

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**LİZOZİM ADSORPSİYONU İÇİN YENİ NESİL KRİYOJELLERİN
SENTEZİ**

Hande EFE

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nesibe AVCIBAŞI

İkinci Danışman : Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi:30.11.2015

Bornova-İZMİR

2015

Sayın Hande EFE tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Lizozim Adsorpsiyonu İçin Yeni Nesil Kriyojellerin Sentezi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30.11.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Nesibe AVCIBAŞI	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Sinan AKGÖL	
Üye	:Prof. Dr. Nalan TÜZMEN	
Üye	: Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL	
Üye	: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Lizozim Adsorpsiyonu İçin Yeni Nesil Kriyojellerin Sentezi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması halinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30/11/2015

ÖZET

**LİZOZİM ADSORPSİYONU İÇİN YENİ NESİL KRİYOJELLERİN
SENTEZİ**

EFE, Hande

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nesibe AVCIBAŞI, II. Danışman: Prof. Dr. Sinan
AKGÖL

Kasım 2015, 105 sayfa

Bu çalışma, organik dialdehit monomer sentezi ve bunların kopolimer olarak kullanıldığı kriyojel formundaki polimerlerin sentezi olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Tezin ilk kısmında, monomerlerin sentezi ve bu monomerlerin spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatıldı. Tezin ikinci kısmında, bu monomerler kullanılarak sentezlenen kopolimerik kriyojellerin yapı ve karakterizasyon analizleri yapıldı. Ayrıca, karakterize edilen kriyojeller lizozim saflaştırılmasında kullanılarak biyoteknolojik uygulaması yapıldı. Adsorpsiyon deneyleri, farklı ortam koşullarında (pH, başlangıç derişimleri, sıcaklık, iyon şiddeti) kesikli deney sisteminde incelendi. Son olarak adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlandı ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmeden lizozim saflaştırılmasında kullanılabilir olduğu gözlemlendi.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Dialdehit Monomer, Kriyojel, Lizozim, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi.

ABSTRACT

**SYNTHESIS OF NEW GENERATION CRYOGELS FOR
LYSOZYME ADSORPTION**

EFE, Hande

Master of Science Thesis, Biomedical technologies Department

Supervisor: Prof. Dr. Nesibe AVCIBAŞI,

Co-supervisor: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

November 2015, 105 pages

This study was developed as two sections; organic dialdehyde monomer synthesis and synthesis of cryogel formed polymers. In first section, the monomers were synthesized and characterised by using spectroscopic methods. In second section, the copolymeric cryogels structure analysis and characterisation were done for synthesized monomers. Additionally, the cryogels were used for the lysozyme purification as biotechnological application. The adsorption experiments were set under different environmental conditions (pH, initial concentration, temperature, ionic strength) in discrete system. Finally, we repeated adsorption-desorption cycle for 5 times and it was observed that the cryogels can be used without significant loss in lysozyme adsorption capacity.

KEY WORDS: Dialdehyde monomer, Cryogel, Hydrophobic Interaction Chromatography.

TEŞEKKÜR

Bu tezin başlangıcından sonuçlanmasına kadar bilgisini, tecrübesini, desteğini ve değerli zamanını benden esirgemeyen, başarılarından feyz aldığım danışman hocam Prof. Dr. Nesibe AVCIBAŞI'na,

Laboratuar imkanlarından faydalanmamı sağlayan, BİOREGE ekibi ile çalışma fırsatı sunan, bilgileriyle bana yol gösteren ikinci danışman hocam Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e,

Çalışmamda tecrübelerinden faydalandığım hocam Doç. Dr. Murat UYGUN'a,

Çalışmalarım boyunca huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan ve her birinin değerli çalışmalara imza atmaya devam edeceğine yürekten inandığım, çok sevdiğim BİOREGE ekibi'ne,

Kriyojellere alışma sürecimde her an imdadıma koşan, sabırla yardımlarını benden esirgemeyen doktora öğrencisi Canan ALTUNBAŞ'a,

Tezimin yazımı esnasında yazımlarına ve çizimlerine yardımcı olan canım arkadaşlarım Gözde ADAR ve Hafize ÖZCAN'a,

Benden maddi manevi desteğini esirgemeyen, uzakta olsak da her zaman yanımda olduklarını hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

HANDE EFE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXIV
SİMGELER VE KISALTMALAR dİZİNİ	XXV
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Aldehitler	1
1.1.1 Aldehitlerin fiziksel özellikleri	1
1.1.2 Aldehitlerin sentezleri	2
1.1.3 Aldehitlerin tepkimeleri.....	7
1.1.4 Aldehitlerin spektroskopik özellikleri	21
1.2 Dialdehitler	23
1.3 Polimerler ve Polimer Formları	23
1.4 Ayırmada Kullanılan Polimerler.....	24
1.4.1 Kriyojeller.....	24
1.5 Afinite Etkileşimleri	27

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.6 Biyoafinite teknolojisi.....	27
1.6.1 Biyoafinite kromatografisi	27
1.6.2 Matriks seçimi	30
1.6.3 Afinite ligandının seçimi.....	31
1.6.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi.....	32
1.7 Lizozim	41
1.7.1 Lizozim hakkında genel bilgiler	41
1.7.2 Lizozimin yapısı.....	41
1.7.3 Lizozimin katalitik mekanizması	43
1.7.4 Lizozim için önerilen Philips mekanizması	44
1.7.5 Lizozim saflaştırılması ve önemi	46
2 KAYNAK ÖZETLERİ	48
2.1 Dialdehitler ile İlgili Kaynak Özetleri.....	48
2.2 Kriyojeller ile İlgili Kaynak Özetleri	49
3 MATERYAL VE METOT.....	51
3.1 Kimyasal Maddeler	51

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2 Deneysel Çalışmalar	52
3.2.1 Dialdehit monomer sentezi	53
3.2.2 Dialdehit monomerlerin saflık kontrolü.....	55
3.2.3 Dialdehit monomerlerin karakterizasyonu.....	55
3.2.4 Dialdehit monomerler ile polimerik kriyojellerin hazırlanması	55
3.2.5 Sentezlenen polimerik kriyojellerin karakterizasyonu	61
3.2.6 Lizozim adsorpsiyon çalışmaları	62
3.2.7 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik.....	63
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	64
4.1 Monomerlerin Saflık Kontrolü	64
4.1.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)	64
4.1.2 Erime noktası tayini.....	64
4.2 Monomerlerin Karakterizasyonu.....	65
4.2.1 FTIR spektrumları.....	65
4.2.2 ¹ H NMR spektrumları.....	70

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4. 3 Kriyojellerin Karakterizasyonları.....	76
4.3.1 FTIR çalışmaları.....	76
4.3.2 Yüzey morfolojisi.....	80
4.3.3 Kriyojellerin şişme testi	84
4.4 Sulu Çözeltilerden Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları	85
4.4.1 pH etkisi	85
4.4.2 Lizozim başlangıç derişiminin etkisi	86
4.4.3 Sıcaklık etkisi.....	86
4.4.4 İyon şiddetinin etkisi.....	87
4.4.5 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik.....	89
5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR DİZİNİ	95
ÖZGEÇMİŞ	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Bütan ve propanalin kaynama noktaları	1
1.2 Bazı doğal kaynaklardan elde edilen hoş kokulu aldehytler	2
1.3 Aldehytlerin yükseltgenmesi	3
1.4 Aldehytlerin indirgenmesi	3
1.5 LiAlH_4 ve DIBAL-H reaktiflerinin asit türevlerinden aldehyt sentezinde kullanılışı	4
1.6 Açıl klorürün indirgenmesiyle aldehyt eldesi	4
1.7 Açıl klorürün aldehyte indirgenme tepkimesinin mekanizması	5
1.8 Esterin aldehyte indirgenme tepkimesinin mekanizması	6
1.9 Nitrilin aldehyte indirgenme tepkimesinin mekanizması	6
1.10 Karbon-oksijen ikili bağına nükleofilik katılma tepkimesi	7
1.11 Kuvvetli bir nükleofilin aldehyte katılma tepkimesinin mekanizması	8
1.12 Bir aldehyte asit katalizli nükleofilik katılma tepkimesinin mekanizması	9
1.13 Aldehytten yarı asetal oluşumu tepkimesi için mekanizma	10
1.14 Hidrat oluşumu tepkimesi için mekanizma	10

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.15 İkiz diollerden karbonil bileşiği oluşumu.....	11
1.16 Kloral hidrat formülü.....	11
1.17 Asit katalizli asetal oluşumu tepkimesinin mekanizması.....	12
1.18 Asetalin hidrolizi.....	13
1.19 Aldehitten tiyoasetal oluşumu.....	13
1.20 Tiyoasetalin Raney nikeli ile tepkimesi.....	14
1.21 İmin oluşumu tepkimesinin mekanizması.....	15
1.22 Aldehitler ve ketonların Wolff-Kishner indirgemesi.....	17
1.23 Aldehit ve ketonlardan, siyanohidrin oluşumunun genel tepkimesi.....	17
1.24 Siyanohidrin oluşum tepkimesinin mekanizması.....	18
1.25 Wittig tepkimesi.....	19
1.26 Wittig tepkimesinin mekanizması.....	19
1.27 Reformatsky tepkimesinin mekanizması.....	20
1.28 Aldehitlerin yükseltgenmesinin genel tepkimesi.....	20
1.29 Feniletanalın infrared spektrumu.....	21

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)ŞekilSayfa

1.30 Feniletanalın 300 MHz ^1H NMR spektrumu (Aldehit ve metilen protonları arasındaki küçük eşleşme (2,6 Hz) genişletilmiş olarak ayrıca gösterilmiştir.)..	23
1.31 a) Kriyojel kromatografi kolonu b) Kuru ve şişmiş formdaki kriyojellerin fiziksel biçimi c) Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) iki farklı büyütmede (x160 ve x795) kriyojel görüntüleri.....	25
1.32 Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	29
1.33 Biyoafinite kromatografisinin dalları.....	30
1.34 Proteinlerdeki hidrofobik bölgelerin agregat oluşu.....	33
1.35 Tuz destekli adsorpsiyon.....	33
1.36 Proteinin liganda bağlanması.....	34
1.37 Bağlı proteinin ligandan ayrılması.....	34
1.38 HIC’de kullanılan tipik ligandlar.....	36
1.39 Çapraz bağlı monosakkarit birimlerine eter bağıyla bağlanmış HIC ligandları.....	38
1.40 Hofmeister serileri, salting-out ve salting-in etkiler.....	39
1.41 Lizozimin (NAM) ile (NAG) arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağına hidrolizlemesinin şematik gösterimi.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.42 Lizozimin substrat bağlama bölgesinin şematik gösterimi.....	42
1.43 Lizozim reaksiyonu için Philips mekanizması.....	45
3.1 Poli(HEMA) kriyojelin molekül formülü (Bileşik VII).....	56
3.2 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP)'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik I-A).....	56
3.3 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH)'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik II-B).....	57
3.4 Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP)'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik III-C).....	57
3.5 Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH)'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik IV-D).....	58
3.6 Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP)'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik V-E).....	58
3.7 Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH)'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik VI-F).....	59
3.8 Polimerik kriyojellerin sentez şeması.....	60
3.9 Kriyojellerin sentez şeması.....	61
3.10 Kuru ve şişmiş kriyojellerin görüntüsü.....	62
4.1 <i>p</i> -DFDFP bileşiğinin FTIR spektrumu.....	67
4.2 <i>p</i> -DFDFH bileşiğinin FTIR spektrumu.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 <i>o</i> -DFDFP bileşiğinin FTIR spektrumu.....	68
4.4 <i>o</i> -DFDFH bileşiğinin FTIR spektrumu.....	68
4.5 <i>m</i> -DFDFP bileşiğinin FTIR spektrumu.....	69
4.6 <i>m</i> -DFDFH bileşiğinin FTIR spektrumu.....	69
4.7 <i>p</i> -DFDFP bileşiğinin NMR Spektrumu.....	70
4.8 <i>p</i> -DFDFH bileşiğinin NMR Spektrumu.....	71
4.9 <i>o</i> -DFDFP bileşiğinin NMR Spektrumu.....	72
4.10 <i>o</i> -DFDFH bileşiğinin NMR Spektrumu.....	73
4.11 <i>m</i> -DFDFP bileşiğinin NMR Spektrumu.....	74
4.12 <i>m</i> -DFDFH bileşiğinin NMR Spektrumu.....	75
4.13 Poli(HEMA) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	76
4.14 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	76
4.15 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	78
4.16 Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	79
4.18 Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	79
4.19 Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH) kriyojelinin FTIR spektrumu.....	80
4.20 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP) kriyojelin SEM görüntüsü.....	81
4.21 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP) kriyojelin SEM görüntüsü.....	81
4.22 Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH) kriyojelin SEM görüntüsü.....	82
4.23 Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP) kriyojelin SEM görüntüsü.....	82
4.24 Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH) kriyojelin SEM görüntüsü.....	83
4.25 Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP) kriyojelin SEM görüntüsü.....	83
4.26 Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH) kriyojelin SEM görüntüsü.....	84
4.27 Kriyojellerin şişme testi.....	84
4.28 Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi.....	85
4.29 Lizozim adsorpsiyonu üzerine başlangıç derişiminin etkisi.....	86
4.30 Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi.....	87

4.31 Lizozim adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi.....	88
4.32 Lizozim adsorpsiyonunun tekrarlanabilirlik grafiğı.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİÇizelgeSayfa

1.1 Bazı aldehitlerin fiziksel özellikleri	2
1.2 Aldehitlerin karbonil (C=O) gerilme frekansları	20
1.3 Biyoafinite kromatografisi için bazı katı destek türleri	30
3.1 Monomer sentezinde kullanılan başlangıç maddeleri	53
4.1 Dialdehit monomerlerin erime noktaları	65
4.2 Monomerlerin FTIR spektrumu bulguları	66
4.3 Polimerik kriyojellerin FTIR spektrumları	76
4.4 Polimerik kriyojellerin SEM görüntülerinde kullanılan büyütme	81
4.5 0,5 mg/g derişimde, oda sıcaklığında pH: 9 fosfat tamponunda, lizozim adsorpsiyon bulguları	89
4.6 Kriyojellerin desorpsiyon yüzdeleri	90

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Asp	Aspartik asit
bs	Broad singlet
dd	Double doublet
DIBAL-H	Diizobütilalüminyum hidrit
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
EC	Enzim kodu
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
Glu	Glutamik asit
HEMA	2-hidroksietilmetakrilat
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
His	Histidin
IgG	Immunoglobulin G
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LAH	Lityum alüminyum hidrür

KISALTMALAR DİZİNİ(devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Lys	Lizin
MBSA	<i>N,N'</i> -metilen bisakrilamit
<i>m</i> -DFDFH	3,3'-diformal-1,6-difenoksihekzan (Bileşik VI)
<i>m</i> -DFDFP	3,3'-diformal-1,5-difenoksipentan (Bileşik V)
Met	Metiyonin
NAG	<i>N</i> -asetilglukozamin
NAM	<i>N</i> -asetilmuramik asit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
<i>o</i> -DFDFH	1,1'-diformal-1,6-difenoksihekzan (Bileşik IV)
<i>o</i> -DFDFP	1,1'-diformal-1,5-difenoksipentan (Bileşik III)
poli(AAm-AGE)	poli(akrilamid-allil glisidil eter)
<i>p</i> -DFDFH	4,4'-diformal-1,6-difenoksihekzan (Bileşik II)
<i>p</i> -DFDFP	4,4'-diformal-1,5-difenoksipentan (Bileşik I)

KISALTMALAR DİZİNİ(devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-3,3'-diformal-1,6-difenoksihekzan) (Bileşik VI-F)
poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-3,3'-diformal-1,5-difenoksipentan) (Bileşik V-E)
poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-1,1'-diformal-1,6-difenoksihekzan) (Bileşik IV-D)
poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-1,1'-diformal-1,5-difenoksipentan) (Bileşik III-C)
poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-4,4'-diformal-1,6-difenoksihekzan) (Bileşik II-B)
poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-4,4'-diformal-1,5-difenoksipentan) (Bileşik I-A)
s	Singlet
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
PCC	Piridinyum klorokromat
PVA	Polivinil alkol
t	Triplet

Tyr

Tirozin

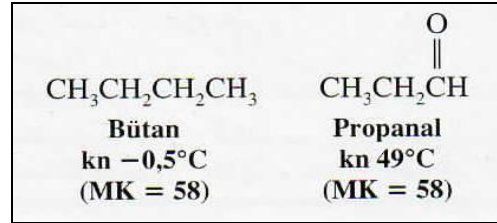
1 GİRİŞ

1.1 Aldehitler

Aldehitler, karbonil grubu taşıyan pek çok organik bileşik sınıfından birisidir. Aldehitler, karbonil grubuna en az bir hidrojen atomu bağlı oluşuyla ketonlardan ayrılırlar. Aldehitler canlı sistemlerde yaygın olarak bulunurlar. Aldehitler, diğer organik bileşiklerin eldesinde başlangıç maddesi olarak sıklıkla olarak kullanılırlar. (Atkins ve Carey, 1997, Fessenden et al, 2001)

1.1.1 Aldehitlerin fiziksel özellikleri

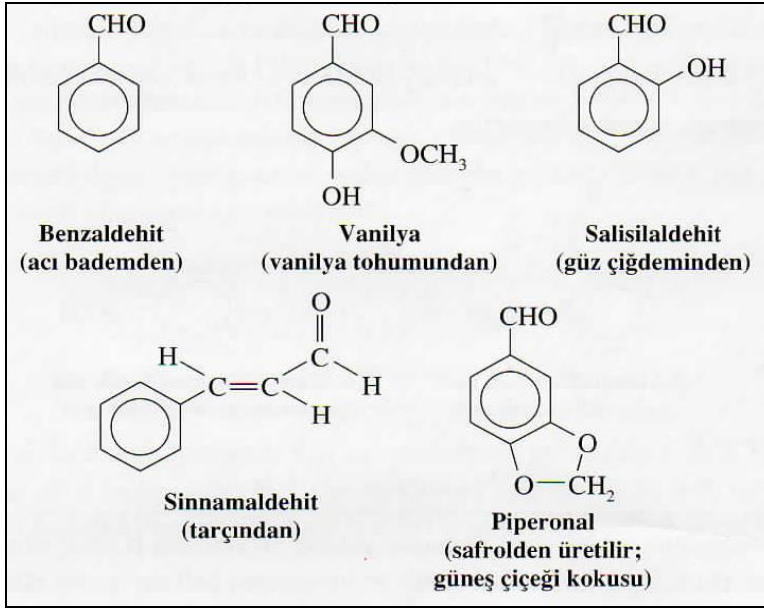
Karbonil grubu polar bir gruptur, bu sebeple aldehitler aynı molekül kütleli hidrokarbonlardan daha yüksek kaynama noktasına sahiptir. Bunun yanı sıra aldehitler, molekülleri arasında kuvvetli hidrojen bağları oluşturamadıkları için, karşılık gelen alkollerden daha düşük kaynama noktasına sahiptirler (Şekil 1.1) (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.1 Bütan ve propanalin kaynama noktaları (Solomons ve Fryhle, 2000)

Karbonilin oksijen atomu, aldehitlerin su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturmasını olanak sağladığı için düşük molekül kütleli aldehitler suda çözünürlük gösterirler.

Doğal kaynaklardan elde edilen aldehitlerin bazıları çok hoş, güzel kokulara sahiptirler (Şekil 1.2) (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.2 Bazı doğal kaynaklardan elde edilen hoş kokulu aldehitler (Solomons ve Fryhle, 2000)

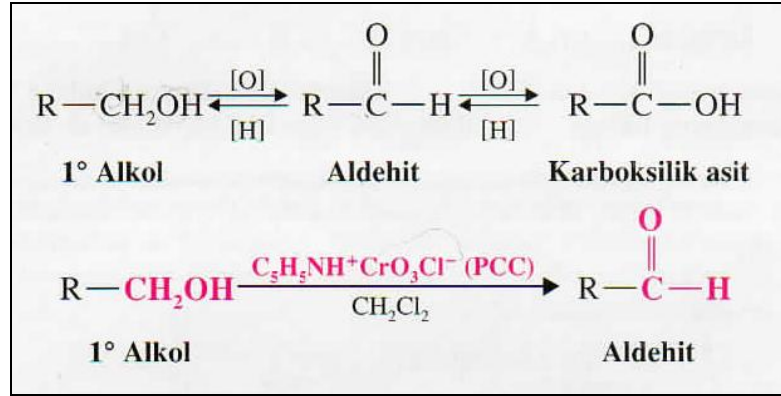
Çizelge 1.1 Bazı aldehitlerin fiziksel özellikleri (Solomons ve Fryhle, 2000)

Formül	Adı	e.n (°C)	k.n (°C)	Sudaki Çözünürlülüğü
HCHO	Formaldehit	-92	- 21	Çok çözünür
CH ₃ CHO	Asetaldehit	-125	21	∞
CH ₃ CH ₂ CHO	Propanal	-81	49	Çok çözünür
CH ₃ (CH ₂) ₂ CHO	Bütanal	-99	76	Çözünür
CH ₃ (CH ₂) ₃ CHO	Pentanal	-91,5	102	Az çözünür
CH ₃ (CH ₂) ₄ CHO	Heksanal	-51	131	Az çözünür
C ₆ H ₅ CHO	Benzaldehit	-26	178	Az çözünür
C ₆ H ₅ CH ₂ CHO	Fenilasetaldehit	33	193	Az çözünür

1.1.2 Aldehitlerin sentezleri

1.1.2.1 1° Alkollerin yükseltgenmesiyle aldehitler

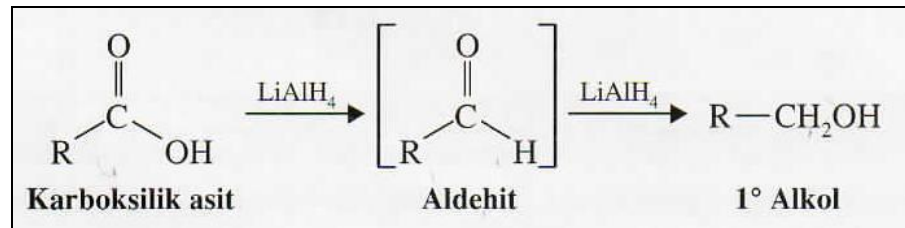
Aldehitlerin yükseltgenme basamakları 1° alkollerle karboksilik asitler arasında yer alır ve aldehitler, 1° alkollerin piridinyum klorokromat (PCC) ile yükseltgenmesinden elde edilebilir. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.3 Aldehitlerin yükseltgenmesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.2.2 Açıl klorürler, esterler ve nitrillerin indirgenmesiyle aldehitler

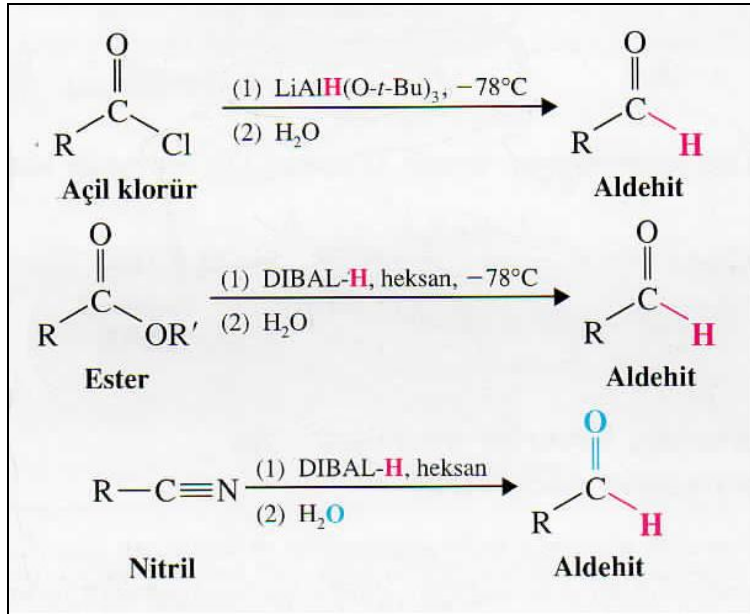
Teorik olarak, karboksilik asitlerin indirgenmesiyle aldehitler elde edilebilir. Fakat uygulamada bu mümkün değildir. Bunun sebebi, karboksilik asidi indirgemek için kullanılan reaktif lityum alüminyum hidrürdür ($LiAlH_4$ veya LAH) ve bir karboksilik asit LAH ile etkileştirildiğinde 1° alkole kadar indirgenir. Bu, LAH çok güçlü bir indirgeme reaktifi olduğu için ve aldehitler kolay indirgeniğinden gerçekleşir. Tepkime karışımında bulunan herhangi bir aldehit, anında LAH tarafından 1° alkole indirgenir (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.4 Aldehitlerin indirgenmesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

Burada önemli olan, karboksilik asidin kendini kullanmamak, bunun yerine daha kolay indirgenen bir karboksilik asit türevini ve LAH'den daha az etkin olan bir alüminyum hidrür türevini kullanmaktır. Fakat burada açıl klorürlerin ($RCOCl$), esterlerin (RCO_2R) ve nitrillerin (RCN) hepsinin karboksilik asitlerden kolayca hazırlandığını ve bunların hepsinin daha kolay indirgeniğini söylemek

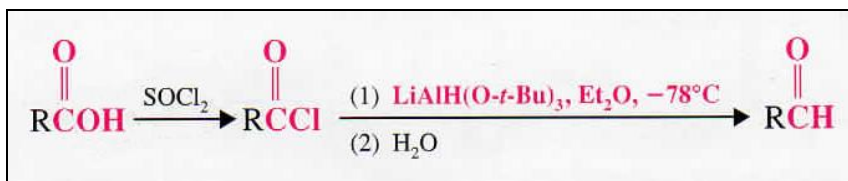
yeterlidir (açıl klorürler, esterler ve nitriller karboksilik asitlerle aynı yükseltgenme basamağına sahiptir.). LAH'den daha az etkili olan alüminyum hidrür türevi de lityum-tri-*ter*-bütoksi alüminyum hidrürdür (DIBAL-H) (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.5 LiAlH_4 ve DIBAL-H reaktiflerinin asit türevlerinden aldehit sentezinde kullanılışı (Solomons ve Fryhle, 2000)

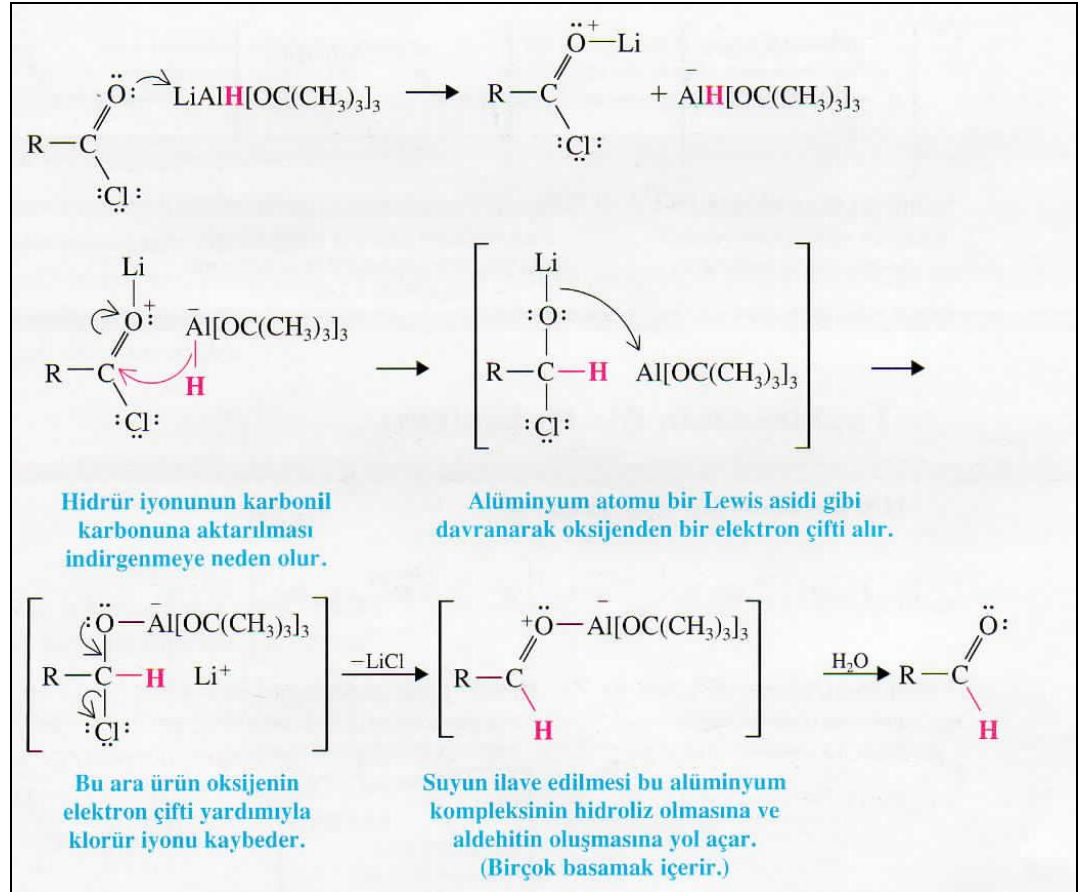
1.1.2.2.1 Açıl klorürlerden aldehitler

Açıl klorürler, lityum tri-*ter*-bütoksialüminyum hidrürü, $\text{LiAlH}[\text{OC}(\text{CH}_3)_3]_3$, ile -78°C 'da etkileştirilerek aldehitlere indirgenebilirler. (Karboksilik asitler, açıl klorürlere SOCl_2 kullanılarak dönüştürülebilirler.) (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.6 Açıl klorürün indirgenmesiyle aldehit eldesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

Mekanizma açısından indirgeme, açıl klorürün karbonil karbonuna alüminyum atomundan bir hidrür iyonunun aktarılmasıyla meydana gelir. Daha sonraki hidroliz, aldehiti açığa çıkarır (Solomons ve Fryhle, 2000).



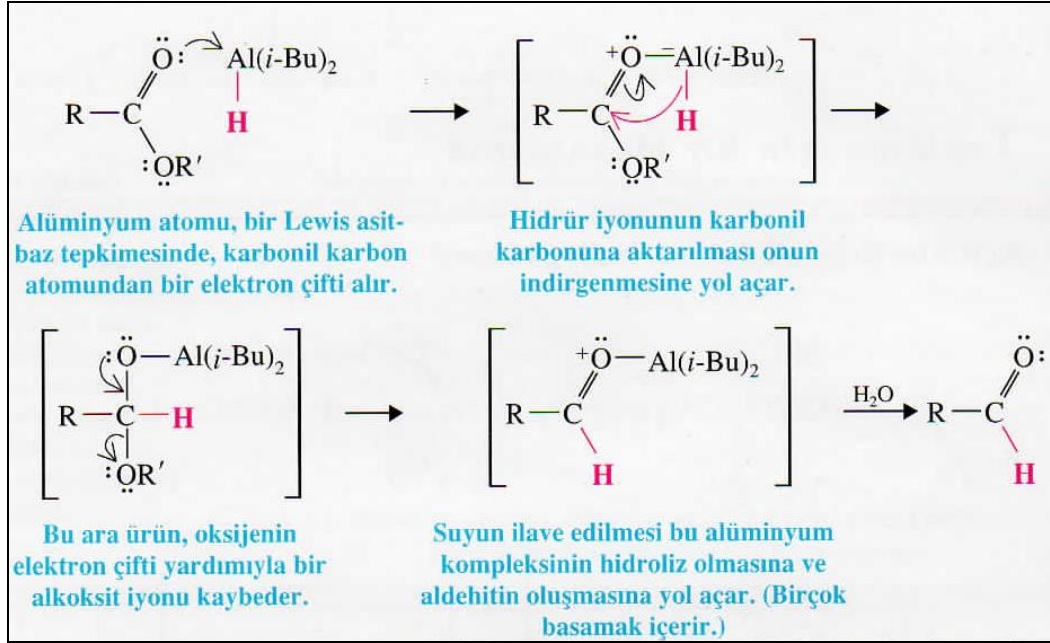
Şekil 1.7 Açıl klorürün aldehite indirgenme tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.2.2.2 Esterler ve nitrillerden aldehitler

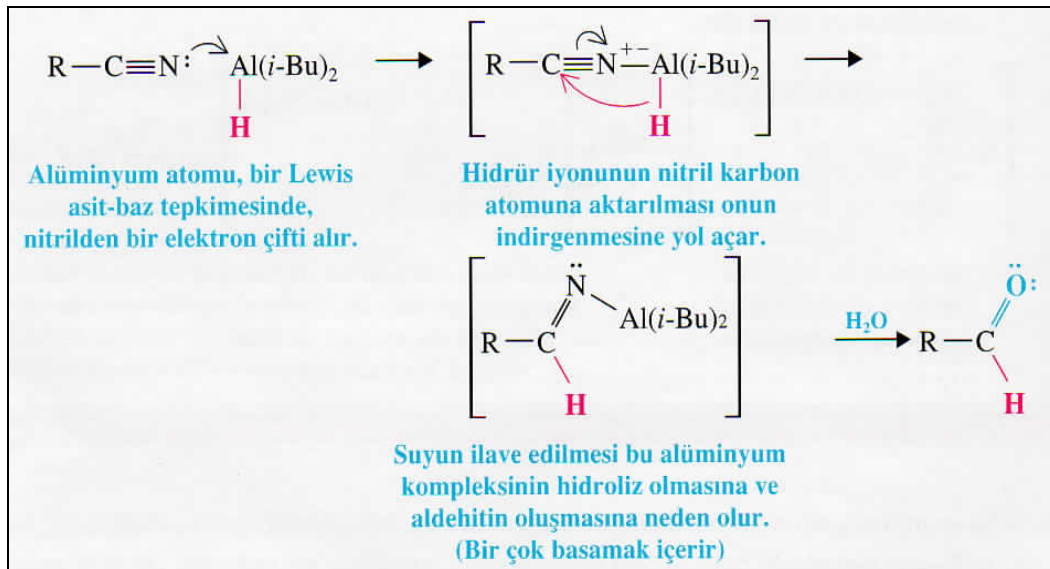
Esterler ve nitriller DIBAL-H kullanılarak aldehitlere indirgenebilirler. Daha ileri indirgemeyi engellemek için reaktifin dikkatlice kontrol edilen miktarları kullanılmalı, yanı sıra ester indirgenmesi düşük sıcaklıklarda yürütülmelidir.

Her iki indirgeme de esterin karbonil karbonuna veya nitrilin -C≡N grubunun karbonuna hidrür iyonunun katılmasıyla oluşan nispeten kararlı bir ara

ürünle sonuçlanmaktadır. Ara ürünün hidrolizinin ise aldehiti açığa çıkardığı bilinmektedir. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.8 Esterin aldehite indirgenme tepkimesinin mekanizması(Solomons ve Fryhle, 2000)

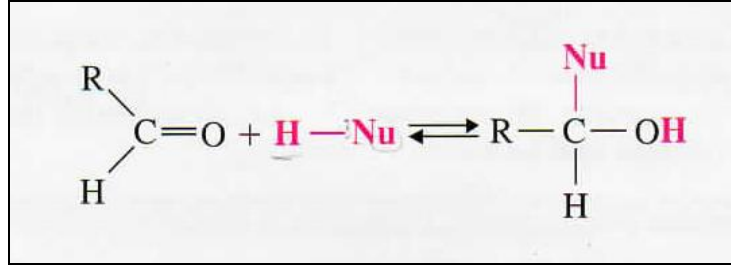


Şekil 1.9 Nitrilin aldehite indirgenme tepkimesinin mekanizması(Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3 Aldehitlerin tepkimeleri

1.1.3.1 Karbon-oksijen ikili bağına nükleofilik katılma

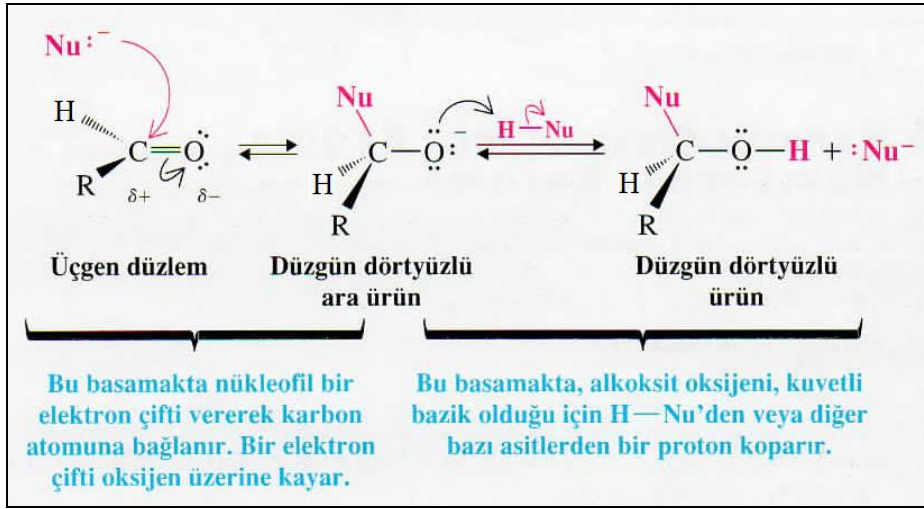
Karbon-oksijen ikili bağına nükleofilik katılma, aldehitlerin en karakteristik tepkimesi olarak bilinir. (Şekil 1.10) (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.10 Karbon-oksijen ikili bağına nükleofilik katılma tepkimesi(Solomons ve Fryhle, 2000)

Aldehitler, yapısal özelliklerinden dolayı nükleofilik katılmaya yatkındır. Karbonil katyonu etrafındaki grupların üçgen düzlem düzenlenmesi, karbonil karbonunun, alttan veya üstten olabilecek bir atağa nispeten daha açık olmasını sağlar. Karbonilin karbon atomundaki pozitif yük onun özellikle bir nükleofilin atağına karşı duyarlı hale getirir. Karbonil oksijen atomundaki negatif yük ise nükleofilik katılmanın asit katalizlere daha yatkın hale getirir. Bu yüzden karbon-oksijen ikili bağına nükleofilik katılma iki genel yoldan birine göre gerçekleşir. (Solomons ve Fryhle, 2000).

1) Reaktif kuvvetli nükleofil (Nu) olduğunda, katılma, üçgen düzlemsel aldehiti düzgün dörtyüzlü ürüne dönüştürerek şekil 1.25 'deki yolla gerçekleşir.

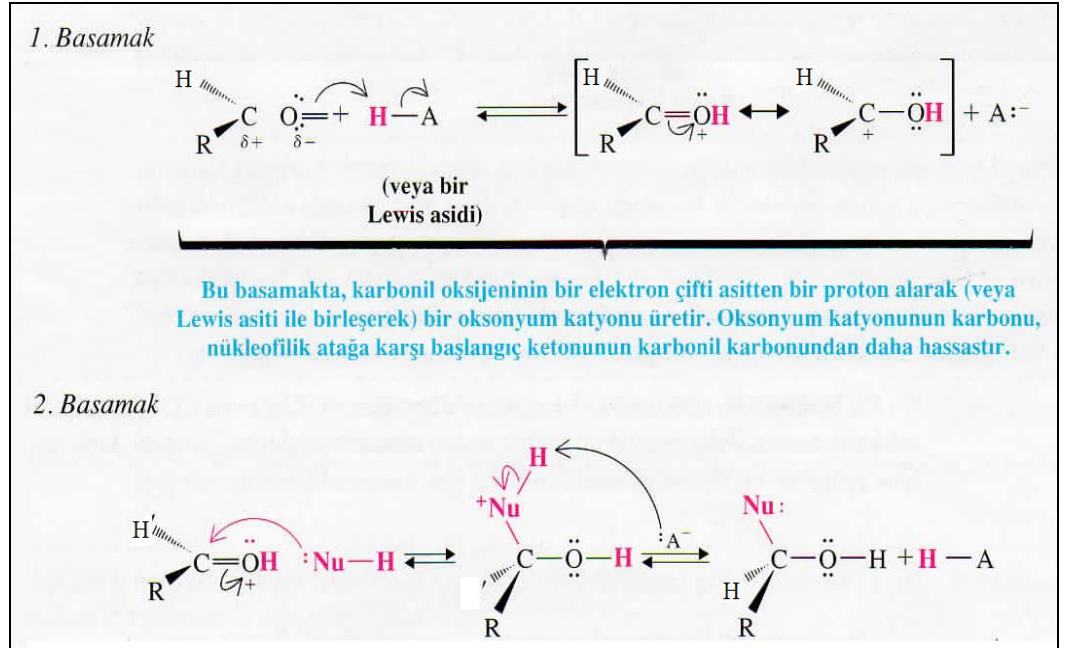


Şekil 1.11 Kuvvetli bir nükleofilin aldehite katılma tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

Böyle katılmalarda nükleofil, elektron çiftlerini, karbonilin karbon atomuna bir bağ oluşturmak için kullanır. Bu sırada, karbon-oksijen π bağındaki elektron çifti karbonil oksijenine kayar ve karbonun melezleşme şekli sp^2 'den sp^3 'e değişir. Bu basamağın en önemli yönünün, karbonil oksijen atomunun karbon oksijen ikili bağının elektron çiftini üzerine alabilme yeteneği olduğu bilinmektedir.

İkinci basamakta oksijen atomu bir proton alır. Bu, oksijen atomunun daha bazık olmasından; tam bir negatif yük taşımasından ve bir alkoksit iyonu olmasından dolayı meydana gelir.

2) Karbon-oksijen ikiliği bağına nükleofilik katılmaları yürüten ikinci mekanizma asit katalizli bir mekanizmadır. (Solomons ve Fryhle, 2000)



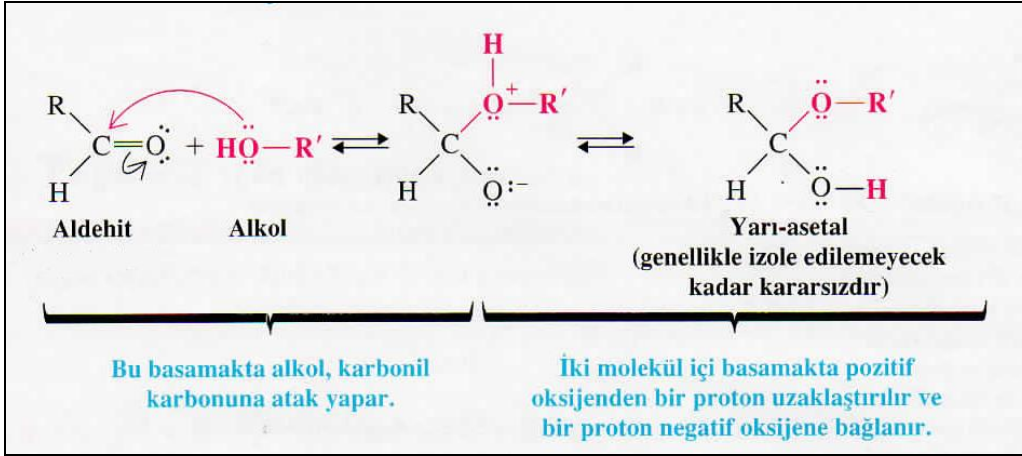
Şekil 1.12 Bir aldehite asit katalizli nükleofilik katılma tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

Bu mekanizma, karbonil bileşiği zayıf nükleofiller varlığında kuvvetli asitlerle etkileştirildiğinde işlemeye başlar. İlk basamakta bu asit, karbonil oksijen atomunun bir elektron çiftine proton verir ve oluşan protonlanmış karbonil bileşiği, yani oksonyum katyonu, karbonil karbon atomunun protonlanmamış bileşikteki göre daha fazla pozitif yük taşıması sebebiyle, karbonil karbonu üzerinden nükleofilin atağına karşı oldukça etkindir (Solomons ve Fryhle, 2000).

1.1.3.2 Alkollerin katılması

1.1.3.2.1 Yarı-asetaller

Aldehitlerin bir alkolde çözülmesi bu iki bileşik arasında yavaş bir dengenin kurulmasına ve yarı-asetal adı verilen yeni bir bileşiğin oluşmasına olanak sağlar. Yarı-asetaller, aldehitin karbonil karbonuna alkol oksijeninin nükleofilik katılmasının sonucu oluşan bileşiklerdir. (Solomons ve Fryhle, 2000)

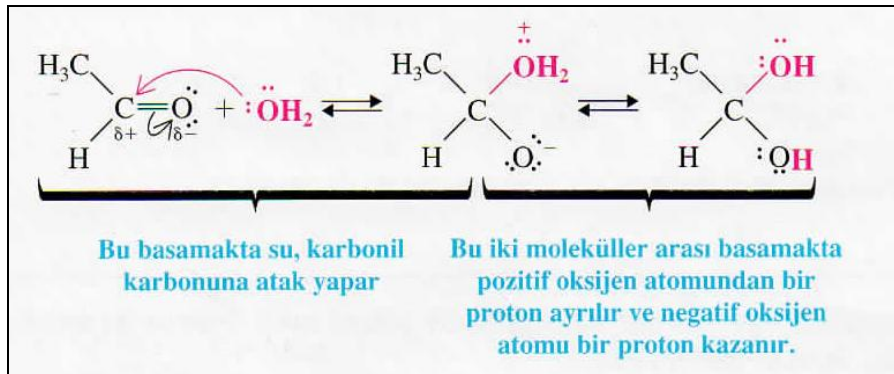


Şekil 1.13 Aldehitten yarı asetal oluşumu tepkimesi için mekanizma(Solomons ve Fryhle, 2000)

Bir yarı asetalin kendine has yapısal özelliği $-\text{OH}$ ve $-\text{OR}$ gruplarının aynı karbon atomuna bağlı olmasıdır. Açık zincirli yarı-asetallerin çoğu, elde edilebilmeleri için yeterli kararlılığa sahip değildirler. Diğer yandan beş veya altı üyeli halkaya sahip halkalı yarı-asetaller genellikle daha karardır (Solomons ve Fryhle, 2000).

1.1.3.2.2 Aldehit hidratlar (ikiz dioller)

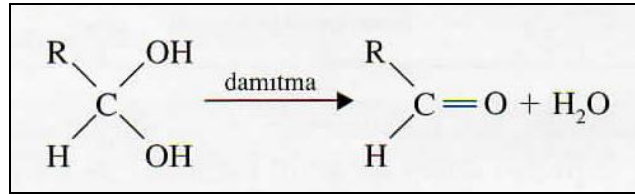
Asetaldehit gibi bir aldehitin suda çözülmesi aldehit ile onun hidratı arasında bir dengenin kurulmasına olanak sağlar. Bu hidrat gerçekte bir 1,1-dioldür ve buna *ikiz-diol* adı verilir (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.14 Hidrat oluşumu tepkimesi için mekanizma(Solomons ve Fryhle, 2000)

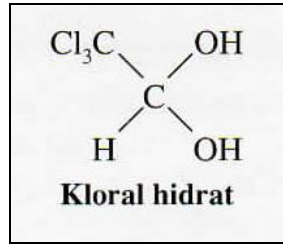
Birçok ketona su katılmasında denge tercih edilmez, halbuki bazı aldehitler (örneğin; formaldehit) sulu çözeltiler içerisinde başlıca ikiz-diol halindedir.

Oluştukları sulu çözeltilerden, ikiz-diolleri izole etmek mümkün olmaz. Örneğin suyun buharlaştırılması dengeyi sağa kaydırır veya *ikiz-diol* (veya hidrat), karbonil bileşiğine geri dönüşür. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.15 İkiz diollerden karbonil bileşiği oluşumu (Solomons ve Fryhle, 2000)

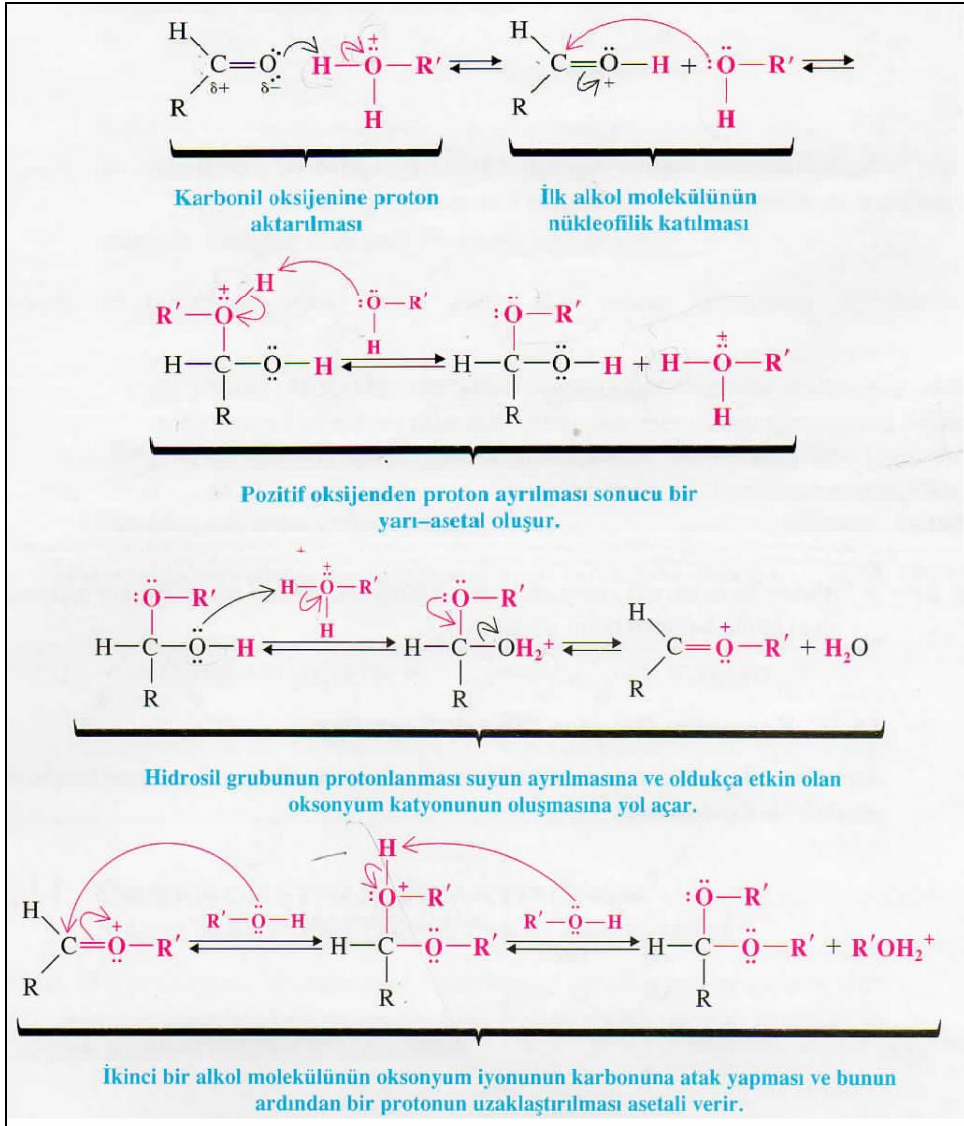
Kuvvetli elektron çekici grupların karbonil grubuna bağlı olduğu bileşikler kararlı *ikiz-dioller* oluşturabilirler ve kloral hidrat olarak oluşturulabilen bileşik buna örnektir (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.16 Kloral hidrat formülü(Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3.2.3 Asetaller

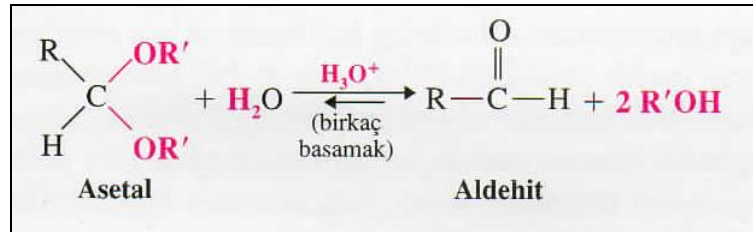
Eğer bir aldehitin alkol çözeltisini alır ve içinden az miktarda HCl gazı geçirirsek, yarı-asetal oluşur ve bunun ardından ikinci bir tepkime meydana gelir. Yarı-asetal, eşdeğer miktarda ikinci bir mol alkol ile asetal oluşturmak üzere tepkimeye girer. Asetal, aynı karbon atomuna bağlı iki -OR grubuna sahip bir bileşiktir. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.17 Asit katalizli asetal oluşumu tepkimesinin mekanizması(Solomons ve Fryhle, 2000)

Bir aldehitten bir asetalin oluşumundaki bütün basamaklar tersinirdir. Eğer bir aldehiti susuz bir alkolün aşırısında çözersek ve az bir miktar susuz asit (örneğin HCl gazı veya derişik H_2SO_4) ilave edersek denge asetal oluşumu yönünü daha çok tercih eder. Denge kurulmasının ardından asit nötralize edilerek ve aşırı alkol buharlaştırılarak asetal elde edilebilir.

Eğer asetali su içerisinde koyar ve az bir miktar asit eklersek, tüm basamaklar geri döner. Bu şartlar altında, denge aldehitin oluşumunu tercih eder. Asetal de hidrolize uğrar (Solomons ve Fryhle, 2000).



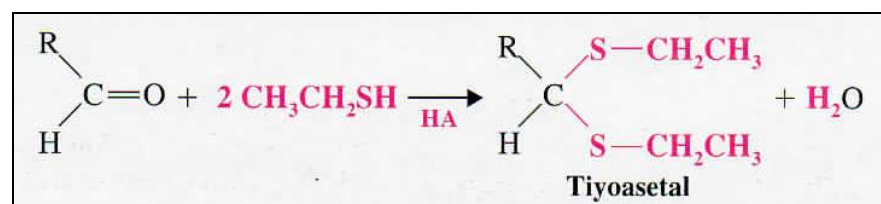
Şekil 1.18 Asetalin hidrolizi (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3.2.4 Koruyucu gruplar olarak asetaller

Asetaller sulu asit içerisinde aldehitlere ve ketonlara hidroliz olmalarına karşın, bazik çözeltilerde kararlıdır. Bu özellikten dolayı asetaller, aldehit ve keton gruplarının bazik çözeltilerdeki istenmeyen tepkimelerden korunması için kullanışlı bir yöntem sağlar. Bir aldehit veya ketonu bir asetale dönüştürebilir, molekülün başka bir yerinde bir tepkime gerçekleştirir ve daha sonra asetali sulu asitle hidroliz edebiliriz (Solomons ve Fryhle, 2000).

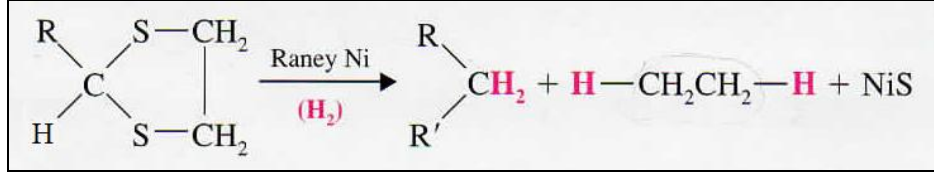
1.1.3.2.5 Tiyoasetaller

Aldehitler, tiyollerle tepkimeye girerek, tiyoasetalleri oluşturabilirler. (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.19 Aldehitten tiyoasetal oluşumu (Solomons ve Fryhle, 2000)

Tiyoasetaller, Raney nikeli ile tepkimeye girerek hidrokarbonları verdikleri için organik sentezlerde önemli yer kaplarlar. Raney nikeli, soğurulmuş hidrojen içeren bir nikel katalizördür. Bu tepkimeler (tiyoasetal oluşumu, ardından kükürdün giderilmesi) aldehit ve ketonların karbonil gruplarının $-\text{CH}_2-$ gruplarına dönüştürülmesi için alternatif bir yöntem sağlar (Solomons ve Fryhle, 2000).

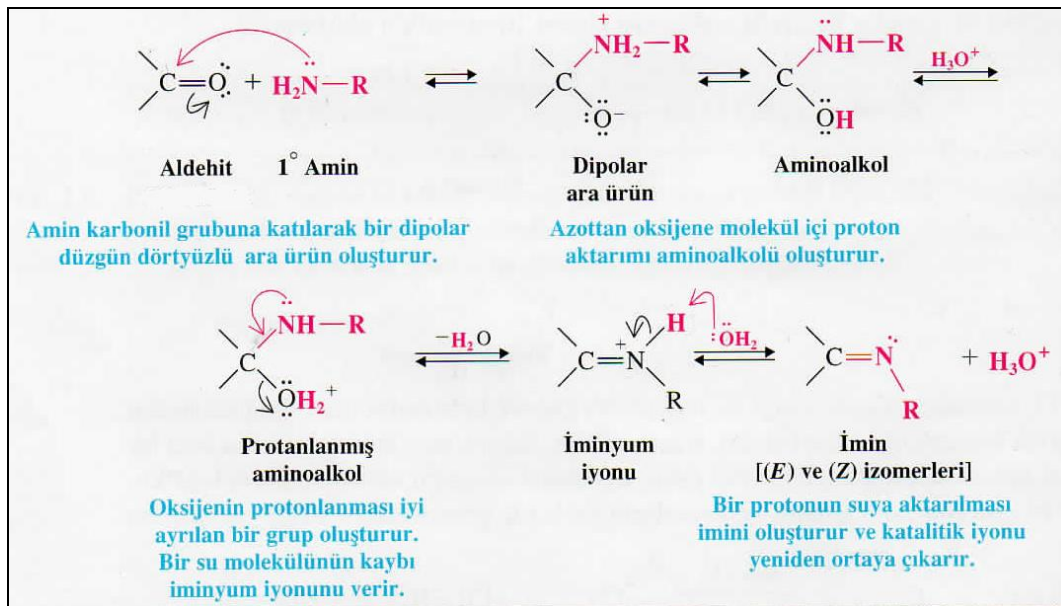


Şekil 1.20 Tiyoasetalin Raney nikeli ile tepkimesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3.3 Amonyak türevlerinin katılması

Aldehitler birincil aminlerle tepkime vererek iminler diye adlandırılan karbon-azot ikili bağına sahip bileşikler oluşturabilirler. Tepkime asitle katalizlenir, ürün ise (E) ve (Z) izomerlerinin bir karışımı olarak oluşabilir.

İmin oluşumu, çok düşük ve çok yüksek pH'de yavaştır. Genel olarak pH 4 ve 5 arasında en hızlı gerçekleşir. Eğer imin oluşumu için önerilen mekanizma dikkate alınırsa asit katalizörünün gerekliliği anlaşılır. Burada önemli basamak, protonlanmış alkolün bir su molekülü kaybederek iminyum iyonu haline geldiği basamaktır. Asit, alkol grubunu protonlayarak, zayıf ayrılan grubu (-OH grubu) iyi ayrılan gruba (-OH₂⁺ grubu) çevirir (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.21 İmin oluşumu tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

Eğer hidronyum iyonu derişimi yüksekse tepkime daha yavaş ilerler. Bunun sebebi, aminin kendisi önemli oranda protonlanır ve bu da ilk basamakta gerekli nükleofil derişimini azaltacak bir etkidir. Hidronyum derişimi az ise, tepkime yine yavaşlar, çünkü protonlanmış aminoalkol derişimi azalır. pH:4 ve pH:5 arasındaki bir pH en uygun olanıdır.

İmin oluşumu, birçok biyokimyasal tepkimede de meydana gelir, çünkü enzimler, genellikle bir aldehit veya keton ile olan tepkimelerinde $-NH_2$ gruplarını kullanma özelliğine sahiptir. Bir imin bağının oluşumu, görme süreci sırasında meydana gelen tepkimelerin bir basamağında da öneme sahiptir.

İminler ayrıca, aminlerin yararlı laboratuvar sentezlerinde ara ürünler olarak da oluşurlar.

Hidroksilamin (NH_2OH), hidrazin (NH_2NH_2) ve semikarbazit ($NH_2NHCONH_2$) gibi bileşiklerin iminleri aldehit ve ketonların türevleri olarak kullanılırlar. (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3.3.1 Dinitrofenilhidrazonlar, semikarbazonlar ve oksimler

Aldehit ve ketonların 2,4-dinitrofenilhidrazin, semikarbazit ve hidroksilamin ile olan tepkimelerinin ürünleri çoğu zaman bilinmeyen aldehit ve ketonların tanınmasında kullanılır. Bu bileşikler, yani 2,4-dinitrofenilhidrazonlar, semikarbazonlar ve oksimler, genellikle nispeten çözünmeyen katılardır ve keskin erime noktalarına sahiptirler. Bilinmeyen bir bileşiğin türevinin erime noktası ile kimya kaynaklarındaki bilinen bir türevin erime noktasının karşılaştırılması, bilinmeyen bileşiğin tanınması için kanıt sağlayabilir (Solomons ve Fryhle, 2000).

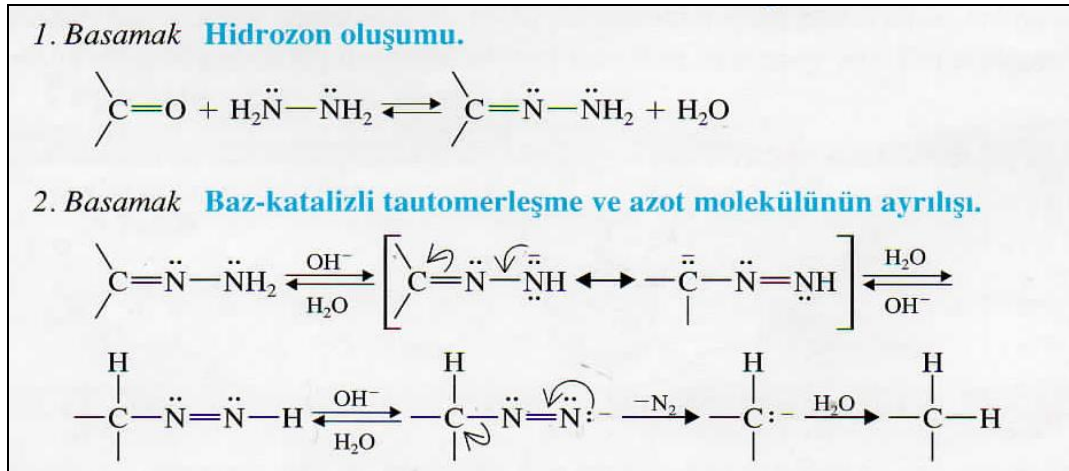
1.1.3.3.2 Hidrazonlar (wolff-kishner indirgemesi)

Hidrazonlar aldehit ve ketonların tanınmasında ara sıra kullanılmaktadır. Ancak 2,4-dinitrofenilhidrazonlardan farklı olarak, basit hidrazonlar genellikle

düşük erime noktalarına sahiptirler. Bununla birlikte hidrazonlar, Wolff-Kishner indirgemesi diye bilinen aldehit ve ketonların karbonil gruplarının $-\text{CH}_2-$ gruplarına indirgenmesi için uygun bir yöntemin temelini oluştururlar.

Wolff-Kishner indirgemesi, eğer dimetilsülfoksit çözücü olarak kullanılırsa, daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir.

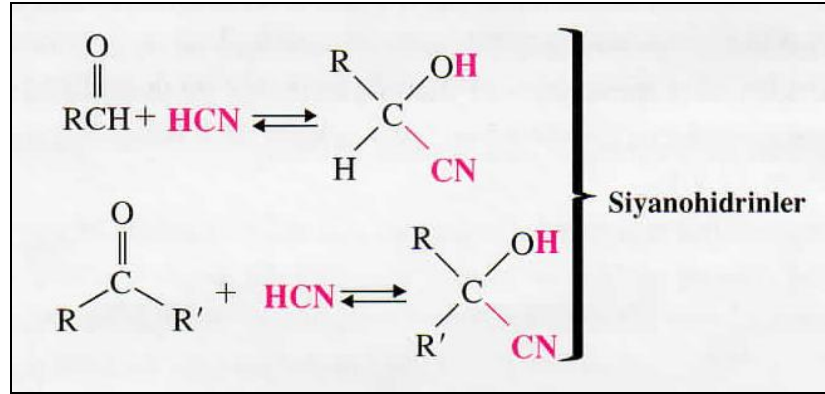
Wolff-Kishner indirgemesi kuvvetli bazik çözeltilerde yapılır ve asitlere duyarlı bileşikler için de kullanılabilir. Tiyoasetallerin indirgenmesi ise nötr çözeltilerde yapılır bunun yanı sıra hem asit hem de bazlara duyarlı bileşikler için kullanılabilir (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.22 Aldehitler ve ketonların Wolff-Kishner indirgemesi(Solomons ve Fryhle, 2000)

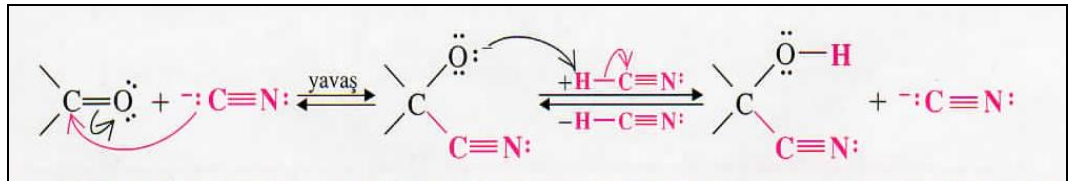
1.1.3.4 Hidrojen siyanür katılması

Hidrojen siyanür, aldehitlerin ve ketonların birçoğunun karbonil grubuna katılarak siyanohidrinler olarak adlandırılan bileşikleri oluşturur. Karbonil grubunun engellenmiş olduğu ketonlar bu tepkimeye girmezler (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.23 Aldehit ve ketonlardan, siyanohidrin oluşumunun genel tepkimesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

Hidrojen siyanürün kendisinin katılması yavaş olur, çünkü HCN zayıf bir nükleofil kaynağıdır. Potasyum siyanürün veya zayıf asit olan HCN'den siyanür iyonları üretecek bir bazın katılması tepkimenin hızında kaydadeğer artışlara neden olur. Bu etki, İngiliz kimyacı Arthur Lapworth tarafından 1903 yılında keşfedildi ve onun HCN katılması üzerindeki bu çalışmaları, Lapworth'u organik kimyanın mekanistik görüş öncülerinden biri haline getirdi. Lapworth, katılmanın iyonik yapıda olduğunu varsaydı. Lapworth, 'siyanohidrinlerin oluşumunun, negatif siyanür iyonlarının karbonil ile nispeten yavaş olarak birleşmesi ve bunun ardından, neredeyse aniden kompleksin hidrojenle birleşmesi şeklinde gösterilebileceğini' öne sürdü. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.24 Siyanohidrin oluşum tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

Siyanür iyonu, daha kuvvetli bir nükleofil olduğundan, karbonil karbonuna HCN'nin kendisinden daha hızlı atak yapabilir ve bu onun katalitik etkisinin kaynağıdır. Siyanür iyonunun katılması bir kere gerçekleşince, ara ürünün kuvvetli bazik alkoksit oksijen atomu, ortamda var olan herhangi bir asitten bir proton koparır ve eğer bu asit HCN ise, bu basamak siyanür iyonunu tekrar üretir (Solomons ve Fryhle, 2000).

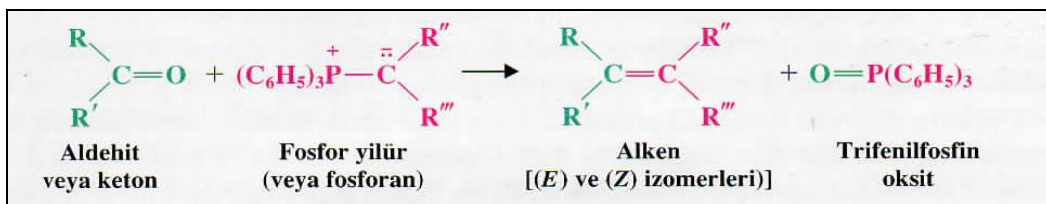
Siyanür iyonundan daha kuvvetli olan bazlar, bu tepkimeyi, HCN'yi bir asit-baz tepkimesiyle siyanür iyonuna dönüştürmek suretiyle katalizlerler.

Sıvı hidrojen siyanür bu tepkime için kullanılabilir (HCN oda sıcaklığında gazdır.) ancak HCN çok zehirli ve uçucu olduğundan tepkime ortamında oluşturulması daha güvenlidir. Bu, aldehit veya ketonun sulu sodyum siyanür ile karıştırılması ve daha sonra karışıma yavaşça sülfürik asit katılmasıyla gerçekleştirilebilir.

Siyanohidrinler organik sentezlerde yararlı olan ara ürünlerdir. Kullanılan koşullara bağlı olarak, asidik hidroliz siyanohidrinleri, α -hidroksi asitlere ya da α,β -doymamış asitlere dönüştürür. (Solomons ve Fryhle, 2000)

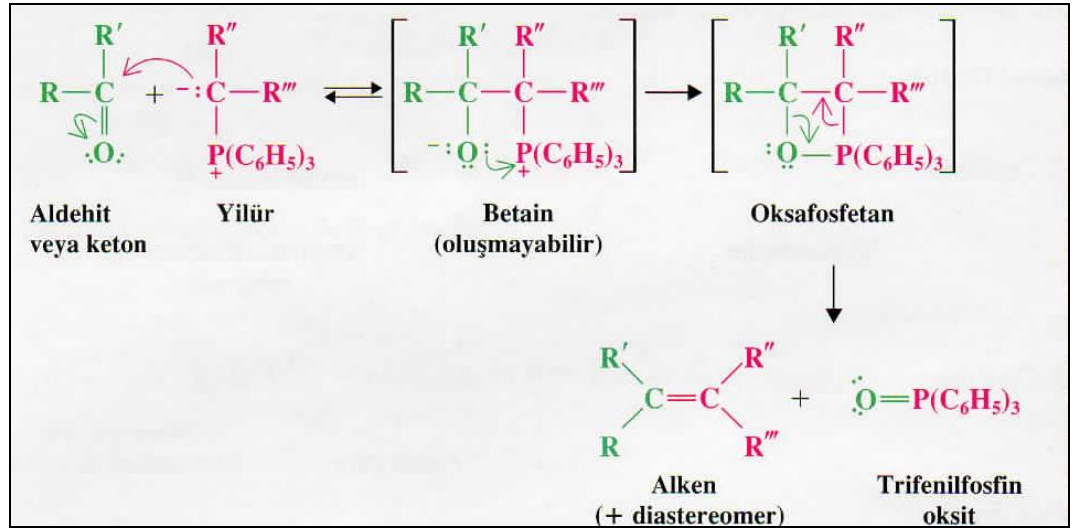
1.1.3.5 Yilürlerin katılması (Wittig tepkimesi)

Aldehit ve ketonlar fosfor yilürlerle tepkimeye girerek alkenleri ve trifenilfosfin oksiti oluştururlar. Yilür, pozitif bir heteroatoma bitişik bir negatif karbonu olan nötr bir moleküldür. Fosfor yilürler fosforanlar olarak da adlandırılırlar. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.25 Wittig tepkimesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

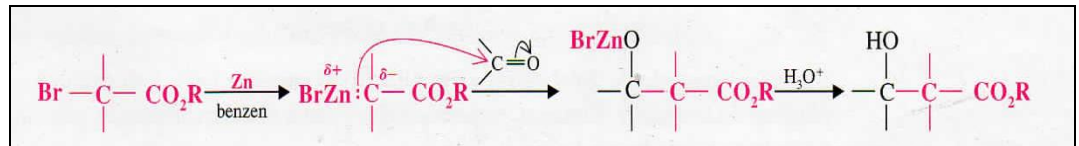
Wittig tepkimesi olarak bilinen bu tepkimenin alkenlerin sentezi için önemli bir yöntem olduğu ispatlanmıştır. Wittig tepkimesi çeşitli bileşiklere uygulanabilir ve sonuçta (E) ve (Z) izomerlerinin bir karışımı oluşmasına rağmen, ürünlerdeki ikili bağın yerinde herhangi bir belirsizlik olmadığından diğer alken sentezlerine üstünlük sağlar (Solomons ve Fryhle, 2000).



şekil 1.26 Wittig tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3.6 Organometalik reaktiflerin katılması (Reformatsky tepkimesi)

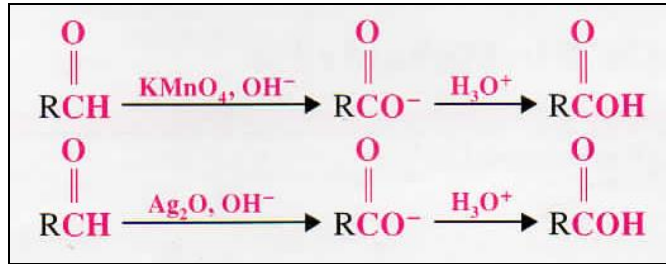
Bir aldehit veya ketonun karbonil grubuna organoinko reaktifinin katılmasını içeren Reformatsky tepkimesi aldehit ve ketonun karbon iskeletini uzatır ve ürün olarak ̢-hidroksi esterler verir. Bu tepkime bir aldehit veya keton ile bir ̑-bromo esterin çinko metali varlığında etkileştirilmesini içerir ve çözücü olarak çoğu kez benzen kullanılır. Başlangıç ürünü çinko alkoksittir ve bu da, ̢-hidroksi esterin oluşması için hidroliz edilmelidir (Solomons ve Fryhle, 2000).



şekil 1.27 Reformatsky tepkimesinin mekanizması (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.3.7 Aldehitlerin Yükseltgenmesi

Aldehitler, ketonlardan daha kolay yükseltgenirler. Aldehitler potasyum permanganat gibi kuvvetli yükseltgen maddelerle kolayca yükseltgenirler ve ayrıca, aldehitlerin gümüş oksit gibi ılıman yükseltgen bileşiklerle de yükseltgenmesi mümkündür. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.28 Aldehitlerin yükseltgenmesinin genel tepkimesi (Solomons ve Fryhle, 2000)

Bu yükseltgenmelerde aldehitler karbonil karbon atomuna bağlı hidrojenini kaybeder. Ketonların, bu hidrojenden yoksun olmaları nedeniyle yükseltgenmeye karşı daha dirençli olduğu bilinmektedir. (Solomons ve Fryhle, 2000)

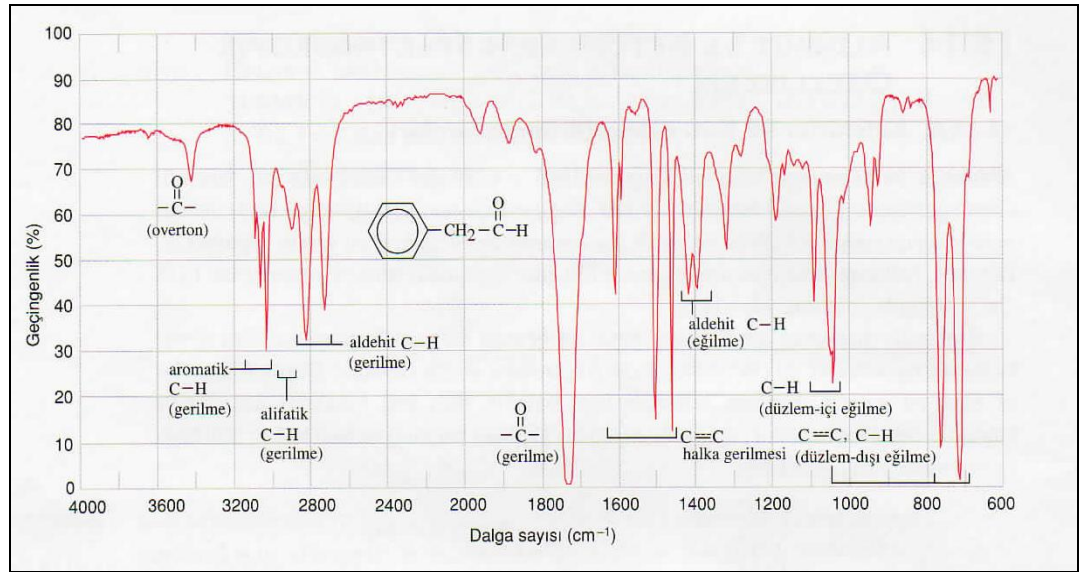
1.1.4 Aldehitlerin spektroskopik özellikleri

1.1.4.1 Aldehitlerin infrared(IR) spektrumları

Aldehitler ve ketonların karbonil grupları $1665\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$ aralığında kuvvetli C=O gerilme soğurması bandları verirler. Soğurmanın tam yeri aldehit veya ketonun yapısına bağlıdır ve bu, IR spektrumunda en tipik ve en yararlı soğurmadır. Doymuş, halkasız aldehitler tipik olarak 1730 cm^{-1} civarında soğurma gösterirler.

Karbonil grubunun bir ikili bağ veya bir benzen halkası ile konjugasyonu C=O soğurmasının yaklaşık 40 cm^{-1} daha düşük frekanslara kaymasına sebep olur. Düşük frekanslara olan bu kayma, konjuge bileşiğin ikili bağının birli bağ karakteri kazanmaya başlamasından kaynaklanır ve birli bağlar ikili bağlardan çok daha kolay gerilirler.

Ayrıca, aldehitlerin CHO grubunun C–H bağ titreşimleri $2700\text{--}2775\text{ cm}^{-1}$ ve $2820\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde kolayca tanınabilen iki zayıf bant verdikleri bilinmektedir. (Solomons ve Fryhle, 2000)



Şekil 1.29 Feniletanalın infrared spektrumu (Solomons ve Fryhle, 2000)

Çizelge 1.2: Aldehitlerin karbonil (C=O) gerilme frekansları (Solomons ve Fryhle, 2000)

Bileşik	Bölge (cm^{-1})
R — CHO	1720–1740
Ar — CHO	1695–1715
$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CHO} \end{array}$	1680–1690

1.1.4.2 Aldehitlerin nükleer manyetik rezonans(NMR) spektrumları

1.1.4.2.1 ^{13}C NMR spektrumları

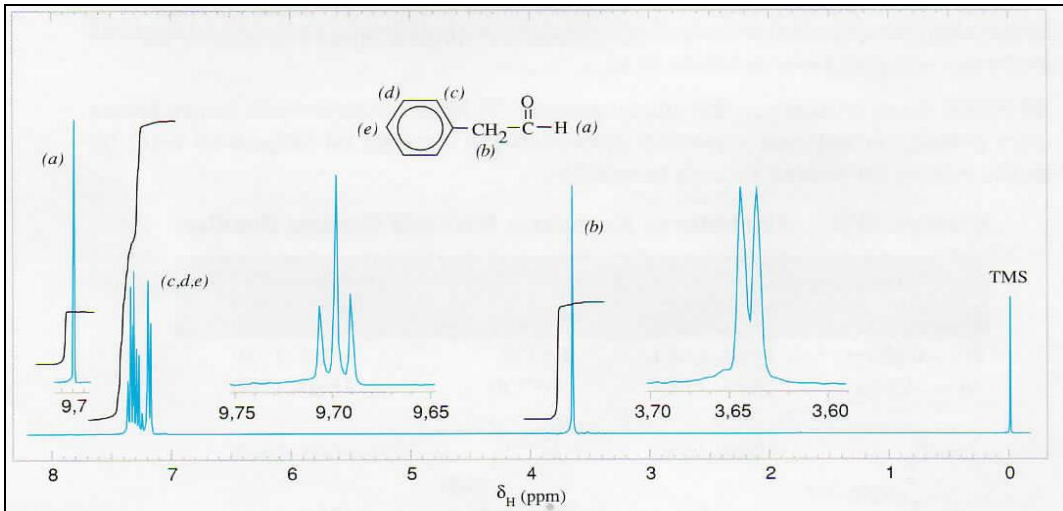
Bir aldehit veya ketonun karbonil karbon atomu, ^{13}C spektrumunda δ 180-200 bölgesinde tipik NMR sinyalleri verir ve bu bölgede neredeyse başka sinyal olmadığından bir sinyalin bulunuşu bir karbonil grubunun varlığını kuvvetle düşündürür. (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.1.4.2.2 ^1H NMR spektrumları

Bir aldehit protonu, ^1H NMR spektrumunda hemen hemen diğer protonların soğurma yapmadığı oldukça düşük alandaki bir bölgede (δ 9-10) bir sinyal verir ve bu nedenle kolayca tanınabilir.

Alifatik aldehitlerin aldehit protonu, komşu karbon atomundaki protonlarla spin-spin eşleşmesi yapar ve yarılmanın şekli, α -karbon atomundaki süstitüsyon derecesini meydana çıkarır. Örneğin; asetaldehitte (CH_3CHO) aldehit proton piki metilin üç protonu tarafından bir dörtlüye, metil protonların piki ise aldehit protonu tarafından bir ikiliye yarılr ve eşleşme sabiti yaklaşık 3 Hz'dir.

α -Karbondaki protonlar, karbonil grubu tarafından perdelenmezler ve bunların da sinyalleri genellikle δ 2,0-2,3 bölgesinde görünür (Solomons ve Fryhle, 2000).



Şekil 1.30 Feniletanalın 300 MHz ^1H NMR spektrumu (Aldehit ve metilen protonları arasındaki küçük eşleşme (2,6 Hz) genişletilmiş olarak ayrıca gösterilmiştir.) (Solomons ve Fryhle, 2000)

1.2 Dialdehitler

Dialdehit moleküller, ilk olarak Lindoy ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (Armstrong ve Lindoy 1975, Adam vd 1983). Dialdehitler, dikarbonil bileşikleri sınıfına dahil bileşiklere verilen isimdir ve iki adet fonksiyonel aldehit grubu içerirler. En önemli dialdehitlerden biri Glioksal'dır, bu da iki karbonlu bir dialdehittir; sarı renkli, formaldehit kokusunda ve çok uçucu bir sıvıdır. Glioksal, kolaylıkla polimerleşerek amorf ve renksiz bir reçine verir ve buna da paraglioksal denir (Solomons ve Fryhle, 2000).

1.3 Polimerler ve polimer formları

Polimer, çok sayıda küçük molekülün kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu makromoleküllere denir. Monomer adı verilen küçük moleküller uygun koşullarda polimerizasyon tepkimesi sonucu birbirleriyle kovalent bağ ile bağlanırlar ve polimer moleküllere dönüşürler (Kazancı, 2010).

Polimerler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Bunları bir araya getirirsek;

- a. Molekül ağırlıklarına göre (oligomer, makromolekül)
- b. Doğada bulunup, bulunmamasına göre (doğal, yapay)
- c. Organik ya da anorganik olmalarına göre,
- d. Isıya karşı gösterdikleri davranışa göre (termosetler, termoplastikler),
- e. Zincirin kimyasal ve fiziksel yapısına göre (Düz, dallanmış, çapraz bağlı, kristal, amorf polimerler),
- f. Zincir yapısına göre (homopolimer, kopolimer),
- g. Sentezlenme şekillerine göre (Kazancı, 2010).

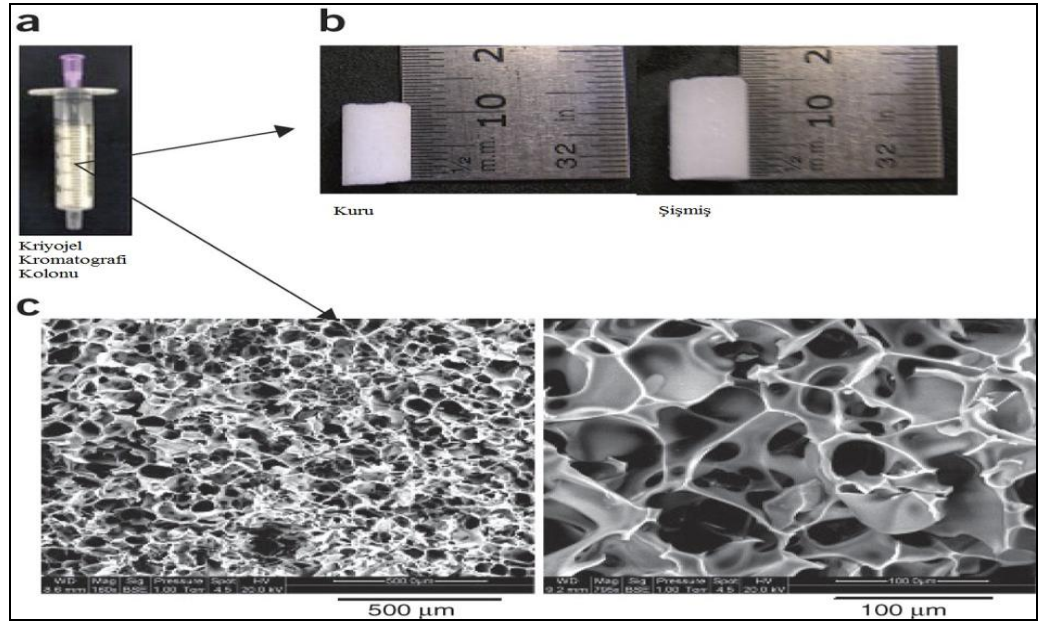
Bu çalışmada amorf polimerlerden hidrojel polimerinin bir çeşidi olan kriyojel polimeri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

1.4 Ayırmada Kullanılan Polimerler

Ayırmada kullanılan polimerler daha çok afinite etkileşimleri ile bağdaşmış bir şekilde karşımıza çıkmaktadır. Bu polimerlere örnek olarak; membranlar, monolitler, kriyojeller, nanopartiküller verilebilir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

1.4.1 Kriyojeller

Kriyojeller, donma sıcaklığının altında oluşan süpermakrogözeneklere sahip üç boyutlu jel matrikslerdir ve hidrojel sınıfı materyallerdir. Kriyojel oluşumu sırasında, öncü çözünen parçacıklar, hızla donarak çoğunlukla su gibi uygun bir çözücü içerisinde çözünür. Sonraki aşamalarda çözücünün büyük kısmı birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafındaki donmamış sıvıda bulunan polimer öncüleri polimerleşir ve buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Tepkime sonunda donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiği zaman buz kristalleri erir ve ‘kriyojel’ olarak adlandırılan gözenekli polimer ağ yapı elde edilir. Gözenek duvarının etrafındaki çözücünün yüzey geriliminden dolayı buz kristallerinin erimesi sayesinde kriyojellerdeki gözenekler dairesel şekle sahip olur (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).



Şekil 1.31 a) Kriyojel kromatografi kolonu b) Kuru ve şişmiş formdaki kriyojellerin fiziksel biçimi c) Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) iki farklı büyütmede (x160 ve x795) kriyojel görüntüleri

Kriyojeller bir dizi yapay ve doğal polimerler veya bunların birleşiminden üretilir ve bunlar polimer ağlarının hem fiziksel hem de kimyasal çapraz bağlanmasıyla oluşturulabilir. En çok kullanılan ve tam olarak karakterize edilmiş olanları poliakrilamid kriyojellerdir. Kriyojellerin süngersi morfolojisi ve makrogözenekleri değişen büyüklükteki moleküllerin jel boyunca düzgün akışını mümkün kılar. Çözelti kriyojel boyunca hem difüzyon hem taşınım ile çok rahat hareket eder ve kütle aktarımı oldukça etkin bir şekilde gerçekleşir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

Akrilamid bazlı kriyojellerin kullanım alanlarından biri, biyolojik moleküllerin saflaştırılmasıdır. Ayırmaya dayalı kriyojelleri kullanmanın asıl avantajı, ham homojenatların ön işlem olmaksızın doğrudan kolonlara uygulanması, fiyat uygunlukları ve bunların yanı sıra analitik ölçekte olduğu gibi preparatif ölçekte de kullanılabilmesidir. Bu özellik onlara analitik olarak yapılan hücre ayırma teknolojilerine göre avantaj kazandırır. Kriyojellerin elastik ve süngersi yapısıyla kazandıkları tersinir deformasyon özellikleri sayesinde afinite kriyojel kolonlara bağlanan biyopartiküller kolondan etkin şekilde sökülür ve desorpsiyon basamağının başarılı bir şekilde uygulanmasına olanak sağlar. Bu

yöntemde mühim olan hücrelerin özellikle mekanik kuvvet uygulanarak ayrılmasının etkin bir şekilde gerçekleşmesidir. Bununla birlikte aynı kriyojel kolonları, hücre immobilizasyonu ve üretilmesinde yapı iskeleti olarak kullanılabilir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

Son zamanlarda moleküler baskılama teknolojisinin getirdiği yenilikler ile, kriyojellere protein baskılanması da yapılabilmektedir. Moleküler baskılama, bir moleküler kalıp kullanarak makromoleküler ağda özgün tanıma bölgeleri oluşturma tekniğine denir. Bir başka deyişle, kalıp molekül hem şekil hem de fonksiyonel grupların yönlenmesiyle polimer matriks tarafından hatırlanır ve bu özellik tayin ve saflaştırma için kullanılır (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

Kriyojeller hücrelerin gelişimi ve üremesi için elverişli üç boyutlu yapıya sahiptirler. Makrogözenekli doğası sayesinde sahip olduğu hızlı şişme kinetiği onları ilaç taşınım araçları ve biyosensörler gibi uyarı-duyarlı sistemlerin tasarımına uygun hale getirir. Kriyojel temelli uyarı-duyarlı polimerler süngersi ve geçirgen yapılarından dolayı çevresindeki her değişikliğe hızlı bir şekilde tepki verebilir. Birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bu jel sistemleri kılcal damarların üzerinde hücrelerin immobilize edildiği bir ağ oluşturur ve ortam bu sistem içerisinde yayılır. Bu reaktörler yüksek yoğunluktaki perfüzyon biyoreaktörleri kadar yüksek performans gösterebilir, yanı sıra tek kullanımlık reaktörler olarak kullanılabilir ve oldukça da ekonomiktirler (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

Biyobozunur polimerler ve özellikle hidrojel, teşhis ve doku mühendisliği gibi tedavi yöntemlerinde geniş uygulama alanına sahiptirler. Özellikle doku mühendisliğinde kullanılan destek malzemelerinin yüzey özellikleri, hücre afinitesini büyük oranda etkilemektedir. Malzeme yüzeyinin hidrofilik, pozitif yüklü, yüksek yüzey enerjisine sahip ve gözenekli bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Gözeneklilik en az %90 olmalıdır. Bunun sebebi, yüzey alanının artırılarak hücre yapışması ve beslenmesinin (hücre afinitesi) artışının sağlanmasıdır (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

1.5 Afinite Etkileşimleri

Afinite, kelime anlamı olarak iki veya daha fazla bileşenin bağ yapabilmek için birbirlerini çekme gücüne denir. Afinite, moleküllerin ne çeşit bağ ile bağlandığına (kovalent, iyonik vb.) bakılmaksızın, bağ yapacak moleküllerin bu bağı yapma isteği olarak düşünülebilir. Afinite etkileşimi ise, iki (ya da daha fazla) molekülün geri dönüşlü etkileşimine denir (Kastritis and Bonvin, 2013).

Afinite etkileşimleri, özellikle biyolojik makromoleküllerde immobilizasyonda, saflaştırmada çokça karşımıza çıkmaktadır (Benesova and Kralova, 2012).

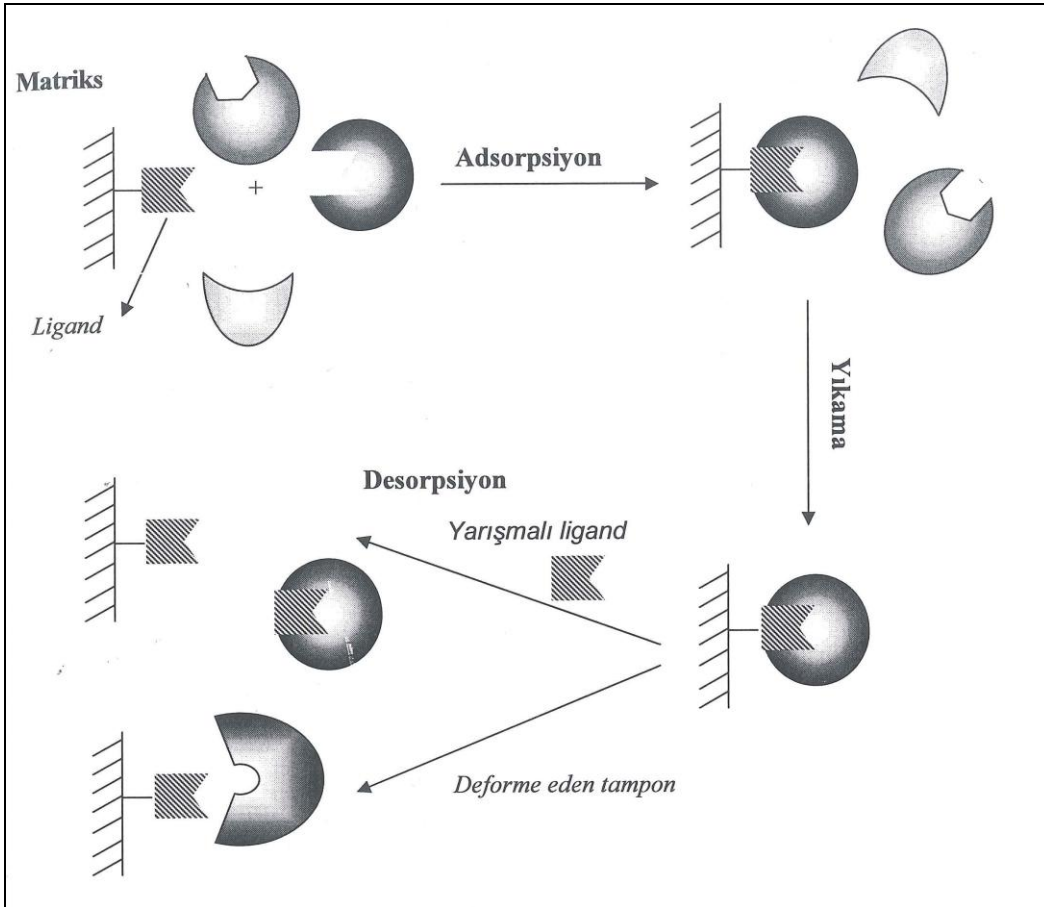
Afinite etkileşimi prensibine dayanan metotlar, yüksek seçicilik gibi pek çok avantaja sahiptir (Brenda and Batista-Viera, 2006, Costa, 2005, Garcia-Junceda et al, 2004). Bu prensibe dayanarak geliştirilen afinite kromatografisi, ligand bağlanabilir taşıyıcı destek materyali ile de ayırmaya olanak sağladığı için, afinite etkileşimlerinin uygulama alanı haline gelmiştir. Bu metot da protein saflaştırılmasında oldukça sık kullanılmaktadır (Cuatrecasas et al, 1968, Cuatrecasas, 1970, Porath, 1992, Machesky et al, 1994 Yılmaz et al, 2005, Benesova and Kralova, 2012, Yamasaki and Eto, 2014).

1.6 Biyoafinite Teknolojisi

1.6.1 Biyoafinite kromatografisi

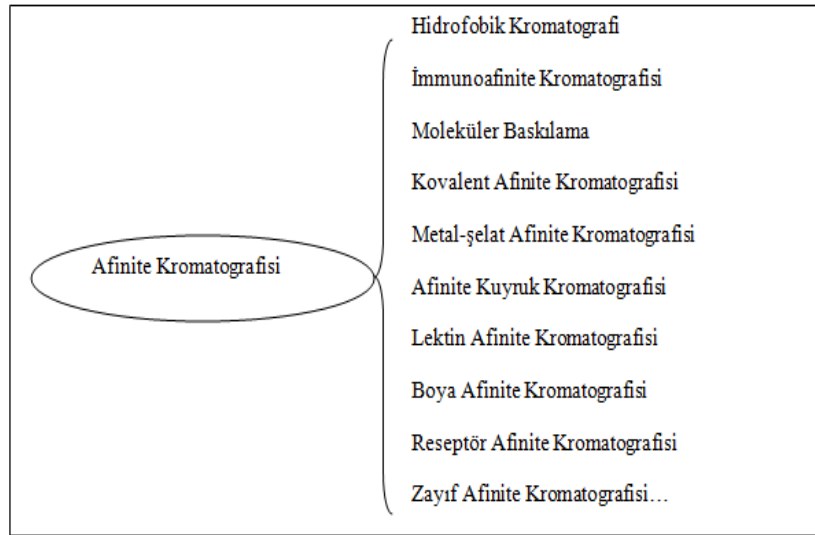
Biyoafinite kromatografisi, biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorbsiyon kromatografisidir. Bu maddeler genellikle ligand olarak adlandırılır. Enzimlerin inhibitörleri, substratları, kofaktörleri veya efektörleri ile aktif veya düzenleyici bölgeleriyle, antibadilerin antijen veya haptenlerle, lektinlerin karbohidrat ile yaptığı kompleksler, nükleik asitlerin nükleotidlerle kompleksleri, hormon ve toksinlerin reseptörlerle oluşturduğu kompleksler, taşıyıcı proteinlerin vitaminler ve şekerlerle kompleksleri biyoafinite kromatografisine örnektir. (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009)

Ayrılacak olan biyomolekölü içeren ham karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandıyla etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar. Afinite olan moleküller ise kolonda absorblanırlar. Bundan sonra adsorblanan biyomolekül ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık veya üre, guanidin klorür gibi ayrıştırıcı ajanların ilavesi ile) veya ligandın kendi çözeltisi kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasındaki kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dağılma kuvveti, dipol-dipol etkileşimi veya yük-aktarım etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile meydana gelir. Bu kuvvetlerden bir kaçının aynı anda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliğini ve etkinliğini belirleyen en temel etkindir (Sundaram, 1978; Scouten, 1981; Scopes, 1982; Gribnan, 1982; Chaiken 1983).



Şekil 1.32 Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009)

Biyoafinite kromatografisinin farklı yaklaşımlarla türevlendirilmesiyle değişik afinite uygulamaları geliştirilmiştir. Bu tekniklerin bir çoğu kendi bilimsel isimleriyle kabul edilmektedir. Bunların bir kısmı Şekil 1.33'te gösterilmiştir (Wilchek, 1999).



Şekil 1.33 Biyoafinite kromatografisinin dalları (Wilchek, 1999)

1.6.2 Matriks seçimi

Biyoafinite kromatografisinin hızlı gelişmesindeki en önemli sebeplerden birisi de istenen özelliklere sahip katı desteklerin geliştirilmesidir. Katı desteğin doğru seçilmesi kromatografik ayırmanın belki de en önemli basamağını oluşturmaktadır. Katı destek immobilize edilen ligand ve adsorblanacak molekülün kararlılığı üzerine de önemli etkiye sahiptir. Katı destek bazı durumlarda ligandın kendisi de olabilmektedir (örneğin lektinlerin saflaştırılması için polisakkaritlerin kullanılması gibi). (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009)

Çizelge 1.3 Biyoafinite kromatografisi için bazı katı destek türleri(Denizli and Küfrevioğlu, 2009)

Katı destek	Kimyasal yapı
Biyopolimerler	Agaroz, dekstran, selüloz
Sentetik polimerler	Poliakrilamid, poli(hiroksietilmetakrilat)
İnorganik malzemeler	Gözenekli cam, demir

	oksit(manyetojeller)
Biyopolimer-sentetik polimer kompoziti	Agaroz/poliakrilamid
İnorganik malzeme/polimer	Silika/hidrofilik poimerler

Çok sayıda ve farklı türde destek malzemesi, bunların aktive edilmiş şekilleri ve kullanıma hazır hale getirilmiş afinite adsorbentleri ticari olarak mevcuttur (Çizelge 1.3).

Katı destek aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

-Çözünmemelidir.

-Uygun geçirgenliğe ve büyük iç yüzey alanına sahip olmalıdır.

-Non-spesifik adsorpsiyonu düşük olmalıdır.

-Afinite ligandının bağlanması için fonksiyonel gruplar içermelidir.

-Ligand immobilizasyonu, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarına karşı kimyasal olarak kararlı olmalıdır.

-Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dayanıklı olmalıdır.

-Hidrofilik karakterde olmalıdır (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009).

1.6.3 Afinite ligandının seçimi

Biyoafinite kromatografisinde kullanılabilecek bir ligandın iki koşulu sağlaması gerekir;

- Saflaştırılacak maddeyle spesifik ve tersinir bir kompleks oluşturmamalıdır.

- Absorbente bağlanmasını sağlayacak fonksiyonel grupları içermelidir.

Bu iki koşulu sağlayan çok sayıda ligand bulunmaktadır. Biyoafinite kromatografisi ilkelerinin pratiğe uygulanmasında kullanılabilecek büyük çeşitlilik, yöntemin etkinliğini belirler. Bu etkinliği sağlayan faktörler; istenilen amaca göre özel olarak uygulanarak kullanılabilecek ligandların çeşitliliği, grup-spesifik ligandların kullanımı ve bir maddenin saflaştırılması için kullanılabilecek ligandların çeşitliliğidir.

Afinite ligandları oldukça farklı türlerde maddeler olabilir ve proteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin yanı sıra daha düşük molekül ağırlıklı bileşikler de afinite ligandı olarak kullanılabilir. Bununla birlikte her hangi bir biyolojik işlevi olmayan basit moleküllerin de kullanımı mümkündür. (Denizli ve Küfrevioğlu, 2009)

Hemoglobin saflaştırılması için katı desteğe bağlı imidazol (Pommerian et. al. 1979) ve grup-spesifik ligand olarak geniş uygulama alanı bulan reaktif boyalar (Lowe,1979; Scouten, 1981; Dean et.al.,1985; Lowe and Clonis, 1985; Clonis, 1987; Denizli and Pişkin, 2001) bu tür ligandlara örnek olarak verilebilir.

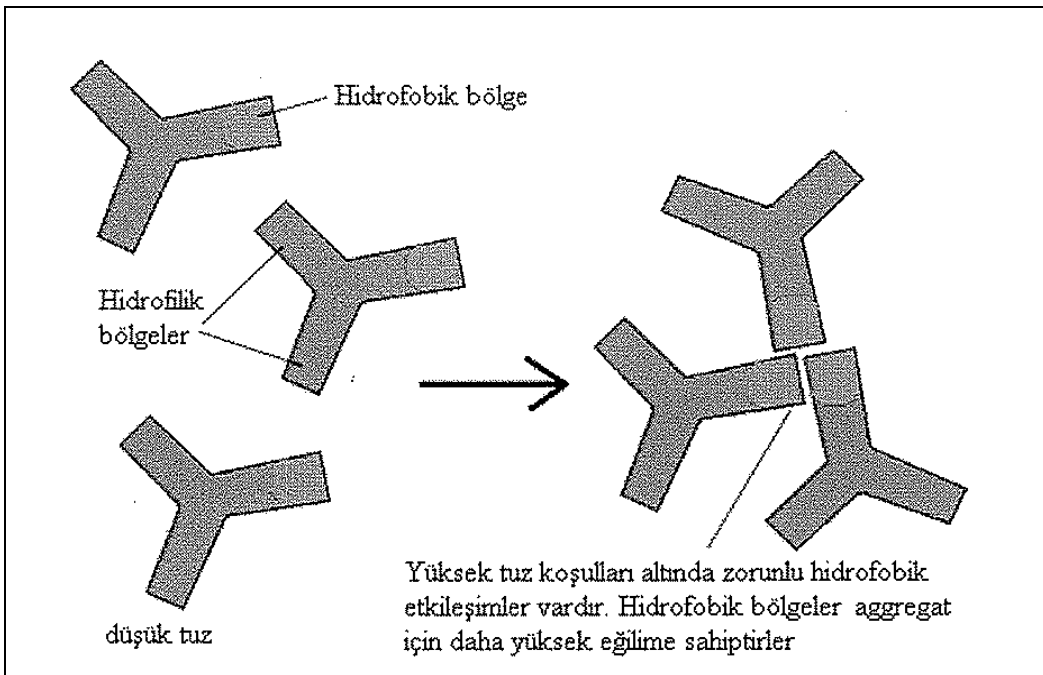
Afinite ligandları spesifite ve kapasite bakımından oldukça geniş dağılıma sahiptirler. Antijen antibadi etkileşimi gibi yüksek afiniteli etkileşimler ve enzim substrat etkileşimleri gibi daha düşük afiniteli etkileşimler de biyoafinite kromatografisinde kullanılabilir. (Denizli and Pişkin, 2001)

Dar bir seçicilik aralığına sahip veya monospesifik bir ligandın kullanılması yüksek bir etkinlik ve saflıkta tek bir bileşiğin saflaştırılmasına olanak tanır. Ancak, bu aynı zamanda saflaştırılacak her madde için özel bir ligand-matriks kombinasyonu gerektireceği için bir dezavantajdır. Dolayısıyla grup-spesifik ligandlar daha büyük pratik öneme sahiptir. Tek bir afinite matriksi ile çok çeşitli maddelerin saflaştırılmasına olanak verirler (Mosbach, 1974).

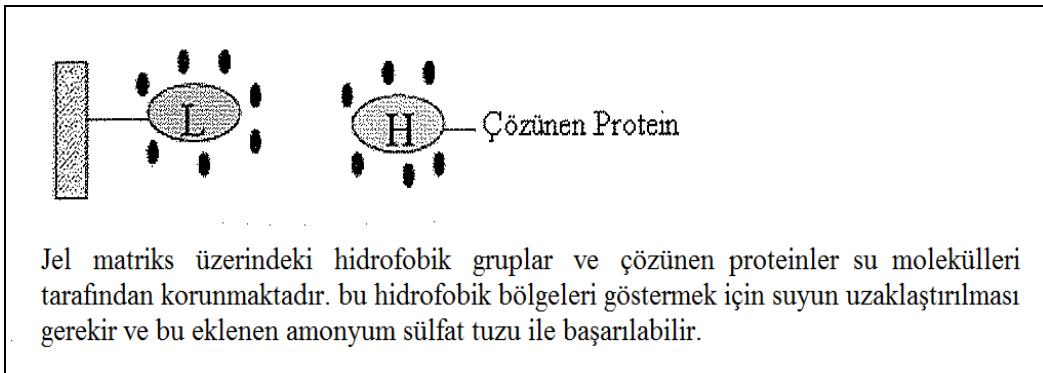
1.6.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi (Hydrophobic Interaction Chromatography,HIC) için türetilen teoriler, genellikle çözünen hidrofobik

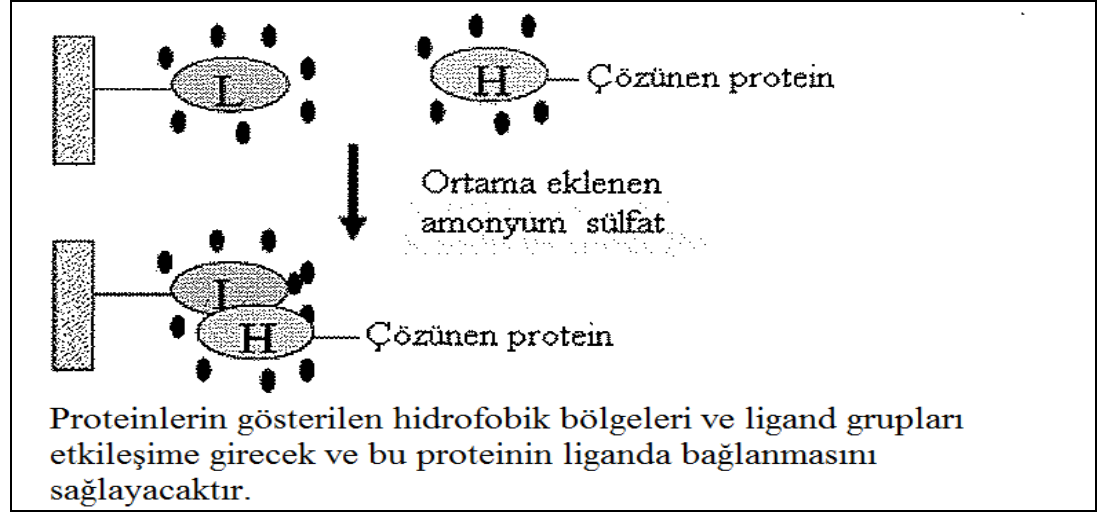
yapılarla su arasındaki etkileşimler için türetilenlere dayanmaktadır. Fakat hiçbirisi evrensel bir kabul görmemiştir. Hepsi için ortak olan nokta, tuzların merkezi rolü ve bunların, çözünenin bağlanması için kromatografik sistemin ayrı bileşenlerine (örneğin çözünene, çözücü ve adsorbent) olan etkileridir. Bunların ışığında, Porath, doğal tuzların orta derecede yüksek derişimlerinde oluşan çözünen-adsorbent etkileşimleri ve HIC için tuz destekli adsorpsiyonu genel bir kavram olarak önermiştir (Özkara, 2008).



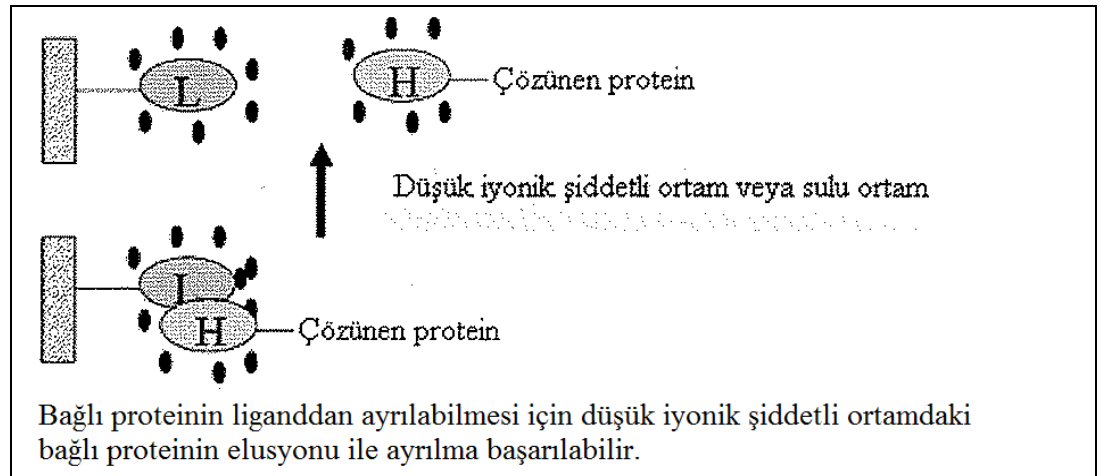
Şekil 1.34 Proteinlerdeki hidrofobik bölgelerin agregat oluşu (Porath, 1986)



Şekil 1.35 Tuz destekli adsorpsiyon (Porath,1986)



Şekil 1.36 Proteinin liganda bağlanması (Porath, 1986)



Şekil 1.37 Bağli proteinin liganddan ayrılması (Porath, 1986)

HIC'nin ayırma mekanizmaları ile ilgili detaya değinmeden önce hidrofilitate terimlerinin ve hidrofobik etkileşim olayının açıklanması gerekir. Hidrofilik; 'su seven' demektir ve dipol-dipol etkileşimi veya hidrojen bağı ile suyla etkileşmeye hazır olan moleküller için kullanılır. Hidrofobik; 'su sevmeyen'

demektir ve suyla etkileşmeyen moleküller için kullanılır. Hidrofilik ve hidrofobik arasında keskin bir sınır yoktur. Yalnızca hidrofobisite (ya da herhangi bir şey için hidrofilisite) derecesi vardır. HIC’de örnek moleküllerin (çoğu zaman proteinler), bir hidrofilik matrikste immobilize hidrofobik ligandlarla etkileşimi sağlanır. Bir proteinin yüzeyinin hidrofobik ligandlarla nasıl etkileştiği sorusuna genel bir cevap bulunmamaktadır. Bununla birlikte, belki de en çok kabul edilen hidrofobik etkileşimi, entropi tarafından sürdürülen mekanizma açıklar (Özkara, 2008)

Sıvı yağ ile su karıştırılacak olursa yağ parçacığı damlacık olarak suda asılı kalır. Eğer karışım iyice çalkalanırsa yağ damlacıklarının su içinde asılı kalması bir müddet devam eder ancak zamanla bir su fazı ve bir sıvı yağ fazı olarak iki faza ayrıldığı görülür. Sıvı içerisinde su moleküllerinin çoğunluğu, aralarındaki hidrojen bağı sebebiyle kümeler halinde bulunurlar ve bu kümeler her bir su molekülünün diğer dördüne bağlanmasıyla meydana gelir. Bir hava-su arayüzünde, su molekülleri, kendilerini oldukça düzenli bir kabuk yapı oluşturacak şekilde dizilirler. Burada, hidrojen bağları olasılığı artık dengeli değildir, fakat arayüz sıvı tarafından daha baskındır. Bu düzenli yapıya artış kazandırarak, kuvvetli bir yüzey gerilimi de sağlayacaktır. (Emmerich et. al., 2007)

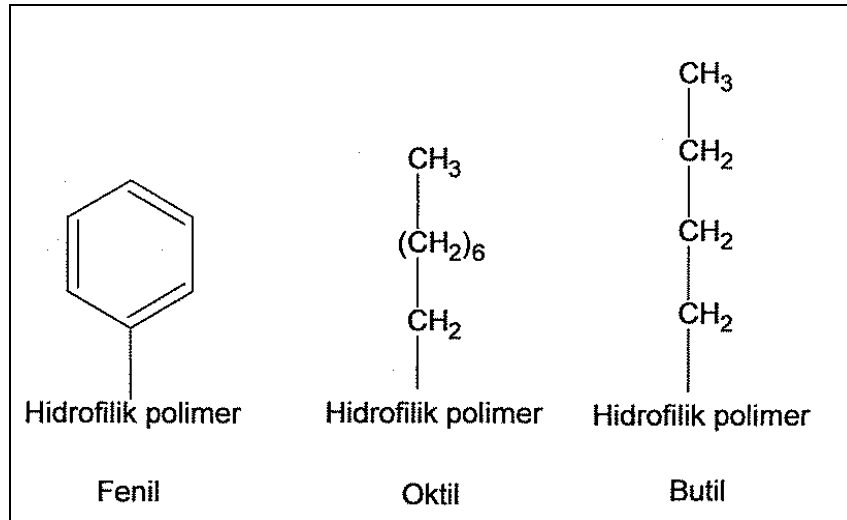
Suyun içerisine bir hidrofobik nesne batırıldığında yüzey gerilimi olayına benzer şeyler gerçekleşir. Su molekülleri, hidrofobik nesnenin yüzeyini ‘ıslatamaz’. Bunun yerine, tüm yönlerde hidrojen bağı yapma olasılığı olmaması nedeniyle hidrofobik nesnenin etrafında bir kabuk oluşturur. Bu kabuğun boyutlarının küçültülmesi, entropideki artışla (ΔS) termodinamik olarak daha çok istenen bir durumu temsil eden düzenli su moleküllerinin sayılarının azalmasını sağlayacaktır. Sonuç olarak hidrofobik yüzeyler bunu başarmak için bir araya gelirler. Bu olay, hidrofobik etkileşim olarak adlandırılır ve hidrofobik moleküller arasındaki doğrudan etkileşimden ziyade, su moleküllerinin tutulumuna bağlıdır (Özkara, 2008)

Proteinler, yüzeylerinde, hem hidrofilik hem de hidrofobik alanları taşırlar ve belirli tuzların yüksek derişimlerinde çökerler (salting out). Bunun nedeni, uygulanan hidrofobik etkileşimdir (Özkara, 2008).

HIC ortamı, proteinlerin hidrofobik yüzeyleri ile birleşebilen ligandlar içerir. Saf su içerisinde bu hidrofobik etki ne ligandlarla proteinler arasında ne de proteinlerin kendi aralarındaki etkileşimine sebep olamayacak kadar zayıftır. Bunun yanı sıra, belirli tuzlar hidrofobik etkileşimleri artırır ve bu gibi tuzların eklenmesi HIC ortamına adsorpsiyon sağlar. Seçici desorpsiyonun sağlanması için tuz, daha sonra azar azar düşürölür ve örnek bileşenler hidrofobisite sırasıyla desorbe olurlar (Özkara, 2008)

1.6.4.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC)'nin prensibi

HIC'de sabit faz, hidrofilik polimere (örneğin çapraz bağı dekstran veya agaroz) bağı küçük nonpolar gruplardan (butil, oktil veya fenil) meydana gelir. HIC'de kullanılan tipik ligandlar şekil 1.38'de gösterilmiştir (Andrea, et al.,2007).



Şekil 1.38 HIC'de kullanılan tipik ligandlar (Andrea M., et al.,2007)

Kolondan geçen, yüzeylerinde hidrofobik aminoasit yan zincirleri bulunan proteinler, kolondan hidrofobik gruplarla etkileşebilir. Örnek, proteinleri

çöktürmeyecek derecede ama yeterince yüksek derişimlerde tuz içeren (genellikle amonyum sülfat) tampon içine yüklenir. Tampondaki tuz, çözünen örneğin çözünmesini azaltır. Böylece çözülme azaldıkça, etkilenen hidrofobik bölgeler ortam tarafından adsorbe edilir. Proteinler, tampon içindeki tuz derişiminin azaltılmasına bağılı olarak desorbe edilirler (Andrea et al,2007).

Molekül ne kadar hidrofilikse, bağlanmayı destekleyecek tuza olan ihtiyaç da o kadar azalır. Proteinlerin desorpsiyonunu sağlamak için, tuz derişimi hidrofobisite artana kadar yavaş yavaş azaltılır. İlave olarak desorpsiyon, hafif organik bileşikler veya deterjan kullanımıyla da gerçekleştirilebilir. (Emmerich et al, 2007)

1.6.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisini Etkileyen Faktörler

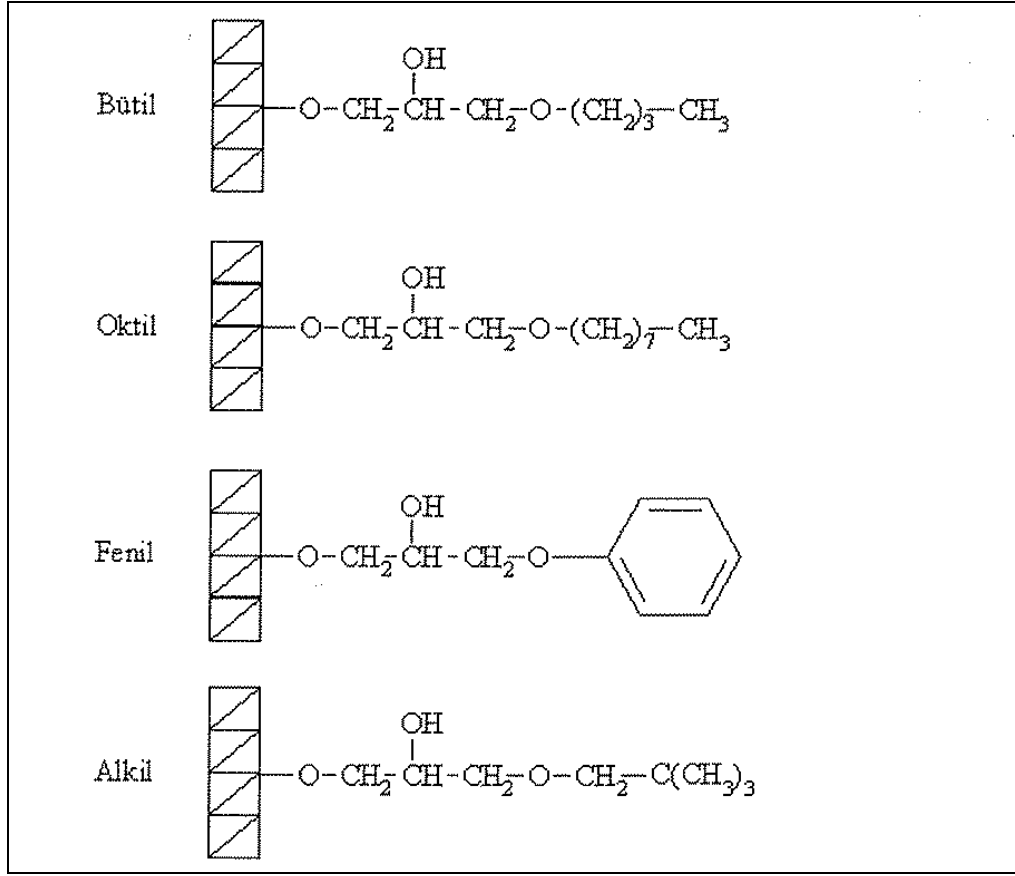
HIC ortamında protein ve peptidlerin davranışını etkileyen ve ayırımın optimizasyonunda dikkate alınması gereken pek çok faktör vardır. Bunlar:

- Ligandın tipi ve miktarı,
- Ana matriksin tipi,
- Tuz tipi ve derişimi,
- pH,
- Sıcaklık ve
- Aditifler (eklenen kimyasal maddeler)dir.

Değişik hidrofobisitelerdeki ligandlar arasında seçim yapmak önemlidir. Çünkü bu, belirli bir proteini adsorbe etmek için gerekli olan tuz derişiminin kontrol edilebilmesini sağlar. Diğer taraftan, oldukça hidrofobik proteinler, yüksek hidrofobisiteli ligandlara kuvvetli bağlanabilirler. Bunları desorbe etmek için sert ve potansiyel olarak desorbe edici koşullara (örnek: organik çözücüler) ihtiyaç duyulur (Özkara, 2008).

HIC’de matrikse immobilize edilen ligandın tipi (alkil veya aril), proteinin seçiciliğini belirler. Hidrofobiste n-oktil>fenil>n-bütül şeklindedir. Fenil immobilize kolonlar (örneğin; Phenyl Sepharose) genellikle iyi bir seçimdir. Düz alkil zincirli (hidrokarbon) ligandlar, ‘saf’ hidrofobik karakter gösterirler; aril ligandlar aromatik ve hidrofobik etkileşimlerin mümkün olduğu ‘karma’ mod özellikler gösterirler (Özkara, 2008).

Yaygın olarak kullanılan matriks tipleri kuvvetli hidrofilik karbohidratlar (örneğin; çapraz bağlı agaroz) veya sentetik kopolimer materyalleridir. Hidrofilik matriksler istenmeyen non-spesifik adsorpsiyonu minimize ettiklerinden dolayı tercih edilirler. Ana matriks yine de protein ile etkileşebilir bu da seçiciliği ve protein geri kazanımını etkileyebilir. Kopolimer desteğin seçiciliğinin, aynı tip ligand immobilize agaroz temelli matriksle kıyaslandığında, aynı olmadığı görülür. Agaroz temelli matrikste, kopolimer matriksteki gibi aynı sonuçları elde etmek için adsorpsiyon ve desorpsiyon şartlarını değiştirmek gerekir (Özkara, 2008).



Şekil 1.39 Çapraz bağlı monosakkarit birimlerin eter bağıyla bağlanmış HIC ligandları (Özkara, 2008)

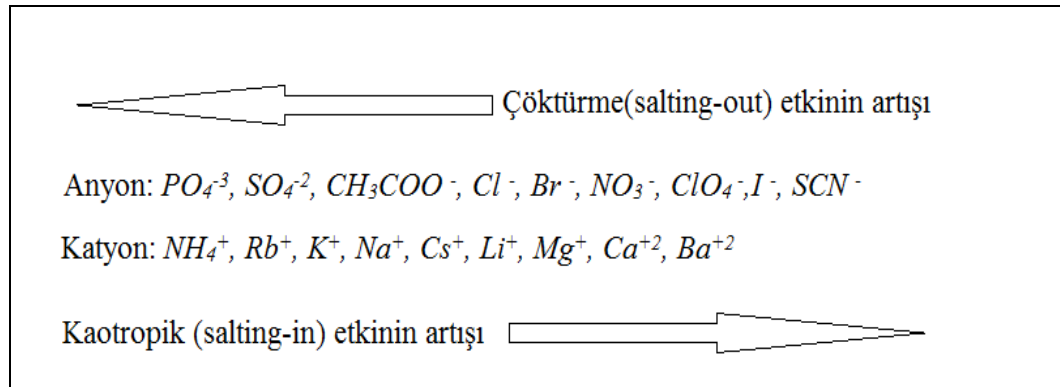
Denge tamponuna ve numune çözeltisine yüksek derişimlerde çeşitli tuzların ilavesi (salting-out) HIC’de ligand-protein etkileşmesini başlatır. Benzer tuzların derişimleri arttıkça, bağlanan proteinlerin oranı da neredeyse lineer olarak belirli bir tuz derişimine kadar artar. Daha yüksek derişimlerde eksponansiyel bir şekilde artmaya devam eder (Özkara, 2008).

Karışım içinde bulunan istenmeyen proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması, iyonik gücün (yani tuz derişiminin) kademeli artırılmasıyla gerçekleşir. Ortama eklenen nötral tuzun iyonik gücü, proteinlerin çözünürlüğünü etkiler. İyonik gücü de tuzu oluşturan anyon ve katyonların yük sayısı ve derişimi belirler. Salting-out; yüksek tuz derişimlerinde eklenen tuz kendi hidratasyonu için ortamdaki suyu tutarak, proteinlerin çözünürlüğünü azaltır. Yüksek tuz derişimi ile hidratasyon kabuğu yani proteinleri çevreleyen tuz molekülleri uzaklaştırılan proteinleri çöktürür. Salting-out etki ile çöktürülen proteinler, doğal yapılarını

koruduklarından, denatüre olmaksızın tekrar çözünür hale gelebilirler (Özkara, 2008).

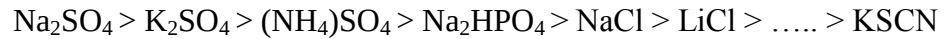
Salting-in; tampondaki tuz derişiminin azaltılması (iyonik gücün düşürülmesi) ile proteinlerin çözünürlüğünün arttırılmasıdır. Proteinler üzerindeki yük etkileşimleri korunur ve düşük tuz derişimi proteinlerin agregasyonunu ve çökmesini önler (Özkara, 2008).

HIC'de tuzların etkileri, proteinlerin çöktürülmesi veya bunun suyun molal yüzey gerilimini artırıcı olumlu etkileri Hofmeister serileri sayesinde açıklanabilir. Bu etkiler, hidrofobik etkileşmeyi başlatan kozmotropik tuzlara (örneğin; amonyum sülfat) ve hidrofobik gelişmeyi azaltan kaotropik (chaotropic) tuzlara bağlıdır (Özkara, 2008).



Şekil 1.40 Hofmeister serileri, salting-out ve salting-in etkiler (Özkara, 2008)

Aşağıda etkileşimleri artırma yeteneklerine göre sırasıyla hidrofobik etkileşimleri artıran tuzlar sıralanmıştır:



Her iki durumda da sodyum, potasyum ve amonyum sülfatlar bağıl olarak daha yüksek 'salting-out' (çöktürme) veya molal yüzey gerilimi artırma etkisi üretir. HIC içinde etkin olarak ligand-protein etkileşimini destekleyenler de yine seviyeleri civarında desorpsiyon tamponu veya suyla yıkamakla etkin olarak desorbe edilirler (Özkara, 2008).

Hidrofobik etkileşim kromatografisinin optimizasyonunda pH değerinde artma, hidrofobik etkiyi zayıflatır; bu nedenle proteinlerin hidrofilitesinde bir artış olur. Diğer taraftan pH değerinde azalma, hidrofobik etkileşimde belirgin bir artışla sonuçlanır. Dolayısıyla nötral pH'da HIC adsorbanına bağlanmayan proteinler asidik pH'da bağlanabilirler(Özkara, 2008).

Sıcaklığın artması daha kuvvetli hidrofobik etkileşmelere neden olur ve proteinlerin adsorbente bağlanması artar. Sıcaklığın artması dengeyi düzenli su formundan serbest su formuna kaydırır, sudaki hidrofobik çözünenlerin etkileşimi için geliştirilen teorilere dayanarak, Hjerten, proteinlerin, HIC adsorbentlerine, bağlanmalarının entropi ile yürütüldüğünü iddia etmiştir ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Bu da etkileşimin sıcaklık artışı ile arttığına işaret etmektedir. Bu etkinin deneysel ispatı, Hjerten ve Jennisen tarafından gösterilmiştir. Hidrofobik etkileşimleri sağlayan van der Waals çekim kuvvetleri de sıcaklığın artması ile artar (Özkara, 2008).

Düşük derişimlerde su ile karışabilir alkoller, deterjanlar, kaotropik (salting-in) tuzların sulu çözeltileri, protein-ligand arasındaki hidrofobik etkileşimleri zayıflatır ve bağlı proteinin desorpsiyonuna öncülük eder. Alkollerin non-polar kısımlarının ve deterjanların HIC ortamının adsorpsiyon bölgeleri için bağlı proteinlerle yarışması, bağlı proteinlerin yerinden ayrılması ile sonuçlanır. Kaotropik tuzlar suyun ve/veya bağlı proteinlerin dizili yapısını etkiler. Aditifler, suyun gerilimini azaltarak, hidrofobik etkileşimlerin zayıflamasına ve takiben ligand-protein kompleksinin ayrılmasına neden olur (Özkara, 2008).

1.7 Lizozim

1.7.1 Lizozim hakkında genel bilgiler

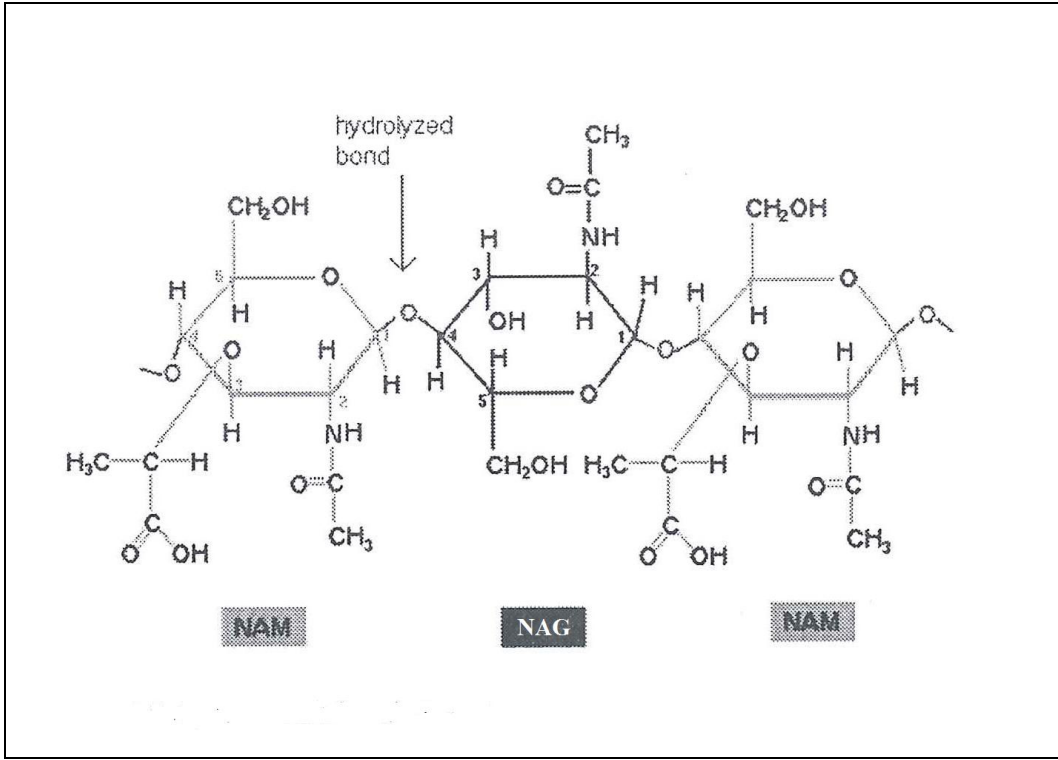
Enzimlerin antibakteriyel doğasına ilk olarak 1922 yılında Alexander Fleming şahit olmuştur. O, kendi burun mukozasındaki örneklerle petri kültüründeki bakteriyi muamele etmiş ve bir süre sonra mukusun yakınındaki bakterinin dağılmaya başladığını görmüştür. Bakteri hücrelerinin parçalanmaya veya patlamaya başlamasından dolayı hücrelerin dağılmaya başladığı görüldü. Böylece o, enzimi lizozim olarak adlandırdı. Lizozim tamamen antibiyotik amaçlı kullanışlı olmayı kanıtlamamasına rağmen, sonradan lizozimin bakteriyofajları,

bakterileri, bitkileri ve hayvanları içeren çok çeşitli organizmalarca üretildiği bulunmuştur (Fleming and Allison, 1922). Alexander Fleming, 1945 yılında penisilini keşfinden dolayı Fizyoloji ve Tıp alanındaki Nobel ödülünü almıştır (Fleming, 1945).

Lizozim küçük boyutlu olduğundan dolayı, daha ileri analizler için uygun bir molekül olduğunu kanıtlamış ve X-ışını kristalografisinin erken tarihinde etkili difraksiyonu çalışmaları için çöktürülmüştür. 1967 yılında David Phillips, tavuk yumurta akından ekstrakte edilen lizozimin üç boyutlu yapısını tanımlamıştır (Phillips, 1967).

1.7.2 Lizozimin yapısı

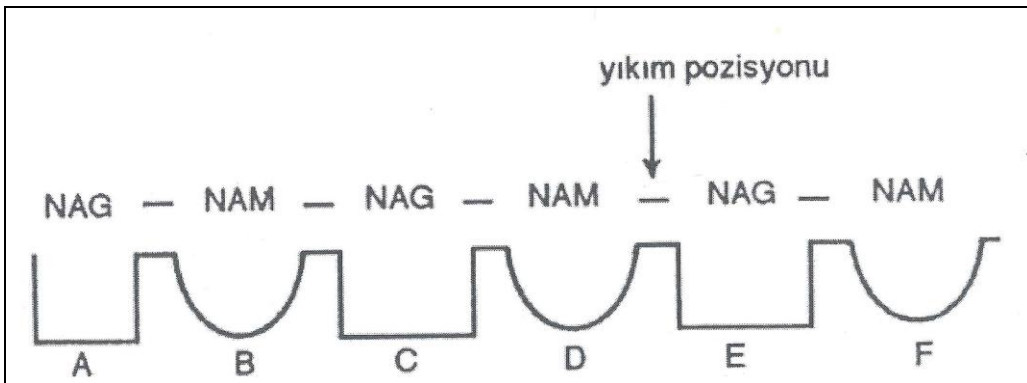
Lizozim molekülün bir tarafına doğru uzanan uzun yarık ve çukurlara sahip asimetrik elips şeklinde bir proteindir. Bu çukurlar karbohidrat substratlarının bağlanması için enzimin aktif bölgesini içerir. Bu enzim sadece polisakkaritin altı şekerine yer sağlar ve onları disakkarit tetrasakkarit alt birimlerine bağlar. Lizozim (EC 3.2.1.1.7) bakteri hücre duvarlarını parçalayan bir enzimdir. N-asetilmuramik asit (NAM) ile N-asetilglukozamin (NAG) arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağını hidrolizler. Lizozim, ökaryot canlılarda bazı enfeksiyonlu bakterilerin hücre duvarını parçalamak için kullanılır (Phillips, 1967).



Şekil 1.41 Lizozimin (NAM) ile (NAG) arasındaki $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağımlı hidrolizmesinin şematik gösterimi

İnsanda gözyaşında bulunur ve lökosit makrofajlarca gizlenir. Lizozimin varlığı birçok organizmada kanıtlanmıştır. Özellikle tavuk yumurta akında bol miktarda bulunur ve burada da antibiyotik görevi görür (Fleming, 1922).

Lizozimin sahip olduğu substrat bağlama bölgesi, amino-şeker birimlerinden ibaret substratların altısını bağlayabilecek şekildedir. (Palmer, 1994). Bu durum şekil 1.1’de şematize edilmiştir. ,



Şekil 1.42 Lizozimin substrat bağlama bölgesinin şematik gösterimi

Altı amino şekerin her biri, enzime hidrojen bağlarıyla bağlıdır; örneğin B ve C bölgelerinde aspartat-101'e, B bölgesinde triptofan-62'ye ve triptofan-63'e ve F bölgesinde asparajin-37'ye bağlanırlar. NAM, büyük laktil yan zinciri nedeniyle yer sınırlı olduğundan A, C ve E bölgelerine bağlanamaz ve D bölgesine bağlandıktan hemen sonra veya bağlanma sırasında heksoz halkası, koltuk konformasyonundan daha az kararlı olan yarı-koltuk konformasyonuna dönüşür. Hidroliz, D ve E bölgeleri arasında yer alır ve NAM'ın C(1) (indirgenen uç) ve NAG'in C(4) bölgesi arasında daima $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağı içerir.

1.7.3 Lizozimin katalitik mekanizması

Lizozim tarafından katalizlenen bir glikozidin hidrolizi reaksiyonu, bir asetalin bir hemiasetale dönüşümüdür. Non-enzimatik asetal hidrolizi, C-O bağının kırılmasıyla oluşan bir reaktif oksijenin protonlanmasını içeren asit-katalizli bir reaksiyondur. Bu oksonyum iyonu olarak adlandırılan bir rezonans kararlı karbokasyonunun oluşumu ile sonuçlanır. Maksimum orbital çakışmasını ve böylece stabilizasyonu kazanmak için oksonyum iyonlarının R ve R' grupları C, O ve H atomlarıyla aynı düzlemde olmalıdır. Bu oksonyum iyonu daha sonra hemiasetal vermek üzere suya eklenir ve asit katalizörünü yeniden üretir.

Lizozimin aktif merkezinin yakın civarında katalitik özellikler için gerekli olan fonksiyonel gruplar yalnızca Glu 35 ve Asp 52'dir. Bu birimler kırılacak $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağının her iki tarafına dağılmıştır. Asp 52 ve Glu 35 'in yan zincirleri önemli oranda farklı çevrelere sahiptir. Asp 52 polar gruplarla çevrilir ve kompleks hidrojen bağı ağına katılır. Dolayısıyla Asp 52'nin normal bir pK'ya sahip olması, deprotonlanması ve böylece lizozimin aktif olduğu pH 3 ile 8 aralığı boyunca negatif yüklü olması gerekir. Aksine, Glu 35'in karboksil grubu yoğun bir non-polar bölgededir ve karboksil gruplarının oldukça yüksek pH'larda protonlanması muhtemeldir. Hem Asp 52 hem de glu 35'in karboksil grupları ve D-NAG biriminin C(1)-O(1) bağı arasındaki en yakın temaslar yaklaşık 3 Å'dur ve bu onları sırasıyla elektrostatik ve asit katalizörleri için birincil aday yapar (Voet and Voet,1990).

1.7.4 Lizozim için önerilen Philips mekanizması

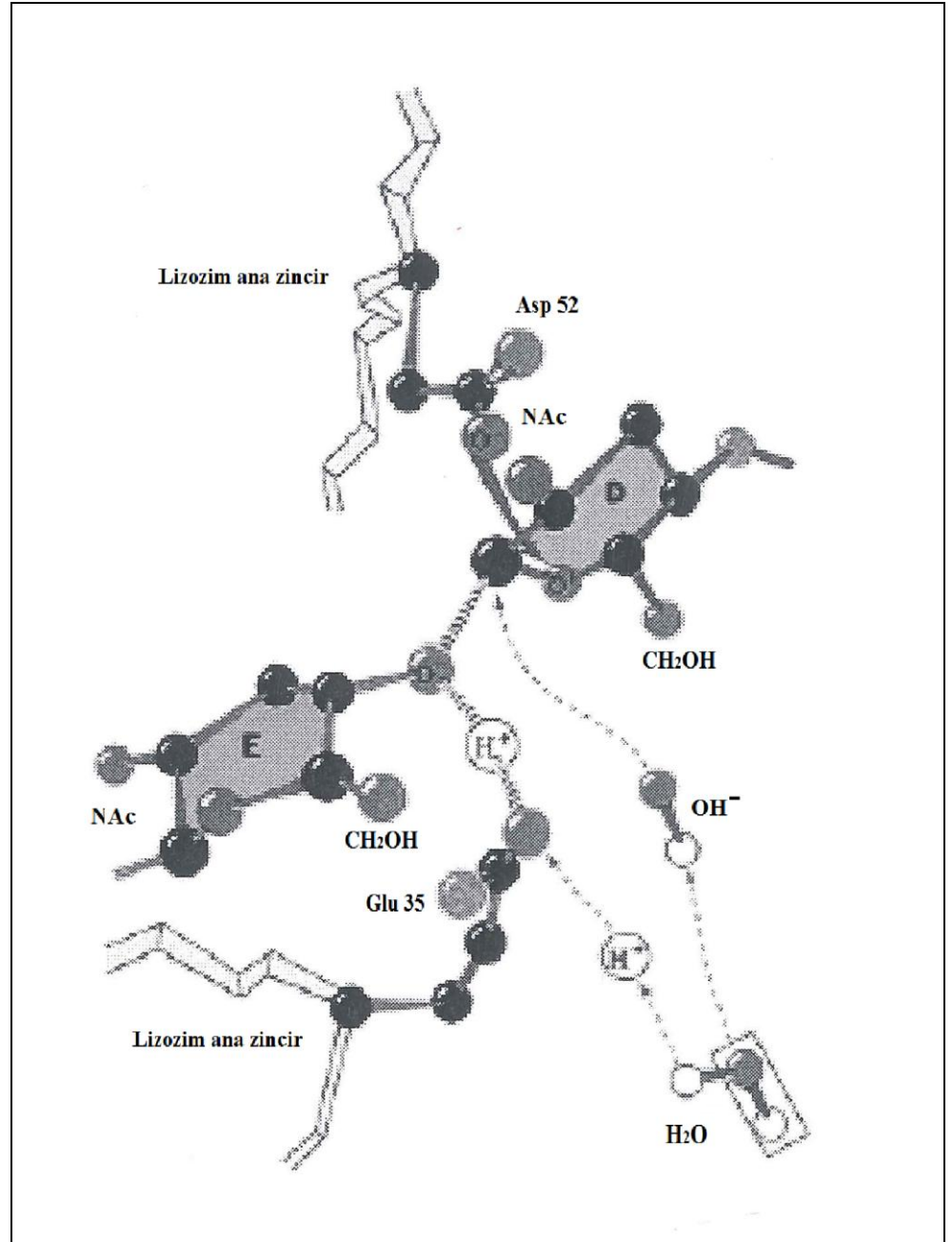
Philips, lizozim için aşağıdaki enzimatik mekanizmayı önermiştir (Şekil 1.43).

a- Lizozim, bir hekzasakkarit birimine bağlanarak bir bakteriyel hücre duvarına yapışır. Bu işlemde D birimi, $-C(6)H_2OH$ grubunun, proteinle başka şekilde yapılabilecek istenmeyen etkileşimlere karşılık olarak yarım kotluk konformasyonuna karşı isteksizdir (Phillips, 1967).

b- Glu 35, civardaki tek polar gruplu D halkasının 1 nolu oksijenine protonunu transfer eder (genel asit katalizi). $C(1)-O(1)$ bağı böylece 1 nolu C'daki rezonans-kararlı oksonyum iyonunu üreterek parçalanır (Phillips, 1967).

c- Asp 52'nin iyonlaşmış karboksil grubu, yük-yük etkileşimleri (elektrostatik kataliz) vasıtasıyla oksonyum iyonu gelişimini stabilize etmek için hareket eder. Asp 52 nin C(1) ve karboksil O atomu arasındaki yaklaşık 3 Å'lık fark nedeniyle kovalent bağ oluşmaz. Bağ yarıma reaksiyonu, D halkasında onu düzlemsel yarım koltuk konformasyonuna zorlayan mevcut gerilme ile kolaylaştırılır. Bu, oksonyum iyonunun istenen düzlemselliğinin bir sonucudur yani D halkasının başlangıç bağlanma konformasyonu, reaksiyonun geçiş halinin konformasyonuna benzer (Phillips, 1967).

d- Bu noktada enzim, bir glikozil-enzim araürünü veren bağlı polisakkarit ile hidrolizlenmiş E halkasını serbest bırakır. Bu oksonyum iyonu, ardından ürün oluşturmak ve Glu 35'i yeniden protonlamak için önceki adımların tersine çözültiden gelen H_2O 'ya bağlanır. Bu reaksiyonun konfigürasyonunun muhafazası, oksonyum iyonlarından birinin enzimatik parçalanmayla karşılaştığında korunmasını gerektirir. Enzim daha sonra katalitik döngüyü tamamlamak üzere D halkası ile ona bağlı sakkarit ürününü serbest bırakır (Phillips, 1967).



Şekil 1.43 Lizozim reaksiyonu için Philips mekanizması

Lizozimin önemli katalitik grupları olan Asp 52 ve Glu 35, grup spesifik reaksiyonların kullanımı vasıtasıyla deneysel olarak tanımlanmıştır.

Ayrıca, lizozimin pH hızı profilinin analizi, bu enzimin pK'ları 3,8 ve 6,7 olan katalitik olarak önemli 2 iyonlaşabilir gruba sahip olduğunu göstermiştir. Bu ikinci iyonlaşma, bir karboksil grubu için anormal derecede yüksek olmasına rağmen, bu iyonlaşmanın lizozimin I2 oksidasyonu ile yok olması nedeniyle Glu

35'e atfedilir. Bu iyonlaşma için diğer tek mantıklı olasılık, bu pK'nın lizozimin tek olan Histidin biriminin olmasıdır fakat bu birim aktif bölgeden oldukça uzakta bulunmaktadır. Trietoksonyum floroborat ile muamele edilmiş enzimde pK 3,8'deki iyonlaşmanın gözlenememesi bu iyonlaşmanın Asp 52 nedeniyle olduğunu gösterir. Bu gözlem, lizozimin yalnızca Asp 52 iyonlaştığında ve Glu 35 iyonlaşmadığında aktif olduğu mekanistik kabulünü doğrular (Voet and Voet, 1990).

Glu 35 ve Asp 52 yanında lizozimin diğer karboksil grupları, substratın varlığında karboksile özgü ajanlarla lizozimi reaksiyona sokarak gösterildiği üzere katalitik işleme katılmazlar. Bu muamele, Glu 35 ve Asp 52 dışındaki tüm karboksil grupları türevlendirildiğinde enzimin neredeyse tamamen aktif olduğu sonucunu verir. Diğer grup spesifik ajanlarla modifiye olan örneğin; His, Lys, Met veya Tyr birimleri, temel protein yapısı bozulmalarına hiç neden olmaz fakat lizozimin katalitik etkinliğinde biraz değişikliğe sebep olur (Voet and Voet, 1990).

1.7.5 Lizozim saflaştırılması ve önemi

Lizozim, birçok doku ve biyolojik sıvıda yer almakta olan güçlü antibakteriyel özelliğe sahip bir enzimdir. Polimorfonükleer lökositler tarafından sentezlenir ve tavuk yumurtasında, bitkilerde, bakterilerde, gözyaşı, tükürük, süt, solunum sıvıları ve servikal sıvılar gibi hayvansal salgılarda bulunur. Lizozim, gram pozitif bakterilerin peptidoglikan yapıdaki hücre duvarında bulunan N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit arasındaki bağları kıran enzim sınıfındadır. Antimikrobiyal aktivitesinin yanında bazı virüslerin inaktivasyonu, memeli hücre membranlarının düzenlenmesi, polimorfonükleer lökosit ve makrofajların fagositik aktivitesinin artırılması ve monositlerin antitümör fonksiyonlarının yaygınlaşmasının uyarılması gibi birçok fonksiyona sahiptir (İbrahim, 2001).

Lizozim, dayanıklı, iyi karakterize edilebilen, ucuz ve kolaylıkla analizlenebilen bir enzimdir. Tavuk yumurtası gibi ucuz bir kaynaktan bol miktarda elde edilebilmektedir (bir tavuk yumurtasından 20 mg'ın üzerinde liyofilize lizozim elde edilebilir.). Hammaddeden kolaylıkla üretilabilir olması

sebebiyle özellikle biyokimya laboratuvarlarında saf protein olarak kıdemli bir yeri vardır (Strang, 2010).

Sayılan özellikleri sayesinde, lizozim gıda, medikal, biyoteknoloji gibi alanlarda geniş bir potansiyele sahiptir. Peynirlerde ‘late gas blowing’ (bir çeşit kontaminasyon) durumunu engellemede, düşük sterilizasyon sıcaklıklarında gıda konservelemede ve immobilize enzim kolonlarında lizozim ko-immobilizasyonu ile otosterilizasyonda kullanılabilmektedir (Proctor and Cunningham, 1988).

Lizozimin izolasyon ve saflaştırılması için birçok yöntem kullanılmaktadır. Klasik kristalizasyon metodu endüstride büyük ölçüde yer bulmuştur (Alderton et al, 1945, Alderton and Fevold, 1946, Durance and Nakai, 1988). İyon değişimi ve afinite kromatografisi gibi daha gelişmiş metotlar da birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (Imoto et al, 1968, Cherkasov and Kravchenko, 1969, Imoto and Yagishita, 1973, Cornelius et al, 1974, Bailon and Nishikawa, 1977, Fernandez-Sousa et al, 1978, Muzarelli et al, 1978, Yamasaki and Eto, 1981, Chang et al, 1986a,b, Li-Chan et al, 1986, Durance and Nakai, 1988). Ancak iyon değişim reçinelerinin düşük kapasiteli oluşu ve afinite destek materyalinin yüksek fiyatı nedeniyle ticari uygulamaları sınırlanabilmektedir. Membran filtrasyonu (ultrafiltrasyon) yöntemi de lizozim ayrılmasında kullanılabilmektedir (Chang et al, 1986a). Ancak bu yöntemle de sınırlı spesifik aktiviteye sahip ham lizozim üretilmektedir (Chiang et al, 1993).

Bu çalışmada, sentezlenen dialdehit monomerlerin hidrofobik bölgeye sahip olması sebebiyle, sentezlenen kriyojellere hidrofobisite kazandıracağı düşünülmüştür. Kriyojel sentezinin karakterizasyonu sonucu başarılı olduğu görülmüş, böylelikle hidrofobik etkileşim kromatografisi yönteminden faydalanılarak lizozim adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları yapılmış, kriyojellerin lizozim saflaştırılmasında kullanılabiliirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2 KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Dialdehitler ile ilgili kaynak özetleri

Aromatik polişif bazları aromatik dialdehit ve diamin reaksiyonu ile elde edilmiştir.

1957 yılında Marvel ve Tarköy, 5.5'-metilenbis salisilaldehit ve o-fenilendiamin kullanarak tetrahidrofuran içinde asetik asit kataliziyle OH-süstitüe poliimin sentezi yapmışlardır.

Stivala ve çalışma arkadaşları azulen-1,3-dialdehit ve çeşitli aromatik diaminler kullanarak dimetilformamid içinde 250° C 'de 8 saat ısıtarak azulen halkası içeren siyah poliimin sentezlemişlerdir.

Dupont'un grubu da termotropik poliimin fiberinin patentini almışlardır. Bu sentezde aromatik dialdehit ve diaminlerin kondenzasyonu ile yüksek dirençli oligomerik poliiminler elde edilmiştir.

1923'te Adams ve arkadaşları tereftitalaldehit ve benzidini alkol içerisinde kaynatarak halkalı dimer sentezlemişlerdir.

Azeotrop (eşkaynar) bir metot kullanarak Davydov, Krantsel, Popov ve Prokofeva, tereftitalaldehit ile fenilendiaminin benzen içerisinde geri akışını (refluks) sağlamışlardır. Bunun sonucunda da halkalı bir oligomer elde etmişlerdir.

Yoda ve arkadaşları 3,3' -benzidinkarboksilik asit veya benzidini aromatik dialdehitlerle dimetilformamid içinde tepkimeye sokmuştur. Sonuç olarak düşük molekül ağırlıklı oligomerler olan piridin veya polifosforik asit elde etmişlerdir.

Dyer ve Anderson, çeşitli aromatik diaminler ile tereftitalaldehiti dimetilsülfoksit, N-metilpirolidon veya asetik asit içerisinde tepkimeye sokmuştur fakat onlar da düşük molekül ağırlıklı oligomerler elde etmişlerdir.

Suematsu da 1981 yılında poliimin sentezi için yeni bir çözelti ortamı hazırlamıştır. Diamin ve dialdehit kondenzasyonunu *m*-kresol ile kolaylaştırmış

ve limon sarısı ile turuncu arasındaki renk tonlarında polimer elde etmiştir.

Hong-Ku ve arkadaşları, 2002’de dialdehit karbazol monomer ve naftalen konjuge polimer içeren LED cihazı elde etmiş ve özelliklerini araştırmışlardır. Bu kondenzasyon polimeri yüksek termal kararlılık ve iyi bir çözünürlük göstermiştir. 2,6- bağlı naftalen ve karbazol içeren polimer elektrolüminesans emisyonunda neredeyse beyaz ışık göstermiştir.

Abd-El-Aziz ve arkadaşları, 2002’de iki terminal aldehit grubuna sahip siklopentadienil demir içeren aromatik eter kompleksi sentezlemişlerdir. Bu sentez metal aracılı nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonuyla gerçekleştirilmiştir. Bu dialdehit monomer daha sonra alifatik ve aromatik diamin çeşitleriyle reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu sentezdeki amaç çözülebilir katyonik organodemir polieter-imin olarak kullanılabilir polimer elde etmektir.

Wu ve Chen, 2002’de Wittig reaksiyonu ile yeni lüminesans polimer sentezlemişlerdir. Bu sentezde fenotiazin dialdehit monomeri ve bisfosforyum tuz monomerleri kullanılmış ve iki çeşit lüminesans polimer sentezi gerçekleştirmişlerdir.

Tüm bunların yanı sıra dialdehit moleküller polimer sentezlerinde çapraz bağlayıcı ve aktive edici olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde kullanılan en yaygın dialdehit glutaraldehitir. Hedström ve arkadaşları, 2008’de monolitik makroporöz albümin/kitosan kriyojelini sentezlerken çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanmışlardır. Kumar ve arkadaşları da, 2005’te sentezledikleri kriyojel boncukları aktive etmek için glutaraldehit kullanmışlardır.

Bu çalışmada da sentezlenen dialdehit kriyojele dehidrasyonla bağlanmıştır. Dialdehitin hidrokarbon gövdesi sayesinde yüksek derecede hidrofobik bir ortam sağlanmıştır. Bu bölgeye lizozim enzimi hidrofobik etkileşimle adsorbe olacağından sentezlenen kriyojelin lizozim saflaştırılmasında kullanılabileceği düşünülmüştür.

2.2 Kriyojeller ile İlgili Kaynak Özetleri

Kumar ve arkadaşları, 2003’te insan periferik lenfsositlerinin sürekli, süpermakrogözenekli, monolitik kriyojel afinite kromatografisiyle spesifik

ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Bu yeni ayırma stratejisinde hücre yüzeyinde İmmunoglobulin G (IgG) bulunduran *Staphylococcus aureus* bakterisindeki protein A ile polimerin etkileşiminden yararlanılmıştır.

Yine Kumar ve arkadaşları, 2005'te hücre yüzey merkezi olarak CD34+ antijenine sahip akut miyeloid lösemi hücrelerin ayrılması için afinite kolonlara dayalı bir model sistem geliştirilmiştir. Polivinil alkol (PVA) kriyojele protein A immobilize edilmiş ve bu kriyojele lösemi hücreleri tutundurulmuştur. Klinik uygulamalarda, kök hücre gelişimi ve fetal hücre teşhisinde kullanılması amaçlanmıştır.

Yanina ve arkadaşları da, 2013'te pektin-PVA kriyojele keratinaz ve enroflaksin immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu polimeri yanık tedavilerinde, diabette kapanmayan yarada mikrop üremesi veya virüs yerleşmesini önlemek amacıyla geliştirmişlerdir.

Chang ve arkadaşları, 2013 yılında, suni doku sentezlemek amacıyla jelatin(%4-10) ve hyaluronik asit(%0.25) içeren kriyojeller sentezlemişlerdir. Bu kriyojeller %90'ın üzerinde poröziteye sahiptir ve por çapları yaklaşık 200 µm'dir. Jelatin konsantrasyonunu arttırdıklarında por çapı, porözitesi ve şişme derecesi düşmüş ancak şişme kinetiğinin artmış olduğunu gözlemişlerdir.

Biyolojik moleküllerin saflaştırılması için akrilamid bazlı süpermakrogözenekli monolitik kolonların kromatografi ortamı olarak hazırlanmasına yönelik çalışmalar da son zamanlarda literatüre girmiştir. Daoud-Attieh ve arkadaşları, 2013'te sığır serumundan IgG'nin pseudo-spesifik saflaştırılmasında kriyojelleri kullanmışlardır. Pseudo-spesifik denmesinin amacı, çalışmada (histidin yerine) vinilimidazol kullanılmış olmasıdır. Vinilimidazol de yapısında 2 azot bulundurduğu için onun lewis bazı gibi davranmasını sağlamış ve imidazol histidin gibi davranarak biyomoleküllerle (IgG) etkileşime girmiştir.

IgG genellikle immüno-teşhis kitlerinde, immünoafinite kromatografisinde ve çeşitli tedavilerde kullanılmak üzere saflaştırılmaktadır. Babac ve arkadaşları, 2006'da konkanavalin A immobilize kriyojeller ile IgG saflaştırmayı

amaçlamışlardır. Konkanavalin A molekülleri aktif bölgeler üzerinden poli(akrilamid-allil glisidil eter) [poli(AAm-AGE)] monolitik kriyojellere kovalent olarak bağlanmıştır. İnsan plazmasından %85 saflıkta ve daha yüksek kapasitede IgG adsorpsiyonu gerçekleşmiştir(25,6 mg/g).

Uzun ve arkadaşları da, 2013 yılında kan plazmasından eşzamanlı olarak albümin ve IgG ayırımında kullanılmak üzere alternatif bir matriks geliştirmişlerdir. Bu matriksin kan ile ilişkili proteomik çalışmalarında yararlı olabilecek büyük ölçekli plazma örneklerinin hazırlanmasında kullanılması amaçlanmıştır.

Moleküler baskılama yöntemiyle kriyojeller biyolojik moleküllerin saflaştırılmasına ve tayinine olanak verir. Bereli ve arkadaşları, 2008’de lizozim baskılanmış kriyojel sentezlemişlerdir. Çalışmanın amacı, yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanılabilecek bir kriyojel elde etmektir. Ertürk ve arkadaşları da, 2013’te insan dişeti fibroblast kültüründen antiviral, antiproliferating ve bağışıklık sistemini düzenleyici bir protein olan interferon-alfayı moleküler baskılama yöntemiyle saflaştırmayı amaçlayan bir kriyojel sentezi gerçekleştirmişlerdir.

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Kimyasal Maddeler

3-hidroksibenzaldehit, 1,5-dibromopentan, 1,6-dibromoheksan, sodyum karbonat, 2-hidroksietilmetakrilat(HEMA), amonyum persulfat(APS), *N,N,N',N'*-tetrametilen diamin(TEMED), *N,N'*-metilen bisakrilamit (MBSA), lizozim ve potasyum tiyosiyanat (KSCN), Sigma-Aldrich firmasından; 4-hidroksibenzaldehit, Merck; salisilaldehit, *N,N*-dimetilformamid(DMF) de Fluka firmasından temin edilmiştir.

3.2 Deneysel Çalışmalar

Bu çalışma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları altı ana grupta toplamak mümkündür. Bunlar:

-Heterosiklik dialdehit monomerlerin sentezi (*p*-DFDFP,*o*-DFDFP,*m*-DFDFP, *p*-DFDFH, *o*-DFDFH, *m*-DFDFH olmak üzere altı adet)

-Monomerlerin saflık kontrolü,

-Monomerlerin karakterizasyonu,

-Poli(HEMA-(monomer)) kriyojellerin sentezi,

-Kriyojellerin karakterizasyonu,

-Kriyojel polimere lizozim adsorpsiyonu ve desorpsiyon şartlarının optimizasyonunun kesikli sistemde incelenmesidir.

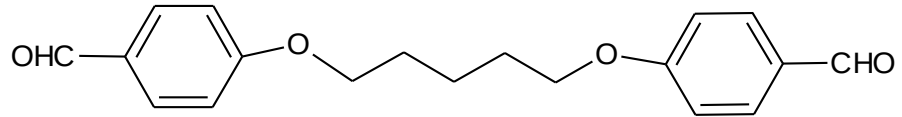
Çizelge 3.1 Monomer sentezinde kullanılan başlangıç maddeleri

	dibromoalkan	hidroksibenzaldehit
<i>p</i>-DFDFP	1,5-dibromopentan	4-hidroksibenzaldehit
<i>p</i>-DFDFH	1,6-dibromoheksan	4-hidroksibenzaldehit
<i>o</i>-DFDFP	1,5-dibromopentan	2-hidroksibenzaldehit
<i>o</i>-DFDFH	1,6-dibromoheksan	2-hidroksibenzaldehit
<i>m</i>-DFDFP	1,5-dibromopentan	3-hidroksibenzaldehit
<i>m</i>-DFDFH	1,6-dibromoheksan	3-hidroksibenzaldehit

3.2.1 Dialdehit monomer sentezi

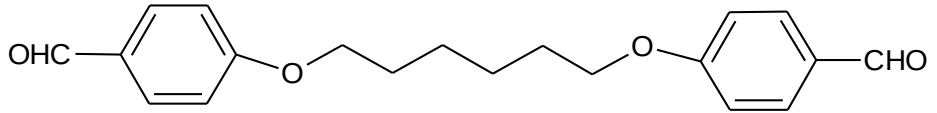
Dialdehit monomerlerin sentezi, çizelge 3.1’de belirtilen başlangıç maddeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan sentezde, her monomer için aynı prosedür kullanılmış, yalnız başlangıç maddeleri farklıdır. Kullanılan prosedür, 3.2.1.1’de *p*-DFDFP bileşiği için detaylı açıklanmıştır. Sentezlenen maddeler her basamakta ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin organik formülleri aşağıda gösterilmiştir.



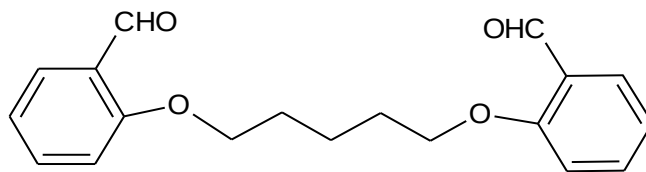
4,4'-diformil-1,5-difenoksipentan (p-DFDFP)

Bileşik I



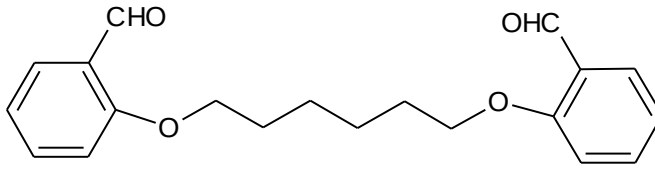
4,4'-diformil-1,6-difenoksihekzan (p-DFDFH)

Bileşik II

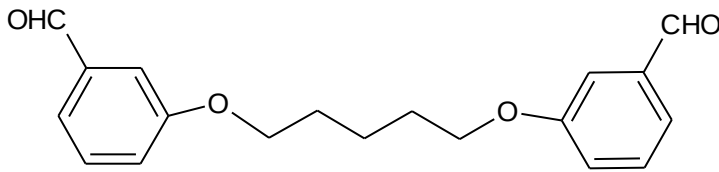


1,1'-diformil-1,5-difenoksipentan (o-DFDFP)

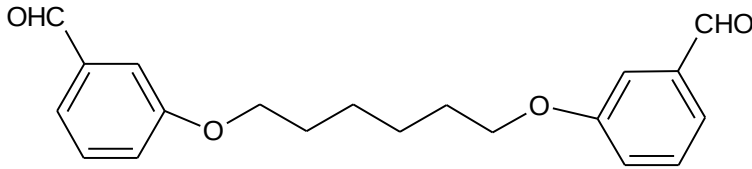
Bileşik III



1,1'-diformil-1,6-difenoksiheksan (o-DFDFH)

Bileşik IV

3,3'-diformil-1,5-difenoksipentan (m-DFDFP)

Bileşik V

3,3'-diformil-1,6-difenoksiheksan (m-DFDFH)

Bileşik VI**3.2.1.1 p-DFDFP Bileşiğinin Sentezi**

0.2 mol 4-hidroksibenzaldehit, 25 ml DMF'te çözüldü ve 0.25 mol sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 0.1 mol 1,5-dibromopentan bu karışıma eklendikten sonra 4 saat 150°C 'de manyetik karıştırıcıda reaksiyon gerçekleştirildi. Bu kimyasal tepkime periyodunun sonunda karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve ardından yaklaşık 5°C suyun içerisine döküldü. Oluşan çökelek süzildükten sonra KOH ve su ile yıkandı, kurutuldu ve etanolden kristalize edildi.

3.2.2 Dialdehit monomerlerin saflık kontrolü

Monomerlerin karakterizasyonu ince tabaka kromatografisi (İTK), Erime derecesi tayini, fourier transform infra-red spektroskopisi (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleriyle yapıldı.

Sentez çalışmaları esnasında tepkimeleri ve elde edilen bileşikleri takip etmek için ince tabaka kromatografisinden (İTK) ve erime derecesi tayininden yararlanılmıştır. İTK kullanılarak yapılan çalışmalarda Kieselgel 60 F254 (Merck 5715) 20x20 cm boyutlarında 0,25 mm kalınlıkta hazır plaklar kullanılmıştır. İTK uygulamalarında çözücü sistemi olarak *m*-DFDFP, *m*-DFDFH, *o*-DFDFP, *o*-DFDFH için kloroform/hekzan (30/1); *p*-DFDFP ve *p*-DFDFH için kloroform/hekzan (10/1) karışımı kullanılmıştır.

3.2.3 Dialdehit monomerlerin karakterizasyonu

Bileşiklerin karakterizasyonu FTIR spektrumu, Perkin Elmer 100 FTIR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Dialdehit monomerler, KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılarak tablet haline getirilip 4000-450 cm⁻¹ aralığında FTIR spektrumu çekilmiştir.

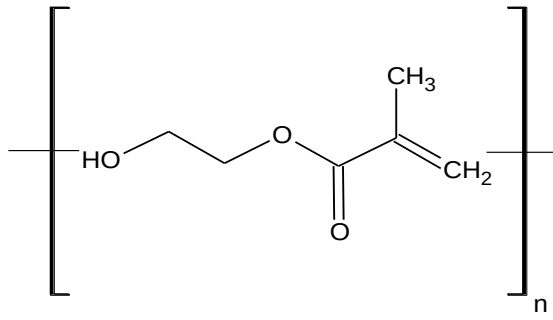
¹H NMR spektrumları, CDCl₃ çözücüsü kullanılarak ¹H NMR Varian AS 400 Mercury Plus NMR spektrometresinde alındı.

3.2.4 Dialdehit monomerler ile polimerik kriyojellerin hazırlanması

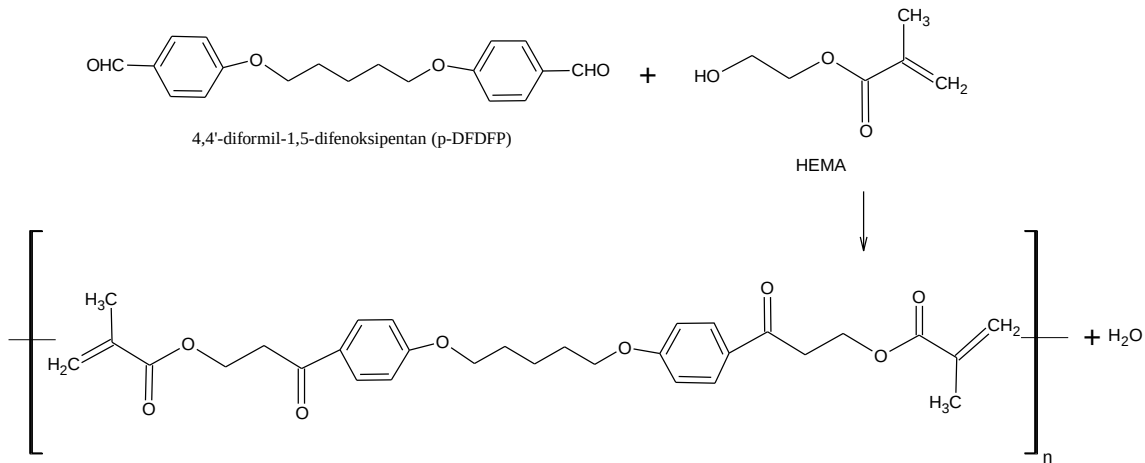
Kriyojeller serbest radikal polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır. MBSA ve HEMA su içerisinde, seçilen dialdehit monomer de metanol içerisinde çözüldü. Çözünme gerçekleşince üç çözelti bir yerde toplandı ve manyetik karıştırıcı ile karıştırırken içerisine reaksiyonu başlatıcı APS eklendi. Çözünmesi için kısa bir süre beklendi. Ardından reaksiyonu hızlandırıcı TEMED de bu karışıma ilave edildi ve fazla bekletilmeden enjektörlere konup -12 °C'de 24 saat

bekletildi. Sürenin sonunda kriyojeller su ile yıkanıp adsorpsiyona hazır hale getirildi. Sentezin yapılaş şeması şekil 3.8’de verilmiştir.

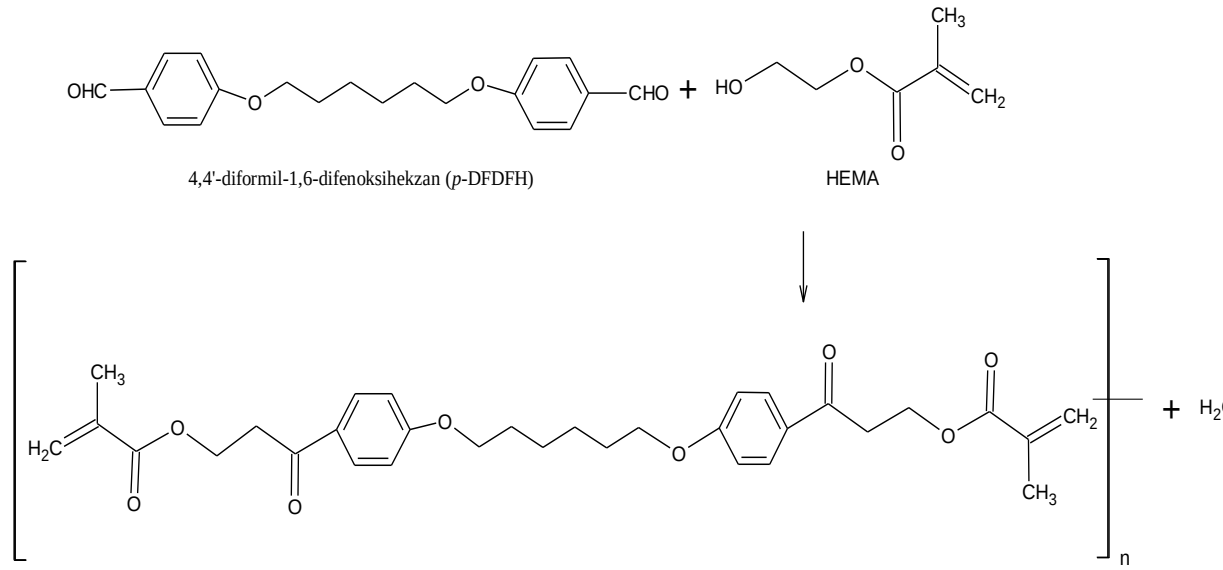
Bu metotla da Poli(HEMA-*p*-DFDFP), Poli(HEMA-*p*-DFDFH, Poli(HEMA-*o*-DFDFP, Poli(HEMA-*o*-DFDFH), Poli(HEMA-*m*-DFDFP) ve Poli(HEMA-*m*-DFDFH) olmak üzere altı farklı kriyojel ve kontrol grubu olarak monomer konulmadan yalnızca HEMA kullanılarak poli(HEMA) kriyojeli sentezlenmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7).



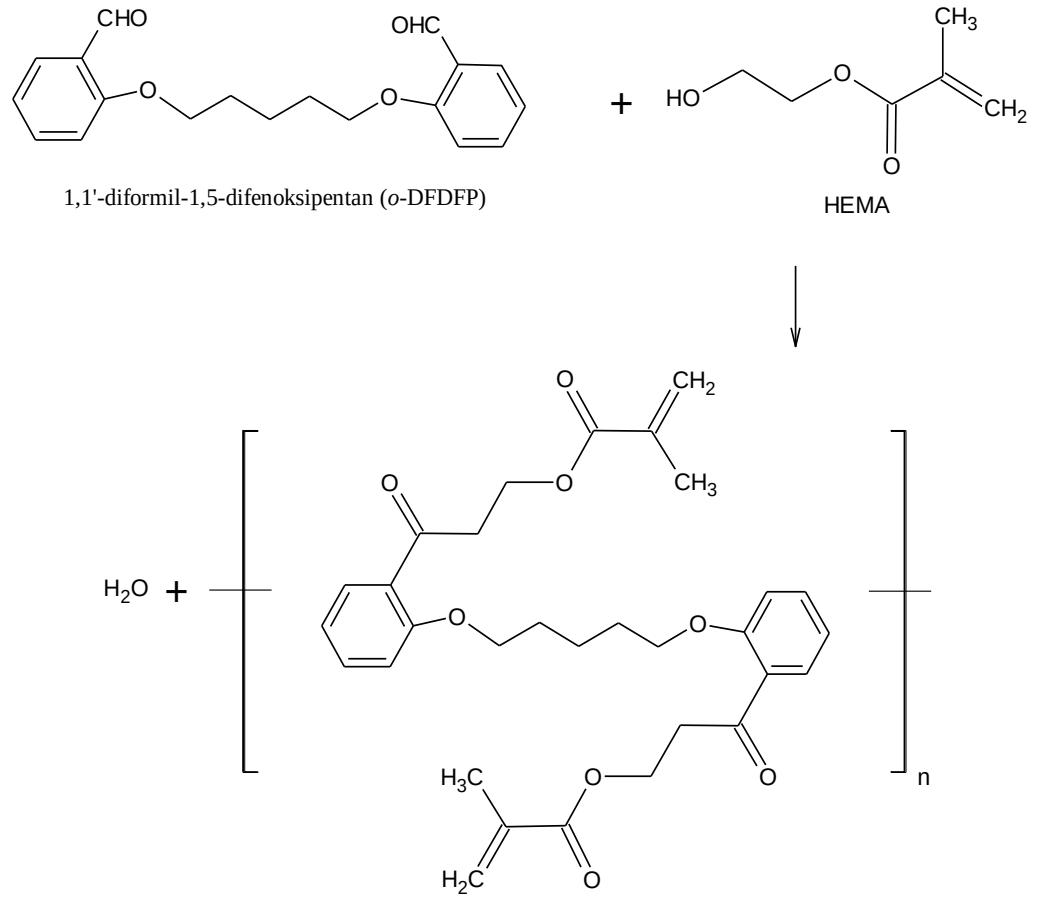
Şekil 3.1 Poli(HEMA) kriyojelin molekül formülü (Bileşik VII)



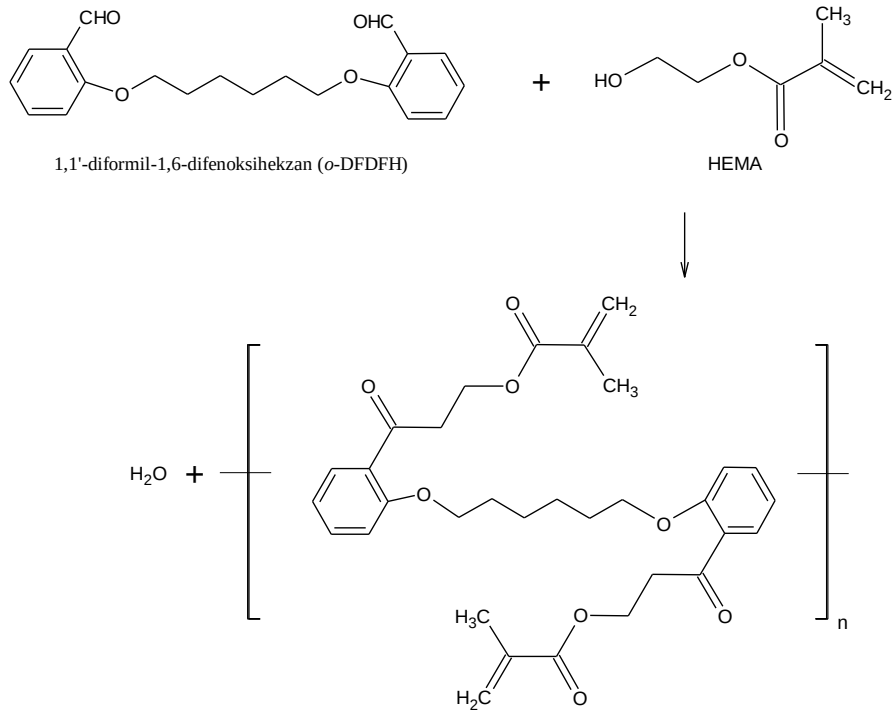
Şekil 3.2 Poli(HEMA-*p*-DFDFP) oluşum reaksiyonu (Bileşik I-A)



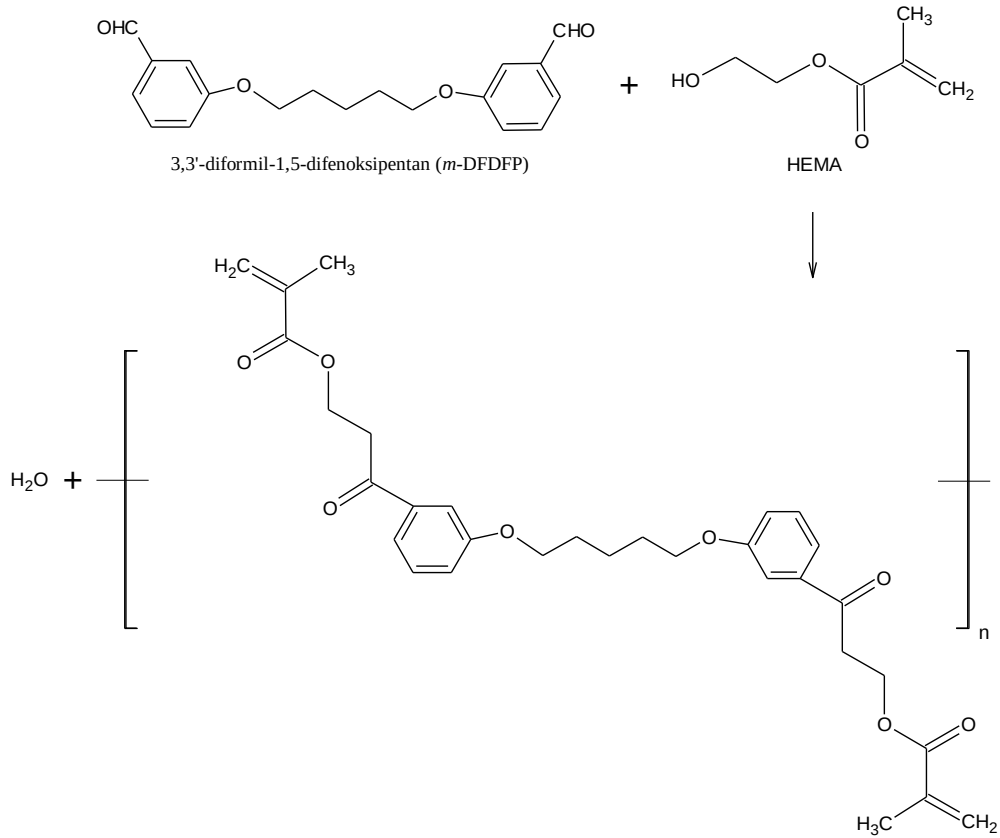
Şekil 3.3 Poli(HEMA-*p*-DFDFH) oluşum reaksiyonu (Bileşik II-B)



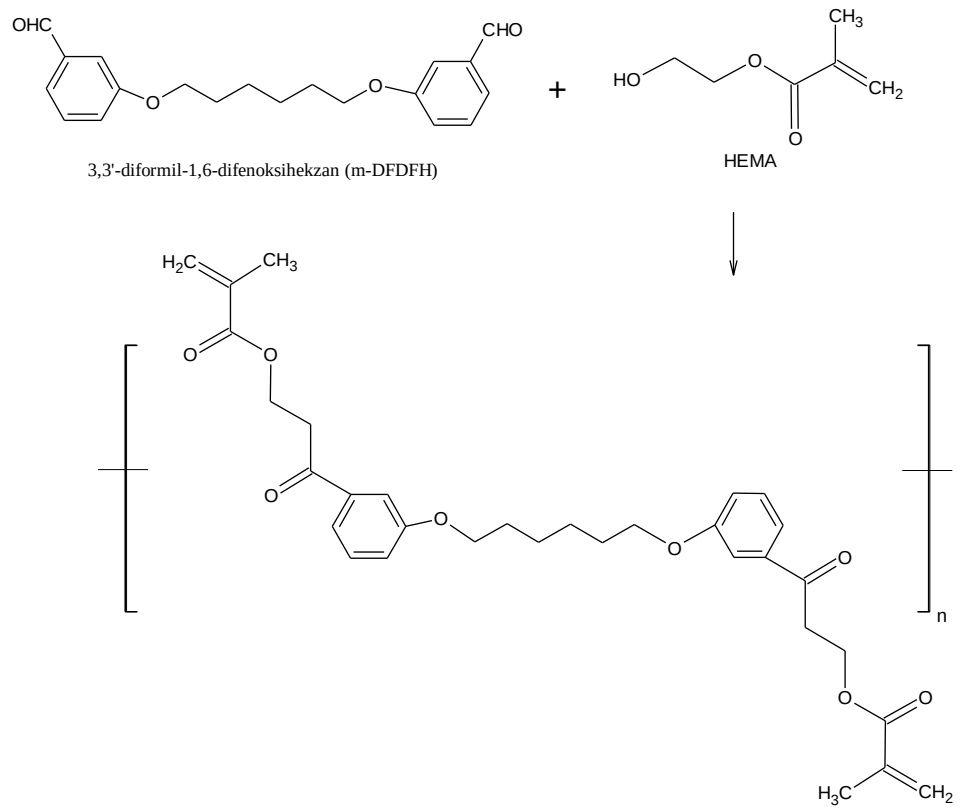
Şekil 3.4 Poli(HEMA-*o*-DFDFP) oluşum reaksiyonu (Bileşik III-C)



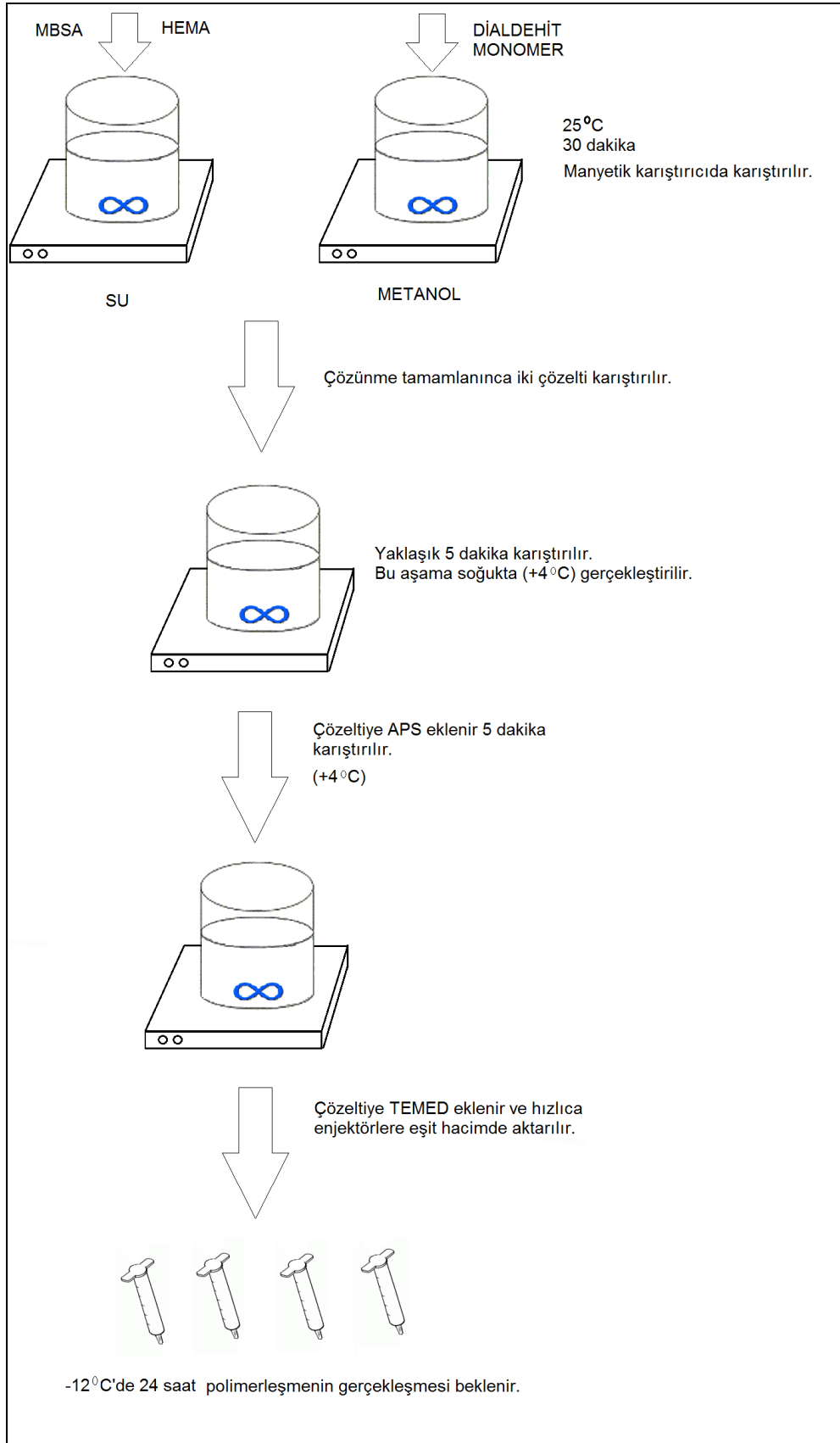
Şekil 3.5 Poli(HEMA-*o*-DFDFH) oluşum reaksiyonu (Bileşik IV-D)



Şekil 3.6 Poli(HEMA-*m*-DFDFP) oluşum reaksiyonu (Bileşik V-E)



Şekil 3.7 Poli(HEMA-*m*-DFDFH) için molekül formülleri (Bileşik VI-F)



Şekil 3.8 Polimerik kriyojellerin sentez şeması



Şekil 3.9 Kriyojellerin sentez sonrası görüntüsü

3.2.5 Sentezlenen polimerik kriyojellerin karakterizasyonu

Tezin ilk kısmında sentezlenen dialdehit monomerlerin kopolimer olarak kullanılması sonucu elde edilen kriyojellerin bir kısmı adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere ayrılırken, bir kısmı da karakterizasyon için ayrılıp kurutuldu. Kriyojelleri karakterize etmek amacıyla, şişme testi, FTIR spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemleri kullanıldı.

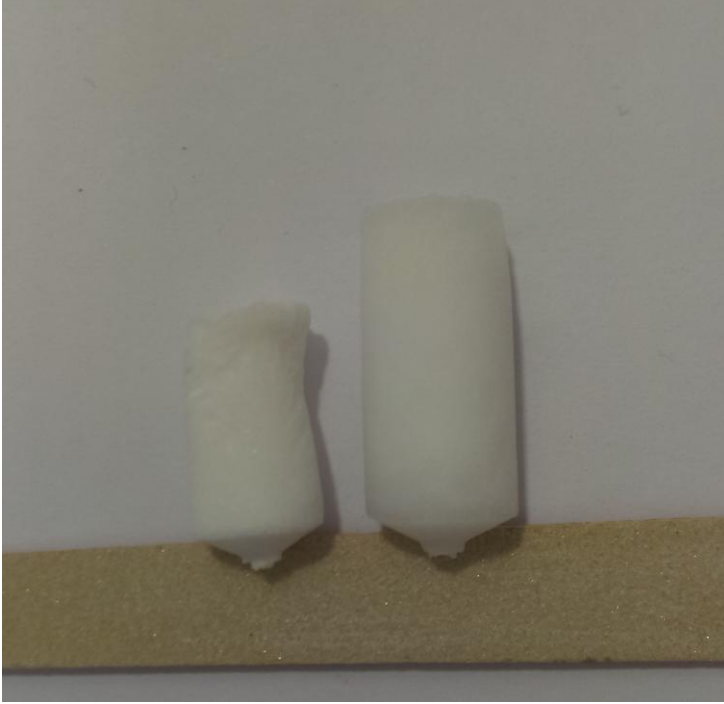
Poli[HEMA-(dialdehit monomer)] polimerlerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer 100 FTIR) kullanılarak elde edildi. Kurutulmuş kriyojeller, KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılarak tablet haline getirilip $4000-450\text{ cm}^{-1}$ aralığında FTIR spektrumu çekildi.

Poli[HEMA-(dialdehit monomer)] polimerlerinin SEM fotoğrafları için SEM cihazı (Quanta 250 S FEG) kullanıldı. Kriyojeller önce kurutuldu, sonrasında polimerin iletkenliğini arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapılarak görüntü alındı. Polimerin morfolojik özellikleri ve boyutu incelendi.

Şişme derecesi tayin edilirken her bir kriyojel etüvde 60°C de 1 gün süreyle bekletilmiştir daha sonra kuru kütlesi tartılarak belli dakikalarda (0., 1., 5., 10., 15., 30., 45., 60., 120., 240.) saf suda bekletilip tartımları alınmıştır. Şişme derecesi eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplandı. Şekil 3.2’de kriyojelin şişmiş ve kuru

görüntüleri verilmiştir. Sentezlenen her bir kriyojelde görüntü benzer olarak gözlenmiştir.

$$\text{şişme derecesi} = \frac{\text{şişen kütle} - \text{kuru kütle}}{\text{kuru kütle}} \times 100 \quad (3.4)$$



Şekil 3.10 Kuru ve şişmiş kriyojellerin görüntüsü

3.2.6 Lizozim adsorpsiyon çalışmaları

Poli[HEMA-(dialdehit monomer)] kriyojellerine lizozim adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde incelendi. Polimerik yapılar 20 ml enzim çözeltileriyle 1 saat süresince adsorpsiyona tabi tutuldu. Adsorpsiyon deneylerinde pH, lizozim başlangıç derişimi ve sıcaklığın lizozim adsorpsiyonuna etkileri incelendi. Çözeltilerdeki lizozim derişimi 280 nm’de spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Kriyojele lizozim adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi için eşitlik 3.1 kullanılmıştır.

$$q = \frac{(C_0 - C).V}{m} \quad (3.1)$$

Burada q, birim kriyojel üzerine adsorplanan lizozim kütlesini (mg/g); C_0 ve C sırasıyla, kriyojeller ile lizozimin etkileştirilmeden önceki ve kriyojeller ile lizozimin etkileştirildikten sonraki derişimlerini (mg/ml); V, hacmi (ml); m, deneylerde kullanılan polimer kütlesini (g) göstermektedir.

3.2.7 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Lizozim desorpsiyonu için desorpsiyon ajanı olarak 1 M KSCN kullanıldı. Desorpsiyon deneyleri, adsorpsiyon amacıyla da kullanılan kesikli sistemde incelendi. Lizozim adsorplanmış polimerik kriyojel yapılara desorpsiyon, oda sıcaklığında kesikli sistemde 1 saat boyunca KSCN kullanılarak gerçekleştirildi. Desorpsiyon ortamındaki lizozim miktarı 280 nm’de spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Desorpsiyon oranı eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan lizozim}}{\text{Adsorplanan lizozim}} \times 100 \quad (3.2)$$

Poli[HEMA-(dialdehit monomer)] kriyojel yapılarının tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Monomerlerin Saflık Kontrolü

4.1.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)

İTK uygulamalarında çözücü sistemi olarak *m*-DFDFP, *m*-DFDFH, *o*-DFDFP, *o*-DFDFH için kloroform/hekzan (30/1); *p*-DFDFP ve *p*-DFDFH için kloroform/hekzan (10/1) kullanıldı. Kromatografi sonucu tek spot gözlenmesi monomerlerin saf olduğunu göstermiştir.

4.1.2 Erime noktası tayini

Altı monomerin tümünün Gallenkamp (Electronic) cihazında erime noktası tayini yapılmıştır. Gözlenen erime noktası (T_e) değerlerinin tümü Çizelge 4.1’de verilmiştir. Erime noktasının başlangıcı ve bitişi arasındaki farkın 1°C’den küçük olması sentezlenen monomerlerin saf olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1 Dialdehit monomerlerin erime noktaları

Dialdehit Monomer	T _e (°C)
<i>o</i> -DFDFP	82,1-82,9
<i>m</i> -DFDFP	82,3-83,0
<i>p</i> -DFDFP	81,5-82,5
<i>o</i> -DFDFH	81,8-82,4
<i>m</i> -DFDFH	82,5-83,3
<i>p</i> -DFDFH	82,4-83,1

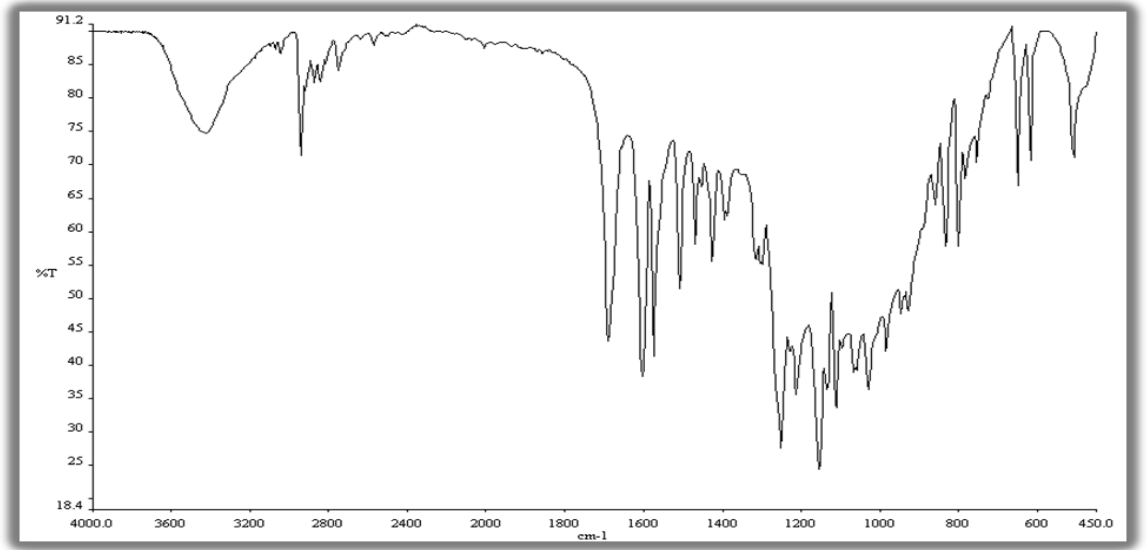
4.2 Monomerlerin Karakterizasyonu

4.2.1 FTIR spektrumları

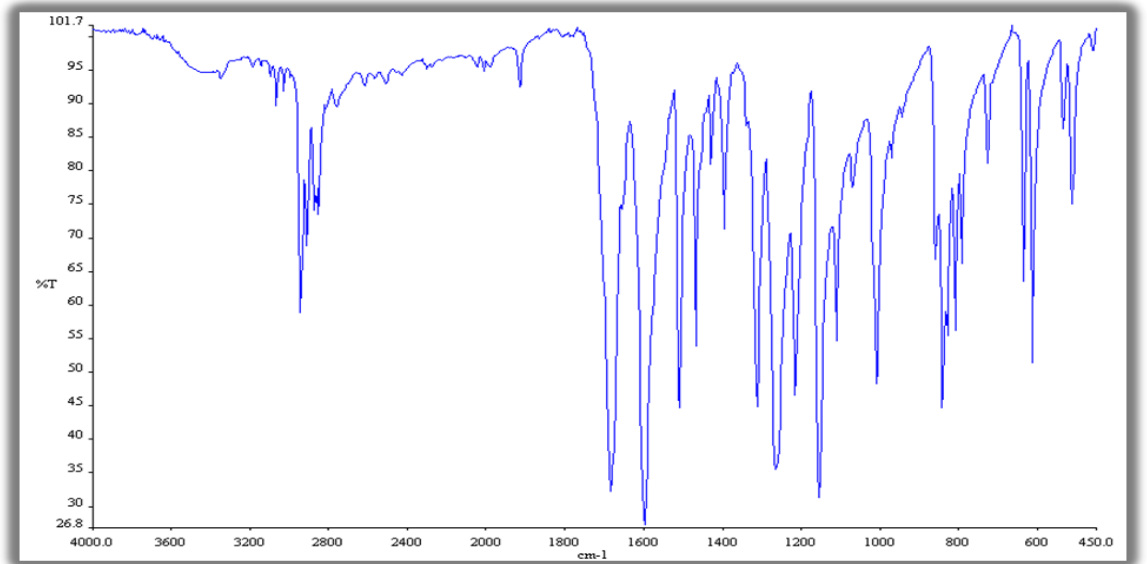
3.2.1’de formülleri verilmiş olan dialdehit monomerlerin tümünün IR spektrumlarında 1682.4 ile 1695.4 cm⁻¹ değeri arasında simetrik aldehit gerilme pikleri gözlenmiştir. 1685.9 ile 1576.2 cm⁻¹ değerleri aralığında ise simetrik aromatik gruplardaki (C=C) gerilme pikleri, 2854.7 ile 3423.5 cm⁻¹ değerleri arasında aromatik C-H eğilmeleri, son olarak 2759.3-2945.9 cm⁻¹ değerinin de alifatik C-H gruplarını göstermektedir.

Çizelge 4.2 Monomerlerin FTIR spektrumu bulguları (Merlic and Strouse, 1997)

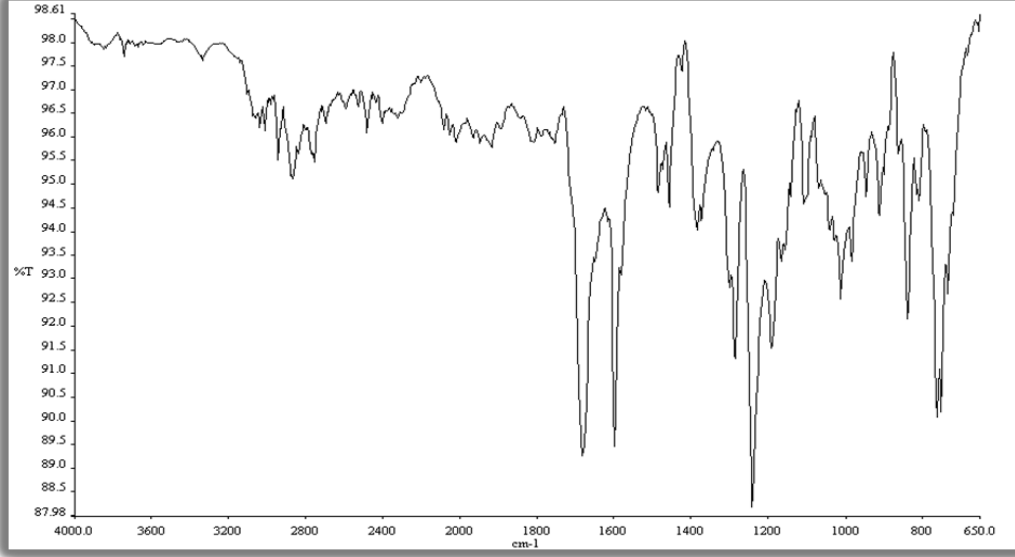
Bileşik	Beklenen (cm ⁻¹)	Gözlenen (cm ⁻¹)					
		I	II	III	IV	V	VI
Aldehit grubundaki karbonil gerilmeleri(C=O)	1690-1740	1691.1	1685.9	1682.7	1682.4	1685.8	1695.4
Aromatik gerilmeler (C=C)	1700-1500	1603.2	1599.0	1599.5	1595.7	1599.9	1598.4
Aromatik C-H gerilme	3030	3423.5	3347.4	-	2854.7	3358.5	2944.2
Aromatik C-H eğilme	680-860	802.5	842.6	762.8	755.2	783.6	784.5
Alifatik C-H gerilmeleri	2950-2850	2944.7	2945.9	2867.8	2759.3	2943.3	2803.5



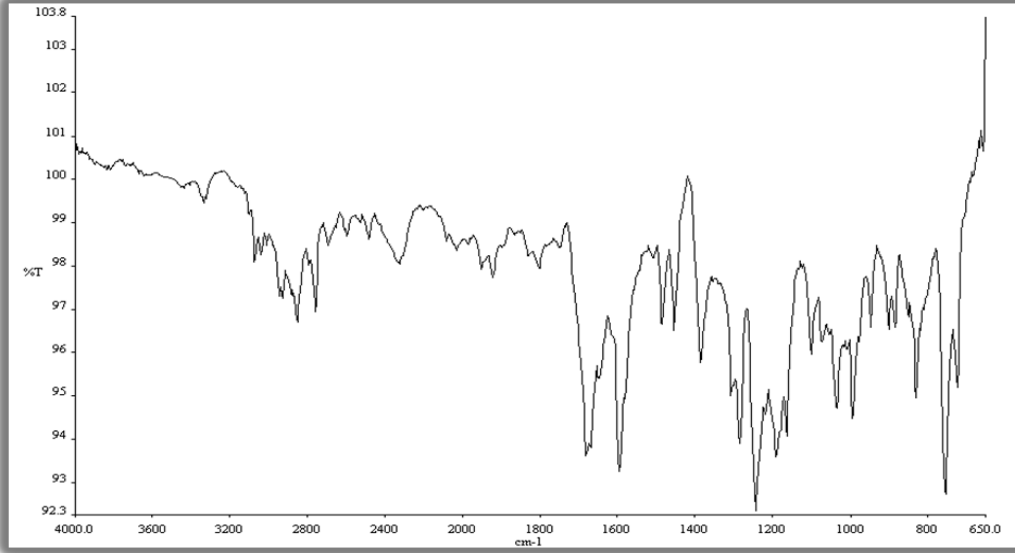
Şekil 4.1 *p*-DFDFP bileşiğinin FTIR spektrumu



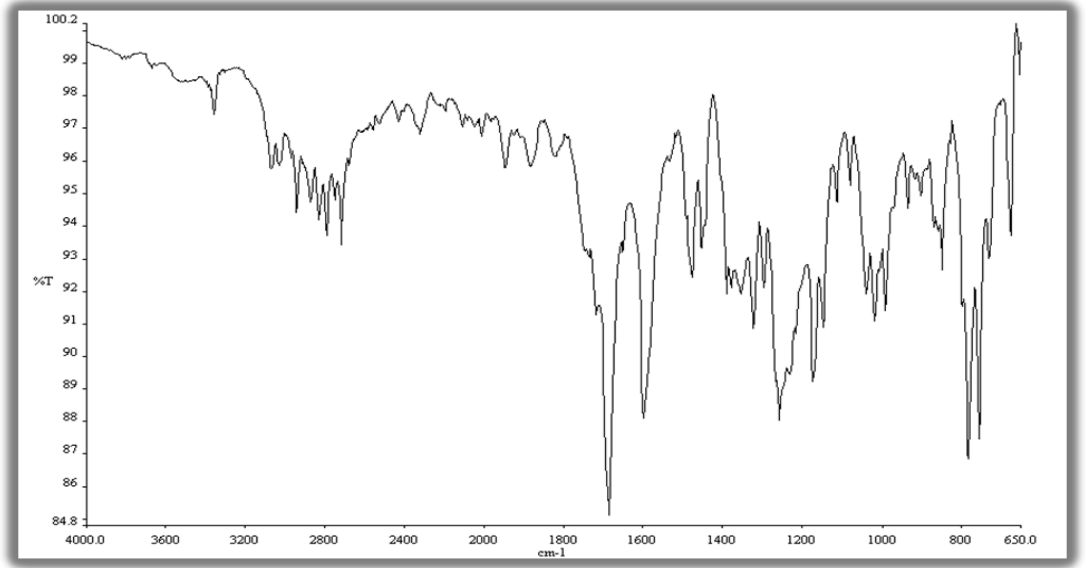
Şekil 4.2 *p*-DFDFH bileşiğinin FTIR spektrumu



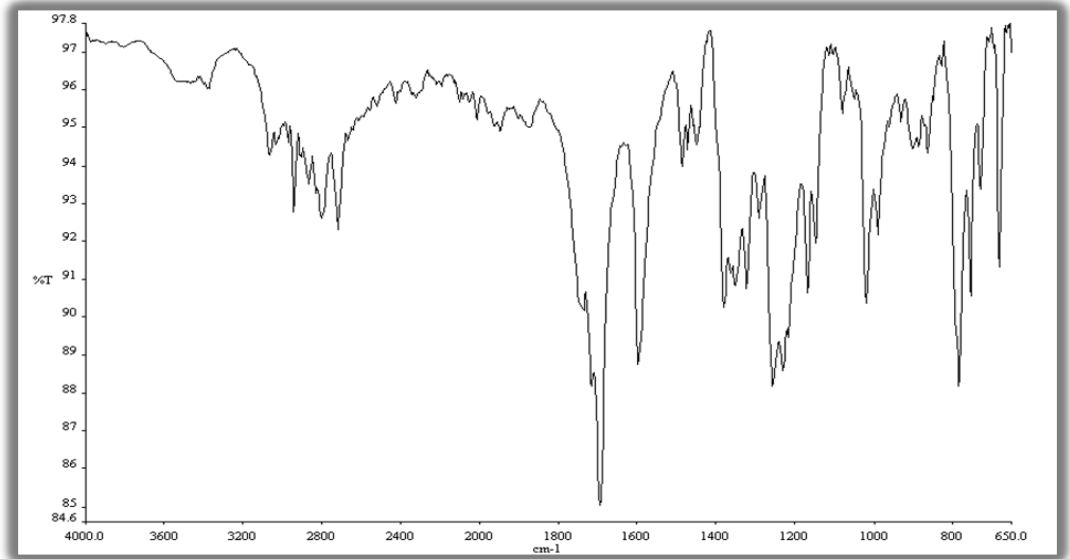
Şekil 4.3 o-DFDFP bileşiğinin FTIR spektrumu



Şekil 4.4 o-DFDFH bileşiğinin FTIR spektrumu

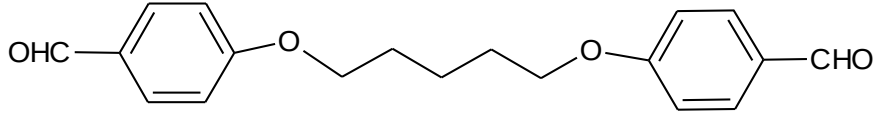


Şekil 4.5 *m*-DFDFP bileşiğinin FTIR spektrumu

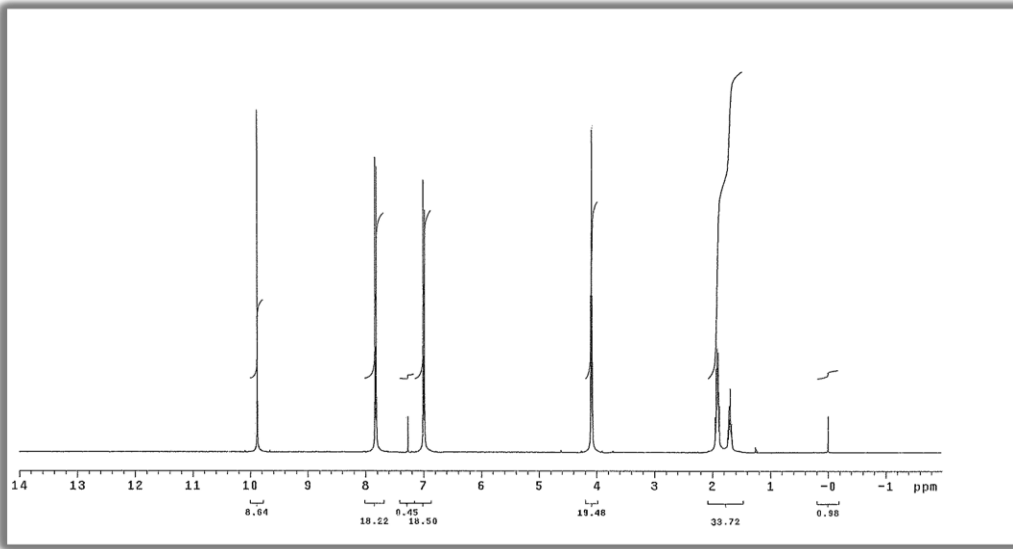


Şekil 4.6 *m*-DFDFH bileşiğinin FTIR spektrumu

4.2.2 ^1H NMR spektrumları



4,4'-diformil-1,5-difenoksipentan (p-DFDFP)

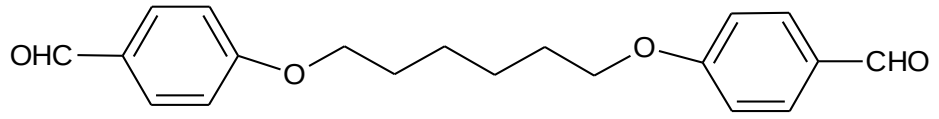


Şekil 4.7 *p*-DFDFP bileşiğinin NMR spektrumu

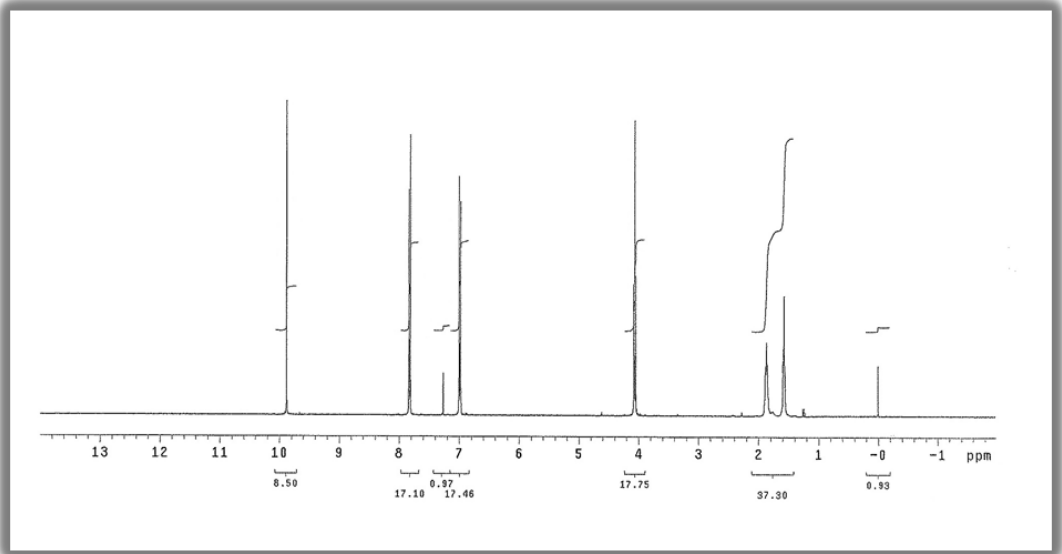
^1H NMR (Şekil 4.2)

(400 MHz, CDCl_3) δ 1,6 (2H, m), 1,9 (4H,m), 4,0 (4H, t), 6,9 (4H, m), 7,8 (4H, m), 9,8 (2H,s) ppm

1,6 ppm, 1,9 ppm, 4,0 ppm'de gözlenen piklerin alifatik zincirdeki 10 adet protona ait olduğu, 6,9 ve 7,8 ppm'de gözlenen piklerin aromatik protonlara ait olduğu (iki aromatik grup, 8 H), ve son olarak gözlenen 9,8 ppm'deki pikin ise iki aldehit grubundaki protonlara ait olduğu düşünülmektedir.



4,4'-diformil-1,6-difenoksiheksan (p-DFDFH)

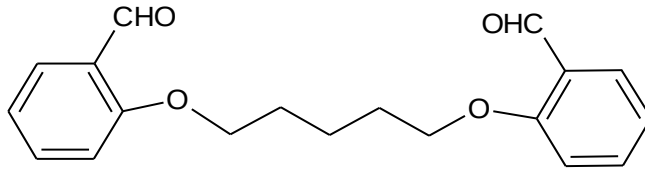


Şekil 4.8 *p*-DFDFH bileşiğinin NMR spektrumu

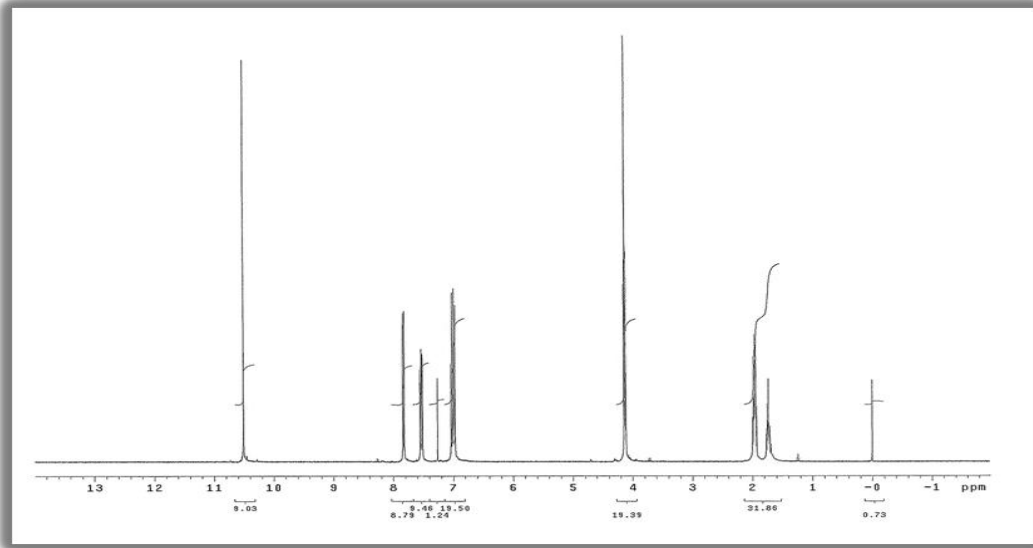
^1H NMR (Şekil 4.4)

(400 MHz, CDCl_3) δ 1,5 (4H, m), 1,8 (4H, m) 4,0 (4H, t), 6,9 (4H, m), 7,8 (4H, m), 9,8 (2H, s) ppm

1,5 ppm, 1,8 ppm, 4,0 ppm'de gözlenen piklerin alifatik zincirdeki 12 adet protona ait olduğu, 6,9 ve 7,8 ppm'de gözlenen piklerin aromatik protonlara ait olduğu (iki aromatik grup, 8 H) ve son olarak gözlenen 9,8 ppm'deki pikin ise iki aldehit protonlarına ait olduğu düşünülmektedir.



1,1'-diformil-1,5-difenoksipentan (o-DFDFP)

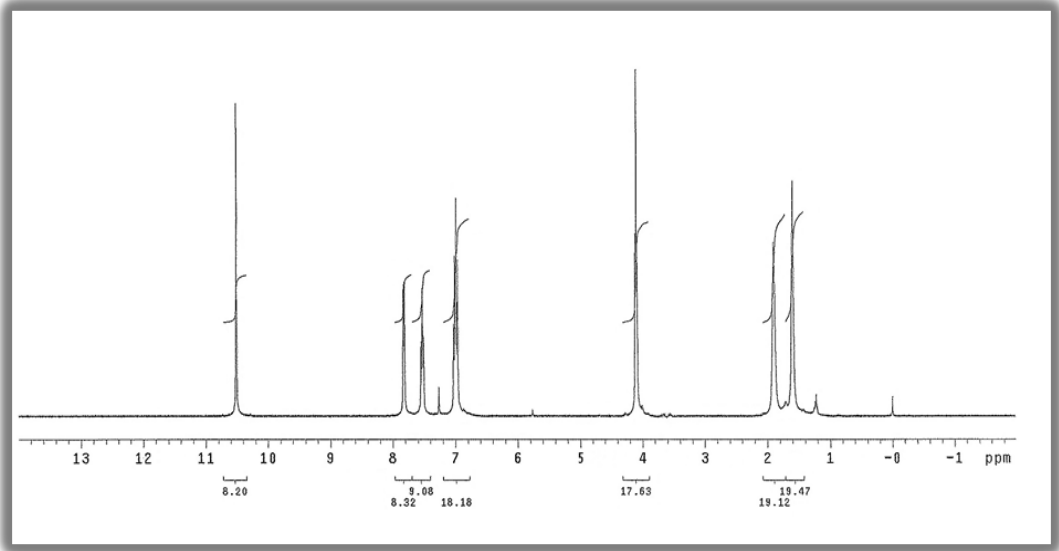


Şekil 4.9 o-DFDFP bileşiğinin NMR Spektrumu

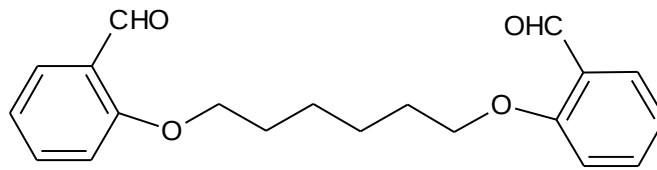
^1H NMR (Şekil 4.6)

(400 MHz, CDCl_3) δ 1,7 (2H, m), 1,9 (4H, m), 4,1 (4H, t), 7,0 (4H, m), 7,5 (2H, m), 7,8 (2H, dd), 10,5 (2H, s) ppm

1,7 ppm, 1,9 ppm, 4,1 ppm'de gözlenen piklerin alifatik zincirdeki 10 adet protona ait olduğu, 7,0 ve 7,5 ppm'de gözlenen piklerin aromatik protonlara ait olduğu (iki aromatik grup, 8 H) ve son olarak gözlenen 10,5 ppm'deki pikin ise iki aldehit grubundaki protonlara ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.10 o-DFDFH bileşiğinin NMR spektrumu

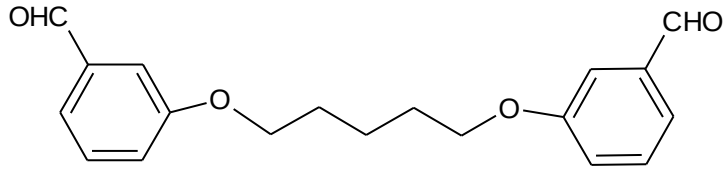


1,1'-diformil-1,6-difenoksihekzan (o-DFDFH)

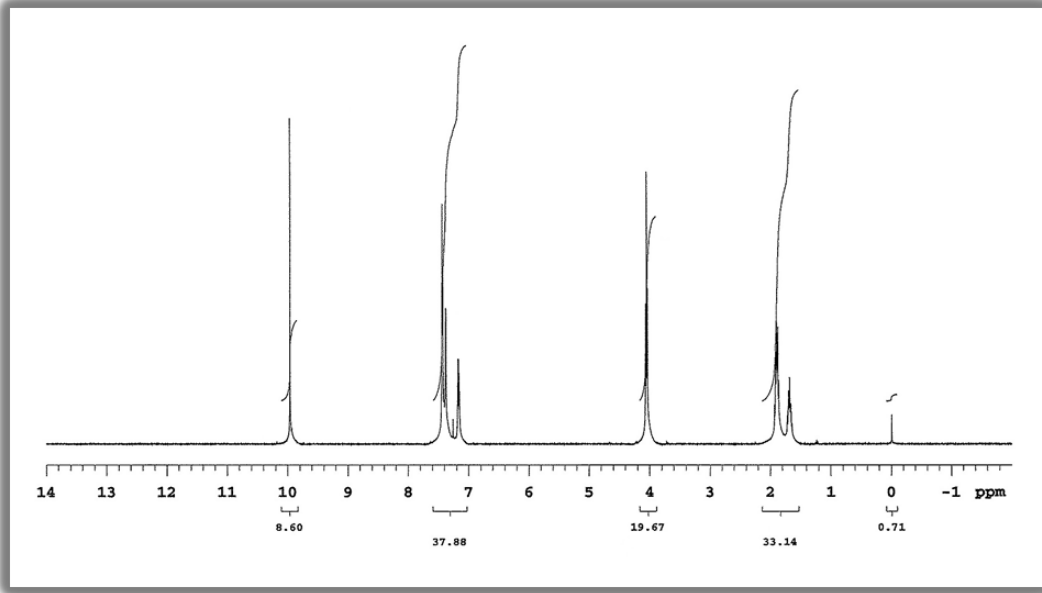
^1H NMR (Şekil 4.8)

(400 MHz, CDCl_3) δ 1,5 (4H, bs), 1,9 (4H, bs), 4,1 (4H, t, $J=16,0$ Hz), 6,9 (4H, m), 7,5 (2H, m), 7,8 (2H, dd, $J=5,92, 11,8$), 10,5 (2H, s) ppm

1,5 ppm, 1,9 ppm, 4,1 ppm'de gözlenen piklerin alifatik protonlara (12 adet), 6,9 ve 7,5 ppm'de gözlenen piklerin aromatik protonlara ait olduğu (iki aromatik grup, 8 H) ve son olarak gözlenen 10,5 ppm'deki pikin ise iki aldehit grubundaki protonlara ait olduğu düşünülmektedir.



3,3'-diformil-1,5-difenoksipentan (m-DFDFP)

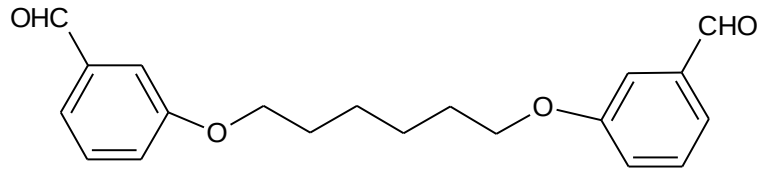


Şekil 4.11 *m*-DFDFP bileşiğinin NMR spektrumu

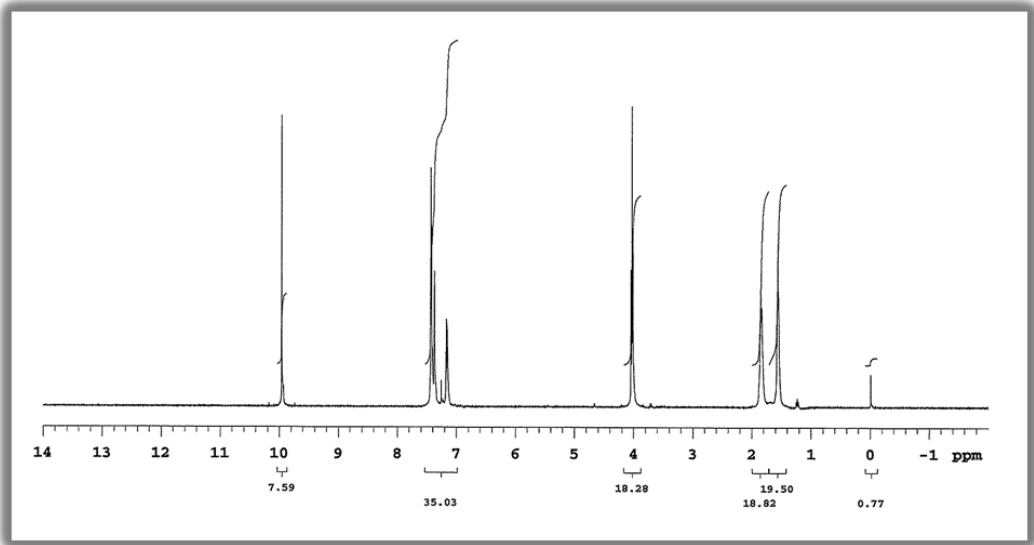
^1H NMR (Şekil 4.10)

(400 MHz, CDCl_3) δ 1,6 (2H,m), 1,8 (4H, m), 4,0 (4H, t), 7,1 (4H, m), 7,4 (4H, m), 9,9 (2H, s) ppm

1,6 ppm, 1,8 ppm, 4,0 ppm'de gözlenen piklerin alifatik zincirdeki protonlara (10 adet) ait olduğu, 7,1 ve 7,4 ppm'de gözlenen piklerin aromatik protonlara ait olduğu (iki aromatik grup, 8 H) ve son olarak gözlenen 9,9 ppm'deki pikin ise iki aldehit grubundaki protonlara ait olduğu düşünülmektedir.



3,3'-diformil-1,6-difenoksiheksan (m-DFDFH)



Şekil 4.12 *m*-DFDFH bileşiğinin NMR spektrumu

^1H NMR (Şekil 4.12)

(400 MHz, CDCl_3) δ 1,5 (4H, m), 1,8 (4H, m), 4,0 (4H, t), 7,1 (4H, m), 7,4 (4H, m), 9,9 (2H, s) ppm

1,5 ppm, 1,8 ppm, 4,0 ppm'de gözlenen piklerin alifatik protonlara ait olduğu, 7,1 ve 7,4 ppm'de gözlenen piklerin aromatik karbonlara ait protonlar olduğu (iki aromatik grup, 8 H) ve son olarak gözlenen 9,9 ppm'deki pikin ise iki aldehit grubundaki protonlara ait olduğu düşünülmektedir.

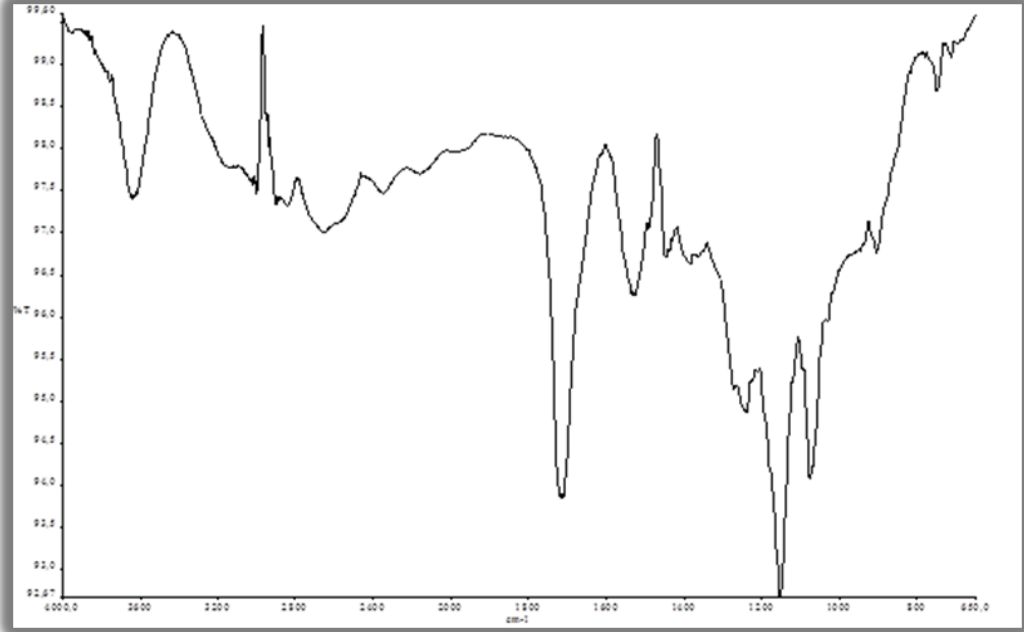
4.3 Kriyojellerin Karakterizasyonu

4.3.1 FTIR çalışmaları

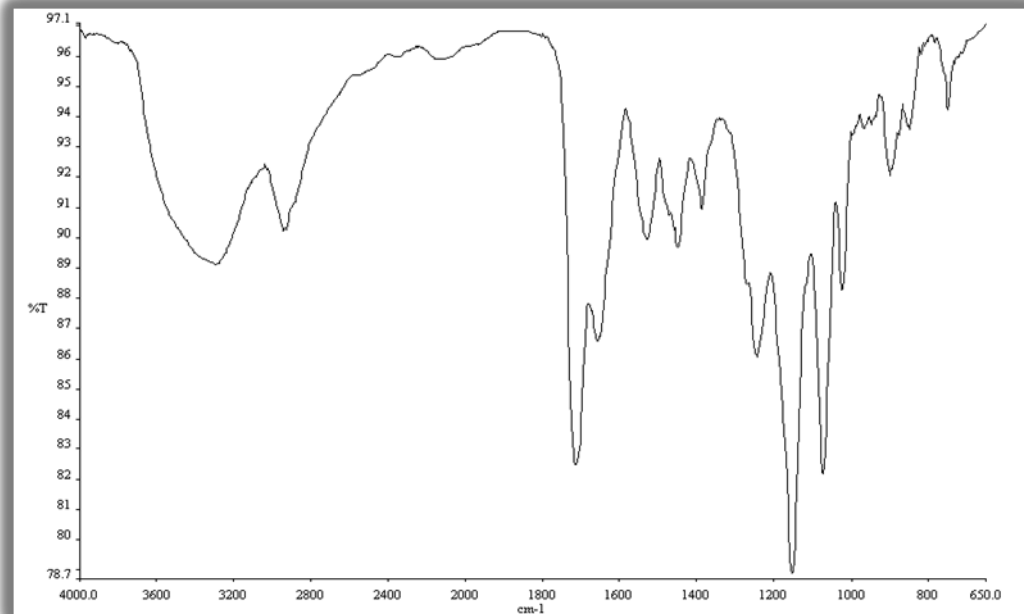
Bölüm 3.2.2’de anlatılan kriyojel polimerlerin sentezinde, monomerlerin yapıya katıldığını göstermek için monomer katılmadan HEMA ile sentezlenen kriyojel ve monomer katılmış HEMA ile sentezlenen kriyojellerin FTIR spektrumları alınmıştır. –OH grubu gerilmelerinin 3296.9 ile 3638.6 cm^{-1} , C=C bağının gerilmelerinin 1244.0 ile 1670.7 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, 1454.6 ile 1650.6 cm^{-1} değerleri arasında aromatik C=C gerilmelerinin, 1084.0 ile 1231.5 cm^{-1} arasında C-O-C’deki C-O ve 2658.7 ile 2952.2 cm^{-1} aralığında alifatik C-H gerilmeleri gözlenmiştir.

Çizelge 4.3 Polimerik kriyojellerin FTIR spektrumları (Merlic and Strouse, 1997)

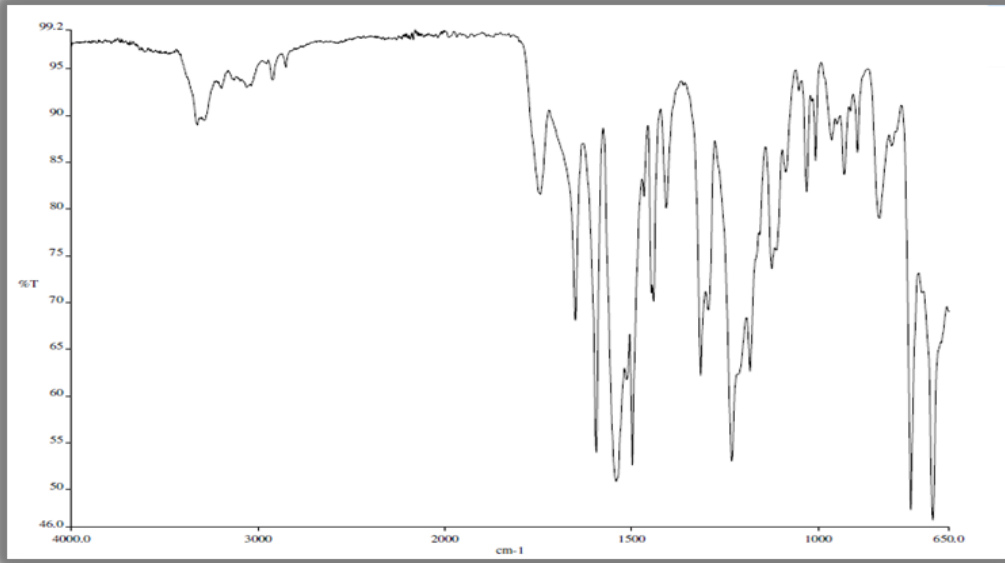
Bileşik	Beklene n (cm^{-1})	Gözlenen (cm^{-1})						
		VII	I-A	II-B	III-C	IV-D	V-E	VI-F
-OH grubu gerilmeleri	3550- 3200	3638.6	3296.9	3325.8	3306.4	3367.7	3361.6	3381.5
C=C gerilmeleri	1680- 1620	1448.8	-	1541.5	-	1670.7	1658.1	1459.9
Aromatik gerilmeler (C=C)	1700- 1500	-	1530.7	1650.6	1454.6	-	-	-
Alifatik C-H	2950- 2850	-	2942.5	2923.9	2942.1	2942.3	2944.1	2952.2



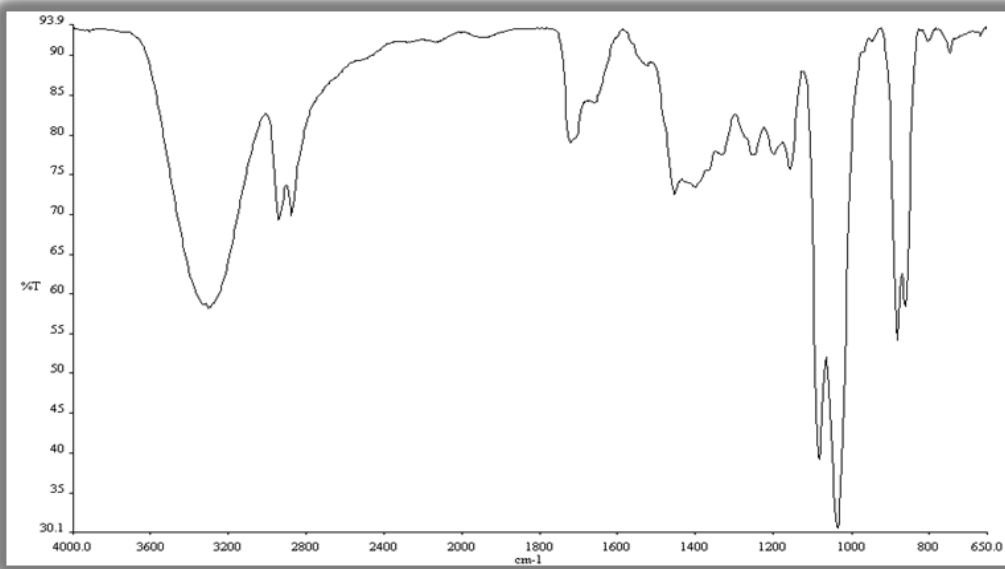
Şekil 4.13 Poli(HEMA) kriyojelinin FTIR spektrumu



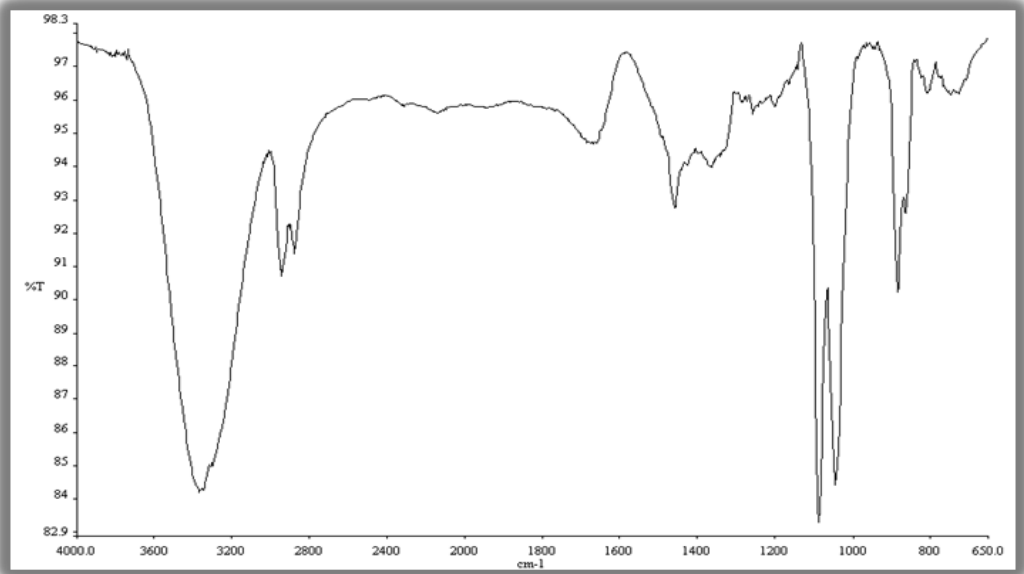
Şekil 4.14 Poli(HEMA-*p*-DFDEP) kriyojelinin FTIR spektrumu



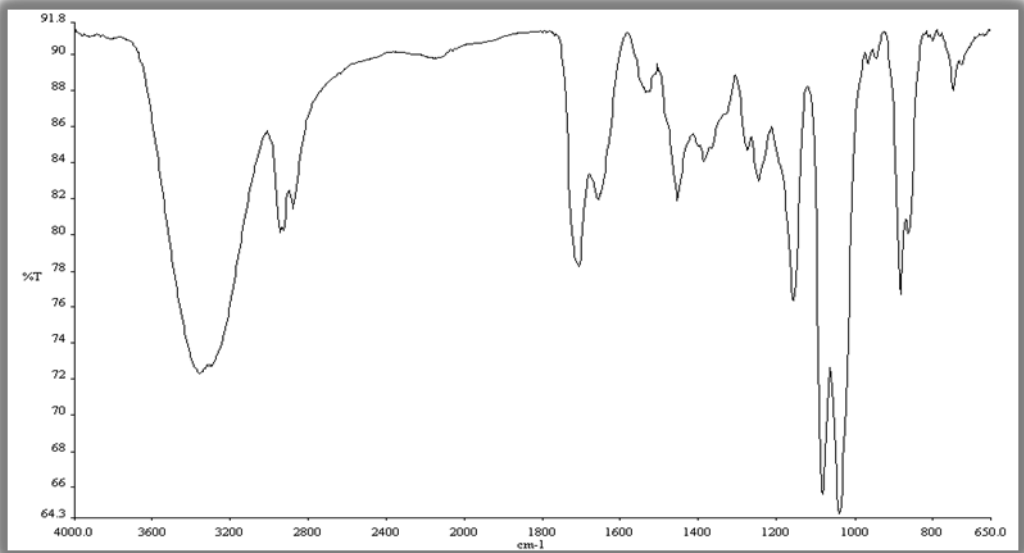
Şekil 4.15 Poli(HEMA-*p*-DFDFH) kriyojelinin FTIR spektrumu



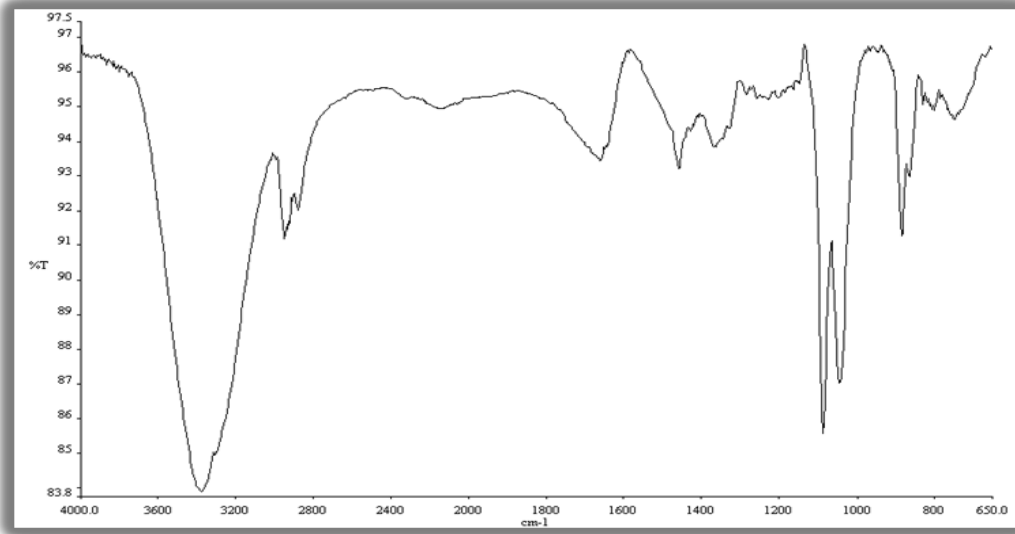
Şekil 4.16 Poli(HEMA-*o*-DFDFP) kriyojelinin FTIR spektrumu



Şekil 4.17 Poli(HEMA-*o*-DFDFH) kriyojelinin FTIR spektrumu



Şekil 4.18 Poli(HEMA-*m*-DFDFP) kriyojelinin FTIR spektrumu



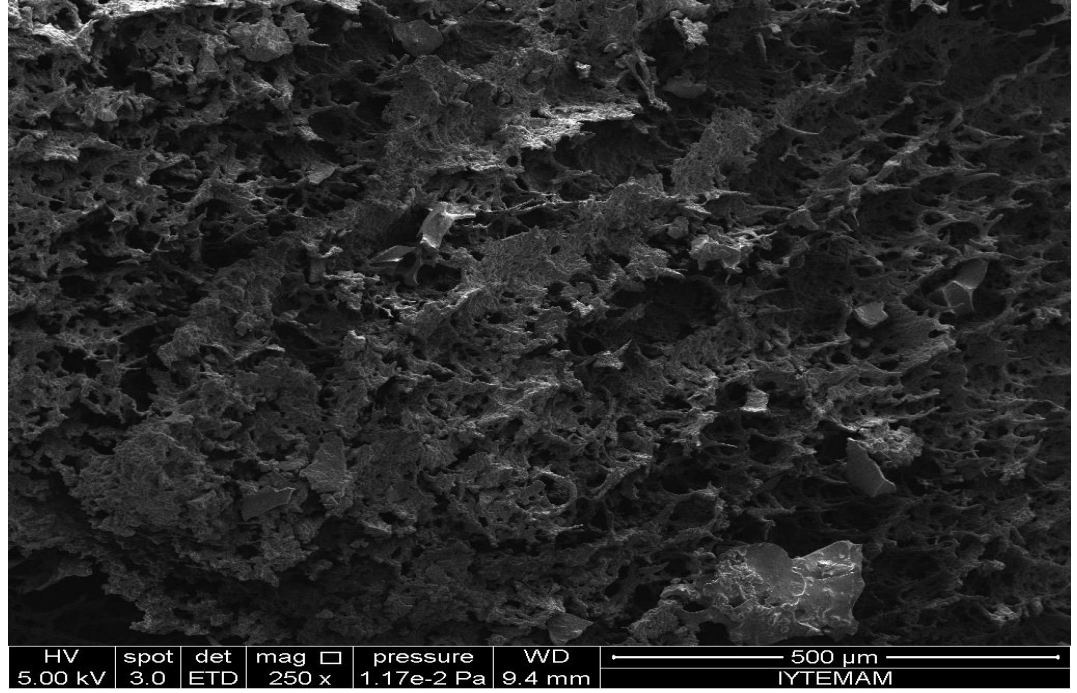
Şekil 4.19 Poli(HEMA-*m*-DFDFH) kriyojelinin FTIR spektrumu

4.3.2 Yüzey morfolojisi

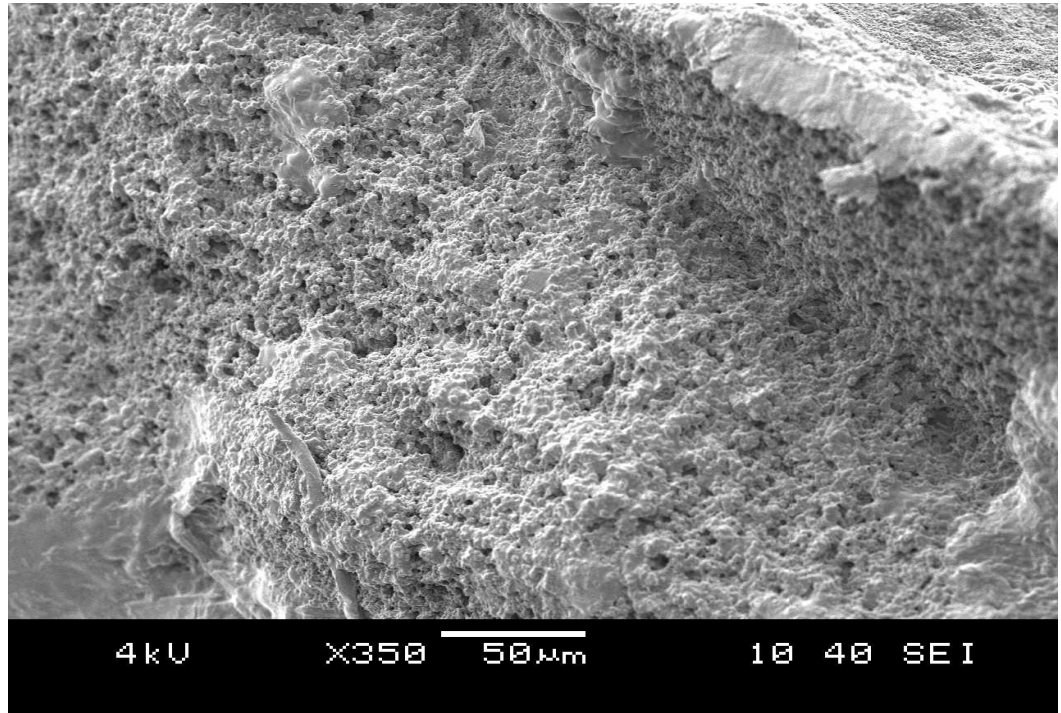
Sentezlenen kriyojellerin farklı büyütmelerdeki SEM fotoğrafları incelendiğinde kriyojellere özgü gözenekli yapı gözlenmektedir. Her bir kriyojel için kullanılan büyütme çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Polimerik kriyojellerin SEM görüntülerinde kullanılan büyütme

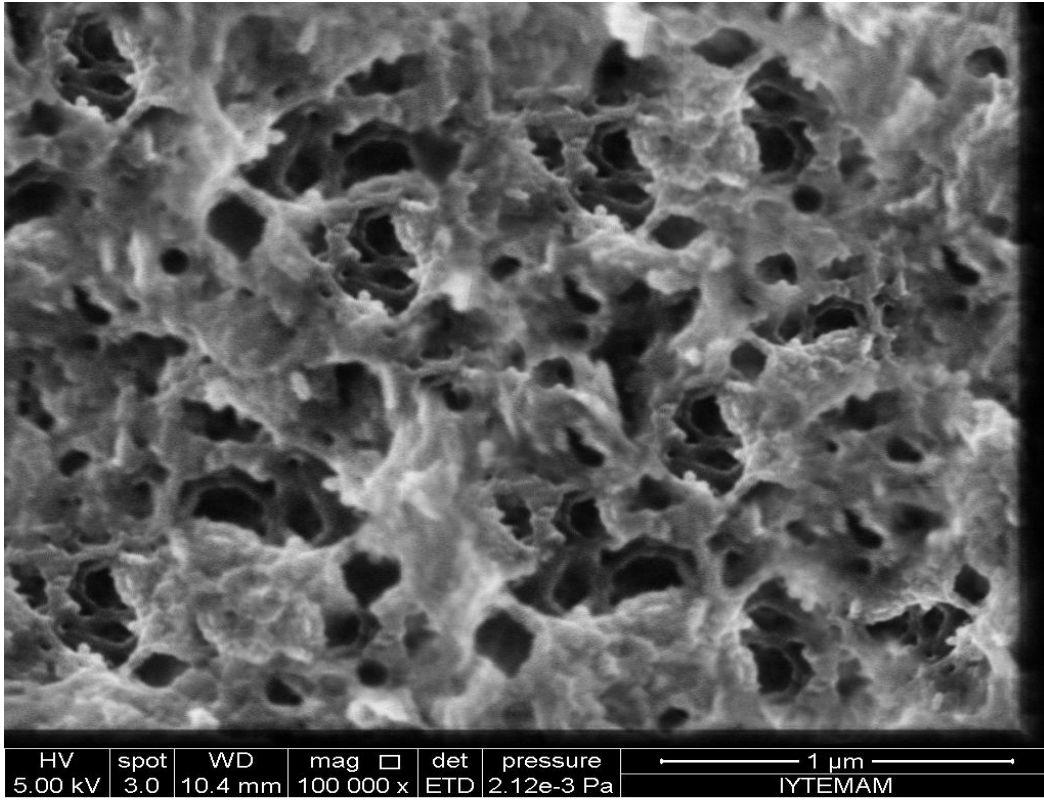
Polimerik Kriyojel	Büyütme katsayısı	μm
Poli(HEMA)	250	500
Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP)	350	50
Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH)	100.000	1
Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP)	750	20
Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH)	750	20
Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP)	750	20
Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH)	500	50



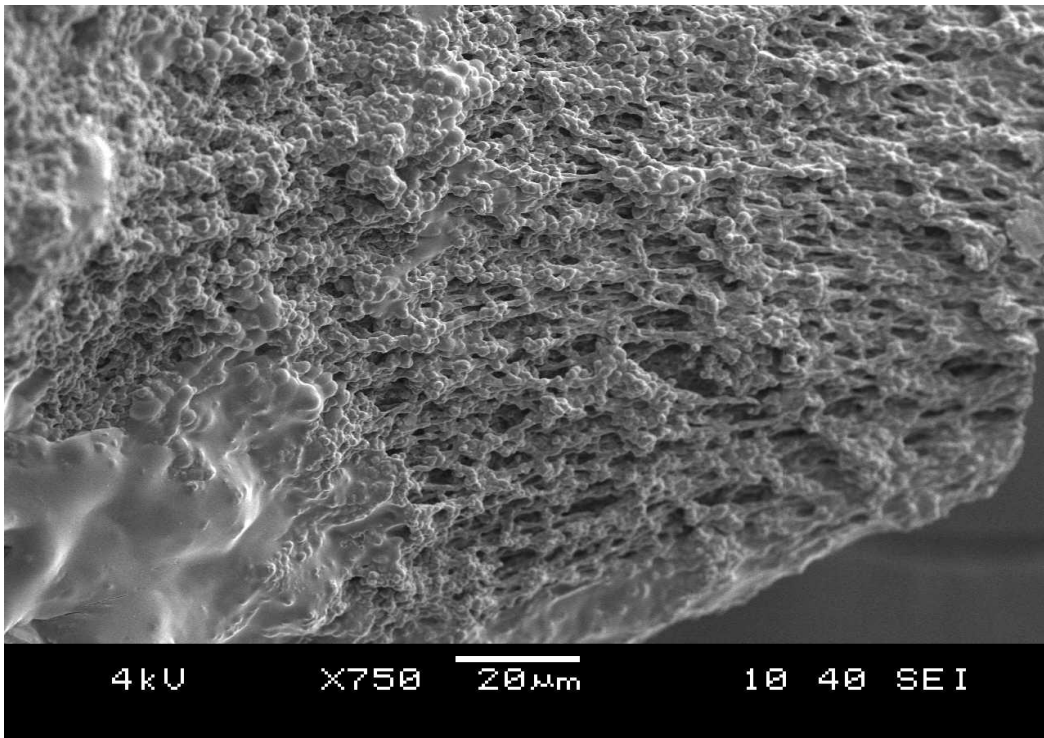
Şekil 4.20 Poli(HEMA) kriyojelin SEM fotoğrafı



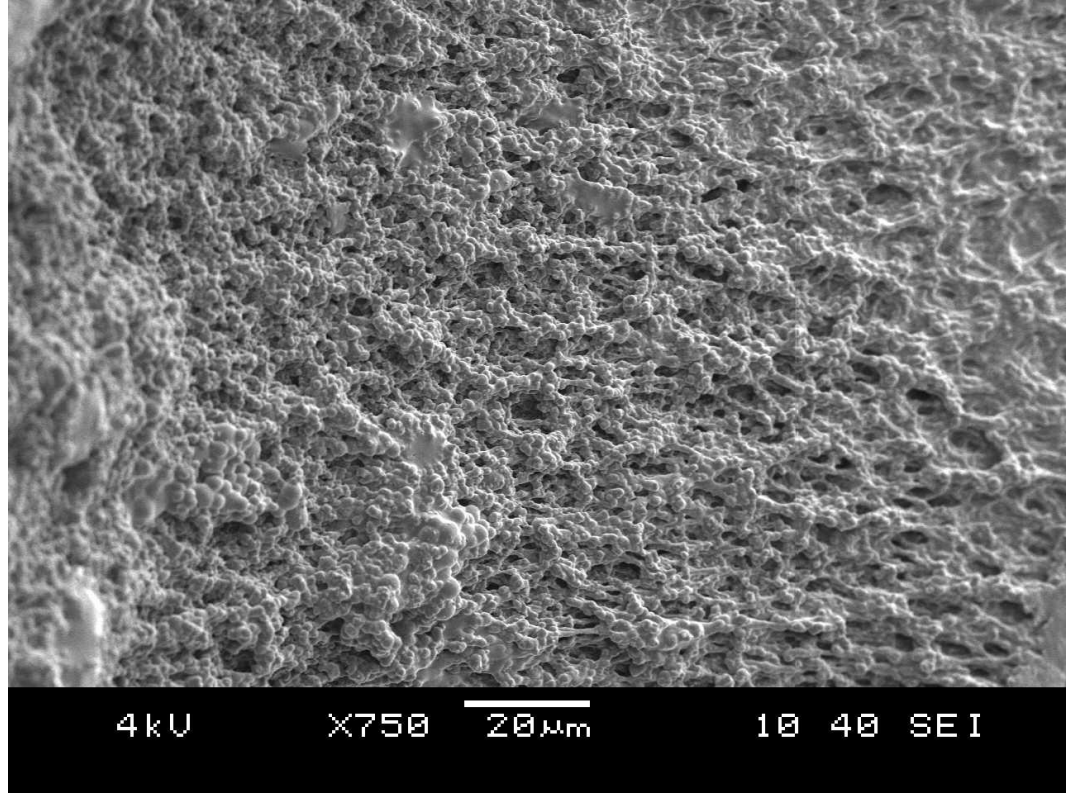
Şekil 4.21 Poli(HEMA-*p*-DFDFP) kriyojelin SEM fotoğrafı



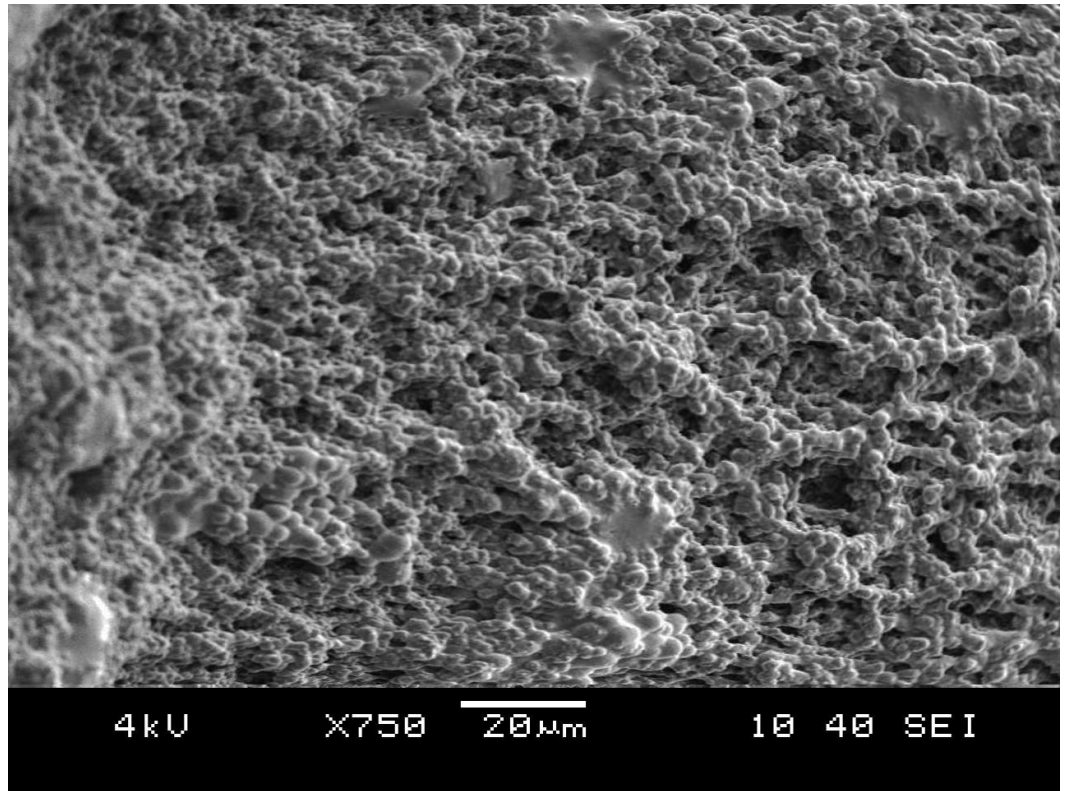
Şekil 4.22 Poli(HEMA-*p*-DFDFH) kriyojelin SEM fotoğrafı



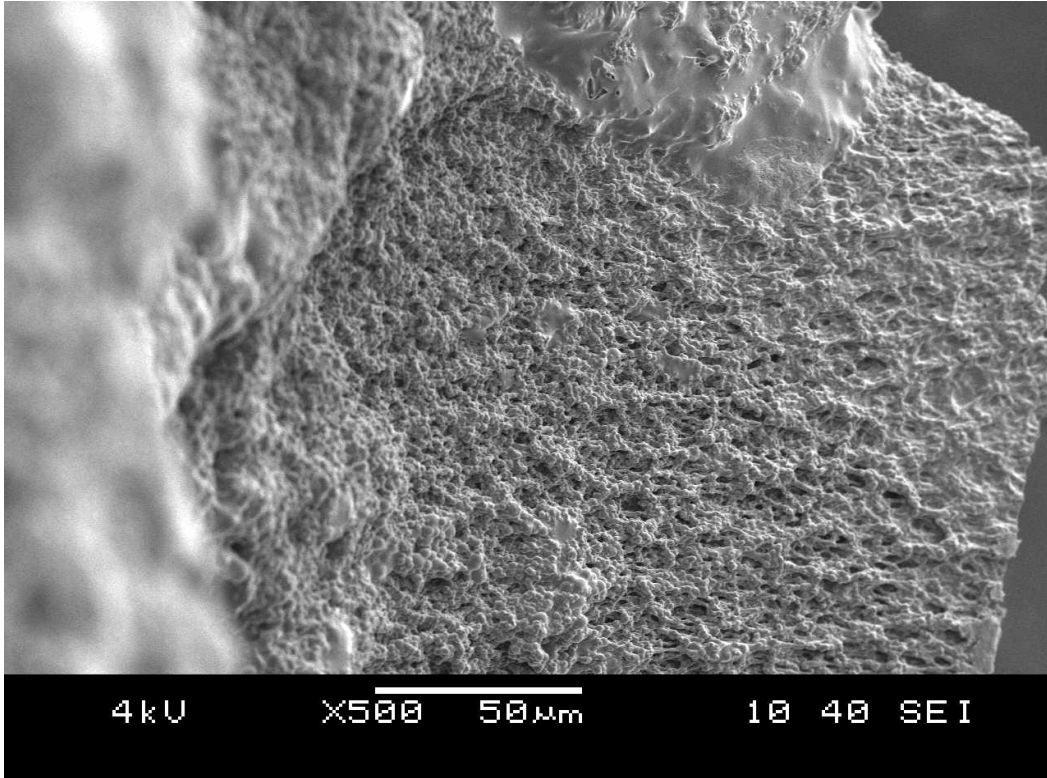
Şekil 4.23 Poli(HEMA-*o*-DFDFP) kriyojelin SEM fotoğrafı



Şekil 4.24 Poli(HEMA-*o*-DFDFH) kriyojelin SEM fotoğrafı



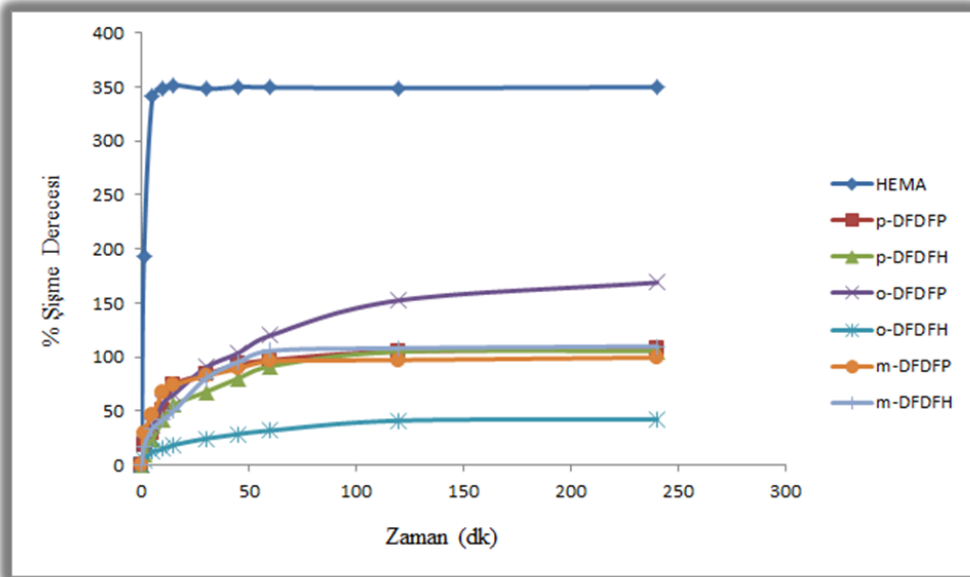
Şekil 4.25 Poli(HEMA-*m*-DFDFP) kriyojelin SEM fotoğrafı



Şekil 4.26 Poli(HEMA-*m*-DFDFH) kriyojelin SEM fotoğrafı

4.3.3 Kriyojellerin Şişme Testi

Şekil 4.27’de görüldüğü üzere şişme derecesi en yüksek olan kriyojelin hidrofilik özelliğe sahip olan poli(HEMA) olduğu görülmüştür.

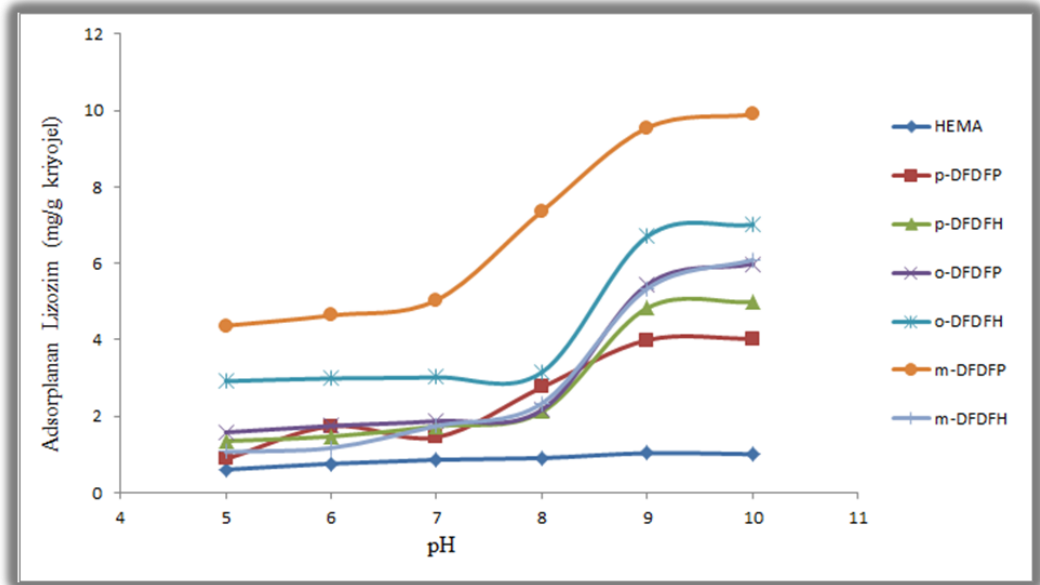


Şekil 4.27 Kriyojellerin şişme testi (T:25°C)

4.4 Sulu Çözeltilerden Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları

4.4.1 pH etkisi

Şekil 4.28’de poli(HEMA) ve poli(HEMA-(monomer)) kriyojel yapılarına lizozim adsorpsiyonunun pH’nın etkisi verilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini göstermek için farklı tampon sistemleri kullanılmış ve pH 5,0-10,0 arasında çalışılmıştır (pH 5,0 için $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH 6,0-8,0 için $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 9,0-10,0 için $(\text{CaHCO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3)$). Kriyojellere maksimum Lizozim bağlama kapasitesi pH 9,0 değerinde gözlenmiştir. Daha asidik ve nötral pH bölgelerinde lizozim adsorpsiyon kapasitesi önemli derecede azalmıştır. Sulu çözeltilerden proteinlerin maksimum adsorpsiyonlarının genellikle net yük taşımadıkları pH değerlerinde (izoelektrik nokta, pI) gözlemlendiği bilindiğinden ve lizozim enziminin de pI değeri 9 olduğundan bu beklenen bir sonuçtur. Poli(HEMA) kriyojel yapı üzerine spesifik olmayan Lizozim adsorpsiyonu pH’dan bağımsızdır ve çalışılan tüm pH değerlerinde ihmal edilebilir olduğu belirlenmiştir.



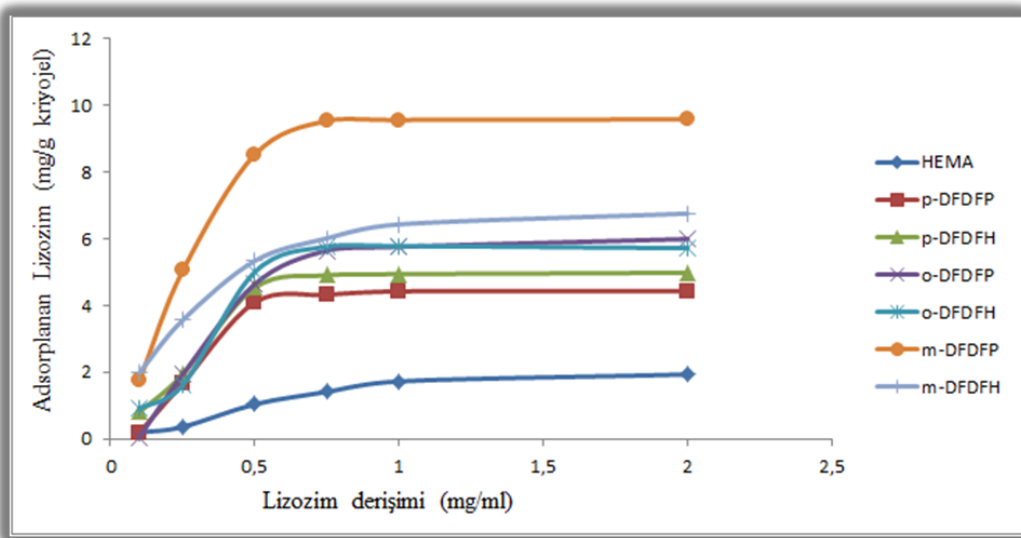
Şekil 4.28 Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi
(T:25°C’de, 0,5 mg/mL lizozim derişimi, t: 1saat)

Poli(HEMA) kriyojel yapıya non-spesifik lizozim adsorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir (1,1 mg/g). Çünkü hidrofilik poli(HEMA) kriyojelin

yüzeyinde lizozim molekülleri ile etkileşebilecek iyonik ve hidrofobik gruplar mevcut değildir. Dialdehit monomerlerin yapıya katılmasıyla kriyojellerin pH: 9,0 fosfat tamponunda lizozim adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde artmıştır.

4.4.2 Lizozim başlangıç derişiminin etkisi

Lizozim başlangıç derişiminin lizozim adsorpsiyonuna etkisi şekil 4.29’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, çözeltideki lizozim derişiminin artmasıyla, kriyojeller tarafından birim kütle başına adsorplanan lizozim miktarı, çalışılan kesikli sistemde 0,5 mg/ml’den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşmıştır. Bu adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir.

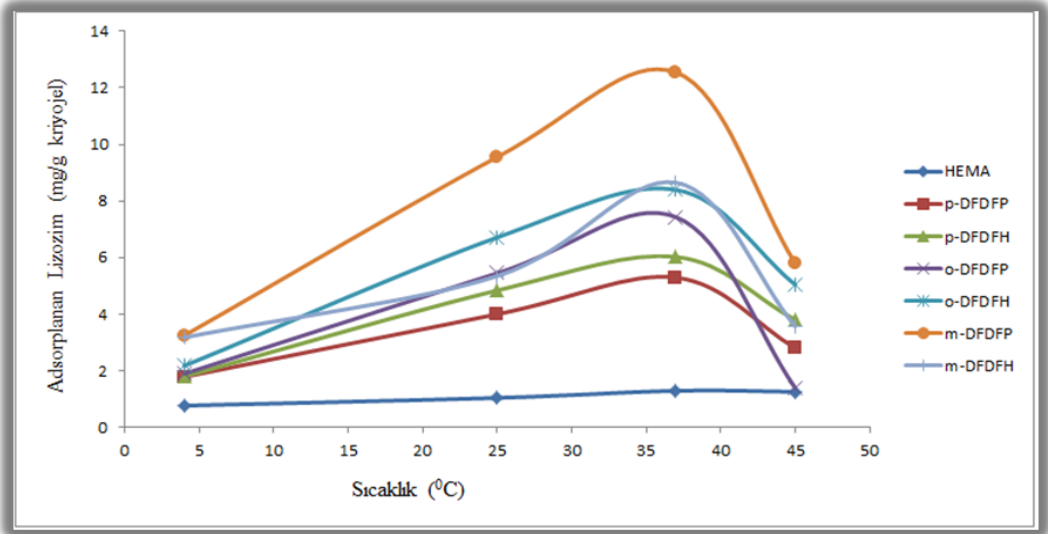


Şekil 4.29 Lizozim adsorpsiyonu üzerine başlangıç derişimin etkisi
(T:25°C’de, pH=9,0 fosfat tamponu, t: 1saat)

4.4.3 Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın etkisi hidrofobik kromatografide oldukça önemlidir. Yüksek sıcaklıklarda proteinlerin üç boyutlu katlanmış yapılarının bozulması sürecinde, protein yüzeyinde gömülü halde bulunan hidrofobik amino asitler açığa çıkar. Böylelikle, destek materyalindeki ligand ile protein arasındaki etkileşim yüzeyi artacağından yüksek sıcaklıklarda daha yüksek tutulma gözlenir. Şekil 4.30’da

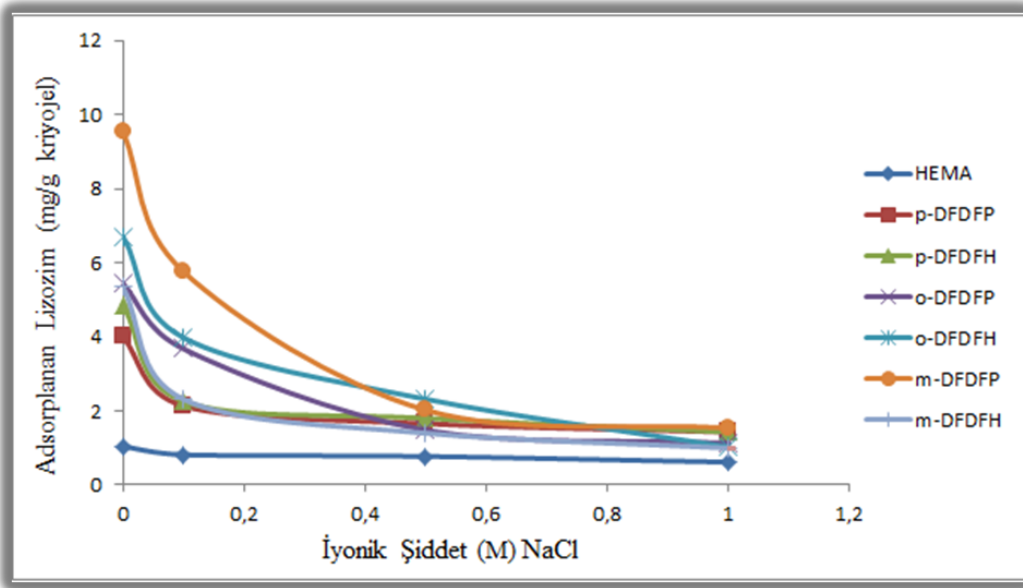
kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi verilmiştir. Sıcaklık aralığı 4-45°C arasında seçilmiştir. Şekil 4.30'dan da görüldüğü gibi poli(HEMA) kriyojel yapılar non-spesifik lizozim adsorpsiyonu, çalışılan bütün sıcaklık değerlerinde çok düşüktür. Poli(HEMA) kriyojellere lizozimin non-spesifik adsorpsiyonuna sıcaklığın herhangi bir etkisi görülmemiştir. Monomer bağlanmış kriyojellerde ise adsorplanan lizozim miktarı sıcaklığın artmasıyla önemli oranda artmıştır.



Şekil 4.30 Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi
(0,5 mg/mL lizozim derişimi, pH=9,0 fosfat tamponu, t: 1 saat)

4.4.4 İyon şiddetinin etkisi

İyon şiddetinin lizozim adsorpsiyonuna etkisi şekil 4.31'de verilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesine iyon şiddetinin etkisini göstermek için, derişimi 0,0-2,0 M arasında NaCl içeren tampon çözelti kullanılmıştır. İyonik şiddet arttıkça lizozim adsorpsiyon kapasitesinde azalma görülmektedir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi NaCl içermeyen derişimde gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin, NaCl tuzunun lizozim enzimidaki tuz köprülerini kırması ve bunun adsorpsiyonu engellemesidir.



Şekil 4.31 Lizozim adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi
(T:25°C'de, 0,5 mg/mL lizozim derişimi, pH=9,0 fosfat tamponu, t: 1saat)

Çizelge 4.5'de, oda sıcaklığında, 0,5 mg/ml lizozim derişiminde, pH:9 fosfat tamponunda her bir kriyojel için elde edilen adsorpsiyon verileri gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 0,5 mg/g derişimde, oda sıcaklığında pH:9 fosfat tamponunda, lizozim adsorpsiyon bulguları

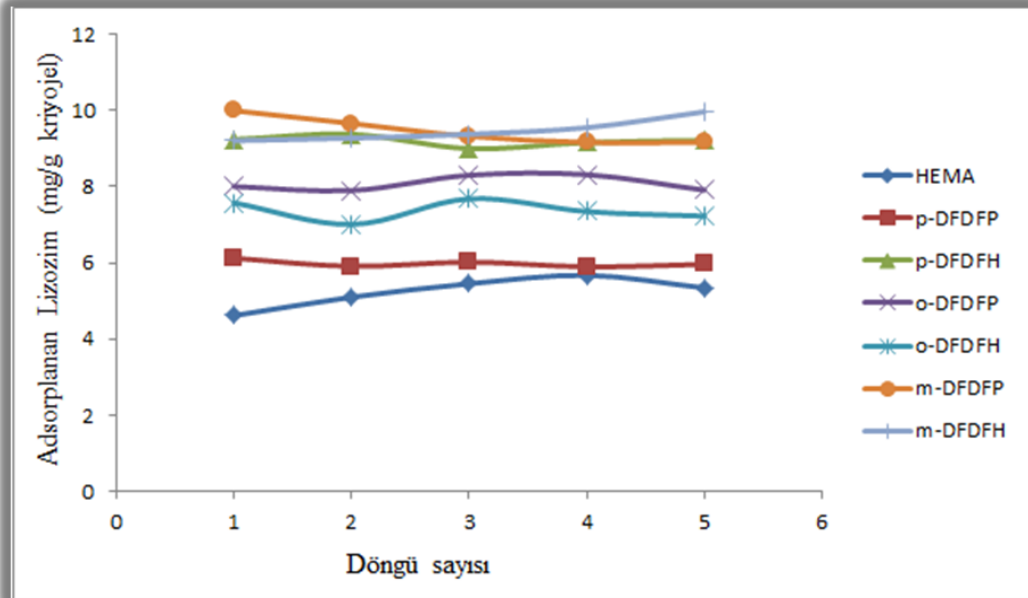
Kriyojel türleri	Adsorplanan lizozim (mg/g kriyojel)
Poli(HEMA)	1,041
Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP)	3,998
Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH)	4,838
Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP)	5,445
Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH)	6,709
Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP)	9,548
Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH)	5,344

4.4.5 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Desorpsiyon deneyleri adsorpsiyon amacıyla kullanılan kesikli sistemde incelenmiştir. Lizozim adsorplanmış poli(HEMA-dialdehit monomer) yapıları 1 saat desorpsiyon ortamıyla etkileştirilmiştir. Desorpsiyon 1 M KSCN ile gerçekleştirilmiştir. Lizozim enziminin poli(HEMA-dialdehit monomer) kriyojel yapılarına adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması aynı kriyojel yapılar kullanılarak ve desorpsiyon ajanı olarak KSCN kullanılarak 5 döngü boyunca tekrar edilmiş ve gözle görülebilir bir değişme olmadığı görülmüştür. Desorpsiyon oranı çizelge 4.6'da, bağlanan lizozim miktarı da tüm döngüler için şekil 4.32'de verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kriyojellerin desorpsiyon yüzdeleri (T: 25°C’de, 1 M KSCN ile t: 2 saat)

Kriyojel türleri	Desorpsiyon yüzdesi(%)
Poli(HEMA)	96,574
Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFP)	97,602
Poli(HEMA- <i>p</i> -DFDFH)	96,921
Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFP)	97,820
Poli(HEMA- <i>o</i> -DFDFH)	98,4472
Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFP)	97,486
Poli(HEMA- <i>m</i> -DFDFH)	97,104



Şekil 4.32 Lizozim adsorpsiyonunun tekrarlanabilirlik grafiği
(T:25°C’de, 0,5 mg/mL lizozim derişimi, pH=9,0 fosfat tamponu, t: 1saat)

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, 6 adet dialdehit monomer sentezlenmiş, karakterize edilmiş, bunun uygulaması olarak da kontrol grubu olarak poli(HEMA) kriyojeli ve monomerlerin komonomer olarak kullanıldığı 6 adet kriyojel olmak üzere yedi adet polimer sentezlenmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen kriyojeller lizozim adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Monomerlerin tüm sentez aşamaları İTK ile takip edilmiş, her birinin son ürünü de İTK ile kontrol edilmiştir. Her bir monomerin erime noktası tayin edilmiştir. Monomerler için FTIR ve ^1H NMR analizleri ile yapıları aydınlatılmıştır.

^1H NMR spektrumları, bileşik I, III ve V'in yapısında 20 adet proton, bileşik II, IV ve VI'nın yapısında bulunan 22 adet proton ile uyumludur.

Monomerlerin FTIR analizlerinde, 1682.4 ile 1695.4 cm^{-1} değerleri arasında simetrik aldehit gerilme pikleri, 1685.9 ile 1576.2 cm^{-1} değerleri aralığında ise simetrik aromatik gruplardaki ($\text{C}=\text{C}$) gerilme pikleri, 755.2 ile 842.6 cm^{-1} değerleri arasında aromatik C-H eğilmeleri, 2759.3-2945.9 cm^{-1} bandında da alifatik C-H grupları gözlemlenmiştir.

Elde edilen monomerlerin uygulaması amacıyla sentezlenen polimerik kriyojellerin karakterizasyonunda şişme testi, FTIR ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Şişme testinde dialdehit monomerlerle sentezlenen kriyojeller (6 adet) ile yalnızca HEMA kullanılarak sentezlenen kriyojeller kıyaslanmıştır. Yalnızca HEMA kullanılarak sentezlenen kriyojellerin, dialdehit monomerler kullanılarak sentezlenen monomerlere oranla şişme yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Kriyojel yapılar hidrofilik özelliktedir. Sentezlenen monomerler ise yapısında uzun bir hidrokarbon zincir içerdiğinden hidrofobisitesi yüksek maddelerdir. Kriyojel sentezinde dialdehit monomerlerin komonomer olarak kullanılması, polimere hidrofobik özellik kazandırmıştır. Bu nedenle dialdehit monomerler kullanılarak sentezlenen kriyojellerin şişme yüzdesi daha düşük olarak elde edilmiştir. Kriyojellerin yüzey morfolojisi karakterizasyonu için

yapılan SEM analizlerinde de her bir yapıda kriyojellere özgü gözenekli yapı görülmektedir.

Kriyojellerin FTIR analizinde biri dialdehit monomer kullanmadan, 6'sı dialdehit monomer kullanılarak sentezlenen 7 kriyojel analizlenmiştir. Poli(HEMA) kriyojel ile dialdehit monomerler kullanılarak sentezlenen diğer kriyojellerin FTIR analizleri karşılaştırıldığında kriyojelin yapısına monomerin katıldığını da görmek mümkün olmuştur. 3296,9 ile 3639,6 cm^{-1} değerleri arasında HEMA yapısında bulunan $-\text{OH}$ gerilme piklerinin, 1448,8 ile 1541,5 cm^{-1} değerleri arasında $\text{C}=\text{C}$ gerilme piklerinin, 1454,6 ile 1650,6 cm^{-1} değerleri arasında simetrik aromatik $\text{C}=\text{C}$ gerilme piklerinin, 2923,9 ile 2952,2 cm^{-1} değerleri arasında ise alifatik $\text{C}-\text{H}$ gerilme piklerinin olduğu düşünülmektedir.

Sentezlenip karakterize edilen kriyojeller lizozim adsorpsiyonunda kullanılmış ve pH, başlangıç derişimi, sıcaklık, iyon şiddetinin etkisini gözlemlemek için kesikli sistemde deneyler yapılmıştır. Deneylerde dialdehit monomer kullanılarak sentezlenmiş kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinin poli(HEMA)'ya göre daha yüksek olduğu görülmüştür. En uygun adsorpsiyon koşulları T:37°C, pH=9 fosfat tamponu, 0,5 mg/ml lizozim derişimi olarak kaydedilmiştir.

Adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini göstermek için farklı tampon sistemleri kullanılmış ve pH 5,0-10,0 arasında çalışılmıştır (pH 5,0 için $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH 6,0-8,0 için $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 9,0-10,0 için $(\text{CaHCO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3)$). Kriyojellere maksimum Lizozim bağlama kapasitesi pH 9,0 değerinde gözlenmiştir. Daha asidik ve nötral pH bölgelerinde lizozim adsorpsiyon kapasitesi önemli derecede azalmıştır. Sulu çözeltilerden proteinlerin maksimum adsorpsiyonlarının genellikle net yük taşımadıkları pH değerlerinde (izoelektrik nokta, pI) gözlemlendiği bilindiğinden ve lizozim enziminin de pI değeri 9 olduğundan bu beklenen bir sonuçtur. Poli(HEMA) kriyojel yapı üzerine spesifik olmayan Lizozim adsorpsiyonu pH'dan bağımsızdır ve çalışılan tüm pH değerlerinde ihmal edilebilir olduğu belirlenmiştir. Poli(HEMA) kriyojel yapıya da non-spesifik lizozim adsorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir (1,1 mg/g).

Çünkü hidrofilik poli(HEMA) kriyojelin yüzeyinde lizozim molekülleri ile etkileşebilecek iyonik ve hidrofobik gruplar mevcut değildir. Dialdehit monomerlerin yapıya katılmasıyla kriyojellerin pH: 9,0 fosfat tamponunda lizozim adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde artmıştır.

Başlangıç derişimi deneylerinde, çözeltideki lizozim derişiminin artmasıyla, kriyojeller tarafından birim kütle başına adsorplanan lizozim miktarı, çalışılan kesikli sistemde 0,5 mg/ml'den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşmıştır. Bu adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir.

Sıcaklık deneylerinde poli(HEMA) kriyojel yapılara non-spesifik lizozim adsorpsiyonu, çalışılan bütün sıcaklık değerlerinde çok düşüktür. Poli(HEMA) kriyojellere lizozimin non-spesifik adsorpsiyonuna sıcaklığın herhangi bir etkisi görülmemiştir. Monomer bağlanmış kriyojellerde ise adsorplanan lizozim miktarı sıcaklığın artmasıyla önemli oranda artmıştır.

İyonik şiddet deneylerinde ise iyonik şiddet arttıkça lizozim adsorpsiyon kapasitesinde azalma görülmektedir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi NaCl içermeyen derişimde gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin, NaCl tuzunun lizozim enzimindeki tuz köprülerini kırması ve bunun adsorpsiyonu engellemesidir.

Desorpsiyon deneyleri adsorpsiyon amacıyla kullanılan kesikli sistemde incelenmiştir. Lizozim adsorplanmış poli(HEMA-dialdehit monomer) yapıları 1 saat desorpsiyon ortamıyla etkileştirilmiştir. Desorpsiyon 1 M KSCN ile gerçekleştirilmiştir. Lizozim enziminin poli(HEMA-dialdehit monomer) kriyojel yapılarına adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması aynı kriyojel yapılar kullanılarak ve desorpsiyon ajanı olarak KSCN kullanılarak 5 döngü boyunca tekrar edilmiş ve gözle görülebilir bir değişme olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abd-El-Aziz, A. S., Corkery, T. C., Todd, E. K., Afifi, T. H. and Ma, G., 2003, Organoiron Polyelectrolytes: Synthesis and Characterization of Cationic Cyclopentadienyliron Complexes of Polyarylether-Imines, *Journal of Inorganic and Organometallic polymers*, 13(3), 113-130 pp.

Adams, R., Bullock J. E. and Wilson W. C., 1923, J. Am. Chem. Soc. 45, 521 p.

Alderton, G., Ward, W. H. and Fevold, H. L., 1945, Isolation of lysozyme from egg White, *The Journal of Biological Chemistry*, California, 17 p.

Alderton, G. and Fevold, H., L., 1946, Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme, *The Journal of Biological Chemistry*, California, 5 p.

Alkan, H., Bereli, N., Baysal Z. and Denizli, A., Biochem. Eng. J., 45 (2009) 201 p.

Andac. M., Plieva, F. M., Denizli, A., Galaev, I. Y. and Mattiasson, B., 2008 *Macromol. Chem. Phys.*, 209, 577 p.

Armstrong, L. G and Lindoy. L. F., 1975, Studies Involving Nitrogen-Oxygen Donor Macrocyclic Ligands. I. Ni (II) Complexes of a New Series of Cyclic Ligands Derived from Salicylaldehyde, *Inorg Chem.*, 14; 1322-1326 pp.

Atkins, R. C. and Carey, F.A., 1997, Organik Kimya, 524 s.

Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I. Y., Piskin, E. and Denizli, A., *React. Funct. Polym.*, 2006, 66, 1263 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Bailon, P. and Nishikawa, A. H., 1977, Affinity purification methods. V¹. A novel and rapid isolation procedure for lysozymes, *Preparative Biochemistry*, New Jersey, 61-87 pp.

Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I. Y. and Denizli, A., *React. Funct. Polym.*, 2009, 69, 36 p.

Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I. Y. and Denizli, A., *Coll. Surf. B*, 2009, 68, 33 p.

Benesova, E. and Kralova, B., 2012, Affinity interactions as a tool for protein immobilization, *Affinity Chromatography*, Czech Republic, 29-34 pp.

Bereli, N., Andaç, M., Baydemir G., Say, R., Galaev, I. Y. and Denizli, A., 2008, Protein Recognition Via İon-coordinated Molecularly İmprinted Supermacroporous Cryogels, *Journal of Chromatography A*, 1190, 18-26 pp.

Chaiken, I. M., Wilchek, M. and Parikh, J., 1983, *Affinity Chromatography and Biological Recognition*. Academic pres, New York.

Chang, C. T., Chen, L. H., Sung, H. and Ka, M. D., 1986, Studies on the purification of lysozyme from egg white by ultrafiltration, *J. Chin. Agric. Chem. Soci.*, 24, 86-93 pp.

Chang, K. -H., Liao, H. -I. and Chen, J. -P., 2013, Preparation and Characterization of Gelatin/Hyaluronic Acid Cryogels for Adipose Tissue Engineering: In Vitro and In Vivo Studies, *Acta Biomaterialia*, 9, 9012-9026 pp.

Cherkasov, I. A. and Kravchenko, N. A., 1969, Improved method fort he isolation of lysozymes by enzyme-substrate chromatography, *Biokhimiya*, Russia, 34, 1089-1091 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Chiang, B. H., Su, C. K., Tsai, G. J. and Tsao, G. T., 1993, Egg White Lysozyme Purification by Ultrafiltration and Affinity Chromatography, *Journal of Food Science*, 58(2): 303-306 pp.

Clonis, Y. D. and Lowe, C., 1987, Scientific Foundations in Clinical Biochemistry, Marks, V., Williams, D.L. (eds.), 2nd edition, Heinemann Medical, London.

Cornelius, D. A., Brown, W. H., Shrake, A. F. and Rupley, J. A., 1974, *Methods Enzymol*, 34, 639 pp.

Cuatrecasas, P., Wilchek, M. and Anfinsen, C. B., 1968, Selective enzyme purification by affinity chromatography, *Proc Natl Sci USA*, Maryland, 61(2), 636-643 pp.

Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography, *Journal of Biological Chemistry*, Maryland, 245(12), 3059-3065 pp.

Daoud-Attieh, M., Chailo, H., Armutcu, C., Uzun, L., Elkak, A. and Denizli, A., 2013, Immunoglobulin G Purification from Bovine Serum with Pseudo-specific Supramacroporous Cryogels, *Separation and Purification Technology*, 118, 816-822 pp.

Davydov, B. E., Krentsel, B. A., Popov, Y. A. and Prokofeva, L. V., 1963, *Vysokomol. Soedin.* 5, 3: 321 p.

Dean, P. D. G., Johnson, W. S. and Middle, F. A., 1985, Affinity Chromatography, Oxford, IRL Press.

Delman, A. D., Stein, A. A. and Simms, B. B., 1967, *J. Macromol. Sci. (Chem.)*. A-1, 147 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I. Y., Pişkin, E. and Denizli, A., J. Appl. Polym. Sci., 105 (2007) 1808 p.

Denizli, A. and Pişkin, E., 2001. J. Biochemical and Biophysical System.

Denizli, A. and Pişkin, E., 2001. Dye-ligand affinity systems, *J. Biochem. Biophys.* 49: 391–416 pp.

Denizli, A. ve Küfrelioğlu, Ö. İ., 2009, Protein kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Ankara.

Durance, T. D. and Nakai, S., 1988, Simultaneous isolation of avidin and lysozyme from egg albumen, Food Science, Canada, 4 p.

Dyer, E. and Anderson, C. C., 1967, *J. Polym. Sci. A-1*, 5:1657 p.

Emmerich, H., Anne, T., Rainer, H. and Alois J., 2007, Hydrophobic İnreaction Chromatography of Proteins IV Kinetics of protein Spreading, *Journal of Chromatography A*, 1139, 84-94 pp.

Ertürk, G., Bereli, N., Tümer, M. A., Say, R. and Denizli, A., 2013, Molecularly İmprinted Cryogels for Human İnterferon-alpha Purification from Human Gingival Fibroblast Culture, *Journal of Molecular Recognition*, 26, 633-642 pp.

Fernandez-Sousa, J. M., Perez-Castells, R. and Rodriguez, R., 1978, A simple, one-step chromatographic procedure for the purification of lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta.*, 523(2), 4 p.

Fessenden, R. J., Fessenden, J.S. and Louge, M. W., 2001, *Organik Kimya*, 1192 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Fleming, A. and Allison, V. D., 1922, Observations on a bacteriolytic substance (“lysozyme”) found in secretions and tissues, *Br J Exp Pathol*, 3(5), 252-260 pp.

Flemming, A. 1945, “Penicillin”,
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf (Erişim tarihi: 26.05.2015)

Gribnan, T. C. B., Visser, J. and Nivard, R. C. F., 1982, Affinity Chromatography and Related Techniques, *Elsevier*, Amsterdam.

Hasselberger, F. X., 1978, in: Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes, Nelson-Hall, Chicago, IL., 128 p.

Hayashi, K., Shimoda, T., Funatsu, M. and Imoto, T., 1968, Iodination of lysozyme, II. reactivity and position of tyrosine residues, *Journal of Biochemistry*, Tokyo, 64, 365-370 pp.

Hedström, M., Plieva, F. and Galaev, I. Y., 2008, Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization, *Anal Bioanal Chem*, 390,907-912 pp.

Ibrahim H. R., Matsuzaki, T. and Aoki, T., 2001, Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function, 506, *FEBS Letters*, Japan, 5 p.

Imoto, T. and Yagishita, K., 1973, *Agr. Biol. Chem.*, 37, 465 p.

Jolles, J. and Jolles, P., 1984, *Mol. Cell. Biochem.* 63, 165-189 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Kastritis, P., L., and Bonvin, A. M. J. J., 2013, On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact, *Journal of the Royal Society, The Netherlands*, 27 p.

Kazancı, A., 2010, Polimer schiff bazları ve metal komplekslerinin sentezi ve katalizör özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 108 s. (yayımlanmamış)

Kokoshis, P. L., Williams, D. L., Cook, J. A. and Di-Luzio, N. R., 1978, *Science* 199, 1340-1342 pp.

Kumar, A., Plieva, F. M., Galaev, I. Y. and Mattison, B., 2003, Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel, *Journal of Immunological Methods*, 283, 185-194 pp.

Kumar, A., Rodriguez-Cabarello, A., Plieva, F.M., Galaev, I. Y., Nandakumar, K. S., Kamihira, M., Holmdahl, R., Orfao, A. and Mattison, B., 2005, 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 pp.

Kumar, A. and Srivastava, A., 2010, Cell separation using cryogel-based affinity chromatography, *Nature Protocols*

Kuyukina, M. S., Iushina, I. B., Kamenskikh, T. N., Bulicheva, M. V. and Stukova, G. I., 2013, Survival of Cryogel-immobilized Rhodococcus Strains in Crude Oil-contaminated Soil and Their Impact on Biodegradation Efficiency, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 118-125 pp.

Lemarbre, P., Rinehart, J. J., Kay, N. E., Vesella, R. and Jacobs, H. S., 1981, *Blood* 58, 994-999 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D. B., and Lo, K. V.**, 1986, Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography, *Journal of Food Science*, Canada, 51, 1032-1036 pp.
- Lowe, C. and Clonis Y. D.**, 1985, Bioactive Polymeric Systems. Gebelein, C.E., Carraher, C.E. (eds), Plenum pres, New York., 203-222 pp.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T. D.**, 1994, *The Journal of Cell Biology*, Belgium, 121(1), 107-115 pp.
- Mallik, S., Plunkett, S. D., Dhal, P. K., Johnson, R. D., Pack, D. W., Shnek D. R. and Arnold, F. H.**, 1994, Towards Materials for the Specific Recognition and Separation of Proteins, *New Journal of Chemistry*, 14:299-304 p.
- Martinez, Y. N., Cavello, I., Hours, R., Cavalitto, S. and Castro, G. R.**, 2013, Immobilized Keratinase and Enrofloxacin Loaded on Pectin PVA Cryogelpatches for Antimicrobial Treatment, *Bioresource Technology*, 145, 280–284 pp.
- Marvel, C. S. and Tarköy, J.**, 1957, *Am. Chem. Soc.* ,79, 6000 p.
- Meltem, Y., Bayramoğlu, G. and Arıca, M. Y.**, 2005, Separation and purification of lysozyme by reactivegreen 19 immobilized membrane affinity chromatography, *Food Chemistry*, 89(1), 11-18 pp.
- Merlic, A. C. and Strouse, J.**, 1997, Table of IR Absorptions, <http://www.chem.ucla.edu/~webspectra/index.html> (Erişim tarihi: 30.06.2015)
- Mosbach, K.**, 1974, AMP and NAD as ‘general ligands.’, *Methods Enzymol.*, 34, 229-242 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Muzarelli, R. A., Borontini, G. and Rochetti, R., 1978, Isolation of lysozyme on chitosan, *Biotechnol. Bioeng.*, 20(1), 87-94 pp.

Osserman, E. F., Klockars, M., Halper, J. and Fischer, R. E., 1974, in: Lysozyme (Osserman, E.F., Cançeld, R.E. and Beychok, S., Eds.), Academic Press, New York.

Özkara, S., Say, R., Andaç, C. and Denizli, A., 2008, An Ion-imprinted Monolith for In-Vitro Removal of Iron Out of Human Plasma with Beta Thalassemia, *Industrial Engineering Chemistry Research*, 47, 7849-7856 pp.

Palmer, T., 1994, Enzim Bilgisi, (Çev. S. Gengiz ve M. Gengiz), Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul, 258 s.

Phillips, D. C., 1967, The hen egg-white lysozyme molecule, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57(3), 484-496 pp.

Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Anderson, J., Galaev, I. Y. and Mattiason, B. J., 2004, *Chromatogr. B*, 807, 129 pp.

Plieva, F. M., Andersson, J., Galaev, I. Y. and Mattiasson, B., 2004, *J. Sep. Sci.*, 27, 129 p.

Porath, J. and Sundberg, I., 1972, High Capacity Chemisorbents for Protein Immobilisation. *Nature (London) New Biology*, 238, 261-262 pp.

Porath, J., 1992, Immobilized metal ion affinity chromatography, *Protein Expression and Purification*, 3(4), 263-281 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Proctor, V. A. and Cunningham, F. E., 1988, The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. CRC Crit Rev Food Sci Technol 26, 359 p.

Scopes, R. K., 1982, Protein Purification; Principles and Practise, New York: Springer Verlag.

Scouten, W. H., 1981, Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices. John Wiley and Sons, New York.

Shim, H. K. and Ahn, T., Song, S. Y., 2002, Synthesis and LED device properties of carbazole and naphthalene contained conjugated polymers, *Thin Solid films*, 417, 7-13 pp.

Simionescu, C. I., Hurduc, N., Dobreanu, A., Colotin, G., Grigoras, M. and Catanescu, O., 2001, Synthesis and characterization of some aliphatic-aromatic poly(schiff base)s, *European Polymer Journal*, 37, 2213-2216 pp.

Smolelis, A. N. and Hartsell, S. E., 1949, J. Bacteriol 58, 731 pp.

Solomons, T. W. G. and Fryhle, C. B., 2002, Organik Kimya, (Çev. G. Okay ve Y. Yıldırım), İstanbul, 1350 s.

Stivala, S. S., Sacco, G. R. and Reich, L., 1964, *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* 2, 943 p.

Strang, R. H. C., 1984, Purification of Egg-White Lysozyme by Ion-Exchange Chromatography, University of Glasgow, 12(2):57-59 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Suematsu, K., Nakamura, K. and Takeda, J., 1983, Synthesis of Aromatic Polyimines by the Condensation of Aromatic Dialdehyde and Diamine, *Colloid & Polymer Science*, 261, 493-501.

Suematsu, K., 1981, Polymer Preprints Japan 30, 880 p.

Sundram, P. V. and Eckstein, F., 1978, Theory and Practise in Affinity Techniques, Academic Pres, New York.

Thakur, A., Chauhan, A. and Willcox, M. D., 1999, Aust. N.Z. J. Ophthalmol. 27: p. 224-227 pp.

Uzun, L., Armutcu, C., Biçen, Ö., Ersöz, A., Say, R. and Denizli, A., 2013, Simultaneous Depletion of İmmunoglobulin G and Albumin from Human Plasma Using Novel Monolithic Cryogel Columns, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 1-8 pp.

Wilchek, M. and Miron, T., 1999, Thirty Years of Affinity Chromatography, React. Funct. Polymers. 41, 263-268 pp.

Wu, T. –Y. and Chen, Y., 2002, Synthesis and Characterization of Novel Luminescent Polymers with Alternate Phenothiazine and Divinylbenzene Units, *Journal of Polymer Science A*, 40,4452-4462 pp.

Yamasaki, N. and Eto, T., 1981, A novel adsorbent for affinity chromatography of lysozyme, *Agric. Biol. Chem.*, Japan, 45(12), 2939-2941 pp.

Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H. and Denizli, A., Biochem, Eng. J., 43 (2009) 272 p.

Yoda, N. and Kurihara, Y., Kogyo kagaku zasshi 70 (1967), 2057 p.

ÖZGEÇMİŞ

Ad : Hande

Soyad : EFE

Doğum Yeri : Osmangazi

Doğum Tarihi : 07.08.1988

Adres : Kazım Dirik Mahallesi 194 Sokak No:22 Ağahan
Apartmanı Bornova-İZMİR

e-posta adresi : handeefe@gmail.com

Cep Telefonu : 0507 857 16 59

EĞİTİM BİLGİLERİ

Bursa Süleyman Çelebi Lisesi (2002-2006)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2007-2012)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal
Teknolojiler Anabilim Dalı (2012-)