

**YÜZEY BASKILAMA YÖNTEM İLE SEÇİCİ  
ADSORBENTLERİN HAZIRLANMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE KROMATOĞRAFİK  
UYGULAMALARI**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC  
ADSORBENTS VIA SURFACE IMPRINTING APPROACH  
AND THEIR CHROMATOGRAPHIC APPLICATIONS**

**KADİR EROL**

**Doç. Dr. Lokman Uzun**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

**KAD R EROL**'un hazırladığı “**Yüzey Baskılama Yöntemiyle Seçici Adsorbentlerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Kromatografik Uygulamaları**” adlı bu çalışmaya ağırlık jürisi tarafından **K MYA ANAB L M DALI**'nda **DOKTORA TEZ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli

**Ba kan**

.....

Doç. Dr. Lokman Uzun

**Danı man**

.....

Prof. Dr. Serap Şenel

**Üye**

.....

Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

**Üye**

.....

Yrd. Doç. Dr. Bora Garipcan

**Üye**

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZ** olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ**  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## ET K

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmamda;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, dilsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- kaynaklarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışmamı olarak sunmadığımı beyan ederim.

21/08/2014

KADİR EROL

## ÖZET

### YÜZEY BASKILAMA YÖNTEMİYLE SEÇİCİ ADSORBENTLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE KROMATOĞRAFİK UYGULAMALARI

KADIR EROL

Doktora Tezi, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Lokman Uzun

Ağustos 2014, 101 sayfa

Yüzey baskılanımı polimerler, günümüzde çok çeşitli alanlarda kendine yer bulan sentetik adsorbentler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, Cu(II) iyonunun ve model proteinin (lizozim), sulu çözeltilerden Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojeller ile adsorpsiyonu kesikli sistem ile araştırılmıştır. Polimerik yapıda ligand olarak polietilenimin (PEI) molekülü kullanılmıştır. Cu(II) iyonunun yapıya bağlanması elektrostatik etkileşimler vasıtasıyla gerçekleştirilmiş olup yapıya bağlanan Cu(II) iyonları sayesinde lizozim proteininin adsorpsiyonu sağlanmıştır. Hazırlanan poli(HEMA-GMA) kriyojeller; Fourier dönümlü infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve bilgisayarlı mikrotomografi ( $\mu$ CT) ile karakterize edilmiştir. Adsorpsiyondan önceki ve sonraki Cu(II) iyonlarının miktarı atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) ile lizozim iyonlarının miktarı ise UV-görünür spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Hem Cu(II) iyonu hem de lizozimin adsorpsiyon kapasitelerine pH'nın, temas süresinin, başlangıç derişiminin, sıcaklığının ve iyonik şiddetin etkisi kesikli sistemde incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında Cu(II) iyonu için en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 2540.0  $\mu$ g/g polimer, lizozim için ise 10270.0  $\mu$ g/g polimer olarak hesaplanmıştır. Cu(II) baskılanımı yapının Cu(II) iyonuna karşı seçicilik katsayısı; Co(II), Ni(II), Cd(II) ve Pb(II) iyonları karşı, yarı masız ve yarı malı ortamlarda oldukça yüksek bulunmuştur. Yine aynı şekilde lizozim baskılanımı polimerin lizozime karşı seçici olduğu, sitokrom c ve sırt

serum albumini (BSA) proteinlerine karşı tespit edilmiştir. Ayrıca Cu(II) ve lizozim baskılanması kriyojellerin Cu(II) ve lizozim baskılanmaması kriyojellere karşı baskılama seçicilik katsayıları da hesaplanmıştır. Cu(II) ve lizozim için matematiksel modellemeler uygulanmış olup her ikisi için de Langmuir adsorpsiyon modelinin uygun olduğu tespit edilmiş ve adsorpsiyon kinetiklerinin yalancı-ikinci derece modele uygun olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yüzey baskılama, Cu(II), lizozim, kriyojel, polietilenimin, metakrilol-benzotriazol.

## **ABSTRACT**

### **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC ADSORBENTS VIA SURFACE IMPRINTING APPROACH AND THEIR CHROMATOGRAPHIC APPLICATIONS**

**KAD R EROL**

**Philosophy of Doctorate, Department of Chemistry**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lokman Uzun**

**August 2014, 101 pages**

Today, surface imprinted polymers emerge as synthetic adsorbents with application in several areas. In this study, adsorptions of Cu(II) ion and model protein (lysozyme) from aqueous solution were investigated using Cu(II) ion and lysozyme imprinted poly(HEMA-GMA) cryogels via batch wise experiments. Polyethyleneimine (PEI) was used as ligand for the polymeric structure. Binding of Cu(II) ions into the structure was achieved via electrostatic interactions and adsorption of lysozyme was performed under favor of Cu(II) ions bounded to the structure. Characterization of poly(HEMA-GMA) cryogels was conducted via Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and microcomputerized tomography ( $\mu$ CT). The amount of Cu(II) ions before and after adsorption process was estimated using atomic absorption spectroscopy (AAS) whereas that of lysozyme molecules was determined using UV-visible spectroscopy. Effect of pH, interaction time, initial concentration of target molecule, temperature and ionic strength on the adsorption of both Cu(II) ions and lysozyme were determined through batch system. Under optimum conditions, maximum adsorption capacity for Cu(II) ions and lysozyme were determined as 2540.0  $\mu$ g/g and 10270.0  $\mu$ g/g polymer respectively. Selectivity coefficient of Cu(II) imprinted structure for Cu(II) ion is quite high as compared to that for Co(II), Ni(II), Cd(II) and Pb(II) ions under both noncompetitive and competitive manners. Similarly, determination of selectivity coefficient of lysozyme imprinted polymers

for lysozyme was conducted with respect to cytochrome c and bovine serum albumin (BSA). Moreover, relative selectivity coefficients of Cu(II) and lysozyme imprinted cryogels were calculated with respect to nonimprinted cryogels. Mathematical models for the adsorption pattern of Cu(II) and lysozyme were applied and Langmuir adsorption isotherm and pseudo-second order model of the kinetics were determined to be suitable for both analysis.

**Key Words:** Surface imprinting, Cu(II), lysozyme, cryogel, polyethyleneimine, methacryloyl benzotriazole.

## TE EKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca bana destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ediyorum.

Çalışmalarımın her safhasında benden desteğini esirmeyen, bilgi ve birikimlerinden her zaman yararlandığım sayın hocalarım Doç. Dr. Lokman UZUN ve Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayattaki deneyimlerinden her zaman faydalandığım, insanlığı ve akademisyenliği kendime örnek aldığım, tanıdığım ilk günden bu yana bana her türlü desteği veren sayın hocam Doç. Dr. Dursun Ali KÖSE'ye en derin saygılarımı sunuyorum ve teşekkür ediyorum.

Akademik hayatın zorlu sürecinde beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, sıkıntılı anlarımda derdimi paylaşan, mutluluklarımda sevincime ortak olan laboratuvar arkadaşım ve abim Kazım KÖSE'ye desteklerinden ötürü çok teşekkür ediyorum.

Son olarak beni bu hayatta her zaman destekleyen, her koşulda arkamda duran ve beni bu günlere getiren sevgili annem Sevim EROL, sevgili babam Bayram EROL ve sevgili ablama sonsuz minnet ve şükranlarımı sunuyorum ve bu tezi onlara armağan ediyorum.

*Kadir Erol, Çorum*

*2014*



## Ç İNDEK İLER

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TE EK KÜR</b> .....	v
<b>Ç İNDEK İLER</b> .....	vi
<b>Ç İZELGELER</b> .....	ix
<b>EK İLLER</b> .....	x
<b>1. G İR</b> .....	1
<b>2. TEMEL B İLG İLER</b> .....	5
2.1. Afinite Kromatografisi.....	5
2.2. İmmobilize Metal- elat Afinite Kromatografisi.....	7
2.3. Moleküler Baskılama .....	8
2.4. Kovalent Baskılama .....	10
2.5. Kovalent Olmayan Baskılama .....	11
2.6. Kovalent ve Kovalent Olmayan Baskılama Kombinasyonu.....	13
2.7. Yüzey Modifiye-Metal Koordine Baskılanımı Polimerler.....	13
2.8. Yüzey Baskılama .....	16
2.9. Kriyojeller .....	17
2.10. Polietilenimin .....	18
2.11. Bakır ve Bakır Metabolizması .....	19
2.12. Lizozim .....	21
<b>3. DENEYSEL Ç İALI MALAR</b> .....	23
3.1. Kimyasal Maddeler .....	23
3.2. Polimerik Malzemelerin Hazırlanması .....	23
3.2.1. Poli(HEMA-GMA) Kriyojel Sentezi .....	23
3.2.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellere Polietilenimin Ba lanması.....	24

3.2.3. Polietilenimin Ba lanımı poli(HEMA-GMA) Kriyojellere Metakrilat Gruplarının Ba lanması .....	24
3.2.4. Bakır(II) Yüzey Baskılanımı Kriyojeller .....	24
3.2.5. Lizozim Yüzey Baskılanımı Kriyojeller .....	26
3.3. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	27
3.3.1. Kriyojellerin i me Testi.....	27
3.3.2. Yüzey Morfolojisinin Belirlenmesi .....	27
3.3.3. FTIR Çalı maları .....	27
3.3.4. Yüzey Alanı Analizi .....	28
3.3.5. Termal Analiz .....	28
3.3.6. Bilgisayarlı Mikrotomografi ( $\mu$ CT) Analizi .....	28
3.4. Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalı maları.....	28
3.4.1. Cu(II) Yüzey Baskılanımı Kriyojeller .....	28
3.4.2. Lizozim Yüzey Baskılanımı Kriyojeller .....	29
3.4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	29
3.5. Elektroforetik Uygulama.....	30
3.5.1. Yumurta Akından Lizozim Safla tırılması.....	31
<b>4. SONUÇLAR VE TARTI MA.....</b>	<b>32</b>
4.1. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	32
4.1.1. i me Testi .....	32
4.1.2. Yüzey Morfolojisinin ncelenmesi .....	32
4.1.3. FTIR Çalı maları .....	39
4.1.4. Yüzey Alanı Analizi .....	43
4.1.5. Termal Analiz .....	43
4.1.6. Bilgisayarlı Mikrotomografi Analizi ( $\mu$ CT) .....	46
4.2. Adsorpsiyon Çalı maları.....	51
4.2.1. Cu(II) Yüzey Baskılanımı Kriyojeller .....	51

4.2.1.1. GMA Miktarının Etkisi .....	51
4.2.1.2. pH Etkisi .....	53
4.2.1.3. Süre Etkisi .....	54
4.2.1.4. Cu(II) Deri iminin Etkisi .....	55
4.2.1.5. Sıcaklı ın Etkisi.....	56
4.2.1.6. yonik iddetin Etkisi .....	57
4.2.1.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	58
4.2.1.8. Seçicilik Çalı maları.....	59
4.2.2. Lizozim Yüzey Baskılanmı Kriyojeller .....	63
4.2.2.1. pH Etkisi .....	63
4.2.2.2. Etkile im Süresinin Etkisi .....	64
4.2.2.3. Lizozim Deri iminin Etkisi .....	65
4.2.2.4. Sıcaklı ın Etkisi.....	66
4.2.2.5. yonik iddetin Etkisi .....	67
4.2.2.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	68
4.2.2.7. Seçicilik Çalı maları.....	69
4.3. Yumurta Akından Lizozim Safla tırılması ve SDS-PAGE Analizi.....	71
4.4. Matematiksel Modellemeler .....	72
4.4.1. Adsorpsiyon zotermeleri .....	72
4.4.2. Adsorpsiyon Kinetik Modelleme.....	77
<b>5. YORUM.....</b>	<b>82</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>85</b>
<b>ÖZGEÇM .....</b>	<b>101</b>

## Ç ZELGELER

<b>Çizelge 2.1.</b> Afinite kromatografisinde kullanan biyolojik etkile im örnekleri.....	6
<b>Çizelge 2.2.</b> Kovalent ve kovalent olmayan baskılanmanın avantajları ve dezavantajları. ..	12
<b>Çizelge 4.1.</b> Kriyojelin kütleli artı na ba lı olarak su tutma kapasiteleri. ....	32
<b>Çizelge 4.2.</b> Yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin yüzey alanı ölçümleri. ...	43
<b>Çizelge 4.3.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik katsayıları (Yarı masız).....	61
<b>Çizelge 4.4.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik katsayıları (Yarı malı).....	62
<b>Çizelge 4.5.</b> Lizozim yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik katsayıları. ....	70
<b>Çizelge 4.6.</b> Cu(II) adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları. ....	76
<b>Çizelge 4.7.</b> Lizozim adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları. ....	76
<b>Çizelge 4.8.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik sabitler. ....	81
<b>Çizelge 4.9.</b> Lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik sabitler. ....	81

## EK LLER

<b>ekil 2.1.</b> Afinite kromatografisinin ematik gösterimi. ....	5
<b>ekil 2.2.</b> Afinite kromatografisinin alt dalları. ....	6
<b>ekil 2.3.</b> mmobilize metal- elat afinite kromatografisinin ematik gösterimi. ....	8
<b>ekil 2.4.</b> Moleküler baskılama yönteminin ematik gösterimi. Çapraz ba lı polimer üzerinde hedef moleküle spesifik olan üç adet tanıma bölgesi (A, B ve C) bulunmaktadır [83]. ....	9
<b>ekil 2.5.</b> Kovalent baskılama [84]. ....	10
<b>ekil 2.6.</b> Kovalent olmayan moleküler baskılama. ....	11
<b>ekil 2.7.</b> Bis-imidazol substratları ile moleküler baskılanmı metal koordine polimerlerin hazırlanması [88]. ....	14
<b>ekil 2.8.</b> Poli(TRIM) partikülleri kullanarak yüzey baskılanmı metal koordine polimerlerin hazırlanması [89]. ....	15
<b>ekil 2.9.</b> Yüzey baskılamanın ematik gösterimi [114]. ....	17
<b>ekil 2.10.</b> Kriyojel sentezinin ematik gösterimi. ....	18
<b>ekil 2.11.</b> Polietilenimin. ....	19
<b>ekil 2.12.</b> Lizozimin yapısı. ....	22
<b>ekil 3.1.</b> Poli(HEMA-GMA) kriyojel membran. ....	25
<b>ekil 3.2.</b> Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin ikinci polimerle me öncesi (a) ve sonrası (b) görüntüsü. ....	26
<b>ekil 4.1.</b> Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin SEM görüntüleri. ....	33
<b>ekil 4.2.</b> Polietilenimin ba lanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin SEM görüntüleri. ..	34
<b>ekil 4.3.</b> Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 1:10) SEM görüntüleri. ....	35
<b>ekil 4.4.</b> Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 2:9) SEM görüntüleri. ....	36
<b>ekil 4.5.</b> Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 3:8) SEM görüntüleri. ....	37
<b>ekil 4.6.</b> Lizozim baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 1:10) SEM görüntüleri. ....	38
<b>ekil 4.7.</b> Poli(HEMA-GMA)'nın yapısı. ....	39
<b>ekil 4.8.</b> Poli(HEMA) kriyojelinin FTIR spektrumu. ....	40
<b>ekil 4.9.</b> Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin FTIR spektrumu. ....	41

<b>ekil 4.10.</b> Poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojelinin FTIR spektrumu.....	41
<b>ekil 4.11.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin FTIR spektrumu. .	42
<b>ekil 4.12.</b> Lizozim yüzey baskılanmı Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin FTIR spektrumu. .....	42
<b>ekil 4.13.</b> Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin termal analiz grafi i. ....	44
<b>ekil 4.14.</b> Poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojelinin termal analiz grafi i. ....	45
<b>ekil 4.15.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin termal analiz grafi i. ....	45
<b>ekil 4.16.</b> Lizozim yüzey baskılanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin termal analiz grafi i. ....	46
<b>ekil 4.17.</b> Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin üç boyutlu $\mu$ CT görüntüleri. ....	47
<b>ekil 4.18.</b> Poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojellerin üç boyutlu $\mu$ CT görüntüleri. ....	48
<b>ekil 4.19.</b> Lizozim yüzey baskılanmı (MIP) poli(HEMA-GMA) kriyojellerin üç boyutlu $\mu$ CT görüntüleri. ....	49
<b>ekil 4.20.</b> Lizozim yüzey baskılanmamı (NIP) poli(HEMA-GMA) kriyojellerin üç boyutlu $\mu$ CT görüntüleri. ....	50
<b>ekil 4.21.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellerin adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması. Cu(II) deri imi: 20 mg/L; etkileme süresi: 60 dak.; sıcaklık 25°C. ....	52
<b>ekil 4.22.</b> Poli(HEMA-GMA) polimerine PEI'nin çok noktali immobilizasyonu.....	53
<b>ekil 4.23.</b> Cu(II) adsorpsiyonuna çözelti pH'sının etkisi. Cu(II) deri imi: 100 mg/L; etkileme süresi: 120 dak.; sıcaklık 25°C.....	54
<b>ekil 4.24.</b> Cu(II) adsorpsiyonuna etkileme süresinin etkisi. pH: 5.5; Cu(II) deri imi: 100 mg/L; sıcaklık 25°C.....	55
<b>ekil 4.25.</b> Cu(II) adsorpsiyonuna Cu(II) deri iminin etkisi. pH: 5.5; etkileme süresi: 120 dak.; sıcaklık 25°C.....	56
<b>ekil 4.26.</b> Cu(II) adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. pH: 5.5; Cu(II) deri imi: 100 mg/L; etkileme süresi: 120 dak. ....	57
<b>ekil 4.27.</b> Cu(II) adsorpsiyonuna iyonik zenginliğin etkisi. pH: 5.5; Cu(II) deri imi: 100 mg/L; etkileme süresi: 120 dak.; sıcaklık 25°C.....	58
<b>ekil 4.28.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği. ....	59
<b>ekil 4.29.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik çalışmaları (Yarı masız).....	59
<b>ekil 4.30.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik çalışmaları (Yarı maslı).....	62

<b>ekil 4.31.</b> Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi. Lizozim deri imi: 100 mg/L; etkile im süresi: 60 dak.; sıcaklık 25°C. ....	64
<b>ekil 4.32.</b> Lizozim adsorpsiyonuna etkile im süresinin etkisi. pH: 6.5; lizozim deri imi: 100 mg/L; sıcaklık: 25°C.....	65
<b>ekil 4.33.</b> Lizozim adsorpsiyonuna lizozim deri iminin etkisi. pH: 6.5; etkile im süresi: 60 dak.; sıcaklık: 25°C.....	66
<b>ekil 4.34.</b> Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklı ın etkisi. pH: 6.5; lizozim deri imi: 200 mg/L; etkile im süresi: 60 dak. ....	67
<b>ekil 4.35.</b> yonik iddet etkisi. pH: 6.5; lizozim deri imi: 200 mg/L; etkile im süresi: 60 dak.; sıcaklık 25°C.....	68
<b>ekil 4.36.</b> Lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerin tekrar kullanılabilirli i.....	69
<b>ekil 4.37.</b> Lizozim baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik çalı maları.....	70
<b>ekil 4.38.</b> Lizozim proteininin elektroforetik ayrımı. 1. Band: Lizozim marker, 2. Band: Lizozim (desorpsiyon-yumurta akı), 3. Band: Lizozim (adsorpsiyon sonrası-yumurta akı), 4. Band: Lizozim (adsorpsiyon öncesi-yumurta akı), 5. Band: Lizozim (desorpsiyon-sulu çözelti), 6. Band: Lizozim (adsorpsiyon sonrası-sulu çözelti), 7. Band: Lizozim (adsorpsiyon öncesi-sulu çözelti), 8. Band: Lizozim marker. ....	72
<b>ekil 4.39.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller için Langmuir izotermi. ....	73
<b>ekil 4.40.</b> Lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller için Langmuir izotermi. ....	74
<b>ekil 4.41.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller için Freundlich izotermi.....	75
<b>ekil 4.42.</b> Lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller için Freundlich izotermi. ....	75
<b>ekil 4.43.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller için deneysel verilerin yalancı birinci derece grafi i. ....	78
<b>ekil 4.44.</b> Lizozim yüzey baskılanmı poli(HEMA-GMA) kriyojelleri için deneysel verilerin yalancı birinci derece kineti i. ....	78
<b>ekil 4.45.</b> Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller için deneysel verilerin yalancı ikinci derece grafi i. ....	79
<b>ekil 4.46.</b> Lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller için deneysel verilerin yalancı ikinci derece grafi i. ....	80

## 1. G R

Hastalıkların teşhis, tedavinin izlenmesi ve biyolojik süreçlerinin aydınlatılmasında ilgili proteinlerin karmaşık ortamlardan ayrılması ve saflaştırılması temel problem olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bağlamda, proteinlerin doğal ortamlarından saflaştırılması için farklı yaklaşımlar önerilmekte ve bu konudaki araştırmalar yoğun şekilde sürdürülmektedir.

Hedef protein moleküllerinin nitel ve nicel tayini için geliştirilen yöntemler son derece seçici olmalıdır. Bu yöntemlerde hedeflenen proteinler klinik hastalıkların tedavisi, biyoreaktörlerin kontrolü, organizma ve zehirlerin tayini gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [1]. Antijen ve antikor arasındaki spesifik etkileşimlere dayalı olan immüno-analizler, biyolojik örneklerdeki proteinlerin nitel ve nicel analizlerinde kullanılmaktadır [2]. Antikorlar; spesifiklik, seçicilik ve kolay kullanım gibi gereklilikleri karşılamasına rağmen hala birçok temel sınırlamalara sahiptir. Üretilen antikorların üretilmesi pahalı, zor ve zaman alıcı olabilmektedir [3,4].

Bu açıdan bakıldığında moleküler baskılanmış polimerler (MIP) gibi reseptör benzeri sentetik malzemeler sıklıkla alternatif seçenek olarak kullanılmaktadır [5-7]. Moleküler baskılanmış polimerler, maliyet ve verimlilik olarak biyoreseptörlere iyi bir alternatif olarak değerlendirilmekte olup çeşitli sensör uygulamalarında da kullanılmaktadır [8-10]. Enzim, antikor ve hormon reseptörleri gibi biyolojik moleküllerin aksine moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik ve kimyasal kararlılık, kolay hazırlanma, tekrar kullanılabilir potansiyeli ve düşük üretim maliyeti gibi önemli avantajlara sahiptir [6,17]. Moleküler baskılama tekniği 1970'li yılların başlarında Wulff öncülük etmiştir [7,11]. Wulff ve ekibinin yaptığı çalışmaları ile yapı üzerindeki kaviteelerde bulunan ilevsel gruplar sentetik bir reseptör gibi davranmaktadır [12]. Baskılanan yapının fonksiyonel monomer ile etkileşimine göre iki tip moleküler baskılama yöntemi geliştirilmiştir. Kovalent baskılama [12,13] ve kovalent olmayan baskılama [14-18].

Moleküler baskılanmış polimerler rasematların ayrılması için, bir enantiyomerin kalıp olarak kullanılması gerekmektedir [19-26]. Arzu edilen seçicilik sağlanmasına rağmen daha güçlü alıkonulan enantiyomerin pikri, bağlanma ve bırakma kinetiğinin yavaş olmasından dolayı geni çıkmaktadır. Bu sorun enantiyo-ayırılarda kullanılan moleküler baskılanmış



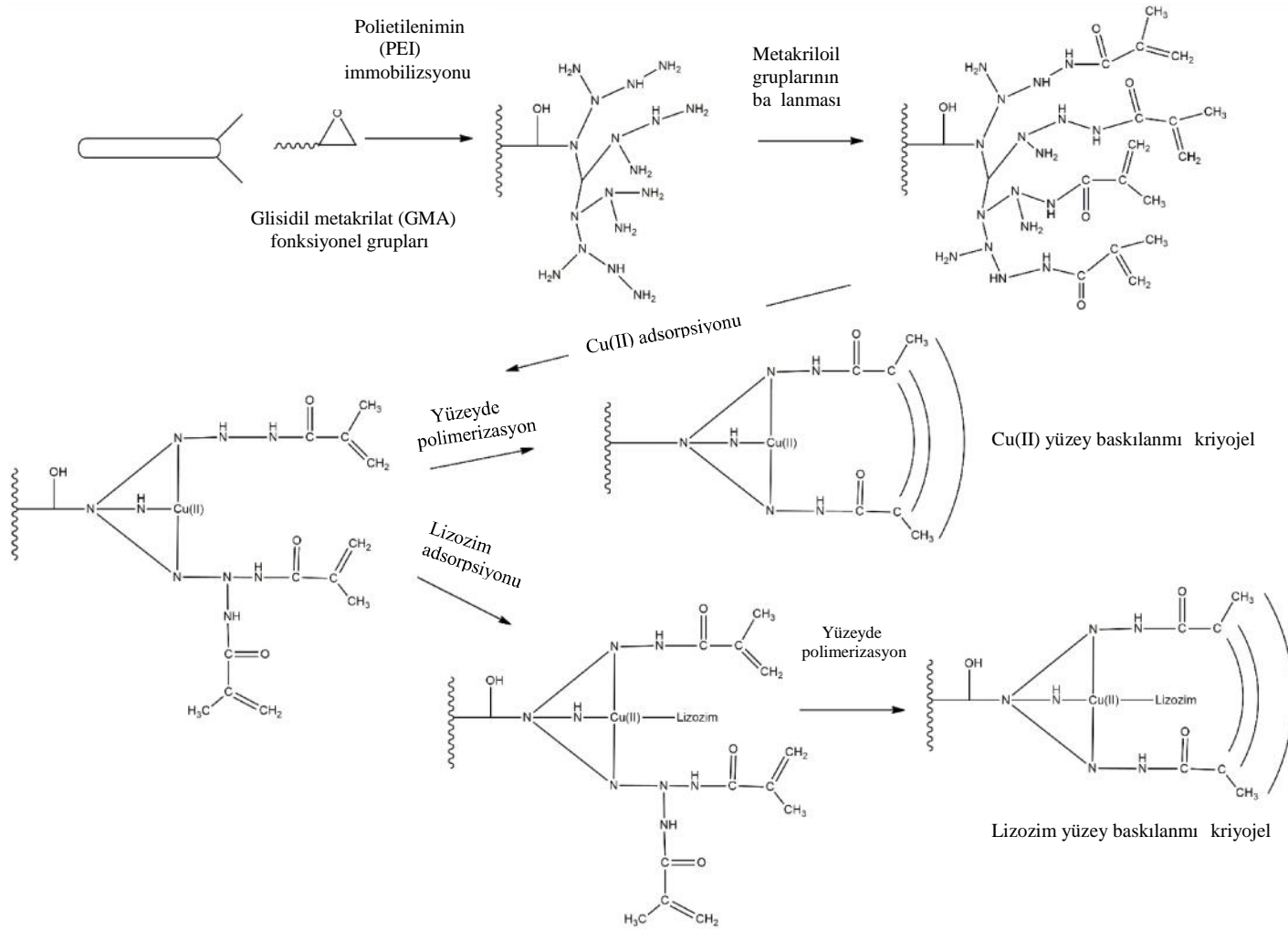
polimerler için çok önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak daha sonraları moleküler baskılanmış polimerler, hedef moleküller için son derece seçici adsorbentler olarak bilim dünyasında yerini sağlamlaştırmıştır [30-36]. Analitlerine karşı spesifik seçiciliğe sahip olan moleküler baskılanmış polimerlerin ulaştığı başarı seviyesi, diğer yöntemlerden hiçbirisi ile sınırlanamamıştır. Daha sonraki çalışmalarda da daha yüksek keskinliğe ve daha düşük tayin limitine sahip sonuçlar elde edilmiş olup [34], çalışmaları; biyoanaliz, biyosensör, gıda ve çevre uygulamalarına kadar uzanmıştır.

Günümüzde küçük moleküllerden, protein gibi biyomakromoleküllere kadar değişik büyüklükteki moleküller, moleküler baskılama tekniğinin çatısı altında değerlendirilmektedir. Protein baskılama yöntemine kendi içerisinde yığın, partikül, epitop veya aspirasyon kısmî ve yüzey baskılama olarak değişik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Yığın baskılama, küçük moleküllerin moleküler baskılanmasından adapte edilmiş olan geleneksel bir yöntemdir. Matris yığını içerisindeki üç boyutlu baskılama bölgelerinin proteinin bütünü için etkili olduğu en basit moleküler baskılama tekniğidir [35-38]. Difüzyonun yolunun uzunluğunu en aza indirmesine rağmen yığın baskılama, cansız sıkıcı ortam ve eleme işlemlerini gerektirmekte ve bu durum düzensiz şekilli partiküllerin oluşmasına neden olarak potansiyel baskılama bölgelerine zarar vermektedir [39,40]. Emülsiyon ve süspansiyon polimerizasyonu teknikleri ile düzgün şekilli (boncuk şeklinde) partiküllerin sentezi mümkün olmaktadır [41-43].

Epitop veya aspirasyon kısmî baskılamada, büyük polipeptit veya proteine bağlı olan küçük bir yapısal element kullanılmaktadır [44-48]. Bu yöntemde baskılama yapılırken hedef proteinin kısa bir peptit dizisi kullanılması için önemli bir avantaj elde edilmektedir. Saf protein moleküllerinin kararlı formlarından hedef peptit dizisini elde etmek zor olduğu için, hedef peptit dizisi doğal kaynaklardan temin edilmektedir. Ancak bu durum da epitopların rasyonel seçim problemini beraberinde getirmektedir.

Yüzey baskılama yönteminde ise ya polimer yüzeyinde ince bir film tabakası meydana getirilip yığın baskılamaya benzer bir yaklaşım uygulanmakta ya da hedef molekül, polimer yüzeyine çok yakın bir bölgeye bağlanıp daha sonra polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir [49].

Bu tez çalışmasında, Cu(II) iyonunun ve lizozimin sulu çözeltiden etkili bir şekilde ayrılması için poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat), [poli(HEMA-GMA)], yüzey baskılanmış seçici adsorbentler hazırlanmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde, 2-hidroksietil metakrilat ile glisidil metakrilatın reaksiyonundan poli(HEMA-GMA) kriyojeli sentezlenmiştir. Bu kriyojel üzerine ligand olarak polietilenimin molekülü bağlanmıştır. Daha sonra mevcut yapı metakriloil benzotriazol (MA-Bt) ile reaksiyona sokulup, yapıya tekrardan polimerleştirilebilir bir nitelik kazandırılmıştır. Daha sonra yapıya Cu(II) iyonları bağlanmıştır olup yapı, akrilamid tabakası ile tekrardan polimerleştirilmiştir. Daha sonraki çalışmada (protein yüzey baskılama), Cu(II) adsorpsiyonunun hemen ardından lizozim adsorpsiyonu yapılmış ve akabinde yüzeyde polimerizasyon benzer şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.1). Yüzey baskılanmış poli(HEMA-GMA) kriyojeller, FTIR, SEM ve bilgisayarlı mikrotomografi ( $\mu$ CT) ile karakterize edilmiştir. Daha sonra, poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin deneysel koşullarda kesikli sistemde Cu(II) ve lizozim adsorpsiyon özellikleri araştırılmıştır. Cu(II) ve lizozimin desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirliği de ayrıca test edilmiştir. Daha sonra yüzey baskılanmış poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin Cu(II) ve lizozim için seçiciliği araştırılmıştır. Son olarak, adsorpsiyon davranışları da araştırılmış ve uygun adsorpsiyon izotermi ile analiz edilmiştir. Deneysel verilerin yalancı-birinci ve yalancı-ikinci derece kinetik modelleri uygulanmıştır.

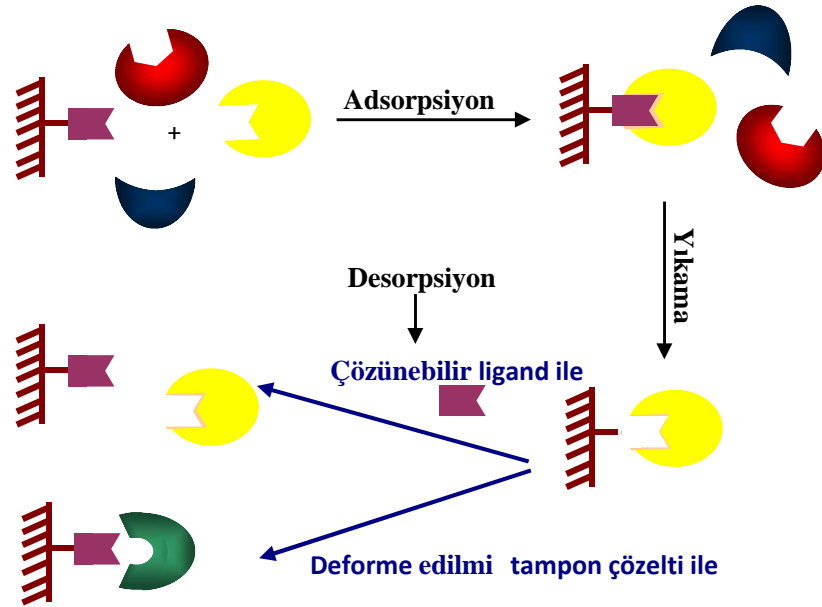


ekil 1.1. Cu(II) ve lizozim yüzey baskılama i lemlerinin tematik gösterimi.

## 2. TEMEL B LG LER

### 2.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, makromoleküller için tanıma, izole etme, ayırma ve safla tırma i lemleri için oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Enzimler, antibadiler, hormonlar, vitaminler, reseptörler, çok sayıda protein ve glikoproteinler, hatta bakteriler, virüsler ve hücreler afinite kromatografisi yöntemi ile ayrılmakta ve safla tırılmaktadır [50-52]. Bu yöntemde spesifik moleküler tanımlar söz konusudur [51,53-55]. Spesifik moleküler tanıma özelliğine sahip moleküller suda çözünmeyen katı desteğe immobilize edilmektedirler. Katı destek üzerine immobilize edilen ligand molekülü sayesinde, bu liganda e lenik olan hedef molekülün uygun ko ullar altında, seçici kromatografik ayrımı sa lanmaktadır. Hedef moleküller daha sonra, ortamın pH, iyonik iddet ve sıcaklık gibi de erleri de i tirilerek spesifik çözücüler veya serbest yarı macı ligandlar kullanılarak elüe edilmektedir ( ekil 2.1). Bu e kilde ligand ve hedef molekül arasındaki ba lar kırılmakta ve hedef moleküller saf bir e kilde elde edilmektedir [55].



ekil 2.1. Afinite kromatografisinin sematik gösterimi.

Bütün biyolojik i lemler, moleküller arasındaki spesifik etkileşimlere ba lıdır. Afinite kromatografisi, ismini, biyolojik afiniteye sahip moleküller arasında meydana gelen adsorpsiyon olayından almaktadır [51,56,57]. Etkileşim, katı desteğe ba lı olan bir ligand

ve bu liganda kar ı spesifik ilgisi olan hedef molekül arasında meydana gelmektedir (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1.** Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkilim örnekleri.

LİGAND	HEDEF MOLEKÜL
Antibadi	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör analogları)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü, membran proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asit ba ılayıcı protein (enzim veya histon)
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Enzimer	Lektin, enzim veya ba ıker ba ılayıcı protein

Afinite kromatografisi kendi içerisinde de alt dallara ayrılmı ı olup, bunların herbiri günümüzde çok fazla ilgi görmektedir ( ekil 2.2).



**ekil 2.2.** Afinite kromatografisinin alt dalları.

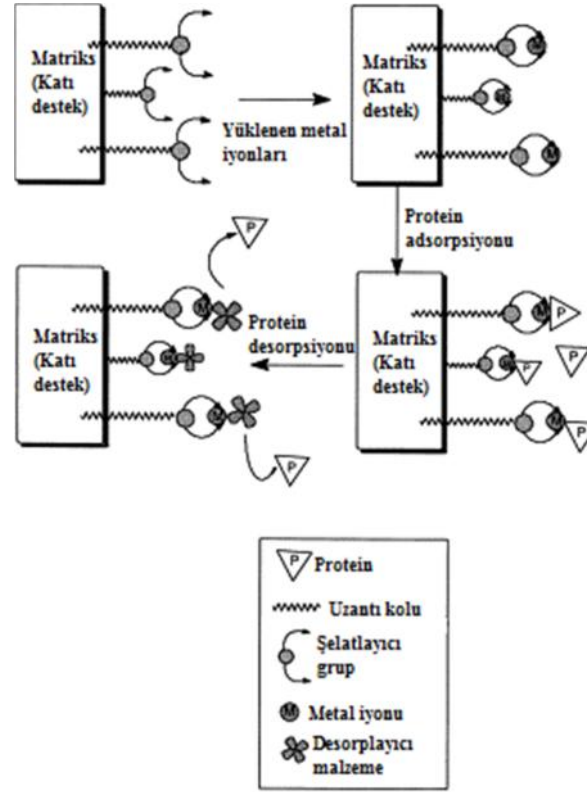
Afinite kromatografisini bu derece tercih sebebi yapan en önemli özelliği ligandın sadece hedeflenen türe spesifik olması ve diğer türler ile etkileşime girmemesidir. Ayrıca ligand ile hedef molekül arasındaki etkileşimin tersinir olması sayesinde hedef moleküller saf bir şekilde elde edilebilmektedir. Afinite kromatografisi gibi çok etkin bir yöntemin bile kendi içerisinde birtakım dezavantajları bulunabilmektedir. Örneğin bazı ligandlar tek bir moleküle değil de benzer özellikli molekül grubuna spesifik olabilmektedir. Bu tür ligandlar, *grup spesifik ligandlar* olarak adlandırılmaktadır.

Afinite kromatografisinde, ligand ile bu liganda spesifik molekül arasındaki etkileşim kuvveti optimum düzeyde olmalıdır. Etkileşim çok zayıf olursa sınırlı bir adsorpsiyon işlemi gerçekleşmemiştir olur. Etkileşim çok kuvvetli ise bu defa hedef molekülün elüsyon problemi ile karşılaşmaya başlanmaktadır. Bu yüzden aktif proteini denatüre etmeden pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi ortam koşullarının optimum derecede tutulması büyük önem arz etmektedir.

## **2.2. İmmobilize Metal- İlat Afinite Kromatografisi**

İmmobilize metal- İlat afinite kromatografisi yönteminde protein (ya da peptit) ve metal iyonu arasındaki etkileşimden yararlanılarak ayırma ve saflaştırma işlemleri yapılmaktadır. Bu yöntemde çok güçlü İlatlayıcılar matrisle bağlanmakta ve böylelikle yüklü metal iyonlarını da adsorbe edebilmektedir. Daha sonra hedef moleküller bu metal atomu ile elektrostatik etkileşim veya koordine kovalent bağ yolu ile etkileşime girmektedir. Daha sonra ortamın pH, sıcaklık ve iyonik güç gibi değişimleri değiştirilerek hedef moleküllerin desorpsiyonu gerçekleştirilebilmektedir [58].

İmmobilize metal- İlat afinite kromatografisi, spesifik proteinlerin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılan ve oldukça talep edilen bir yöntemdir (Şekil 2.3).



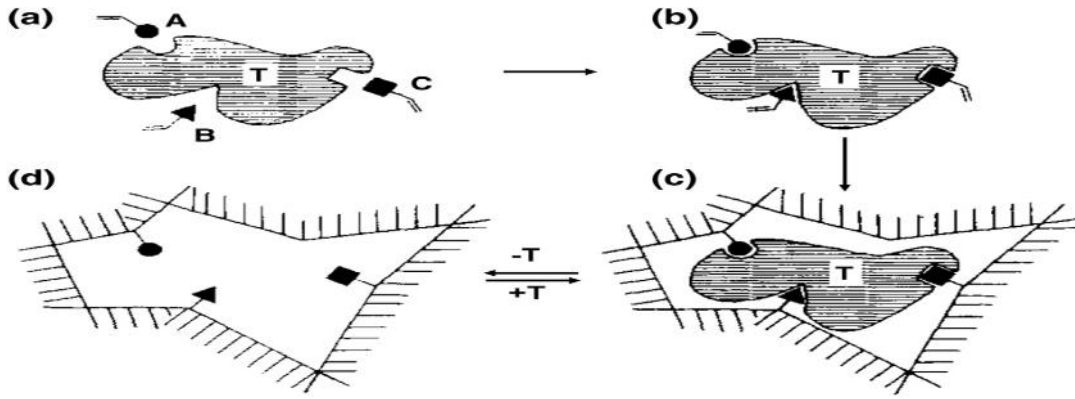
ekil 2.3. immobilize metal- elat afinite kromatografisinin mekanik gösterimi.

### 2.3. Moleküler Baskılama

Misafir molekülleri bir kavite içine alan yapılara olan ilgi, sahip oldukları uygulama potansiyeli ve çeşitliliğinden dolayı oldukça fazladır. Bu potansiyel; moleküler tanıma, kimyasal sensör, ayırma ve tanıma gibi alanlarda oldukça fazla kendine yer bulmaktadır [59-61]. Ev sahibi molekül içindeki kavitede meydana gelen ev sahibi-misafir molekül etkileşimi, güçlü hidrojen bağı veya metal-ligand kovalent bağ formasyonu ile meydana gelmektedir. Bu işlemlerde misafir moleküller çözelti içinde bulunmakta ve ev sahibi moleküllerin sahip olduğu kavitelere girmektedirler.

Bu tür yöntemlerin bir uzantısı olan moleküler baskılama yöntemi, hedef molekül için son derece seçici ve spesifik tanıma bölgelerine sahip matrikslerin kullanıldığı bir ayırma ve saflandırma yöntemidir (ekil 2.4). Son yıllarda oldukça önem verilen bir yöntemin kromatografi [62], sensör [63], ilaç salınımı ve kataliz [64] gibi çok sayıda uygulama alanı bulunmaktadır. Geleneksel yöntemlerle hazırlanan moleküler baskılama polimerlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan birincisi polimer tabakalar genellikle kalındır ve birim hacim başına düz en tanıma bölgesi göreceli olarak düşüktür. İkincisi ise kütle transfer

oranının düşük olması ve hedef moleküllerin tanıma bölgelerine kolaylıkla bağlanamamasıdır. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için son yıllarda yüzey baskılama [65-68], epitop baskılama [69,70], yeni sol-jel türevleri olan kserojeller [71], orta derecede çapraz bağlanımı [72], uyarılara anlık cevap veren hidrojeller [73], süper makro gözeneklere sahip krijojeller [74] ve nanopartiküller [75-77] geliştirilmiştir. Bu alanlarda yapılan çalışmaların kapsamlı avantajları öne sürülmekte ve rapor edilmektedir [78-82].



**ekil 2.4.** Moleküler baskılama yönteminin sematik gösterimi. Çapraz bağlanmış polimer üzerinde hedef moleküle spesifik olan üç adet tanıma bölgesi (A, B ve C) bulunmaktadır [83].

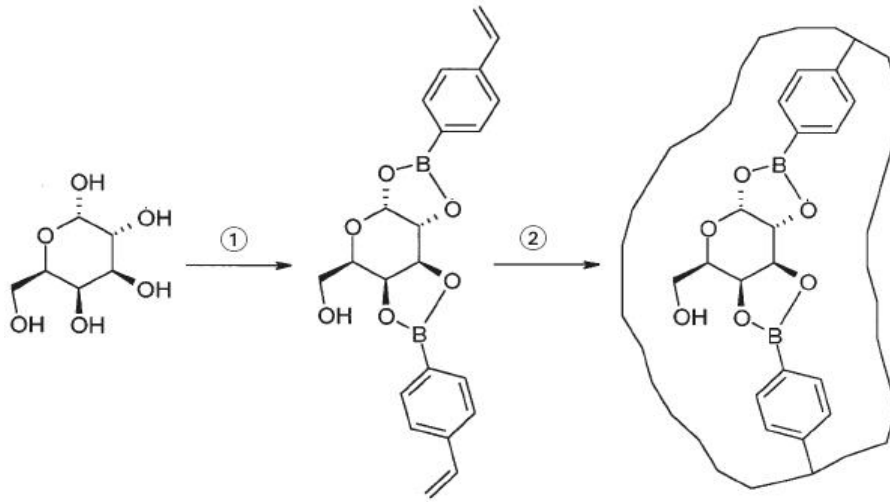
Günümüzde protein gibi büyük biyomakromoleküllerin ayırma ve saflaştırma işlemleri için moleküler tanıma bölgelerine sahip sentetik malzemelere son derece ihtiyaç duyulmaktadır. Anticadiller de bu amaçla kullanılabilir. Ancak çok pahalı ve kararsız oldukları için, moleküler baskılama yöntemine olan ilgi daha da artmaktadır. Doğal yapısında tanıma bölgelerine sahip anticadiller ile kıyaslandığında moleküler baskılama yöntemi ucuz bir yöntemdir. Ayrıca anticadillere göre daha kararlı, daha seçici ve kütle transfer kısıtlamaları daha düşüktür.

Moleküler baskılama yöntemi, fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasındaki etkileşime göre ikiye ayrılır. Bu iki çeşit yaklaşımda kendi içerisinde avantajları ve dezavantajları barındırmaktadır. Bu iki etkileşim çeşidinden hangisinin seçileceği çeşitli faktörlere bağlıdır.



## 2.4. Kovalent Baskılama

Wulff ve arkadaşları ilk kez kovalent baskılama olayını gerçekleştirmişlerdir [84] (ekil 2.5). Polivinilbenzen boronik asitini, 4-nitrofenil-D-piranoziti ile 2:1 oranında konjuge olması (hedef molekül) ve bu yapının metil metakrilat ve etilen dimetakrilat (çapraz bağlayıcı) moleküllüyle kopolimerize olması ile polimerizasyonu tamamlanmıştır. Polimerizasyondan sonra boronik asit ester ayrılması ve 4-nitrofenil-D-piranoziti uzaklaştırılmasıdır.



ekil 2.5. Kovalent baskılama [84].

Sonuçta meydana gelen polimerik yapı, arzu edildiği gibi baskılananlere son derece güçlü ve seçici olarak bağlanmaktadır. Bunun nedeni baskılanan yapının son durumda oluşan polimerik yapı tarafından hatırlanmasıdır. Polimerizasyon öncesi fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında kovalent bir bağlanma meydana gelmektedir. Daha sonra belirli koşullar altında polimerizasyonu gerçekleştirilmektedir. Polimerizasyon sonrası kovalent bağlar kırılmakta ve hedef molekül ortamdan uzaklaşmaktadır.

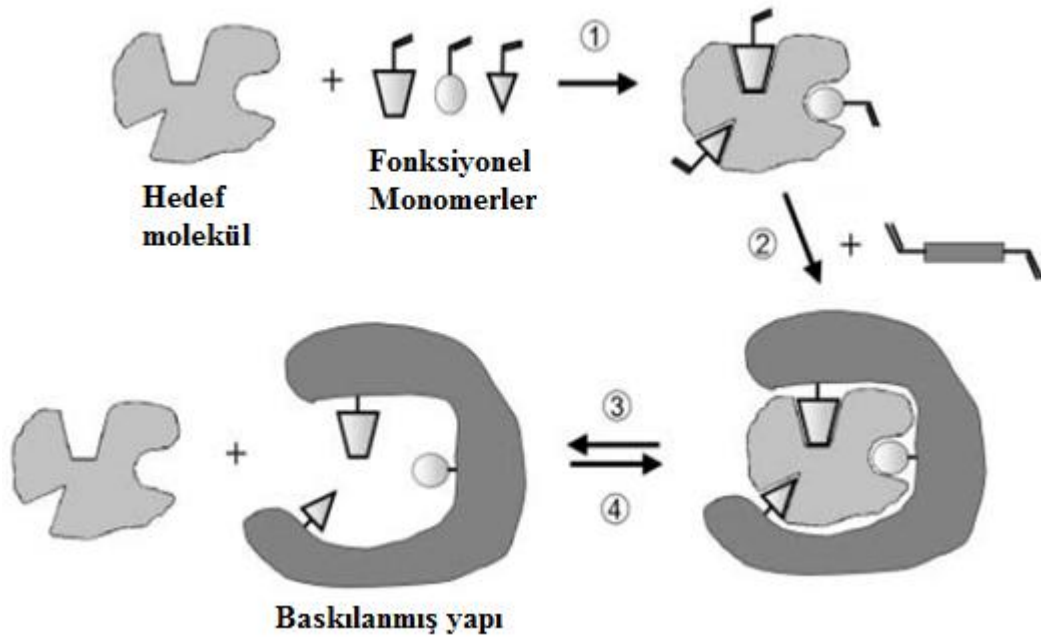
Kovalent baskılamada monomer ve hedef molekül arasındaki konjugatlar kararlı ve stokiyometriktir ve bundan dolayı moleküler baskılama işlemleri göreceli olarak düzgün olmaktadır. Ayrıca konjugatlar kovalent bağ ile oluşturulmuş ve oldukça kararlı olduğu için çok çeşitli polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek ya da düşük pH, yüksek derecede polar çözücü vs.) bulunmaktadır.

Bunun yanında kovalent baskılamanın bazı sıkıntıları da özellikle vurgulanmalıdır. Monomer-hedef molekül konjugatının sentezinin sıkıntılı olması ve pek de ekonomik olmaması, mevcut tersinir kovalent bağların sayısının sınırlı olması, kovalent bağların ayrılmasıyla amaçta baskı etkisinin azalması, kovalent bir bağın oluşumu ve kırılması söz konusu olduğu için hedef molekülün bağlanması ve ayrılmasının yavaş olması bunlar arasında sayılabilmektedir.

## 2.5. Kovalent Olmayan Baskılama

Mosbach ve arkadaşları, moleküler baskılama işlemi için fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında kovalent bağ oluşmasının zorunlu olmadığını belirtmişlerdir. Hatta kovalent olmayan etkileşimlerle de moleküler baskılama işlemi gerçekleştirilmiştir [85,86].

Monomer karışımı içerisinde yer alan türlerin kovalent olmayan etkileşimi kendiliğinden oluşumu ve moleküler baskılama etkisi tespit edilmiştir. Örneğin, metakrilik asitin, teofilin ilacı ile baskılanması işlemi, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir (ekil 2.6). Aynı yöntem çeşitli ilaçların, insektisitlerin ve diğer önemli kimyasalların baskılanmasında da kullanılmaktadır. Çok sayıda deneysel çalışma için bu yöntem o kadar kolaydır ki baskılama etkisi de bir o kadar dikkate değerdir.



ekil 2.6. Kovalent olmayan moleküler baskılama.

Bu i lemde hedef molekül-fonksiyonel monomer arasındaki etkile im; hidrojen ba ı, elektrostatik etkile im ve koordinasyon ba ı gibi kovalent olmayan etkile imlerle sa lanmaktadır. Polimerizasyon i lemi için öncelikle reaksiyon karı ımına gerekli bile enler eklenmektedir. Polimerizasyondan sonra hedef moleküller uygun çözücülerle ortamdan uzakla tılmaktadır. Polimer üzerinde, hedef molekülü kovalent olmayan etkile imlerle tanıyan bölgeler olu turulmaktadır.

Kovalent olmayan baskılamanın; fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında kovalent etkile im zorunlulu un bulunmaması, hedef molekülün ortamdan uzakla ma ko ullarının kolay olması, hedef molekülün ba lanmasının ve ayrılmasının hızlı olması gibi avantajları bulunmaktadır.

Baskılama i leminin belirgin bir e kilde olmaması (fonksiyonel monomer-hedef molekül etkile iminin de i ken olması ve tam olarak stokiyometrik olmaması), karı ım içerisindeki kovalent olmayan etkile imin olu umunun en üst düzeye çıkarılması için polimerizasyon artlarının dikkatli seçilmek zorunda olması, fonksiyonel monomerin a ırısının bulunmasının spesifik olmayan ba lanma bölgelerinin olu masına neden olması ve seçici ba lanmayı azaltması bu yöntemin ön plana çıkan dezavantajlarıdır.

**Çizelge 2.2.** Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajları ve dezavantajları.

	Kovalent	Kovalent olmayan
Monomer-hedef molekül konjugat sentezi	Zorunlu	Zorunlu de il
Polimerizasyon artları	Oldukça rahat	Sınırlı
Polimerizasyon sonrası hedef molekülün uzakla tılması	Zor	Kolay
Hedef molekülün ba lanması ve ayrılması	Yava	Hızlı
Ba lanma bölgesinin yapısı	Net	Daha az net

## 2.6. Kovalent ve Kovalent Olmayan Baskılama Kombinasyonu

Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajları kombine edilerek bir çalışmada altında toplanabilmektedir [87]. Bu yöntemde; polimer, kovalent baskılama işleminde olduğu gibi hazırlanmakta ancak hedef molekülün polimere bağlanması kovalent olmayan etkileşimler ile gerçekleştirilmektedir. Bu sayede kovalent baskılamanın en önemli problemlerinden biri olan hedef molekülün yavaş bağlanması ve ayrılması sorunu da ortadan kalkmaktadır.

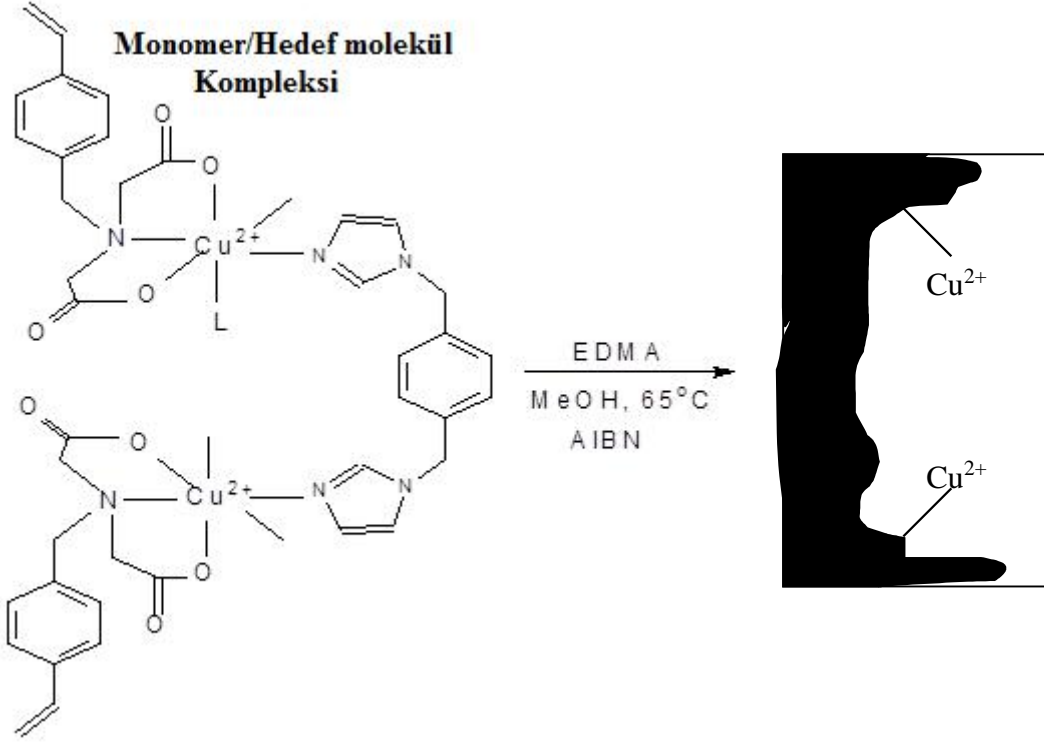
Moleküler baskılama yöntemi son yıllarda oldukça yaygın kullanılan bir teknik olduğu için hedef molekülün polimer üzerindeki bağlanma bölgesine ne kadar kolay bağlandı ve ayrıldı, yöntemin ekonomik şartlarının uygunluğu gibi konular oldukça önem kazanmaktadır.

## 2.7. Yüzey Modifiye-Metal Koordine Baskılanmış Polimerler

Metal koordinasyonun olduğu baskılanmış polimerler önemli avantajlar sunmasına rağmen, hedef molekülün serbestliğini optimize etmek için çaba harcanması sebebiyle, malzemelerden önemli ve verimli cihazları tasarlamak için gerekli olan bazı özelliklerle çelişmektedir. Örneğin kromatografik uygulamalarda, baskılanmış polimerler hazırlanırken, bağlanma bölgelerinin spesifik düzenlenmesini sağlamak için göreceli olarak yüksek derinimde çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır. Bu da partiküllerin içerisindeki substrat difüzyonunu engellenmektedir. Bu durum da pik genişlemesine ve düşük pik çözünürlüğüne neden olmaktadır. Aynı zamanda büyük substratların bağlanma bölgelerine ulaşmasını ciddi derecede sekteye uğratmaktadır. Ayrıca yavaş polimerizasyonundaki hedef moleküller, kromatografik ve sensör uygulamaları için zorunlu olan hızlı bağlanmayı sağlayan mekanik kararlılık ve homojeniteyi gerektiren işlemlerde kullanılamamaktadır.

Bu problemleri azaltmak için baskılanmış polimerlerin yüzeyine ince bir film kaplama düncesi doğmuştur. Burada yüzeyi kaplanacak olan katı destek uygun fiziko-mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Yüzey modifiye-metal koordine baskılanmış polimerlerin hazırlanması için iki kimyasal yaklaşım geliştirilmiştir. İlk yaklaşımda,  $\text{Cu}^{2+}$ -iminodiasetik asit (IDA) monomerinin polimerizasyonu ile moleküler baskılanmış bis-imidazol hedef molekülünün, bu reaktif polimer yüzeyinde hapsedilmiş metal komplekslerinin oluşmasını sağladığı tespit edilmiştir. Bu baskılanmış polimerlerin, benzer özellikli yavaş polimerler ile

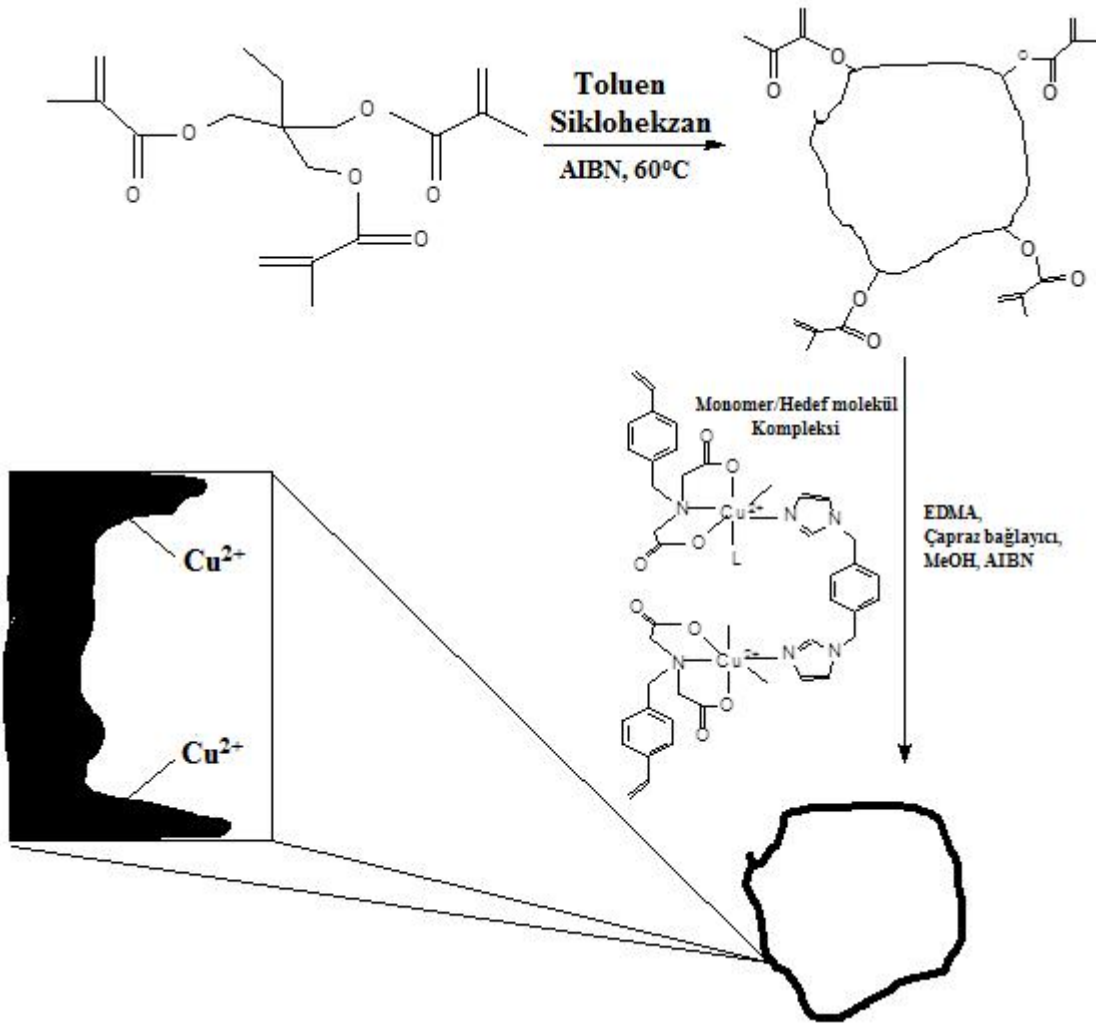
kıyaslandı ında, substrat ve metal iyonlarının uzakla tırılması ve tekrar yüklenmesi için daha hızlı bir kineti e sahip oldukları gözlenmiştir. Bu substrat tanıma özelli ine sahip iki çe it polimer de kar ıla tırılabilir bulunmu tur. Bu yüzey baskılama yöntemi ekil 2.7'de gösterilmiştir.



**ekil 2.7.** Bis-imidazol substratları ile moleküler baskılanmış metal koordine polimerlerin hazırlanması [88].

Bir di er yakla ımda ise Arnold ve arkadaşları, trimetil propan trimetakrilatı (TRIM) öncü bir monomer olarak kullanarak dayanıklı bir reaktif polimerik destek hazırlamışlardır [89]. Bu trifonksiyonel monomerin kontrollü artlar altındaki polimerizasyonu yüzey eri ilebilir polimerize olmaması metakrilat kalıntıları taşıyan büyük gözenekli polimerik yapıların meydana gelmesini sağlamaktadır ( ekil 2.8). Poli(TRIM) matriksinin yüksek mekanik kararlılığı ve farklı çözücüler içerisindeki i me e iliminin göreceli olarak düşük olması, bu reaktif desteğin fonksiyonelleşmesinin, polimerin yapının özelliğini ve yapısını etkilemediğinin düşünülmesini sağlamıştır. Bu durum da poli(TRIM) partiküllerinin moleküler baskılama i lemlerinde reaktif destek olarak değerlendirilebileceğinden üncesini doğurmu tur. Polimer ba ılı metakrilat kalıntılarının reaktivitesi, bu polimer deste e, çe itli

i levsel polimer zincirleri a ılama ile de erlendirilmi tir. Bu yüzey a ılanmı polimerleri karakterize etmek için spektroskopik ve yüzey analitik yöntemler geli tirilmi tir. Bundan dolayı, yüzey ba lı metakrilat kalıntılarının gözden kaybolması ve yeni i levsel polimer zincirlerinin olu ması, <sup>13</sup>C-NMR ve FTIR spektroskopik analiz yöntemleri ile aç ı a çıkarılmı tır. X-1 ını fotoelektron spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu analizleri poli(TRIM) partiküllerinin yüzeyinin a ılanmı i levsel polimer zincirleri ile kaplandı mını göstermektedir.



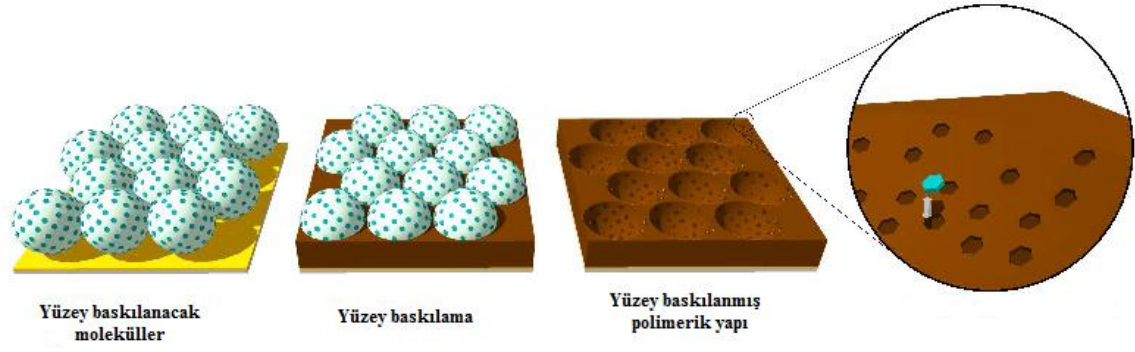
**ekil 2.8.** Poli(TRIM) partikülleri kullanarak yüzey baskılanmı metal koordine polimerlerin hazırlanması [89].

Di er bir çalı mada, modifiye edilmi gözenekli silika partiküller reaktif katı destek olarak kullanılarak yüzey baskılanmı metal koordine bölgeler yaratılmı tır [90]. Silika

partiküllerin içerdiği yüzey baskı polimerize gruplar, gözenekli silika grupların 3-(metoksisilil)propil metakrilat ile reaksiyona girmesi sonucu tespit edilmiştir. Sonuçta oluşan metakrilat fonksiyonel gruplarına sahip silika partiküller, yüzeye hapsedilmiş metal koordine baskılanmış bölgeler oluşturmak için kullanılmıştır. Bu bölgelerin yukarıda bahsedilen poli(TRIM) polimerine uygun olan bölgeler ile benzer özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzey modifiye baskılanmış polimerler, farklı substratlar için kromatografik işlemlerde bir adsorbent olarak değerlendirilmiştir.

## **2.8. Yüzey Baskılama**

Yüzey baskılama yönteminde ya ince bir film tabakası halinde polimer sentezlenip hedef molekül bir polimere baskılanmakta ya da protein molekülleri düz veya küresel bir substratın yüzeyine baskılanmakta ve bu substrat moleküllerinin etrafında sonradan bir polimerle meydana gelmektedir [91-93]. Bu baskılama yönteminde, hedef molekülün baskılanma bölgeleri polimer tabakasının yüzeyine çok yakın bölgelerde bulunmakta ve bu durum, kütle transferi ve kavitelelerin hedef molekülden ayrılmasındaki yaşanan bazı sorunların çözümüne yardımcı olmaktadır [92,94,95]. Özellikle nanoboyuttaki küresel protein molekülleri için uygun bir yöntemdir. Birçok molekül yüzey baskılama yönteminde destek maddesi olarak baskılanmış ile kullanılabilir. Örneğin; silika nanopartiküller [96-98], Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller [99-105], nanoteller/nanotüpler [106-109], polistiren nanopartiküller [110] ve kuantum noktalar [111]. Bununla beraber bahsi geçen bu partiküllerin yüzeylerinin işlevsel hale getirilmesi ve modifikasyonu kompleks ya da çok basamaklı bir polimerizasyonu ile sağlanmaktadır. Metil metakrilat (MMA) en önemli monomer bileşendir ve fonksiyonel monomerler ile kopolimer oluşturularak poli(MMA) kürelerini meydana getirmektedir [112]. Bu küreler protein baskılamaya son derece uygun mekanik yapıda ve iyi biyouyumluluğa sahip katı taşıyıcılardır [113]. Ancak yüzey baskılama yöntemi ile sınırlı sayıda baskılanmış bölge meydana gelmektedir.

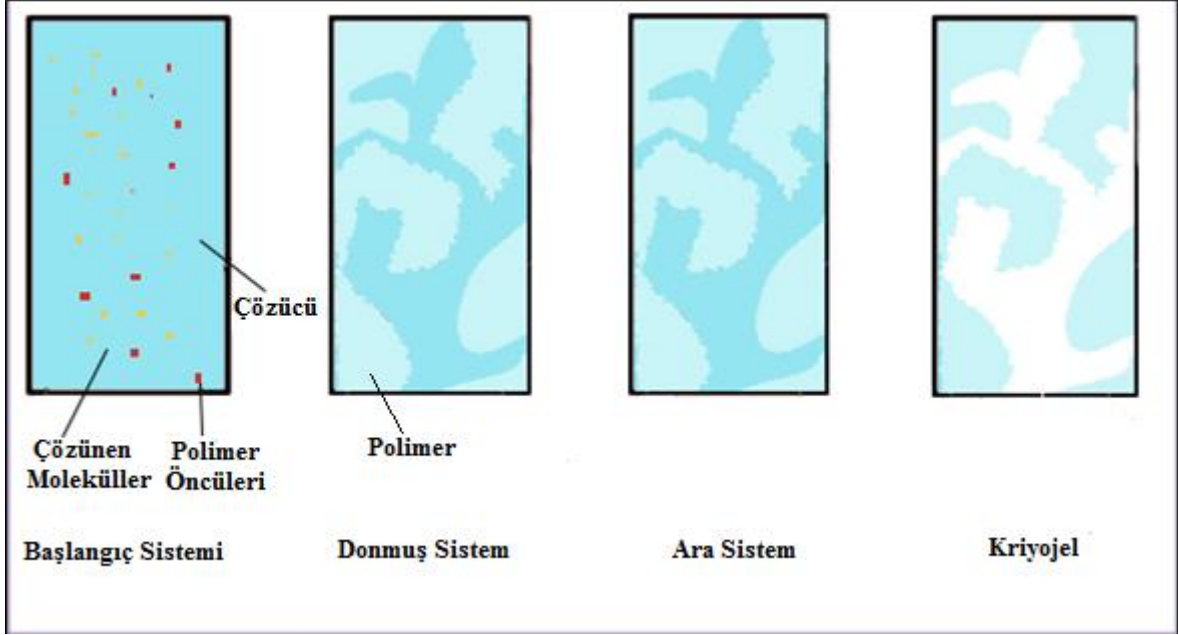


ekil 2.9. Yüzey baskılamanın ematik gösterimi [114].

## 2.9. Kriyojeller

Kriyojeller, çözücünün donma sıcaklığının altında hazırlanan hidrojel türevleridir. Donmuş veya kısmen donmuş çözeltide polimerizasyon meydana gelirken, çözücünün katı kristalleri, geniş ve birbirleriyle bağlantılı makrogözenekler meydana getirmektedir [115-120]. Su ve suda çözünebilen monomerler, sıklıkla suyla etkileşimi mükemmel olan kriyojellerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Su moleküllerinin kristal yapısı, aynı zamanda, rasgele ve birbirleriyle son derece bağlantılı akı kanallarının oluşmasını sağlamaktadır (ekil 2.10). Meydana gelen süper makrogözenekli yapı âdeta bir sünger andırmaktadır [116,117]. Kriyojellerin en önemli yapısal özellikleri, kısa difüzyon zamanları, ince yüzey filmleri, iletimle aktarımı tolare edebilmeleri ve düşük geri basınç özellikleridir. Bu özellikler ile kriyojellerden çevresel uygulamalar, biyoteknoloji ve biyokromatografi alanlarında oldukça fazla yararlanılmaktadır [115,121].





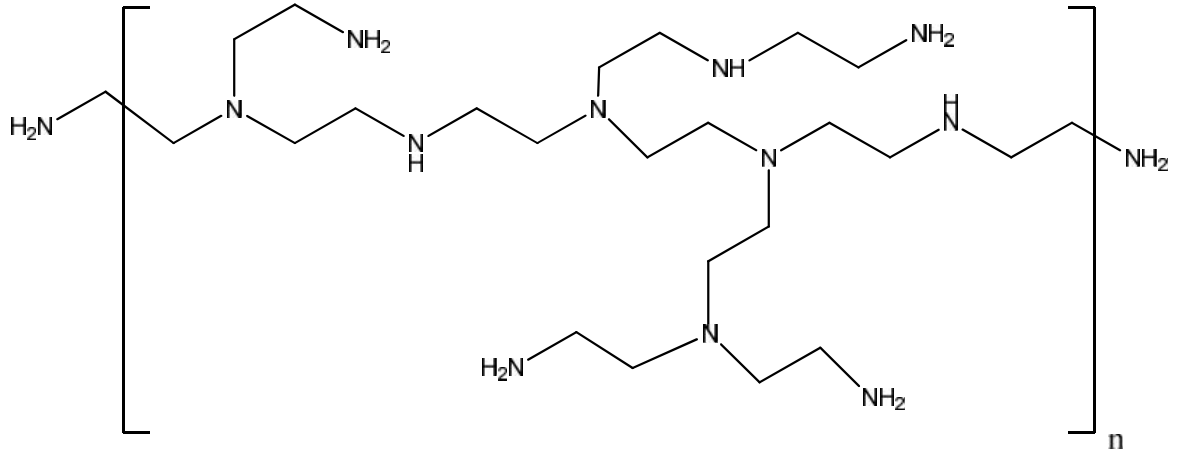
ekil 2.10. Kriyojel sentezinin ematik gösterimi.

## 2.10. Polietilenimin

Polietilenimin (PEI), enzim aktivasyonuna ve kararlılığına pozitif yönde etki eden bir polikasyon olarak bilinmektedir [122]. Bu polimer farklı uygulamalarda çok yönlü olarak kullanılmaktadır. Sentetik enzim üretiminde [122,123], nükleik asit çöktürme işlemlerinde [124] ve ham besinlerden protein saflandırılması sırasında hücre artıklarını çöktürmede bir ajan olarak kullanılmaktadır [124]. Ayrıca adsorpsiyon işlemlerinde biyokatalizörlerin katı destek üzerine immobilize edilmesinde de bu polimerden yararlanılmaktadır [125,126]. Enzimlerin ve afinite ligandlarının suda çözünabilir taşıyıcısı olan polietilenimin molekülü hem prokaryotik [127] hem de ökaryotik hücrelerde membranları destabilize eden bir antibakteriyel etki yaratmaktadır.

Polietilenimin, polianyonları kuvvetli bir şekilde bağlamaktadır. Uygulamalarda proteinler, nükleik asitler ve nükleotitler kullanılmaktadır. Aynı zamanda Ni(II), Pd(II), Pt(II), Co(II) ve Cu(II) gibi metal iyonlarını da kuvvetli şekilde bağlamaktadır.

Polietilenimin, etilenimin moleküllerinin polimerle ip dallanmış yapıda hidrofilik özellikte üç boyutlu bir yapı oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Oluşan yapıdaki aminlerin %25'i primer, %50'si sekonder ve %25'i de tersiyer amindir (ekil 2.11).



ekil 2.11. Polietilenimin.

## 2.11. Bakır ve Bakır Metabolizması

Ço u metal iyonunun farklı biyolojik rolleri günümüzde tanımlanmıştır. Metal iyonları; kataliz reaksiyonlarında, hormon aksiyonlarında, gen ve di er düzenleyici fonksiyonlarda, makromoleküllerin yapısal kararlılıklarında, kas kasılmalarında, sinir iletiminde ve ta nımında önemli roller üstlenmektedirler. Kobalt, bakır, demir, mangan, molibden, nikel, çinko vs. gibi alkali ve toprak alkali metallerinin ço u spesifik enzimlerin aktivasyon mekanizmalarında yer alan esansiyel bile enlerdir. Ancak bu metal iyonlarının miktarı belli bir seviyeyi a tı nda önemli sorunlar ba göstermektedir. A ır metallerin toksisitesi, biyomoleküllerin esansiyel fonksiyonel gruplarının bloklanması, biyomoleküllerin aktif konformasyonlarının de i tirilmesi, biyomembranların bütünlü ünün bozulması ve bazı di er biyolojik aktif ajanların de i tirilmesi gibi durumlara yol açmaktadır [128]. Toksik metaller vücuda hava yolu veya yiyecek ve içecekler ile girmekte ve hipertansiyon, kanser, akci er hastalıkları, böbrek fonksiyonlarında bozukluk, pankreas verimlili inin azalması ve dejenerasyon gibi sorunlara sebebiyet vermektedir [129].

En önemli a ır metallere den biri olan bakır, insanlar ve hayvanlar için gerekli bir iz elementtir. Vücutta bakır, C(I) (cuprous) ve Cu(II) (cupric) formlarında de i kenlik gösterirken, vücuttaki bakırın büyük ço unlu u Cu(II) formundadır. Bakır, indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinde kolaylıkla elektron alıp vermesi nedeniyle son derece önemli bir element olmasının yanı sıra serbest radikallerin uzakla tırılmasında da rol oynamaktadır. Bilim adamları halen bakırın vücuttaki fonksiyonları ile ilgili yeni bilgiler ara tırmaktadırlar.

Bakır birçok gıdalarda bulunmakta ve en çok da organ etlerinde, kabuklu deniz ürünlerinde, fındık ve tohumlarda bulunmaktadır. Bu day kepe i ve bütün tahıl ürünleri de bakır için iyi bir kaynaktır. Bitkilerin yeti ti i topraklardaki mineral miktarları de i kenlik gösterdi inden, bitkilerdeki bakır miktarı da de i ebilir.

Klinik olarak bakır eksikli i çok yaygın de ildir. Ciddi bakır eksikliklerinde, bakır serumu ve seruloplazmin de erleri %30 de erine dü ebilir. Bakır eksikli inin en bilinen klinik durumu anemidir ve bu aneminin demir eksikli iyle bir alakası yoktur ve bakır takviyesi alınarak tedavi edilebilmektedir. Bakır eksikli i aynı zamanda nötrofil (nötropeni) olarak bilinen beyaz kan hücrelerinin sayısının çok dü ük de erlere dü mesi ile de sonuçlanabilmektedir. Bu durumda vücudun hastalıklara kar ı direnci dü er. Bakır alımı eksik olan erken do an bebeklerde ve küçük çocuklarda osteoporoz ve kemik geli iminde bazı anormallikler riski bulunmaktadır. nek sütü bakır açısından fakirdir ve sadece inek sütüyle beslenen bebek ve çocuklarda bakır eksikli i daha sık gözlenmektedir.

Bakır toksisitesi genelde çok nadirdir. Akut bakır zehirlenmesinin ba lıca belirtileri karın a rısı, bulantı, kusma ve ishal gibi daha fazla bakır sindirimini ve emilimini engelleyen belirtilerdir. Daha ciddi akut bakır zehirlenmeleri ciddi karaci er hastalıklarına, böbrek rahatsızlıklarına, kusmaya ve ölüme dahi neden olabilmektedir. Bakıra uzun süreli maruz kalınması karaci er rahatsızlıkları ile sonuçlanmaktadır.

Genellikle, sa lıklı bireylerin 10.000 µg (10 mg) kadar günlük bakır alımı karaci ere zarar vermemektedir. Ayrıca bakır metabolizmasını etkileyen genetik bozukluklar (Wilson hastalığı, Hintli çocukluk çirozu, idiyopatik bakır zehirlenmeleri), bakır az miktarlarda alınsa dahi kronik bakır zehirlenmesi oldu u için sa lı ı olumsuz yönde etkilemektedir.

Bakır, tüketildi inde kan dola ımına hemen geçip, tüm vücuda da ılmaktadır. Tüketilen gıdalarda bakırın dı ındaki bazı özel maddeler, gastrointestinal sistemden kan dola ımına bakır geçi ini etkilemektedir. Vücut kan dola ımına yüksek miktarlarda bakır giri ini son derece iyi bloke etmektedir. Akci erler ve deriden vücuda ne kadar bakır girdi i bilinmektedir. Bakır vücudu idrar veya dı kı yoluyla terk edebilir. Ancak genelde dı kı yoluyla terk etmektedir. Bakırın vücuttan atılması ise birkaç gün sürmektedir. Genelde vücutta kalan bakır miktarı sabittir yani vücuda giren bakır miktarı ile vücudu terk eden bakır miktarı birbirine e ittir [130-132].

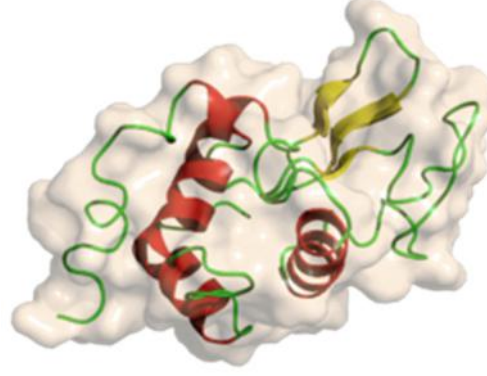
Bakır merkezleri, metaloproteinlerde bulunan ve en iyi karakterize edilen aktif merkezlerden biridir. Bu merkezler biyolojik reaksiyonlarda ve proteinler arası elektron transfer reaksiyonlarında rol almaktadırlar [133-138].

Bitkiler için gerekli bir eser element olan bakır özellikle asit karakterli topraklarda yüksek derinliklerde bulunmaktadır. Endüstride çok yaygın olarak kullanılan bu madde topraktan havadan ya da suyla karışarak toprağa geçmektedir. Fakat bakırın toprakta ve bitkide asıl birikmesi, bakır sülfat olarak bazı meyve bahçelerinde pestisit olarak kullanılmasıyla gerçekleşmektedir. Halk dilinde 'göz taşı' olarak bilinen bakır sülfat, gerek kuru toz halinde gerekse de daha yaygın olarak suda erimiş halde bahçelere ve narenciye bahçelerine spreyleme yoluyla püskürtülmektedir. Daha sonra bu madde, gerek püskürtülme anında topraktan gerekse daha sonra yağmur sularıyla yıkanarak toprağa geçmektedir. Bakır sülfat topraktaki yararlı mikroorganizmalar içinde toksik etki yarattığından topraktaki humus miktarını kısıtlayarak toprağın organik bakımından fakirleşmesine sebep olmaktadır [139].

## **2.12. Lizozim**

Lizozim proteini (E.C.3.2.1.17), yumurta akında bol bulunan bir glikozit hidrolaz enzimidir [140]. Dalakta, göz yaşı ve sütte de bulunduğu bilinmektedir. Moleküler ağırlığı 14.307 Da olup, 129 aminoasit rezidüsünden meydana gelmektedir. Bu rezidüler dört disülfid köprüsü tarafından çapraz bağlı olarak bulunmaktadır [141]. Lizozim, mukopolisakkaritlerdeki, muramik asit ve N-asetilglukozamin arasındaki (1-4) glikozit bağını hidroliz ederek bakterilerin hücre duvarını parçalamaktadır [142]. Antibakteriyel özelliğinden dolayı, hücre parçalayıcı bir ajan olarak oldukça fazla kullanım alanına sahiptir [143]. Lizozimin, antikanser ilaçlarında kullanım potansiyeli bulunmakla beraber aynı zamanda HIV virüsünden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır [144,145]. Ayrıca ülser ve enfeksiyonların tedavisinde de lizozim içeren ilaçlardan faydalanılmaktadır [146]. Lizozimden en fazla, gıda endüstrisindeki et, balık ürünleri, süt, günlük tüketim maddeleri, meyve ve sebze gibi besin maddelerinde koruyucu olarak yararlanılmaktadır [147,148]. Bundan dolayı lizozime olan talep oldukça fazladır ve bu enzimin ayırma ve saflaştırma teknikleri oldukça ilgi görmektedir.

Lizozimin geleneksel ayırma ve safla tırma yöntemleri; ultrafiltrasyon [149], çöktürme [150], kromatografi [151] ve ters misel ekstraksiyonudur [152]. Bütün bu yöntemler etkili olmasına rağmen genel olarak karma ık, zaman alıcı ve pahalıdır [153,154].



**ekil 2.12.** Lizozimin yapısı.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), polietilenimin (PEI) (dallanmış, moleküler ağırlığı 25 kDa) ve sıvı serum albumin (BSA) Aldrich (Münih, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Akrilamid (AA), N,N-metilen bisakrilamid (MBAA), sodyum lauril sülfat (SLS), bakır(II) nitrat trihidrat, nikel(II) nitrat heksahidrat, kobalt(II) nitrat heksahidrat, kadmiyum(II) nitrat tetrahidrat, kurun(II) nitrat ve sitokrom c Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Glisidil metakrilat (GMA) ve lizozim ise Fluka (St. Gallen, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Monomerler ve lizozim kullanılıncaya kadar 4°C'da buzdolabında muhafaza edilmiştir. N,N,N,N-tetrametiletilediamin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) BioRad (Hercules, CA, ABD) firmasından satın alınmıştır. APS desikatör içerisinde muhafaza edilmiştir. Benzotriazol metakrilat laboratuvar ortamında literatüre uygun şekilde sentezlenmiştir [155]. Adsorpsiyon deneylerinde kullanılan su; yüksek akımlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA, Almanya) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde i leme tabii tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgu iyon de i im sistemi kullanılarak safla tırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenli i 18 M<sup>-1</sup>dur.

#### 3.2. Polimerik Malzemelerin Hazırlanması

##### 3.2.1. Poli(HEMA-GMA) Kriyojel Sentezi

Çalışma kapsamında fonksiyonel monomer (Glisidil metakrilat, GMA) oranları farklı olan 3 kriyojel hazırlanmıştır. Monomer fazı olarak GMA (250, 500, 750 µL), HEMA (2500, 2250, 2000 µL) ve distile su (3250 µL) karıştırılmıştır. Bu amaçla toplam HEMA + GMA miktarı, 2750 µL olarak sabit tutulmuştur. Dağıtma fazı ise 0.5 g sodyum lauril sülfat (SLS), 12.80 mL distile su ve 1.2 mL EGDMA kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra iki faz birbirine karıştırılmıştır. 10-15 dakika buz banyosunda soğutulmuştur. 10 mg APS ve 50 µL TEMED ilâve edilmiştir. Karışım 24 saat boyunca -20°C'de bekletilmiştir.

Elde edilen kriyojeller membran (disk) şeklinde kesilmiştir. Distile su ile sodyum lauril sülfat ve diğer bileşenler uzaklaştırma ve yıkama suyu berrak hale gelinceye kadar çalkalayıcıda 100 rpm hızda çalkalanmış ve yıkama suyu 15 dakikada bir değiştirilmiştir.

### **3.2.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellere Polietilenimin Ba lanması**

Hazırlanan kriyojellere 25 mL %5'lik (w/w) pH: 10.6 polietilenimin çözeltisi ilâve edilmiştir. 50°C'de 100 rpm'de 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Membranlara bağlanmadan çözelti ortamında kalan polietilenimin miktarını tespit etmek için ortamdan 10 mL numune alınmış ve 0.1 M ayarlı HNO<sub>3</sub> çözeltisi ile potansiyometrik titrasyon yapılmıştır.

Fiziksel adsorpsiyon ile membran yüzeyine tutunan polietilenimin moleküllerini uzaklaştırmak için poli(HEMA-GMA) kriyojeller distile su ile defalarca yıkanmış ve yıkama suları toplanmıştır. Yıkama suyundaki polietilenimin miktarını tespit etmek için aynı şekilde 0.1 M ayarlı HNO<sub>3</sub> çözeltisi ile potansiyometrik titrasyon yapılmıştır.

Daha sonra polietilenimin molekülleri üzerindeki serbest amino grubu miktarı hesaplanmıştır. Bunun için kurumu membran üzerine (yaklaşık 0.05 g) 25 mL 0.1 M ayarlı HNO<sub>3</sub> çözeltisi ilâve edilmiştir. Membran üzerindeki serbest amino grupları tarafından nötralize edildikten sonra kalan HNO<sub>3</sub> miktarı da 0.1 M ayarlı NaOH çözeltisi ile titre edilerek hesaplanmıştır. Uygun kütle dengelikleri kullanılarak primer amin grupları hesaplanmıştır.

### **3.2.3. Polietilenimin Bağlanması poli(HEMA-GMA) Kriyojellere Metakrilat Gruplarının Bağlanması**

Polietilenimin molekülleri bağlanması polimerik yapıya metakrilat benzotriazolün etanoldeki çözeltisinden 19.18 mL (11.3 mg/mL) ilâve edilmiştir. Oda sıcaklığında 100 rpm'de 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra numuneler 2 saat boyunca distile su ile yıkanmıştır.

### **3.2.4. Bakır(II) Yüzey Baskılanması Kriyojeller**

Çalışmanın bu aşamasında; yüzey baskılanma işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermek amacıyla metakrilat grupları takılması PEI uçları aracılığıyla Cu(II) iyonlarının baskılanması amaçlanmıştır.

PEI gruplarının kısmen metakrilat türevine dönüştürülmesinden sonra serbest amin uçlarına Cu(II) iyonlarının adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 25 mL Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O

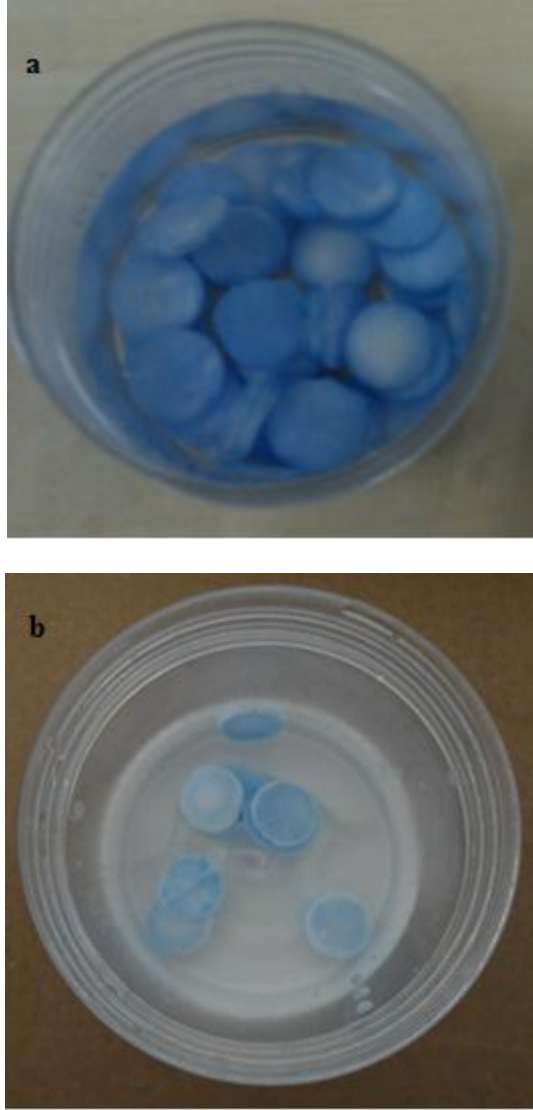
(100 mg/L) çözeltisi yaklaşık 2.75 g kriyojel membranının üzerine ilâve edilmiştir. 2 saat boyunca 100 rpm'de karıştırılan numuneler daha sonra 2 saat boyunca distile su ile yıkanarak non-spesifik olarak adsorbed Cu(II) iyonları uzaklaştırılmıştır (ekil 3.1).

Yüzeye adsorbed Cu(II) miktarı, adsorpsiyon öncesi, sonrası ve yıkama çözeltilerinden atomik absorpsiyon spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Yüzey baskınlama işlemi için kriyojeller tuzlu suda yıkılmış ve azot gazı ile iyice kurutulmuştur. Bu arada, 20 mL distile su içerisinde 1.0 g akrilamit ve 200 mg N,N -metilen bisakrilamit çözümü vardır. Daha sonra, bu çözelti 15-20 dak. buz banyosunda soğutulmuş ve 10 mg amonyum persülfat (APS) ve 50 µL N,N,N,N -tetrametiletildiamin (TEMED) ilâve edilmiştir. Kurutulan kriyojeller, bu çözelti içerisine atılarak, iki cam plaka arasında 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra, kriyojel örnekleri -20°C'da 24 saat bekletilerek, ikinci kriyojelle me yürütülmüştür. Elde edilen kriyojel numuneleri, aynı boyutta kesilmiştir (disk halindeki kriyojellerin ikinci polimerizasyon sırasında renkleri açıkça fark edilmektedir) ve yıkanarak saklanmıştır. Burada dikkat edilmeli ki; Cu(II) adsorpsiyonu sonrasında, rengi beyazdan maviye dönen kriyojellerin rengi, ikinci polimerle me sonrasında oluşan polimer katmanına bağlı olarak biraz solgunlaşmıştır (ekil 3.2).



**ekil 3.1.** Poli(HEMA-GMA) kriyojel membran.





**ekil 3.2.** Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin ikinci polimerle me öncesi (a) ve sonrası (b) görüntüsü.

### **3.2.5. Lizozim Yüzey Baskılanmı Kriyojeller**

Lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerinin sentezi bölüm 3.2.4'de verilen yöntemin biraz de i tirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Temel kriyojelin sentezi, PEI ba lanması, metakrilat gruplarının eklenmesi ve Cu(II) iyonlarının adsorpsiyonu daha önce verildi i gibi uygulanmıştır. Bu i lemlerin akabinde ise yeni bir a ama olarak lizozimin sulu çözeltiden adsorpsiyon a aması eklenmiştir. Bu amaçla, Cu(II) ba lanmı kriyojel örnekleri, lizozim çözeltisi (pH: 6.5, 25 mL, 100 mg/L) ile 2 saat etkile tirilmiştir. Ba lanan lizozim miktarı, adsorpsiyon öncesi, sonrası ve yıkama çözeltilerinin UV-görünür spektrofotometrik ölçümü ile (280 nm) belirlenmiştir. Bu a ama sonrası, yüzey baskılama i lemi bölüm 3.2.4'de verildi i gibi uygulanmıştır.

### **3.3. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Karakterizasyonu**

#### **3.3.1. Kriyojellerin Su Tutma Testi**

Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin su tutma kapasitesi distile su kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için öncelikle kuru kriyojel numuneleri, dikkatlice tartılmıştır. Daha sonra izotermal su banyosunun içerisindeki distile suyun içerisine atılmış ve 25°C'de 30 dak. bekletilmiştir. Daha sonra kriyojel örnekleri, bir süzgeç kağıdının üzerine alınıp yüzeye tutunan suyun uzaklaştırılması için hızlıca silinmiş, tekrar tartılmış ve su tutma kapasitesi hesaplanmıştır. Su tutma kapasitesini belirlemek için aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$\text{Su tutma kapasitesi } \% = [(W_s - W_o) / W_o] \times 100 \quad (\text{Denklik 3.1})$$

Bu denklemde  $W_o$  ve  $W_s$  sırasıyla kuru membranın ve su tutmuş membranın ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

#### **3.3.2. Yüzey Morfolojisinin Belirlenmesi**

Yüzey baskılanmış kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM; Carl Zeiss AG - EVO® 50 Series, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. Liyofilizasyon ile kurutulmuş kriyojel numunesi, SEM analizi için uygun hale getirilmiş ve SEM tutucusu üzerine çift taraflı karbon bant ile tutturulmuştur. Numune daha sonra ince bir altın tabakası ile vakum altında kaplanmıştır. Daha sonra elde edilen SEM numunesi cihaza yerleştirilmiş ve farklı büyütme oranlarında görüntüleri alınmıştır.

#### **3.3.3. FTIR Çalışmaları**

Poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin karakteristik fonksiyonel gruplarının belirlenmesinde Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (Thermo Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer, ABD) kullanılmıştır. Kriyojeller öncelikle kurutulup toz haline getirilmiş (yaklaşık 2 mg) ve toz halinde susuz potasyum bromür (KBr) (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış pelet haline getirilerek FTIR spektrumu 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında elde edilmiştir.

### 3.3.4. Yüzey Alanı Analizi

Kriyojellerin spesifik yüzey alanı, Brunauer-Emmett-Teller (BET), (AUTOSORPİİ 6B, Quantachrome Instruments, ABD) cihazı ile belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuş kriyojel numuneleri gözeneklerdeki oksijen ve nemi gidermek için, 35°C'de 100 mbar vakum altında 6 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra kriyojel örneklerine oda sıcaklığında azot gazı ile muamele edilmiştir.

### 3.3.5. Termal Analiz

Kriyojellerinin kimyasal içeriğini saptamak amacıyla termogravimetrik analiz cihazı (Shimadzu DTG-60H, Japonya) da kullanılmıştır. Termogravimetrik analiz işlemi, 50 cm<sup>3</sup>/dak. hava akı hızı ve 10°C/dak. ısıtma hızıyla 0°C'den 900°C'ye ısıtılarak gerçekleştirilmiştir ve kütle kayıpları incelenmiştir.

### 3.3.6. Bilgisayarlı Mikrotomografi (μCT) Analizi

Kriyojellerin içerdiği gözenekleri, bu gözeneklerin dağılımını ve akı kanallarını üç boyutlu görüntülemek amacıyla bilgisayarlı mikrotomografi (μCT) (Skyscan 1172, ABD) cihazı kullanılmıştır. Bunun için numunelere 360° açıyla 0.4° aralıklarla X-ışınları gönderilmiştir. Görüntü kalitesini arttırmak için 0.5 mm alüminyum filtre kullanılmıştır. X-ışınlarının gücü 50 kV olup her 500 ms'de bir, piksel başına 10 μm çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilmiştir.

## 3.4. Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları

### 3.4.1. Cu(II) Yüzey Baskılanması Kriyojeller

Adsorpsiyon deneyleri için kesikli sistem tercih edilmiştir. Numuneler 5 mL Cu (II) çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla pH, etkileme süresi, Cu(II) başlangıç derişimi, sıcaklık ve tuz etkisi incelenmiştir. Cu(II) çözeltisi ve tampon çözelti çalkayıcıda (100 rpm) 30 dak. karıştırılarak dengeye getirilmiştir. Daha sonra Cu(II) baskılanması kriyojellerin ilâvesiyle adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Adsorbe edilen Cu(II) miktarı atomik adsorpsiyon spektrometresi (AAS) (Perkin Elmer, AAAnalyst 800, ABD) ile ölçülmüştür. Adsorpsiyon kapasitesi amaçladığı formüle göre hesaplanmıştır.

$$q = [(C_i - C_f) \times V] / m \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Burada  $q$ ; adsorpsiyon miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ),  $C_i$ ; Cu(II) çözeltisinin adsorpsiyondan önceki deri imini ( $\mu\text{g/L}$ ),  $C_f$ ; Cu(II) çözeltisinin adsorpsiyondan sonraki deri imini ( $\mu\text{g/L}$ ),  $V$ ; adsorpsiyon ortamının hacmini (L) ve  $m$  ise adsorbent miktarını (g) göstermektedir.

### **3.4.2. Lizozim Yüzey Baskılanmı Kriyojeller**

Bu amaç için de kesikli sistem tercih edilmiştir. Numuneler 5 mL analit çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Lizozim çözeltisi ve tampon çözelti çalkayıcıda (100 rpm) 30 dak. karıştırılarak dengeye getirilmiştir. Daha sonra lizozim baskılanmı kriyojellerin ilavesiyle adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Adsorbe edilen lizozim miktarı UV-VIS Spektrofotometresi (UVmini-1240-UV-VIS Spektrofotometresi, Shimadzu, Tokyo, Japonya) ile 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Adsorpsiyon miktarına; pH etkisi, adsorpsiyon süresinin etkisi, lizozim çözeltisinin başlangıç deri iminin etkisi, sıcaklığın etkisi ve iyonik ziddetin etkisi incelenmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi Etkililik 3.2’de verilen kütle denklemi ile hesaplanmıştır.

### **3.4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik**

Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellerden adsorplanan Cu(II) iyonlarının desorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Cu(II) adsorplanmı kriyojeller 0.1 M HNO<sub>3</sub> çözeltisi bulunan 25 mL desorpsiyon ortamında, oda sıcaklığında 2 saat sürekli karıştırılmıştır. Jellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, Cu(II) adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojeller kullanılarak 5 kez tekrarlanmıştır. Sonraki adsorpsiyon işlemi öncesi, kriyojellere uygun dengeleme çözeltisi (bir sonraki adsorpsiyon çözeltisinin çözücüsü) ile dengelenmiştir.

Lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerden adsorplanan lizozimin desorpsiyonu da benzer şekilde kesikli sistemde çalışılmıştır. Lizozim adsorplanmı kriyojeller 1.0 M NaCl çözeltisi bulunan 25 mL desorpsiyon ortamında, oda sıcaklığında 2 saat sürekli karıştırılmıştır. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, lizozim adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojeller kullanılarak 5 kez tekrarlanmıştır. Döngülerin arasında, kriyojeller bir sonraki adsorpsiyon çözeltisinin tamponuyla dengelenmiştir.

### 3.5. Elektroforetik Uygulama

Elektroforez, iyonların elektrik alandaki göç hareketini esas alan bir ayırma yöntemidir. Pozitif yüklü iyonlar negatif elektroda (katot) ve negatif yüklü iyonlar pozitif elektroda (anot) doğru hareket etmektedirler. İyonlar, toplam yüklerine, boyutlarına ve ekilerine göre farklı hızlara sahip olmakta ve buna göre jel üzerinde farklı hızlarda göç etmektedirler. Bu çalışmalarda sodyum dodesil sülfat (SDS) bütün proteinlerin yükünü negatif yapmak için kullanılmaktadır.

SDS-PAGE analizi için, önceden hazırlanmış olan %12'lik yürütme jeli (0.375 M Tris-HCl, pH: 8.8, %12 akrilamid) enjektör ile iki cam arasına dökülmüştür. Burada jelin hava ile temasını kesmek için üzeri tamamen saf su ile doldurulmuştur. Jelin polimerize olması için yaklaşık 30 dakika beklenilmiştir. Yürütme jeli polimerize olduktan sonra üzerindeki saf su, aparat ters çevrilerek boşaltılmıştır. Bu işlemden sonra %5'lik yükleme jeli (0.125 M Tris-HCl, pH: 6.8, %5 akrilamid), yürütme jeli üzerine dökülmüştür. Camlar arasına, örneklerin (desorbe edilmiş lizozim çözeltisi) yükleneceği çukurların hazırlanması için plastik taraklar yerleştirilmiştir. Taraklar, etrafında baloncuk kalmayacak şekilde sabitlenmiş ve 20-30 dakika beklenilmiştir. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılmış, camlar aparat üzerine yerleştirildikten sonra tankın içi SDS içeren elektroforez tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% SDS, pH: 8.3) ile doldurulmuş ve 8 µL örnek (desorbe edilmiş lizozim çözeltisi), 8 µL örnek tamponu (SDS, β-merkaptoetanol, gliserol, tris-HCl ve bromfenol mavisi içeren) ile karıştırılıp tüm numune elektroforez için yardımı ile jel çukurlarına yüklenmiştir. İlk kuyucu standart (lizozim içeren) yüklenmiştir. Tüm bu işlemler esnasında jellerin içinde ve arasında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edilmiştir. Yüklenen örnekler güç kaynağı ile 150 A'de, 3.5-4 saat elektroforeze tabi tutulmuştur. Bromfenol mavisinin jeldeki görüntüsü takip edilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez durdurulmuş ve jel camların arasından dikkatlice çıkarılarak Coomassie Brilliant Blue R-250 ile elektroforez tamponu içinde 20 dakika hafifçe sağa sola hareket ettirilerek boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jel, boya çıkarıcıda bir gece bekletilmiştir. Son aşamada jelin foto rafları çekilmiş ve oluşan bantlar, standart bantları ile karşılaştırılmıştır. Bantlar arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilmiştir.

### 3.5.1. Yumurta Akından Lizozim Safla tırılması

Bu çalı madaki amaç, yumurta akına, lizozim yüzey baskılanmı kriyojelleri muamele edip lizozim safla tırmak ve elde edilen lizozimin SDS-PAGE analizi ile saflı nı belirlemektir. Yumurta akı proteinlerinin yakla ık %3.4'ü lizozim proteininden meydana gelmektedir. İlk amada, yumurta akı taze yumurtadan ayrılma ve fosfat tamponu (1:10) (0.1 M, pH: 6.5) ile seyreltilmi tir. Seyreltilmi yumurta akı, buz banyosunda homojenize edilmi ve 4°C'de, 14.500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmi tir. Santrifüj sonrasında alınan numunelerin üzerindeki süpernatandan, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile albumin gibi daha büyük moleköl kütesine sahip proteinler ortamdan uzakla tırılma tir.

100 mg/L, 25 mL lizozim çözeltisi pH:6.5 tampon çözeltisi içerisinde hazırlanma tir. Bu çözeltiden 8 µL alınma ve 8 µL örnek çözeltisi (SDS ile hazırlanan, brom fenol mavisi içeren) ile karı tırılarak jel kuyularına aktarılmı tir. Elektrofrezden sonra ayrılan lizozim Coomassie Brilliant R-250 ile boyanarak görünür hale getirilmi ve ilk (ba langıç) olarak kaydedilmi tir.

Kriyojeller 25 mL distile su ile yıkanma ve 0.1 M fosfat tamponu (pH: 6.5) ile muamele edilmi tir. Daha sonra optimum deney ko ullarında adsorpsiyon i lemi uygulanma tir. Kriyojeller üzerine adsorplanan lizozim 1.0 M NaCl çözeltisi ile desorplanma tir. Bu çözeltiden alınan 8 µL, elektroforetik analiz için kullanılmı ve son (final) olarak kaydedilmi tir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTI MA

### 4.1. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Karakterizasyonu

#### 4.1.1. i me Testi

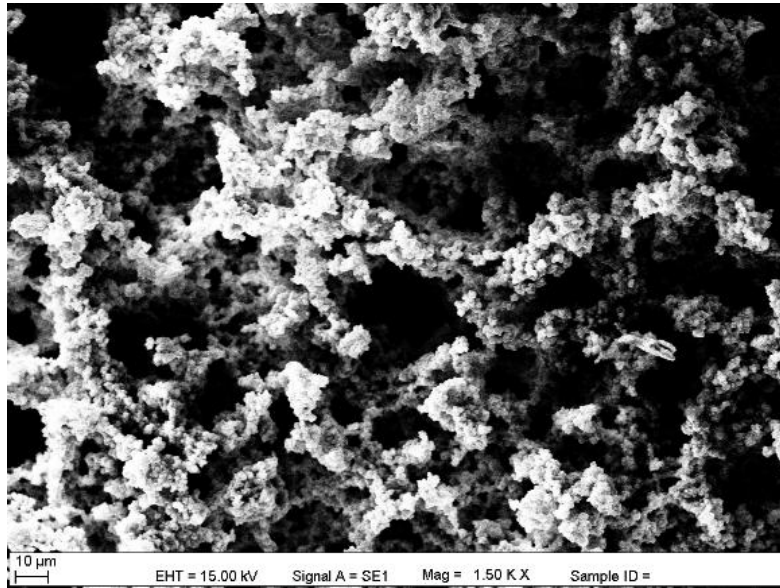
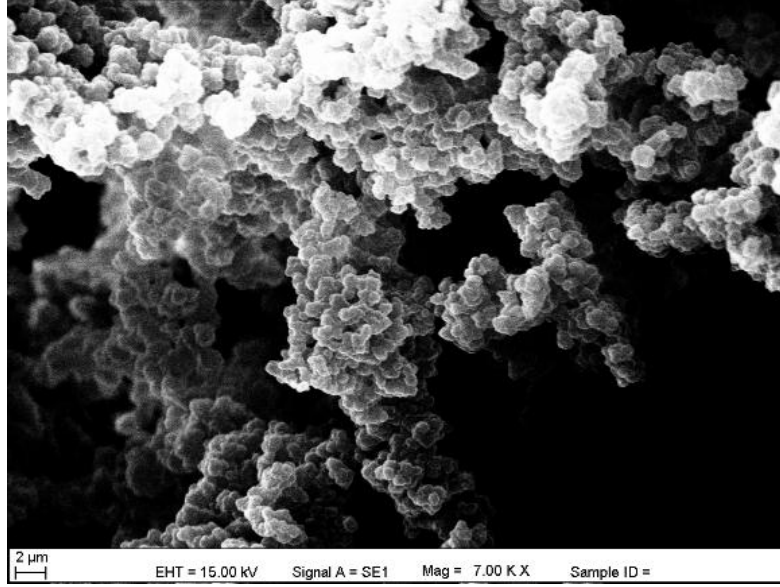
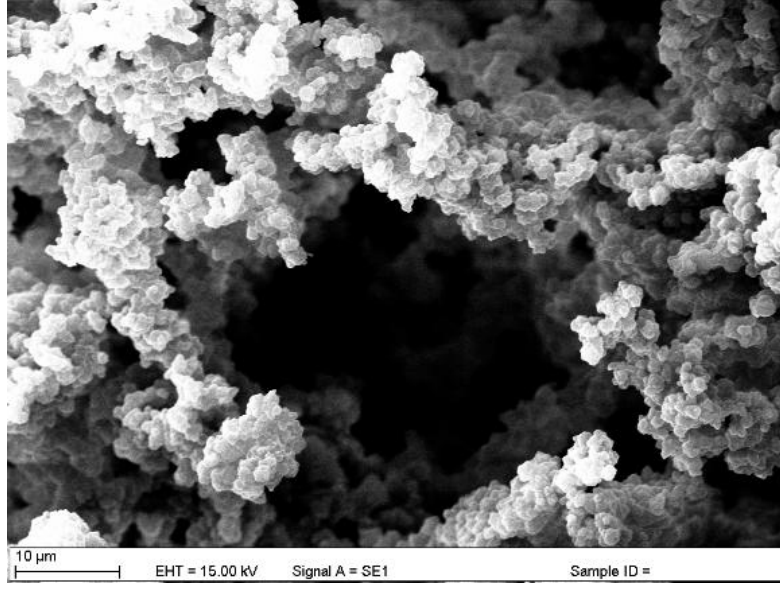
Hazırlanan kriyojellerin i me testi kütleli artı a göre yapılmı olup, kriyojellerin su tutma kapasitesi E itlik 3.1'deki gibi hesaplanmı ve Çizelge 4.1'de verilmi tir. Çizelgeden de görüldü ü gibi, Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellerin kuru kütlesi yakla ık 55.0 mg/disk, i me testi sonrasında ise yakla ık 308.0 mg/disk olarak belirlenmi tir. Bu de erlere göre Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellerin su tutma kapasitesi % 460 olarak hesaplanmı tir. Lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerin ise kuru kütlesi yakla ık 64.6 mg/disk, i me testi sonrasında ise yakla ık 365.0 mg/disk olarak belirlenmi tir. Bu sonuçlara göre lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerin su tutma kapasitesi % 465 olarak hesaplanmı tir. Buna göre lizozimin yapıya girmesiyle birlikte, su tutan grup sayısının artması bu i me davranı de i ikli ine sebep olmu tur.

**Çizelge 4.1.** Kriyojelin kütleli artı na ba lı olarak su tutma kapasiteleri.

Kriyojel	Kuru kütle (mg)	i me testi sonrası kütle (mg)	Su tutma (%)
Poli(HEMA-GMA)	47.0	224.0	377
Poli(HEMA-GMA)-PEI	49.8	252.0	406
Poli(HEMA-GMA)-PEI-Cu(II)	55.0	308.0	460
Poli(HEMA-GMA)-PEI-Cu(II)-Lizozim	64.6	365.0	465

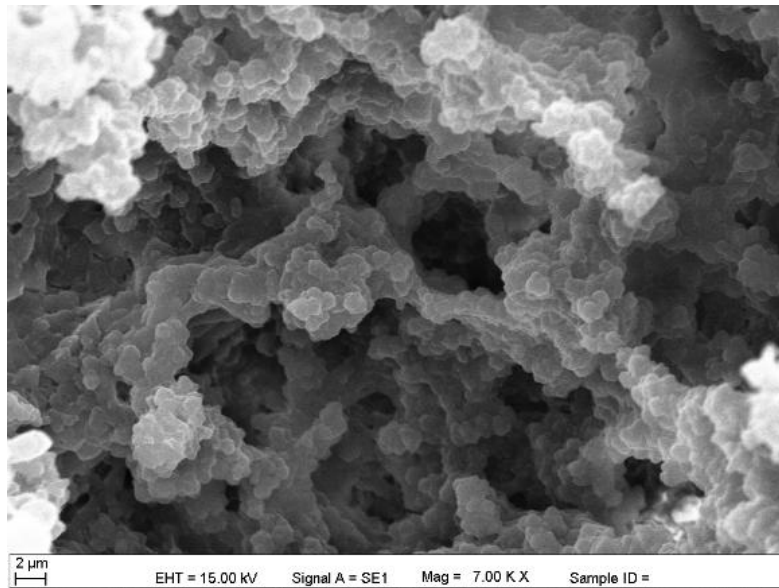
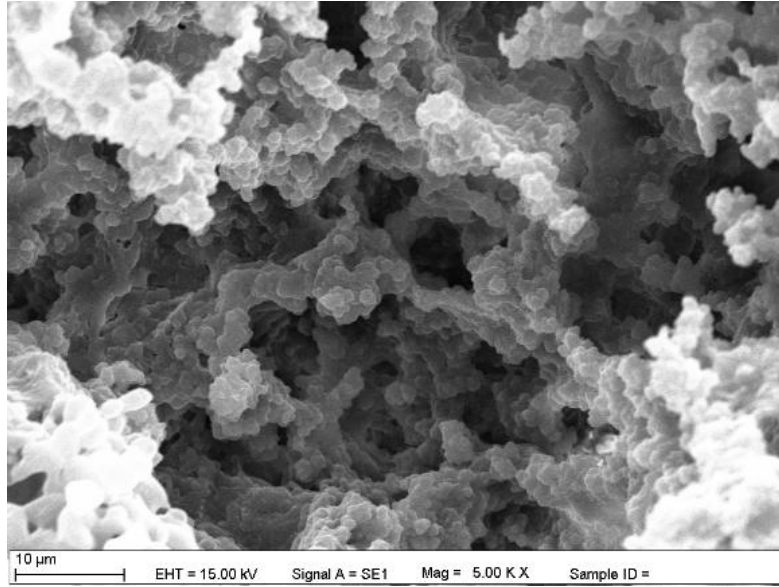
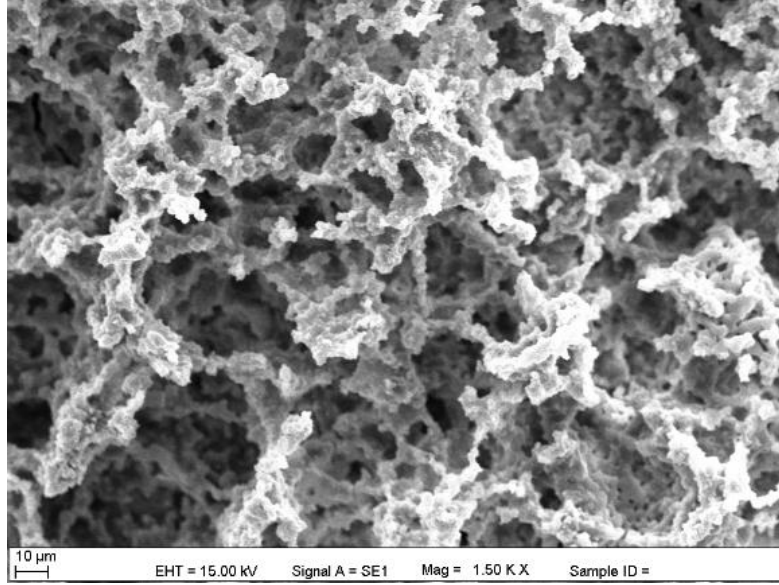
#### 4.1.2. Yüzey Morfolojisinin ncelenmesi

Kriyojellerin yüzey morfolojisini gösteren SEM görüntüleri a a ıda verilmi tir ( ekil 4.1-4.6). ekillerden de görüldü ü gibi istenilen özellikte makrogözenekli polimerler elde edilmi tir. Takip edilen ekillerde görüldü ü gibi, GMA/HEMA oranının de i imi kriyojel yapısını fazla de i tirmemi tir. Her üç reçeteyle hazırlanan kriyojellerin yapısal özellikleri benzerdir. Pürüzlü hücre duvarı ve birbiriyle ba lantılı geçi kanalları açıkça görülmektedir. Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin görüntüleri incelendi inde; yüzey baskılanmı kriyojellerin, baskılanmamı kriyojellere göre beklenildi i gibi daha geni kavitelere sahip oldu u fark edilmektedir. Bu durum, analit molekülleri etrafında monomerlerin yönlenmelerine ve buna ba lı düzenlenmi polimerizasyondan kaynaklı olabilir.

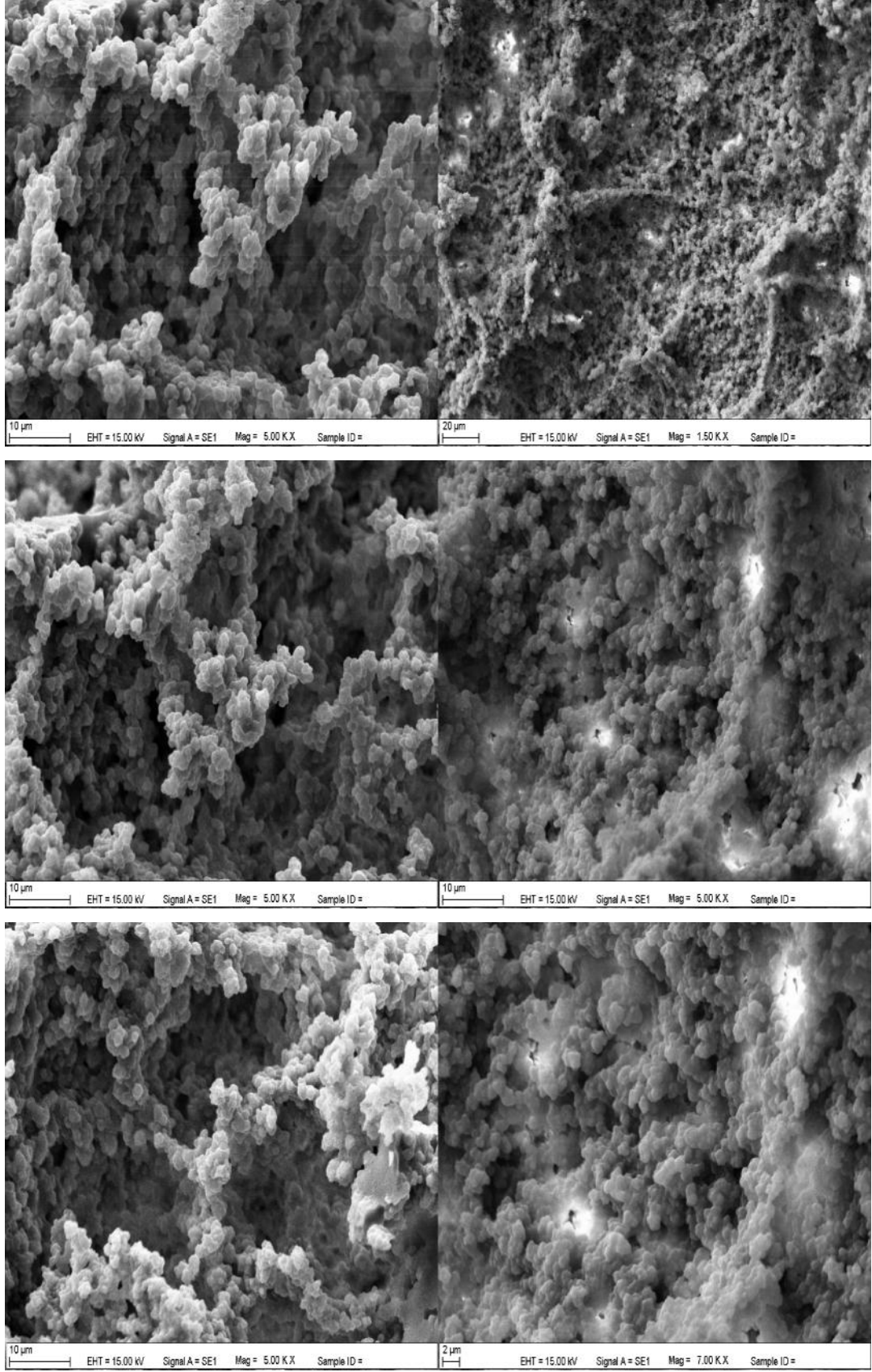


**ekil 4.1.** Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin SEM görüntüleri.





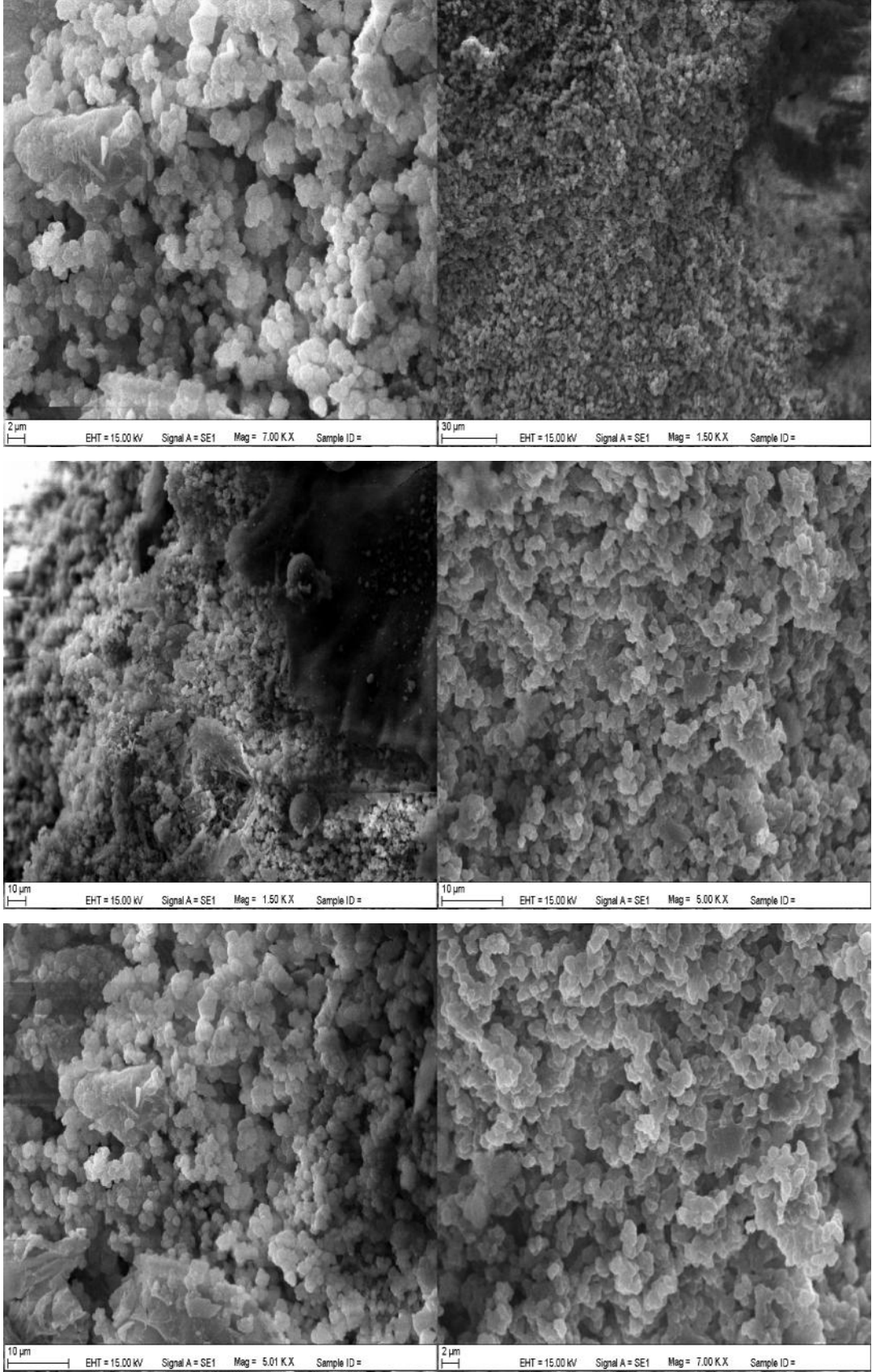
**ekil 4.2.** Polietilenimin ba lanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin SEM görüntüleri.



MIP

NIP

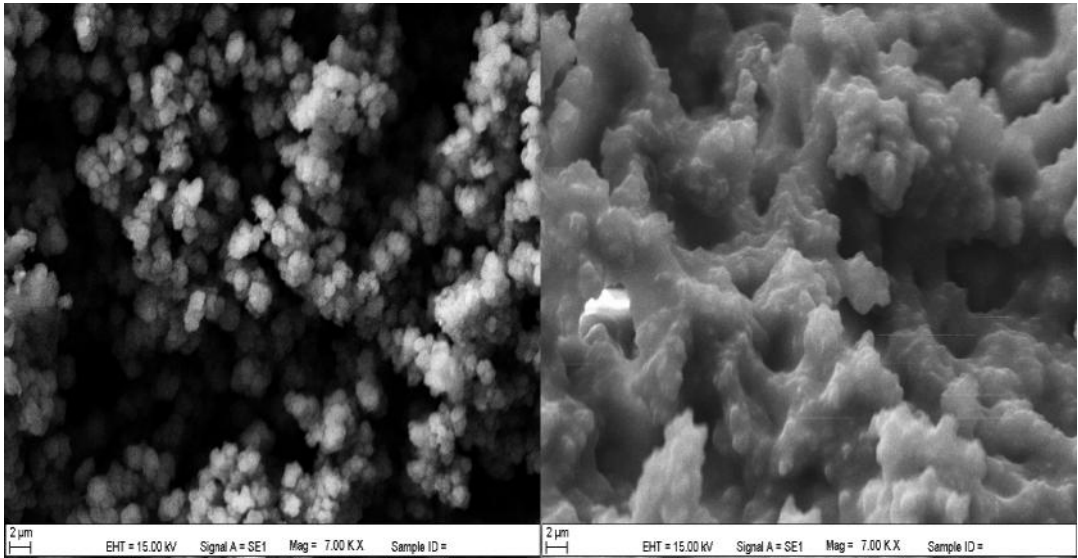
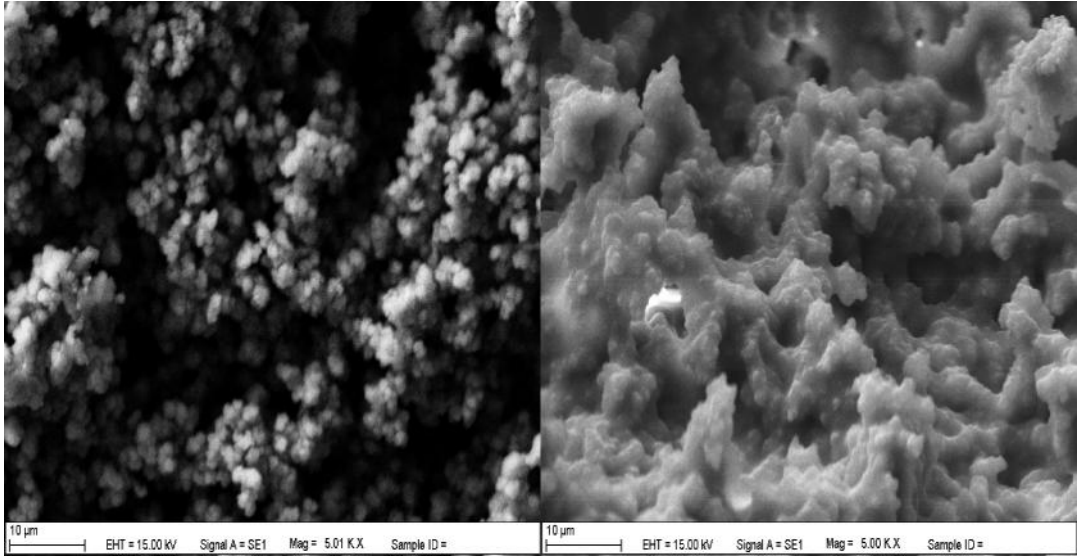
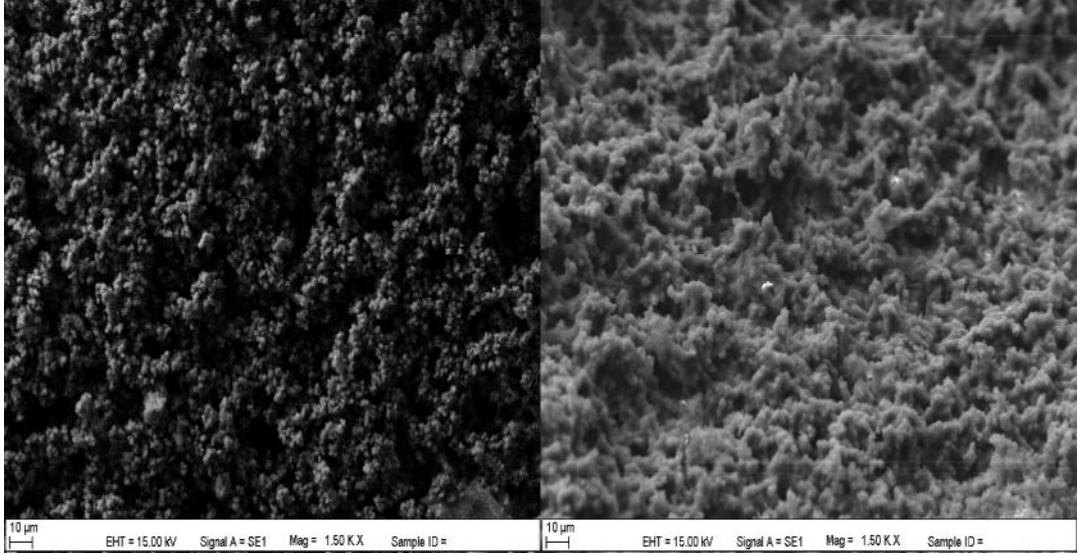
ekil 4.3. Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 1:10) SEM görüntüleri.



MIP

NIP

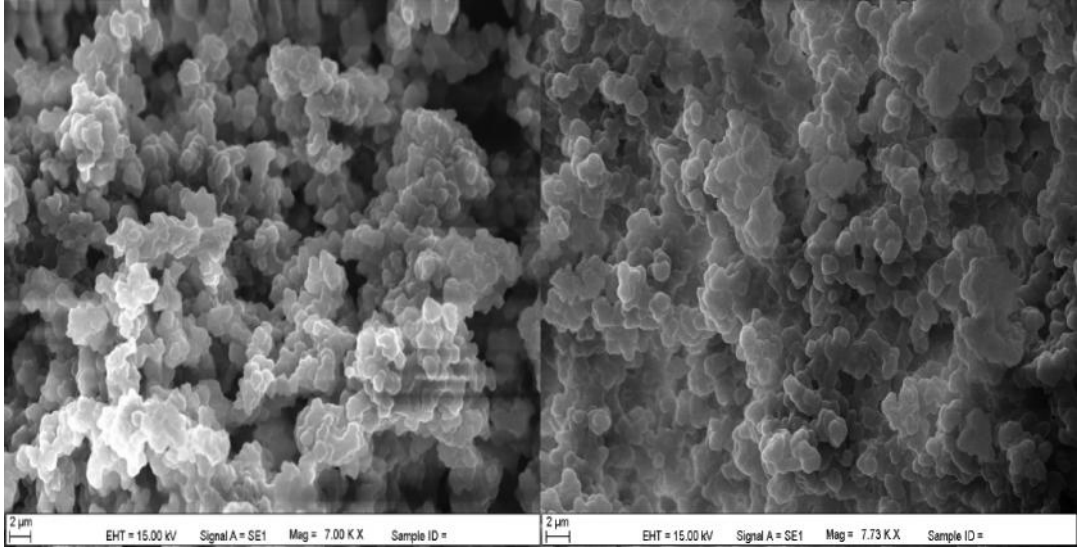
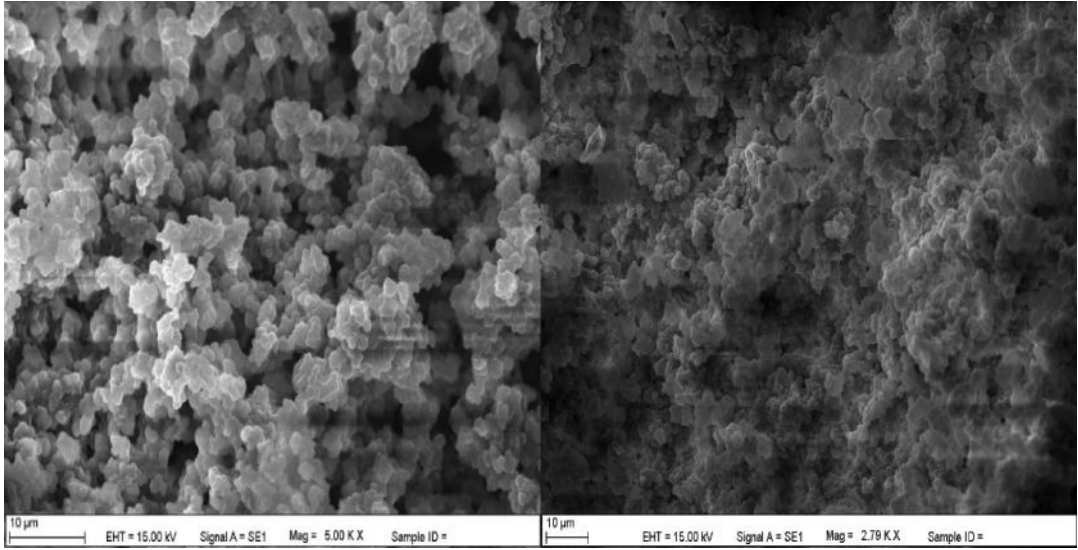
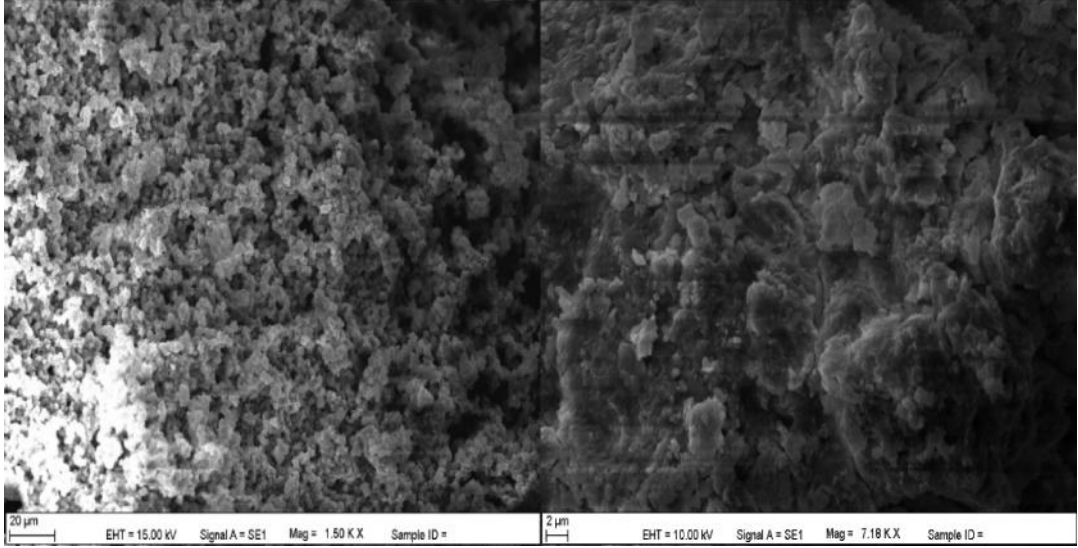
ekil 4.4. Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 2:9) SEM görüntüleri.



MIP

NIP

ekil 4.5. Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 3:8) SEM görüntüleri.



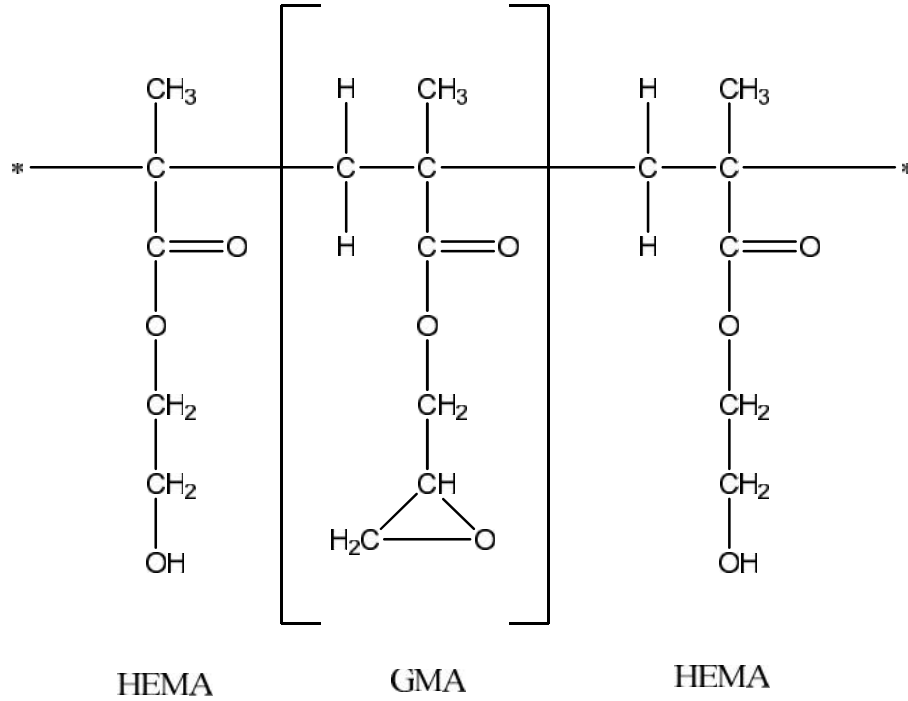
MIP

NIP

**ekil 4.6.** Lizozim baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin (GMA:HEMA; 1:10) SEM görüntüleri.

### 4.1.3. FTIR Çalışmaları

Poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin molekül formülü ekil 4.7’de, bu kriyojellerin FTIR spektrumları ise ekil 4.8- 4.12’de görülmektedir.



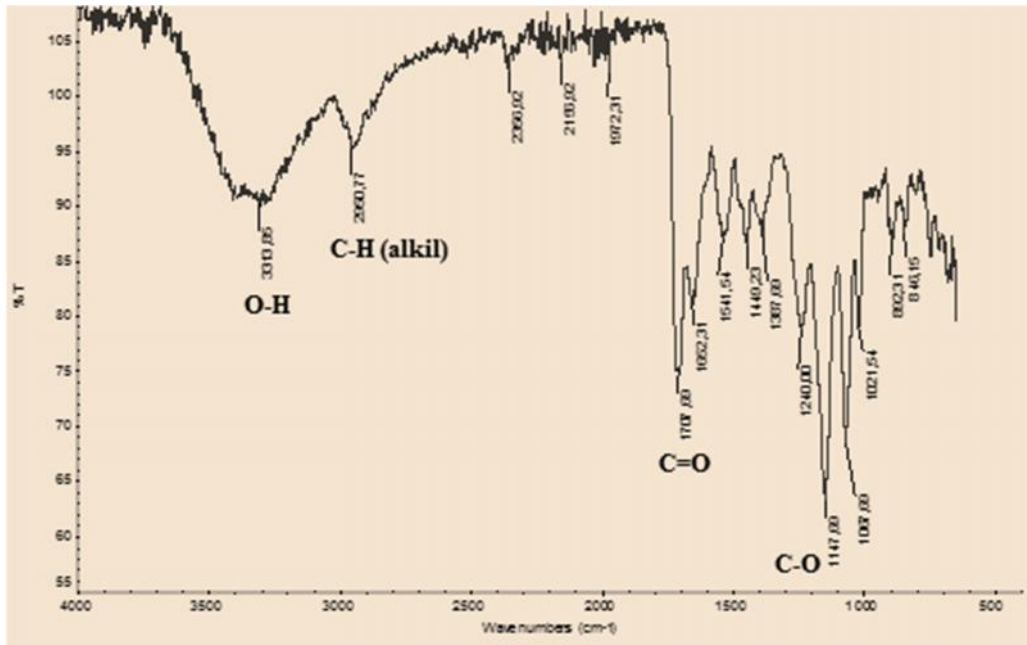
**ekil 4.7.** Poli(HEMA-GMA)’nın yapısı.

Poli(HEMA) kriyojelinin FTIR spektrumu ekil 4.8’de görülmektedir. Spektrum incelendi inde,  $3300\text{ cm}^{-1}$  (OH gerilmesi),  $2960\text{ cm}^{-1}$  (CH alkil gerilmesi),  $1710\text{ cm}^{-1}$  (C=O gerilmesi) ve  $1150\text{ cm}^{-1}$  (C-O gerilmesi) bandları bulunmaktadır.

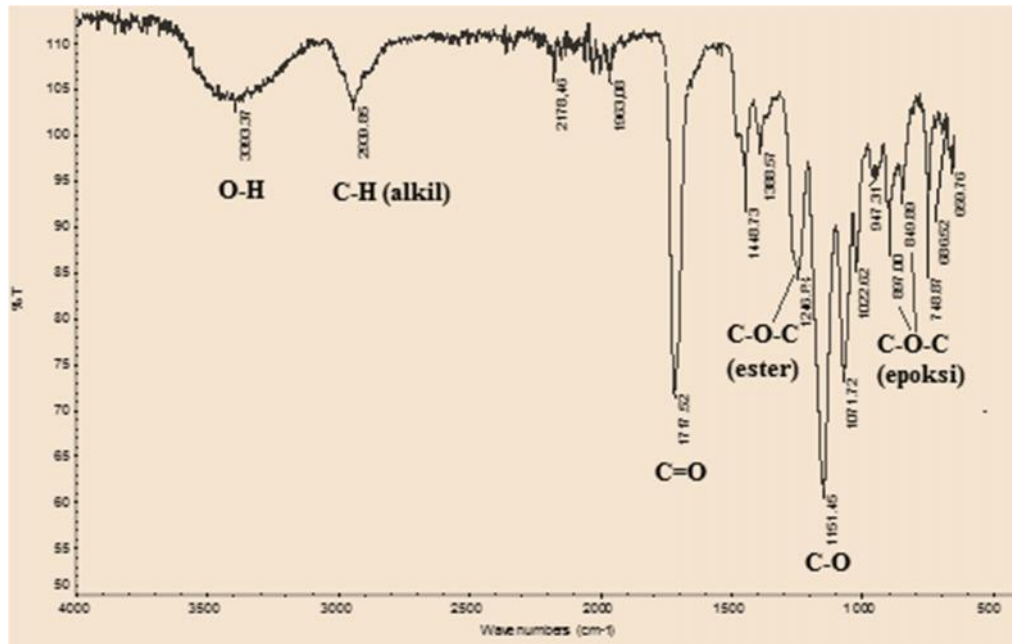
Spektrumlar bir arada de erlendirildi inde, birçok ortak band görülmektedir. Poli(HEMA) kriyojelinin spektrumunda bulunan benzer bandlar, poli(HEMA-GMA) kriyojelinin spektrumunda da bulunmakla beraber, ilâveten  $1240\text{ cm}^{-1}$  (ester grubu C-O-C gerilmesi),  $900\text{ cm}^{-1}$  (epoksi grubu asimetrik halka gerilmesi) ve  $850\text{ cm}^{-1}$  (epoksi grubu simetrik halka gerilmesi) bandları da görülmektedir ( ekil 4.9). Bu gruplar, kullanılan fonksiyonel monomerin (GMA) yapısında bulunmaktadır. Bu sonuçlar, polimerizasyon i lemi sonucunda fonksiyonel monomerin yapıya ba arıyla sokuldu unu ve epoksi grubunun polimerizasyonda korundu unu göstermektedir.

Polietilenimin ba lanmı poli(HEMA-GMA) kriyojelinin spektrumu incelendi inde ise beklenildi i gibi; 1070 ve 1020  $\text{cm}^{-1}$  (C-N gerilmesi), 750 ve 730  $\text{cm}^{-1}$  (N-H gerilmesi) bandları dikkat çekmektedir ( ekil 4.10). Bu gruplar, polietilenimin (PEI) molekülünün yapısında bulunmaktadır. Bu sonuçlar, PEI moleküllerinin yapıya ba arı ile ba landı ı dü üncesini do rulamaktadır.

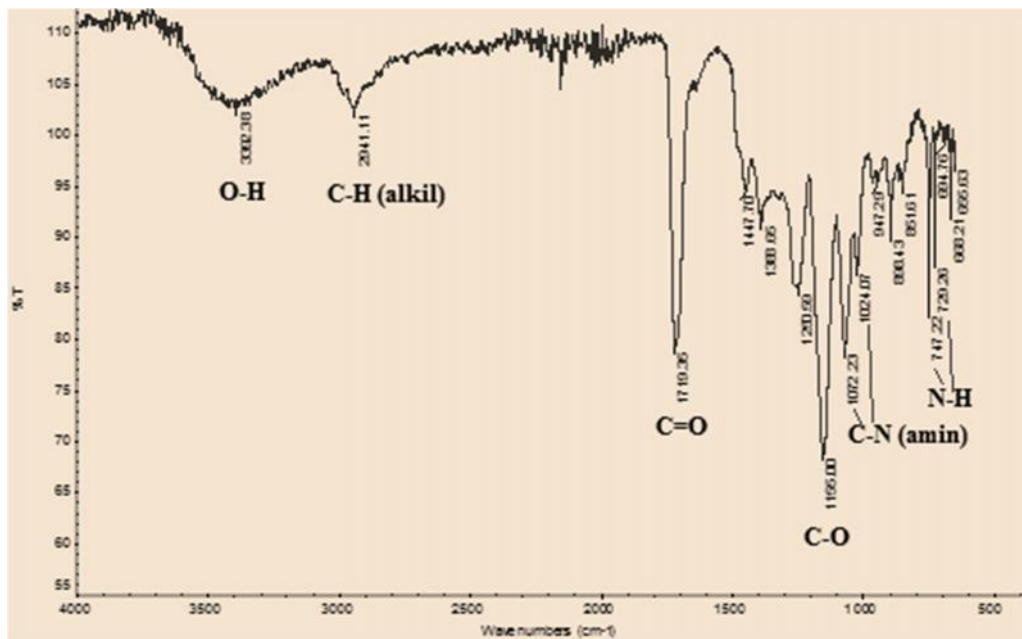
Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerin spektrumları görüldü ü gibi hemen hemen aynı olup PEI ba lanmı polimerik yapıda bulunan tüm bandları içermektedirler ( ekil 4.11-4.12). Bunun nedeni, yüzeye polietilenimin ba lanmasından sonra meydana gelen yüzey olayları sonucu, benzer fonksiyonel gruplara sahip moleküllerin ba lanması ve farklı fonksiyonel grupların ise büyük bandların altında kalıp görülememesi (poliakrilamit tabakasında bulunan amit ba larındaki N-H gerilmesi, 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  aralı nda band vermekte olup, O-H gerilmesinden kaynaklanan 3100-3600  $\text{cm}^{-1}$  aralı ndaki yayvan bandın altında kalması ve görülememesi gibi) ya da IR spektrumunda, 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  aralı nda band vermemesidir (Cu(II) gibi).



ekil 4.8. Poli(HEMA) kriyojelinin FTIR spektrumu.

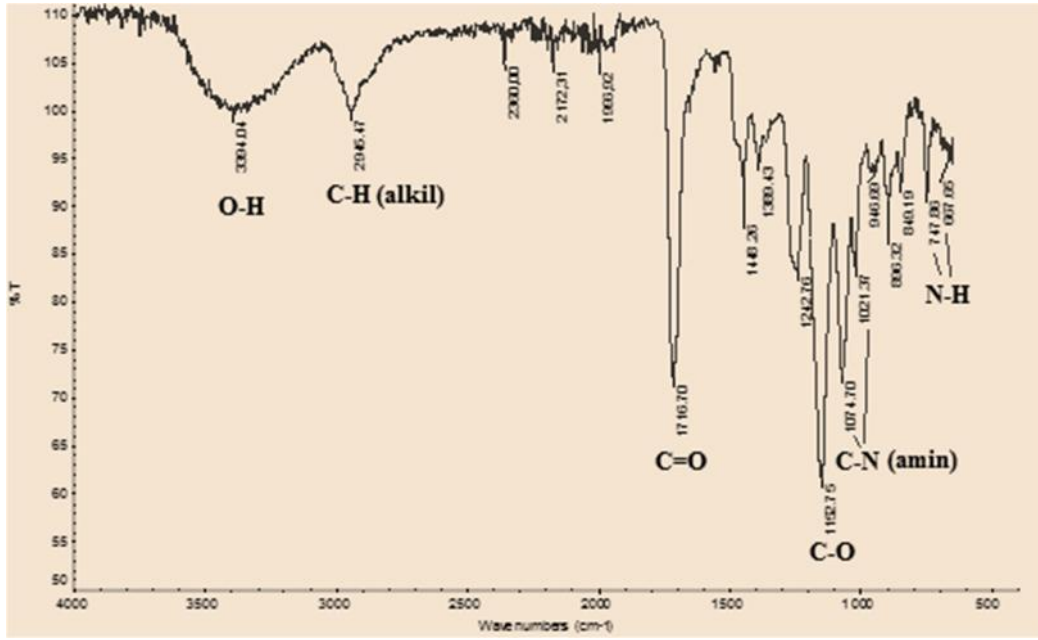


ekil 4.9. Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin FTIR spektrumu.

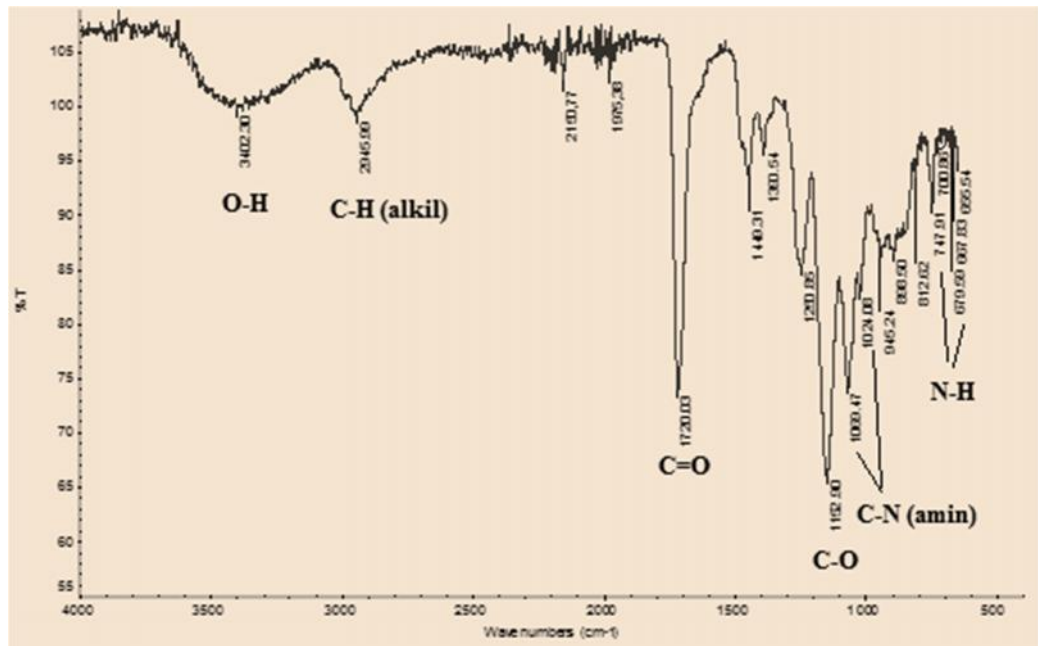


ekil 4.10. Poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojelinin FTIR spektrumu.





ekil 4.11. Cu(II) yüzey baskılanımı Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin FTIR spektrumu.



ekil 4.12. Lizozim yüzey baskılanımı Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin FTIR spektrumu.

#### 4.1.4. Yüzey Alanı Analizi

Yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin spesifik yüzey alanları, toplam gözenek hacimleri ve ortalama gözenek boyutları Çizelge 4.2’de verilmi tir. Spesifik yüzey alanları, toplam gözenek hacimleri ve ortalama gözenek boyutları BJH yöntemi ile hesaplanmı tır. Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerin spesifik adsorpsiyon yüzey alanları sırası ile 9.857 m<sup>2</sup>/g ve 6.789 m<sup>2</sup>/g olarak tespit edilmi tir. Yine aynı ekilde Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanmamı kriyojellerin spesifik yüzey alanları sırasıyla 6.562 m<sup>2</sup>/g ve 6.456 m<sup>2</sup>/g olarak hesaplanmı tır. Bu beklenen bir durumdur. Yüzey baskılanmı kriyojellerin spesifik yüzey alanları, yüzeylerinde bulunan kaviterler sayesinde baskılanmamı kriyojellere göre daha yüksek bulunmu tur. Kriyojellerin sentezi esnasında kullanılan sodyum lauril sülfat (SLS) bile i i, yüzey aktif bir madde oldu undan alı ılmı mın aksine yüzeyi düzgün de il, pürüzlü kriyojeller elde edilmi tir. Bu durum, kriyojellerin spesifik yüzey alanlarında bir miktar artı a/iyile meye olanak sa lamı tır.

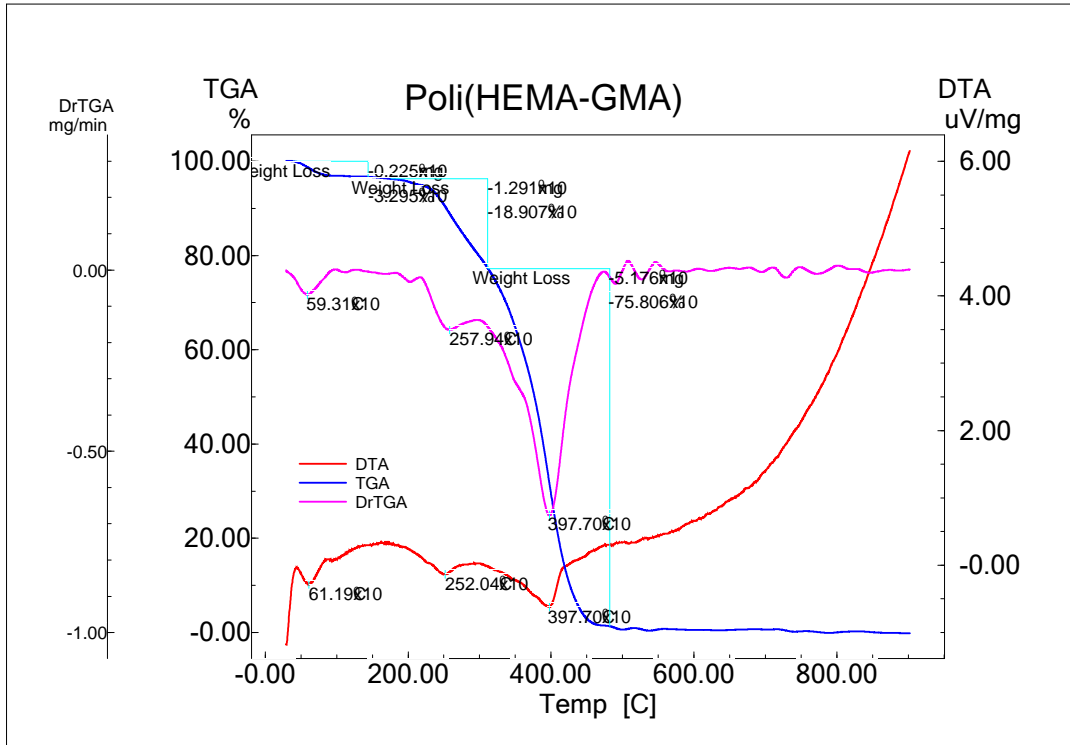
**Çizelge 4.2.** Yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin yüzey alanı ölçümleri.

Kriyojel	Spesifik yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g)	Toplam gözenek hacmi (cm <sup>3</sup> /g)
Lizozim-MIP	6.8	0.0233
Lizozim-NIP	6.5	0.0099
Cu(II)-MIP	9.9	0.0372
Cu(II)-NIP	6.6	0.0183

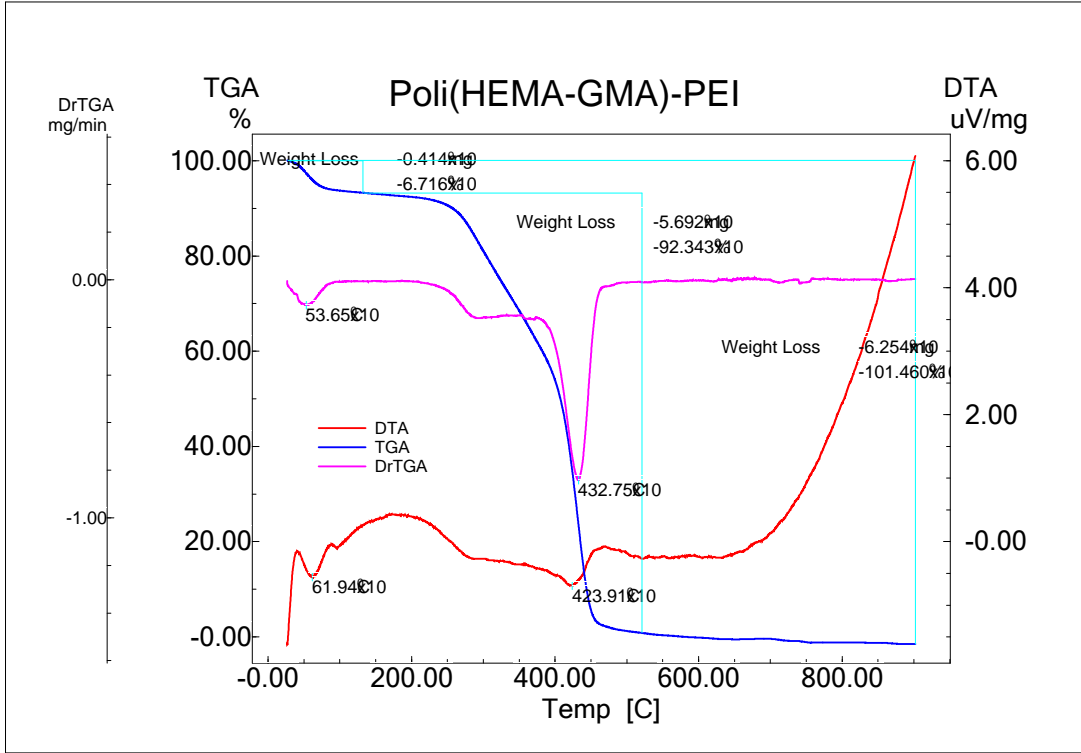
#### 4.1.5. Termal Analiz

Termal gravimetrik analiz cihazı ile kriyojellerin 0-900°C aralı nda analizleri yapılmı olup kütle kayıpları sonucu elde edilen grafikler a a ıda verilmi tir ( ekil 4.13-4.16). Bu grafiklerde termogravimetrik analiz (TGA) e rileri ısıtma i lemi sonucu meydana gelen kütle kayıplarını, drTGA e rileri en fazla kütle kayıplarının meydana geldi i sıcaklıkları ve diferansiyel termal analiz (DTA) e rileri ise tepkimelerin ısı alan (endotermik) ve ısı veren (ekzotermik) özelliklerinin incelenmesi konusunda veriler sa lamaktadır. ekiller incelendi inde kriyojellerin tamamında az da olsa de i en oranlarda (%3-%6) nem bulunmaktadır ve ilk kütle kayıpları nemden ileri gelmektedir. Tüm kriyojeller 250°C’ye kadar kararlı olup bu sıcaklık de erinden sonra polimerik yapılardan kopmalar oldu u görülmektedir. Bu sonuç, kriyojel yapılarından fonksiyonel monomer gibi polar grupların koptu unu göstermektedir. Poli(HEMA-GMA) ve poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojellerinin TGA e rileri incelendi inde, 350-800°C arasında e rilerin sıfıra yakın seyretti i

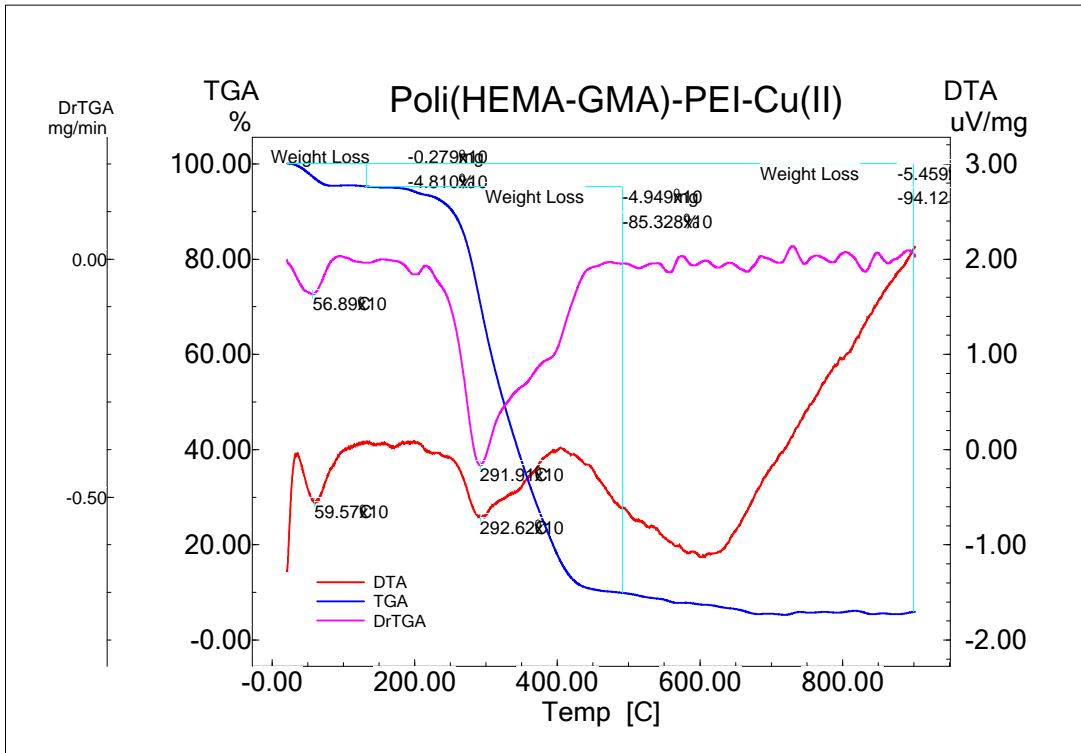
görülmektedir. Bu durum, bu sıcaklık aralığında yapıda organik kalıntıların bulunduğunun bir göstergesidir. Ayrıca poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojelinde 250°C civarında meydana gelen kütle kaybının % olarak değerlendirildiğinde, poli(HEMA-GMA) kriyojelinininkinden fazladır. Bu durum yapıya bağlı olan PEI molekülünden kaynaklanmaktadır. PEI molekülleri, GMA molekülleri ile beraber 250°C civarında yapıdan kopmaktadır ve poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojelinin toplam kütle kaybı poli(HEMA-GMA) kriyojeline göre fazla olmaktadır. Cu(II) yüzey baskılanması poli(HEMA-GMA) kriyojelinde Cu(II) iyonlarından kaynaklanan toplam kütle artışı nedeniyle 250°C civarında yaşanan kütle kaybının değerlendirildiğinde % olarak azalmıştır. Çünkü bu sıcaklık aralığında Cu(II) iyonları kopmamaktadır ve TGA eğrisinin 400-800°C sıcaklık aralığında yaklaşık %10 çizgisi civarında kararlı bir hâl alması yapıdan geriye inorganik kalıntıların (CuO gibi) kaldığının bir göstergesidir. Lizozim yüzey baskılanması kriyojelinde TGA eğrisinde Cu(II) baskılanması kriyojelinde TGA eğrisi ile benzer olup meydana gelen kopmalar sonucu 400-800°C sıcaklık aralığında %20 çizgisi civarında eğri düz bir hâl almaktadır. Bunun nedeni de yapıdan geriye gelen inorganik kalıntılardır (Cu<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Tüm kriyojellerin DTA grafiklerine bakıldığında kriyojellerin sıcaklık etkisiyle bozulma tepkimelerinin endotermik olduğu görülmektedir.



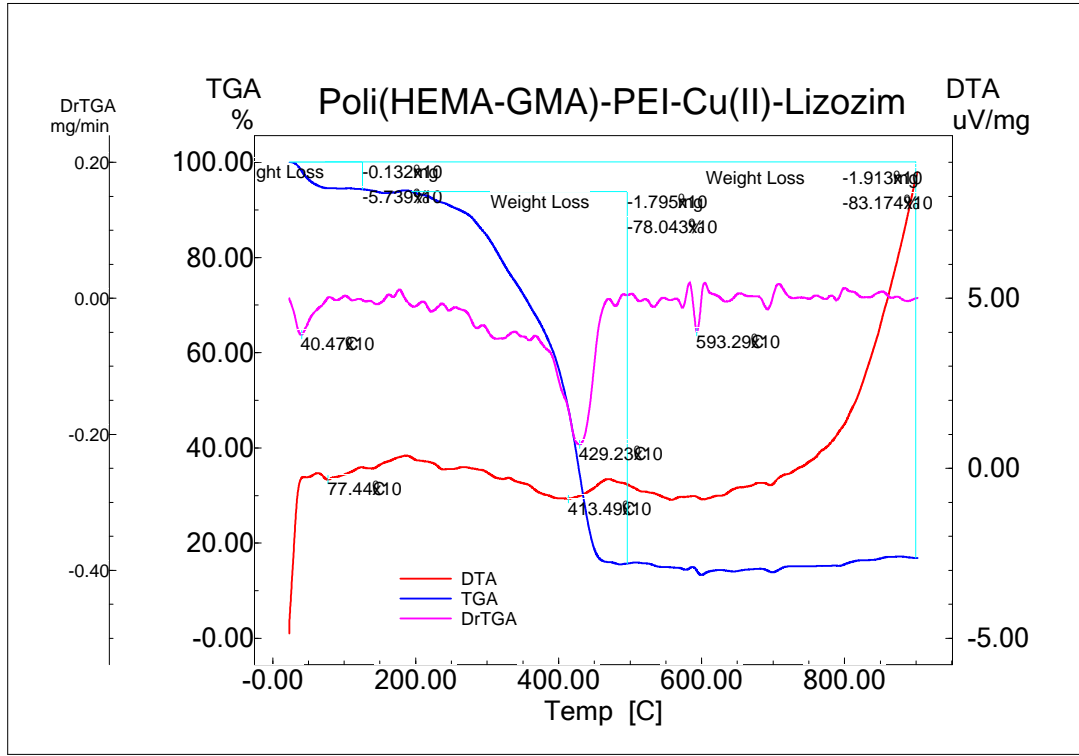
ekil 4.13. Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin termal analiz grafiği.



ekil 4.14. Poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojelinin termal analiz grafi i.



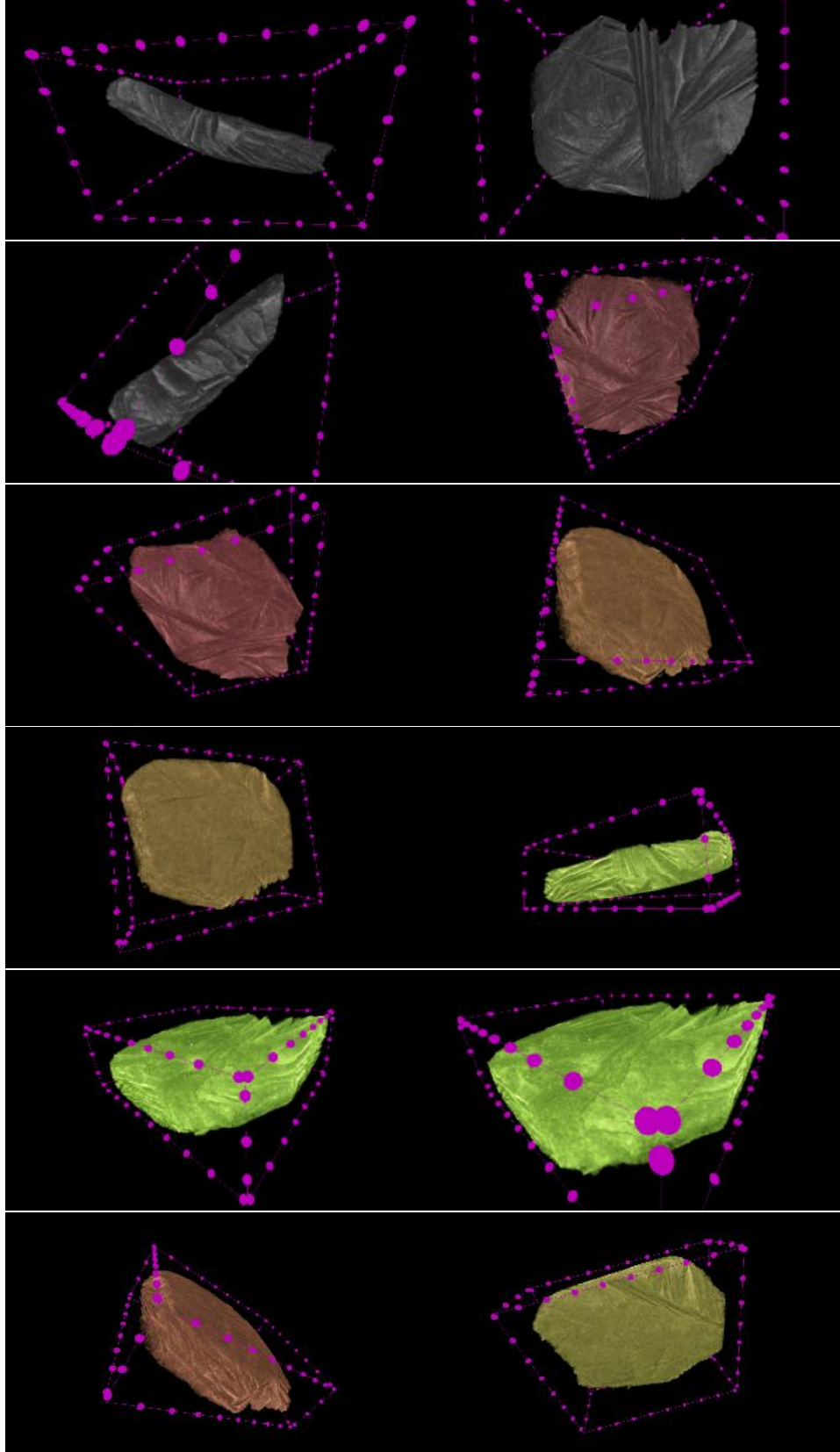
ekil 4.15. Cu(II) yüzey baskılanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin termal analiz grafi i.



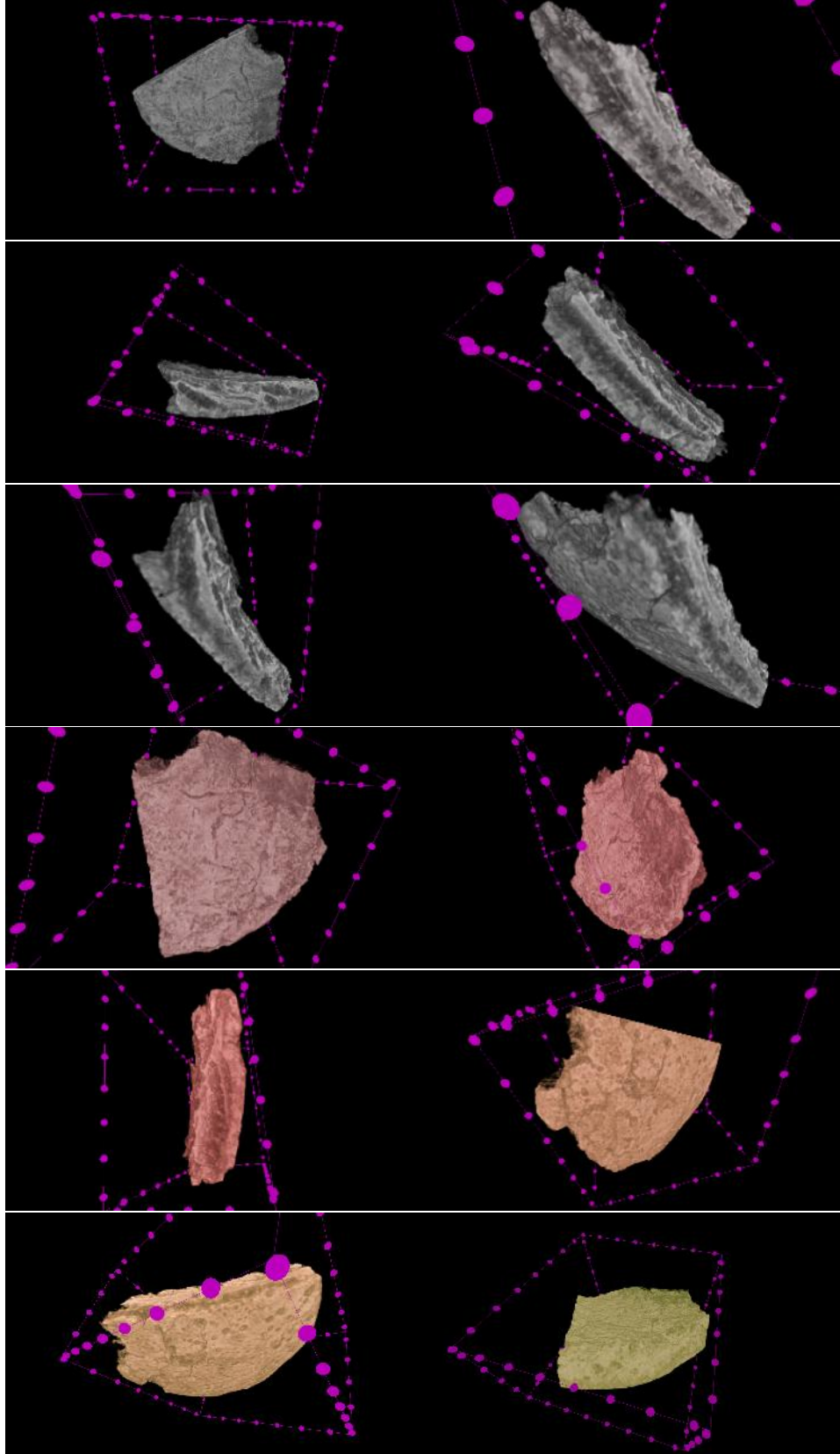
**ekil 4.16.** Lizozim yüzey baskılanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin termal analiz grafi i.

#### 4.1.6. Bilgisayarlı Mikrotomografi Analizi ( $\mu$ CT)

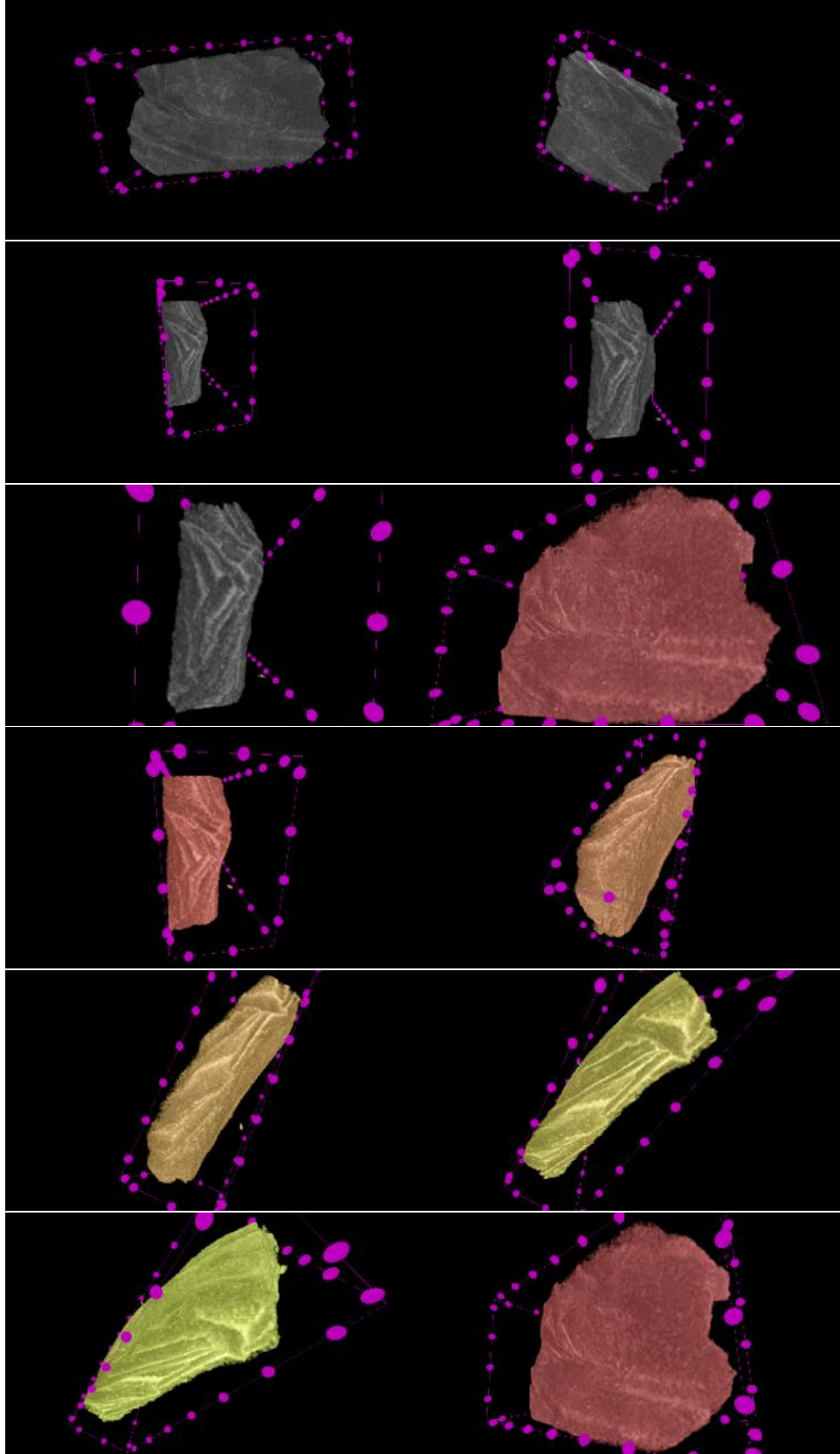
Bilgisayarlı mikrotomografi analizi yapılan kriyollerin üç boyutlu görüntüleri ekil 4.17-4.20’de verilmi tir. ekillere bakıldı nda kriyojellerin gözenekli yapıları ve sahip oldukları akı kanalları açıkça fark edilmektedir. ekil 4.18 incelendi inde, poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin gözeneklerinin ve akı kanallarının PEI moleküllerinin yapıya ba lanmasıyla büyük ölçüde doldu u görülmektedir. kinci polimerle menin gerçekleşmesi sonucu meydana gelen i kinlik lizozim baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin doluluk oranını arttırmaktadır.



ekil 4.17. Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin üç boyutlu  $\mu$ CT görüntüleri.

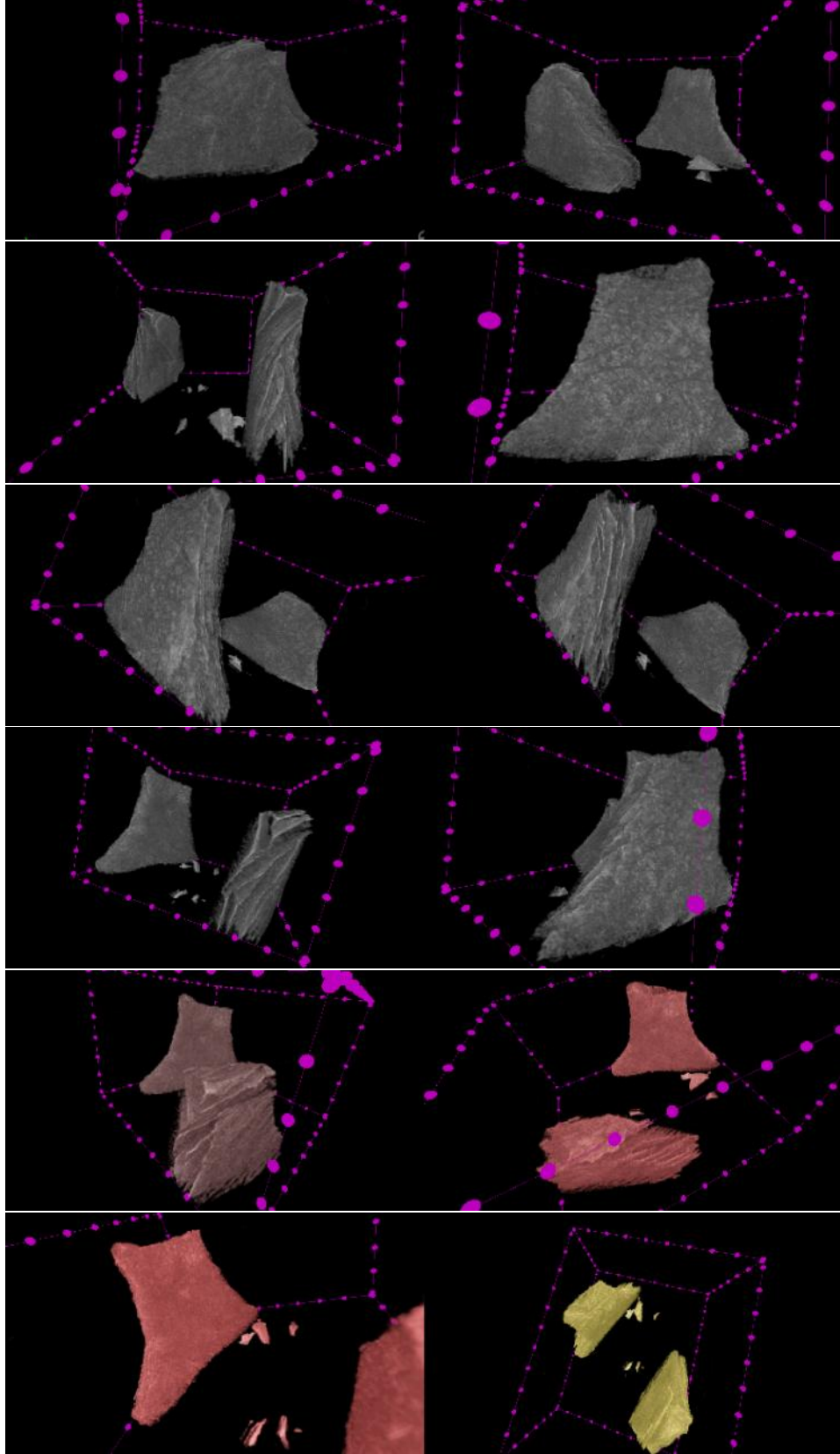


ekil 4.18. Poli(HEMA-GMA)-PEI kriyojellerin üç boyutlu  $\mu$ CT görüntüleri.



**ekil 4.19.** Lizozim yüzey baskılanmı (MIP) poli(HEMA-GMA) kriyojellerin üç boyutlu  $\mu$ CT görüntüleri.





**ekil 4.20.** Lizozim yüzey baskılanmamı (NIP) poli(HEMA-GMA) kriyojellerin üç boyutlu  $\mu$ CT görüntüleri.

## **4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları**

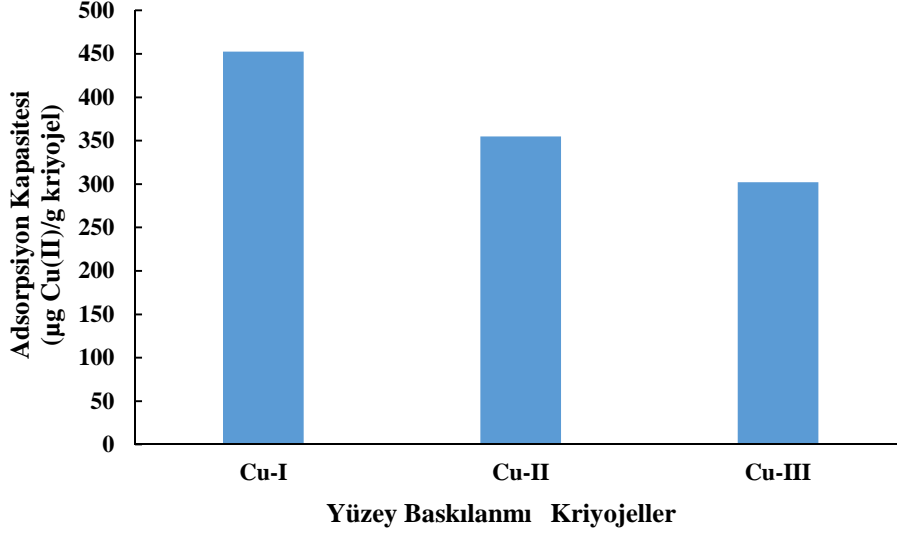
Tez çalışması kapsamında, yüzey baskılama yaklaşımlarıyla moleküler baskılanmış kriyojeller sentezlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle temel çukur polimeri olarak poli(HEMA-GMA) kriyojeli sentezlenmiş ve daha sonra hem etkileşim bölgeleri kazandırmak hem de ileri modifikasyon için iskeleler hazırlamak amacıyla polietilenimin baskılanması gerçekleştirilmiştir. Polietilenimin primer amin uçlarının kısmî modifikasyonunu takiben seçilen iki kalıp analit [Cu(II) iyonları ve lizozim]'in yüzey baskılanması ikinci bir kriyojelle birlikte gerçekleştirilmiş ve elde edilen polimerler karakterize edilmiştir. Tezin bu bölümünde ise her iki kalıp molekülüne ait adsorpsiyon çalışmalarının sonuçları ayrı ayrı tartışılmıştır.

### **4.2.1. Cu(II) Yüzey Baskılanmış Kriyojeller**

#### **4.2.1.1. GMA Miktarının Etkisi**

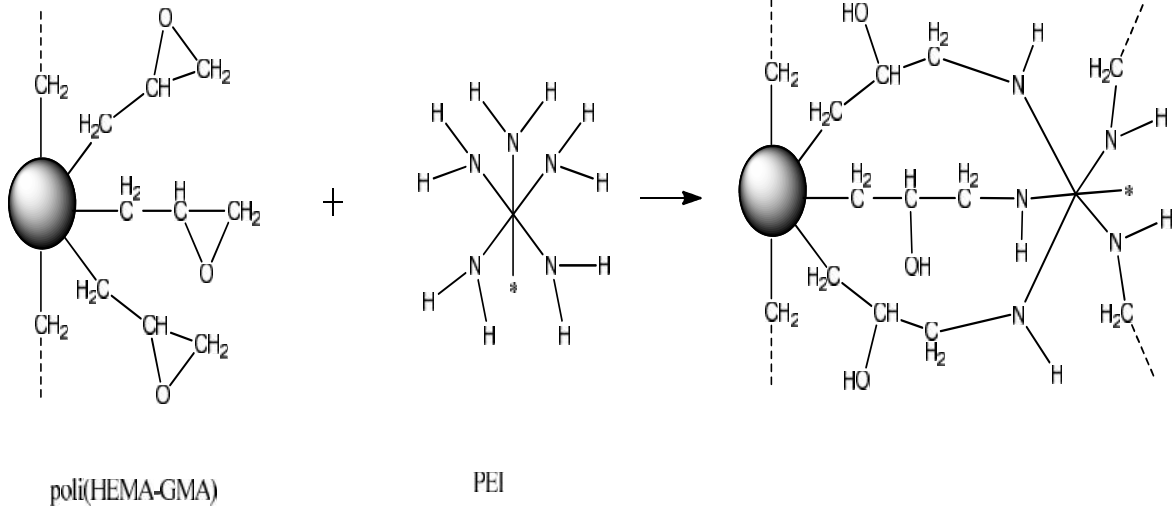
Adsorpsiyon deneyleri için kesikli sistem tercih edilmiştir. 250 µL GMA ve 2500 µL HEMA kullanılarak hazırlanan Cu(II) yüzey baskılanmış kriyojel Cu-I, 500 µL GMA ve 2250 µL HEMA kullanılarak hazırlanan Cu(II) yüzey baskılanmış kriyojel Cu-II ve 750 µL GMA ve 2000 µL HEMA kullanılarak hazırlanan Cu(II) yüzey baskılanmış kriyojel Cu-III olarak isimlendirilmiştir.

Numuneler Cu(II)'ın 5 mL sudaki çözeltisi (100 mg/L) ile hazırlanmış olup numunenin pH'sı yaklaşık 5.3 olarak okunmuştur. Membranların ilavesiyle adsorpsiyon deneyi gerçekleştirilmiş olup her üç kriyojelin de adsorpsiyon kapasiteleri ekil 4.21'de karşılaştırılarak gösterilmiştir.



**ekil 4.21.** Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerin adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması. Cu(II) derişimi: 20 mg/L; etkileşim süresi: 60 dak.; sıcaklık 25°C.

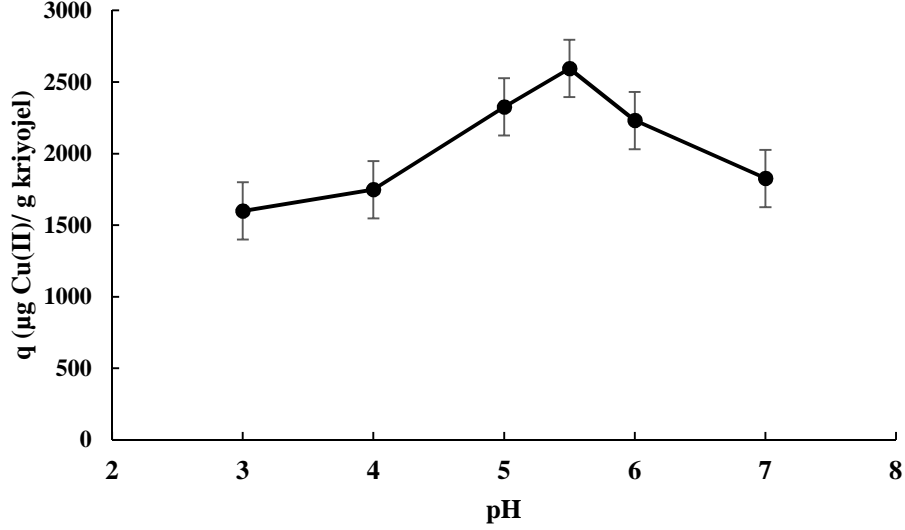
deneyden de görüldüğü gibi maksimum Cu(II) adsorpsiyon kapasitesi Cu-I kriyojelinde elde edilmiş olup (450.0 µg/g), Cu-II (350.0 µg/g) ve Cu-III (300.0 µg/g) kriyojellerinden elde edilen değerlerden önemli düzeyde yüksektir. Bunun nedeni artan GMA miktarı ile jelleşen ba lanan dallanmış polietilenimin moleküllerinde bulunan amino (NH<sub>2</sub>) gruplarının atak yapıcı epoksi grubu sayısının artması, çok noktallı polietilenimin immobilizasyonunun gerçekleşmesi ve böylelikle de Cu(II) gruplarının bağlanabileceği primer amino grubu sayısının azalmasıdır. Artan GMA miktarı ile jelleşen ba lanan polietilenimin moleküllerindeki toplam serbest amino gruplarının sayısı azalmıştır (ekil 4.22). Bu durum, her üç kriyojel ile yapılan potansiyometrik titrasyon sonucu elde edilen veriler ile doğrulanmaktadır. Cu-I, Cu-II ve Cu-III kriyojellerinin 0.1 M HNO<sub>3</sub> ile potansiyometrik titrasyonu sonucu elde edilen veriler sonucunda bu kriyojellere bağlı olan serbest amino miktarları sırasıyla; 0.062 mol, 0.058 mol ve 0.053 mol olarak hesaplanmıştır. Bundan dolayı daha sonraki çalışmalarda Cu(II) yüzey baskılamasında Cu-I kriyojeller kullanılmaktadır.



**ekil 4.22.** Poli(HEMA-GMA) polimerine PEI'nin çok noktali immobilizasyonu.

#### 4.2.1.2. pH Etkisi

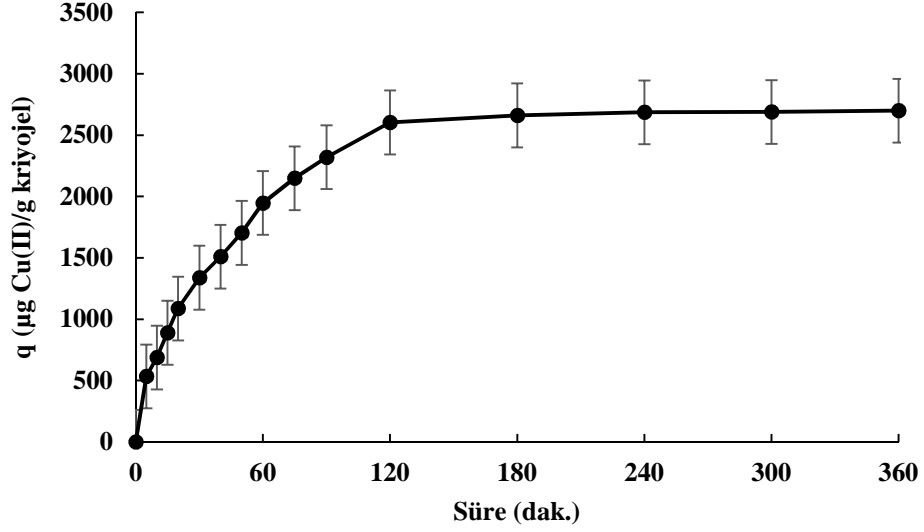
Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerden Cu(II) adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini incelemek için pH: 3-8 aralı nda de i tirilerek deneyler yapılmı tır. Adsorpsiyon miktarının pH: 5.5'te en yüksek oldu u tespit edilmi tir. Bunun nedeni Cu(II) iyonlarının pH: 5.5 de erinden sonra hidroksit bile iklerinin olu ması ve ortamdaki serbest Cu(II) iyonu sayısının azalmasıdır. Bu yüzden adsorpsiyon kapasitesi pH: 5.5 de erinden sonra dü meye ba lamaktadır. pH: 5.5 de erinden dü ük pH de erlerinde ise ortam asidik oldu ndan amino gruplarına Cu (II) iyonları ile beraber hidrojen iyonları ( $H^+$ ) da ba lanmaktadır. Bu da adsorpsiyon kapasitesini dü ürmektedir. Bu yüzden daha sonraki çalı mlarda pH: 5.5 de erinde çalı ılmı tır ( ekil 4.23).



**ekil 4.23.** Cu(II) adsorpsiyonuna çözelti pH'sının etkisi. Cu(II) deri imi: 100 mg/L; etkile im süresi: 120 dak.; sıcaklık 25°C.

#### 4.2.1.3. Süre Etkisi

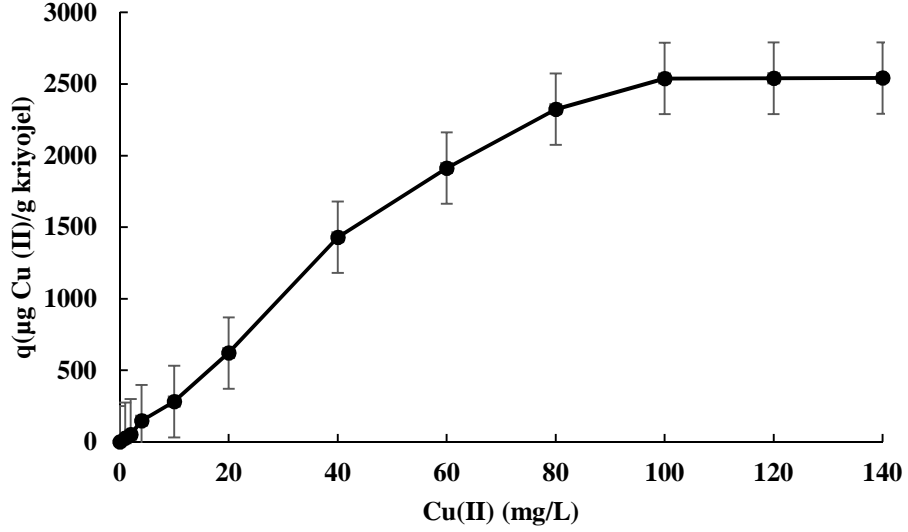
Belirlenen optimum pH de erinde (pH=5.5); adsorpsiyon çözeltisinden farklı zaman aralıklarında (10-360 dak.) numuneler alınarak adsorplanan Cu(II) miktarı belirlenmiştir ( ekil 4.24). ekilden de görüldü ü gibi, 45-60 dak.'da adsorpsiyon kapasitesinin sabitlendi i gözlenmiştir. Buna göre bu süre aralı ı içerisinde adsorbentın analiti ba lama bölgelerinin doygunlu a ula tı ı dü ünülmektedir. Ancak adsorbentın denge adsorpsiyon de erine ula tı ından emin olmak için en uygun temas süresi 120 dak. olarak belirlenmiştir ve tüm çalı malarda uygulanmıştır.



**ekil 4.24.** Cu(II) adsorpsiyonuna etkile im süresinin etkisi. pH: 5.5; Cu(II) deri imi: 100 mg/L; sıcaklık 25°C.

#### 4.2.1.4. Cu(II) Deri iminin Etkisi

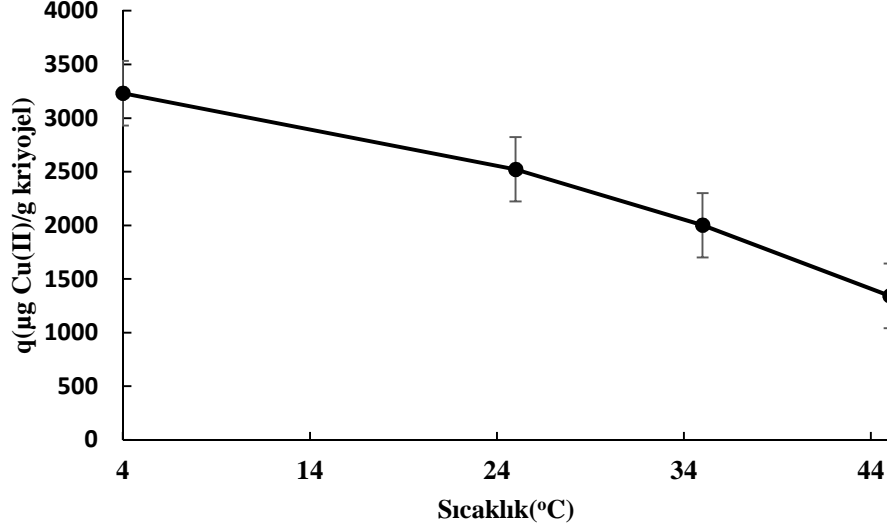
Adsorpsiyon ortamındaki, Cu(II) çözeltisinin deri iminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini incelemek için, pH: 5.5'te, 120 dak. etkile im süresi ile 5-700 mg/L deri im aralı nda adsorpsiyon i lemleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda artan Cu(II) deri imi ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlemlenmiştir. 100 mg/L Cu(II) deri iminden sonra adsorbentin Cu(II) bağlanma bölgeleri tamamen Cu(II) ile doydu u için adsorpsiyon kapasitesinin önemli ölçüde de i medi i fark edilmedi olup daha sonraki çalışmalarda 100 mg/L Cu(II) deri imlerinde çalışılmı ştır ( ekil 4.25).



**ekil 4.25.** Cu(II) adsorpsiyonuna Cu(II) deri iminin etkisi. pH: 5.5; etkile im süresi: 120 dak.; sıcaklık 25°C.

#### 4.2.1.5. Sıcaklı ın Etkisi

Adsorpsiyon üzerine sıcaklı ın etkisini incelemek için 4°C, 25°C, 35°C ve 45°C sıcaklık de erlerinde çalı ılmı tır. Yapılan deneyler sonucunda artan sıcaklıkla beraber polietilenimin molekülerinde bulunan amino gruplarındaki azot atomları ile Cu(II) iyonları arasındaki koordine kovalent ba lar zayıfladı ından ve sayısı azaldı ından adsorpsiyon kapasitesinin azaldı ı fark edilmi tir ( ekil 4.26). Bu sonuç ligand ile analit arasındaki etkile imin beklenildi i gibi kovalent olmayan ikincil etkile imler (koordine kovalent ba , elektron payla ımı, hidrojen ba ı vs.) oldu unu göstermektedir.

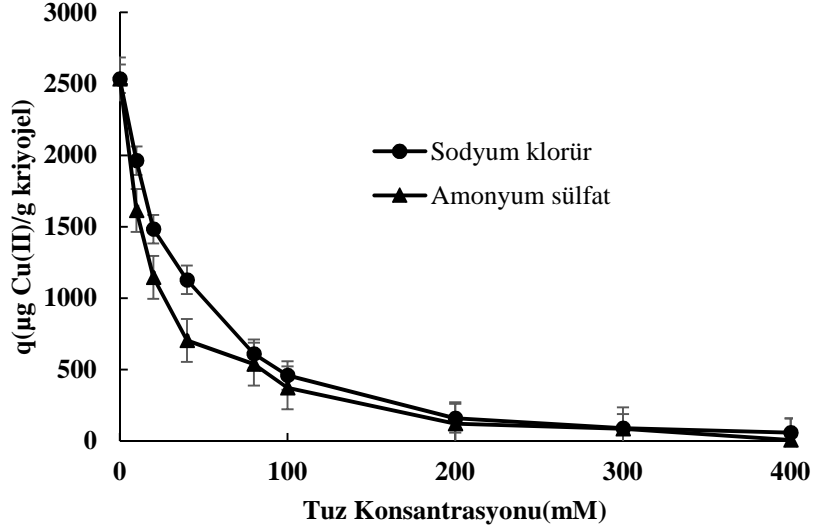


**ekil 4.26.** Cu(II) adsorpsiyonuna sıcaklı ın etkisi. pH: 5.5; Cu(II) deri imi: 100 mg/L; etkile im süresi: 120 dak.

#### 4.2.1.6. yonik iddetin Etkisi

yonik iddetin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla NaCl ve  $(NH_4)_2SO_4$  tuzları ile çalı ılmı tır. Deri imleri 10-400 mM de erleri arasında de i tirilerek adsorpsiyon kapasiteleri belirlenmi tir. Artan iyonik iddet ile adsorpsiyon kapasitesinin azaldı ı belirlenmi tir ( ekil 4.27). Bu sonuç, analit ile ligand arasındaki etkile imin sıcaklı ın etkisinde belirlendi i gibi elektrostatik etkile imler oldu u dü üncesini do rulamaktadır. Çünkü artan tuz deri imi (iyonik iddet) ile beraber pozitif iyon miktarları ( $Na^+$  ve  $NH_4^+$ ) da artmakta ve bu iyonlar polietilenimin moleküllerindeki amino grupları ile koordine kovalent ba yapma konusunda Cu(II) iyonları ile yarı hâline girmektedir. Böylece amino gruplarına ba lanan Cu(II) iyonlarının sayısı azalmaktadır. Ayrıca numune çözeltisi içerisinde bulunan Cu(II) iyonları da  $Cl^-$  ve  $SO_4^{2-}$  iyonları ile elektrostatik etkile ime girerek iyonik ba lar olu turmaktadır. Böylelikle, analit ve ligand arasında bir maskeleye olayı gerçekte mektedir. Bu sebeple adsorpsiyon kapasitesi artan iyonik iddetle beraber azalmaktadır.



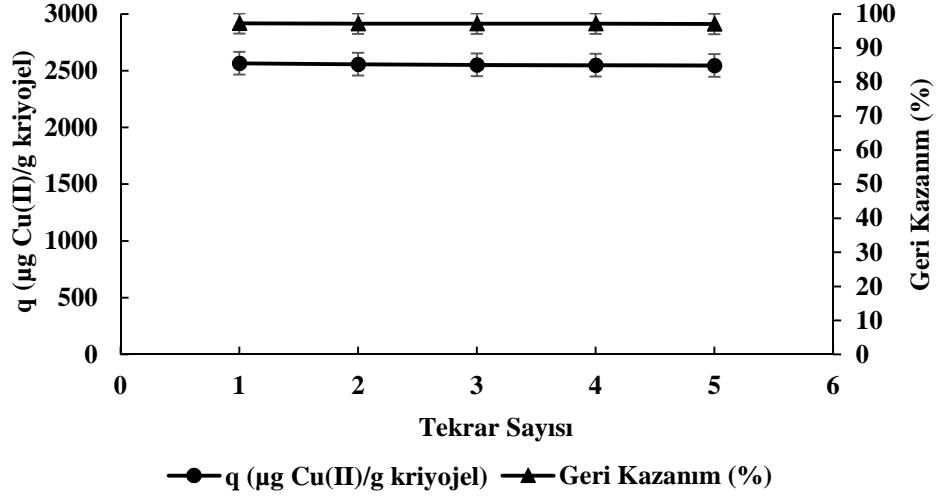


**ekil 4.27.** Cu(II) adsorpsiyonuna iyonik iddetin etkisi. pH: 5.5; Cu(II) deri imi: 100 mg/L; etkile im süresi: 120 dak.; sıcaklık 25°C.

#### 4.2.1.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellere adsorplanan Cu(II)'nin desorpsiyonu kesikli sistemde çalı ılmı tır. Bakır adsorplamı kriyojeller 0.1 M HNO<sub>3</sub> çözeltisi bulunan 5 mL desorpsiyon ortamında 60 dakika süre ile sürekli karı tırlmı tır. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirli ini göstermek için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı membranlar kullanılarak 5 kez tekrarlanmı tır.

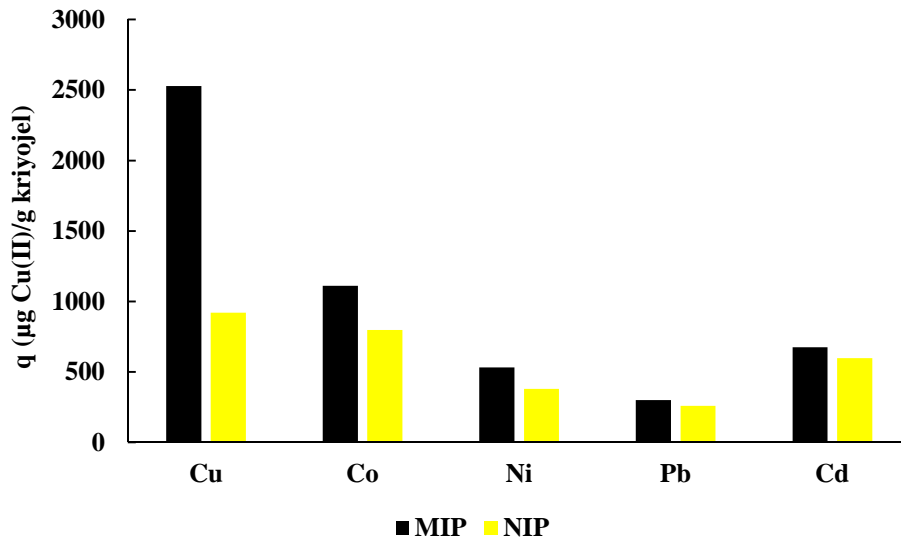
Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucu Cu(II) iyonlarının %97'si kazanılabilmi tir. Bu durum, PEI ile Cu(II) iyonlarının tersinir olarak etkile ti ini ve yumu ak ko ullar altında geri kazanımın ba arıldı ını göstermektedir. Ayrıca, yüksek geri kazanım oranı, tekrar kullanım özelli ini belirtmekte ve böylelikle adsorpsiyon kapasitesinde kaydade er bir azalma gözlenmemi tir ( ekil 4.28).



ekil 4.28. Cu(II) yüzey baskılanması kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

#### 4.2.1.8. Seçicilik Çalışmaları

Cu(II) yüzey baskılanması kriyojellerin Cu(II) iyonlarına karşı seçiciliğini belirlemek için yine kesikli sistem tercih edilmiştir. İlk olarak Cu(II) yüzey baskılanması kriyojeller (MIP) ve baskılanmamış membranların adsorpladıkları Cu(II) miktarlarının yanında Co(II), Ni(II), Pb(II) ve Cd(II) miktarları da yarı masız olarak çalışılmış ve kantitatif metal analizleri atomik absorpsiyon spektrometresinde ölçülmüştür (ekil 4.29).



ekil 4.29. Cu(II) yüzey baskılanması ve baskılanmamış kriyojellerin seçicilik çalışmaları (Yarı masız).

Bu çalı mada Cu(II), Co(II), Ni(II), Pb(II) ve Cd(II) a ır metallerinin 500 mg/L deri iminde çözeltileri hazırlanmı tır. Bu a ır metallerin her biri için Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojeller ile teker teker adsorpsiyon çalı maları yapılmı tır. Adsorpsiyon ortamı ise 5 mL (pH: 5.5) 100 mg/L a ır metal çözeltileri ile olu turulmu tur. Deneyler oda sıcaklı ında, çalkalamalı etüvde, 100 rpm'de, 2 saat etkile im süresi ile gerçekte tirilmi tir. Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin herbir a ır metal için adsorpsiyon kapasiteleri hesaplandıktan da ılım katsayısı a a ıdaki ekilde bulunmu tur.

$$K_d = (C_i - C_f) \cdot V / C_f \cdot m \quad (\text{E itlik 4.1})$$

Bu e itlikte  $K_d$ ; da ılım katsayısını (L/g),  $C_i$ ; analit çözeltilerinin adsorpsiyondan önceki deri imini ( $\mu\text{g/L}$ ),  $C_f$ ; Cu(II) çözeltilerinin adsorpsiyondan sonraki deri imini ( $\mu\text{g/L}$ ),  $V$ ; adsorpsiyon ortamının hacmini,  $m$ ; kuru kriyojel kütleini (g) göstermektedir (Çizelge 4.1).

Daha sonra seçicilik katsayısı a a ıdaki e itli e göre hesaplanmı ır.

$$k = K_d (\text{hedef iyon}) / K_d (\text{yarı macı iyon}) \quad (\text{E itlik 4.2})$$

Burada  $k$ ; seçicilik katsayısını,  $K_d (\text{hedef iyon})$ ; Cu(II) iyonlarının da ılım katsayısını,  $K_d (\text{yarı macı iyon})$ ; yarı macı iyonların [Co(II), Ni(II), Pb(II), Cd(II)] da ılım katsayısını göstermektedir.

Son olarak ba ıl seçicilik katsayısı a a ıdaki e itli e göre hesaplanmı tır.

$$k' = k_{(\text{MIP})} / k_{(\text{NIP})} \quad (\text{E itlik 4.3})$$

Burada  $k'$ ; ba ıl seçicilik katsayısını,  $k_{(\text{MIP})}$ ; Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojelin seçicilik katsayısını,  $k_{(\text{NIP})}$ ; baskılanmamı kriyojelin seçicilik katsayısını göstermektedir.

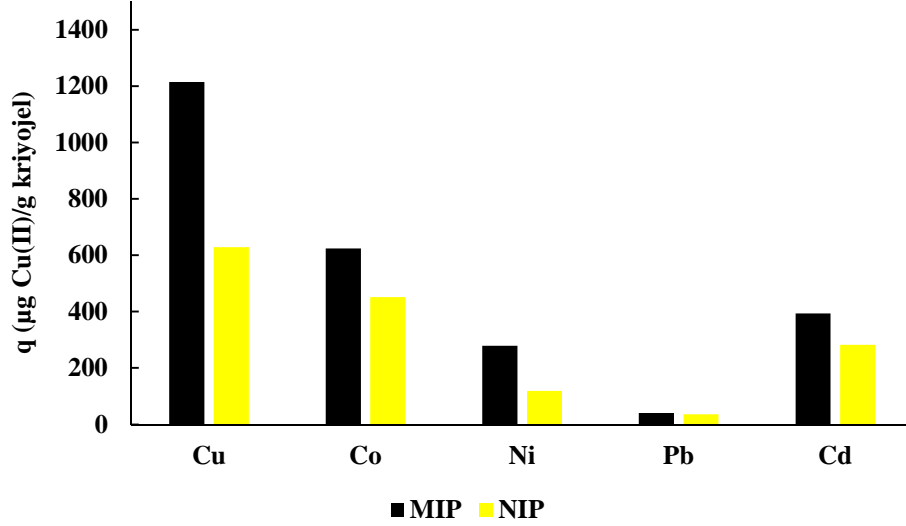
**Çizelge 4.3.** Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik katsayıları (Yarı masız).

A ır Metal	MIP			NIP			k'
	q (µg/g)	K <sub>a</sub> (L/g)	k	q (µg/g)	K <sub>a</sub> (L/g)	k	
<b>Cu(II)</b>	2530.0	35.02	-	920.0	10.20	-	-
<b>Co(II)</b>	1110.0	12.60	2.80	800.0	8.73	1.17	2.39
<b>Ni(II)</b>	530.0	5.63	6.22	380.0	3.96	2.58	2.41
<b>Pb(II)</b>	300.0	3.10	11.23	260.0	2.67	3.82	2.94
<b>Cd(II)</b>	680.0	7.29	4.80	600.0	6.34	1.61	2.98
<b>Toplam</b>	5150.0			2960.0			

ekil 4.29 ve Çizelge 4.3'den de görüldü ü gibi Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller baskılanmamı kriyojellere göre herbir a ır metal için daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bu durum, yüzey baskılama i leminin gerçekleşmesinde metal iyonlarıyla etkile ebilecek grupların açıkta kalması/maskelenmesi ile açıklanabilir. Ayrıca Cu(II) yüzey baskılanmı polimerik yapının baskılanmamı yapıya göre daha büyük yüzey alanına sahip olması da bir de er önemli parametredir. Ayrıca en yüksek seçicilik katsayısına Cu(II) iyonu için ula ılmıştır. Bu sonuç, Cu(II) yüzey baskılanmı poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin Cu(II) iyonlarına kar ı son derece seçici oldu unu göstermektedir. Bu seçicilik Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojellerin yüzeyinde bulunan Cu(II) iyonlarına özgü olan kavitelere kaynaklanmaktadır.

Seçicilik çalı malarının bir sonraki a amasında ise yine Cu(II), Co(II), Ni(II), Pb(II) ve Cd(II) a ır metallerinin 500 mg/L deri iminde çözeltileri hazırlanmı tır. Bu a ır metallerin, Cu(II) baskılanmı ve baskılanmamı kriyojeller ile adsorpsiyon çalı maları aynı anda ve aynı ortamda (yarı malı olarak) yapılmı tır. Deneyler oda sıcaklı nda, çalkalamalı etüvde, 100 rpm'de 2 saat etkile im süresi ile gerçekleşme tirilmi tir. A ır metal deri imleri aynı ekilde atomik absorpsiyon spektrometresi ile belirlenmi tir ( ekil 4.30).

Bu çalı mada da Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin herbir a ır metal için adsorpsiyon kapasiteleri hesaplandıktan da ılım katsayıları, seçicilik katsayıları ve ba ıl seçicilik katsayıları sırasıyla E itlik 4.1, E itlik 4.2 ve E itlik 4.3'deki gibi hesaplanmı tır (Çizelge 4.4).



**ekil 4.30.** Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik çalı maları (Yarı malı).

**Çizelge 4.4.** Cu(II) yüzey baskılanmı ve baskılanmamı kriyojellerin seçicilik katsayıları (Yarı malı).

A ır Metal	MIP			NIP			k'
	q (µg/g)	K <sub>d</sub> (L/g)	k	q (µg/g)	K <sub>d</sub> (L/g)	k	
<b>Cu(II)</b>	1210.0	13.93	-	630.0	6.75	-	-
<b>Co(II)</b>	620.0	6.67	2.09	450.0	4.73	1.43	1.46
<b>Ni(II)</b>	280.0	2.86	4.87	120.0	1.20	5.63	0.87
<b>Pb(II)</b>	40.0	0.40	34.83	36.0	0.36	18.75	1.86
<b>Cd(II)</b>	390.0	4.09	3.41	280.0	2.91	2.32	1.47
<b>Toplam</b>	2540.0			1516.0			

ekil 4.30 ve Çizelge 4.4'den de görüldü ü gibi Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller baskılanmamı kriyojellere göre herbir a ır metal için yarı masız ko ullarda oldu u gibi daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bu durum, yüzey alanı ve/veya polimerizasyon ko ullarıyla ili kilidir (Çizelge 4.2). Ancak Cu(II) iyonları yarı macı iyonlarla aynı ortamda bulundu undan yarı masız ko ullarda elde edilen de erlere göre adsorpsiyon kapasiteleri hem baskılanmı hem de baskılanmamı kriyojellere göre önemli ölçüde azalmı tır. Bu sonuç, metal iyonlarının polietilenimin ile etkile iminin yarı malı oldu unu ve antagonistik etki gösterdiklerini açı a çıkarmaktadır. Bu çalı mada da beklenildi i gibi en yüksek seçicilik katsayısına Cu(II) iyonu için ula ılmı tır. Bu sonuç,

Cu(II) baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin hem yarı masız hem de yarı malı ko ullar altında Cu(II) iyonlarına kar ı son derece seçici oldu unu göstermektedir.

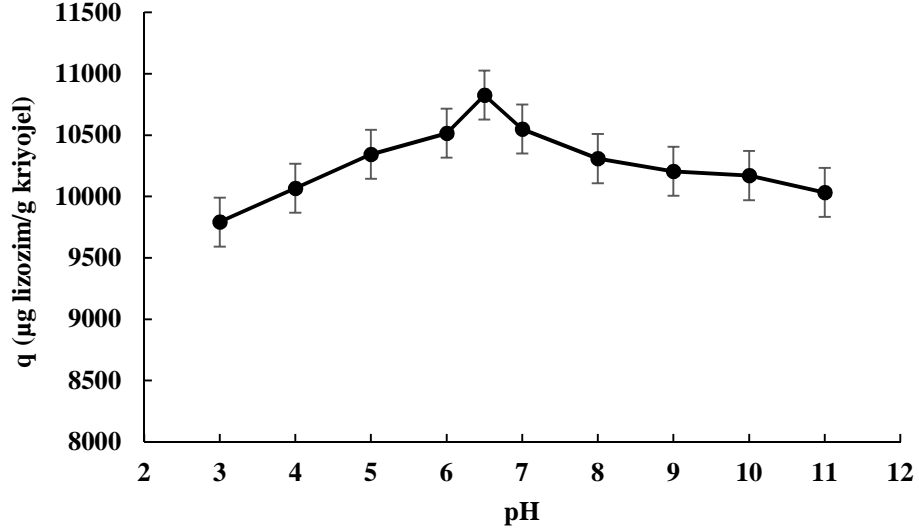
Ayrıca Cu(II) iyonunun adsorpsiyon kapasitesi, yarı malı ve yarı masız ortamların her ikisinde de Co(II), Ni(II), Pb(II) ve Cd(II) ile kıyaslandı nda beklenildi i gibi çok daha yüksektir. Co(II) ve Ni(II) iyonlarının boyutları Cu(II) iyonuna daha yakın oldu u için polimerik yapı tarafından daha çok adsorbe edildi i dü ünülmektedir. Cd(II) ve bilhassa da Pb(II) iyonlarının boyutları ise Cu(II) iyonundan çok daha farklı oldu u için bu iyonların adsorpsiyon kapasiteleri oldukça dü ük çıkmı tır. Bu da Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerdeki kavitelelerin Cu(II) iyonunun hem boyutlarına hem de koordinasyon küresine uygun oldu unu göstermektedir.

#### **4.2.2. Lizozim Yüzey Baskılanımı Kriyojeller**

##### **4.2.2.1. pH Etkisi**

Lizozim yüzey baskılanımı kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini incelemek için pH: 3.0-11.0 aralı nda uygun tamponlar varlı nda de i tirilerek deneyler yapılmı tır. Adsorpsiyon miktarının pH: 6.5'te en yüksek oldu u tespit edilmi tir ( ekil 4.31). Lizozim yüzey baskılanımı kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi daha dü ük ve daha yüksek pH de erlerinde önemli ölçüde dü mektedir.

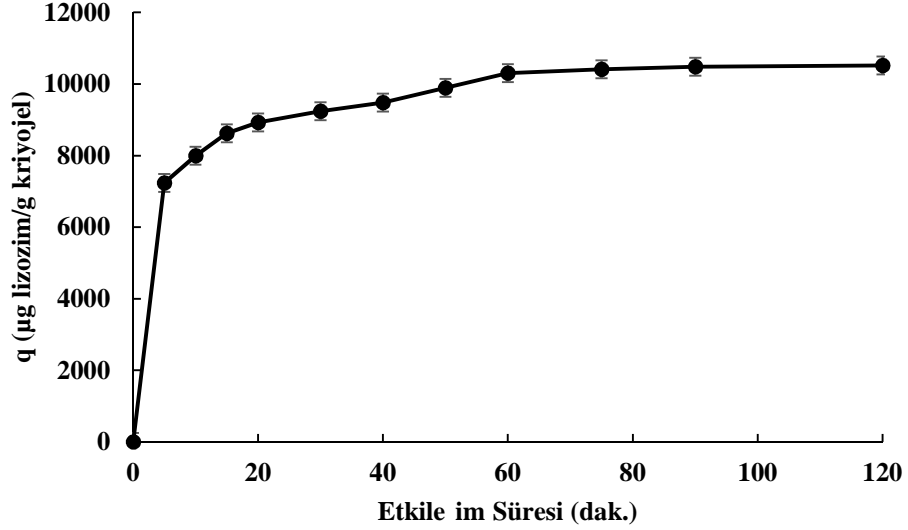
Lizozim proteinin izoelektrik noktası pH: 11.2'dir. Proteinlerin izoelektrik noktalarındaki net yükün sıfır olması onların yükten yoksun oldu u anlamına gelmemektedir [156]. Lizozimin en etkin oldu u pH aralı ı 6.0-6.5'dir. Dolayısıyla, lizozimin afinite sistemiyle etkile iminin bu de er aralı nda olması beklenen bir durumdur. Lizozim proteininin yüzeye yakın bölgelerinde bir histidin, dört aspartik asit, iki glutamik asit ve iki tirozin kalıntısı bulunmaktadır [157]. Dolayısıyla; histidin, aspartik asit ve glutamik asit kalıntıları fizyolojik pH (pH: 7.0) civarında yüksüz yan grup veya negatif yüke sahip olmaktadır. Böylelikle de polietilenimin moleküllerine ba lı pozitif yüklü Cu(II) iyonlarının lizozim proteinine ba lanması elektrostatik etkile imler (koordine kovalent etkile im) vasıtasıyla daha kolay hale gelmektedir.



**ekil 4.31.** Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi. Lizozim deri imi: 100 mg/L; etkile im süresi: 60 dak.; sıcaklık 25°C.

#### 4.2.2.2. Etkile im Süresinin Etkisi

Belirlenen optimum pH de erinde (pH:6.5) adsorpsiyon çözeltilisinden farklı zaman aralıklarında (10-360 dak.) numuneler alınarak adsorplanan lizozim miktarları belirlenmi tir ( ekil 4.32). ekilden de görüldü ü gibi, 60. dak.'da lizozim adsorpsiyon kapasitesinin hemen hemen sabitlendi i gözlenmi tir. Buna göre lizozimin adsorbente ba landı ı bölgelerin 60 dak. sonra doygunlu a ula tı ı dü ünülmektedir. Bundan dolayı en uygun temas süresi 60 dak. olarak belirlenmi ve di er tüm çalı malarda uygulanmı tır.

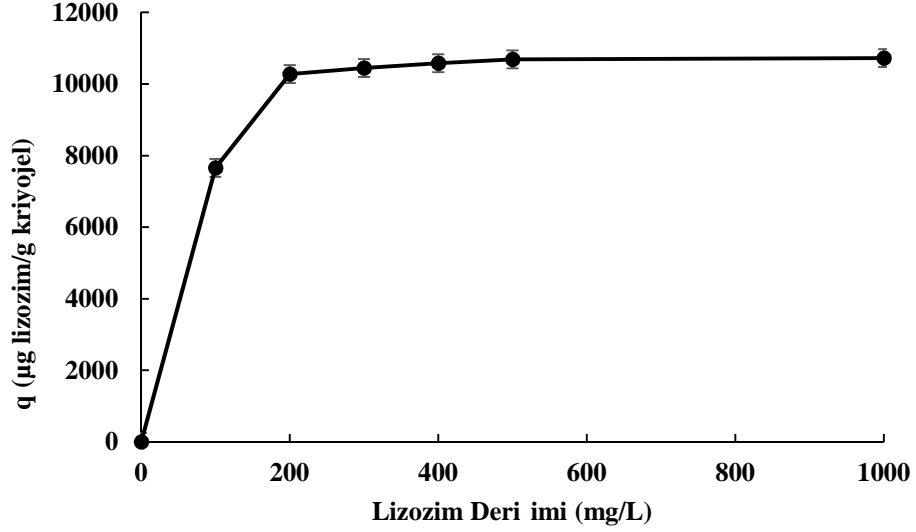


**ekil 4.32.** Lizozim adsorpsiyonuna etkile im süresinin etkisi. pH: 6.5; lizozim deri imi: 100 mg/L; sıcaklık: 25°C.

#### 4.2.2.3. Lizozim Deri iminin Etkisi

Adsorpsiyon ortamındaki, lizozim çözeltisinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini incelemek için, pH: 6.5'te, 60 dak. etkile im süresi ile 100-1000 mg/L deri im aralı ında adsorpsiyon i lemleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda artan lizozim deri imi ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlemlenmiştir. 200 mg/L lizozim deri iminden sonra adsorbentin lizozim bağlanma bölgeleri tamamen lizozim ile doydu u için adsorpsiyon kapasitesinin önemli ölçüde de i medi i fark edilmiştir olup daha sonraki çalışmalarda 200 mg/L lizozim deri imlerinde çalışılmı tır ( ekil 4.33).

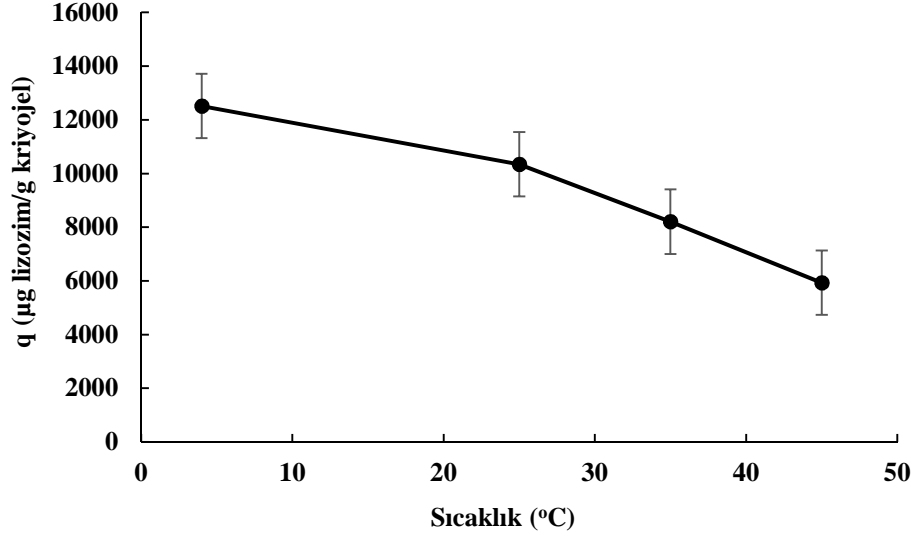




**ekil 4.33.** Lizozim adsorpsiyonuna lizozim deri iminin etkisi. pH: 6.5; etkile im süresi: 60 dak.; sıcaklık: 25°C.

#### 4.2.2.4. Sıcaklı ın Etkisi

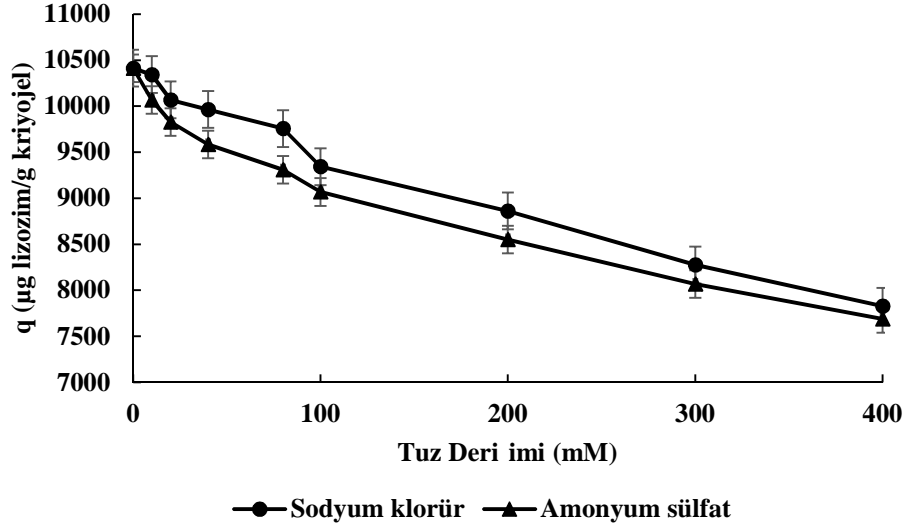
Adsorpsiyon kapasitesi üzerine sıcaklı ın etkisini incelemek için 4°C, 25°C, 35°C ve 45°C sıcaklık de erlerinde çalı ılmı tır. Daha önce de belirtildi i gibi hem Cu(II)-PEI etkile imleri hem de Cu(II)-lizozim etkile imleri, koordine kovalent ba ve elektron payla ımı gibi etkile imlerdir. Bu etkile imlerin kuvveti, sıcaklıkla ters orantılıdır. Dolayısıyla artan sıcaklık, baskın etkile imlerde azalmaya; bu durum da adsorpsiyon kapasitesinde azalmaya sebep olmaktadır ( ekil 4.34).



**ekil 4.34.** Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklı ının etkisi. pH: 6.5; lizozim deri imi: 200 mg/L; etkile im süresi: 60 dak.

#### 4.2.2.5. yonik iddetin Etkisi

yonik iddetin lizozim adsorpsiyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla NaCl ve  $(NH_4)_2SO_4$  tuzları ile çalı ılmı tır. Tuz deri imleri 10-400 mM de erleri arasında de i tirilerek adsorpsiyon kapasiteleri incelenmi tir. Artan iyonik iddet ile adsorpsiyon kapasitesinin azaldı ı belirlenmi tir ( ekil 4.35). Bu sonuç, analit ile ligand arasındaki etkile imin beklenildi i gibi elektrostatik oldu u dü ünmesini do rulamaktadır. Artan tuz deri imi ile adsorpsiyon ortamındaki katyon/anyon etkile imleri etkilenmektedir. Ayrıca elektron verici ve alıcı grupların tuz iyonları tarafından maskelenmesi lizozim adsorpsiyonunu inhibe etmekte ve adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bunun yanında, pH: 6.5 noktasında lizozim proteinin yüzeye yakın bölgelerinde bulunan aminoasit kalıntılarının pozitif ve negatif yüklü grupları da tuz moleküllerinin pozitif ve negatif yüklü grupları ile elektrostatik etkile ime girmekte ve Cu(II)-lizozim arasındaki elektrostatik etkile imlerin sayısını azaltmaktadır. Bu sebeple adsorpsiyon kapasitesi artan iyonik iddetle beraber azalmaktadır. Çalı ılan lizozim deri imleri çok dü ük oldu undan  $(NH_4)_2SO_4$  tuzundan kaynaklanabilecek kaotropik bir etki beklenmemektedir [158]

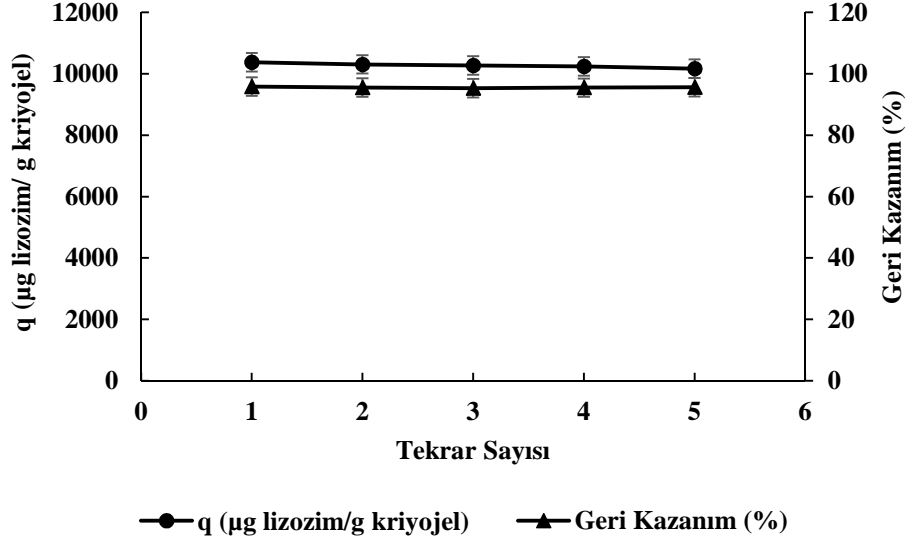


**ekil 4.35.** yonik iddet etkisi. pH: 6.5; lizozim deri imi: 200 mg/L; etkile im süresi: 60 dak.; sıcaklık 25°C.

#### 4.2.2.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Lizozim yüzey baskılanmı kriyojellere adsorplanan lizozimin desorpsiyonu da kesikli sistemde çalı ılmı tır. Lizozim adsorplamı kriyojeller 1 M NaCl çözeltilisi bulunan 5 mL desorpsiyon ortamında 60 dakika süre ile 100 rpm hızda sürekli karı tırılmı tır. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirli ini göstermek için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojeller kullanılarak 5 kez tekrarlanmı tır. Desorpsiyon-adsorpsiyon i lemlerinin arasında rejenerasyon için 20 mM NaOH (10 mL, 30 dak.) ve dengeleme için tampon çözeltili (pH: 6.5, 10 mL, 30 dak.) ile kriyojeller yıkanmı tır.

Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucu lizozim proteini %96 geri kazanım oranıyla elde edilirken adsorpsiyon kapasitesinde kaydade er bir azalma gözlenmeden aynı kriyojeller 5 defa kullanılmı tır ( ekil 4.36).



**ekil 4.36.** Lizozim yüzey baskılanımı kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

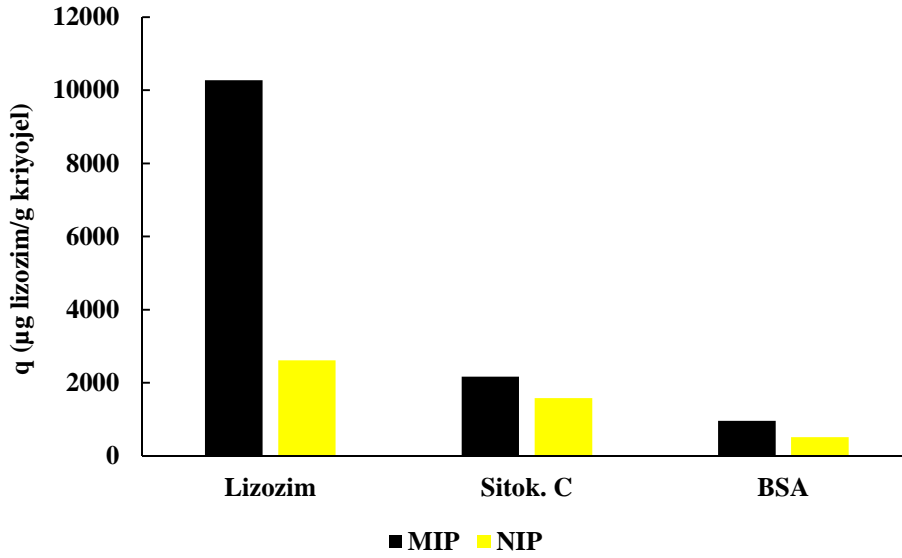
#### 4.2.2.7. Seçicilik Çalışmaları

Lizozim yüzey baskılanımı kriyojellerin lizozime karşı seçiciliğini belirlemek için çalışmaları kesikli sistemde yapılmıştır. Bu çalışmada lizozim yüzey baskılanımı kriyojeller ve baskılanmamış kriyojellerin adsorpladıkları lizozim miktarlarının yanında sırasıyla serum albümin (BSA) ve sitokrom c miktarları da hesaplanmıştır.

İlk olarak lizozim, BSA ve sitokrom c proteinlerinin 1000 mg/L derişiminde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu proteinlerin her biri için lizozim yüzey baskılanımı ve baskılanmamış kriyojeller ile adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Adsorpsiyon ortamı ise 1 mL 1000 mg/L protein çözeltisi ve 4 mL pH: 6.5 tamponundan son derişim 200 mg/L olacak şekilde oluşturulmuştur. Deneyler oda sıcaklığında, çalkalamalı etüvde, 100 rpm hızda 1 saat etkileşim süresi ile gerçekleştirilmiştir. UV-görünür spektrometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülen değerler ile herbir protein için adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır ve grafiğe geçirilmiştir (ekil 4.37).

ekil 4.37'den de görüldüğü gibi lizozim yüzey baskılanımı kriyojeller lizozime karşı son derece seçici davranmaktadır. Sitokrom c proteinlerinin BSA proteinlerine göre daha fazla adsorbe edildiği tespit edilmiştir. Sitokrom c izoelektrik nokta ve moleküler ağırlık olarak lizozime benzer yapısal özelliklere sahiptir. BSA proteini ise boyut ve yük olarak lizozim

proteininden çok farklıdır [74]. Dolayısıyla, sitokrom c proteinin BSA proteinine göre yapıya daha fazla bağlanması beklenen bir durumdur.



**ekil 4.37.** Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin seçicilik çalışmaları.

Bu çalışmada da lizozim yüzey baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin herbir protein için dağılım katsayıları, seçicilik katsayıları ve bağıl seçicilik katsayıları sırasıyla Etilik 4.1, Etilik 4.2 ve Etilik 4.3'teki gibi hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Çizelgeden de görüldüğü gibi lizozim yüzey baskılanmış kriyojellerin sitokrom c ve BSA proteinlerine karşı lizozim seçiciliği oldukça yüksek olup (sitokrom c'ye karşı 11.99 kat, BSA'ya karşı 29.46 kat); bu sonuç, yüzey baskılanmış yapı üzerindeki kaviteletin lizozim molekülünün boyutlarına uygun olduğunu düşündürmektedir.

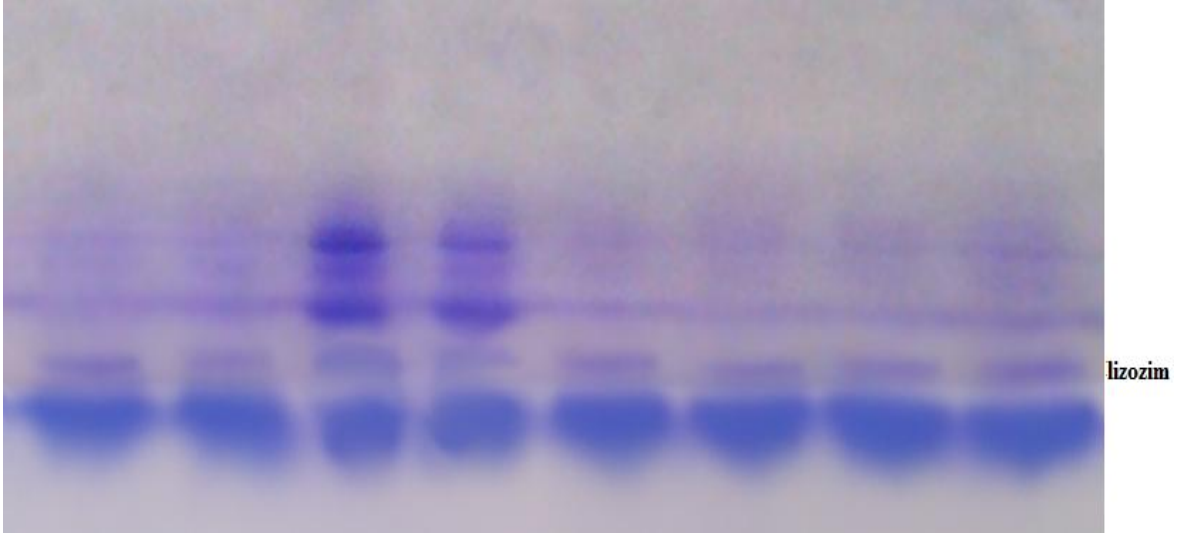
**Çizelge 4.5.** Lizozim yüzey baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin seçicilik katsayıları.

Protein	MIP			NIP			k'
	q (µg/g)	K <sub>d</sub> (L/g)	k	q (µg/g)	K <sub>d</sub> (L/g)	k	
Lizozim	10270.0	145.83	-	2620.0	15.33	-	-
Sitokrom c	2170.0	12.16	11,99	1590.0	8.68	1.77	6.77
BSA	970.0	4.95	29,46	520.0	2.62	5.85	5.04
<b>Toplam</b>	13410.0			4730.0			

### 4.3. Yumurta Akından Lizozim Safla tırılması ve SDS-PAGE Analizi

Elektroforetik olarak karakterize edilen lizozim çözeltilerine sodyum dodesil sülfat (SDS) ile muamele edilmi ve lizozimlerin denatürasyonu sa lanarak negatif yük kazandırılmı tır. Jel üzerinde farklı moleköl kütlelerine sahip proteinler farklı mesafelerde göç etmektedirler. Molekül kütlesi dü ük proteinler jel üzerinde daha fazla mesafe katederken, moleköl kütlesi yüksek proteinler daha az mesafe katetmektedir. ekil 4.38 incelendi inde, sulu çözeltiden ve yumurta akından adsorbe edilen lizozim proteinin 1.0 M NaCl ile desorpsiyonu sonucu elde edilen desorpsiyon çözeltilerindeki lizozim varlı ı jel görüntüsü üzerinde açıkça fark edilmektedir.

Lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller ile lizozim adsorpsiyonu, hem sulu çözeltiden hem de yumurta akından paralel ekilde optimum deney ko ullarında gerçekte tirilmi tir. Sulu çözeltiden adsorbe edilen lizozim için adsorsiyon kapasitesi 10440 µg/g olarak hesaplanırken, yumurta akından elde edilen lizozim için adsorpsiyon kapasitesi 7650.0 µg/g olarak belirlenmi tir. Bu beklenen bir sonuçtur. Sulu çözeltide sadece lizozim proteini bulunurken, yumurta akından ekstrakte edilen çözeltide lizozim dı ında ba ka protein türleri ve safsızlıklar da bulunabilmektedir. Bu sebeple saf lizozim çözeltisinden elde edilen adsorpsiyon kapasitesinden bir miktar dü ü olması ola an bir durumdur. Yumurta akından elde edilen lizozimin adsorpsiyonu sonucu gerçekte tirilen desorpsiyon i lemi sonucunda desorpsiyon oranı %85 olarak bulunmu tur. Bu sonuç, yumurta akından elde edilen lizozim ile lizozim yüzey baskılanmı kriyojel arasındaki etkile imin büyük ölçüde tersinir oldu unu göstermektedir. Ayrıca safla tırma i leminin lizozimin yapısal özelliklerine olumsuz etki (denatürasyon gibi) yapmadı mı da belirtmektedir.



**ekil 4.38.** Lizozim proteininin elektroforetik ayrımı. 1. Band: Lizozim marker, 2. Band: Lizozim (desorpsiyon-yumurta akı), 3. Band: Lizozim (adsorpsiyon sonrası-yumurta akı), 4. Band: Lizozim (adsorpsiyon öncesi-yumurta akı), 5. Band: Lizozim (desorpsiyon-sulu çözelti), 6. Band: Lizozim (adsorpsiyon sonrası-sulu çözelti), 7. Band: Lizozim (adsorpsiyon öncesi-sulu çözelti), 8. Band: Lizozim marker.

#### 4.4. Matematiksel Modellemeler

##### 4.4.1. Adsorpsiyon zotermleri

Adsorpsiyon izotermleri her bir analitin adsorbent ile etkileşimini tanımlamak için kullanılmaktadır. Böylelikle çözeltideki analit derişimi ve iki faz dengede iken, katı faza adsorplanan analit miktarı arasındaki ilişki belirlenebilmektedir.

Langmuir adsorpsiyon modeli, moleküllerin sabit sayıda iyi tanımlanmış bölgelere adsorlandı rını ve her birinin sadece bir molekül tutacağını kabul etmekte olup, bu bölgelerin de enerji bakımından eşit olduğu ve birbirinden uzak olduğu ve bundan dolayı da komşu bölgelere adsorplanan moleküller arasında yan etki olmadığını öngörmektedir [159].

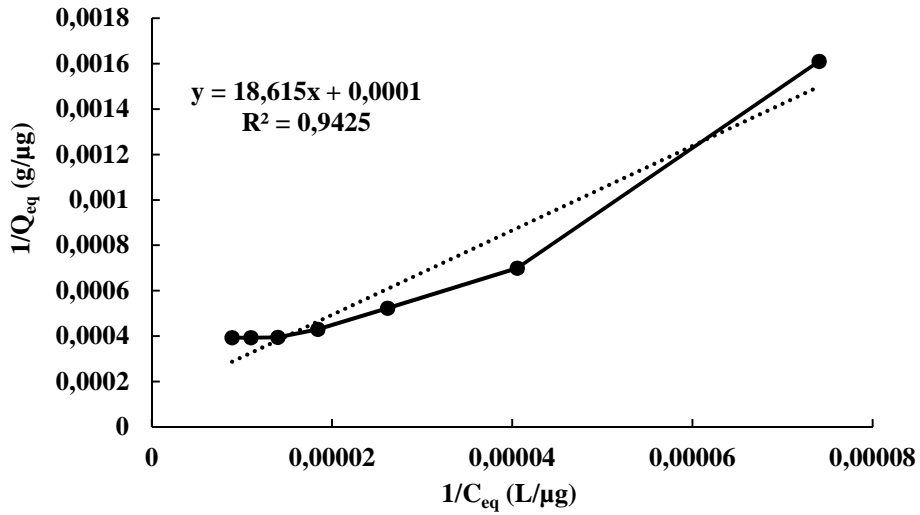
Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.4' de verilmiştir. Yüzey baskılanmış kriyojellerin Cu(II) ve lizozim için denge verilerinin karşılıklı gelen de ğerimleri lineer (doğrusal) bir grafik vermektedir ki bu Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir.

$$Q_{eq} = Q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + bC_{eq}) \quad (\text{Eşitlik 4.4})$$

Bu e itlikte Q; adsorplanmı analit miktarını ( $\mu\text{g/g}$ ),  $C_{\text{eq}}$  denge analit deri imini ( $\mu\text{g/L}$ ), b Langmuir sabitini ( $\text{L}/\mu\text{g}$ ) ve  $Q_{\text{max}}$  maksimum adsorpsiyon kapasitesini göstermektedir ( $\mu\text{g/g}$ ). Bu e itlik do rusalla tırıldı ında

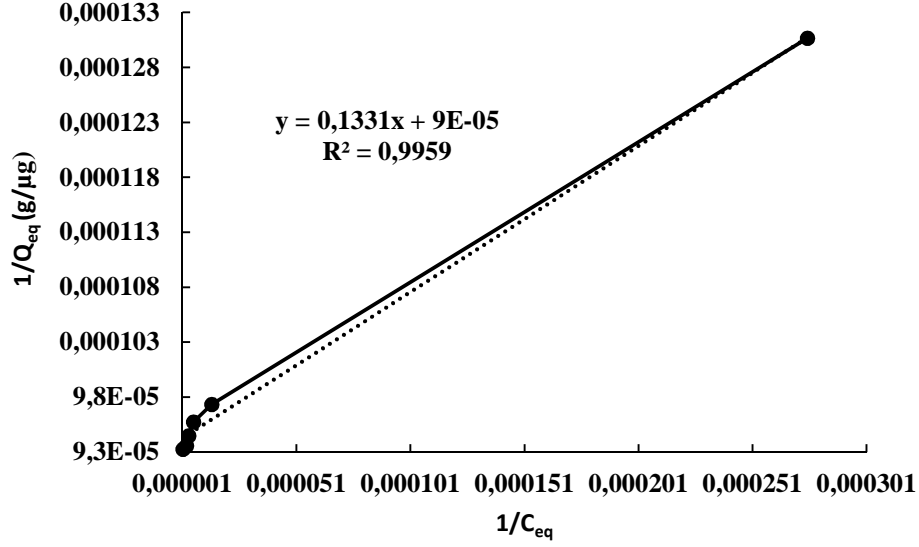
$$1 / Q_{\text{eq}} = [1 / (Q_{\text{max}} \cdot b)] [1 / C_{\text{eq}}] + [1 / (Q_{\text{max}})] \quad (\text{E itlik 4.5})$$

elde edilmektedir.  $1/C_{\text{eq}}$  kar ı  $1/Q$  grafi inin y eksenini kesti i nokta  $1/Q_{\text{max}}$  de erini ve e imi de  $1/Q_{\text{max}} \cdot b$  de erini vermektedir ( ekil 4.39 ve ekil 4.40).



**ekil 4.39.** Cu(II) yüzey baskılanmı kriyojeller için Langmuir izotermi.





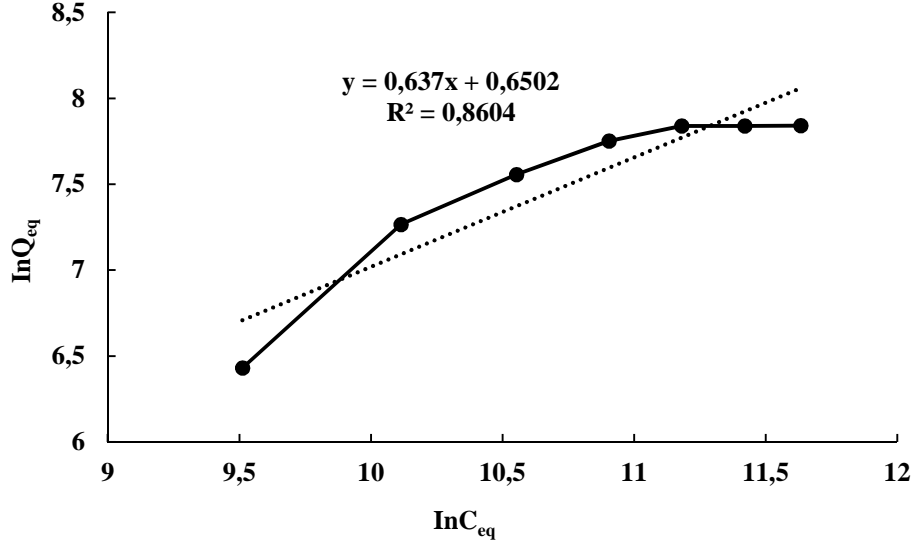
**ekil 4.40.** Lizozim yüzey baskılanımı kriyojeller için Langmuir izoterminin.

Cu(II) yüzey baskılanımı ve lizozim yüzey baskılanımı kriyojellere ait maksimum adsorpsiyon kapasiteleri ( $Q_{max}$ ) sırasıyla 10000.0  $\mu\text{g/g}$  ve 11111.1  $\mu\text{g/g}$  olarak deney verilerinden hesaplanmıştır (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). Langmuir korelasyon katsayıları ( $R^2$ ), her iki yüzey baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojeller için oldukça yüksektir (Cu(II) için 0.9425 ve lizozim için 0.9959). Bu sonuçlar, Langmuir adsorpsiyon modelinin bu afinite sistemlerine uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Diğer tanımla, yüzey baskılama sırasında oluşturulan kavite homojen dağılımı, enerji ve yan etkileşiminin olmadığını anlamına gelmektedir.

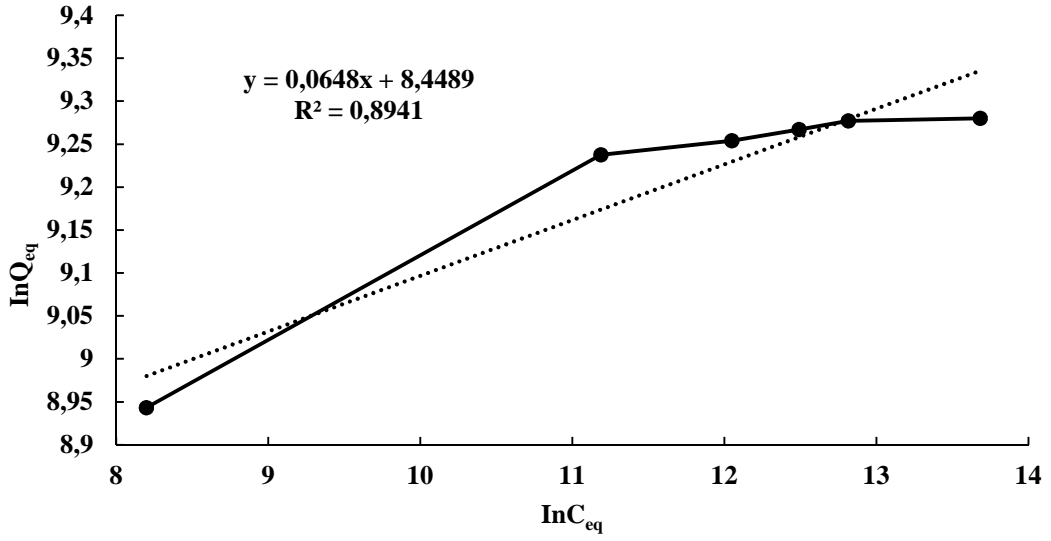
Diğer izoterm ise, sık sık adsorpsiyon davranışlarını göstermekte kullanılan Freundlich izotermidir [160]. Bu izoterm, heterojen yüzeye adsorpsiyon hususunda Langmuir izotermine üstel bir formudur. Adsorplanan protein, tüm bağlanma bölgelerine olan toplam adsorpsiyonuna eşittir. Freundlich izotermi tersinir adsorpsiyonu belirtir ve tek katmanlı olarak sınırlıdır. Basit formül;

$$Q_{eq} = K_F (C_{eq})^{1/n} \quad (\text{Eşitlik 4.6})$$

eklenmiştir.  $K_F$  ve  $n$  Freundlich sabitleridir.  $\ln Q_{eq}$  ya karşı  $\ln C_{eq}$  grafiğinde,  $\ln K_F$  eksenini kesen nokta ve  $1/n$  eğimini bulmak için kullanılmaktadır (ekil 4.41 ve ekil 4.42).



ekil 4.41. Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojeller için Freundlich izotermini.



ekil 4.42. Lizozim yüzey baskılanımı kriyojeller için Freundlich izotermini.

**Çizelge 4.6.** Cu(II) adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

Q <sub>deneyssel</sub> (µg/g)	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri			
	Q <sub>max</sub> · (µg/g)	b (L/µg)	R <sup>2</sup>	K <sub>f</sub>	n	1/n	R <sup>2</sup>
2541.0	10000.0	0.0000054	0.9425	1.92	0.637	1.57	0.8604

**Çizelge 4.7.** Lizozim adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

Q <sub>deneyssel</sub> (µg/g)	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri			
	Q <sub>max</sub> · (µg/g)	b (L/µg)	R <sup>2</sup>	K <sub>f</sub>	n	1/n	R <sup>2</sup>
10723.0	11111.1	0.00068	0.9959	4699.9	0.0648	15.432	0.8941

Daha önce de bahsedildi i üzere Freundlich izotermi, yüzey heterojenitesini gösteren iki parametre içermektedir, K<sub>f</sub> ve 1/n. 1/n, yüzey heterojenite indeksidir. Bu de erler ve regresyon katsayıları incelendi inde, hem Cu(II) yüzey baskılanmı hem de lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller üzerine adsorpsiyon i lemi çok katmanlı adsorpsiyon ekinde olmamı tır. Cu(II) ve lizozim adsorpsiyon izotermi tleri tüm deri im aralı ı çalı malarında do rusal çıkmı tır ve korelasyon katsayıları yüksektir. zotermi tlerin korelasyon katsayıları göz önüne alındı ında, Langmuir adsorpsiyon modeli oldukça uygundur. Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7; Freundlich adsorpsiyon izotermi sabitlerini, n, K<sub>f</sub> ve korelasyon katsayılarını, göstermektedir. Cu(II) ve lizozim Langmuir izotermi tleri için regresyon katsayı de erleri Freundlich izoterm de erlerinden daha yüksektir ve Langmuir Q<sub>max</sub> de erleri deneyssel veriler ile daha iyi uyu maktadır.

#### 4.4.2. Adsorpsiyon Kinetik Modelleme

Kütle transferi ve kimyasal etkileşim gibi parametrelerin adsorpsiyon hızları üzerindeki kontrol mekanizmalarını inceleyebilmek amacıyla deneysel sonuçları matematiksel kinetik modeller ile test etmek gerekmektedir. Kinetik modeller (yalancı-birinci ve ikinci derece ektitlikler) ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimlerine ektit olduğu durumlarda kullanılabilir. Lagergren birinci-derece hız ektitli i sıvı çözültiden katı yüzeye adsorpsiyonda en çok kullanılan ektitliklerden biridir. Aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$dq_t / dt = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (\text{Ektitlik 4.7})$$

$k_1$ , yalancı- birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (1/dak.) ve  $q_{eq}$  ve  $q_t$  sırasıyla dengedeki ve  $t$  anındaki adsorplanan analit miktarlarını ( $\mu\text{g/g}$ ) göstermektedir.

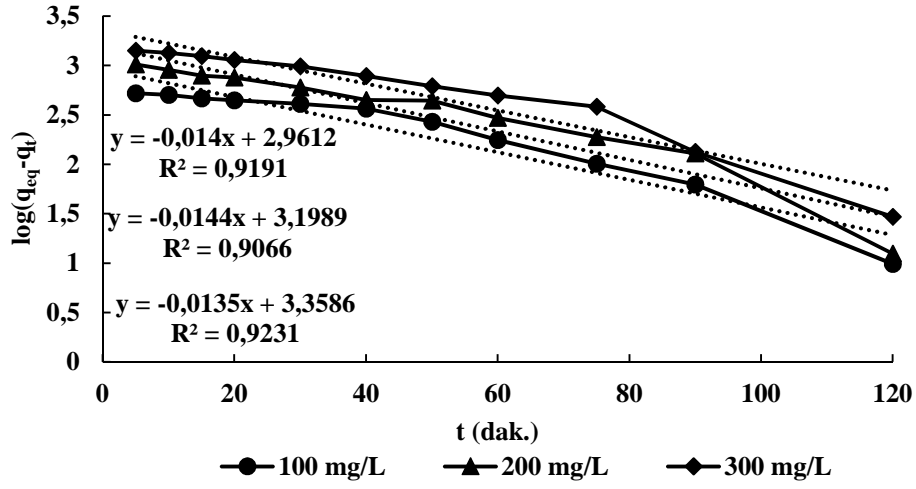
Sınır değerler,  $t=0$  için  $q_t=0$  ve  $t=t$  için  $q_t=q_t$ , uygulandıktan sonra integrasyon alındığında;

$$\log[q_{eq} / (q_{eq} - q_t)] = (k_1 t) / 2.303 \quad (\text{Ektitlik 4.8})$$

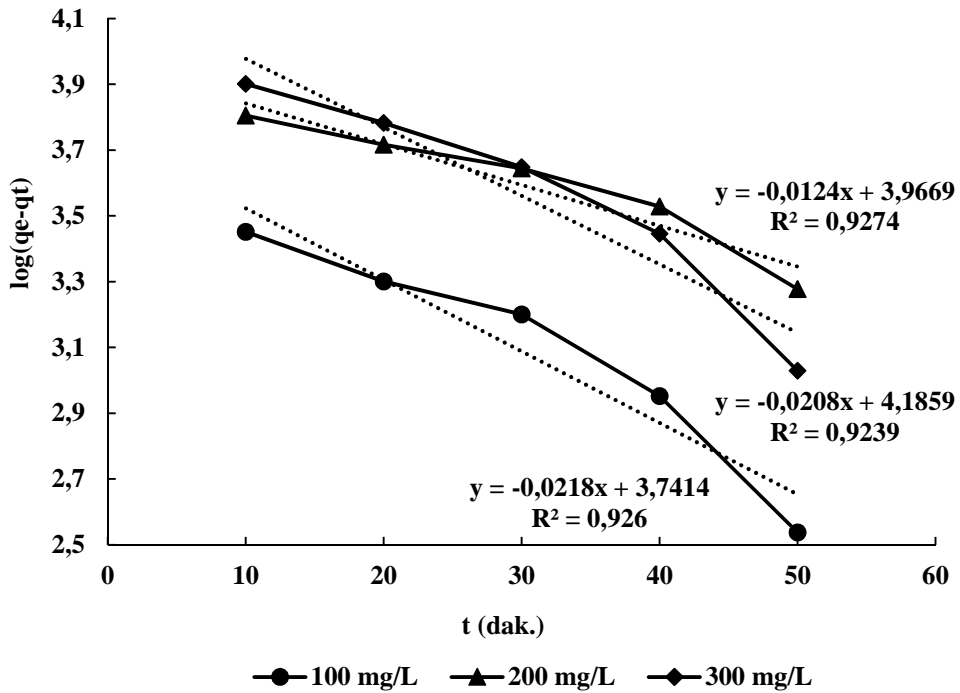
Denklemin doğrusal formu elde etmek için tekrar organize edilirse;

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t) / 2.303 \quad (\text{Ektitlik 4.9})$$

ektitli i elde edilir.  $\log(q_{eq})$  karşı  $t$ , bu kinetik modelin uygulanabilmesi için doğrusal bir grafik vermelidir. Asıl birinci-derece ektitlemde  $\log(q_{eq})$ ,  $\log(q_{eq} - q_t)$  ile  $t$ 'nin grafiğinin kesimine ektit olmalıdır (Ektitlik 4.43 ve Ektitlik 4.44).



ekil 4.43. Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojeller için deneysel verilerin yalancı birinci derece grafi i.



ekil 4.44. Lizozim yüzey baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojelleri için deneysel verilerin yalancı birinci derece kineti i.

Bunlara ek olarak, denge adsorpsiyon kapasitesine dayalı yalancı-ikinci derece e itlik a a rdaki ekilde ifade edilebilmektedir:

$$dq_t / dt = k_2 (q_{eq} - q_t)^2 \quad (\text{E itlik 4.10})$$

$k_2$  (g/ $\mu$ g.dak) yalancı-ikinci derece adsorpsiyon i leminin hız sabitidir. Denklem 4.10'a,  $t=0$  için  $q_t=0$  ve  $t=t$  için  $q_t=q_t$  sınırlarında, integrasyon uygulanırsa, sonuç;

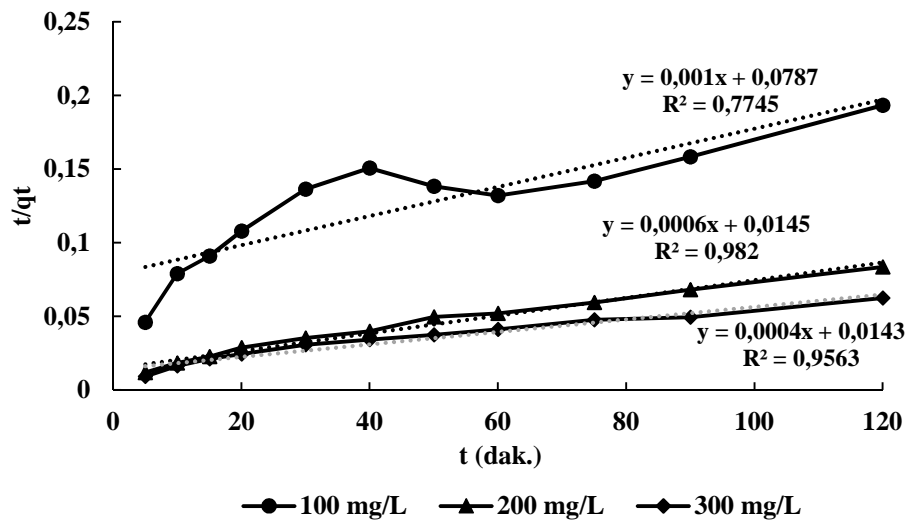
$$[1/(q_{eq} - q_t)] = (1 / q_{eq}) + k_2 t \quad (\text{E itlik 4.11})$$

Veya do rusal forma e it olarak;

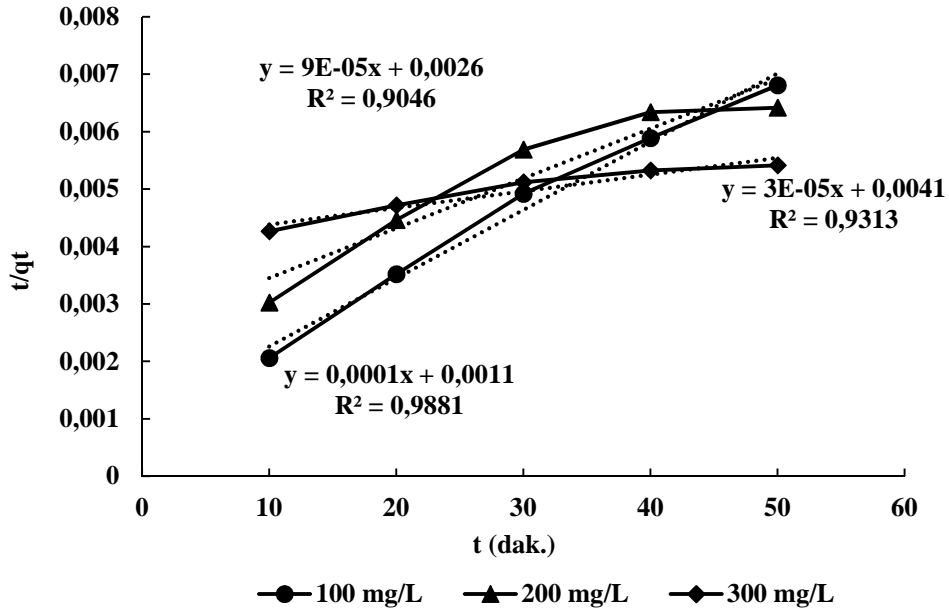
$$(t / q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq}) t \quad (\text{E itlik 4.12})$$

e itli i elde edilir.

$t / q_t$ 'ye kar ı t grafi i, ikinci-derece kinetiklerin uygulanabilir olması için do rusal bir ba ıntı vermelidir. Hız sabiti ( $k_2$ ) kesim noktasından ve dengedeki adsorpsiyon ise ( $q_{eq}$ ) e imden elde edilebilmektedir ( ekil 4.45 ve ekil 4.46).



**ekil 4.45.** Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojeller için deneysel verilerin yalancı ikinci derece grafi i.



**ekil 4.46.** Lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller için deneysel verilerin yalancı ikinci derece grafi i.

ekil 4.43-4.46'dan alınan deneysel adsorpsiyon kapasitelerinin ve teorik de erlerin kar ıla tırılması Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da verilmi tir. Yalancı-ikinci derece kinetik modelinden elde edilen teorik  $q_{eq}$  de erleri deneysel de erlere yakındır ve korelasyon katsayıları yüksektir. Sonuçlar de i ik deri imler için  $R^2$  de erlerinin genelde 1.00' a yakın oldu unu göstermektedir. Cu(II) yüzey baskılanmı ve lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller ikinci derece kinetik modele uymaktadır. Bu durum, beklenen bir sonuçtur. Yüzey baskılama yakla ımının temel amacı, difüzyon kısıtlamalarının önüne geçmektir. Yalancı-ikinci derece kinetik modelinin uygun olması, herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın adsorpsiyon i leminin gerçekleşti ini göstermektedir. Adsorpsiyon i leminde hız belirleyici basamak analit ile baskılanmı kaviterde bulunan ligandın kimyasal etkile imidir. Bir di er tanımla, yüzey baskılanmı kriyojellere analit (Cu(II) ve lizozim) adsorpsiyon i lemi, kimyasal kontrollü bir süreçtir.

**Çizelge 4.8.** Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik sabitler.

Ba langıç Deri imi (mg/L)	Q <sub>deneyssel</sub> (µg/g)	Yalancı-Birinci Derece			Yalancı- kinci Derece		
		q <sub>eq</sub> (µg/g)	k <sub>1</sub> (1/dak.)	R <sup>2</sup>	q <sub>eq</sub> (µg/g)	k <sub>2</sub> (g/µg.dak.)	R <sup>2</sup>
100	620.9	914.5	0.03224	0.9191	1000.0	0.0000127	0.7745
200	1437.0	1580.9	0.03316	0.9066	1666.7	0.0000248	0.9820
300	1924.3	2283.5	0.03109	0.9231	2500.0	0.0000112	0.9563

**Çizelge 4.9.** Lizozim yüzey baskılanımı kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik sabitler.

Ba langıç Deri imi (mg/L)	Q <sub>deneyssel</sub> (µg/g)	Yalancı-Birinci Derece			Yalancı- kinci Derece		
		q <sub>eq</sub> (µg/g)	k <sub>1</sub> (1/dak.)	R <sup>2</sup>	q <sub>eq</sub> (µg/g)	k <sub>2</sub> (g/µg.dak.)	R <sup>2</sup>
100	7688.6	5513.2	0.05020	0.9260	10000.0	0.0000091	0.9881
200	9688.3	9266.2	0.02856	0.9274	11111.1	0.0000031	0.9046
300	10308.9	15342.6	0.04790	0.9239	33333.3	0.000000022	0.9313



## 5. YORUM

Cu(II) baskılanımı ve lizozim baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojelleri ile Cu(II) ve lizozim adsorpsiyonu çalışmaları için kesikli sistem tercih edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinden de görüldüğü gibi yüzey baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojeller gözenekli bir yapıya sahiptir. Ancak kriyojellerin sentezi sırasında kullanılan yüzey aktif bileşen (sodyum lauril sülfat) yüzünden yüzeyleri düzgün değil, pürüzlü meydana gelmiş olup, bu durumun kriyojellerin yüzey alanında bir miktar artışa olanak sağladığı düşünülmektedir. Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerin Cu(II) adsorpsiyonuna pH etkisi 3.0-8.0 pH aralığında incelenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH: 5.5 asetat tamponunda, 2540.0 µg/g olarak elde edilmiştir. Cu(II) bağlanma derinliği 100 mg/L olarak alınmıştır. Cu(II) iyonlarının daha bazik ortamlarda hidroksitleri şeklinde çökeceğini ya da daha asidik ortamlarda koordine kovalent etkileşimlerin olumsuz etkisinde etkileneceği düşünüldüğünde pH: 5.5 de eri Cu(II) iyonlarının koordine kovalent etkileşim ya da elektron paylaşımı ile yapıya bağlanabilmesi açısından uygun bir değerdir.

Lizozim yüzey baskılanımı poli(HEMA-GMA) kriyojellerin Cu(II) adsorpsiyonuna pH etkisi 3-11 pH aralığında incelenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH: 6.5 fosfat tamponunda 10270.0 µg/g olarak elde edilmiştir. Lizozim bağlanma derinliği 200 mg/L olarak alınmıştır. Lizozim proteininin en etkin olduğu pH aralığı pH: 6.0-6.5 aralıdır [156]. Bu bağlamda pH: 6.5 de eri fizyolojik pH değerine de (pH: 7) çok yakın olduğundan daha aşağı ve daha yukarı pH değerlerinde lizozimin denatürasyon riski bulunmaktadır. Bu sebeple lizozim adsorpsiyonu için pH: 6.5 de eri uygun bir değer olarak değerlendirilmektedir.

Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerin Cu(II) adsorpsiyon kapasitesi sıcaklık arttıkça azalmaktadır. Bunun durum adsorpsiyonda temel olan elektrostatik etkileşimlerin sıcaklık artışıyla beraber zayıflayıp bir miktar azalmasından kaynaklanmaktadır. Lizozim yüzey baskılanımı kriyojellere lizozim adsorpsiyon kapasitesi de sıcaklık arttıkça azalmaktadır. Cu(II) iyonları için yukarıda bahsedilen husus bu durum için geçerlidir yani sıcaklık artışı koordine kovalent etkileşim ya da elektron paylaşımı gibi etkileşimleri olumsuz yönde etkilemektedir.

Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanımı kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi iyonik iddet arttıkça azalmaktadır. Bu da beklenen bir durumdur. Çünkü tuz deri imi (iyonik iddet) arttıkça ortamda katyon/anyon dengesi de i mekte ve tuz moleküllerinden gelen katyon ( $\text{Na}^+$  ve  $\text{NH}_4^+$ ) ve anyonların ( $\text{Cl}^-$  ve  $\text{SO}_4^{2-}$ ) maskeleyici etkisi, analit ve ligand arasındaki etkile imleri olumsuz yönde etkilemekte ve adsorpsiyon kapasitesini dü ürmektedir.

Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerin Cu(II) desorpsiyonu için kesikli sistem tercih edilmi tir. Desorpsiyon çalı malarında 0.1 M  $\text{HNO}_3$  çözeltisi kullanılmı olup 5 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda %97 geri kazanım oranı elde edilmi tir. Lizozim yüzey baskılanımı kriyojellerden lizozim desorpsiyonu için de yine kesikli sistem tercih edilmi tir. Desorpsiyon çalı malarında 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmı olup 5 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda %96 geri kazanım oranı elde edilmi tir. Her iki kriyojelin de adsorpsiyon kapasitesinde 5 defa tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kaydade er bir azalma gözlenmemi tir. Bu sonuçlar her iki yüzey baskılanımı kriyojelin de tekrar kullanılabilirli inin yüksek oldu unu göstermektedir.

Cu(II) yüzey baskılanımı (MIP) kriyojellerin Cu(II) baskılanmamı (NIP) kriyojellere göre Cu (II) adsorpsiyon kapasitesi yüksek çıkmı tır. Ayrıca Co(II), Ni(II), Cd(II) ve Pb(II) a ır metallerine kar ı da seçicilik ve ba ıl seçicilik katsayıları oldukça yüksek bulunmu tur. Yine aynı ekilde lizozim yüzey baskılanımı (MIP) kriyojellerin lizozim baskılanmamı kriyojellere (NIP) göre lizozim adsorpsiyon kapasitesi yüksek çıkmı tır. Ayrıca sitokrom c ve sı ır serum albumini (BSA) proteinlerine kar ı da seçicilik ve ba ıl seçicilik katsayıları oldukça yüksek bulunmu tur. Bu sonuçlar yüzey baskılanımı kriyojellerin, yüzeylerinde baskılanan türlere özgü kavitele r içerdikleri ve bu sebeple daha yüksek spesifik yüzey alanlarına sahip oldukları dü ününcesini do rulamaktadır. Nitekim, yapılan yüzey alanı ölçümleri sonucunda yüzey baskılanımı kriyojellerin yüzey alanlarının baskılanmamı kriyojellere göre daha yüksek oldu u tespit edilmi tir (Çizelge 4.2).

Cu(II) yüzey baskılanımı kriyojellerin Cu(II) adsorpsiyonu sonucu elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi Langmuir adsorpsiyon modelinden elde edilen  $Q_{\text{max}}$ . de eri ile uyumludur. Langmuir adsorpsiyon izotermi için elde edilen regrasyon katsayısı (0.9425)

Freundlich izoterminden elde edilen regresyon katsayısından (0.8604) yüksektir. Langmuir adsorpsiyon modeli bu sisteme uygulanabilir. Aynı zamanda lizozim yüzey baskılanmı kriyojellerin lizozim adsorpsiyonu sonucu elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi da Langmuir adsorpsiyon modelinden elde edilen  $Q_{max}$ . de eri ile uyumludur. Langmuir adsorpsiyon izotermi için elde edilen regresyon katsayısı (0.9959) Freundlich izoterminden elde edilen regresyon katsayısından (0.8941) yüksektir. Bu sonuçlara bakıldı ında, Langmuir adsorpsiyon modeli bu sisteme uygulanabilir. Yani yüzey baskılanmı kriyojellere, baskılanan türlerin adsorpsiyonu tek tabaka halinde gerçekleş mi olup kom u bölgeler arasında yan al etkile imler bulunmamaktadır.

Cu(II) ve lizozim yüzey baskılanmı kriyojeller ile Cu(II) ve lizozim adsorpsiyon tepkimeleri, yalancı-ikinci derece kinetik modele uymaktadır. Bu durum, difüzyon kısıtlamaları olmadan adsorpsiyon i lemlerinin gerçekleş ti ini ve adsorpsiyon tepkimelerinin kimyasal kontrollü bir süreç oldu unu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Whitcombe, M.J., Chianella I., Larcombe L., Piletsky S.A., Noble J., Porter R., et al., The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection, *Chemical Society Reviews*, 40, 1547–1571, **2011**.
- [2] Issaq, H.J., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Serum and plasma proteomics, *Chemistry Reviews*, 107, 3601–3620, **2007**.
- [3] Yang, K.G., Zhang, L.H., Liang, Z., Zhang, Y.K., Protein-imprinted materials: rational design, application and challenges, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2173-2183, **2012**.
- [4] Zhou, W.H., Lu, C.H., Guo, X.C., Chen, F.R., Yang H.H., Wang, X.R., Mussel-inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition, *Journal of Materials Chemistry*, 20, 880–883, **2010**.
- [5] Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., Shea, K.J., Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 15242–15243, **2008**.
- [6] Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R., Mosbach, K., Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361, 645–647, **1993**.
- [7] Wulff, G., Sarhan, A., Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates, *Angewandte Chemie International Edition*, 11, 341–348, **1972**.
- [8] Lakshmi, D., Bossi, A., Whitcombe, M.J., Chianella I, Fowler SA, Subrahmanyam S., et al., Electrochemical sensor for catechol and dopamine based on a catalytic molecularly imprinted polymer-conducting polymer hybrid recognition element, *Analytical Chemistry*, 81, 3576–84, **2009**.
- [9] Panasyuk, T.L., Mirsky, V.M., Piletsky, S.A., Wolfbeis, O.S., Electropolymerized molecularly imprinted polymers as receptor layers in a capacitive chemical sensors, *Analytical Chemistry*, 71, 4609–4613, **1999**.
- [10] Riskin, M., Tel-Vered, R, Willner, I., The imprint of electropolymerized polyphenol films on electrodes by donor-acceptor interactions: selective electrochemical sensing of N, N -dimethyl-4,4 -bipyridinium (methyl viologen),

*Advanced Functional Materials*, 17, 3858–3863, **2007**.

- [11] Wulff, G., Sarhan, A., Zabrocki, K., Enzyme-analog built polymers and their use for resolution of racemates, *Tetrahedron Letters*, 44, 4329–4332, **1973**.
- [12] Wulff, G., Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular template — a way towards artificial antibodies, *Angewandte Chemie International Edition*, 34, 1812–1832, **1995**.
- [13] Wulff, G., Schauhoff, S., Enzyme-analog-built polymers. 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting: selectivity dependence on the arrangement of functional-groups versus spatial requirements, *Journal of Organic Chemistry*, 56, 395–400, **1991**.
- [14] Arshady, R., Mosbach, K., Synthesis of substrate selective polymers by host-guest polymerization, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182, 687–692, **1981**.
- [15] Sellergren, B., Lepisto, M., Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *Journal of the American Chemical Society*, 110, 5853–5860, **1988**.
- [16] Takagishi, T., Klotz, I.M., Macromolecule-small molecule interactions: introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages, *Biopolymers*, 11, 483–491, **1972**.
- [17] Takagishi, T., Hayashi, A., Kuroki, N., Cross-linked polyvinylpyrrolidones with increased affinity and specificity for methyl-orange and its homologs, *Journal of Polymer Science Part A*, 20, 1533–1547, **1982**.
- [18] Takagishi, T., Sugimoto, T., Hamano, H., Lim Y.J., Kuroki, N., Kozuka, H., Binding of methyl orange by crosslinked vinylpyrrolidone-divinylbenzene copolymers: template effect, *Journal of Polymer Science Part C*, 22, 283–289, **1984**.
- [19] Andersson, L.I., Mosbach, K., Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only noncovalent and nonionic interactions, *Journal of Chromatography A*, 516, 313–322, **1990**.
- [20] Andersson, L.I., Oshannessy, D.J., Mosbach, K., Molecular recognition in synthetic polymers: preparation of chiral stationary phases by molecular

- imprinting of aminoacid amides, *Journal of Chromatography A*, 513, 167–179, **1990**.
- [21] Lei, J.D., Tan, T.W., Enantioselective separation of naproxen and investigation of affinity chromatography model using molecular imprinting, *Biochemical Engineering Journal*, 11, 175–179, **2002**.
- [22] Sellergren, B., Molecular imprinting by noncovalent interactions: tailor-made chiral stationary phases of high selectivity and sample load capacity, *Chirality*, 1, 63–68, **1989**.
- [23] Sellergren, B., Shea, K.J., Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers, *Journal of Chromatography A*, 635, 31–49, **1993**.
- [24] Wulff, G., Vesper, W., Grobeeinsler, R., Sarhan, A., Enzyme-analogue built polymers. 4. Synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for resolution of racemates, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 178, 2799–2816, **1977**.
- [25] Wulff, G., Minarik, M., Template imprinted polymers for HPLC separation of racemates, *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2987–3000, **1990**.
- [26] Kempe, M., Fischer, L., Mosbach, K., Chiral separation using molecularly imprinted heteroaromatic polymers, *Journal of Molecular Recognition*, 6, 25–29, **1993**.
- [27] Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., A review of solid phase extraction: basic principles and new developments, *Chromatographia*, 40, 474–483, **1995**.
- [28] Yongqin-Q., L., Zhixing, L., Wei, F., Tianwei, T., Evaluation of the polymerization and recognition mechanism for phenol imprinting SPE, *Chromatographia*, 66, 339–347, **2007**.
- [29] Yongqin-Q., L., Zhixing, L., Wei, F., Xin, Z., Tianwei, T., Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers, *Biochemical Engineering Journal*, 36, 221–229, **2007**.
- [30] Yongqin-Q., L., Zhixing, L., Tianwei, T., Wei, F., Peiyong, Q., Cong L., Application of molecular dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer, *Sensors and Actuators B*, 133, 15–23, **2008**.

- [31] Matsui, J., Okada, M., Tsuruoka, M., Takeuchi, T., Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor, *Analytical Communications*, 34, 85–87, **1997**.
- [32] Muldoon, M.T., Stanker, L.H., Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts, *Analytical Chemistry*, 69, 803–808, **1997**.
- [33] Sellergren, B., Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer, *Analytical Chemistry*, 66, 1578–1582, **1994**.
- [34] Sellergren, B., Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18, 164–174, **1999**.
- [35] Hawkins, D.M., Stevenson, D., Reddy, S.M., Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs), *Analytica Chimica Acta*, 542, 61–65, **2005**.
- [36] Kempe, M., Mosbach, K., Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 691, 317–323, **1995**.
- [37] Ou, S.H., Wu, M.C., Chou, T.C., Liu C.C., Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme, *Analytica Chimica Acta*, 504, 163-166, **2004**.
- [38] Tao, Z.Y., Tehan, E.C., Bukowski, R.M., Tang, Y., Shughart, E.L., Holthoff, W.G., Cartwright, A.N., Titus, A.H., Bright, F.V., Templated xerogels as platforms for biomolecule-less biomolecule sensors, *Analytica Chimica Acta*, 564, 59–65, **2006**.
- [39] Bossi, A., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Righetti, P.G., Turner, A.P.F., Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition, *Analytical Chemistry*, 73, 5281–5286, **2001**.
- [40] Ciardelli, G., Cioni, B., Cristallini, C., Barbani, N., Silvestri, D., Giusti, P., Acrylic polymeric nanospheres for the release and recognition of molecules of clinical interest, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1083–1090, **2004**.
- [41] Pang, X., Cheng, G., Li, R., Lu, S., Zhang, Y., Bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide gel beads prepared via inverse-phase seed suspension polymerization, *Analytica Chimica Acta*, 550, 13–17, **2005**.

- [42] Pang, X., Cheng, G., Lu, S., Tang, E., Synthesis of polyacrylamide gel beads with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of bovine serum albumin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 225–230, **2006**.
- [43] Pang, X., Cheng, G., Zhang, Y., Lu, S., Soft-wet polyacrylamide gel beads with the imprinting of bovine serum albumin, *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1182-1188, **2006**.
- [44] Nishino, H., Huang, C.S., Shea K.J., Selective protein capture by epitope imprinting, *Angewandte Chemie Internatiol Edition*, 45, 2392–2396, **2006**.
- [45] Rachkov, A., Minoura, N., Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach, *Journal of Chromatography A*, 889, 111–118, **2000**.
- [46] Rachkov, A., Minoura, N., Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 255–266, **2001**.
- [47] Tai, D.F., Jhang, M.H., Chen, G.Y., Wang, S.C., Lu, K.H., Lee, Y.D., Liu, H.T., Epitope-cavities generated by molecularly imprinted films measure the coincident response to anthrax protective antigen and its segments, *Analytical Chemistry*, 82, 2290–2293, **2010**.
- [48] Tai, D.F., Lin, C.Y., Wu, T.Z., Chen, L.K., Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film, *Analytical Chemistry*, 77, 5140–5143, **2005**.
- [49] Yongqin, L., Tianwei, T., Frantisek, S., Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules, *Biotechnology Advances*, 31, 1172-1186, **2013**.
- [50] Deutscher, M.P., *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 182, **1990**.
- [51] Scouten, W.H., *Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices*, John Wiley and Sons, New York, **1981**.
- [52] Matejtschuk, P., *Affinity Separations, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1997**.



- [53] Scopes, R.K., 1982, *Protein Purification; Principles and Practise*, Springer Verlag, New York, **1982**.
- [54] Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Smith, P.K., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, New York, **1992**.
- [55] Turkova, J., *Bioaffinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [56] Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., *Methods in Enzymology*, (Ed: Jacoby, W.B.), Academic Press, New York, USA, 104, 3-55, **1984**.
- [57] Jonson, J.C., Ryden, L., *Protein Purification*, John Wiley & Sons, New York, USA, 375-442, **1998**.
- [58] Kågedal, L., *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications*, (Eds: Janson, J.C., Rydén, L.), Wiley-VCH, New York, **1998**.
- [59] Lehn, J.M., *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [60] Conn, M.M., Rebek, J.Jr., Self-Assembling Capsules, *Chemical Reviews*, 97, 1647-1688, **1997**.
- [61] Fujita, M., Umemoto, K., Yoshizawa, M., Fujita, N., Kusukawa, T., Biradha, K., Molecular paneling via coordination, *Chemical Communications*, 509, **2001**.
- [62] Li, X.X., Liu, X., Bai, L.H., Duan, H.Q., Huang, Y.P., Liu, Z.S., Preparation of imprinted monolithic column under molecular crowding conditions, *Chinese Chemical Letters*, 22, 989-992, **2011**.
- [63] Wei, Q.Q., Wei, T.X., A novel method to prepare SPR sensor chips based on photografting molecularly imprinted polymer, *Chinese Chemical Letters*, 22, 721-724, **2011**.
- [64] Chen, P.Y., Nien, P.C., Wu, C.T, Wu, T.H., Li, C.W., Ho, K.C., Fabrication of a molecularly imprinted polymer sensor by self-assembling monolayer/mediator system, *Analytica Chimica Acta*, 643, 38-44, **2009**.

- [65] Castro, B., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N., Vazquez-Duhalt, R., Bárzana, E., Molecular imprinting for the selective adsorption of organosulfur compounds present in fuels, *Analytica Chimica Acta*, 435, 83–90, **2001**.
- [66] Gao, B., An, F., Zhu, Y., Novel surface ionic imprinting materials prepared via couple grafting of polymer and ionic imprinting on surfaces of silica gel particles, *Polymer*, 48, 2288–2297, **2007**.
- [67] Bossi, A., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Righetti, P.G., Turner, A.P.F., Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition, *Analytical Chemistry*, 73, 5281–5286, **2001**.
- [68] Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K., A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes, *Biomaterials*, 26, 5564–5571, **2005**.
- [69] Rachkov, A., Minoura, N., Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 255–266, **2001**.
- [70] Nishino, H., Huang, C.S., Shea, K.J., Selective protein capture by epitope imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 2392–2396, **2006**.
- [71] Lee, K., Itharaju, R.R., Puleo, D.A., Protein-imprinted polysiloxane scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 3, 515–522, **2007**.
- [72] Hawkin, D.M., Stevenson, D., Reddy, S.M., Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs), *Analytica Chimica Acta*, 542, 61–65, **2005**.
- [73] Hua, Z.D., Chen, Z.Y., Li, Y.Z., Zhao, M.P., Thermosensitive and Salt-Sensitive Molecularly Imprinted Hydrogel for Bovine Serum Albumin, *Langmuir*, 24, 5773–5780, **2008**.
- [74] Bereli, N., Andac, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A*, 1190, 18–26, **2008**.
- [75] Sener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160, 791–799, **2011**.

- [76] Uzun, L., Uzek, R., enel, S., Say, R., Denizli, A., Chiral recognition of proteins having L-histidine residues on the surface with lanthanide ion complex incorporated-molecularly imprinted fluorescent nanoparticles, *Materials Science and Engineering C*, 33, 3432-3439, **2013**.
- [77] Sener, G., Ozgur, E., Yilmaz, E., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 815-821, **2010**.
- [78] Turner, N.W., Jeans, C.W., Brain, K.R., Allender, C.J., Hlady, V., Britt, D.W., From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins, *Biotechnology Progress*, 22, 1474–1489, **2006**.
- [79] Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1131–1137, **2007**.
- [80] Hansen, D.E., Recent developments in the molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 28, 4178–4191, **2007**.
- [81] Janiak, D.S., Kofinas, P., Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 399–404, **2007**.
- [82] Ye, L., Mosbach, K., Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors, *Chemistry of Materials*, 20, 859–868, **2008**.
- [83] Wulff, G., Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates— a way towards artificial antibodies, *Angewandthe Chemie International Edition*, 34, 1812–1832, **1995**.
- [84] Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, R., Sarhan, A., Enzyme-analogue built polymers, 5) On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 178, 2817-2825, **1977**.
- [85] Arshady, R., Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182, 687-692, **1981**.
- [86] Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R., Mosbach, K., Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361, 645-647, **1993**.

- [87] Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., Vulfson, E. N., A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 7105-7111, **1995**.
- [88] Odabaşı, M., *Proteinlerin Ayrılması için Moleküler Baskılanmış Polimerler*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2005**.
- [89] Dhal, P.K., Vidyasankar S., Arnold, F.H., Surface grafting of functional polymers to macroporous poly(tn'methylolpropane trimethoacrylate), *Chemistry of Materials*, 7, 154-162, **1995**.
- [90] Plunkett, S.D., Doktora Tezi, California Institute of Technology, California, **1994**.
- [91] Glad, M., Norrlov, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K., Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica, *Journal of Chromatography A*, 347:11–23, **1985**.
- [92] Kempe, M., Glad, M., Mosbach, K., An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A, *Journal of Molecular Recognition*, 8, 35–39, **1995**.
- [93] Norrlov, O., Mansson, M.O., Mosbach, K., Improved chromatography prearranged distances between boronate groups by the molecular imprinting approach, *Journal of Chromatography A*, 396, 374–377, **1987**.
- [94] Shi, H.Q., Tsai, W.B., Garrison, M.D., Ferrari, S., Ratner, B.D., Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition, *Nature*, 398, 593–597, **1999**.
- [95] Gao, D.M., Zhang, Z.P., Wu, M.H., Xie, C.G., Guan, G.J., Wang, D.P., A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 7859–7866, **2007**.
- [96] Fu, G.Q., He, H.Y., Chai, Z.H., Chen, H.C., Kong, J., Wang, Y., Jiang, Y.Z., Enhanced lysozyme imprinting over nanoparticles functionalized with carboxyl groups for noncovalent template sorption, *Analytical Chemistry*, 83, 1431–1436, **2011**.

- [97] Cheng, W., Liu, Z., Wang, Y., Preparation and application of surface molecularly imprinted silica gel for selective extraction of melamine from milk samples, *Talanta*, 116, 396–402, **2013**.
- [98] Lin, Z., Xia, Z., Zheng, J., Zheng, D., Zhang, L., Yang, H., Chen, G., Synthesis of uniformly sized molecularly imprinted polymer-coated silica nanoparticles for selective recognition and enrichment of lysozyme, *Journal of Materials Chemistry*, 22, 17914-17922, **2012**.
- [99] Gao, R.X., Kong, X., Wang, X., He, X.W., Chen, L.X., Zhang, Y.K., Preparation and characterization of uniformly sized molecularly imprinted polymers functionalized with core–shell magnetic nanoparticles for the recognition and enrichment of protein, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 17863–17871, **2011**.
- [100] Li, L., He, X.W., Chen, L.X., Zhang, Y.K., Preparation of Core-shell Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Recognition of Bovine Hemoglobin, *Chemistry – An Asian Journal*, 4, 286–293, **2009**.
- [101] Kan, X.W., Zhao, Q., Shao, D.L., Geng, Z.R., Wang, Z.L., Zhu, J.J., Preparation and Recognition Properties of Bovine Hemoglobin Magnetic Molecularly Imprinted Polymers, *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 3999–4004, **2010**.
- [102] Gai, Q.Q., Qu, F., Liu, Z.J., Dai, R.J., Zhang, Y.K., Superparamagnetic lysozyme surface-imprinted polymer prepared by atom transfer radical polymerization and its application for protein separation, *Journal of Chromatography A*, 1217, 5035–5042, **2010**.
- [103] Zhou, W.H., Lu, C.H., Guo, X.C., Chen, F.R., Yang, H.H., Wang, X.R., Mussel-inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition, *Journal of Materials Chemistry*, 20, 880–883, **2010**.
- [104] Zhang, M., Zhang, X.H., He, X.W., Chen, L.X., Zhang, Y.K., A self-assembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein, *Nanoscale*, 4, 3141–3147, **2012**.
- [105] Jing, T., Du, H.R., Dai, Q., Xia, H., Niu, J.W., Hao, Q.L., Mei, S.R., Zhou, Y.K., Magnetic molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 301–306, **2010**.

- [106] Zhang, M.S., Huang, J.R., Yu, P., Chen, X., Preparation and characteristics of protein molecularly imprinted membranes on the surface of multiwalled carbon nanotubes *Talanta*, 81, 162–166, **2010**.
- [107] Li, Y., Yang, H.H., You, Q.H., Zhuang, Z.X., Wang, X.R., Protein Recognition via Surface Molecularly Imprinted Polymer Nanowires, *Analytical Chemistry*, 78, 317–320, **2006**.
- [108] Chen, T., Shao, M.W., Xu, H.Y., Zhou, S.J., Liu, S.S., Lee, S.T., Molecularly imprinted polymer-coated silicon nanowires for protein specific recognition and fast separation, *Journal of Materials Chemistry*, 22, 3990–3996, **2012**.
- [109] Ouyang, R.Z., Lei, J.P., Ju, H.X., Surface molecularly imprinted nanowire for protein specific recognition., *Chemical Communications*, 5761–5763, **2008**.
- [110] Tan, C.J., Wangrangsimakul, S., Bai, R.B., Tong, Y.W., Defining the interactions between proteins and surfactants for nanoparticle surface imprinting through miniemulsion polymerization. *Chemistry of Materials*, 20, 118–127, **2008**.
- [111] Zhang, W., He, X.W., Chen, Y., Li, W.Y., Zhang, Y.K., Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2553–2558, **2011**.
- [112] Camli, S.T., Buyukserin, F., Yavuz, M.S., Budak, G.G., Fine-tuning of functional poly(methylmethacrylate) nanoparticle size at the sub-100 nm scale using surfactant-free emulsion polymerization, *Colloids Surfaces A*, 366, 141–146, **2010**.
- [113] Wu, A.H., Jia, J., Luan, S.J., Amphiphilic PMMA/PEI core–shell nanoparticles as polymeric adsorbents to remove heavy metal pollutants, *Colloids Surfaces A*, 384, 180–185, **2011**.
- [114] Júlia Bognár, J., Júlia Sz cs, J., Dorkó, Z., Viola Horváth, V., Gyurcsányi R.E., Nanosphere Lithography as a Versatile Method to Generate Surface-Imprinted Polymer Films for Selective Protein Recognition, *Advanced Functional Materials*, 23, 4703-4709, **2013**.
- [115] Asliyuçe, S., Bereli, N., Uzun, L., Onur, M.A., Say, R., Denizli, A., Ion-imprinted supermacroporous cryogel, for in vitro removal of iron out of human plasma with beta thalassemia, *Separation and Purification Technology*, 73, 243, **2010**.

- [116] Gupta, A., Sarkar, J., Kumar, A., High throughput analysis and capture of benzo[a]pyrene using supermacroporous poly(4-vinyl pyridine-co-divinyl benzene) cryogel matrix, *Journal of Chromatography A*, 1278, 16-21, **2013**.
- [117] Hajizadeh, S., Xu, C., Kirsebom, H., Ye, L., Mattiasson, B., Cryogelation of molecularly imprinted nanoparticles: A macroporous structure as affinity chromatography column for removal of  $\beta$ -blockers from complex samples, *Journal of Chromatography A*, 1274, 6-12, **2013**.
- [118] Berillo, D., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., Kirsebom, H., Formation of macroporous self-assembled hydrogels through cryogelation of Fmoc-Phe-Phe, *Journal of Colloid and Interface Science*, 368, 226-230, **2012**.
- [119] Kirsebom, H., Topgaard, D., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes, *Langmuir*, 26, 16129-16133, **2010**.
- [120] Yun, J.X., Jespersen, G.R., Kirsebom, H., Gustavsson, P.E., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., An improved capillary model for describing the microstructure characteristics, fluid hydrodynamics and breakthrough performance of proteins in cryogel beds, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5487-5497, **2011**.
- [121] Uzek, R., Uzun, L., Senel, S., Denizli, A., Nanospines incorporation into the structure of the hydrophobic cryogels via novel cryogelation method: An alternative sorbent for plasmid DNA purification, *Colloids Surfaces B*, 102, 243-250, **2013**.
- [122] Teramoto, M., Nishibue, H., Okuhara, K., Ogawa, H., Kozono, H., Matsuyama, H., Effect of addition of polyethyleneimine on thermal stability and activity of glucose dehydrogenase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 203-208, **1992**.
- [123] Suh, Y.J., Hager, L.P., Chemical and transient state kinetic studies on the formation and decomposition of horseradish peroxidase compounds XI and XII, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22102-22109, **1991**.
- [124] Burgess, R.R., Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins, *Methods in Enzymology*, 208, 3-10, **1991**.
- [125] Nayak, S.S., Ramani, A., Kamath, S.S., Kundaje, G.N., Aroor, A.R., Serum apoproteins A and B and the lecithin: cholesterol acyl transferase activities in

liver cirrhosis and hepatic coma patients, *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 40, 299-304, **1988**.

- [126] Senthuran, A., Senthuran, V., Mattiasson, B., Kaul, R., Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*, *Biotechnology and Bioengineering*, 55, 841-853, **1997**.
- [127] Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Koski, P., Polyethylenimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria, *Microbiology*, 143, 3193-3199, **1997**.
- [128] Stokinger, H.E., *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, (Eds: Clayton, G.D., Clayton F.E.), John Wiley, New York, 1563, **1981**.
- [129] Friberg, L., Elinder, C.G., *Encyclopedia of Occupational Health and Safety*, 3rd ed., Geneva, Switzerland, International Labor Organization (ILO), **1985**.
- [130] Ursel, A., *Natural care – Vitamins & Minerals Handbook*, Dorling Kindersley, London, **2001**.
- [131] Dutch Nutrition Centre, [www.voedingscentrum.nl/](http://www.voedingscentrum.nl/) (Temmuz, 2014).
- [132] Agency for Toxic Sub. and Disease Registry, [www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/) (Temmuz, 2014).
- [133] Solomon, E.I., Randall, D.W., Glaser, T., Electronic structures of active sites in electron transfer metalloproteins: contributions to reactivity, *Coordination Chemistry Reviews*, 200-202, 595-632, **2000**.
- [134] Randall, D.W., Gamelin, D.R., LaCroix, L.B., Solomon, E.I., Electronic structure contributions to electron transfer in blue Cu and Cu<sub>A</sub>, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5, 16-29, **2000**.
- [135] Adman, E.T., *Advances in Protein Chemistry*, (Eds: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., and Eisenberg, D.S.), Academic Press, 42, San Diego, 145-197, **1991**.
- [136] Gray, H.B., Solomon, E.I., Electronic Structures of Blue Copper Centers in Proteins. *Copper Proteins*, (Ed: Spiro, T.G.), Wiley, New York, 1-39, **1981**.



- [137] Solomon, E.I., Lowery, M.D., Guckert, J.A., LaCroix, L.B., In Electron Transfer reactions: Advances Chemistry Series, *American Chemical Society*, 253, 317-330, **1997**.
- [138] Solomon, E.I., Baldwin, M.J., Lowery, M.D., Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity, *Chemical Reviews*, 92, 521-542, **1992**.
- [139] Erol, K., Farklı Koyun Irklarından Safla tırılan Paraoksonaz Enziminin A ır Metallerle nhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, **2011**.
- [140] Basar, N., Uzun, L., Guner, A., Denizli, A., Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 234-242, **2007**.
- [141] Mine, Y., Ma, F., & Lauriau, S., Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1088-1094, **2004**.
- [142] Yeh, C.H.K., Dodds, M.W.J., Zuo, P., Johnson, D. A., A population-based study of salivary lysozyme concentration and candidal counts, *Archives of Oral Biology*, 42, 25-31, **1997**.
- [143] Yılmaz, M., Bayramo lu, G., Arıca, M. Y., Separation and purification of lysozyme by Reactive Green 19 immobilised membrane affinity chromatography, *Food Chemistry*, 89, 11-18, **2005**.
- [144] Hartono, Y. D., Lee, A. N., Lee-Huang, S., Zhang, D., Computational study of bindings of HL9, a nonapeptide fragment of human lysozyme, to HIV-1 fusion protein gp41, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 1607-1611, **2011**.
- [145] Ye, J., Wang, C., Chen, X., Guo, S., & Sun, M., Marine lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumor growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1261-1267, **2008**.
- [146] Ghosh, R., Silva, S.S., Cui, Z.F., Lysozyme separation by hollow fibre ultrafiltration, *Biochemical Engineering Journal*, 6, 19-24, **2000**.

- [147] Juneja, V. K., Dwivedi, H. P., Yan, X., Novel natural food antimicrobials, *Food Science and Technology*, 3, 381–403, **2012**.
- [148] Sun, J., Su, Y., Rao, S., Yang, Y., Separation of lysozyme using superparamagnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles, *Journal of Chromatography B*, 879, 2194–2200, **2011**.
- [149] Wan, Y. H., Lu, J. R., Cui, Z. F., Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration, *Separation and Purification Technology*, 48, 133–142, **2006**.
- [150] Chang, H. M., Yang, C. C., Chang, Y. C., Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 161–164, **2000**.
- [151] Bai, L. G., Liu, H. Y., Liu, Y. K., Zhang, X. H., Yang, G. L., Ma, Z. Y., Preparation of a novel hybrid organic–inorganic monolith for the separation of lysozyme by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 100–106, **2011**.
- [152] Noh, K. H., Imm, J. Y., One-step separation of lysozyme by reverse micelles formed by the cationic surfactant, cetyldimethylammonium bromide, *Food Chemistry*, 93, 95–101, **2005**.
- [153] Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobley, T. J., Thomas, O. R. T., Protein purification using magnetic adsorbent particles, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 505–516, **2006**.
- [154] Safarik, I., Safarikova, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *BioMagnetic Research and Technology*, 2, 1–17, **2004**.
- [155] Quincy, A.S., *Synthesis and Characterization of Functional Polymers With Controlled Architecture and Their Application as Anticorrosion Primers*, Doktora Tezi, University of New Hampshire, Materials Science, **2009**.
- [156] Köse, K., *Lizozim Safla tırılmasına Yönelik Hidrofobik Manyetik Nanopartiküller*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.

- [157] Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochemical Engineering Journal*, 43, 272-279, **2009**.
- [158] Saylan, Y., Sarı, M.M., Özkara, S., Uzun, L., Denizli, A., Hydrophobic microbeads as an alternative pseudo-affinity adsorbent for recombinant human interferon- $\gamma$  via hydrophobic interactions, *Materials Science and Engineering C*, 32, 937-944, **2012**.
- [159] Langmuir, I., The Adsorption of Gas on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum, *Journal of the American Chemical Society*, 40, 1361–1370, **1918**.
- [160] Freundlich, H.M.F., Über die adsorption in losungen, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57, 385–471, **1906**.

# ÖZGEÇM

## **Kimlik Bilgileri**

Adı Soyadı : Kadir EROL

Do um Yeri : BALIKES R/MERKEZ

Medeni Hali : Bekar

E-posta : kadirerol86@gmail.com

Adresi : Hitit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, ÇORUM

## **E itim**

Lise : Cumhuriyet Anadolu Lisesi (2001-2005)

Lisans : Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2005-2009)

Yüksek Lisans : Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Kimya Bölümü (2009-2011)

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü (2011-2014)

**Yabancı Dil ve Düzeyi:** ÜDS- ngilizce (83.75), KPDS- ngilizce (80.00)

**Deneyimi:** Hitit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Ara tırma Görevlisi (2010- )

**Deneyim Alanları:** Enzim, protein, hidrofobik etkile im, mikropartikül, nanopartikül, kriyojel.

**Tezden Üretilmi Projeler ve Bütçesi:** -

**Tezdan Üretilmi Yayınlar:** -

**Tezden Üretilmi Tebli ve/veya Poster Sunumu ile Katıldı ı Toplantılar:** -