

**T.C  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
KİM-YL-2010-0001**

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ NANOPARTİKÜLLERİN  
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE LİZOZİM  
SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILMASI**

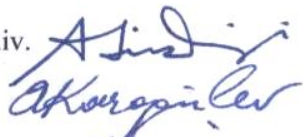



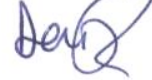
**Mehmet Emin ÇORMAN**

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

**AYDIN**

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

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mehmet Emin ÇORMAN tarafından hazırlanan “Moleküler Baskılanmış Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lizozim Saflaştırılmasında Kullanılması” başlıklı tez, 09.07.2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Adil DENİZLİ	Hacettepe Üniv.	
Üye : Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ	
Üye : Prof. Dr. Mustafa DEMİR	ADÜ	
Üye : Doç. Dr. Sinan AKGÖL	Ege Üniv.	
Üye : Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Ünvanı, Adı Soyadı  
Enstitü Müdürü

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

15/07/2010

İmza



Ad ve Soyad

Mehmet Emin ÇORMAN

## ÖZET

### **MOLEKÜLER BASKILANMIŞ NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE LİZOZİM SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILMASI**

Mehmet Emin ÇORMAN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER  
İkinci Danışman: Doç. Dr. Sinan AKGÖL

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanması kolay, dayanıklı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneği olan polimerlerdir. Moleküler baskılanmış polimerler afinite ayırma araçları olarak düşünülebilir. Bu çalışmanın amacı, sulu çözeltiden lizozim saflaştırmak için lizozim-baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin hazırlanmasıdır. Lizozim MATrp ile kompleksleştirilmiş ve miniemülsiyon polimerizasyon reaksiyonu ile lizozim baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri sentezlenmiştir. Ayrıca baskılanmamış nanopartiküller, kontrol deneyi için kalıp molekül lizozim olmadan sentezlenmiştir. Lizozim baskılanmış poli(HEMA-MATrp) polimerine lizozim adsorpsiyonu farklı ortam koşullarında (pH, iyonik şiddet, lizozim derişimi, sıcaklık) kesikli sistemde incelenmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu FTIR, SEM, AFM, Zeta boyut analizi ve Elementel analiz ile gerçekleştirilmiştir. Lizozim-baskılanmış polimerlerin spesifik yüzey alanı 1648,0 m<sup>2</sup>/g; boy dağılımları 261 nm olarak bulunmuştur. Elementel analiz sonuçlarına göre partiküller 0.85 µmol MATrp/g polimer içermektedir. Maksimum lizozim adsorpsiyonu 1182,8 mg/g olarak bulunmuştur. Desorpsiyon için etilen glikol kullanılmış ve % 94 geri kazanım sağlanmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmış ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Lizozim baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin seçiciliğini göstermek için lizozim, sığır serum albümini (BSA), sitokrom c'nin adsorpsiyonu araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, baskılanmış nanopartiküllerin lizozim için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Moleküler baskılanmış polimerler, nanopartikül, lizozim

**ABSTRACT****MOLECULARLY IMPRINTED NANOPARTICLES PREPARATION,  
CHARACTERIZATION AND ITS USAGE FOR LYSOZYME  
PURIFICATION**

Mehmet Emin ÇORMAN

M. Sc. Thesis, Department of Chemistry  
Supervisor: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER  
Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Molecularly imprinted polymers (MIP) are easy to prepare, stable, inexpensive and capable of molecular recognition. MIPs can be considered as affinity separation media. The aim of this study was to prepare lysozyme-imprinted poly(HEMA-MATrp) nanoparticles which can be used for the purification of lysozyme from aqueous solutions. Lysozyme was complexed with MATrp and the lysozyme-imprinted poly(HEMA-MATrp) nanoparticles were synthesized by miniemulsion polymerization reaction. Also, non-imprinted nanoparticles were synthesized without lysozyme for control experiments. Adsorption of lysozyme onto lysozyme imprinted poly(HEMA-MATrp) polymer was investigated in batch system under various medium conditions (i.e. pH, ionic strength, lysozyme concentration, temperature). Characterization of nanoparticle polymer was conducted using FTIR, SEM, AFM, Zeta sizer and Elemental analysis. The specific surface area of the lysozyme imprinted particles was found to be 1648,0 m<sup>2</sup>/g with a size range of 261 nm in diameter. According to the elemental analysis results, the particles contained 0,85 µmol MATrp/g polymer. The maximum lysozyme adsorption capacity was 1182,8 mg/g polymer. Ethylene glycol was used for desorption of lysozyme. The adsorbed lysozyme was desorbed with 94 % recovery. It was observed that after 5 adsorption-desorption cycle, there is no significant loss in adsorption capacity. In order to show the selectivity of the lysozyme imprinted poly(HEMA-MATrp) nanoparticles, adsorption of lysozyme, bovine serum albumin (BSA) and cytochrome c were investigated. The results show that the imprinted nanoparticle has high selectivity and sensitivity for lysozyme.

**Key Words:** Molecular imprinting polymers, nanoparticle, lysozyme

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve akademik hayatım süresince engin bilgilerinden yararlandığım tezimin gerçekleşmesindeki yardımlarından dolayı çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. A.Alev KARAGÖZLER'e,

Hayata ve bilime olan sevgisiyle akademik yaşantımda daima örnek aldığım yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında tezimin konu seçiminden yürütülmesine kadar her aşamada içtenlikle gösterdiği emek ve desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü öğretim üyesi çok sevgili ikinci danışman hocam Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e,

Tezimin deneysel aşamasındaki zorlukları aşabilmem için bana laboratuvarını açan ve bilimsel tecrübelerinden yararlanma fırsatını ve mutluluğunu sunan Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye

Laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlükleri çözmemde bana yardımcı olup, bilimsel tecrübeleri ile bana katkıda bulunan ve bilgilerinden faydalanmamı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalındaki öğretim üyesi Sayın hocam Dr. Lokman UZUN'a ve laboratuvar çalışmalarım süresince güler yüzleri ile bana destek olup, neşeli bir ortamda çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında her zaman beni destekleyen, bıkmadan usanmadan beni dinleyen, sıkıntılarımı paylaşan önerileriyle katkıda bulunan, çalışmalarım boyunca bana destek olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a, Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e, Arş. Grv. Nevra ÖZTÜRK'e ve Arş. Grv. Murat UYGUN'a

Tezimin gerçekleştirilmesinde ve yazımındaki yardımlarından dolayı hakkını asla ödeyemeyeceğim Burcu ALKAN'a ve gerektiğinde hayatlarını bana göre düzenleyen, meşguliyetlerimi anlayışla karşılayan canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Mehmet Emin ÇORMAN

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELERİN DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji.....	1
1.1.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	3
1.2. Nanobiyoteknoloji.....	4
1.3. Nanopartiküller.....	5
1.3.1. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları.....	7
1.3.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemi.....	8
1.4. Polimer Sentezleme Teknikleri.....	9
1.4.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	9
1.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	11
1.5.1. Moleküler Baskılama Tekniği.....	14
1.5.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	15
1.5.2.1. Kovalent baskılama.....	15
1.5.2.2. Kovalent olmayan baskılama.....	16
1.5.3. Moleküler Baskılamada Kullanılan Bileşikler.....	18
1.5.3.1. Fonksiyonel monomerler.....	18
1.5.3.2. Hedef/Kalıp molekül.....	19
1.5.3.3. Çapraz bağlayıcılar.....	19
1.5.3.4. Çözücüler.....	20
1.5.3.5. Başlatıcılar.....	20
1.5.4. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulama Alanları.....	21
1.6. Lizozim.....	22
1.6.1. Lizozim Enziminin Yapısı.....	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. N-Metakroil-(L)-Tryptofan (MATrp) Monomerinin Sentezlenmesi.....	30
3.2.2. Lizozim Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	30
3.2.3. HEMA-MATrp Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	32
3.2.3.1. Elementel analiz.....	32

3.2.3.2. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri.....	33
3.2.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri.....	33
3.2.3.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) ölçümleri.....	33
3.2.3.5. Zeta boyut analizi.....	33
3.3.3.6. Yüzey alanının hesaplanması.....	33
3.2.4. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) Polimerine Lizozim Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi.....	34
3.2.5. Seçicilik Deneyleri.....	35
3.2.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	37
4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	39
4.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri.....	39
4.2.2. Elementel Analiz.....	41
4.2.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri.....	41
4.2.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri.....	42
4.2.5. Zeta Boyut Analizi.....	43
4.2.6. Yüzey Alanının Hesaplanması.....	43
4.3. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) Polimerine Lizozim Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi.....	44
4.3.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi.....	44
4.3.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Tuz Türünün ve Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	45
4.3.3. Adsorpsiyona Lizozim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	47
4.3.4. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	48
4.3.5. Adsorpsiyon İzotermi.....	50
4.3.6. Kinetik Analizler.....	52
4.3.7. Seçicilik Deneyleri.....	55
4.3.8. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) Polimerinden Lizozimin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	58
5. SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	75



## SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AIBN	Azobis(izobütironitril)
APS	Amonyum persülfat
b	Langmuir sabiti
BSA	Sığır serum albümin
BPO	Benzoil peroksit
Cyt-c	Sitokrom-c
DVB	p-divinilbenzen
EGDMA	Etilenglikoldimetakrilat
FTIR	Fourier Transform Infrared
KBr	Potasyum bromür
MAA	Metakrilikasit
MIP	Moleküler baskılanmış polimerler
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
nano-p(HEMA)	Nano-poli(2-hidroksietil metakrilat)
NanoS	Nano Zetasizer
NaOH	Sodyum hidroksit
NIP	Baskılanmamış polimerler
NMR	Nükleer manyetik rezonans
p(HEMA-MATrp)	poli(2-hidroksietil metakrilat - ko- metakriloilamidotriptofan)
PVA	Polivinil alkol
$Q_{max}$	Maksimum Adsorpsiyon Kapasitesi
$R^2$	Korelasyon sabiti
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nano ölçek gösterimi.....	2
Şekil 1.2. Mikro ve nano bileşenlerin büyüklük skalası ve örnekleri.....	3
Şekil 1.3. Sürfaktan moleküllerinden oluşan miseller.....	9
Şekil 1.4. Şişmiş misel yapısı.....	10
Şekil 1.5. Eş boyutlu polimer partikülleri.....	10
Şekil 1.6. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.7. Moleküler baskılamanın çeşitli uzantıları; İkili Baskılama ve Doğrudan Kalıplama.....	14
Şekil 1.8. Kovalent baskılamanın şematik görünümü.....	15
Şekil 1.9. Kovalent olmayan baskılamanın şematik görünümü.....	17
Şekil 1.10. Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler.....	19
Şekil 1.11. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	20
Şekil 1.12. Yaygın olarak kullanılan başlatıcılar.....	21
Şekil 1.13. Bakteri hücre duvarlarının NAM-NAG polisakkarit birimleri.....	23
Şekil 1.14. Lizozimin primer (a) ve üç boyutlu (b) yapısı.....	23
Şekil 3.1. Nano-p(HEMA-MATrp) polimerinin sentezinin şematik gösterimi.....	31
Şekil 4.1. MATrp monomerinin elde edilmesi.....	37
Şekil 4.2. MATrp monomerinin NMR spektrum.....	38
Şekil 4.3. MATrp monomerinin FTIR spektrum.....	38
Şekil 4.4. p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin FTIR spektrumu.....	40
Şekil 4.5. Lizozim baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin FTIR spektrumu.....	40
Şekil 4.6. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin SEM fotoğrafları.....	41
Şekil 4.7. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin AFM fotoğrafları.....	42
Şekil 4.8. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri.....	43
Şekil 4.9. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonu üzerine pH' ın etkisi.....	45
Şekil 4.10. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna farklı tuz türünün ve derişiminin etkisi.....	47
Şekil 4.11. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna farklı derişimlerin etkisi.....	48
Şekil 4.12. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	49
Şekil 4.13. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	51
Şekil 4.14. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	52
Şekil 4.15. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin lizozim adsorpsiyonuna zamanın etkisi.....	53

Şekil 4.16. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin pseudo-birinci ve pseudo-ikinci derecede incelenmesi.....	54
Şekil 4.17. Cyt-c'nin üç boyutlu yapısı.....	55
Şekil 4.18. BSA'nın üç boyutlu yapısı.....	56
Şekil 4.19. Lizozimin üç boyutlu yapısı.....	56
Şekil 4.20. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin lizozim, albümin ve sitokrom-c adsorpsiyon miktarı.....	57
Şekil 4.21. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği.....	58

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 1.1. Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemi.....	8
Çizelge 4.1. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon parametreleri.....	52
Çizelge 4.2. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin pseudo-birinci ve pseudo-ikinci dereceden kinetik sabitleri.....	55
Çizelge 4.3. Lizozime göre BSA ve Cyt-c için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.....	57

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Nanoteknoloji

“Nano” sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelir. Bir nanometre ise, metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. Nanoyapıların olağanüstü özellikleri çok öncelerden tahmin edilmekteydi. Nitekim 1960’lı yıllarda, Feynman nanoyapıların bu yönünü vurgulayarak bilim insanlarının dikkatlerini nanometre boyutlarına çekmek için çaba gösterdi. Böylece 20. yüzyılın son çeyreğinde, doğada bulunmayan yeni nanoyapıların atomsal düzeyde tasarlanarak sentezlenmesi devri başladı.

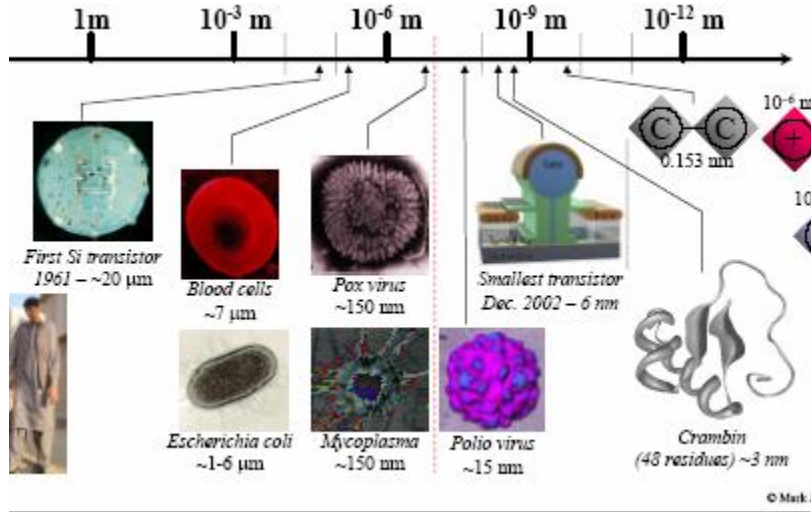
Teknolojide ilerlemiş ülkeler, nanoteknolojiye odaklanarak, bu devrimin içinde yer almalarını sağlayacak programlar üzerinde ciddi çalışmalar yapmaktadırlar. Nanoteknoloji, maddenin atom veya molekülleri üzerinde yapılan uygulamalarla makineleşmede hassasiyetin teorik sınırlarına ulaşması nedeniyle, günümüzün en ileri üretim teknolojisi olarak kabul edilmektedir (Çıracı, 2005).

Nanoteknoloji kavramını ilk defa dile getiren Amerika Birleşik Devletleri’nden Eric Drexler (Foresight Enstitüsü’nün kurucusu), ünlü Massachusetts Teknoloji Enstitüsü (Massachusetts Institute of Technology - MIT) laboratuvarındaki eğitimi sırasında, biyolojik sistemlerden esinlenerek moleküler makineler yapılabileceğini önermiş ve nanoteknolojinin ilk tohumlarını serpmiştir.

Nanoteknoloji vizyonunun ortaya çıkışını, 1959 yılında fizikçi Richard Feynman’ın “malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi ile başarılabiliriz” üzerine yapmış olduğu ünlü konuşmasına kadar dayandırabiliriz (There is Plenty of Room at the Bottom). Bu konuşmasında Feynman minyatürize edilmiş enstrümanlar ile nano yapıların ölçülebileceği ve yeni amaçlar doğrultusunda kullanılabilmesinin altını çizmiştir (Hey, 1996).

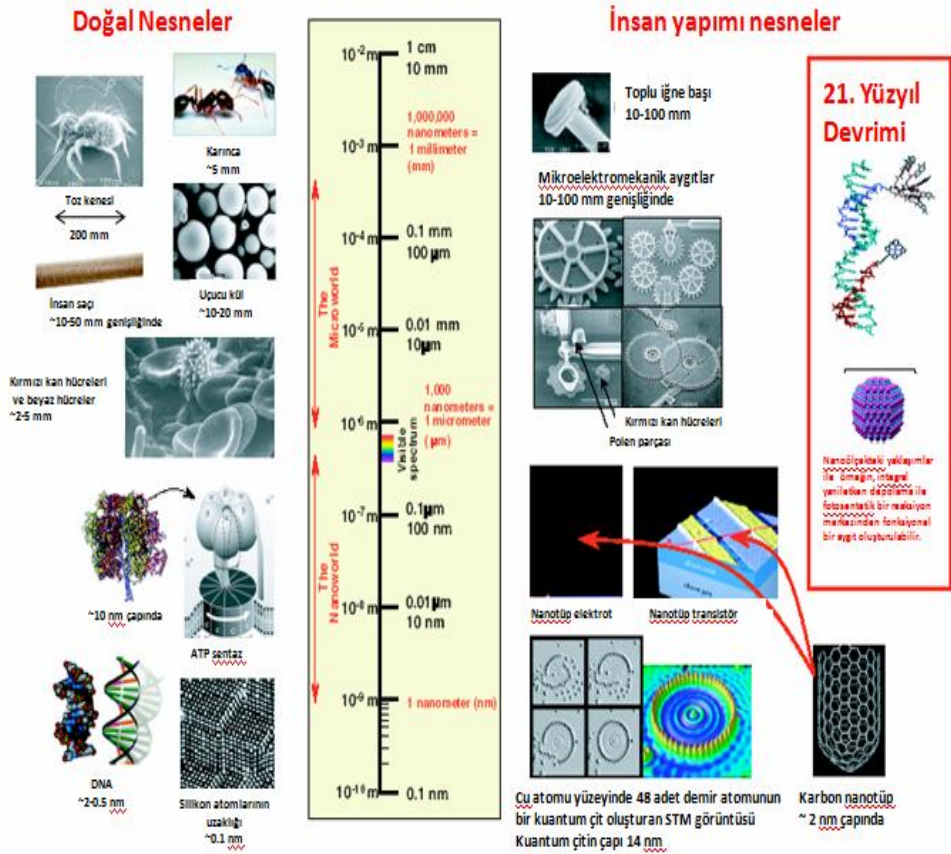
Ünlü fizikçi Richard Feynman’ın, 1959 yılında yaptığı ve günümüzde hızla gelişmekte olan nanoteknolojinin müjdecisi sayılan konuşmasında öngördüğü gibi, küçük ölçeklerle doğrulanacak uzun yolda bizi hoş, şaşırtıcı ve yararlı bulgular bekliyor (Takayangi vd., 2001; Oshima vd., 2003; Senger, 2004). Nanoölçekte maddelerin ve yapıların kontrolü, mühendislik yaklaşımları ile mümkün olur.

Nanobilim ve nanoteknolojinin, biyoloji ve tıp araştırmalarını da tamamen değiştireceğine bilim dnyasının önemli bir bölümü inanmaktadır (Vogel, 2003). Her yapının ve etkinin atomik düzeyde bir duyarlılıkla kontrol edilmesi ve belli bir iř için olası en küçük makinenin yapılması nanoteknolojinin büyülu noktasını oluşturmaktadır. Bu işlemleri gerçekleştirecek makine parkı, cihazlar, aletler geliştikçe nanoteknolojide yol alınmiş olunacaktır. Feynman mevcut durumun, atom üstüne atom dizilerek yeni bir yapı oluşturulmasına ters dūřmedięini verdiği örneklemlerle ifade etmiş ve bu sayede çok hafif, yüksek mukavemetli, akıllı, çok ucuz, temiz materyaller elde edileceğini ve nanoaletler kullanılarak endüstride ve hayatımızdaki amaca göre istenilen yere yönlendirilebileceğini ortaya koymuştur (Goodsell, 2000).



şekill.1.1.Nano ölçek gösterimi (Biggs, 2003)

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.



Şekil 1.2. Mikro ve nano bileşenlerin büyüklük skalası ve örnekleri (Mamalis, 2007)

### 1.1.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknoloji uygulamalarında üretilen malzemeler, parçalar ve aletlerin hepsi atomlardan oluşmaktadır. Nanoteknolojinin gelişmekte olan pek çok potansiyel uygulama alanı mevcuttur. Nano düzeydeki özelliklere bağlı olarak hastalıkların teşhisine, ilaç etkileşimlerinin belirlenmesine, DNA düzenlenmesine ve işlenmesine olanak sağlanmaktadır. Ayrıca vücuda alınan gıda maddelerinin ve sıvıların izlenmesi, bitki ve hayvanlardaki sağlık takibi, çevresel izleme ve denetleme gibi konular üzerine uygulamalar da mümkün olmaktadır.

Bununla birlikte; küçük, hızlı, akıllı ve çoklu analiz yapabilen sensörler; küçük, yüksek yoğunluklu ve hızlı özelliklere sahip elektronikler ve optikler; daha iyi kontrol ve daha iyi salınım yapabilen sistemler; yüksek dayanıklılık, kararlılık ve optiklik özelliklerinden dolayı kompozit ve film yapımı; elektrik, yüksek yoğunluk depolaması gibi özelliklerinden dolayı enerji; yumuşak iyileştirme filmleri; otolens gibi sistemlerde kullanılabilen akıllı sistemler de uygulama alanlarındadır. Bu potansiyel uygulama alanlarına sahip nanoteknolojinin alt dalları ise;

- Nanomateryaller,
- Nanoelektronikler,
- Nanobiyoteknoloji ve Nanomakinalar olarak sayılabilir (Biggs, 2003).

## 1.2. Nanobiyoteknoloji

Modern bilim biyolojik olayları (yaşamı) moleküler düzeyde inceleyebilmek için, özellikle çok hızlı ve çok sayıda paralel ve/veya art arda devam eden biyolojik reaksiyonları anlamaya ve buradan alacağı bilgiler ile esas olarak yaşam kalitesini artıracak teknolojik gelişmeler sağlamaya çalışmaktadır. Şüphesiz bunların doğru ve hızlı olarak yapılması, birçok bilinmeyen de çözümü demektir. Nanobiyoteknoloji tanımı, bu çalışmalar sırasında ortaya çıkan bir konunun gelişimi ile bulunmuştur. Nanoteknolojinin biyolojik ve biyokimyasal uygulamalarını içeren alt dalına nanobiyoteknoloji adı verilir.

Nanoteknolojinin biyoloji için sunduğu en önemli olanak biyomoleküler yapı, fonksiyon ve özelliklerinin araştırılması için yeni araçlar oluşturmaktır. Bu yeni araçlar kullanıldığında hücrenin yapısal elemanlarının ve moleküler ilişkilerinin doğrudan ölçümü mümkün olabilmektedir. Nanobiyoteknolojinin gelişiminde biyolojik mekanizmaları taklit ederek nanoboyutlu aygıtların yapımı önemli rol oynamaktadır. Çok büyük potansiyele sahip olan bu olayın gelecek yıllarda daha da gelişmesi beklenmektedir.

Son yirmi yılda, moleküler biyoloji ve gen teknolojisi alanlarında kaydedilen büyük gelişmeler, nanobiyoteknolojideki hızlı değişim ve ilerleyişin itici gücü olmuş ve bu teknoloji, giderek çok daha fazla sayıda sanayi ve hizmet sektörünü kapsar ve etkiler hale gelmiştir.



Nanobiyoteknoloji ilk olarak taklit edilecek olağanüstü modeller oluşturur. Daha sonra, bize sentetik ve biyolojik nanoteknolojiyi birleştirerek hibrid yapıların ortaya çıkmasını sağlayacak, çalışan hazır hücre bileşenlerini sunarlar (Leggett ve Jones, 2005). İnsan sağlığından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji üretimine kadar yaşamın pek çok alanı bu teknolojinin kapsamına girmiştir. Nanobiyoteknoloji bitki ve hayvanları geliştirmek, ürünlerin kalitesini arttırmak ya da özel kullanımlar için mikroorganizmaları geliştirmek amacıyla canlı organizmaların kullanıldığı teknolojileri içeren disiplinler arası bir bilim dalıdır. Canlıların iyileştirilmesi ya da endüstriyel kullanımına yönelik ürünler geliştirilmesini ve modern teknolojinin doğa bilimlerine uygulanmasını kapsar (Leggett ve Jone, 2005).

### **1.3. Nanopartiküller**

Nanometre boyutlarındaki nesnelere dayalı bir teknoloji olan nanoteknoloji materyaller, cihazlar ve sistemler gibi pek çok dalda gelişimini sürdürmektedir. Günümüzde nanomateryaller hem bilimsel alanda hem de ticari uygulamalarda kullanılmaktadır. 10 yıl öncesine kadar, boyuta bağlı kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı nanopartiküller çalışılmaktaydı. Günümüzde ise, nanopartiküller ticari uygulamalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Sharma, 2001). Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı, koloidal partiküllerdir. Nanopartiküller, nanoküre ve nanokapsül olarak da isimlendirilebilir. Nanokürede etkin madde matriks sistem içinde homojen olarak dağılmıştır. Nanokapsülde ise etkin madde bir polimerik membranla çevrilidir. Nanopartiküllerden istenen özellikler, ilacı kontrollü olarak salması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gibi sıralanabilir (Koç ve Kocaman, 2004). Eş boyutlu olan nanopartiküller biyoetiketleme uygulamalarında uygundur. Biyolojik etiketleme, biyolojik veya moleküler kaplama, biyoorganik yüzeye sahip tabaka oluşturma nanopartiküllere bağlı olarak yapılmalıdır. Biyolojik kaplama; antibadileri, kollajen gibi biyopolimerleri ve küçük moleküllerin monotabakalarını içermektedir (Salata, 2004).

Nanopartiküller, kullanılan başlangıç malzemesinin karakteristiğinden dolayı fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile farklı üretim yöntemlerini geliştirmiştir. Boyutları 100 nm ve altında kalan tozlar olarak tanımlanan nanopartiküller, nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Miller vd., 2004; Rao vd., 2005). Bu partiküller diğer ticari malzemelerden genelde farklı ve üstün kabul edilen özellikler göstermektedir.

Sıkça belirtilen nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmasıdır (Liveri, 2006).

Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri olağandışı özellikler sebebiyle yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır ( Miller vd., 2004; Rao vd., 2005; Liveri, 2006). Bunların yanı sıra, malzemelerin nanoboyut seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine izin vermektedir. Açıkça görülmektedir ki, nanoyapılı malzemelerin ve cihazların tasarlanmasını, üretimini ve işlevsel olarak kullanımını kapsayan nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler için vazgeçilemez ilk adım nanopartiküllerin üretimidir. Nanoteknolojik malzemelerin çıkış noktasını oluşturan nanopartiküller geniş bir kimyasal aralık ve morfolojide üretilebilirler (Gürmen ve Erbin 2008).

Enzim taşıyıcı materyalin boyutundaki azalma genellikle enzimin etkinliğini geliştirir. Yüzeye bağlanmalarda, küçük partiküller enzimi tutabilmesi için daha geniş yüzey alanına sahiptirler, bu sayede partikülün birim kütlesi başına bağlanan enzim miktarı artar (Jia vd., 2003). Gözenekli materyallere enzim bağlanmalarında, küçük gözenekli partiküllerin büyük gözenekli partiküllere oranla substrat difüzyonu az olduğundan daha düşük kütle transfer direnci beklenir. Son yıllarda, bu alanda destek materyal olarak nanoyapıların kullanımına büyük ilgi vardır (Daubresse vd., 1996; Martins vd., 1996; Caruso ve Schuler, 2000; Chen ve Su, 2001; Liao ve Chen, 2001; Jia vd., 2003). Nanopartiküllerin birim kütlesi başına düşen yüzey alanı geniş olduğundan, nanopartiküller üzerine enzim bağlanması etkili bir şekilde başarılabilir (Chen and Su, 2001).

Bununla birlikte, nanopartiküller, enzimin optimizasyon çelişkilerine ideal çareler sunar; minimum difüzyonal sınırlılık, birim kütle başına maksimum yüzey alanı, yüksek miktarlarda enzim bağlama (Jungbae K. vd., 2006).

Umut verici performans özellikleri ile birlikte 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 vd., 2006).

Nanopartiküller, hücreye fagositoz yoluyla girer ve hücre içindeki lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar. Nanopartiküller, pasif hedeflendirme ile en fazla karaciğer ve böbreklerde toplanırlar ve dolayısıyla da karaciğerin kanser ve paraziter hastalıklarında kullanılırlar. Monoklonal antikolar nanopartiküllere antijen bağlayan bölgelerinden adsorbe olurlar. Bu özel etkileşim, *in vivo* ilaç hedeflendirilmesinde önemli rol oynar. Monoklonal antikolarla kaplı nanopartiküller *in vitro* koşullarda hedef tümör hücrelerine karşı etkili olmaktadır (Koç ve Kocaman, 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikropartiküllü ilaç taşıyıcı sistemlerin (mikroküre, nanopartikül) veya biyokonjugantların hedef hücreye ulaşması ve hücre içine endositik yollarla alınabilmesinde en önemli parametrenin, taşıyıcı sistemin hedefle etkileşmesine olanak sağlayacak sürede dolaşımda kalması olduğunu göstermektedir. Bu nedenle biyolojik sıvılarda veya dolaşımda kalış süresini arttıran, opsonize edici bileşenlerle etkileşmeyi önleyen sterik stabilizasyon ve hedeflendirici ligantların ilaç taşıyıcı sistem tasarımında birlikte kullanılarak ligant-reseptör aracılı hedeflendirme yapılması ön plana çıkmaktadır (Koç ve Kocaman, 2004).

### **1.3.1. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları**

Günümüzde, nanopartiküller ticari alanda birçok uygulama alanına sahiptir (Salata, 2004). Aşağıda, nanoyapıların tıp ve biyolojide kullanılan bazı uygulama alanları verilmektedir:

- a) Floresan biyolojik etiketler (Bruchez vd., 1998; Wang vd., 2002).
- b) İlaç ve gen salınımı (Mah vd., 2000; Panatarotto vd., 2003).

- c) Patojenlerin biyotanınması (Edelstein vd. , 2000).
- d) Protein analizi (Nam vd., 2003).
- e) DNA yapılarının saptanması (Mahtab vd., 1995).
- f) Doku mühendisliği (Ma vd., 2003; de la Isla vd., 2003).
- g) Isı ile tümör parçalanması (Yoshida vd., 1999).
- h) Biyolojik moleküllerin ve hücrelerin saflaştırılması (Molday vd. , 1982).
- i) Fagokinetik çalışmalar (Parak vd., 2002).

Yukarıda da belirtildiği gibi, nanopartiküller, proteinlerin nanomateryalleri biyoetiketlemede kararlı kıldığı gibi aynı etki alanı içerisinde yer almaktadır. Biyolojik hedefler ile etkileşimde bulunabilmek için nanopartiküllerin, biyoanorganik ara yüzey olarak bağlanması gerekir. Örneğin; antibadileri kararlı kılan küçük tektabakalar veya kollojen gibi biyopolimerler içeren biyolojik kaplamalar, nanopartikülleri biyokararlı kılarlar (Sinani vd., 2003).

### 1.3.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemi

Çizelge1.1. Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemi

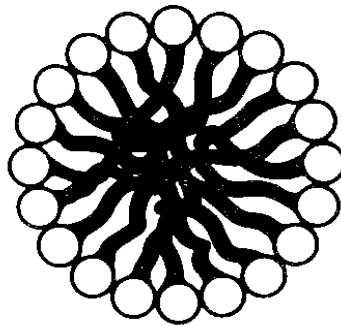
Polimer Tipi	Hazırlama yöntemi	Etkin madde
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofilik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su/yağ emülsiyonu ısı denaturasyonu ve ısı yalıtımı</li> <li>• Sulu ortamda dsolvasyon ve çapraz bağlanma</li> <li>• Sulu ortamda çapraz bağlanma</li> <li>• Organik çözücüden polimer çöktürmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofilik</li> <li>• Hidrofilik protein</li> <li>• Hidrofilik protein</li> <li>• Hidrofilik</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofobik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emülsiyon polimerizasyonu</li> <li>• Yüzeyler arası polimerizasyonu</li> <li>• Çözücü buharlaştırma</li> <li>• Çözücü yer değiştirme</li> <li>• Tuzla çöktürme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofilik</li> <li>• Hidrofobik</li> <li>• Hidrofilik/Hidrofobik Polar çözücülerde çözünen</li> </ul>

## 1.4. Polimer Sentezleme Teknikleri

Radikalik polimerizasyonlar gerekleŖtiđi koŖullar altında hem homojen hem de heterojen tiplerde olabilir. Bu sınıflandırma genellikle baŖlangı reaksiyon karışımının homojen veya heterojen olup olmamasına dayanır. Bazı homojen sistemler, reaksiyon ortamında polimerin özünmezliğinin bir sonucu olarak polimerizasyon ilerledikçe heterojen olabilir. Kütle ve çözelti polimerizasyonları homojen işlemler iken, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları heterojen işlemlerdir (Oğian, 2004).

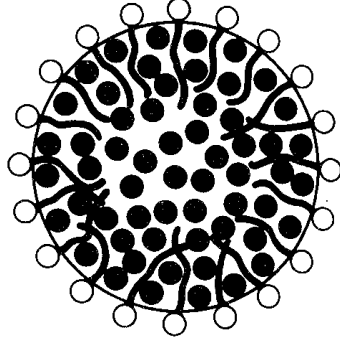
### 1.4.1. Emülsiyon Polimerizasyonu

Su ortamında, monomer, yüzey aktif madde ve suda çözünen (potasyum persülfat, amonum persülfat gibi) bir baŖlatıcı bulunur. Reaksiyon ortam sürekli karışırılır. Yüzey aktif ajanlar veya surfaktanlar birbirleriyle miseller oluŖturmak üzere iliŖkiye girerek, kritik değerlerdeki derişimlerde suda çözünebilirler. Bu miseller içinde surfaktan moleküller, suda hidrokarbon (veya olefilik veya hidrofobik) uçları ve polar uçlarından (hidrofilik) ufak ve eŖ boyutlu küreler oluŖturmak üzere düzenlenirler. Emülsiyon polimerizasyonu, sodyum dodesil sülfat (SDS) veya benzer anyonik, non-iyonik surfaktan ile baŖlatılır. Bu surfaktan yılanı benzer şekilde bulunur (Bangs, 1987).



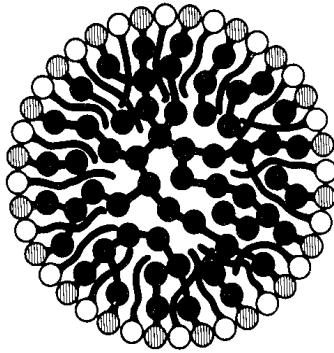
Ŗekil 1.3. Surfaktan moleküllerinden oluŖan miseller

Emülsiyon polimerizasyonu için gerekli malzemeler 4 bileşeni içerir. Bunlar; su (demineralize), suda çok az çözünen bir monomer, suda çözünen radikal oluşturucu bir başlatıcı ve bir surfaktandır. Bir emülsiyon polimerizasyonunun gidişi ve oluşan polimer lateksin özellikleri surfaktanla güçlü bir şekilde etkilenir.



Şekil 1.4. Şişmiş misel yapısı

Her iki şekilde de kuyruk kısmı hidrokarbon ucu, yuvarlak baş kısım ise hidrofilik ucu, sülfonik asit grubunu temsil eder. Kritik misel derişimlerinin üzerinde, surfaktan molekülleri kendilerini küresel şekilde düzenlerler, kuyruk kısımları merkeze doğru toplanır, baş ve iyonik gruplar kürenin yüzeyine, suya doğru yönelir. Bu miseller, aynı sayıda surfaktan molekülleri içerirler ve bu yüzden monodispers veya çapça eş boyutlu eğilimdedirler. Daha çok surfaktan eklenirse, aynı boyutlarda daha çok misel oluşur. Şişmiş bir misel yukarıda görülmektedir.



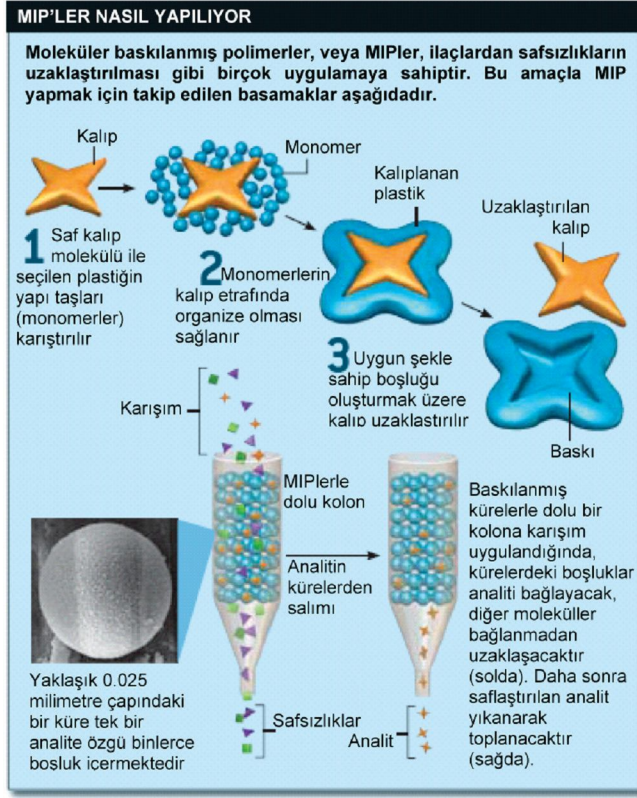
Şekil 1.5. Eş boyutlu polimer partikülleri (Bangs, 1987)

Monomer damlacıklarının daha geniş hacimlerine rağmen miseller daha geniş yüzey alanı sunarlar. 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 (Braun, 2005).

Emülsiyon polimerizasyonu, çeşitli ayırt edici avantajlara sahiptir. Emülsiyon (kolloidal) sisteminin fiziksel durumu işlemin kontrolünü kolaylaştırır. Emülsiyon polimerizasyonu, polimerizasyon hızını azaltmaksızın polimerin molekül kütlelerini arttırma kabiliyetine sahip olan eşsiz bir işlemdir. Farklı reaksiyon mekanizması nedeni ile emülsiyon polimerizasyonu, hem yüksek molekül kütlesi hem de yüksek reaksiyon hızlarına eş zamanlı olarak ulaşma kabiliyeti avantajına sahiptir (O'dian, 2004).

### **1.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi**

Modern biyoteknoloji alanında yasa dışı ilaçların ve kimyasal savaş ajanlarının ortaya çıkarılması, bununla birlikte klinik teşhislerde, çevresel analizlerde, gıda analiz ve üretiminde yeni talepler ve fırsatların belirlenmesiyle hedef moleküle spesifik biçimde bağlanma yeteneğine sahip biyomimetik reseptör sistemlerini içeren hassas ve seçici uygulama alanları ortaya çıkmıştır (Haupt ve Mosbach, 2000). İnorganik iyonlar gibi küçük hedef moleküllerini ortaya çıkarmak oldukça zor gerçekleşen bir durumdur. Bu sebepten dolayı farklı yöntemler ortaya çıkmıştır ve bunlardan biri de moleküler baskılama yöntemidir (Lehn, 1995). Moleküler Baskılama yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar, hedef moleküle yüksek seçicilik göstermesi nedeniyle umut vaat etmektedir. Moleküler baskılama yöntemi ilk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanmış ve sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Wulff vd., 1987).



Şekil 1.6. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi (Denizli ve Yavuz, 2008)

Moleküler baskılama yönteminin en ilgi çeken yanlarında biri de çeşitli analitlere uygulanmasıdır. Küçük organik moleküller (tıbbi ilaçlar, pestisitler, aminoasitler ve peptitler, nükleoid bazlar, steroidler ve şekerler) daha iyi belirlenir (Zhang vd., 2005; Zhu vd., 2006; Urraca vd., 2006a; Urraca vd., 2006b; Tao et al., 2006; Sun et al., 2004; Matsunaga vd., 2006; Maier vd., 2004; Huang vd., 2004; Homer vd., 2004; Hall vd., 2006; Graham vd., 2002; Benito-Pena vd., 2006; Ersöz vd., 2005; Odabaşı, vd., 2007; Özcan vd., 2006). Benzer yaklaşımlarla daha büyük organik moleküllerin baskılanması sorunlu olmasına rağmen kısmen de olsa baskılanabilirler. Bunlar proteinler, mineral kristaller ve hücreler olabilir (Kempe vd., 1995; Aherne vd., 1996; Hjerten vd., 1997; Shi vd., 1999; D'Souza; 1999).

Moleküler baskılanmış polimerler hedef molekülü seçici bir şekilde tanırlar. Bununla birlikte moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler,

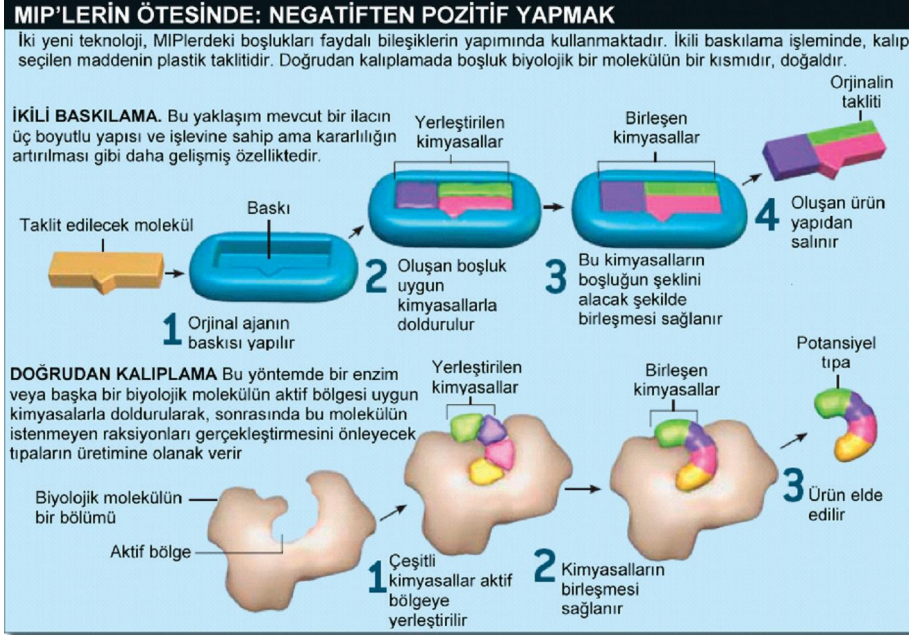


bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça kullanışlıdır ve hazırlama prosedür maliyeti düşük ve kolaydır. Böylece yıllarca uygun koşullarda performansını korurlar (Ensing vd; 2001; Piletsky vd; 2001; Rao vd., 2004).

Moleküler baskılama yönteminin karakteristik özellikleri yaşam, farmasötik ve çevre bilimleri gibi geniş bir alanda tanıma ve ayırma amaçlı olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Andersson vd., 1990; Ramstrom vd., 1996; Spivak, 2005; Yavuz vd., 2006; Odabaşı vd., 2007). Baskılanmış polimerlerle moleküler tanıma, son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Lu vd., 2002; Jiang vd., 2007).

Moleküler baskılama tekniği, bir kalıp molekülü etrafında fonksiyonel monomerlerin kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle düzenlenmesi ve sonrasında uygun bir işlem süreci ile kimyasal fonksiyona sahip katı malzemelerin oluşturulmasını amaçlamaktadır. İşlem sonrasında kalıp molekülün uzaklaştırılması ile yapıda kalıp molekülüne özgü oyuklar oluşmaktadır. Sonuç olarak ayırma, kimyasal tayin ve kataliz gibi işlemler için ideal bir malzeme elde edilmektedir (Wulff, 1995; Mosbach ve Ramstrom, 1996; Lu vd., 2002). Moleküler baskılama tekniği, kalıp moleküller yoluyla sentetik polimerlerde spesifik tanıma bölgeleri oluşturmaktadır. Fonksiyonel monomer, genellikle iki fonksiyonel grup içerir. Bunlardan biri, kalıpla doğrudan kovalent olmayan etkileşime veya tersinir kovalent etkileşime girer, diğeri ise kalıpla etkileşime girmeyen çapraz bağlayıcı ile kovalent bağ yapabilir. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında monomerin, çapraz bağlayıcının ve kalıp molekülün molar oranları ile polimerizasyon sıcaklığının seçimi oldukça önemlidir (Karim vd., 2005).

Bugün moleküler baskılama teknolojisini çok çeşitli uzantıları ortaya çıkmıştır. Bunlardan bir tanesi orijinal molekülü kopyasını oluşturmayı sağlayan işlem, bu işlemde orijinalle aynı üç boyutlu yapıya ve aynı işleve sahip bileşikler oluşturulur. İşlevsellik, fonksiyonel grupların orijinaliyle birebir aynı şekilde ve yönlerde dizilmesinden kaynaklanır. Bu teknolojiye “ikili baskılama” adı verildi. Diğer bir yaklaşımdaysa ikili baskılama yönteminde olduğu gibi aktif bölgeye küçük kimyasal maddeler doldurularak buranın şeklini alması sağlanabilir. Oluşan yapı bu bölgeyi tıkayacak bir kopyası olacaktır ve sonrasında canlı bir hücrede bu yapının etkinliği denenebilir.



Şekil 1.7. Moleküler baskılamanın çeşitli uzantıları; İkili Baskılama ve Doğrudan Kalıplama (Denizli ve Yavuz 2008)

### 1.5.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama yöntemi aşağıda açıklandığı gibi 3 adımda gerçekleşir (Andersson, 2000; Ye ve Mosbach, 2001; Komiyama vd., 2003; Sellergren ve Allender; 2005):

1. **Ön kompleksleşme:** Uygun fonksiyonel gruba sahip ve polimerleşebilen monomer, ilgilenilen analitle (hedef molekül/kalıp) kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle kompleks oluşturur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir. Monomer-kalıp molekülün polimerizasyonu gerçekleşir.
2. **Polimerizasyon:** Polimerizasyon adımı, monomer-kalıp kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.
3. **Hedef molekülün (Analitin) uzaklaştırılması:** Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır.

Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanır; seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.

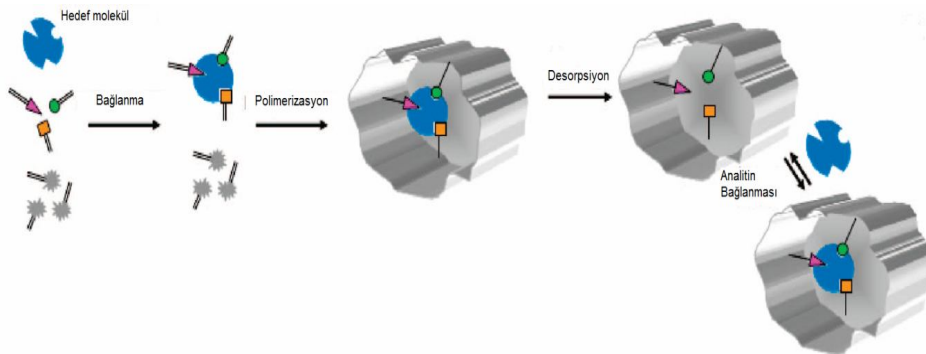
### 1.5.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi hedef molekül ile monomer arasındaki etkileşim türüne göre kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

#### 1.5.2.1. Kovalent baskılama

Kovalent baskılama yönteminde, hedef molekül ile monomer kompleksi Schiff bazı, ketal, esterler, amidler ve boronik asitlerin tersinir kovalent bağlanması ile oluşur (Wulff ve Sarhan, 1972; Shea ve Dougherty, 1986; Sellergren and Andersson, 1990).

Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirlerine kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül, baskılanmış polimerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur.



Şekil 1.8. Kovalent baskılamanın şematik görünümü (Ellen vd., 2007)

### **Avantajları**

1. Kararlı kalıp-monomer kompleksi oluşturulduğundan bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı gerçekleşir.
2. Konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulduğu için polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH gibi) istenildiği gibi uygulanabilir.

### **Dezavantajları**

1. Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez işlemi pek ekonomik değildir.
2. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır.
3. Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetikleri yavaştır.
4. Polimerizasyondan sonra hedef molekülü uzaklaştırmak zordur (Takeuchi ve Haginaka, 1999; Komiyama vd., 2003).

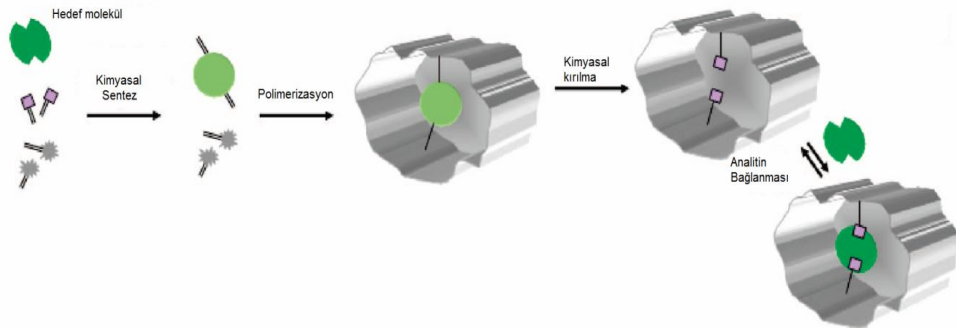
#### **1.5.2.2. Kovalent olmayan baskılama**

Mosbach ve arkadaşları moleküler baskılamada kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent bağın gerekli olmadığını ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent olmayan etkileşimlerin daha başarılı olacağını vurgulamışlardır.

Reaksiyon karışımına eklenildiğinde kovalent olmayan etkileşimler kendiliğinden gerçekleşir ve başarılı bir biçimde baskılama sağlanır. Monomer kalıp molekül bağlanması hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşim yoluyla gerçekleşmiştir. Bu yöntemle çeşitli ilaçların, insektisitlerin ve diğer pratikte önemli kimyasalların baskılamasında başarı sağlanmıştır. Birçok bilim adamı, baskılama etkisinin bu kadar çok değer taşıırken çok basit bir metotla gerçekleşmesini beklemiyorlardı. Bilim adamları, bu metodun, geniş moleküler alanda uygulanacağı yönünde ikna olmuşlar ve kendi laboratuvarlarında kullanmaya başlamışlardır (Arshady ve Mosbach, 1981; Vlatakis vd., 1993).

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması kovalent olmayan (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağı oluşumu gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır. Kovalent olmayan baskılama, kalıbın uzaklaştırma işleminin basitliği ve polimerde çok sayıda afinitesi yüksek bölgeler oluşturması nedeniyle moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında günümüzde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bu yaklaşım esnasında kalıp ve monomer arasında bağlanma gerçekleşerek özel bağlanma bölgeleri oluşur ve ardından çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyon gerçekleşir. Kovalent olmayan etkileşimde kalıp molekül olarak hidroksil, karboksil, amino ve amit gibi polar grupları olan bileşikler seçilmelidir.

Baskılanmış hedef moleküller, kovalent olmayan etkileşimler (hidrofobik, hidrojen bağı ve metal koordinasyonu gibi) yoluyla polimerle hem baskılama işlemi hem de tekrar bağlanma ile etkileşmektedir (Wulff ve Knorr, 2002; Marty ve Mauzac, 2005; Yan ve Row, 2006).



Şekil 1.9. Kovalent olmayan baskılamanın şematik görünümü (Ellen vd.,2007)

### Avantajları

1. Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur.
2. Kalıp molekül, polimerizasyondan sonra polimerden kolayca uzaklaştırılır; çünkü kovalent olmayan etkileşimler kovalent etkileşimlere göre daha zayıftır.

3. Hedef molekülün tekrar bağlanma kinetiği hızlıdır.
4. Kovalent olmayan baskılama, kovalent baskılama metoduna göre daha kolaydır ve kovalent bağlanmaya göre daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşmaktadır (Komiya vd., 2003).

### **Dezavantajları:**

1. Kovalent olmayan etkileşimleri arttırmak amacıyla uygulanabilecek polimerizasyon koşulları sınırlıdır.
2. Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir ve bağlanma seçiciliğini azaltır (Katz vd., 1999; Dong vd., 2002).

Etkili bir moleküler baskılama elde edebilmek için baskılama işleminde; fonksiyonel monomer, analit (baskılanacak molekül veya iyon), çapraz bağlayıcı, polimerizasyon için çözücü ve başlatıcı kullanılır.

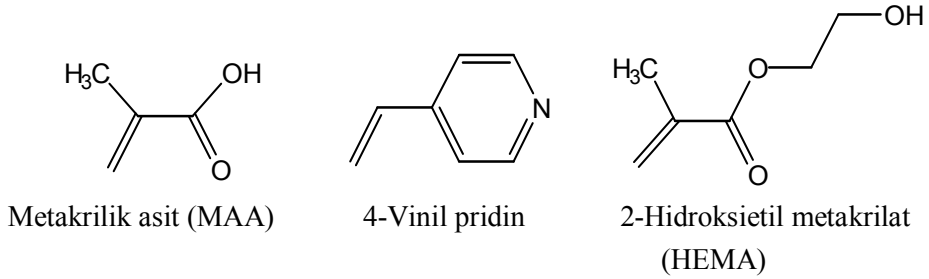
### **1.5.3. Moleküler Baskılamada Kullanılan Bileşenler**

#### **1.5.3.1. Fonksiyonel monomerler**

Baskılama işlemi esnasında monomer-kalıp kompleksinin kararlı olması için fonksiyonel monomer seçimi çok önemlidir. Fonksiyonel monomer için anahtar eleman, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun fonksiyonel bağlanma bölgelerinin sayısıdır. Kompleks oluşumu ve baskılama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerlerin ve baskılanacak molekül veya iyonun fonksiyonel gruplarının uyumu önem taşımaktadır. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip bazı fonksiyonel monomerlerin adları aşağıda verilmiştir.

Asidik Monomerler: Metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA). Bazik Monomerler: 4-vinil pridin(4-VP), 2-vinil pridin (2-VP), N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM).

Nötrale monomerler: Akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksi metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren (Cormack ve Elorza, 2004).



Şekil 1.10. Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler

### 1.5.3.2. Hedef/Kalıp molekül

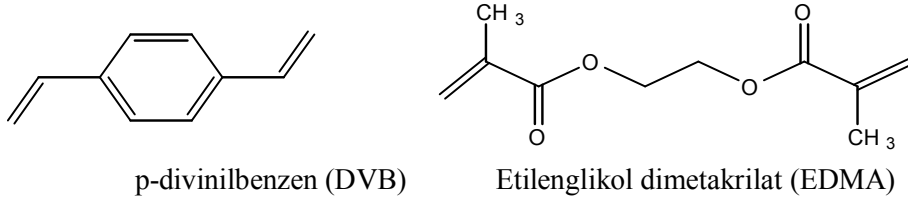
Moleküler baskılama yönteminde baskılanacak molekül veya iyon, uygun fonksiyonel gruplara sahip monomerlerle etkileşeceği için baskılanacak molekül çok önemlidir. Baskılanacak molekülün polimerleşecek grup içermesi, reaksiyonu engelleyecek veya yavaşlatacak grubun olması ve yüksek sıcaklıklarda baskılanan molekülün kararlılığı önemli parametrelerdir. Kalıp molekülde bağ yapan grupların sayısı arttıkça bağlanma etkileşimi de artmaktadır. Moleküler baskılama tekniği kullanılarak yapılan enantiomerik ayrımlarda, kalıp molekül üzerindeki fonksiyonel gruplar sistematik olarak değiştirilerek enantiomerlerin seçiciliği kıyaslanır (Sellergren, 1994). Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir (Cormack ve Mosbach, 1999).

### 1.5.3.3. Çapraz bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz halinde olması) kontrol edilmesini, baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinin de mekanik kararlılığının olmasını sağlar. Etkin bir baskılama işlemi için, çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomerler uyum içinde olmalıdır. Aksi takdirde fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri, polimerizasyon sırasında baskın çıkar ve kopolimerizasyon gerçekleşmez. Çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel

monomer arasında stokiyometrik dengenin olması gerekir. Çok büyük mol oranlarında çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimler göstererek baskılamanın etkinliğini azaltmaktadır.

Çok küçük mol oranlarında ise, kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır. Hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve yine etkin bir sonuç elde edilemez (Chapuis vd., 2004). Etilenglikol dimetakrilat (EDMA) ve divinil benzen yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır.



Şekil 1.11. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar

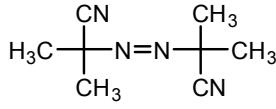
#### 1.5.3.4. Çözücüler

Baskılama yönteminin türüne bağlı olarak uygun çözücüler kullanılır. Kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda, baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu arttırma gibi bir görevi de vardır. Aynı zamanda kalıp ve fonksiyonel monomer arasında kovalent olmayan etkileşim oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için çözücü seçimi önemlidir. Ayrıca polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısını eşit yayarak, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellemektedir.

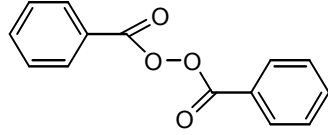
#### 1.5.3.5. Başlatıcılar

Farklı kimyasal özelliklere sahip birçok kimyasal başlatıcı, serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynak olarak kullanılmaktadır. Genellikle 2,2-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADV N) kullanılır. Monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Bu koşullarda, ısı bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir (Cormack ve Elorza, 2004).





Azobis(izobütironitril) (AIBN)



Benzoilperoksit (BPO)

Şekil 1.12. Yaygın olarak kullanılan başlatıcılar

#### 1.5.4. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulama Alanları

Moleküler baskılanmış polimerler aşağıdaki alanlarda kullanılmaktadırlar:

- Katı faz ekstraksiyonu
- Sıvı kromatografisi
- Kapiler elektroforez
- Kapiler elektrokromatografi
- Kimyasal sensör geliştirilmesi.

Son zamanlarda moleküler baskılanmış polimerler, kimyasal sensör sistemlerinde molekül tanıma membranı veya tabakası olarak kullanılmaktadırlar (Haginaka ve Kagawa, 2004). Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerler aminoasit türevlerini, ilaçları, şeker türevlerini, steroidleri, proteinleri ve protein analoglarını başarılı bir biçimde ayırma amacıyla kullanılmaktadır (Yu ve Mosbach 1997).

MIP bazlı şiral-sabit faz ayırmalarında saf enantiyomerik kalıp molekül kullanılarak kovalent ya da kovalent olmayan baskılama tekniği ile seçiciliği oldukça yüksek polimerler elde edilebilir. Kapiler elektroforez ve Kapiler elektrokromatografi yöntemlerinde baskılanmış polimerlerle kaplanmış kapilerler kullanılarak, özellikle kiral bileşiklerin, aromatik aminoasitlerin ve lokal anestetik maddelerin ayrılması gerçekleştirilmektedir. Afinite ortamı için moleküler baskılanmış polimerlerin etkinliği, katı faz ekstraksiyon (SPE) uygulamalarıyla da sağlanmaktadır. Moleküler baskılamaya dayalı SPE sorbentleri, iyi seçiciliklerinden dolayı kromatografide kullanımı gittikçe artan sorbentlerdir. Klinik, ilaç, biyokimyasal ve çevre analizlerinde birçok uygulaması olan bir yöntemdir.

Özellikle ilaçların, plazmanın, idrar ve doku homojenatı gibi biyolojik matrikslerdeki endojen bileşiklerin analizlerinde önem kazanmaktadır (Takeuchi ve Haginaka, 1999; Owens vd., 1999).

Bununla birlikte;

- Katalitik aktiviteye sahip polimerler veya yapay enzim olarak,
- Biyolojik reseptörleri taklit eden yapılar olarak,
- Biyolojik sensörler olarak,
- Seçimli difüzyonu sağlamak üzere tasarlanmış membranların yapımında,
- Ağır metal iyonlarının atık sulardan uzaklaştırılması ve aşırı metal detoksifikasyonunda kullanılmaktadır (Ramstrom ve Ansell, 1998; Mosbach ve Haupt, 1998; Takeuchi ve Haginaka, 1999; Brüggemann, 2002).

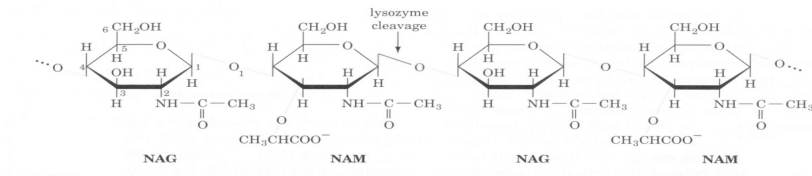
## 1.6. Lizozim

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 hücrelerde parçalanma ve patlama gözlenmiştir. Böylece Alexander Fleming, enzimi lizozim olarak adlandırmıştır. Lizozimin bakteriler, bitkiler ve hayvanları içeren çok çeşitli organizmalarca üretildiği bulunmuştur. Alexander Fleming, 1945 yılında penisilini keşfinden dolayı Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almıştır.

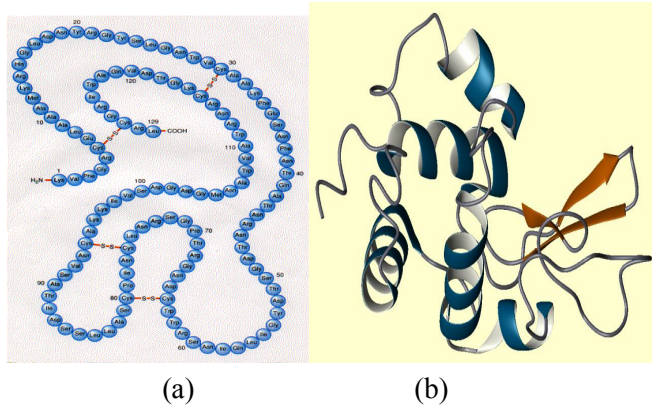
Lizozim küçük boyutu nedeniyle, daha ileri analizler için uygun bir molekül olarak düşünülmüş ve X-ışını kristolografisinin ilk örnekleri arasına konulmuştur. Lizozimin aminoasit sekansı belirlenmiş ve kristalleri X-ışını difraksiyon çalışmaları için çöktürülmüştür. 1966 yılında David Phillips, tavuk yumurta akından ekstrakte edilen lizozimin üç boyutlu yapısını tanımlamıştır. Lizozim, X ışını kristolografisi kullanılarak yapısı aydınlatılan üçüncü (1962'de won John Kendrew'in miyoglobini ve Max Perutz'un hemoglobini tanımlayarak Nobel ödülleri almasından sonra) karbohidrat bağlayan bir protein ve enzim olması açısından ilk proteindir.

### 1.6.1. Lizozim Enziminin Yapısı

Lizozim (EC 3.2.1.17), bakteri hücre duvarlarını parçalayan bir enzimdir. N-asetilmuramik asit (NAM) ile N-asetilglukoz amin (NAG) arasındaki  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidik bağımlı hidrolizleyerek ve hücre duvarı peptidoglikanlarının NAM-NAG polisakkarit bileşenini değiştirerek hücre duvarını parçalar (Şekil 1.12). Lizozim, hücrelerde ve omurgalıların salgılarında yaygın olarak bulunur. Bakterileri öldürebildiğinden dolayı sıkça insanın kendi antibiyotiği olarak da adlandırılan bir enzimdir. Biyolojik sıvıların ve dokuların yaygın bileşenidir ve yumurta akında, gözyaşında, terde, geniş getiren hayvanların sindirim sisteminde bulunur (Baker vd., 2007).



Şekil 1.13. Bakteri hücre duvarlarının NAM-NAG polisakkarit birimleri (Voet ve Voet, 1990)



Şekil 1.14. Lizozim primer (a) ve üç boyutlu (b) yapısı (Voet ve Voet, 1990)

Lizozim, mekanistik olarak en iyi anlaşılmış enzimlerden biridir. İçte çapraz bağlı 4 disülfid bağı ve 129 amino asit birimi içeren (Şekil 1.13) tek polipeptid zincirinden oluşmuş oldukça küçük bir proteindir (14,6 kD).

## 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 (Warren vd., 1981; Sava vd., 1989; Das vd., 1992). Ayrıca insan kanseri kemoterapisinde lizozimin kullanımı da rapor edilmiştir (Vacca vd., 1985; Cartei vd., 1991). İlaveten lizozimin *in vitro* insan-insan hibridoma HB4C5 hücrelerinde immunoglobulin M (IgM)'in üretimini 13 kat artırdığı rapor edilmiştir (Murakami vd., 1997). Bu sonuç, lizozimin hibridoma teknolojisi ile antikor üretimini artırmada bir ajan olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Lizozimin papaya sütü, at, eşek ve deve sütü, böcek larvası ile diğer hayvansal ve bitkisel kaynaklarda varlığı bilinmektedir ve farklı kaynaklardan lizozim saflaştırılması ile ilgili literatürde yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Ghosh ve Cui, 2000).

Moleküler baskılama bir kalıp molekülü etrafında fonksiyonel monomerlerin kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle organize edilmesi ve sonrasında uygun bir işlem süreci ile kimyasal fonksiyona sahip katı malzemelerin oluşturulmasını amaçlamaktadır. Sonuçta moleküler baskılanmış polimer için seçici bölgeler oluşmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP'ler) hazırlanmaları kolay, kararlı ve ucuzdur.

MIP'ler, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlılıkları, asitler, bazlar, metal iyonlar ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları nedeniyle oldukça dayanıklıdırlar. Ayrıca polimerlerin depolama dayanıklılıkları da çok yüksektir. Dönüşümlü derecelerde onlarca yıl muhafaza edilebilme performansı gösterir yani polimer uzun süre özelliğini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilir.

Bu bölümde moleküler baskılama tekniğiyle gerçekleştirilen çalışmalara değinilmiştir.

Odabaşı vd.,(2007), N-Metakroil-(L)-Histidin metil ester (MAH) fonksiyonel monomerini  $Cu^{2+}$  ile kompleksleştirmiş daha sonra bu kompleksleştirilmiş monomeri kullanarak yığın polimerizasyonu tekniği ile lizozim baskılanmış poli(HEMA-MAH) [Lys-MIP] polimerini sentezlemiş ve bu polimeri yumurta akından lizozim saflaştırmasında kullanmışlardır. Polimerin maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi 12,1 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon 60 dakikada dengeye ulaşmıştır.

Yüksek kompleksleşme, lizozim molekülleri ve lizozim boşluğuna sahip partikülün arasındaki geometrik afiniteden dolayı adsorpsiyonun hızla dengeye geldiği düşünülmüştür. Bağlı seçicilik katsayısı lizozim baskılanmış tanınma bölümlerinin adsorpsiyon afinitesini gösterir.

Lizozim/insan serum albumin ve lizozim/sitokrom-c için baskılanmış polimerin baskılanmamış polimere göre bağlı seçicilik katsayısı sırası ile 3,6 ve 4,1 kat daha yüksek bulunmuştur. Sentezlenmiş olan polimer [Lys-MIP] adsorpsiyon kapasitesini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılmıştır.

Şener vd., (2009), lizozim varlığında MAH ve EDMA'nın miniemülsiyon polimerizasyon reaksiyonunda, baskılanmış nanopartiküller hazırlamışlardır. SPR biyosensörü, altın yüzeyin lizozim baskılanmış poli(etilen glikol metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metil ester) poli(EDMAH) nanopartikülleri ile modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Nanopartiküller, geçirgenlik elektron mikroskobu (TEM) ve zeta boyut analizi ile karakterize edilmiştir. Partikül büyüklüğü, TEM görüntülerine göre yaklaşık 50 nm bulunmuştur. Lizozim baskılanmış poli(EDMAH) nanopartiküllerin seçiciliğini göstermek için lizozim, sığır serum albümini (BSA) ve sitokrom c'nin yarışmacı adsorpsiyonu araştırılmış ve baskılanmış nanosensörün lizozim için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Hjerten vd., (1997) ve Huang vd.,(2005), protein ayırma uygulamalarında amfoterik baskılanmış polimerler geliştirmişlerdir. Çapraz bağlayıcı (BisA) ve iki fonksiyonel monomer (MAA ve N-[3-(dimetiamino)propil]metakrilamit) varlığında süspansiyon polimerizasyon yöntemiyle lizozim ve BSA baskılanmıştır.

Bu polimerler kapasite ve seçiciliği belirlemek için kromatografide durgun faz olarak kullanılmıştır. Çoklu elektrostatik etkileşimlerden dolayı lizozim karşılıklı polimerine seçici olarak bağlanmıştır.

Ou vd., (2004), daha ileri bir metot kullanarak lizozim baskılamışlardır. Fonksiyonel monomer olarak MAA ve AAm, çapraz bağlayıcı olarak 2-(dimetilamino)etilmetakrilat kullanılmıştır. NaCl çözeltisi ve daha sonra su ile kalıp molekül uzaklaştırılmıştır (bu ılımlı elüsyon koşulu Hjerten ve Huang'ın asit yıkama adımıyla karşılaştırılmıştır). Ayrıca baskılanmış polimerin baskılanmamış polimere göre bağlı seçicilik katsayısı sırası ile 1,83-3,38 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu şekilde çıkmasının nedeni olarak orijinal hedef molekülün %25'inin polimer içerisinde olduğu gibi kaldığı kaydedilmiştir.

Hirayama vd., (2001), lizozim baskılanmış polimer tabaka ile kaplı silika küreler oluşturmuşlardır. Bunun için lizozim, yüzeyi modifiye edilmiş silika küreler ve çapraz bağlayıcılar bulunduran fosfat tamponu içinde akrilamid ve akrilik asit veya akrilamid ve N,N,-dimetilaminopropil polimerize edilmiştir. Sonuç olarak silika küreleri yüzeyinde lizozim tanıma bölgeleri ihtiva eden polimer tabaka oluşturulmuştur. Modifiye silika kürelerin modifiye edilmemiş silika kürelere kıyasla daha seçici bir şekilde lizozimi adsorpladığı gözlenmiştir. Lizozim tanıma bölgesi içeren moleküler baskılanmış polimer tabakası ile Quartz crystal microbalance(QCM) sensor yapılmış ve QCM sensörü lizozime karşı yüksek seçicilik göstermiştir.

Lu vd., (2006), manyetik duyarlı protein baskılanmış soft-jel kompozit mikroküreleri (MS-PIGMs) süspansiyon polimerizasyonu kullanarak hazırlamışlardır. Hedef molekül olarak lizozim ve BSA kullanılmıştır. Baskılanmış polimerlerin hedef moleküllerine karşı yüksek adsorpsiyon seçiciliği ve moleküler tanıma spesifikliği gösterdiği gözlenmiş ve baskılamanın polimer jel mikrokürelerin adsorpsiyon seçiciliğini arttıracığı ispatlanmıştır.

Lin vd., (2006), moleküler baskılama ve mikrokontakt baskılama tekniklerinin kombinasyonu ile yapay antibadi olarak ince film hazırlamayı amaçlamışlardır.

Bu çalışmada, seçilen hedef moleküle uygun çapraz bağlayıcının önemi araştırılmış ve uzatıcı kollara sahip monomerlerin yüksek baskılama gösterdiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak MIP de çapraz bağlayıcı monomerlerin seçim

önemi çalışılmıştır. Hekzametildisilazan ile önceden işleme tabi tutulmuş cam yüzeye lizozim, ribonükleaz A ve miyogloblin adsorbe edilmiştir. Aynı zamanda lizozim bağlamada en seçici çapraz bağlayıcının tetraetilenglikol dimetakrilat (TEGMA), miyogloblin ve ribonükleaz A için ise polietilenglikol 400 dimetakrilat (PEG400DMA) olduğu gözlenmiştir.

Zhang vd., (2009), Akriloil  $\beta$ -siklodekstrin ve yardımcı fonksiyonel monomer olarak akrilamid kullanılarak baskılanmış polimer hazırlamışlardır. Langmuir adsorpsiyon modeli ile maksimum adsorpsiyon kapasitesi hesaplanmıştır. Sonuçlar lizozim baskılanmış silika kürelerin karışım içerisinde lizozimi yüksek seçicilikle ve etkili biçimde ayırdığı gözlenmiştir.

Bereli vd., (2008), bu çalışmada, lizozim baskılanmış süpermakrogözenekli kriyojeller sentezleyerek yumurta akından lizozim enziminin saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. N-metakriloil-(L)-histidinmetilester(MAH) metal koordinasyon monomer olarak seçilmiştir.  $Cu^{2+}$  MAH ile kompleksleştirilmiş ve lizozim baskılanmış poli(HEMA-MAH)[Lyz-MIP] kriyojel N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) başlatıcı varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile oluşturulmuştur.

Lizozimin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 22,9 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Lizozim/insan serum albumin ve lizozim/sitokrom-c için baskılanmış polimerin baskılanmamış polimere göre bağlı seçicilik katsayısının sırası ile 4,6 ve 3,2 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sentezlenmiş olan Lyz-MIP kriyojel adsorpsiyon kapasitesini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılmıştır.

Matsunaga vd., (2007), akrilik asit ve N,N'-metilenbisakrilamidin radikal kopolimerizasyonu ile yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör üzerine lizozim seçiciliği için moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) hazırlamışlardır, N,N',-bis(akriloil)sistamin ile modifiye edilen altın kaplı SPR sensör üzerine MIP ince filmler kovalent olarak bağlanmıştır. Polimerizasyon esnasında ve tekrar bağlanma testlerinde optimum konsantrasyondaki NaCl varlığının hedef proteini belirlemede seçiciliği artırıcı etkide olduğu gözlenmiştir.

Shi vd., (1999), radyo-frekans akkor boşalma plazma birikimi ile polimerik ince filmler oluşturmuşlardır. Disakkaritler polimer filme kovalent olarak bağlanmış, oluşan polisakkarit benzeri oyuklar çeşitli hedef proteinlerin (lizozim,

immunoglobülin G, ribonükleaz ve streptavidin) tanınmasında yüksek seçicilik sergilemişlerdir. Lizozim baskılanmış polimerde, lizozimin adsorpsiyonun ribonükleaz'a göre 26 kat daha seçici olduğu gözlenmiş ve hedef moleküle spesifikliği doğrulanmıştır.

Küçük boyutlardaki biyomoleküllerin baskılanmasına dayalı birçok farklı çalışma mevcuttur, ancak nispeten oldukça büyük kalıplar olan proteinlerin baskılanmasına ilişkin çalışmalara daha az rastlanmaktadır. Proteinlerin baskılanmasının güç olmasının nedenleri büyük kalıpların düşük rijiditeleri ve baskılama sırasında bağlanma kavitelerindeki azalmadır. Dahası protein gibi büyük biyomoleküllerin ikincil ve üçüncül yapıları ısı veya ışına maruz kaldığında etkilenebilmektedir. (Mahony vd., 2005). Yine de son zamanlarda protein kalıplarının uzaklaştırılması ve yeniden yüklenmesiyle ilgili bazı ileri düzeyde çalışmalar yapılmıştır (Hawkins vd., 2005).



## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Materyal

#### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Lizozim, triptofan, poli(vinil alkol) (PVA), sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat (APS), sodyum bikarbonat ve sodyum bisülfat Sigma (St. Louis, ABD) firmasından temin edildi. 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) Fluka AG (İsviçre) firmasından sağlandı ve kullanılmadan önce düşük basınç altında damıtılarak polimerizasyon inhibitörlerinden arındırıldı. Soyum klorür, amonyum sülfat ve sodyumsülfat analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlandı.

#### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. Monomerlerin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü-Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskopu (SEM, Phillips XL-30S FEG), kullanılmıştır. Lizozim adsorpsiyon kapasitesi verileri Shimadzu UV 1601 UV-Görünür Bölge Taramalı Spektrofotometresi ile elde edilmiştir. Miniemülsiyon oluşumu, homojenizatör ile (T10, Ika Labortechnik, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Polimeri yıkama ve çöktürme işlemleri için santrifüj (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) kullanılmıştır.

### 3.2. Yöntem

Sunulan çalışma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları dört ana grup altında toplamak mümkündür. Bu ana gruplar:

- Pseudospesifik ligand N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) sentezi,
- Lizozim baskılanmış poli(HEMA-MATrp) ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) hazırlanması

- Pseudospesifik ligand MATrp ile baskılanmış polimerik nanoyapıların karakterizasyonu,
- Lizozim baskılanmış polimerde lizozim adsorpsiyon ve desorpsiyon şartlarının optimizasyonunun kesikli sistemde incelenmesidir.

### 3.2.1. N-Metakriloil-(L)-Triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezlenmesi

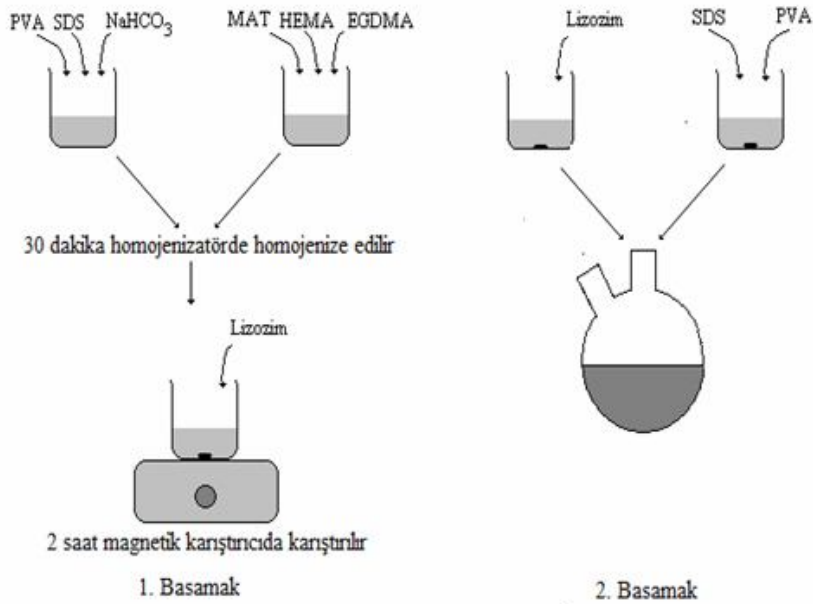
N-Metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.0 g L-triptofan ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuştur. 14.0 g trietilamin bu çözeltiye ilave edilmiştir. 4.0 mL metakroil klorür yavaşça bu çözeltinin üstüne dökülmüştür. Bu reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım N-Metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) etanolde çözülmüştür. Bu çalışma Hacettepe üniversitesinde gerçekleşmiştir.

### 3.2.2. Lizozim Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) Nanopartiküllerin Hazırlanması

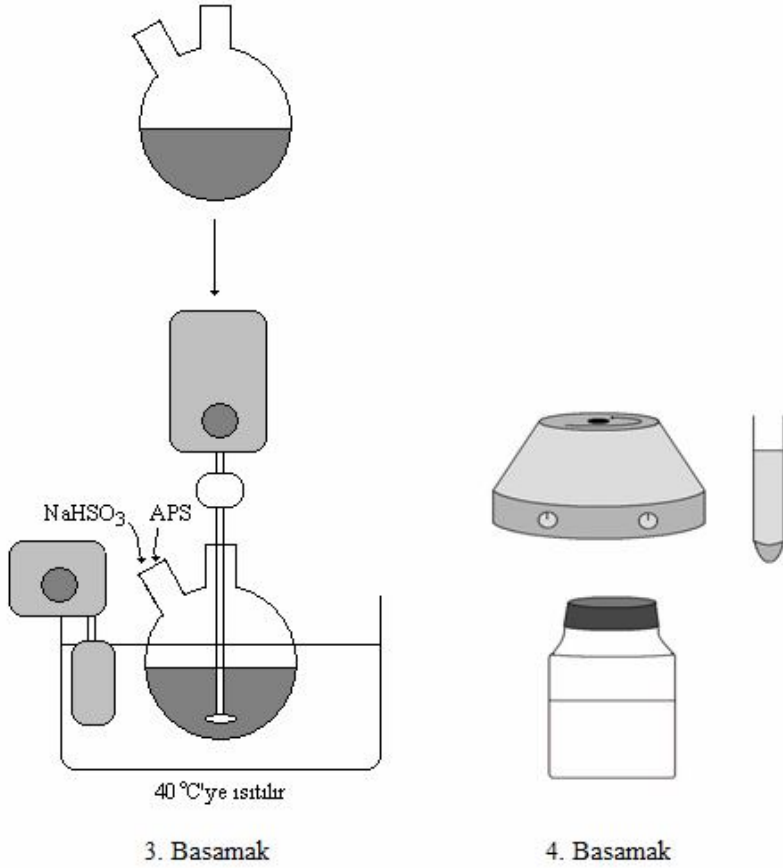
Lizozim baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir. Polimerizasyon ikili sıvı faz karışımında gerçekleştirilmiştir. Birinci sıvı faz, PVA (0,187 g), SDS (28,9 mg) ve sodyum bikarbonat (23,4 mg)'ın sulu çözeltisidir (10 mL). İkinci sıvı faz, PVA (0,1 g) ve SDS (0,1 g)'nin sulu çözeltisidir (200 mL). Monomer fazı ise; MATrp monomeri (1,34 mL), HEMA (0,7 mL), EGDMA (1,4 mL) kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklenmiştir. Karışım, miniemülsiyon elde etmek için 25.000 rpm'de homojenize (T10, Ika Labortechnik, Almanya) edilmiştir. Daha sonra, kalıp protein (lizozim, 0,94 µmol) miniemülsiyona eklenmiş ve etkin monomer-kalıp etkileşimini gerçekleştirmek için manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi devam ederken kalıp molekülü içeren miniemülsiyon yavaşça ikinci sıvı faza eklenmiştir. Daha sonra karışım cam polimerizasyon reaktörüne aktarılmıştır. Reaktör mekanik olarak karıştırılmış (400 rpm) ve 40°C'ta ısıtılmıştır. Son olarak, sodium bisülfid (0,115 g) ve amonyum persülfat (0,126 g) karışıma eklenmiştir. Polimerizasyon 40°C'ta 24 saat süreyle

devam ettirilmiştir. Elde edilen lizozim baskılanmış nanopartiküller 5 kez deiyonize su, 5 kez etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkılarak reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırılmıştır. Her bir yıkama basamağı için çözelti 9000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiş (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) ve nanopartiküller yıkama ortamından ayrılmıştır. Yıkama işleminden sonra kalıp molekül olan lizozimin polimerik yapıdan uzaklaştırılabilmesi amacıyla 1 M Etilen glikol çözeltisi kullanılmıştır. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde tekrar dağıtılmış ve 4°C'de saklanmıştır.

Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküller polimerizasyon ortamında kalıp molekül (lizozim) olmaksızın aynı yöntem ile hazırlanmıştır.



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



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

### 3.2.3. HEMA-MATrp Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

#### 3.2.3.1. Elementel analiz

Sentezlenen p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin, MATrp içeriğinin belirlenmesi için, elementel analiz cihazı kullanıldı. Elementel analizlerin belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlendi. Polimerik nanoyapılar (1,0 mg) elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum örnek hücreesine yerleştirilerek  $\pm 0,0001$  g duyarlılıkla tartıldı. Polimerik nanoyapılar cihaza konularak yakma işlemi sonucunda % karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O) ve azot (N) analizi yapıldı.

### 3.2.3.2. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri

Baskılanmış ve baskılanmamış HEMA-MATrp polimerlerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir. Bunun için kurutulmuş nanopartiküller (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış, tablet haline getirilmiş ve 4000-450  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekilmiştir.

### 3.2.3.3. 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. Ölçümler İYTE’de gerçekleştirildi.

### 3.2.3.4. 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. Bu çalışma Hacettepe üniversitesinde gerçekleştirildi.

### 3.2.3.5. Zeta boyut analizi

Sentezlenen polimerlerin zeta boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edildi. Bu amaçla zeta boyut analizi cihazının örnek haznesine 1 mL polimer çözeltisi enjekte edilerek yüzey yükü ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler Hacettepe üniversitesinde gerçekleştirildi.

### 3.2.3.6. Yüzey alanının hesaplanması

Sentezlenen p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin yüzey alanlarının bulunması için 1 ml süspansiyondaki partikül sayısını veren aşağıdaki eşitlikten (Leigh B.

Bangs, Uniform Latex particles, Seragen Diagnostics Inc., Third Edition, 1987, Indianapolis) yararlanıldı;

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

Burada N, 1 ml süspansiyondaki nanopartikül sayısı; S, % katı; d, çap ( $\mu\text{m}$ );  $\rho_s$ , polimer yoğunluğunu (g/ml) göstermektedir.

Nanopartiküllere ait çizilen kütle-hacim standart grafiğinden yararlanılarak ml süspansiyondaki mg nanopartikül sayısı teorik olarak saptandı. Elde edilen bu verilerden yararlanarak aşağıdaki kürenin yüzey alanı eşitliği de kullanılıp, sentezlenen p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin spesifik yüzey alanı  $\text{m}^2/\text{g}$  cinsinden hesaplandı.

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

Burada  $\pi$ , 3.14; r, nanopartikül yarıçapını (m) göstermektedir.

#### **3.2.4. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) Polimerine Lizozim Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi**

Sentezlenen baskılanmış p(HEMA-MATrp) 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, zaman ve adsorpsiyon süresinin etkisi incelendi. Çözeltilerdeki lizozim derişimi tayini 280 nm'de spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Polimerik nanoyapılara lizozim adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi için ise Eşitlik 3.3 kullanılmıştır.

$$q = [(C_0 - C)V]/m \quad (3.3)$$

Burada q, birim nanoyapı üzerine adsorplanan lizozim kütlesini (mg/g);  $C_0$  ve C sırasıyla, nanoyapılar ile lizozimin etkileştirilmeden önceki ve nanoyapılar ile lizozimin etkileştirilmeden sonraki derişimlerini (mg/mL); V, hacmi (mL); m, deneylerde kullanılan nanoyapı kütlesini (g) göstermektedir.

### 3.2.5. Seçicilik Deneyleri

Seçicilik denemelerinde BSA ve sitokrom-c molekülleri kullanılmış ve BSA ve sitokrom-c için lizozim molekülerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (3.4)$$

Eşitlikte  $K_d$  dağılma katsayısını;  $C_i$  ve  $C_f$  biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini,  $V$  kullanılan çözelti hacmini (mL) ve  $m$  polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

Yarışmacı türler varlığında biyomolekülün bağlanması için seçicilik katsayısı Eşitlik 3.5'e göre denge bağlanma verilerinden elde edilebilir.

$$K = K_{\text{kalıp}}/K_{\text{girişimci}} \quad (3.5)$$

Baskılanmış polimerik nanoyapılar diğere biyomoleküllerin  $k$  değerleri baskılama seçiciliği hakkında yorum yapılmasına olanak verir. Bağlı seçicilik katsayısı aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır:

$$k' = k_{\text{baskılanmış}}/k_{\text{kontrol}} \quad (3.6)$$

### 3.2.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Lizozim desorpsiyonu için desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M Etilenglikol kullanıldı. Desorpsiyon deneyleri, adsorpsiyon amacıyla da kullanılan kesikli sistemde incelendi. Lizozim adsorplanmış polimerik nanoyapılar, desorpsiyon ortamında oda sıcaklığında, 1 saat 600 rpm hızda sürekli karıştırıldı. Desorpsiyon ortamındaki lizozim miktarı 280 nm'de spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Desorpsiyon oranı Eşitlik 3.7 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan lizozim}}{\text{Adsorplanan lizozim}} \times 100 \quad (3.7)$$

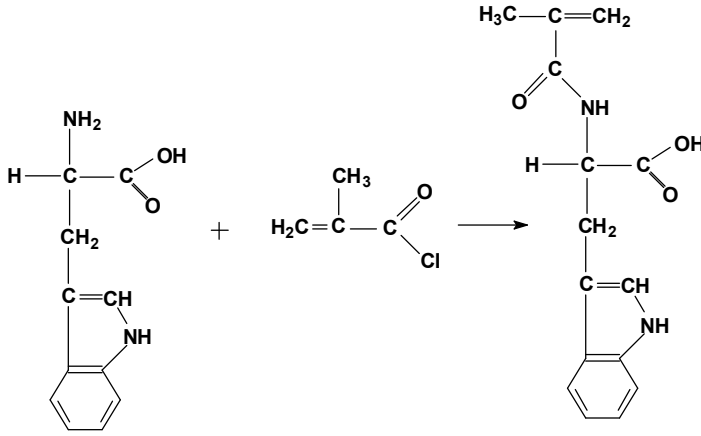
Baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanoyapılarının tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı nanopartiküller kullanılarak adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlandı. Her desorpsiyon işlemi sonrasında, p(HEMA-MATrp) nanoyapıları, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH ile yıkandı.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

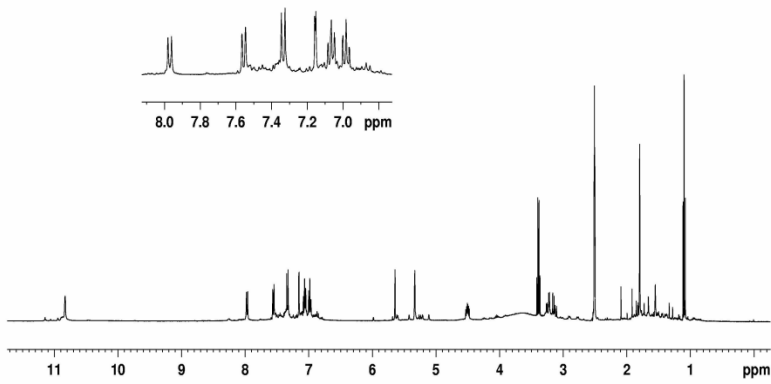
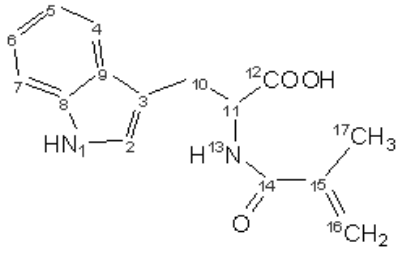
### 4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

MATrp monomeri L-triptofan ve metakroil klorürün reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.1).

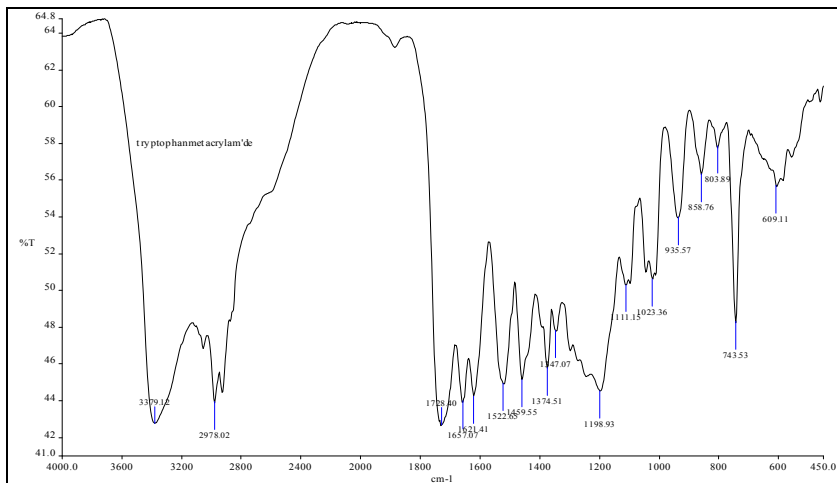


Şekil 4.1. MATrp monomerinin elde edilmesi

Elde edilen MATrp monomerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu Şekil 4.2’ de verilmiştir. İlgili protonlara ait karakteristik pikler şekil üzerinde işaretlenmiştir. Bu karakteristik pikler şunlardır: 3H,  $^{17}\text{CH}_3$  1.80(s), 2H,  $^{10}\text{CH}_2$  3.42-3.36(q); 1H,  $^{11}\text{CH}$  4.50-4.51(m); 1H,  $^{16}\text{CH}_2$  5.33(s); 1H,  $^{16}\text{CH}_2$  5.64(s); 1H,  $^{13}\text{NH}$ (amid) 7.15(d); 5H,  $^{4,5,6,7,2}$ indol 7.15-7.57(m); 1H,  $^1\text{NH}$ (indol) 8.25(d); 1H,  $^{12}\text{OH}$ (asit) 11.1(s). MATrp monomerinin FTIR spektrumu Şekil 4.3’de gösterilmiştir. MATrp’nın FTIR spektrumunda sırasıyla  $1533\text{ cm}^{-1}$  (NH eğilme),  $1454\text{-}1391\text{ cm}^{-1}$  (CN aromatik), and  $1657\text{ cm}^{-1}$  (C=O amid) pikleri görülmektedir.



Şekil 4.2. MATrp monomerinin NMR spektrum



Şekil 4.3. MATrp monomerinin FTIR spektrum

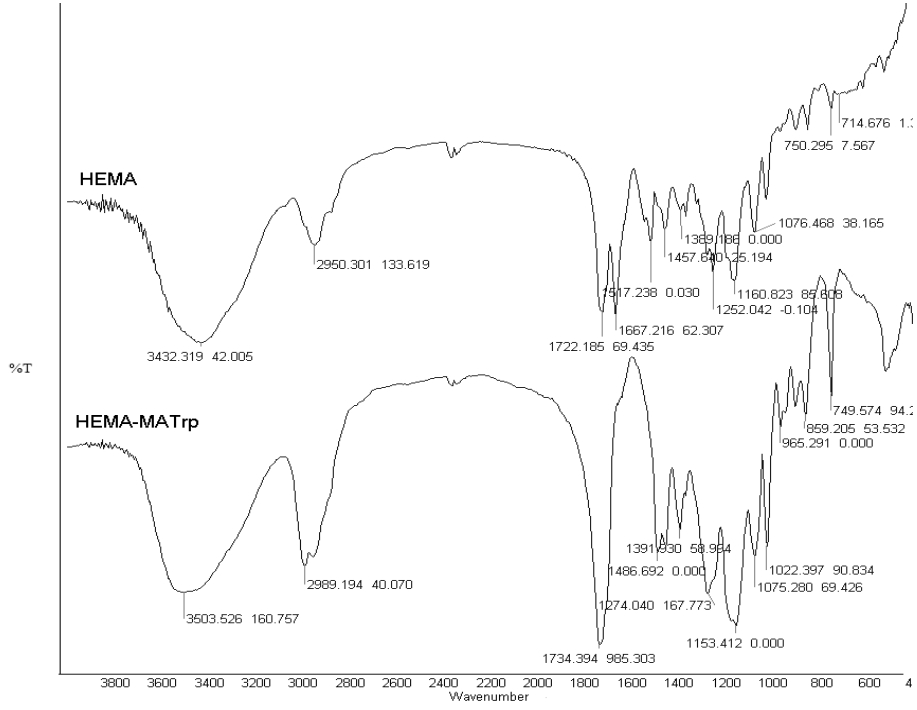
## 4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

### 4.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

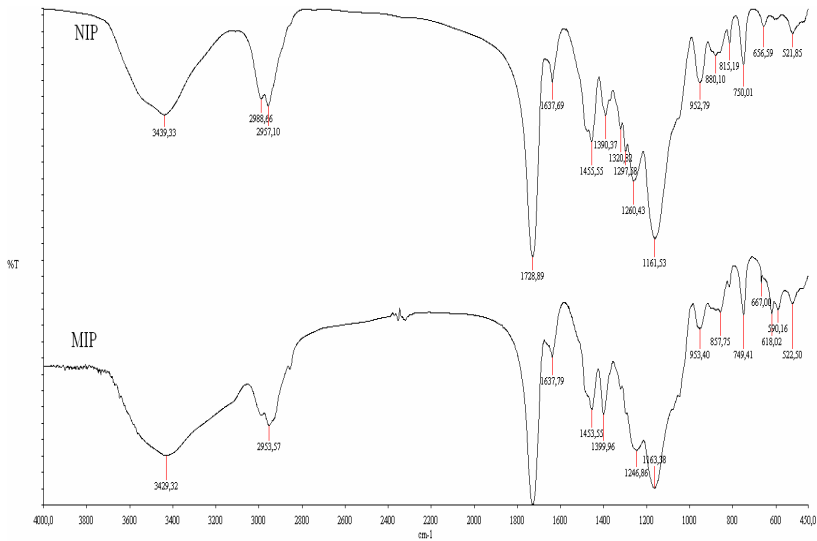
Baskılanmamış ve Lizozim baskılanmış partiküller FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) komonomer ve kalıp molekül Lizozim'in non-kovalent bağlanması için ligand kompleksleyici ajan olarak seçilmiştir. İlk basamakta, triptofan ve metakroil klorürden MATrp sentezlenmiştir. Daha sonra MATrp molekülleri ve lizozim ile ön kompleks oluşturulmuştur. Sonraki basamakta, MATrp/Lizozim ön kompleksi HEMA-EGDMA monomerleri varlığında polimerleştirilmiştir. Baskılanmamış partiküller de kalıp molekül Lizozim olmaksızın benzer şekilde hazırlanmıştır.

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi hem p(HEMA) hem de p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin -OH gruplarının gerilme titreşimi sırasıyla yaklaşık  $3432\text{ cm}^{-1}$  ve  $3503\text{ cm}^{-1}$  civarında gözlenmiştir. p(HEMA-MATrp) nanoyapılarının  $3503\text{ cm}^{-1}$  civarında yaptığı pik p(HEMA) nanoyapılarının  $3432\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikten daha geniş olmasının nedeni p(HEMA-MATrp) nanoyapılarının yapısındaki -NH gerilme titreşimlerinin de bu pikin içinde yer almasından kaynaklanabilir.

Proteinlerin FTIR spektrumu bu tür moleküllerin tümünde görüldüğü üzere karakteristik amid absorpsiyon bantları gösterirler (CONH). Protein zincirlerinin amid gruplarının karakteristik bantları sekonder amidlerin absorpsiyon bantları ile benzerdir. Proteinlerin ikincil yapısının analizinde en kullanışlı infrared bandı yaklaşık  $1700\text{ cm}^{-1}$  civarında gözlenen amid I bandıdır. Bu titreşimin tam frekansı C=O ve N-H gruplarının hidrojen bağ doğasına ve bu da proteinin ikincil yapısına bağlıdır. MIP ve NIP partikülleri şekil 4.5'de benzer pikler gösterdiler. Bunun nedeni aynı koşullarda sentezlenmeleri ve aynı fonksiyonel gruplara sahip olmalarıdır.



Şekil 4.4. p(HEMA) ve p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin FTIR spektrumu



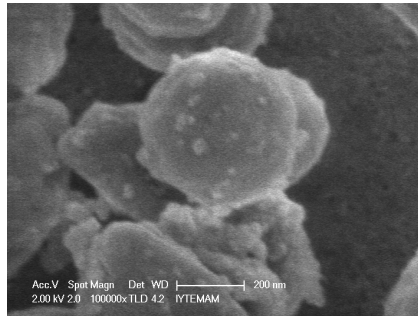
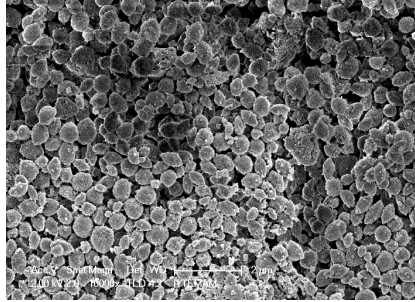
Şekil 4.5. Lizozim baskılanmış(MIP) ve baskılanmamış(NIP) nanopartiküllerin FTIR spektrumu

#### 4.2.2. Elementel Analiz

Poli(HEMA-MATrp) partiküllerin yapısına ilave edilen MATrp miktarını belirlemek üzere elementel analiz ölçümleri yapılmıştır. Yapıya ilave edilen MATrp miktarı azot sitokiyometrisinden faydalanılarak bulunmuştur. HEMA'nın yapısında azot bulunmadığına dikkat edilmelidir. Polimerik yapıya ilave edilen azotun kaynağı sadece MATrp'dır. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelerin elementel analiz sonuçları sırasıyla 0.85  $\mu\text{mol/g}$  nanoküre ve 0.87  $\mu\text{mol/g}$  nanoküre olarak bulunmuştur.

#### 4.2.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

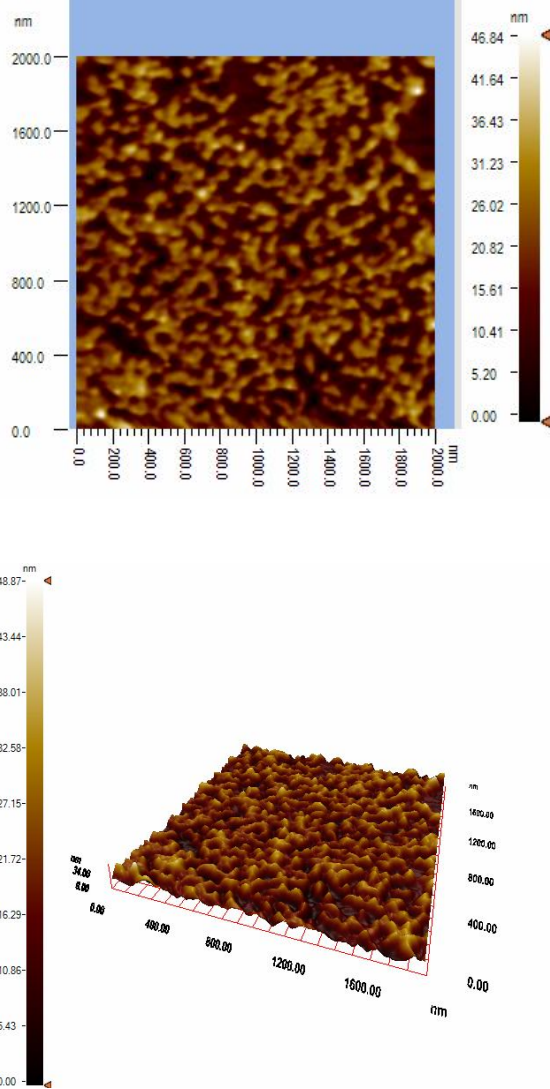
Şekil 4.6'da Baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin SEM fotoğrafı görülmektedir. Emülsiyon polimerizasyonu sonucunda elde edilen nanopartiküller yaklaşık 260 nm boyutunda ve gözeneksiz yüzeye sahiptirler.



Şekil 4.6. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin SEM fotoğrafları

#### 4.2.4. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

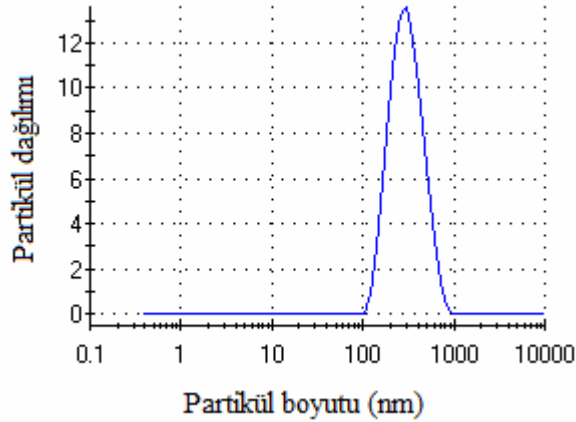
AFM ile büyüklük ve yüzey morfolojileri incelenir (Kumar ve Lehr, 2004). Şekil 4.7’de sentezlenen polimerik nano yapıların üç boyutlu AFM fotoğrafı görülmektedir. Fotoğraflara bakıldığında, sentezlenen nanopartiküller boy ve boy dağılımlarının oldukça dar ve küresel olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin AFM fotoğrafları

#### 4.2.5. Zeta Boyut Analizi

Şekil 4.8’de lizozim baskılanmış nanopartiküllerin zeta boyut analizi sonuçları görülmektedir. Lizozim baskılanmış partiküllerin ortalama boyutu 261 nm’dir ve partiküllerin polidispersitesi 1,203 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri

#### 4.2.6. Yüzey Alanının Hesaplanması

p(HEMA-MATrp) nanopartikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile 261 nm boyutunda üretilmiştir. p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin yüzey alanı 1648 m<sup>2</sup>/g olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında oldukça geniş bir yüzey alanı sağlanabildiğini ifade etmektedir. Odabaşı ve Denizli (2007), lizozim adsorpsiyonu için 22.9 m<sup>2</sup>/g yüzey alanına sahip lizozim baskılanmış p(HEMA-MAH-Cu(II)) partiküllerini sentezlemişlerdir. Yılmaz (2009), lizozim adsorpsiyonu için 50.0 m<sup>2</sup>/g spesifik yüzey alanına sahip hidrofobik kriyojel sentezlemişlerdir. Öncel (2005), 19.1 m<sup>2</sup>/g spesifik yüzey alanına sahip lizozim adsorpsiyonu için p(HEMA-MAPA) küreleri sentezlemişlerdir. Ruckenstein ve Zeng (1997), lizozim adsorpsiyonu için 1,6 m<sup>2</sup>/g yüzey alanına sahip makrogözenekli kitin membranlarını sentezlemişlerdir. Uygun (2008), lizozim adsorpsiyonu için 580,0 m<sup>2</sup>/g spesifik yüzey alanına sahip mag-nano-p(HEMA-MAPA) polimerini sentezlemiştir.

Bulunan bu oldukça geniş yüzey alanı değeri, düşük kütle transfer sınırlamaları oluşturduğundan dolayı oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılabilmesini sağlamaktadır (Kim vd., 2006; Jia, vd., 2003).

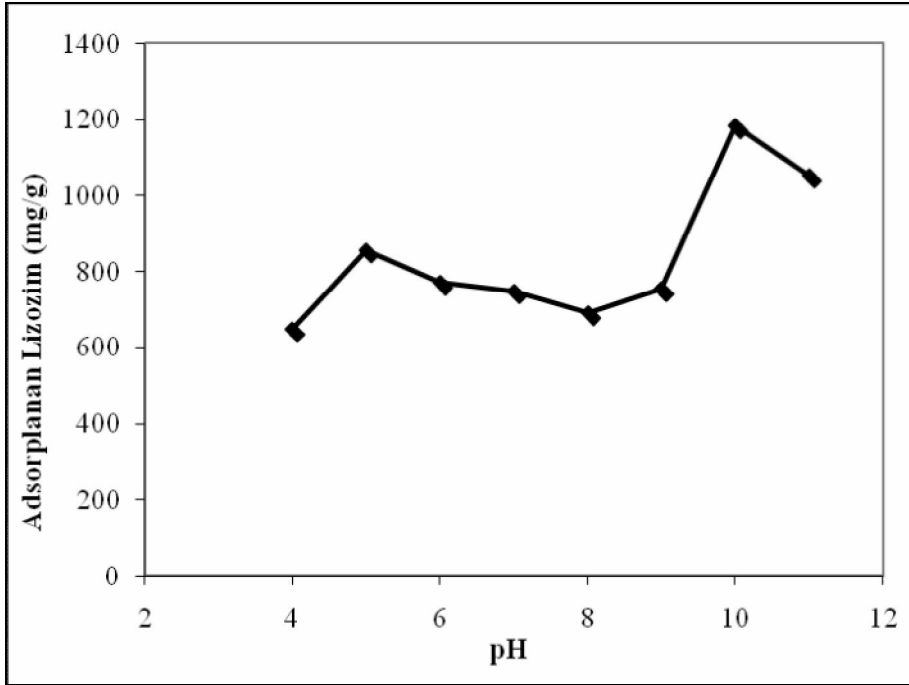
Nanopartiküllerin birim kütlesi başına düşen yüzey alanı geniş olduğundan dolayı, nanopartiküller üzerine enzim bağlanması etkili bir şekilde başarılabilir. Dahası, nanopartiküller, enzim adsorpsiyonunda optimizasyon çelişkilerine minimum difizyonel sınırlılık, birim kütle başına maksimum yüzey alanı, yüksek miktarlarda enzim bağlama gibi ideal çareler de sunar.

### **4.3. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) Polimerine Lizozim Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi**

#### **4.3.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi**

Şekil 4.9’da farklı pH değerlerinde lizozim adsorpsiyon kapasitesi gösterilmektedir. Adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini göstermek için farklı tampon sistemleri kullanılmış ve pH 4.0–11.0 arasında çalışılmıştır (pH 4.0–6.0 için 0.1 M  $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 7.0–9.0 için 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 10.0–11.0  $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{NaHCO}_3$  ). p(HEMA-MATrp) nanoyapıların maksimum lizozim bağlama kapasitesi pH 10.0’da, 1182,8 mg lizozim/g polimer olarak bulunmuştur. pH 10,0’dan yüksek ve düşük pH değerlerinde lizozim adsorpsiyonu azalmıştır. Lizozimin izoelektrik noktası 11,2 dir. İzoelektrik noktada proteinler yüksüz olduklarından izoelektrik noktaya yakın pH’larda elektrostatik etkileşimler minimum, hidrofobik etkileşimler ise maksimumdur. pH 10,0’da maksimum adsorpsiyonun gözlenmesi sentezlenen nanopartiküle protein moleküllerinin bağlanmasında hidrofobik etkileşimlerin oranının yüksek olduğunu göstermektedir.



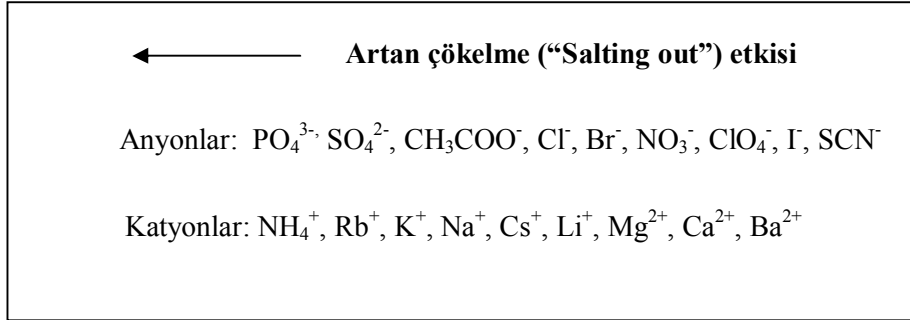


Şekil 4.9. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonu üzerine pH' ın etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 1,0 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

#### 4.3.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Tuz Türünün ve Derişiminin İncelenmesi

Çalışmanın bu bölümünde lizozim adsorpsiyonuna tuz türünün ve derişiminin etkisi incelenmiştir. bu bağlamda hazırlanan lizozim çözeltilerine sodyum klorü, sodyum sülfat ve amonyum sülfat eklenmiştir. Hidrofobik adsorpsiyonda kullanılan tuz tipi, hidrofobik etkileşim 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 (Pählman vd., 1977; Roe, 1989).

Proteinlerin çökmesinde bazı anyon ve katyonların Hofmeister serisi.

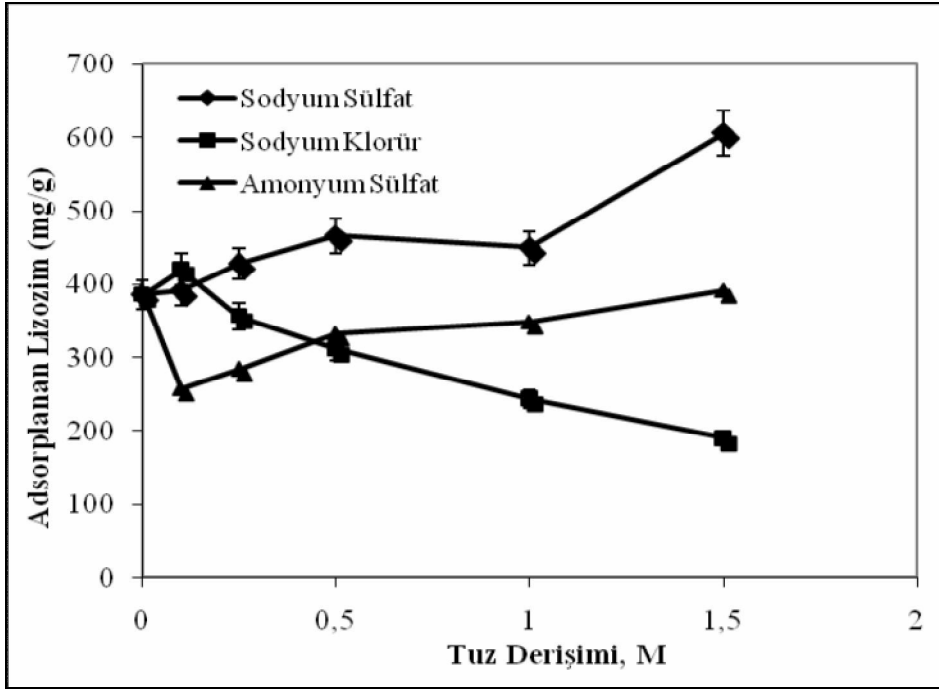


**Artan kaotropik (“salting in”) etki** →

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



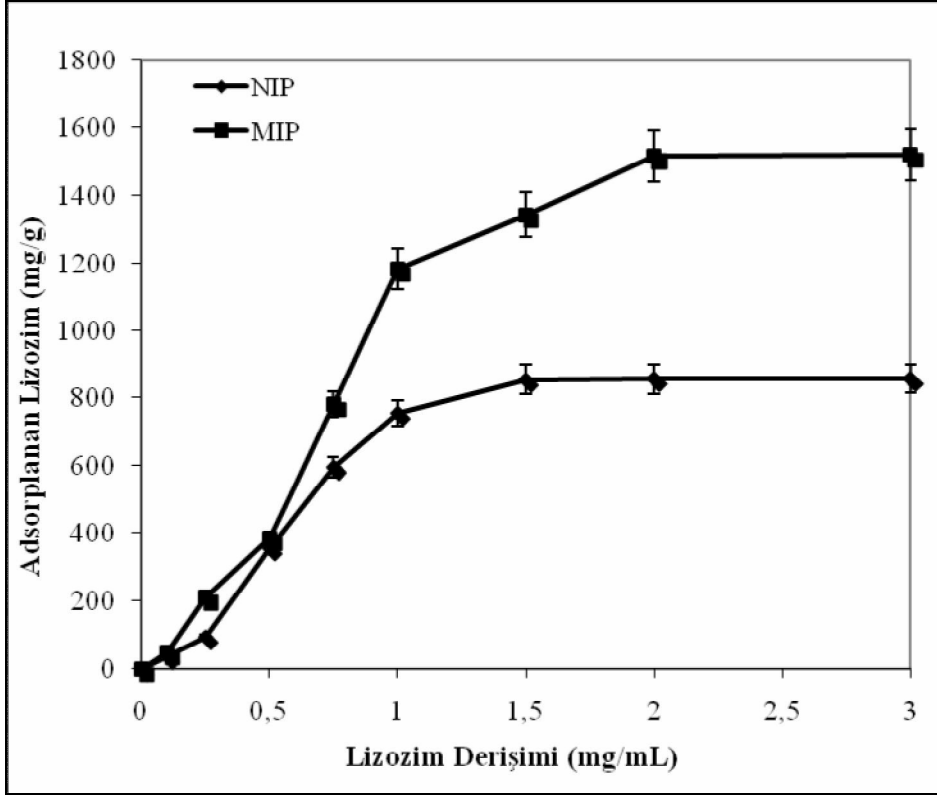
Şekil 4.10’da görüldüğü üzere, adsorpsiyon kapasitesindeki bu değişimler tuzların varlığında su moleküllerinin yapısının bozulması ve yüzey gerilmesinin azalması nedeniyle açıklanabilir. Sülfat iyonlarının varlığında adsorpsiyon kapasitesi artarken sodyum klorür varlığında azalmaktadır. Bu durum tek değerlikli iyonların moleküller arası köprü kurma özelliklerinin az olmasına ve iyonik itme kuvvetlerine bağlıdır, sülfat iyonları ise moleküller arası köprüler kurarak hem hidrofobik etkileşimleri hem de adsorpsiyonu artırmaktadırlar.



Şekil 4.10. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna farklı tuzların ve iyonik şiddetin etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C; pH: 10,0

#### 4.3.3. Adsorpsiyona Lizozim Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.11’de lizozim başlangıç derişiminin adsorpsiyona olan etkisi görülmektedir. Çözeltideki lizozim derişiminin artmasıyla gram nano partikül başına adsorplanan lizozim miktarı artmakta ve 2 mg/mL lizozim derişiminde doyunluğa ulaşmaktadır. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartikülleri için gözlenen eğrinin başlangıç doğrusal kısmı, MATrp grupları içeren Baskılanmış p(HEMA-MATrp) nano partikülleri ile lizozim arasındaki yüksek afiniteyi göstermektedir. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 25 °C’de 1514,6 mg/g polimer olarak bulunurken baskılanmamış p(HEMA-MATrp) üzerine maksimum adsorpsiyon 856,3 mg/g nanopartikül olarak bulunmuştur.



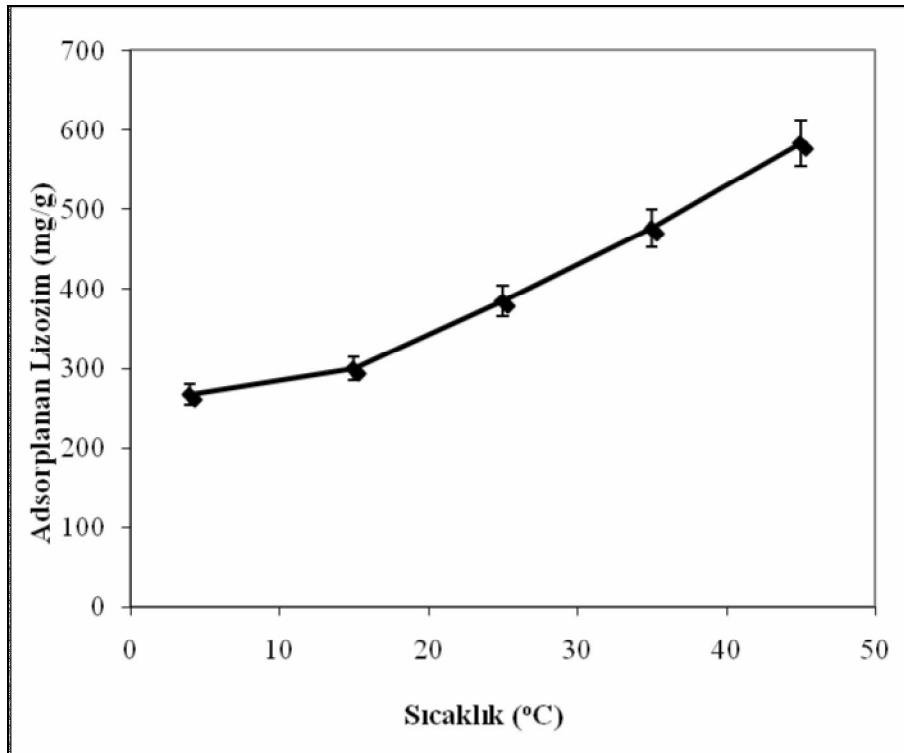
Şekil 4.11. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna farklı derişimlerin etkisi. İnkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C; pH: 10,0

#### 4.3.4. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi sıcaklık artışına bağlı olarak gram nanopartikül başına adsorplanan lizozim miktarında önemli bir artış olduğu görülmektedir. 25 °C’de adsorplanan lizozim miktarı 385 mg/g iken 45 °C’de bu değer 583 mg/g olarak bulunmuştur. Hjertan *et al.* (1974) tarafından hidrofobik etkileşimde 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 matriksin hidrofobik grupları arasındaki temas alanı artar ve yüksek sıcaklıklarda hidrofobik etkileşimler teşvik edilir.

Altıntaş vd., (2007), hidrofobik bir destek olan mag-poli(GMA)-L-triptofan mikrokürelerine lizozim adsorpsiyonunu gerçekleştirerek sıcaklığın adsorpsiyona olan etkisini incelemiştir. Sıcaklığa bağlı olarak adsorplanan lizozim miktarının önemli oranda arttığını gözlemlemiştir. Queiroz vd., (2001) ve Lienqueo vd., (2007) tarafından yayınlanan derleme makalelerinde de sıcaklığın önemli bir parametre olduğu ve sıcaklık ile protein bağlanmasının arttığı rapor edilmiştir.



Şekil 4.12. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) polimerinin lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; pH: 10,0

### 4.3.5. Adsorpsiyon İzotermi

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). Langmuir modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermine yaygın olarak kullanılmıştır (Li ve Husson, 2006). Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$C_{eq}/q_e = 1/q_{max} + 1/q_{max} \cdot b \cdot C_{eq}$$

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:

$C_{eq}$ '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 4.13'de baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğim ve kesiminden maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış ve baskılanmamış için sırasıyla ( $q_{max}$ )  $1.67 \times 10^3$  mg/g,  $1.00 \times 10^3$  mg/g Langmuir sabiti ( $b$ ) 2.994 mL/mg, 3.333 mL/mg olarak bulunmuştur.

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 sınırlanmaz (Proctor ve Toro-Vazquez, 1996). Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

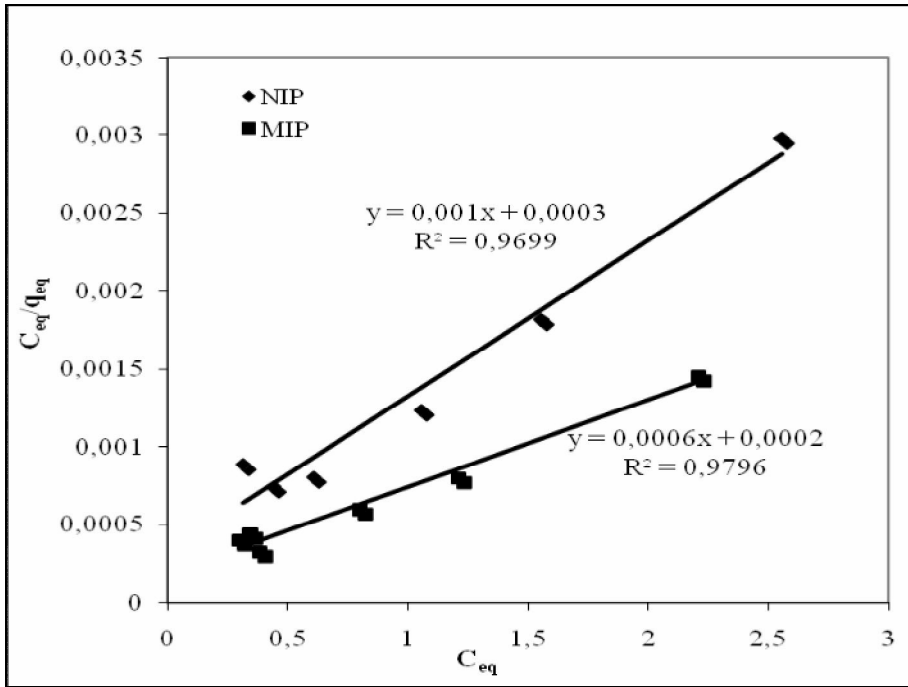
$$\ln q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq}$$

Burada  $q_{eq}$ , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan lizozim miktarı (mg/g);  $C_{eq}$ , çözültideki lizozimin denge derişimi (mg/mL);  $K_f$ , adsorbana bağlı adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g);  $1/n$ , adsorpsiyon şiddeti sabitidir.

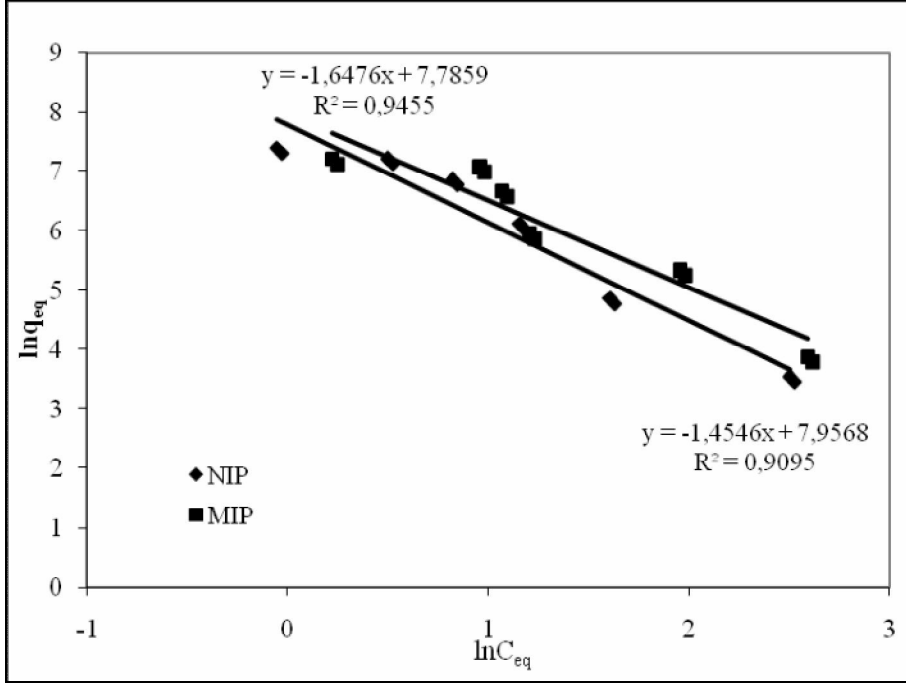
$\ln C_{eq}$ 'e karşı  $\ln q_{eq}$  grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun eğimi  $1/n$ 'i, kesimi  $\ln K_f$ 'yi verir.

Şekil 4.14’de baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğim ve kesiminden maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış ve baskılanmamış için sırasıyla grafiğin eğiminden  $1/n$  değerleri 1.4546, 1.6476 kesiminden ise  $K_f$  değerleri  $2.86 \times 10^3 \text{mg/g}$ ,  $2.41 \times 10^3 \text{mg/g}$  olarak bulunmuştur.

Moleküler baskılanmış polimerlerin heterojen bağlanma bölgeleri de içerdiği son zamanlarda rapor edilmiştir (Umpleby vd., 2001; Wei vd., 2005). Lizozim adsorpsiyon verileri Langmuir (Şekil 4.13) ve Freundlich (Şekil 4.14) adsorpsiyon izotermine uygulanmış ve elde edilen grafiklerin  $R^2$  değerlerine bakılarak lizozim adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış nanopartiküllerin yüzeyindeki lizozim bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her iki izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 4.14. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Freundlich adsorpsiyon izotermleri

Çizelge 4.1. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon parametreleri

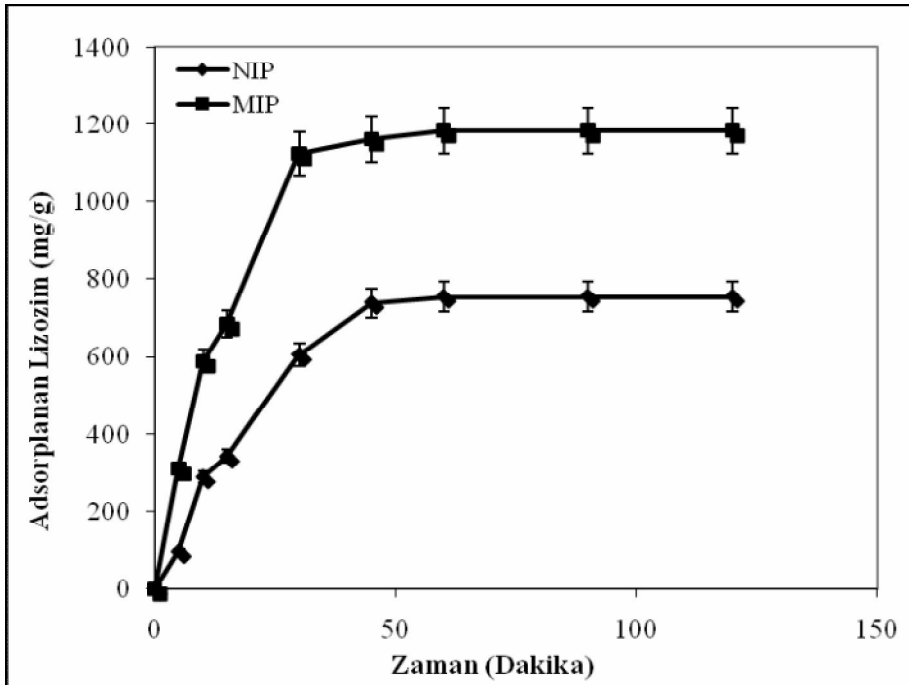
	Langmuir		Freundlich			
	$Q_{max}$ (mg/g)	b (ml/mg)	$R^2$	$K_F$	1/n	$R^2$
MIP	$1.67 \times 10^3$	2.994	0.9796	$2.86 \times 10^3$	1.4546	0.9095
NIP	$1.00 \times 10^3$	3.333	0.9699	$2.41 \times 10^3$	1.6476	0.9455

#### 4.3.6. Kinetik Analiz

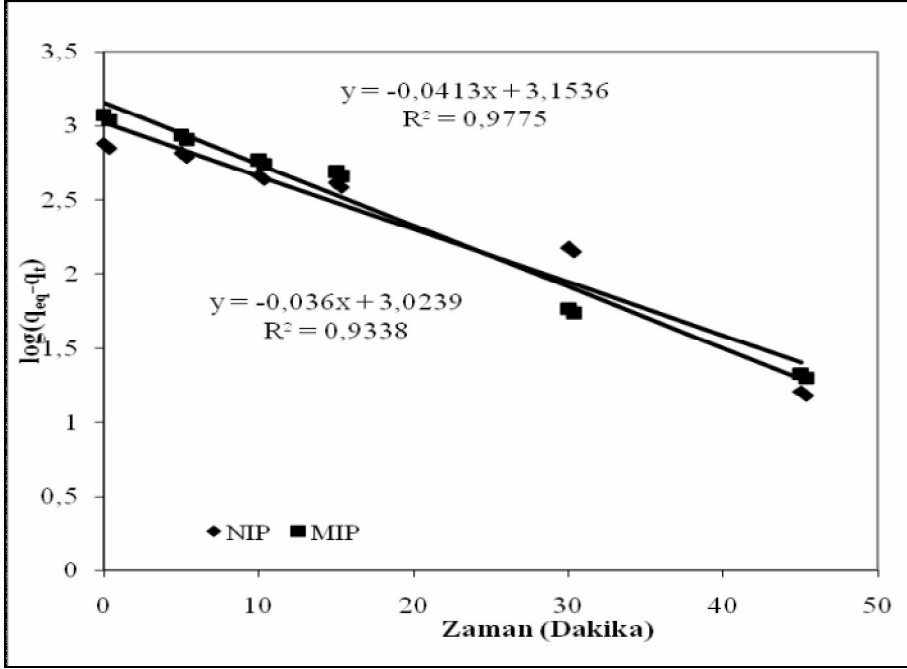
p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonunun zamana bağımlılığı incelenmiş ve adsorpsiyon kapasitesinin zamanla arttığı ve 60. dakikada doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.15). Deneysel verilere pseudo-



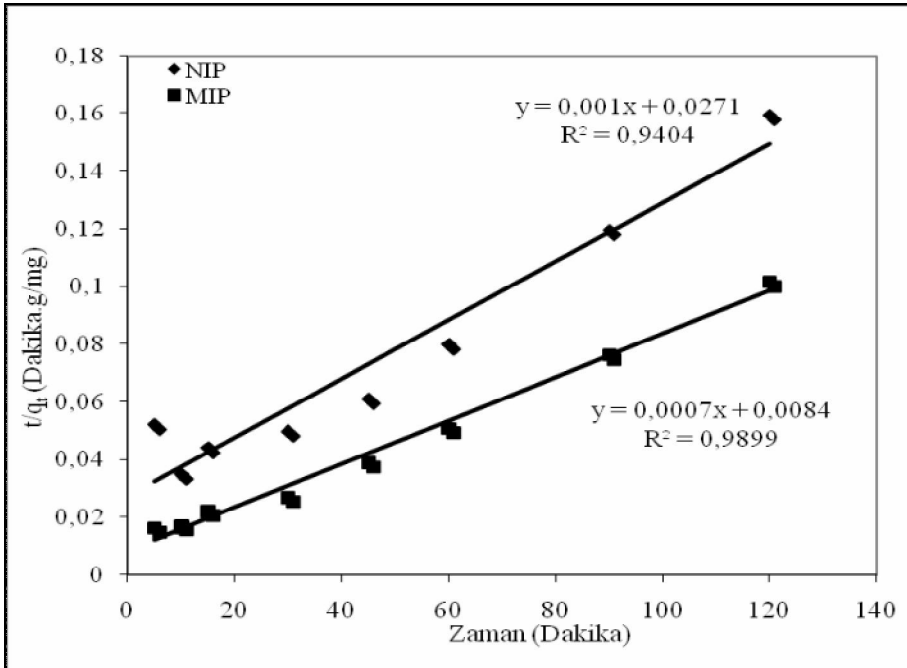
birinci ve pseudo-ikinci derece kinetik modelleri uygulanmış. Adsorpsiyonun hızlı gerçekleşmesi, nanopartikül geometrisi ve baskılanmış bölgelerin yüzeyde ve/veya yüzeye yakın bölgede olması ile ilişkilidir. Etkileşim bölgelerinin yüzeyde olması difüzyon kısıtlamalarını ortadan kaldırmakta ve hızlı bir desorpsiyon kinetiğine olanak sağlamaktadır. Şekil 4.16 (A) ve (B)'de baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin lizozim adsorpsiyonunun pseudo-birinci ve pseudo-ikinci dereceden kinetik grafikleri görülmektedir. Çizelge 4.2'de ise bu grafiklerden elde edilen hız sabitleri ile deneysel ve denge anındaki adsorplanan protein miktarları görülmektedir. Çizelge 4.2'ye bakıldığında pseudo-ikinci dereceden kinetik için bulunan korelasyon katsayılarının, pseudo-birinci dereceden kinetik için bulunanlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca deneysel  $q_{eq}$  değerlerinin, pseudo-ikinci dereceden kinetik için bulunan  $q_{eq}$  değerlerine daha yakın bulunması p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonunun pseudo-ikinci dereceden kinetiğe uygun olduğunu göstermektedir. Bu durum, adsorpsiyon işlemi sırasında hız belirleyen basamağın lizozim baskılanmış partiküllerin adsorpsiyonunun kimyasal kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.15. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin lizozim adsorpsiyonuna zamanın etkisi. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 10,0 sıcaklık: 25°C



(A)



(B)

Şekil 4.16. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin pseudo-birinci (A) ve pseudo-ikinci (B) dereceden incelenmesi

Çizelge 4.2. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin pseudo-birinci ve pseudo-ikinci dereceden kinetik sabitleri

	Birinci Derece			İkinci Derece		
	$k_1$ (1/min)	$q_{eq}$ (mg/g)	$R^2$	$k_2$ (1/min)	$q_{eq}$ (mg/g)	$R^2$
MIP	0.0951	$1.42 \times 10^3$	0.9775	$5.82 \times 10^{-5}$	$1.43 \times 10^3$	0.9899
NIP	0.0829	$1.06 \times 10^3$	0.9338	$3.69 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^3$	0.9404

#### 4.3.7. Seçicilik Deneyleri

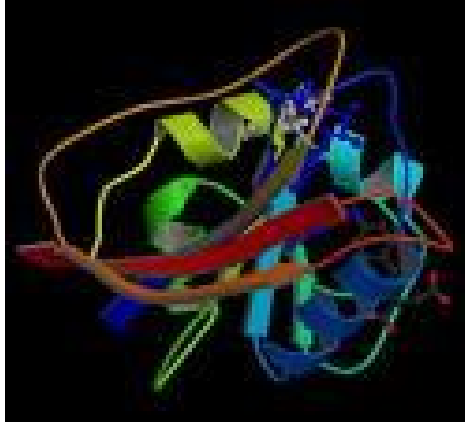
Hazırlanan lizozim baskılanmış nanopartiküllerin lizozime karşı seçiciliğinin göstermek üzere yarışmalı adsorpsiyon deneyleri sürekli sistemde gerçekleştirilmiştir. Seçicilik deneyleri sığır serum albümini (BSA) ve sitokrom c (cyt-c) varlığında gerçekleştirilmiştir. Sitokrom c, lizozime yakın molekül ağırlığı ve izoelektrik noktasının olmasından, BSA ise boyut, molekül ağırlığı ve yük bakımından lizozimden oldukça farklı olmasından dolayı yarışmacı proteinler olarak seçilmişlerdir.

Lizozim, BSA ve Cyt-c'nin her üçü de globüler yapıdadır. Cyt-c, 104 aminoasit içeren 12,0 kDa ağırlığında tek polipeptid zinciri içeren ve hem grubuna sahip proteindir. Cyt-c'nin üç boyutlu yapısı aşağıda gösterilmiştir.



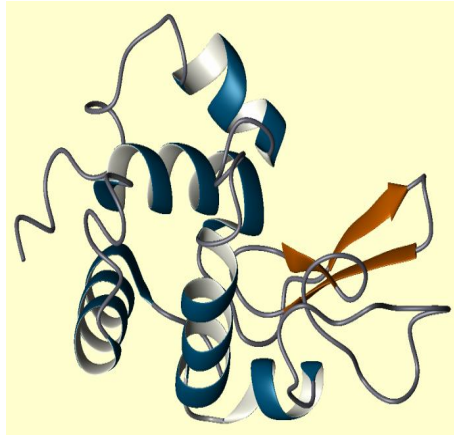
Şekil 4.17. Cyt-c'nin üç boyutlu yapısı

BSA, 607 aminoasit içeren 66.4 kDa ağırlığında moleküler boyutu 40x40x140 kübik angstrom yapısında olan tek polipeptid zinciri içeren proteindir.



Şekil 4.18. BSA'nın üç boyutlu yapısı

Lizozim çapraz bağlı 4 disülfid bağı ve 129 amino asit birimi içeren tek polipeptid zincirinden oluşmuş oldukça küçük bir proteindir (14,6 kD). Bu protein molekülü 30 x 30 x 45 Å'luk boyutları ile kabaca elipsoidal bir şekildedir.



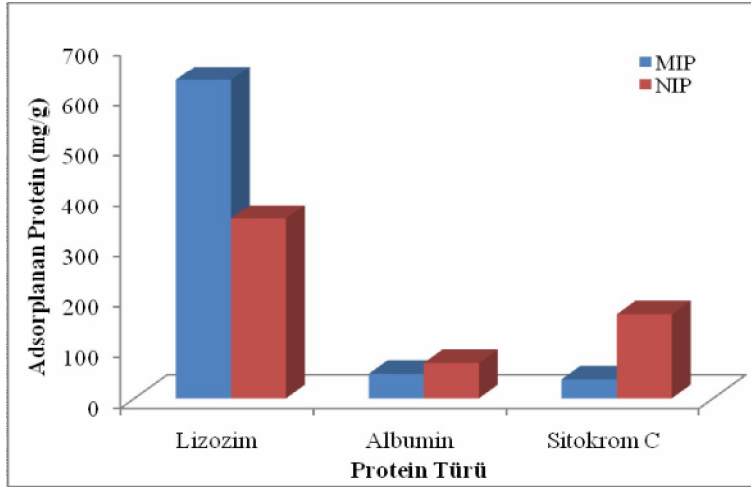
Şekil 4.19. Lizozimin üç boyutlu yapısı

Eşitlik 3.2, 3.3 ve 3.4 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, BSA için 13,1 (baskılanmış) ve 1,79 (baskılanmamış); sitokrom c için 33,2 (baskılanmış) ve 1,73 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl

seçicilik katsayısı ise 19,2 (lizozim/sitokrom c) ve 7,3 (lizozim/BSA) olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; lizozim baskılanmış polimerler, lizozimi sitokrom c'ye göre 19,2 kat; BSA'ya göre 7,3 kat seçicilikte tanımaktadır. Bağlı seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir (Zhang vd., 2002). Hem molekül ağırlığı ve boyutu hem de izoelektrik noktası birbirine çok yakın olan iki molekül arasında 19,2 katlık ayırma faktörünün oldukça başarılı bir sonuç olduğu belirtilmelidir.

Çizelge 4.3. Lizozime göre BSA ve Cyt-c için seçicilik ve bağlı seçicilik kat sayıları.

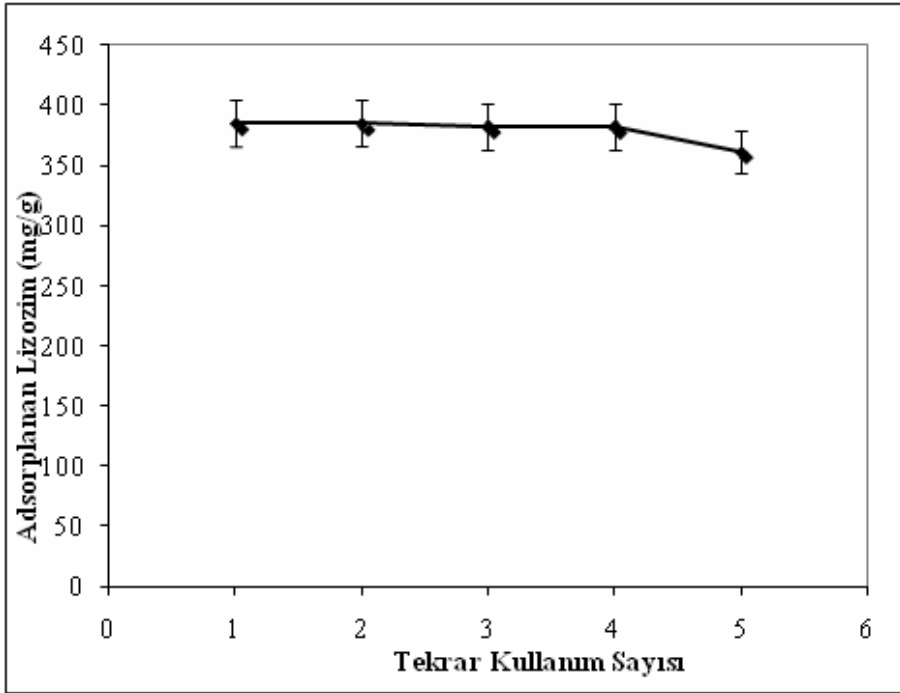
Protein	MIP		NIP		
	$K_d$ (ml/g)	k	$K_d$ (ml/g)	k	$k'$
Lizozim	432,2	-	142,4	-	-
BSA	32,9	13,1	79,4	1,79	7,3
Sitokrom c	13,0	33,2	82,2	1,73	19,2



Şekil 4.20. Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin lizozim, Albümin ve sitokrom-c adsorpsiyon miktarı. Başlangıç derişimleri: 0,5 mg/mL; pH: 10,0 sıcaklık: 25°C

#### 4.3.8. Baskılanmış p(HEMA-MATrp) Polimerinden Lizozimin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Bir destek materyalinin en önemli özelliklerinden biri defalarca kullanılabilmeye olanak vermesidir. Lizozim enziminin p(HEMA-MATrp) nano partiküllerine adsorpsiyonu ve desorpsiyonu işlemleri aynı nanopartiküller kullanılarak 5 döngü boyunca tekrar edilmiştir. Desorpsiyon oranı % 94 olarak bulunmuştur. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi 5 döngü boyunca adsorplanan lizozim miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 4.21. Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği. Başlangıç lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 10,0; sıcaklık: 25° C

## 5. SONUÇ

MATrp monomeri, L-triptofan metil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.

MATrp monomerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda MATrp monomerine ait karakteristik pikler şunlardır:  $3\text{H}$ ,  $^{17}\text{CH}_3$  1.80(s),  $2\text{H}$ ,  $^{10}\text{CH}_2$  3.42-3.36(q);  $1\text{H}$ ,  $^{11}\text{CH}$  4.50-4.51(m);  $1\text{H}$ ,  $^{16}\text{CH}_2$  5.33(s);  $1\text{H}$ ,  $^{16}\text{CH}_2$  5.64(s);  $1\text{H}$ ,  $^{13}\text{NH}$ (amid) 7.15(d);  $5\text{H}$ ,  $^{4,5,6,7,2}$ indol 7.15-7.57(m);  $1\text{H}$ ,  $^1\text{NH}$ (indol) 8.25(d);  $1\text{H}$ , OH(asit) 11.1(s).

MATrp monomerinin FTIR spektrumunda MATrp monomerine ait karakteristik MATrp'nın FTIR spektrumunda sırasıyla  $1533\text{ cm}^{-1}$  (NH eğilme),  $1454\text{-}1391\text{ cm}^{-1}$  (CN aromatik), and  $1657\text{ cm}^{-1}$  (C=O amid) pikleri görülmektedir.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin boyutları, zeta boyut analizörü ile belirlenmiştir. Lizozim baskılanmış partiküllerin ortalama boyutu 261 nm ve polidispersitesinin 1,203 olarak bulunmuştur.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin spesifik yüzey alanı  $1648\text{ m}^2/\text{g}$  olarak bulunmuştur.

Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin elementel analiz sonuçları sırasıyla  $0.85\text{ }\mu\text{mol/g}$  nanoküre ve  $0.87\text{ }\mu\text{mol/g}$  nanoküre olarak bulunmuştur.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri ile nanopartiküllerin yaklaşık 260 nm boyutunda ve gözeneksiz yüzeye sahip olduğu gözlenmiştir.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanoyapıların maksimum lizozim bağlama kapasitesi pH 10.0'da,  $1182,8\text{ mg lizozim/g}$  polimer olarak bulunmuştur. Bu değer altındaki ve üstündeki pH değerlerinde adsorpsiyon kapasitesi önemli miktarda azalmıştır.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine 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 10,0 karbonat tamponunda gerçekleştiği bulunmuştur.

Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin maksimum lizozim adsorpsiyonu 2 mg/mL lizozim derişiminde sırasıyla 1514,6mg/g, 856,3mg/g nanopartikül olarak bulunmuştur.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-45 °C aralığında incelenmiş ve sıcaklık artışı ile adsorplanan lizozim miktarının önemli miktarda arttığı bulunmuştur.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) partiküllerine lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi farklı derişimlerdeki tuzlar [NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] kullanılarak incelenmiş ve 1,0 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> derişiminde adsorpsiyonun maksimum olduğu saptanmıştır.

Lizozim baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi ile desorpsiyon oranı % 94 olarak bulunmuş ve 5 adsorpsiyon-desorpsiyon adımından sonra adsorplanan lizozim miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.

Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonunun Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Langmuir denkleminde hesaplanan maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış ve baskılanmamış için sırasıyla ( $q_{max}$ )  $1.67 \times 10^3$  mg/g,  $1.00 \times 10^3$  mg/g olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayıları ise sırasıyla 0.9796, 0.969'dir.

Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine lizozim adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon kinetikleri (pseudo birinci dereceden ve pseudo ikinci dereceden) araştırıldığında adsorpsiyonun pseudo ikinci dereceden kinetik yaklaşıma uygunluğu görülmüştür.



Elde edilen  $Q_{eq}$  değerleri incelendiğinde lizozim baskılanmış sistemde adsorpsiyonun kimyasal kontrollü geręekleřtięini göstermektedir.

Seçicilik denemelerinde Baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerine BSA ve sitokrom-c molekülleri kullanılmış ve BSA ve sitokrom-c için lizozim moleküllerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Seçicilik katsayıları, BSA için 13,1 (baskılanmış) ve 1,79 (baskılanmamış); sitokrom c için 33,2 (baskılanmış) ve 1,73 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur.

Baskılama seğiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı ise 19,2 (lizozim/sitokrom c) ve 7,3 (lizozim/BSA) olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; lizozim baskılanmış polimerler, lizozimi sitokrom c'ye göre 19,2 kat; BSA'ya göre 7,3 kat seçicilikte tanımaktadır. Bağıl seçicilik katsayıları lizozim baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir.

Sonuç olarak; lizozim baskılanmış nanopartiküller, sulu çözeltilerden lizozimin tayininde başarı ile kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- Aherne, A., Alexander, C., Payne, M. J., Perez, N., Vulfson, E. N. 1996. Bacteria Mediated Lithography of Polymer Surfaces, **Journal of the American Chemical Society**, 118 (36): 8771-8772
- 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.
- Andersson, L.I. 2000. Molecular imprinting: Developments and Applications in the Analytical Chemistry Field. **Journal of Chromatography B**, 745: 3-13.
- Andersson, L.I., Miyabayashi, A., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K., 1990. Enantiomeric resolution of amino acid derivatives on molecularly imprinted polymers as monitored by potentiometric measurements. **Journal of Chromatography A**, 516, 323-331.
- Arıca, M.Y., Akın-Öktem, G. and Denizli, A. 2001. Novel hydrophobic ligand-containing hydrogel membrane matrix: preparation and application to  $\gamma$ -globulins adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 21: 273-283.
- Arshady, R., Mosbach, K.. 1981. Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization. **Macromolecular Chemistry**, 182: 687-692.
- 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. 1987. Uniform Latex Particles, Seradyn Inc., Seragen Diagnostics, Inc., Indianapolis, ABD.
- Benito-Pena, E., Moreno-Bondi, M.C., Aparicio, S., Orellana, G., Cederfur, J., Kempe, M., 2006. Molecular Engineering of Fluorescent Penicillins for Molecularly Imprinted Polymer Assays. **Analytical Chemistry**, 78 p. 2019.
- Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2008. Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. **Journal of Chromatography A**, 1190, 18-26.
- Biggs, M. 2003. Introduction to Nanotechnology. **Chemical Engineering Science**, 58.

- Braun, D., Cherdrón, H., Rehahn, M., Ritter, H. Voit, B. 2005. Polymer synthesis: Theory and Practice. Fundamentals, methods, experiments. Springer, Germany.
- Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A.P. 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, 281, 2013-2016.
- Brüggemann, O. 2002. Molecularly Imprinted Materials- Receptors More Durable than Nature Can Provide. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 76, 127-163.
- Cartei, F., Cartei, G., Ceshia, V., Pacor, S., Sava, G. 1991. Hematologic effects of oral treatment with lysozyme chloride-A phase II study. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, 50: 530-538.
- Caruso, F., Schüler, C. 2000. Enzyme Multilayers on Colloid Particles: Assembly, Stability and Enzymatic Activity. **Langmuir**, 16, 9595–9603.
- Chapuis, F., Pichon, V., Hennion, M.C. 2004. Molecularly Imprinted polymers: Developments and applications of New selective Solid-Phase Extraction Materials. **LC-GC Europe**, 17 (7), 408-417,
- Chen, J.-P., Su, D.-R., 2001. Latex particles with thermo-flocculation and magnetic properties for immobilization of chymotrypsin. *Biotechnology Progress*. **Biotechnology Progress**, 17, 369–375.
- Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. 2004. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis And Characterisation. **Journal Chromatography B**, 804, 173-182.
- Cormack, P.A.G., Mosbach, K. 1999. Molecular Imprinting: Recent Developments and the Road Ahead. **Reactive and Functional Polymers**, 41, 115-124.
- Çıracı, S. 2005. Metrenin Bir Milyarda Birinde Bilim ve Teknoloji. **Bilim ve Teknik**, 6-11.
- D'Souza, S. M., Alexander, C., Carr, S. W., Waller, A. M., Whitcombe, M. J., Vulfson, E. N. 1999. Directed nucleation of calcite at a crystalimprinted polymer surface. **Nature**, 398: 312–316.
- Das, S., Banerjee, S., Dasgupta, J. 1992. Experimental evaluation of preventive and therapeutic potentials of lysozyme. **Chemotherapy**, 38: 350-357.

- Daubresse, C., Grandfils, C., Jerome, R., Teyssie, P. 1996. Enzyme immobilization in reactive nanoparticles produced by inverse microemulsion polymerization. **Colloid and Polymer Science**, 274:482–489.
- De la Isla, A., Brostow, W., Bujard, B., Estevez, M., Rodriguez, J.R., Vargas, S., Castano, V.M. 2003. Nanohybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology. **Materials Research Innovations**, 7:110-114.
- Denizli A., Yavuz H. 2008. Moleküler Baskılama ve Önemi. **Bilim ve Teknik**, 82-87.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Lui, S.X ve Wang, N. 2002. Separation of ephedrine stereoisomers by molecular imprinted polymers influence of synthetic condition and mobile phase compositions on the chromatographic performance. **Analist**, 127, 1427-1432.
- Edelstein, R.L., Tamanaha, C.R., Sheehan, P.E., Miller, M.M., Baselt, D.R., Whitman, L.J., Colton, R.J. 2000. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. **Biosensors and Bioelectronics**, 14:805-813.
- Ensing, K., Berggren, C., Majors, R. E., 2001. Selective Sorbents for Solid-Phase Extraction Based on Molecularly Imprinted Polymers. **LC-GC Europe**, 19(9): 943-954.
- Ersöz, E., Denizli, A., Özcan, A., Say, R. 2005. Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, **Biosensors and Bioelectronics**, 20, 11 2197-2202.
- Ghosh, R., Cui, Z.F. 2000. Purification of lysozyme using ultrafiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, 68(2): 191-203.
- Goodsell, D. 2000. Evolution has forced innovative solutions to biomolecular problems. Some may inform the growing field of nanotechnology. **American Scientist**, [Electronic Journal], Vol.8:1-25  
“<http://www.americanscientist.org/issues/pub/2000/3/biomolecules-and-nanotechnology/5>”

- Graham, A.L., Carlson, C.A., Edmiston, P.L. 2002 Development and Characterization of Molecularly Imprinted Sol–Gel Materials for the Selective Detection of DDT. **Analytical Chemistry**, 74, 458.
- Gürmen, S., Ebin, B. 2008. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası, 31-38, İstanbul.
- Haginaka, J., Kagawa, C. 2004. Chiral Resolution of Derivatized Amino Acids Using Uniformly Sized Molecularly imprinted Polymers in Hydro-Organic Mobile Phases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 378, 1907–1912.
- Hall, A.J., Quaglia, M., Manesiotis, P., De Lorenzi, E., Sellergren B. 2006. Article Polymeric Receptors for the Recognition of Folic Acid and Related Compounds via Substructure Imprinting. **Analytical Chemistry**, 78, p. 8362.
- Haupt, K., Mosbach, K., 2000. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. **Chemical Reviews**, 100, 2495-2504.
- Hawkins, D.M., Stevenson, D. Reddy, S.M. 2005. Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs). **Analytica Chimica Acta**, 542, 61-65.
- Hey, A.J. 1996. Memories of Richard Feynman, *Physics Today*, 48-49.
- Hirayama, K., Sakai, Y., Kameoka, K. 2001. Synthesis of polymer particles with specific binding sites for lysozyme by a molecular imprinting technique and its application to a quartz crystal microbalance sensor. **Journal of Applied Polymer Science**, 81(14): 3378-3387.
- 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., Liao, J.L., Nakazato, K., Wang, Y., Zamaratskaia, G., Zhang, H.X. 1997. Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins. **Chromatographia**, 44:227–234.
- Homer, M.L., Yen, S.P.S., Ryan, M.A., Ksendzov, A., 2004. Development of molecularly imprinted polymer films for l-proline detection. **Electrochemical Society**, 08 p. 394.

- Huang, J., Zhang, J., Zheng, S. 2005. Template imprinting amphoteric polymer for the recognition of proteins. **Journal of Applied Polymer Science**, 95: 358–361.
- Huang, Y.C., Lin C.C., Liu C.Y. 2004. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers based on 9-ethyladenine for the recognition of nucleotide bases in capillary electrochromatography, **Electrophoresis**, 25 p. 554.
- Jia, H., Zhu, G., Wang, P. 2003. Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: The effect of particle mobility. **Biotechnology and Bioengineering**, 84, 406-414.
- Jiang, X., Jiang, N., Zhang, H., Liu, M. 2007. Small Organic Molecular imprinted Materials: Their Preparation and Application. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, DOI 10.1007/s00216-007-1336-6.
- Jungbae, K., Jay, W., Grate, P.W. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization, **Chemical Engineering Science**, 61, 1017 – 1026.
- Karim, K., Breton, O.F., Rouillon, R., Piletska, E.V., Guerreiro, A., Chianella, I., Piletsky, S.A. 2005. How to Find Effective Functional Monomers For Effective Molecularly imprinted Polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, 1795-1808.
- Katz, A., Davis, M.E., 1999. Investigation into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers. **Macromolecules**, 32, 4113-4121.
- Kempe, M., Mosbach, K. 1995. Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. **Journal of chromatography A**, 691(1-2):317-23.
- Kim, J., Grate, J.W. and Wang, P. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, 61: 1017-1026.
- Koç F., Kocaman S., 2004. Eskişehir, Kontrollü Salınım Sistemleri ve Bu Sistemlerde Kullanılan Polimerler, Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Bitirme Tezi, Eskişehir.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma H. 2003. Molecular Imprinting, from Fundamentals to Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN: 3-527-30569-6.

- 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.
- Leggett, G.J., Jones, R.A.L. 2005. Bionanotechnology. In: Nanoscale science and technology. Kelsall, R.W., Hamley, I.W., Geoghegan, M. (eds). John Wiley & Sons, Ltd., pp. 419-444, West Sussex.
- Lehn, J.M., 1995. Supramolecular Chemistry: from molecular information towards self-organization and complex matter. Wiley-VCH: Weinheim.
- Li, X., Husson, S.M., 2006. Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 336-348.
- Liao, M.H., Chen, D. H. 2001. Immobilization of Yeast Alcohol Dehydrogenase on Magnetic Nanoparticles for Improving Its Stability. **Biotechnology Letters**, 23(20), 1723-1727.
- Lienqueo, M.E., Mahn, A., Salgado, J.C., Asenjo, J.A. 2007. Current insights on protein behavior in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, 849: 53-68.
- Lin, H.Y., Hsu, C.Y., Thomas, J.L., Wang, S.E., Chen, H.C., Chou, T.C. 2006. The microcontact imprinting of proteins: The effect of cross-linking monomers for lysozyme, ribonuclease A and myoglobin. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 534-543.
- Liveri, V. T. 2006. Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems. Springer Science Business Media, New York.
- Lu, S., Cheng, G., Pang, X. 2006. Protein-imprinted soft-wet gel composite microspheres with magnetic susceptibility II. Characteristics. **Journal of Applied Polymer Science**, 99, 2401-2407.
- Lu, Y., Li, C., Liu, X., Huang, W. 2002. Molecular Recognition Through the Exact Placement of Functional Groups on Non-Covalent Molecularly imprinted Polymers. **Journal of Chromatography A**, 950, 89-97.
- Ma, J., Wong, H., Kong, L.B., Peng, K.W. 2003. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. **Nanotechnology**, 14:619-623.

- Mah, C., Zolotukhin, I., Fraites, T.J., Dobson, J., Batich, C., Byrne B. J. 2000. Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors *in vitro* and *in vivo*. **Molecular Therapy**, 1:S239
- Mahony, J.O., Nolan, K., Smyth, M.R. 2005. Molecularly imprinted polymers potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, 534, 31-39.
- Mahtab, R., Rogers, J.P., Murphy, C.J. 1995. Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between "straight", "bent", and "kinked" oligonucleotides. **Journal of the American Chemical Society**, 117: 9099-9100.
- Maier, N.M., Buttinger, G., Welhartizki, S., Gavioli, E., Lindner, W. 2004. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. **Journal of Chromatography B**, 804, p. 103.
- 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.
- Martins, M.B.F., Simoes, S.I.D., Cruz, M.E.M., Gaspar, R. 1996. Development of enzyme-loaded nanoparticles, **Journal of Materials Science**, 14: 413-414.
- Marty, J.D., Mauzac, M. 2005. Molecular Imprinting: State of the Art and Perspectives. **Advanced Polymer Science**, 172, 1-35.
- Matsunaga, T., Hishiya, T., Takeuchi, T. 2007. Surface plasmon resonance sensor for lysozyme based on molecularly imprinted thin films. **Analytica Chimica Acta**, 591, 63-67.
- Matsunaga, T., Takeuchi, T. 2006. Crystallized Protein-imprinted Polymer Chips. **Chemistry Letters**, 35 p. 1030.
- Miller, J.C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J.M., Kundahl, G. 2004. The Handbook of Nanotechnology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.



- Molday, R.S., MacKenzie, D. 1982. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. **Journal of Immunological Methods**, 52: 353-367.
- Mosbach, K. ve Ramström, O. 1996. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. **Biotechnology**, 14, 163-170.
- Mosbach, K., Haupt, K. 1998. Some New Developments and Challenges in Non-Covalent Molecular imprinting Technology. **Journal of Molecular Recognition**, 11, 62-68.
- Murakami, F., Sasaki, T. Sugahara, T. 1997. Lysozyme stimulates immunoglobulin production by human-human hybridoma and human peripheral blood lymphocytes. **Cytotechnology**, 24: 177-182.
- Nam, J.M., Thaxton, C.C., Mirkin, C.A.: 2003. Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. **Science**, 301:1884-1886.
- Odabaşı M., Say R., Denizli A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. **Materials Science&Engineering C** 27, 90–99.
- Odinan, G. 2004. Principles of polymerization. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Oshima, Y., Onga, A., Takayanagi, K. 2003. Helical Gold Nanotube Synthesized at 150 K. **Physical Review Letters**, 91, 205503.
- Ou, S.H, Wu, M.C., Chou, TC, Liu, C.C., 2004. Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme. **Analytica Chimica Acta**, 504:163–166.
- Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I., 1999. Molecular Imprinting for Bio- and Pharmaceutical Analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, 18 (3) 146-154.
- 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.
- Özcan, A. A., Say, R., Denizli, A., Ersoz, A. 2006. L-Histidine Imprinted Synthetic Receptor for Biochromatography Applications, **Analytical Chemistry**, 78, 20, 7253-7258.

- Panatarotto, D., Prtidos, C.D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A. 2003. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. **Chemistry & Biology**, 10: 961-966.
- Parak, W.J., Boudreau, R., Gros, M.L., Gerion, D., Zanchet, D., Micheel, C.M., Williams, S.C., Alivisatos, A.P., Larabell, C.A. 2002. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. **Advanced Materials**, 14: 882-885.
- Pisetsky, S. A., Alcock, S., Turner, A. P. F. 2001. Molecular imprinting at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, 19 (1): 9-12.
- Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz Y.P. 1995. **Biosensors and Bioelectronics**, 10: 959.
- 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., Cabral, J.M.S. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, 87: 143-159.
- Ramstrom, O., Ye, L., Mosbach, K., 1996. Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting. **Chemistry and Biology**, 3, 471-477.
- Ramström, O., Ansell, R.J. 1998. Molecular Imprinting Technology: Challenges and Prospects for the Future. **Chirality**, 10: 195-209.
- Rao, C.N. R., Müller, A. Cheetham, A. K. 2005. The chemistry of nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. John Wiley & Sons, Inc., 3:527.
- Rao, T. P., Daniel, S. Ve Gladis, J. M., 2004. Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (II-SPE). **Trends in Analytical Chemistry**, 23, 28-35.
- Roe, S., Harris, E.L.V., Angal, S. 1989. Protein Purification Methods: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp., 1, 221-232.
- Ruckenstein, E. and Zeng, X. 1997. Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. **Biotechnology and Bioengineering**, 56(6): 610-617.

- Salata, O.V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of Nanobiotechnology**, 1-6.
- 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.
- Sellergren, B., 1994. Enantiomer Separation Using Tailor-Made Phases Prepared by Molecular imprinting. Practical Approach Chiral Separation Liquid Chromatography, 69-93.
- Sellergren, B., Allender, C.J. 2005. Molecularly imprinted Polymers: A bridge to Advanced Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, 1733-1741.
- Sellergren, B., Andersson, Lars. 1990. Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy. **Journal of Organic Chemistry**, 55 (10), pp 3381–3383
- Senger, R., S. Çıracı, 2004. “Chiral Single-Wall Gold Nanotubes”, **Physical Review Letters** 93, 196807
- Sharma, R., Chistib, Y., Banerjee, U.T. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, 627–662.
- Shea, K.J., Gilman, J.W., Haffner, C.D., Dougherty, T.K. 1986. Diastereomeric Atropisomers of the Tricyclo[9.3.1.0<sub>3,8</sub>] Pentadecane Ring System. Synthesis and Structural Studies. **Journal of the American Chemical Society**, 108: 4953.
- Shi, H., Tsai, W.B., Garrison, M. D., Ferrari, S., Ratner, B.D. 1999. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. **Nature**, 593-597.
- Sinani, V.A., Koktysh, D.S., Yun, B.G., Matts, R.L., Pappas, T.C., Motamedi, M., Thomas, S.N., Kotov, N.A. 2003. Collagen coating promotes biocompatibility of semiconductor nanoparticles in stratified LBL films. **Nano Letters**, 3:1177-1182.
- Spivak, D.A., 2005. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57, 1779-1794. Springer Science Business Media, Inc., New York.

- Sun, R., Huimin, Y., Hui, L., Zhongyao, S. 2004. Construction and application of a stoichiometric displacement model for retention in chiral recognition of molecular imprinting. **Journal of Chromatography A**, pp. 1055
- Şener, G. 2009. Nanopartiküllerle Duyarlılığı Arttırılmış Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörlerin Hazırlanması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Takayanagi, K., Kondo, Y., Ohnishi, H. 2001. Suspended gold nanowires: Ballistic transport of electrons. **JSAP International** 3: 3-8.
- Takeuchi, T., Haginaka, J. 1999. Separation and Sensing Based on Molecular Recognition Using Molecularly Imprinted Polymers. **Journal of Chromatography B**, 728: 1-20.
- Tao, Z., Tehan, E.C., Bukowski, R.M., Tang, Y., Shughart, E.L., Holthoff, W.G., Cartwright, A.N., Titus, A.H., Bright F.V. 2006. Templated xerogels as platforms for biomolecule-less biomolecule sensors. **Analytica Chimica Acta**, 564 p. 59.
- Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2001. Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm. **Analytical Chemistry**, 73: 4584-4591.
- Urraca, J.L., Marazuela, M.D., Merino, E.R., Orellana G., Moreno-Bondi M.C., 2006. Molecularly imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis. **Journal of Chromatography A**, 1116: 127-134.
- Urraca, J.L., Marazuela, M.D., Moreno-Bondi M.C. 2006. Molecularly imprinted polymers applied to the clean-up of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol from cereal and swine feed sample extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 385: 1155-1161.
- Uygun, D.A.. 2008. Protein Saflaştırılması İçin Magnetik Nano Yapıların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Aydın.
- Vacca, A., Campobasso, N., Iodice, G., Ronco, M. and Dammacco, F. 1985. Cyclic lysozyme administration as a tool for immunopotential in patients with multiple myeloma. **Chemotherapy**, 19: 145-155.

- Vlatakis, G., Andersson, L. I., Muller, R., Mosbach, K.. 1993. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. **Nature**, 361, 645-647.
- Voet, D., Voet, J.G. 1990. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 1223 p. USA.
- Vogel, V., Baird, B. 2003. Report of the national nanotechnology initiative workshop, Arlington, VA, 3, VCH, Weinheim, 617–642.
- Wang, S., Mamedova, N., Kotov, N. A., Chen, W., Studer, J. 2002. Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates, **Nano Letters**, 2(8): 817-822.
- 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.
- Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M., 2005. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for chromatographic separations. **Separation Science and Technology**, 40, 109–129.
- Wulff, G., 1995. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates- A Way towards Artificial Antibodies. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 34: 1812-1832.
- Wulff, G., Knorr, K.. 2002. Stoichiometric Noncovalent interaction in Molecular imprinting. **Bioseparation**, 10: 257-276.
- Wulff, G., Poll, H.G., 1987. Enzyme-analog built polymers .23. Influence of the structure of the binding-sites on the selectivity for racemic-resolution. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry And Physics**, 188 (4): 741-748.
- Wulff, G., Sarhan, A. 1972. The use of polymers with enzymeanalogous structures for the resolution of racemates. **Angewandte Chemie**. 84: 364.
- Yan, H., Row, K.H. 2006. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, 7: 155-178.
- Yavuz, H., Karakoc, V., Turkmen, D., Say, R., Denizli, A. 2006. Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 41: 8–15.

- Ye, L., Mosbach, K., 2001. Polymers Recognizing Biomolecules Based on A Combination of Molecular imprinting and Proximity Scintillation: A New Sensor Concept. **Journal of American Chemical Society**, 123(12): 2901–2902.
- Yılmaz F., Bereli N., Yavuz H., Denizli A. 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, 272-279.
- Yoshida, J., Kobayashi, T. 1999. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 194:176-184.
- Yu, C., Mosbach, K. 1997, Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers,. **Journal of Organic Chemistry**, 62: 4057–4064.
- Zhang, W., Qin, L., He, X.W., Li, W.Y., Zhang, Y.K. 2009. Novel surface modified molecularly imprinted polymer using acryloyl- $\beta$ -cyclodextrin and acrylamide as monomers for selective recognition of lysozyme in aqueous solution. **Journal of Chromatography A**, 1216: 4560–4567.
- Zhang, Z., Haiping, L., Li ,H., Nie, L., Yao, S. 2005. Stereoselective Histidine Sensor Based on Molecularly Imprinted Sol-Gel Films. **Analytical Biochemistry**, 336 (1): 108-116
- Zhang, L., Cheng, G., Fu, C. 2002. Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and suspension polymerization. **Polymer International**, 51(8) 687-692.
- 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.
- Zhu, X., Su, Q., Cai, J., Yang J. Gao, Y., 2006. Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, 101: 4468-4473.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Emin ÇORMAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : BİNGÖL-01/02/1985

### EĞİTİM DURUMU

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

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

1. M. Emin Çorman, Nevra Öztürk, Nilay Bereli, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2010). Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *Trametes versicolor* laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume: 63, Issue: 1-2, pages: 102-107.

2. M. Emin Çorman, Nevra Öztürk, Nalan Tüzmen, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2009). Magnetic polymeric nanospheres as an Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support for catalase, *Biochemical Engineering Journal*, Volume: 49, Issue: 2, pages: 159-164.

3. Nesibe Avcıbaşı, Murat Uygun, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2010). Application of supermacroporous monolithic hydrophobic cryogel in capturing of albumin, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (Kabul Edildi).

-Diğer

1. Sinan Akgöl, M. Emin Çorman, Nevra Öztürk, Cem Esen, Adil Denizli. (2008). Batch removal of lead ions from aquatic solutions by 2-hydroxyethyl methacrylate nanobeads carrying Cibacron Blue F3GA, *Analele Universităţii din Oradea-fascicula Chimie*, 15, pp. 36-42.

b) Bildiriler

-Uluslararası

1. Nevra Öztürk, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Newly synthesized nanobeads for high capacity of DNA binding". *The International*

Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), 01-05 October 2008, Kusadasi-Turkey. (2008), pp. 138.

2. Nevra Öztürk, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Preparation and usability of Ni(II)-attached methacryloylamidoglutamic acid functionalized nano-p(1-hydroxyethylmethacrylate) nanospheres for urease immobilization". The International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), 01-05 October 2008, Kusadasi-Turkey. (2008), pp. 83.

-Ulusal

1. Murat Uygun, M. Emin Çorman, Nesibe Avcıbaşı, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Bismaleimid Türevi Süper Gözenekli Kriyojeller ile Antibadi Saflaştırılması", Kromatografi 2010 16-19 Haziran, Erzurum.

2. Nevra Öztürk, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Baskılanmış Spesifik Nanoyapılarla Anti-Kanser-ilaç Taşımını", Kromatografi 2010 16-19 Haziran, Erzurum.

3. Nevra Öztürk, M. Emin Çorman, Emir Özçalışkaner, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Geri Dönüşümlü Amilaz İmmobilizasyonu için Nanoyapılar", VI. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi , 26-29 Mayıs 2010, Aksaray.

4. Nevra Öztürk, M. Emin Çorman, Nesibe Avcıbaşı, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Hidrofobik bir nanopolimer: Nano-P(HEMA-PTCADI) ve lizozim immobilizasyon etkinliğinin araştırılması", Kromatografi 2009, 26-29 Eylül 2009, Trabzon

5. Murat Uygun, M. Emin Çorman, Nesibe Avcıbaşı, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Perilen bazlı yeni polimerik kriyojellerin hazırlanması, karakterizasyonu ve albumin adsorpsiyonu", Kromatografi 2009 26-29 Eylül 2009, Trabzon.

6. Deniz Aktaş Uygun, M. Emin Çorman, Serpil Özkara, Sinan Akgöl, Adil Denizli. Moleküler baskılanmış manyetik nanokürelerin ilaç salınımlarında kullanımı", Kromatografi 2009, 26-29 Eylül 2009, Trabzon.



7. Gözde Baydemir, Müge Andaç, Ali Derazshamshir, M.Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. “Metal şelatlanmış nanoküreler ile lizozim saflaştırılması”, Kromatografi 2009, 26-29 Eylül 2009, Trabzon.
8. Murat Uygun, M. Emin Çorman, Mehmet Fidan, Nesibe Avcıbaşı, Sinan Akgöl, Adil Denizli. “Yeni sentezlenen kriyojelik poli(HEMA-TMBBI) matriksinin hazırlanması, karakterizasyonu ve lipaz saflaştırılmasında kullanılması”, Kromatografi 2009, 26-29 Eylül 2009, Trabzon.
9. M. Emin Çorman, Nevra Öztürk, Sinan Akgöl, Adil Denizli. Preparation of nano-poly (EGDMA-MAC) nanostructures and its usage for immobilization of glucose oxidase, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Eskişehir.
10. M. Emin Çorman, Cem Esen, Nevra Öztürk, Sinan Akgöl, Adil Denizli Removal of Cadmium Ions From Aqueous Media Using Nanoparticles, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Eskişehir.
11. Nevra Öztürk<sup>1</sup>, M. Emin Çorman<sup>1</sup>, Sinan Akgöl<sup>1</sup>, Adil Denizli<sup>2</sup> Preparation of nanoparticles which contains amino acid for immobilization of Laccase, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Eskişehir.
12. Cem Esen, M. Emin Çorman, Nevra Öztürk, Sinan Akgöl, Adil Denizli. Molecular Recognition Based Iron Removal via Imprinted Nanoparticles, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Eskişehir.
13. M. Emin ÇORMAN, Nevra Öztürk, Sinan Akgöl, Adil Denizli. “Lizozim adsorpsiyonu için moleküler baskılanmış nanopartiküller”, V. Ulusal Afinitite Teknikleri Kongresi , 20-24 Mayıs 2009, Balıkesir.

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

## **İLETİŞİM**

E-posta adresi: mehmetemincorman@gmail.com