindedirler. Aksine kozmotropik tuzlar (sodyum, potasyum ve amonyum sülfatlar), daha yüksek salting out veya molal yüzey gerilimi artışı etkileri nedeniyle hidrofobik etkileşimleri ve protein çökmesini teşvik ederler. Bu nedenle eluentteki tuzun uygun tipinin seçilmesi yalnızca tüm proteinin alıkonmasında değil aynı zamanda ayırma seçiciliğinde de önemli değişikliklerle sonuçlanır (Lienqueo *et al.*, 2007).

c) Mobil Fazın pH'ının Etkisi

Mobil fazın pH'ı, hidrofobik etkileşim kromatografisinde protein alıkonmasını etkileyen önemli bir faktördür. Genellikle pH değerindeki artış (9-10'a kadar), hidrofobik ligandlar ve proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri, proteinin yükündeki değişimden kaynaklanan hidrofilikliğı artırması nedeniyle azaltır. Diğer taraftan pH değerindeki bir azalma, hidrofobik etkileşimlerde görünür bir artışla sonuçlanır. Bununla birlikte Hjertan *et al.* (1986), lizozim ve sitokrom C gibi bazı proteinlerin daha düşük pH'larda hidrofobik ligandlara zayıf bir şekilde bağlandığını gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar, aynı zamanda 5,0-8,5 pH aralığından ziyade pH 8,5'ün üstünde ve/veya 5,0'in altındaki pH değerlerinde proteinlerin alıkonmasının dramatik olarak değiştiğini bulmuşlardır. Her protein farklı pH değerlerinde farklı

davrandığı için, bu parametrenin HIC ile protein ayrılmasının optimizasyonunda kullanılması gerekir (Queiroz *et al.*, 2001).

1.9.2.2. Sabit Fazın Etkisi

Sabit faz, hidrofilik polimer omurgasına bağlı küçük non-polar gruplardan (bütil, oktil veya fenil gibi) oluşur. Bu sebeple, hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan çeşitli sabit faz tipleri ligandın kimyasal doğası, destek üzerindeki ligandın yüzey derişimi ve temel desteğin kimyasal doğası ve tanecik büyüklüğüne bağlı olarak farklılaşır.

a) Ligand tipinin etkisi

En yaygın kullanılan ligandlar lineer zincirli alkanlar (bütil, oktil gibi) ve bazı aromatik gruplardır (fenil gibi). Alkil ligandın zincir uzunluğundaki bir artış, protein ve reçine arasındaki hidrofobik etkileşimin gücünü artırır; aynı zamanda adsorplanan proteine karşı reçinenin özgüllüğü değişir. Bununla birlikte, ayırma gücü zincir uzunluğu arttığında azalır. Diğer taraftan reçinenin substitusyon derecesindeki bir artış, çok noktalı bağlanma oluşumunun daha yüksek olasılığı nedeniyle sabit fazın bağlanma kapasitesindeki bir artışa yol açar ve bu kez de denatürasyonsuz olarak bağlı proteini elue etmek zorlaşabilir. Aynı tip ligand ve aynı tip temel destek kullanılarak, hidrofobik etkileşim kromatografisi reçinesinin seçiciliği, ligand yoğunluğu değiştirilerek ayarlanabilir (Lienqueo *et al.*, 2007).

b) Destek etkisi

Destek etkisi, kimyasal yapı ve tanecik büyüklüğüyle verilir. Desteğin kimyasal doğası durumunda destek, hidrofilik karbohidratlar (çapraz bağlı agaroz gibi), silika veya sentetik kopolimer materyalleri olabilir. Aynı tip ligandı kullanan sabit fazların seçiciliği, desteklerin tipine göre değişebilir (Lienqueo *et al.*, 2007).

1.9.2.3. Sıcaklık Etkisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde sıcaklık artışı protein alıkonmasını artırır ve sıcaklıktaki azalma genellikle protein elüsyonunu teşvik eder. Aslında hidrofobik etkileşim kromatografisi entropi ile yönetilen bir işlemdir. Gibbs serbest enerjisi Eşitlik 1.11'e göre verilir.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Eşitlik 1.11}$$

ΔH küçük bir pozitif veya negatif değer olabildiğinden ΔG , pozitif entropi değişimi ile kontrol edilir ve bu yüzden sıcaklıkla artar. Hidrofobik etkileşim kromatografisindeki k' kapasite faktörü Eşitlik 1.12'ye göre sıcaklık artışıyla artar.

$$\ln k' = \ln \phi - \Delta G / RT \quad \text{Eşitlik 1.12}$$

Burada R gaz sabiti, ϕ faz oranı, T mutlak sıcaklıktır.

Bununla birlikte, protein alıkonması üzerindeki zıt bir etki, farklı proteinlerin konformasyonel durumları ve sulu çözeltilerdeki çözünürlükleri üzerine sıcaklığın etkisi nedeniyle olabilir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde sıcaklığın rolü çok basit olmamasına rağmen, bu parametre daha zayıf etkileşimlere ulaşmak ve denatürasyonsuz ılımlı koşullar altında proteinlerin ayrılmasını ve elüsyonunu sağlamak için kullanılabilir (Queiroz *et al.*, 2001).

1.10. POLİMERLER

Polimerler modern toplumda çok çeşitli uygulamalara sahip olan çok yüksek molekül kütleli maddelerdir. Polimerler, kovalent bağlarla bağlanmış çeşitli yapısal birimlerden oluşur. Örneğin, polietilen uzun zincirli bir polimerdir ve aşağıdaki şekilde ifade edilir (Eşitlik 1.13):



Burada yapısal veya tekrarlanan birim $-CH_2-CH_2-$ dir ve n, polimerin zincir uzunluğunu temsil eder.

Polimerler, monomer olarak adlandırılan küçük molekül ağırlıklı bileşiklerin kimyasal reaksiyonu sonucu elde edilirler. Örneğin eşitlik 1.13'deki polietilen, etilen monomerinden oluşur. Monomerler polimer oluşturmak için reaksiyonun tekrarlanan birimleri arasındaki bağları sağlamak üzere ya fonksiyonel gruplara ya da ikili (veya üçlü) bağlara sahiptir. Polimerik maddeler genellikle yüksek dayanıklılığa sahiptirler, bir camsı geçiş sıcaklıkları vardır, kauçuk elastikiyeti sergilerler ve eriyikler ve çözeltiler gibi yüksek viskoziteye sahiptirler.

Aslında polimerlerin sahip olduğu bu eşsiz özelliklerin bir çoğunun kullanılması insanlık için oldukça faydalıdır. Polimerler gıda paketlenme, giyim, ev döşemesi, ulaşım, medikal aygıtlar, bilgi teknolojisi ve daha bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. İpek, yün ve pamuk gibi doğal lifler polimerdir ve binlerce yıldır kullanılmaktadırlar. Poliolenler, poliesterler, akrilikler, naylonlar ve epoksi reçineleri gibi sentetik polimerler, plastikler, filmler, yapıştırıcılar ve koruyucu kaplamalar olarak geniş bir kullanım alanı bulmuştur.

Biyomateryaller yapay organlar, kemik ve diş çimentoları, bağ dokuları, kalp pilleri veya kontak lensler şeklinde vücut içerisinde kullanılan maddeler olarak tanımlanmaktadır. İnsan vücudu biyolojik dokulardan (kan, hücreler ve proteinler) oluşur ve bu biyolojik dokular kan ile veya dokular ile uyumlu olmayan maddeleri reddetme kabiliyetine sahiptirler. Böylesi uygulamalar için hayvanlar veya bitkilerden türetilen polimerik maddeler doğal adaydırlar. Bunlardan bazıları selülozikler, kitin (veya kitosan), dekstran, agaroz ve kollajendir. Sentetik maddeler arasında polisiloksan, poliüretan, polimetil metakrilat, poliakrilamid, poliester ve polietilen oksitler yaygın olarak kullanılır çünkü bu polimerler vücut içerisinde inerttirler. Bazen mekanik dayanıklılık, seçimli geçirgenlik, yapışkanlık ve/veya parçalanma gereksinimleri nedeniyle uyumlu olmayan polimerik maddeler bile kullanılmaktadır; fakat bu maddeler kullanılmadan önce yüzeyleri biyolojik moleküllerle (heparin, biyolojik reseptörler, enzimler vb.) modifiye edilmektedir (Kumar ve Gupta, 2003).

1.10.1. Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerlerin sınıflandırılmasındaki en eski yol polimerleri ısıya karşı olan cevaplarına göre sınıflandırmadır. Bu sistemde polimerler iki tiptir: Termoplastikler ve termosetler. Termoplastik, ısı etkisiyle eritilerek yeniden şekillendirilebilen polimerler için kullanılan genel bir kavramdır. Termosetler, zincirleri arasında yoğun çapraz bağ bulunan (ağ-yapı) ısı ile eritilemeyen polimerlerdir (Saçak, 2006).

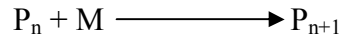
Polimerlerin önemli diğer sınıflandırması ise molekül yapılarına göre sınıflandırmadır. Bu sisteme göre polimerler 1) Lineer zincir polimeri 2) Dallanmış zincir polimeri 3) Ağ veya jel polimeri olarak sınıflandırılırlar. Lineer zincir polimerinde farklı moleküller daha zayıf ikincil kuvvetlerle bir arada tutulurken, tekrarlanan birimler güçlü kovalent bağlarla bir arada tutulurlar. Polimere termal enerji sağlandığında, ikincil kuvvetlerin üstesinden gelmeye çalışan moleküllerin düzensiz hareketi artar. Tüm kuvvetlerin üstesinden gelindiğinde moleküller serbest hareket etmeye başlarlar ve polimer erir ve bu polimerlerin termoplastik doğasını açıklar. Dallanmış polimerler, üzerinde rasgele yayılan dallanmalar ile lineer bir iskelete sahip olan molekülleri içerir. Bu tip polimeri oluşturmak için monomer iki doğrultudan daha fazla büyüme kabiliyetine sahip olmalıdır ki bu da başlangıç monomerinin ikiden daha fazla fonksiyonelliğe sahip olması gerektiğine işaret eder. Dallanmış zincirler, yalnızca monomerlerin düşük çevrilmeleriyle oluşur ancak yüksek çevrilmeleri oluşturan reaksiyonlara izin verilirse polimer jel olarak adlandırılan üç boyutlu bir ağ oluşturur. Aslında multifonksiyonel bir monomer polimerleştiğinde dallanmış ve lineer zincirlerin toplu hareketiyle gelişir ve eninde sonunda ağ yapılı bir polimer (veya bir jel) oluşturur. Jel polimeri herhangi bir çözümden çözünmez fakat kendi matriksinde bulunan çözgen moleküllerinin yapıya girmesiyle şişer (Kumar ve Gupta, 2003).

1.10.2. Polimerlerin Polimerizasyon Mekanizmasına Göre Kimyasal Sınıflandırılması

Eski literatürlere bakıldığında polimerler sentezlendikleri mekanizmaya bağlı olarak iki sınıfa ayrılır (Kumar ve Gupta, 2003). 1) Katılma Polimerleri ve 2) Basamaklı Polimerler.

1.10.2.1. Katılma Polimerleri

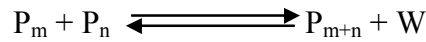
Bu polimerler, bir monomer molekülünün herhangi bir kısmı çıkarılmaksızın uzayan zincirine (P_n) bir bifonksiyonel veya polifonksiyonel monomerin ardışık ilavesiyle oluşur. Zincir uzunluğunu ifade eden n alt indisi ile aşağıdaki gibi şematik olarak gösterilebilir.



Burada M , monomer molekülünü ifade etmektedir, bu zincir uzama adımı genellikle çok hızlıdır.

1.10.2.2. Basamaklı Polimerler

Bu polimerler, küçük moleküler türlerin çıkarılması ile bifonksiyonel veya polifonksiyonel monomerlerden oluşur. Bu reaksiyon herhangi iki uzayan polimer molekülleri arasında olabilir ve şu şekilde ifade edilebilir.



Burada P_m ve P_n polimer zincirleri ve W , kondenzasyon ürünüdür.

Günümüzdeki literatüre baktığımızda bu sınıflandırma şekli çok doğru değildir ve polimerizasyon mekanizması şu iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Kumar ve Gupta, 2003).

1.10.2.3. Zincir Uzaması Polimerizasyonu

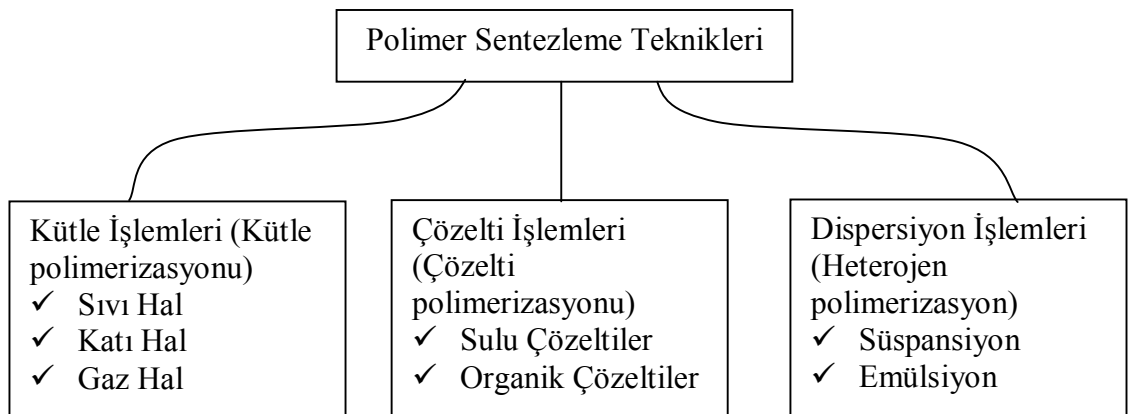
Katılma polimerizasyonuna alternatif olarak verilebilecek fakat kimyasal olarak daha uygun bir isimdir. Zincir uzama polimerizasyonunda, özel moleküllerin uzamayı başlattığı, uzamanın hızlı olduğu ve daha sonra aniden durduğu bulunmuştur. Bu sebeple, bu reaksiyon herhangi bir anda monomer molekülleri, uzamış polimer molekülleri ve yalnızca az sayıda hızlıca uzayan polimer moleküllerinden oluşur.

1.10.2.4. Adım-Uzaması Polimerizasyonu

Bu mekanizmanın kinetiği kondenzasyon polimerizasyonuna benzer fakat küçük moleküllerin elimine edilmediği reaksiyonları içerir. Adım uzaması polimerizasyonunda, monomer molekülleri başlangıçta düşük molekül kütleli polimerleri oluşturmak için birbirleri ile reaksiyona girer ve monomer çok hızlı bir şekilde tüketilir. Monomerler ilk olarak düşük molekül kütleli polimerleri oluşturur sonra bu polimerler sürekli uzayan zincirler oluşturmak için birbirleri ile reaksiyona girmeyi sürdürür.

1.10.3. Polimer Sentezleme Teknikleri

Polimer üretim teknikleri Şekil 1.17'deki gibi üç farklı kategoriye ayrılabilir (Braun *et al.*, 2005).



Şekil 1.17 Polimer sentezleme teknikleri (Braun *et al.*, 2005)

Radikalik polimerizasyonlar gerçekteştiği koşullar altında hem homojen hem de heterojen tiplerde olabilir. Bu sınıflandırma genellikle başlangıç reaksiyon karışımının homojen veya heterojen olup olmasına dayanır. Bazı homojen sistemler, reaksiyon ortamında polimerin çözünebilirliğinin bir sonucu olarak polimerizasyon ilerledikçe heterojen olabilir. Kütle ve çözelti polimerizasyonları homojen işlemlerken, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları heterojen işlemlerdir (Ođian, 2004).

1.10.3.1. Kütle (Bulk) Polimerizasyonu

Saf bir monomerin bulk veya kütle polimerizasyonu, en basit işlem ile minimum kirlenmiş ürün oluşturur. Bununla birlikte, radikal zincir polimerizasyonunun özelliği nedeni ile bulk polimerizasyonunun kontrolü zordur. Yüksek derecede ekzotermik oluşları, yüksek aktivasyon enerjisine sahip olmaları ve jel oluşturmaya yatkınlık özellikleri birlikte ısı dağılımını zorlaştırır. Bulk polimerizasyonu, dikkatli sıcaklık kontrolü gerektirir. Dahası, bir çok sistemin viskozitesi yavaş karıştırmada hızlı bir şekilde yükseldiğinden güçlü ve özenli bir karıştırmaya da gereksinim vardır. Viskozite ve ekzoterm etkileri, sıcaklık kontrolünü zorlaştırır. Bölgesel sıcak noktalar oluşur ve bu durum polimer ürünün bozunmasına ve renksizleşmesine neden olduğu gibi polimere zincir transferleri nedeni ile moleköl ağırlığı dağılımı genişler. Polimerizasyon hızının kontrolsüz arttığı ekstrem durumlarda yıkıcı, kontrolsüz reaksiyonlar oluşabilir. Kütle polimerizasyonu problem çıkarmasından dolayı zincir polimerizasyonu için adım polimerizasyonundaki kadar ticari olarak kullanılmaz. Bununla birlikte etilen, stiren ve metil metakrilatın polimerizasyonlarında kullanılır. Isı dağılımı ve viskozite problemlerinin, reaksiyona girmeyen monomerin geri dönüşümü ve ayrılması ile düşük dönüşümle polimerizasyonu gerçekleştirerek üstesinden gelinir. Bir alternatif, polimerizasyonu geniş bir reaktörde düşük dönüşümle ve ince tabakalardaki final dönüşümüyle gerçekleştirmektir (Ođian, 2004).

1.10.3.2. Çözelti Polimerizasyonu

Monomerin bir çözen içinde polimerleşmesi, kütle polimerizasyonu işleminin bir çok dezavantajının üstesinden gelir. Çözen bir seyreltici gibi davranır ve polimerizasyon ısısının transferine yardım eder. Çözen, reaksiyon karışımının viskozitesini azaltarak, karıştırmayı kolaylaştırır. Termal kontrol, kütle polimerizasyonu ile karşılaştırıldığında çözelti polimerizasyonunda daha kolaydır. Diğer taraftan çözenin varlığı yeni zorluklara neden olabilir. Çözen uygun bir şekilde seçilmezse çözene zincir transferi bir problem olabilir. Dahası, çözenin uzaklaştırılmasında zorluklar olursa polimerin saflığı etkilenebilir. Vinil asetat, akrilonitril ve akrilik asidin esterleri çözeltide polimerleşir (O'dian, 2004).

1.10.3.3. Heterojen Polimerizasyon

Bir çok polireaksiyon, özellikle zincir polimerizasyonları, heterojen koşullar altında da gerçekleşebilir. Bu durumda sıvı monomer, çözünmediği bir sıvıda karıştırılarak küçük damlacıklara dağılır ve bu durumda polimerleşir. Reaksiyon süresince oluşan makromoleküller katı halde olduğundan dağılan fazın yığılma durumunda bir değişiklik olur. Bu sebeple orijinal sıvı/sıvı dağılımı (emülsiyon), bir sıvı/katı dağılımı (süspansiyon) haline gelir. Eğer polimer (poliakrilonitril gibi) monomerde çözünmüyorsa bu geçiş reaksiyonun başlarında olur. Aksi durumda, yani polimer (polistiren gibi) monomerde çözünüyor ya da şişiyorsa, emülsiyonun hali sadece yüksek dönüşümde değişir. "Emülsiyon polimerizasyonu" terimi sistemin başlangıç durumuna ilişkin iken "süspansiyon polimerizasyonu" terimi final durumuna göre seçilmiştir. Bu biçimsel benzerliğe karşın iki işlem polimer taneciklerinin büyüklüğü (emülsiyon polimerizasyonunda 0,1-0,5 µm, süspansiyon polimerizasyonunda 0,5 µm-2 mm) ve reaksiyon kinetikleri bakımından farklıdır. Bu metotların şu avantajları vardır: Polimerizasyon ısısı, monomerin küçük damlacıklara parçalanması ve suyun yüksek ısı kapasitesi nedeniyle kolayca dağıtılır. Reaksiyon karışımı, yüksek dönüşümde bile çok hareketli kalır çünkü viskozite, monomer/polimer damlacıklarında artarken çözeltinin tümünün viskozitesinde büyük değişiklikler olmaz. Bu sebeple % 50 katı içerikleri kolay muamele edilir. Dispersiyon içindeki polireaksiyonlar laboratuarda kolayca hazırlanabilir. Bazı durumlarda dağılım

polimerizasyonları, polikatılmalı ve polibasamaklı reaksiyonlarda da kullanılabilir. Süspansiyon ve emülsiyon teknikleri, oluşan polimerlerin özelliklerini modifiye etmek için ilave yollar sağlar. Örneğin: Tanecik büyüklüğü ve tanecik büyüklüğü dağılımının değiştirilmesi, iyonik grupların küçük miktarlarının yapıya girmesi, çekirdek/kabuk yapısına sahip polimer taneciklerinin hazırlanması gibi (Braun *et al.*, 2005).

a) Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu (boncuk veya küre polimerizasyonu olarak da adlandırılır) monomerin su içinde (sürekli faz) damlacıklar halinde (50-500 µm çapında) süspanse edilmesiyle gerçekleştirilir. Stiren, akrilik ve metakrilik esterler, vinil klorürler, vinil asetat ve tetrafloroetilen süspansiyon metoduna göre polimerleşir. Su/monomer kütle oranı çoğu polimerizasyonda 1/1'den 4/1'e değişir. Monomer damlacıklarının (daha sonra polimer taneciklerine dönüşür) birleşmeleri çalkalama ve süspansiyon stabilizörünün (aynı zamanda dağıtıcılar veya yüzey aktif maddeler olarak da adlandırılır) varlığı ile önlenir. Stabilizörlerin suda çözünen polimerler (sıkça elektrolit veya tamponun varlığında) ve suda çözünmeyen inorganik maddeler olmak üzere iki tipi kullanılmaktadır. Suda çözünen polimer sınıfını poli(vinil alkol), hidroksiopropil selüloz, sodyum poli(stiren sülfonat) ve akrilik asit-akrilat ester kopolimerinin sodyum tuzu; suda çözünmeyen inorganik maddeler sınıfını ise talk, hidroksiapatit, baryum sülfat, kaolin, magnezyum karbonat ve magnezyum hidroksit, kalsiyum fosfat ve alüminyum hidroksit oluşturur. Süspansiyon stabilizörünün miktarı genelde sulu fazın (suda çözünen polimerler bazen yüksek derişimlerde kullanılmasına rağmen) kütle yüzdesinin 0,1'inden daha azdır. Bu değer emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan yüzey aktif madde derişimlerinden daha düşüktür ve süspansiyon polimerizasyonunda daha büyük boyutlu monomer damlacıkları elde edilmesini açıklar. Emülsiyon polimerizasyonun aksine süspansiyon polimerizasyonunda iki fazlı sistemin sürekliliği çalkalanmaksızın sağlanamaz. Diğer bir fark süspansiyon polimerizasyonunda kullanılan dağıtıcıların, emülsiyon polimerizasyonundaki gibi koloidal miselleri nadiren oluşturmasıdır. Süspansiyon polimerizasyonda kullanılan başlatıcılar monomer damlacıklarında çözünür. Böyle başlatıcılar genellikle yağda-çözünen

başlatıcılar olarak adlandırılır. Süspansiyon polimerizasyonundaki her monomer damlacığı küçültülmüş bir kütle polimerizasyon sistemi olarak ele alınabilir. Her bir damlacık içindeki polimerizasyon kinetikleri karşılık gelen kütle polimerizasyonununkinin aynısıdır (O'dian, 2004).

b) Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyonda çalışmak, aslında sudaki radikal polimerizasyonu ile sınırlıdır. Süspansiyon polimerizasyonuna benzer olarak temel prensip suda eser miktarda çözünen bir monomerin su içinde dağılması ve bu durumda polimerleşmesidir. Bununla birlikte, bu iki işlem arasında bazı farklılıklar vardır. Bunlar:

- Monomerin suda çok az da olsa bir çözünürlüğü gereklidir. Stearil akrilat gibi fazla hidrofobik monomerler emülsiyon koşullarında polimerleşmezler.
- Monomerin emülsifikasyonu, miseller oluşturabilen suda çözünür emülsiyonlaştırıcıların varlığında olur. Polimerizasyonun başlangıcında monomer misellerdeki gibi monomer damlacıkları şeklindedir.
- Birkaç özel durumun dışında suda çözünür başlatıcılar (potasyum peroksodisülfat; redoks sistemleri) kullanılır.
- Başlangıç basamağı tercihen sulu fazda gerçekleştirilir.
- Polimerizasyon, monomer damlacıklarında değil lateks taneciklerine yavaşça şişmek sureti ile misellerde gerçekleşir.
- Polimerizasyonun hızı (sabit başlatıcı derişiminde) misellerin sayısına ve dolayısıyla emülsiyonlaştırıcının derişimine bağlıdır. Polimerizasyon hızı ve derecesi eş zamanlı olarak arttırılabilir.

- Oluşan polimer taneciklerinin büyüklüğü, süspansiyon polimerizasyonununkinden çok daha küçüktür.

Emülsiyon polimerizasyonu için gerekli malzemeler aslında 4 bileşeni içerir. Bunlar: su (deminealize), suda çok az çözünen bir monomer, suda çözünen radikal oluşturucu bir başlatıcı ve bir emülsiyonlaştırıcıdır. Bir emülsiyon polimerizasyonunun gidişi ve oluşan polimer lateksin özellikleri emülsiyonlaştırıcıdan güçlü bir şekilde etkilenir. Emülsiyonlaştırıcı moleküller hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşur. Hidrofilik kısım üzerindeki elektrik yüküne göre anyonik, katyonik ve non-iyonik emülsiyonlaştırıcılar olarak sınıflandırılır. Anyonik emülsiyonlaştırıcıların örnekleri alkil-bağlı benzen veya naftalen sülfonik asitlerin tuzları yanında yağ asitleri, sodyum dodesil sülfatların K^+ , Na^+ ve NH_4^+ tuzlarıdır. Katyonik emülsiyonlaştırıcıların örnekleri, en azından tek bir hidrofobik süstitüente sahip olan kuaterner amonyum tuzlarıdır. Tipik non-iyonik emülsiyonlaştırıcılar, etoksillenmiş fenoller ve etilen oksit ve propilen oksitin blok kopolimerleridir. Çok seyreltik sulu çözeltilerde emülsiyonlaştırıcılar, izole edilmiş moleküller veya elektrolitler olarak davranır. Bununla birlikte emülsifiyer derişiminin artması ile çözeltilerin yüzey gerilimi, viskozite, elektriksel iletkenlik ve ozmotik basınç gibi bazı fiziksel özelliklerinde beklenmedik değişimler olabilir. Bu beklenmedik değişimlerin gözleendiği derişim kritik misel derişimi (CMC) olarak adlandırılır. Her emülsifiyer için bu değer karakteristiktir. Kritik misel derişiminin altında emülsifiyer yalnız bir molekül gibi çözüner, CMC'nin üzerinde emülsifiyer moleküller, düzenli molekül agregatlarını oluşturmak üzere toplanır ve bu misellerde hidrofobik birimler iç kısımlara yönelirken hidrofilik kısımlar sulu faza doğru yönelir. Bu miseller yaklaşık 3,5 nm çapındadır.

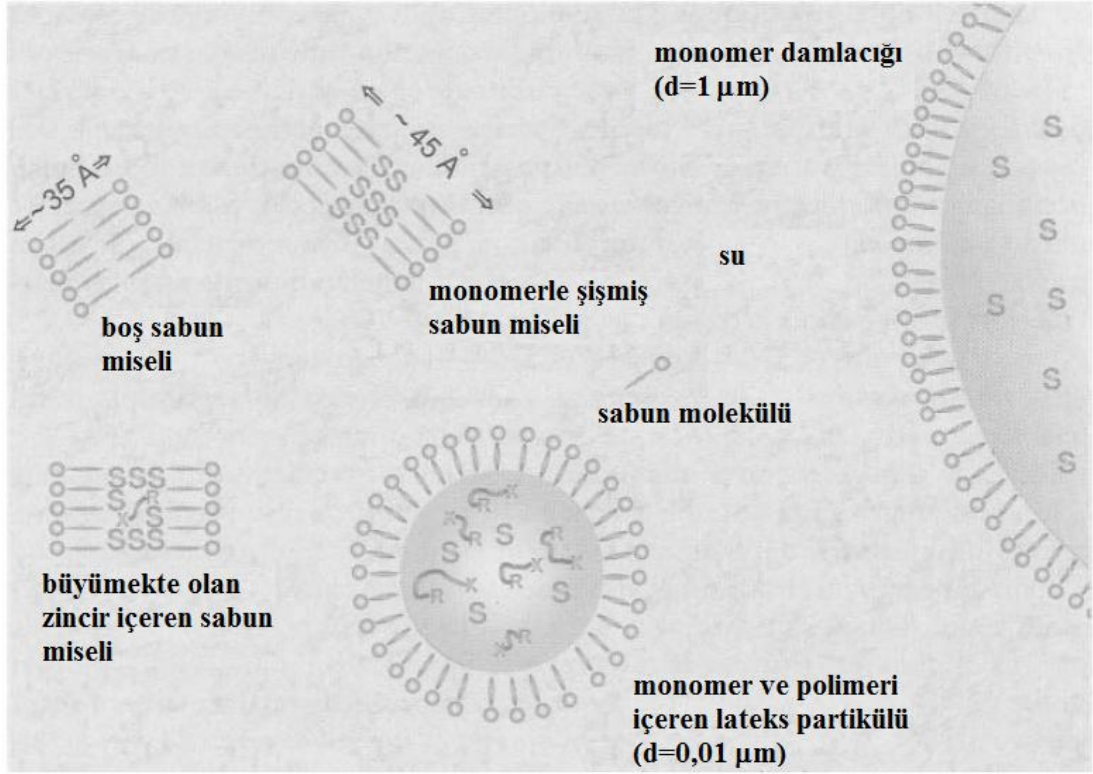
Monomerin ilavesi ile misellerin büyüklüğü 4,5-5,0 nm çapına kadar önemli oranda artar. Bununla birlikte, monomer damlacıklarının boyutları misellerinkinden yine de çok daha büyüktür. Emülsiyon polimerizasyonunda genellikle monomerin % 0,5-5,0'ı kadar emülsifiyer kullanılır. Sudaki yağ emülsiyonlarında, su içeriği monomerin miktarının yarım katından 4 katına kadar değişir. Bu miseller sıvıların mL'sinde yaklaşık 10^{18} 'lik bir derişimde bulunurlar ve her misel yaklaşık 100 monomer molekülünü içerir. Aksine monomer damlacıklarının sayısı yaklaşık mL

başına 10^{10} kadardır. Bu sebeple monomer damlacıklarının daha geniş hacimlerine rağmen miseller daha geniş yüzey alanı sunar. Sulu fazda oluşan bir radikal, monomer damlacıklarından ziyade daha sıklıkla monomer dolu miseller ile çarpışacaktır. Böylece, polimerizasyon pratik olarak monomer damlacıklarında değil sadece misellerde gerçekleşir. Misellerde tüketilen monomerin yerine sulu faz içinden geçerek monomer damlacıklarından difüzlenenler geçer. Harkins ile Smith ve Ewart'ın teorilerine göre emülsiyon polimerizasyonunun kinetik gidişatı üç kısma ayrılır: Başlangıçta polimerizasyon ilerlerken misellerden bazılarının boyutları hızlıca artar ve hem monomer hem de polimeri içeren lateks olarak adlandırılan taneciklere dönüşür. Bu tanecikler hala monomer damlacıklarından çok daha küçüktürler ve sıvının mL'si başına yaklaşık 10^{14} tanecik olacak şekilde yaklaşık 20-40 μm başlangıç çaplarına sahiptirler. Tüketilen monomer sürekli olarak sulu faz içinden difüzyon yolu ile gelen monomer damlacıklarından tamamlanır. Büyümekte olan lateks partiküllerinin yüzeyine sulu fazdan giderek daha çok emülsifiyer molekülü adsorplanarak stabilizasyona yardım ederken hiç polimer içermeyen miseller yavaşça ortadan yok olur. Serbest emülsifiyerin derişimi sonunda kritik misel derişiminin altına düşer ve bu durumda yüzey gerilimi önemli oranda artar. Bundan sonra, pratikte hiç yeni lateks tanecikleri oluşmaz. Tanecik oluşumu periyodu olarak adlandırılan emülsiyon polimerizasyonunun bu ilk fazı yaklaşık % 10-20'lik dönüşümden sonra tamamlanır.

Bu noktadan sonra, polimerizasyon sadece sayısı sabit kalan lateks taneciklerinde gerçekleşir. Monomer damlacıkları lateks partiküllerine monomer taşıyıcı rezervuar olma fonksiyonlarını devam ettirirler böylece lateks partikülleri içindeki monomer derişimi ve buna bağlı olarak da polimerizasyon hızı sabit kalır. İkinci periyot sırasında, reaksiyon monomer açısından sıfırinci derecedendir.

Polimerizasyonun monomer taneciklerinin tümünü harcadığı yani dönüşümün % 60-80 düzeyinde olduğu durumda, artık kalan monomerlerin tümü lateks taneciklerinde bulunmaktadır. Bu durumda taneciklerdeki monomer derişimi polimerizasyon ilerledikçe azalır yani reaksiyonunun son periyodu birinci derecedendir. Polimerizasyonun sonunda emülsiyon, orijinal misellerden daha büyük fakat orijinal monomer damlacıklarından daha küçük olan 50-150 μm aralığında büyüklüklere

sahip polimer taneciklerinden oluşur (Braun *et al.*, 2005). Şekil 1.18’de emülsiyon polimerizasyonundaki mevcut türlerin şematik gösterimi görülmektedir.



Şekil 1.18 Emülsiyon polimerizasyonundaki mevcut türlerin şematik gösterimi (S: stiren monomeri, R-X: uzayan polimer zinciri) (Braun *et al.*, 2005)

Emülsiyon polimerizasyonu, çeşitli ayırt edici avantajlara sahiptir. Emülsiyon (koloidal) sisteminin fiziksel durumu işlemin kontrolünü kolaylaştırır. Termal ve viskozite problemleri, kütle polimerizasyonundan daha az önemlidir. Lateks olarak adlandırılan emülsiyon polimerizasyonunun ürünü bir çok durumda ileri bir ayırma gerektirmeksizin doğrudan kullanılabilir. Böylesi uygulamalar boyaları, kaplamaları, apreleri ve yer cilalarını içerir. Emülsiyon ve diğer polimerizasyon işlemleri arasındaki fiziksel farklılıklardan başka kinetik farklılıklar çok önemlidir. Emülsiyon polimerizasyonu, polimerizasyon hızını azaltmaksızın polimerin molekül kütlelerini artırma kabiliyetine sahip olan eşsiz bir işlemdir. Farklı reaksiyon mekanizması nedeni ile emülsiyon polimerizasyonu, hem yüksek molekül kütleleri hem de yüksek reaksiyon hızlarına eş zamanlı olarak ulaşma kabiliyeti avantajına sahiptir (Oadian, 2004).

1.10.4. Destek Maddesi Olarak Poli(2-hidroksietil metakrilat): p(HEMA)

Biyotıp ve biyoteknolojide metakrilat hidrojellerinin kullanımı, son on yılda çok önemli ilerlemeler göstermiştir. 1960'larda gelişen öncü çalışmalardan (Wichterle ve Lim, 1960) sonra metakrilat hidrojelleri ilaç dağıtım sistemleri, kontak lensler, gıda teknolojisi, kalite kontrol sistemleri ve biyosensörler için sentetik membranlarda uygulanmaktadır. Metakrilat hidrojeller genellikle iki farklı monomerden oluşur. Oluşan kopolimerin özellikleri monomerlerin yapısına ve derişimine bağlıdır.

2-hidroksietil metakrilat (HEMA), biyolojik moleküllerin ve enzimlerin immobilizasyonuna izin veren ve düşük sıcaklıklarda (-20'den +10°C'ye) polimerleşen suda çözünür bir monomerdır. Polimer iskeletindeki hidroksietil gruplarının varlığı materyale yüksek hidrofilisite ve iyi biyoyumluluk kazandırır. İlâveten bu gruplar yeni monomerler hazırlamakta kullanılabilir. pHEMA polimerinin sertliği hidrojelin hazırlanması sırasında suyun miktarı değiştirilerek kolayca modifiye edilebilmekte ve enzim immobilizasyonunda matriks olarak başarılı bir şekilde kullanılabilir. Yukarıda bahsedilen özellikleri pHEMA'yı enzim elektrotlarında çok sık olarak kullanılan metakrilat immobilizasyon desteği yapmaktadır. Ayrıca HEMA'nın diğer monomerlerle kopolimerizasyonu şişme derecesi, mekanik dayanıklılığı, optik özellikleri ve oksijen geçirgenliği gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri değişen hidrojeller verir (Perez *et al.*, 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lizozim (E.C. 3.2.1.17) ticari olarak değerli bir enzimdir ve yaygın olarak farklı uygulamalarda (süt ürünlerinde gıda katkı maddesi, bakteriyel hücre içi ürünlerin ekstraksiyonunda bir hücre parçalama ajanı, oftalmolojik preparatların bileşeni ve ülserler ve enfeksiyonların tedavisinde bir ilaç olarak) kullanılmaktadır. Bu uygulamalara ilaveten büyük miktarlarda saf lizozim, araştırma laboratuvarlarındaki biyokimyasal ve biyofizyolojik çalışmalarda model protein olarak kullanılmaktadır. Lizozimin bir antikanser ilacı olarak potansiyel kullanımı hayvan ve *in vitro* hücre kültürü deneyleriyle gösterilmiştir (Das *et al.*, 1992; Sava *et al.*, 1989; Warren *et al.*, 1981). Ayrıca insan kanseri kemoterapisinde lizozimin kullanımı da rapor edilmiştir (Cartei *et al.*, 1991; Cartei *et al.*, 1992; Vacca *et al.*, 1985). İlaveten lizozimin *in vitro* insan-insan hibridoma HB4C5 hücrelerinde immunoglobulin M (IgM)'in üretimini 13 kat artırdığı rapor edilmiştir (Murakami *et al.*, 1997). Bu sonuç, lizozimin hibridoma teknolojisi ile antikor üretimini artırmada bir ajan olarak kullanım bulabileceğini göstermektedir. Lizozimin papaya sütü, at, eşek ve deve sütü, böcek larvası ve diğer hayvansal ve bitkisel kaynaklarda varlığı bilinmektedir ve farklı kaynaklardan lizozim saflaştırılması ile ilgili literatürde yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Ghosh ve Cui, 2000).

Pahud ve Widmer (1982), dana iškembesinden lizozim enziminin saflaştırılmasını DEAE-Sephacel anyon değişim ve Sephadex G-100 jel geçirgenlik kromatografisini kullanarak gerçekleştirmişler ve enzimin önemli oranda kitinaz aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır. Moss *et al.* (1997) tarafından farklı sığır kıkırdağı dokularından yeni lizozim enzimi izoformları katyon değişim, jel filtrasyon ve ters-faz FPLC'yi içeren 3 adımlı bir işlemlle saflaştırılmıştır. Yumuşak kene (*Ornithodoros moubata*) bağırsağından lizozim enziminin saflaştırılması magnetik kitin üzerine afinite adsorpsiyonu ve ardından MonoS FPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kopacek *et al.*, 1999). Yeni bir kaz tipi lizozimi tepeli deve kuşu (*Casuaris casuaris*) yumurtasından pH uygulama adımları ve katyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Thammasirirak *et al.*, 2001). Manda sütü lizozimi Priyadarshini ve Kansal (2002) tarafından CM-selüloz iyon değişimi ve Sephadex G-

50 büyüklük dışlama kromatografisi ile saflaştırılmış ve N-terminal amino asit sekansı, biyokimyasal özellikleri ve antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Tütün kurdu (*Spodoptera litura*) hemolenflerinden lizozim enzimi ısı muamelesi, katyon değişimi ve ters faz kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Kim ve Yoe, 2003). İstiridye (*Crassostrea virginica*) plazmasından iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerinin kombinasyonu kullanılarak lizozim enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Xue *et al.*, 2004). Sürüngen lizozimleri pH muamelesi, katyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırılmış ve karşılaştırılarak karakterizasyonları yapılmıştır (Thammasirirak *et al.* 2006). *Bufo andrewsi* türü kara kaplumbağası deri salgısından 3 adımlı kromatografik işlemlerle lizozim saflaştırılmıştır (Zhao *et al.*, 2006). Mor Washington midyesi, *Saxidomus purpurata*'dan lizozim saflaştırılması Chitopearl Basic BL-01 afinite ve TSKjel ODS-120T kolon kromatografileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Miyachi *et al.*, 2006). Deniz türlerinden lizozimin saflaştırılması amonyum sülfat çöktürülmesi, diyaliz, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ve CM-Sephadex-50 iyon değişim kromatografisini izleyen ultrafiltrasyonla gerçekleştirilmiştir (Zhang *et al.*, 2008).

Lizozim enzimi doğal olarak tavuk yumurtası akında (Chicken Egg White: CEW) bulunmaktadır. Tavuk yumurtası akında bulunan proteinler ve bazı özellikleri aşağıdaki çizelgede (Çizelge 2.1) görülmektedir (Ghosh, 2003).

Çizelge 2.1 CEW'de bulunan temel proteinler (Ghosh, 2003).

Proteinler	Molekül kütlesi	İzoelektrik nokta (pI)	Toplam proteindeki yüzdesi (%)
Ovalbumin	45 000	4,5	54
Konalbumin	80 000	6,1	12
Ovomukoid	28 000	4,1	11
Ovomusin	5,5 – 8,3 x 10 ⁶	4,5 – 5,0	3,5
Lizozim	14 300	11,0	3,4
G2 globulin	3,0 – 4,5 x 10 ⁴	5,5	4,0
G3 globulin	12 700	4,8	4,0
Ovoinhibitör	49 000	5,1	1,5

Tavuk yumurtasından lizozim enziminin saflaştırılması ile ilgili literatürde yayınlanan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ruckenstein ve Zeng (1997),

makrogözenekli kitin afinite membranlarını kullanarak tavuk yumurtası akından lizozim enzimini saflaştırmıştır. Ghosh ve Cui (2000), 25 kDa ve 50 kDa'luk MWCO polisülfon membranlarını kullanarak ultrafiltrasyon ile tavuk yumurtası akından lizozim enziminin saflaştırılmasını incelemişlerdir. Ghosh *et al.* (2000), 30 kDa'luk MWCO polisülfon membranlarını kullanarak hollow fiber ultrafiltrasyonu ile lizozim enzimini ayırmayı başarmıştır. Şenel *et al.* (2001), destek matriksi olarak poliamid kullanarak boya ve metal şelat afinite hollow fiberlerini hazırlamış ve yumurta akı lizoziminin adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Ticari olarak temin edilebilir polivinilidin florür (PVDF) membranının katyon değişim mekanizmasıyla lizozimi seçici olarak bağlayabildiği gösterilmiş ve bu membranlar CEW'den lizozim enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır (Ghosh, 2003). Çeşitli çaplardaki silika nanopartiküller üzerine CEW lizoziminin adsorpsiyonu çalışılmıştır (Vertegel *et al.*, 2004). Yapılan bu çalışmada, adsorplanan lizozim moleküllerinin fonksiyonu ve yapısı üzerinde nanopartiküllerin büyüklüğünün etkisi incelenmiştir. Rojas *et al.* (2006) tarafından hidrofobik bir reçine Streamline Phenyl adsorban olarak kullanılarak yumurta akı proteinleri ve lizozim enziminin adsorpsiyonu gerçekleştirilmiş ve farklı tuz tipleri ve derişimlerinin adsorpsiyona olan etkileri incelenmişlerdir. Gong *et al.* (2006), 5 µm çaplı non-poröz poli(glisidilmetakrilat-ko-etilendimetakrilat) küreleri tek adımlı bir şişme polimerizasyon metodu ile hazırlayarak bu kürelerin kimyasal modifikasyonu ile zayıf katyon değiştirici (WCX) sabit fazını sentezlemiştir. Hazırlanan WCX reçineleri yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanılmıştır. Islam *et al.*, (2006), pH'a bağımlı olarak Sephadex G-75 matriksini, CEW'den lizozim saflaştırmasında kullanmışlar ve % 80'in üzerindeki verimle lizozim enzimini 70 kat saflaştırmışlardır. Chiu *et al.* (2007), cam fiber bazlı katyon değişim membranlarını kullanarak yumurta akından lizozimin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Afinite çöktürmesi için termo duyarlı poliakrilamid türevleri sentezlenmiş ve yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanılmıştır. Saflaştırma katsayısı 28 ve lizozim verimi % 80 (veya daha fazlası) olarak bulunmuştur (Shen ve Cao, 2007). Lizozim adsorpsiyonu için yeni bir adsorban, kollajen fiber matriks üzerine Fe (III) immobilizasyonu ile Lu *et al.* (2007) tarafından hazırlanmıştır. Bu immobilize metal afinite desteği yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanılmış ve % 100 saflıkta ve % 70,5 oranında geri

kazanım ile lizozim elde edilmiştir. Baker *et al.* (2007) kum kullanarak % 77 verimle yumurta akından lizozim enzimini 21 kat saflaştırmışlardır. Wen *et al.* (2007) tarafından ışığa duyarlı katyon değişim kopolimeri sentezlenerek yumurta akından % 81,3 verimle lizozim enzimi saflaştırılmıştır. Metakrilat aşılınmış ve boya ligandı immobilize edilmiş PET fiberler, lizozim adsorpsiyonu için kullanılmıştır. Elüe edilen lizozimin saflığı HPLC ile % 84 olarak bulunmuştur (Karakışla *et al.*, 2008). Poli(metakrilik asit) aşılınmış çapraz bağlı kitosan [kitosan-g-poli(MAA)] küreler lizozim adsorpsiyonunda iyon değiştirici destek olarak kullanılmıştır. Bu destek maddesi kullanılarak batch sistemi ile yumurta akından lizozim % 94 oranında saflaştırılmıştır (Bayramoğlu *et al.*, 2007).

Yumurta akı lizoziminin magnetik desteklere adsorpsiyonu ile ilgili literatürde yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır. Safarik (1991), lizozim izolasyonu için magnetik biyospesifik afinite adsorbanlarını kitin, agar ve agarozun yapısına magnetit partiküllerini inkorpore ederek hazırlamıştır. Tek bir adımda yumurta akı lizozimini % 90 saflıkta izole etmiştir. Safarik ve Safarikova (1993) magnetik kitini, asetik anhidrit ile asetilasyondan sonra magnetik kitosandan hazırlamışlar ve magnetik kitinin kapasitesini 1 mL sorbent başına 2,5 mg lizozim olarak bulmuşlardır. Magnetik nanoboyutlu bir adsorban, çekirdek olarak Fe_3O_4 nanopartikülleri ve iyon değiştirici grup olarak poliakrilik asit kullanılarak sentezlenmiştir (Liao ve Chen, 2002). Bu magnetik adsorban yumurta lizoziminin adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Liao ve Chen (2002) başka bir çalışmasında yeni bir magnetik nanoadsorbanı karbodiimid aktivasyonu ile Fe_3O_4 süperparamagnetik partiküller üzerine poliakrilik asidi kovalent bağlayarak hazırlamışlardır. Bu adsorban üzerine maksimum lizozim adsorpsiyonu 0,224 mg/mg olarak bulunmuştur. Magnetik poli(HEMA) kürelerine inkorpore edilmiş Cibacron Blue F3GA üzerine lizozim adsorpsiyonu gerçekleştirilmiş ve maksimum lizozim adsorpsiyonu 295 mg/g olarak bulunmuştur (Odabaşı ve Denizli, 2004). Nano boyuttaki magnetik partiküller üzerine lizozim adsorpsiyonu ve desorpsiyonunu Peng *et al.* (2004) gerçekleştirmişlerdir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri sırasında lizozimin konformasyonel değişimini circular dichroism (CD), floresans ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile incelemişlerdir. Safarik *et al.* (2005), odun talaşını su

bazlı magnetik sıvı ile temastan sonra magnetik olarak modifiye etmiş ve yumurta akı lizoziminin saflaştırılmasında kullanarak tek adımda % 96 saflıkta lizozim elde etmişlerdir. Hidrofobik afinite ligandı L-triptofan immobilize edilmiş magnetik poli(glisidil metakrilat) küreleri 1,6 µm çapında tek boyutlu formda sentezlenerek tavuk yumurtası akından lizozimin afinite saflaştırılmasında kullanılmıştır (Altıntaş *et al.*, 2007). Maksimum lizozim adsorpsiyonu 259,6 mg/g olarak bulunmuş ve yumurta akından lizozim enzimi 71 kat saflaştırılmıştır. Başar *et al.* (2007), Cibacron Blue F3GA taşıyan magnetik poli(HEMA) küreleri nano boyutta ve toz haldeki Fe₃O₄'ün varlığında, HEMA'nın süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Bu magnetik polimer yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanılmıştır. İki magnetik makro gözenekli selüloz katyon değiştirici (Iontosorb MG CM 100 ve Iontosorb MG SHP 100) yumurta beyazını seyreltmeden lizozim saflaştırılmasında kullanılmıştır (Safarik *et al.*, 2007).

Destek materyali olarak HEMA monomerinin kullanıldığı lizozim adsorpsiyonu çalışmaları da literatürde mevcuttur. Arıca ve Bayramoğlu (2005), HEMA-kitosan membranları hazırlayarak Reactive Blue 4 ve Reactive Red 120'yi bu membranlara immobilize etmiş ve lizozim adsorpsiyonunda kullanmıştır. Başka bir çalışmada, poli(HEMA-kitosan) kompozit membranına Reactive Green 19 immobilize edilerek lizozim saflaştırılmasında kullanılmıştır (Yılmaz *et al.*, 2005). Ortalama büyüklüğü 150-200 µm olan poli(HEMA-MAPA) küreleri sentezlenerek yumurta akından lizozim adsorpsiyonunda kullanılmıştır (Öncel *et al.*, 2005). Desorplanan lizozimin saflığını % 74 verimle % 82 olarak bulmuşlardır. Odabaşı *et al.* (2007), lizozim saflaştırılması için lizozim baskılanmış polimerleri, p(HEMA-MAH)[Lys-MIP] hazırlamışlardır. Derazshamshir *et al.* (2008), yumurta akı lizoziminin afinite saflaştırılması için Zn²⁺-şelatlanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelleri sentezlemiş ve maksimum lizozim adsorpsiyonunu 209 mg/g olarak bulmuştur.

Lizozim enziminin saflaştırılması kadar immobilizasyonu da oldukça önemlidir. Lizozim enziminin immobilizasyonu ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şöyledir:

Appendini ve Hotchkiss (1997), yumurta akı lizozimini gıda ile teması uygun olan polimerlerden polivinil alkol küreler, naylon 6,6 peletleri ve selüloz triasetat filmleri üzerine immobilize ederek aktivite verimlerini karşılaştırmıştır. Hidroksipropil metilselüloz asetat süksinat polimerik desteğine yumurta akı lizozimi kovalent olarak immobilize edilerek optimum immobilizasyon koşulları ve serbest ve immobilize lizozim aktivitelerine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir (Chen *et al.*, 2003). Başka bir çalışmada keratin sünger üzerine lizozim enzimi immobilize edilerek kararlılığı incelenmiştir (Kurimoto *et al.*, 2003). Çeşitli çaplardaki silikon nanopartiküller üzerine yumurta akı lizozimi Vertegel *et al.* (2004) tarafından immobilize edilerek enzimin yapısı ve aktivitesi incelenmiştir. Lei *et al.* (2004), morfolojileri kontrol edilebilen mezoporöz silikalarda lizozimin immobilizasyon davranışını araştırmışlardır. Ding *et al.* (2005) silika nanotüpler üzerine lizozim enzimini immobilize ederek immobilize lizozim moleküllerindeki yapısal değişiklikleri ve enzimatik aktiviteleri incelemişlerdir. Deng *et al.* (2006) tarafından lizozim içeren kitosan nanopartiküller hazırlanarak karakterizasyonları yapılmıştır. Conte *et al.* (2007), polivinil alkol üzerine lizozimi immobilize ederek lizozimin antimikrobiyal aktivitesini ve seçilmiş mikroorganizmalara karşı etkinliğini araştırmıştır. Lizozim NaY zeolit üzerine immobilize edilerek *Micrococcus lysodeicticus* hücrelerinin parçalanması için kullanılmıştır (Chang ve Chu, 2007). Başka bir çalışmada silika materyallerinin üç farklı morfolojisi: hollow silika nanotüpler, hollow silika nanoküreler ve katı silika partiküller lizozim immobilizasyonu için kullanılarak lizozim bağlama kapasiteleri karşılaştırılmıştır (Xiao *et al.*, 2008).

Bu tezde yumurta akı lizozim enziminin immobilizasyonu için yeni bir adsorban olarak nano boyutta ve magnetik özellik taşıyan magnetik-nano-poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-metakriloilamidofenilalanin) [mag-nano-p(HEMA-MAPA)] polimerinin sentezlenmesi amaçlanmıştır. MAPA komonomeri, metakriloil klorür ile fenilalaninin uygun koşullarda tepkimeye girmesi ile elde edilir ve ligand olarak yapısına girdiği mag-nano-p(HEMA) polimerine hidrofobik bir amino asit olan fenilalanin nedeniyle fonksiyonellik kazandırır. Bu yaklaşımın en önemli avantajı pseudo-biyospesifik MAPA'nın komonomer olarak yapıya girmesinden dolayı matriks aktivasyonu ve ligand immobilizasyonu gibi basamaklara ihtiyaç

duyulmayacak olmasıdır. Protein saflaştırılmasında kullanılan matrikslerin aktivasyonunda ve ligandların hazırlanmasında karşılaşılan teknik güçlüklerin (aktivasyon ajanının toksisitesi ve istenmeyen tepkimeler) ve zaman kaybının bu yeni yaklaşımda olmaması yeni hazırlanmış olan adsorbanın klasik taşıyıcılara karşı önemli bir üstünlük elde etmesini sağlayacaktır. Hazırlanacak nano boyuttaki pseudo-biyospesifik afinite adsorbanının bir diğer önemli avantajı ise klasik biyoafinite ligandı içeren adsorbanlara göre daha ucuz ve kararlı bir yapıya sahip olacak olmasıdır. Hidrofobik bir yapı olan metakriloilamidofenilalaninin polimer yapısına girmesi nano boyutlarda sentezlenmesi planlanan polimerin hidrofobik özellik göstermesini ve lizozim immobilizasyonunda hidrofobik etkileşimlerin baskın olmasını sağlayacaktır. Ayrıca sentezlenecek mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın magnetik özellikte olması, saflaştırma ve ayırma işlemlerinde magnetik polimerlerin sahip olduğu avantajları sunacaktır. Sentezlenmesi planlanan mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin gözeneksiz olması, gözenekli materyallerle karşılaşılan difüzyonel sınırlamaların minimum düzeyde olmasını sağlayacaktır. İlaveten nano boyutlarda sentezlenmesi tasarlanan mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri, birim kütlesi başına sağladığı geniş yüzey alanı nedeniyle önemli miktarda lizozim bağlanmasına imkan verecektir.

Özet olarak, bu tez çalışmasında ilk olarak yumurta akı lizozim enziminin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonu için magnetik, nano boyutlarda ve hidrofobik özellikte bir destek materyali hazırlanması amaçlanmıştır. İkinci olarak hazırlanacak destek materyalinin lizozim enziminin immobilizasyonu ve yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılmasında kullanılabilirliği araştırılacaktır. Nano boyutlarda bir destek maddesinin sentezlenmesinin amaçlandığı bu çalışma, materyal boyutlarının küçültülmesi ilkesine dayanan nanoteknolojik uygulamalara bir örnek oluşturacaktır. İlaveten, magnetik nanopartiküllerin enzimlerin immobilizasyonunda ve/veya saflaştırılmasında kullanılmasının araştırıldığı bu çalışma literatüre önemli katkılar sağlayacak ve farklı uygulama alanlarına temel oluşturacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Deneyleerde, Velp (Multistirrer 15) çoklu magnetik karıştırıcı, Hettich (Universal 32R) santrifüj, Hanna (pH 211) pH metre, Hereaus (Function Line) etüv, Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, IKA (MS2) vorteks, Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu, VWR (1180S) sirkülatörlü su banyosu, Bandelin Sonorex (RK255H) ultrasonik banyo, Shimadzu (AX 200) 0,1 mg duyarlıkta terazi, Bio-Rad (Mini-Protean 3) elektroforez, UVP güç kaynağı ve Brand (Transferpette) otomatik pipetler kullanıldı.

Poli(vinil alkol), 2-hidroksietil metakrilat, magnetit (Fe_3O_4 , nanotoz), potasyum persülfat, fenilalanin, $NaNO_2$, K_2CO_3 , metakriloil klorür, etil asetat, eter, sikloheksan, lizozim (chicken egg white), N-N'metilenbisakrilamid, elektroforez için standart protein karışımı [miyozin (tavşan kanı, 205 kDa), β -galaktozidaz (*E. coli* 116 kDa), fosforilaz B (tavşan kanı, 97 kDa), albumin (sığır serum, 66 kDa), albumin (yumurta akı, 45 kDa), karbonik anhidraz (sığır eritrosit, 29 kDa)] ve *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC No 4698) Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; β -merkaptotanol, brom fenol blue, glisin, TEMED, Commasie Brilliant Blue G-250, Bradford boya çözültisi, akrilamid, amonyum persülfat, sodyum dodesil sülfat (SDS), gliserol, Tris-Baz, NaN_3 , K_2HPO_4 , $NaHCO_3$, NaCl ve KBr Merck (Dramstadt, Almanya)'dan; asetik asit, etanol ve sodyum asetat Riedel-de Haën (Seelze, Almanya)'dan; KH_2PO_4 ve $(NH_4)_2SO_4$ Carlo Erba (Rodano, İtalya)'dan; etilen glikol Panreac (Barselona, İspanya)'dan; etilen glikol dimetakrilat Aldrich (Milwaukee, WI, ABD)'den temin edildi.

Sentezlenen polimerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, USA), Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümünde bulunan EL 9 Varian (Palo Alto, CA) Elektron Spin Rezonans Spektrometresi, Anadolu Üniversitesi BİBAM'de bulunan Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM,

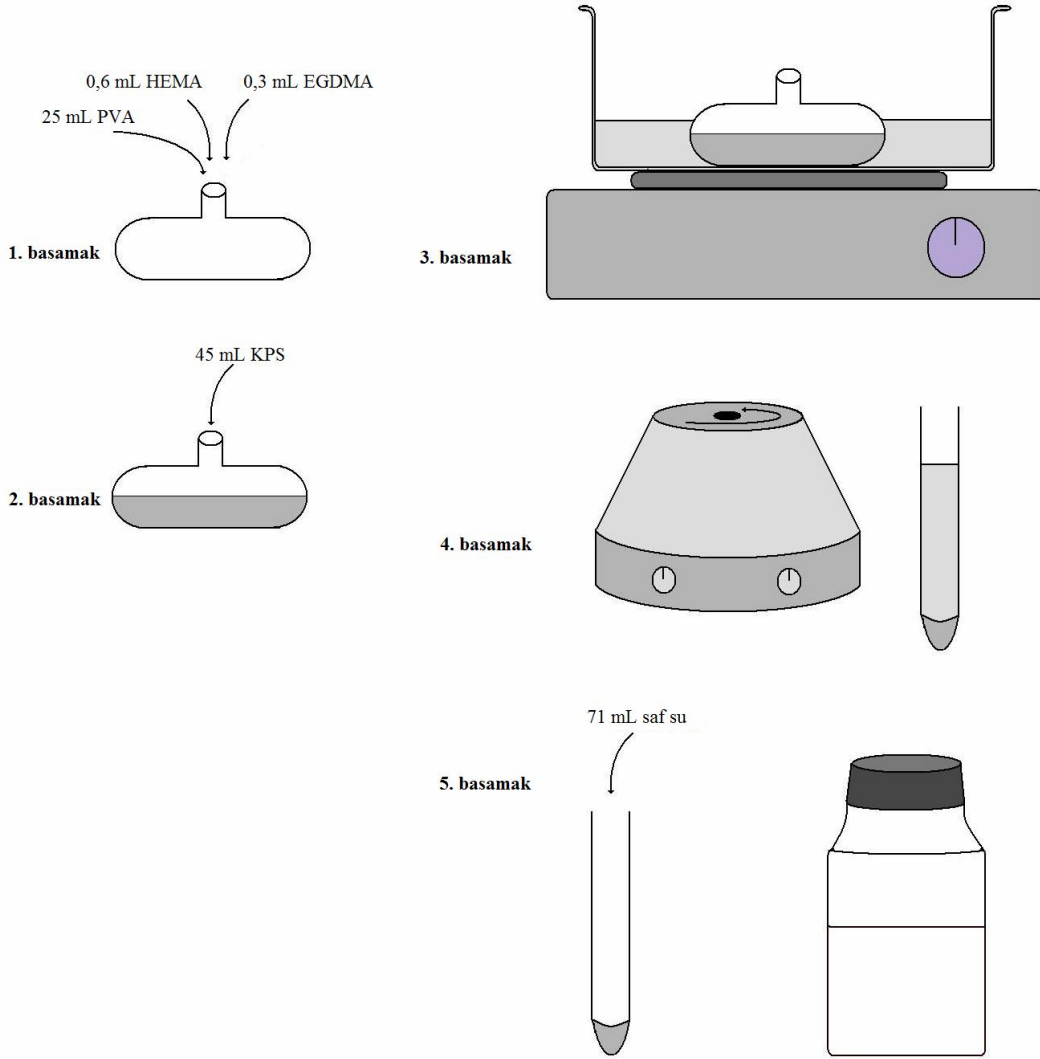
FEI Company Tecnai™, G2 Spirit, Biotwin, 20-120 kV) ve MALDI-TOF kütle spektrometresi (Applied Biosystems Voyager STR), Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünde bulunan Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere), TÜBİTAK ATAL'da bulunan elementel analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü-Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM, Phillips XL-30S FEG) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM, Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV), Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında bulunan Bio-LC cihazı (DIONEX sistemi: PDA-100 Photodiode array dedektörü, LC 25 kromatografi fırını, GS 50 gradient pompası) kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Nano-p(HEMA) Polimerinin Sentezlenmesi

Nano-p(HEMA) polimeri, emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak sentezlendi. Nano-p(HEMA) polimerinin hazırlanması için 100 mL hacimli laboratuvar tipi bir cam reaktör kullanıldı. Polimerin hazırlanması için stabilizatör olarak 0,5 gram polivinil alkol (PVA, d:1,269 g/mL) alınarak 45 mL saf suda 60 °C'de ultrasonik banyo yardımıyla çözüldü. Reaktöre, hazırlanan PVA çözeltisinden 25 mL alınarak üzerine 0,6 mL 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA, d:1,074 g/mL) monomeri ve 0,3 mL etilenglikoldimetakrilat (EGDMA, d:1,051 g/mL) çapraz bağlayıcısı ilave edildi ve 30 saniye mekanik olarak çalkalandı. Potasyum persülfatın (KPS) 0,0198 gramı tartılarak 45 mL saf suda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak (100 rpm) çözüldü ve reaktöre ilave edildi. Reaktör 70 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 200 rpm'lik bir hızda çalkalandı ve 7 saat sonunda polimerizasyonun gerçekleştiği renk takibi ile gözlendi. Reaktör soğutulduktan sonra nanoyapılar 18 000 g'de 1 saat süreyle santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöken nanoyapılar etanol (% 99,8) ile daha sonra etanol/su (1:1) karışımı ve su ile yıkanarak polimerizasyona katılmayan maddelerden arındırıldı. Yıkama işleminin ardından nanoyapılara polimerizasyon hacmi kadar (yaklaşık 71 mL) saf su ilave

edilerek emülsiyon oluşturmaları sağlandı. Üretilen nano-polimerler, kullanılmadıkları zaman mikrobiyal büyümenin olmaması için % 0,02'lik NaN_3 çözeltisi içerisinde buzdolabında saklandı. Polimerizasyon işleminin şematik gösterimi Şekil 3.1'deki gibidir.



Şekil 3.1 Nano-p(HEMA) polimerinin sentezinin şematik gösterimi

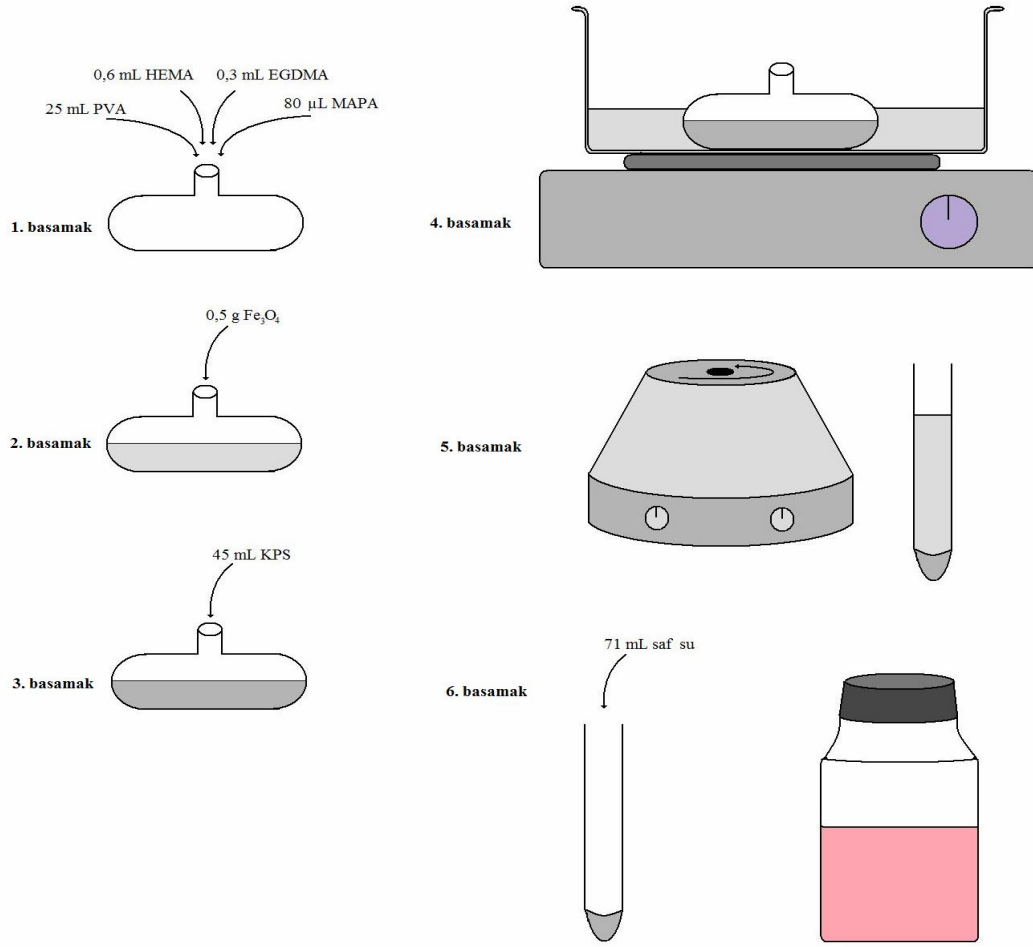
3.2.2. Metakriloilamidofenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezi

Fenilalanin (5 g) ve NaNO_2 (0,2 g), 30 mL K_2CO_3 (% 5, w/v)'ın sulu çözeltisinde çözüldü ve çözelti 0°C 'ye buz banyosunda soğutuldu. Daha sonra çözeltiye azot gazı altında yavaş yavaş 4 mL metakriloil klorür (d: 1,07 g/mL) eklenerek oda

sıcaklığında 2 saat boyunca magnetik karıştırıcıda 100 rpm hızda karıştırıldı. Bu kimyasal tepkime periyodu sonunda, çözeltinin pH'ı 7,0'a ayarlandı ve etil asetat ile ekstrakte edildi. Sulu faz, döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalan kısım (MAPA), eter ve sikloheksandan kristallendirildi.

3.2.3. Mag-Nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinin Sentezlenmesi

Magnetik-nano-poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-metakriloilamidofenilalanin) [mag-nano-p(HEMA-MAPA)] polimeri, emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak sentezlendi. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin hazırlanması için 0,5 gram polivinil alkol (PVA) alınarak 45 mL saf suda 60 °C'de ultrasonik banyo yardımıyla çözüldü ve laboratuvar tipi bir reaktöre hazırlanan PVA çözeltisinden 25 mL alındı. Üzerine 0,6 mL 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomeri ve 0,3 mL etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı ve 80 µL metakriloilamidofenilalanin (MAPA) komonomeri karışımı ilave edildi ve 30 saniye çalkalandı. Daha sonra bu reaktöre polimerin magnetik özellik kazanması için 0,5 g magnetit (Fe₃O₄) ilave edilerek yine 30 saniye çalkalandı. Potasyum persülfatın 0,0198 gramı tartılarak 45 mL saf suda magnetik karıştırıcıda (100 rpm) karıştırılarak çözüldü ve reaktöre ilave edildi. Reaktör 70 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 200 rpm'lik bir hızda karıştırıldı ve 7 saat sonunda polimerizasyonun gerçekleştiği renk takibi ile gözlendi. Reaktör soğutulduktan sonra magnetik nanoyapılar 18 000 g'de 1 saat süreyle santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöken magnetik nanoyapılar önce etanol (% 99,8) ile daha sonra etanol/su (1:1) karışımı ve su ile yıkanarak polimerizasyona katılmayan maddelerden arındırıldı. Yıkama işleminin ardından magnetik nanoyapılara polimerizasyon hacmi kadar (yaklaşık 71 mL) saf su ilave edilerek emülsiyon oluşturmaları sağlandı Polimerizasyon işleminin şematik gösterimi Şekil 3.2'deki gibidir. Sentezlenen magnetik nano-polimerler, kullanılmadıkları zaman mikrobiyal büyümenin olmaması için % 0,02'lik NaN₃ çözeltisi içerisinde buzdolabında saklandı. Elde edilen polimerin fiziksel görünümü fotoğrafı çekilerek görüntülendi.



Şekil 3.2 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin sentezinin şematik gösterimi

3.3. MAG-NANO-p(HEMA-MAPA) POLİMERİNİN KARAKTERİZASYONU

3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Nano-p(HEMA) ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerlerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, USA) kullanılarak elde edildi. Bunun için kurutulmuş nanopartiküller (0,1 g), yaklaşık 0,1 g KBr ile karıştırıldı ve pelet haline getirilerek spektrumları alındı.

3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri

Sentezlenen polimerik yapıya magnetik partiküllerin inkorpore olduğu toz haline getirilen nanopartiküllerin elektron spin rezonans spektrumu ile belirlendi. Bunun için EL 9 Varian (Palo Alto, CA) Elektron Spin Rezonans Spektrometresi kullanıldı.

3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

SEM ölçümlerinin yapılabilmesi için polimerik nano yapılar çöktürülerek kurutuldu. Havanda öğütülerek toz haline getirildi. Toz halindeki polimerin SEM ölçümleri taramalı elektron mikroskobu (Phillips XL-30S FEG) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojisi hakkında bilgi edinmek için AFM ölçümleri, Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için nanopartiküller çöktürülerek 1cm x 1cm boyutlarında cam yüzey üzerine dağıtıldı ve kurutuldu. AFM ölçümleri tapping modu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin fotoğrafı, transmisyon elektron mikroskobu (TEM, FEI Company Tecnai™, G2 Spirit, Biotwin, 20-120 kV) ile çekildi. Bunun için emülsiyon halindeki polimerler, formvar kaplı bir bakır ızgara üzerine damlatılarak kurutuldu ve TEM ölçümleri yapıldı.

3.3.6. Yüzey Alanının Hesaplanması

Sentezlenen olan mag-p(HEMA-MAPA) nanokürelerinin yüzey alanının bulunması için 1 mL süspansiyondaki partikül sayısını (Bangs, 1984) ve kürenin yüzey alanını veren Eşitlik 3.1 ve 3.2 kullanıldı.

$$N = 6 \times 10^{10} \times S / \pi \times \rho_s \times d^3 \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

$$\text{Kürenin yüzey alanı} = 4 \times \pi \times r^2 \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

Burada N, 1 mL süspansiyondaki nanopartikül sayısını; S, % katı; d, partikülün çapını (μm); ρ_s , polimer yoğunluğunu (g/mL), r partiküllerin yarıçapını (nm) göstermektedir. Ayrıca nanopartiküllere ait çizilen kütle-hacim standart grafiğinden yararlanılarak mL süspansiyondaki mg nanopartikül kütlesi teorik olarak hesaplandı.

3.3.7. Yüzey Yükü Analizi (Zeta Potansiyel Ölçümü)

Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin zeta potansiyeli, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edildi. Bu amaçla zeta potansiyel ölçüm cihazının örnek haznesine 1 mL polimer çözeltisi enjekte edilerek yüzey yükü ölçümü gerçekleştirildi.

3.3.8. Elementel Analiz

Sentezlenen polimere MAPA monomerinin katılma derecesi elementel analiz ile araştırıldı. Bunun için Elementel Analiz LECO CHNS 932 (USA) cihazı kullanıldı.

3.3.9. MALDI-TOF (Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon- uçuş zamanlı kütle spektrometresi) Ölçümleri

Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin MALDI-TOF analizleri Applied Biosystems Voyager STR cihazı ile yapıldı. Matriks olarak α -siyano-4-hidroksi sinamik asit (CHCA) kullanıldı. Bunun için 10 mg CHCA, 500 μL asetonitril ve 500 μL % 0,1'lik trifloroasetik asit karışımında çözüldü ve karışım vortekslenerek çözünmeyen kısım santrifüjle uzaklaştırıldı. Örnekler matriksle 1:24 oranında karıştırılarak vortekslendi ve daha sonra plakaya 1 μL örnek-matriks karışımı uygulandı. Plaka kurduğunda cihaza yerleştirildi ve koşullar değiştirilerek analiz gerçekleştirildi.

3.4. MAG-NANO-p(HEMA-MAPA) POLİMERİNE LİZOZİM ADSORPSİYONU VE DESORPSİYONU KOŞULLARININ İNCELENMESİ

Sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine lizozim adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde incelendi. Bunun için nano yapılar lizozim çözeltisi ile denge süresi boyunca (2 saat) 100 rpm hızda magnetik olarak karıştırıldı. Adsorpsiyona pH, tuz çeşidi ve iyonik şiddet, lizozim başlangıç derişimi, sıcaklık ve adsorpsiyon süresinin etkisi incelendi. Desorpsiyon işlemleri ile polimerin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı.

3.4.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Farklı pH çözeltilerinde (pH 4,0–5,0 asetat tamponu; 6,0–8,0 fosfat tamponu; 9,0–11,0 karbonat tamponu; 100 mM) derişimleri 0,5 mg/mL olan 5'er mL lizozim çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerden 1'er mL alınarak spektrofotometrik olarak 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan 4'er mL'lik çözeltilere 2'şer mL sentezlenen polimer çözeltilerinden ilave edilerek 2 saat süre ile 100 rpm hızda magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. İkinci saatin sonunda örneklerden 1'er mL alınarak 18 000 g'de 15 dakika santrifüjlendi ve süzüntüde 280 nm'de absorbans okundu. Eşitlik 3.3 gereğince gram polimer başına adsorplanan lizozim miktarları hesaplanarak pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi.

$$Q = [(C_0 - C)V]/m \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

Burada Q, birim nano yapı üzerine adsorplanan lizozim kütlesini (mg/g); C₀ ve C sırası ile lizozimin nano yapılar ile etkileştirilmeden önceki ve sonraki derişimlerini (mg/mL); V, toplam hacmi (mL); m, deneylerde kullanılan nano yapı kütlesini (g) göstermektedir. Adsorpsiyonun en yüksek olduğu pH seçilerek diğer adsorpsiyon deneylerine belirlenen pH ile devam edildi. Bu bölümde yapılan işlemler MAPA taşımayan nano-p(HEMA) için de gerçekleştirilerek karşılaştırma yapıldı.

3.4.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Farklı Tuzların ve İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

Lizozim adsorpsiyon deneyleri, pH 9,0 karbonat tamponunda derişimleri 0; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 M olan NaCl, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄ tuzları ile gerçekleştirilerek bu tuz derişimlerinde adsorplanan lizozim miktarları hesaplandı. Tuz derişimlerine karşı, gram polimer başına adsorplanan lizozim miktarı (mg lizozim/gram polimer) grafikleri çizilerek adsorpsiyonun en yüksek olduğu tuz çeşidi ve derişimi belirlendi.

3.4.3. Adsorpsiyona Lizozim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Adsorpsiyona lizozim başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi için derişimleri 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL olan lizozim çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler 25 °C'de, pH 9,0 karbonat tamponunda ve 1,0 M Na₂SO₄ içeren ortamda 2 saat boyunca polimer çözeltisi ile muamele edildi. Her bir derişimde adsorplanan lizozim miktarı hesaplanarak lizozim derişimine karşı, adsorplanan lizozim miktarı grafiği çizildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulundu. İlaveten, bu bölümde yapılan işlemler MAPA taşımayan nano-p(HEMA) polimeri için de gerçekleştirilerek non spesifik adsorpsiyon değeri hesaplandı. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) için lizozim derişimine karşı adsorplanan lizozim miktarı verilerinden yararlanarak Langmuir ve Freundlich izotermleri çizildi ve değerlendirildi.

3.4.4. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonu, 4, 15, 25, 35, 45, 55, 65 °C'deki sıcaklıklarda gerçekleştirildi. 4 °C için buzdolabı diğer sıcaklıklar için su banyoları kullanıldı. pH 9,0 karbonat tamponunda ve 1,0 M Na₂SO₄ tuzu içeren lizozim enzimi belirtilen sıcaklıklarda polimer çözeltisi ile 2 saat boyunca muamele edilerek adsorplanan lizozim miktarları hesaplandı ve sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçirildi. Sıcaklığın lizozim adsorpsiyonuna etkisi değerlendirildi.

3.4.5. Lizozim Adsorpsiyonuna Zamanın Etkisinin İncelenmesi

Lizozim adsorpsiyonu, farklı lizozim başlangıç derişimlerinde Bölüm 3.4.3.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilerek 120 dakika boyunca belli aralıklarla (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120 dakika) izlendi. Bu zaman aralıklarında adsorplanan lizozim miktarları hesaplanarak zamana karşı grafiğe geçirildi. Bu verilerden yararlanılarak mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine lizozim adsorpsiyonunun birinci ve ikinci dereceden kinetik bağıntıları türetilerek grafikleri çizildi ve değerlendirildi.

3.4.6. Mag-Nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinden Lizozimin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerinin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için lizozim adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyonu işlemleri gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak % 50'lik etilen glikol sulu çözeltisi kullanıldı. Lizozim adsorplanmış polimerik nano yapılar oda sıcaklığında 6 mL % 50'lik etilen glikol çözeltisi ile 100 rpm hızda 1 saat süre ile magnetik olarak karıştırıldı. Desorpsiyon ortamındaki lizozim miktarı 280 nm'deki absorbansın spektrofotometrik olarak okunması ile bulundu. Yüzde desorpsiyon oranı Eşitlik 3.4'e göre hesaplandı.

$$\% \text{ desorpsiyon} = \left[\frac{\text{desorpsiyon ortamına salınan lizozim miktarı (mg)}}{\text{adsorplanan lizozim miktarı (mg)}} \right] \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.4}$$

Desorpsiyon işleminden sonra mag-p(HEMA-MAPA) nano küreleri pH 9,0 karbonat tamponu (100 mM) ile yıkanarak tekrar lizozim adsorpsiyonu için kullanıldı. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri 10 kez tekrar edilerek adsorplanan lizozim miktarı, döngü sayısına karşı grafiğe geçirildi.

3.5. LİZOZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Lizozim aktivitesi, Shugar (1952) tarafından önerilen spektrofotometrik metoda göre tayin edildi. Bunun için 9,0 mg *Micrococcus lysodeikticus* (*M. lysodeikticus*) hücresi tartılarak 25 mL 100 mM pH 9,0 karbonat tamponunda süspansiyon edilerek aynı tamponla son hacim 30 mL'ye tamamlandı. Örnek küvetine 2,9 mL hücre ve 0,1 mL lizozim enzimi, kör küvetine ise 2,9 mL hücre ve 0,1 mL 100 mM pH 9,0 karbonat tamponu konularak hücrenin parçalanma hızı spektrofotometrik olarak 450 nm'de 5 dakika boyunca izlendi. 1 Unite lizozim, pH 9,0 ve 25 °C'de 450 nm'de dakika başına bulanıklıktaki 0,001'lik azalma olarak tanımlandı. Spesifik aktivite aşağıdaki formüle (Eşitlik 3.5) göre hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{(\Delta A_{450nm} / \text{dakika}) \times 10^3}{\text{mg protein}} \quad \text{Eşitlik 3.5}$$

3.5.1. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozim aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 4,0–5,0 asetat tamponu; 6,0–8,0 fosfat tamponu; 9,0–11,0 karbonat tamponu) 100 mM'lık derişimlerde tampon çözeltiler hazırlandı. Serbest ve immobilize lizozim için Eşitlik 3.5 kullanılarak spesifik aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek spesifik aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. pH değerlerine karşılık % aktivite grafikleri çizilerek serbest ve immobilize lizozim için optimum pH değerleri bulundu.

3.5.2. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozim için farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 35, 45, 55, 65 °C'de) aktivite ölçümleri yapıldı. Bu sıcaklıklar spektrofotometreye bağlanan bir sirkülatörlü su banyosu ile sağlandı. Serbest ve immobilize lizozim için sıcaklıklara karşı % aktivite grafikleri çizildi ve optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.5.3. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Substrat Değişiminin Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozim aktivitesine substrat değişiminin etkisinin araştırılması için farklı derişimlerde (0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 mg/mL) *M. lysodeikticus* hücresi hazırlanarak 450 nm'de absorbansları okundu ve substrat derişimine karşı absorbans standart grafiği çizildi. Serbest ve immobilize lizozim ile farklı substrat derişimlerinde aktivite ölçümleri yapıldı. Bunun için örnek küvetine 0,1 mL lizozim enzimi ve 2,9 mL pH 9,0 karbonat tamponunda hazırlanmış hücre, kör küvetine ise 0,1 mL lizozim enzimi ve 2,9 mL pH 9,0 karbonat tamponu konarak hücrenin parçalanma hızı spektrofotometrik olarak 5 dakika boyunca izlendi. Aktivite hesapları yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak serbest ve immobilize lizozim için K_m ve V_{max} kinetik sabitleri bulundu.

3.5.4. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Depo Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozim için, belli aralıklarla toplam üç ay boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Bu zaman aralığında serbest ve immobilize lizozim buzdolabında 4 °C'de muhafaza edildi. Aktivite ölçümleri Bölüm 3.5'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize lizozim için zamana karşı % aktivite grafikleri çizilerek depo kararlılıkları incelendi.

3.5.5. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozimin ısıl kararlılığının incelenmesi için yüksek bir sıcaklık olan 55 °C seçildi. Bu amaçla serbest ve immobilize lizozim, 55 °C'deki su banyosunda 240 dakika boyunca tutuldu ve belli zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize lizozim için zaman karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek değerlendirildi.

3.5.6. İmmobilize Lizozimin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize lizozimin işlemsel kararlılığının incelenmesi için immobilize lizozim ile 10 kez aktivite ölçümleri yapıldı. Bunun için substrat içeren ortama immobilize lizozim ilave edilerek Bölüm 3.5'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. İmmobilize lizozim her bir aktivite ölçümünden sonra tampon çözelti ile yıkanarak hücre artıklarından temizlendi ve tekrar aktivite ölçümü için kullanıldı. Döngü sayısına karşılık % aktivite grafiği çizilerek immobilize lizozimin işlemsel kararlılığı incelendi.

3.6. YUMURTA AKINDAN LİZOZİM SAFLAŞTIRILMASI

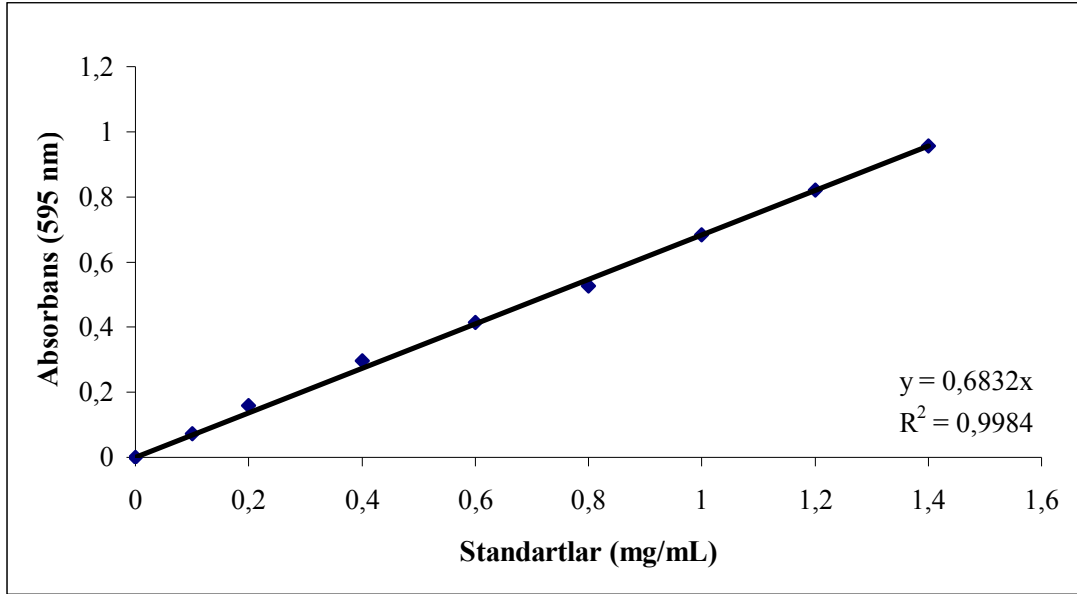
Yumurta akından lizozimin saflaştırılması için taze yumurtanın beyaz kısmı ayrıldı. Ayrılan beyaz kısım pH 9,0 karbonat tamponu ile 2 kat seyreltilerek 4 °C'de 30 dakika karıştırıldı. Elde edilen homojenat 12 000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatanda protein tayini ve aktivite ölçümleri yapıldı. Daha sonra yumurta akının yaklaşık % 54'ünü oluşturan ovalbuminlerin (Ghosh, 2003) izoelektrik çöktürme ile ayrılmasına çalışıldı. Bunun için süpernatanın pH'ı, 1,0 M'lık HCl ile 4,5'e ayarlanarak 4 °C'de 1 saat bekletildi ve 12 000 g'de 30 dakika santrifüjlendi ve süpernatın ayrılarak pH'ı 9,0'a ayarlandı. Elde edilen süpernatandan 4,0 mL alınarak 4,0 mL pH 9,0 karbonat tamponu ile seyreltildi. Daha sonra ortama derişimi 1,0 M olacak şekilde Na₂SO₄ ilave edildikten sonra 8 mL polimer çözeltisi ile 2 saat boyunca karıştırıldı. İki saatin sonunda polimer enzim çözeltisi karışımı 18 000 g'de

15 dakika santrifüjlendikten sonra süzüntüde protein tayini yapılarak bağlanan protein miktarı hesaplandı. İmmobilize lizozimin destek maddesinden ayrılması için % 50'lik etilen glikol ile 1 saat karıştırılarak desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon işlemi sonunda elde edilen örnekte protein tayini ve aktivite ölçümleri yapıldı ve elektroforeze uygulandı.

3.6.1. Protein Tayini

Yumurta akından lizozim saflaştırılması işlemlerinde protein tayinleri Bradford (1976) yöntemine göre yapıldı. Commassie Brilliant Blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki + yüklü gruplara seçimli olarak bağlanan bir boyadır. Boya kırmızı ($A_{\max} = 465 \text{ nm}$) ve mavi ($A_{\max} = 595 \text{ nm}$) formlarda bulunur. Kırmızı form çözeltideki haldir ve boya proteine bağlandığında mavi renk oluşur. Reaksiyon oldukça tekrarlanabilir ve hızlıdır. İki dakika içinde renk oluşur ve bir saat kadar kararlı kalır (Robty ve White, 1987).

Bradford yöntemi ile protein tayini için piyasadan hazır alınan sıvı haldeki Bradford boya çözeltisi kullanıldı. Bu amaçla örnek tüpüne 2,5 mL boya çözeltisi ve 50 μL protein çözeltisi, kör tüpüne ise 2,5 mL boya çözeltisi ve 50 μL saf su konarak vortekslendi. İki dakika beklenerek 595 nm'de absorbans okundu. Okunan absorbanslara karşı gelen protein derişimleri kalibrasyon grafiğinden elde edildi. Kalibrasyon grafiği için derişimleri 0-1,4 mg/mL aralığında olan sığır serum albumin (BSA) çözeltileri (0,15 M NaCl içerisinde) hazırlanarak bu çözeltilerde protein tayinleri gerçekleştirildi. BSA derişimine karşı 595 nm'de ölçülen absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Bradford yöntemi ile protein tayini için kalibrasyon grafiği

3.6.2. SDS-PAGE Elektrofrezinin Uygulanması

Lizozimin saflığı Laemmli (1970) yöntemine göre SDS-PAGE kullanılarak yapıldı. SDS PAGE jel hazırlığı ve elektroforeze uygulama işlemleri Arat (2007)'ye göre gerçekleştirildi. Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapıldı. Elektrofrez camları % 70'lik etanolla iyice temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için kenarları silikonlandı. % 10'luk ayırma jeli için 2,55 mL saf su, 1,66 mL pH 8,8 ayırma tamponu ($2,8 \cdot 10^{-3}$ M SDS içeren 3,0 M Tris-baz tamponu) ve 2,2 mL % 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid çözeltisiyle karıştırılarak hava kabarcığı kalmaması için 10 dakika vakum altında gazı uzaklaştırıldı. Altı mikrolitre TEMED ve 43 μ L % 10'luk amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırıldı. Hazırlanan jel enjektör kullanılarak mini elektrofrez camları arasına döküldü. Jelin havayla temasını kesmek için üzeri % 70'lik etanolla kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat beklendi. Bir saatin sonunda jel üzerindeki alkol kurutma kağıdı ile jele temas etmeden yavaşça alındı. Ayırma jelinin üzerine % 5'lik yoğunlaştırma jeli döküldü. Yoğunlaştırma jelinin hazırlanması için 965 μ L saf su, 416 μ L pH 8,8 yoğunlaştırma tamponu ($3,5 \cdot 10^{-4}$ M SDS içeren 0,5 M Tris-baz tamponu), 278 μ L % 30'luk akrilamid/bis akrilamid karıştırılarak vakum altında 10 dakika gazı uzaklaştırıldı. Üzerine 1,7 μ L TEMED ve

17 µL % 10'luk amonyum persülfat ilave edilerek karıştırıldı ve elektroforeze döküldü. Tarak, jelle hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jelle yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için 1 gece beklendi.

Jelle uygulanacak örnekler ve standart [miyozin (tavşan kanı, 205 kDa), β-galaktozidaz (*E. coli* 116 kDa), fosforilaz B (tavşan kanı, 97 kDa), albumin (sığır serum, 66 kDa), albumin (yumurta akı, 45 kDa), karbonik anhidraz (sığır eritrosit, 29 kDa)], pH 8,5 yükleme tamponuyla (12,5 mL 1 M pH 6,8 Tris Baz, 40 mL % 10'luk SDS, 20 mL gliserol, 2 mL % 2'lik brom fenol mavisi, 5 mL % 5'lik β-merkaptotanol) uygun oranlarda seyreltildikten (10 µg protein/15 µL) sonra kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi. Tarak jelle zarar vermeden çekildi ve jel saf su ile yıkanarak polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar yarısına kadar pH 8,5 yürütme tamponu ($2,5 \cdot 10^{-2}$ M Tris baz, 0,2 M glisin, $3,5 \cdot 10^{-3}$ M SDS) ile dolduruldu. Uygun derişimlerde seyreltmeleri yapılan örneklerden kuyucuklara 15 µL yüklendi. Örnekler jelle yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde yürütme tamponu eklendi. Güç kaynağı ile üst jelle 100 V 20 mA, alt jelle 200 V 40 mA elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi 90 dakikada tamamlandı.

Elektroforetik yürütme tamamlandıktan sonra cam plakalar arasından çıkarılan jel Commasie Brilliant Blue G-250 çözeltisi içine alınarak bir gece bekletildi. Daha sonra jel boya çözeltisinden çıkarılarak boya giderimi için iki ayrı yıkama çözeltisinde bekletildi. Birinci yıkama çözeltisinde (400 mL metanol, 70 mL asetik asit, 530 mL saf su) ve ikinci yıkama çözeltisinde (50 mL metanol, 70 mL asetik asit, 880 mL saf su) 6'şar saat bekletildi. Fotoğraf çekiminden sonra jel % 5'lik asetik asit çözeltisinde saklandı.

3.6.3. Bio-LC'nin Uygulanması

Yumurta akından saflaştırılan lizozim enziminin miktarını belirlemek için Bio-LC kullanıldı. Bu amaçla piyasadan satın alınan saf lizozim enzimi, yumurta akı ve polimerden desorbe edilen (saflaştırılan) lizozim enzimi Bio-LC cihazına enjekte edildi. Bio-LC analizi DIONEX sistemi: PDA-100 Photodiode array dedektörü, LC

25 kromatografi firması, GS 50 gradient pompası kullanılarak gerçekleştirildi. Kolon olarak Hamilton PRP-Infinity Reversed Phase (I.D. 30x4,1 mm, partikül büyüklüğü 4 µm) kullanıldı. Mobil faz A (% 20 asetonitril, % 1 trifloroasetik asit) ve B (% 60 asetonitril, % 0,095 trifloroasetik asit) çözeltilerinin 2,0 mL/dakika akış hızında, back pressure 1000-1200 psi ve lineer gradient (5 dakikada % 100 A → % 80 B) programında uygulandı. Kolon sıcaklığı 25 °C, injeksiyon hacmi 100 µL olarak ayarlandı. Dedeksiyon 215 nm'de gerçekleştirildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. MAG-NANO-p(HEMA-MAPA) POLİMERİNİN FOTOĞRAFI

Sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin fotoğrafı Şekil 4.1’de görülmektedir. Bu polimerin fiziksel görünümüne bakıldığında, hafif kıvılcımsı bir renge ve bulanık bir görüntüye sahip olduğu görülmektedir. Sıvı içerisinde dağılmış partiküller 18 000 g’de santrifüj edildiğinde çökmektedir.

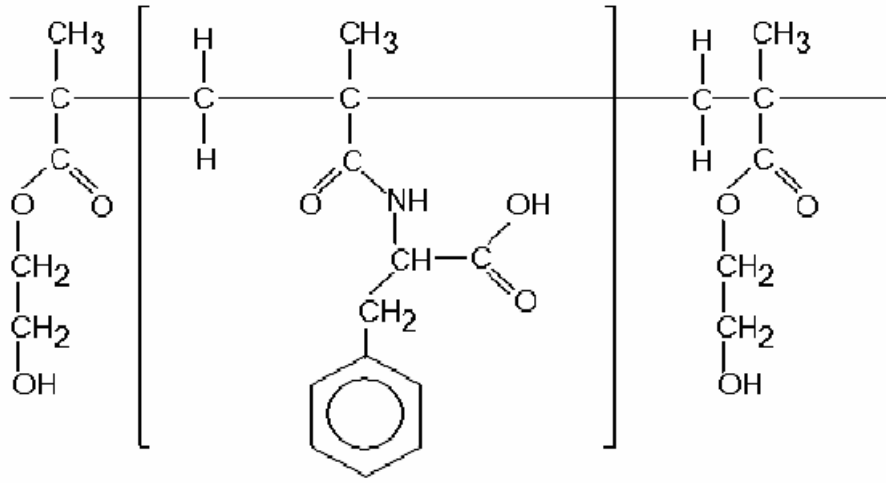


Şekil 4.1 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin fotoğrafı

4.2. MAG-NANO-p(HEMA-MAPA) POLİMERİNİN KARAKTERİZASYONU

4.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

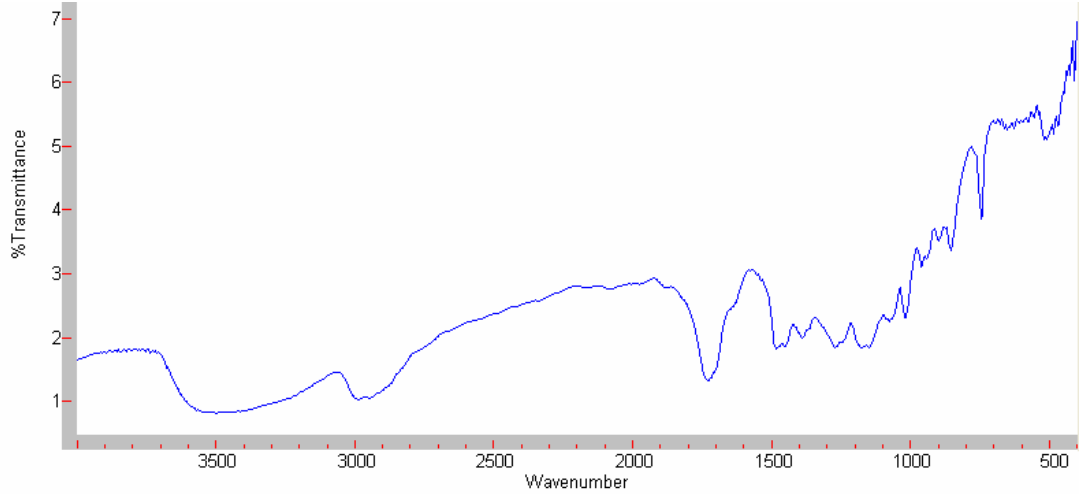
Sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin olası kimyasal yapısı Şekil 4.2'deki gibi önerilmiştir (Öncel *et al.*, 2005).



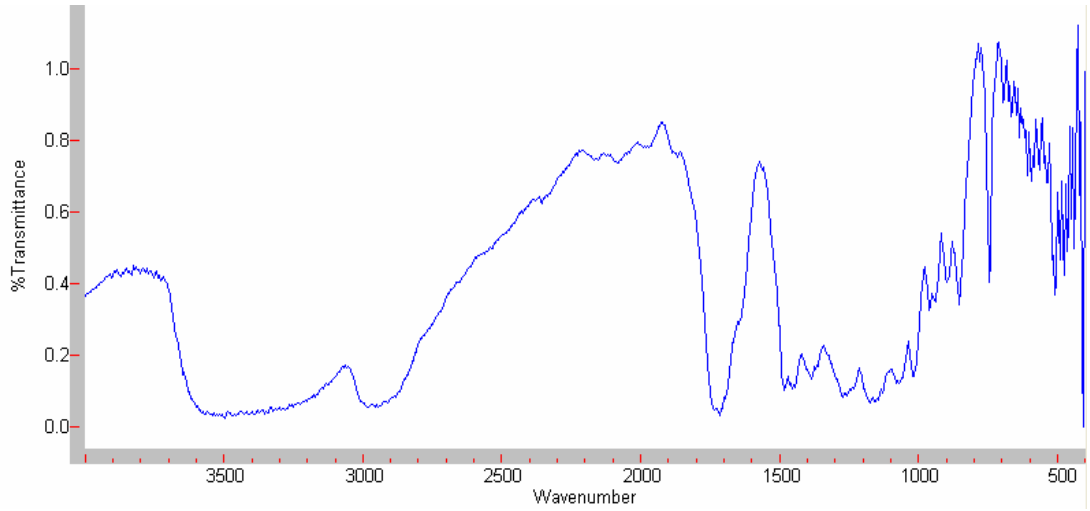
HEMA 2-Metakriloilamidofenilalanin

Şekil 4.2 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin kimyasal formülü

Nano-p(HEMA) ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerlerinin FTIR spektrumları Şekil 4.3 ve 4.4'de görülmektedir.



Şekil 4.3 Nano-p(HEMA) polimerinin FTIR spektrumu

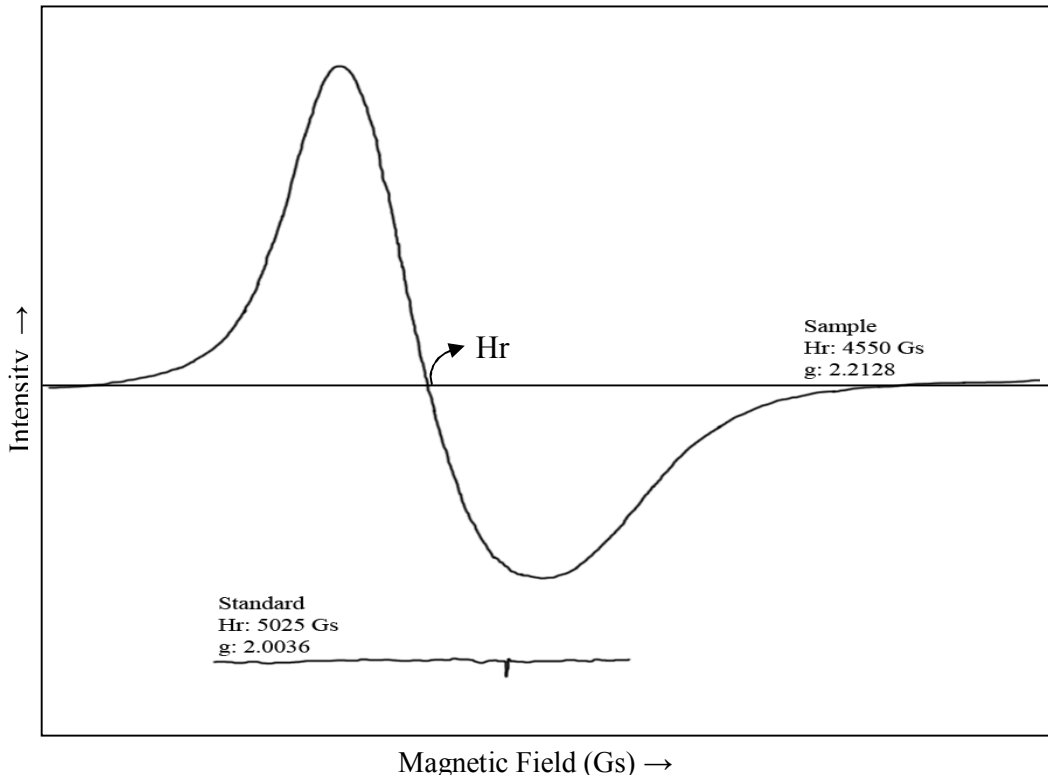


Şekil 4.4 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin FTIR spektrumu

Şekil 4.3 ve 4.4'de, nano-p(HEMA) ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin –OH gruplarının gerilme titreşimleri $3400\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmektedir. Bu aralıkta mag-nano-p(HEMA-MAPA) nanoyapılarının yaptığı pikin nano-p(HEMA) nanoyapılarının gösterdiği pike göre daha geniş olmasının nedeni, mag-nano-p(HEMA-MAPA) yapısındaki –NH gerilme titreşimlerinin bu aralık içerisinde titreşim göstermesinden kaynaklanabilir. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) nanoyapılarının FTIR spektrumunda görülen 748 cm^{-1} civarındaki keskin pik ise MAPA yapısındaki aromatiklikten kaynaklanabilir. 1700 cm^{-1} civarında gözlenen –C=O gerilme titreşiminin mag-nano-p(HEMA-MAPA) yapılarında daha keskin olmasının sebebi mag-nano-p(HEMA-MAPA) yapısındaki ekstra –C=O gruplarından ileri gelebilir.

4.2.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri

Polimerik yapıdaki manyetik partiküllerin varlığı ESR ile saptanır. Manyetik alana (Gauss) karşı manyetik pik yoğunluğu grafiği bu anlamda oldukça karakteristiktir. Şekil 4.5’de mag-nano-p(HEMA-MAPA) için çekilmiş olan ESR spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.5 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın ESR spektrumu

g Faktörü, eşleşmemiş elektronları bulunan moleküllerin nicel özelliğinin ortaya konmasında kullanılır ve Eşitlik 4.1 ile hesaplanır:

$$g = hv / \beta H_r$$

Eşitlik 4.1

h: Planck sabiti ($6,626 \cdot 10^{-27}$ erg/s)

β : evrensel sabit ($9,274 \cdot 10^{-21}$ erg/G)

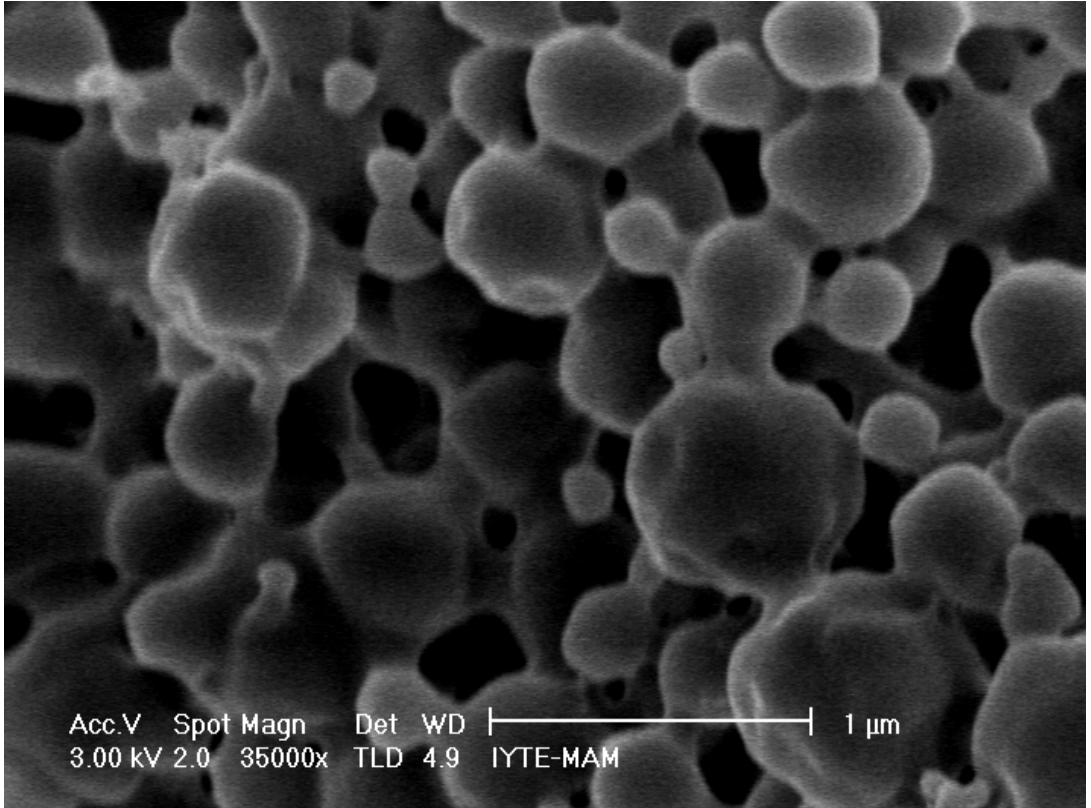
v: frekans (Hz)

H_r : magnetik alanın rezonansı (G)

Bilinmeyen bir sinyal için g faktörünün ölçülmesi, sinyal orijininin tanımlanmasında çok yararlıdır. Literatürde g faktörü değerleri Fe^{3+} için sırasıyla, 1.4–3.1 ve 2.0–9.7 arasında bulunmuştur (Sarı *et al.*, 2006). Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri için yukarıdaki eşitlikten g faktörü 2,2128 olarak bulunmuştur. Bu da sentezlenen polimerik yapının manyetik özellik kazandığını göstermektedir.

4.2.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Şekil 4.6’da mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin SEM fotoğrafı görülmektedir.

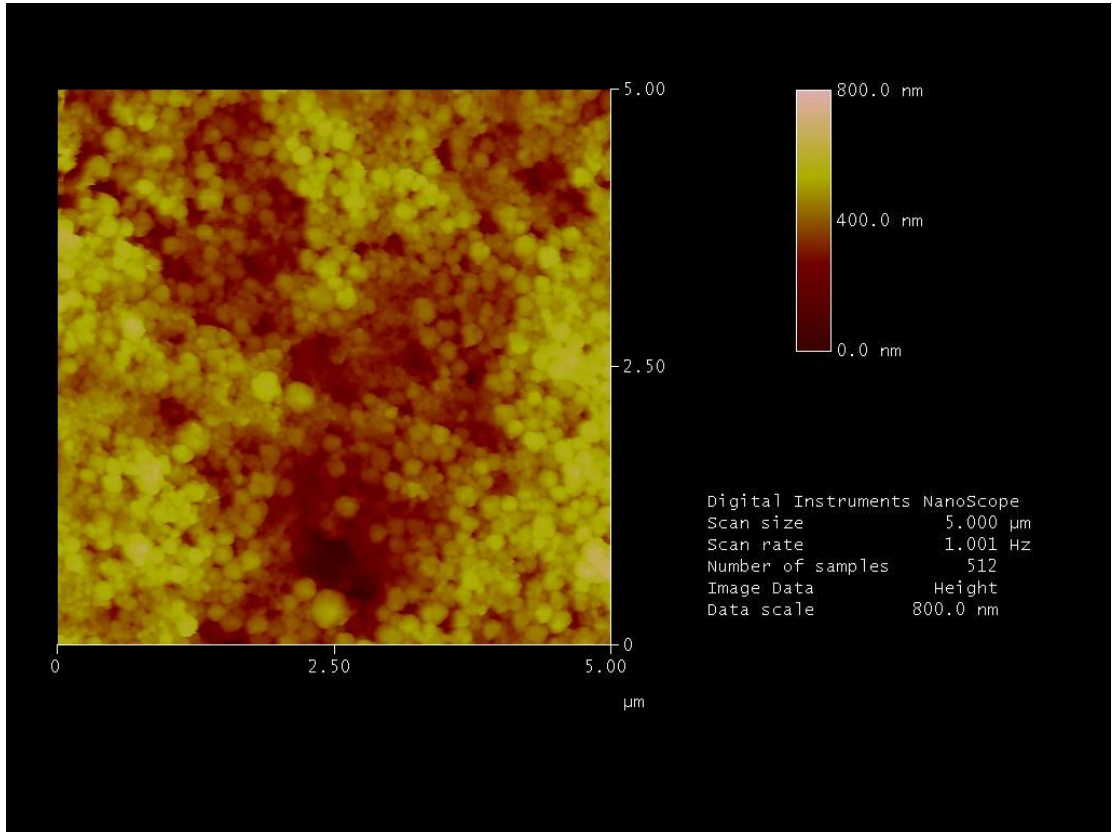


Şekil 4.6 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)’nın SEM fotoğrafı

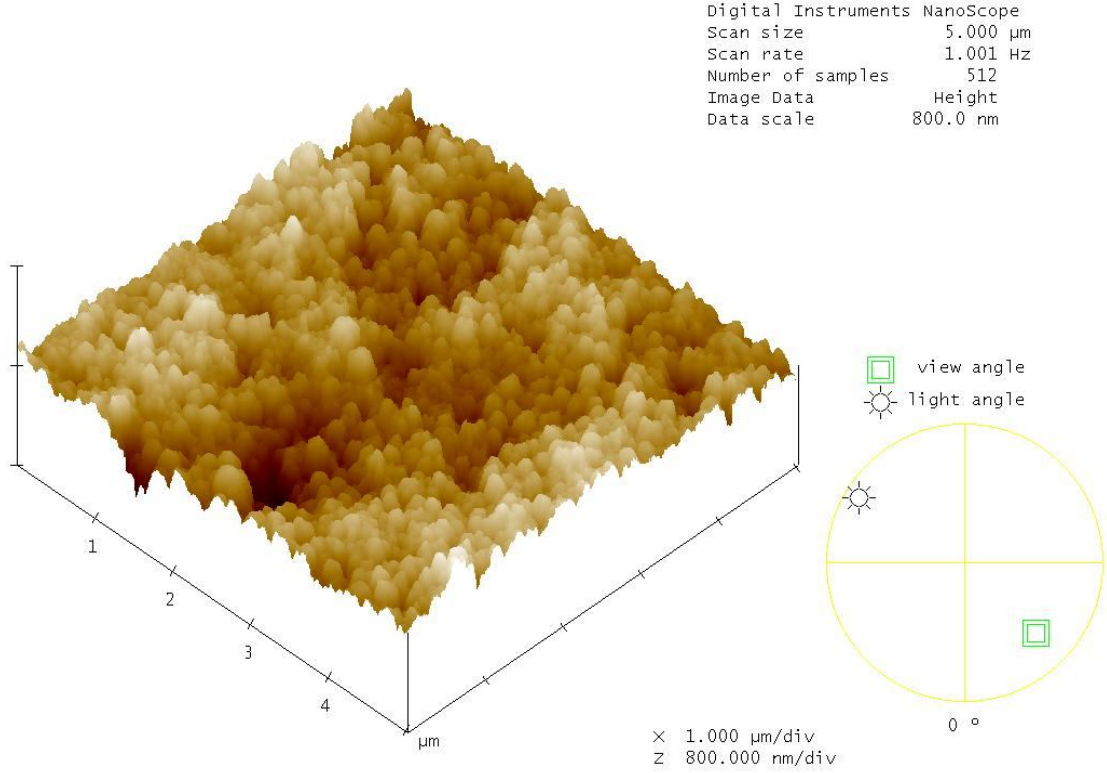
SEM fotoğrafı sentezlenen nano yapıların küresel yapıda ancak biraz deforme olduğunu göstermektedir. Bu deformasyon örnek hazırlığı aşamasında polimerin kurutulduktan sonra toz haline getirilmesi sırasında gelişmiş olabilir.

4.2.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

AFM ile büyüklük ve yüzey morfolojileri incelenir (Kumar ve Lehr, 2004). Şekil 4.7'de sentezlenen polimerin AFM fotoğrafı, Şekil 4.8'de ise sentezlenen polimerin üç boyutlu AFM fotoğrafı görülmektedir. Fotoğraflara bakıldığında, sentezlenen nanopartiküller yaklaşık olarak eş boyutta (< 400 nm) ve küresel yapıdadır.



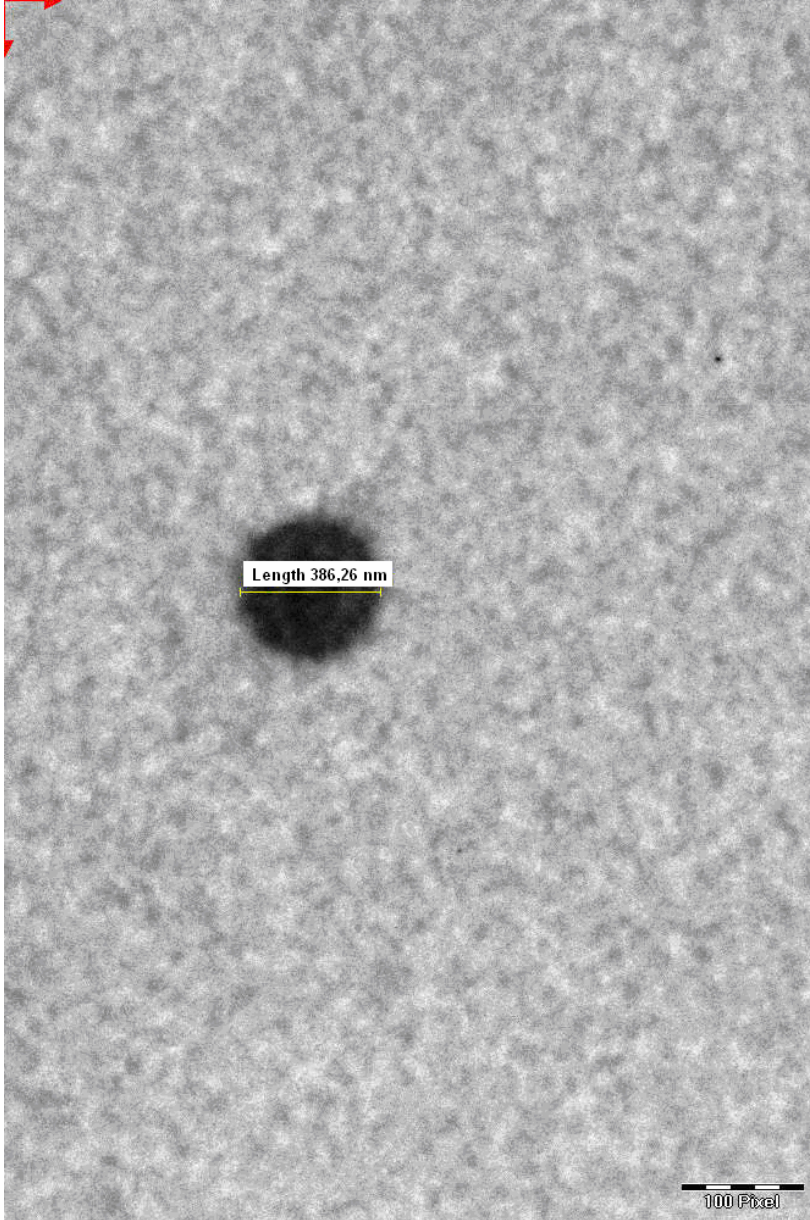
Şekil 4.7 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın AFM fotoğrafı



Şekil 4.8 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın üç boyutlu AFM fotoğrafı

4.2.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Şekil 4.9'da sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin TEM fotoğrafı görülmektedir. Fotoğraftan da görüldüğü gibi sentezlenen polimer oldukça küresel yapıda olup, çapı 386,26 nm'dir. Nanoboyutlarda sentezlenen partiküller geniş yüzey alanı sağlamaları nedeni ile partiküllerin birim kütlesi başına daha fazla miktarda enzim yüklemesine izin verirler (Kim *et al.*, 2006).



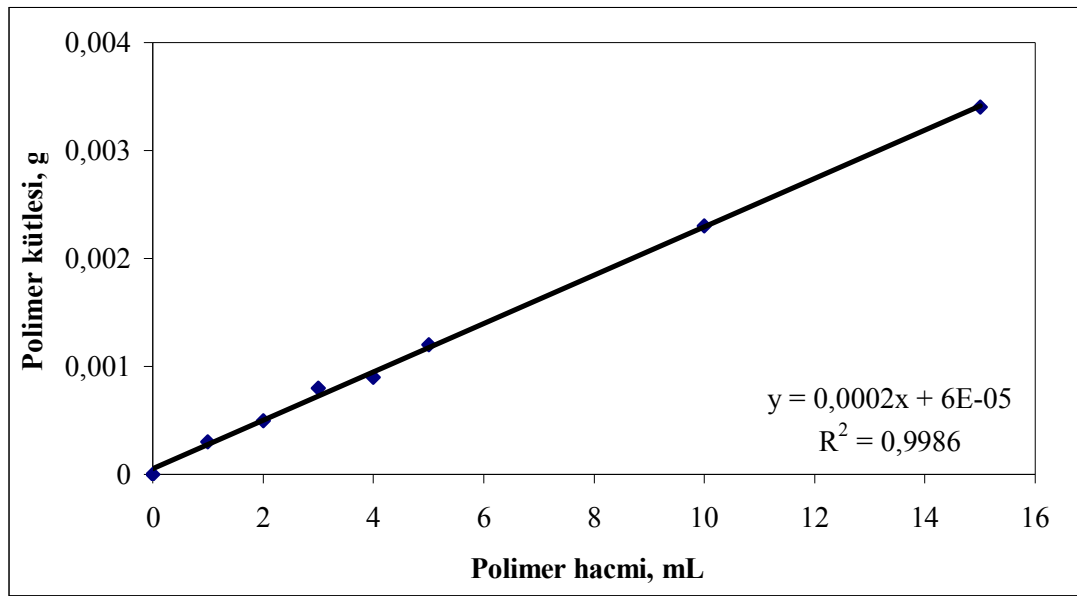
M-N-PX9900 386.26

Şekil 4.9 Mag-nano-p(HEMA-MAPA)'nın TEM fotoğrafı

4.2.6. Yüzey Alanının Hesaplanması

Şekil 4.10'da sentezlenen nanopartiküllerin hacim-kütle standart grafiği görülmektedir. Bu grafikten ve Bölüm 3.3.4'deki eşitliklerden yararlanarak mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin spesifik yüzey alanı $580,0 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Bu değer literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında oldukça geniş bir yüzey alanı sağlanabildiğini ifade etmektedir. Ruckenstein ve Zeng (1997), lizozim adsorpsiyonu için $1,6 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına sahip makrogözenekli kitin

membranlarını, Odabaşı ve Denizli (2004), lizozim adsorpsiyonu için $56 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına sahip Cibacron Blue F3GA inkorpore edilmiş magnetik poli(HEMA) kürelerini hazırlamışlardır. Lu *et al.* (2007), lizozim adsorpsiyonu için Fe (III) immobilize kollajen fiber desteğini hazırlayarak yaklaşık $6 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına, Bayramoğlu *et al.* (2007) lizozim adsorpsiyonu için poli(metakrilik asit) aşılınmış çapraz bağlı kitosan küreleri hazırlayarak $4,36 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına ulaşmışlardır. Geniş yüzey alanı, enzim immobilizasyonunda birim kütle başına bağlanan enzim miktarını artırmaktadır.



Şekil 4.10 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) partiküllerinin hacim-kütle grafiği

4.2.7. Yüzey Yükü Analizi (Zeta Potansiyel Ölçümü)

Zeta potansiyel değeri, partikülün hem kararlılığı hem de mukoadhezyon özelliğini etkileyen önemli bir faktördür. Teorik olarak pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyel değerleri partikül süspansiyonunun kararlılığını gösterir. Aynı elektrik yüküne sahip partiküller arasındaki elektrostatik itme kürelerin bir araya gelmesini (agregasyonunu) önler. Öte yandan, mukoadhezyon pozitif zeta potansiyel durumunda artabilir (Kumar ve Lehr, 2004).

Zeta potansiyel terimi koloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyelin bir ölçüsüdür. Başka bir deyişle zeta potansiyel, dispersiyon ortamı ile disperse olmuş partiküle

bağlı akışkanın durağan tabakası arasındaki potansiyel farktır. Zeta potansiyelinin önemi bu değer koloidal dispersiyon ortamlarının (örneğin multi vitamin şuruplar) kararlılığının bir ölçüsü olarak kabul edilmesindedir. Zeta potansiyeli bir dispersiyon içerisindeki benzer yük taşıyan komşu partiküllerin aralarındaki itmenin derecesini gösterir. Bir süspansiyon oluşturacak kadar yeterli düşük yoğunluğa ve küçük partikül boyutlarına sahip molekül ve partiküller için yüksek bir zeta potansiyel değeri kararlılık göstergesidir. Yani bu çözelti veya dispersiyon agregasyona karşı dirençlidir. Zeta potansiyelinin düşük olması durumunda çekim kuvvetleri itme kuvvetlerinden daha yüksektir ve dispersiyon bozulur ve flokule olur. Sonuç olarak negatif veya pozitif yüksek zeta potansiyeline sahip kolloidler elektriksel olarak kararlıdır (http://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential).

Sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin zeta potansiyel değeri pH 7,0'da -10 mV olarak bulunmuştur. Negatif değerde elde edilen bu zeta potansiyel, sentezlenen nanopartikül yapılarının kararlı olduğunu göstermektedir (Kumar ve Lehr, 2004).

4.2.8. Elementel Analiz

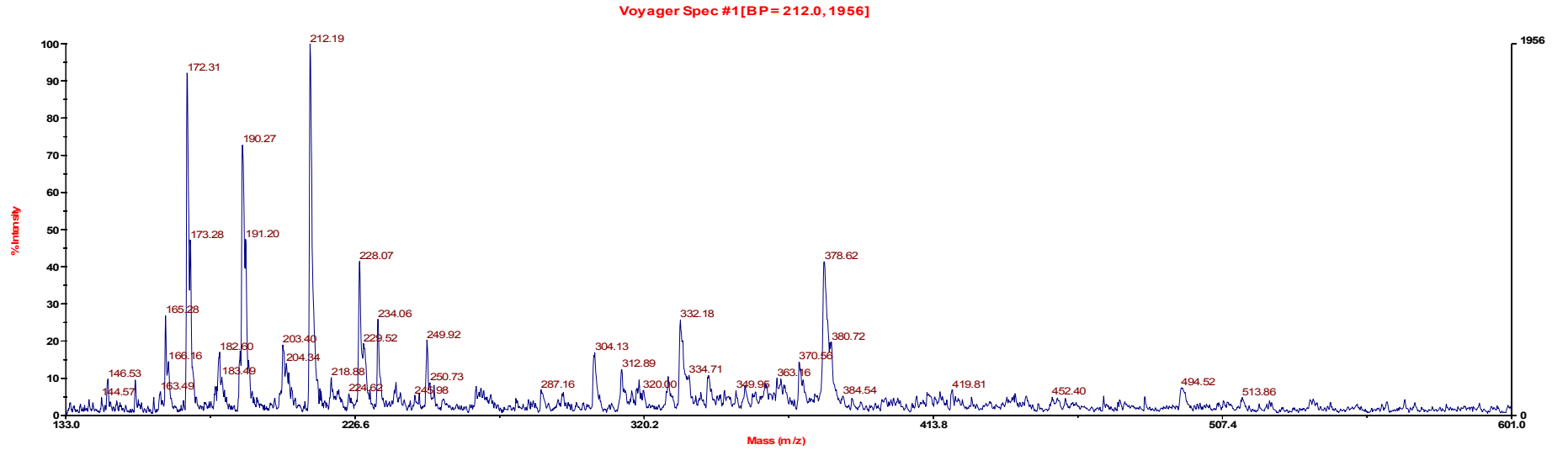
Sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri elementel analize tabi tutularak polimerdeki MAPA içeriği azot stokiyometrisi kullanılarak hesaplanmıştır ve $4,30 \times 10^{-3}$ mmol/g polimer olarak bulunmuştur. HEMA ve polimerizasyonda kullanılan diğer kimyasal maddelerin yapısında azot bulunmamaktadır. Elementel analiz ile tespit edilen azot sadece polimerik yapıya katılmış olan MAPA komonomerinden kaynaklanmaktadır.

4.2.9. MALDI-TOF (Matriks-Destekli Lazer Desorpsiyon/

İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) Ölçümleri

Sentezlenen mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin MALDI-TOF ölçümleri Anadolu Üniversitesi BİBAM'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumlar aşağıda verilmiştir.

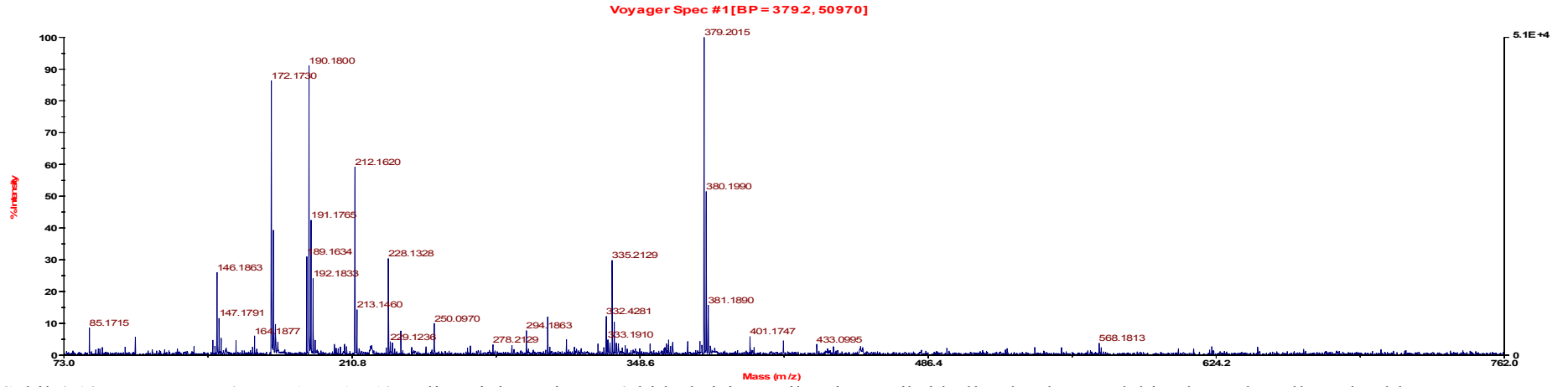
Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14’de görülen m/z değerleri (172, 173, 190-191, 212, 294, 379-380), matriks olarak kullanılan α -siyano-4-hidroksisinnamik asitte aittir. Şekil 4.11’de m/z 234 olarak görülen pik MAPA monomerine aittir [$233 (\text{MAPA } M_w) + 1$]. Şekil 4.12’de m/z 146 olarak görülen pik $-\text{CH}_2$ grubuna bağlı HEMA’yı göstermektedir [$130 (\text{HEMA } M_w) + 14 + 2$]. Şekil 4.13’de görülen m/z 146 ve m/z 234 sırası ile $-\text{CH}_2$ grubuna bağlı HEMA’yı ve MAPA’yı göstermektedir. Şekil 4.14’de görülen m/z 234 değeri MAPA monomerini, m/z 335 ise HEMA-MAPA’dan 2 adet $-\text{CH}_2$ grubunun ayrılması ile oluşan yapıyı göstermektedir [$363 (\text{HEMA-MAPA } M_w) - 2 \times 14$].



Şekil 4.11 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu

Çalışma koşulları:

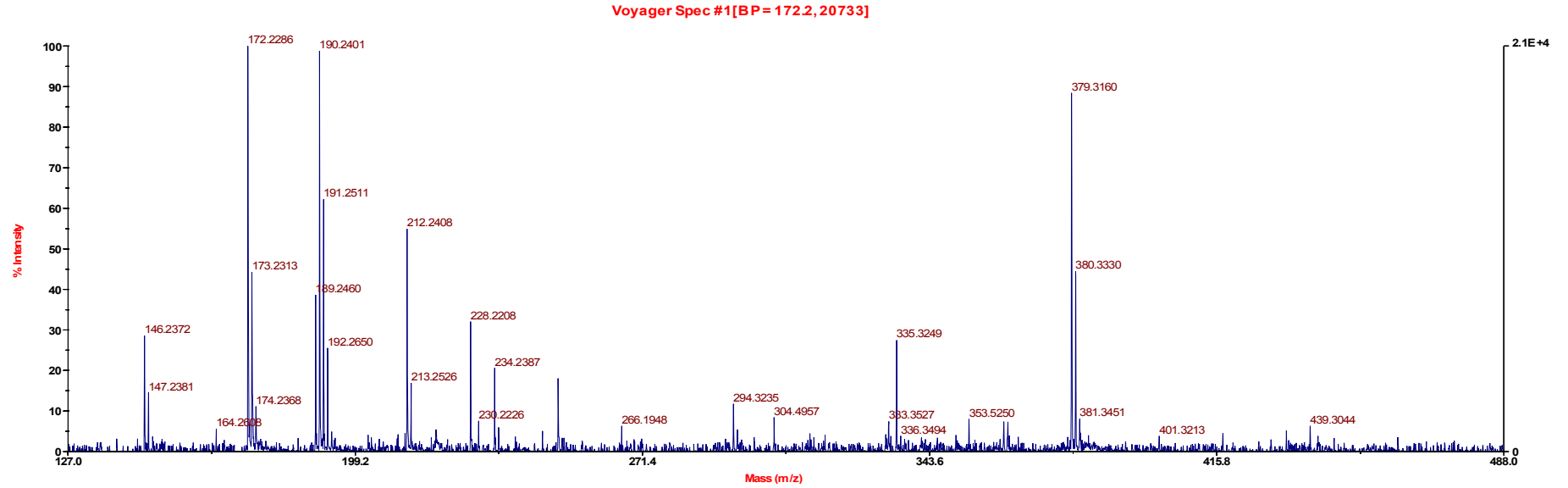
Hızlandırma gerilimi:	25000 V
Sistem gerilimi:	90%
Belirlenen kütle aralığı:	100 -- 1500 Da
Lazer vuruşlarının sayısı:	100/spektrum
Lazer şiddeti:	2376
Çalışma modu:	Lineer
Ayrıştırma modu:	Gecikmeli
Polarite:	Pozitif
Matriks:	CHCA



Şekil 4.12 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu

Çalışma koşulları:

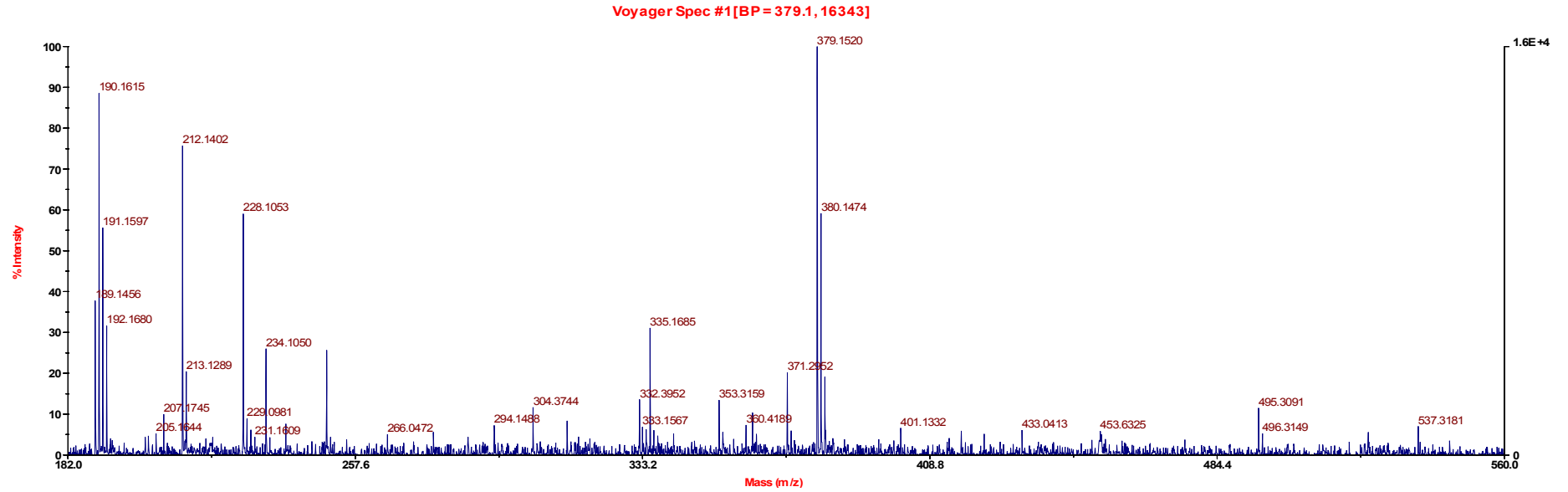
Çalışma modu:	Reflektör
Ayrıştırma modu:	Gecikmeli
Polarite:	Pozitif
Hızlandırma gerilimi:	20000 V
Sistem gerilimi:	63%
Ayrıştırma erteleme zamanı:	100 nsec
Belirlenen kütle aralığı:	50 -- 1500 Da
Lazer vuruşlarının sayısı:	100/spektrum
Lazer şiddeti:	2305
Matriks:	CHCA



Şekil 4.13 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu

Çalışma koşulları:

Çalışma modu:	Reflektör
Ayrıştırma modu:	Gecikmeli
Polarite:	Pozitif
Belirlenen kontrol:	Manüel
Hızlandırma gerilimi:	20000 V
Sistem gerilimi:	65%
Ayrıştırma erteleme zamanı:	100 nsec
Belirlenen kütle aralığı:	50 -- 1000 Da
Lazer vuruşlarının sayısı:	100/spektrum
Lazer şiddeti:	2305
Matriks:	CHCA



Şekil 4.14 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matrisi kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında elde edilen MALDI-TOF spektrumu

Çalışma koşulları:

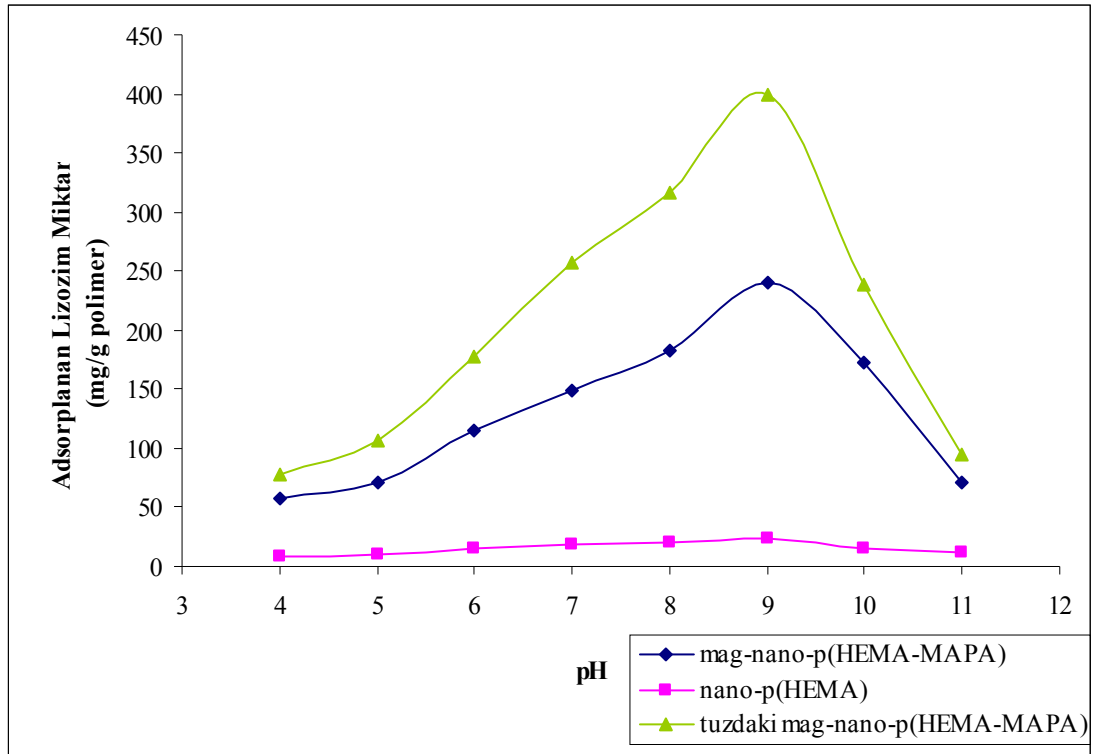
Çalışma modu:	Reflektör
Ayrıştırma modu:	Gecikmeli
Polarite:	Pozitif
Hızlandırma gerilimi:	20000 V
Sistem gerilimi:	65%
Ayrıştırma erteleme zamanı:	100 nsec
Belirlenen kütle aralığı:	50 -- 1500 Da
Lazer vuruşlarının sayısı:	100/spektrum
Lazer şiddeti:	2305
Matriks:	CHCA

4.3. MAG-NANO-p(HEMA-MAPA) POLİMERİNE LİZOZİM ADSORPSİYONU VE DESORPSİYONU KOŞULLARININ İNCELENMESİ

4.3.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi

Mag-p(HEMA-MAPA) nano yapılarına maksimum lizozim adsorpsiyonu pH 9,0 karbonat tamponunda gözlenmiştir. pH 9,0'dan daha yüksek ve düşük pH değerlerinde adsorpsiyon önemli oranda azalmıştır Lizozimin izoelektrik noktası 10,5 dir (Verhamme *et al.*, 1988). İzoelektrik noktada proteinler yüksüz olduklarından izoelektrik noktaya yakın pH'larda elektrostatik etkileşimler minimum, hidrofobik etkileşimler ise maksimumdur (Lienqueo *et al.*, 2007). pH 9,0'da maksimum adsorpsiyonun gözlenmesi sentezlenen polimere protein moleküllerinin bağlanmasında hidrofobik etkileşimlerin oranının yüksek olduğunu göstermektedir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde adsorpsiyonu etkileyen önemli bir faktör tuz derişimidir (Queiroz *et al.*, 2001). Maksimum adsorpsiyonun pH 9,0'da olduğu tespit edildikten sonra Bölüm 4.2.2.'de sonuçları verilen farklı tuzların etkileri incelenmiş ve bu incelemenin sonunda 1,0 M Na₂SO₄ ortamında adsorpsiyonun en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu tespitten sonra farklı pH'larda 1,0 Na₂SO₄ derişimde adsorpsiyon kapasitesi tekrar incelenmiştir. Şekil 4.15'de görüldüğü gibi tuz içermeyen ortamda pH 9,0'da adsorplanan lizozim miktarı 241 mg/g polimer iken 1,0 M'lık Na₂SO₄ tuzu ortamında bu değer 398 mg/g polimer olarak bulunmuştur. MAPA monomeri taşımayan poli(HEMA) nano yapılarına spesifik olmayan lizozim adsorpsiyonu pH 9,0 karbonat tamponunda oldukça düşük (24 mg/g polimer) bulunmuştur.

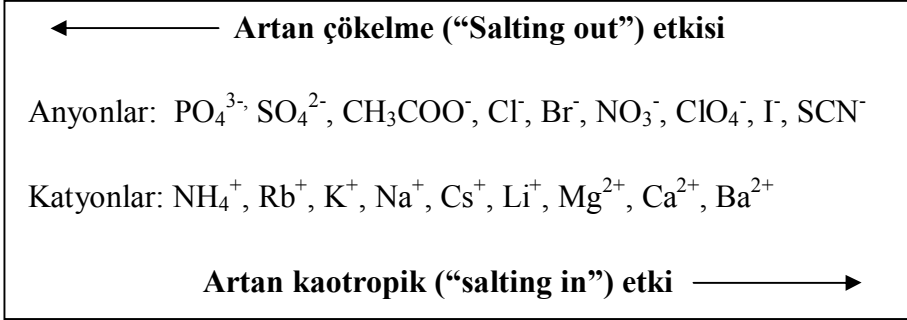


Şekil 4.15 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna pH ve tuzun etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

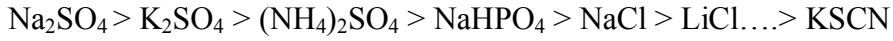
4.3.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Farklı Tuzların ve İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.16, mag-nano-p(HEMA-MAPA) partiküllerinin lizozim adsorpsiyonuna tuz derişimi ve çeşidinin etkisini göstermektedir. Hidrofobik adsorpsiyonda kullanılan tuz tipi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ile protein adsorpsiyonunun optimizasyonunda önemli bir parametredir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde farklı tuzların etkisi Hofmeister serisi ve suyun molal yüzey gerilimi üzerindeki etkileri ile incelenir ve aşağıdaki gibidir (<http://brf.jcs.anu.edu.au/services/chromatography/HIC%20Handbook.pdf>).

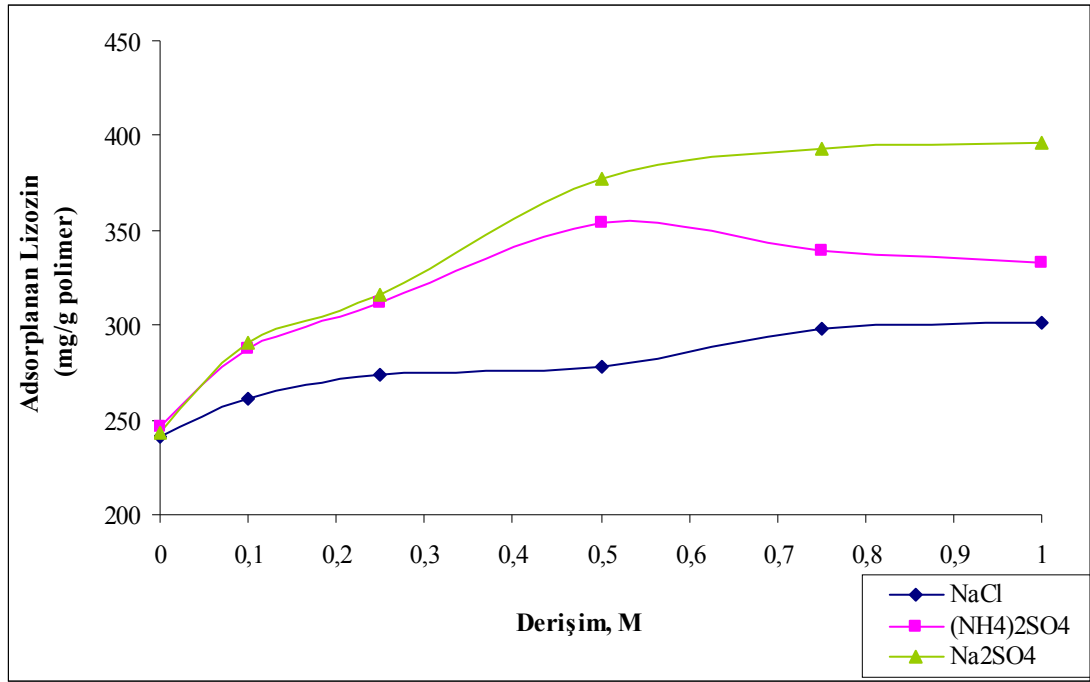
Proteinlerin çökmesinde bazı anyon ve katyonların Hofmeister serisi.



Suyun molal yüzey gerilimi üzerinde bazı tuzların bağıl etkileri aşağıdaki sırayı takip eder.



Her iki durumda sodyum, potasyum veya amonyum sülfatlar yüksek salting out etki ve molal yüzey gerilimi artışı gösterir. Bu durum bu tuzların, ligand ve protein arasındaki hidrofobik etkileşimleri artırmasını sağlar. Şekil 4.16’da görüldüğü üzere $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dışında diğer tuzların derişimi arttıkça adsorpsiyon kapasitesi artmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1,0 M’lık Na_2SO_4 tuzu derişiminde ve 398 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Rojas *et al.* (2006) tarafından hidrofobik bir destek olarak Streamline Phenyl reçinesi kullanılarak lizozim adsorpsiyonuna üç farklı tuzun (Na_2SO_4 , NH_4SO_4 , NaCl) etkisi incelenmiştir. Benzer olarak bu araştırmacılar en fazla lizozim adsorpsiyonunun 1,0 M Na_2SO_4 ’ın varlığında gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

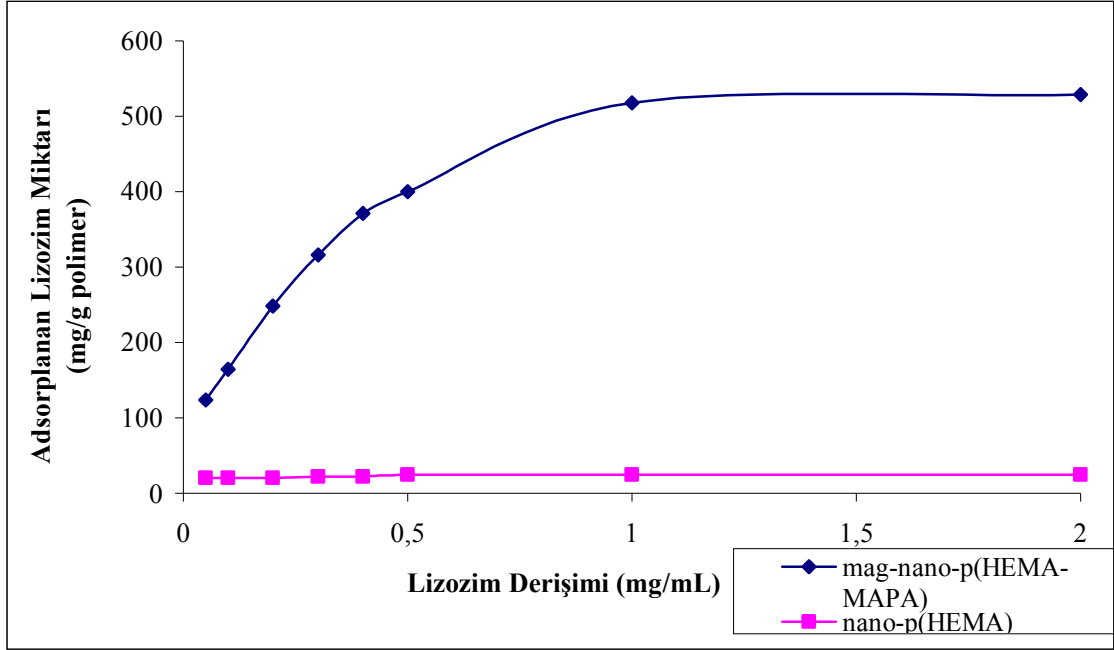


Şekil 4.16 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna farklı tuzların ve iyonik şiddetin etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C; pH: 9,0

4.3.3. Adsorpsiyona Lizozim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.17’de lizozim başlangıç derişiminin adsorpsiyona olan etkisi görülmektedir. Çözeltideki lizozim derişiminin artmasıyla gram nano partikül başına adsorplanan lizozim miktarı artmakta ve 1 mg/mL lizozim derişiminde doygunluğa ulaşmaktadır. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri için gözlenen eğrinin başlangıç doğrusal kısmı, MAPA grupları içeren mag-p(HEMA-MAPA) nano partikülleri ile lizozim arasındaki yüksek afiniteyi göstermektedir. 25 °C’de maksimum adsorpsiyon kapasitesi 517 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Öncel *et al.* (2005), 150-200 µm boyutlarında poli(HEMA-MAPA) polimerini kullanarak maksimum lizozim adsorpsiyonunu 114,3 mg/g olarak, Başar *et al.* (2007) Cibacron Blue F3GA taşıyan magnetik poli(HEMA) kürelerini kullanarak maksimum lizozim adsorpsiyonunu 342 mg/g olarak rapor etmişlerdir. Lu *et al.* (2007) Fe (III) immobilize kollajen fiber desteğini kullanarak maksimum lizozim adsorpsiyonunu 395 mg/g, Derazshamshir *et al.* (2008), Zn²⁺ şelatlanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerini kullanarak maksimum

lizozim adsorpsiyonunu 209 mg/g olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda nano-p(HEMA)'dan kaynaklanan non-spesifik adsorpsiyon değeri 24 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bu bağlanma nano-p(HEMA) polimerinin hidroksil grupları ile lizozim üzerindeki grupların zayıf etkileşimlerinden (van der Waals etkileşimi ve hidrojen bağı) kaynaklanabilir.

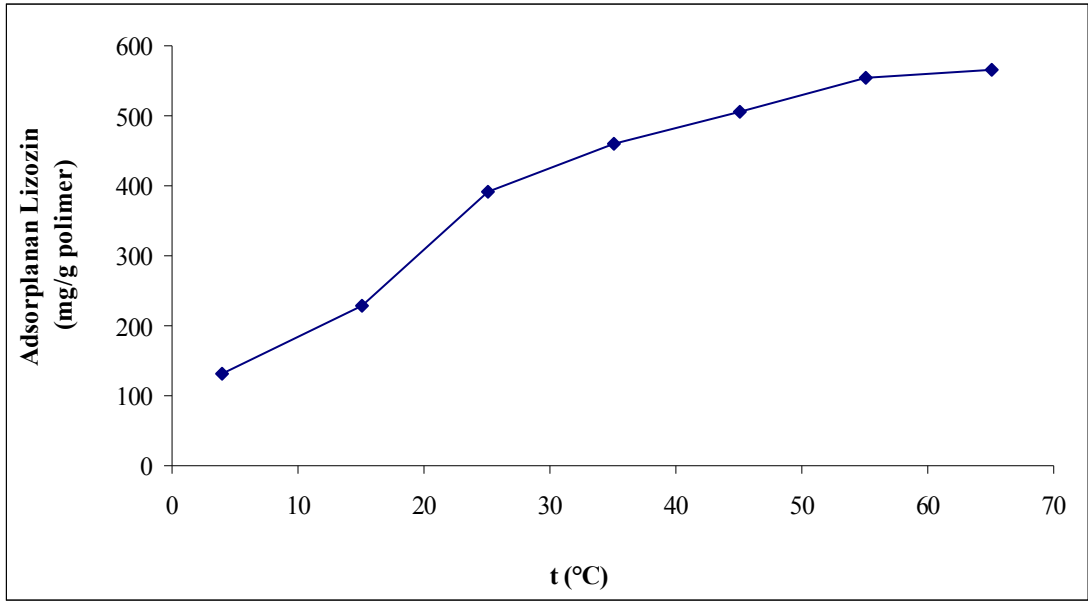


Şekil 4.17 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna lizozim derişiminin etkisi. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

4.3.4. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi sıcaklık artışına bağlı olarak gram polimer başına adsorplanan lizozim miktarında önemli bir artış olduğu görülmektedir. 25 °C'de adsorplanan lizozim miktarı 393 mg/g iken 65 °C'de bu değer 565 mg/g olarak bulunmuştur. Hjertan *et al.* (1974) tarafından hidrofobik etkileşim kromatografisinde, sıcaklık artışının protein alıkonmasını artırdığı ve sıcaklık azalmasının protein elüsyonunu teşvik ettiği rapor edilmiştir. Proteinler, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen açılma ile gömülmüş hidrofobik amino asit birimlerini yüzeye çıkarırlar (Arıca *et al.*, 2001). Böylece protein ve polimer matrisin hidrofobik grupları arasındaki temas alanı artar ve yüksek sıcaklıklarda hidrofobik etkileşimler teşvik edilir. Altıntaş *et al.*

(2007), hidrofobik bir destek olan mag-poli(GMA)-L-triptofan kürelerine lizozim adsorpsiyonunu gerçekleştirerek sıcaklığın adsorpsiyona olan etkisini incelemişlerdir. Sıcaklığa bağlı olarak adsorplanan lizozim miktarının önemli oranda arttığını gözlemlemişlerdir. Queiroz *et al.* (2001) ve Lienqueo *et al.* (2007) tarafından yayınlanan derleme makalelerinde de sıcaklığın HIC’de önemli bir parametre olduğu ve sıcaklık ile protein bağlanmasının arttığı rapor edilmiştir.



Şekil 4.18 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

4.3.5. Adsorpsiyon İzotermleri ve Kinetikleri

Langmuir modeli, eşit ulaşılabilir adsorpsiyon bölgeleri, tek tabakalı yüzey kaplama ve adsorplanan türler arasında etkileşim olmaması gibi homojenite varsayımı temeline dayanır (Mohann *et al.*, 2006). Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$q_{eq} = q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + b \cdot C_{eq}) \quad \text{Eşitlik 4.2}$$

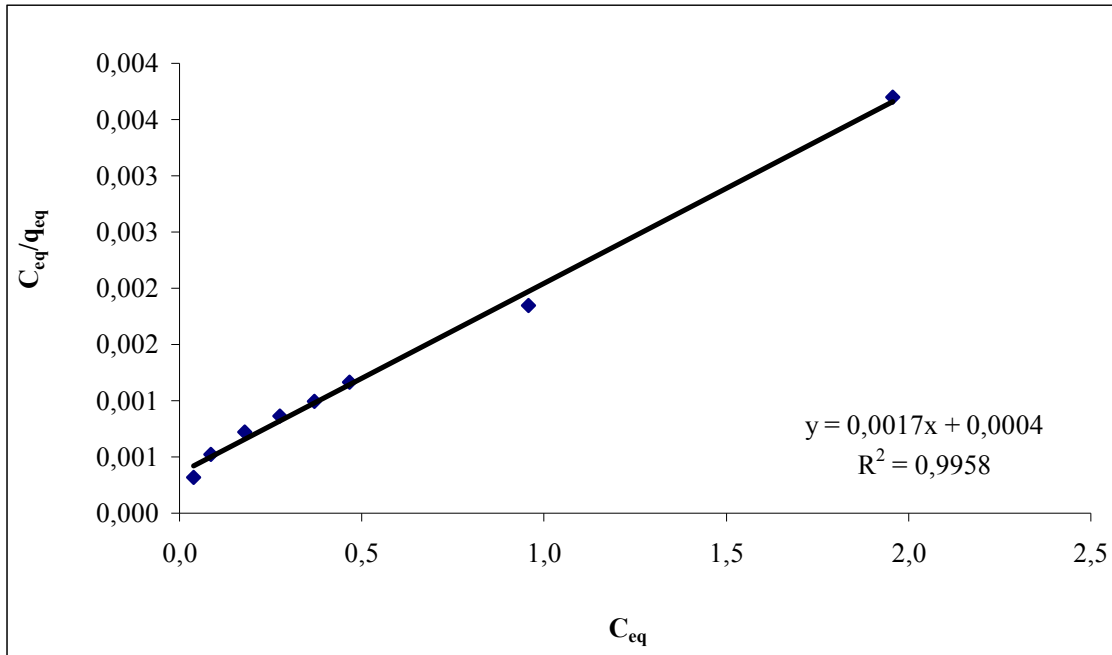
Burada q_{eq} , denge anında adsorbana bağlı lizozim derişimi (mg/g); C_{eq} , çözültideki denge lizozim derişimi (mg/mL); b , Langmuir sabiti (mL/mg, adsorpsiyonun serbest

enerjisi veya net entalpisi ile ilgili bir sabittir) ve q_{max} , maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g). Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir:

$$C_{eq}/q_{eq} = 1/q_{max} \cdot b + C_{eq}/q_{max} \quad \text{Eşitlik 4.3}$$

C_{eq} 'a karşı C_{eq}/q_{eq} grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun kesimi $1/q_{max} \cdot b$ 'yi, eğimi ise $1/q_{max}$ 'ı verir.

Şekil 4.19'da mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğim ve kesiminden maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi (q_{max}) 588 mg/g, Langmuir sabiti (b) 4,25 mL/mg olarak bulunmuştur.



Şekil 4.19 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

Freundlich izoterm modeli, genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanır. Adsorplanan maddenin miktarı, tüm bölgelerdeki adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izotermi geri dönüşümlü adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabakanın oluşumu ile sınırlandırılmaz (Proctor ve Toro-Vazquez, 1996).

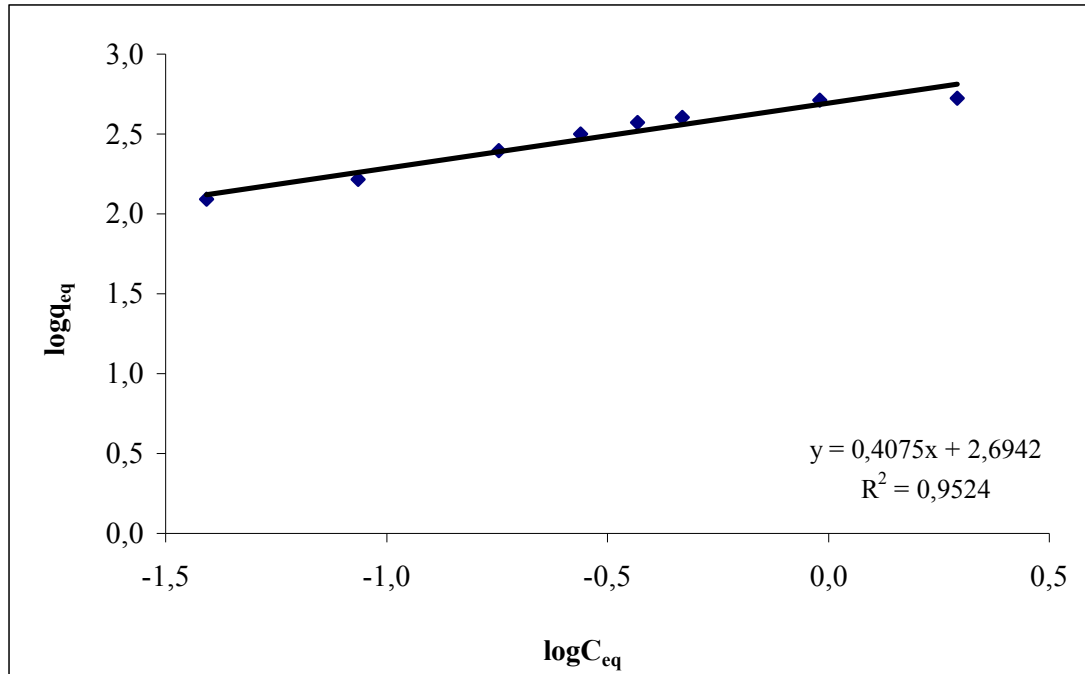
$$q_{eq} = K_f \cdot (C_{eq})^{1/n} \quad \text{Eşitlik 4.4}$$

Burada q_{eq} , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan lizozim miktarı (mg/g); C_{eq} , çözeltideki lizozimin denge derişimi (mg/mL); K_f , adsorbann bağıl adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g); $1/n$, adsorpsiyon şiddeti sabitidir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir:

$$\log q_{eq} = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{eq} \quad \text{Eşitlik 4.5}$$

$\log C_{eq}$ 'e karşı $\log q_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun eğimi $1/n$ 'i, kesimi $\log K_f$ 'yi verir.

Şekil 4.20'de mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermini görülmektedir. Grafiğin eğiminden $1/n$ değeri 0,4075, kesiminden ise K_f değeri 494,5 mg/g olarak bulunmuştur. $1/n$ değerinin 1'den küçük olması adsorpsiyonun istemliliğini göstermektedir.



Şekil 4.20 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermini. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

Şekil 4.19 ve 4.20'deki adsorpsiyon izotermi grafiklerinin korelasyon katsayıları (0,9958; 0,9524) karşılaştırıldığında deneysel verilerin Langmuir adsorpsiyon izotermine uygunluğu görülmektedir.

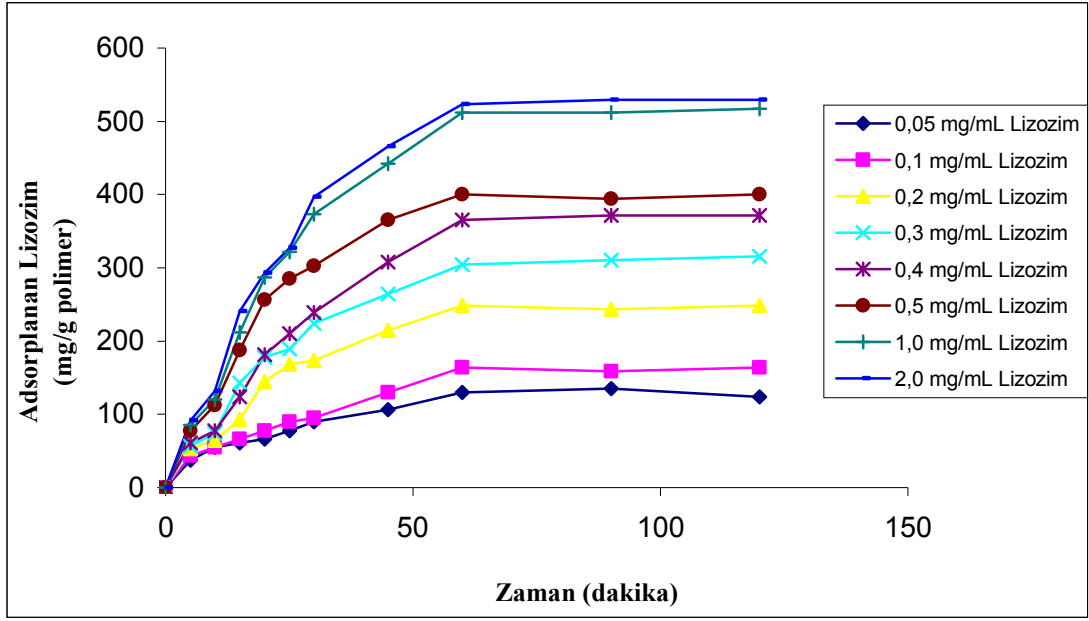
Adsorpsiyonun görünen Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG°), kendiliğinden gerçekleşmenin temel bir kriteridir. ΔG° değeri negatif ise verilen bir sıcaklıkta reaksiyon kendiliğinden yürür. Mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonunun standart Gibbs serbest enerji değişimi aşağıdaki termodinamik eşitlik kullanılarak hesaplanabilir (Al-Anber ve Al-Anber, 2008).

$$\Delta G^\circ = -R.T.\ln b$$

Eşitlik 4.6

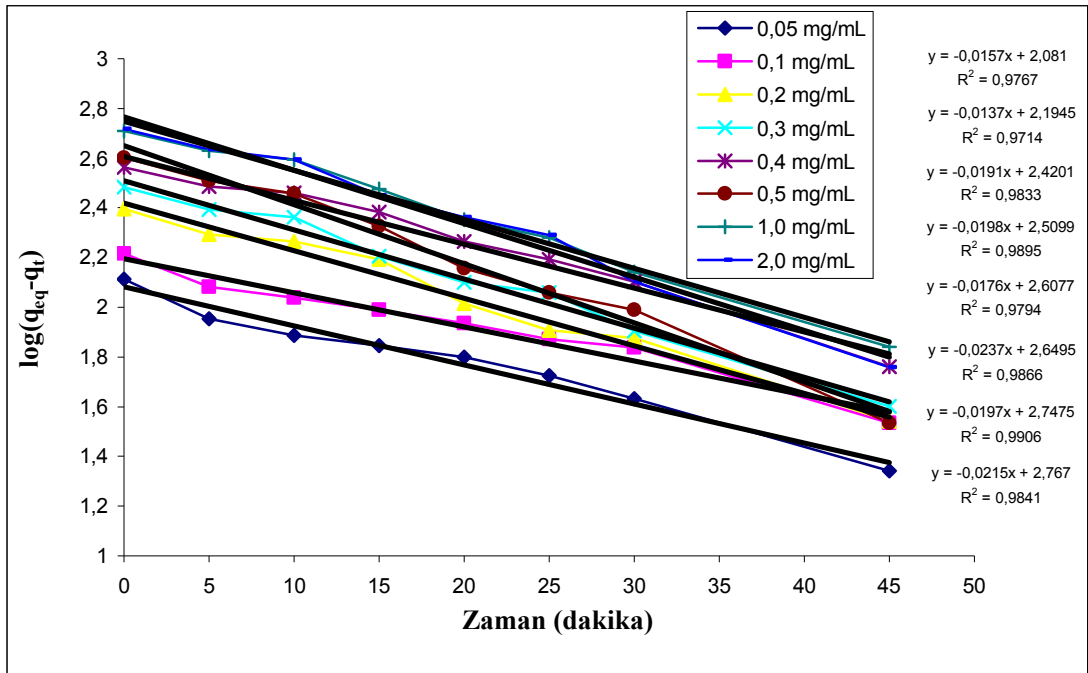
Burada T, mutlak sıcaklık ve R, gaz sabitidir (8,314 J/mol.K). 25 °C'de standart Gibbs serbest enerji değişimi değeri -3,59 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. ΔG° 'nin bu negatif değeri mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonunun istemli olduğunun göstergesidir.

Şekil 4.21, zamana bağlı olarak mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerinin lizozim adsorpsiyon kapasitesi üzerine lizozim derişiminin etkisini gösterir. Grafikten görüldüğü gibi adsorpsiyon kapasiteleri, zamana bağlı olarak artmış, 120. dakikanın sonunda doygunluğa ulaşmıştır.

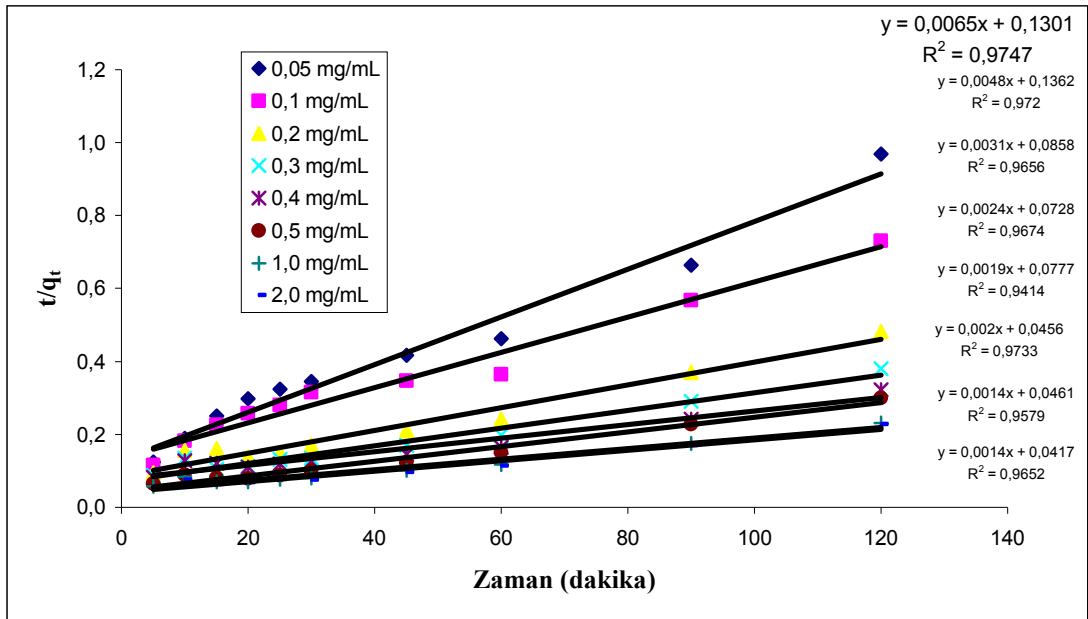


Şekil 4.21 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun zamana bağlı olarak farklı lizozim derişimlerinde incelenmesi. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

Şekil 4.22 ve 4.23’de mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonunun pseudo birinci ve ikinci dereceden kinetik grafikleri görülmektedir. Çizelge 4.1’de ise bu grafiklerden elde edilen hız sabitleri ile deneysel ve denge anındaki adsorplanan protein miktarları görülmektedir. Çizelge 4.1’e bakıldığında pseudo birinci dereceden kinetik için bulunan korelasyon katsayılarının, pseudo ikinci dereceden kinetik için bulunanlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca deneysel q_{eq} değerlerinin, pseudo birinci dereceden kinetik için bulunan q_{eq} değerlerine daha yakın bulunması mag-p(HEMA-MAPA) nano kürelerine lizozim adsorpsiyonunun pseudo birinci dereceden kinetiğe uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun birinci dereceden kinetiğinin incelenmesi. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄



Şekil 4.23 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetiğinin incelenmesi. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

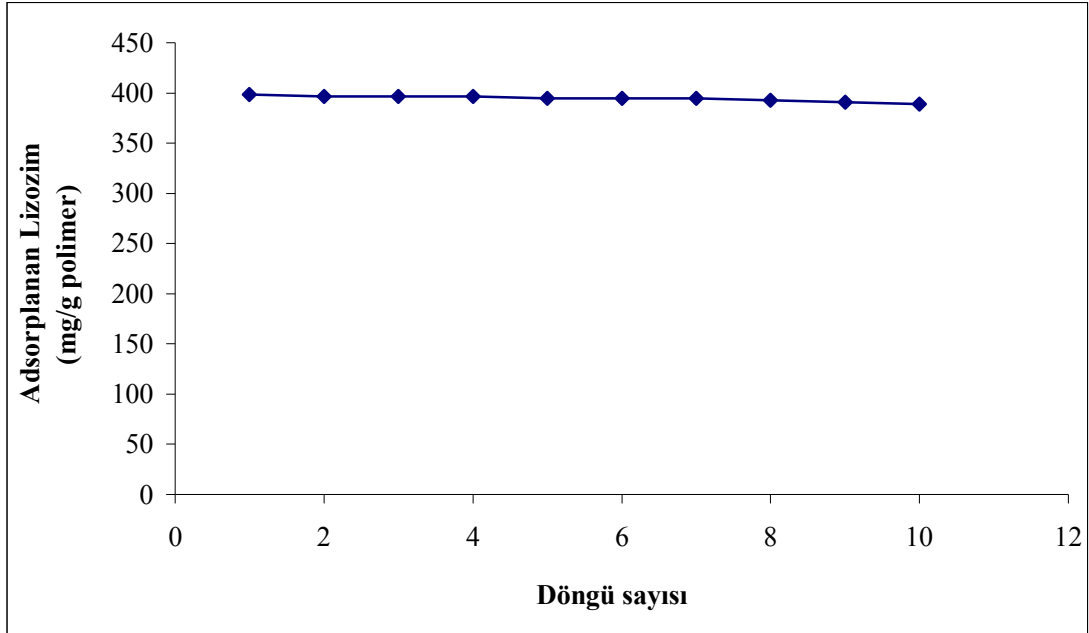
Çizelge 4.1 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonunun birinci ve ikinci dereceden kinetik sabitleri

Başlangıç lizozim derişimi (mg/mL)	Deneysel q_{eq} ex (mg/g)	Birinci dereceden kinetik			İkinci dereceden kinetik		
		k_1 (dk^{-1})	q_{eq} (mg/g)	R^2	k_2 ($\times 10^{-4}$ g/(mg.dk))	q_{eq} (mg/g)	R^2
0.05	130	0.036	120.5	0.9767	3.2	153.8	0.9747
0.1	164	0.032	156.5	0.9714	1.69	208.3	0.9720
0.2	249	0.044	263.1	0.9833	1.12	322.6	0.9656
0.3	304	0.046	323.5	0.9895	0.79	416.7	0.9674
0.4	366	0.041	405.2	0.9794	0.46	526.3	0.9414
0.5	400	0.055	446.0	0.9866	0.88	500.0	0.9733
1.0	512	0.045	559.0	0.9906	0.42	714.0	0.9579
2.0	523	0.050	584.8	0.9841	0.47	714.0	0.9652

4.3.6. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) Polimerinden Lizozimin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Bir destek materyalinin en önemli özelliklerinden biri defalarca kullanılabilmeye olanak vermesidir. Lizozim enziminin mag-p(HEMA-MAPA) nano yapılarına adsorpsiyonu ve desorpsiyonu işlemleri aynı nanoyapılar kullanılarak 10 döngü boyunca tekrar edilmiştir. Desorpsiyon oranı % 98 olarak bulunmuştur. Şekil 4.24'de görüldüğü gibi 10 döngü boyunca adsorplanan lizozim miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin yeniden kullanılabilmesi ve taze enzim ile yüklenmesi ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Ruckenstein ve Zeng (1997), lizozim adsorpsiyonu için makrogözenekli kitin membranlarını kullanmışlar ve 10 döngü boyunca gerçekleştirdikleri lizozim adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinde adsorpsiyon kapasitesinde bir değişiklik gözlemlememişlerdir. Altıntaş *et al.* (2007), mag-p(GMA)-L-triptofan kürelerini lizozim enziminin adsorpsiyonunda kullanmışlar ve 10 kez ardı ardına gerçekleştirilen adsorpsiyon-desorpsiyon işlemlerinde adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma olmadığını rapor etmişlerdir. Shen ve Cao (2007), termo-duyarlı

poliakrilamid türevli bir polimer sentezleyerek lizozim adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Beş adsorpsiyon-desorpsiyon işleminden sonra polimerin adsorpsiyon kapasitesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.24 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin lizozim adsorpsiyonu için tekrar kullanılabilirliği. İnkübasyon süresi: 2 saat; pH: 9,0; sıcaklık: 25 °C; tuz derişimi: 1,0 M Na₂SO₄

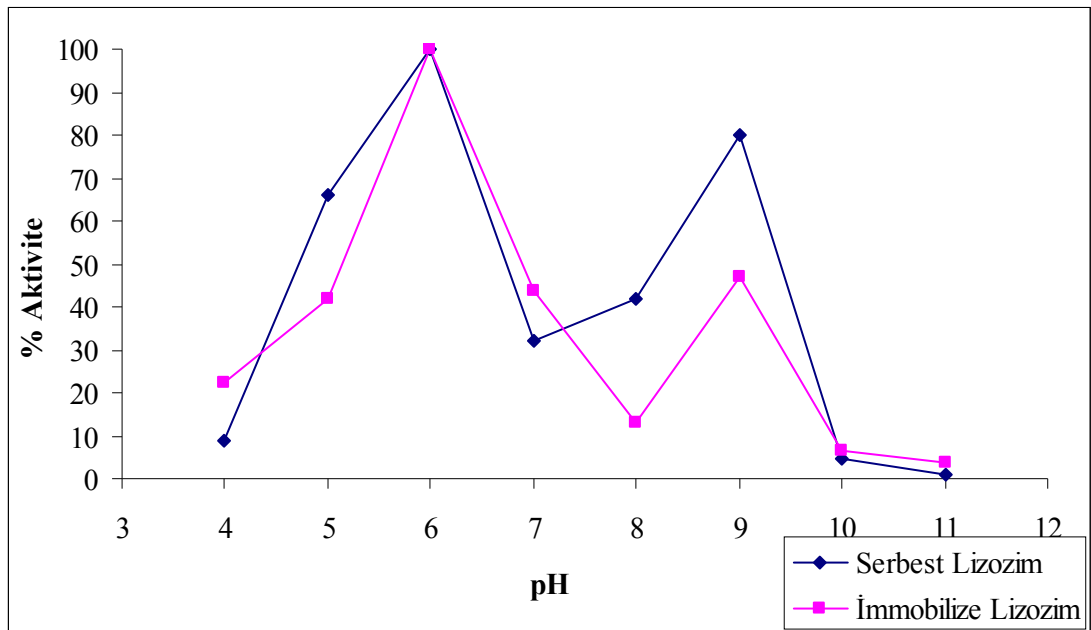
4.4. LIZOZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

4.4.1. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Pek çok enzimin katalitik aktivitesi, içinde bulunduğu çözeltinin pH'ına bağlıdır. Lizozim aktif bölgesinde iki adet karboksi grubu bulundurur. Kataliz reaksiyonunun kabul edilen mekanizmasına göre hücre duvarı polisakkariti, enzimin aktif bölgesindeki yarığa bağlanır. Aktif bölgedeki karboksi gruplarından bir tanesi polisakkarit yapıdaki glikozidik oksijene bir proton verir. Glikozidik oksijen okzonyum iyonu haline gelir ve şekeri iyi ayrılan grup haline getirir. Bu şeker, yapıdan ayrıldığında komşu şekerlerin bir tanesinin anomerik karbonu üzerinde karbokasyon oluşur. Ortamdaki su molekülü bu iyona saldırır ve yeni bir okzonyum

iyonu oluşur. Nötralliğin geri kazanılması için bir protonun uzaklaştırılması gerekir. Bu durumda ikinci protonu uzaklaşmış karboksi grubu baz olarak davranır. Aktif merkezdeki iki karboksi grubundan herhangi biri yanlış protonlanırsa istenilen fonksiyonu göstermeyecektir. Aktivite sırasındaki bu proton hareketi açıkça göstermektedir ki, ortamın pH'ı katalizlenen reaksiyonun hızı üzerine etki edecektir (www.linfield.edu/chem/C440/Lysozyme.pdf).

Lizozim enzimi geniş bir pH aralığında (6,0'dan 9,0'a kadar) aktivite gösterir. pH 6,2'de geniş bir iyonik şiddet aralığında (0,02'den 0,10 M'a kadar) maksimum aktivite gözlenirken, pH 9,2'deki aktivite daha dar bir iyonik şiddet aralığında (0,01'den 0,06 M'a kadar) gözlenir (Davies *et al.*, 1969). pH'ın serbest ve immobilize lizozim aktivitesi üzerine etkisi iyonik şiddetin 0,10 M olduğu ortamda incelenmiştir. Serbest ve immobilize lizozimin optimum pH'ları 6,0 olarak bulunmuştur. Bu iyonik şiddet ortamında pH 6,0'daki aktivitenin daha yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur (Şekil 4.25).

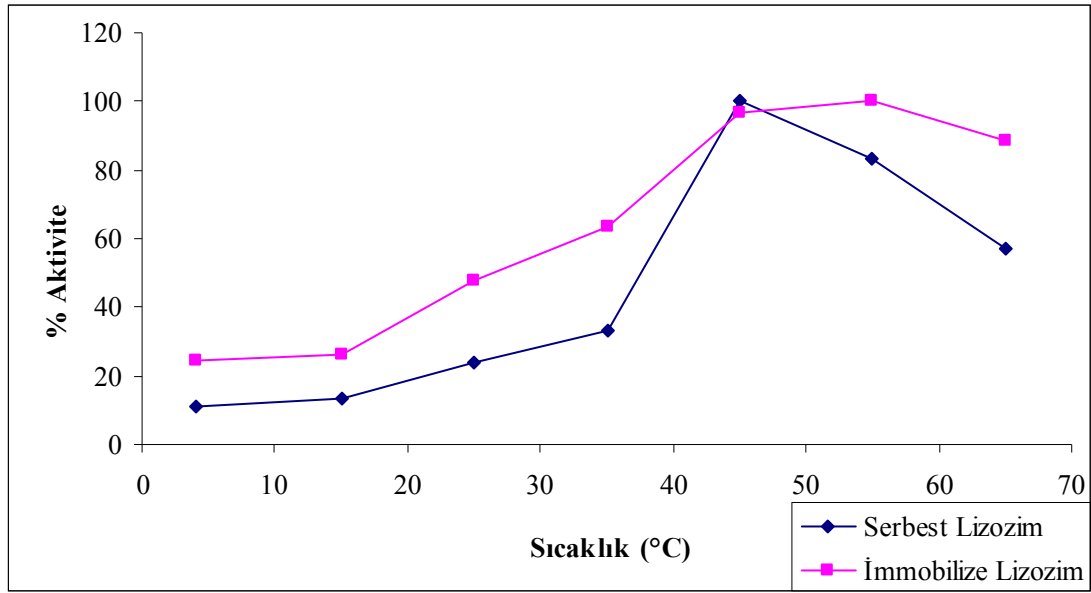


Şekil 4.25 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim aktivitesine pH'ın etkisi. İyonik şiddet: 0,10 M; sıcaklık: 25 °C

4.4.2. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Bir sistemin sıcaklığı bir anlamda sistemdeki moleküllerin kinetik enerjilerinin bir ölçüsüdür. Bu nedenle, sistemin sıcaklığının artması sistemin kinetik enerjisinin artması olarak algılanabilir. Kinetik enerjinin yükselmesi sistemde daha enerjik çarpışmalara, birim zamandaki çarpışma sayısının artmasına ve sistemdeki moleküllerin ısısının artmasına neden olur. Enzim aktivitesine sıcaklık etkisi belli bir sıcaklık artışına kadar, bahsedilen özelliklerin artması nedeni ile, aktivitenin yükselmesi şeklinde olur. Ancak, daha yüksek sıcaklıklarda ısının bir kısmı kimyasal potansiyel enerjiye dönüştüğünde ve bu kimyasal potansiyel enerji yeterli büyüklüğe eriştiğinde proteinlerin üç boyutlu yapısını bir arada tutan zayıf bağlar kırılabileceğinden enzim denatüre olur ve inaktif bir protein haline gelir. Bu nedenle, her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir optimum sıcaklık vardır.

Şekil 4.26'da serbest ve immobilize lizozimin 4 - 65 °C aralığında sıcaklığa karşı % aktivite grafikleri görülmektedir. Serbest lizozim için optimum sıcaklık 45 °C bulunurken, immobilize lizozim için bu değer 55 °C olarak bulunmuştur. İmmobilize lizozimin, serbest lizozime göre daha yüksek optimum sıcaklık sergilemesi enzim ve destek materyali arasındaki hidrofobik etkileşimlerin bir sonucu olarak enzim üzerindeki konformasyonel değişimlerin oluşmasıyla açıklanabilir. İlaveten immobilize lizozimin yüksek sıcaklık ile ortaya çıkan denatürasyona dayanıklılığı daha rijit yapıya sahip olmasından kaynaklanabilir (Chang ve Chu, 2007).

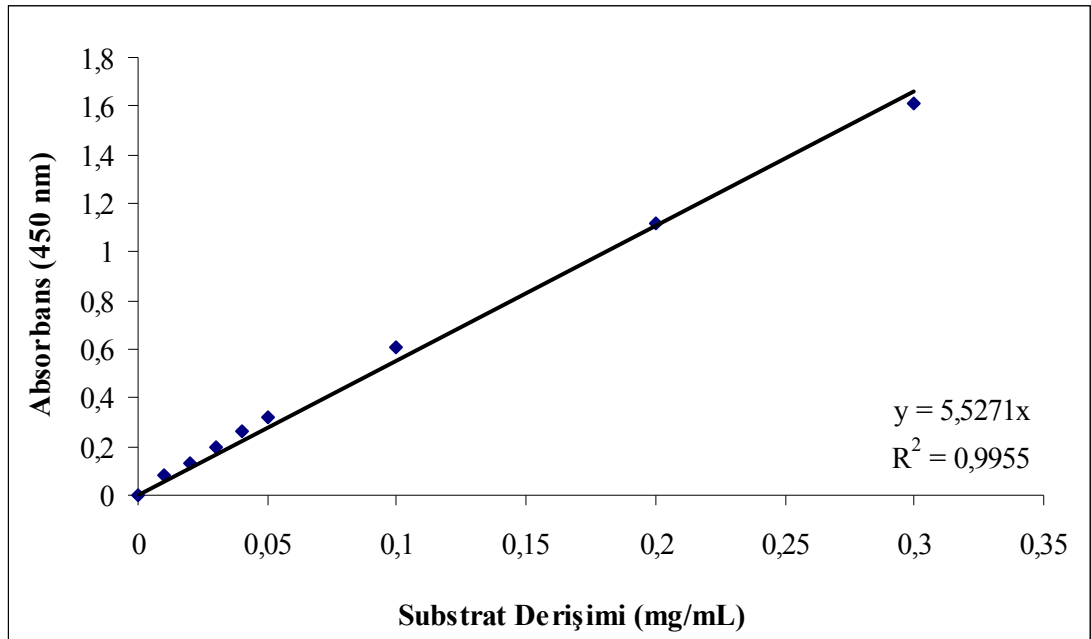


Şekil 4.26 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim aktivitesine sıcaklığın etkisi. pH: 9,0; iyonik şiddet: 0,1 M

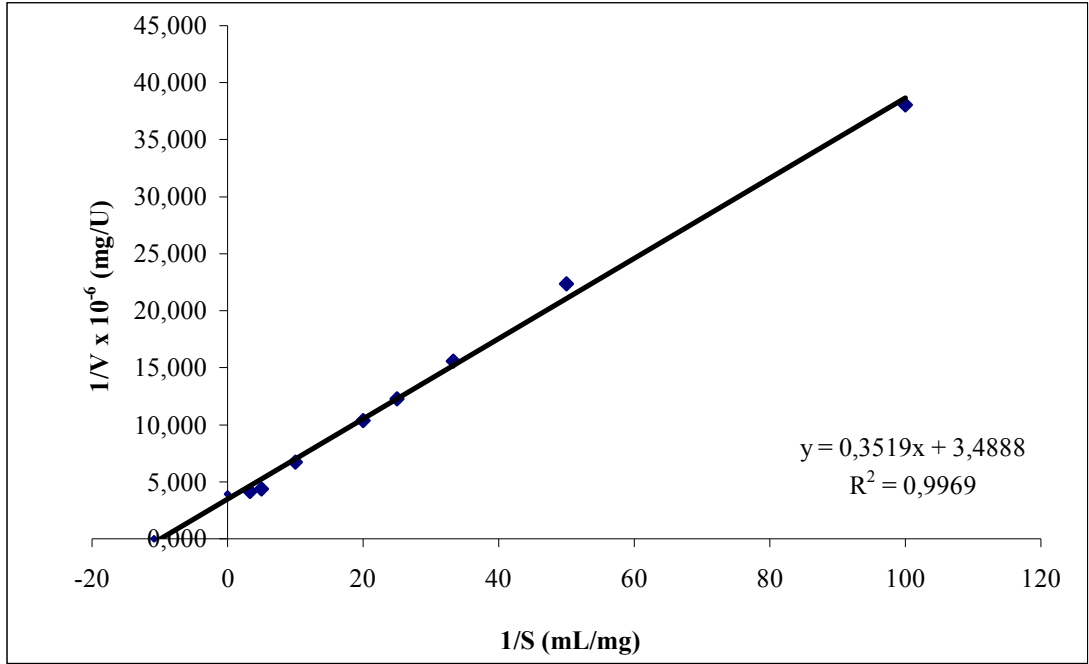
4.4.3. Serbest ve İmmobilize Lizozim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozimin kinetik sabitleri olan Michaelis sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) *M. lysodeikticus* substratı kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan lizozim enzimi aktivite tayin yöntemi oldukça duyarlı olup, gram pozitif bir organizma olan *M. lysodeikticus* süspansiyonunun türbiditesinin azalmasının görüntülenmesini içermektedir (Verhamme *et al.*, 1988). Şekil 4.27'de *M. lysodeikticus* substrat derişiminin (mg/mL) artmasıyla 450 nm'de absorbansın (bulanıklığın) arttığı görülmektedir. Şekil 4.28 ve 4.29'da serbest ve immobilize lizozim için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri, Çizelge 4.2'de ise bu grafikler kullanılarak tespit edilen kinetik sabitler görülmektedir. Serbest lizozim için bulunan V_{max} değeri (286 631,5 U/mg), immobilize lizozim için bulunan V_{max} değerinden (16 548,1 U/mg) daha yüksektir (yaklaşık 17 kat). V_{max} , enzimin tümü substratına doymuş olduğundaki olası en yüksek hızdır ve bu parametre immobilize enzimin gerçek özelliklerini yansıtır fakat difüzyonel sınırlamalardan etkilenebilir (Reshmi *et al.*, 2007). İmmobilize lizozimin K_m değeri (0,145 mg/mL), serbest lizozimin K_m değerinden (0,101 mg/mL) yaklaşık 1,5 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler, serbest enziminkilerle karşılaştırıldığında immobilize enzim ile substratı arasındaki

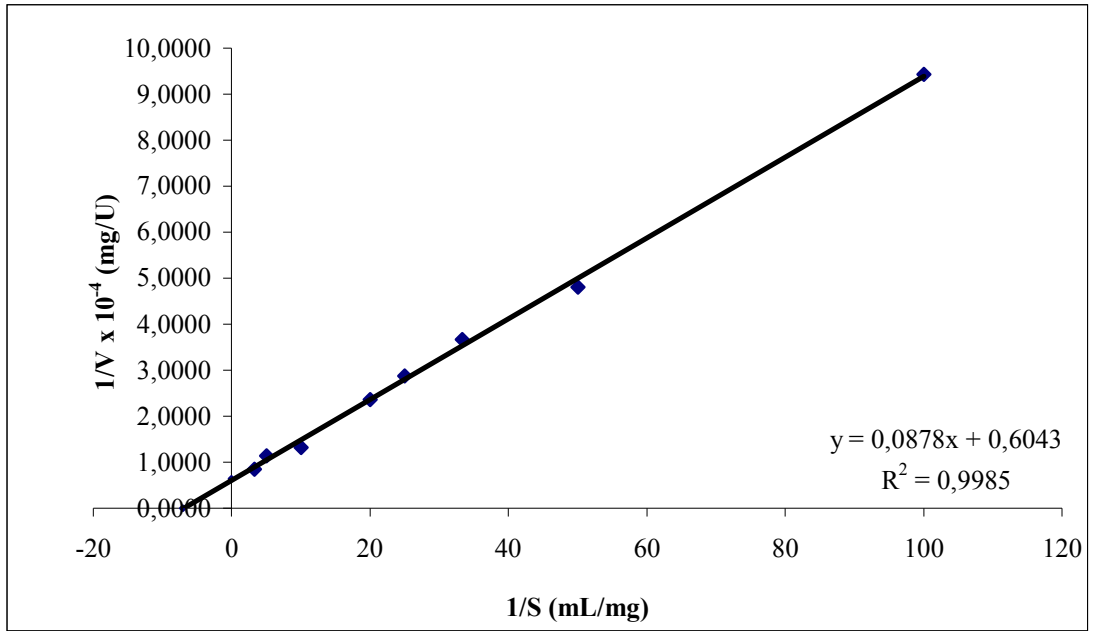
aktivitenin azaldığını göstermektedir. Bu durum difüzyon engelleri ve sterik etkilerden kaynaklanabilir (Arıca *et al.*, 2000). Diğer yandan afinitedeki bu değişiklik enzimin destek üzerine immobilizasyonu sonucunda substratın aktif bölgeye ulaşılabilirliğinin de azalmasından kaynaklanabilir (Palmieri *et al.*, 1993). Lizozim enziminin değişik özellikteki desteklere immobilizasyonunun gerçekleştirildiği çok sayıda çalışma olmakla beraber bu çalışmaların çoğunda serbest ve immobilize lizozimin kinetik parametreleri tespit edilmemiştir.



Şekil 4.27 *M. lysodeikticus* substratı derişimine karşılık absorbans grafiği



Şekil 4.28 Serbest lizozim için Lineweaver-Burk grafiği



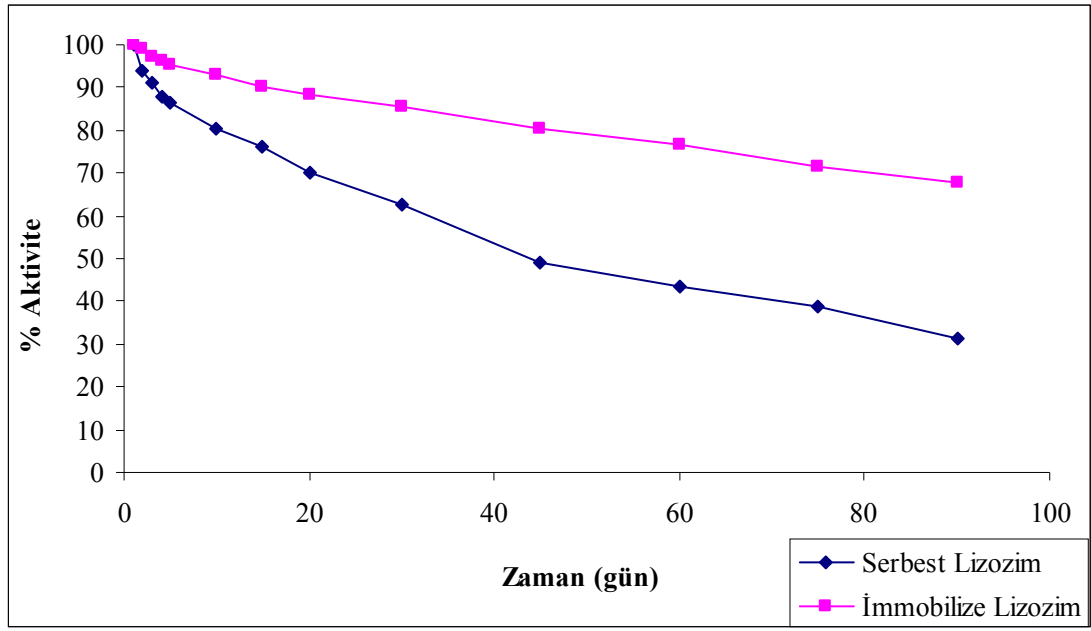
Şekil 4.29 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.2 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim için kinetik sabitler

Enzim Şekli	K_m	V_{max}
Serbest lizozim	0,101 mg/mL	286 631,5 U/mg
İmmobilize lizozim	0,145 mg/mL	16 548,1 U/mg

4.4.4. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Depo Kararlılığının İncelenmesi

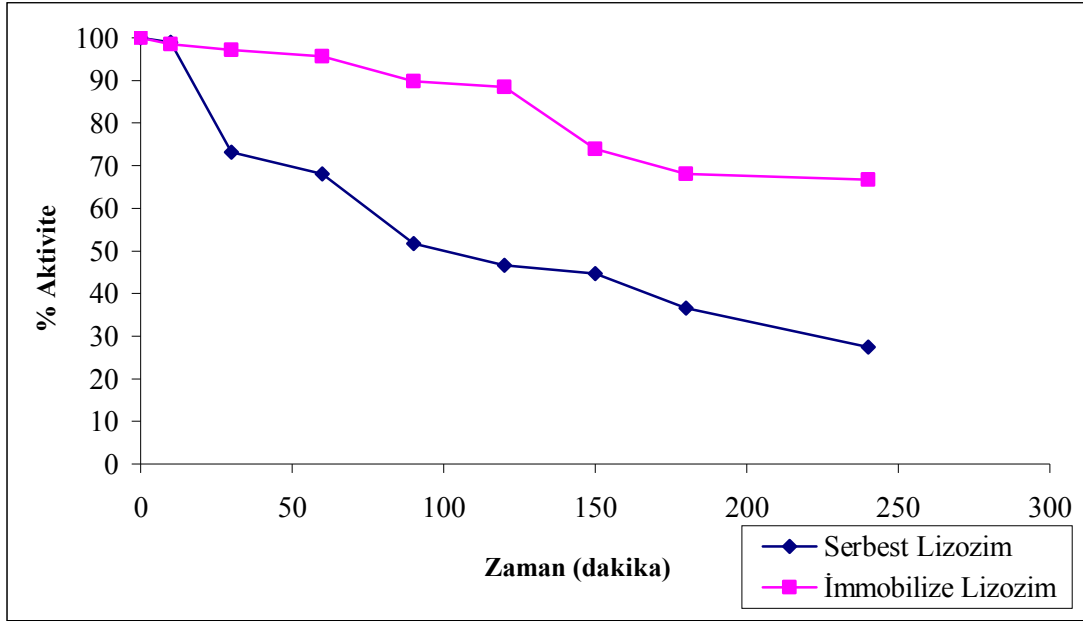
Serbest ve immobilize lizozimin 4 °C’de 90 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelendi. Bu zaman periyodunda enzimde herhangi bir sızma gözlenmedi. Serbest lizozim 90 günün sonunda aktivitesinin % 31’ini korurken, immobilize lizozim başlangıç aktivitesinin % 68’ini korumuştur (Şekil 4.30). Bir destek maddesine enzim immobilizasyonu genellikle bazı konformasyonel değişikliklerin oluşması ile enzimin serbestliğini sınırlar ve bu denatürasyona karşı artan stabiliteyle sonuçlanabilir (Hong *et al.*, 2008). Yapılan bir çalışmada hidroksipropil metilselüloz asetat süksinat polimerik desteğine lizozim enzimi immobilize edilerek 4 °C’de serbest ve immobilize lizozimin depo kararlılığı 30 gün boyunca incelenmiştir. 30 günün sonunda serbest enzimde aktivite gözlenmezken immobilize lizozimde yaklaşık % 50 aktivite gözlenmiştir (Chen *et al.*, 2003).



Şekil 4.30 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozimin depo kararlılığı. Sıcaklık 4 °C

4.4.5. Serbest ve İmmobilize Lizozimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize lizozimin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.31’de görülmektedir. 55 °C’de 240 dakika boyunca ısıyla muameleden sonra serbest lizozim başlangıç aktivitesinin % 27’sini korurken, immobilize lizozim % 67’sini korumuştur. Bu sonuçlar adsorplanan lizozimin, ısıya karşı serbest lizozimden daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Enzimlerin immobilizasyonla termal kararlılığının artması onların uygulama potansiyellerini genişletebilir. Chen *et al.* (2003), serbest lizozim enzimi ve hidroksipropil metil selüloz asetat süksinat polimerik desteğine immobilize ettikleri lizozim enzimini 50 dakika farklı sıcaklıklarla (50, 60, 70 °C) muamele ederek aktivitelerini incelemişlerdir. Serbest lizozim 50 °C’lik sıcaklık muamelesinden sonra başlangıç aktivitesinin % 80’inden fazlasını kaybetmiş, 60 °C’de ise tamamen inaktif hale gelmiştir. Diğer taraftan immobilize lizozim 50 dakika 70 °C’lik sıcaklık muamelesinden sonra başlangıç aktivitesinin neredeyse yarısını korumuştur.

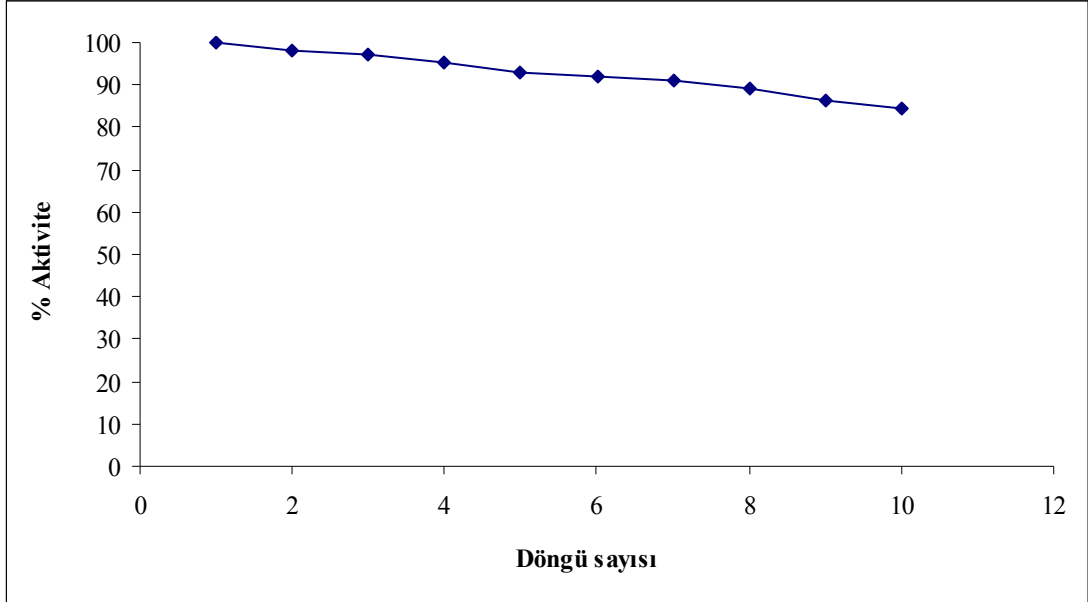


Şekil 4.31 Serbest ve mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim aktivitesinin 55 °C’de zamana bağlı olarak değişimi

4.4.6. İmmobilize Lizozimin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize enzim sistemlerinin işlemsel kararlılığı ekonomik yönden çok önemlidir ve kararlılığın korunması immobilize enzimleri serbest enzimlerden daha avantajlı kılar. İmmobilize lizozimin işlemsel kararlılığı, 25 °C’de ard arda aktivite ölçümleri yapılarak incelenmiştir. Şekil 4.32’de görüldüğü gibi immobilize lizozim 10 döngüden sonra aktivitesinin % 84’ünü korumuştur. Aktivitedeki bu hafif düşüş, kullanımlar sırasında meydana gelen lizozim inaktivasyonundan kaynaklanabilir. İmmobilize enzimlerin aktivitesinde önemli bir azalma olmadan gösterdiği işlemsel kararlılık, endüstriyel uygulamaların ekonomisi bakımından önemlidir. Bayramoğlu *et al.* (2002), p(HEMA-MAPA) membranlarına karbodiimid aktivasyonu ile lipaz enziminin kovalent immobilizasyonunu gerçekleştirerek immobilize lipazın işlemsel kararlılığını incelemişlerdir. Yirmi kullanımdan sonra bile immobilize lipazın başlangıç aktivitesinin % 63’ünü koruduğunu gözlemlemişlerdir. Tang *et al.* (2006), kitosan nanopartiküllerine immobilize ettiği proteinaz enziminin 9 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 88’ini koruduğunu rapor etmişlerdir. Tang *et al.* (2007), başka bir çalışmada kitosan nanopartiküllerine immobilize ettikleri lipazın 10

kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 60'ını koruduğunu gözlemlemişlerdir.



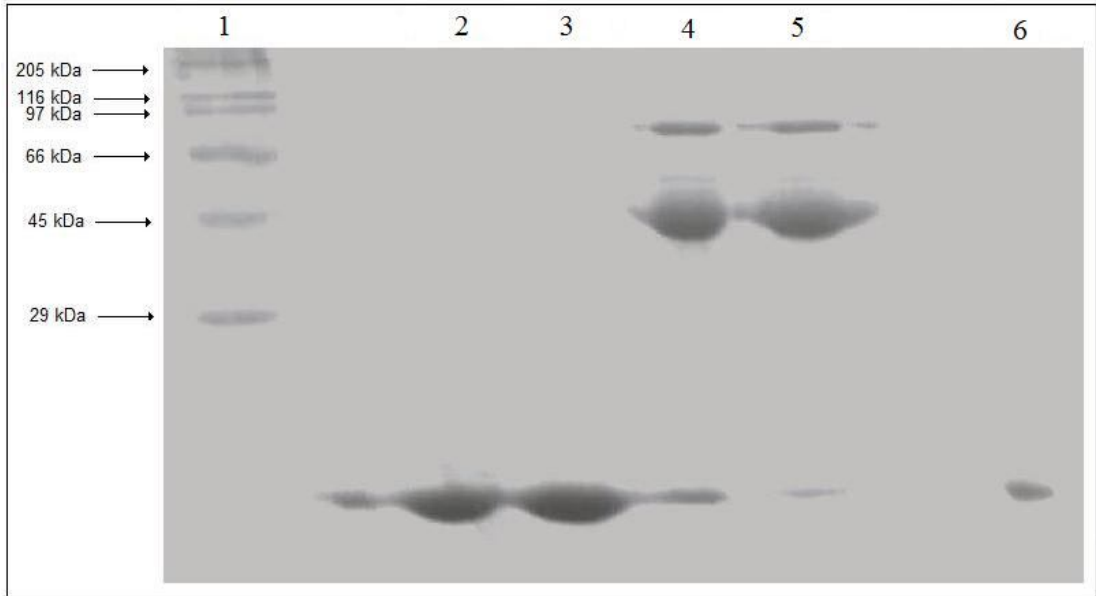
Şekil 4.32 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozimin işlemsel kararlılığı

4.5. YUMURTA AKINDAN LİZOZİM ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri kullanılarak lizozim immobilizasyonu parametrelerinin optimizasyonu sırasında ticari olarak satılan lizozim enzimi kullanılmıştır. Immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonundan sonra tespit edilen bu koşullarda polimerin bir biyokimyasal ortamdan lizozim enzimini ayırmak ve saflaştırmak için kullanılabilirliğini ölçmek üzere yumurta akından lizozim saflaştırılması deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için daha önce materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde yumurta akı lizozimi polimere immobilize edilmiş daha sonra da desorbe edilen enzimin saflığı ve miktarı araştırılmıştır.

4.5.1. SDS-PAGE Elektrofrez Sonucu

Polimerden desorbe edilen lizozim enziminin saflığı SDS-PAGE ile tayin edilmiştir. Şekil 4.33’de 1. sütunda protein standartları, 2 ve 3. sütunlarda ticari olarak satılan lizozim enzimi, 4 ve 5. sütunlarda yumurta akı proteinleri, 6. sütunda ise mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri ile yumurta akından saflaştırılan lizozim enzimi görülmektedir.



Şekil 4.33 Yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılmasına ilişkin SDS-PAGE analizi.

1: standartlar, 2 ve 3: ticari lizozim, 4 ve 5: yumurta akı, 6: saflaştırılmış lizozim

Yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılmasına ilişkin veriler Çizelge 4.3’de görülmektedir.

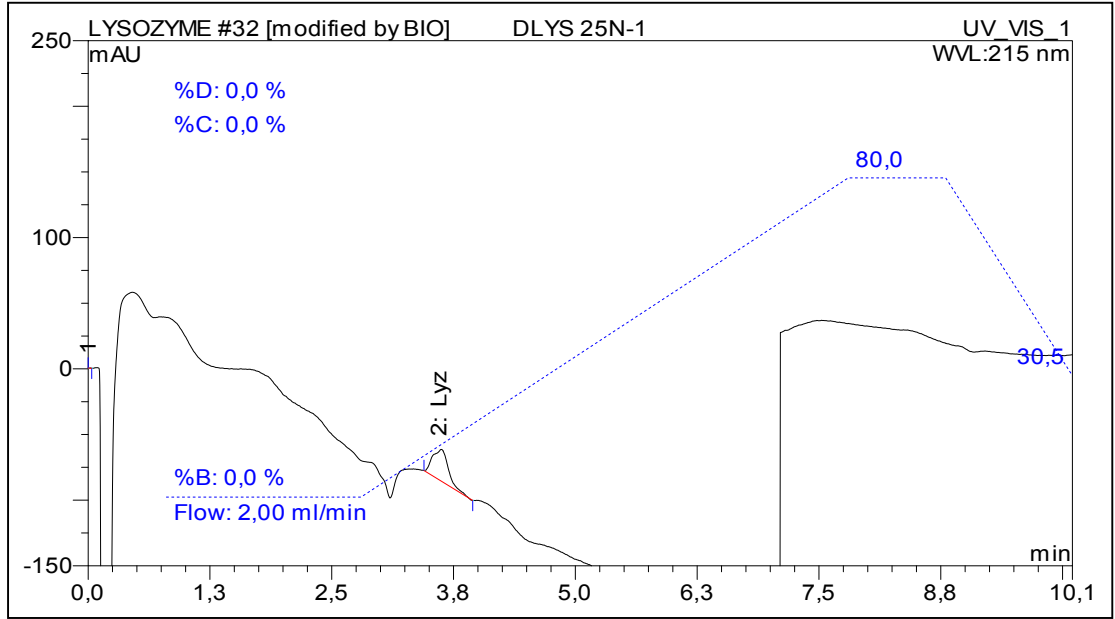
Çizelge 4.3 Yumurta akı lizozim enziminin mag-nano-p(HEMA-MAPA) ile saflaştırılması

Saflaştırma Adımı	Total Protein (mg)	Aktivite (Unite)	Total	Spesifik	% verim	Saflaştırma Katsayısı
			Aktivite (Unite)	Aktivite (Unite/mg)		
Yumurta akı	123,84	6300	25200	203,49	% 100	1
pH 4,5'de izoelektrik çöktürme sonrası	112,92	5760	23040	204,04	% 91,43	1
Mag-nano-p(HEMA-MAPA) ile saflaştırılan lizozim	0,148	4950	19800	133783,78	% 78,57	657

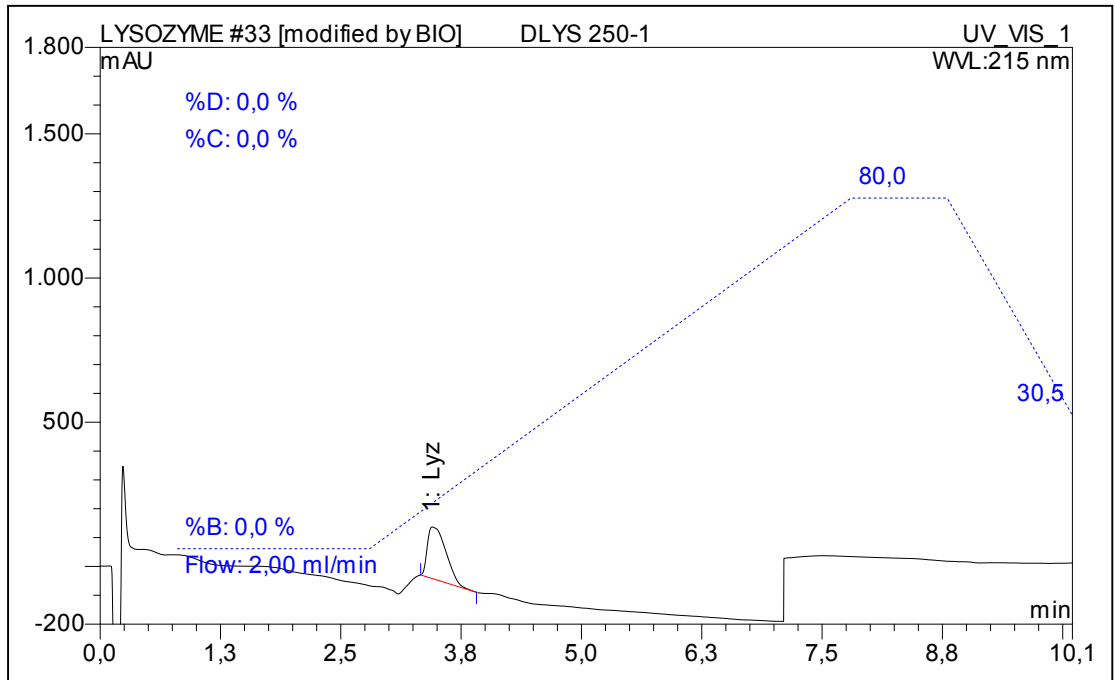
Çizelge 4.3'den görüldüğü üzere desorbe edilen enzimin 657 kat saflaştırıldığı aktivite geri kazanımının % 78,57 olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan lizozimin spesifik aktivitesi 133 783,78 U/mg olarak bulunmuştur. Piyasadan satın alınan serbest lizozimin spesifik aktivitesi ise 266 171,05 U/mg olarak hesaplanmıştır.

4.5.2. Bio-LC ile Lizozim Miktarı Tayini

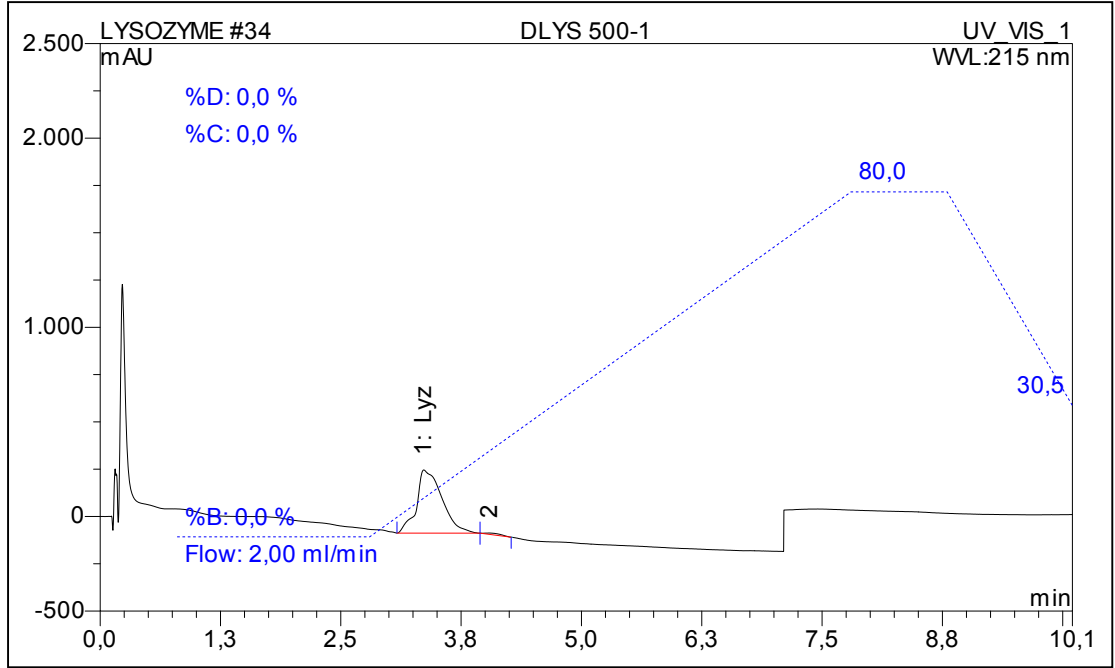
Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri ile yumurta akından saflaştırılan lizozim enzimin saflığı Bio-LC ile tayin edilmiştir. Şekil 4.34, 4.35, 4.36'da sırasıyla 25, 250 ve 500 ppm ticari lizozim içeren örneklerin kromatogramı, Şekil 4,37'de 250 ppm protein içeren yumurta akı örneğinin kromatogramı, Şekil 4.38'de mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri ile yumurta akından saflaştırılan lizozim örneğinin kromatogramı görülmektedir.



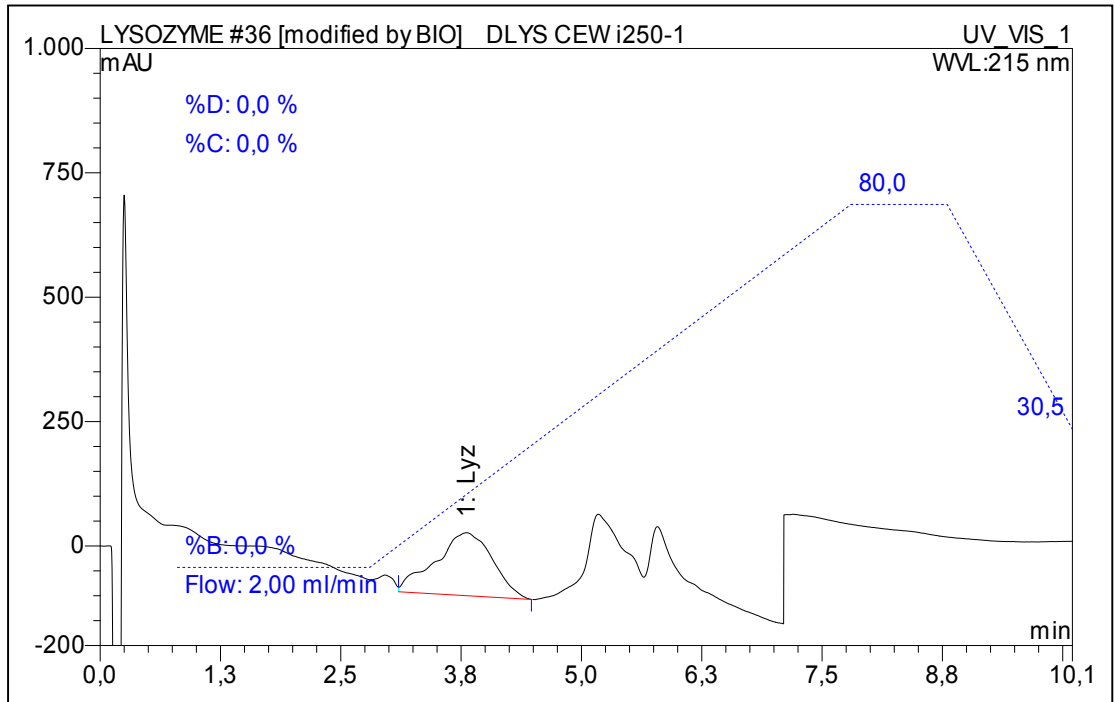
Şekil 4.34 25 ppm ticari lizozim içeren örneğin Bio-LC kromatogramı



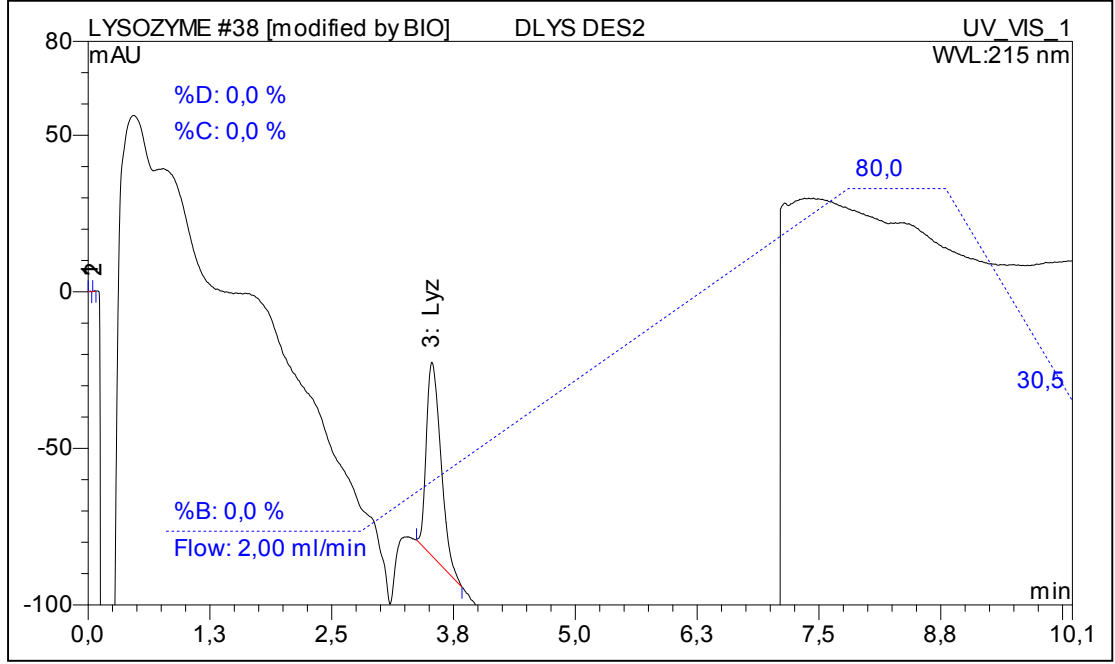
Şekil 4.35 250 ppm ticari lizozim içeren örneğin Bio-LC kromatogramı



Şekil 4.36 500 ppm ticari lizozim içeren örneğin Bio-LC kromatogramı



Şekil 4.37 250 ppm protein içeren yumurta akı örneğinin Bio-LC kromatogramı



Şekil 4.38 Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri ile yumurta akından saflaştırılan lizozim örneğinin Bio-LC kromatogramı

Kromatogramlara bakıldığında lizozim enziminin alıkonma süresi yaklaşık 3,8 dakikadır. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri ile yumurta akından saflaştırılan lizozim örneğindeki lizozim derişimi, ticari lizozim örnekleri ile elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarının integrasyonu ile hesaplanmıştır. Saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen lizozim enziminin saflığı % 96 olarak bulunmuştur.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu çalışmada lizozim enziminin immobilizasyonu ve saflaştırılması için yeni bir destek maddesi olarak mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir.
- Elde edilen partiküller oldukça küresel yapıda olup çapları 386 nm'dir. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinin spesifik yüzey alanı 580,0 m²/g'dır.
- FTIR ve MALDI-TOF ölçümleri ile MAPA monomerinin mag-nano-p(HEMA-MAPA)'ya inkorpore olduğu bulunmuştur.
- Sentezlenen polimerik yapıya MAPA monomerinin katılma miktarı elementel analiz ile değerlendirilerek 4,30x10⁻³ mmol/g olarak hesaplanmıştır.
- SEM, TEM ve AFM fotoğrafları ile sentezlenen partiküllerin küresel ve gözeneksiz yapıda olduğu gözlenmiştir.
- ESR ölçümleri ile polimerik yapının magnetik özellik kazandığı saptanmıştır. Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri için bulunan negatif zeta potansiyel değeri polimerin kararlı yapıda olduğunu göstermiştir.
- Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine lizozim adsorpsiyonu farklı pH çözeltilerinde (pH 4,0–5,0 asetat tamponu; 6,0–8,0 fosfat tamponu; 9,0–11,0 karbonat tamponu; 100 mM) incelenmiş ve maksimum lizozim adsorpsiyonunun pH 9,0 karbonat tamponunda gerçekleştiği bulunmuştur.
- Batch deneylerinde lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi farklı derişimlerdeki tuzlar [NaCl, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄] kullanılarak incelenmiş ve 1,0 M Na₂SO₄ derişiminde adsorpsiyonun maksimum olduğu saptanmıştır.
- Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine maksimum lizozim adsorpsiyonu 1,0 mg/mL lizozim derişimde ve 1,0 M Na₂SO₄ içeren ortamda 517 mg/g

polimer olarak bulunmuştur. Nano-p(HEMA)'ya non-spesifik lizozim adsorpsiyonu değeri oldukça düşüktür (24 mg/g polimer).

- Mag-nano-p(HEMA-MAPA) partiküllerinin lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4 - 65 °C aralığında incelenmiş ve sıcaklık artışı ile adsorplanan lizozim miktarının önemli miktarda arttığı bulunmuştur.
- Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine lizozim adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelendiğinde Langmuir adsorpsiyon izotermi bu afinite adsorpsiyon sistemine uygundur. Sentezlenen polimere lizozim adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon kinetikleri (pseudo birinci dereceden ve pseudo ikinci dereceden) araştırıldığında adsorpsiyonun pseudo birinci dereceden kinetik yaklaşıma uygunluğu görülmüştür.
- Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerinden lizozimin desorpsiyonu, desorpsiyon ajanı olarak % 50'lik etilen glikol kullanılarak araştırılmıştır. Desorpsiyon oranı % 98 olarak bulunmuş ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon adımından sonra adsorplanan lizozim miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.
- Gerçekleştirilen bu tez çalışması her ne kadar mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimeri kullanılarak lizozim enziminin saflaştırılması olarak sunulsa da lizozimin immobilize formda kullanılmasına olanak verdiği için endüstriyel işlemlerde ekonomik yönden oldukça önemlidir.
- Mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerine immobilize edilmiş lizozim enziminin aktivitesine pH'ın etkisi farklı pH değerlerinde (pH 4,0–5,0 asetat tamponu; 6,0–8,0 fosfat tamponu; 9,0–11,0 karbonat tamponu; 100 mM) ve 0,1 M iyonik şiddet ortamında incelenerek serbest ve immobilize lizozimin optimum pH'ı 6,0 olarak bulunmuştur.

- Serbest ve immobilize lizozimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 4-65 °C aralığında araştırılmıştır. Serbest lizozim için optimum sıcaklık 45 °C bulunurken, immobilize lizozim için 55 °C olarak bulunmuştur.
- Serbest ve immobilize lizozim aktivitesine substrat derişiminin etkisi incelenerek kinetik sabitler saptanmıştır. Serbest lizozim için bulunan V_{max} değeri (286 631,5 U/mg), immobilize lizozim için bulunan V_{max} değerinden (16 548,1 U/mg) yaklaşık 17 kat daha yüksektir. İmmobilize lizozimin K_m değeri (0,145 mg/mL), serbest lizozimin K_m değerinden (0,101 mg/mL) yaklaşık 1,5 kat daha yüksektir.
- Serbest ve immobilize lizozimin depo kararlılıkları 4 °C'de 90 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak değerlendirilmiştir. Serbest lizozim 90 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 31'ini korurken immobilize lizozim başlangıç aktivitesinin % 68'ini korumuştur.
- Serbest ve immobilize lizozimin ısı kararlılıkları 55 °C'de 240 dakika boyunca incelenmiş ve serbest lizozim 240 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin % 27'sini korurken immobilize lizozim başlangıç aktivitesinin % 67'sini korumuştur.
- İmmobilize lizozimin işlemsel kararlılığı 10 döngü boyunca aktivite ölçümleri ile incelenmiştir. İmmobilize lizozim 10 döngüden sonra başlangıç aktivitesinin % 16'sını yitirmiştir.
- Sentezlenen polimer yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Saflaştırma işlemleri sonunda lizozim enziminin aktivite geri kazanımı % 78,57 ve saflaştırma katsayısı 657 olarak bulunmuştur. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile görüntülenmiş, saflık oranı Bio-LC ile % 96 olarak bulunmuştur.

Bilindiği üzere enzimler kimya, ilaç ve gıda endüstrilerinde biyokatalizör olarak, klinik ve kimyasal analizlerde ise spesifik ligandlar olarak kullanılırlar. Bir enzimin

yüksek saflıkta elde edilmesi onun potansiyel uygulama alanlarını genişletmektedir. Bu tezde yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılması için magnetik özellikte ve nano boyutta bir destek materyali sentezlenmiştir. Nano boyutta sentezlenen bu destek materyali, birim kütlesi başına sunduğu geniş yüzey alanı nedeni ile önemli miktarda lizozim bağlanmasını ve lizozim enziminin yüksek saflıkta elde edilmesini sağlamıştır. Sentezlenen polimerin magnetik özellikte olması ise bu polimere farklı alanlarda kullanılabilme potansiyellerini sunmuştur. Yapılan bu çalışma materyal boyutlarının küçültülmesi ilkesine dayanan nanoteknolojik uygulamalara bir örnektir. Sunulan bu tez çalışması literatüre önemli katkılar sağlayacak ve farklı uygulama alanlarına zemin oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Al-Anber, M. and Al-Anber, Z. A. 2008. Utilization of natural zeolite as ion-exchange and sorbent material in the removal of iron. **Desalination**, 225: 70-81.
- Altıntaş, E.B., Tüzmen, N., Candan, N. and Denizli, A. 2007. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B**, 853: 105-113.
- Appendini, P. and Hotchkiss, J.H. 1997. Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. **Packaging Technology and Science**, 10: 271-279.
- Arat, Ö. 2007. *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, pp. 41, Aydın.
- Arıca, M.Y. and Bayramoğlu, G. 2005. Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilized composite membranes. **Process Biochemistry**, 40: 1433-1442.
- Arıca, M.Y., Akın-Öktem, G. and Denizli, A. 2001. Novel hydrophobic ligand-containing hydrogel membrane matrix: preparation and application to γ -globulins adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 21: 273-283.
- Arıca, M.Y., Şenel, S., Alaeddinoğlu, N.G., Patır, S. and Denizli, A. 2000. Invertase immobilized on spacer-arm attached poly(hydroxyethyl methacrylate) membrane preparation and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, 75: 1685-1692.
- Bahar, T. and Çelebi, S.S. 2000. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR). **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 28-33.

- Baker, A.S., Jimenez, T., Dong, Z., Ruth, P. and Islam, M.R. 2007. Purification of lysozyme from hen eggs using sand. **European Journal of Scientific Research**, 16(3): 358-366.
- Bangs, L.B. 1984. Uniform latex particles. Seradyn Inc., P.O. Box 1210, IN, USA
- Başar, N., Uzun, L., Güner, A. and Denizli, A. 2007. Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. **International Journal of Biological Macromolecules**, 41: 234-242.
- Bayramoğlu, G., Ekici, G., Beşirli, N. and Arıca, M.Y. 2007. Preparation of ion-exchange beads based on poly(methacrylic acid) brush grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. . **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 310: 68-77.
- Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A. and Arıca, M.Y. 2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. **Journal of Food Engineering**, 52: 367-374.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-251.
- Braun, D., Cherdron, H., Rehahn, M., Ritter, H. and Voit, B., 2005. Polymer synthesis: Theory and Practice. Fundamentals, methods, experiments. Springer, Germany.
- Brena, B.M. and Batista-Viera, F. 2006. Immobilization of enzymes. In: Immobilization of enzymes and cells. Guisan, J.M. (eds). Humana Pres Inc., pp. 15-30, Totowa, New Jersey.
- Burns, M.A. and Graves, D.J. 1988. Structural studies of a liquid fluidized magnetically stabilized bed. **Chemical Engineering Communication**, 67: 315-330.

- Cao, L. 2005. Carrier-bound immobilized enzymes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Cartei, F., Cartei, G., Ceshia, V., Pacor, S. and Sava, G. 1991. Hematologic effects of oral treatment with lysozyme chloride-A phase II study. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, 50: 530-538.
- Cartei, F., Cartei, G., Ceshia, V., Pacor, S. and Sava, G. 1992. Recovery of lymphocyte CD4⁺-CD8⁺ ratio in patients treated with lysozyme. **Drug Investigation**, 4: 51-57.
- Chang, Y.K. and Chu, L. 2007. A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. **Biochemical Engineering Journal**, 35: 37-47.
- Chen, S.H., Yen, Y.H., Wang, C.L. and Wang, S.L. 2003. Reversible immobilization of lysozyme via coupling to reversibly soluble polymer. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 643-649.
- Chiu, H.C., Lin, C.W. and Suen, S.Y. 2007. Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. **Journal of Membrane Science**, 290: 259-266.
- Cocker, T.M., Fee, C.J. and Evans, R.A. 1997. Preparation of magnetically susceptible polyacrylamide/magnetite beads for use in magnetically stabilized fluidized bed chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, 53: 79-87.
- Conte, A., Buonocore, G.G., Sinigaglia, M. and Nobile, M.A.D. 2007. Development of immobilized lysozyme based active film. **Journal of Food Engineering**, 78: 741-745.
- Das, S., Banerjee, S. and Dasgupta, J. 1992. Experimental evaluation of preventive and therapeutic potentials of lysozyme. **Chemotherapy**, 38: 350-357.

- Davies, R. C., Neuberger, A. and Wilson, B. M. 1969. The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta**, 178: 294-305.
- Deng, Q.Y., Zhou, C.R. and Luo, B.H. 2006. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. **Pharmaceutical Biology**, 44(5) 336-342.
- Derazshamshir, A., Ergün, B., Peşint, G. and Odabaşı, M. 2008. Preparation of Zn²⁺-chelated poly(HEMA-MAH) cryogel for affinity purification of chicken egg lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**, 109: 2905-2913.
- Ding, H.M., Shao, L., Liu, R.J., Xiao, Q.G. and Chen, J.F. 2005. Silica nanotubes for lysozyme immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, 290: 102-106.
- Dunnill, P. and Lilly, M.D. 1974. Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. **Biotechnology and Bioengineering**, 16: 987-990.
- Feynman, R. 1959. There's plenty of room at the bottom [<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>], Erişim tarihi: 10/02/2006.
- Feynman, R. 1959. There's plenty of room at the bottom. **The Vega Science Trust**. The American Physical Society at CalTech, California.
- Fuentes, M., Mateo, C., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R. 2005. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. **Biosensors and Bioelectronics**, 20: 1380-1387.
- Ghosh, R. 2003. Purification of lysozyme by microporous PVDF membrane-based chromatographic process. **Biochemical Engineering Journal**, 14: 109-116.
- Ghosh, R. and Cui, Z.F. 2000. Purification of lysozyme using ultrafiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, 68(2): 191-203.

- Ghosh, R., Sudarshana, S. and Cui, Z. 2000. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, 6: 19-24.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. and Mulligan, C.N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 50: 213-224.
- Gong, B., Zhu, J., Li, L., Qiang, K. and Ren, L. 2006. Synthesis of non-porous poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads and their application in separation of biopolymers. **Talanta**, 68: 666-672.
- Halling, P.J. and Dunnill, P. 1980. Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents. **Enzyme and Microbial Technology**, 2: 2-11.
- Hjertén, S., Rosengren, J. and Pahlman, S. 1974. Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives agarose. **Journal of Chromatography**, 101: 281-288.
- Hjerten, S., Yao, K., Eriksson, K.O. and Johansson, B. 1986. Gradient and isocratic high-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on agarose columns. **Journal of Chromatography**, 359: 99-109.
- Ho, Y.S. 1995. Adsorption of heavy metals from waste streams by natural materials, PhD thesis. The University of Birmingham, UK.
- Ho, Y.S., McKay, G., Wase, D.A.J. and Foster, C.F. 2000. Study of the sorption of divalent metal ions on to peat. **Adsorption Science and Technology**, 18: 639-650.
- Hong, J., Xu, D., Gong, P., Yu, J., Ma, H. And Yao, S. 2008. Covalent-bonded immobilization of enzyme on hydrophilic polymer covering magnetic nanogels. **Microporous and Mesoporous Materials**, 109: 470-477.

Hsieh, C.H., Lo, S.L., Kuan, W.H. and Chen, C.L. 2006. Adsorption of copper ions into microwave stabilized heavy metal sludge. **Journal of Hazardous Materials B**, 136: 338-344.

<http://brf.jcs.anu.edu.au/services/chromatography/HIC%20Handbook.pdf>, Erişim Tarihi: 20/06/2008.

http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_nanotechnology_applications, Erişim Tarihi: 20/06/2008.

http://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential, Erişim tarihi: 25.06.2008.

<http://www.bv229.k12.ks.us/biophilia/lysozyme.htm>, Erişim Tarihi: 26/06/2008.

<http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>, Erişim tarihi: 10/02/2006.

Islam, R., Kite, J., Baker, A.S., Ching, A. and Islam M.R. 2006. Affinity purification of hen egg lysozyme using Sephadex G75. **African Journal of Biotechnology**, 5(20): 1902-1908.

Karakışla, M., Bayramoğlu, G. and Arica, M.Y. 2008. Preparation of methacrylamide grafted and dye-ligand immobilized PET fibers: studies of adsorption and purification of lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**, 108: 3313-3323.

Katz, H. and Sears, T. 1969. Electric field phenomena in fluidized and fixed beds. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 47: 50-53.

Kenedy, J.F., Melo, E.H.M. and Jumel, K. 1990. Immobilized enzymes and cells. **Chemical Engineering Progress**, 7: 81-89.

Kim, J., Grate, J.W. and Wang, P. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, 61: 1017-1026.

- Kim, J.W. and Yoe, S.M. 2003. Purification of lysozyme from hemolymph of tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **Korean Journal of Entomology**, 33(4): 287-291.
- Kopacek, P., Vogt, R., Jindrak, L., Weise, C. and Safarik, I. 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29: 989-997.
- Kumar, A. and Gupta, R.K. 2003. Fundamentals of polymer engineering. Marcel Dekker Inc., USA.
- Kumar, M.N.V.R. and Lehr, U.B.C.M. 2004. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. **Biomaterials**, 25: 1771-1777.
- Kurimoto, A., Tanabe, T., Tachibana, A. and Yamauchi, K. 2003. Keratin sponge: immobilization of lysozyme. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96(3): 307-309.
- Kuroiwa, T., Noguchi, Y., Nakajima, M., Sato, S., Mukataka, S. and Ichikawa, S. 2008. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylase-coated magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry**, 43: 62-69.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 690-685.
- Lei, J., Fan, J., Yu, C., Zhang, L., Jiang, S., Tu, B. and Zhao, D. 2004. Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. **Microporous and Mesoporous Materials**, 73: 121-128.
- Leggett, G.J. and Jones, R.A.L. 2005. Bionanotechnology. In: Nanoscale science and technology. Kelsall, R.W., Hamley, I.W. and Geoghegan, M. (eds). John Wiley & Sons, Ltd., pp. 419-444, West Sussex.
- Liao, M.H. and Chen, D.H. 2002. Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent. **Biotechnology Letters**, 24: 1913-1917.

- Liao, M.H. and Chen, D.H. 2002. Preparation and characterization of a novel magnetic nano-adsorbent. **Journal of Materials Chemistry**, 12: 3654-3659.
- Lienqueo, M.E., Mahn, A., Salgado, J.C. and Asenjo, J.A. 2007. Current insights on protein behavior in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, 849: 53-68.
- Lochmüller, C.H. and Wigman, L.S. 1987. Affinity separation in magnetically stabilized fluidized beds: synthesis and performance of packing materials. **Separation Science and Technology**, 22: 2111-2125.
- Lu, A.X., Liao, X.P., Zhou, R.Q. and Shi, B. 2007. Preparation of Fe(III)-immobilized collagen fiber for lysozyme adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 301: 85-93.
- Mamalis, A.G. 2007. Recent advances in nanotechnology. **Journal of Materials Processing Technology**, 181: 52-58.
- Mandal, M., Kundu, S., Ghosh, S.K., Panigrahi, S., Sau, T.K., Yusuf, S.M. and Pal, T. 2005. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell. **Journal of Colloid and Interface Science**, 286: 187-194.
- Miyauchi, K., Matsumiya, M. and Mochizuki, A. 2006. Purification and characterization of lysozyme from purple Washington clam *Saxidomus purpurata*. **Fisheries Science**, 72: 1300-1305.
- Mohann, D., Pittman, C.U. Jr. and Steele, P.H. 2006. Single, binary and multi-component adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin-a biosorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, 297: 489-504.
- Moore, W.J. 1972. Physical Chemistry, Longman Group Limited, London.

- Mosbach, K. and Anderson, L. 1977. Magnetic ferrofluids for preparation of magnetic polymers and their application in affinity chromatography. **Nature**, 270: 259-261
- Moss, J.M., Van Damme, M.P.I., Murphy, W.H., Stanton, P.G., Thomas, P. and Preston, B.N. 1997. Purification, characterization and biosynthesis of bovine cartilage lysozyme isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 339(1): 172-182.
- Muhammad, N., Parr, J., Smith, M.D. and Weatley, D. 1998. Adsorption of heavy metals in slow sand filters. In **Proceeding of the 24th WEDC Conference**, pp 346-349. Islamabad.
- Munro, P.A., Dunnill, P. and Lilly, M.D. 1977. Nonporous magnetic materials as enzyme supports: studies with immobilized chymotrypsin. **Biotechnology and Bioengineering**, 19: 101-124.
- Murakami, F., Sasaki, T. and Sugahara, T. 1997. Lysozyme stimulates immunoglobulin production by human-human hybridoma and human peripheral blood lymphocytes. **Cytotechnology**, 24: 177-182.
- Odabaşı, M. and Denizli, A. 2004. Cibacron Blue F3GA incorporated magnetic poly(hydroxyethyl methacrylate) beads for lysozyme adsorption. **Journal of Applied Polymer Science**, 93: 719-725.
- Odabaşı, M., Say, R. and Denizli, A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. **Materials Science and Engineering C**, 27: 90-99.
- Odinan, G. 2004. Principles of polymerization. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Öncel, Ş. 2004. Fenilalanin içeren hidrofobik etkileşim kromatografi sorbentlerinin sentezlenmesi ve lizozim saflaştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, pp. 57-58, Ankara.

- Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B. and Denizli, A. 2005. Synthesis of phenylalanine-containing hydrophobic beads for lysozyme adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 44(18): 7049-7056.
- Özkara-Yavuz, S. 2007. Hidrofobik etkileşim kromatografisi. In: Protein kromatografisi ve yeni nesil polimerik sistemler yaz okulu notları. Denizli, A. ve Küfrevioğlu, İ. (eds). Atatürk Üniversitesi., pp 165-185. Erzurum.
- Pahud, J.J. and Widmer, F. 1982. Calf rennet lysozyme. **Biochemical Journal**, 201: 661-664.
- Palmer, T. 1994. Enzim Bilgisi (Çeviri: Gengiz, S. ve Gengiz, M.). Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, pp. 258. İstanbul.
- Palmieri, G., Giardina, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberrini, M. and Sannia, G. 1993. A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: application to a fungal phenol oxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, 16: 151-158.
- Papazoglou, E.S. and Parthasarathy, A. 2007. Bionanotechnology. Morgan & Claypool, pp. 1-10, Colorado.
- Peng, Z.G., Hidajat, K. and Uddin, M.S. 2004. Adsorption and desorption of lysozyme on nano-sized magnetic particles and its conformational changes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 35: 169-174.
- Perez, J.P.H., Cabarcos, E.L. and Ruiz, B.L. 2006. The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors. **Biomolecular Engineering**, 23: 233-245.
- Priyadarshini, S. and Kansal, V.K. 2002. Purification, characterization, antibacterial activity and N-terminal sequencing of buffalo-milk lysozyme. **Journal of Dairy Research**, 69: 419-431.

- Proctor, A. and Toro-Vazquez, I.F. 1996. The Freundlich isotherm in studying adsorption in oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 73: 1627-1633.
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T. and Cabral, J.M.S. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, 87: 143-159.
- Ramsden, J.J. 2005. What is nanotechnology. **Nanotechnology Perceptions**, 1: 3-17.
- Reshmi, R., Sanjay, G. and Sugunan, S. 2007. Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. **Catalysis Communications**, 8: 393-399.
- Robinson, P.J., Dunnill, P. and Lilly, M.D. 1973. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, 15: 603-606.
- Robty, J.F. and White, B.J. 1987. Biochemical techniques theory and practice electrophoretic techniques. Waveland Pres, Inc., pp 131-157.
- Rojas, E.E.G., Coimbra, J.S.R., Minim, L.A., Saraiva, S.H. and Silva, C.A.S. 2006. Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin and lysozyme. **Journal of Chromatography B**, 840: 85-93.
- Romanskevic, T., Budriene, S., Pielichowski, K. and Pielichowski, J. 2006. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, 17(4): 74-89.
- Ruckenstein, E. and Zeng, X. 1997. Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. **Biotechnology and Bioengineering**, 56(6): 610-617.
- Saçak, M. 2006. Polimer kimyası. Gazi Kitabevi, Ankara.
- Safarik, I. 1991. Magnetic biospecific affinity adsorbent for lysozyme isolation. **Biotechnology Techniques**, 5(2): 111-114.

- Safarik, I. and Safarikova, M. 1993. Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 27(4): 327-330.
- Safarik, I. and Safarikova, M. 2004. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **Biomagnetic Research and Technology**, 2:7.
- Safarik, I., Sabatkova, Z., Tokar, O. and Safarikova M. 2007. Magnetic cation exchange isolation of lysozyme from native hen egg white. **Food Technology and Biotechnology**, 45(4): 355-359.
- Safarik, I., Safarikova, M., Weyda, F., Szablewska, E.M. and Waniewska, A.S. 2005. Ferrofluid-modified plant-based materials as adsorbents for batch separation of selected biologically active compounds and xenobiotics. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 293: 371-376.
- Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M. and Denizli, A. 2006. Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 45: 3036-3043.
- Sava, G., Benetti, A., Ceschia, V. and Pacor, S. 1989. Lysozyme and cancer: Role of exogenous lysozyme as anticancer agent. **Anticancer Research**, 9: 583-592.
- Şenel, S., Say, R., Arıca, Y. and Denizli, A. 2001. Zinc ion-promoted adsorption of lysozyme to Cibacron Blue F3GA-attached microporous polyamide hollow-fiber membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 182: 161-173.
- Shen, L.L. and Cao, X.C. 2007. Synthesis of thermo-sensitive polyacrylamide derivatives from affinity precipitation and its application in purification of lysozyme. **Biochemical Engineering Journal**, 33: 66-71.
- Shugar, D. 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, 8: 302-309.

- Tang, Z.X., Qian, J.Q. and Shi, L.E. 2006. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. **Process Biochemistry**, 41: 1193-1197.
- Tang, Z.X., Qian, J.Q. and Shi, L.E. 2007. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. **Materials Letters**, 61: 37-40.
- Thammasirirak, S., Ponkham, P., Preecharram, S., Khanchanuan, R., Phonyothee, P., Daduang, S., Srisomsap, C., Araki, T. and Svasti, J. 2006. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 143: 209-217.
- Thammasirirak, S., Torikata, T., Takami, K., Murata, K. and Araki, T. 2001. Purification and characterization of goose type lysozyme from cassowary (*Casuaris casuaris*) egg white. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 65(3): 584-592.
- Tong, X.D., Xue, B. and Sun, Y. 2001. A novel magnetic affinity support for protein adsorption and purification. **Biotechnology Progress**, 17: 134-139.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. and Chibata, I. 1966. Studies on continuous enzyme reaction. I. Screening of carriers for preparation water-insoluble aminoacylase. **Enzymologia**, 31: 214-224.
- Tsai, Y., Lin, F., Chen, W. and Lin, C. 2002. Isothermal titration microcalorimetric studies of the effect of salt concentrations in the interaction between proteins and hydrophobic adsorbents. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 197: 111-118.
- Vacca, A., Campobasso, N., Iodice, G., Ronco, M. and Dammaco, F. 1985. Cyclic lysozyme administration as a tool for immunopotential in patients with multiple myeloma. **Chemotherapy**, 19: 145-155.
- Verhamme, I.M.A., Van Dedem, G.W.K. and Lauwers, A.R. 1988. Ionic-strength-dependent substrate inhibition of the lysis of *Micrococcus luteus* by hen egg-white lysozyme. **European Journal of Biochemistry**, 172: 615-620.

- Vertegel, A.A., Siegel, R.W. and Dordick, J.S. 2004. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. **Langmuir**, 20(16): 6800-6807.
- Voet, D. and Voet, J.G. 1990. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 1223 p. USA.
- Warren, J., Reinhart, J., Zeilling, B. and Neidhard, J. 1981. Lysozyme and enhancement of tumor cell immunoprotection in a marine fibrosarcome. **Cancer Research**, 41: 1642-1645.
- Wen, W., Wan, J., Cao, X. and Xia, J. 2007. Preparation of a light-sensitive and reversible dissolution copolymer and its application in lysozyme purification. **Biotechnology Progress**, 23(5): 1124-1129.
- Wichterle, O. and Lim, D. 1960. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, 185: 117-118.
- www.linfield.edu/chem/C440/Lysozyme.pdf, Erişim tarihi: 25.06.2008.
- Xiao, Q.G., Tao, X., Zou, H.K. and Chen, J.F. 2008. Comparative study of solid silica nanoparticles and hollow silica nanoparticles for the immobilization of lysozyme. **Chemical Engineering Journal**, 137: 38-44.
- Xue, Q.G., Schey, K.L., Volet, A.K., Chu, F.L.E. and La Peyre, J.F. 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Comparative Biochemistry and Physiology B- Biochemistry & Molecular Biology**, 139(1): 11-25.
- Yılmaz, M., Bayramoğlu, G. and Arıca, M.Y. 2005. Separation and purification of lysozyme by Reactive Green 19 immobilised membrane affinity chromatography. **Food Chemistry**, 89: 11-18.
- Zhang, X., Wang, Y.L., Sun, M., Ren, X., Zou, Y.L., Wang, Q.Y. and Wang, W. 2008. Purification and properties of lysozyme from a marine strain. **Annals of Microbiology**, 58(1): 89-94.

Zhao, X.S., Bao, X.Y., Guo, W. and Lee, F.Y. 2006. Immobilizing catalysts on porous materials. **Materials Today**, 9(3): 32-39.

Zhao, Y., Jin, Y., Lee W.H. and Zhang, Y. 2006. Purification of a lysozyme from skin secretions of *Bufo andrewsi*. **Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology**, 142: 46-52.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Deniz AKTAŞ UYGUN
Doğum Yeri ve Tarihi: BİNGÖL/1980

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

1. Akgöl, S., Öztürk, N., Karagözler, A.A., Uygun, D.A., Uygun, M. and Denizli, A. 2008. A new metal-chelated beads for reversible use in uricase adsorption. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 51: 36–41.
2. Karagözler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.Ç. and Uygun, D.A. 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. **Food Chemistry**, 111: 400–407.

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

1. Öztürk, N., Uygun, D.A., Tüzmen, N., Kamburcu, T., Akgöl, S., Denizli, A. Removal of cholesterol by nano-pHEMA based nanostructures. Biomed 2008, 14th Biomedical Science & Technology Symposium, 4-7 May 2008, Marmaris.
2. Çelik, T., Aslantürk, Ö.S., Uygun, D.A. Determination of total phenolic content and antioxidant activity of strawberry trees, arbutus unedo fruits. International Symposium on Food, Nutrition and Cancer, 17 Mayıs 2008, İzmir.

-Ulusal

1. Uygun, D.A., Karagözler, A.A., Akgöl, S., Denizli, A. Synthesis of magnetic nano-poly[(hydroxyethyl methacrylate)-co-(methacrylamidophenylalanine)] and their utilization as an affinity sorbent for lysozyme adsorption. IV. Ulusal Afinitive Teknikleri Kongresi, 4-7 Mayıs 2008, Marmaris.
2. Uygun, D.A., Öztürk, N., Tüzmen, N., Kamburcu, T., Akgöl, S., Denizli, A. Preparation of magnetic hydrophobic nanoparticles for cholesterol removal. IV. Ulusal Afinitive Teknikleri Kongresi, 4-7 Mayıs 2008, Marmaris.

3. Uygun, D.A., Uygun, M., Karagözler, A.A., Akgöl, S. Linoleik Asit ile Modifiye Edilmiş Kitosan Partiküllere İmmunoglobulin G'nin Bağlanması. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.
4. Acar, D.Ö., Uygun, M., Uygun, D.A., Karagözler, A.A. Malatya ve Aydın Yöresi Kiraz Ağacı Yapraklarının Bazı Antioksidan Özellikleri. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.
5. Karagözler, A.A., Uygun, D.A., Uygun, M. *Opopanax hispidus* (Friv.) Gris. (Sarı Ot) ve *Rosemarinus officinalis* L. (Biberiye)'nin antioksidan kapasitelerinin ve prolin düzeylerinin incelenmesi, XX. Ulusal Kimya Kongresi, 04-08 Eylül 2006, Kayseri.
6. Uygun, M., Karagözler, A.A., Başbülbül, G., Uygun, D.A., Bıyık, H.H. Aydın yöresinden toplanan Kapari (*Capparis spinosa* L.) ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası.
7. Uygun, D.A., Karagözler, A.A., Başbülbül, G., Uygun, M., Oryaşın, E. Aydın yöresinden toplanan zeytin yaprağı (*Olea europea* L.) ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası.
8. Uygun, D.A., Öztürk, N., Uygun, M., Karagözler, A.A., Akgöl, S., Denizli, A. Reaktif imidazol grubu taşıyan metal-şelat afinite mikrokürelere ürikaz immobilizasyonu. VI. Ulusal Kromatografi Kongresi, 28-30 Haziran 2006, İzmir.
9. Karagözler, A.A., Uygun, M., Aktaş, D., Öztürk, N. Kapari (*Capparis spinosa* L.) tomurcuklarının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül – 4 Ekim 2005, Kuşadası.
10. Karagözler, A.A., Uygun, M., Aktaş, D., Caba, S., Hacıoğlu, C. Kekik bitkisinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi, XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül – 4 Ekim 2005, Kuşadası.
11. Karagözler, A.A., Aktaş, D., Uygun, M., Ak, E., Yücecengiz, Ç. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) yaprağının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül – 4 Ekim 2005, Kuşadası.
12. Karagözler, A.A., Aktaş, D., Uygun, M., Kavas, C., Kırgil, A. Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül – 4 Ekim 2005, Kuşadası.
13. Aktaş, D., Karagözler, A.A. Karbonik Anhidraz Enziminin Alginat Üzerine İmmobilizasyonu Koşullarının İncelenmesi. XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, 5-9 Temmuz 2004, Kars.

14. Karagözler, A.A., Aktaş, D., Cakici, E., Öz, N. Karbonik Anhidraz Enziminin Isırgan Otu Bitkisinden Kısmi Saflaştırılması, XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, 5-9 Temmuz 2004, Kars.

15. Aktaş, D., Uygun, M., Karagözler, A.A. Bitki Karbonik Anhidraz Enziminin Kısmi Saflaştırılmasına Kromatografik İşlem Sırasının Etkisi, V. Ulusal Kromatografi Kongresi, 30 Haziran - 2 Temmuz 2004, Eskişehir.

16. Aktaş, D., Mehmet, N., Aladağ, M., Karagözler, A.A. Mide hastalıklarında mide suyunun karbonik anhidraz aktivitesinin değişiminin incelenmesi, XVII. Ulusal Kimya Kongresi, 8-11 Eylül 2003, İstanbul.

17. Aktaş, D., Karagözler, A.A. Proteom Analizi, ADÜ II. Akademik Hafta Etkinlikleri, 11-15 Aralık 2000, Aydın.

c) Katıldığı Projeler

1. "Protein saflaştırılması için magnetik nanoyapıların hazırlanması ve karakterizasyonu". ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FBE-08031. Proje araştırmacısı.

2. "Aydın Yöresinde Üretilen Zeytinyağlarının Antioksidan Kapasitesinin Yağın Depolanma Koşullarına ve Süresine Bağlı Olarak Elektrokimyasal Yöntemle İzlenmesi". ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-08001. Proje araştırmacısı.

3. "Zeytin Bitkisinde Mineral Bitki Besin Maddelerinin ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerinin Mevsimsel Değişiminin İncelenmesi". ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: ZRF-08008. Proje araştırmacısı.

4. "Bitki ve hayvan dokularının melatonin içeriğinin HPLC yöntemi ile tayini". ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-06015. Proje araştırmacısı.

5. "Besin ve Sağaltım Amaçlı Kullanılan Bitkilerin *in vitro* Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi". ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-03014. Proje araştırmacısı.

6. "Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi". ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-02004. Proje araştırmacısı.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi, 2000-devam ediyor.

İLETİŞİM

E-posta adresi: daktas@adu.edu.tr

Tarih: 30/06/2008