

**GIDALARDAN KOLESTEROLÜN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJEL MİKROKÜRELER**

**MOLECULARLY IMPRINTED CRYOGEL MICROBEADS FOR
CHOLESTEROL REMOVAL FROM FOODS**

FATMA KARTAL ERSOY

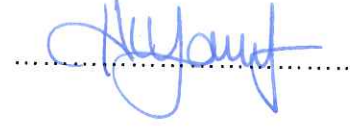
Prof. Dr. ADİL DENİZLİ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

Fatma Kartal Ersoy'un hazırladığı “**Gıdalardan Kolesterolün Uzaklaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Mikroküreler**” 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. Münire Nalan TÜZMEN
Üye



Doç. Dr. Fatma YILMAZ
Üye



Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE 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 ama 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 kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak 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 haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- ✕ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 Ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

14.08.2018


Fatma KARTAL ERSÖY

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. Şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7. 2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.



Canım Ailem ve Sevgili Eşim'e...

ETİK

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

- tez içindeki bütün 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 üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.

14 /08 /2018


Fatma KARTAL ERSÖY

ÖZET

GIDALARDAN KOLESTEROLÜN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJEL MİKROKÜRELER

Fatma KARTAL ERSOY

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Ağustos 2018, 108 sayfa

Epidemiyolojik araştırmalara göre, kandaki kolesterol seviyesi ve gıdayla alınan kolesterol miktarı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Gıdayla alınan kolesterol miktarı belli bir düzeyin üzerinde olduğunda insan vücudunda kalp hastalıkları, koroner arter hastalığı, arteriyoskleroz, hipertansiyon, serebral tromboz gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir. Dolayısıyla tıp biliminde ve gıda endüstrisinde kolesterolün kontrolü ve ayrılması oldukça önemlidir. Günümüzde kandaki yüksek kolesterol seviyesinden kaynaklı hastalık riskini azaltmak için vücuda alınan gıdalara ve beslenmeye dikkat ederek plazma kolesterolü derişiminin düşürölmesi hedeflenmektedir. Son yıllarda tüketici bilincinin artması, gıdalar üzerindeki bilimsel araştırmalar, yeni gıdaların bulunması ve gıda-sağlık arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalar fonksiyonel gıdaları öne çıkarmakta ve böylece çeşitli yöntemlerle gıdalardan kolesterolün uzaklaştırılmasıyla düşük kolesterollü gıdaların üretilmesi oldukça önemli hale gelmektedir. Kolesterolün besinlerden absorpsiyonunu önleyen özgül inhibitörlerin üretimi ile kolesterol miktarının düşürölmesi de oldukça önemli bir yaklaşımdır. Klinik

olarak, tavsiye edilen kan kolesterol derişimlerine ulaşmak için kolesterolün hem adsorpsiyonu hem de uzaklaştırılması gerekli olduğundan, diğer bir yaklaşımda kolesterole seçici, kolay ulaşılabilir, kolay hazırlanabilir ve etkili adsorbentlerin geliştirilmesidir.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) ilgili analitlere seçici olarak bağlanabilen biyotaklitçilerdir. Moleküler baskılanmış polimerler kromatografik ayırmalarda, tıbbi teşhis ve çevre analizi gibi biyosensör uygulamalarında, farmasötik ilaç taşınım çalışmaları gibi birçok alanda kullanılmakla birlikte en büyük potansiyel gösterdiği alanlardan biri gıda analizidir. Araştırmalar, MIP'lerin yüksek seçicilik ve yüksek yükleme kapasitesi sağlayarak karmaşık gıda matris etkilerini en aza indirebileceğini, geri kazanımları ve belirleme limitlerini arttırılabileceğini göstermektedir.

Bu tez kapsamında kolesterolün gıdalardan etkin bir şekilde ayrılması için MIP'lerde, moleküler baskılama yönteminin spesifik tanıma sağlaması ile kriyojelin yüksek akış, kontrol edilebilir gözenek yapısı, yüksek yüzey alanı, mekanik ve kimyasal kararlılığını birleştiren eşsiz bir afinite ayırma teknolojisi hedeflenmiştir. Kriyojeller kan, gıda, atık su, doku iskelelerinin üretimi gibi alanlarda kullanılan oldukça önemli yapılardır. Çalışma kapsamında öncelikle gıdalardan kolesterolün seçici olarak uzaklaştırılması için mevcut yöntemlere alternatif kolesterole seçici bağlanma bölgelerinin oluşmasına olanak sağlayacak fonksiyonel monomer ile moleküler baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat-metakriloilamidotriptofan metil ester) kriyojel mikroküreler hazırlanmıştır. Kolesterol baskılanmış kriyojel mikrokürelerin (CHO-MIP) karakterizasyon çalışmaları zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu, termogravimetrik analiz ve elementel analiz ile gerçekleştirilmiştir. CHO-MIP ile kolesterol arasındaki etkileşimler incelenmiştir ve kolesterolün adsorpsiyonuna etki eden faktörler incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Hazırlanan kriyojelin sürekliliğinin ölçüsü olarak tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Kriyojel mikrokürelerin seçiciliği de kolesterole yapısal olarak benzer estradiol ve progesteron gibi yarışmacı moleküller kullanılarak belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında adsorpsiyon izotermine ve adsorpsiyon kinetik analizlerine yer verilmiştir. En son olarak, gerçek gıda örneklerinden kolesterolün seçimli ve etkin olarak

uzaklaştırılması çalışmaları sentezlenen kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküreler ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kriyojel mikroküre, moleküler baskılama, fonksiyonel gıdalar, kolesterol uzaklaştırma.



ABSTRACT

MOLECULARLY IMPRINTED CRYOGEL MICROBEADS FOR CHOLESTEROL REMOVAL FROM FOODS

Fatma KARTAL ERSOY

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

August 2018, 108 pages

According to epidemiological studies, there is a direct relationship between the level of cholesterol in the blood and the amount of cholesterol taken with food. When the amount of cholesterol taken with food is above a certain level, this can cause various diseases such as heart diseases, coronary artery disease, arteriosclerosis, hypertension, cerebral thrombosis in the human body. Thus, its control and separation are very important in medical science and food industries. Nowadays, it is aimed to reduce plasma cholesterol concentration by paying attention to food intake and nutrition in order to decrease the risk of illness caused by high blood cholesterol. In recent years, the studies on the rise of consumer awareness, scientific researches on foods, the discovery of new foods and the relationship between food and health have highlighted functional foods and it has become very important to produce low cholesterol foods by removing cholesterol from foods with various methods. It is a very important approach to reduce the amount of cholesterol by producing specific inhibitors that prevent

absorption of cholesterol from foods. Clinically, another approach is to develop cholesterol-selective, easily accessible, easily prepared, and effective adsorbents, since both adsorption and removal of cholesterol are required to achieve the recommended blood cholesterol concentrations.

Molecularly imprinted polymers (MIP) are biomimics that can selectively bind to the relevant analytes. One of the most interesting areas where MIP have shown the greatest potential is food analysis as well as they have used in many applications, such as biosensor applications such as medical diagnostics and environmental analysis, pharmaceutical drug delivery studies, and chromatographic separations. Research shows that MIP can reduce the complex food matrix effects, increase recovery and detection limits by providing the high selectivity and high loading capacity.

In this thesis, a unique affinity separation technology that combines the specific recognition of molecular imprinting with the high flow of cryogel, controllable pore structure, high surface area, mechanical and chemical stability in MIP has been aimed at effectively separating cholesterol from foodstuffs. Cryogels are very important structures used in areas such as blood, food, waste water, the production of tissue scaffoldings.

In the study, firstly molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate-methacryloyl-amidotryptophane methyl ester) cryogel microbeads were prepared using functional monomer which would allow cholesterol selective binding sites to be generated for selective removal of cholesterol from the foods. Characterization studies of cholesterol imprinted cryogel microbeads (CHO-MIP) were carried out by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope, thermogravimetric analysis and elemental analysis.

The interactions between CHO-MIP and cholesterol have been investigated and the factors affecting the adsorption of cholesterol have been investigated to determine optimum conditions. Reusability as a measure of the continuity of the prepared cryogel was investigated. The selectivity of cryogel microbeads has been determined using

competitor molecules such as estradiol and progesterone, which are structurally similar to cholesterol.

In the thesis study adsorption isotherms and adsorption kinetic analyzes are included. Finally, selective and efficient removal of cholesterol from food samples has been performed with synthesized cholesterol imprinted cryogel microbeads.

Key Words: Cryogel microbead, molecular imprinting, functional foods, cholesterol removal.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, engin bilgi ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye...

Her zaman desteğini hissettiğim hocadan öte ablam olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nilay Bereli'ye...

Güler yüzü, mütevaziliği, akademik duruşu ve vizyonu ile değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e...

Çalışkanlığı, azmi ve bilgisiyle her zaman yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Fatma Yılmaz, Doç. Dr. Deniz Türkmen ve Doç. Dr. Lokman Uzun'a ...

Kardeş olmak ben olmaktan kurtulup biz olmaktır. Biz olabildiğimiz canım Bioreg ailem'e...

Uzun yıllar birlikte görev yaptığım Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü çalışma arkadaşlarım'a...

Her zaman yanımda olan ve yardımını esirgemeyen Dr. Recep Üzek'e...

Her zaman desteğini hissettiğim canım arkadaşlarım Dr. Canan Çorman ve Dr. M. Emin Çorman ve şimdiden hayatımıza renk katan Mustafa Emin'e...

Güzel muhabbetiyle, desteğiyle yanımda olan canım arkadaşım Dr. Ali Derazshamshir'e...

İyi ki yollarımız kesişti dediğim... Her zaman dostluklarını hissettiğim ve çok sevdiğim değerlilerim Dr. Sevgi Aslıyüce ve Dr. Duygu Çimen'e...

Beni her zaman her konuda destekleyen, hep yanımda olduklarını bildiğim varlıkları şükür sebebim canım annem ve babam'a...

Hayatımın her anında hep yanımda olan her mutluluğu her zorluğu birlikte paylaştığım canımdan öte güzel insana...Canım eşim'e...

Hayatıma hoş gelenim'e...

Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	I
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XV
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1 Kolesterol	4
2.1.1. Kolesterolün İşlevi	6
2.1.2. Yüksek Kolesterol Ve Oksitlenmiş Kolesterol Seviyelerinin Riskleri	7
2.1.2.1 Sitotoksik Etki	7
2.1.2.2. Aterojenik Etkisi	7
2.1.2.3. Metabolizma Ve Membranlara Etkisi	8
2.1.3. Kolesterol Düşürücü İlaçlar	8
2.1.4. Gıdalar ve Kolesterol	9
2.1.5. Gıda Maddelerinden Kolesterol Uzaklaştırma Yöntemleri	10
2.1.5.1. Fiziksel Yöntemler	10
2.1.5.1.1. Vakumlu Buhar Damıtma	10
2.1.5.1.2. Kısa Yol Moleküler Damıtma	10
2.1.5.1.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	11
2.1.5.2. Kimyasal Yöntemler	11
2.1.5.3. Biyolojik Yöntemler	11
2.1.5.3.1. Kolesterol Redüktaz	11
2.1.5.3.2. Kolesterol Oksidazları	11
2.1.5.4. Kompleks Oluşturma	11
2.1.5.4.1. Digitonin	11
2.1.5.4.2. Saponinler	12

2.1.5.4.3. β -Siklodekstrin	12
2.2. Fonksiyonel Gıdalar	13
2.2.1. Bazı Fonksiyonel Gıda Ürünleri Örnekleri	13
2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi	15
2.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Temelleri	16
2.3.2. Moleküler Baskılamamanın Temel Öğeleri	18
2.3.2.1. Hedef Kalıplar	18
2.3.2.2. Fonksiyonel Monomerler	19
2.3.2.3. Çapraz Bağlayıcılar	22
2.3.2.4. Porojenler	23
2.3.2.5. Başlatıcılar	23
2.3.3. Karakterizasyon Yöntemleri	24
2.3.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları	25
2.4. Kriyojel	27
2.4.1. Kriyojelin Yapısı ve Özellikleri	28
2.4.1.1. Monomerler Ve Çapraz Bağlayıcılar	30
2.4.1.2. Kalıp Molekül	31
2.4.1.3. Gözenek Yapısı	32
2.4.2. Kriyojelin Geometrisi	34
3. LİTERATÜR ÖZETİ	36
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
4.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	38
4.2. N-Metakriloil-(L)-Tryptofan (MATrp) Monomerinin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	38
4.2.2. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu	38
4.2.2.1. ATR-FTIR Analizi	38
4.2.2.2. GC-MS Çalışmaları	38
4.3. Kolesterol Baskılanmış Ve Baskılanmamış P(HEMATrp) Kriyojel Mikrokürelerin Hazırlanması	38
4.4. Kalıp Molekülünün Uzaklaştırılması	39

4.5. Kolesterol Baskılanmış ve Baskılanmamış P(HEMATrp) Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	40
4.5.1. ATR-FTIR ile Yapı Analizi.....	40
4.5.2. Termogravimetrik Analiz (TGA-DTA).....	40
4.5.3. Denge Şişme Oranının ve Makrogözenek Miktarının Belirlenmesi.....	40
4.5.4. Yüzey Alanı Ölçümleri	41
4.5.5. Elementel Analiz.....	41
4.5.6. CHO-MIP Ve NIP'lerin Yüzey Morfolojileri.....	41
4.6. Adsorpsiyon Çalışmaları.....	42
4.6.1. Kolesterol Adsorpsiyon Çalışmalarının Optimizasyonu	42
4.6.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	43
4.6.3. Seçicilik Çalışmaları	43
4.7. Gerçek Gıda Örneklerinden Moleküler Baskılanmış Kriyojel Mikrokürelerle Kolesterolün Geri Kazanımı.....	44
5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
5.1. MATrp Monomerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu	46
5.2. Kolesterol Baskılanmış ve Baskılanmamış P(HEMATrp) Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	49
5.2.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) ile Yapı Analizi	49
5.2.2. Yüzey Alanı Ölçümleri	50
5.2.3. Şişme Özellikleri.....	50
5.2.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri	51
5.2.5 Termogravimetrik Analiz.....	53
5.2.6. Elementel Analiz.....	55
5.3. Adsorpsiyon Çalışmaları.....	55
5.3.1. Adsorpsiyon Çalışmalarının Optimizasyonu	55
5.3.1.1. İyonik Şiddetin Etkisi.....	56
5.3.1.2. Sıcaklığın Etkisi	57
5.3.1.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi	58
5.3.1.4. Zamanın Adsorpsiyon Üzerine Etkisi.....	59

5.3.1.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	60
5.3.1.6. Sentezlenmiş CHO-MIP'lerin Seçiciliği.....	61
5.4.1. Adsorpsiyon İzotermi.....	62
5.4.2. Adsorpsiyon Kinetiği Modellemesi.....	66
5.4.3. Gerçek Gıda Örneklerinden Moleküler Baskılanmış Kriyojel Mikrokürelerle Kolesterolün Geri Kazanımı.....	69
6. YORUM.....	71
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Moleküle baskılamada yaygın olarak kullanılan hedef kalıplar.	19
Çizelge 2.2. MIP için tipik karakterizasyon yöntemleri ve temel amaçları.....	25
Çizelge 5.1. CHO-MIP ve NIP'ler için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	62
Çizelge 5.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm sabitleri ve korelasyon katsayıları.....	66
Çizelge 5.3. CHO-MIP'ler için birinci ve ikinci dereceden kinetik sabitler.	69
Çizelge 5.4. Gerçek gıda ürünlerinden kolesterolün geri kazanımı	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kolesterolün kimyasal yapısı.	4
Şekil 2.2. Membranda kolesterol ve fosfolipidlerin etkileşimi.	5
Şekil 2.3. Dünyanın her yerinde üretilen fonksiyonel gıdaların bazıları.	15
Şekil 2.4. Moleküler baskılamada kullanılan beş temel yöntem: (1) kovalent olmayan baskılama, (2) elektrostatik/iyonik baskılama, (3) kovalent baskılama, (4) yarı kovalent baskılama ve (5) metal merkezli koordinasyon temelli baskılama [78].	17
Şekil 2.5. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler: (A) Kovalent baskılama, (B) Kovalent olmayan baskılama, (C) Yarı-kovalent baskılama, (D) Ligand değişim temelli baskılama [78].	21
Şekil 2.6. Moleküler baskılamada kullanılan yeni fonksiyonel monomerlerin kimyasal yapıları [78].	22
Şekil 2.7. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan başlatıcıların kimyasal yapıları. (a) Azobisisobutyronitril (AIBN); (b) azobisdimetilvaleronitril (ADVN); (c) 4,4'-azobis(4-siyanovaleirik) (ACID); (d) benzoilperoksit (BPO); (e) benzildimetilasetal (BDK) ; (f) potasyum persülfat (KPS) [78].	24
Şekil 2.8. Ön hazırlık tekniklerinde, kromatografide ve sensör çalışmalarında moleküler baskılanmış polimer uygulamalarının yapısal diyagramı [78].	26
Şekil 2.9. Gözenekli hidrojellerin performansını etkileyen parametrelerin şematik gösterimi [108]	28
Şekil 2.10. Moleküler baskılanmış kriyojellerin hazırlanmasının şematik gösterimi. ...	30
Şekil 2.11. Kriyojellerin hazırlanması için kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar (a) MBAAm; (b) GA [103].	31
Şekil 2.12. Farklı formlarda hazırlanmış kriyojellerin dijital görüntüleri [110].	35
Şekil 4.1. Kriyojel mikrokürelerin sentezinin şematik gösterimi.	39
Şekil 5.1. MATrp monomerinin sentezi.	46
Şekil 5.2. p(HEMATrp) polimerinin molekül yapısı.	47
Şekil 5.3. MATrp monomerinin ATR-FTIR spektrumu.	48
Şekil 5.4. MATrp'nın detaylı kütle spektrumu.	48
Şekil 5.5. MATrp'nın kütle spektrumu.	49

Şekil 5.6. p(MATrp), p(HEMA) ve CHO-MIP'e ait ATR-FTR spektrumları.	50
Şekil 5.7. p(HEMA), CHO-MIP ve NIP'in şişme derecesi.	51
Şekil 5.8. CHO-MIP'lerin SEM görüntüleri	52
Şekil 5.9. NIP'lerin SEM görüntüleri	53
Şekil 5.10. (A) CHO-MIP; (B) p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin TGA analizi	55
Şekil 5.11. Farklı miktarlarda MATrp içeren CHO-MIP'lere kolesterol adsorpsiyonu. 56	
Şekil 5.12. CHO-MIP'nin kolesterol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; zaman: 150 dk; T: 25 °C).	57
Şekil 5.13. CHO-MIP'nin kolesterol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; zaman: 150 dk).	58
Şekil 5.14. CHO-MIP ve NIP'de kolesterol adsorpsiyonuna derişimin etkisi (zaman: 150 dk; T: 25 °C).	59
Şekil 5.15. CHO-MIP'lerde kolesterol adsorpsiyonuna zamanın etkisi. (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; T: 25 °C).	60
Şekil 5.16. CHO-MIP'lerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; zaman: 150 dk; T: 25 °C).	60
Şekil 5.17. Kolesterol analoglarının moleküler yapıları	61
Şekil 5.18. CHO-MIP ve NIP'lere kolesterol ve yarışmacı moleküllerin adsorplanan madde miktarları (mg/g) (başlangıç derişimleri: 1.0 mg/mL; adsorpsiyon süresi: 150 dakika; T:25 °C).	62
Şekil 5.19. Adsorpsiyon modelleri (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.....	65
Şekil 5.20. CHO-MIP'ler için deneysel verilerin yalancı-birinci dereceden kinetik.	68
Şekil 5.21. CHO-MIP'ler için deneysel verilerin yalancı-ikinci dereceden kinetik.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Moleküler baskılanmış polimer	MIP
Moleküler baskılama teknolojisi	MIT
Yüksek yoğunluklu lipoprotein	HDL
Düşük yoğunluklu lipoprotein	LDL
Çok düşük yoğunluklu lipoprotein	VLDL
Kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikroküreler	CHO-MIP
Kolesterol baskılanmamış p(HEMATrp) kriyojel mikroküreler	NIP
İskemik kalp hastalığı	IHD
3-hidroksi-3-metilglukan koenzim A	HMG-CoA
Dünya sağlık örgütü	WHO
Metakrilik asit	MAA
Etilen glikol dimetakrilat	EGDMA
Poli(hidroksietil metakrilat-metakriloilamidotriptofan metil ester)	p(HEMATrp)
N,N'-metilenbisakrilamid	MBAAm
Divinilbenzen	DVB
Tetrahidrofur	THF
N,N-dimetilformamid	DMF
Serbest radikal polimerizasyon	FRP
Polivinil alkol	PVA
Gluteraldehit	GA
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin	TEMED
2-Hidroksietil metilakrilat	HEMA
Amonyum persulfate	APS
N-metakrilloil-L-triptofan metil esterin	MATrp
Metanol	MeOH
Asetik asit	HAc
Langmuir-Freundlich	LF
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	HPLC
Bağıl standart sapma	R.S.D
İmmünoglobulin G	IgG

Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi	GC-MS
Diferansiyel termal analiz	DTA
Termogravimetrik Analiz	TGA
Taramalı elektron mikroskobu	SEM
Zayıflatılmış toplam yansıma	ATR
Zayıflatılmış toplam yansıma - Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	FTIR-ATR



1.GİRİŞ

Kolesterol ismi, Yunanca chole (safra) ve steros (katı) sözcüklerinden türetilmiştir. Kimyasal olarak kolesterol, yağ benzeri bir bileşiktir, temel olarak, saf formunda pulcuk şeklinde bulunan bir alkoldür. Üç kaynaşık sikloheksan (6 karbon) halka, bir siklopentan (5 karbon) halkası ve sekiz karbon atomu bir yan zincirinden oluşan 27 karbon atomundan oluşur [1, 2]. Kolesterol, biyolojik zarların bileşenlerinden biridir. Kolesterol, karaciğer, omurilik ve beyin gibi yoğun şekilde paketlenmiş zarlara sahip dokularda daha bol miktarda bulunur [3]. Aynı zamanda kolesterol, yumurta, süt ürünleri, kümes hayvanları, balık, domuz yağı ve diğer yağlar gibi hayvansal gıda ürünlerinin çoğunda bulunmasına rağmen vücuttaki kolesterolün ancak küçük bir kısmı gıda kaynaklıdır; çoğu vücut tarafından sentezlenir [4]. Kolesterol, hücrede çok çeşitli olaylarda kritik roller üstlenmektedir. Hücrenin uygun yer ve miktardaki kolesterole sahip olması zar yapısı, sinyal iletimi ve insan sağlığı için gereklidir. Ökaryotlarda önemli bir zar bileşeni olan kolesterol, hücresel bölmeler arasında yarı geçirgen bariyer oluşumuna yardım eder, zar akıcılığını ve membran proteinlerinin işlevini düzenler, zar yoluyla gerçekleşen uyarı iletimine katkıda bulunur. Ayrıca kolesterol metabolitleri olan steroidler ve safra asitleri, uyarı iletici ve diğer lipidlerin çözünür hale getirilmesi gibi önemli biyolojik işlevlere sahiptir ve bu işlemler için kanda çok az miktarda kolesterol bulunması yeterlidir [5].

Ağırlık olarak iki tip kolesterol vardır: yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol. Kolesterol, insan vücudunda önemli bir rol oynar, ancak yüksek düzeydeki kolesterol atardamar duvarlarında kolesterol birikimlerine yol açabilmektedir. Bu birikimler damar yoluyla kan akışını engelleyerek göğüs ağrısı, inme ve kalp krizine neden olur [6]. İnsanlar kolesterolü yumurta, balık, et ve süt ürünleri gibi hayvansal kökenli gıdalardan elde ederler. Bu nedenle kolesterolün ayrılması birçok besin işleme endüstrisi için önemlidir.

Günümüzde kolesterolün uzaklaştırılması için fiziksel, kimyasal ve biyomedikal yaklaşımları içeren birçok yöntem vardır. Fiziksel yöntemler; saponin/digitonin, süperkritik sıvı özütleme, hidrofobik adsorban ve moleküler baskılama yöntemi kullanılarak adsorpsiyon temelli ayırıştırma, kimyasal yöntemler; β -siklodekstrin

kullanılarak konukçu kompleksleşmesi, fotokatalizör ile bozunma ve enzim işlevselleştirilmiş materyallerle çöktürme ve biyomedikal yaklaşımlar arasında, yağ metabolizmasını modifiye ederek kolesterol sentezini kontrol etmeyi içerir.

Literatürde birçok ayırma yöntemi olmasına rağmen bu yöntemlerin çoğunun seçiciliği oldukça düşüktür ve kolesterolün uzaklaştırılması sırasında genellikle gıdaların tadını ve besleyici bileşenini bozarlar [7]. Gıda, çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları, daha iyi, daha seçici ve hassas analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir.

Moleküler tanıma, yüz yıl önce Emil Fischer'in "anahtar ve kilit model" olarak tanımladığı reseptör ve substrat arasındaki komplekse dayanır. Bu kompleksin oluşumu, kilit veya reseptör (protein/enzim) ile anahtar veya substrat (analit) üzerindeki tamamlayıcı fonksiyonel gruplar arasındaki molekül içi etkileşimlerin sonucudur ve moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskılama" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle olan yüksek seçicilikleri nedeniyle oldukça ümit vaat etmektedirler. İlk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanan moleküler baskılama yöntemiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapıları düzenlenmiştir [8, 9]. Moleküler baskılanmış polimerler kalıp ya da bir başka deyişle hedef molekülün varlığında fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcıların kopolimerizasyonu ile sentezlenir. Kalıp moleküllerinin çıkarılmasından sonra yüksek ölçüde çapraz bağlı polimer matriste kalıp moleküllerine şekil, boyut ve kimyasal olarak tamamlayıcı spesifik tanıma boşlukları oluşur ve böylece kalıp molekülüne oldukça benzer veya özdeş molekülleri bağlamak için uygun hale gelir. Kalıp moleküle özgü bu tanıma boşlukları, karmaşık bir biyo-çevreden hedef molekülü seçici olarak uzaklaştırmayı sağlar. Literatürde 1931 yılından beri ayırma ve saflaştırma alanında [10], kimyasal sensörler [11], kataliz [12], ilaç taşınımı [13], biyolojik antikolar ve reseptör sistemleri [14] gibi birçok alanda moleküler baskılama yöntemi oldukça önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Benzersiz özelliklerine bağlı olarak, MIP'ler gıda analizi alanını büyük ölçüde geliştirmiştir. MIP teknolojisi, örnek hazırlama alanında sorbent olarak kullanılmaktadır. MIP'ler, C18 silika jeli gibi geleneksel sorbentlerle karşılaştırıldığında, daha yüksek yükleme kapasiteleri, analitlerin tutulması için daha

yüksek etkinlik ve tutma işlemi sırasında geliştirilmiş seçicilik gibi belirgin avantajlar sunar [15, 16].

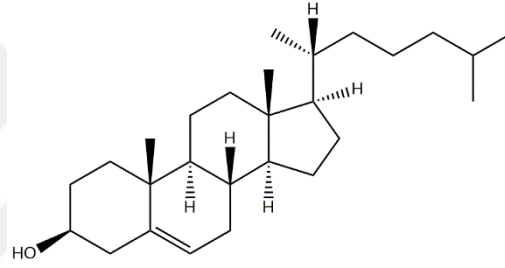
Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların kısmi olarak donmuş çözeltilerden hazırlanan jel matrisleridir. Kriyojeller tipik olarak, birbiri ile bağlantılı makro gözeneklerden ya da süper makro gözeneklerden oluşurlar. Makro gözenekli kriyojellerin geniş gözenekli yapıları, düşük geri basınca neden olmakta ve böylece yüksek viskoziteye sahip ortamlarda çalışma problemini ortadan kaldırmaktadır. Kriyojellerdeki birbiri ile bağlantılı makro gözenekler difüzyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesine, nano veya makro boyuttaki partiküllerin kütle transferine katkıda bulunurlar. Kriyojellerin bu eşsiz özellikleri, osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları ile bir araya gelerek onları biyolojik uygulamalar için önemli hale getirmektedir. Kriyojeller özellikle biyolojik malzemelerin kromatografik uygulamaları için tasarlanırlar [17, 18]. Kriyojeller yüksek kütle aktarımı yapabilme özelliğinden dolayı kromatografik kolonlarda yüksek saflık ve hızla ayırma işlemlerini gerçekleştirmek için uygun malzemelerdir [19]. Kriyojeller disk, monolitik kolon, çubuk, toz ve küre şeklinde tasarlanabilen gözenek boyutu uygulamaya göre ayarlanabilen yapılardır [20].

Tez çalışması kapsamında, yüksek seçicilik sağlayan moleküler baskılama yöntemi ve yüksek kütle aktarımına ve yüksek yüzey alanına sahip küre formundaki kriyojellerin avantajlarının birleştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada gıdalardan kolesterolün uzaklaştırılması için moleküler baskılama yöntemi kullanılarak kriyopolimerizasyon yöntemiyle kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküreler hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojelin birbirine bağlı makro gözenekli yapısıyla, sıvı akış kanalının yeterince büyük olması sonucunda düşük geri basınç ve düşük difüzyon direnci gibi akışkanlar mekaniğinin iyi özelliklerine sahip olması, kriyojelin hızlı ve etkili bir şekilde kütle transferini sağlaması ve dolayısıyla viskoz ortamlarda da kolayca kullanılabilir. Ayrıca kriyojellerin küre formunda hazırlanması ile kriyojelin spesifik yüzey alanı ve adsorpsiyon kapasitesi artmıştır. Kriyojel mikrokürelere bu eşsiz özellikleri yanında moleküler baskılama yönteminin uygulanması ile kolesterole yüksek seçicilikte kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküreler sentezlenmiştir. Bu çalışma sonucunda kolesterole kolayca ulaşabilen, basit, düşük maliyetli, yüksek seçicilikte, hassas, tekrar kullanılabilen ve ticari uygulama potansiyeli olan bir adsorbent geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİ

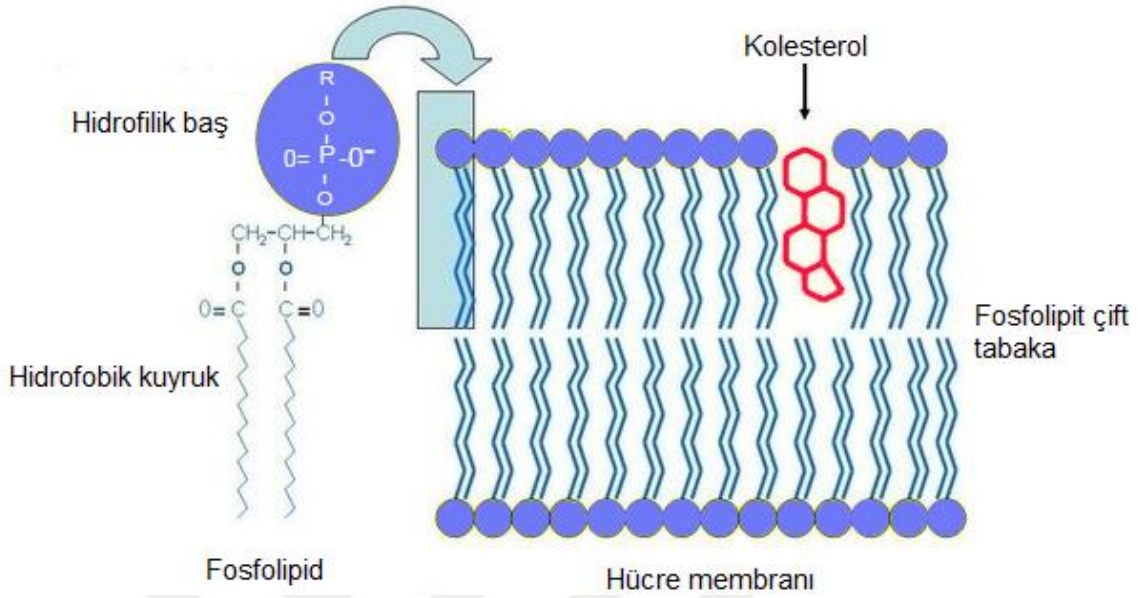
2.1 Kolesterol

Kolesterol $C_{27}H_{45}OH$ molekül formülüne sahip ve yapısında birden fazla hidrokarbon halkası içeren bir steroid alkoldür (Şekil 2.1) [21]. Moleküler ağırlığı 386.66 g/mol'dür ve kolesterolün erime noktası 148.50 °C'dür. Kolesterol, plazma membranlarının ana yapı taşıdır, molar bazda lipidlerin %50'sini oluşturur ve membran bütünlüğünü ve organizasyonu korumak için gereklidir [22]. Kolesterol, steroid hormonları, safra asitleri ve provitamin D₃ öncülü olarak görev yapar [23].



Şekil 2.1. Kolesterolün kimyasal yapısı.

Kolesterol molekülünün ampifilik karakteri, fosfolipit molekülleriyle aynı doğrultuda membran içine nüfuz etmesini sağlar (Şekil 2.2) [24]. Kolesterol, hidrojen bağları (kolesterolün polar hidroksil grubu ve fosfolipidin polar uç kısmı arasında) ve van der Waals etkileşimleri (hidrofobik steroid halka ve fosfolipit açil grupları arasında) yoluyla fosfolipidlerle etkileşir. Kolesterol, hücre zarının akışkanlığını, fosfolipitler arasındaki küçük boşluklara sokulması yoluyla ayarlar, böylece hareketlerini kısıtlar. Bu nedenle hücre zarı akışkanlığı, kolesterol içeriğiyle ters orantılıdır [25].



Şekil 2.2. Membranda kolesterol ve fosfolipidlerin etkileşimi.

Membran bölgelerindeki kolesterolün varlığı çeşitli proteinlerin aktivitesini etkiler. Hücre zarının kolesterol/fosfolipid mol oranı, geçirgenlik, transport protein fonksiyonları, membran enzim aktiviteleri, substrat olarak membran bileşenlerini ve zar proteinlerinin konfigürasyonunu gibi zar özelliklerini etkiler.

Kolesterol, lipoproteinler adı verilen özel taşıyıcılar tarafından kanda taşınan yağda çözünen bir maddedir. Lipoproteinler, karaciğer, bağırsak ve çevresel dokular arasında lipitleri değiştiren kompleks taşıma sisteminin önemli bir parçasıdır. Farklı tipte lipoproteinler, kolesterolü çevreleyen protein kabuğunun kalınlığına göre sınıflandırılır. Dört ana lipoprotein sınıfı sınıflandırılmıştır: trigliseritlerin bağırsak emiliminden türetilen şilomikron; trigliseritlerin taşınması için karaciğerde üretilen çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL); bir VLDL metabolizması ürünü ve kolesterolün birincil taşıyıcısı düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve kolesterolün karaciğere ters taşınmasında rol oynayan yüksek yoğunluklu lipoproteindir (HDL) [26].

Kötü tür kolesterol olarak adlandırılan LDL-kolesterol (LDL-C), kolesterolü çeşitli vücut hücrelerine nakletme ve fazla kolesterolü arter duvarlarında biriktirerek kalp hastalığı riskini arttırmada rol oynamaktadır [27].

“İyi” ya da “sağlıklı” kolesterol olarak adlandırılan HDL-kolesterol (HDL-C), kolesterolün kandan ve arter duvarlarından, vücut tarafından parçalanmak ve bertaraf etmek için safraya dönüştürüldüğü karaciğere taşınmasından sorumludur. Bu “ters kolesterol taşıma işleminin” kalp hastalığını önlemede ve düzeltmede yardımcı olduğuna inanılmaktadır [28, 29].

Serum kolesterol düzeyini ve genel sağlığı inceleyen bazı çalışmalar, yüksek serum kolesterol (ve diğer lipit) derişimleri ile koroner kalp hastalığı, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalığı (IHD) arasında lipit hipotezi olarak adlandırılan bir ilişki olduğunu göstermektedir [30, 31]

Yüksek kolesterol seviyesinin insan sağlığı açısından büyük risk taşıması kişinin kolesterol alımını basit bir şekilde azaltması, IHD’yi tamamen önlemek veya ilerlemesini geciktirmek veya durdurmak için en etkili silahtır [32]. Bununla birlikte, yüksek kolesterol seviyelerinin zararlı etkileri, taranabilir. Yeme alışkanlıklarındaki kolesterol alımında sadece %10’luk bir düşüş gibi nispeten küçük değişiklikler, 70 ve 40 yaşlarında koroner kalp hastalığı riskini sırasıyla %20 ve %50’lik bir oranda azaltmaktadır [33].

2.1.1. Kolesterolün İşlevi

Kolesterolün, düzgün işleyen bir vücudun korunmasına yönelik birçok temel biyolojik süreç ve yolda katkısı oldukça önemlidir. Kolesterol hem temel fosfolipid iki tabakalı özelliklere sahip bir aracılı olarak hem de doğrudan etkileşime girdiği spesifik membran proteinlerinin bir modülatörü olduğu için normal hücre zarı aktiviteleri, kolesterolün varlığına bağlıdır [34, 35]. Örneğin, kolesterol membrana gömülü reseptörlerin fonksiyonunu afinite durumlarını, bağlanma kapasitelerini ve sinyal iletimlerini etkileyerek düzenler.

Kolesterol, sinyal transdüksiyonunda yer alan en büyük hücre yüzey reseptörleri ailesini temsil eden bazı G protein-bağlı reseptörlerin düzenlenmesinde rol oynar. Reseptörler, yığın lipit özellikleri (örneğin kolesistokinin) ve doğrudan kolesterol etkileşimleri (örneğin oksitosin) ile düzenlenebilir. Biyofiziksel çalışmalar, kolesterolün membran hidrokarbon ortamını değiştirerek rodopsin aktivitesini modüle edebildiğini göstermiştir. Bazı durumlarda kolesterol, reseptörü tanımlanmış bir konformasyonda stabilize ederek biyolojik işlevini yerine getirmesini sağlar [36].

Kolesterol ayrıca belirli enzim aktiviteleri için de gereklidir ve Na⁺/K⁺ ATPase, fosfolipidlerle etkileşerek membran özelliklerini kontrol eden, kolesterolün fizyolojik seviyelerini içeren bir zar içinde olduğunda maksimum aktivite sergiler. Membrandaki kolesterolün varlığı iki tabakalı kalınlığı artırır ve hem küçük, yüksüz polar moleküler türlere hem de iyonlara membran geçirgenliğini azaltır. Kolesterolün iyon sızması üzerindeki bu etkisi, aksi durumda ATP şeklinde bir metabolik enerji maliyeti gerektirecek olan, membran boyunca bir elektrokimyasal gradyanın muhafaza edilmesi için esastır [37]. Beyin ve sinir sisteminin doğal büyümesi ve gelişimi kolesterol gerektirir. Sinirler, sinir fonksiyonu ve plastisite için gerekli olan özellikle kolesterol açısından zengin bir madde olan miyelin izolasyon katmanları ile kaplanır [38, 39].

2.1.2. Yüksek Kolesterol ve Oksitlenmiş Kolesterol Seviyelerinin Riskleri

Yüksek miktarda kolesterol ve oksisterollerin besin kaynaklarından kan akışına emilimi, etki alanı geniş biyolojik sonuçlara sahip olabilir.

2.1.2.1 Sitotoksik etki

Çeşitli hayvan hücrelerinin vasküler kas hücreleri, aortik kaslar, endotelyum üzerine oksisterollerin etkilerini inceleyen birçok araştırma mevcuttur ve elde edilen bulgular düşük derişimlerdeki oksisterollerin bile nekroz, hücre büyüme inhibisyonu ve hasar gibi sitotoksik etkilere neden olduğunu açıkça göstermektedir [40].

2.1.2.2. Aterojenik etkisi

Ateroskleroz (damar serleşmesi), iskemik kalp hastalığı ve inmenin en yaygın altta yatan nedenidir ve 2010 yılında dünya çapında dört ölümden sorumludur [41]. Hastalık, kronik inflamasyon ve büyük ve orta büyüklükte arterlerde lipid yüklü plakların birikmesi ile yavaş yavaş ilerler. Ateroskleroz tipik olarak gelişiminin ilk on yılı için plağın aşınması damarları tıkayan ve iskemik doku hasarına yol açan trombüs oluşumuna ya da bozulmaya neden oluncaya kadar fark edilmez [42].

Oksitlenmiş düşük yoğunluklu protein (LDL), yüksek derecede sitotoksiktir ve endotelial bütünlüğün kaybına neden olabilir [43]. Aterojenik hastalık, çok düşük ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL ve VLDL) insan vasküler hücrelerine (endotel hücreleri, makrofajlar, düz kas hücreleri ve lenfositler gibi) bağlanması nedeniyle oluşur [44, 45].

2.1.2.3. Metabolizma ve membranlara etkisi

Oksitlenmiş kolesteroller kolesterol sentezinin inhibisyonuna neden olur ve kanserojendirler. Düşük derişimlerde (10^{-9} ve 10^{-6} M) oksitlenmiş kolesterol, hücre metabolizmasına (hücre büyümesi ve DNA sentezi) ve membran fonksiyonuna ciddi zarar verebilen bir süreç olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-redüktaz enzim aktivitesini azaltarak kolesterol sentezini inhibe eder.

2.1.3. Kolesterol düşürücü ilaçlar

Kolesterol diyetten elde edilir ve ayrıca karaciğerde sentezlenebilir. Ortalama Kuzey Amerika diyeti günde yaklaşık 300-500 mg kolesterol sağlarken, endojen kolesterol kaynakları günde 1000-1600 mg'a ulaşabilir [46]. Vücut tarafından kolesterol oluşumu oranı, diyet kaynaklarından emilen kolesterol miktarına oldukça duyarlıdır. Bağırsakta kolesterol emiliminin azalmasının sadece total serum kolesterol seviyesini düşürmekle kalmayıp, aynı zamanda yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL, iyi kolesterol) oranını kandaki LDL'ye (kötü kolesterol) de arttırabileceği gösterilmiştir [47, 48].

Serum kolesterol seviyelerini düşürmek için kullanılan ilaçların çoğu, kolesterol sentez yolunun hız kontrol edici enzim olan 3-hidroksi-3-metilglükon koenzim A redüktaz (HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ya da statinleri) inhibitörleri olarak işlev görür. Bu inhibitörler LDL kolesterolü %20 ile %55 arasında kolesterol seviyelerini %20-40 arasında düşürür [49]. Statinler (mevastatin, lovastatin, serivastatin ve simvastatin vb.) etkili ilaçlar olsa da maalesef pahalıdırlar ve onlarla birlikte kas zayıflığı ve kas toksisitesini içeren ciddi yan etkilere neden olma potansiyeli taşırlar [50]. Diğer bir ilaç ise, yağda çözünen vitaminlerin, trigliseritlerin veya safra asitlerinin emilimini etkilemeden ve ayrıca ana metabolize edici enzimleri etkilemeden diyet kolesterolün ve safranın ince bağırsak boyunca taşınmasını seçici olarak engelleyen ezetimibe'dir [51].

Bu yeni ilaçların geliştirilmesi ile, hiperkolesterolemi tedavisi muhteşem bir şekilde ilerlemiştir. Bununla birlikte, bazı hiperkolesterolemi vakalarının ilaçlara iyi cevap vermediği de bilinmektedir. Bu ilaçların iki veya üçünü birleştirerek agresif bir tedavi

kullanılsa bile, kolesterol seviyesi, optimum bir seviyeye kadar yeterince düşürülmeyebilir.

2.1.4. Gıdalar ve Kolesterol

Beslenme açısından bakıldığında, kolesterol, bitki kaynaklarında önemli miktarda bulunmaz; çoğunlukla yumurta, et, balık, sığır eti, karides ve süt ürünleri gibi hayvan kökenli gıdalarda bulunur. Normal vücut fonksiyonları için gerekli olan kolesterolün büyük bir kısmı endojen olarak sentezlense bile, önemli miktarda toplam vücut kolesterolü gıdalardan elde edilir [4, 21].

Kolesterol alımı için gıda referans değerleriyle ilgili olarak, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinden heyet, doymuş yağ asitlerinin alımıyla ilgili kararın yanında kolesterol alımı hakkında bir referans önermemeye karar verdi (EFSA, 2010). Bununla birlikte, Almanya-Avusturya-İsviçre (D-A-CH, 2008), Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (WHO / FAO, 2003) yetişkin nüfusta günde maksimum 300 mg kolesterol alımı için öneriler getirdi [21].

İnsanlar günde yaklaşık 1500 mg kolesterol sentezliyor, ancak gıda 300-600 mg kolesterol içeriyor. Kolesterol sentezindeki azalma, plazma kolesterol seviyesini düşürmenin en etkili yoludur. Kolesterol biyosentezi, iki asetil CoA molekülü ile başlar ve HMG-CoA redüktazın hız sınırlayıcı reaksiyona aracılık ettiği bir çoklu enzim yoludur. Statin ilaç sınıfı (simvastatin ve prava-statin), karaciğerdeki güçlü HMG-CoA redüktaz inhibitörleridir. Hiperkolesteromi hastalarında statinlerin plazma kolesterolünü %30'a kadar azaltabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, yan etkiler, döküntüler ve gastrointestinal semptomlar da dahil olmak üzere bu inhibitörlerin kullanımı ile ilişkilidir [52].

Kolesterol, genel kalp sağlığının bir göstergesi olarak kullanılır. Epidemiyolojik çalışmalar plazma kolesterol derişimi ile koroner kalp hastalığı riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Kolesterol açısından zengin bir diyet ile koroner kalp hastalığının yaygınlığı arasında güçlü bir bağlantı da görülmektedir. Kolesterol düşürücü fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler, plazma toplam kolesterolünü düşürmek için, özellikle de kan kolesterol seviyesi çok az olarak yüksek ancak kolesterol düşürücü ilaçların öngörülmesini garanti edecek kadar yüksek olmayan hastalar için olası

alternatif tedavilerdir [21, 53, 54].

Gıdalardaki kolesterolün değerlendirilmesi için analitik yöntemler, bu bileşiğin kardiyovasküler hastalıkla olan ilişkisi nedeniyle çok önemlidir [55]. Yüksek kolesterol, koroner kalp hastalığının gelişiminde bir risk faktörüdür (1160/2011 sayılı Komisyon Yönetmeliği (AB)). Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada engelliliğin ve erken ölümün önemli bir nedenidir (WHO, 2007). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2030 yılına kadar Kardiyovasküler hastalıkların önde gelen ölüm nedenleri olmaya devam edeceğini ve yaklaşık 23.6 milyon kişiyi küresel olarak etkileyeceğini öngördü [56]. Serum kolesterolünde %1'lik bir düşüşün bile koroner kalp hastalığı riskini %2-3 oranında azaltabileceği bildirilmiştir.

2.1.5. Gıda Maddelerinden Kolesterol Uzaklaştırma Yöntemleri

Gıda maddeleri üzerinde kullanılabilen birçok kolesterol uzaklaştırma yöntemi vardır. Bu yöntemler fiziksel, kimyasal, biyolojik (enzimatik) ve kompleksleştirme işlemlerini içerir. Ancak, bu süreçler maliyetlidir.

2.1.5.1. Fiziksel Yöntemler

2.1.5.1.1. Vakumlu buhar damıtma

Bu işlemde buhar, vakum altında sıvı süt yağından geçirilir. Omega Source Corporation bu tescilli teknolojiyi satın almıştır ve şu anda 109.10 kg/gün kolesterolü uzaklaştırılmış susuz süt yağı üretmektedir [57]. Bu yöntemle, serbest kolesterol yüzde 93 oranında azaltılmıştır.

Firma Hoche (Speikem, Almanya) ticari bir ölçekte vakum buhar damıtma teknolojisini kullanmaktadır. Bu yöntemle elde edilen süt yağının koku ve tat bakımından neredeyse nötr olduğu ve %75 daha az kolesterol içeriği olduğu bildirilmiştir [57].

2.1.5.1.2. Kısa yol moleküler damıtma

Kısa yol moleküler damıtma, moleküllerin buharlaşan bir sıvının sıcak yüzeyinden, kondansatörün soğutulmuş yüzeyine kısa bir yoldan aktarılmasına dayanır. Lanzani ve arkadaşları 1994 yılında, tereyağı ve domuz yağı içindeki kolesterolün azaltılması için yeni bir kısa yol moleküler damıtma sistemini araştırmışlardır. Bununla birlikte, bu yöntem susuz tereyağından düşük molekül ağırlıklı trigliseridlerin en az kaybıyla kolesterol uzaklaştırılmıştır [58].

2.1.5.1.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Bradley 1990 yılında yaptığı çalışmada, uygun bir maliyet için bir süt yağı ürünü (%80 plastik krem) üretmenin teknik olarak mümkün olduğunu göstermiştir, bu da süperkritik karbondioksit kullanılarak ekstrakte edilen kolesterolün en az yüzde 90'ını oluşturmuştur. Elde edilen süt yağı rengini ve lezzetlerini korumuştur. Aynı çalışmada bu teknoloji ile kolesterolün %90'ını tereyağından uzaklaştırılmıştır [59].

2.1.5.2. Kimyasal Yöntemler

Gu ve arkadaşları, siklik anhidrit ve kolesterolün hidroksil grubu arasındaki reaksiyona dayanan kimyasal yöntemi tarif etmiştir [60]. Reaksiyon, bir terminal asit grubuna sahip olan akril zincirleri ile monoesterler oluşturur. Bu süreç, kolesterolün %40'ına kadarını hayvansal yağlardan etkili ve ekonomik bir şekilde giderebilir. Wrezel ve arkadaşları, Gu ve arkadaşlarına benzer bir işleme dayanarak "Yenilebilir Yağlardan Kolesterol Çıkarma Yöntemi" patentini çıkarmışlardır [61].

2.1.5.3. Biyolojik Yöntemler

2.1.5.3.1. Kolesterol redüktaz

Kolesterol redüktaz, kolesterolü, insanlar tarafından zayıf bir şekilde emilen koprostanole dönüştüren bir enzimdir. Dehal ve arkadaşları (1991), bakteriler tarafından veya birkaç yeşil bitkinin yapraklarından ekstraksiyonuyla üretilen birkaç kolesterol redüktazını araştırmışlardır. Kolesterol redüktazın kolesterolü süt, krem, kıyma ve domuzda koprostanole dönüştürebildiğini bulmuşlardır. Bakteriyel veya bitkisel kaynaklardan gelen bu redüktazların, gıdaların kolesterol içeriğini azaltmak için kullanılabileceği sonucuna varmışlardır [61].

2.1.5.3.2. Kolesterol oksidazları

Christodoulou ve arkadaşları (1994) gıdalardaki kolesterolün, bazı bakteriyel suşlar tarafından üretilen kolesterol düşürücü enzimler tarafından neredeyse ortadan kaldırılabilceğini bildirmişlerdir. Bu enzimler Xiansheng ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [61-63].

2.1.5.4. Kompleks oluşturma

2.1.5.4.1. Digitonin

Digitonin, kolesterol miktarını belirlemek için çöktürme ajanı olarak uzun bir tarihe

sahiptir. 1909'un başlarında Windaus, bu digitoninin kolesterol ile alkol-çözünmez kompleks oluşturduğunu keşfetti. O zamandan beri, digitonin çöktürme yöntemi, karmaşık karışımlardan kolesterolün analizi ve ayrılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem, yağın aseton veya hekzan gibi organik bir çözücü içerisinde çözünmesini ve sonrasında alkolik digitonin solüsyonunun eklenmesini gerektirir. Çözünmeyen bir kolesterol dijitonid oluşur ve bunlar kolayca uzaklaştırılabilir. Bu yöntem kullanışlı ve basittir. Bununla birlikte, işlem büyük miktarda çözücü ve pahalı kimyasallar gerektirir [61].

2.1.5.4.2. Saponinler

Bitkilerden elde edilen saponinler, seçici olarak kolesterolü bağlamak ve çöktürmek için kullanılabilir. Riccomini ve arkadaşları (1990), krem ve saponinleri 65 °C'de 1 saat süreyle karıştırılması, karışımın Celite ile süzülmesi ve su ile yıkanması ile kremada %80'lik bir kolesterol azaltımı rapor etmiştir. Susuz tereyağında aynı işlem kolesterolde %90'lık azalma sağladı. Son ürünlerde olumsuz bir koku tespit edilmemiştir. Micich ve arkadaşları (1992), kolesterolün tereyağından uzaklaştırılmasını iyileştirmek için polimer destekli saponinleri araştırmışlardır. Bu yeni destek tekrar kullanılabilir ve tereyağında kalan saponini azaltmıştır. 1.0 g polimer destekli saponinler, hekzanda 3.0 mg saf kolesterol bağlayabilir. Ayrıca, tereyağından (hekzan içinde çözülmüş) kolesterol gideriminin, saf kolesterolden %10-40 daha az etkili olduğu da gösterilmiştir [61].

2.1.5.4.3. β -siklodekstrin

β -siklodekstrin, kolesterolü ve esterlerini sulu çözeltilerden uzaklaştırmak için kullanılabilir [64, 65]. β -siklodekstrin, α - (1-4)-bağıyla birleştirilen yedi glikoz biriminden oluşan siklik bir oligosakarittir. Molekölün merkezinde, çeşitli bileşiklerle bir kompleks oluşturma yeteneğine sahip bir boşluk vardır. β -siklodekstrin, serbest ve esterlenmiş kolesterol ile toksik olmama, yenilebilirlik, kimyasal stabilite ve kompleksleştirme avantajlarına sahiptir.

β -siklodekstrin ile hayvansal yağlardan kolesterolün uzaklaştırılması hakkında çeşitli çalışmalar bildirilmiştir. Yen ve Tsai, β -siklodekstrin ile bir domuz yağı karışımından kolesterol uzaklaştırılması üzerinde çalışmışlardır. Onlar kolesterolün yaklaşık

%90'ının, domuz yağından çıkartılabileceğini buldular [66].

2.2. Fonksiyonel Gıdalar

“Fonksiyonel gıda” terimi, özellikle fizyolojik etkilere sahip özel bileşenlerle takviye edilmiş gıda ürünlerini tanımlamak için beslenme, duyuşal tatmin, takviye ve fizyolojik sistemlerin modülasyonu arasındaki ilişkiler üzerine yapılan bir çalışma sonucunda ilk olarak 1984 yılında Japonya’da kullanılmıştır [67-69]. Poulsen (1999), fonksiyonel gıdaların üretiminin dört kategorisini belirterek daha geniş bir fonksiyonel gıda tanımı sunmuştur: (a) iyileştirme; yani, halihazırda ürün içinde mevcut olan bir maddeyi ekleyerek geliştirme; (b) süstitüsyon (yerine koyma); yani bir bileşenin benzer, ancak daha sağlıklı bir madde ile yer değiştirme; (c) zenginleştirme; yani temel üründe bulunmayan bir maddenin eklenmesi; ve (d) eleme; yani sağlıklı bir bileşenin çıkarılması. [70].

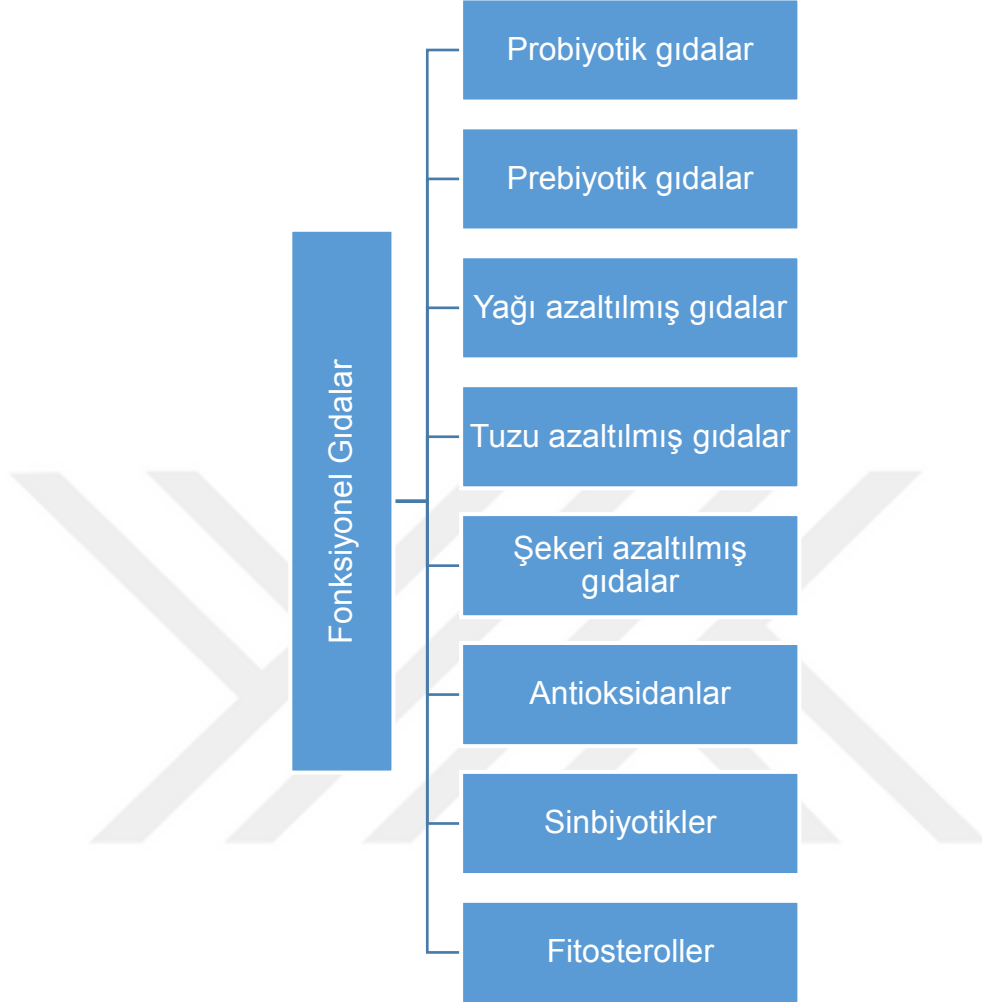
Fonksiyonel gıdaların hedefleri çeşitlidir: bunlar vücudun genel koşullarını (örneğin, pre ve probiyotikler) geliştirir, bazı hastalıkların (örneğin kolesterol düşürücü ürünler) riskini azaltır ve bazı hastalıkları tedavi etmek için kullanılabilir. Fonksiyonel gıda pazarının yükselişi temel olarak kişisel sağlıkla ilgili bir dizi ciddi farkındalıktan kaynaklanmaktadır. Fonksiyonel gıdalar, etkilerini diyetle tüketilmesi beklenebilecek normal miktarlarda göstermelidir. Bununla birlikte, bu kavram herhangi bir özel mevzuatın ya da tanınmış uluslararası tanımın olmamasından dolayı resmi bir karar değildir [71]. Fonksiyonel gıdaların gelişimi, özel yatırımları, tüketim kararlarını ve hükümet düzenlemelerini desteklemek için araştırma ile elde edilen bilgi akışlarının gerekli olduğu önemli pazar potansiyeli ile uzun vadeli bir akım gibi görünmektedir [72].

2.2.1. Bazı fonksiyonel gıda ürünleri örnekleri

İlk üretilen fonksiyonel gıdaların çoğu vitamin E, folik asit, çinko, demir ve kalsiyum gibi vitaminler ve minerallerle takviye edilmiş olanlardır. Daha sonra üretilen fonksiyonel gıdalarda sağlıklı bir yaşamı teşvik etmek ya da kanser gibi hastalıkların önlenmesi için omega-3 yağ asidi, fitosterol ve çözünür lif gibi çeşitli mikrobeyinlerle zenginleştirilmiş gıdalara odaklanılmıştır. Son zamanlarda, gıda şirketleri, tek bir gıdada birden fazla sağlık yararı sunan gıda ürünlerini geliştirmek için adımlar atmıştır [73].

Fonksiyonel gıdalar neredeyse tüm gıda kategorilerinde geliştirilmiştir (Şekil 2.3) ve

olası sınıflandırmalarına göre bazı fonksiyonel gıdalar (1) düzenli mide ve kolon fonksiyonlarını (pre-ve probiyotikler) geliştiren ya da öğrenme kabiliyetlerini ve davranışlarını destekleyerek çocukların hayatını iyileştirenler gibi yaşama iyi yönde katkıda bulunanlar; (2) yüksek kolesterol veya yüksek tansiyon gibi mevcut bir sağlık riski sorununu azaltmak için tasarlanmış olanlar; (3) laktoz içermeyen, glutensiz ürünler gibi yaşamımızı kolaylaştıran ürünlerdir [74]. Fonksiyonel gıda ürünleri, yiyecek ve içecek pazarının tüm bölümleri üzerinde homojen bir şekilde dağılmamakta, tüketici sağlığı ile ilgili endişeler ve ürün tercihleri piyasalar arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu ürünler temel olarak süt, şekerleme, alkolsüz içecekler, unlu mamuller ve bebek maması pazarlarında başlatılmıştır [75]. Fonksiyonel gıdaların tasarımı ve geliştirilmesi, renk, doku, tat ve ağız hissi gibi ürün özelliklerine bakılmaksızın, sadece istenilen besin fonksiyonuna bağlı olarak yapılmamalıdır. Gıdaların görünüm ve duyuşal özellikleri, besin değerlerinden önce tüketicinin en önem verdiği özellikleridir. Üretim açısından bakıldığında, en popüler fonksiyonel gıda ürünü formatı içeceklerdir. Fonksiyonel içecekleri farklı fizikokimyasal fonksiyonel özelliklere sahip birkaç bileşen içeren ve aynı zamanda çeşitli temel süreçlerle karşılaşabilen daha karmaşık gıda formülasyonu ile karşılaştırıldığında formüle etme ve işleme nispeten daha kolaydır [76, 77].



Şekil 2.3. Dünyanın her yerinde üretilen fonksiyonel gıdaların bazıları.

2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT), genellikle bir moleküler anahtarla uyuşacak bir moleküler kilit yapma yöntemi olarak tanımlanır. Şekil, boyut ve fonksiyonel gruplar için tamamlayıcı olan özel olarak oluşturulmuş bağlanma bölgelerine sahip moleküler olarak baskılanmış polimerlerin (MIP) oluşturulması için bir tekniktir. Yapıların öngörülebilirliği, tanıma özgüllüğü ve uygulama evrenselliği gibi benzersiz özellikleri sayesinde, MIP'ler çeşitli alanlarda çok çeşitli uygulamalar bulmuştur [78]. MIP'ler kalıp molekül (atom, iyon, molekül, kompleks veya moleküler, iyonik veya makromoleküler bir düzenek, mikroorganizmalar) varlığında fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kopolimerizasyonu ile sentezlenir. Kalıp moleküllerinin yapıdan uzaklaştırılmasından sonra

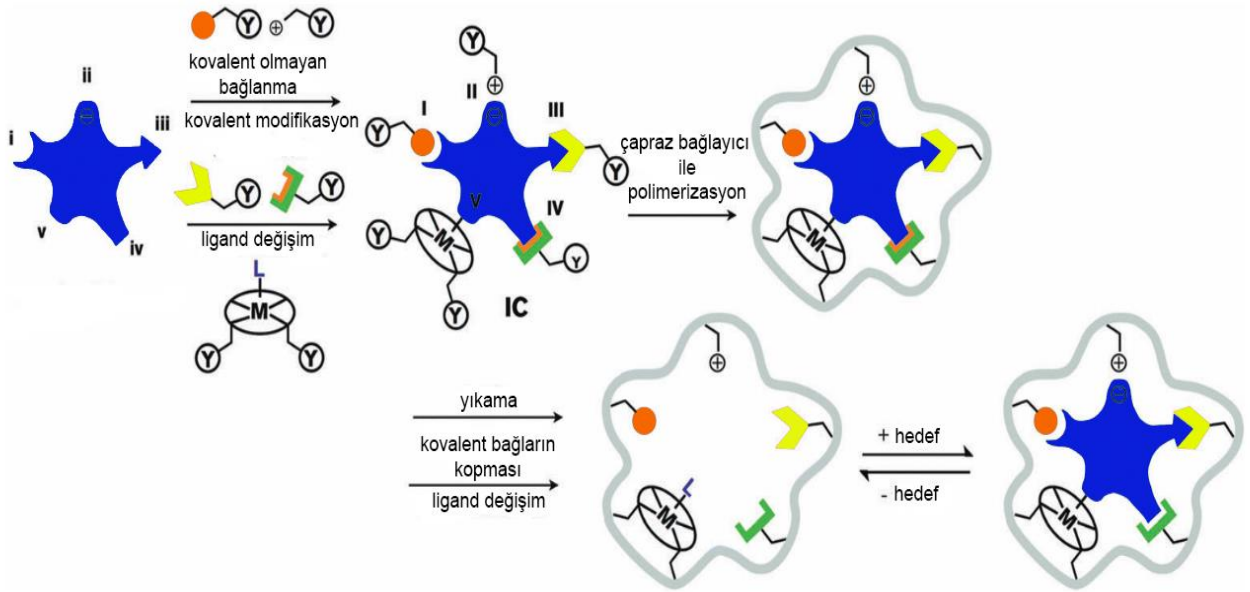
kalıp molekülüne şekil, boyut ve uzaysal yönelimine tamamlayıcı olan tanıma boşlukları, moleküler hafıza, çapraz bağlı polimer matrisinde oluşturulur (Şekil 2.4) [16, 79].

Genel olarak polimer matrisi içinde mevcut moleküler tanıma alanlarını kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasındaki, hidrojen bağları, dipol-dipol ve iyonik etkileşimler gibi moleküller arası etkileşimler oluşturur. Böylece, elde edilen polimer moleküler tanıma ile seçici olarak sadece kalıp moleküllerini tanır ve bağlar.

Moleküler baskılanmış polimerlerin baskılama işleminde kullanılan hedef molekül için yüksek seçicilik ve afiniteye sahip olması, protein ve nükleik asit gibi biyolojik sistemler ile karşılaştırıldığında yüksek sıcaklığa ve basınca, asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı daha kararlı olması, düşük maliyetli olması ve oda sıcaklığında uzun süre depolanabilmesi gibi avantajlara sahiptir [80, 81].

2.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Temelleri

Moleküler baskılama işlemi, fonksiyonel bir monomerin ve moleküler bir kalıbın etrafında bir çapraz bağlayıcının polimerizasyonunu içerir [82]. İlk olarak, kalıp-monomer kompleksleri, seçilen kalıp molekülü ile tamamlayıcı bir fonksiyonel monomer arasında gerçekleşir sonra kompleks çevresinde bir çapraz bağlama polimerizasyon reaksiyonu gerçekleşir [83]. Şekil 2.4'te gösterildiği gibi polimerizasyon esnasında oluşan etkileşimlere göre bağlanma bölgeleri farklı özellikler gösterir ve moleküler baskılama yöntemi, polimerizasyon sırasında monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimlere göre sınıflandırılır [78].



Şekil 2.4. Moleküler baskılamada kullanılan beş temel yöntem: (1) kovalent olmayan baskılama, (2) elektrostatik/iyonik baskılama, (3) kovalent baskılama, (4) yarı kovalent baskılama ve (5) metal merkezli koordinasyon temelli baskılama [78].

Genellikle, MIP üretmek için iki ana yöntem vardır; kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlere dayanır:

Kovalent baskılama; fonksiyonel monomer kalıntılarının sadece baskılanmış boşluklarda mevcut olmasını sağlar ve homojen bağlanma bölgesi dağılımı elde edilir. Ancak, kovalent baskılama, tersinir kondensasyon reaksiyonları sınırlı olduğundan daha az esnek bir yöntem olarak kabul edilir. Ayrıca güçlü kovalent etkileşimler yavaş bağlanma ve ayrışma ile sonuçlanacağından termodinamik dengeye ulaşmak çok zordur [84].

Kovalent olmayan baskılama; iyonik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve π - π etkileşimleri ile ilerleyebilir. En yaygın etkileşim, genellikle metakrilik asit (MAA) grupları ve polar olmayan çözücülerdeki birincil aminler arasında meydana gelen hidrojen bağlarıdır [85]. Son zamanlarda, kovalent olmayan baskılama, işlemin basitliği ve bağlanma ve ayrılmanın hızlı olması nedeniyle en popüler ve genel sentez stratejisi haline gelmiştir. Bununla birlikte, kovalent olmayan baskılama, kompleksi bir arada tutan etkileşimlerin bir miktar bozulmasına bile duyarlıdır (örneğin, suyun varlığında) bu nedenle

de çok güçlü değildir [83]. Kovalent baskılamanın dayanıklılığını ve kovalent olmayan baskılamanın hızlı hedef alımının birleştirmek için, yarı kovalent baskılama olarak adlandırılan yeni bir yöntem ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, kalıbın fonksiyonel monomere kovalent olarak bağlandığı ama kalıbın yeniden bağlanmasının kovalent olmayan etkileşimlere dayandığı alternatif bir yöntemdir [86].

2.3.2. Moleküler Baskılamamanın Temel Öğeleri

Tipik bir MIP sentez protokolü bir kalıp, fonksiyonel bir monomer, çapraz bağlayıcı, polimerizasyon başlatıcısı ve bir çözücü (porojen) içerir. MIP'lerin üstün özelliklerle hazırlanmasında polimerizasyon reaksiyonu, monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çözücü tipi ve miktarı, polimerizasyon reaksiyonun sıcaklığı ve süresi gibi önemli birçok faktör olmasına rağmen moleküler baskılamanın üç ögesi, kalıp moleküller, fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcılar oldukça önemlidir [78].

2.3.2.1. Hedef Kalıplar

Moleküler baskılamanın en temel amacı, biyolojik reseptörlerle karşılaştırılabilir afinite ve özgüllüğe sahip MIP'lerin üretilmesidir.

Genel olarak, bir ideal kalıp molekülü üç gereksinimi karşılamalıdır; polimerizasyonu engellemeyen fonksiyonel gruplar içermelidir; polimerizasyon reaksiyonu sırasında mükemmel kimyasal kararlılık göstermelidir ve fonksiyonel [87] monomerlerle kompleks oluşturabilen fonksiyonel gruplar içermelidir [86].

Günümüze kadar MIP'ler çok çeşitli küçük organik moleküllerin tanınması ve tespiti için başarıyla uygulanmaktadır. Ve çok sayıda iyon baskılı polimerde hazırlanmaktadır ve Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi metal iyonlarının seçilmesi ve zenginleştirilmesi için kullanılmıştır. Ancak, metal iyonun kendisi bir kalıp molekül olarak görüldüğünde, genellikle düşük seçicilik elde edilmektedir. Metal iyonları aynı yüklere, benzer iyonik yarıçaplara ve özelliklere sahiptir [88]. Günümüzde baskılama kalıbı olarak bir metal iyonu ve bir ligand kompleksinin kullanılması yöntemi, iyon baskılamada yeni bir eğilimdir. Metal iyon-ligand kompleksi, işlevsel monomerler ile kolayca önceden polimerize edilebilir ve polimerizasyon reaksiyonundan sonra, yüksek adsorpsiyon verimine ve seçiciliğine katkıda bulunan metal iyonu için özel tanıma bölgeleri bırakarak metal iyonu uzaklaştırılır.

Küçük moleküllere ek olarak, proteinler, virüsler ve hücreler gibi MIP'ler için büyük yapılandırılmış türler de kalıp molekül olarak kullanılmaktadır [87, 89, 90]. Ancak, proteinlerin ve diğer biyomakromoleküllerin baskılanması bazı problemlere neden olabilmektedir [91, 92]. Çizelge 2.1'de, çeşitli hedef kalıp türleri özetlenmektedir [78].

Çizelge 2.1. Moleküle baskılamada yaygın olarak kullanılan hedef kalıplar.

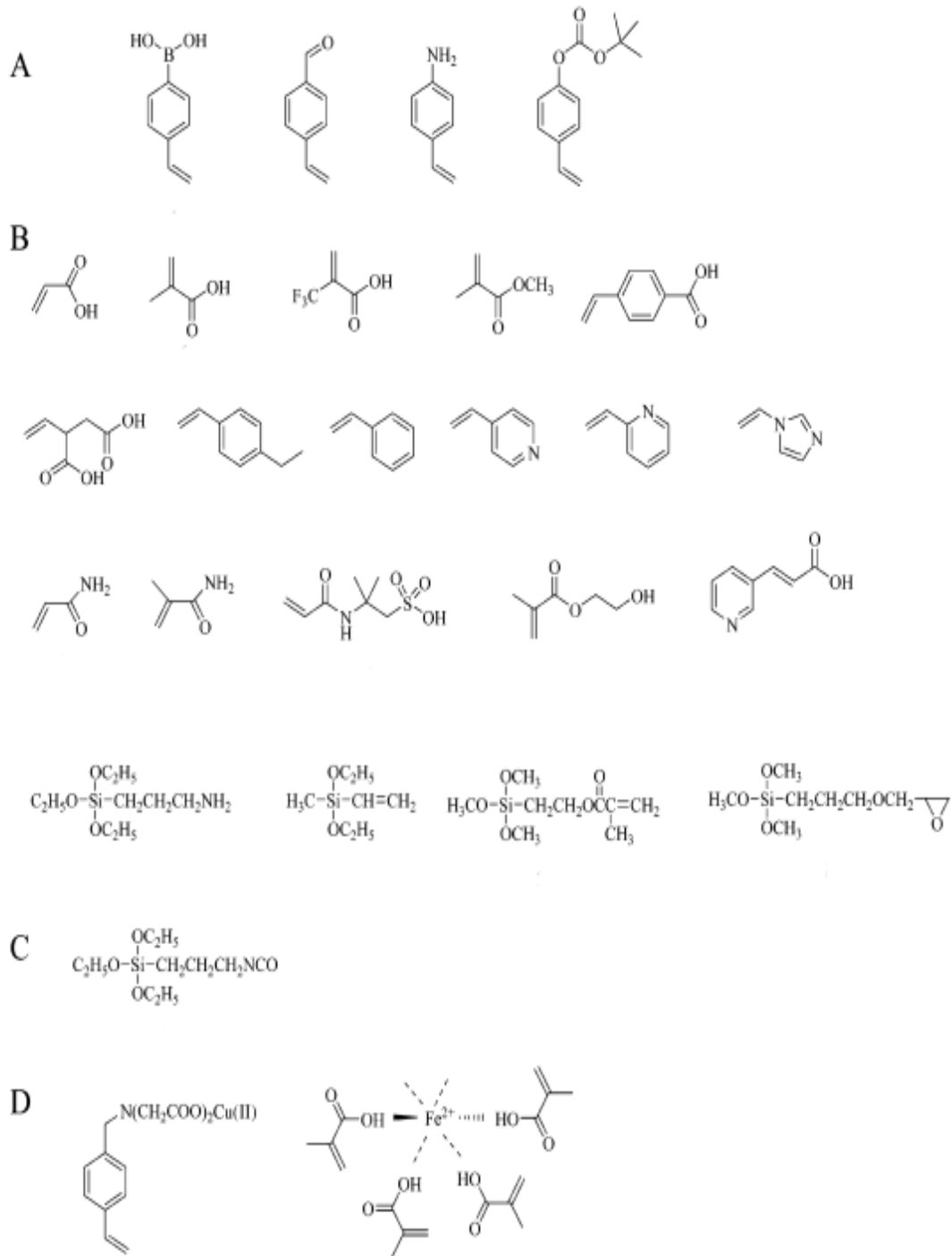
Tür	Tipik örnek
İyonlar	Pu(II); Hg(II); CH ₃ Hg(I); Cd(II); Cu(II); Cr(III); Fe(III); Ni(II); UO ₂ ²⁺ ; Th(IV); Eu(III); As(III); PO ₄ ³⁻
Organik moleküller	Pestisitler: Atrazin; 2,4-diklorofenoksiasetik asit; benzimidazol fungusitler Endokrin sistemi bozan kimyasallar: Bisfenol A; estradiol; estron; polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) Patlayıcı: 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) Farmasötikler: Tetrasiklin; kuinolon, propranolol; digoksin; sülfonamidler Amino asitler ve peptidler: Tirozin; alanin; tripeptid; helikal peptidler Şekerler: D-fruktoz, D-glikoz; D-galaktoz
Biyomakromoleküller	Lizozim; adenzin; sığır serum albümin (BSA)
Hücreler ve virüsler	Tütün mozaik virüsü; sığır lösemi virüsü; dengue virüsü; gut homing T

2.3.2.2. Fonksiyonel monomerler

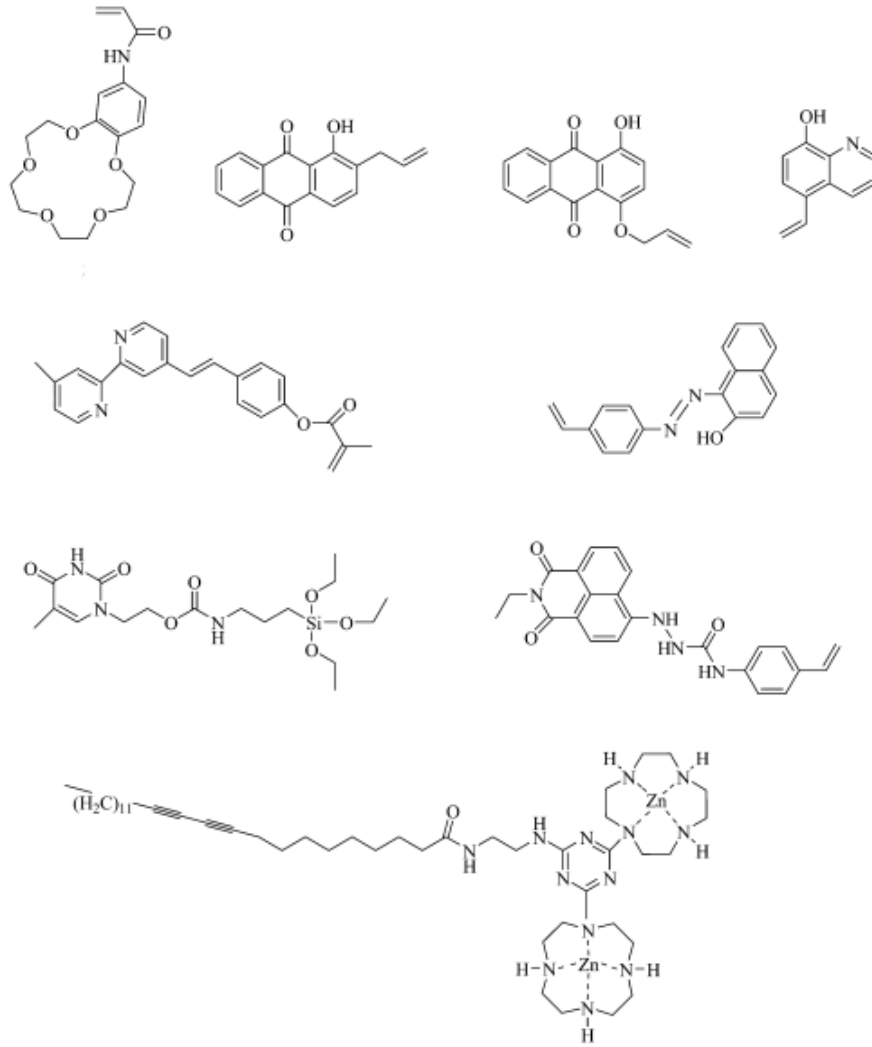
Fonksiyonel monomerin rolü, fonksiyonel gruplar sağlayarak kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla kalıp moleküle bir ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır. Dolayısıyla, kalıp ile kuvvetli bir şekilde etkileşime girebilen ve polimerizasyondan önce spesifik donör-reseptör veya antibadi-antijen kompleksleri oluşturabilen uygun bir fonksiyonel monomerin seçilmesi önemlidir. Çünkü moleküler baskılanmış polimerlerin afinitesini etkileyen kalıp molekül ve monomer arasındaki etkileşimlerin gücü tanıma bölgelerinin doğruluğunu ve seçiciliğini belirler. Etkileşim gücü arttıkça kompleks daha kararlı olur ve bu durum, moleküler baskılanmış

polimerlerin yüksek bağlanma kapasitesine sahip olmasını sağlar. Bazı tipik fonksiyonel monomerler Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Bunlar arasında MAA, hidrojen bağ vericisi ve alıcı özellikleri nedeniyle “evrensel” bir fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır [93]. Ayrıca, MAA'nın yüksek molar fraksiyonları polimerik malzemelerin büyük gözenek boyutuna neden olur ve polimerlerin bağlanma kapasitesini daha da artırır [94].

Bilindiği gibi, moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin sayısı sınırlıdır, bu da MIP'lerin seçiciliğini ve diğer uygulamalarını bir ölçüde sınırlandırmaktadır. Kalıplarla güçlü etkileşimler oluşturabilen yeni fonksiyonel monomerlerin tasarlanması ve sentezlenmesi gereklidir. Genel olarak, fonksiyonel bir monomer iki tip birimden oluşur. Biri bir vinil çift bağ gibi tanıma birimi ve diğeri silikon hidroksil gibi polimerleştirilebilir bir birimdir. Bu nedenle, vinil grubu ve silikon hidroksil tarafından modifiye edilen bazı kompleks ligandlar, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi [95-97] tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Moleküler baskılanmış polimerlerin afinitesini ve baskı verimliliğini polimer sentezindeki kalıp molekül ve monomerin mol oranları etkiler. Düşük mol oranları daha az sayıda kalıp-monomer komplekslerinin oluşumuna ve polimerde daha az bağlanma bölgelerine neden olurken, çok yüksek mol oranları düşük bağlanma seçiciliğine neden olur. Bu nedenle, yüksek baskı verimi elde ederek kalıp moleküle karşı seçiciliği arttırmak için monomer-kalıp molekül mol oranı optimize edilmelidir.



Şekil 2.5. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler: (A) Kovalent baskılama, (B) Kovalent olmayan baskılama, (C) Yarı-kovalent baskılama, (D) Ligand değişim temelli baskılama [78].



Şekil 2.6. Moleküler baskılamada kullanılan yeni fonksiyonel monomerlerin kimyasal yapıları [78].

2.3.2.3. Çapraz bağlayıcılar

Polimerizasyon işleminde, kalıp molekülleri etrafındaki fonksiyonel moleküllere stabilize etmek için bir çapraz bağlayıcı kullanılır, böylece kalıp moleküllerin uzaklaştırılmasından sonra bile yüksek düzeyde çapraz bağlı bir katı polimer oluşur. Çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, MIP'lerin seçiciliği ve bağlama kapasitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Genel olarak, çok düşük miktarlarda çapraz bağlayıcı, düşük çapraz bağlama derecesine bağlı olarak kararsız mekanik özelliklere neden olur, yüksek miktarda çapraz bağlayıcı ise MIP'lerin birim kütlesi başına tanıma bölgelerinin sayısını azaltır.

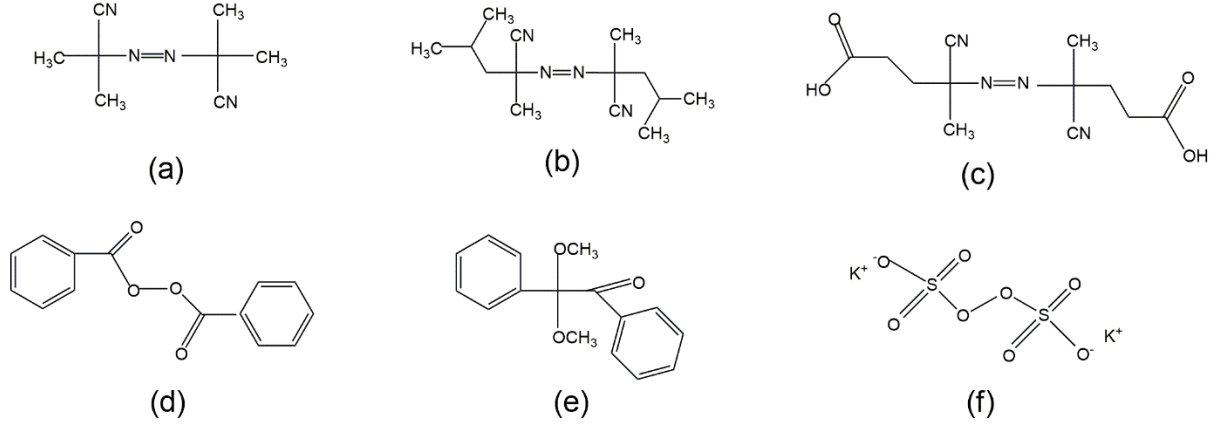
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM), N,N'-metilenbisakrilamid (MBAA) ve divinilbenzen (DVB) yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı maddelerdir [78, 80].

2.3.2.4. Porojenler

Porojenler (porojenik çözücüler) genel olarak polimerasyon işleminde dağılma ortamı ve gözenek oluşturuıcı maddeler olarak görev yaparlar. Dolayısıyla, polimerizasyonda da önemli bir rol oynarlar. Genellikle, MIP sentezi için kullanılan çözücüler 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofuran (THF), asetonitril, dikloroetan, kloroform, N,N-dimetilformamid (DMF) ve toluendir [98]. Porojenlerin polaritesi, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi etkileyebilir. Polimerlerin adsorpsiyon özellikleri ve morfolojisi, kullanılan çözücülerin tiplerine bağlı olduğu için, toluen, asetonitril ve kloroform gibi polar olmayan ve daha az polar organik çözücüler, genellikle iyi bir baskılama verimi elde etmek için kovalent olmayan baskılamada kullanılır. Monomerlerin ve moleküler baskılama için çözücülerin seçim süreçlerini değerlendirmek ve MIP seçiciliği hakkında bir fikir sahibi olmak için, teorik hesaplamaların kullanılması çok önemlidir [99].

2.3.2.5. Başlatıcılar

MIP'lerin büyük çoğunluğu yaygın olarak serbest radikal polimerizasyon (FRP), fotopolimerizasyon ve elektropolimerizasyon ile hazırlanır. FRP, çok çeşitli fonksiyonel gruplar ve kalıp yapıları için termal veya fotokimyasal olarak başlatılabilir. Başlatıcı olarak peroksi bileşiklerinin yanı sıra azo bileşikleri yaygın olarak kullanılır (Şekil 2.7) [82, 100, 101]. Başlatıcılardan, azobisisobutironitril (AIBN), 50-70 °C ayrışma sıcaklığında en uygun şekilde kullanılır. Polimerizasyon reaksiyonunu sağlamak için, polimerizasyondan hemen önce çözünmüş oksijenin polimerizasyon çözeltilerinden uzaklaştırılması çok önemlidir ve oksijen, azot veya argon gibi inert bir gaz ile temizlenebilir.



Şekil 2.7. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan başlatıcıların kimyasal yapıları. (a) Azobisisobutironitril (AIBN); (b) azobisdimetilvaleronitril (ADVN); (c) 4,4'-azobis(4-siyanovalerik) (ACID); (d) benzoilperoksit (BPO); (e) benzildimetilasetal (BDK) ; (f) potasyum persülfat (KPS) [78].

2.3.3. Karakterizasyon yöntemleri

Geleneksel olarak, MIP'lerin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile belirlenir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve çeşitli floresan teknikleri de ince film MIP'lerin karakterizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Monomer-kalıp etkileşimlerini karakterize etmek için nükleer manyetik rezonans (NMR), kızılötesi (IR) ve UV-Vis spektroskopilerini kullanılmaktadır. Polimerlerin spesifik yüzey alanları ve gözenek boyutları azot adsorpsiyon deneyleri aracılığıyla Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi ile ölçülebilir. Termal kararlılık termogravimetrik analiz (TGA) ile incelenir. Fe₃O₄ gibi manyetik malzemeler için manyetik özellikler, titreşimli örnek manyetometresi (VSM) kullanılarak analiz edilir. MIP'ler için tipik karakterizasyon yöntemleri Çizelge 2.2'de listelenmiştir [78].

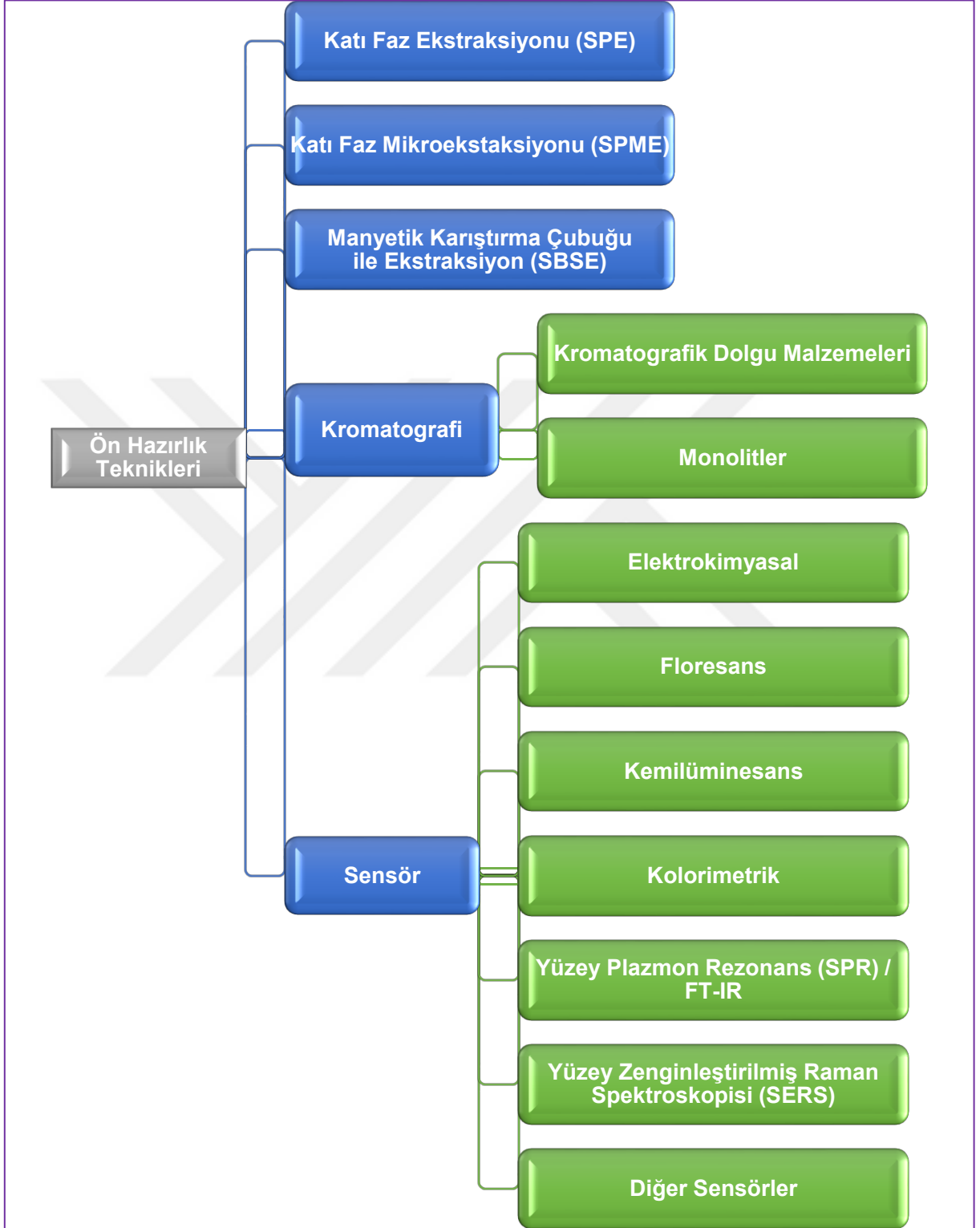
Çizelge 2.2. MIP için tipik karakterizasyon yöntemleri ve temel amaçları.

Amaç	Karakterizasyon Yöntemi
Morfoloji değerlendirilmesi	SEM, TEM, AFM
Hedef molekül ile monomerlerin etkileşimini gösterme ya da hesaplamalı tasarım verilerinin doğrulanması için	NMR, IR, UV-vis
Yapı analizi	X-ışını absorpsiyon ince yapı, difraksiyon ve XPS
Polimerin gözenek boyutu ve özgül yüzey alanı ölçümü	Azot adsorpsiyon
Termal kararlılığın değerlendirilmesi	TGA
Manyetik özelliklerinin değerlendirilmesi	VSM

2.3.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları

MIT'in çeşitli akıllı teknolojileri ve stratejileri hızlı bir şekilde gelişmektedir bunun yanı sıra, geleneksel polimerizasyon prosedürlerinin sürekli kullanımı ve geliştirilmesi ile birlikte üstün performanslara sahip yeni MIP'ler hazırlandı. Sonuç olarak, daha heyecan verici ve evrensel uygulamalar gerçekleştirildi. Örneğin, hollow gözenekli polimer sentez teknolojisi ile birleştirilmiş yüzey baskılama teknolojisinin, çöktürme polimerizasyonu içine sokulmasıyla yüksek adsorpsiyon kapasitesine, yüksek baskılama verimliliğine, iyi morfolojiye, homojen boyuta ve ideal yüzey özelliklerine sahip MIP'ler üretilir, bunlar özellikle örnek ön işlemi veya kromatografi için sorbent veya sabit faz olarak uygundur.

Nanomalzemelerin ve nanobaskılamanın hazırlanması gibi sol-jel işlemlerine kompozit baskı malzemesi stratejisinin sokulmasıyla kimyasal/biyolojik algılama için daha uygun olan mükemmel arayüz özelliklere, elektriksel ve optik özelliklere sahip MIP'ler hazırlanmaktadır. MIP'ler Şekil 2.8'de şematik olarak gösterildiği gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Görüldüğü gibi, MIP'ler örnek ön hazırlık ve kromatografik ayırma (SPE, monolitik kolon kromatografisi vb.) ve aktif moleküllerin, farmasötiklerin, çevresel kirleticilerinin vb. algılanması (elektrokimyasal algılama, floresan algılama vb.) için yaygın olarak kullanılmaktadır. MIP'ler saflaştırma/ayırma ve gerçek örneklerin algılanmasında da yaygın olarak kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.8. Ön hazırlık tekniklerinde, kromatografide ve sensör çalışmalarında moleküler baskılanmış polimer uygulamalarının yapısal diyagramı [78].

2.4. Kriyojel

Geleneksel jel, monomerlerin varlığında oda sıcaklığında ya da oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda hazırlanan gözenekli bir polimerdir. Sıcaklık 0 °C ile -20 °C arasındayken, çözücünün (örneğin su) donma noktasının altındaki bir sıcaklıkta, polimerizasyon ya da çapraz bağlanma reaksiyonu, monomer ya da öncülleri içeren yarı katı fazda meydana gelir. Reaksiyon ürünü oda sıcaklığında eridikten sonra gevşek, makro gözenekli bir kriyojenik jel benzeri polimer hazırlanır ve kriyojel olarak adlandırılır.

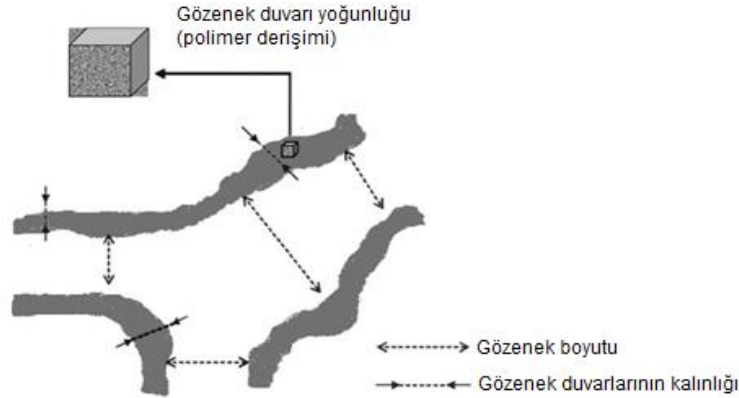
Su, çözücü, dağıtıcı madde ve porojen olarak hareket edebilir. Su, kriyojelin makro gözenekli yapısını suyun donmuş buz kristalinin geçici olarak tamamen birbirine bağlı bir kriyojenik iskelete dönüştüğü bir faz ayrımıyla oluşturmaya yardımcı olur. İskelet içinde dağılan reaktant bakımından zengin sıvı organik mikrofaz içinde oluşturulan polimerizat, kriyojel oda sıcaklığında çözüldükten sonra bir gözenek duvarı olacak şekilde büyür.

Kriyojel içinde tamamen birbirine bağlı bir yapı oluşturulur, böylece buz kristalinin şekli ve boyutu makro gözeneklerin şeklini ve boyutunu belirler [102, 103]. Kriyojelin özgül gözenekli yapısıyla aktif tanıma bölgelerinin çoğu hedefe karşı hem yüksek seçicilik hem de yüksek adsorpsiyon kapasitesi kazanır [104]. Aktif tanıma bölgeleri uygun bir hedef molekülü, monomer ve çapraz bağlama reaktifinin tepkimesiyle oluşur ve kriyojeldeki gözeneklerin iç yüzeyinde aşılama modifikasyonu gibi kimyasal modifikasyonla büyüyebilirler. Kriyojelin gözeneklerinin elastik duvarı iyi bir mekanik kararlılığa sahiptir ve bu da tekrarlanan kurutma-şişme ve sonrasında çok sayıda sıkıştırma-geri kazanımdan sonra bile kriyojenin gözenek yapısını, iç yüzeyini ve adsorplayıcı özelliklerinin kararlılığını %50'den fazla bir oranda korumaya yardımcı olur. Bu, durum kuru halde saklama için, ıslak halde rejenerasyon için ve kriyojelin çoklu tekrar kullanımı için uygundur [105]. Kriyojeller ısıya duyarlıdır ve gözenekli yapısı farklı sıcaklıklarda değişebilir [103, 106]. Buna özelliğine dayanarak, molekül baskılı kriyojel bir monolitik kolonunun kolon verimliliğini arttırabilir ve sıcaklık değişimi ile maddelerin ayrılmasını iyileştirilebilir.

2.4.1. Kriyojelin yapısı ve özellikleri

Kriyojeller, belirli bir uygulama için uyarlanabilen çok çeşitli morfoloji ve özellik ile üretilir. Bunlar, heterojen, transparan olmayan, geniş makro gözenekli malzemelerdir. Başlangıçtaki monomer/polimer, çözücü, başlatıcı ve çapraz bağlayıcının doğası, bunların derişimleri ve oranları, sıcaklık ve donma hızı [107] gibi deneysel sentez koşullarına bağılı olarak, makro gözenek büyüklüğü geniş bir aralıkta değışir. Örneğin, çapraz bağlayıcı olmadan üretilen ısıl tersinir PVA kriyojeleri 100 nm ile 1 μm arasında gözenek boyutuna sahiptir. Kimyasal olarak çapraz bağılı PVA kriyojelleri 1 μm 'den 150 μm 'ye kadar geniş gözeneklere sahiptir. Süper makrogözenekli kriyojeller genellikle birbirine bağılı gözenekli yapıya sahip süngerimsi malzemelerdir [108].

Kriyojellerin özellikleri, gözenek yapısına (gözenek boyutu, gözenek büyüklüğü dağılımı ve ara bağılantı), gözenek duvarının kalınlığına ve şişmiş gözenek duvarlarında polimer yoğunluğu olarak ifade edilen yoğunluğa bağılıdır (Şekil 2.9) [109]. Gözenek boyutu toplam gözenek hacmini tanımlar ve gözenek ağılar arası bağılantı ile birlikte jeldeki kütle transferini kontrol eder. Gözenek duvar kalınlığı ve yoğunluğu, kriyojenin makroskopik mekanik özelliklerini belirler.



Şekil 2.9. Gözenekli hidrojenlerin performansını etkileyen parametrelerin şematik gösterimi [108] .

Kriyojeller büyük miktarda sıvıya sahiptir ve en yaygın kullanılan çözücü sudur. Bazı malzemelerde, toplam kütlenin %97'sini oluşturur. Kriyojel içindeki toplam sıvı hacmi iki fraksiyondan oluşur: (1) duvarlar içindeki polimer ağı tarafından bağlanan çözücü ve (2) gözeneklerde bulunan kılcal bağlı veya serbest çözücü [108]. Kılcal bağlı çözücü kriyojellerde çözücü içeriğinin büyük kısmını oluşturur ve kriyojellerden küçük bir basınçla jeli sıkarak, mekanik olarak birbirine bağlı gözeneklerden kolayca çıkarılabilir. Makromoleküller ve hatta 50 µm'den daha büyük gözeneklere sahip kriyojellerdeki kolloid parçacıklar (protein miseller ve virüsler) dahil olmak üzere oldukça gözenekli birbirine bağlı yapı, tüm çözücülerin engelsiz difüzyonuna izin verir [110]. Bu özellik onları biyolojik parçalama ve hücre kültürü için cazip malzemeler yapar [111]. Biyolojik parçalama uygulamaları için monolitik kriyojeller doğrudan kromatografik kolonlarda hazırlanmıştır. Monolitik kolonlar, viskoz solüsyonlara ve ham hücre homojenatları gibi partikül süspansiyonlarına bile çok düşük akış direnci göstermiştir [17].

Akıllı polimerlerden üretilen kriyojeller sıcaklık, pH ve çözeltinin iyonik gücü gibi çevresel faktörlerin küçük değişikliklerinden sonra şişme derecelerini önemli ölçüde değiştirirler. Kriyojellerin tepki süresi, sıradan jellerdeki uzun mesafelere kıyasla kriyojel makro gözenekli yapının ince duvarlarındaki kısa mesafeler boyunca hızlı kütle ve ısı aktarımı nedeniyle aynı kimyasal bileşimdeki normal jellerinden daha hızlıdır [108].

Moleküler olarak baskılanmış kriyojelin hazırlama süreci şematik olarak Şekil 2.10'da gösterilmiştir. İlk aşama, kalıp molekül, yapısal monomerler, fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcıların ya da çoğu durumda bir yüzey aktif madde yardımıyla polivinil alkol (PVA) gibi [112] bir polimerin ve glutaraldehit (GA) gibi bir çapraz bağlayıcı karışımının suya (çözücü olarak) eklenmesidir. Daha sonra sıfırın altında serbest radikal polimerizasyonu, 0 °C ile -20 °C arasındaki sıcaklıkta sulu bir çözelti içinde yükseltgenme-indirgeme başlatıcı sistemleri [103] tarafından başlatılmıştır, ki bu çoğunlukla $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, KHS_2O_8 gibi bir yükseltgen madde ve NaHSO_3 , N,N,N',N' -tetrametiletildiamin (TEMED) gibi bir indirgeyici maddedir. Spesifik bir gözenekli yapıya sahip olan moleküler baskılanmış kriyojel, daha sonra, polimerik ürün oda sıcaklığında eritildikten sonra kriyojel içerisindeki kalıp molekülün uzaklaştırılması ile hazırlandı [104, 105].



Şekil 2.10. Moleküler baskılanmış kriyojellerin hazırlanmasının şematik gösterimi.

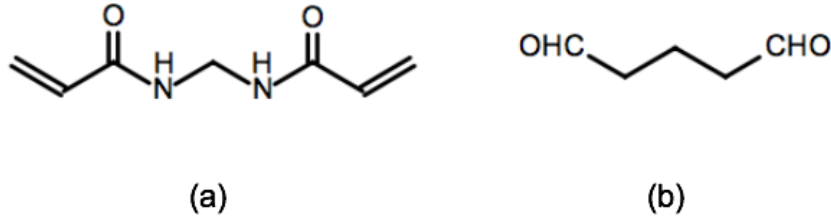
2.4.1.1. Monomerler ve çapraz bağlayıcılar

Kriyojellerde 2-hidroksietil metilakrilat (HEMA) [104], akrilamid (AAM) [112], N,N-dimetilakrilamid (DMAM) [113], N-izopropilakrilamid (NIPAm) [114], N-vinilkaprolaktam (VCL) [115], etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) [116] ve akrilamido metilpropansülfonik asit (AMPS) [117] gibi monomerler yapısal monomer olarak sıklıkla kullanılmaktadır. HEMA, kimyasal inertlik, yüksek mekanik dayanıklılık, yüksek kimyasal ve biyolojik kararlılık ve üstün biyo-uyumluluğun avantajları sayesinde, kriyojelin yapısal monomeri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [118].

Fonksiyonel bir monomer, hedef molekülle benzer bir sterik konfigürasyona ve benzer fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu durum, seçicilik özelliklerinin iyileştirilmesini, adsorpsiyon kapasitesi artırılmasını ve hazırlanan kriyojelin hedefe olan biyo-uyumluluğunun geliştirilmesini sağlar. Kriyojellerin fonksiyonel monomerlerinin çoğu N-metakrilamidin türevleridir. Fonksiyonel monomerlerdeki gruplar, kriyojeller arasındaki hedef moleküle kuvvetli polar bağlar, hidrojen bağları, koordinasyon bağları ve van der Waals kuvvetleri oluşturmak için ester grupları ve imino grupları sağlayabilen amino asit metil esterleridir [119].

Çapraz bağlayıcılar, ağ yapısındaki kriyojellerin üretilmesinde ve üretilen kriyojellerin yüksek sertlik ve mükemmel şişme özellikleri gibi iyi mekanik özellikler kazandırılmasında faydalıdır. Çapraz bağlayıcılar üzerinde bulunan fonksiyonel gruplar, kriyojelin hedef moleküllere olan tanıma kabiliyetindeki artışa katkıda bulunur [120]. Şekil 2.11’de gösterildiği gibi, N,N'-metilenbisakrilamid (MBAAm) en yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardan biridir. Bir kriyojelde MBAAm’nin eklenmesi,

kriyojelin üç boyutlu yapısının oluşmasına yardımcı olur ve kriyojelin hedef moleküle koordine bağlarının oluşmasını destekler. Kullanılan diğer çapraz bağlayıcılar; EGDMA ve GA'dır [19, 103].



Şekil 2.11. Kriyojellerin hazırlanması için kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar (a) MBAAm; (b) GA [103].

2.4.1.2. Kalıp Molekül

Bir kalıp molekül olarak Fe^{3+} [19], BrO_3^- [121], AsO_4^{3-} [122] gibi basit bir inorganik iyon ve estradiol (E2), L-glutamin [123], L-histidin [124] gibi küçük bir organik molekül, lizozim (Lys) [125], bilirubin (BIL) [126], insan serum albumin (HSA) [118], α -2b interferon (α -2b IFN) [126] ve karbonik anhidraz (CAH) [127] gibi bir biyomakromolekül [128] kullanılabilir. Belirli bütün bir biyomakromolekül mevcut olmadığı zaman, bu biyomakromolekülün belirli bir fragmanı kalıp olarak kullanılabilir. Örneğin, immünoglobulin G (IgG) fragmanları Fab [129] ve Fc [130], insan plazmasından IgG'yi adsorbe etmek için hazırlanan molekül baskılı kriyojellerde kalıp olarak kullanılmaktadır.

Birleşik kalıpta, iki veya daha fazla maddenin bir karışımı ortak kalıp olarak davranır [131].

Dummy kalıbında, yapısal analoglar, hedef moleküllerin kararlı izotop etiketli bileşikleri kalıp olarak kullanıldığında, hazırlanan kriyojellerin, benzer sterik konfigürasyonları ve fonksiyonel grupları hedef moleküllere göre daha iyi seçiciliğe sahip olacaklardır [122]. Dummy kalıp toksisite problemini, hedef maddenin yüksek maliyetini çözebilir ve dahası, hedef molekül doğrudan bir kalıp olarak kullanıldığında ortaya çıkan, kalıp sızması problemini önleyebilir. Kalıp sızmasından kaynaklı kalitatif ve kantitatif

kesinliğe olan girişimi ortadan kaldırır ve böylece hedef moleküllerin tespitinin güvenilirliğini ve doğruluğunu artırır [132, 133].

2.4.1.3. Gözenek yapısı

Bir kriyojelin özgül boşluğu ve fonksiyonel grupları, hedef moleküle olan ilgisine ve erişilebilirliğine katkıda bulunur. Bir kriyojelin seçicilik ve derişim verimi, kalıbın ve polimerin kimyasal yapısı ve sterik konfigürasyonu ile birlikte pH, asidik etki ve tuz etkisi gibi sulu çözeltilerdeki koşulları ile ilişkilidir. Bu etkiler, yüzey adsorpsiyonu (BET), gözenek boyutu, adsorpsiyon izotermi ve benzer analizler ile tartışılabilir.

Uygun gözenek büyüklüğü dağılımına sahip bir kriyojel, yani makro, mezo- ve mikro gözeneklerin uygun oranları, uygun reaksiyon koşulları altında kalıbın, yapısal monomerin, fonksiyonel monomerin ve çapraz bağlayıcının uygun oranıyla hazırlanabilir. Böylece kriyojel, geniş bir özgül yüzey alanına ve analitler için yüksek bir kütle transfer oranına sahip olur ve böylece iyi bir adsorplama ve kromatografik davranışı gösterir [134]. Bir kriyojelin gözenek yapısı ve adsorpsiyon kapasitesi, farklı sıcaklıklarda hazırlandıkları için normal bir jelinkinden oldukça farklıdır.

Bir kriyojelin hazırlanması sırasında, sudan dondurulan buz kristalleri, kriyojelin hacminin %80-90'ını ya da daha yüksek bir hacmini işgal eder. Yapısal monomerler ve fonksiyonel monomerler ya da polimer öncüllerinin çapraz bağlanma reaksiyonları arasındaki polimerizasyon reaksiyonları, sadece kriyojel içinde bulunan buz kristalleri arasındaki boşluklarda dağılan mikro sıvı fazında meydana gelir. Daha sonra, ürünler oda sıcaklığında eritilir ve eriyen buz ile gevşek bir şekilde yapılandırılmış makro gözenekli bir polimer elde edilir (1–100 μm .). Bir kriyojelin makro gözenekleri içerisinde mezo gözenekler (2–50 nm) ve mikro gözenekler (<2 nm) vardır. Bir kriyojelin toplam gözenek hacmi yaklaşık 20-40 cm^3/g 'dır ve gözenek duvarının kalınlığı 1–10 μm ile 15–50 μm arasındadır.

Bir kriyojel içindeki akış kanalı, birbirine bağlı makro gözenekli yapısı nedeniyle yeterince büyüktür. Düşük geri basınç ve düşük difüzyon direnci gibi akışkanlar mekaniğinin iyi özelliklerine sahip olan kriyojel, örneğin hızlı ve etkili bir şekilde kütle transferini sağlayabilir. Tüm inorganik iyonlar, küçük organik moleküller, biyolojik makromoleküller ve hatta hücreler kriyojelden geçebilir. Bir kriyojel, karmaşık çevresel

su örneklerinde ve biyolojik örneklerde hedef moleküllerin seçici adsorpsiyonu ve desorpsiyonunda kullanıldığında denge süresinin kısa olması nedeniyle kriyojel yüksek verim sağlar ve büyük hacimli sıvı numunelerinin analizinde kullanılabilir [104].

Bir kriyojelin gözenek büyüklüğü, seçicilik ve adsorpsiyon özellikleri üzerinde karmaşık bir etki oluşturur. Kriyojelin, gözenek boyutu daha büyük iken, örneğin akış hızı daha yüksektir ve örnek daha hızlı işlem görür. Bununla birlikte, bu durum kriyojel ile hedef moleküllerin temas süresinin daha kısa olmasının yanı sıra, bir kriyojelin daha küçük özgül yüzey alanı ve daha az bağlanma bölgesine sahip olmasından dolayı hedef moleküllerin etkili adsorpsiyonuna uygun değildir. Ayrıca kriyojelin daha küçük bir gözenek boyutu ve daha ince bir duvarı olduğu zaman, daha geniş bir alana sahip olması nedeniyle hedef moleküllere daha yüksek bir adsorpsiyon kapasitesi vardır. Bu durumda bir örnekle, kriyojelin işlem hızı daha yavaştır [103].

Bir kriyojelin yüzeyinin ve iç boşluklarının uygun polaritesi, uygun bir kalıp molekülden, uygun bir monomerden veya spesifik fonksiyonel gruplara sahip bir yerleştirilmiş polimer öncüsünden kaynaklanabilir. Bu, kriyojelin omurgasının $-R$, $-COO^-$ ve / veya $-OH$, $-NH_2$ ve $-SH$ gibi hidrofilik fonksiyonel gruplar gibi hidrofobik fonksiyonel gruplarla modifiye edilmesiyle de gerçekleştirilebilir.

Kriyojel, kriyojelin $-SO_3^-$ ve / veya $-NR_3^+$ gibi iyonik gruplarla modifiye edilmesiyle yüklenebilir. Bir kriyojel, amfifilik bir moleküle dönüşebilir, yani kriyojel pozitif ve negatif olarak aynı zamanda şarj edildiğinde molekül hem hidrofilik hem de hidrofobiktir. Kriyojel farklı polarite ve iyonik özelliklere sahip çeşitli hedef moleküllere karşı yüksek seçicilik ve yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olabilir. Elektrostatik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve hatta kriyojel ve hedef molekül/metalik iyonlar arasında daha güçlü koordinasyon bağları olabilir. Bu nedenle, bir kriyojel, analiz, iyon değişimi ve katalizin çok sayıda muhteşem özelliğine sahiptir [103, 105, 118].

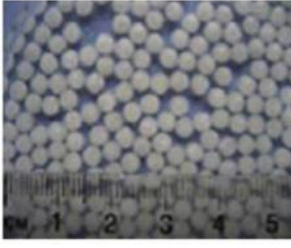
Kriyojelin süper makro gözenekli yapısı, kriyojelin biyolojik makromolekülleri spesifik tanıma ve adsorpsiyon kapasitesini arttırmak için kriyojelin gözenek duvarına çok miktarda kısa zincirlerin aşılması için faydalıdır [120, 135].

2.4.2. Kriyojelin Geometrisi

Donma koşulları altında jel oluşturuucu monomerler içeren sulu çözeltinin kriyopolimerizasyonuyla hazırlanan süngerimsi malzemeleri olan kriyojel toz, tabaka, çubuk, küre, membran ve monolitik malzeme formunda hazırlanabilir (Şekil 2.12). Biyoayırma için çoğu kriyojel, laboratuvar ölçeğinde kullanılmaya uygun olan monolit formunda hazırlanmıştır. Monolitik bir kriyojelin, kriyojelin kendisi ile aynı çapa sahip olan uygun bir kolona gereksinimi vardır ve bu nedenle bazen ölçek uygun değildir. Bununla birlikte, formattaki monolitik kriyojellerden farklı olarak kriyojel küreleri, sulu jel-oluşturucu karışımı suyla karışmayan çözücülere damlatarak oluşan sulu damlacıkların dondurulması-çözdürülmesiyle üretilmiştir [136-139]. Damlatma yöntemi, kullanım için uygundur, ancak nispeten büyük damlacıklar üretme eğilimindedir.

Mikrokanallar ya da mikroakışkanlar, monodispers damlacıklarının veya partiküllerinin kontrollü olarak hazırlanması için kullanılmıştır [140-142]. Bu damlacıkların ya da partiküllerin boyutları, mikrokanalların geometrisinin yanı sıra sıvı özellikleri ve hızı ile de ilişkilidir [143-145]. Kriyojel kürelerin hazırlama işleminde, kriyojel kürelerin çap dağılımı, sulu fazın ve su ile karışmaz sıvının akış hidrodinamiğinin değiştirilmesi ile ayarlanabilir ve kontrol edilebilir [146].

Kriyojelin uygun şekli performansını artıracaktır. Molekül baskılı kriyojelin, bir monolitik sütunu aracılığıyla, hedef maddenin rekombinant tutma mekanizmasını kriyojel üzerindeki yapısal analogları ile keşfedebiliriz. Bir kriyojel, moleküler olarak basılmış polimerik parçacıklara gömüldüğünde, kriyojelin özgül yüzey alanı ve adsorpsiyon kapasitesi dikkat çekici şekilde artacaktır. Kriyojel, yüksek miktarlarda biyolojik numunelerin yüksek verimle işlenmesine yardımcı olan, moleküler olarak baskılı ayırma membranı olarak da hazırlanabilir [103].



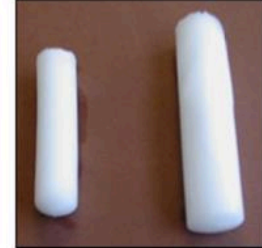
Küre



Tabaka



Monolit/Disk



Kolon

Şekil 2.12. Farklı formlarda hazırlanmış kriyojellerin dijital görüntüleri [110].

3. LİTERATÜR ÖZETİ

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde Sinha ve arkadaşları β -siklodekstrin (β -CD) ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik mezo gözenekli silika sentezlemişler ve mezogözenekli silikanın içindeki manyetik nanopartiküllerle kolesterolün manyetik olarak ayrılmasını sağlamışlar. Bu malzemenin kolesterol ayrılması için kolesterolün kristal, toz ya da mikro heterojen her bir formu için etkin bir şekilde biçimde kullanılabileceğini ve malzemenin yeniden kullanılabilirliğini gözlemlemişlerdir [7]. Zengin ve arkadaşları yüzey aracılı RAFT polimerizasyonu ile yüzey moleküler baskılanmış polimer çekirdek-kabuk süper paramanyetik Fe_3O_4 nanopartikül (Fe_3O_4 @MIP SPNPs) sentezlemişler. Sentezledikleri polimer süper paramanyetik özellikte olup kolesterolü spesifik olarak tanımaktadır. Kolesterolün zenginleştirilmesi ve ayrımı için sentezlenen Fe_3O_4 @MIP SPNPs'lerin yüksek bağlanma kapasitesi ve seçicilikte olduğunu ayrıca nanopartiküllerin geri kazanımının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir [65]. Zhan ve arkadaşları süspansiyon polimerizasyon yöntemiyle düşük sıcaklıkta ($<0^\circ\text{C}$) süper makrogözenekli poliakrilamit (pAAm) temelli kriyojel küreler hazırlamışlar. Daha sonra düşük sıcaklıkta sentezlenen kriyojel kürelerle karşılaştırmak için oda sıcaklığında standart gözenekli küreler hazırlamışlar. Kürelerin çapını 50-400 μm aralığında ve bazı küreleri de düzensiz, geniş gözenekli 3-90 μm çapında olduğunu tespit etmişler. Bu kriyojel kürelerin özelliklerini modifiye ederek mekanik dayanıklılığı, kararlılığını arttırmışlardır [147]. Çaktü ve arkadaşları kolesterol baskılanmış eş boyutlu poli(glisidilmetakrilat-N-metakroil-(L)- tirozin metilester) mikroküreleri poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojeller içerisine gömmüşler ve elde ettikleri kompozit kriyojeli kolesterolün seçimli olarak uzaklaştırılması için kullanmışlar. Kompozit kriyojelleri şişme testleri, SEM, BET, FTIR ve elementel analiz ile karakterize etmişler. Mikrokürelerin PHEMA kriyojeline gömülmesi ile kriyojelin spesifik yüzey alanının arttığını tespit etmişler. Elde ettikleri kompozit kriyojeller ile homojenize süttten kolesterolün %80' inini uzaklaştırmışlardır [148]. Guan ve arkadaşları bir kitosan türevi kullanılarak moleküler baskılanmış polimerlerin geliştirilmesi üzerine çalışmışlardır. $\text{MeSO}_3\text{H}'$ deki kitosanın amino gruplarının seçimli korunmasıyla bir o-açıl kitosan sentezlemişler ve kalıp molekül kolesterol varlığında/yokluğunda glutaraldehid ile çapraz bağlanma gerçekleştirmişler. Yeniden bağlanma deneylerinde, kolesterol

baskılanmamış polimer ile baskılanmış polimer karşılaştırılarak kolesterol baskılanmış polimerin kolesterolü tanıdığı ve böylece kolesterole iyi bir bağlanma kapasitesi gösterdiğini gözlemişlerdir [149]. Li ve arkadaşları iki aşamada kolesteril kitin karbonat (Chol-Chi) sentezlemişler ve kimyasal yapısını Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve katı-hal ^{13}C nükleer manyetik rezonans ile karakterize etmişlerdir. Elde edilen Chol-Chi'yi kovalent olarak bağlanan kalıp öncüsü olarak kolesterolü baskılamak için kullanılmışlar. Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu ile yapılan analizde MIP parçacıkların yüzeyinin pürüzlü ve gözenekli olduğu tespit edilmiştir. Denge adsorpsiyon kapasitesini moleküler kolesterol baskılı polimer için (Chol-MIP) 13.60 mg/g iken kolesterol baskılanmamış polimerde (Chol-NIP) 4.75 mg/g olarak bulmuşlar. Chol-MIP tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde beş adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra ilk adsorpsiyon kapasitesinin ihmal edilebilir kaybı gözlenmiştir. Buna ek olarak, stigmasterol ve estradiol seçicilik çalışmaları için yarışmacı moleküller olarak seçilmiş ve MIP polimerlerin kolesterole yüksek seçicilikte olduğunu gözlemişlerdir [150]. İnanan ve arkadaşları, kalıp molekül olarak kolesterolün ve fonksiyonel monomer olarak N-metakriloilamido-(L)-fenilalanin metil ester (MAPA)'ın kullanıldığı 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) temelli nanoküreler hazırlamışlar. Elde ettikleri kolesterol baskılanmış nanoküreleri hazırladıkları gastrointestinal çözeltisinden kolesterolün adsorpsiyonu çalışmaları için kullanmışlar ve en yüksek adsorpsiyon kapasitesini 714.17 mg/g olarak bulmuşlardır [151]. Tahir ve arkadaşları β -siklodekstrini (β -CD) kimyasal modifikasyon ile β -CD- N_3 dönüştürerek daha sonra klik reaksiyonu ile cam yüzey üzerine kovalent olarak bağlamışlardır. Fonksiyonelleştirilmiş cam yüzeyi üzerindeki β -CD, kolesterol ile kompleks oluşturarak süttten kolesterolün uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Yapılan çalışmada %69 oranında süttteki kolesterolün uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir [152].

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından, N,N'-metilen-bis(akrilamid) (MBAA), metanol, amonyum persulfat (APS), kolesterol, estradiol, progesteron ise Sigma (St Louis, USA) firmasından alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş olup analitik saflıktadır.

4.2. N-Metakriloil-(L)-Tryptofan (MATrp) Monomerinin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer N-metakriloil-L-triptofan metil esterinin (MATrp) sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir [153, 154]. Sentez reaksiyonunda, 100.0 mL diklorometan içerisinde L-triptofan metil ester (5.0 g) ve hidrokinon (0.2 g), çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0 °C'e soğutulmuştur ve çözeltiye trietilamin (12.74 g) eklenilmiştir. Daha sonra azot atmosferi altında metakriloil klorür (5.0 mL) bu çözeltiye yavaşça eklenerek oda sıcaklığında, 2 saat boyunca manyetik olarak karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon tamamlandıktan sonra hidrokinon ve reaksiyona girmemiş metakriloil klorür %10'luk bir NaOH çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilmiş ve sıvı faz bir dönel buharlaştırıcıda buharlaştırılmıştır. Elde edilen MATrp etanolde kristalize edilmiştir. MATrp'nin karakterizasyonu ATR-FTIR ve GC-MS ile gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu

4.2.2.1. ATR-FTIR analizi

MATrp monomerinin zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR; Spectrum One™, Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) kullanılarak elde edilmiştir.

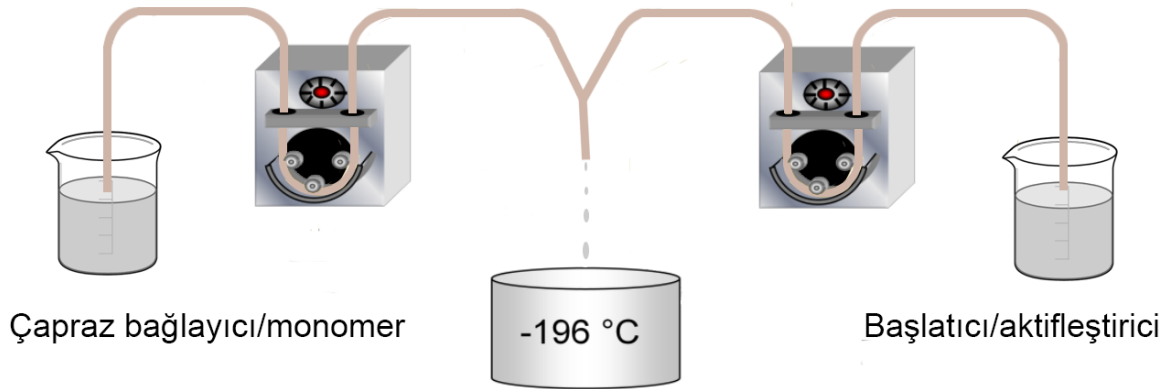
4.2.2.2. GC-MS Çalışmaları

MATrp monomerinin kütle spektrumu Shimadzu QP2010 Ultra GC-MS (elektron iyonizasyon) kullanılarak ölçülmüştür.

4.3. Kolesterol Baskılanmış ve Baskılanmamış p(HEMATrp) Kriyojel Mikrokürelerin Hazırlanması

Kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelerin (CHO-MIP) hazırlanması için öncelikle kolesterol metanolde çözülmüştür. MATrp ve çözünmüş kolesterol

manyetik karıştırıcıda 4 saat karıştırılarak 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 mol oranlarında kolesterol:MATrp içeren 5 farklı ön-kompleks elde edilmiştir. Daha sonra bu ön-komplekse HEMA (1.30 mL) eklenerek monomer çözeltisi karıştırılmaya devam edilmiştir. Ayrı bir beherde 9.0 mL suda çözülmüş 0.283 g N,N'-metilen bisakrilamid (MBAAM) içeren çözelti monomer çözeltisine eklenerek karıştırılmış böylece ilk çözelti karışımı hazırlanmıştır. İkinci çözelti karışımı başlatıcı/aktifleştirici çiftinden oluşmuştur. Bu çözelti karışımı için 0.02 g amonyum persülfat (APS) ve 25.0 µL N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin (TEMED) 5.0 mL suda çözülmüştür. İki peristaltik pompa eşit uzunlukta ve eşit çaptaki borularla bağlanarak "T sistem" oluşturacak şekilde birbirine bağlanmıştır (Şekil 4.1). Pompalardan 1:2 akış hızlarında monomer/çapraz bağlayıcı çözeltisi ve başlatıcı/aktifleştirici çözeltisi geçirilmiştir. Elde edilen çözelti damlacıkları -196 °C'de sıvı azot içinde polimerleşmeye bırakılmıştır ve sonrasında sıvı azot içerisindeki damlacıklar polimerleşmenin tamamlanması için -12 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Sentezlenen polimerler 24 saatin sonunda oda sıcaklığına getirilmiş ve reaksiyona girmemiş monomerlerin polimerik yapıdan uzaklaştırılması için kriyojeller deiyonize su ile yıkanmıştır. Aynı yöntemle, kalıp molekül olan kolesterol kullanılmadan kolesterol baskılanmamış p(HEMATrp) kriyojel mikroküreler (NIP) sentezlenmiştir.



Şekil 4.1. Kriyojel mikrokürelerin sentezinin şematik gösterimi.

4.4. Kalıp Molekülünün Uzaklaştırılması

Hazırlanan kriyojel mikrokürelerden polimerin yapısını bozmadan kalıp molekül olan kolesterolün etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamak için desorpsiyon çözeltisi olarak metanol:asetik asit (MeOH:HAc) (80:20) kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi,

desorpsiyon çözeltisinde kalıp molekül olan kolesterol molekülünü UV-spektrofotometre ile 505 nm'de renk testi yöntemiyle tayin edilemeye kadar tekrarlanmıştır.

4.5. Kolesterol Baskılanmış ve Baskılanmamış p(HEMATrp) Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu

4.5.1. ATR-FTIR ile Yapı Analizi

MATrp monomeri, p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin ve CHO-MIP'lerin karakteristik fonksiyonel grupları bir zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR; Spectrum One™, Perkin Elmer, Massachusetts, ABD) kullanılarak elde edilmiştir.

4.5.2. Termogravimetrik Analiz (TGA-DTA)

Sentezlenen kriyojel mikrokürelerin termal özelliklerinin değerlendirilmesi 50 °C/dakika'lık bir ısıtma hızında çalışan termogravimetrik analiz cihazı (TA® instruments Inc., New Castle, DE) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz, 30 °C ile 800 °C sıcaklık aralığında %99.5 azot atmosferi altında yürütülmüştür. Yaklaşık olarak, 2.0 mg'lık her numune, her test için açık platin bir potada ısıtılmıştır. Artan sıcaklığa veya zamana bağlı olarak kriyojel mikrokürelerin termal bozunması ve kütle değişimi termogravimetri (TG) ile, referans ve kriyojel mikroküre arasındaki sıcaklık farkı diferansiyel termal analiz (DTA) cihazı ile tespit edilmiştir.

4.5.3. Denge Şişme Oranının ve Makrogözenek Miktarının Belirlenmesi

Sentezlenen kriyojel mikrokürelerin denge-şişme oranlarının belirlenmesi için; başlangıçta kuru olan kriyojel mikroküreler ± 0.0001 duyarlılıkla tartıldıktan sonra, 50 mL damıtık su içeren bir behere konulmuştur. Sabit sıcaklıkta, 25 ± 0.5 °C ve farklı zaman aralıklarında kriyojel mikroküreler sudan alınmış ve kriyojel mikroküre yüzeyindeki su uzaklaştırılarak (± 0.0001 duyarlılıkla) tartılmıştır. Kuru ve şişmiş kriyojel mikrokürelerin ağırlıkları kaydedilmiştir. Polimerik partiküllerin su içeriği aşağıda verilen denklem ile hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = [(W_d - W_s)/W_d] \times 100$$

Burada; W_d : kriyojel mikrokürelerin kuru ağırlığı (g) W_s : kriyojel mikrokürelerin şiştikten sonraki ağırlığı (g)'dir.

Kriyojel mikrokürelere ait makrogözenek miktarının belirlenmesi için; öncelikle denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel mikrokürelere tartılmış ve sonrasında şişmiş kriyojel mikrokürelere ait makrogözenek miktarı aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_{sw} - W_{sq}) / W_{sw}] \times 100$$

Bu eşitlikte W_{sw} denge şişme oranına ulaşmış kriyojel mikrokürelere ait ağırlığını (g), W_{sq} ise denge şişme oranına ulaşmış kriyojel mikrokürelere ait sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) ifade etmektedir.

4.5.4. Yüzey Alanı Ölçümleri

BET cihazı (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) kullanılarak CHO-MIP ve NIP'e ait spesifik yüzey alanı belirlenmiştir. Örneklerin azot atmosferi altında, 150 °C'de, 1 saat boyunca gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -210 °C'de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen veriler yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır.

4.5.5. Elementel Analiz

Kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelere ait MATrp katkısının miktarı, azot stokiyometrisi göz önüne alınarak bir elementel analiz cihazı (Thermo Scientific FLASH 2000 Serisi CHNS/O Analyzer, Cambridge, UK) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunun için elementel analiz cihazının kalay kapsül örnek hücrelerine, 1.50 mg kriyojel, ± 0.1 mg duyarlılıkla tartılarak yerleştirilmiş ve örnek cihaza konularak yakma işlemi sonucunda örneğin % azot (N), karbon (C) ve hidrojen (H) analizi yapılmıştır.

4.5.6. CHO-MIP ve NIP'lerin Yüzey Morfolojileri

CHO-MIP ve NIP'lerin yüzey ve yığın yapısı, yüksek büyütme sağlaması nedeniyle yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, 1200EX, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta deiyonize su içinde şişmiş ve daha sonra 24 saat boyunca 0.001 mbar ve -52 °C'de kurutulmuş (Christ Freezed Dryer-Alpha 1-2 LD Maryland, ABD) kriyojel mikrokürelere ait iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek

plakası üzerine tutturulmuştur. Sonra örnek yüzeyi 200 Å kalınlığında metalik altın ile vakum altında kaplanmış ve bu sayede yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek çeşitli büyütme oranlarında görüntüler elde edilmiştir.

4.6. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.6.1. Kolesterol Adsorpsiyon Çalışmalarının Optimizasyonu

Kolesterol adsorpsiyon çalışmaları iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, maksimum kolesterol adsorpsiyon miktarını belirlemek için 5 farklı tür kriyojel mikroküre kesikli bir sistemde oda sıcaklığında, 1.0 mg/mL derişimde kolesterolün metanoldeki çözeltisi (2.0 mL) ile etkileştirilmiştir. Bu adımda uygun kalıp molekül/monomer oranı belirlendi ve seçilen kriyojel mikroküre daha ileri çalışmalar için kullanıldı. Daha sonra kolesterol adsorpsiyon çalışmaları, kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel mikrokürelerin 150 dakika boyunca farklı derişimlerdeki (0.5-3.0 mg/mL) kolesterol molekülleriyle etkileşimleri incelenerek gerçekleştirilmiştir. Bunun için kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel mikroküreler, 2.0 mL kolesterol çözeltisi ile 150 dakika, 16 rpm karıştırma hızı ile rotatörde etkileştirilmiştir. Başlangıç kolesterol derişiminin (0.5-3.0 mg/mL), zamanın, sıcaklığın (4-45 °C) ve iyonik şiddetin (0-0.1 M NaCl) adsorpsiyon hızına ve kapasitesine etkisi incelenmiştir.

Çözeltideki kolesterol derişimleri, 505 nm’de, spektrofotometrik (Thermo Scientific, Genesys 10-S) olarak kolesterol tayini esasına dayanan ticari bir kit (QCA Quimica Clinica Aplicade S.A.) ile belirlenmiştir. Deneyler ve ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Kriyojel mikrokürelerin birim kütlesi başına adsorbe edilen kolesterol miktarı, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q = \frac{(C_i - C_f) V}{m}$$

Burada Q, kriyojel mikrokürelerin birim kütlesi başına adsorbe edilen kolesterol miktarıdır (mg/g); C_i ve C_f , kolesterol çözeltilerinin başlangıç çözeltisindeki ve etkileşim sonrası süpernatanttaki derişimi (mg/mL); m, kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel mikrokürelerin kütlesi (g) ve V, kolesterol çözeltisinin hacmidir (mL).

4.6.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

CHO-MIP ve NIP'lerden kolesterolün desorpsiyonu, 24 saat boyunca, oda sıcaklığında, 16 rpm karıştırma hızında MeOH:HAc (80:20) çözeltisi ile kriyojellerin muamele edilmesiyle gerçekleştirildi. Desorpsiyon ortamındaki kolesterol miktarı renk testi yöntemiyle 505 nm'de UV-spektrofotometre ile belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorbe olan kolesterol miktarı}}{\text{Adsorbe olan kolesterol miktarı}} \times 100$$

CHO-MIP'lerin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojel mikroküreler kullanılarak 8 kez tekrar edilmiştir. Her desorpsiyon işleminin ardından kriyojel mikroküreler, deiyonize su ile yıkanmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri 3 kez tekrar edilmiş ve her bir veri seti için, ortalama değerleri ve standart sapmaları belirlemek için standart istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. Hata payını belirlemek için her deney grubu için %95 güven aralıkları hesaplanmıştır.

4.6.3. Seçicilik Çalışmaları

CHO-MIP'lerin seçiciliğini kanıtlamak için kolesterol analogları progesteron ve estradiol ile yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. Aynı ayrı hazırlanmış yarışmacı moleküllerin metanol içerisinde 1.0 mg/mL derişimindeki çözeltileri, kesikli sistemde 150 dakika süresince, 16 rpm karıştırma hızında CHO-MIP ve NIP'lerle etkileştirilmiştir. Kolesterol analoglarının miktarı estradiol için 270 nm ve progesteron için 244 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

CHO-MIP'lerin spesifikliğini belirlemek için seçicilik katsayısı ve göreceli seçicilik hesaplanmıştır. Kolesterol ile ilgili olarak progesteron ve estradiol için dağılım katsayısı (K_d) aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı:

$$K_d = \left[\frac{C_i - C_f}{C_f} \right] \times \frac{V}{m}$$

K_d dağılım katsayısını temsil eder (L/g); C_i ve C_f sırasıyla başlangıç ve etkileşim sonrası kolesterol derişimleri (mg/L). V örnek hacmi (L) ve m ise kriyojel mikroküre ağırlığıdır (g).

Kolesterolün, yarışmacı moleküllerin varlığında adsorpsiyonu için seçicilik katsayısı (k), denkleme göre bağlanma verilerinden elde edilmiştir:

$$k = \frac{Kd(kolesterol)}{Kd(x)} \quad (x: kolesterol analogları)$$

Kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküre ile kontrol olarak ifade edilen kolesterol baskılanmamış kriyojel mikrokürelerin k değerleri baskılama seçiciliği hakkında yorum yapılmasına olanak verir. Bağlı seçicilik katsayısı (k') aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır;

$$k' = \frac{k_{baskılanmış}}{k_{kontrol}}$$

4.7. Gerçek Gıda Örneklerinden Moleküler Baskılanmış Kriyojel Mikrokürelerle Kolesterolün Geri Kazanımı

Kolesterol düzeyini düşürmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yaklaşımların kullanıldığı birçok yöntem vardır. Tüm bu yöntemler ile süt ürünlerinde kolesterol seviyesi düşürülmesine rağmen bu yöntemlerin en büyük eksikliği kolesterole seçiciliklerinin yetersiz olmasıdır. Kolesterol giderme çalışmaları, bir perakende mağazasından satın alınan ticari homojenize süttten yapılacaktır.

İlk olarak, sütte bulunan kolesterol, Sinha ve arkadaşlarının rapor ettiği yöntem ile ekstrakte edildi ve spektrofotometre ile derişimi belirlendi [7]. Öncelikle 5.0 mL etanolik KOH (0.5 M) çözeltisi, 4.0 mL süt ile karıştırıldı ve 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra, tüm karışım 80 °C'e ısıtılarak 30 dakika karıştırıldı ve oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve karışıma 2.0 mL su ve 3.0 mL hekzan ilave edildikten sonra 10 dakika boyunca karıştırıldı. Ardından, numune faz ayrımı elde etmek için 3000 rpm'de santrifüj edildi. Kolesterol içeren üst hekzan fazı toplandı ve hekzan, kolesterolün elde edilmesi için dönel buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırıldı. Elde edilen kolesterol, 2.0 mL metanolde çözüldü ve UV-spektrofotometre ile kolesterol analizi için kullanıldı.

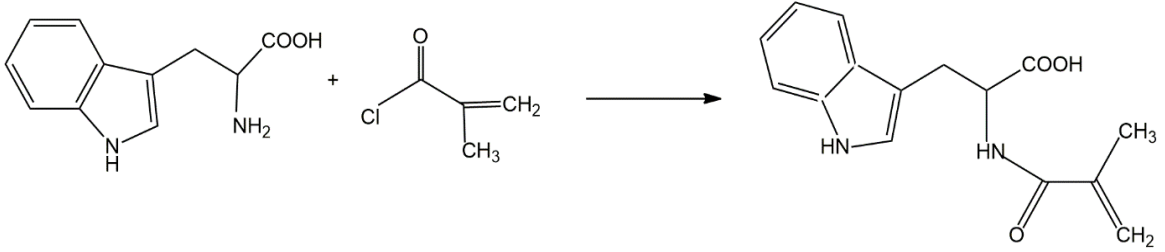
Çalışmanın devamında, 5.0 mL süte 0.3 mg/mL ve 0.5 mg/mL kolesterol ilave edilerek, 1.33 mg CHO-MIP'ler ile karıştırıldı (3 saat, 16 rpm). Daha sonra, kolesterol içeren kriyojel mikroküreler ortamdan uzaklaştırıldı ve daha sonra, sütte adsorplanmadan kalan kolesterol ekstrakte edildi ve yukarıda belirtilen yöntem izlenerek kolesterol miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi.



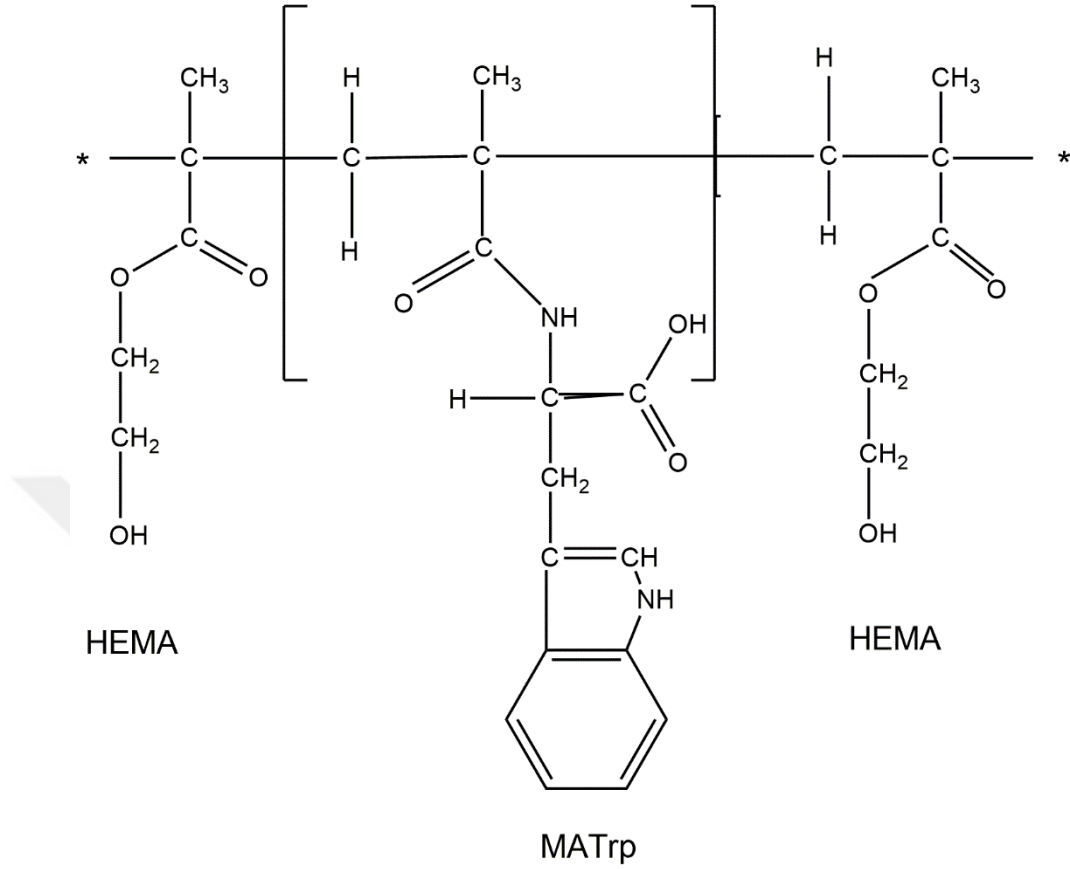
5. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

5.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) metanolden ve gıdalardan kolesterolün seçici olarak uzaklaştırılabilmesi için fonksiyonel komonomer olarak kullanılmıştır. L-Triptofan ve Metakroil klorür moleküllerinden MATrp komonomeri sentezlenmiş (Şekil 15) daha sonra kolesterol ile farklı mol oranlarında (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5) kompleksleştirildikten sonra, kompleks HEMA monomeri ile polimerleştirilerek kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) polimeri elde edilmiştir. Şekil 5.1 MATrp komonomerinin ve Şekil 5.2 kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) polimerinin molekül şeklini göstermektedir.

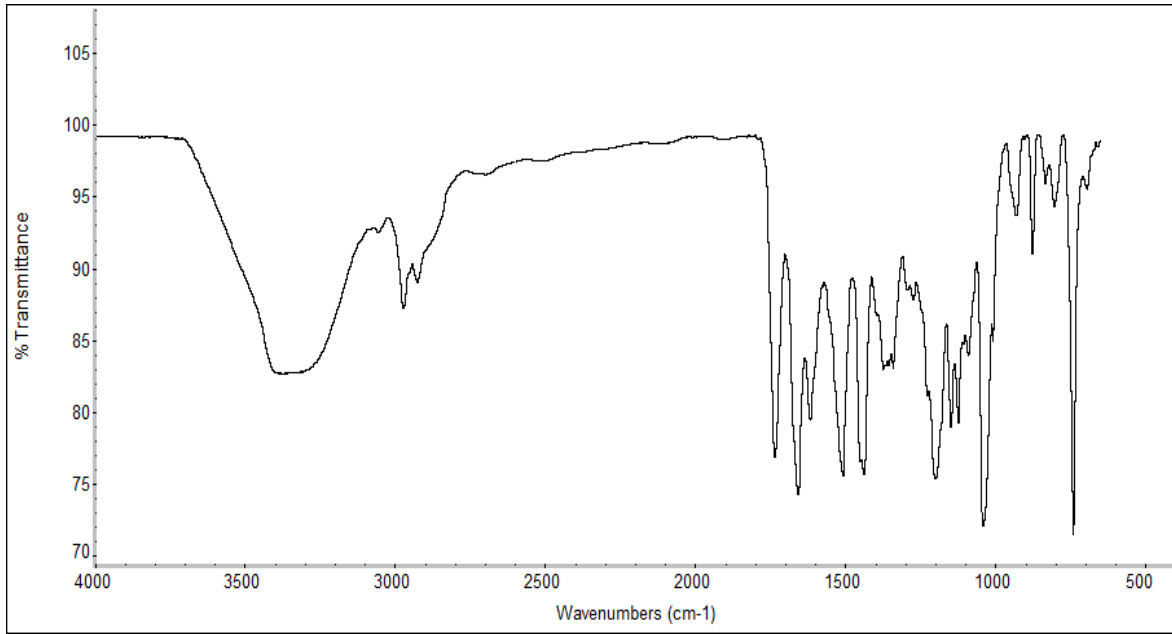


Şekil 5.1. MATrp monomerinin sentezi.



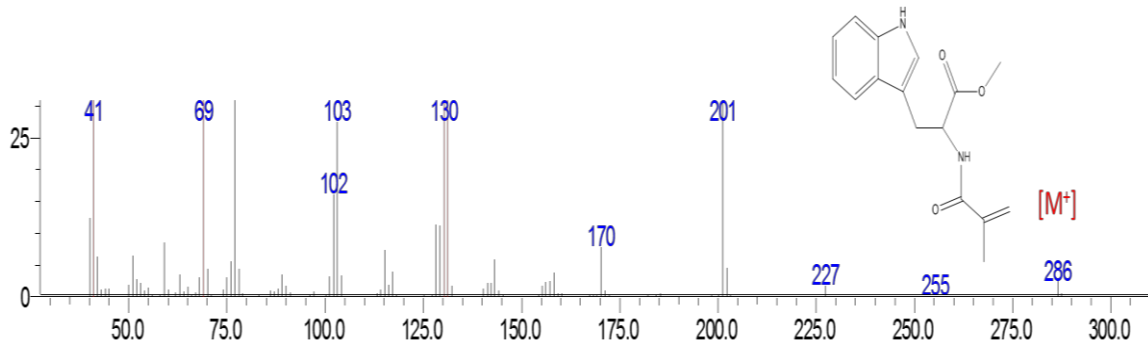
Şekil 5.2. p(HEMATrp) polimerinin molekül yapısı.

MATrp monomerinin yapısının doğrulanması için ATR-FTIR yöntemi kullanılmıştır. MATrp monomerine ait olan karakteristik bandlar ATR-FTIR spektrumu ile Şekil 5.3'te verilmiştir. 3053 cm^{-1} 'de aromatik C-H, 2972 cm^{-1} ve 2853 cm^{-1} 'de alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandları, 1734 cm^{-1} 'de ester karbonil (C=O) grubuna ait gerilme bandı, 1653 cm^{-1} 'de ise amid karbonil grubuna ait gerilme bandı ve 3348 cm^{-1} 'de de N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon bandı görülmektedir.

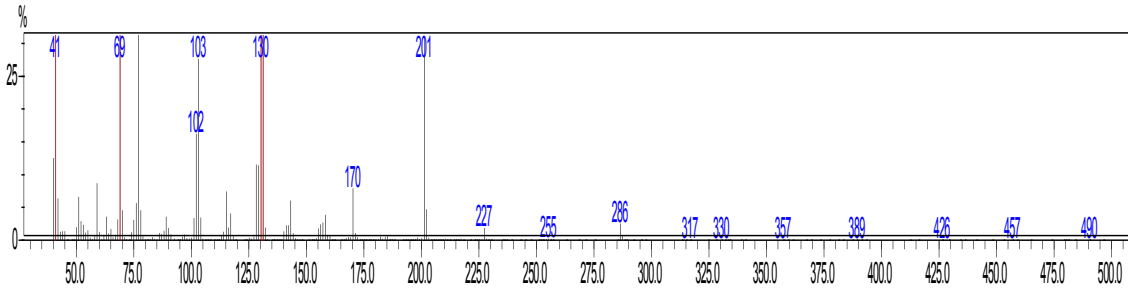


Şekil 5.3. MATrp monomerinin ATR-FTIR spektrumu.

MATrp'nın kütle spektrumu Shimadzu QP2010 Ultra GC-MS (elektron iyonizasyon) kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen spektrumda moleküler iyon piki $[M^+]$ (m/z) 286 Da değerinde gözlenmiştir. Bu değer yapı ile uyumludur (Şekil 5.4-5.5).



Şekil 5.4. MATrp'nın detaylı kütle spektrumu.



Şekil 5.5. MATrp'nın kütle spektrumu.

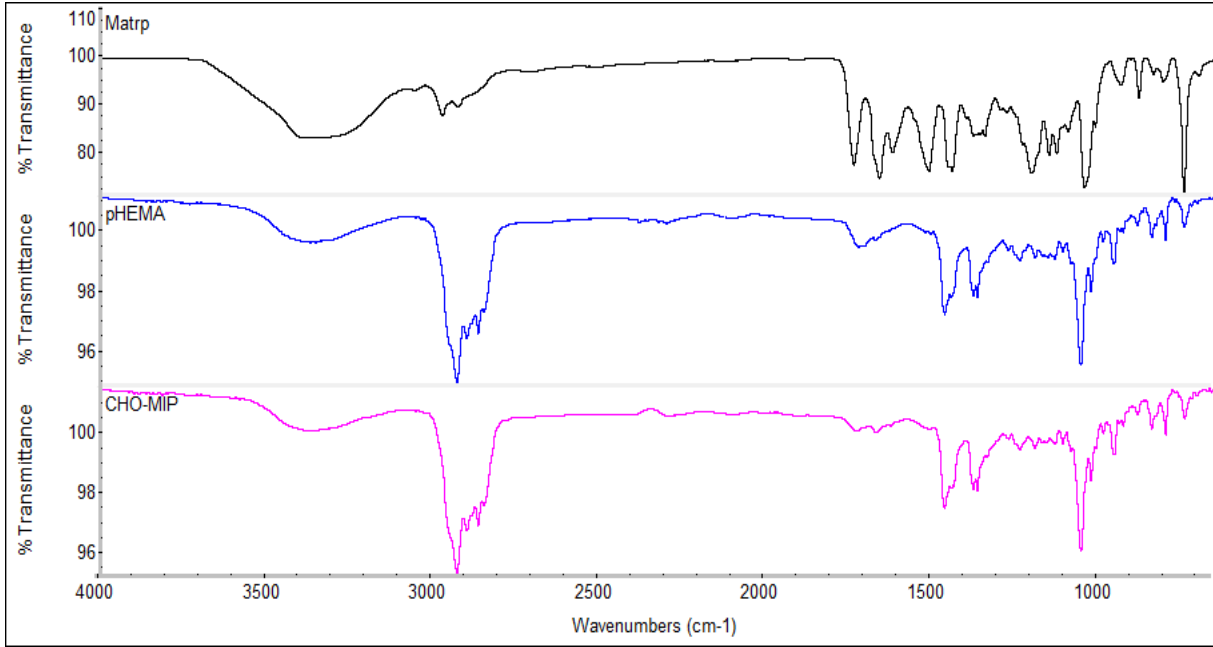
5.2. Kolesterol Baskılanmış ve Baskılanmamış p(HEMATrp) Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu

CHO-MIP'ler, kriyopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen kriyojel mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları şişme özellikleri, yüzey alanı ölçümleri, ATR-FTIR, elementel analiz, TGA-DTA ve SEM ile gerçekleştirilmiştir

5.2.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) ile Yapı Analizi

Hazırlanan CHO-MIP'nin karakterizasyonu içinde ATR-FTIR yönteminden yararlanılmıştır. Şekil 5.6'da CHO-MIP'ye ait ATR-FTIR spektrumu görülmektedir. 1726 cm^{-1} 'de ester karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$) gerilmesi, 1669 cm^{-1} 'de amid karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$) gerilmesine ait absorpsiyon bandları görülmektedir. 3375 cm^{-1} bölgesinde, MATrp monomerinden gelen N-H ve yapıdaki O-H gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bandı beraberce görülmektedir. 2950 cm^{-1} civarında gözlenen absorpsiyon bandı ise polimerik yapı içerisinde tekrarlayan alifatik C-H bağlarına ait gerilmelerden kaynaklanmaktadır.

CHO-MIP'nin ATR-FTIR spekturumu, p(MATrp) ve p(HEMA) polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 5.6). CHO-MIP'e ait spektrum, p(MATrp) ve p(HEMA) için elde edilen spektrumlardan farklıdır ve MATrp monomerine ait karakteristik bandlar göstermektedir. Bu sonuç HEMA varlığında fonksiyonel monomer olan MATrp'ın yapıya başarıyla dahil edildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 5.6. p(MATrp), p(HEMA) ve CHO-MIP'e ait ATR-FTR spektrumları.

5.2.2. Yüzey Alanı Ölçümleri

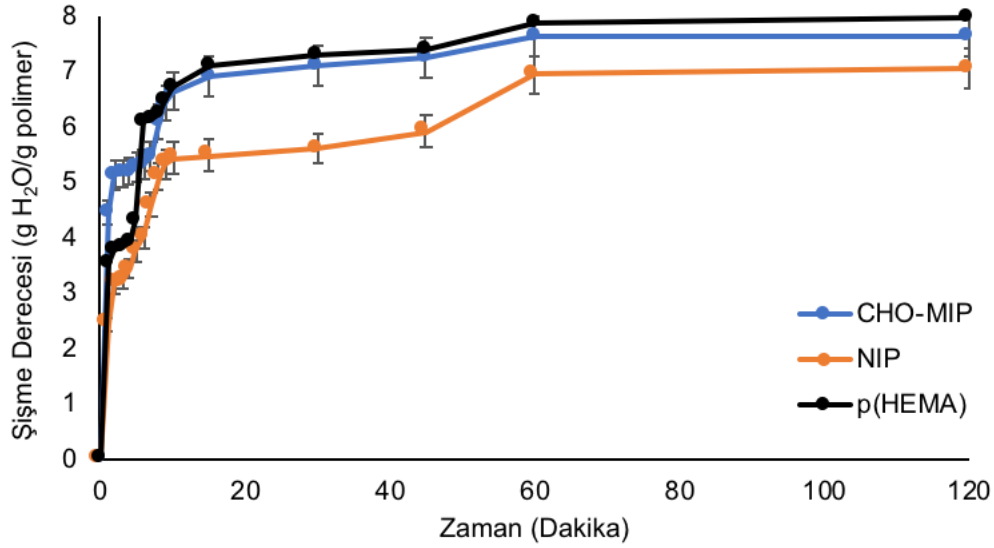
CHO-MIP ve NIP'nin özgül yüzey alanları, sırasıyla 17.63 m²/g ve 14.72 m²/g olarak bulunmuştur. Bu durum kriyopolimerizasyon sırasında kolesterol moleküllerine özgül boşlukların oluşmasıyla kolesterol baskılanmış kriyojel mikrokürelerin özgül yüzey alanlarının artmasının sonucudur.

5.2.3. Şişme Özellikleri

p(HEMA) kriyojel mikroküreler çapraz bağlı hidrofilik yapıya sahiptir. CHO-MIP'nin yapısında bulunan triptofan aminoasitinden dolayı çapraz bağlı hidrofobik yapıdadır ve sulu ortamda çözünmez ancak çapraz bağlanma derecesine ve matrisin hidrofilitesine bağlı olarak şişer. Şekil 5.7'de CHO-MIP ve NIP'nin zamanla şişme derecesini göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan kriyojel mikrokürelerin denge şişme oranı p(HEMA) için 7.99 g H₂O/g, kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküre için 7.66 g H₂O/g ve NIP için 7.05 g H₂O/g'dır. p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin su alım oranının CHO-MIP ve NIP'ye göre yüksek olması MATrp'nin hidrofobikliğinin yüksek olması sonucunda CHO-MIP ve NIP'nin hidrofobikliğin artması ve dolayısıyla su alımının azalmasına neden olmasına bağlıdır. Su alımında hidrofobik etki baskındır. CHO-MIP'nin su alım oranı NIP'e göre daha büyüktür. CHO-MIP ve NIP'nin denge şişme

oranları karşılaştırıldığında moleküler baskılama işleminin kriyojellerin şişme oranını arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum CHO-MIP ve NIP'nin hidrofobik olmasına karşın baskılanmış kriyojel mikrokürede kolesterole özgü boşlukların özgül yüzey alanını arttırması ile açıklanabilir.

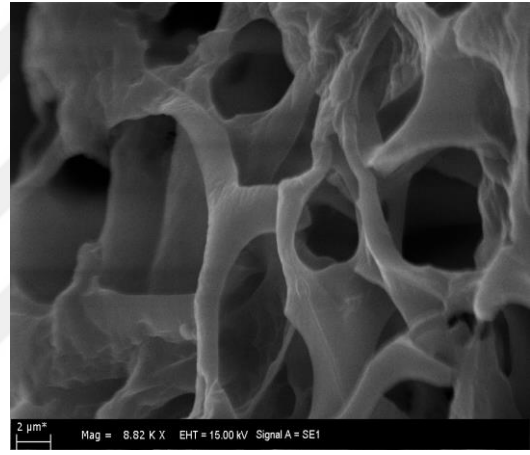
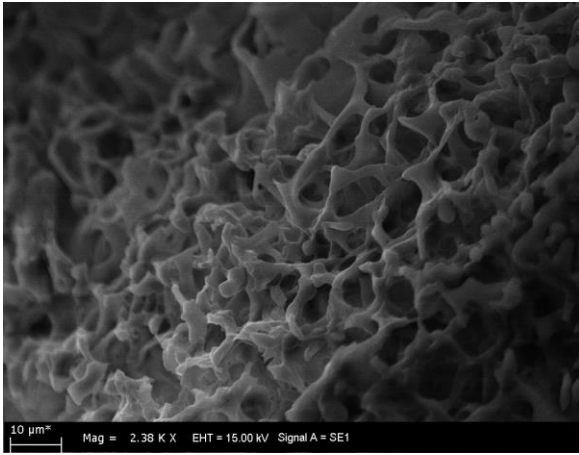
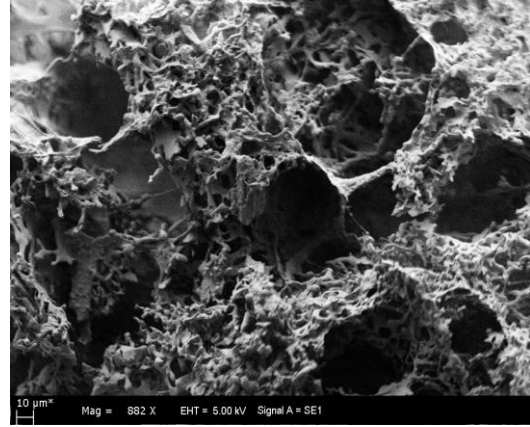
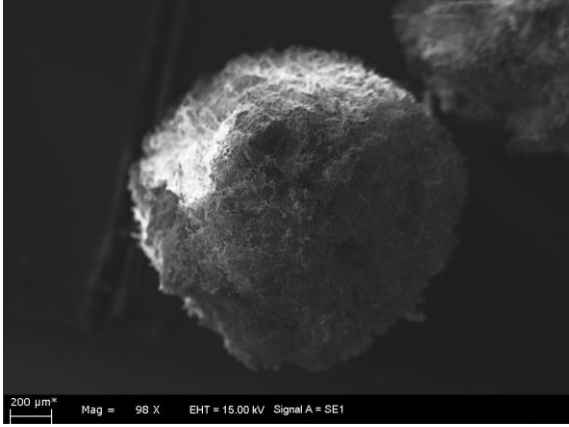
p(HEMA), CHO-MIP ve NIP'in gözenekliliğini belirlemek için öncelikle kriyojel mikroküreler şişmiş ve daha sonra sıkılmıştır. Suda gözeneklilik p(HEMA) için %82.54, CHO-MIP için %76.49, NIP için %73.83 olarak bulunmuştur.



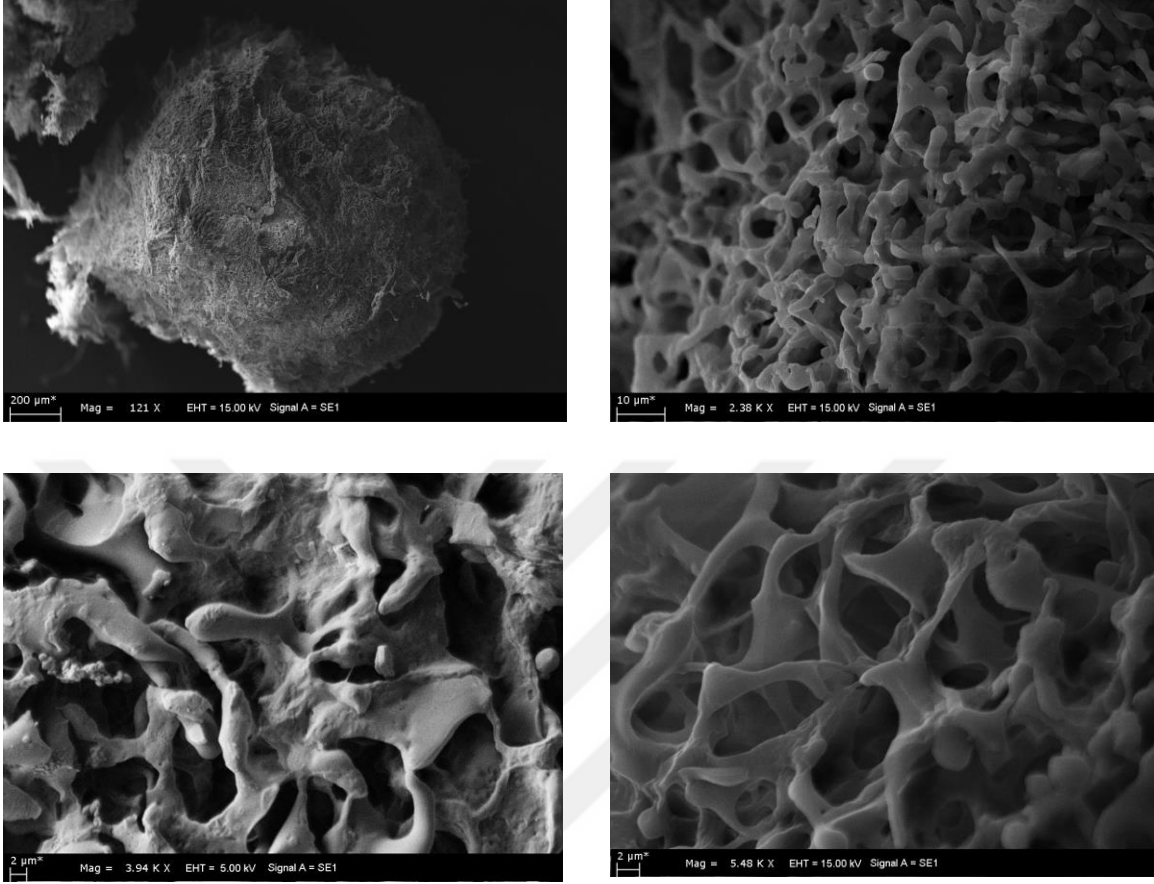
Şekil 5.7. p(HEMA), CHO-MIP ve NIP'in şişme derecesi.

5.2.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri

CHO-MIP ve NIP'lerin yüzey morfolojisi SEM görüntüleri kullanılarak incelenmiştir (Şekil 5.8-5.9). SEM görüntülerinden görüldüğü gibi, yüksek monodispersiteye sahip kriyojeller, küresel formda, 1633 µm boyutlarında olup birbiriyle bağlantılı makrogözenekli akış kanallarına sahiptir. Gözeneklerin boyutu 3-50 µm arası değişmektedir. Bu birim partikül kütlesi başına düşen özgül yüzey alanını artıran gözenekli yapı, kalıp molekül olan kolesterolün kriyojel içerisine difüzyon direncini azaltarak kolayca difüze olmasını sağlamaktadır ayrıca özgül yüzey alanının artması adsorpsiyon kapasitesini de arttırmaktadır.



Şekil 5.8. CHO-MIP'lerin SEM görüntüleri



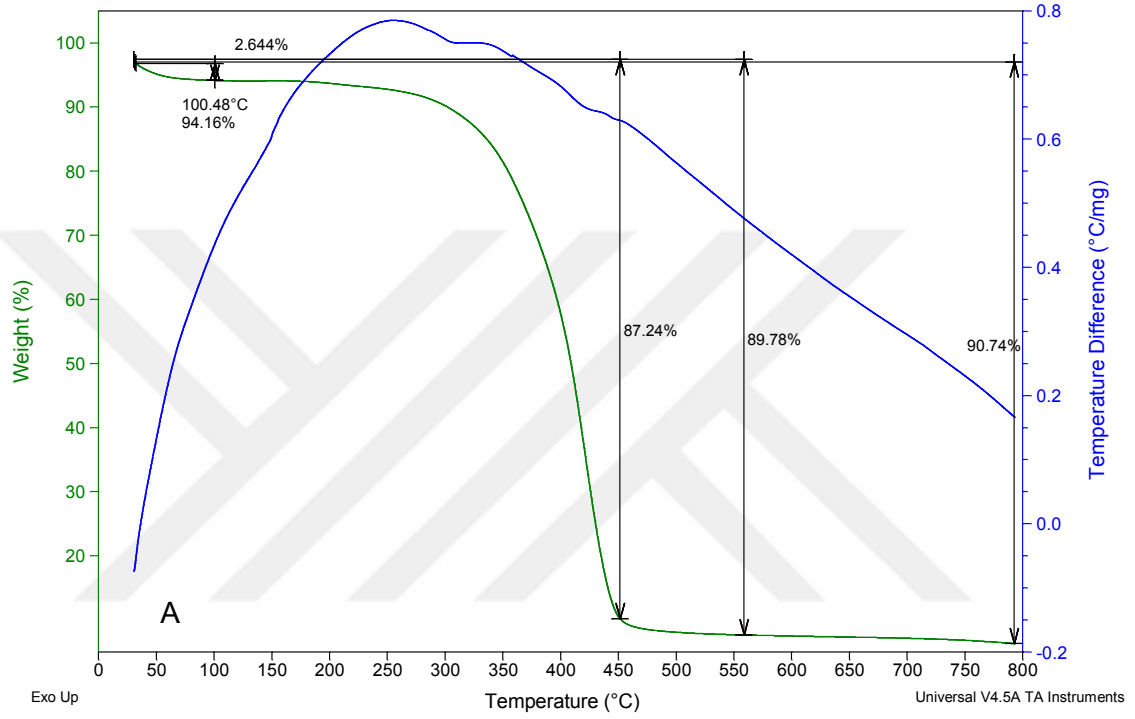
Şekil 5.9. NIP'lerin SEM görüntüleri

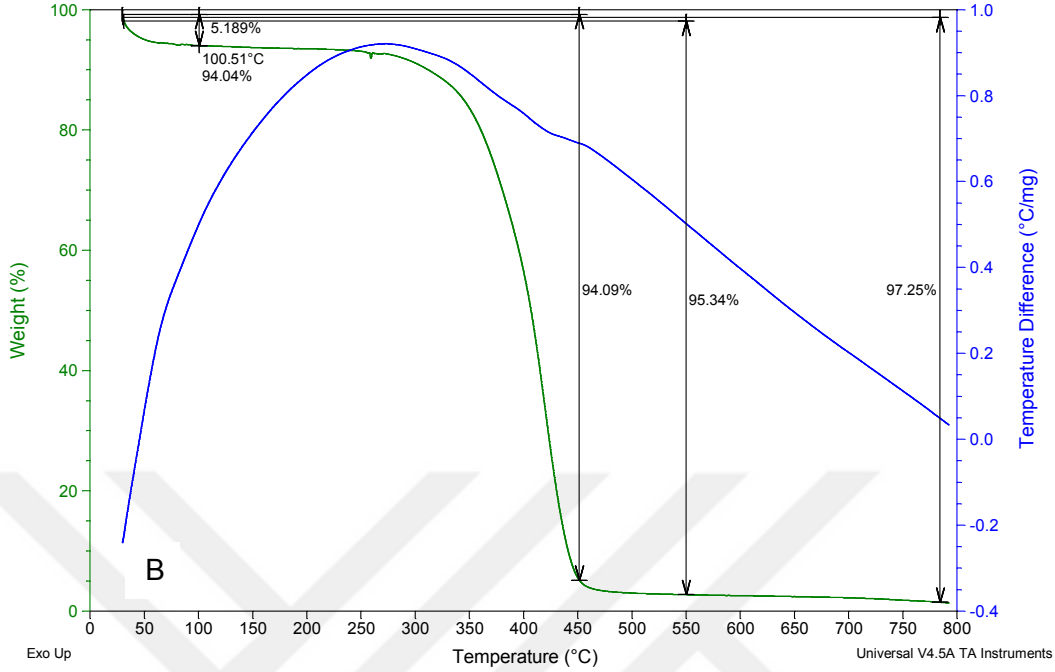
5.2.5 Termogravimetrik Analiz

CHO-MIP ve p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin bozunma sıcaklığını ve termomekanik kararlılığı TGA ile araştırılmıştır. Termal bozunma profili kriyojel mikrokürelerin yapısında MATrp olup olmadığını ortaya çıkarmak için tercih edilmiştir. Şekil 5.10(a), 800 °C'e kadar sıcaklık artışı nedeniyle CHO-MIP'lerin ağırlık kayıplarını göstermektedir. 100.48 °C'de adsorbe edilen suyun kaybına karşılık gelen ağırlık kaybı %2.64 olarak kaydedildi. CHO-MIP'nin maksimum dekompozisyonu yaklaşık olarak 300 °C'den başlar ve 450 °C'e kadar devam eder. Bu aralık için ağırlık kaybı %87.24'tür.

Görüldüğü gibi CHO-MIP'in ayrışması tek aşamada gerçekleşir. Şekil 5.10 (b)'de görüldüğü gibi, p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin 100.51 °C'de adsorbe edilen suyun kaybına karşılık gelen ağırlık kaybı %4.69'dur. Ayrışma sıcaklığı yaklaşık 300 °C'den başlar ve sürekli olarak 450 °C'e kadar devam eder. Bu aralık için ağırlık kaybı %94.09'dur. Elde edilen verilerden komonomer MATrp'ın HEMA monomerin yapısına

katılması ile p(HEMA) kriyojel mikrokürenin toplam termal stabilitesini arttırdığı söylenebilir. Polimerler termal olarak, genellikle 250 °C'den 350 °C'e (esnek alifatik polimerler için) veya 350 °C'den 550 °C'e (sert aromatik polimerler için) belirli bir sınırlayıcı sıcaklık aralığının altında stabildir.





Şekil 5.10. (A) CHO-MIP; (B) p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin TGA analizi

5.2.6. Elementel Analiz

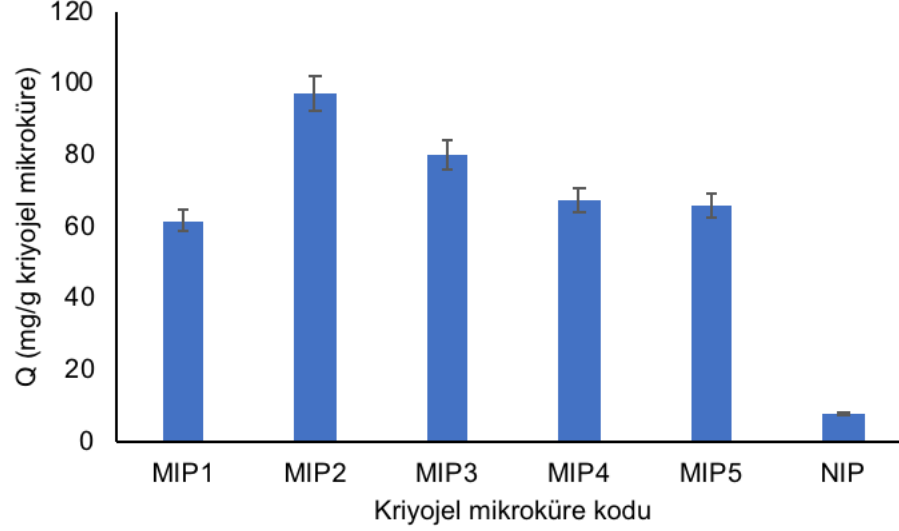
Triptofan ihtiva eden komonomer, MATrp'nin polimer yapısına dahil edilme derecesi, sentezlenen CHO-MIP ile p(HEMA) kriyojel mikrokürelerin analiz sonucunun karşılaştırılması ile azot içeren polimer bileşenlerinin bertaraf edilmesiyle hesaplanmıştır. MATrp'nin polimerik yapıya dahil edilmesi, azot stokiyometrisinden tüm deneylerde kullanılan MIP2 kodlu polimer için 103.91 μmol MATrp/g polimer olarak hesaplanmıştır.

5.3. Adsorpsiyon Çalışmaları

5.3.1. Adsorpsiyon Çalışmalarının Optimizasyonu

Şekil 5.11 farklı polimerizasyon reçetesi ile hazırlanan CHO-MIP'lerin ve NIP'nin kolesterol adsorpsiyon kapasitelerini göstermektedir. Burada polimerizasyon reçetesinde MATrp monomeri miktarını değiştirerek hazırlanan MIP1-MIP5 kriyojel mikrokürelerde 1.0 mg/mL kolesterol çözeltisi için en yüksek kolesterol adsorpsiyon kapasitesi MIP2'de gözlenmiştir (97.42 mg/g). NIP'lerde ise aynı derişimdeki kolesterol çözeltisi için kolesterol adsorpsiyonu daha düşüktür (7.70 mg/g). Bu davranış,

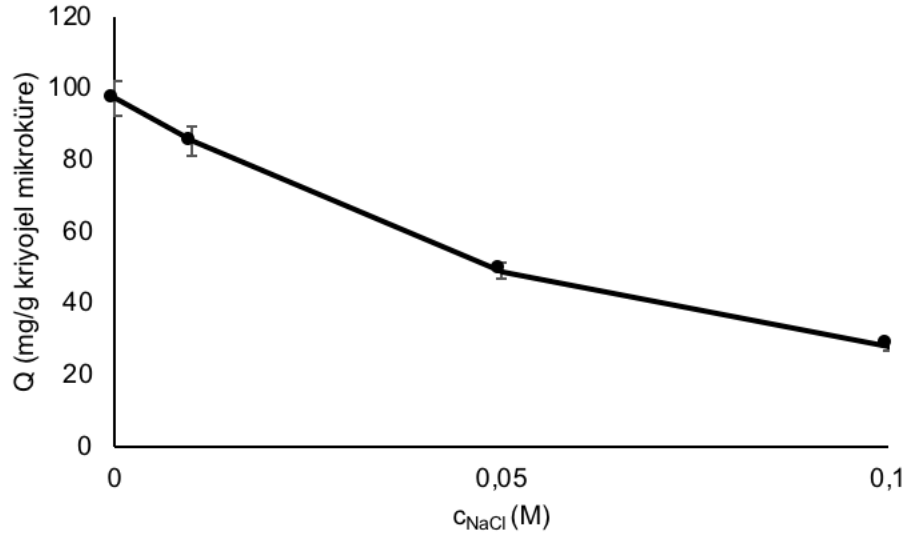
kolesterol molekülleri (şekil hafızası / geometrik afinite) için uygun olan polimerlerde daha fazla boşluk oluşumu ve daha yüksek kolesterol adsorpsiyon kapasitesi ile açıklanabilir.



Şekil 5.11. Farklı miktarlarda MATrp içeren CHO-MIP'lere kolesterol adsorpsiyonu.

5.3.1.1. İyonik Şiddetin Etkisi

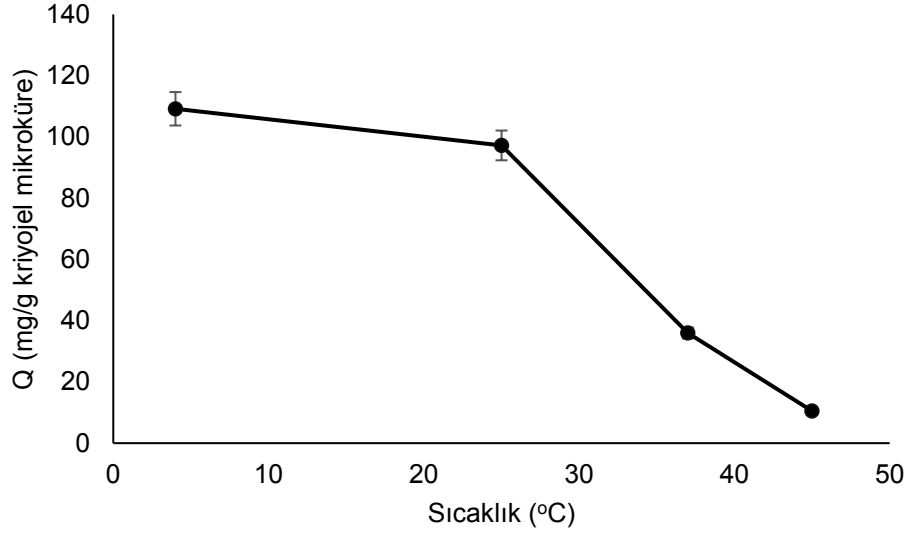
İyonik şiddetin kolesterol adsorpsiyonu üzerine etkisini belirlemek için adsorpsiyon çalışmaları 0-0.1 M NaCl içeren kolesterolün metanolde hazırlanan çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Ortamda tuz olmadığında kolesterol adsorpsiyon kapasitesi en yüksek seviyededir (Şekil 5.12). Metanol içinde -OH grubu gibi polar kimyasal gruplar hidrofobik etkiye neden olmaz. H-bağlanma etkileşimleri metanolde meydana gelir. İyonlar H-bağlanma etkileşimlerini bozar ve böylece artan iyonik güç ile adsorpsiyon kapasitesi azalır.



Şekil 5.12. CHO-MIP'nin kolesterol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; zaman: 150 dk; T: 25 °C).

5.3.1.2. Sıcaklığın Etkisi

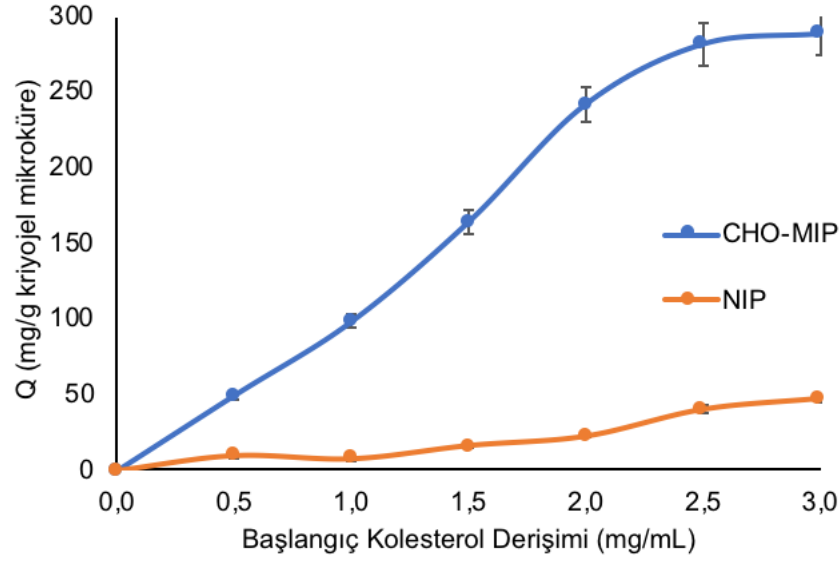
CHO-MIP'lere kolesterol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla kolesterol adsorpsiyon deneyleri 4-45 °C arası değışen farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.13'te görüldüğü gibi CHO-MIP'lerin adsorpsiyon kapasitesi, artan sıcaklıkla azalmıştır. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi 4 °C'de gözlenmiştir. Kolesterol baskılanmış kriyojel mikrokürelerde kolesterol adsorpsiyonu 4 °C'de 109.18 mg/g, 25 °C'de 97.22 mg/g, 37 °C'de 35.98 mg/g ve 45 °C'de 10.50 mg/g'dır. Adsorpsiyon işleminde etkin olan temel etkileşimlerin belirlenmesi için sıcaklık ile kolesterol adsorpsiyonu arasındaki ilişki önemlidir. Adsorpsiyon kapasitesindeki değışimler sıcaklıkla ters orantılı olduğu durumlarda hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler baskın iken adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklıkla doğru orantılı olarak değıştiği durumlarda van der Waals ve hidrofobik etkileşimler baskındır. Çünkü hidrofobik etkileşimler, entropi artışıyla yürüyen etkileşimlerdir ve sıcaklık bu etkileşimleri arttırmaya yönelik etkide bulunur.



Şekil 5.13. CHO-MIP'nin kolesterol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; zaman: 150 dk).

5.3.1.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi

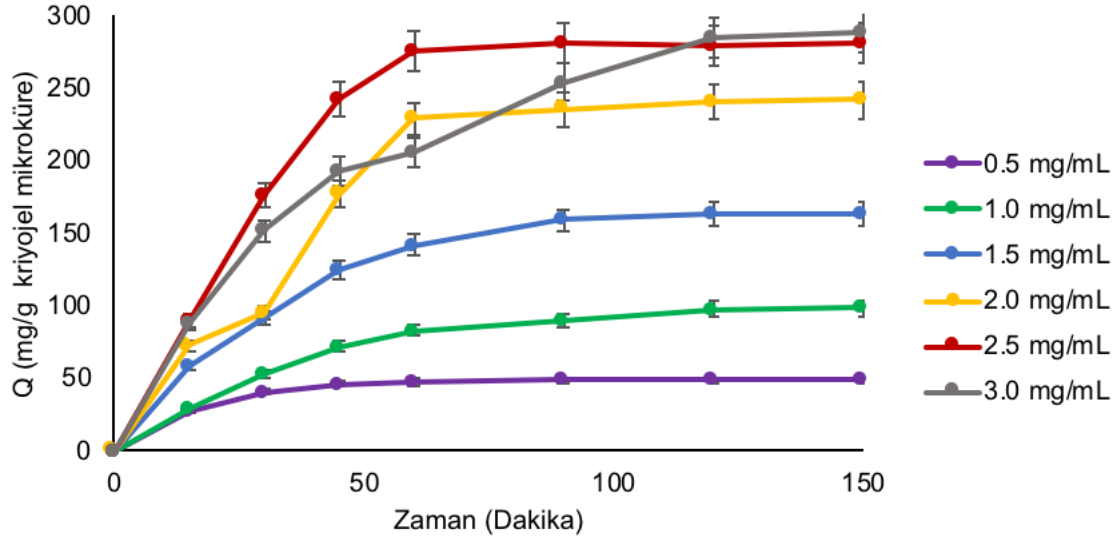
CHO-MIP ve NIP'nin kolesterol adsorpsiyonu çalışmaları, metanolde hazırlanmış farklı derişimlerdeki (0-3.0 mg/mL) kolesterol çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. CHO-MIP ve NIP'lerin adsorpsiyon kapasitesinin, çözeltide bulunan kolesterol derişimi ile değişimi Şekil 5.14'te gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre, çözeltideki kolesterol derişiminin artmasıyla, birim kriyojel mikroküre başına adsorplanan kolesterol miktarı, başlangıçta hızlı artmakta ve yaklaşık 288.72 mg/g değerinde kolesterolün bağlanabileceği spesifik etkileşim bölgelerinin dolmasına bağlı olarak denge değerine ulaşmaktadır. Bu derişim değerinden sonra önemli bir artış gözlenmemesi adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı artmakta ve dolayısıyla sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir. Özellikle CHO-MIP'nin adsorpsiyon izoterminin başlangıcında eğimin hızla yükselmesi, baskılama yöntemiyle polimerik yapıda oluşturulan kolesterol için kolesterole özgü moleküler tanıma boşlukları ile açıklanabilir. CHO-MIP ve NIP için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 288.72 mg/g ve 47.42 mg/g'dır.



Şekil 5.14. CHO-MIP ve NIP'de kolesterol adsorpsiyonuna derişimin etkisi (zaman: 150 dk; T: 25 °C).

5.3.1.4. Zamanın Adsorpsiyon Üzerine Etkisi

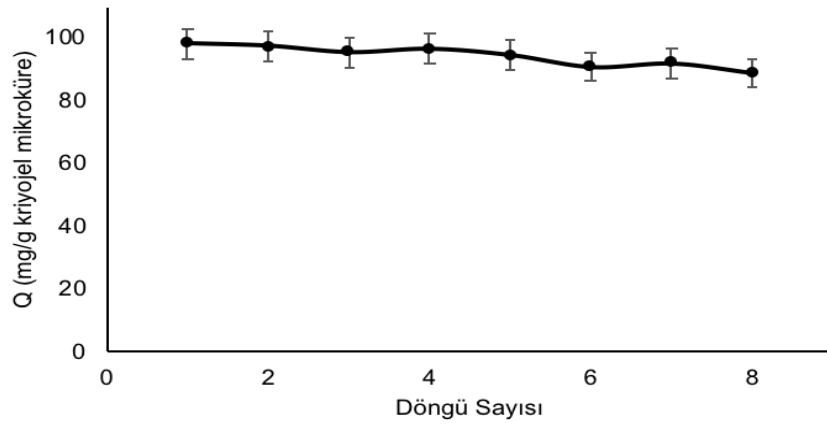
Kolesterol adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi, kolesterol derişiminin zamanla azalması olarak gözlendi (Şekil 5.15). Daha hızlı adsorpsiyon oranları, adsorpsiyon sürecinin başında gözlendi ve daha sonra adsorpsiyon dengesi, yaklaşık olarak 50-60 dakikada elde edildi. Ayrıca, artan kolesterol derişimi ile adsorpsiyon oranları artmıştır. Sıvı (kolesterol çözeltisi) ve katı faz (kriyojel mikroküreler) arasındaki kolesterol derişiminin farkı itici güç olarak adlandırılır ve çözeltideki kolesterol derişimi arttıkça, itici güç de artar. Yüksek kolesterol derişimlerinde yüksek adsorpsiyon oranları, sıvıdan katı faza kütle aktarımı için yüksek itici güce bağlı olabilir. En yüksek adsorbe edilen kolesterol miktarı 288.72 mg/g olarak hesaplandı.



Şekil 5.15. CHO-MIP'lerde kolesterol adsorpsiyonuna zamanın etkisi. (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; T: 25 °C).

5.3.1.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

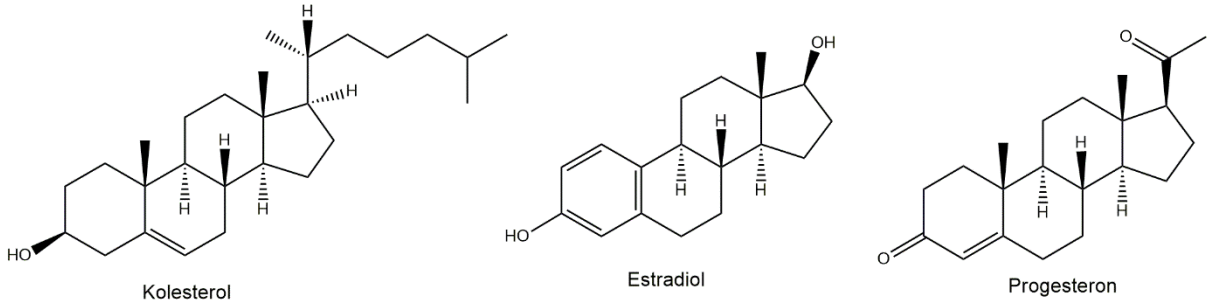
Adsorplanmış kolesterolün %89.43'ünün MeOH:HAc (80:20) ile desorbe olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada MeOH:HAc (80:20) desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, CHO-MIP'lerin yeniden kullanılabilirliğini göstermek için sekiz kez tekrarlandı. Sekiz adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün sonunda CHO-MIP'lerin adsorpsiyon kapasitesi %9.21 azalmıştır (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. CHO-MIP'lerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü (kolesterol derişimi: 1.0 mg/mL; zaman: 150 dk; T: 25 °C).

5.3.1.6. Sentezlenmiş CHO-MIP'lerin Seçiciliği

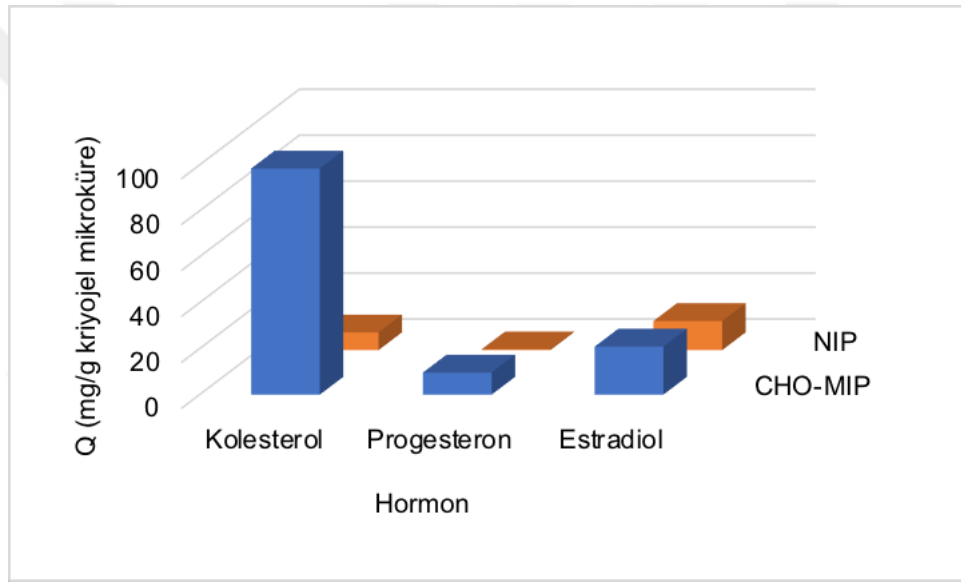
Kolesterol baskılanmış polimerin etkinliğini karşılaştırmak için estradiol ve progesteron seçicilik deneylerinde hedef molekül olarak seçilmişlerdir. Kolesterol analoglarının moleküler yapıları Şekil 5.17'de verilmiştir. Yarışmalı adsorpsiyondan kaçınmak için, kolesterol ve yapısal analoglarının çözeltileri, 1.0 mg/mL derişiminde tek tek hazırlanmıştır. Kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış polimerler tarafından adsorplanan kolesterol, progesteron ve estradiol miktarı Şekil 5.18'da gösterilmektedir. Kolesterole göre estradiol ve progesteron için K_d , k ve k' değerleri, Çizelge 5.1'de verilmiştir. CHO-MIP'lerin K_d değerleri, NIP'ler ile karşılaştırıldığında kolesterol için K_d değeri, yarışmacı moleküllere göre daha yüksektir. Bağlı seçicilik katsayısı kolesterol baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir ve elde edilen verilerden CHO-MIP'lerin kolesterol molekülüne estradiol molekülüne göre 4.77 kat, progesteron molekülüne göre ise 2.76 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküre ile adsorplanan kolesterol miktarının kolesterol baskılanmamış kriyojel mikrokürenin adsorplanan kolesterol miktarından daha yüksek olması kolesterol, hedef molekül, için, bu spesifik seçicilik, hidrojen bağlanma etkileşimleri ve moleküler boyut tanıma [155, 156] ve kriyopolimerizasyon sırasında oluşturulan sorbentte bulunan tamamlayıcı bağlanma bölgelerine bağlı olabilir [80, 157]. Bu durum, CHO-MIP'lerin kolesterol için bir absorbe edici olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.17. Kolesterol analoglarının moleküler yapıları

Çizelge 5.1. CHO-MIP ve NIP'ler için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

	CHO-MIP		NIP		
	k_d	k	k_d	k	k'
Kolesterol	109.55		15.31		
Estradiol	38.64	2.84	25.74	0.59	4.77
Progesteron	19.07	5.75	7.35	2.08	2.76



Şekil 5.18. CHO-MIP ve NIP'lere kolesterol ve yarışmacı moleküllerin adsorplanan madde miktarları (mg/g) (başlangıç derişimleri: 1.0 mg/mL; adsorpsiyon süresi: 150 dakika; T:25 °C).

5.4.1. Adsorpsiyon İzotermi

Her kolesterol molekülünün adsorban ile etkileşimlerini tanımlamak için bir adsorpsiyon izotermi kullanılır. Bu, çözeltideki kolesterol derişimi ve iki faz dengede olduğunda katı faz üzerine adsorbe edilen kolesterol miktarı arasında bir ilişki sağlar.

Langmuir adsorpsiyon modeli, moleküllerin her biri sadece bir molekülü tutabilen sabit sayıda iyi tanımlanmış bölgeye adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölgelerin aynı

zamanda, enerji olarak eşdeğer olduğu ve birbirlerinden uzak olduğu varsayılır, yani bitişik bölgelerde adsorbe edilen moleküller arasında hiçbir etkileşim yoktur.

Adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek için adsorpsiyon izotermi kullanıldı. Langmuir adsorpsiyon izotermi denklem 5.1 tarafından ifade edilmiştir. Kolesterol için denge verilerinin karşılık gelen dönüşümleri, lineer bir grafiğe yol açmıştır, bu da Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sistemlerde uygulanabileceğini ve denklemlerle açıklanabileceğini göstermektedir:

$$Q = Q_{\max} b C_{\text{eq}} / (1 + b C_{\text{eq}}) \quad (5.1)$$

Q, adsorbe edilen kolesterol miktarı (mg/g) olduğunda C_{eq} , denge durumunda kolesterol derişimini (mg/mL), b Langmuir sabitini (mL/mg) ifade ederken $Q_{\max}$, maksimum adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g). Bu eşitliğin doğrusallaştırılmış hali aşağıdaki denklemlerle ifade edilmektedir.

$$1/Q_{\text{eq}} = 1/(Q_{\max} b) (1/C_{\text{eq}}) + 1/Q_{\max}$$

CHO-MIP'nin adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri ($Q_{\max}$) verileri deneysel verilerden elde edilmiştir (Çizelge 5.2).

Adsorpsiyon davranışını tanımlamak için sıklıkla kullanılan diğer iyi bilinen izoterm, Freundlich izotermidir. Bu izoterm heterojen bir yüzey üzerinde adsorpsiyon için Langmuir yaklaşımının başka bir şeklidir. Adsorbe molekül miktarı, tüm bağlanma bölgelerindeki adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izoterm tersinir adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabakanın oluşumu ile sınırlı değildir. Bu ampirik denklem şu formu alır:

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

Burada K_F ve n Freundlich sabitleridir.

$\ln Q_{\text{eq}}$ 'ye karşı $\ln C_{\text{eq}}$ çizimi, $\ln K_F$ 'nin kesişimini ve $1/n$ 'lik eğimi oluşturmak için kullanılmıştır.

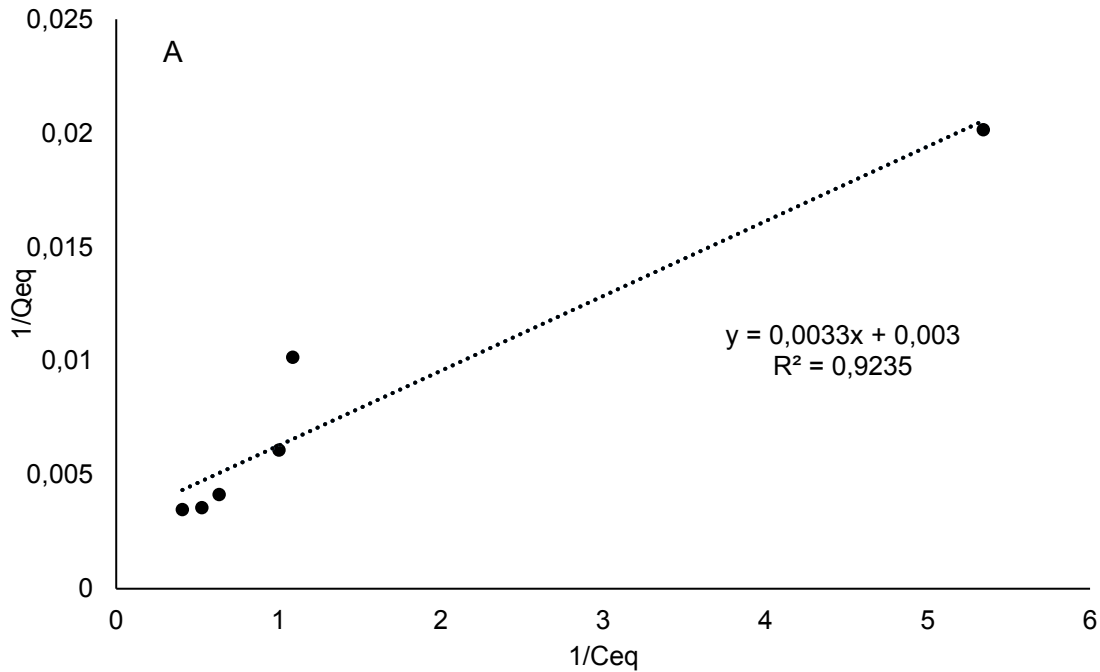
Daha önce bahsedildiği gibi Freundlich izoterm, yüzey heterojenliğini gösterir, iki parametre içerir, $1/n$ ve K_F . $1/n$, yüzey heterojenite indeksi, 0 ile 1.0 arasındadır. 1.0'e yakın ise, polimer heterojen bir yüzeye sahiptir.

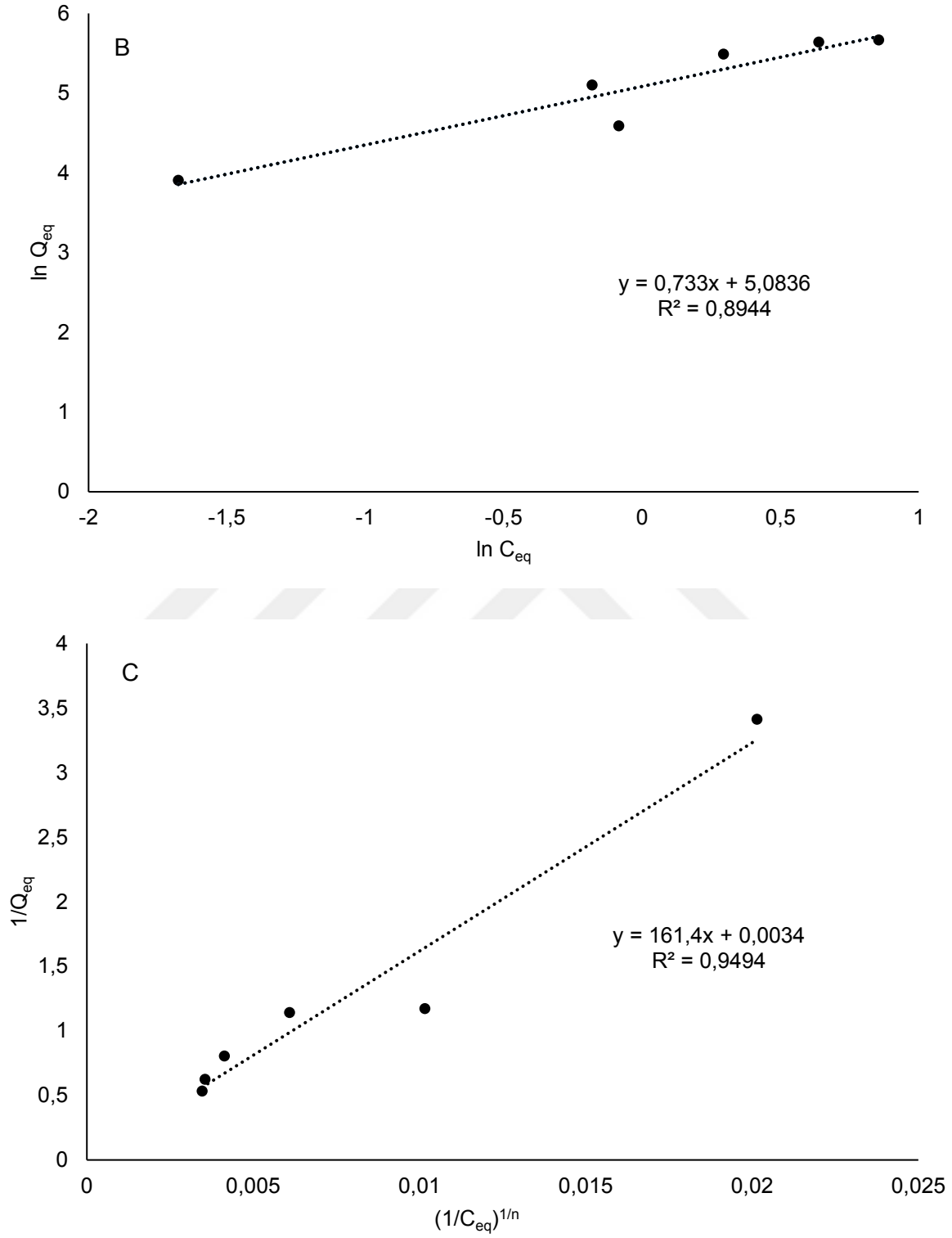
Langmuir-Freundlich izotermi, heterojen yüzeylere adsorpsiyon hakkında bilgi verir. Adsorpsiyon enerjisinin adsorbanın heterojen yüzeyine dağılımını tanımlar [158]. Düşük adsorplanan madde derişiminde bu model Freundlich izoterm modeli olurken yüksek adsorplanan madde derişimlerinde Langmuir izoterm olur. Langmuir-Freundlich izotermi aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$Q_{eq} = Q_{max} [C_{eq}]^{1/n} / K_{LF} + [C_{eq}]^{1/n}$$

Langmuir-Freundlich maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg/g), heterojen bir katı için denge sabiti, heterojen bir parametredir ve 0 ile 1 arasındadır. Bu parametreler non-lineer regresyon teknikleri kullanılarak elde edilebilir [159, 160].

Şekil 5.19'da CHO-MIP'lerin Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izotermine ait grafikler verilmiştir.





Şekil 5.19. Adsorpsiyon modelleri (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Şekil 5.19'a göre elde edilen veriler Langmuir-Freunlich modeli ile en uyumludur ($R^2=0.9494$). Moleküler baskılı polimerler (MIP) uygulanan bağlayıcı modellerin çoğu homojen modeller olmuştur. Diğer taraftan da MIP'ler, geniş bir dizi bağlanma afiniteleri ve seçicilikleri olan bağlanma bölgelerini içeren heterojen materyallerdir. Kolesterol baskılanmış kriyojel mikrokürelerin bağlanma davranışının heterojen Langmuir-Freundlich (LF) izotermiyle doğru bir şekilde modellenebildiği görülmektedir. MIP'leri modellemek için LF izotermi homojen ve heterojen MIP'lerde bulunan tek modlu heterojen dağılımın doğru bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Burada, Langmuir-Freundlich (LF) izotermi hem yüksek hem de düşük derişimlerde MIP'lerin hem homojen hem de heterojen dağılımlarını modelleyebilir. Bu nedenle, LF bağlanma modeli, homojen bağlanma modellerinin pratik uygulanabilirliği ile afinite dağılımı analizini birleştirir. Bununla birlikte, LF bağlanma modelinin sağladığı daha iyi uyum, MIP'lerde bulunan heterojenlik göz önüne alındığında, fiziksel olarak uygun olmanın bir sonucudur. Langmuir ve Freundlich modelleri karşılaştırıldığında, her birinin MIP'lere uygulandığında belirli sınırlamaları vardır. Langmuir modeli homojen bir model iken, MIP'lerin çoğu heterojen dağılımlara sahiptir. Diğer taraftan, Freundlich modeli, düşük derişim bölgelerinde MIP'lere mükemmel uyum gösteren heterojen bir modeldir. Bununla birlikte, Freundlich modeli, doyma davranışını modelleme yeteneğine sahip değildir ve bu nedenle, yüksek derişimli bölgelerde deneysel adsorpsiyon izoterminden sapmaktadır [161].

Çizelge 5.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm sabitleri ve korelasyon katsayıları

Deneysel		Langmuir		Freundlich Freundlich		Langmuir- Freundlich	
Q_{deneysel}	288.72	Q_{max}	333.33	Q_{max}	161.35	Q_{max}	294.12
		b	0.909	n	1.364	K_{LF}	2.1×10^{-5}
		R^2	0.9235	R^2	0.8944	R^2	0.9494

5.4.2. Adsorpsiyon Kinetiği Modellemesi

Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon sürecinin kontrol mekanizmasını incelemek için deneysel verileri test etmek için kinetik modeller kullanılmıştır.

Lagergren'in birinci dereceden hız denklemi, bir sıvı çözeltiden çözünen maddenin adsorpsiyonu için en yaygın kullanılanlardan biridir. Aşağıdaki gibi temsil edilebilir:

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t)$$

burada k_1 , yalancı-birinci derece adsorpsiyonun (1/dakika) hız sabiti ve q_{eq} ve q_t , denge altındaki ve t zamanında (mg/g) adsorbe edilen kolesterol miktarlarını gösterir. Sınır koşullarını uygulayarak entegrasyondan sonra, $t = 0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t'$ 'de $q_t = q_t$ verir.

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

Denklem doğrusal bir form elde etmek için yeniden düzenlenebilir;

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

kinetik modelin uygulanabilirliğini doğrulamak için, $\log(q_{eq})$ 'ye karşı t grafiği düz bir çizgi vermelidir. Gerçek bir birinci dereceden süreçte $\log q_{eq}$, $\log(q_{eq} - q_t)$ grafiğinin t ile kesişme noktasına eşit olmalıdır.

Ek olarak, denge adsorpsiyon kapasitesine dayalı bir yalancı ikinci dereceden bir denklem formda ifade edilebilir.

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq} - q_t)^2 \quad (5.2)$$

k_2 (g /mg.min), yalancı birinci dereceden adsorpsiyon sürecinin hız sabitidir. Denklem 5.2'yi integralini almak ve sınır koşullarını uygulama, $t = 0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t'$ 'de $q_t = q_t$ 'ye neden olur.

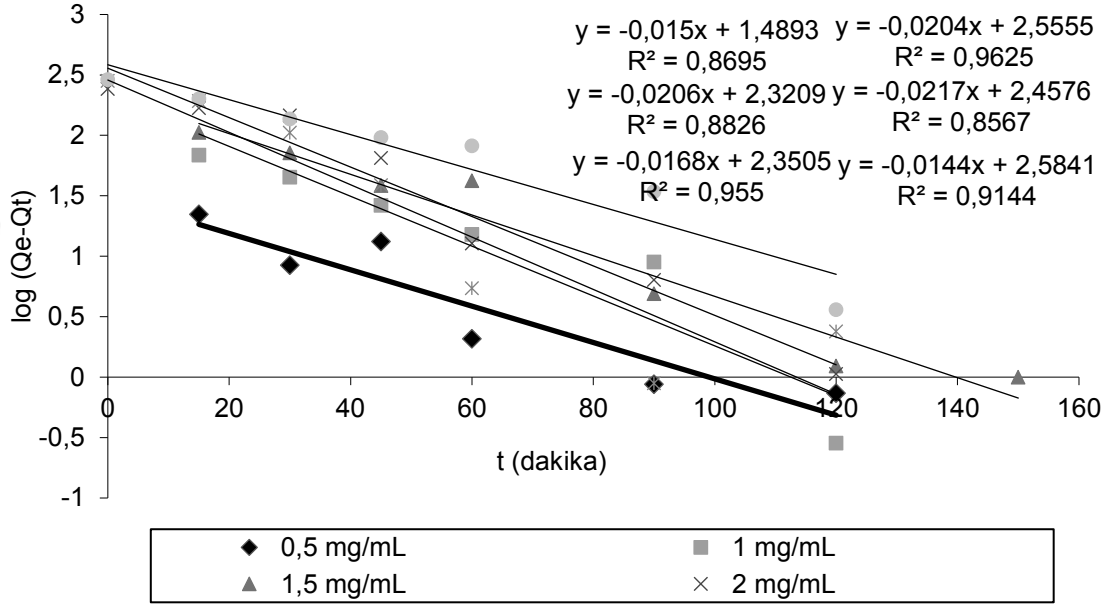
$$[1/(q_{eq} - q_t)] = (1/q_{eq}) + k_2 t$$

Ya da lineer form için eşdeğerdir

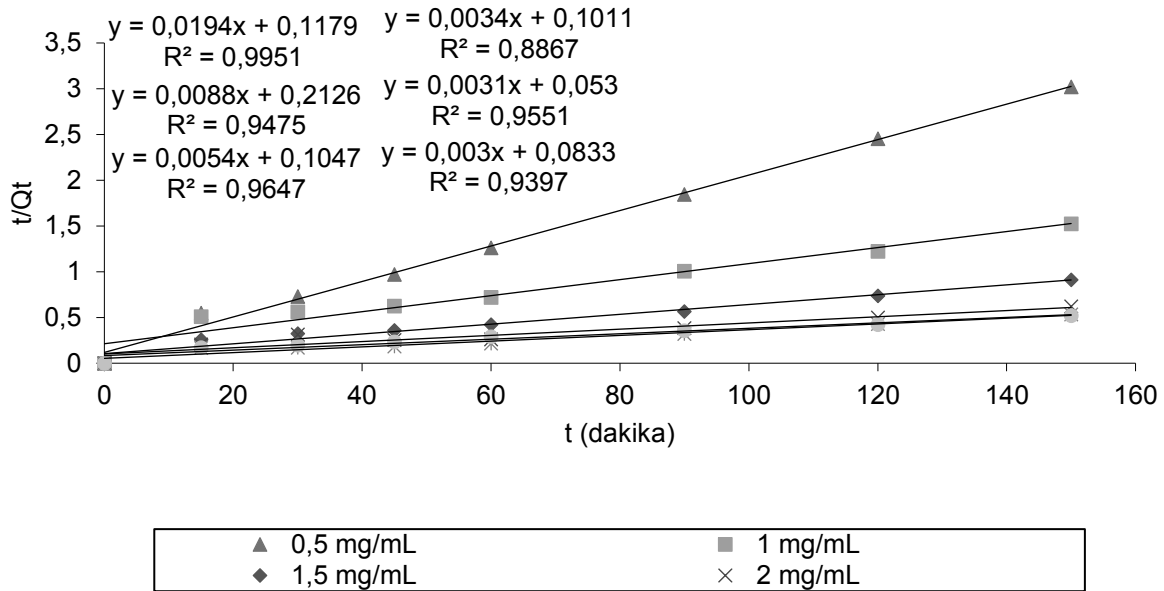
$$(t/q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq}) t$$

t/q_t karşı t 'nin grafiği, ikinci dereceden kinetiklerin uygulanabilirliği için doğrusal bir ilişki vermelidir. Denge (q_2) 'de hız sabiti (k_2) ve adsorpsiyon sırasıyla kesişme ve eğimden elde edilebilir. Deneysel adsorpsiyon kapasitesinin ve Şekil 5.20 ve Şekil 5.21'den elde edilen teorik değerlerin karşılaştırması Çizelge 5.3'te sunulmuştur. Yalancı birinci ve ikinci dereceden kinetik modellerden tahmin edilen teorik q_e değeri, deneysel değerlere

yakındır ve korelasyon katsayıları yüksektir. Sonuçlar, farklı derişim için R^2 değerlerinin genel olarak 1.0'e yakın olduğunu göstermektedir. Bu CHO-MIP kriyojel mikroküreler ikinci derece kinetik modele uymaktadır.



Şekil 5.20. CHO-MIP'ler için deneysel verilerin yalancı-birinci dereceden kinetik.



Şekil 5.21. CHO-MIP'ler için deneysel verilerin yalancı-ikinci dereceden kinetik.

Çizelge 5.3. CHO-MIP'ler için birinci ve ikinci dereceden kinetik sabitler.

	Denge	Deneysel	Yalancı birinci dereceden kinetik			Yalancı ikinci dereceden kinetik		
	Derişim (mg/mL)	Q_e (mg/g)	k_1 (1/dakika)	Q_e (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.dakika)	Q_e (mg/g)	R^2
CHO-MIP	0.5	49.64	3.4×10^{-2}	4.43	0.869	3.2×10^{-3}	51.55	0.995
	1.0	98.41	4.7×10^{-2}	10.18	0.883	3.6×10^{-4}	113.64	0.948
	1.5	164.24	3.9×10^{-2}	10.49	0.955	2.8×10^{-4}	185.19	0.965
	2.0	241.95	4.7×10^{-2}	12.88	0.963	1.1×10^{-2}	294.12	0.887
	2.5	281.76	4.8×10^{-2}	11.68	0.857	1.8×10^{-4}	322.58	0.955
	3.0	288.72	3.3×10^{-2}	13.25	0.914	1.1×10^{-2}	333.33	0.940

5.4.3. Gerçek Gıda Örneklerinden Moleküler Baskılanmış Kriyojel Mikrokürelerle Kolesterolün Geri Kazanımı

Literatürde, kolesterolün süt ve gıda ürünlerinden tahmini için kolorimetrik, gravimetrik, kromatografik, kızıl ötesi gibi çeşitli analitik yaklaşımlar bulunmaktadır. Süt ürünlerinde kolesterol tahmini için, iki ana yöntem geliştirilmiştir; doğrudan ve dolaylı yöntem. Doğrudan yöntemde, kloroformda çözündürülmüş susuz süt yağı, uygun bir seyreltmede renk geliştirilirken, dolaylı yöntemde renk geliştirmede sabunlaşmayan madde kullanılır. Ayrıca literatürde Fourier dönüştürülmüş kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi diğer yöntemler de bulunmaktadır.

CHO-MIP'nin potansiyelini belirlemek için hedef analitin kompleks matrislerden seçici olarak bağlanması için farklı miktarlarda kolesterol ilave edilmiş süt örnekleri kriyojel mikrokürelere uygulanır uygun ekstraksiyon yöntemi kullanılarak kolesterol miktarı UV-spektrofotometre ile belirlenir. Çizelge 5.4'te gerçek örnek sonuçları verilmiştir. Elde edilen verilere göre sentezlenen CHO-MIP sadece yüksek afinite ve yüksek bağlanma kapasitesi değil aynı zamanda gerçek örneklerle değerlendirildiğinde yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik göstermiştir.

Çizelge 5.4. Gerçek gıda ürünlerinden kolesterolün geri kazanımı

Gıda	Eklenen kolesterol (mg/mL)	Geri kazanım (%)	R.S.D (%)
Süt	0.3	100.28	5.18
	0.5	94.31	3.01

Geri kazanım = (ölçülen kolesterol ilave edilmiş örnekteki miktar-ölçülen süt örneği)/başlangıçta ilave edilen kolesterol derişimi x 100%

Bağıl standart sapma (R.S.D) = (standart sapma/ortalama) x 100%

6. YORUM

Bu tez çalışması kapsamında gıdalardan kolesterolün uzaklaştırılması amacıyla kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküreler hazırlanmıştır. Bu kapsamda, hazırlanması planlanan kolesterole yüksek seçicilikteki polimer, gıda teknolojisinde gelişmelerin oldukça hızlı olduğu günümüzde toplum sağlığı açısından önemli bir problemin ortadan kaldırılması amacıyla kullanım imkanına sahip olacaktır. Ayrıca, moleküler baskılama yöntemine dayalı kriyojel mikrokürelerin yüksek seçicilikte, fiziksel koşullara dayanıklı, kolay hazırlanabilir ve düşük maliyetli olması ile kolesterolün uzaklaştırılmasında diğer yöntemlere alternatif olma potansiyelini ortaya çıkaracaktır. Bu amaçla ilk olarak MATrp monomeri, L-triptofan metil esteri ile metakroil klorürün reaksiyonu sonucu sentezlenmiştir. Elde edilen monomer ATR-FTIR ve GC-MS çalışmaları ile karakterize edilmiş ve elde edilen sonuçlar MATrp monomerinin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir.

Kolesterol:MATrp mol oranı 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 olacak şekilde beş farklı oranda baskılanmış kriyojel mikroküre sentezlenmiş ve kolesterolün adsorpsiyon çalışmaları ile uygun kalıp molekül/monomer oranı belirlendi. Ayrıca özgül olmayan bağlanmaların etkisini göstermek için baskılanmamış kriyojel mikroküre hazırlanmıştır.

Fonksiyonel monomerin yapıya girdiğinin belirlenmesi için elementel analiz ve ATR-FTIR sonuçlarına yapısal karakterizasyon için başvurulmuştur. p(HEMATrp) kriyojel mikroküreye ait spektrum, p(MATrp) ve p(HEMA) için elde edilen spektrumlardan farklıdır ve MATrp monomerine ait karakteristik bandlar göstermektedir. Bu sonuç HEMA varlığında fonksiyonel monomer olan MATrp'ın yapıya başarıyla dahil edildiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca elementel analiz sonucunda yapıya MATrp'nın dahil edildiği azot stokiyometrisi kullanılarak belirlenmiştir.

Kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel mikrokürelerin SEM görüntüleri ile yüzey morfolojileri ve gözenek boyutu belirlenmiştir.

Elde edilen verilerin Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modellerine uygunluğu incelendi ve veriler izoterm modellerine uygulandı. Elde edilen veriler Langmuir-Freundlich modeli ile en uyumludur. Böylece Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli heterojenliğe bağlı olarak MIP'lerde Langmuir ve

Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerinin kısıtlamalarını bertaraf ederek daha iyi uyum sağlar

Sentezlenmiş kolesterol baskılanmış kriyojel mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiş ve sekiz adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında kriyojel mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesi %9.21 azalmıştır.

TGA-DTA analizi sonucunda p(HEMA) kriyojel mikroküreler ile kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelerin TGA-DTA termogramları incelendiğinde yapıya MATrp'nın girmesiyle kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelerin p(HEMA) kriyojel mikrokürelere göre termal kararlılık kazandığı gözlenmiştir.

p(HEMA) kriyojel mikroküreler hidrofilik yapıdadır ve yapıya MATrp katılmasıyla yapının hidrofobikliği artmıştır. Kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel mikrokürelerin denge şişme oranları karşılaştırıldığında ise baskılama işleminin kriyojel mikrokürede kolesterole özgü boşlukların özgül yüzey alanını arttırması ile kriyojellerin şişme oranını arttırdığı gözlenmiştir. p(HEMA), kolesterol baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelerin denge şişme oranları sırasıyla 7.99 g H₂O/g, 7.66 g H₂O/g ve 7.05 g H₂O/g'dır. Makrogözenek oranları ise sırasıyla %82.54, %76.49, %73.83'tür.

Elde edilen teorik Q_{eq} değerlerinin deneysel değerlere oldukça yakın olması ve R^2 değerleri dikkate alındığında, yalancı ikinci derece reaksiyonların baskın olduğu ve ikinci derece kinetik modelinin kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelere daha uygun olduğu görülmektedir. Elde edilen kinetik analiz verileri kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelere kolesterol adsorpsiyonunda herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın; adsorpsiyon işlemi kimyasal kontrollü olarak yani kolesterol baskılanmış kriyojel mikroküre ile kolesterol arasındaki spesifik bağlanma tepkimesinin kinetik davranışı kontrol ettiğini göstermektedir.

Kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelerin spesifik yüzey alanı 17.63 m²/g olarak bulunmuştur. Kolesterol baskılanmamış kriyojel mikrokürelerin spesifik yüzey alanı ise 14.72 m²/g olarak bulunmuştur. Yüzey alanı baskılama işlemi sonucunda kolesterole spesifik olarak oluşan boşluklar nedeniyle artmıştır.

Kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelere, kolesterol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla kolesterol adsorpsiyon deneyleri 4-45 °C arası değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık artışı ile birlikte adsorpsiyon kapasitesinde azalış meydana gelmiştir bu durum kolesterol ile kriyojel mikroküre arasındaki baskın etkileşim türünün hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler olduğunu göstermektedir.

Sentezlenen CHO-MIP'lerle gerçek gıda örneklerinden kolesterolün geri kazanımı çalışmalarında ticari süt örneğine farklı miktarlarda ilave edilen kolesterol için yüzde geri kazanım yüksek ve yüzde bağıl standart sapma değerleri %5.2'den düşüktür.

Kolesterol baskılanmış p(HEMATrp) kriyojel mikrokürelerin kolesterol moleküllerine estradiol moleküllerine göre 4.77 kat, progesteron molekülüne göre 2.76 kat daha seçici olduğu bulunmuştur. Veriler doğrultusunda, kolesterole kolayca ulaşabilen ve kolesterol ile etkileşime girdikten sonra kolayca ayrılabilen bir akıllı polimer üretilerek karmaşık bir biyo-çevreden kolesterolün uzaklaştırılması ve gıdalardan büyük ölçekli kolesterol ayrımı için kullanılabilmesi hedeflenerek literatüre önemli katkılar sağlanabilir.

Fonksiyonel gıdalar ve içeceklerin küresel piyasa potansiyeli 2020 yılına kadar 192 milyar dolara çıkacak. Her ne kadar hızla gelişse de, bu ürünlerin tüketicilerin beklentilerini karşılaması gerektiği için, bu gıdaların geliştirilmesi gıda üreticileri için çok zor olabilir. Mevcut çalışmaları analiz etmek ve iyileştirilmesi gereken alanları belirlemek tüketicinin seçimini ve davranışını daha iyi anlamamıza katkıda bulunabilir. Geliştirilecek malzeme sadece süt ürünlerinde değil diğer gıda ürünlerinin geniş bir yelpazesinde de kolesterol ayırmak için ticari bir adsorbent oluşturacak potansiyele sahiptir.

KAYNAKLAR

- [1] Waterham, H. R., Defects of cholesterol biosynthesis, *FEBS Lett*, 580, 5442-5449, **2006**.
- [2] Faye, B., Bengoumi, M., Al-Masaud, A., Konuspayeva, G., Comparative milk and serum cholesterol content in dairy cow and camel, *Journal of King Saud University - Science*, 27, 168-175, **2015**.
- [3] Raguz, M., Mainali, L., Widomska, J., Subczynski, W. K., The immiscible cholesterol bilayer domain exists as an integral part of phospholipid bilayer membranes, *Biochim Biophys Acta*, 1808, 1072-1080, **2011**.
- [4] Ahn, J. H., Jeong, I. S., Kwak, B. M., Leem, D., Yoon, T., Yoon, C., Jeong, J., Park, J. M., Kim, J. M., Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods, *Food Chem*, 135, 2411-2417, **2012**.
- [5] Mouritsen, O. G., Zuckermann, M. J., What's so special about cholesterol?, *Lipids*, 39, 1101-1113, **2004**.
- [6] Rozner, S., Garti, N., The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 282-283, 435-456, **2006**.
- [7] Sinha, A., Basiruddin, S., Chakraborty, A., Jana, N. R., beta-Cyclodextrin functionalized magnetic mesoporous silica colloid for cholesterol separation, *ACS Appl Mater Interfaces*, 7, 1340-1347, **2015**.
- [8] Mosbach, K., Ramström, O., The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Bio/Technology*, 14, p.163, **1996**.
- [9] Kryscio, D. R., Peppas, N. A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomater*, 8, 461-473, **2012**.
- [10] Andersson, L. I., Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 745, 3-13, **2000**.
- [11] Piletsky, S. A., Turner, N. W., Laitenberger, P., Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics--future potential and existing problems, *Med Eng Phys*, 28, 971-977, **2006**.
- [12] Li, W., Li, S., Molecular Imprinting: A Versatile Tool for Separation, Sensors and Catalysis, *Oligomers - Polymer Composites - Molecular Imprinting*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 191-210, **2007**.
- [13] Puoci, F., Iemma, F., Picci, N., Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: a review, *Curr Drug Deliv*, 5, 85-96, **2008**.
- [14] Longo, L., Vasapollo, G., Phthalocyanine-Based Molecularly Imprinted Polymers as Nucleoside Receptors, *Metal-Based Drugs*, 2008, p.281843, **2008**.
- [15] Cormack, P. A. G., Mosbach, K., Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124, **1999**.

- [16] Ashley, J., Shahbazi, M.-A., Kant, K., Chidambara, V. A., Wolff, A., Bang, D. D., Sun, Y., Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives, *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 606-615, **2017**.
- [17] Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol*, 21, 445-451, **2003**.
- [18] Ertürk, G., Mattiasson, B., Cryogels-versatile tools in bioseparation, *Journal of Chromatography A*, 1357, 24-35, **2014**.
- [19] Aslıyüce, S., Bereli, N., Uzun, L., Onur, M. A., Say, R., Denizli, A., Ion-imprinted supermacroporous cryogel, for in vitro removal of iron out of human plasma with beta thalassemia, *Separation and Purification Technology*, 73, 243-249, **2010**.
- [20] Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10, 163-188, **2001**.
- [21] Albuquerque, T. G., Oliveira, M. B. P. P., Sanches-Silva, A., Costa, H. S., Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 193, 18-25, **2016**.
- [22] Bloch, K., Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function, *Steroids*, 57, 378-383, **1992**.
- [23] Zerbinati, C., Iuliano, L., Cholesterol and related sterols autoxidation, *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 151-155, **2017**.
- [24] Dufourc, E. J., Sterols and membrane dynamics, *J Chem Biol*, 1, 63-77, **2008**.
- [25] Martinez-Seara, H., Rog, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., Karttunen, M., Reigada, R., Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of the double-bond position, *Biophys J*, 95, 3295-3305, **2008**.
- [26] Bhagavan, N. V., Ha, C.-E., Chapter 18 - Lipids III: Plasma Lipoproteins, *Essentials of Medical Biochemistry*, Academic Press, San Diego, 225-239, **2011**.
- [27] Roy, S., Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk and Evidence-based Management of Cholesterol, *North American Journal of Medical Sciences*, 6, 191-198, **2014**.
- [28] Durstine, J. L., Haskell, W. L., Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins, *Exerc Sport Sci Rev*, 22, 477-521, **1994**.
- [29] Wadhera, R. K., Steen, D. L., Khan, I., Giugliano, R. P., Foody, J. M., A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality, *J Clin Lipidol*, 10, 472-489, **2016**.
- [30] Frösen, J., Tulamo, R., Heikura, T., Sammalkorpi, S., Niemelä, M., Hernesniemi, J., Levonen, A.-L., Hörmkö, S., Ylä-Herttuala, S., Lipid accumulation, lipid oxidation, and low plasma levels of acquired antibodies against oxidized lipids

associate with degeneration and rupture of the intracranial aneurysm wall, *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 71-71, **2013**.

- [31] Steinberg, D., Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy, *J Lipid Res*, 47, 1339-1351, **2006**.
- [32] Varbo, A., Benn, M., Tybjaerg-Hansen, A., Jørgensen, A. B., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G., Remnant Cholesterol as a Causal Risk Factor for Ischemic Heart Disease, *Journal of the American College of Cardiology*, 61, 427-436, **2013**.
- [33] Law, M. R., Wald, N. J., Thompson, S. G., By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease?, *BMJ*, 308, 367-372, **1994**.
- [34] Yazdanyar, A., Yeang, C., Jiang, X. C., Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein- mediated reverse cholesterol transport, *Curr Atheroscler Rep*, 13, 242-248, **2011**.
- [35] Wüstner, D., Solanko, K., How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, 1908-1926, **2015**.
- [36] Luchetti, G., Sircar, R., Kong, J. H., Nachtergaele, S., Sagner, A., Byrne, E. F. X., Covey, D. F., Siebold, C., Rohatgi, R., Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling, *eLife*, 5, p.e20304, **2016**.
- [37] Albert, A. D., Boesze-Battaglia, K., The role of cholesterol in rod outer segment membranes, *Progress in Lipid Research*, 44, 99-124, **2005**.
- [38] Alizadeh, A., Dyck, S. M., Karimi-Abdolrezaee, S., Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects, *Front Mol Neurosci*, 8, p.35, **2015**.
- [39] Zhang, J., Liu, Q., Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain, *Protein Cell*, 6, 254-264, **2015**.
- [40] Bjorkhem, I., Diczfalusy, U., Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 734-742, **2002**.
- [41] Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K. C., Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H.,

- Fowkes, F. G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J. P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M., Nasser, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., 3rd, Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., De Leon, F. R., Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard, D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P. H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z. J., Lopez, A. D., Murray, C. J., AlMazroa, M. A., Memish, Z. A., Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*, 380, 2095-2128, **2012**.
- [42] Gisterå, A., Hansson, G. K., The immunology of atherosclerosis, *Nature Reviews Nephrology*, 13, p.368, **2017**.
- [43] Rodriguez, I. R., Alam, S., Lee, J. W., Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein in cultured RPE cells is dependent on the formation of 7-ketocholesterol, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2830-2837, **2004**.
- [44] Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E. K., Hultén, L. M., Wiklund, O., Innerarity, T. L., Boren, J., Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis, *Nature*, 417, 750-754, **2002**.
- [45] Hansson, G. K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N Engl J Med*, 352, 1685-1695, **2005**.
- [46] Wilson, M. D., Rudel, L. L., Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol, *J Lipid Res*, 35, 943-955, **1994**.
- [47] Arnold, D. R., Kwiterovich, P. O., CHOLESTEROL | Absorption, Function, and Metabolism, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, (eds: Caballero, B., Academic Press, Oxford, 1226-1237, **2003**.
- [48] Amundsen, A. L., Ose, L., Nenseter, M. S., Ntanios, F. Y., Plant sterol ester-enriched spread lowers plasma total and LDL cholesterol in children with familial hypercholesterolemia, *Am J Clin Nutr*, 76, 338-344, **2002**.

- [49] Millar, P. J., Floras, J. S., Statins and the autonomic nervous system, *Clin Sci (Lond)*, 126, 401-415, **2014**.
- [50] Whitehead, N. P., Kim, M. J., Bible, K. L., Adams, M. E., Froehner, S. C., A new therapeutic effect of simvastatin revealed by functional improvement in muscular dystrophy, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 12864-12869, **2015**.
- [51] van Heek, M., Farley, C., Compton, D. S., Hoos, L., Davis, H. R., Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function, *Br J Pharmacol*, 134, 409-417, **2001**.
- [52] Vasanthi, H. R., Kartal-Özer, N., Azzi, A., Das, D. K., Dietary Supplements, Cholesterol and Cardiovascular Disease, *Modern Dietary Fat Intakes in Disease Promotion*, (eds: De Meester, F., Zibadi, S., Watson, R. R.), Humana Press, Totowa, NJ, 227-247, **2010**.
- [53] Natarajan, P., Ray, K. K., Cannon, C. P., High-Density Lipoprotein and Coronary Heart Disease: Current and Future Therapies, *Journal of the American College of Cardiology*, 55, 1283-1299, **2010**.
- [54] Marette, S., Roosen, J., Blanchemanche, S., Feinblatt-Mélèze, E., Functional food, uncertainty and consumers' choices: A lab experiment with enriched yoghurts for lowering cholesterol, *Food Policy*, 35, 419-428, **2010**.
- [55] Dinh Thu, T. N., Thompson Leslie, D., Galyean Michael, L., Brooks, J. C., Patterson Kristine, Y., Boylan, L. M., Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 269-289, **2011**.
- [56] http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/ (Ağustos, **2018**).
- [57] Boudreau, A., Arul, J., Cholesterol Reduction and Fat Fractionation Technologies for Milk Fat: An Overview, *Journal of Dairy Science*, 76, 1772-1781, **1993**.
- [58] Armando, L., Paolo, B., Carlo, M., Liliana, F., Stefania, V., Enzo, F., Pierre, B., A new short-path distillation system applied to the reduction of cholesterol in butter and lard, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 609-614, **1994**.
- [59] Bradley, R. L., Jr., Removal of Cholesterol from Milk Fat Using Supercritical Carbon Dioxide¹, *Journal of Dairy Science*, 72, 2834-2840, **1989**.
- [60] Gu, Y. F., Chen, Y., Hammond, E. G., Use of cyclic anhydrides to remove cholesterol and other hydroxy compounds from fats and oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1205-1209, **1994**.
- [61] M. Shingla, K., Mehta, B., *Cholesterol and its oxidation products: occurrence and analysis in milk and milk products* vol. 5, 2018.
- [62] H., A., K., W., R., N., Degradation of Cholesterol in Egg Yolk by *Rhodococcus equi* No. 23, *Journal of Food Science*, 53, 659-660, **1988**.

- [63] Christodoulou, S., Hung, T. V., Trehwell, M. A., Black, R. G., Enzymatic Degradation of Egg Yolk Cholesterol, *Journal of Food Protection*, 57, 908-912, **1994**.
- [64] Del Valle, E. M. M., Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046, **2004**.
- [65] Zengin, A., Yildirim, E., Tamer, U., Caykara, T., Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol, *Analyst*, 138, 7238-7245, **2013**.
- [66] Gow-Chin, Y., Li-Ju, T., Cholesterol Removal from a Lard-water Mixture with β -Cyclodextrin, *Journal of Food Science*, 60, 561-564, **1995**.
- [67] Hardy, G., Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning, *Nutrition*, 16, 688-689, **2000**.
- [68] Kwak, N.-S., Jukes, D. J., Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept, *Food Control*, 12, 99-107, **2001**.
- [69] Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D., Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, *Curr Opin Biotechnol*, 16, 198-203, **2005**.
- [70] Goetzke, B., Nitzko, S., Spiller, A., Consumption of organic and functional food. A matter of well-being and health?, *Appetite*, 77, 94-103, **2014**.
- [71] Krystallis, A., Maglaras, G., Mamalis, S., Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods, *Food Quality and Preference*, 19, 525-538, **2008**.
- [72] Bigliardi, B., Galati, F., Innovation trends in the food industry: The case of functional foods, *Trends in Food Science & Technology*, 31, 118-129, **2013**.
- [73] Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A., Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review, *Appetite*, 51, 456-467, **2008**.
- [74] Otles, S., Cagindi, O., Safety Considerations of Nutraceuticals and Functional Foods, *Novel Technologies in Food Science: Their Impact on Products, Consumer Trends and the Environment*, (eds: McElhatton, A., do Amaral Sobral, P. J.), Springer New York, New York, NY, 121-136, **2012**.
- [75] Menrad, K., Market and marketing of functional food in Europe, *Journal of Food Engineering*, 56, 181-188, **2003**.
- [76] Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., Lundin, L., Incorporation of functional ingredients into foods, *Trends in Food Science & Technology*, 20, 388-395, **2009**.
- [77] Parada, J., Aguilera, J. M., Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients, *J Food Sci*, 72, R21-32, **2007**.
- [78] Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., Li, J., Molecular imprinting: Perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45, 2137-2211, **2016**.

- [79] Whitcombe, M. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004-2011, *J Mol Recognit*, 27, 297-401, **2014**.
- [80] Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, p.5908, **2011**.
- [81] Haupt, K., Linares, A. V., Bompert, M., Bui, B. T. S., Molecularly Imprinted Polymers, *Molecular Imprinting*, (eds: Haupt, K., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1-28, **2012**.
- [82] Yan, H., Row, K., Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7, p.155, **2006**.
- [83] Lofgreen, J. E., Ozin, G. A., Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol-gel silica, *Chem Soc Rev*, 43, 911-933, **2014**.
- [84] Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J., Whitcombe, M. J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J Mol Recognit*, 19, 106-180, **2006**.
- [85] Schirhagl, R., Bioapplications for Molecularly Imprinted Polymers, *Analytical Chemistry*, 86, 250-261, **2014**.
- [86] Chen, L., Xu, S., Li, J., Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chem Soc Rev*, 40, 2922-2942, **2011**.
- [87] Cai, D., Ren, L., Zhao, H., Xu, C., Zhang, L., Yu, Y., Wang, H., Lan, Y., Roberts, M. F., Chuang, J. H., Naughton, M. J., Ren, Z., Chiles, T. C., A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins, *Nat Nanotechnol*, 5, 597-601, **2010**.
- [88] Zhang, Z., Li, J., Song, X., Ma, J., Chen, L., Hg²⁺ ion-imprinted polymers sorbents based on dithizone-Hg²⁺ chelation for mercury speciation analysis in environmental and biological samples, *RSC Advances*, 4, 46444-46453, **2014**.
- [89] O., H., L., D. F., Selective Microorganism Detection with Cell Surface Imprinted Polymers, *Advanced Materials*, 13, 1480-1483, **2001**.
- [90] Zhang, Z., Li, M., Ren, J., Qu, X., Cell-imprinted antimicrobial bionanomaterials with tolerable toxic side effects, *Small*, 11, 1258-1264, **2015**.
- [91] Li, S., Cao, S., Whitcombe, M. J., Piletsky, S. A., Size matters: Challenges in imprinting macromolecules, *Progress in Polymer Science*, 39, 145-163, **2014**.
- [92] Zhang, W., He, X.-W., Chen, Y., Li, W.-Y., Zhang, Y.-K., Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2553-2558, **2011**.

- [93] Zhang, Y., Song, D., Lanni, L. M., Shimizu, K. D., Importance of Functional Monomer Dimerization in the Molecular Imprinting Process, *Macromolecules*, 43, 6284-6294, **2010**.
- [94] Golker, K., Karlsson, B. C. G., Olsson, G. D., Rosengren, A. M., Nicholls, I. A., Influence of Composition and Morphology on Template Recognition in Molecularly Imprinted Polymers, *Macromolecules*, 46, 1408-1414, **2013**.
- [95] Pinheiro, S. C., Descalzo, A. B., Raimundo, I. M., Jr., Orellana, G., Moreno-Bondi, M. C., Fluorescent ion-imprinted polymers for selective Cu(II) optosensing, *Anal Bioanal Chem*, 402, 3253-3260, **2012**.
- [96] Wagner, R., Wan, W., Biyikal, M., Benito-Peña, E., Moreno-Bondi, M. C., Lazraq, I., Rurack, K., Sellergren, B., Synthesis, Spectroscopic, and Analyte-Responsive Behavior of a Polymerizable Naphthalimide-Based Carboxylate Probe and Molecularly Imprinted Polymers Prepared Thereof, *The Journal of Organic Chemistry*, 78, 1377-1389, **2013**.
- [97] Banerjee, S., König, B., Molecular Imprinting of Luminescent Vesicles, *Journal of the American Chemical Society*, 135, 2967-2970, **2013**.
- [98] Gladis, J. M., Rao, T. P., Effect of Porogen Type on the Synthesis of Uranium Ion Imprinted Polymer Materials for the Preconcentration/Separation of Traces of Uranium, *Microchimica Acta*, 146, 251-258, **2004**.
- [99] Saloni, J., Walker, K., Hill, G., Theoretical Investigation on Monomer and Solvent Selection for Molecular Imprinting of Nitrocompounds, *The Journal of Physical Chemistry A*, 117, 1531-1534, **2013**.
- [100] Wang, B., Wang, Y., Yang, H., Wang, J., Deng, A., *Preparation and characterization of molecularly imprinted microspheres for selective extraction of trace melamine from milk samples* vol. 174, 2011.
- [101] Zhang, H., Dramou, P., He, H., Tan, S., Pham-Huy, C., Pan, H., Molecularly imprinted stationary phase prepared by reverse micro-emulsion polymerization for selective recognition of gatifloxacin in aqueous media, *J Chromatogr Sci*, 50, 499-508, **2012**.
- [102] Gun'ko, V. M., Savina, I. N., Mikhalevsky, S. V., Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation, *Advances in Colloid and Interface Science*, 187-188, 1-46, **2013**.
- [103] Wang, J., Wang, Q.-M., Tian, L.-L., Yang, C., Yu, S.-H., Yang, C., Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43, 1777-1784, **2015**.
- [104] Lan, H., Gan, N., Pan, D., Hu, F., Li, T., Long, N., Qiao, L., An automated solid-phase microextraction method based on magnetic molecularly imprinted polymer as fiber coating for detection of trace estrogens in milk powder, *Journal of Chromatography A*, 1331, 10-18, **2014**.
- [105] Hu, Y., Wang, Y., Chen, X., Hu, Y., Li, G., A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid

- chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples, *Talanta*, 80, 2099-2105, **2010**.
- [106] Tamahkar, E., Bereli, N., Say, R., Denizli, A., Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome c recognition, *Journal of Separation Science*, 34, 3433-3440, **2011**.
 - [107] Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *J Sep Sci*, 30, 1657-1671, **2007**.
 - [108] Mikhlovsky, S. V., Savina, I. N., Dainiak, M., Ivanov, A. E., Galaev, I. Y., 5.03 - Biomaterials/Cryogels, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, (eds: Moo-Young, M., Academic Press, Burlington, 11-22, **2011**.
 - [109] Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhlovsky, S., Galaev, I. Y., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303-309, **2005**.
 - [110] Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Noppe, W., Mattiasson, B., Cryogel applications in microbiology, *Trends in Microbiology*, 16, 543-551, **2008**.
 - [111] Dainiak, M. B., Galaev, I. Y., Kumar, A., Plieva, F. M., Mattiasson, B., Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 106, 101-127, **2007**.
 - [112] Xue, W., Champ, S., Huglin, M. B., Jones, T. G. J., Rapid swelling and deswelling in cryogels of crosslinked poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid), *European Polymer Journal*, 40, 467-476, **2004**.
 - [113] Asliyuce, S., Uzun, L., Yousefi Rad, A., Unal, S., Say, R., Denizli, A., Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 889-890, 95-102, **2012**.
 - [114] Le Noir, M., Plieva, F. M., Mattiasson, B., Removal of endocrine-disrupting compounds from water using macroporous molecularly imprinted cryogels in a moving-bed reactor, *Journal of Separation Science*, 32, 1471-1479, **2009**.
 - [115] Hajizadeh, S., Xu, C., Kirsebom, H., Ye, L., Mattiasson, B., Cryogelation of molecularly imprinted nanoparticles: A macroporous structure as affinity chromatography column for removal of β -blockers from complex samples, *Journal of Chromatography A*, 1274, 6-12, **2013**.
 - [116] Le Noir, M., Plieva, F., Hey, T., Guieysse, B., Mattiasson, B., Macroporous molecularly imprinted polymer/cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants, *Journal of Chromatography A*, 1154, 158-164, **2007**.
 - [117] Baggiani, C., Baravalle, P., Giovannoli, C., Anfossi, L., Giraudi, G., Molecularly imprinted polymer/cryogel composites for solid-phase extraction of bisphenol A from river water and wine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 815-822, **2010**.

- [118] Andac, M., Galaev, I. Y., Denizli, A., Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 259-265, **2013**.
- [119] Çavuş, A., Baysal, Z., Alkan, H., Preparation of poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogels containing l-histidine for insulin recognition, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 84-89, **2013**.
- [120] Ünlüer, Ö. B., Ersöz, A., Denizli, A., Demirel, R., Say, R., Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel, *Journal of Chromatography B*, 934, 46-52, **2013**.
- [121] Hajizadeh, S., Kirsebom, H., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Evaluation of selective composite cryogel for bromate removal from drinking water, *J Sep Sci*, 33, 1752-1759, **2010**.
- [122] Önnby, L., Pakade, V., Mattiasson, B., Kirsebom, H., Polymer composite adsorbents using particles of molecularly imprinted polymers or aluminium oxide nanoparticles for treatment of arsenic contaminated waters, *Water Research*, 46, 4111-4120, **2012**.
- [123] Wang, Y., Li, N., Molecular imprinting technology and its application, *Chemical Industry and Engineering Progress*, 29, 2315-2323, **2010**.
- [124] Bereli, N., Saylan, Y., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., l-Histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition, *Separation and Purification Technology*, 82, 28-35, **2011**.
- [125] Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I. Y., Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A*, 1190, 18-26, **2008**.
- [126] Baydemir, G., Andaç, M., Perçin, I., Derazshamshir, A., Denizli, A., Molecularly imprinted composite cryogels for hemoglobin depletion from human blood, *Journal of Molecular Recognition*, 27, 528-536, **2014**.
- [127] Ertürk, G., Bereli, N., Tümer, M. A., Say, R., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogels for human interferon-alpha purification from human gingival fibroblast culture, *Journal of Molecular Recognition*, 26, 633-642, **2013**.
- [128] Zhang, C., Jia, X., Wang, Y., Zhang, M., Yang, S., Guo, J., Thermosensitive molecularly imprinted hydrogel cross-linked with N-malely chitosan for the recognition and separation of BSA, *Journal of Separation Science*, 37, 419-426, **2014**.
- [129] Uygun, M., Karagözler, A. A., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogels for carbonic anhydrase purification from bovine erythrocyte, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 42, 128-137, **2014**.
- [130] Asliyuçe, S., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., Immunoglobulin G recognition with Fab fragments imprinted monolithic cryogels: Evaluation of the effects of metal-ion assisted-coordination of template molecule, *Reactive and Functional Polymers*, 73, 813-820, **2013**.

- [131] Bereli, N., Ertürk, G., Tümer, M. A., Say, R., Denizli, A., Oriented immobilized anti-hlgG via Fc fragment-imprinted PHEMA cryogel for IgG purification, *Biomedical Chromatography*, 27, 599-607, **2013**.
- [132] Rabieizadeh, M., Kashefimoftad, S. M., Naeimpoor, F., Monolithic molecularly imprinted cryogel for lysozyme recognition, *Journal of Separation Science*, 37, 2983-2990, **2014**.
- [133] Andac, M., Galaev, I. Y., Yavuz, H., Denizli, A., "Molecularly imprinted cryogels for human serum albumin depletion," in *Methods in Molecular Biology* vol. 1286, ed, 2015, pp. 233-237.
- [134] Huang, J. X., Hu, Y. L., Hu, Y. F., Li, G. K., *Chinese J. Anal. Chem.*, 40, 643-650, **2012**.
- [135] Fan, H., Sun, T., Dong, J., Tong, G., Sui, D., Ion imprinted polymer and its application in the analytical chemistry, *Chemistry Bulletin / Huaxue Tongbao*, 72, 10-14, **2009**.
- [136] Kumar, A., Rodríguez-Caballero, A., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Nandakumar, K. S., Kamihira, M., Holmdahl, R., Orfao, A., Mattiasson, B., Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: Effect of ligand coupling and matrix architecture, *Journal of Molecular Recognition*, 18, 84-93, **2005**.
- [137] Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 227-242, **1998**.
- [138] Orakdogan, N., Karacan, P., Okay, O., Macroporous, responsive DNA cryogel beads, *Reactive and Functional Polymers*, 71, 782-790, **2011**.
- [139] Tripathi, A., Kumar, A., Multi-Featured Macroporous Agarose-Alginate Cryogel: Synthesis and Characterization for Bioengineering Applications, *Macromolecular Bioscience*, 11, 22-35, **2011**.
- [140] Baroud, C. N., Gallaire, F., Dangla, R., Dynamics of microfluidic droplets, *Lab on a Chip*, 10, 2032-2045, **2010**.
- [141] Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A., Whitesides, G. M., Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - Scaling and mechanism of break-up, *Lab on a Chip*, 6, 437-446, **2006**.
- [142] Tan, J., Xu, J. H., Li, S. W., Luo, G. S., Drop dispenser in a cross-junction microfluidic device: Scaling and mechanism of break-up, *Chemical Engineering Journal*, 136, 306-311, **2008**.
- [143] Liu, C., Zhu, L., Lin, D., Yao, S., Preparation of chitosan-NaCS/TPP microcapsule with uniform size by microfluidic chip, *Huagong Xuebao/CIESC Journal*, 63, 216-222, **2012**.
- [144] Xu, L., Tan, X., Yun, J., Shen, S., Zhang, S., Tu, C., Zhao, W., Tian, B., Yang, G., Yao, K., Formulation of poorly water-soluble compound loaded solid lipid nanoparticles in a microchannel system fabricated by mechanical microcutting

- method: Puerarin as a model drug, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51, 11373-11380, **2012**.
- [145] Yun, J., Zhang, S., Shen, S., Chen, Z., Yao, K., Chen, J., Continuous production of solid lipid nanoparticles by liquid flow-focusing and gas displacing method in microchannels, *Chemical Engineering Science*, 64, 4115-4122, **2009**.
 - [146] Zhao, W., Zhang, S., Lu, M., Shen, S., Yun, J., Yao, K., Xu, L., Lin, D.-Q., Guan, Y.-X., Yao, S.-J., Immiscible liquid-liquid slug flow characteristics in the generation of aqueous drops within a rectangular microchannel for preparation of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) cryogel beads, *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 2182-2190, **2014**.
 - [147] Zhan, X. Y., Lu, D. P., Lin, D. Q., Yao, S. J., Preparation and characterization of supermacroporous polyacrylamide cryogel beads for biotechnological application, *Journal of Applied Polymer Science*, 130, 3082-3089, **2013**.
 - [148] Caktu, K., Baydemir, G., Ergun, B., Yavuz, H., Cholesterol removal from various samples by cholesterol-imprinted monosize microsphere-embedded cryogels, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 42, 365-375, **2014**.
 - [149] Guan, H. M., Tong, Y. J., Zheng, J. H., Li, X., Cholesterol-Imprinted Receptor Using Chitosan Derivative as the Precursor, *Advanced Materials Research*, 699, 712-717, **2013**.
 - [150] Li, X., Tong, Y., Jia, L., Guan, H., Fabrication of molecularly cholesterol-imprinted polymer particles based on chitin and their adsorption ability, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 146, 423-430, **2015**.
 - [151] Inanan, T., Tuzmen, N., Akgol, S., Denizli, A., Selective cholesterol adsorption by molecular imprinted polymeric nanospheres and application to GIMS, *Int J Biol Macromol*, 92, 451-460, **2016**.
 - [152] Tahir, M. N., Lee, Y., Immobilisation of β -cyclodextrin on glass: Characterisation and application for cholesterol reduction from milk, *Food Chemistry*, 139, 475-481, **2013**.
 - [153] Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochemical Engineering Journal*, 43, 272-279, **2009**.
 - [154] Osman, B., Uzun, L., Besirli, N., Denizli, A., Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33, 3609-3614, **2013**.
 - [155] Nezhadali, A., Mojarab, M., Fabrication of an electrochemical molecularly imprinted polymer triamterene sensor based on multivariate optimization using multi-walled carbon nanotubes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 744, 85-94, **2015**.
 - [156] Nezhadali, A., Es'haghi, Z., Khatibi, A.-D., Selective Extraction of Cholesterol from Dairy Samples Using a Polypyrrole Molecularly Imprinted Polymer and

- Determination by Gas Chromatography, *Food Analytical Methods*, 10, 1397-1407, **2017**.
- [157] Augustine, A., Mathew, B., Synthesis of Carbon Nanotube Incorporated Molecular Imprinted Polymer with Binding Affinity towards Testosterone, *ISRN Polymer Science*, 2014, p.7, **2014**.
- [158] Alahmadi, S., Mohamad, S., Maah, M. J., Comparative study of tributyltin adsorption onto mesoporous silica functionalized with calix[4]arene, p-tert-butylcalix[4]arene and p-sulfonatocalix[4]arene, *Molecules*, 19, 4524-4547, **2014**.
- [159] Jossens, L., Prausnitz, J. M., Fritz, W., Schlünder, E. U., Myers, A. L., Thermodynamics of multi-solute adsorption from dilute aqueous solutions, *Chemical Engineering Science*, 33, 1097-1106, **1978**.
- [160] Ayawei, N., Ebelegi, A. N., Wankasi, D., Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms, *Journal of Chemistry*, 2017, p.11, **2017**.
- [161] Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Chen, Y., Shah, R. N., Shimizu, K. D., Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm, *Analytical Chemistry*, 73, 4584-4591, **2001**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Fatma KARTAL ERSOY

Doğum Yeri: Muğla

Medeni Hali: Evli

E-posta: fatmakartal@yandex.com

Adresi: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

Eğitim

Lisans: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi

Doktora: Hacettepe Üniversitesi

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, ileri seviye

İş Deneyimi

2017- Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

2011-2017 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

2010-2011 Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

2009-2010 Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Deneyim Alanları

Moleküler Baskılama Teknolojisi, Protein Saflaştırma, Biyoafinite Kromatografisi, Biyomalzemeler, Polimer Teknolojisi, Biyoteknoloji, Sensör Uygulamaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

~~YÜKSEK LİSANS~~/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:14/08/2018

Tez Başlığı / Konusu: **Gıdalardan Kolesterolün Uzaklaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Mikroküreler**

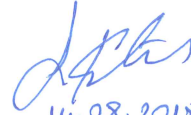
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 94 sayfalık kısmına ilişkin, 14/08/2018 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden 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.


14.08.2018
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Fatma KARTAL ERSOY

Öğrenci No: N13149680

Anabilim Dalı: KİMYA

Programı: DOKTORA

Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)