

**TİROZİN SAFLAŞTIRMASI
İÇİN KOMPOZİT TAŞIYICILARIN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF COMPOSITE CARRIERS FOR
TYROSINE PURIFICATION**

GİZEM ÖZTÜRK

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

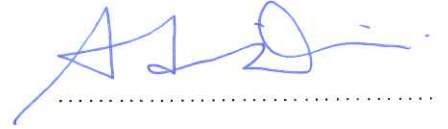
2019

GİZEM ÖZTÜRK' ün hazırladığı "Tirozin Saflaştırması için Kompozit Taşıyıcıların Hazırlanması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI' nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Başkan



Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Danışman



Prof. Dr. Sinan AKGÖL
Üye



Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN
Üye



Dr. Öğretim Üyesi Fatma YILMAZ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak .../.../... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmada,

- tez içerisindeki tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının 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 üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20/06/2019

GİZEM ÖZTÜRK

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20/06/2019

GİZEM ÖZTÜRK

ÖZET

TİROZİN SAFLAŞTIRMASI İÇİN KOMPOZİT TAŞIYICILARIN HAZIRLANMASI

Gizem ÖZTÜRK

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Haziran 2019, 88 sayfa

Tirozin insan vücudu için esansiyel olmayan ve L-fenilalanin kullanılarak vücut tarafından üretilebilen bir amino asittir. Tirozin, önemli beyin kimyasallarının üretimine, ruh halinin düzenlenmesine, stres seviyesinin düşmesine, melanin pigmentinin üretimine, tiroid fonksiyonlarının düzenlenmesine ve bunun gibi vücut için kritik metabolik faaliyetlere katkı sağlar. Bu sebeple yüksek saflıkta elde edilmesi ticari öneme sahiptir.

Moleküler baskılama, istenilen molekülü yüksek saflıkla ve özgünlükle elde etmek için maliyeti düşük, hazırlaması kolay ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntemdir. Bu teknoloji günümüzde yapılan saflaştırma çalışmalarında sıklıkla ve başarı ile kullanılmaktadır.

Kriyojeller donma sıcaklığının altında radikalik polimerizasyon ile hazırlanan süper makrogözenekli ve yüksek esnekliğe, dayanıklılığa sahip polimerik jellerdir. Bu sebeple özellikle biyomoleküllerin saflaştırma çalışmalarında kullanımı oldukça fazladır.

Bu çalışmada, tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreler sentezlenmiş ve SEM, FTIR, ESR ve EDX yöntemleriyle karakterize edildikten sonra poli(2-hidroksietil metakrilat) temelli kriyojele gömölerek tirozin saflaştırması için yüksek seçiciliğe, kimyasal ve mekanik dayanıklılığa sahip bir kompozit taşıyıcı hazırlanmıştır. Hazırlanan kompozit taşıyıcının ilk olarak SEM, FTIR, ESR ve EDX yöntemleri ile karakterizasyonu yapılmıştır. Ardından tirozin adsorpsiyonu için optimum koşullar rotatör yardımıyla kesikli sistemde belirlenmiştir. Maksimum tirozin adsorpsiyon kapasitesi sulu çözeltide oda sıcaklığında hazırlanan pH 8,0 tampon çözeltisinde 62,27 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur. Hazırlanan kompozit taşıyıcıya adsorbe edilen tirozin her analiz sonrası 0,1 M NaCl kullanılarak desorbe edilmiş ve kompozit taşıyıcının tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Ayrıca kompozit taşıyıcının yarışmacı ajanlar kullanılarak seçiciliği incelenmiştir. Son olarak yapılan matematiksel hesaplamalarla ile tirozin ile kompozit taşıyıcı arasındaki etkileşimin uyduğu adsorpsiyon izoterm modeli belirlenmiştir. Geliştirilen kompozit taşıyıcının tirozin saflaştırmasında başarı ile kullanılabileceği görölmüştür.

Anahtar kelimeler: Manyetik silika mikroküre, moleküler baskılama, kompozit kriyojel, tirozin.

ABSTRACT

PREPARATION OF COMPOSITE CARRIERS FOR TYROSINE PURIFICATION

Gizem ÖZTÜRK

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

June 2019, 88 pages

Tyrosine is an amino acid that is non-essential for the human body and can be produced by the body using L-phenylalanine. Tyrosine contributes to the production of important brain chemicals, regulation of mood, reduction of stress level, production of melanin pigment, regulation of thyroid functions, and other critical metabolic activities. Therefore, high purity synthesis of it has a commercial importance.

Molecular printing is a cost effective, easy to prepare and highly reproducible method for obtaining the desired molecule with high purity and specificity. This technology is used frequently and successfully in the purification studies carried out today.

Cryogels are super macroporous polymeric gels which are prepared by radicalic polymerization below freezing temperature and have high flexibility and durability. Therefore, the use of biomolecules in purification studies is quite high.

In this study, tyrosine imprinted magnetic silica microspheres were synthesized and these microspheres were embedded in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based cryogels to prepare a composite carrier that has high selectivity and high chemical/mechanical resistance after characterization by SEM, FTIR, ESR and EDX. The prepared composite carrier was first characterized by SEM, FTIR, ESR and EDX methods. Then, optimum conditions for tyrosine adsorption were determined in the batch system by a rotator. Maximum tyrosine adsorption capacity was found as 62.27 mg/g in pH 8.0 buffer solution prepared at room temperature in aqueous solution. The tyrosine adsorbed by the prepared composite carrier was desorbed using 0.1 M NaCl after each analysis and the usability of the composite carrier was examined. In addition, the selectivity of the composite carrier against the competitive agents was investigated. Finally, with the mathematical calculations, the adsorption isotherm model which is compatible for the interaction between tyrosine and composite carrier was determined. It has been found that the developed composite carrier can be used successfully in tyrosine purification.

Keywords: Magnetic silica microsphere, molecular imprinting, composite cryogel, tyrosine.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirme fırsatını bana veren, tecrübeleri ile akademik hayatıma yön veren, desteğini asla esirgemeyen, anlayışını ve bilgeliğini örnek aldığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli' ye,

Çalışmalarımda desteğini hep yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

Güler yüzü, anlayışı ve desteğiyle çalışmalarım boyunca hep yanımda olan, sabrı ve neşesiyle benden emeğini asla esirgemeyen sevgili hocam Dr. Yeşeren Saylan'a,

Çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen hocalarım Dr. Nilay Bereli' ye, Dr. Sevgi Aslıyüce'ye ve BIOREG'deki tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca emeği ve fedakarlığı ile bugün olduğum insana dönüşmemi sağlayan, tüm başarılarımda en çok payı olan canım aileme ve özellikle her soruma her saatte bitmeyen bir sabırla cevap verebilen canım ağabeyim Dr. Mehmet Burak Kaynar'a,

Her anımda, yaşadığım her zorlukta sırtımı dayayabildiğim, desteğiyle bana güç veren en büyük destekçim sevgili eşim Can Öztürk'e,

Sonsuz Teşekkürler....

Gizem ÖZTÜRK

Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tirozin	3
2.2. Tirozin Safılaştırmanın Önemi	4
2.3. Tirozin Safılaştırma Yöntemleri	6
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	6
2.4.1. Moleküler Baskılamada Çapraz Bağlayıcıların Rolü	7
2.4.2. Moleküler Baskılamada Kullanılan Fonksiyonel Monomerler	8
2.4.3. Moleküler Baskılamada Kullanılan Çözücüler	9
2.4.4. Moleküler Baskılamada Kullanılan Başlatıcılar	9
2.4.5. Kovalent Baskılama	9
2.4.6. Kovalent Olmayan Baskılama	10
2.4.7. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları	10
2.5. Silika Mikroküreler ve Kullanım Alanları	11
2.6. Manyetik Silika Mikroküreler ve Uygulama Alanları	11
2.7. Kriyojeller.....	12
2.7.1. Kriyotropik Jelleşmenin Temel Karakteristik Özellikleri	12

2.7.2.	Kriyojellerin Kullanım Alanları	13
2.8.	Kompozit Sistemlerin Tasarımı.....	14
2.9.	Afinite Kromatografisi	14
2.10.	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (İMAK)	16
3.	DENEYSEL YÖNTEM VE BULGULAR	17
3.1.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	17
3.2.	Fonksiyonel Monomer (MAH) Sentezi.....	17
3.3.	Ön-Kompleksin Hazırlanması.....	18
3.4.	Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi	19
3.5.	Manyetik Silika Mikrokürelerin Yüzey Modifikasyonu	19
3.6.	Tirozin Baskılanmış Manyetik Silika Mikrokürelerin Hazırlanması.....	19
3.7.	Manyetik Silika Mikrokürelerin Karakterizasyonu	21
3.7.1.	Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR)	21
3.7.2.	Taramalı Elektron Mikroskobu.(SEM)	21
3.7.3.	Enerji Dağılımlı X- Işını Spektroskopisi (EDX)	21
3.7.4.	Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR)	21
3.8.	Kompozit Taşıyıcının Hazırlanması.....	22
3.9.	Kompozit Taşıyıcının Karakterizasyonu	23
3.9.1.	Şişme Testi	24
3.9.2.	Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR)	24
3.9.3.	Enerji Dağılımlın X-Ray Spektroskopisi.(EDX).....	24
3.9.4.	Taramalı Elektron Mikroskobu.(SEM)	24
3.9.5.	Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR)	25
3.10.	Adsorpsiyon Çalışmaları	25
3.10.1.	pH'ın Etkisi.....	26
3.10.2.	Başlangıç Derişiminin Etkisi	26
3.10.3.	Sıcaklığın Etkisi	27

3.10.4. İyonik Şiddetin Etkisi.....	27
3.10.5. Döndürme Hızının Etkisi.....	27
3.11. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	28
3.12. Seçicilik Çalışmaları.....	28
3.13. Gerçek Örnek Çalışmaları.....	29
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Ön-Kompleksin Karakterizasyonu.....	30
4.2. Manyetik Silika Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	31
4.2.1. Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR).....	31
4.2.2. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi.(EDX).....	32
4.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu.(SEM).....	33
4.2.4. Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (ESR).....	35
4.3. Kompozit Taşıyıcının Karakterizasyonu.....	36
4.3.1. Şişme Testi.....	36
4.3.2. Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR).....	37
4.3.3. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi.(EDX).....	38
4.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu.(SEM).....	39
4.3.5. Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (ESR).....	40
4.4. Adsorpsiyon Çalışmaları.....	41
4.4.1. pH'ın Etkisi.....	42
4.4.2. Sıcaklığın Etkisi.....	42
4.4.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi.....	43
4.4.4. İyonik Şiddetin Etkisi.....	44
4.4.5. Döndürme Hızı Etkisi.....	45
4.5. Seçicilik Çalışmaları.....	46
4.6. Tekrar Kullanılabilirlik.....	47
4.7. Gerçek Örnek Çalışmaları.....	48

4.8. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri	49
4.9. Tirozin Saflaştırılması ile İlgili Literatür Özeti.....	52
4.10. Kompozit Kriyojellerle İlgili Literatür Özeti	55
5. SONUÇLAR.....	57
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	61
EKLER.....	69
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Fenilalaninin metabolik patikası [9].	3
Şekil 2.2	Tirozin amino asidinin yapısı ve özellikleri.	4
Şekil 2.3	Moleküler baskılanmanın temel basamakları.	7
Şekil 2.4	Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcı ve başlatıcıların yapıları [29].	8
Şekil 2.5	Kriyojel oluşum şeması [60].	13
Şekil 2.6	Afinite kromatografisinin temel ilkesi [73].	15
Şekil 3.1	Fonksiyonel monomerin sentez reaksiyonu.	18
Şekil 3.2	Fonksiyonel monomer ile metal iyonu arasındaki olası etkileşim.	19
Şekil 3.3	Tirozin baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin hazırlanmasının şematik gösterimi.	20
Şekil 3.4	Polimerizasyon sisteminin optik fotoğrafı.	20
Şekil 3.5	Kompozit taşıyıcı hazırlanmasının şematik gösterimi.	23
Şekil 3.6	Kompozit taşıyıcının polimerizasyon sonrası bütün ve kesilmiş hallerinin optik fotoğrafı.	23
Şekil 3.7	Adsorpsiyon deneylerinin gerçekleştirildiği rotatörün optik fotoğrafı.	25
Şekil 4.1.	UV-görünür bölge spektrofotometre cihazının optik fotoğrafı.	30
Şekil 4.2	MAH:Cu:Tirozin ön-komplekslerinin spektrofotometrik sonucu.	30
Şekil 4.3	FTIR-ATR spektrofotometre cihazının optik fotoğrafı.	31
Şekil 4.4	Modifiye olmamış (a) ve modifiye olmuş (b) manyetik silika mikroküreler ait FTIR-ATR spektra sonucu.	32
Şekil 4.5	Modifiye olmamış manyetik silika mikrokürelerin EDX sonucu.	33
Şekil 4.6	Modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin EDX sonucu.	33
Şekil 4.7	Taramalı elektron mikroskopu cihazının optik fotoğrafı.	34
Şekil 4.8	Modifiye olmamış manyetik silika mikrokürelerin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.	34
Şekil 4.9	Modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.	35
Şekil 4.10	Elektron spin rezonans cihazının optik fotoğrafı.	35
Şekil 4.11	Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin ESR spektra sonucu.	36

Şekil 4.12 Tirozin baskılanmış kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin şişme testi sonuçları.....	37
Şekil 4.13 Boş kriyojele (a) ve tirozin baskılanmış kompozit taşıyıcıya (b) ait FTIR-ATR spektra sonucu.....	38
Şekil 4.14 Kompozit taşıyıcının EDX sonucu.....	39
Şekil 4.15 Kompozit taşıyıcının farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri...	39
Şekil 4.16 Boş kriyojelin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.	40
Şekil 4.17 Baskılanmış kompozit taşıyıcının ESR spektrum sonucu.	40
Şekil 4.18 Farklı derişimlere sahip tirozin çözeltileri için 280 nm'de alınan spektrofotometre sonuçları ile çizilen kalibrasyon grafiği.....	41
Şekil 4.20 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi; Deney koşulları: pH: 8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Döndürme hızı: 15 rpm.	43
Şekil 4.21 Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcıların tirozin adsorpsiyonuna tirozin derişiminin etkisi. Deney koşulları: pH: 8,0; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.....	44
Şekil 4.22 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisi. Deney koşulları: pH: 8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.	45
Şekil 4.23 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna döndürme hızının etkisi. Deney koşulları: pH: 8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C.....	46
Şekil 4.24 Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcıların farklı amino asitlere göre adsorplama kapasiteleri. Deney koşulları: pH:8,0; Amino asit derişimleri: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.	47
Şekil 4.25 Kompozit taşıyıcıya tirozin adsorpsiyonuna tekrar kullanılabilirlik etkisi. Deney koşulları: pH:8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.	48
Şekil 4.26 Kompozit taşıyıcının fosfat tamponu, yapay plazma, idrar ve tükürük örneklerinde tirozin adsorpsiyonu sonuçları.	49
Şekil 4.27 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonunu deneysel verileri kullanılarak çizilen Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli grafiği.	51
Şekil 4.28 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonunu deneysel verileri kullanılarak çizilen Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli grafiği.	51

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 Afinite kromatografisinde en sık kullanılan ligandlar ve hedef moleküller.....	15
Tablo 4.1 Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcılar için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.....	47
Tablo 4.2 Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri sabitleri.....	52
Tablo 4.3 Tirozin baskılanmış farklı polimerlerin kıyaslanması.....	54
Tablo 4.4 Farklı kompozit kiyojel çalışmaları.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μm	Mikrometre
nm	Nanometre
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
L	Litre
mg	Miligram
M	Molar
g	Gram
G	Gauss
k	Seçicilik katsayısı
k'	Bağıl seçicilik katsayısı
Q	Adsorplama kapasitesi

Kısaltmalar

APS	Amoyum persülfat
DVB	Divinilbenzen
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi
ESR	Elektron spin rezonans spektrometresi
FTIR	Fourier transform infrared spektrofotometre
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
KBr	Potasyum bromür
MAH	N-metakriloil-(L)-histidin metil ester
MBA	N,N-Metilen bisakrilamit
3-MPS	3-Merkaptopropil trimetoksisilan
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NaCl	Sodyum klorür
NIP	Baskılanmamış polimer
PHEMA	Poli hidroksietil metakrilat

PKU	Fenilketonüri
RPM	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metil-etilendiamin
TRIM	Trimetakrilat
TMP	Trimetilpropan

1. GİRİŞ

Tirozin doğada en çok L formunda bulunan esansiyel olmayan bir amino asittir. Fenilalanin, fenilalanin hidrosilaz enzimi tarafından tirozine dönüştürülür. Tirozin, vücutta dopamin, epinefrin ve norepinefrin gibi katekolaminleri üretmekle görevlidir. Ayrıca tiroid hormonu ve melanin sentezinde görev alır. Tirozin, neurotransmitter ürettiği için çevresel kaynaklı stresi azalttığına yönelik çalışmalar vardır [1]. Fenilketonüri hastalığında vücut fenilalanini düzgün metabolize edemez [2]. Bu durumda tirozin sentezlenemeyeceği için bu hastaların katekolamin üretebilmeleri ve melanin, tiroid hormonu üretim mekanizmalarının zarar görmemesi için tirozini dışarıdan hazır almaları gerekir. Ayrıca fenilketonüri annelerin kanlarındaki düşük tirozin seviyesi fetüsün beyinsel gelişimini kötü yönde etkileyebileceğinden tirozin takviyeleri kullanmaları gerekir. Tirozinemi, otozomal resesif bir metabolizma hastalığıdır [3]. Bu hastaların kanında ve idrarında tirozin amino asidi birikir. Bu durum organ hasarında ve zeka geriliğine neden olur. Hastalığın tedavisi için sadece diyet yetersiz kalmaktadır. Bu hastaların kanından tirozin uzaklaştırmak için kompozit taşıyıcı kullanılan bir tedavi yöntemi geliştirmek umut vaat etmektedir.

Tirozinin insanlarda soğuk kaynaklı çalışma belleği açlığını tersine çevirdiğini, dikkat bozukluğu ve hiperaktivite tedavisinde olumlu sonuçlar verdiğini dolayısıyla konsantrasyon ve bellek üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [4-7]. Dolayısıyla tirozin gıda takviyesi olarak çok tercih edilmektedir.

Son yıllarda biyokimya, ilaç, çevre alanlarında yapılan multidisipliner çalışmalar ve yaşanan gelişmeler sonucunda seçiciliği ve hassasiyeti yüksek, maliyeti düşük, kolay hazırlanabilen analitik çalışmalar yapılması hızla önem kazanmıştır. Moleküler baskılama teknolojisi seçiciliği, tekrarlanabilirliği yüksek ve maliyeti düşük bir yöntem olduğundan bu alanda umut vaat etmektedir. Bu yöntemde hedef molekül kalıp olarak kullanılarak bir polimer sentezlenir. Sentezlenen polimer hedef moleküle özgü tanıma bölgelerine sahip olur. Moleküler baskılanmış polimerler doğal alternatiflerinin sahip olduğu seçiciliğe sahiptir [8]. Böylece antibadi/antijen veya enzim/substrat arasındaki seçicilik polimerik bir yapıya

aktarılmış olur. Biyomoleküllerin aksine moleküler baskılanmış polimerlerin kimyasal, mekanik ve termal dayanıklılıkları yüksek olduğundan moleküler baskılanmış polimerler araştırmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. MIP adsorbentler; hormon, DNA, protein gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında, ilaç, biyoışaretleyici, sensör tasarımında ve istenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılabilir.

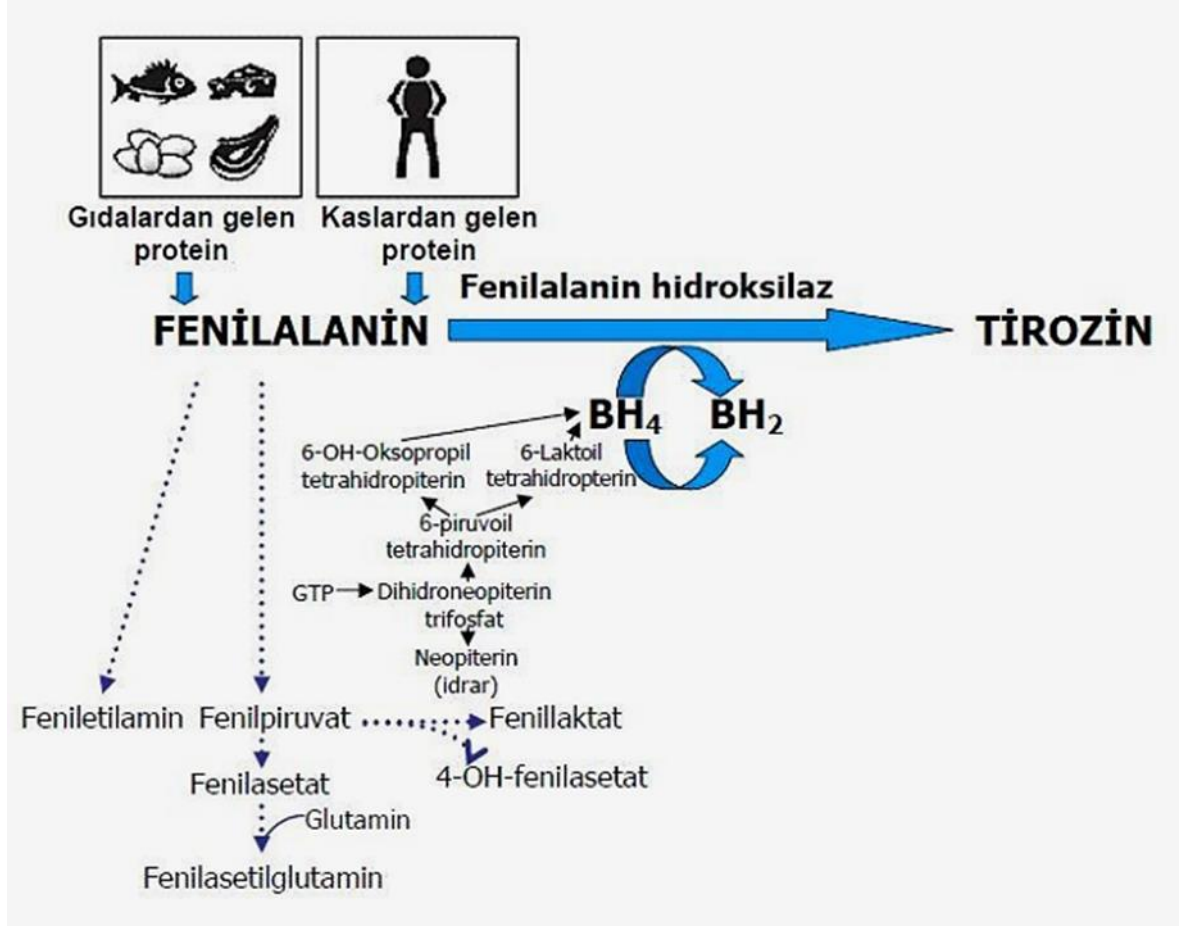
Makrogözenekli polimerik malzemeler günümüzde biyokimya ve eczacılık başta olmak üzere çeşitli alanlarda yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda sıfırın altındaki sıcaklıklarda sentezlenen makrogözenekli polimerik malzemeler yani kriyojeller, hidrofilik ve elastik yapıları ayrıca gözenek yapılarının çeşitliliği sayesinde ilgi görmektedir. Kriyojeller mikro veya süper makrogözenekli olabilirler. Kriyojellerin temel özelliği çözeltinin kristallenmesidir. Çözelti hem gözeneklerde hem de polimer yapısında bulunduğu heterofazlıdır. Kovalent, iyonik veya kovalent olmayan tipleri vardır. Blok, silindir, boncuk veya istenen herhangi bir tipte üretilebilir. Kriyojellerin üretimi, düşük basınçta çözeltinin uzaklaştırılması gerekmediğinden, daha basittir. Kriyojellerin kimyasal, mekanik, osmotik kararlılıkları oldukça yüksektir. Bu özellikleri sayesinde virüsler, organeller, hücre ve plazmit gibi biyolojik molekül ve nanopartiküllerin ayrılmasında kullanılabilirler. Günümüzde makrogözenekli polimerik malzemeler eczacılıkta, tıpta, biyoteknolojik araştırmalarda; ilaç salınım mekanizmalarında, yapay organ üretiminde, nem tutucu olarak, kromatografik malzeme olarak, saflaştırma amaçlı adsorbent olarak çok çeşitli alanlarda kullanılabilir. Kriyojele manyetik moleküler baskılanmış polimerler gömülüp kompozit taşıyıcı sistemler üretilerek özellikleri geliştirilebilmektedir.

Bu çalışmada, tirozin saflaştırması amacıyla moleküler baskılanmış manyetik silika mikroküreler kriyojele gömülerek yeni bir kompozit taşıyıcı malzeme sentezlenmiştir. Sunulan çalışmada, üretilen yeni nesil kompozit taşıyıcı sistem ile sulu çözülden ve yapay plazma, idrar, tükürük gibi gerçek örneklerden yüksek seçicilik ile tirozin uzaklaştırılmış, hazırlanan kompozit taşıyıcının tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmış ve sonuçlar rapor edilmiştir. Hazırlanan kompozit taşıyıcının tirozin saflaştırması için düşük maliyetli, tekrar kullanılabilirliği fazla ve yüksek seçiciliğe sahip olması büyük bir avantaj sağlayacağını göstermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

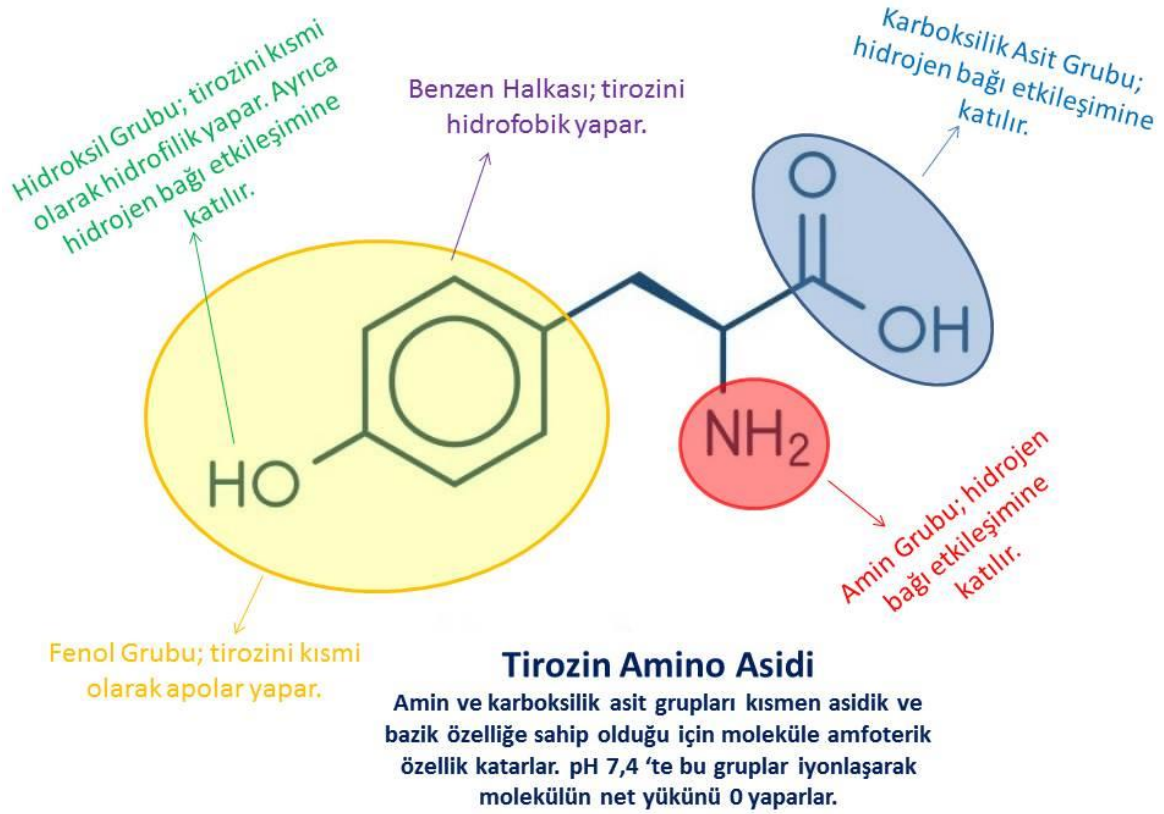
2.1. Tirozin

Tirozin esansiyel olmayan bir amino asittir ve doğada en çok L formunda bulunur. İnsan vücudu tirozini, esansiyel bir amino asit olan fenilalanininden üretir. Fenilalaninin metabolik patikası aşağıdaki görselde verilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Fenilalaninin metabolik patikası [9].

Tirozin ilk olarak 1846 yılında Alman kimyager Justus von Liebig tarafından peynirde bulunmuştur. 'Tyrosine' kelimesi Yunanca peynir anlamına gelen tyrosdan gelir [10]. Doğal olarak peynirde, balıkta, tavukta, hindide, yumurtada ve diğer yüksek protein içeren gıdalarda bulunur [11]. Tirozin amino asidinin yapısı ve özellikleri görselde verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Tirozin amino asidinin yapısı ve özellikleri.

Tirozin; nörotransmitter olarak adlandırılan epinefrin, norepinefrin ve dopamin gibi birkaç önemli beyin kimyasalının üretimi için vazgeçilmez bir amino asittir. Nörotransmitterler, sinir hücrelerinin iletişim kurmasına ve ruh halinin düzenlenmesine yardımcı olur [12]. Tirozin ayrıca saç ve deri renginden sorumlu pigment olan melanin üretimine katkı sağlar. Adrenal, tiroid ve hipofiz bezleri gibi hormonların yapılmasından ve düzenlenmesinden sorumlu organların işlevine katkı sağlar. Tirozin, vücutta neredeyse tüm proteinlerin yapısında yer alır. Tirozinin vücutta düşük seviyelerde bulunması düşük kan basıncı, düşük vücut ısısı ve düşük aktif tiroid düzeyi ile ilişkilendirilmiştir [13].

2.2. Tirozin Saflaştırmanın Önemi

Fenilketonüri, vücutları fenilalanin amino asidini metabolize edemeyen insanlarda ortaya çıkan kalıtsal bir rahatsızlıktır [14]. Bu hastalıkta fenilalanin hidroksilaz enziminin ya da kofaktörü olan tetrahidrobiopterinin yetersiz çalışması sonucun-

da besinsel proteinlerde yer alan fenilalanin tirozine çevrilemez. Dolayısıyla fenilalanin ve türevleri (fenilketon-fenilamin) vücutta birikir. Enzimi yapan gen 12. kromozomda yer alır [15]. Bu hastaların kanında fenilalanin seviyesi yükselir ve bu durum merkezi sinir sistemi için zehirlidir. Başta zihinsel engel olmak üzere birçok beyin hasarına yol açabilir [16]. Tedavi amacı ile hastalar diyetlerinde fenilalanininden kaçınmak zorundadır. Tirozin, fenilalanininden üretildiği için bu hastalarda tirozin eksikliği görülebilir. Tirozin, fenilketonürlü hastalar için protein takviyelerinde kullanılır. Ayrıca fenilketonürlü hastaların, gebelikleri sırasında fetüs gelişiminde bozukluk olmaması için tirozin takviyeleri kullanmaları gerekmektedir.

Tirozinemi, tirozin amino asidinin kanda ve organlarda birikerek başta akciğer, böbrek ve periferik sinir sistemi olmak üzere organ hasarına neden olan bir metabolizma hastalığıdır [17]. Herediter tirozineminin en sık karşılaşılan türü tip 1 herediter tirozinemi diğer adıyla hepatorenal tirozinemidir. Bu durum tirozin amino asidinin yıkımından sorumlu fumaril asetoasetat hidrolaz enziminin eksikliğinden kaynaklanır [18]. Bu hastalıkta serum ve idrarda tirozin metabolitlerinin (tiramin, PHFPA, PHFLA, PHFAA, homojenik asit, suksinil asetoasetik asit, suksinil aseton) seviyesi yükselir [19]. Sadece diyet tedavisi ile hastaların %90'ı 12 yaşından önce kaybedilmektedir [20]. Bu durumda kandan etkin bir şekilde tirozin uzaklaştıran bir kompozit taşıyıcı ile yeni bir tedavi yöntemi geliştirmek tirozinemili hastalar için umut vaat etmektedir.

Tirozin, stres nörotransmitterleri olan epinefrin ve norepinefrin üretiminde önemli yere sahiptir. Bazı araştırmacılar, stres altında vücudun fenilalanininden yeterli miktarda tirozin üretilmediğine inanmaktadır [21]. Yapılan bazı hayvan ve insan çalışmalarına göre, tirozin takviyeleri psikolojik stres altında hafıza ve performansı iyileştirmeye yardımcı olabilmektedir. Ön araştırmalar, tirozinkinaz inhibitörlerinin tiroid kanseri tedavisinde rol oynayabileceğini önermektedir. Diğer çalışmalar, tirozinkinaz inhibitörlerinin akciğer kanseri veya pulmoner fibrozis bulunan kişiler arasında akciğer fonksiyonlarının iyileşmesine yardımcı olabileceğini önermektedir [22].

Tüm bu sebeplerle; tirozin, ilaç sektöründe ticari değere sahip bir amino asittir. Tirozinin hem yüksek saflıkta hem de düşük maliyette elde edilmesi ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır.

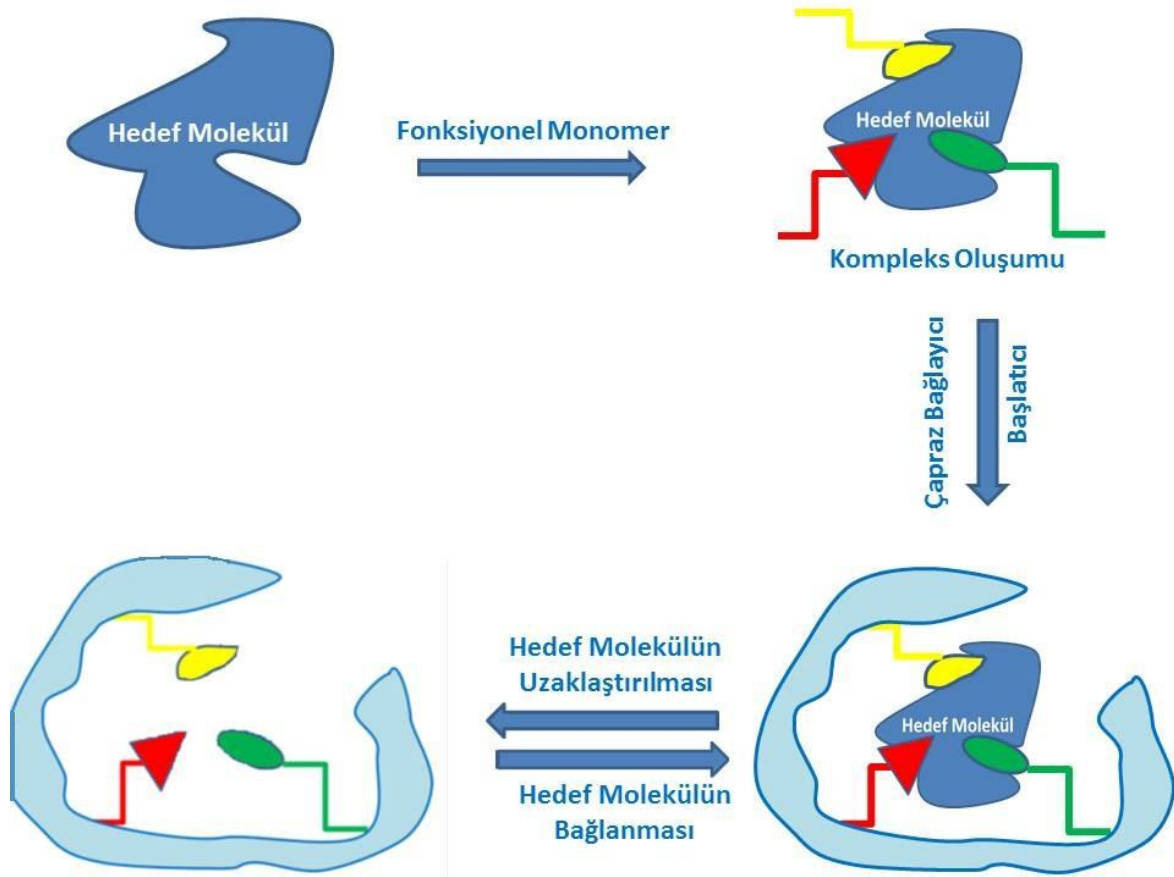
2.3. Tirozin Saflaştırma Yöntemleri

Tirozin ticari olarak değerli bir amino asit olduğundan saf olarak elde edilmesi günümüzde önem kazanmıştır. Bu amaçla pek çok çalışma yapılmaktadır. Tirozin bir biyomolekül olduğundan yığın içerisinde yapısını bozmadan ayırmak zordur. Bu yüzden moleküler baskılama teknolojisi tirozin saflaştırılması için maliyeti düşük, tekrarlanabilirliği yüksek, hazırlaması kolay ve etkinliği yüksek bir yöntemdir. Afinite kromatografisi, kolon kromatografisi, sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez gibi kromatografik yöntemler bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır.

2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama, analizi yapılacak molekül için yüksek seçiciliğe sahip tanıma bölgeleri olan polimerlerin hazırlanmasını sağlayan bir tekniktir [23]. Moleküler baskılama teknolojisi ile biyolojik reseptörleri taklit edebilen sentetik malzemeler üretilir [24]. Bu sentetik malzemeler, biyolojik benzerlerinin aksine yüksek kararlılığa sahiplerdir. Ayrıca ısı, mekanik ve kimyasal dayanıklılıkları daha yüksektir [25]. Moleküler baskılanmış polimerlerin maliyeti düşüktür ve hazırlanmaları kolaydır [26].

Moleküler baskılama yöntemi üç temel aşama ile açıklanabilir [23]. Birinci aşamada, hedef molekül ile uygun fonksiyonel gruba sahip monomer kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler ile kompleks oluşturur. İkinci aşamada, oluşan komplekse uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenerek polimerizasyon sağlanır. Üçüncü aşamada ise hedef molekül uygun bir çözücü ile polimerden uzaklaştırılır (Şekil 2.3). Böylece moleküler baskılanmış polimer üzerinde hedef molekülün yüzey morfolojisine sahip, ve kimyasal olarak yapı olarak hedef moleküle uygun yüksek seçiciliğe sahip alanlar oluşturulmuş olur.



Şekil 2.3 Moleküler baskılamanın temel basamakları.

2.4.1. Moleküler Baskılamada Çapraz Bağlayıcıların Rolü

Çapraz bağlayıcılar hedef molekülü, hedef molekülün etrafındaki fonksiyonel monomerleri ve bunların fonksiyonel gruplarını bir arada tutan ağ yapıda ve gözenekli bir polimer oluştururlar. Yapıdan hedef molekül uzaklaştırıldığında, polimerin içinde oluşan boşluk hedef molekülün tüm yüzey özelliklerine sahiptir.

Hangi çapraz bağlayıcının ne kadar kullanıldığı moleküler baskılanmış polimerin seçiciliğini ve bağlama kapasitesini etkiler. Kullanılan çapraz bağlayıcı miktarı az olursa polimer yeterince sert olmaz ve hedef boşluklarının şeklini koruyamaz. Diğer yandan kullanılan çapraz bağlayıcı miktarı yüksek olursa baskılanmış polimerin tanıma bölgelerinin sayısı azalır.

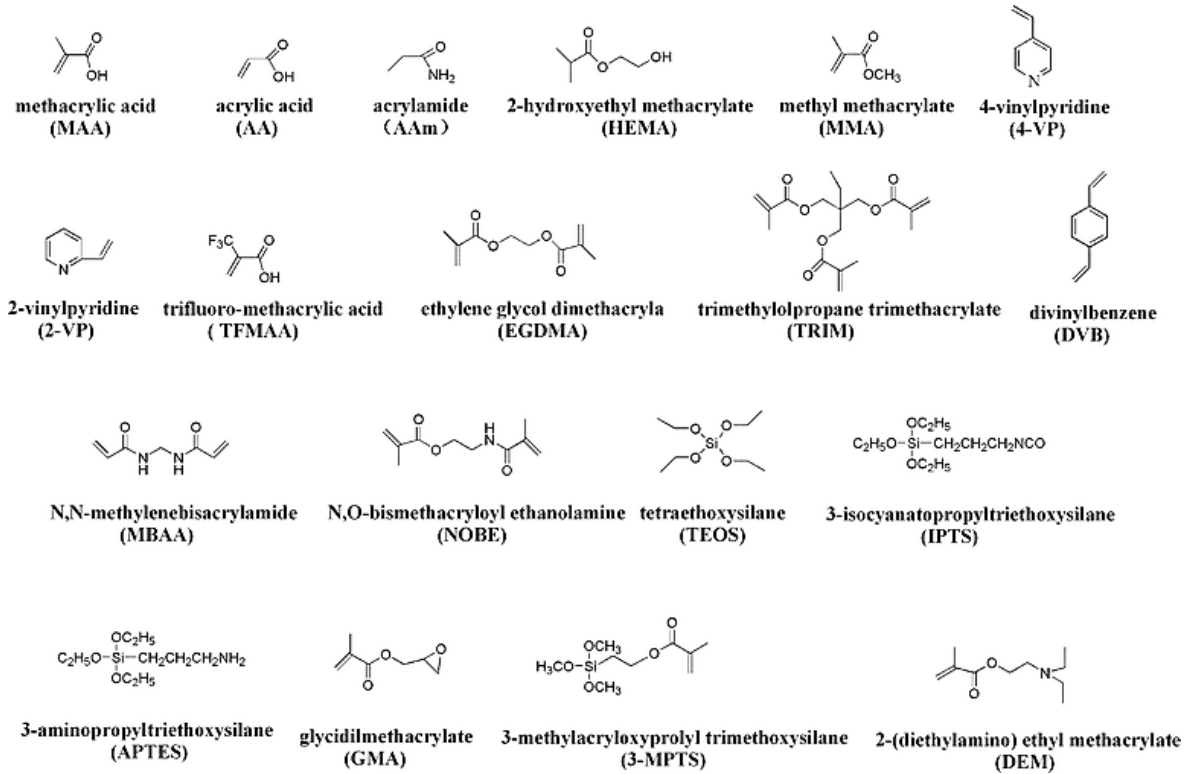
En sık kullanılan çapraz bağlayıcılar; etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropan (TMP), trimetakrilat (TRIM), N,N-metilenbisakrilamid (MBA) ve divinilbenzen (DVB)'dir.

Çapraz bağlayıcı türlerini moleküler baskılanmış polimerlerin baskılama faktörü üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada, zidovudin isimli bir AIDS tedavisi ilacı EDGMA, TRIM, DVB çapraz bağlayıcıları kullanılarak moleküler baskılama yöntemi ile saflaştırılmıştır [27].

2.4.2. Moleküler Baskılamada Kullanılan Fonksiyonel Monomerler

Moleküler baskılamada monomerin fonksiyonel grupları ile kalıp molekül kompleks oluşturur. Kompleks oluşumunda kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimler ekili olabilir. Monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşim ne kadar güçlü ise moleküler baskılanmış polimerin kalıp molekülü tanımadaki doğruluğu ve seçiciliği o kadar artar. Bu sebeple fonksiyonel monomer seçimi önemlidir. Bir çalışmada kullanılacak fonksiyonel monomeri seçmek için spektroskopik analizler, bilgisayarlı simülasyon gibi ön çalışmalar yapılır.

Moleküler baskılamada en yaygın olarak; metakrilik asit (MAA) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerleri kullanılmaktadır [28]. Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcı ve monomerlerin yapıları Şekil 2.4 'de verilmiştir.



Şekil 2.4 Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcı ve başlatıcıların yapıları [29].

Moleküler baskılamada, kullanılan kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin arasındaki mol oranı da önemlidir. Mol oranı düşük kullanılırsa polimerde daha az bağlama alanı oluşur. Yüksek mol oranı kullanılırsa bağlanma seçiciliği azalır. Bu sebeple baskılama verimini artırmak için optimum mol oranı bulunmalıdır.

2.4.3. Moleküler Baskılamada Kullanılan Çözücüler

Polimerleşme sürecinde çözücünün görevi tüm bileşenleri tek fazda birleştirmektir. Polimerin gözeneklerini oluşturan da çözücüdür. Bu sebeple moleküler baskılamada kullanılan çözücünün yapısı da, hacmi de önemlidir. Moleküler baskılama çalışmalarında en sık kullanılan çözücüler asetonyitril, toluen ve kloroformdur.

Çözücü, moleküler baskılamada gözenek oluşturucu olarak kullanılabilir. Çünkü kullanılan çözücünün hacmi yüksek tutulursa polimerin gözenek boyutu artar. Bu da moleküler baskılanmış polimerde akışı sağladığı için tercih edilen bir özelliktir. Çözücünün polaritesi de çözücü seçiminde önemli bir faktördür. Kloroform ve toluenin polarlığı az olduğundan kovalent etkileşimleri artırarak kompleks oluşumunu artırır. Diğer yandan daha polar çözücüler kompleks oluşumdaki kovalent olmayan etkileşimleri azaltır.

2.4.4. Moleküler Baskılamada Kullanılan Başlatıcılar

Moleküler baskılama çalışmalarında polimer sentezi için en çok kullanılan yöntem serbest radikalik polimerizasyondur. Bu yöntemde polimerizasyon çok hızlı gerçekleşir. Serbest radikalik polimerizasyonda en çok kullanılan başlatıcılar inorganik veya organik peroksitler, diazo bileşikler veya redoks başlatıcılardır. En sık kullanılan başlatıcı azo N-N'-bis izobutyronitril (AIBN)' dir.

2.4.5. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılamada, hedef molekül ile monomer birbirine kovalent bağlar ile bağlanır [30]. Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından kovalent bağlar kopartılarak hedef molekül ile polimer birbirinden ayrılır. Molekül tekrar bağlanırken yeniden kovalent bağlar oluşur. Kovalent baskılamanın bazı avantajları ve dezavantajları vardır.

Kovalent bağlar daha kararlı bir karakteristiğe sahip olduğu için monomer-kalıp molekül kompleksi yüksek kararlılıktadır ve stokiometrik oranda gerçekleşir,

bağlanma bölgeleri daha homojendir. Yine kovalent bağların kararlı karakteristiğinden ötürü polimerizasyon koşullarında (sıcaklık, pH, çözücü türü) bir kısıtlama yoktur.

Kovalent bağlanmanın dezavantajları ise, hedef molekülün polimere tersinir bağlanma sayısının sınırlı olması, bağlanma kinetiğinin yavaş olması, uygun kalıp molekülün sınırlı olması, hedef molekülü uzaklaştırmanın zor olmasıdır. Bu sebeple kovalent baskılamanın fazla esnek olmayan bir yöntem olduğu söylenebilir. [31].

2.4.6. Kovalent Olmayan Baskılama

Bu tür baskılamada kalıp molekül ile monomer arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ve iyonik etkileşimler oluşur [32]. Hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra, moleküler baskılanmış polimere yine bu kovalent olmayan etkileşimler ile bağlanır.

Kovalent olmayan baskılamanın avantajları; kalıp molekül sınırlaması olmaması, sentezin basit olması, kalıp molekülün uzaklaştırılması için çözücü ekstraksiyonunun yeterli olması, kalıp molekülün uzaklaştırmasının kolay olması, hedef molekülün tekrar bağlanma kinetiğinin hızlı olması ve kovalent baskılamaya göre daha yüksek afinitede bağlanma bölgeleri oluşmasıdır. Dezavantajları ise, polimerizasyon koşullarının sınırlı olması, fonksiyonel monomer miktarı fazla tutulması gerektiğinden non-spesifik bağlanma bölgeleri oluşmasıdır. Kovalent olmayan baskılama daha esnek ve daha az kısıtlamaları olan bir yöntemdir [33]. Bu sebeple günümüzde daha popülerdir.

2.4.7. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları

Sahip oldukları avantajlar sayesinde moleküler baskılanmış polimerler günümüzde oldukça popüler bir çalışma alanıdır. Biyoayırma, saflaştırma, sensör tasarımı, kataliz, kontrollü ilaç salınımı, kirleticilerin uzaklaştırılması gibi birçok alanda kendisine yer bulmaktadır [29]. Moleküler baskılanmış polimerler en çok kromatografik ayırmada kullanılırlar. Ayrıca ilaç sentezinde optik açıdan saf bileşiklere ihtiyaç olduğundan moleküler baskılanmış polimerler kiral ayırmalarda sıkça kullanılırlar. Moleküler baskılama ile iyonların, biyomakromoleküllerin, organik moleküllerin, hücre ve virüslerin yüksek seçicilik ile analizi yapılabilir [34].

Bazı çalışmalarda moleküler baskılanmış polimerler antikorları taklit eden yapay bağlayıcı olarak veya enzimleri taklit eden yapay katalizörler olarak kullanılmaktadır [35].

2.5. Silika Mikroküreler ve Kullanım Alanları

Mikrokürelerin boyutu birkaç mikrometreden milimetreye kadar değişebilir. Farklı yapılarda, gözenekli veya gözeneksiz olarak hazırlanabilirler. Silika mikrokürelerin yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) gelişimine katkısı olmuştur. Silika mikroküreler ilk olarak 1968 yılında Stöber ve Fink'in geliştirdiği bir yöntemle sentezlenmiştir. Bu yöntemde silika mikroküreler, silisik asidin tetraesterlerinin belirli çözeltilerle kimyasal reaksiyona sokulması ile elde edilmiştir [36]. HPLC tekniği ile silika kolonlar kullanılarak biyomoleküllerin ayrılması ilk kez 1970'de yapılmıştır. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kullanımı silikanın ortaya çıkmasıyla başlamıştır ki bu teknik günümüzde en çok kullanılan kromatografik yöntemdir. Silika mikrokürelerin yüksek sıcaklığa karşı toleransı fazladır.

Silika mikroküreler biyoayırma, biyolojik etkinliğe sahip maddelerin immobilizasyonunda, kolon kromatografisinde, kontrollü ilaç salınımında, biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanım alanı bulmuştur [37-39]. Ayrıca seramik üretiminde ve kozmetik alanında da kullanımı mevcuttur.

2.6. Manyetik Silika Mikroküreler ve Uygulama Alanları

Silika mikroküreler biyouyumlu malzemeler olduğundan biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için uygun yapıdadırlar. Manyetik silika mikroküreler ise, silika mikrokürelere yüksek manyetik duyarlılık katarak kullanım alanlarını genişletmiş ve yeni avantajlar eklemiştir. Ayrıca çalışmanın türüne göre fonksiyonel gruplar eklenerek manyetik silika mikrokürelerin yüzeyleri kolaylıkla modifiye edilebilmektedir. Böyle eşsiz özelliklere sahip olduklarından, katalizör olarak, biyobelirteç olarak, biyoayırma ve özellikle kontrollü ilaç salınımında oldukça ilgi görmüşlerdir [40, 41]. Ayrıca manyetik mikrokürelerin bileşimi değiştirilerek inorganik çalışmalarda da kullanılabilir. Manyetik silika mikroküreler manyetik, termal ve ultraviyole duyarlılığa sahiptir ve mikrodalga ışınları absorbe edebilirler.

Manyetik silika mikroküreler, silika mikrokürelerin yüzeyinin manyetit (Fe_3O_4) ile ferrit kaplanmasıyla [42] veya demir pentakarbonilin sonokimyasal yöntemle kaplanmasıyla sentezlenir [43]. Manyetik silika mikrokürelerin en önemli uygulama alanı moleküler baskılama teknolojisindedir. Manyetik silika mikrokürelerin yüzeyi modifiye edilip moleküler olarak baskılandıklarında kompozit malzemeler hazırlanabilir.

2.7. Kriyojeller

Kriyojeller çözeltilerinin kriyojenik işlemleri ile sentezlenen jellerdir [44]. Kriyojelleşme sıfırın altındaki sıcaklıklarda meydana gelen jelleşmedir. Kriyojeller hem donmuş katı faza hem de donmamış sıvı mikrofaza sahip olduklarından heterofazlı sistemlerdir [45]. Çözücü kristalleri donmuş katı fazı oluşturur ve gözenek yapıcı görevindedir. Donmamış bölgelerde ise jelleşme oluşur. Kriyojel ilk olarak 1984 yılında sentezlenmiştir ama 1980'lerin sonunda popüler hale gelmiştir. Kriyo Yunanca'da dondurulmuş, buz anlamına gelen kryos'dan gelmektedir.

Kriyojeller makrogözenekli olmaları, dokulara benzer elastikiyetleri, biyouyumlulukları, ozmotik, fiziksel ve kimyasal dayanıklılıkları, sünger benzeri yapıları, kolay hazırlanmaları gibi eşsiz özelliklere sahip olmaları ile günümüzde popüler hale gelmiştir [46].

2.7.1. Kriyotropik Jelleşmenin Temel Karakteristik Özellikleri

Kriyojeller, kovalent olarak çapraz bağlanmış iyonotropik jeller ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ile bağlanmış fiziksel jeller olarak ikiye ayrılabilir [47]. Kriyotropik jelleşme şu şekillerde oluşabilir:

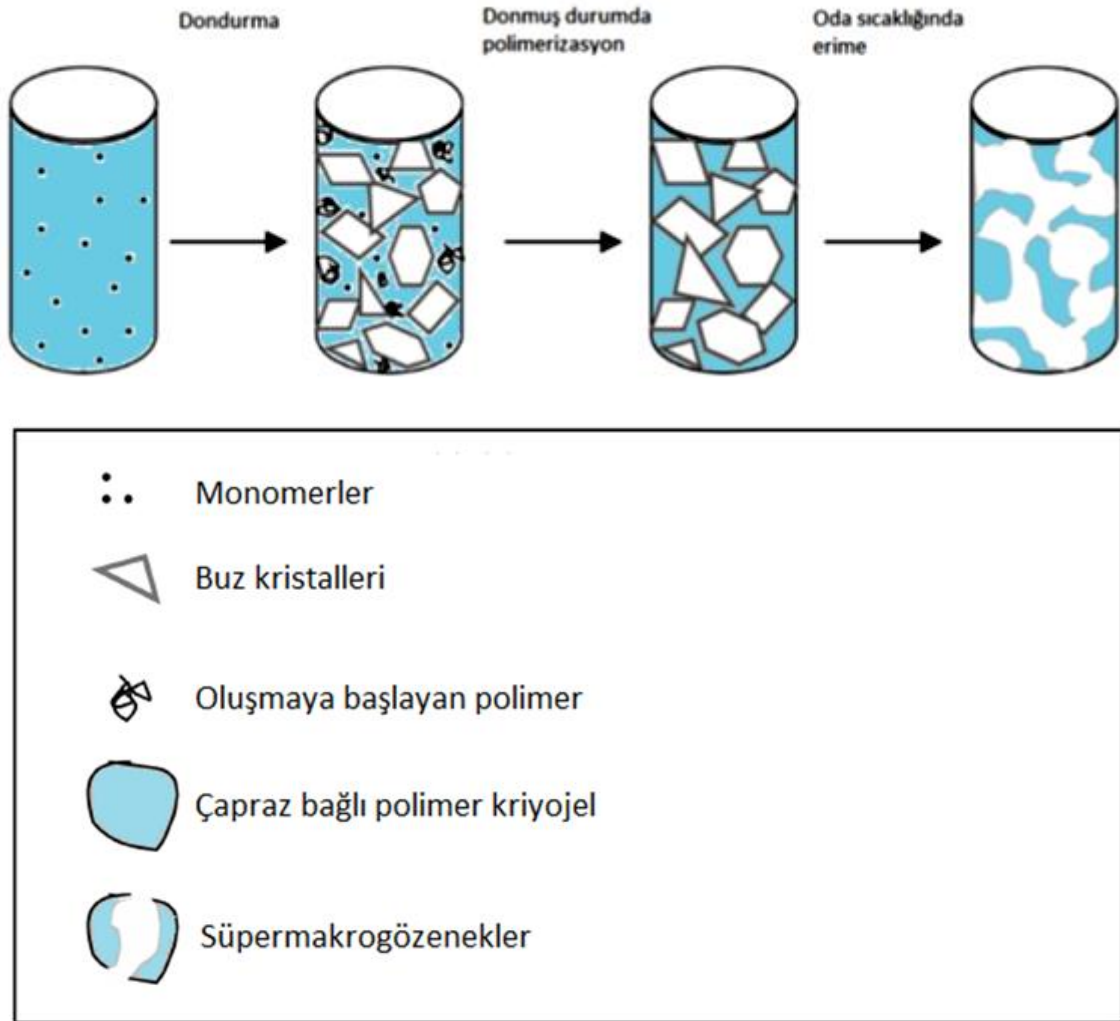
- Donma sırasında [48-51],
- Örnek donmuş haldeyken saklama sırasında [52-54],
- Donmuş örneğin tavlama sırasında [55-59].

Kriyojelin türü ne olursa olsun hazırlama basamakları şu şekildedir:

- Polimerizasyon çözeltisinin hazır hale getirilmesi,

- Polimerizasyon çözeltisinin dondurulması,
- Donmuş polimerizasyon sisteminin inkübasyonu,
- Donmuş polimerizasyon sistemin oda sıcaklığında tavlanması.

Kriyojel oluşum aşamaları Şekil 2.5'de görsel olarak anlatılmıştır.



Şekil 2.5 Kriyojel oluşum şeması [60].

2.7.2. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojeller gözenek boyutları ve sünger benzeri yapıları sayesinde biyomolekül çalışmalarında difüzyon sorunu olmaksızın kullanılabilirler. Kriyojeller hücre ayırma ve hücre kültürü çalışmalarında büyük ilgi görmektedir [46]. Ayrıca biyoafinite

sorbentlerinde matriks olarak, moleküler ligand ve hücrelerin immobilizasyonunda, kromatografi çalışmalarında kromatografik malzeme olarak kullanılırlar [61].

Kriyojellerin üstün özellikleri sayesinde doku mühendisliği alanında destek malzemesi olarak kullanımları da mevcuttur. Kan gibi viskoz sıvılar bile kriyojellerde akış sorunu yaşanmadan analize imkan verir. Kriyojellere moleküler baskılanmış polimerler gömülerek özellikleri geliştirilebilir ve biyoayırma çalışmaları için üstün seçiciliğe sahip kompozit malzemeler tasarlanabilir.

2.8. Kompozit Sistemlerin Tasarımı

Makrogözenekli jellerin içerisine moleküler baskılanmış polimerler gömülmesi yeni ve başarılı sonuçlar elde edilen bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımla makrogözenekli jellerin hızlı ve kolay akış sağlaması, sünger benzeri yapıları, kimyasal ve mekanik dayanımları ile moleküler baskılanmış polimerlerin yüksek seçicilikleri birleşerek yeni üstün özelliklere sahip kompozit sistemler tasarlanmış olur.

Makrogözenekli jellerin benzersiz yapısıyla moleküler baskılanmış polimerlerin üstün özelliklerini birleştiren çalışmalar günümüzde oldukça popülerdir. Literatürde bu alanda protein saflaştırma, bilirubin ayırma, antibadi saflaştırma, endokrin bozucuların izini sürme, peptit ayırma, hemogloblin uzaklaştırma, 17 β -estradiol adsorplama ve daha bir çok çalışma bulunmaktadır [62-69].

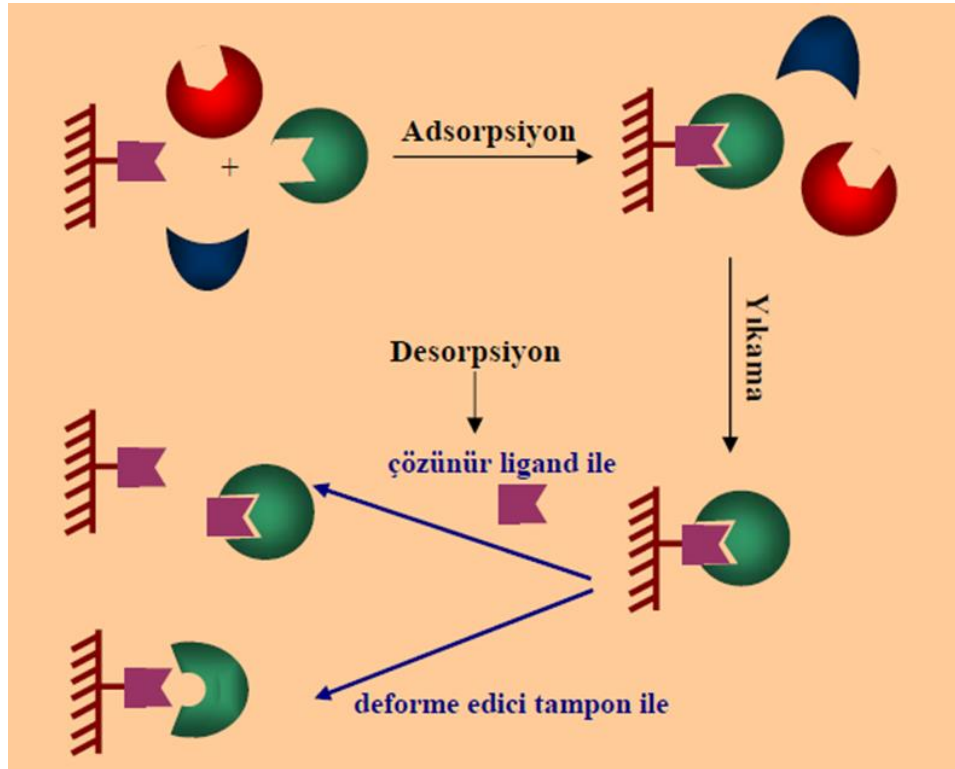
2.9. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi bir yığın içerisinden spesifik bir molekülü saflaştırmak için seçiciliği en yüksek ve güçlü kromatografik yöntemlerden biridir [70]. Birbiriyle enzim substrat gibi anahtar kilit ilişkisinde olan iki molekülün etkileşimine dayanır [71]. Bu tersinir bir etkileşimdir. Afinite kromatografisinde sabit faza bağlı ve hedef moleküle biyolojik afinitesi olan bir ligand vardır [72]. Örnek karışımı kolona verildiğinde hedef molekül yüksek seçicilik ile liganda bağlanarak kolonda tutulur. Geri kalan moleküller kolondan ayrılır. Daha sonra ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık, adsorpsiyon ajanı, ligand çözeltisi) hedef molekül kolondan desorbe edilir. Afinite kromatografisinin temel prensibi Şekil 2.6'da

şematize edilmiştir. Afinite kromatografisinde en sık kullanılan ligandlar ve hedef moleküller ise Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Afinite kromatografisinin en sık kullanılan ligandları ve hedef molekülleri.

LİGANLAR	HEDEF MOLEKÜLLER
Antikorlar	Antijenler, virüsler ve hücreler
İnhibitörler	Enzimler
Lektinler	Polisakkaritler, glikoproteinler ve yüzey hücre reseptörleri
Nükleik asitler	Nükleik asitleri bağlayan proteinler (enzimler veya histonlar)
Hormonlar, vitaminler	Reseptörler ve taşıyıcı proteinler
Şekerler	Lektinler, enzimler veya diğer şeker bağlayıcı proteinler



Şekil 2.6 Afinite kromatografisinin temel ilkesi [73].

Afinite kromatografisinde ligand ile hedef molekül arasındaki etkileşimin şiddeti önemlidir. Eğer hedef molekül ile ligandın etkileşimi çok zayıf olursa adsorpsiyon işlemi gerçekleşmez, buna karşın bu etkileşim çok kuvvetli olursa da adsorbe edilen hedef molekül ligandan desorbe edilemez. Bunun haricinde desorpsiyon için kullanılan yöntemin hedef molekülü parçalamadan ligandan ayırması için uygun koşulların tespit edilmesi de önemlidir.

Afinite kromatografisinin başarısını belirleyen faktörler; ligand seçiciliği, geri kazanım, tekrar kullanılabilirlik, kararlılık, sürdürülebilirlik ve düşük maliyet vb. etkenlerdir.

2.10. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (İMAK)

İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) ilk kez 1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. İMAK, Zn(II), Cu(II), Ni(II), ve Co(II) gibi geçiş metali iyonlarının sulu çözeltilerdeki spesifik afinitelerine dayanır [74]. Bu teknikte, bahsi geçen geçiş metali iyonları bir desteğe immobilize edilerek proteinler fraksiyonlara ayrılır ve saflaştırılır [75]. Proteinler, yüzeylerinde bulunan sistein, tirozin, histidin ve triptofan gibi belli amino asit birimlerinin barındırdığı elektron verici grupların immobilize metal iyonu koordinasyon bölgelerine spesifik olarak bağlanması ilkesiyle saflaşırlar. Amino asitlerin azot, kükürt ve oksijen gibii elektron verici atomları ile metal iyonları arasında 2 dişliden 5 dişliye kadar şelat oluşumu gözlenebilir. Proteinlerin amino uçları dışında yan zincirlerindeki elektron verici grupları da metal iyonları ile şelat oluşumuna katılabilir.

Desteğe immobilize edilen metal iyonlarına spesifik etkileşimler ile bağlanan hedef moleküller düşük pH'lı bir tamponla, iyonik şiddet değiştirilerek, yarışmalı yer değiştirici bir ajanla veya şelatlaştırıcı ajanlar kullanılarak desorbe edilebilir. İMAK; proteinlerin saflaştırılması ve izolasyonu, protein ve peptidlerin karakterizasyonu, fosfopeptidlerin izolasyonu, oligonükleotid, RNA, DNA izolasyonu için sıklıkla kullanılır [76].

3. DENEYSEL YÖNTEM VE BULGULAR

Aktarılan tezin içeriğinde yapılan deneysel çalışmaları şu ana başlıklarda toplanmak mümkündür;

- N-metakriloil-(L)-histidin metil ester fonksiyonel monomerinin sentezlenmesi ve ön-kompleksin hazırlanması,
- Tirozin baskılanmış ve baskılanmamış manyetik silika mikrokürelerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu,
- Tirozin baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin kriyojele gömülmesi ile kompozit taşıyıcı sentezlenmesi ve karakterizasyonu,
- Sentezlenen kompozit taşıyıcı ile tirozin adsorpsiyonu,
- Sentezlenen kompozit taşıyıcının seçiciliğinin incelenmesi ve baskılanmamış kompozit ile kıyaslanması,
- Sentezlenen kompozit taşıyıcının tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi,
- Sentezlenen kompozit taşıyıcı ile gerçek örneklerden tirozin saflaştırılması.

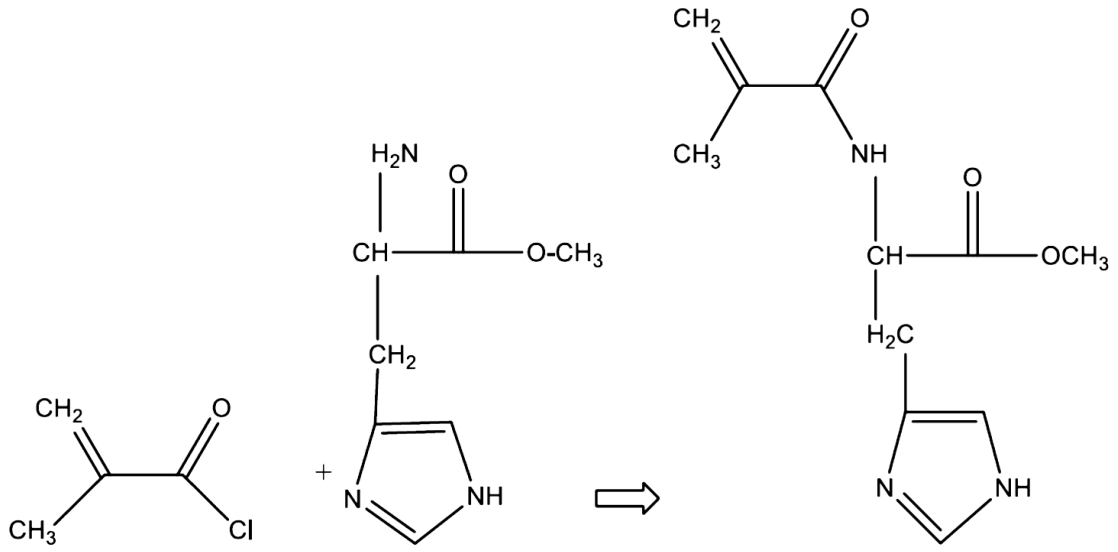
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N,N-metilen bisakrilamid (MBA) Sigma (ABD) firmasından satın alınmıştır. Amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin (TEMED), 3-merkaptopropil trimetoksisilan (3-MPS), sodyum bisüfit, tirozin, triptofan ve fenilalanin Sigma (ABD) firmasından satın alınmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan geri kalan kimyasallar Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kimyasallar kullanılmadıkları sürede 4°C'de saklanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Kullanılan saf suyun 18,25 MΩ/cm dirence sahiptir.

3.2. Fonksiyonel Monomer (MAH) Sentezi

Amino asit temelli bir monomer olan N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) şu şekilde sentezlenmiştir:

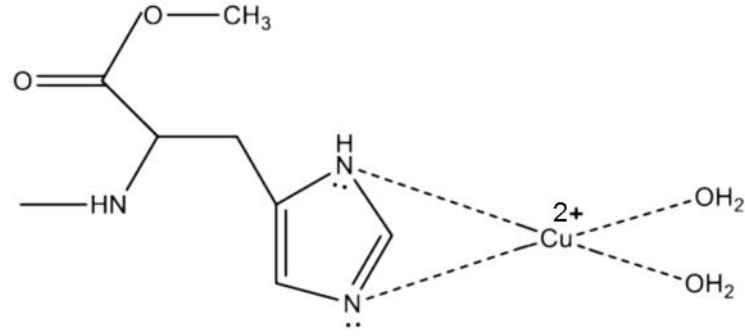
Hidrokinon ve L-histidin metil ester, diklorometan çözeltisinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 0°C'ye kadar soğutulmuştur. Soğutulan çözeltiliye trietilamin ilave edilmiştir. Daha sonra metakroil klorür yavaş yavaş bu çözeltinin üzerine dökülmüştür. Elde edilen çözelti azot atmosferinde manyetik karıştırıcıyla iki saat 25°C'de karıştırılmıştır. Ardından, reaksiyona girmeyen metakroil klorürün ekstraksiyonu NaOH çözeltisi ile yapılmıştır. Sulu fazın buharlaştırılması, döner buharlaştırıcı ile yapılmıştır. Kalan kısım (fonksiyonel monomer) etanol kullanılarak çözülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Fonksiyonel monomerin sentez reaksiyonu.

3.3. Ön-Kompleksin Hazırlanması

Şekil 3.2'deki gibi olası etkileşime giren monomer N-metakroilol-(L)-histidin metil ester ile Cu^{2+} kaynağı olan $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ sulu ortamda çözülerek 20 rpm'de 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmış ve metal şelat oluşumu sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan metal şelat karışımına farklı oranlarda (10:10:1, 10:10:2, 10:10:3) tirozin kalıp molekülü eklenerek yine 20 rpm'de 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül oranını belirlemek için her örneğin ayrı ayrı UV-görünür bölge spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.2 Fonksiyonel monomer ile metal iyonu arasındaki olası etkileşim.

3.4. Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi

Başlangıç malzemesi olarak kullanılan manyetik eş boyutlu ve gözenekli silika mikroküreler literatürdeki prosedürler takip edilerek hazırlanmış ve manyetik özellik kazandırılarak yüzey modifikasyonuna hazır hale getirilmiştir. Bu amaçla silika mikroküreler çoklu basamaklı mikro-süspansiyon polimerizasyon protokolü ile sentezlenmiş ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ içeren sulu çözelti ile karıştırılarak santrifüjlenmiştir. Daha sonra saf su ile yıkanmış ve ultrasonike edilerek manyetik silika mikroküreler 80°C sıcaklıkta vakum altında 48 saat boyunca kurutulmuştur [77,78].

3.5. Manyetik Silika Mikrokürelerin Yüzey Modifikasyonu

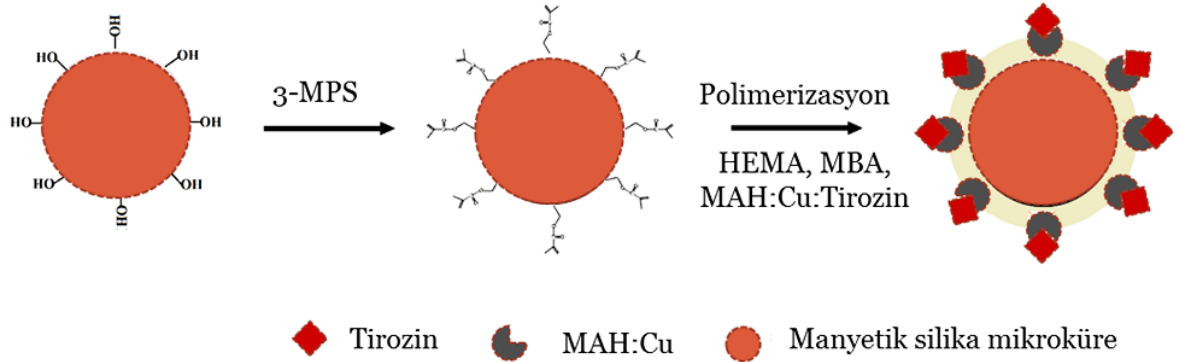
Manyetik silika mikrokürelerin yüzey modifikasyonu için manyetik silika mikroküreler, etanolde çözülerek üzerine (3-merkaptopropil) trimetoksisilana (3-MPS) eklenmiş ve 25 rpm'de 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra, manyetik silika mikroküreler etanol ve saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan manyetik silika mikroküreler liyofilizatörde (Christ Alpha 1-2-LD-plus, Almanya) 24 saat bekletilerek kurutulmuştur.

3.6. Tirozin Baskılanmış Manyetik Silika Mikrokürelerin Hazırlanması

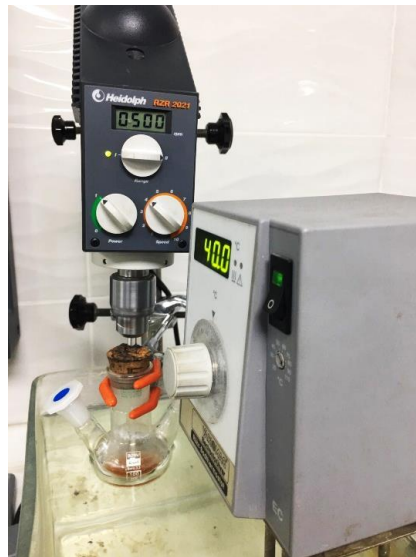
Manyetik silika mikrokürelere tirozin baskılanması aşağıda anlatılan şekilde yapılmıştır:

Saf suda çözülen MBA çapraz bağlayıcısı karışımına HEMA monomeri eklenmiştir. Daha sonra bu çözeltiye MAH:Cu:Tirozin fonksiyonel monomer ve kalıp molekül karışımı ve modifiye manyetik silika mikroküreler eklenmiştir. Son olarak, çözeltiye NaHSO₃ ve (NH₄)₂S₂O₈ başlatıcı çifti eklenmiş ve 40°C'de 24 saat boyunca 500 rpm hızda karıştırılarak polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3-Şekil 3.4).

Polimerizasyon sonunda tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreler sırası ile etanol ve saf su ile yıkanarak safsızlıklardan ve polimerleşmemiş monomer kalıntılarında uzaklaştırılmıştır. Baskılanmamış manyetik silika mikrokürelerin hazırlanması için kalıp molekül tirozin olmadan aynı yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Tirozin baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin hazırlanmasının şematik gösterimi.



Şekil 3.4 Polimerizasyon sisteminin optik fotoğrafı.

3.7. Manyetik Silika Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikroküreler liyofilizatör ile kurutulduktan sonra, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), elektron spin rezonansı (ESR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), ve Fouirer transform infrared spektrofotometre (FTIR) kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.7.1. Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR)

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin Fourier transform infrared (FTIR) spektrumu, FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile elde edilmiştir. Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikroküreler, KBr (IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen bir şekilde karıştırılarak tablet formuna dönüştürülmüştür. Tabletler, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiştir. FTIR sonuçları $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu değişiminde elde edilmiştir.

3.7.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin yüzey morfolojileri SEM (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir. Kuru manyetik silika mikroküreler iletken yapıştırıcı kullanılarak SEM numune plakasına yapıştırılmıştır. Bu işlem sonrası numune yüzeyi vakum şartlarında metalik altın ile kaplanmış ve yüzeye iletkenlik özelliği kazandırılmıştır. Hazırlanan örnekler SEM bölmesine koyularak farklı büyüme oranlarında görüntüleri alınmıştır.

3.7.3. Enerji Dağılımlı X- Işını Spektroskopisi (EDX)

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin içeriğindeki iyon analizi EDX ile incelenmiştir. Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikroküreler iletken yapıştırıcı kullanılarak numune plakası üzerine yapıştırılmıştır. Bu işlemden sonra örneğin yüzeyi vakum atmosferinde metalik altın ile kaplanmış ve yüzeye iletkenlik özelliği kazandırılmıştır. Örnekler SEM bölmesine yerleştirilmiş ve SEM görüntüleri çekilirken iyon analizleri yapılmıştır.

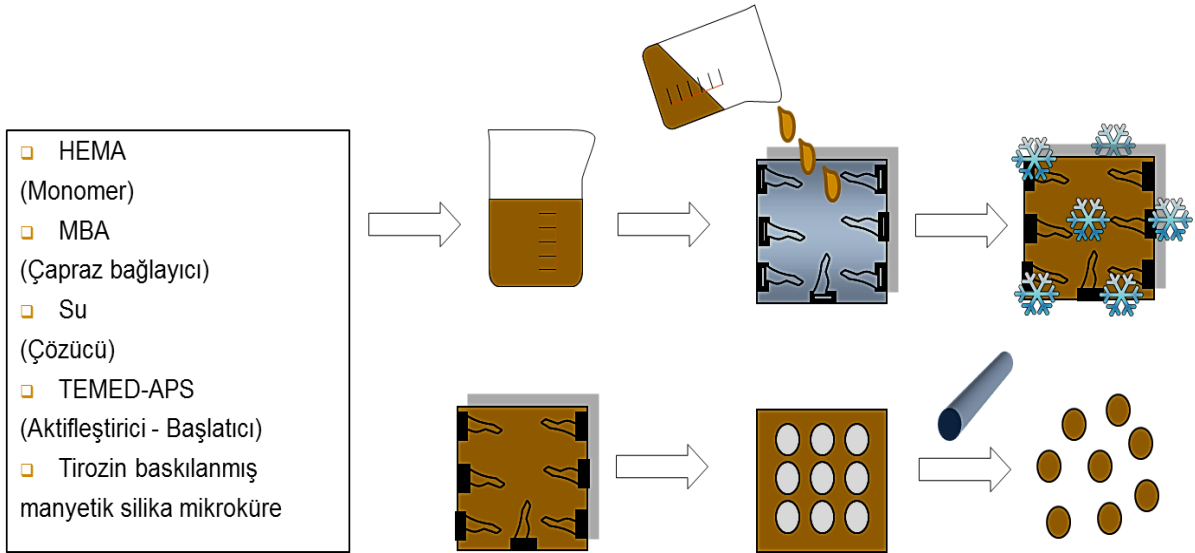
3.7.4. Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR)

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerdeki manyetit varlığı, ESR spektroskopisi (Bruker X bant, ABD) ile 25°C'de 1000-5000 G manyetik alan aralığında incelenmiştir. ESR spektrumları manyetik alana bağlı soğurmanın birinci türevinin değişimi olarak gözlenmiştir.

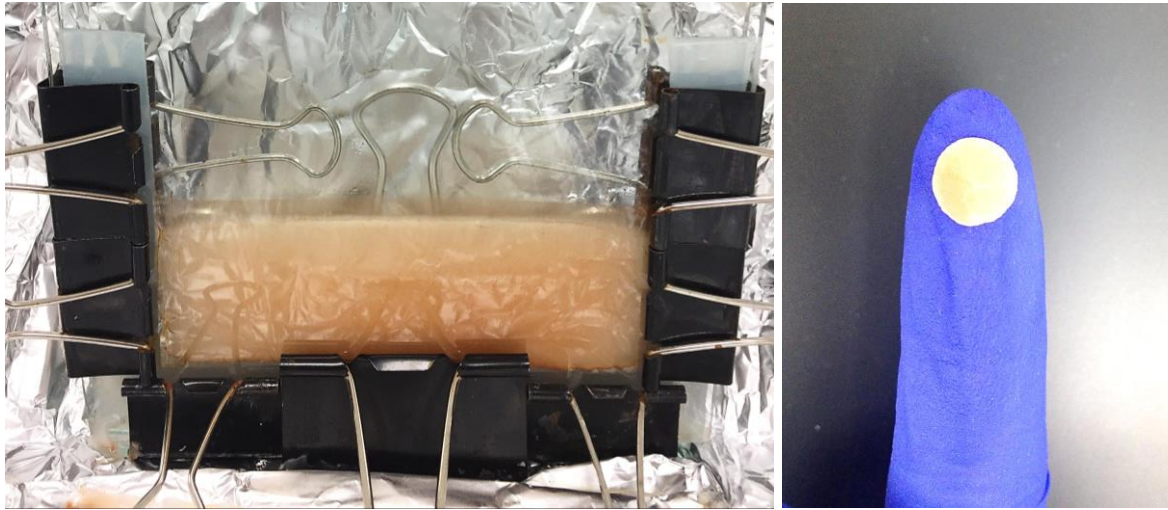
3.8. Kompozit Taşıyıcının Hazırlanması

Tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreler gömülerek hazırlanan yeni kompozit taşıyıcı kısaca aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan metilen bisakrilamit (MBA) saf su ile çözülmüştür. Bu çözelti ile yine saf suda çözünen HEMA monomeri karıştırılmıştır. Tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreler bu çözeltiye ilave edilmiş ve amonyum persülfat (APS) ile tetrametil etilendiamin (TEMED) başlatıcı çifti de eklenerek sonuç çözelti iki cam arasına dökülmüştür. -12°C'de 24 saat boyunca polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kompozit taşıyıcı 24 saat sonunda oda sıcaklığında tavlana mayaya bırakılmış ve saf su ile yıkanarak adsorpsiyon deneyleri için 0,9 cm'lik membran halinde kesilmiştir. Baskılanmamış kompozit taşıyıcının hazırlanması için baskılanmamış manyetik silika mikroküreler kullanılmış ve aynı yöntem takip edilmiştir. Ayrıca herhangi bir mikroküre gömülmeden boş kriyojeller hazırlanmış ve karakterizasyon deneylerinde kıyaslama yapmak için kullanılmıştır. Şekil 3.5'de tirozin baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin gömülü yeni nesil kompozit taşıyıcı hazırlanma yönteminin şematik gösterimi verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.6'da polimerizasyon sonrası kompozit taşıyıcının bütün ve 0,9 cm çapındaki perfüratör yardımıyla kesilmiş kuru hallerinin optik fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 3.5 Kompozit taşıyıcı hazırlanmasının şematik gösterimi.



Şekil 3.6 Kompozit taşıyıcının polimerizasyon sonrası bütün ve kesilmiş hallerinin optik fotoğrafı.

3.9. Kompozit Taşıyıcının Karakterizasyonu

Tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreleri kriyojele gömerek hazırlanan yeni kompozit taşıyıcı eş boyutlarda kesildikten sonra liyofilizatörde kurutulmuş ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), elektron spin rezonans (ESR), taramalı elektron mikroskopu (SEM), Fourier transform infrared spektrofotometre (FTIR) ve şişme testi ile karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon deneylerinin detayları aşağıda anlatılmıştır.

3.9.1. Şişme Testi

Hazırlanan kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin denge şişme oranı aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir:

Kuru kompozit taşıyıcı tartılarak içerisinde 5 mL saf su olan beherde bekletilmiştir. Farklı sürelerde (0-900 saniye) sudan alınan kompozit taşıyıcı kurutma kağıdı yardımı ile yüzeyindeki sudan arındırılarak tartılmıştır. Aşağıdaki eşitlik yardımı ile kompozit taşıyıcının içerisindeki su miktarı belirlenmiştir:

$$\text{Yüzde şişme oranı} = [(W_s - W_i) / W_i] \times 100 \quad (3.1)$$

W_i kompozit taşıyıcının şişmeden önceki W_s ise şişmeden sonraki ağırlığını (g) göstermektedir.

3.9.2. Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR)

Hazırlanan kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin Fourier transfer infrared (FTIR) spektrumu, FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) cihazı ile elde edilmiştir. Hazırlanan kompozit taşıyıcı ve boş kriyojel, KBr (IR Grade, Merck, Almanya) kullanılarak homojen bir şekilde karıştırılmış ve tablet formuna dönüştürülmüştür. Tabletler, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiştir. FTIR sonuçları $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu değişiminde elde edilmiştir.

3.9.3. Enerji Dağılımının X-Ray Spektroskopisi (EDX)

Kompozit taşıyıcının içeriğindeki iyon analizi EDX ile incelenmiştir. Kompozit taşıyıcı iletken yapıştırıcı kullanılarak numune plakası üzerine yapıştırılmıştır. Ardından örneğin yüzeyi vakum atmosferinde metalik altınla kaplanmış ve yüzeye iletkenlik özelliği kazandırılmıştır. Örnekler SEM bölmesine yerleştirilmiş ve SEM görüntüleri çekilirken iyon analizleri yapılmıştır.

3.9.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin yüzey morfolojileri SEM (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir.. Kuru kompozit taşıyıcı ve boş kriyojel iletken yapıştırıcı ile SEM numune plakasına yapıştırılmıştır. Bu işlem

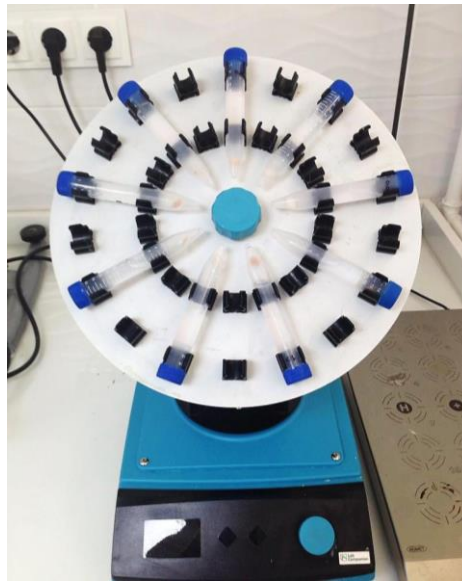
sonrası numune yüzeyi vakum şartlarında metalik altın ile kaplanmış ve yüzeye iletkenlik özelliği kazandırılmıştır. Örnekler SEM bölmesine yerleştirilerek farklı büyüme oranlarında görüntüleri alınmıştır.

3.9.5. Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR)

Kompozit taşıyıcıdaki manyetit varlığı, ESR spektroskopisi (Bruker X bant, ABD) ile 25°C'de 1000-5000 G manyetik alan aralığında bakılmıştır. ESR spektrumları manyetik alana bağlı soğurmanın birinci türevinin değişimi olarak gözlenmiştir.

3.10. Adsorpsiyon Çalışmaları

Sulu çözümlerden tirozin adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Tirozin adsorpsiyonuna pH (5,0-9,0), tirozin derişimi (0,01-2,0 mg/mL), sıcaklık (4-45°C), iyonik şiddet (0,0-1,0 M NaCl) ve döndürme hızı (5-20 rpm) gibi farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla tirozin adsorpsiyon çalışmaları Jeiotech (Lab Companion, ABD) rotatör yardımıyla kesikli sistemde 2 saat sürede kompozit taşıyıcı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Kompozit taşıyıcının adsorpsiyon kapasitesi 280 nm dalga boyunda UV Spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601, Japonya) kullanılarak bulunmuştur. Desorpsiyon işlemi 1 saat boyunca 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Sonrasında kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerın ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.



Şekil 3.7 Adsorpsiyon deneylerinin gerçekleştirildiği rotatörün optik fotoğrafı.

Gram kompozit taşıyıcının adsorpladığı tirozin miktarı (mg tirozin/g kompozit taşıyıcı) aşağıdaki eşitlik ile bulunmuştur:

$$Q_{\text{tirozin}} = [(C_0 - C_s) \cdot V] / m_{\text{kompozit taşıyıcı}} \quad (3.2)$$

Eşitliğe göre; Q_{tirozin} gram kompozit taşıyıcının adsorpladığı tirozin miktarını (mg/g) ifade eder. C_0 ve C_s ise başlangıçtaki ve adsorpsiyodan sonraki çözeltinin tirozin derişimini (mg/mL) vermektedir. Eşitlikteki V , adsorpsiyon çözeltisinin hacmini (mL), $m_{\text{kompozit taşıyıcı}}$ ise kullanılan kompozit taşıyıcının ağırlığını (g) ifade etmektedir.

3.10.1. pH'ın Etkisi

Aynı derişimdeki (0,1 mg/mL) tirozin örnekleri, farklı pH tampon çözeltileri (pH 5,0 asetat tamponu ve pH 6,0; 7,0; 7,4; 8,0; 9,0 fosfat tamponu) ile hazırlanmış ve kompozit taşıyıcı ile 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat süre ile etkileştirilmiştir. Böylelikle pH'ın adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Desorpsiyon işlemi 1 saat süre ile 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Ardından kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerın ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

3.10.2. Başlangıç Derişiminin Etkisi

Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcılar, 0,01-2,0 mg/mL derişimlerinde tirozin içeren pH 8,0 tampon çözeltileri ile 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat boyunca etkileştirilmiştir. Tirozin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Desorpsiyon işlemi 1 saat süre ile 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Ardından kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir.

Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerin ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

3.10.3. Sıcaklığın Etkisi

Tirozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için, kompozit taşıyıcı pH 8,0 fosfat tamponunda aynı tirozin miktarı (0,1 mg/mL) ile farklı sıcaklıklarda (4, 25, 37 ve 45°C) 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat süre ile etkileştirilmiştir. Desorpsiyon işlemi 1 saat süre ile 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Ardından kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerin ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

3.10.4. İyonik Şiddetin Etkisi

Tirozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için, kompozit taşıyıcı pH 8,0 fosfat tamponunda aynı tirozin miktarı (0,1 mg/mL) farklı tuz derişimlerinde (0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 ve 1,0 M NaCl) 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat süre ile etkileştirilmiştir. Desorpsiyon işlemi 1 saat süre ile 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Ardından kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm dalga boyunda UV-görünür bölge spektrofotometresiyle alınan absorbans değerleriyle tayin edilmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerin ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

3.10.5. Döndürme Hızının Etkisi

Tirozin adsorpsiyonuna döndürme hızının etkisini incelemek için, kompozit taşıyıcı pH 8,0 fosfat tamponunda aynı tirozin miktarı (0,1 mg/mL) farklı döndürme hızlarında (5, 10, 15 ve 20 rpm) 25°C' de 2 saat süre ile etkileştirilmiştir. Desorpsiyon işlemi 1 saat süre ile 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Ardından kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerin ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

3.11. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

Kompozit taşıyıcının tekrar kullanılabilirliğini belirleyebilmek için adsorpsiyon/desorpsiyon işlemleri aynı kompozit taşıyıcı kullanılarak pH 8,0 fosfat tamponunda aynı tirozin miktarı (0,1 mg/mL) ile 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat süre ile etkileştirilmiş ve bu döngü 8 kez tekrarlanmıştır. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerın ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

3.12. Seçicilik Çalışmaları

Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcıların seçiciliğini göstermek için triptofan ve fenilalanin amino asitleri yarışmacı amino asitler olarak seçilmiştir. Seçilen amino asitlerin 0,1 mg/mL derişiminde pH 8,0 fosfat tamponunda ayrı ayrı hazırlanan örnekleri kesikli sistemde 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat süre ile ayrı ayrı baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcı ile etkileştirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm dalga boyunda UV-görünür bölge spektrofotometresiyle alınan absorbans değerleriyle tayin edilmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerın ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

Fenilalanin ve triptofan için tirozine göre seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

Yarışmacı türlerin olduğu bir ortamda bir amino asitin kompozit taşıyıcıya adsorbe olmasını ifade eden seçicilik katsayısı Eşitlik 3.3 kullanılarak dengedeki adsorpsiyon verileriyle hesaplanabilir.

$$k = k_{\text{hedef amino asit}} / k_{\text{yarışmacı amino asit}} \quad (3.3)$$

Baskılanmış kompozit taşıyıcı ile diğer amino asitlerin k değerleri baskılanmanın ne kadar seçici olduğunu anlaşılmasını sağlar. Bağıl seçicilik katsayısını ifade eden k' değeri Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanır:

$$K' = k_{\text{Baskılanmış}} / k_{\text{Baskılanmamış}}$$

(3.4)

3.13. Gerçek Örnek Çalışmaları

Hazırlanan kompozit taşıyıcının gerçek örneklerde kullanılabilir olduğunun anlaşılabilmesi için yapay plazma, tükürük ve idrar örnekleri hazırlanmıştır. Yapay plazma, tükürük ve idrar örneklerinin her birinden 10 µL alınarak pH 8,0 fosfat tamponunda aynı tirozin miktarı (0,1 mg/mL) ile hazırlanmış örneklere eklenmiş ve kompozit taşıyıcı ile 15 rpm döndürme hızında 25°C' de 2 saat süre ile etkileştirilmiştir. Desorpsiyon işlemi 1 saat süre ile 0,1 M NaCl kullanılarak yapılmıştır. Ardından kompozit taşıyıcı saf su ile yıkanarak bir sonraki analize hazır hale getirilmiştir. Adsorplanan tirozin miktarı 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler 3'er defa tekrarlanmış ve 3 değerın ortalaması alınarak hata oranları eklenmiştir.

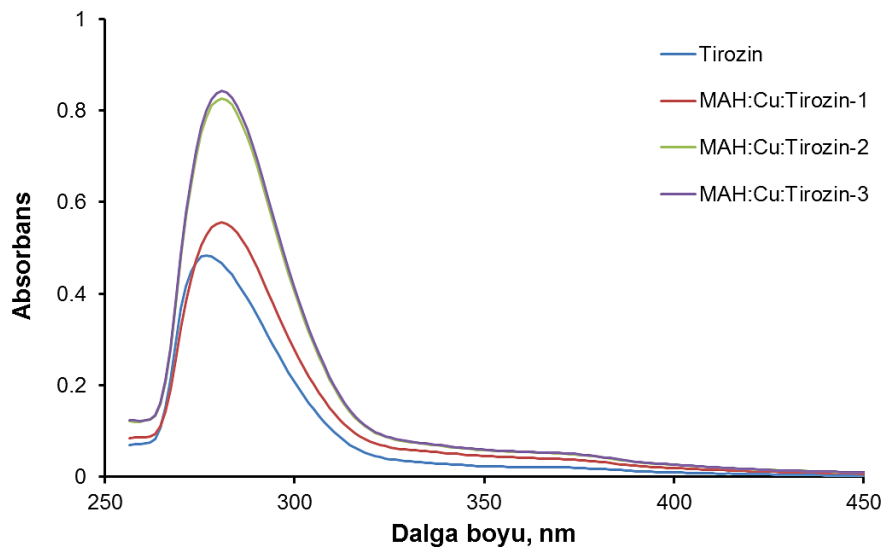
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön-Kompleksin Karakterizasyonu

N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) sulu çözeltiden ayrıca gerçek örneklerden tirozinin spesifik olarak saflaştırılabilmesi için fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. Şelat oluşturan MAH monomeri Cu^{2+} iyonuna farklı miktarlarda tirozin eklenerek ön-kompleksler oluşturulmuştur. Sadece tirozin, 10:10:1, 10:10:2 ve 10:10:3 oranlarında oluşturulan ön-kompleksler ayrı ayrı UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçümler yapılmıştır (Şekil 4.1). Optimum tirozin kalıp molekülü ve MAH:Cu monomer oranı 10:10:2 olarak belirlenmiştir. Bu orandan sonra absorbanda kayda değer bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Ön-kompleks oranı 10:10:2 olarak seçilmiştir. Polimerizasyon bu oran kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. UV-görünür bölge spektrofotometre cihazının optik fotoğrafı.



Şekil 4.2 MAH:Cu:Tirozin ön-komplekslerinin spektrofotometrik sonucu.

4.2. Manyetik Silika Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Manyetik silika mikrokürelerin yapısal analizi için FTIR, EDX, SEM ve ESR yöntemleri kullanılmıştır.

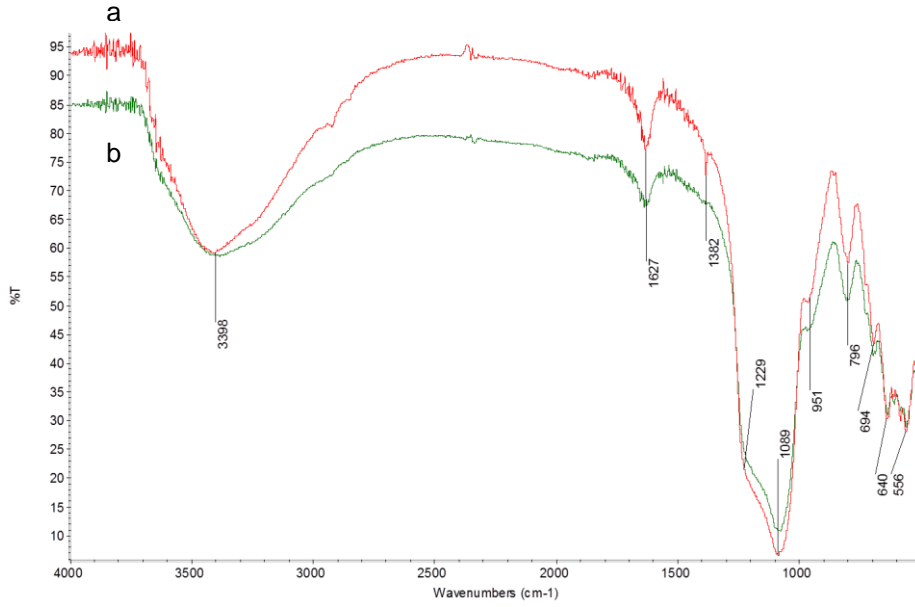
4.2.1. Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR)

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin Fourier transform infrared (FTIR) spektrumu, FTIR-ATR spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 FTIR-ATR spektrofotometre cihazının optik fotoğrafı.

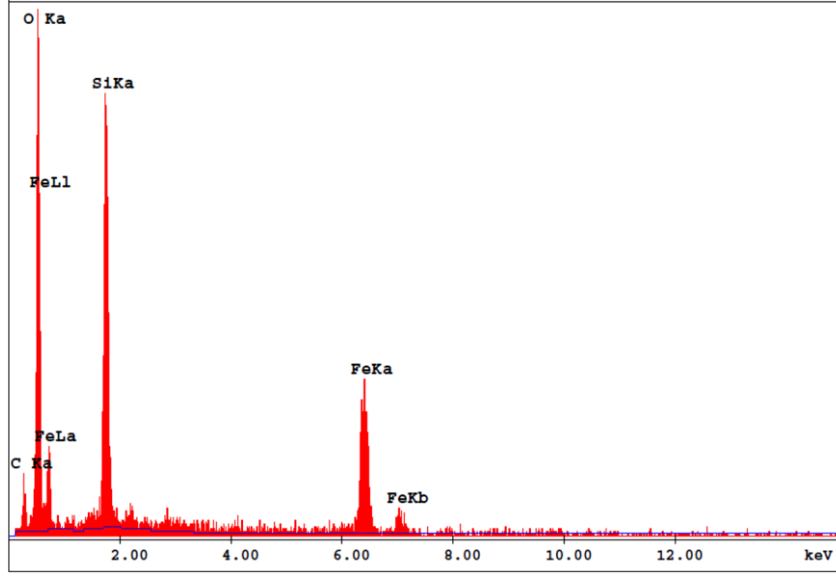
Şekil 4.4 sırası ile modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin FTIR-ATR analizini göstermektedir. Buna göre 3398 cm^{-1} 'de görülen geniş piklerin O-H gerilme bantlarına, 1627 cm^{-1} 'de görülen piklerin C-C gerilme bantlarına son olarak 1089 cm^{-1} 'de görülen piklerin Si-O-C gerilme bantlarına ait olduğu söylenebilir.



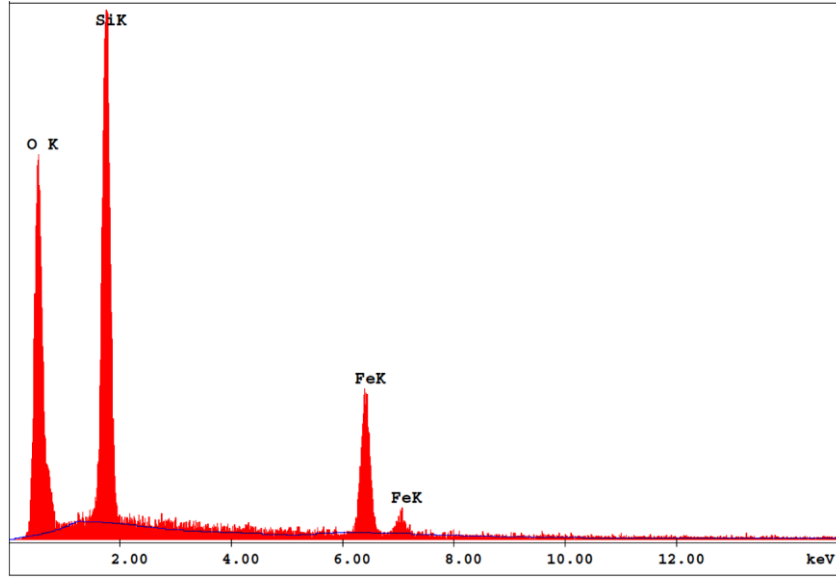
Şekil 4.4 Modifiye olmamış (a) ve modifiye olmuş (b) manyetik silika mikroküreler ait FTIR-ATR spektra sonucu.

4.2.2. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX)

Modifiye olmamış ile modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin elementel analizi EDX spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. EDX sonuçları modifiye olmamış ve olmuş silika mikroküreler içerisinde sırasıyla kütlece %24,9 ve %25,8 demir bulunduğunu göstermiştir. Yine modifiye olmamış ve modifiye silika mikroküreler içerisindeki silisyum oranı ise sırasıyla kütlece %18,9 ve %30,4'tür (Şekil 4.5-4.6). Bu sonuçlar yüzey modifikasyonunun silika mikrokürelerin demir tutma kararlılıklarını değiştirmediğini göstermiştir. Böylece hedef moleküllerin immobilizasyonunda modifiye silika mikrokürelerin manyetik taşıyıcı olarak başarı ile kullanılacakları görülmüştür. Ayrıca her iki örnekte de baskın yapının silika olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Modifiye olmamış manyetik silika mikrokürelerin EDX sonucu.



Şekil 4.6 Modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin EDX sonucu.

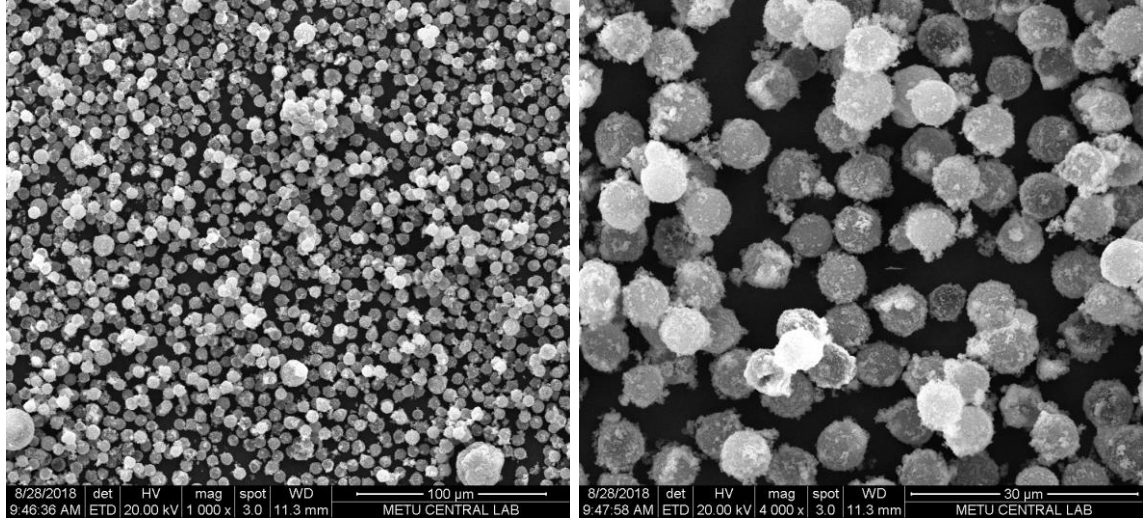
4.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Modifiye olmamış ile modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin yüzey morfolojileri SEM (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Farklı büyütme oranlarında görüntülenen modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin ortalama çapı 6,3 μm olan düzgün küresel, homojen ve eş boyutlu bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.

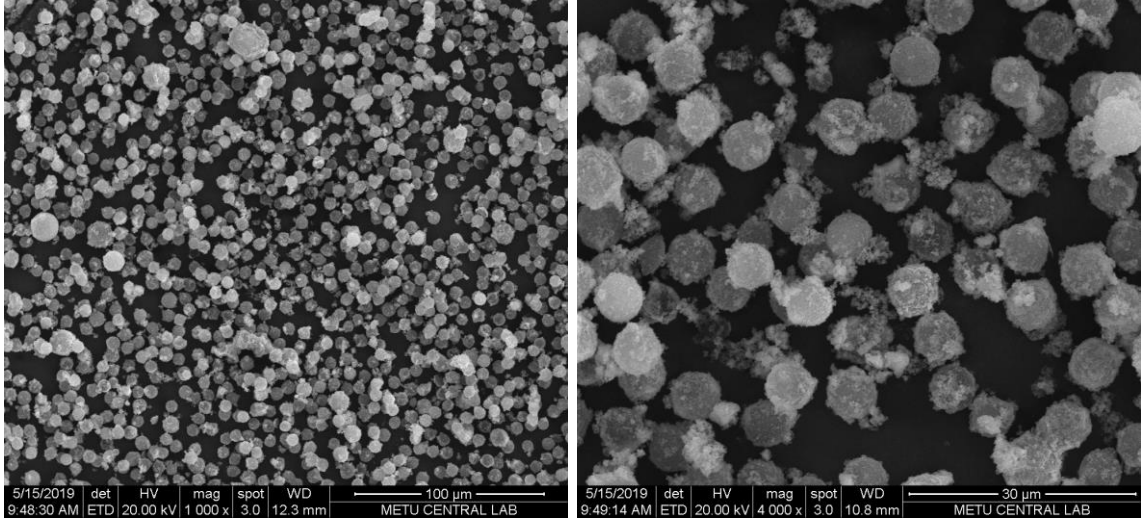
Ayrıca SEM görüntüleri mikroküre yüzeylerinin gözenekli bir yapıya sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin SEM görüntüleri Şekil 4.8'de ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.7 Taramalı elektron mikroskobu cihazının optik fotoğrafı.



Şekil 4.8 Modifiye olmamış manyetik silika mikrokürelerin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.



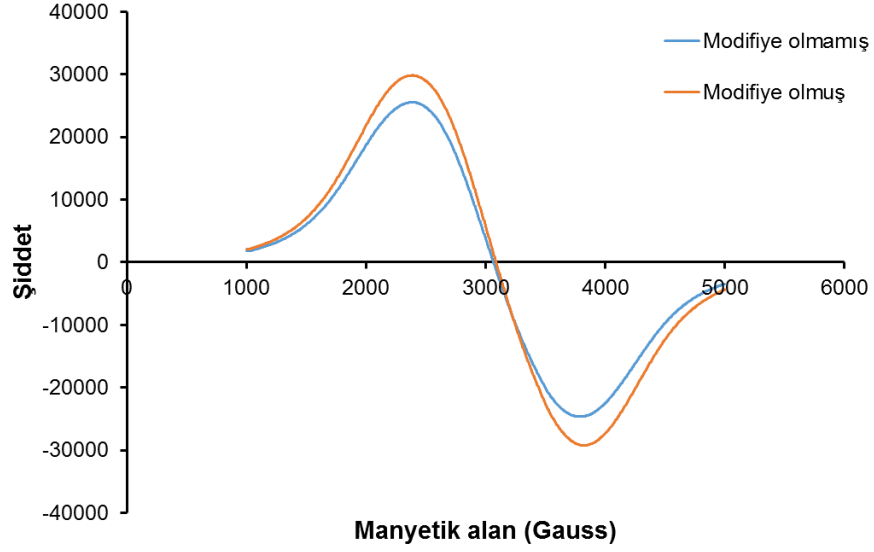
Şekil 4.9 Modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

4.2.4. Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (ESR)

Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerdeki manyetit varlığı, ESR spektroskopisi (Bruker X bant, ABD) ile belirlenmiştir (Şekil 4.10). Şekil 4.11'deki ESR spektrumlarına göre modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerde sırasıyla 3065 ve 3084 Gauss (G) manyetik alan altında soğurma rezonansı gözlenmiştir. Bu değerler literatürde manyetit için bilinen değerlerle uyuşmaktadır. Ayrıca spektrumlardaki en düşük şiddet değerine denk gelen g-faktörleri yine sırasıyla 2,272 ve 2,258 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen eğrilerin simetrik olması modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin kolayca manyetik alanı adsorbe edebileceğini ve bırakabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.10 Elektron spin rezonans cihazının optik fotoğrafı.



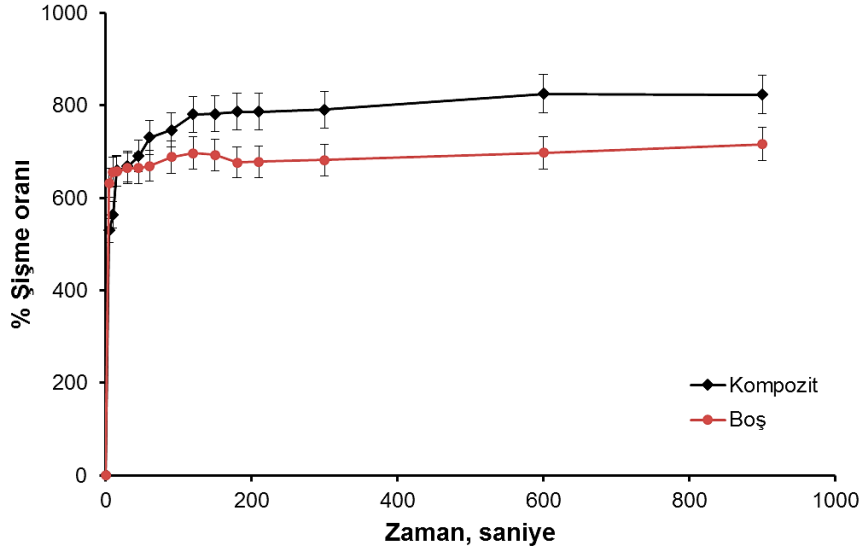
Şekil 4.11 Modifiye olmamış ve modifiye olmuş manyetik silika mikrokürelerin ESR spektra sonucu.

4.3. Kompozit Taşıyıcının Karakterizasyonu

Kompozit taşıyıcılar, şişme testi, FTIR, EDX, SEM ve ESR ile karakterize edilmiştir.

4.3.1. Şişme Testi

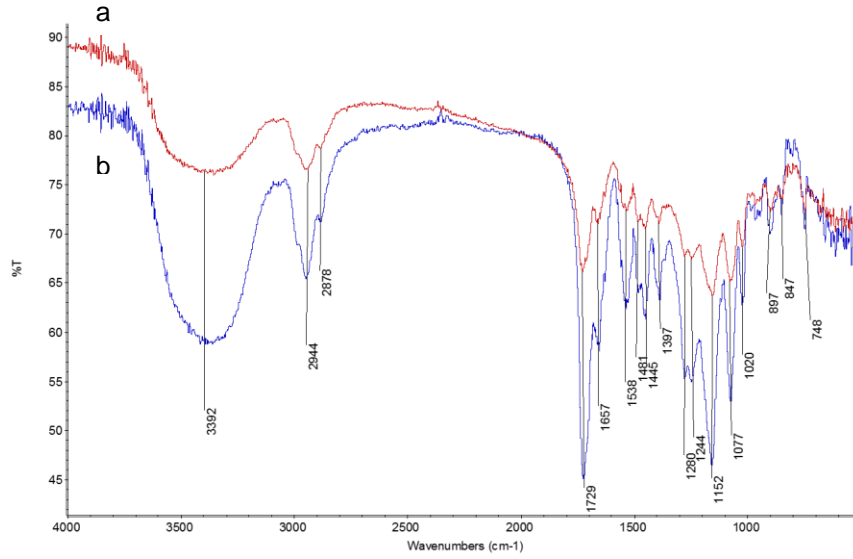
Şişme testi ile kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin su tutabilme performansının zamana bağlı değişimi belirlenmiştir (Şekil 4.12). Şekilden görüldüğü gibi hazırlanan polimerleri yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Bir başka deyişle hidrofilik bir yapıdadırlar. Su içerisinde şişme oldukça hızlı gerçekleşmiş ve 5 saniye gibi kısa bir sürede kompozit taşıyıcının ağırlığının 6 kat arttığı gözlenmiştir. Yaklaşık 200 saniye içerisinde denge şişme değerine ulaşılmıştır. Kompozit taşıyıcının şişme oranı 5,52 g H₂O/g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar kompozit kriyojelin su tutma performansının boş kriyojele göre daha yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12 Tirozin baskılanmış kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin şişme testi sonuçları.

4.3.2. Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR)

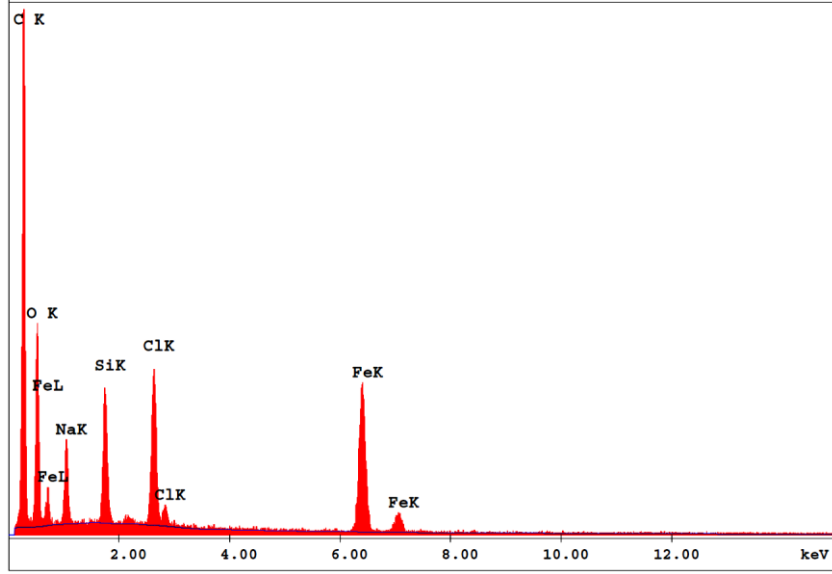
Boş kriyojelin ve kompozit taşıyıcının Fourier transform infrared (FTIR) spektrumu, FTIR-ATR spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile alınmıştır. Şekil 4.13'de gösterildiği gibi sırası ile boş kriyojel ve kompozit taşıyıcıya ait 3992 cm^{-1} dalga boyundaki ve 2944 cm^{-1} dalga boyunda piklerin N-H, C-H gerilme bantlarından kaynaklandığı görülmektedir. Ayrıca 1729 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} ve 1538 cm^{-1} dalga boylarındaki piklerin şiddetlenip kayması kompozit taşıyıcıya MAH'ın girdiğini ve polimerizasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir.



Şekil 4.13 Boş kriyojelle (a) ve tirozin baskılanmış kompozit taşıyıcıya (b) ait FTIR-ATR spektra sonucu.

4.3.3. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX)

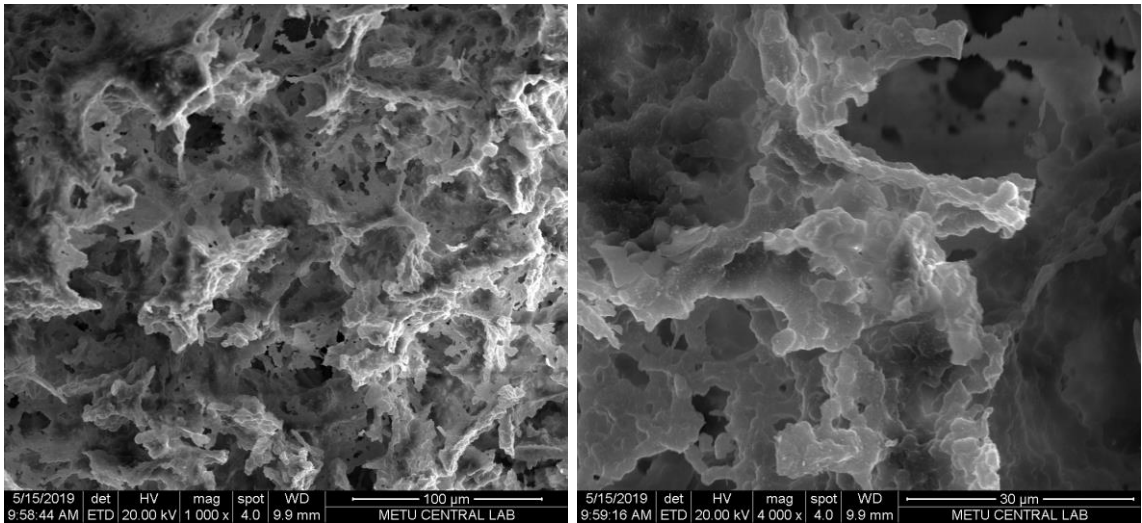
Kompozit taşıyıcının elementel tayini EDX spektroskopisi ile yapılmıştır. EDX sonuçları kompozit taşıyıcının yapısında %5,72 demir ve %7,03 silisyum olduğunu göstermektedir (Şekil 4.14). Bu sonuç kompozit taşıyıcısında uzun süre sulu ortamda saklanmasına karşın modifiye manyetik silika mikrokürelere benzer şekilde demir tutma kararlılığını koruduğunu göstermiştir. Böylece hedef moleküllerin immobilizasyonunda manyetik taşıyıcı olarak başarıyla kullanılabileceği görülmüştür. Ancak EDX sonucu malzeme içerisinde desorpsiyonda kullanılan tuzun düşük miktarda safsızlık olarak kaldığını göstermiştir.



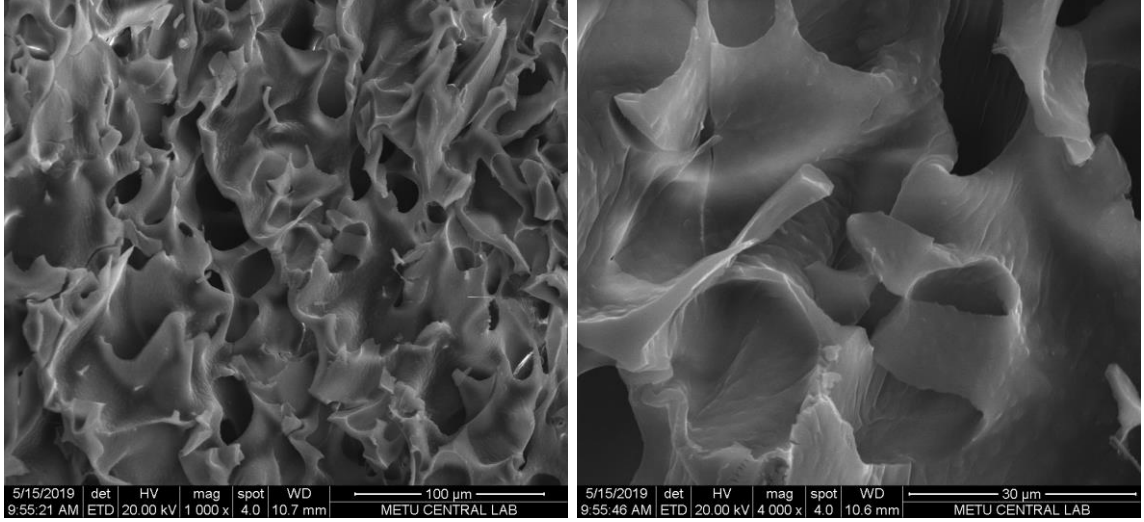
Şekil 4.14 Kompozit taşıyıcının EDX sonucu.

4.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin yüzey morfolojileri SEM (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) cihazıyla belirlenmiştir. SEM fotoğraflarından görüldüğü gibi her iki polimerde süpermakrogözenekli kesintisiz bir yapıya sahiptir (Şekil 4.15-4.16). Bu gözenekler sayesinde viskozitesi yüksek sıvıların polimerden akışı için uygun oldukları sonucuna varılmıştır. Ayrıca kompozit taşıyıcı ile boş kriyojel arasındaki pürüzlülük farkı manyetik silika mikrokürelerin başarı ile polimere gömüldüğünü göstermiştir. Gömülen mikrokürelerin pürüzlülüğü artırması kompozit taşıyıcının yüzey alanının artmasını sağlamıştır.



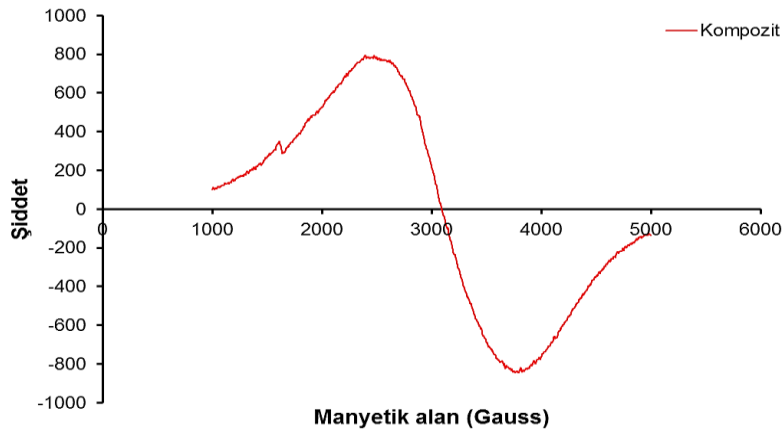
Şekil 4.15 Kompozit taşıyıcının farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.



Şekil 4.16 Boş kriyojelin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

4.3.5. Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (ESR)

Kompozit taşıyıcıdaki manyetit varlığı, ESR spektroskopisi (Bruker X bant, ABD) ile incelenmiştir. Şekil 4.17'deki ESR spektrumunda kompozit taşıyıcının 3088 Gauss (G) manyetik alan altında rezonans soğurması göstermiştir. Bu değer literatürde manyetit için bilinen değerlerle uyumaktadır Ayrıca spektrumlardaki en düşük şiddet değerine denk gelen g-faktörü 2,252 olarak ölçülmüştür. Elde edilen eğrinin simetrik olması kompozit taşıyıcının kolayca manyetik alanı absorbe edebileceğini ve bırakabileceğini göstermiştir. Bu özellik, biyomedikal ve biyokromatografik uygulamalarda manyetik malzemelerin tasarlanması ve kullanılması için çok yararlı ve kullanışlı olduğunu göstermektedir.



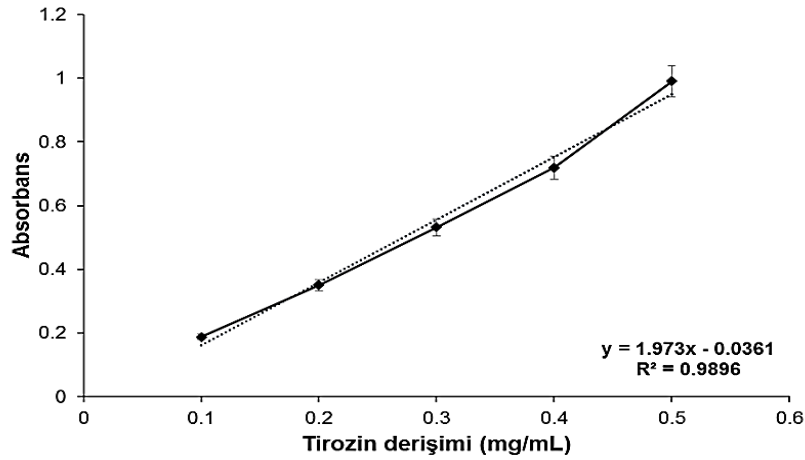
Şekil 4.17 Baskılanmış kompozit taşıyıcının ESR spektrum sonucu.

4.4. Adsorpsiyon Çalışmaları

Kompozit taşıyıcının optimum adsorpsiyon koşullarının belirlenmesi için sulu çözeltiden yapılan tirozin adsorpsiyonu sonuçları bu kısımda aktarılmıştır. Yapılan deneylerle; ortamın pH'sının, başlangıç tirozin konsantrasyonunun, döndürme hızının, ortam sıcaklığının ve iyonik siddetin adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak kompozit taşıyıcı ile tirozin arasındaki etkileşimin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinden hangisine uygun olduğu incelenmiştir.

Kompozit taşıyıcının tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için, aynı kompozit taşıyıcı ile ard arda 8 kez tirozin adsorpsiyonu ve desorpsiyonu çalışmaları yapılmıştır. Kompozit taşıyıcıya tirozin baskılanmasının ne kadar seçici olduğunun anlaşılması için yarışmacı amino asitlere karşı seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları hesaplanmıştır.

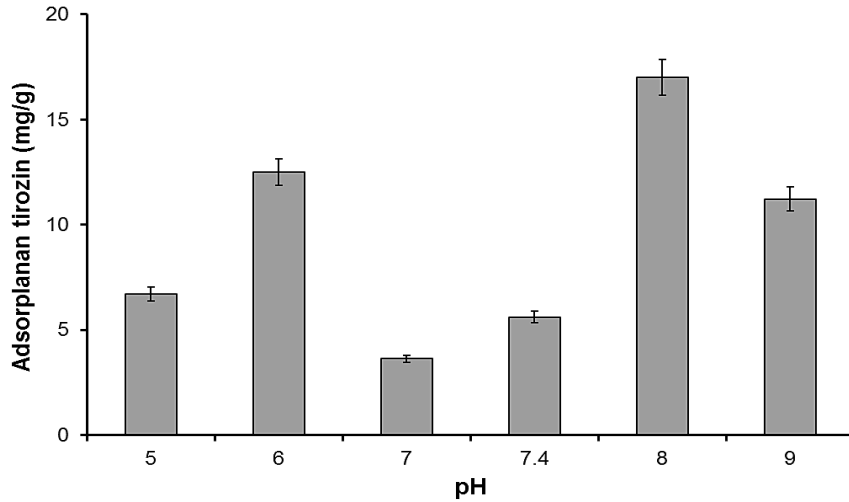
Kalibrasyon eğrisi derişimi bilinen tirozin çözeltisi kullanılarak çözeltideki tirozin derişimiyle numunenin derişimini karşılaştırabilmek için elde edilmiştir. Şekil 4.18'e göre farklı derişimlere sahip tirozin örnekleri 280 nm'de yaklaşık %99 doğrulukla absorbans yapmaktadır. Tüm deneylerde hesaplanan absorplama kapasitesi (Q) miktarları kalibrasyon grafiği eğrisinden elde edilen $y=1.973x-0.0361$ eşitlik kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 4.18 Farklı derişimlere sahip tirozin çözeltileri için 280 nm'de alınan spektrofotometre sonuçları ile çizilen kalibrasyon grafiği.

4.4.1. pH'in Etkisi

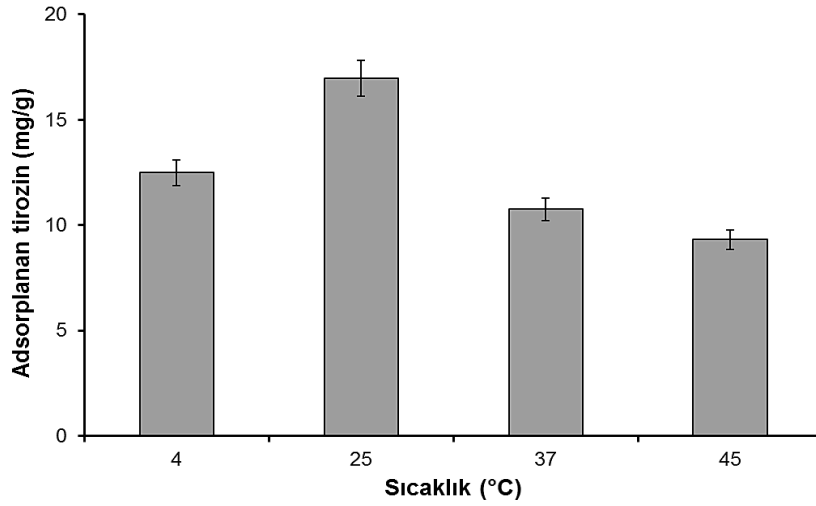
pH'in baskılanmış kompozit taşıyıcıya tirozin adsorpsiyonunu ne şekilde etkilediği farklı pH'larda (pH 5,0-9,0) belirlenmiştir (Şekil 4.19). Elde edilen verilere göre baskılanmış kompozit taşıyıcıya en yüksek tirozin adsorpsiyonu pH 8,0 fosfat tamponu varlığında gerçekleşmiştir. Tirozinin bu pH'daki moleküler konformasyonu tirozin baskılanmış kompozit taşıyıcılar tarafından daha iyi tanımlanmış ve tirozin daha yüksek afinite ile bağlanmıştır. Tirozin, izoelektrik noktası 5,7 olduğundan pH 8,0 ortamında eksi yüklenerek Cu^{2+} iyonu ile elektrostatik olarak kolayca etkileşmiştir. Buna ek olarak, tirozinin izoelektrik noktasına yakın olan pH 6,0 tampon çözeltisinde kısmi yüksüz olarak yapısındaki hidroksil grupları sayesinde hidrojen bağları yapmış ve adsorpsiyon kapasitesinde yükselme gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmalar pH 8,0 fosfat tamponunda yürütülmüştür.



Şekil 4.19 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna pH'in etkisi. Deney koşulları: Tirozin derişimi: 0,1mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.

4.4.2. Sıcaklığın Etkisi

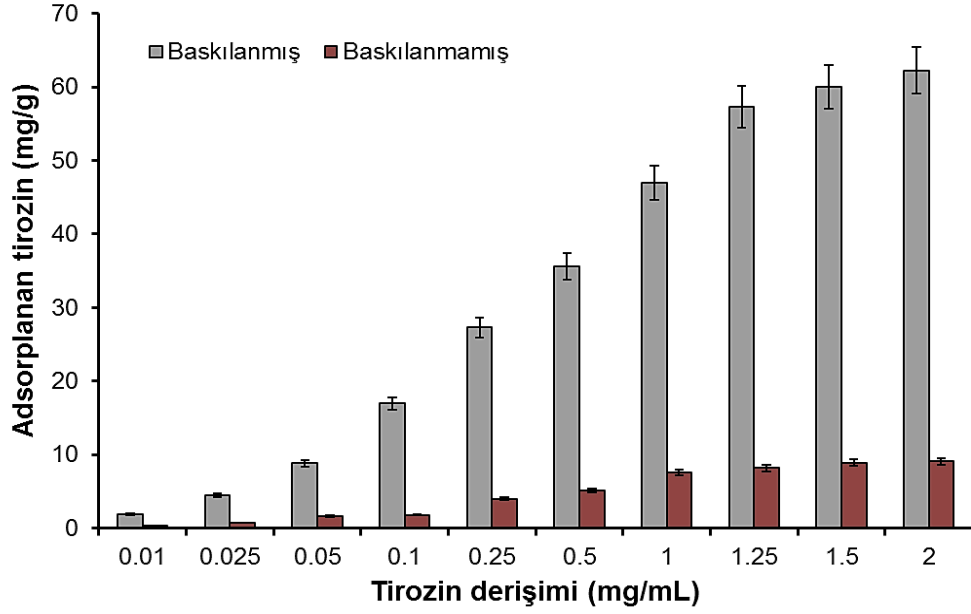
Baskılanmış kompozit taşıyıcısına tirozin adsorpsiyonunun farklı sıcaklıklardaki değişimini belirlemek amacıyla tirozin adsorpsiyonu farklı sıcaklıklar altında (4-45°C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20'de görüleceği gibi maksimum adsorplanan tirozin miktarı (16,96 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı) 25°C'de gözlenmiştir. Sıcaklık artışı devam ettikçe tirozin ile kompozit taşıyıcı arasındaki etkileşimler zayıflamaya başladığından adsorplanan tirozin miktarı da azalmıştır.



Şekil 4.20 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi; Deney koşulları: pH: 8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Döndürme hızı: 15 rpm.

4.4.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi

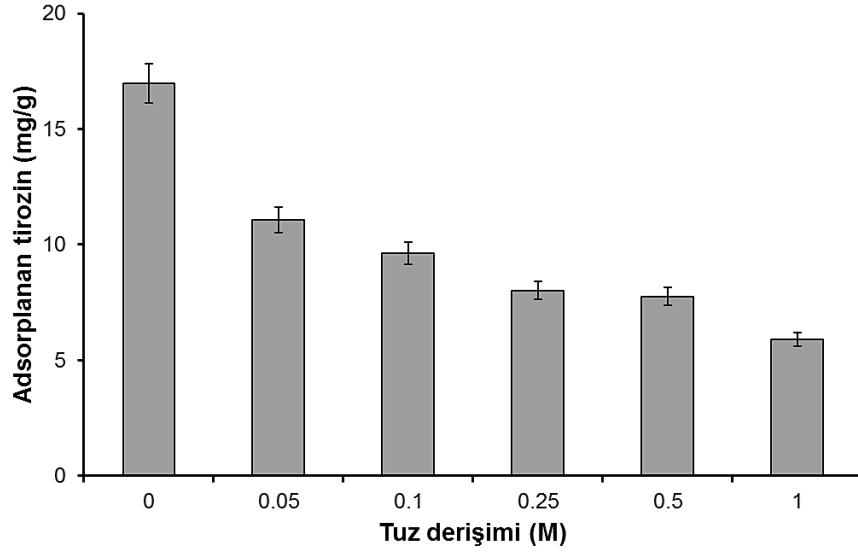
Başlangıç tirozin derişiminin baskılanmış ile baskılanmamış kompozit taşıyıcılara tirozin adsorpsiyonuna etkisini görmek için pH 8,0 fosfat tamponu içerisinde farklı derişimlerde (0,01-2,0 mg/mL) tirozin çözeltileri kullanılarak tirozin adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.21'den anlaşıldığı üzere, çözeltilerin tirozin derişimi arttıkça, birim kompozit taşıyıcının adsorpladığı tirozin miktarı 1,0 mg/mL başlangıç tirozin derişimine ulaşılana kadar hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Tirozinin adsorplanabileceği seçimli bölgelerin azalmasıyla 2,0 mg/mL başlangıç tirozin değerinde plotaya ulaşılmıştır. Bu da moleküler baskılama yöntemi ile tirozin için oluşturulan spesifik tanıma bölgelerinin tirozin molekülü ile dolduğunu ve bu derişimde doyumluğa ulaştığını göstermiştir. Ayrıca baskılanmış kompozit taşıyıcının maksimum adsorplama kapasitesi 62,27 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak hesaplanırken tirozin olmadan hazırlanan baskılanmamış kompozit taşıyıcının maksimum adsorplama kapasitesi sadece 9,05 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.21 Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcıların tirozin adsorpsiyonuna tirozin derişiminin etkisi. Deney koşulları: pH: 8,0; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.

4.4.4. İyonik Şiddetin Etkisi

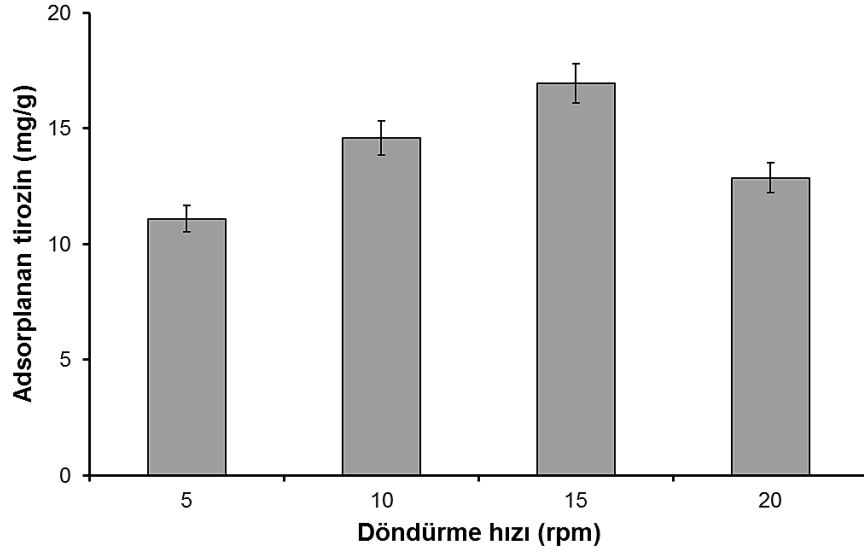
Baskılanmış kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna farklı iyonik şiddetlerin etkisini araştırmak için; adsorpsiyon deneyleri farklı derişimlerde (0,0-1,0 M) NaCl varlığında pH 8,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan tirozin örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NaCl derişiminin artmasının tirozin adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.22'de verilmiştir. Adsorpsiyon ortamına tuz ilavesi amino asitlerde hidrofobik etkileşimlerin artmasına sebep olur. Ancak tirozin yapısındaki hidroksil grupları nedeniyle göreceli hidrofobik bir amino asit olduğundan yani en az hidrofobik özellik gösteren amino asitlerden biri olduğundan şekilde de görüldüğü gibi NaCl derişimi arttıkça tirozin adsorpsiyonu düşmektedir.



Şekil 4.22 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisi. Deney koşulları: pH: 8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.

4.4.5. Döndürme Hızı Etkisi

Aynı derişimdeki (0,1 mg/mL) tirozin örneklerinin farklı döndürme hızlarında (5-20 rpm) yapılan adsorpsiyon deneylerinde tirozin adsorpsiyon kapasitesinin (16,96 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı) maksimum 15 rpm döndürme hızı ile elde edildiği gözlenmiştir. Şekil 4.23'de değişen döndürme hızı ile adsorpsiyon kapasiteleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu ilişki şu şekilde açıklanabilir. Döndürme hızının artması kompozit taşıyıcı ile tirozinin etkileşimini hızlandırmakta dolayısıyla adsorpsiyonu artırmaktadır. Ama döndürme hızı gereğinden fazla arttığında tirozin ile kompozit taşıyıcı yeterince birbirini yakalayamadığından etkileşememektedir.



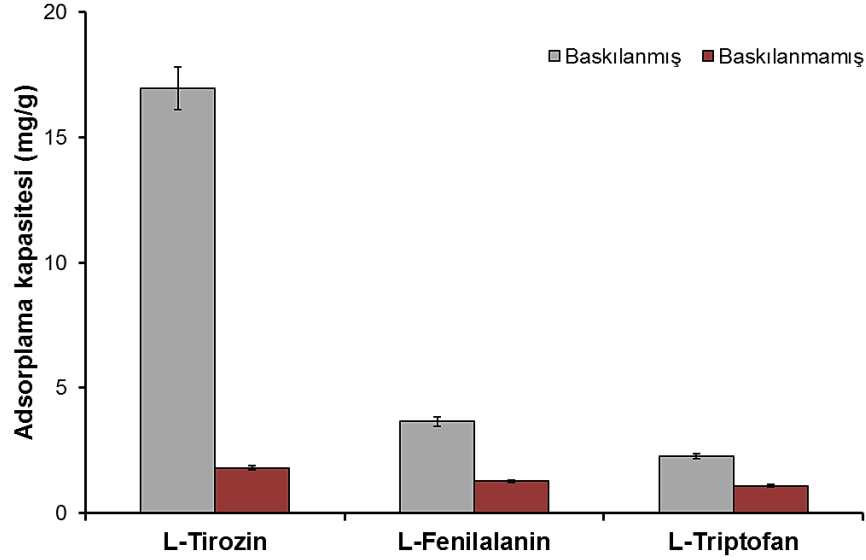
Şekil 4.23 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonuna döndürme hızının etkisi. Deney koşulları: pH: 8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C.

4.5. Seçicilik Çalışmaları

Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcı ile seçicilik çalışmaları aromatik amino asitler sınıfına giren diğer amino asitler (triptofan ve fenilalanin) kullanılarak yapılmıştır. Tirozin amino asitinin izoelektrik noktası 5,7 ve molekül ağırlığı 181,19 Da iken diğer yarışmacı aminoasitler olan triptofan ve fenilalanin için bu değerler sırası ile 5,9 ve 204,23 Da ve 5,5 ve 165,19 Da'dur. Benzer izoelektrik noktalara ve yakın moleküler ağırlıklarına sahip olmasına rağmen baskılanmış kompozit taşıyıcının tirozin adsorplama kapasitesi fenilalanine göre 4,65 kat iken triptofana göre ise 7,44 kat daha fazladır. Ayrıca baskılanmamış kompozit taşıyıcının üç amino asite karşı birbirine yakın adsorplama kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

Buna ek olarak, Şekil 4.24'te görüldüğü gibi aynı derişimde (0,1 mg/mL) tirozin örnekleri ayrı ayrı baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcı ile etkileştirildiğinde adsorplama kapasitesinin 16,96 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı'dan 1,81 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı'ya düştüğü gözlenmiştir. Tablo 4.1'de hesaplanan tüm katsayılar detayları ile gösterilmiştir. Bağlı seçicilik katsayıları fenilalanin için 3,26 iken triptofan için de 4,48'dir. Bağlı seçicilik değeri 1'in üzerindeyse baskılama işlemi etkilidir. Dolayısıyla bu sonuçlara göre kompozit

taşıyıcıya yapılan baskılama işlemi etkilidir. Elde edilen tüm bu sonuçlara göre sentezlenen kompozit taşıyıcının tanıma bölgeleri tirozine karşı oldukça yüksek seçicilik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.24 Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcıların farklı amino asitlere göre adsorplama kapasiteleri. Deney koşulları: pH:8,0; Amino asit derişimleri: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.

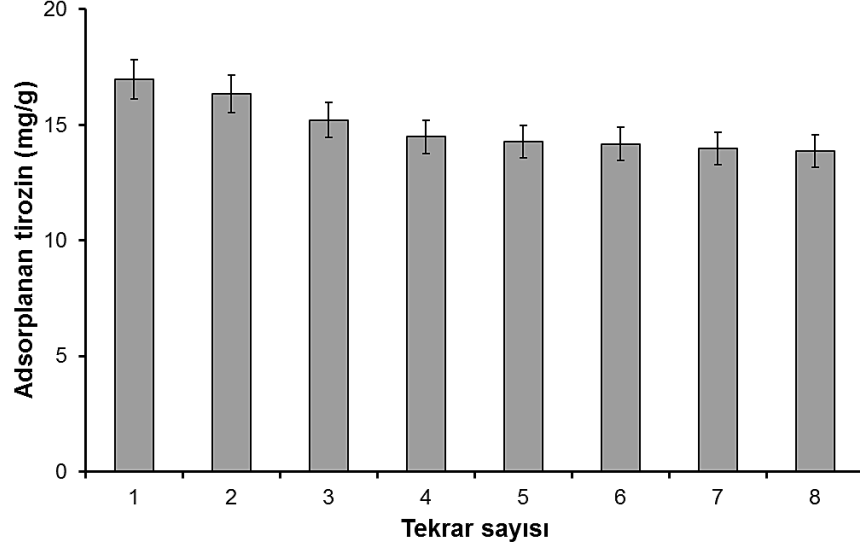
Tablo 4.1 Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcılara ait seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.

	Baskılanmış	k	Baskılanmamış	k	k'
L-Tirozin	16.96		1.81		
L-Fenilalanin	3.65	4.65	1.27	1.43	3.26
L-Triptofan	2.28	7.44	1.09	1.66	4.48

4.6. Tekrar Kullanılabilirlik

Biyomolekül saflaştırma çalışmalarında üretilen malzemenin tekrar kullanılabilir olması önemlidir. Malzemin tekrar kullanılabilir olması maliyeti önemli ölçüde düşüreceğinden aranan bir özelliktir. Bu amaçla aynı kompozit taşıyıcı ile aynı derişimde (0,1 mg/mL) 8 tirozin örneği ayrı ayrı 2 saat süreyle kesikli sistemde etkileştirilmiş ve her seferinde adsorpsiyon kapasitesinde düşüş olup olmadığı

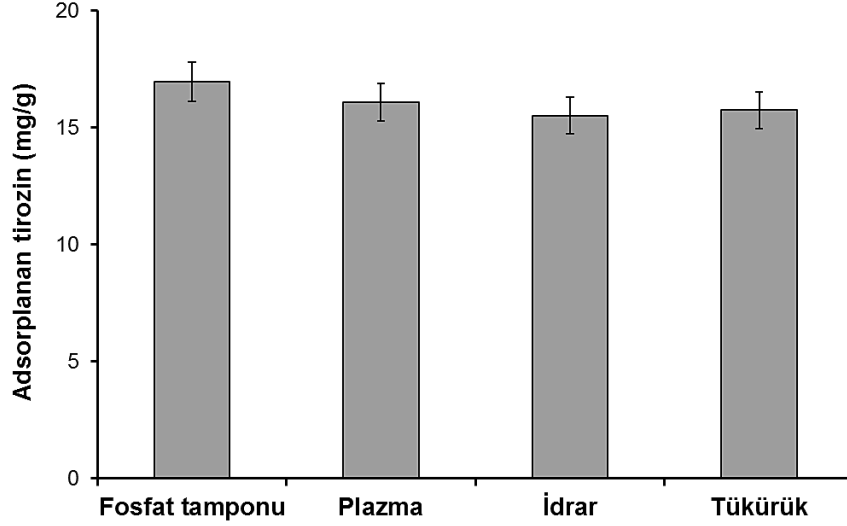
araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 8 döngü sonunda kompozit taşıyıcı adsorpsiyon kapasitesinde sadece 3,1 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı'lık bir düşüş gerçekleşmiştir (Şekil 4.25). Bu değer ihmal edilebilir bir düzeydedir ve kompozit taşıyıcının kapasitesinde önemli bir azalma olmadan defalarca kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.25 Kompozit taşıyıcıya tirozin adsorpsiyonuna tekrar kullanılabilirlik etkisi. Deney koşulları: pH:8,0; Tirozin derişimi: 0,1 mg/mL; Sıcaklık: 25°C; Döndürme hızı: 15 rpm.

4.7. Gerçek Örnek Çalışmaları

Baskılanmış kompozit taşıyıcı ile yapay idrar, yapay plazma ve yapay tükürük örneklerinden tirozin adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.26'da elde edilen sonuçlar kompozit taşıyıcının sadece sulu ortamda değil yapay plazma, yapay idrar ve yapay tükürük gibi kompleks ortamlarda da tirozin adsorpsiyonu yapabildiğini göstermiştir. Aynı ortamdaki diğer moleküller kompozit taşıyıcıdaki bağlanma bölgelerini kısmi bloke ederek tirozinin bağlanmasını güçleştirmiş ve adsorplama kapasitelerinde düşüşler gözlenmiştir.



Şekil 4.26 Kompozit taşıyıcının fosfat tamponu, yapay plazma, idrar ve tükürük örneklerinde tirozin adsorpsiyonu sonuçları.

4.8. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Adsorpsiyon izoterm modeli, tirozinin kompozit taşıyıcı ile etkileşiminin anlaşılması için belirlenmiştir. Bu amaçla Langmuir ile Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri kullanılmıştır. Adsorpsiyon izoterm modeli denge anında tirozin derişimiyle katı faza adsorplanan tirozin arasındaki ilişkiyi tanımlar.

Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline göre her bir adsorpsiyon bölgesi sadece bir moleküle bağlanabilir. Bağlanma bölgelerinin enerji düzeylerinin eşit olduğu ve yakın bağlanma bölgelerine adsorblanan moleküllerin birbiri ile etkileşmediği varsayılır [79]. Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli Eşitlik 4.1 ile tanımlanabilir. Fazların dengede olduğu anlardaki veriler eşitliğe uygulanarak doğrusal bir grafik elde edilirse Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin uygulanabilir olduğu görülür.

$$1/Q_{\text{denge}} = 1/Q_{\text{maksimum}} + 1/Q_{\text{maksimum}} \cdot b \cdot C_{\text{denge}} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikteki; Q_{denge} , kompozit taşıyıcıya adsorblanan tirozin miktarını (mg/g) ifade etmektedir. C_{denge} dengeki tirozin derişimini (mg/mL) verirken b , Langmuir sabitini (mL/mg) ve q_{maksimum} , teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) ifade eder.

Tirozin adsorpsiyonunun deneysel verilerinin Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin uygulanması ile çizilen grafik Şekil 4.27’de aktarılmıştır.

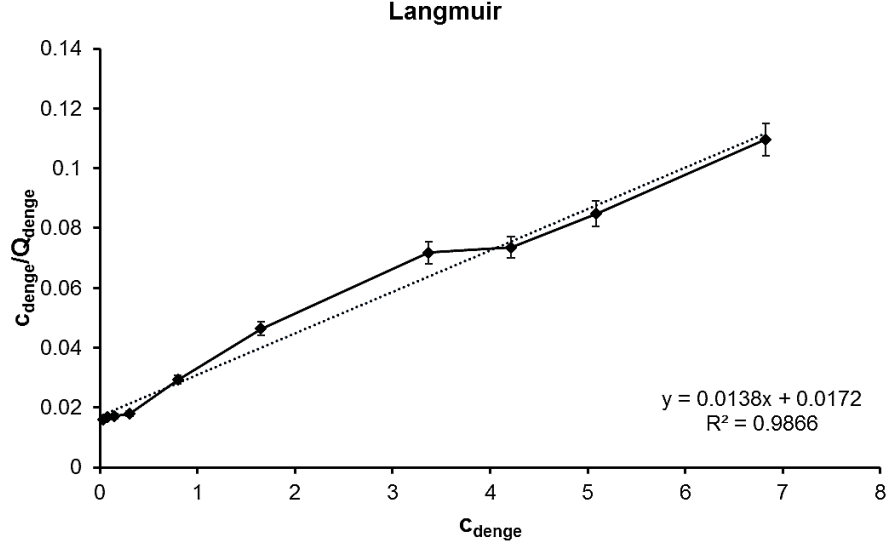
Kompozit taşıyıcıyla tirozin arasındaki etkileşimi tanımlayabilecek başka bir model ise Freundlich adsorpsiyon izoterm modelidir. Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline göre adsorplanan molekülün adsorbent yüzeyine bağlanma enerjisi yakındaki bağlanma bölgelerinin dolu olup olmamasına göre değişir. [80]. Freundlich adsorpsiyon izoterm modelini ifade eden eşitlik şöyledir;

$$Q = K_f \cdot C_{\text{denge}}^{1/n} \quad (4.2)$$

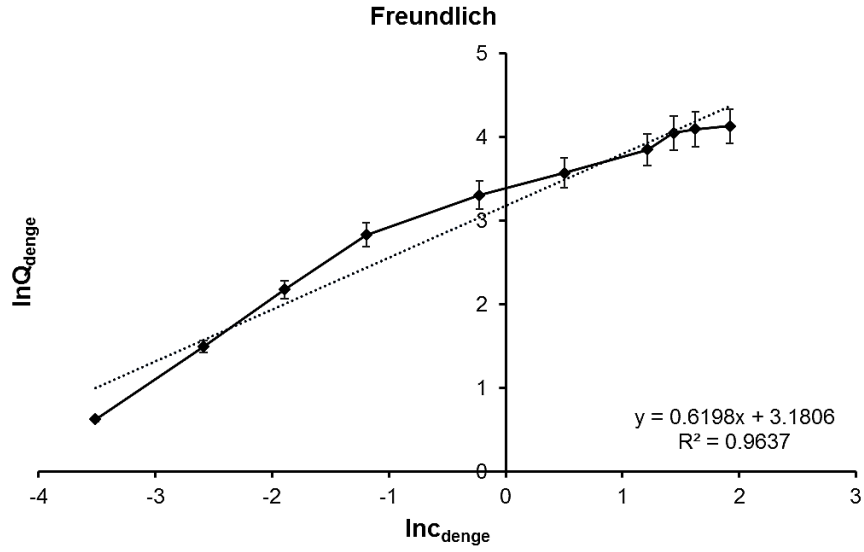
Yukarıdaki eşitlikteki; Q, adsorpsiyon miktarını (mg/g), C_{denge} ise tirozin derişimi (mg/mL) ifade eder. K_f adsorpsiyon kapasitesini gösterirken $1/n$, adsorpsiyon şiddetini gösterir. Bu eşitliğin logaritmasının alınması eşitliği daha kolay kullanılabilir hale getirir;

$$\ln Q = \ln K_f + 1/n \cdot \ln C_{\text{denge}} \quad (4.3)$$

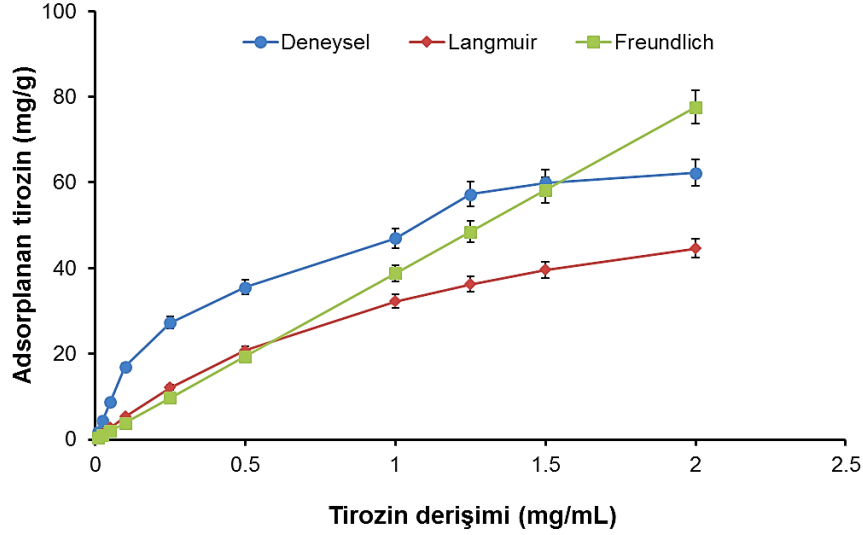
Tirozin adsorpsiyonu için elde edilen deneysel verilere Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli uygulanarak çizilen grafik Şekil 4.28’de verilmiştir. Ayrıca deneysel adsorplama kapasitesi ile adsorpsiyon izoterm modellerinin adsorplama kapasitesi kıyaslaması Şekil 4.29’da verilmiştir. Tablo 4.2 adsorpsiyon izoterm modellerinin sabitlerini göstermiştir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında deneysel verilere göre en uygun model Langmuir adsorpsiyon izoterm modelidir ($R^2 = 0,9866$). Elde edilen sonuca göre; hazırlanan kompozit taşıyıcının yüzeyindeki tirozin bağlanma bölgeleri homojen bir dağılıma sahiptir. Ayrıca bağlanma bölgeleri tek tabakalıdır ve eş enerjiliye sahiptir. Adsorplanan tirozin komşu bağlanma bölgelerindeki tirozinlerle minimum etkileşimdedir.



Şekil 4.27 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonunu deneysel verileri kullanılarak çizilen Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli grafiği.



Şekil 4.28 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonunu deneysel verileri kullanılarak çizilen Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli grafiği.



Şekil 4.29 Kompozit taşıyıcının tirozin adsorpsiyonunun deneysel verileri ile adsorpsiyon izoterm modelleri kıyaslaması.

Tablo 4.2 Langmuir ile Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri için hesaplanan sabitler.

	Langmuir			Freundlich		
Q_{denge} (mg/g)	Q_{maks} (mg/g)	b (mL/mg)	R^2	K_f	$1/n$	R^2
62.27	72.46	0.8	0.987	24.06	0.62	0.964

4.9. Tirozin Saflaştırılması ile İlgili Literatür Özeti

Tablo 4.3 incelendiğinde Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada midyeden esinlenerek, açık tübüler kapiler elektroforez için sabit faz olarak moleküler baskılanmış manyetik polimer sentezlemiş ve bu polimeri enantiyomerik ayırma amaçlı kullanmışlardır. Moleküler baskılanmış polimerler, tek basamakta manyetit (Fe_3O_4) nanoparçacıklar ve fonksiyonel monomer olarak dopamin kullanılarak sentezlenmiştir. L-triptofan, L-tirozin, glisil L-fenilalanin kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Sentezlenen manyetik polidopamin film miknatıslar yardımıyla mikrokanallar oluşturacak şekilde katlanmıştır. Sentezlenen baskılanmış polidopamin filmler SEM ve FTIR ile karakterize edilmiştir. 3,5 mM D-tirozin ve 7 mM L-tirozin kullanılarak enantiyomerik ayırma yapılmıştır. Tekrar kullanılabilirlik için 6 tekrar yapılmış ve adsorpsiyon kapasitesinin kayda değer bir oranda düşmediği belirtilmiştir [81].

İkinci çalışmada Saumya ve arkadaşları bakır oksit modifiye moleküler baskılanmış polipirol film ile yerinde tirozin teşhisi için voltametrik bir sensör geliştirmişlerdir. 1×10^{-8} ve 8×10^{-6} M aralığında tirozin derişimlerinde tasarlanan sensörden cevap alınmıştır. Tirozinin elektrokatalitik davranışlarını anlamak için voltametrik ve kronoamperometrik deneyler yapılmıştır. Sensörün elektron transfer katsayısı, difüzyon katsayısı ve yük transfer oranı belirlenmiştir. Tasarlanan sensörün yüksek seçicilikle yapay ve gerçek idrardan başarıyla tirozin tayin edebildiği görülmüştür. Seçicilik çalışmaları için yarışmacı amino asit olarak D-tirozin, serin, triptofan, sistein, valin, fenilalanin ve lösin kullanılmıştır [82].

Ferreira ve arkadaşları ise tirozinin tutulması ve kontrollü salınımı için moleküler baskılanmış polimerler geliştirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Polimerlerin sentezi için monomer olarak metakrilik asit, akrilamid, itakonik asit ve vinil benzoik asit kullanılmıştır. Polimerizasyon iki farklı organik çözücüde gerçekleştirilmiştir. Bunlar modifiye etanol ve modifiye dimetil sülfoksittir. Seçicilik çalışmaları 3-nitro-tirozine karşı yapılmış. Freundlich adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğu gösterilmiştir. Çalışma aralığı 10-130 mg/L tirozin derişimidir. Seçicilik faktörü 2,7 ve maksimum tirozin adsorpsiyonu ise 253 mg/g olarak bulunmuştur. Tasarlanan kontrollü salınım sisteminin %40-50 arası verimle çalıştığı ve 7 saate kadar salınım yapabildiği belirtilmiştir [83].

Moein ve arkadaşları yüksek verimde biyoanaliz için monolitik moleküler baskılanmış polimer sol jel paketlenmiş uçları hazırlamış bunlarla insan plazma ve idrarından ekstrakte ettikleri tirozini LC MS/MS kullanarak tayin etmişlerdir. Hazırlanan moleküler baskılanmış polimer sol-jel paketlenmiş uçları ile akciğer kanseri belirteci L-tirozin ekstrakte edilip LC MS/MS ile incelenmiştir. Monomer olarak trimetoksisilil propil metakrilat, çapraz bağlayıcı olarak da tetraetilortosilikat kullanılmıştır. Çalışma aralığı 1-1000 nM/L tirozin derişimidir. Seçicilik çalışmaları hipurik asit, sarkosin ve glisin kullanılarak yapılmıştır. Tirozin için zenginleştirme faktörü 0,91 ona en yakın olan hipurik asit için 0,32 olarak bulunmuştur. Baskılama faktörü ise tirozin için 4,55 ona en yakın olan hipurik asit içinse 1,83 olarak bulunmuştur [84].

Zheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ürik asit ve tirozin tayini için moleküler baskılanmış polimer ve grafen oksit kullanılarak kompozit bir elektrokimyasal sensör üretilmiştir. Fonksiyonel monomer olarak aminomerkapto tiadiazol

kullanılmıştır. Çalışma aralığı 0,1-400 mM tirozin derişimidir. Seçicilik çalışmaları için yarışmacı moleküller olarak dopamin, epinefrin, adenin, askorbik asit, glukoz ve ksantin kullanılmıştır. Gerçek örnek olaraksa plazma ve idrardan tirozin analizi yapılmıştır [85].

Yapılan bu tez çalışmasında ise, tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreler P(HEMA) kriyojele gömülerek yeni bir kompozit bir taşıyıcı tasarlanmıştır. Seçicilik çalışmaları benzer amino asitler olan L-fenilalanin ve L-triptofana karşı yapılmış ve kompozit taşıyıcının tirozine yüksek afinite ve seçicilik ile bağlandığı görülmüştür. Yapay idrar, tükürük ve plazma gibi karmaşık örneklerden tirozin başarıyla adsorplanmıştır. Elde edilen veriler hazırlanan kompozit taşıyıcının literatürdeki benzerlerinin aksine ekonomik, tekrar kullanılabilirliği, afinitesi ve adsorpsiyon kapasitesi yüksek bir alternatifi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Tablo 4.3 Tirozin baskılanmış farklı polimerlerin kıyaslanması.

Polimer	Monomer	Çapraz Bağlayıcı	Çalışma Aralığı	Seçicilik	Gerçek Örnek	Kaynak
Manyetik nanopartükül	Dopamin	Belirtilmemiş	3,5-7 mM	D-tirozin	Belirtilmemiş	[81]
Bakıroksit film	Pirol	Tetrabutyl amonyumperklorat	1×10^{-8} - 8×10^{-6} M	Serin, sistein, valin, fenilalanin, lösin	İdrar	[82]
Gözenekli polimer	Metakrilik asit, itakonik asit, akrilamid, 4-vinil benzoik asit	Etilen glikol dimetilakrilat	10-130 mg/L	3-nitro-L-tirozin	Belirtilmemiş	[83]
Monolitik polimer	Trimetoksisilil propil metakrilat	Tetraetil ortosilikat	1-1000 nM/L	Hipurik asit, sarkosin, glisin	Plazma ve idrar	[84]
Grafen oksit elektrot	2-amino-5-merkapt-1,3,4-tiadiazol	Belirtilmemiş	0.1-400 μ M	Dopamin, epinefrin, adenin, askorbik asit, glukoz, ksantin	Plazma ve idrar	[85]

<i>Manyetik silika mikroküre gömülü kriyojel</i>	<i>2-hidroksietil metakrilat</i>	<i>Metilen bisakrilamid</i>	<i>0.01-2 mg/mL</i>	<i>Fenilalanin, triptofan</i>	<i>Plazma, idrar, tükürük</i>	<i>Bu çalışma</i>
--	----------------------------------	-----------------------------	---------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------

4.10. Kompozit Kriyojellerle İlgili Literatür Özeti

Tablo 4.4 incelendiğinde ilk çalışmada Baydemir ve arkadaşları bilirubin saflaştırması için bilirubin baskılanmış partikülleri hazırlamışlardır. Daha sonra bu partikülleri PHEMA kriyojele gömerek kompozit bir kriyojel sentezlemişlerdir. Bu amaçla monomer olarak HEMA çapraz bağlayıcı olarak ise EDGMA kullanmışlar ve 10.3 mg/g adsorplama kapasitesine sahip olduğunu raporlamışlardır. Seçicilik çalışmalarında ise testesteron ve kolesterol kullanarak hazırladıkları kompozit kriyojelin yüksek seçicilikte bilirubin adsorpladığını gözlemişlerdir [86].

İkinci çalışma incelendiğinde Andaç ve arkadaşları ilk olarak albümin baskılanmış mikroküreler hazırlamışlardır. Daha sonra bu mikroküreleri PHEMA kriyojele gömerek albümin saflaştırması için bir kompozit kriyojel elde etmişlerdir. Bu çalışmada monomer olarak HEMA ve GMA çapraz bağlayıcı olarak ise EDGMA kullanmışlardır. Maksimum adsorplama kapasitesini 722.1 mg/dL olarak bulurken yarışmacı ajan olarak da transferrin ve miyogloblin kullanmışlardır [87].

Aslıyüce ve arkadaşları ise hazırladıkları Hepatit B antikor baskılanmış polimeri, PHEMA kriyojele gömerek Hepatit B antikor adsorplayan kompozit kriyojel sentezlemişlerdir. Bu amaçla foksiyonel monomer olarak HEMA ve amino asit temelli bir monomer olan MAT monomeri, çapraz bağlayıcı olarak ise EDGMA kullanılmıştır. Hazırlanan kompozit kriyojelin Hepatit A antikor ve immunoglobulin E yarışmacı ajanlarına göre yüksek seçicilikte Hepatit B antikor adsorpladığı raporlamışlardır [62].

Bir diğer çalışmada Koç ve arkadaşları 17 β estradiol baskılanmış partikülleri PHEMA kriyojele gömerek kompozit taşıyıcı ile bir kirletici olan 17 β estradiol uzaklaştırma çalışması yapmışlardır. Bu amaçla monomer olarak amino asit temelli bir monomer olan MAT monomeri ve HEMA monomerini kullanmışlardır. Maksimum adsorplama kapasitesi 5.32 mg/g polimer olarak hesaplanmıştır [69].

Son çalışmada ise Tekin ve arkadaşları ağır metal uzaklaştırma çalışmaları için imidazol içeren baskılanmış partikülleri PHEMA kriyojele gömerek kompozit

taşıyıcı sentezlenmiştir. Bu amaçla monomer olarak amino asit temelli bir monomer olan VIM ve HEMA monomeri kullanılmıştır. Farklı metal iyonlarının (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) adsorplama kapasiteleri sırası ile 7620 $\mu\text{g/g}$, 5800 $\mu\text{g/g}$ 4340 $\mu\text{g/g}$ ve 2540 $\mu\text{g/g}$ olarak rapor edilmiştir [88].

Tablo 4.4 Farklı kompozit kiyojel çalışmaları.

Polimer	Monomer	Çapraz Bağlayıcı	Hedef Molekül	Kaynak
Bilirubin baskılanmış partikül gömülü kiyojel	Hidroksietil metakrilat / N-metakroil-L-tirozinmetilester	Etilen glikol dimetakrilat	Bilirubin	[86]
Albümin baskılanmış partikül gömülü kiyojel	Hidroksietil metakrilat / Glisidil metakrilat	Etilen glikol dimetakrilat	Albümin	[87]
Hepatit antikor baskılanmış partikül gömülü kiyojel	Hidroksietil metakrilat / N-metakroil-L-tirozinmetilester	Etilen glikol dimetakrilat	Hepatit B antikor	[62]
17 β -estradiol baskılanmış partikül gömülü kiyojel	Hidroksietil metakrilat / N-metakroil-L-tirozinmetilester	Etilen glikol dimetakrilat	17 β -estradiol	[69]
Metal baskılanmış kompozit kiyojel	Hidroksietil metakrilat / N-vinil imidazol	Etilen glikol dimetakrilat	Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+}	[88]

5. SONUÇLAR

- N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) sulu çözeltiliden ve gerçek örneklerden tirozinin seçici bir şekilde saflaştırılabilmesi için fonksiyonel monomer olarak seçilmiş ve başarıyla sentezlenmiştir.
- Şelat oluşturan MAH monomeri ve Cu^{2+} farklı miktarlarda tirozin eklenerek ön-kompleksler oluşturulmuştur. Sadece tirozin, 10:10:1, 10:10:2 ve 10:10:3 oranlarında oluşturulan ön-kompleksler için ayrı ayrı UV-görünür bölge spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır ve optimum fonksiyonel monomer:metal şelat:kalıp molekül oranı 10:10:2 olarak belirlenmiştir.
- Modifiye olmamış ve modifiye manyetik silika mikroküreler başarıyla sentezlenmiştir. Yüzey modifikasyonu yapılan manyetik silika mikrokürelerin FTIR ile karakterizasyonu yapılmıştır.
- EDX iyon analizleri ile modifiye olmamış ve modifiye manyetik silika mikrokürelerin yapılarındaki demir ve silisyum oranları tespit edilmiş ve safsızlık olmadığı görülmüştür.
- SEM yapı analizleri ile modifiye olmamış ve modifiye manyetik silika mikrokürelerin yapılarının homojen boyutta ve gözenekli yapıda olduğu ve her iki yapı için de mikrokürelerin ortalama çapının 6,3 μm civarında olduğu gözlemlenmiştir.
- ESR analizi ile modifiye olmamış ve modifiye manyetik silika mikrokürelerin manyetik alan altında soğurma rezonans verdiği görülmüştür. Bu sonuç manyetik ile uyumludur. Dolayısıyla yüzey modifikasyonu süresince mikrokürelerin manyetik özelliklerinin değişmediği anlaşılmıştır.
- Yüzey modifikasyonları ve karakterizasyonları yapılan manyetik silika mikroküreler P(HEMA) kriyojele gömülerek kompozit taşıyıcı hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.
- İlk olarak şişme testi ile kompozit taşıyıcının ve boş kriyojelin su tutabilme performansının zamana bağlı değişimine bakılmış ve iki yapısında yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Kompozit taşıyıcının şişme oranı 5,52 g H_2O /g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar

kompozit taşıyıcının su tutma performansının boş kriyojele göre daha yüksek olduğunu göstermiştir.

- Kompozit taşıyıcının FTIR ile yapı analizi yapılmıştır. 3992 cm^{-1} 'deki ve 2944 cm^{-1} 'deki pikler N-H ve C-H gerilme bantlarından kaynaklanmıştır. Ayrıca 1729 cm^{-1} 'deki, 1657 cm^{-1} 'deki ve 1538 cm^{-1} 'deki piklerin şiddetlenip kayması yapıya MAH monomerinin girdiğini ve polimerizasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir.
- EDX sonuçları kompozit taşıyıcının yapısında %5,72 demir ve %7,03 silisyum olduğu bulunmuştur. Bu sonuç kompozit taşıyıcısında uzun süre sulu ortamda saklanmasına karşın modifiye manyetik silika mikrokürelere benzer şekilde demir tutma kararlılığını koruduğunu göstermiştir.
- SEM fotoğraflarından kompozit taşıyıcının süpermakrogözenekli, pürüzlü ve birbirine bağlı bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Gömülen mikrokürelere pürüzlülüğü artırması kompozit taşıyıcının yüzey alanının artmasını sağlamıştır.
- ESR spektrumunda kompozit taşıyıcı 3088 Gauss (G) manyetik alan altında rezonans soğurması göstermiştir. Bu değer literatürde manyetit için bilinen değerlerle uyumaktadır. Bu sonuçlar kompozit taşıyıcının manyetik özelliğini koruduğunu ve biyolojik çalışmalarda uygun manyetik bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.
- Kompozit taşıyıcının karakterizasyon çalışmalarından sonra tirozin adsorpsiyonunun optimum koşullarını bulmak amacıyla farklı parametrelerin taraması yapılmıştır.
- Tirozin adsorpsiyonu farklı pH aralıklarında (pH 5,0-9,0) incelenmiştir. Baskılanmış kompozit taşıyıcıya maksimum tirozin adsorpsiyonu pH 8,0 fosfat tamponunda gözlenmiş ve bu pH'daki maksimum tirozin adsorpsiyon miktarı 62,27 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur.
- Başlangıç tirozin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla hem baskılanmamış hem de baskılanmış kompozit taşıyıcılar kullanılmıştır. Tirozin derişiminin artmasıyla birlikte birim kriyojel başına adsorplanan tirozin miktarı artmakta ve yaklaşık 2 mg/mL tirozin

derişiminden sonra denge değerine ulaşmaktadır. Baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcı için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 62,27 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı ve 9,05 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur.

- Baskılanmış kompozit taşıyıcıya tirozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla tirozin adsorpsiyon deneyleri farklı sıcaklıklardaki ortamlarda (4-45°C) gerçekleştirilmiştir. Maksimum adsorplama kapasitesi 25°C'de 16,96 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur.
- Baskılanmış kompozit taşıyıcıya tirozin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacıyla adsorpsiyon deneyleri farklı derişimlerde 0-1,0 M NaCl içeren tirozin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. NaCl varlığının adsorpsiyon kapasitesini azalttığı görülmüştür.
- Baskılanmış kompozit taşıyıcıya tirozin adsorpsiyonuna akış hızının etkisini belirlemek amacıyla tirozin adsorpsiyon deneyleri farklı akış hızlarında (5-20 rpm) gerçekleştirilmiştir. Maksimum adsorplama kapasitesi 15 rpm'de 16,96 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı olarak bulunmuştur.
- Kompozit taşıyıcının tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kompozit taşıyıcı kullanılarak 8 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilere göre kompozit taşıyıcının adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilceği görülmüştür.
- Tirozin baskılanmış ve baskılanmamış kompozit taşıyıcılar ile seçicilik çalışmaları L-fenilalanin ve L-triptofan ile yapılmıştır. Sonuçlar L-tirozin baskılanmış kompozit taşıyıcının tirozin moleküllerine L-fenilalanin amino asidine göre 4,65 kat, L-triptofan amino asidine göre 7,44 kat daha seçici olduğunu göstermiştir.
- Ayrıca sonuçlara göre baskılanmış kompozit taşıyıcı maksimum 16,96 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı tirozin adsorplamışken, baskılanmamış kompozit taşıyıcı 1,81 mg tirozin/g kompozit taşıyıcı tirozin adsorplamıştır.
- Bağıl seçicilik katsayısı ise L-fenilalanin için 3,26 iken L-triptofan için 4,48'dir. Bu sonuçlara göre baskılanmış kompozit taşıyıcı tirozine karşı

yüksek seçicilik göstermektedir. Ayrıca baskılanmamış kompozit taşıyıcı her üç amino aside karşı birbirine yakın adsorpsiyon kapasitesine sahiptir.

- Kompozit taşıyıcının doğal ortamdaki adsorpsiyon kapasitesini ölçmek için yapay tükürük, plazma ve idrar örnekleri kullanılmıştır. Sonuçlara göre kompozit taşıyıcının sadece sulu ortamdaki değil daha kompleks ortamlar olan tükürük, plazma ve idrardan da yüksek seçicilik ile tirozin adsorplayabilmektedir.
- Deneysel verilere göre matematiksel hesaplamalar yapılarak Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerinin grafikleri çizilmiş ve sonuçlar göz önüne alınarak en uygun modelin Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli olduğu görülmüştür. Bu sonuç kompozit taşıyıcının yüzeyindeki tirozin bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] L.E. Banderet ve H.R. Lieberman, Treatment with tyrosine, a neurotransmitter precursor, reduces environmental stress in humans, *Brain Research Bulletin*, cilt 4, no. 22, pp. 759-762, **1989**.
- [2] R. Surtees ve N. Blau, The neurochemistry of phenylketonuria, *European Journal of Pediatrics*, cilt 2, no. 159, pp. 109-113, **2000**.
- [3] M.J. Prieto-Alamo ve F. Laval, Deficient DNA-ligase activity in the metabolic disease tyrosinemia type I, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, cilt 21, no. 95, pp. 12614-12618, **1998**.
- [4] D. Shurtleff, J.R.Thomas, J. Schrot, K. Kowalski ve R. Harford, Tyrosine reverses a cold-induced working memory deficit in humans, *Pharmacological Biochemistry Behaviors*, cilt 4, no. 47, pp. 935-941, **1994**.
- [5] S. Yeghiayan, S. Luo, B. Shukitt-Hale ve H. Lieberman, Tyrosine improves behavioral and neurochemical deficits caused by cold exposure, *Physiology and Behavior*, cilt 3, no. 72, pp. 311-316, **2001**.
- [6] M. Hinz, A. Stein, R. Neff, R. Weinberg ve T. Uncini, Treatment of attention deficit hyperactivity disorder with monoamine amino acid precursors and organic cation transporter assay interpretation, *Neuropsychiatric Disorder Treats*, no. 7, pp. 31-37, **2011**.
- [7] D. Neri, D. Wiegmann, R. Stanny, S. Shappell, The effects of tyrosine on cognitive performance during extended wakefulness, *Aviation, Space and Environmental Medicine*, cilt 4, no. 66, pp. 313-319, **1995**.
- [8] O. Ramström ve R.J. Ansell, Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future, *Chirality*, cilt 3, no. 10, pp. 195-209, **1998**.
- [9] İ. Ülker ve N. Şanlıer, Nutrition and New Treatment Approaches in Phenylketonuria, *Güncel Pediatri*, cilt 2, no. 16, pp. 187-198, **2018**.
- [10] S. Rao ve V. Yeragani, Hypertensive crisis and cheese, *Indian Journal of Psychiatry*, cilt 1, no. 51, pp. 65-66, **2009**.
- [11] USDA Food Composition Databases Nutrient: Tyrosine, United States Department of Agriculture, Washington, **2019**.

- [12] B.L. Parry, The Role of Central Serotonergic Dysfunction in the Aetiology of Premenstrual Dysphoric Disorder, *CNS Drugs*, cilt 15, no. 4, pp. 277-285, **2001**.
- [13] A.A. Carhill, M.E. Cabanillas, C. Jimenez, S.G. Waguespack, M.A. Habra, M. H. Anita, Y.R. Vassilopoulou-Sellin, R.F. Gagel, S.I. Sherman ve N.L. Busaidy, The Noninvestigational Use of Tyrosine Kinase Inhibitors in Thyroid Cancer: Establishing a Standard for Patient Safety and Monitoring, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, cilt 19, no. 1, pp. 31-42, **2013**.
- [14] R.A. Williams, C.D. Mamotte ve J.R. Burnett, Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism, *The Clinical Biochemist Reviews*, cilt 1, no. 29, pp. 31-41, **2008**.
- [15] N. Blau, F.J. Spronsen ve H. Levy, Phenylketonuria, *The Lancet*, cilt 376, no. 9750, pp. 1417-1427, **2010**.
- [16] G.L. Sara, L.M. Alejandra, I.G. Isabel ve V.A. Marcela, Conventional Phenylketonuria Treatment, *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, no. 4, pp. 1-7, **2016**.
- [17] P.A. Russo, G.A. Mitchel ve I.M. Tanguay, Tyrosinemia: A Review, *Pediatric and Developmental Pathology*, cilt 3, no. 4, pp. 212-221, **2001**.
- [18] S. Murat, K. Ayşe, Ü. Emin, G. Nelgin, C.M. Serdar, Ö. Işıl, O. Fatma, S. Müjgan, G. Gülden ve D. Özlem, Hipofosfatemik Raşitizm ile Gelen Hereditör Tirozinemili On Beş Yaşında Erkek Hasta: Ender Bir Vaka Sunumu, *Çocuk Dergisi*, cilt 1, no. 11, pp. 32-35, **2011**.
- [19] E. Holme ve S. Lindstedt, Diagnosis and management of tyrosinemia type I., *Current Opinion in Pediatrics*, cilt 6, no. 7, pp. 726-732, **1995**.
- [20] A.G. Weinbergab, C.E. Mizeab ve H.G. Worthen, The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia, *The Journal of Pediatrics*, cilt 3, no. 88, pp. 434-438, **1976**.
- [21] P.J. Vanessa ve P. Rutherford, Tyrosine supplementation for phenylketonuria, *Cochrane Systematic Review*, cilt 2, **2000**.
- [22] A. Thomas, A. Rajan ve G. Giaccone, Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer, *NIH Public Access*, cilt 3, no. 26, pp. 589-605, **2012**.
- [23] Prof. Dr. Adil Denizli, Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Ankara: Detay Copy Matbaa Yayıncılık, **2016**.

- [24] S. Aslıyuce, L. Uzun, A.Y. Rad, S. Unal, R. Say ve A. Denizli, Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, no. 189-190, pp. 95-102, **2012**.
- [25] K. Mosbach, Molecular imprinting, *Trends in Biochemical Science*, cilt 1, no. 19, pp. 9-14, **1994**.
- [26] Z. Zhang, H. Li, H. Liao, L. Nie ve S. Yao, Influence of cross-linkers' amount on the performance of the piezoelectric sensor modified with molecularly imprinted polymers, *Sensors and Actuators B: Chemical*, cilt 2, no. 105, pp. 176-182, **2005**.
- [27] T. Muhammad, Z. Nur, E.V. Piletska, O. Yimita ve S.A. Piletsky, Rational design of molecularly imprinted polymer: the choice of cross-linker, *Analyst*, no. 137, p. 2623, **2012**.
- [28] A. Kowalska, A. Stobiecka ve S. Wysocki, A computational investigation of the interactions between harmaline and the functional monomers commonly used in molecular imprinting, *Journal of Molecular Structure: Theochem*, Cilt 1 / 21-3, no. 901, pp. 88-95, **2009**.
- [29] L. Chen, S. Xu ve J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Royal Society of Chemistry*, no. 40, pp. 2922-2942, **2011**.
- [30] E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A. Cormack ve D.C. Sherrington, Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples, *Journal of Chromatography A*, Cilt 1 / 21-2, no. 963, pp. 169-178, **2002**.
- [31] N. Shima, H. Reinhard, B. Lachlan, D.S. Basil ve H. Milton, A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmaterol imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, no. 1359, pp. 35-43, **2014**.
- [32] F.L. Dicker ve O. Hayden, Molecular imprinting in chemical sensing, *Trends in Analytical Chemistry*, cilt 3, no. 18, pp. 192-199, **1999**.
- [33] C.C. Hwang ve W.C. Le, Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *Journal of Chromatography A*, Cilt 1 / 21-2, no. 963, pp. 69-78, **2002**.

- [34] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu ve J. Li, Molecular imprinting: perspectives and applications, Royal Society of Chemistry, no. 45, pp. 2137-2211, **2016**.
- [35] F. Canfarotta, K. Smolinska-Kempisty ve S. Piletsky, Replacement of Antibodies in Pseudo-ELISAs: Molecularly Imprinted Nanoparticles for Vancomycin Detection., Methods in Molecular Biology, no. 1575, pp. 389-398, **2017**.
- [36] W. Stöber, A. Fink ve E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron, Journal of colloid and interface science, cilt 1, no. 26, pp. 62-69, **1968**.
- [37] R. Schmidt, R. Ackermann, Z. Kratky, B. Wasserman ve Bruce Jacobson, Fast and efficient purification of yeast plasma membranes using cationic silica microbeads, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, cilt 2, no. 732, pp. 421-427, **1983**.
- [38] S. Radin, T. Chen ve P. Ducheyne, The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres, Biomaterials, cilt 5, no. 30, pp. 850-858, **2009**.
- [39] C.L. Guillemin, M. LePage ve A.J. deVries, Silica Microbeads "Spherosil" in Gas Chromatography, Journal of Chromatographic Science, cilt 8, no. 9, pp. 470-486, **1971**.
- [40] F. Caruso, H. Fiedler ve K. Haage, Assembly of β -glucosidase multilayers on spherical, Colloids and Surfaces A: Physicochemical, cilt 1, no. 169, pp. 287-293, **2000**.
- [41] C. Liu, J. Guo, W. Yang, J. Hu, C. Wang ve S. Fu, Magnetic mesoporous silica microspheres with thermo-sensitive polymer shell for controlled drug release, Journal of Material Chemistry, cilt 27 no. 19, pp. 4764-4770, **2009**.
- [42] M. Zhang, T. Itoh ve M. Abe, Ultrasonic visualization of still and flowing waters using contrast, Japanese journal of applied physics, cilt 1, no. 36, p. 243, 1997.
- [43] S. Ramesh, Y. Koltypin, R. Prozorov ve A. Gedanken, Sonochemical deposition and characterization of nanophasic amorphous nickel on silica microspheres, Chemistry of, cilt 2, no. 9, pp. 546-551, **1997**.
- [44] V.I. Lozinsky, Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, Russian chemical reviews, no. 71, pp. 489-511, **2002**.

- [45] G.B. Sergeev ve V. Batyuk, Reactions in Frozen Multicomponent Systems, Russian Chemical Reviews, no. 45, p. 391, **1976**.
- [46] F.M. Plieva, I. Yu.Galaev, W. Noppe ve B. Mattiasson, Cryogel applications in microbiology, Trends in Microbiology, cilt 11, no. 16, pp. 543-551, **2008**.
- [47] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Y. Galaev ve B.Mattiasson, The potential of polymeric cryogels in bioseparation, Bioseparation, no. 10, pp. 163-188, **2002**.
- [48] M. Richter, S. Augustas ve F. Schierbaum, Ausgewahlten metoden der stakechemie, VEB Fachuchverlag, p. 183, **1969**.
- [49] J. Bringham, M. Gidley, R. Hoffmann ve C. Smith, Microscopic imaging of network strands in agar carrageenan/locust bean gum gels, Food hidrocolloids, no. 8, pp. 331-344, **1994**.
- [50] V. Lozinsky, L. Damshkaln, C. Brown ve I. Norton, Study of cryostructuration of polymer systems. XIX. On the nature of intermolecular links in the cryogels of locust bean gum, polymer international, no. 49, p. 1434-1443, **2000**.
- [51] R. Tanaka, T. Hatakeyama ve H. Hatakeyama, Formation of locust bean gum hydrogel by freezing–thawing, polymerisation international, no. 45, pp. 118-126, **1998**.
- [52] V. Lozinsky, E. Vainerman ve S. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels, Method for the preparation of macroporous polymer materials, **1982**.
- [53] V. Lozinsky, Cryotropic gelation as an approach to the preparation of supermacroporous hydrogels, Boston, **1998**.
- [54] S. Rogozhin, E. Vainerman ve V. Lozinsky, The formation of spatial cross-linked polymeric structures under freezing of a reacting system, Dokla Akademy, no. 263, pp. 115-118, **1982**.
- [55] L. Damshkaln, I. Simenel ve V. Lozinsky, Study of cryostructuration of polymer systems. XV. Freeze–thaw-induced formation of cryoprecipitate matter from the low-concentrated aqueous solutions of poly(vinyl alcohol), Journal of Applied Polymer Science, no. 74, pp. 1978-1986, **1999**.
- [56] L. Domotenko, V. Lozinsky, E. Vainerman ve S. Rogozhin, The influence of freezing and thawing conditions of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions on the properties of cryogels which are formed as a result, Vysokomolekul soed, cilt A, no. 30, pp. 1661-1666, **1988**.

- [57] V. Lozinsky, Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol), *Russian Chemical Reviews*, no. 67, pp. 573-586, **1998**.
- [58] V. Lozinsky ve L. Damshkaln, Study of cryostructuration of polymer systems. XVII. Poly(vinyl alcohol) cryogels: dynamics of the cryotropic gel-formation, *Journal of Applied Polymer Science*, no. 77, pp. 2017-2023, **2000**.
- [59] Y. Mori, H. Tokura ve M. Yoshikawa, Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous polyvinyl alcohol solutions and their applications, *Journal of Material Science*, no. 32, pp. 491-496, **1997**.
- [60] F.M. Plieva, I.N. Savina, S. Deraza, J. Anderssona, I.Y. Galaeva ve B. Mattiasson, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide, *Journal of Chromatography B*, no. 807, pp. 129-137, **2004**.
- [61] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Y. Galaev ve B. Mattiasson, The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, no. 10, pp. 163-188, **2002**.
- [62] S. Aslıyuce, L. Uzun, A.Y. Rad, S. Unal, R. Say ve A. Denizli, Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, no. 889-890, pp. 95-102, **2012**.
- [63] G. Baydemir, N. Bereli, M. Andaç, R. Say, I. YuGalaev ve A. Denizli, Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, cilt 1, no. 68, pp. 33-38, **2009**.
- [64] N. Bereli, M. Andaç, G. Baydemir, R. Say, I. YuGalaev ve A. Denizli, Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A*, Cilt 21, no. 1190, pp. 18-26, **2008**.
- [65] M.L. Noir, F. Plievaa, T. Hey, B. Guieysse ve B. Mattiasson, Macroporous molecularly imprinted polymer/cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants, *Journal of Chromatography A*, Cilt 21, no. 1154, pp. 158-164, **2007**.
- [66] N. Bereli, Y. Saylan, L. Uzun, R. Say ve A. Denizli, I-Histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition, *Separation and Purification Technology*, no. 82, pp. 28-35, **2011**.
- [67] E. Tamahkar, N. Bereli, R. Say ve A. Denizli, Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome c recognition, *Separation Science*, cilt 23, no. 34, pp. 3433-3440, **2011**.
- [68] A. Derazshamshir, G. Baydemir, M. Andaç, R. Say, I. Y. Galaev ve A. Denizli,

Molecularly Imprinted PHEMA-Based Cryogel for Depletion of Hemoglobin from Human Blood, *Macromolecular Chemistry and Physics*, cilt 6, no. 211, pp. 657-668, **2010**.

- [69] İ. Koç, G. Baydemir, E. Bayram, H. Yavuz ve A. Denizli, Selective removal of 17 β -estradiol with molecularly imprinted particle-embedded cryogel systems, *Journal of Hazardous Materials*, cilt 3, no. 192, pp. 1819-1826, **2011**.
- [70] M. Urh, D. Simpson ve K. Zhao, Affinity chromatography: general methods., *Methods in Enzymology*, no. 38, pp. 463-417, **2009**.
- [71] G. Mayers ve C. v. Oss, *Encyclopedia of Immunology*, Londra: Elsevier Ltd., **1998**.
- [72] J. Goding, *Monoclonal Antibodies (Third Edition)*, Australia: Elsevier Ltd., **1996**.
- [73] A. Denizli, *Biyoyayırma ve Polimerik Taşıyıcılar.*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Tükiye Bilimler Akademisi, **2011**.
- [74] D. Otter, *PROTEIN | Determination and Characterization Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, no. 2, pp. 4824-4830, **2003**.
- [75] H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn ve F. Schäfer, Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review., *Methods in Enzymology*, no. 73, pp. 463-439, **2009**.
- [76] B. Çelikkaya, Süleyman Ali Tuncel, Protein İzolasyonu için İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Bazlı Kesikli Sistemlerin Geliştirilmesi, Ankara: Fen Bilimleri Enstitüsü, **2017**.
- [77] K. Salimi, D.D. Usta, İ. Koçer, E. Çelik ve A. Tuncel, Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO₂ microspheres for, *International Journal of Biological Macromolecules*, no. 111, pp. 178-185, **2018**.
- [78] K. Salimia, U.D. Duygu, Ö. Çelikkıçak, A. Pınar, B. Salih ve A. Tuncel, Ti(IV) carrying polydopamine-coated, monodisperse-porous SiO₂microspheres with stable magnetic properties for highly selectiveenrichment of phosphopeptides, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, no. 153, pp. 280-290, **2017**.
- [79] Y. Saylan, F. Yılmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz ve A. Denizli, Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications, *Sensors*, cilt 4, no. 17, p. 898, **2017**.
- [80] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz ve A. Denizli, Development of surface plasmon resonance sensors based on

molecularly imprinted nanofilms for sensitive and selective detection of pesticides, *Sensors and Actuators B: Chemical*, no. 241, pp. 446-454, **2017**.

- [81] X. Wang, R. Liang, X. Meng ve J. Qiu, One-step synthesis of mussel-inspired molecularly imprinted magnetic polymer as stationary phase for chip-based open tubular capillary electrochromatography enantioseparation, *Journal of Chromatography A*, no. 1362, pp. 301-308, **2014**.
- [82] V. Saumya, K. Prathish ve T. Rao, In situ copper oxide modified molecularly imprinted polypyrrole film based voltammetric sensor for selective recognition of tyrosine., *Talanta*, no. 85, pp. 1056-1062, **2011**.
- [83] R. Vanessa, A.F. Manuel, M.A. Carlos, A. Pereira ve S. Fernando, Molecularly imprinted polymers for enhanced impregnation and controlled, *Reactive and Functional Polymers*, no. 131, pp. 283-292, **2018**.
- [84] M. Moein, A. El-Beqqali, A. Abdel-Rehim, A. Jeppsson-Dadoun ve M. Abdel-Rehim, Preparation of monolithic molecularly imprinted polymer sol-gel packed tips for high-throughput bioanalysis: Extraction and quantification of l-tyrosine in human plasma and urine samples utilizing liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, no. 967, pp. 168-173, **2014**.
- [85] Z. Weihua, Z. Min, L. Weifen, Y. Shangmin, N. Liting, L. Gengen, L. Haifeng ve L. Weilu, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer/reduced graphene oxide composite for simultaneous determination of uric acid and tyrosine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, no. 813, pp. 75-82, **2018**.
- [86] G. Baydemir, N. Bereli, M. Andaç, R. Say, I.Y. Galaev ve A. Denizli, Supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel with, *Reactive and Functional Polymers*, no. 69, pp. 36-42, **2009**.
- [87] M. Andaç, G. Baydemir, H. Yavuz ve A. Denizli, Molecularly imprinted composite cryogel for, *Journal of Molecular Recognition*, no. 25, pp. 555-563, **2012**.
- [88] K. Tekin, L. Uzun, Ç. A. Şahin, S. Bektas ve A. Denizli, Preparation and characterization of composite cryogels containing imidazole group, *Reactive and Functional Polymers*, no. 71, pp. 985-993, **2011**.
- [89] O. Ramström ve K. Mosbach, Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials, *Current opinion in chemical biology*, no. 3, pp. 759-764, **1999**.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 04/07/2019

Tez Başlığı/ Konusu: TİROZİN SAFLAŞTIRMASI İÇİN KOMPOZİT TAŞIYICILARIN HAZIRLANMASI / Bu çalışmada, tirozin baskılanmış manyetik silika mikroküreler sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra poli(2-hidroksietil metakrilat) temelli kriyojele gömülerek tirozin saflaştırması için yüksek seçiciliğe, kimyasal ve mekanik dayanıklılığa sahip bir kompozit taşıyıcı hazırlanmıştır.

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 60 sayfalık kısmına ilişkin, 02/07/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

04/07/2019

Adı Soyadı: GİZEM ÖZTÜRK
Öğrenci No: N13144273
Anabilim Dalı: KİMYA
Programı:
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Adil Denizli

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Gizem Öztürk
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Evli
E-Posta : str3rt@gmail.com

Eğitim

Lise : Gölbaşı Anadolu Lisesi 2003-2007
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü 2007-2011
Y. Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü 2011-2013
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü 2013-2019

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (iyi)

İş Tecrübesi

-

Deneyim Alanları

Moleküler Baskılama, Biyoayırma, Makrogözenekli Polimerler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

--

Tezden Üretilmiş Yayınlar

--

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Gizem Öztürk, Yeşeren Saylan, Adil Denizli. Manyetik Kompozit Taşıyıcılarla Tirozin Saflaştırılması, 19. Kromatografi Kongresi, Hacettepe Üniversitesi, 12-14 Haziran 2019.

