

KABUL ONAY SAYFASI

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

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

Adı Soyadı : Firdevs COŞKUN

İmza :

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EŞ BOYUTLU NANOKÜRELRİN HAZIRLANMASI VE LİZOZİM ADSORPSİYONUNDA KULLANILMASI

Firdevs COŞKUN

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sinan AKGÖL

Bu çalışmada, destek materyali olarak poli(2-hidroksietil metakrilat-metakrilolil amidotriptofan[P(HEMA-MAT)]) nanopartikülleri kullanıldı. MAT komonomeri, ligand olarak yapısına girdiği P(HEMA) nanopartiküllerine hidrofobik özellik kazandırdı ve metakroil klorür ile triptofan uygun koşullarda tepkimeye girmeleri sonucu elde edildi. P(HEMA) ise temel taşıyıcı katı destek olarak seçildi. 155.64 nm boyutundaki P(HEMA-MAT) nanopartikülleri; HEMA ve MAT monomerlerinin emülsiyon polimerizasyonu ile üretildi. Nanopartiküllerin 1051.3 m²/g spesifik yüzey alanına sahip olduğu bulundu ve elementel analiz ve Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), yöntemleri ile karakterize edildi. Sentezlenip karakterize edilen bu nanopartiküller lizozim immobilizasyonu için kullanıldı. Adsorpsiyon deneyleri, farklı ortam koşullarında (pH, başlangıç derişimi, sıcaklık gibi) kesikli deney sisteminde incelendi. Nano-P(HEMA) ve P(HEMA-MAT) nanoyapılarının lizozim adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 1.2 mg/g ve 770 mg/g bulundu. Bunlara ek olarak immobilizasyon şartlarının optimizasyonu çalışmaları da (optimum pH, sıcaklık, ısıl kararlılık, depo kararlılığı gibi) gerçekleştirildi. İmmobilize enzimin kinetik parametreleri (V_{max} , K_m) tespit edilerek, serbest enziminkiyle karşılaştırıldı. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlandı ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmeden lizozim adsorpsiyonunda kullanılabilir olduğu bulundu.

2008,100 sayfa

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nanobiyoteknoloji, Nanopartiküller, Lizozim, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, İmmobilizasyon

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

**PREPARATION OF MONO SIZE NANOBEADS AND ITS USAGE FOR
LYSOZYME ADSORPTION**

Firdevs COŞKUN

Adnan Menderes University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr Sinan AKGÖL

In this study, poly(2-hydroxyethyl methacrylate) P(HEMA) nanoparticles carrying methacryloylamidophenylalanine (MAT) ligand, as a comonomer, providing hydrophobic functionality to the adsorbent were prepared. MAT was synthesized by reacting methacryloyl chloride with phenylalanine. We selected P(HEMA) as the basic solid matrix. Nanospheres with an average size of 155.64 nm were obtained by emulsion polymerization of P(HEMA) and MAT. The nanoparticles had a specific surface area of 1051.3 m²/g, and were characterized by elemental analysis and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Nanospheres which synthesized and characterized were used for the lysozyme immobilization. Adsorption experiments were investigated under different medium conditions (i.e., medium pH, initial concentration, temperature) in a batch system. Lysozyme adsorption capacity of P(HEMA) and P(HEMA-MAT) beads were 1.2 mg/g and 770.0 mg/g respectively. In addition to these, studies of optimization of the immobilization conditions were obtained. Kinetic parameters (V_{max} , K_m) of the immobilized enzyme were determined and compared to the kinetic parameters that of free enzyme. It was observed that after 5 adsorption-desorption cycle, P(HEMA-MAT) nanoparticles can be used without significant loss in lysozyme adsorption capacity.

2008,101 Page**KEY WORDS:** Nanobiotechnology, Nanoparticles, Lysozyme, Hydrophobic Interaction Chromatography, Immobilization.

ÖNSÖZ

Bu tezin başlangıcından sonuçlanmasına kadar bilgisini, desteğini ve değerli zamanını benden esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e,

Hacettepe Üniversitesinin olanaklarından faydalanmamı sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye ,

Laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e,

Deneyin yapılış aşamasında yardımcı olan Arş. Grv Nevra Öztürk'e

Çalışmalarım boyunca huzurlu ve doğru bir çalışma ortamı sağlayan ve yardımcı olan Arş. Grv. Deniz AKTAŞ UYGUN ve Arş. Grv. Murat UYGUN'a,

Tezimin yazımı esnasında, yazımlarına ve çizimlerine yardımcı olan Y.Lisans Öğrencileri Mehmet Emin ÇORMAN'a ve Özay GÖRÜNMEZOĞLU'na

Ayrıca benden maddi manevi desteğini esirgemeyen nişanlım Haydar ATEŞ'e ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

FİRDEVS COŞKUN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji ve nanobiyoteknoloji.....	1
1.1.1. Nanoteknolojinin Amaçları.....	1
1.1.2. Nanoteknolojinin Gelişimi.....	1
1.1.3.Nanoteknolojide Kullanılan Araçlar.....	2
1.1.4. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları.....	3
1.1.5. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	3
1.1.5.1. Mikro-Alaşım Bilimi	4
1.1.5.2. Akıllı Taşıyıcı Sistemler	4
1.1.5.3. Nano-Biyoproses	4
1.1.5.4. Biyoanalitik Nanosensörler.....	4
1.1.5.5. Nanomalzemeler.....	5
1.1.5.6. Biyoselektif Yüzeyler.....	5
1.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	5
1.2.1. Enzim İmmobilizasyonun Tarihsel Süreci.....	9
1.2.2. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
1.2.3. Nanoyapıların Enzim Çalışmasında Kullanılması.....	17
1.2.4. Nanopartiküller.....	18
1.3. Polimerizasyon ve Polimerizasyon Yöntemleri.....	19
1.3.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	20

1.3.2. Süspansiyon Polimerizasyonu.....	24
1.4. Biyoafinite Teknolojisi.....	25
1.4.1. Biyoafinite Kromatografisi.....	25
1.4.1.1. Matriks Seçimi.....	28
1.4.1.2. Afinite Ligandının Seçimi.....	30
1.4.1.3. Grup spesifik Ligandlar.....	31
1.4.1.4. Uzatıcı Kollar.....	32
1.4.1.5. Aktivasyon Yöntemleri.....	33
1.4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi.....	34
1.4.2.1. HIC'nin Prensibi.....	38
1.4.2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisini Etkileyen Faktörler.....	39
1.5. Lizozim.	42
1.5.1. Lizozim Hakkında Genel Bilgiler.....	42
1.5.2. Lizozimin Yapısı.....	43
1.5.3. Lizozimin Katalitik Mekanizması.....	45
1.5.4. Lizozim için Önerilen Phillips Mekanizması.....	46
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	49
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	52
3.1. Kimyasal Maddeler.....	52
3.2. Deneysel Çalışmalar.....	52
3.2.1. Metakriloilamidotriptofan Monomerinin Sentezi.....	52
3.2.2. p(HEMA-MAT) Nanoyapılarının Hazırlanması.....	53
3.2.3. Nanoyapılarının Çöktürülmesi.....	55
3.2.4. p(HEMA- MAT) Nanoyapıların Karakterizasyonu.....	56
3.2.4.1. Yüzey Alanı.....	56
3.2.4.2. Elementel Analiz.....	56
3.2.4.3. FTIR Çalışmaları.....	57
3.2.4.4. Nanoyapılarının Boyut Analizi.....	57
3.2.4.5. Zeta Potansiyel Analizi.....	57
3.2.5. Lizozim Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	57
3.2.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	58
3.2.7. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivite Ölçüm Yöntemleri.....	58

3.2.8. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması.....	59
3.2.9. Isıl Kararlılık Denemeleri.....	59
3.2.10. Depo Kararlılığı Denemeleri.....	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	60
4.1. p(HEMA-MAT) Nanoyapılarının Karakterizasyonu.....	61
4.1.1. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	61
4.1.2. Yüzey Morfolojisi.....	63
4.1.3. Elementel Analiz.....	63
4.1.4. FTIR Çalışmaları.....	64
4.1.5. Polimerik Nano yapılarının Boyut Analizi.....	65
4.1.6. Zeta Potansiyel Analizi.....	66
4.2. Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları	67
4.2.1. Lizozimin Başlangıç Derişimine Etkisi.....	67
4.2.2. pH Etkisi.....	68
4.2.3. Sıcaklık Etkisi.....	69
4.2.4. Katalitik Aktivite Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi	70
4.2.5. Kinetik Sabitler.....	72
4.2.6. Isıl Kararlılık.....	75
4.2.7. Depo Kararlılığı.....	76
4.2.8. Adsorpsiyon İzotermi.....	77
4.2.9. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	100

SİMGELER DİZİNİ

NCF	Non katalitik fonksiyon
CF	Katalitik fonksiyon
AMP	Adenozin monofosfat
DEAE	Dietilaminoetil
CM	Karboksi metil
PVA	Polivinil alkol
PAAm	Poliakrilamid jel
CLEC	Çapraz bağlı enzim kristali
CLEA	Çapraz bağlı enzim kümesi
SDS	Sodyum dodesilsülfat
KPS	Potasyum persülfat
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
NAM	N-asetilmuramik asit
NAG	N-asetilglukoz amin
TEM	Transaminasyon elektron mikroskobu
HEMA	2-hidroksietilmetakrilat
EGDMA	Etilenglikoldimetakrilat
MAT	Metakrilamidotriptofan
NaN ₃	Sodyumazid
KSCN	Potasyum tiyosiyonat
NaOH	Sodyum hidroksit
K _m	Michaelis sabiti
V _{max}	Maksimum hız
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
p(HEMA)	Poli(hidroksietil metakrilat)
p(HEMA-MAT)	Poli(hidroksietilmetakrilatmetakrioloamidotriptofan)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. İmmobilize enzim uygulama alanları.....	6
Şekil 1.2. İmmobilize enzimin NCF ve CF arasındaki bağlantı ve uygulamaları....	7
Şekil 1.3. Enzim immobilizasyonu için genel prosedürlerin gösterimi.....	15
Şekil 1.4. Sürfaktan moleküllerinden oluşan miseller.....	21
Şekil 1.5. Şişmiş misel yapısı.....	22
Şekil 1.6. Persülfat iyonlarının iki sülfat serbest radikaline dönüşümü.....	22
Şekil 1.7 Oligomer oluşturmak üzere sülfat serbest radikallerinin monomer molekülleriyle tepkimesi.....	23
Şekil 1.8. İki serbest radikalın etkileşmesiyle gerçekleşen polimerizasyon.....	23
Şekil 1.9. Eş boyutlu polimer partikülleri.....	24
Şekil 1.10. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 1.11. Ligandların aktive edilmiş taşıyıcılara immobilizasyonları.....	34
Şekil 1.12. Proteinlerdeki hidrofobik bölgelerden agregat oluşumu.....	35
Şekil 1.13. Tuz destekli adsorpsiyon.....	35
Şekil 1.14. Proteinin liganda bağlanması.....	36
Şekil 1.15. Bağlı proteinin ligandan ayrılması.....	36
Şekil 1.16. HIC’de kullanılan tipik ligandlar.....	38
Şekil 1.17. Çapraz bağlı monosakkaritlerin birimlerinde eter bağıyla bağlanmış HIC ligandları.....	40
Şekil 1.18. Lizozimin (NAM) ile (NAG) arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağına hiro-lizlemesi şematik gösterimi.....	44
Şekil 1.19. Lizozimin substrat bağlanma bölgesinin şematik gösterimi.....	44
Şekil 1.20. Bir asetalin bir hemiasetale enzimatik olmayan asit katalizli hidrolizinin	
Şekil 1.21. Lizozim reaksiyonu için Phillips mekanizması.....	48
Şekil 3.1. p(HEMA-MAT) nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan emülsiyon Polimerizasyonun şematik gösterimi.....	54
Şekil 4.1. Nanopartiküllerinin standart kütle-hacim grafiği.....	62
Şekil 4.2. P(HEMA-MAT) nanoyapılarının SEM fotoğrafı.....	63
Şekil 4.3. P(HEMA-MAT) nanoyapılarının olası molekül formülü.....	64
Şekil 4.4. p(HEMA-MAT) nanoyapılarının FTIR spektrumu.....	65

Şekil 4.5. p(HEMA) nanoyapılarının FTIR spektrumu.....	65
Şekil 4.6. p(HEMA-MAT) nanoyapılarının zeta-boyut analizi.....	66
Şekil 4.7. Lizozim adsorpsiyonuna lizozim başlangıç derişiminin etkisi	67
Şekil 4.8. Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi.....	69
Şekil 4.9. Sıcaklığın adsoplanan lizozim miktarına etkisi.....	70
Şekil 4.10. pH'ın serbest ve immobilize lizozim üzerine etkisi.....	71
Şekil 4.11. Sıcaklığın serbest ve immobilize lizozim üzerine etkisi	72
Şekil 4.12. Serbest lizozim için Lineweaver- Burk grafiği.....	74
Şekil 4.13. İmmobilize lizozim için Linewear- Burk grafiği.....	74
Şekil 4.14. 50°C'de zamanla serbest ve immobilize lizozimin aktivitesindeki Değişim.....	76
Şekil 4.15. Serbest ve immobilize lizozimin depo kararlılığı grafiği.....	77
Şekil 4.16. Lizozim adsorpsiyonun Langmuir adsorpsiyon izotermi grafiği.....	78
Şekil 4.17. Lizozim enziminin adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği.....	79

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1 İmmobilize enzim kriterleri.....	8
Çizelge 1.2. Afinite kromatografisi dalları.....	28
Çizelge 1.3. Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri.....	29
Çizelge 1.4. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand sınıfları.....	20
Çizelge 1.5. Hofmeister serileri, salting-out ve salting-in etkiler.....	41
Çizelge 3.1. 155.64 nm (Polidispersite:017) boyutundaki nano yapılarının hazırlanma reçetesi ve polimerizasyon koşulları.....	55
Çizelge 4.1 İmmobilize ve serbest lizozim için kinetik parametreler.....	74

