

**MİKRO VE NANO YÜZEYLERDE
ENZİMLERİN AKTİF BÖLGE BENZETİMİ İÇİN
YENİ MOLEKÜLER TANIMLAMA TEKNOLOJİLERİ
Doktora Tezi**

Rüstem KEÇİLİ

Eskişehir, 2017

**MİKRO VE NANO YÜZEYLERDE
ENZİMLERİN AKTİF BÖLGE BENZETİMİ İÇİN
YENİ MOLEKÜLER TANIMLAMA TEKNOLOJİLERİ**

RÜSTEM KEÇİLİ

**DOKTORA TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Mayıs, 2017**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Rüstem Keçili'nin "Mikro ve Nano Yüzeylerde Enzimlerin Aktif Bölge Benzetimi İçin Yeni Moleküler Tanımlama Teknolojileri" başlıklı tezi 26/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN	
Üye	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	: Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	
Üye	: Doç. Dr. Lokman UZUN	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Volkan KILIÇ	

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

MİKRO VE NANO YÜZEYLERDE ENZİMLERİN AKTİF BÖLGE BENZETİMİ İÇİN YENİ MOLEKÜLER TANIMLAMA TEKNOLOJİLERİ

Rüstem KEÇİLİ

Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2017

Danışman: Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN

Moleküler tanıma canlı organizmalar için oldukça önemli bir kavramdır. Bu çalışmada mikro ve nano yüzeylerde lipaz enziminin aktif bölgesinin yeni nesil moleküler tanımlama teknolojileri kullanılarak taklit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak, lipaz benzeri mikro ve nano yapıların hazırlanmasında kullanılacak fonksiyonel monomerler metakriloilamido histidin (MAH), metakriloilamido serin (MASE) ve metakriloilamido glutamik asit (MAGA) sentezlenmiştir. Sonrasında p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler süpansiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlanmıştır.

İkinci aşamada, demir nanopartiküllerin yüzeyi metakriloil modifikasyonu sonrasında p-nitrofenilpalmitat baskılanmış polimerik kabuk ile kaplanmıştır.

Üçüncü aşamada ise nanokatmanlarında p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimer içeren polimer-kil nanokompozit malzemeleri hazırlanmıştır. Hazırlanan enzim mimik yapıların karakterizasyonları şişme testleri, BET, FT-IR, SEM ve TEM cihazları ile gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında, hazırlanan mikro ve nano yapıların p-nitrofenil palmit hidrolizi, biyodizel üretimi, jasmonik asit ve oleik asit esterifikasyonundaki etkinlikleri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Tanıma, Lipaz, Yapay Enzim, Biyodizel, Esterifikasyon, Jasmonik Asit, Oleik Asit.

ABSTRACT

NEW MOLECULAR RECOGNITION TECHNOLOGIES FOR MIMICKING THE ACTIVE SITES OF ENZYMES ON MICRO AND NANO SURFACES

Rüstem KEÇİLİ

Department of Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, May, 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN

Molecular recognition is a crucial phenomena for living organisms. This study is aimed to mimic the active site of lipase on the micro and nano surfaces by using new molecular recognition technologies. For this purpose, firstly, functional monomers methacryloylamido histidine (MAH), methacryloylamido serine (MASe) and methacryloylamido glutamic acid (MAGA) were synthesized and then p-nitrophenyl palmitate microbeads were prepared by suspension polymerization technique.

In the second step, surface of the iron nanoparticles was coated with p-nitrophenyl palmitate imprinted polymeric shell.

In the third step, polymer-clay nanocomposite materials having p-nitrophenyl palmitate imprinted polymer between their nanolayers were prepared. The characterization of the prepared enzyme mimic structures was carried out by swelling tests, BET, FT-IR, SEM and TEM.

In the last step of the study, the efficiencies of the prepared micro and nanostructures for the p-nitrophenyl palmitate hydrolysis, biodiesel production, jasmonic acid and oleic acid esterifications were investigated.

Keywords: Molecular Recognition, Lipase, Artificial Enzyme, Biodiesel, Esterification, Jasmonic Acid, Oleic Acid.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince yardımı ve desteğiyle her zaman yanımda olan Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN'a

Bana her türlü konuda destek olan Hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımda bulunan Hocam Sayın Prof. Dr. Deniz HÜR'e

Tezimin değerlendirilmesinde jüri üyesi olarak yer alan ve yardımlarını eksik etmeyen Hocalarım Sayın Doç. Dr. Lokman UZUN'a, Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK'e ve Yrd. Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a

Desteği ve gülen yüzüyle hep yanımda olan eşim Merve KEÇİLİ'ye

Maddi-manevi destekleriyle hayatımın her anında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Annem Safiye KEÇİLİ, Babam Yaşar KEÇİLİ, Kız Kardeşim Zeynep ÖZAYDIN ve Erkek Kardeşim Hüseyin KEÇİLİ'ye

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rüstem KEÇİLİ

Mayıs 2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Rüstem KEÇİLİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP'ler).....	3
1.1.1. Başlatıcılar	5
1.1.2. Fonksiyonel monomerler	6
1.1.3. Çapraz bağlayıcılar.....	7
1.1.4. Çözücüler	9
1.2. MIP'lerin Hazırlanmasında Kullanılan Yaklaşımlar	9
1.2.1. Kovalent baskılama	10
1.2.2. Yarı kovalent baskılama	11
1.2.3. Kovalent olmayan baskılama	12
1.2.4. Metal-şelat etkileşimli baskılama	14
1.3. Yapay Enzimler.....	16
1.4. Biyometik Katalizörlerin Hazırlanmasında Kullanılan Yaklaşımları	17
1.4.1. Dizayn yaklaşımı.....	17
1.4.2. Geçiş hali analoğu (TSA) yaklaşımı	17
1.4.3. Katalitik aktivite seçimi yaklaşımı	18
1.5. MIP'lerin Katalizör Olarak Kullanımı.....	18
1.5.1. Hidroliz reaksiyonları.....	18
1.5.2. Eliminasyon reaksiyonları	26
1.5.3. C-C bağı oluşum reaksiyonları.....	26

1.6. Polimer Sentezi.....	27
1.6.1. Serbest radikal polimerizasyonu	27
1.6.2. Kondenzasyon polimerizasyonu	28
1.7. Polimerizasyon Yöntemleri.....	28
1.7.1. Yığın (bulk) polimerizasyonu	28
1.7.2. Süspansiyon polimerizasyonu	30
1.7.3. Emülsiyon polimerizasyonu	31
1.7.4. Çöktürme polimerizasyonu.....	32
1.8. Lipaz ve Uygulama Alanları.....	33
1.9. Jasmonik Asit ve Metil Jasmonat.....	34
1.10. Metil Oleat.....	36
1.11. Biyodizel.....	37
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
2.1. Materyal.....	39
2.1.1. Kullanılan kimyasallar	39
2.1.2. Kullanılan cihazlar	39
2.2. Yöntem	39
2.2.1. Amino asit içeren fonksiyonel monomerlerin sentezi.....	39
2.2.2. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin hazırlanması	42
2.2.3. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin hazırlanması	43
2.2.4. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin hazırlanması.....	44
2.2.5. Karakterizasyon çalışmaları.....	46
2.2.5.1. Yüzey morfolojisi	46
2.2.5.2. NMR analizleri.....	46
2.2.5.3. Yüzey alanı ölçümü.....	46
2.2.5.4. Şişme testi	47
2.2.5.5. Elementel analiz	47
2.2.5.6. FT-IR analizleri.....	47

2.2.6. Hazırlanan mikro ve nanoplatformların p-nitrofenil palmitat hidrolizinde kullanımı	48
2.2.7. Enzim aktivitesi çalışmaları	48
2.2.8. Transesterifikasyon reaksiyonları.....	49
2.2.9. GC-MS analizleri	49
3. BULGULAR.....	51
3.1. Hazırlanan Mikro ve Nanoplatformların Karakterizasyonu	51
3.1.1. Yüzey morfolojisi	51
3.1.2. Yüzey alanı ölçümü.....	53
3.1.3. Şişme testi	53
3.1.4. Elementel analiz	53
3.1.5. FT-IR analizleri.....	54
3.1.6. NMR analizleri.....	56
3.2. Moleküler Baskılanmış Mikrokürelerin p-Nitrofenil Palmitat Hidrolizinde Kullanımı	57
3.2.1. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi.....	57
3.2.2. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi	58
3.2.3. Enzim kinetiği	59
3.2.4. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği	61
3.2.5. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı.....	62
3.3. Moleküler Baskılanmış Manyetik Nanopartiküllerin p-Nitrofenil Palmitat Hidrolizinde Kullanımı.....	63
3.3.1. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi.....	63
3.3.2. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi	63
3.3.3. Enzim kinetiği	64
3.3.4. Moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği.....	65
3.3.5. Moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküllerin transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı	65
3.4. Moleküler Baskılanmış Polimer-Kil Nanokompozitlerin p-Nitrofenil Palmitat Hidrolizinde Kullanımı.....	67
3.4.1. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi.....	67

3.4.2. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi	68
3.4.3. Enzim kinetiği	68
3.4.4. Moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin tekrar kullanılabilirliği.....	69
3.4.5. Moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı	70
 4. SONUÇ, TARTIşMA VE ÖNERİLER.....	72
 KAYNAKÇA.....	73
 ÖZGEÇMİř	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajları ve dezavantajları	13
Tablo 1.2. Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan MIP temelli yapay enzimler.....	24
Tablo 3.1. Sentezlenen fonksiyonel monomerlere ait elementel analiz sonuçları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların şematik özeti	3
Şekil 1.2. MIP sentezinin şematik gösterimi	4
Şekil 1.3. MIP içerisinde olası bağlanma bölgelerinin şematik gösterimi	5
Şekil 1.4. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan başlatıcılar.....	6
Şekil 1.5. Sıcaklık ya da UV ışık altında 2,2'-azodiizobütironitril'in parçalanması	6
Şekil 1.6. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler.....	7
Şekil 1.7. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar	8
Şekil 1.8. Kovalent olarak 4-nitrofenil- α -D-mannopiranoz baskılanmış polimerin şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.9. Yarı-kovalent baskılama ile hazırlanan kolesterole seçici MIP'in şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.10. Kovalent olmayan baskılama ile (-)-isoproterenol'e seçici MIP hazırlanmasının şematik gösterimi	14
Şekil 1.11. DPA için MIP temelli Au/Ag nanosensörün hazırlanması	15
Şekil 1.12. QCM sensör yüzeyinde 8-OHdG baskılı polimerin hazırlanması.....	16
Şekil 1.13. Leonardt ve Mosbach tarafından geliştirilen kimotripsin benzeri MIP-temelli enzimin şematik gösterimi	19
Şekil 1.14. Sellergren ve Shea. tarafından geliştirilen kimotripsin benzeri MIP-temelli enzimin şematik gösterimi	20
Şekil 1.15. DEVPA ve DPP arasındaki etkileşimin şematik gösterimi	20
Şekil 1.16. p-NPA hidrolizine yönelik hazırlanan MIP-temelli enzimin şematik gösterimi	21
Şekil 1.17. MIP-temelli silika nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi	22
Şekil 1.18. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler tirozin ve arjininin yan zincirleri arasındaki olası etkileşimler	23
Şekil 1.19. Yığın polimerizasyonu ile MIP hazırlanmasının şematik gösterimi	30
Şekil 1.20. Süspansiyon polimerizasyonu ile MIP hazırlanmasının şematik gösterimi	31

Şekil 1.21. Emülsiyon polimerizasyonunun aşamaları	32
Şekil 1.22. Çöktürme polimerizasyonu ile nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi	33
Şekil 1.23. Saldırıya maruz kalmış bitki yapraklarında jasmonik asit ve diğer savunma hormonlarının sentezini başlatan sinyal mekanizması	35
Şekil 1.24. Bitki bünyesinde jasmonik asitin biyosentez mekanizması	36
Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan fonksiyonel monomerlerin açık yapıları	41
Şekil 2.2. p-Nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimerin şematik gösterimi	42
Şekil 2.3. Yüzeyinde p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllerin şematik gösterimi.....	43
Şekil 2.4. Nanotabakalarında p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılanmış polimer-kil kompozit malzemelerin hazırlanmasının şematik gösterimi.....	45
Şekil 2.5. Lipaz katalizli p-NPP hidroliz reaksiyonu	48
Şekil 3.1. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik mikrokürelere ait SEM görüntüleri.....	51
Şekil 3.2. Yüzeyinde p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllere ait TEM görüntüsü.....	52
Şekil 3.3. Manyetik nanopartiküllerin TMSPM modifikasyonu öncesi ve sonrası FT-IR spektrumu.....	54
Şekil 3.4. Yüzeyinde pNPP baskılı polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu.....	55
Şekil 3.5. pNPP baskılanmış polimer-kil nanokompozitin FT-IR spektrumu.....	55
Şekil 3.6. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi	58
Şekil 3.7. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi	58
Şekil 3.8. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelere için Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 3.9. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelere için Lineweaver-Burk grafiği	61
Şekil 3.10. Transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler	62
Şekil 3.11. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi	63
Şekil 3.12. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi	64
Şekil 3.13. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküller için Lineweaver-Burk grafiği	64

Şekil 3.14. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği	65
Şekil 3.15. Transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler	66
Şekil 3.16. Jasmonik asit'in esterifikasyon reaksiyonu sonunda oluşan ürünlere ait GC-MS kromatogramı.....	66
Şekil 3.17. Oleik asit'in esterifikasyon reaksiyonu sonunda oluşan ürünlere ait GC-MS kromatogramı.....	67
Şekil 3.18. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi	67
Şekil 3.19. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi	68
Şekil 3.20. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitler için Lineweaver-Burk grafiği.....	69
Şekil 3.21. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin tekrar kullanılabilirliği	70
Şekil 3.22. Transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler	71

KISALTMALAR DİZİNİ

ABDV	: 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril)
AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
BET	: Gözenek boyutu analizörü
BocPheONP	: <i>N-tert</i> -bütoksikarbonil fenil alanin- <i>p</i> -nitrofenil ester
DEVPA	: N,N'-dietil(4-vinilfenil)amidin
DPA	: Dipikolinik asit
DPP	: Difenil fosfat
DVB	: Divinil benzen
EDMA	: Etilen glikoldimetakrilat
FT-IR	: Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
HVA	: Homovanilik asit
JA	: Jasmonik asit
MAA	: Metakrilik asit
MAAP	: Metakriloilamido antipirin
MABt	: Metakriloilamido benzotriazol
MAGA	: Metakriloilamido glutamik asit
MAH	: Metakriloilamido histidin
MAIDA	: Metakriloilimido diasetik asit
MASe	: Metakriloilamido serin
MBAA	: N, N'-metilenbisakrilamit
MeJA	: Metil jasmonat
MOEDMAC ₁₆	: 2-Metakriloiloksi etil dimetilheksadesil amonyum bromür
MIP	: Moleküler baskılanmış polimer
NIPAm	: N-izopropil akrilamit
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
p-NPA	: p-Nitrofenil asetat
p-NPP	: p-Nitrofenil palmitat
p-NP	: p-Nitro fenol
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin
PETRA	: Pentaeritritol triakrilat

PVAL	: Polivinilalkol
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TFMAA	: Trifloro metakrilik asit
TMSPM	: Trimetoksisililpropil metakrilat
TRIM	: Trimetilolpropan trimetakrilat
TSA	: Geçiş hali analogu

1. GİRİŞ

Vücudumuzu bulunan hücreler ve moleküller birbirleri arasında etkileşim içerisinde. Bu karşılıklı etkileşim “moleküler tanıma” yoluyla gerçekleşir ve vücudumuzun yaşamsal fonksiyonları olağanüstü bir uyum içerisinde yerine getirilir. O nedenle moleküler tanıma canlı organizmalarda yaşamın varlığı için oldukça önemli bir kavramdır. Örneğin, hücre membranlarının yüzeyinde yer alan reseptörler hormonları moleküler tanıma ile kendine bağlar ve hücreler arası etkileşimden sorumludurlar. “Moleküler tanıma” ilk kez 1987 yılında Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn ve Charles J. Pedersen’in bu konu üzerine olan araştırmaları ile Nobel Kimya ödülünü kazanmalarıyla tüm Dünya’da tanınır hale gelmiştir.

Doğada bulunan moleküler yapıların birbirini tanıması ve etkileşime girmesi bilim insanlarının ilgisini her zaman çekmiş ve son yıllarda bu yapıları taklit edecek mimik sistemlerin dizayn edilip hazırlamasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Hazırlanan bu mimik sistemler yapay reseptörler olarak da adlandırılırlar ve sahip oldukları en önemli avantajlarından birisi moleküler tasarımın serbest ve doğal olmasıdır.

Moleküler baskılama teknolojisi çok yönlü yapay reseptörleri verimli, basit, hızlı, seçici ve ekonomik olarak hazırlamak için geliştirilmiştir. Yapay reseptörler uygun fonksiyonel monomerlerin kalıp molekül (hedef molekül) varlığında ve çapraz bağlayıcı ajan eşliğinde polimerleştirilmesiyle kolayca hazırlanabilir. Hazırlanan moleküler baskılama temelli yapay reseptörlerin hedef moleküle karşı yüksek afinite gösteren binlerce hatta milyonlarca bağlanma bölgesi bulunurken doğal reseptörler bir veya birkaç bağlanma bölgesine sahiptir.

Çok yönlü endüstriyel uygulamaları ve eşsiz katalitik performansı ile lipazlar biyoteknoloji dünyasında her geçen gün önem kazanmaktadır. Endüstride kullanım alanlarına örnek olarak yağların biyodönüşümleri, deterjan, tekstil ve ilaç sektörleri verilebilir.

Lipazlar yağların çeşitli reaksiyonlarında, ester ve gliseridlerin sentezinde ve yağların modifikasyonunda biyokatalizör olarak kullanılmıştır. Lipazlar yaygın şekilde transesterifikasyon reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılır (Desaive ark. 2004). Bununla birlikte düşük kararlılığı ve yüksek seçiciliğe sahip enzimin üretim maliyetinin yüksek olması lipazın geniş ölçekteki endüstriyel uygulamalarında önemli bir problem

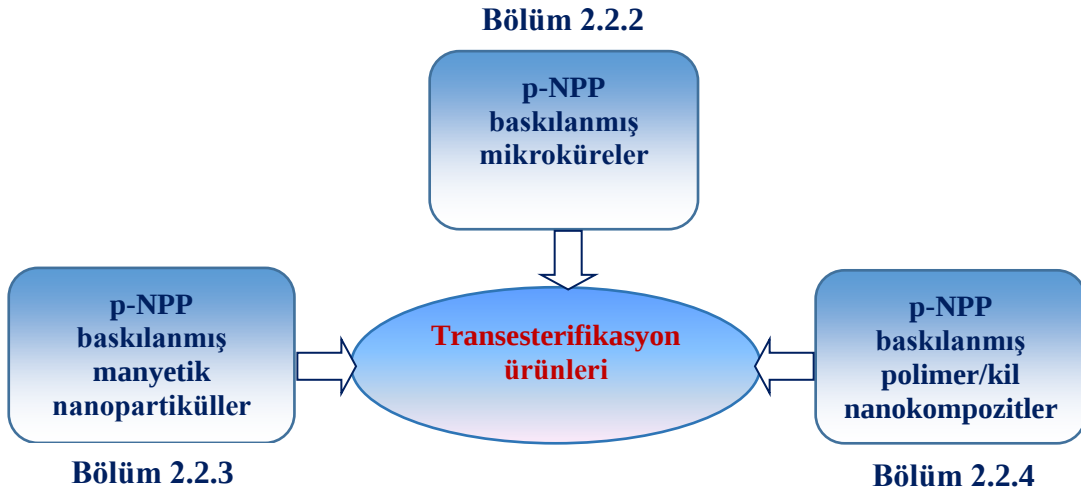
oluşturmaktadır. Lipazların uygulamaları arasında biyodizel üretimi (Hsu ve ark. 2002), enantiyomerik ilaç sentezi (Massolini, 2003) ve poliestерlerin enzimatik polimerizasyonu (Gübitz ve Paulo, 2003) örnek olarak verilebilir. Literatürde yer alan birçok çalışmada farklı malzemelere immobilize edilmiş lipazlar transesterifikasyon reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmıştır (Pang ve ark. 2016; Bayramoğlu ve ark. 2015; Kuo ve ark. 2013).

Doğal lipazlarda bulunan Ser-Glu-His aktif sistemi ile donatılmış yapay bir enzim literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında Ser-Glu-His aminoasitlerini içeren monomerlerin birlikte organizasyonu ve yüksek oranda çapraz bağlanmasıyla lipaz enziminin aktif bölgesi mikropartiküllerde, manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde ve polimer-kil kompozitlerin nanotabakalarında olmak üzere üç farklı mikro ve nanoplatformda oluşturulmuştur. Hazırlanan bu malzemelerin etkinliği bitkisel yağlardan yağ asidi metil esterlerinin (biyodizel) üretimindeki transesterifikasyon işlemlerinde test edilmiştir. Bunlara ek olarak, hazırlanan yapay enzim sistemlerinin biyokimyasal proseslerde (jasmonik asitten metil jasmonat eldesi, oleik asitten metil oleat eldesi) kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının bilimsel ve teknolojik çıktıları aşağıda özetlenmiştir:

1. Moleküler baskılama teknolojisine dayalı yapay lipaz sentezi ve karakterizasyonu: Yüksek sıcaklık, düşük ve yüksek pH gibi sert koşullar altında çabuk bozunabilen ve oldukça pahalı doğal enzimlere bir alternatif olarak lipazın aktif bölgesinin (Ser-Glu-His) polimerik mikro ve nano yüzeylerde ve polimer-kil nano kompozitlerde oluşturulması ve karakterizasyonları
2. Enzim aktivitesinin belirlenmesi: Çalışmanın bu aşamasında yapay lipazın p-nitrofenil palmitat hidrolizindeki etkinliğinin test edilerek enzimatik aktivitesinin belirlenmesi
3. Sentetik lipazın biyodizel üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması
4. Sentetik lipazın sadece bitki fizyolojisinde kompleks bir mekanizma ile üretilen metil jasmonat eldesinde kullanılması ve oleik asitten metil oleat eldesinde kullanılabilirliğinin araştırılması

Şekil 1.1’de bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların şematik özeti verilmiştir.



Şekil 1.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların şematik özeti

1.1. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP’ler)

MIP’ler hedef molekül için seçici tanıma bölgelerine sahip sentetik malzemelerdir. Moleküler baskılama teknolojisi ilk kez 1972 yılında Günter Wulff ve ekibi tarafından literatüre rapor edilmiş ve polimerik yapı içerisinde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle hedef moleküle özgü seçici bağlanma bölgeleri elde edilmiştir (Wulff ve Sarhan, 1972). Daha sonra yapılan çalışmalarda istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle "Yapay enzim" elde edilebileceğini de göstermiştir (Wulff ve Poll, 1987). Antikor gibi biyoreseptörler yüksek seçicilikleri nedeniyle spesifik antijenlerini saflaştırmada kullanılan popüler ligandlardır. Fakat yüksek seçiciliği olan bu biyolojik moleküller ortam şartlarından kolay etkilenir ve protein yapıları asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda denatüre olur. Antikor/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran yaklaşım “Moleküler Baskılama” dır (Mosbach ve Ramström 1996).

MIP’ler moleküler tanımaya elverişlidir, ucuzdur ve kolayca hazırlanabilir. Bunun yanısıra, sert proses koşullarına (yüksek sıcaklık, düşük ya da yüksek pH vb)

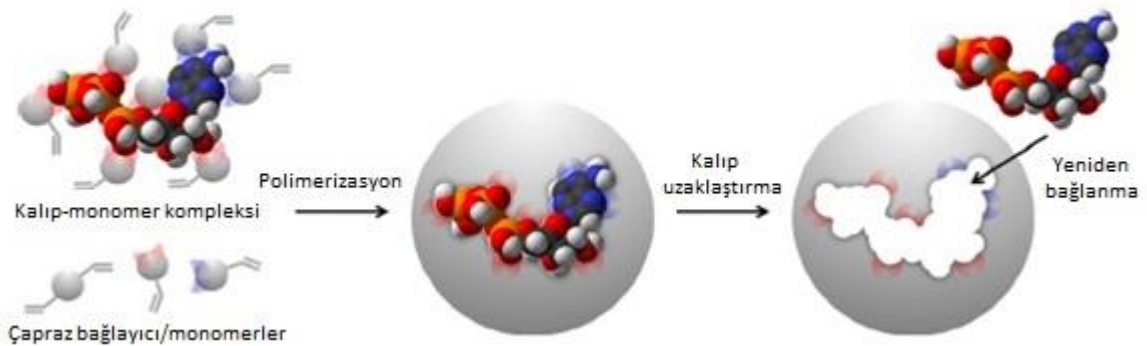
oldukça dayanıklıdır ve kararlılıklarını korur. Uzun süre performansında değişim olmaksızın saklanabilirler (Selligren, 2001; Kryscioa ve Peppas 2012; Cheong ve ark. 2013; Vasapollo ve ark. 2011; Chen ve ark. 2012; Guerreiro ve ark. 2011; Lai ve Feng, 2003; Kupai ve ark. 2017)

Moleküler baskılama yöntemi temelde üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 1.2):

1) Ön-kompleksleşme: Bu basamakta fonksiyonel monomerler kalıp molekül ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler sonucu kalıp-monomer kompleksi oluşur. Bu etkileşim esnasında kalıp molekülün kimyasal özellikleri ve üç boyutlu yapısı önemlidir.

2) Polimerizasyon: Kalıp-fonksiyonel monomer kompleksi uygun bir çapraz bağlayıcı eşliğinde başlatıcı kullanılarak polimerleştirilir.

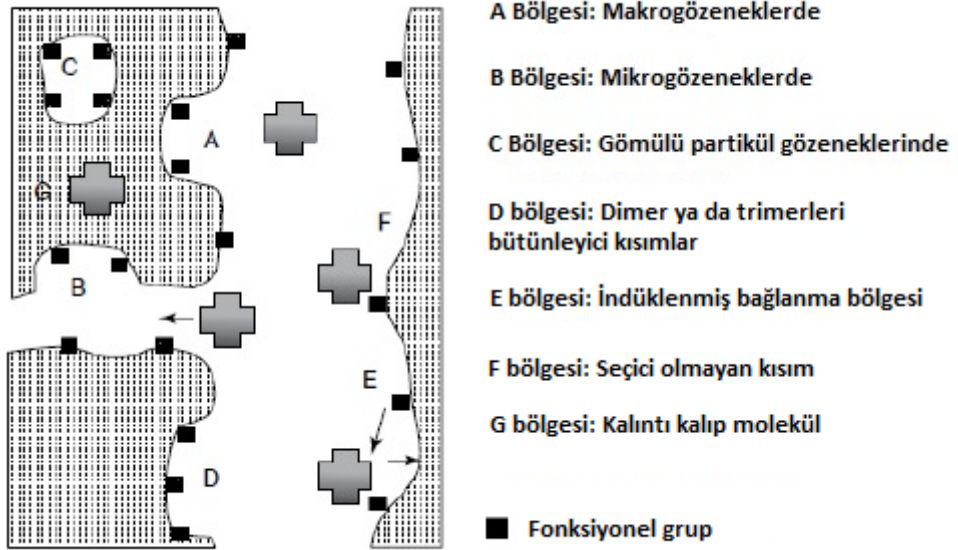
3) Kalıp molekülün polimerik yapıdan uzaklaştırılması: Analit molekülün uzaklaştırılmasına uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan analit molekülü uzaklaştırılır. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik (büyüklük, şekil ve üç boyutlu yapı) olarak seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir.



Şekil 1.2. MIP sentezinin şematik gösterimi

Kaynak: Wackerlig ve Schirhagl, 2016

Hedef molekülün yeniden bağlanma kinetiği bağlanma prosesinde etkin olan etkileşimlerin doğasına bağlıdır. Polimerik ağı yapısı oluşan bağlanma bölgelerini etkiler ve dolayısıyla hazırlanan MIP'in hedef molekülü bağlama yeteneği de bundan etkilenir. Şekil 1.3'de bir MIP içerisinde olası bağlanma bölgeleri şematize edilmiştir.



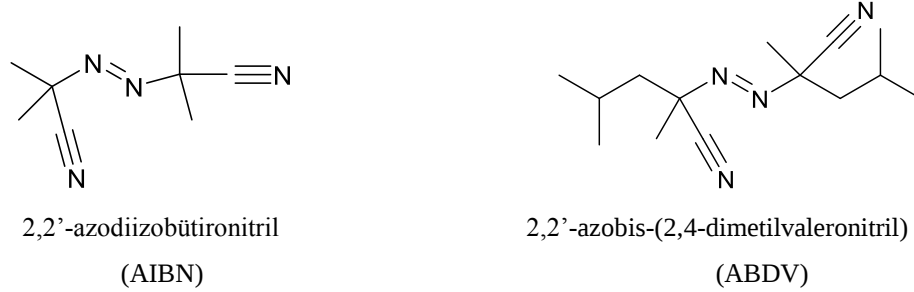
Şekil 1.3. MIP içerisinde olası bağlanma bölgelerinin şematik gösterimi

Moleküler baskılama tekniğinde, çözücü, fonksiyonel monomer, kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılır. Etkili bir baskılama elde edebilmek için bu parametrelerin seçimi oldukça önemlidir. Aşağıda bu parametreler detaylıca açıklanmıştır.

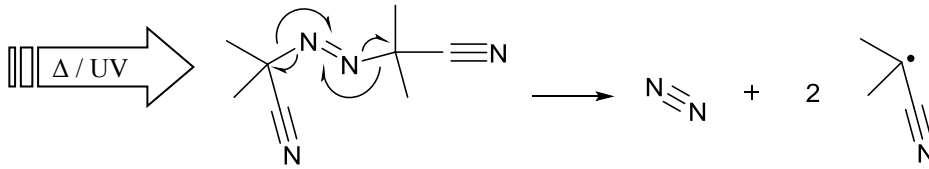
1.1.1. Başlatıcılar

Başlatıcılar Şekil 1.4'de şematik olarak gösterildiği gibi sıcaklık ya da UV ışık altında paraçalanarak iki serbest radikal moleküllerine paraçanırlar ve radikallerdeki eşleşmemiş elektronlar fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcı ile reaksiyona girerek polimerizasyon süresince polimerik ağı oluştururlar. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleksleşmenin hidrojen bağı ile gerçekleştiği durumlarda düşük polimerizasyon sıcaklığı tercih edilir ve bu şartlarda düşük

sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal olarak aktif olan başlatıcılar tercih edilir. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan başlatıcılar Şekil 1.5’de verilmiştir.



Şekil 1.4. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan başlatıcılar

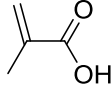


Şekil 1.5. Sıcaklık ya da UV ışık altında 2,2'-azodiizobütironitril'in parçalanması

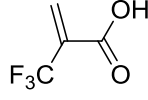
1.1.2. Fonksiyonel monomerler

Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Kovalent olmayan moleküler baskılamada baskılamanın gerçekleşmesi için genellikle daha fazla miktarda baskılanacak molekül kullanılır. Kompleks oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerin fonksiyonelliği ile baskılanacak molekülün veya iyonun fonksiyonelliğinin uyuşması çok önemlidir. Fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kompleksleşme monomerin sterik ve elektronik etkisine bağlıdır. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip yaygın olarak kullanılan bazı fonksiyonel monomerler yanında metal-şelat etkileşimini ön plana çıkaran monomerler de son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 1.6’da MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler verilmiştir.

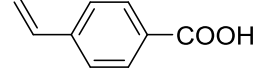
ASİDİK



Metakrilik asit

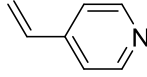


Trifloro
metakrilik asit

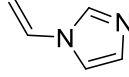


4-Vinilbenzoik asit

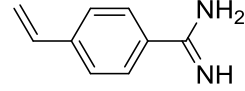
BAZİK



4-Vinilpiridin

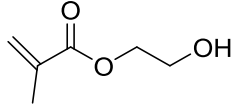


1-Vinilimidazol

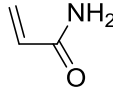


4-Vinilbenzamidin

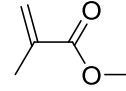
NÖTR



2-Hidroksietil-
metakrilat



Akrilamit



Metil metakrilat

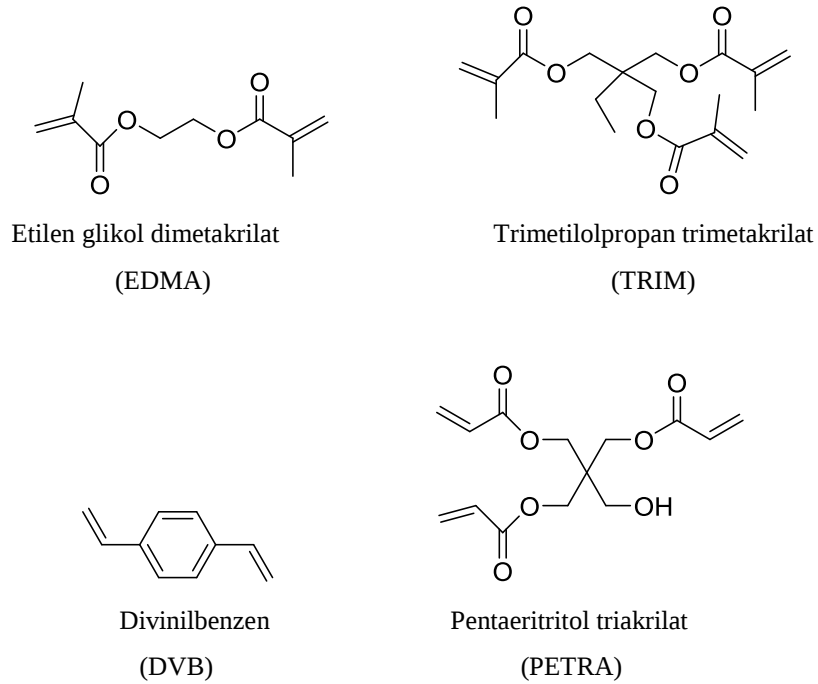
Şekil 1.6. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler

Sentezin kolay olması nedeni ile akrilik ve metakrilik asidin esterleri ve amidleri yaygın olarak kullanılır. Ticari olarak pek çok fonksiyonel monomer bulunur. Bununla birlikte ticari monomerler genellikle depolama esnasında istenmeyen polimerleşmelerin engellenmesi için inhibitör ve stabilizör (hidrokinon ve fenol gibi) içerirler. Bu nedenle ticari monomerlerin içerisindeki bu maddelerin polimerizasyon işlemi öncesinde damıtma işlemi ile uzaklaştırılması gerekir.

1.1.3. Çapraz bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar polimerizasyon prosesinde oldukça önemlidir. Polimerizasyon için hazırlanan karışımda en büyük oranı oluştururlar ve polimerizasyon süresince oluşan polimerik yapının rijit olmasını sağlarlar. Çapraz bağlayıcılar MIP'lerde öncelikle polimer morfolojisinin (jel, makro gözenekli ya da toz halinde) kontrolünü ve polimerik yapının mekanik kararlılığını sağlarlar. Makro gözenekli polimer elde edebilmek ve polimerin yeteri kadar mekanik kararlılığının olması için genellikle yüksek çapraz bağlama oranı tercih edilir. Polimerlerde çapraz bağlama oranı

% 80'i aşmaktadır. Yüksek oranda çapraz bağlama, aynı zamanda baskılanmış polimerin çözücünde çözünmesini önler ve baskılanmış polimerlerin kullanımını kolaylaştırır. Etkili bir baskılama için çapraz bağlayıcının reaktifliği ile fonksiyonel monomerin reaktifliği uygun olmalıdır. Aksi takdirde, fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcı baskın olduğunda polimerizasyon etkili bir şekilde gerçekleşmez (Cormack ve Elorza 2004). Çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer arasındaki stokiyometrik oran da oldukça önemlidir. Son derece yüksek oranlarda, özellikle çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomer ve/veya baskılanan molekül ile kovalent olmayan etkileşimde baskılama etkisi zarar görür. Fazla miktarda çapraz bağlayıcı olduğunda polimerizasyon baskılanacak molekül etrafında gerçekleşir (Chapuis ve ark. 2004). Moleküler baskılama için uygun birkaç çapraz bağlayıcı baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer gibi davranarak kendiliğinden komplekşelebilir. Farklı türde çapraz bağlayıcı ajanının kullanılması ile konuk bağlanma bölgelerinin yapıları ve bunların etrafındaki çevre kontrol edilebilir. Organik çözücülerin kullanıldığı polimerizasyon sistemlerinde çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinil benzen (DVB) yaygın olarak kullanılır. Suda çözünür çapraz bağlayıcı ajanı ise N, N'-metilenbisakrilamid (MBAA)'dir. Şekil 1.7'de MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar verilmiştir.



Şekil 1.7. MIP sentezinde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar

1.1.4. Çözücüler

Polimerizasyon prosesinde çözücü, fonksiyonel monomer, kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı ajanın tek fazda bulunmasını ve polimerik yapıda gözeneklerin oluşumunu sağlar. Bu nedenle kullanılan çözücüye genellikle “porojen” denir. Özellikle, makro gözeneklere sahip polimerlerin hazırlanmasında, çözücü gözeneklerin yapısı, morfolojisi ve gözenek hacmini kontrol etmeyi sağlayan önemli bir parametredir. Polimerizasyon süresince çözücü molekülleri polimerik yapının içine dahil edilir ve son aşamada uzaklaştırılır. Bu işlemler süresince, boşluk çözücü molekülleri tarafından polimerde gözenek olarak bulunur (Cormack ve Elorza 2004). Çözücünün diğer bir rolü ise polimerizasyon reaksiyonu oluşurken sıcaklığı dağıtmasıdır. Aksi takdirde, reaksiyon karışımının sıcaklığı bölgesel olarak çok yüksek olur ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşur. Çözücünün seçimi kalıp molekülün baskılanma çeşidine bağlıdır. Kovalent baskılama tekniğinde, fonksiyonel monomer, kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıdan oluşan tüm bileşenle iyi bir şekilde çözüldüğü sürece birçok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada ise, fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki etkileşimi ve baskılama etkisini arttırmak için çözücü seçimi daha önemlidir. Kloroform çoğu monomer ve baskılanacak molekülü iyi çözmesi nedeni ile çok yaygın olarak kullanılan çözücülerden biridir. Bununla birlikte, ticari kloroformda depolama süresince fosgen oluşumundan kurtulmak için etanolle stabilize edilir. Etanol monomer ile baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağlanmasını engellemesi nedeni ile çoğu moleküler baskılama için (özellikle kovalent olmayan baskılama için) uygun değildir. Çözücü, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimleri ve hidrojen bağlarının oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik özellikte olmalıdır. Normalde toluen gibi protik olmayan çözücüler hidrojen bağı kararlı kıldığı için tercih edilir. Bununla birlikte, kompleksleşmede hidrofobik kuvvetler kullanılıyor ise çözücü olarak su seçilebilir.

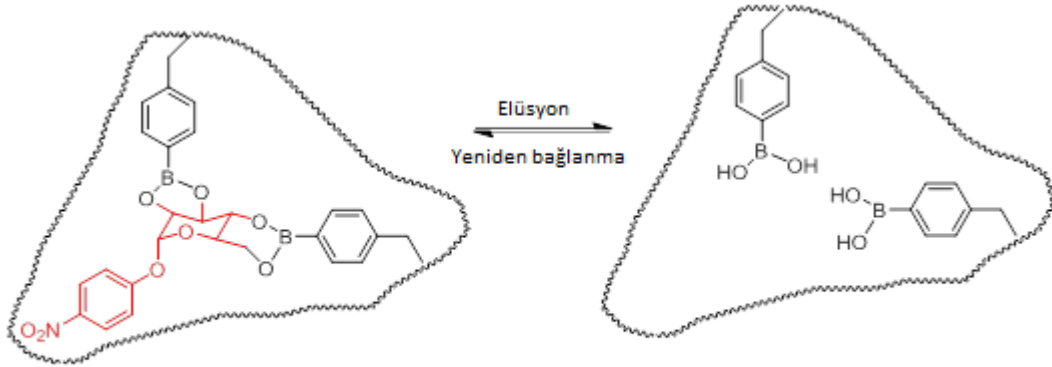
1.2. MIP’lerin Hazırlanmasında Kullanılan Yaklaşımlar

MIP’lerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağı çeşidine göre kovalent, yarı-kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere 3 farklı yöntem kullanılır. Bu yöntemler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

1.2.1. Kovalent baskılama

Günter Wulff ve Ali Sarhan 1972 yılında kovalent baskılama ile MIP hazırlanmasını literatüre ilk kez rapor etmişlerdir (Wulff ve Sarhan, 1972). Bu yaklaşımda kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında tersinir kovalent bağlar ile tersinir etkileşim gerçekleşir (Wulff ve ark. 1973; Wulff ve ark. 1977; Wulff ve Schauhoff, 1991; Wulff, 1995; Wulff ve Biffis, 2001) ve kalıp molekül-fonksiyonel monomerin çapraz bağlayıcı ajan varlığında kopolimerizasyonu gerçekleşir. Daha sonra kalıp molekül polimerik yapı içerisinde uygun bir çözücü veya çözücü karışımı ile uzaklaştırılır. Bu işlemin sonunda hedef moleküle üç boyutlu yapı ve fonksiyonel grup oryantasyonu açısından uygun kaviteler oluşur.

Literatürde yer alan bir çalışmada, Wulff ve araştırma grubu 4-nitrofenil- α -D-mannopiranoz baskılanmış polimeri kovalent baskılama yöntemi ile hazırlamışlardır (Wulff ve Poll, 1977). 4-nitrofenil- α -D-mannopiranoza yönelik MIP hazırlanması şematik olarak Şekil 1.8’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, fonksiyonel monomer 4-vinilfenilboronik asit hidroksil grupları ile esterifikasyon yolu ile kovalent olarak 4-nitrofenil- α -D-mannopiranoza bağlanmıştır.



Şekil 1.8. Kovalent olarak 4-nitrofenil- α -D-mannopiranoz baskılanmış polimerin şematik gösterimi

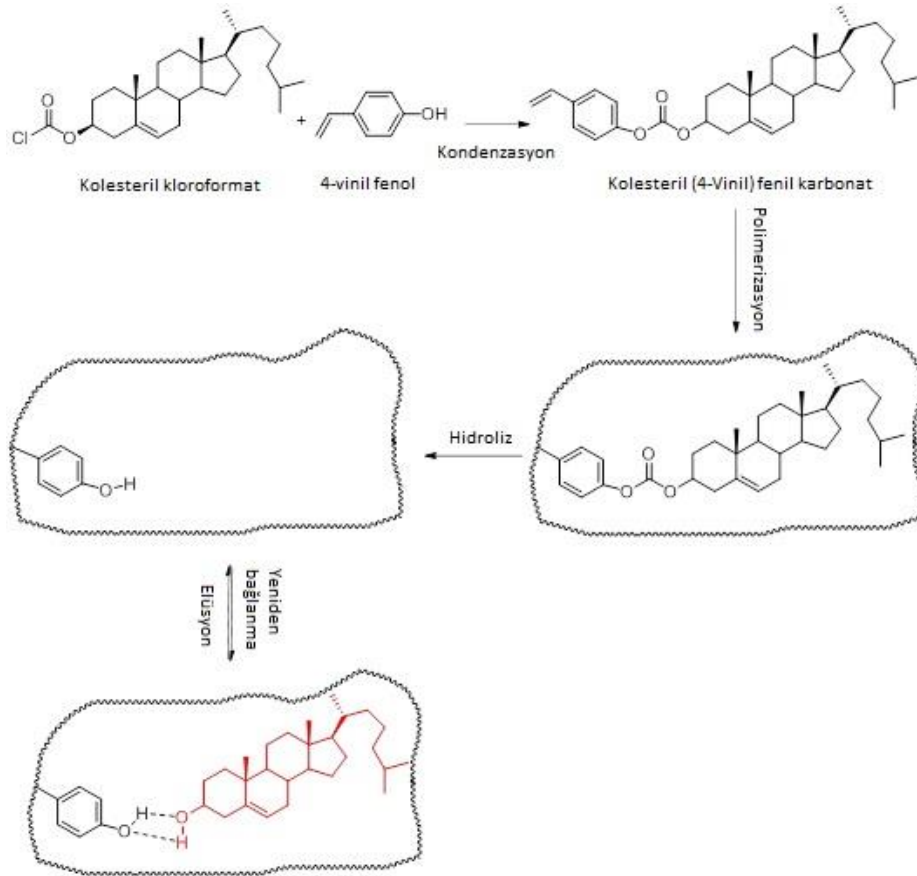
Kaynak: Wulff ve Poll, 1977

Kovalent baskılamanın bazı avantajları bulunmaktadır. MIP hazırlarken fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında oluşan kompleks kararlıdır. Baskılama prosesi istenildiği gibi kontrol edilebilir. Güçlü kovalent etkileşimlerden dolayı proses

paramatereleri eskrem koşullarda olabilir (Yüksek sıcaklık, pH vb). Teorik olarak non-spesifik bağlanma olasılığı çok düşüktür. Bununla birlikte kovalent baskılama yaklaşımının dezavantajları da söz konusudur. Örneğin, kullanılan fonksiyonel monomerler sınırlıdır. Fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında oluşan kompleksin sentezinde sorunlarla karşılaşılabilir ve sentez prosesi çok ekonomik değildir. Bu nedenlerden dolayı, kovalent baskılama yaklaşımı ile MIP hazırlanması çok yaygın değildir ve literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

1.2.2. Yarı-kovalent baskılama

MIP hazırlanmasında kullanılan bir diğer yaklaşım ise yarı-kovalent baskılamadır. Bu yaklaşım ilk kez Whitcombe ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Whitcombe ve ark. 1995). Yarı-kovalent baskılamada, polimerizasyon prosesi öncesi fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşim kovalent iken, polimerizasyon sonrası MIP ile kalıp molekül arasında kovalent olmayan etkileşim gerçekleşir. Whitcombe ve arkadaşları çalışmalarında yarı-kovalent baskılama yöntemi ile kolesterol baskılanmış polimerler hazırlamışlardır. Bu amaçla, kolesteril kloroformat 4-finilfenol ile kolesteril (4-vinil)fenil karbonat oluşturmak üzere reaksiyona girmiştir. Daha sonra, kalıp molekül olarak karbonat çapraz bağlayıcı varlığında polimerleştirilmiştir. Son aşamada ise karbonat bağının hidrolizi ile kalıp molekül polimerik yapı içerisinden uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hazırlanan MIP'in kolesterolü fenolik gruplar aracılığı ile ve kovalent olmayan etkileşimlerle seçici olarak bağladığını göstermiştir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Yarı-kovalent baskılama ile hazırlanan kolesterole seçici MIP'in şematik gösterimi

Kaynak: Whitcombe ve ark. 1995

1.2.3. Kovalent olmayan baskılama

MIP hazırlanmasında kullanılan başka bir yaklaşım ise ilk kez Arshady ve Mosbach tarafından önerilen kovalent olmayan baskılamadır (Arshady ve Mosbach, 1981). Bu yaklaşımda, fonksiyonel monomerler kalıp molekül etrafında kovalent olmayan etkileşimler ile (iyonik, polar, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri) biraraya gelerek çapraz bağlayıcı ajan varlığında polimerleşerek hedef moleküle seçici tanıma bölgelerini oluştururlar.

Kovalent olmayan baskılama yöntemi kullanılan fonksiyonel monomerlerin çeşitliliği ve kalıp moleküllere karşı kolay uygulanabilirliği gibi özellikleri sayesinde oldukça kullanışlı ve gerçekleştirilmesi kolay bir yaklaşımdır. Etkileşimlerin kovalent olmayan doğası kalıp molekülün polimerik yapıdan uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.

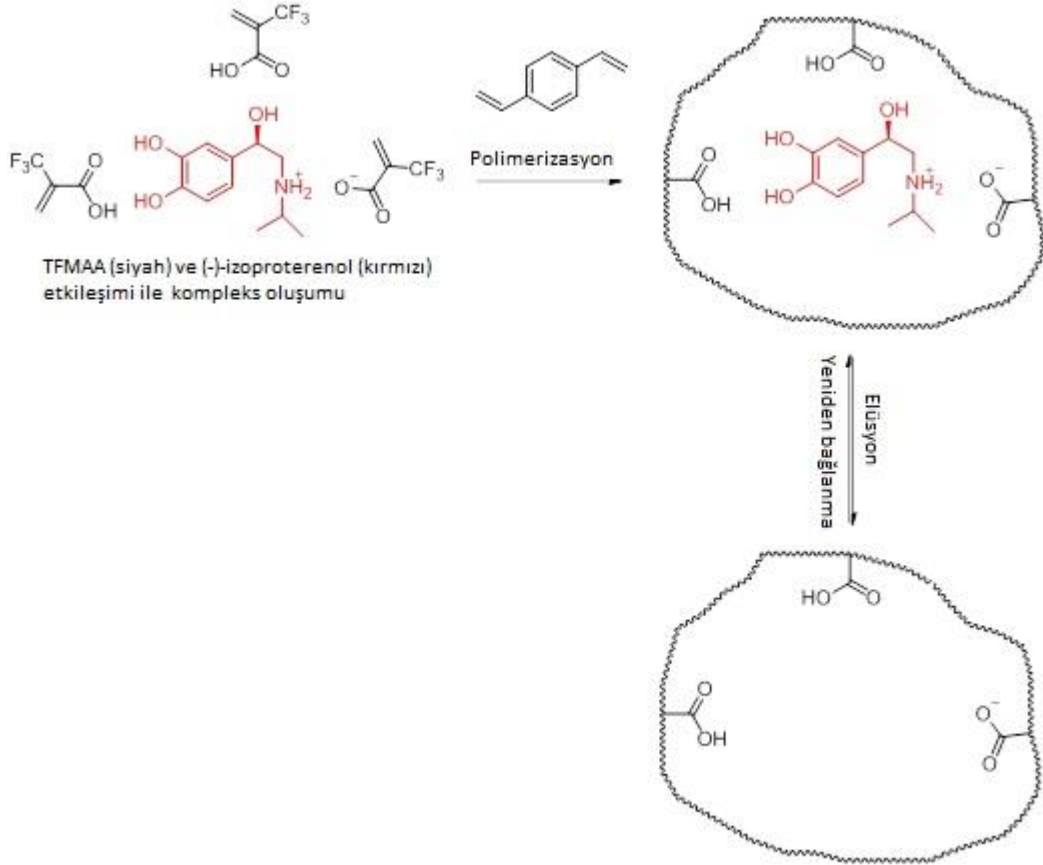
Bununla birlikte, bu yaklaşımla hazırlanan MIP'lerin hedef moleküle karşı düşük bağlama kapasitesi ve heterojen bağlanma bölgelerine sahip olma gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

Kovalent ve kovalent olmayan yaklaşımla baskılanmış polimerlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 1'de özetlenmektedir.

Tablo 1.1. *Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajları ve dezavantajları*

İşlem	Kovalent Baskılama	Kovalent Olmayan Baskılama
Monomer-baskılanacak molekül konjugesinin sentezi	Gerekli, zor	Gereksiz
Polimerizasyon Şartları	Oldukça serbest	Sınırlı
Polimerizasyondan sonra baskılanan molekülün uzaklaştırılması	Zor	Kolay
Baskılanacak molekülün bağlanması ve ayrılması	Yavaş	Hızlı
Baskılama Etkisi	Hedef moleküllerinin uzaklaştırılması sonucunda baskılama etkisi azalır	Fazla miktardaki fonksiyonel monomer spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturur ve bağlanma seçiciliği azaltır

Yılmaz ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma bu yaklaşımla hazırlanmış MIP'lere örnek olarak verilebilir (Yılmaz ve ark. 2002). Bu çalışmada, (-)-isoproterenol baskılanmış polimerler Şekil 1.10'da şematik olarak gösterildiği gibi kovalent olmayan baskılama yaklaşımı ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, (-)-isoproterenol ile hidrojen bağı yapabilme özelliğine sahip triflorometakrilik asit (TFMAA) fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan MIP'in (-)-isoproterenol'ün enantioseçici tanınması için yüksek afinite ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 1.10. Kovalent olmayan baskılama ile (-)-isoproterenol'e seçici MIP hazırlanmasının şematik gösterimi

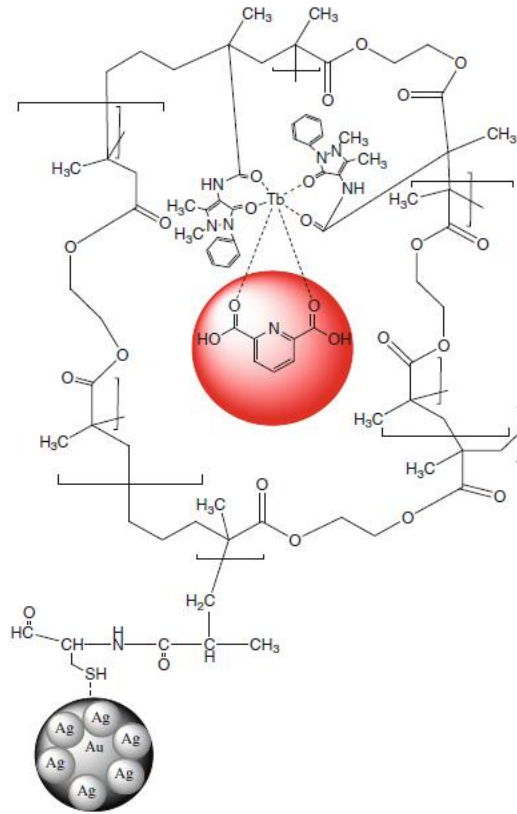
Kaynak: Yılmaz ve ark. 2002

1.2.4. Metal-şelat etkileşimli baskılama

Metal-şelat etkileşimleri, bağlanma gücü ve seçiciliği açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla kıyaslandığında kovalent etkileşimlere daha çok benzemektedir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir. Özellikle hidrojen bağlarının etkin olduğu baskılama sistemlerine göre çözücü profilinin su da dahil olmak üzere geniş sınırlarda kullanılabilmesi ve baskılanacak tamamlayıcı ligandın geometrik yönelmesinin seçiciliğe getirdiği avantaj nedeniyle metal-şelat etkileşimlerine dayanan baskılama sistemleri daha çok tercih edilmektedir.

Gültekin ve arkadaşları (Gültekin ve ark. 2009) metal-şelat etkileşimli baskılama yaklaşımını kullanarak *Bacillus cereus* sporların tayinine yönelik dipikolinik

asit (DPA) baskılanmış nanokabuklara sahip altın-gümüş nanokümeler hazırlamışlardır. Bu amaçla DPA kalıp molekül ve metakriloil imidodiasetik asit-krom(III) [MAIDA-Cr(III)] metal şelat momomeri olarak kullanılmıştır. Floresans ölçümleriyle elde edilen sonuçlar hazırlanan nanosensörün DPA için yüksek afinite ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir. Benzer bir yaklaşımla aynı araştırma grubu tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada (Gültekin ve ark. 2010), metal-şelat fonksiyonel monomeri olarak metakriloilamido antipirin-terbium [(MAAP)₂-Tb(III)] kompleksi, kalıp molekül olarak ise DPA kullanılmıştır. Şekil 1.11’de altın-gümüş nanokümelerin yüzeyinde DPA’sa seçici MIP kabuk hazırlanması şematik olarak verilmiştir. Hazırlanan sensörün DPA tanıma etkinliği floresans ölçümleri ile araştırılmış ve hedef molekül DPA’ya karşı oldukça seçici olduğu görülmüştür.

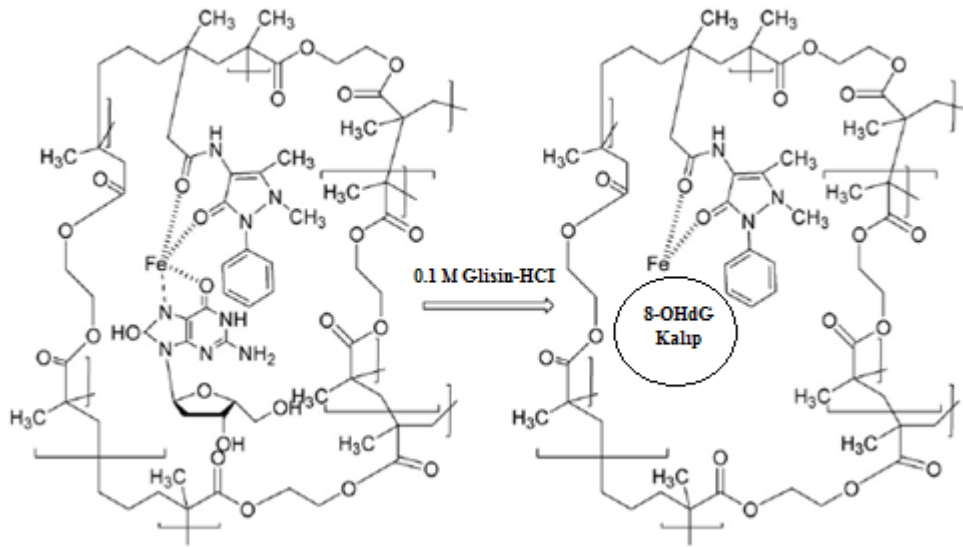


Şekil 1.11. DPA için MIP temelli Au/Ag nanosensörün hazırlanması

Kaynak: Gültekin ve ark. 2010

Literatüre rapor edilen başka bir çalışmada (Ersöz ve ark. 2009) Ersöz ve arkadaşları 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) tayini için 8-OHdG baskılı film kaplanmış QCM sensör hazırlamışlardır. Sensör yüzeyindeki polimerik film oluşumu

metakriloil aminoantipirin (MAAP)-Fe(III) metal şelat fonksiyonel monomerinin çapraz bağlayıcı N-N'-metilenbisakrilamid ve kalıp molekül 8-OHdG varlığında foto-graft yüzey polimerizasyonu ile UV ışık altında gerçekleştirilmiştir. Şekil 1.12`de 8-OHdG baskılanmış polimerin hazırlanışı şematik olarak verilmiştir. Meme kanseri teşhisi konulmuş hastadan alınan kan serumunda 8-OHdG seviyesi tayinine yönelik yapılan testlerde QCM sensörün oldukça seçici olduğu tespit edilmiş ve afinite sabiti 78760 M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 1.12. QCM sensör yüzeyinde 8-OHdG baskılı polimerin hazırlanması

Kaynak: Ersöz ve ark. 2009

1.3. Yapay Enzimler

Doğal enzimlerin üstün katalitik özelliklere sahip olması bilim insanlarını doğal enzimlere benzer ve onların bu üstün özelliklerini taklit edebilecek yapıları dizayn etmeye ve geliştirmeye yöneltmiştir. Dizayn edilen bu yapılar ise genel olarak “biyomimetik enzimler” ve “yapay enzimler” terimleri ile tanımlanmıştır. Literatürde yapay enzimlerle ilgili çalışmalar 1972 yılında Breslow tarafından rapor edilmiştir (Breslow, 1995).

Yapay enzimler doğal enzimlere kıyasla daha kararlıdır. Örneğin bir çalışmada alan antijen mimikler hazırlanmış ve elde edilen sonuçlar hedef moleküler karşı güçlü ve seçici bağlanmanın gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Breslow ve Singh, 1998). Yapay enzim hazırlanmasındaki amaçlardan birisi de yapay enzimlerin, doğal enzimlerle gerçekleştirilemeyen katalitik reaksiyonlarda kullanılabilesidir (Murakami ve ark., 1996).

Doğal enzimlerin pahalı oluşu ve düşük kararlılığa sahip olmaları doğal enzimlerin endüstriyel boyutta kullanımları kısıtlamıştır. Ayrıca ekstrem koşullar altında (yüksek sıcaklık, yüksek pH vb) kolayca denatüre olmalarından dolayı enzimler geniş çapta kullanılamamaktadırlar.

1.4. Biyomimetik Katalizörlerin Dizaynında Kullanılan Yaklaşımlar

Biyomimetik katalizörlerin dizaynında kullanılan yaklaşımlar 3 ana kategoriye ayrılır. Bunlar dizayn yaklaşımı, geçiş hali analoğu yaklaşımı ve katalitik aktivite seçimi yaklaşımıdır.

1.4.1. Dizayn yaklaşımı

Bu yaklaşım hedef substrata karşı yüksek bağlanma afinitesi ve katalitik aktivite gösteren mimik enzimlerin dizaynını ve sentezini içerir. Bu amaçla bağlanma bölgelerine sahip makromoleküler bileşikler geleneksel teknikler ile sentezlenir. Bu bileşikler genellikle doğal enzimlerden esinlenerek enzim aktif bölgesinde yer alan ve aktivitede önemli rol oynayan fonksiyonel grupların seçildiği yapılardır. Bu alanda özellikle siklodekstrinlerin dizaynı ve hazırlanması konusunda önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Li ve Wang, 2014; Ibrahim ve ark. 2014; Zhou ve ark. 2014; Asahar ve ark. 2013; Lindbäck ve ark. 2012; Tang ve ark. 2011; Yu ve ark. 2010; Nakajima ve ark. 2004; Ikeda ve ark. 2000; Tsutsumi ve ark. 2000; Breslow ve Nesnas, 1999; Desper ve ark. 1994). Bununla birlikte siklofanlar da (Breslow ve Fang, 2002) üzerinde çalışılan ve kayda değer sonuçların elde edildiği bileşiklerdir.

1.4.2. Geçiş hali analoğu (TSA) yaklaşımı

Supramoleküler komplekslerin hazırlanması biyomimetik enzim teknolojisinde oldukça önemlidir (Nassimbeni, 2000) Bu yaklaşımda, bir kimyasal reaksiyonun geçiş analoğunu (TSA) bağlama yeteneğine sahip olan konak bir molekül hazırlanır. Daha sonra, hazırlanan bu konak molekül kalıbın uzaklaştırılması sonucunda mimik enzim olarak davranır (Motherwell ve ark. 2001). Bu yaklaşımla katalitik antibadilerin hazırlanması konusunda önemli başarılar elde edilmiştir (Tanaka, 2002) ve MIP temelli mimik enzimlerin tasarlanması ve hazırlanmasına esin kaynağı olmuştur (Hall ve ark. 2005).

1.4.3. Katalitik aktivite seçimi yaklaşımı

Bu yaklaşımla çok sayıda konak bileşikden oluşan bir kütüphane hazırlanır (Gordon, J.F. Kerwin, 1998; Wilson ve Czarnik, 1997). Kütüphane içerisindeki konak moleküllerin taraması işlemi sonucunda ilgilenilen reaksiyona potansiyel aktivite gösteren seçici katalizörün hızlı bir şekilde belirlenmesi sağlanır.

1.5. MIP'lerin Katalizör Olarak Kullanımı

Enzimatik katalizde doğal enzimlere alternatif olarak kullanılan MIP temelli yapay katalizörler MIP'lerin en popüler uygulamalarından biridir (Piletsky ve Turner, 2006).

Doğal enzimlerde substralarına karşı sadece bir aktif bölge bulunurken, enzim benzeri MIP partiküllerinde binlerce aktif bağlanma bölgesi hazırlanabilir. Enzim benzeri MIP'lerin hazırlanmasında uygun fonksiyonel gruplar kalıp olarak substrat ya da reaksiyondaki TSA'nın seçilmesiyle polimerik ağa dahil edilirler. Kalıp molekülün uzaklaştırılması sonucunda, elde edilen polimer substrat molekülüne (kalıp) karşı yapay enzim olarak davranırlar.

Aşağıdaki bölümlerde, katalitik MIP'lerin farklı reaksiyonlarında kullanımlarına ait literatürde yer alan örneklerle yer verilmiştir.

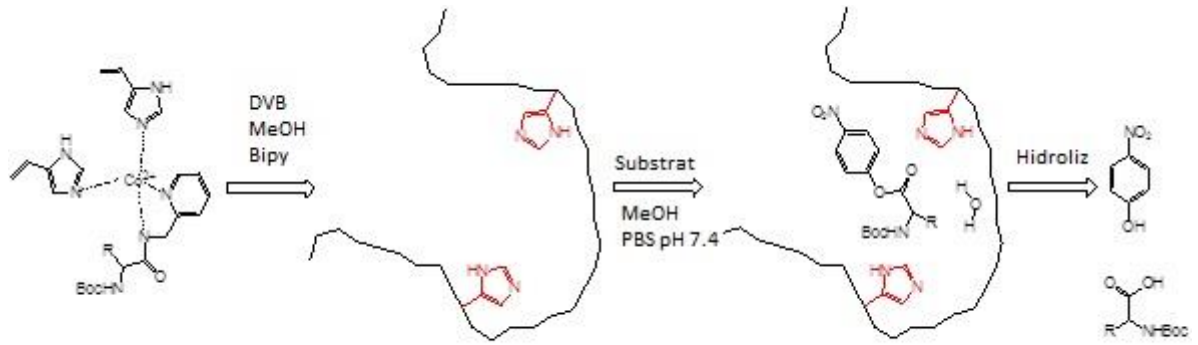
1.5.1. Hidroliz reaksiyonları

Amit ve esterlerin hidrolizleri biyolojik sistemler için oldukça önemlidir. Hidroliz reaksiyonlarında kullanılmak üzere MIP-temelli yapay enzimlerin dizaynı ve geliştirilmesi her geçen gün birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir.

Lipaz, serin proteaz ve kolesterol esteraz gibi birçok hidrolitik enzim aynı mekanizma ile katalitik etki gösterir. Üzerinden en çok yoğunlaşılan konulardan birisi MIP-temelli yapay serin proteazların dizaynı ve sentezidir. Enzim aktif bölgesinde yer alan amino asit olmalarından dolayı serin, histidin ve aspartik asit mimik serin proteazların sentezinde kullanılırlar. Katalitik bölgesi ve etki mekanizması en iyi aydınlatılmış enzimlerden birisi olan kimotripsin MIP-temelli yapay enzimlerin dizaynı

ve hazırlanmasında model enzim olarak esin kaynağı olmuştur (Alexander ve ark. 2003).

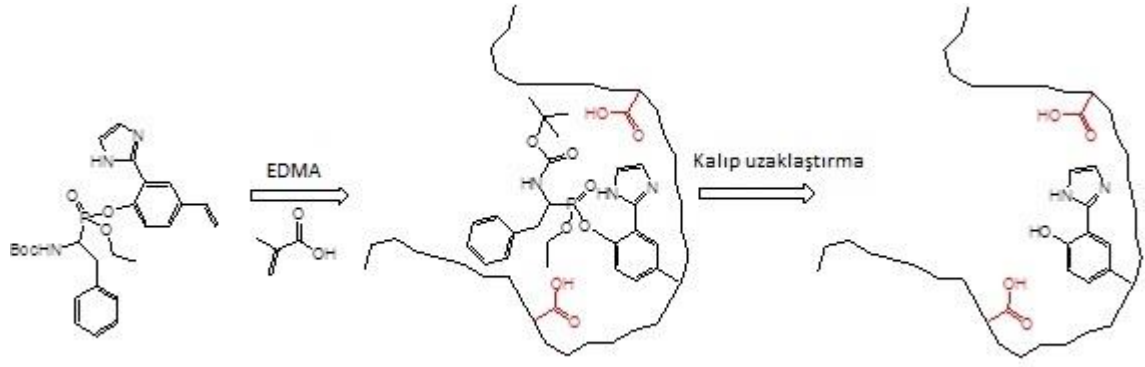
İlk kimotripsin benzeri MIP, Leonhardt ve Mosbach tarafından geliştirilmiştir (Leonardt ve Mosbach, 1987). Çalışmalarında amino asit nitrofenil esterlerinin hidrolizi için imidazol grupları polimerik ağ içerisinde yer almıştır. MIP-temelli yapay katalizörler 4-(5)-vinilimidazol ile kalıp molekül olarak N-terminali korunmuş amino asit türevinin çapraz bağlayıcı DVB ve Co^{2+} iyonu varlığında kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Şekil 1.13'de hidroliz reaksiyonlarında kullanılmak üzere MIP hazırlanmasına yönelik proses şematik olarak gösterilmiştir. Hazırlanan MIP-temelli yapay enzim Boc-metionin (ya da lösin) p-nitrofenil ester'inin hidrolizinde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan MIP'in hedef moleküle karşı yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 1.13. Leonardt ve Mosbach tarafından geliştirilen kimotripsin benzeri MIP-temelli enzimin şematik gösterimi

Kaynak: Leonardt ve Mosbach, 1987

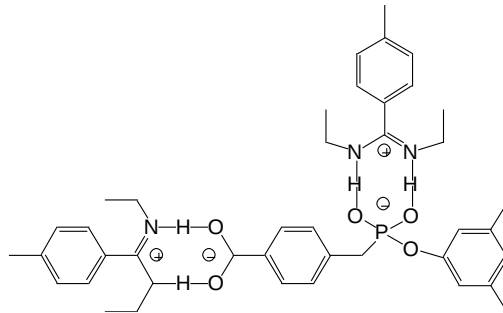
Bir başka çalışmada, Sellergren ve Shea (Sellergren ve Shea, 1994) *N*-tert-bütoksikarbonil fenil alanin-*p*-nitrofenil ester (BocPheONP) hidrolizine yönelik kimotripsin benzeri MIP-temelli enzim hazırlamıştır. Yapay enzim fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA) ve kalıp molekülün çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EDMA) varlığında kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Sellergren ve Shea. tarafından geliştirilen kimotripsin benzeri MIP-temelli enzimin şematik gösterimi

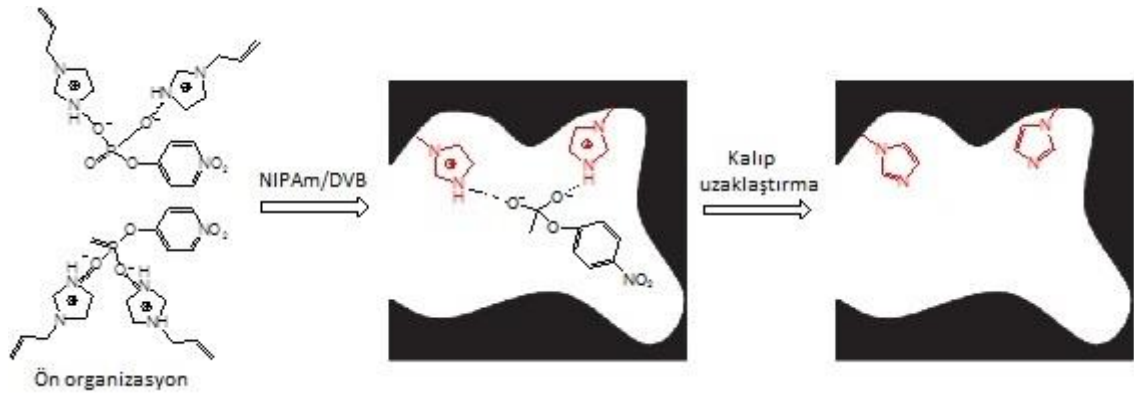
Kaynak: Sellergren ve Shea, 1994

Elde edilen sonuçlar hazırlanan MIP-temelli enzimin BocPheONP hidrolizinde etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Wulff ve ekibi yayınladıkları başka bir çalışmada (Strikovsky ve ark. 2000) N,N'-dietil(4-vinilfenil)amidin'i (DEVPA) monolit ve mikroküre formunda MIP-temelli enzim hazırlamak için fonksiyonel monomer olarak kullanmışlardır. Difenil fosfat (DPP) ise kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Şekil 1.15'de fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşim şematik olarak verilmiştir. Hazırlanan yapay enzimin difenil karbonat ve difenil karbamat hidrolizinde kullanılabirliği araştırılmıştır. Elde edilen deneysel sonuçlar hazırlanan MIP-temelli yapay enzimin difenil karbonat ve difenil karbamat substratlarına karşı yüksek afiniteye sahip olduğunu ve etkili bir katalizör olarak hidroliz reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 1.15. DEVPA ve DPP arasındaki etkileşimin şematik gösterimi

MIP'lerin hidroliz reaksiyonlarındaki uygulamalarına yönelik bir başka örnek çalışma Li ve ekibi tarafından literatüre rapor edilmiştir (Li ve ark. 2011). Çalışmalarında, p-nitrofenil asetat (p-NPA) hidrolizinde kullanılmak üzere MIP-temelli enzim geliştirmişlerdir. Bu amaçla, Şekil 1.16'da şematik olarak verildiği gibi N-izopropil akrilamit (NIPAm) ve p-NPA sırasıyla fonksiyonel monomer ve kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Hazırlanan MIP-temelli enzim sıcaklığa bağlı olarak hidrofilik ve hidrofobik özellik gösterebilme yeteneği sergilemiştir. Bununla birlikte p-NPA hidrolizinde 20 °C sıcaklıkta hidrofilik özelliğinden dolayı yüksek katalitik aktivite göstermiştir. Sıcaklık arttıkça (40 °C civarı) hazırlanan MIP-temelli enzim hidrofobik özellik sergileyerek aktivitesinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 1.16. *p-NPA hidrolizine yönelik hazırlanan MIP-temelli enzimin şematik gösterimi*

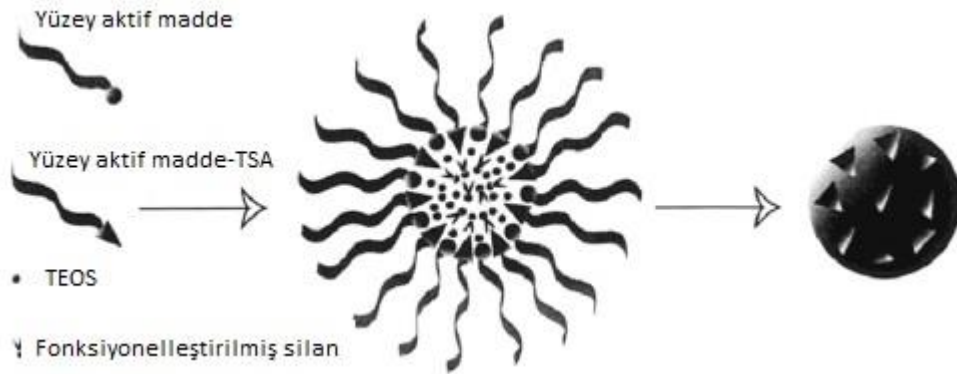
Kaynak: Li ve ark. 2011

Başka bir çalışmada, Erdem ve arkadaşları paraokson hidrolizi için MIP/organo-simektit nanokompozit-temelli yapay enzim hazırlamıştır (Erdem ve ark. 2010a). Paraokson baskılanmış nanokompozit metakriloamidohistidin- Cu^{2+} (MAH- $\text{Cu}(\text{II})$) ve [2-metakriloiloksi) etil] dimetilhekzadesil amonyum bromür] (MOEDMAC16) kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan nanokompozit katalizörün katalitik aktivitesi Michaelis-Menten enzim kinetiği modeli ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre paraokson baskılanmış nanokompozitin baskılanmamış kompozite göre paraokson hidrolizinde yüksek aktivite göstermiştir.

Aynı ekibin gerçekleştirdiği başka bir çalışmada ise paraokson baskılanmış mikroküreler süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, paraokson kalıp molekül, fonksiyonel monomerler olarak metakriloamidohistidin Co^{2+} ,

metakriloamidohistidin- Zn^{2+} ve metakriloamidohistidin- Ni^{2+} kullanılmıştır. Hazırlanan MIP-temelli yapay enzimlerin baskılanmamış polimere kıyasla paraokson hidrolizinde daha yüksek katalitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Erdem ve ark. 2010b).

2000 yılında Markowitz ve arkadaşları katalitik aktivite gösteren ilk MIP silika nanopartikülleri mikro-emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlamışlardır (Markowitz ve ark. 2000). Gerçekleştirilen çalışmada, enzim benzeri silika nanopartiküllerin sentezi için α -kimotripsin'in geçiş hali analogu kalıp molekül olarak kullanılmıştır (Şekil 1.17). α -Kimotripsin'in aktif bölgesinde yer alan amino asitler ile fonksiyonelleştirilmiş spesifik silanlar MIP-temelli silika nanopartiküllerin sentezinde kullanılmıştır. Sentezlenen enzim benzeri silika nanopartiküllerin boyutu 400–600 nm aralığında bulunmuştur ve aktivite tayinleri kimotripsin substratı süksinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilit (Suc-AAPF-PNA) ve tripsin substratı benzoil-DL-arjinin-*p*-nitroanilit (D,L-BAPNA) hidrolizinin takip edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar yüzey baskılanmış silika nanopartiküllerin D-BAPNA and L-BAPNA'nın hidroliz reaksiyonlarında enantiyoseçici enzim olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur. MIP-temelli silika nanopartikülleri kullanılarak D-BAPNA hidrolizinin L-BAPNA hidrolizinden 10 kat daha hızlı olduğu tespit edilmiştir.

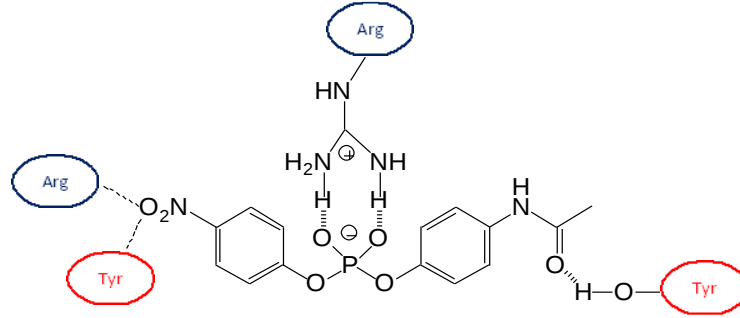


Şekil 1.17. MIP-temelli silika nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi

Kaynak: Markowitz ve ark. 2000

Pasetto ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada (Pasetto ve ark. 2005), *p*-nitrofenil karbonat hidrolizine karşı aktivite gösteren katalitik MIP mikrojeller radikalik polimerizasyonla hazırlanmıştır. Bu amaçla, fosfat anyonu kalıp molekül,

polimerize olabilir arjinin ve tirozin yan zincirleri de fonksiyonel monomerler olarak polimerik jel yapısına dahil edilmiştir. Şekil 1.18'den de görüleceği gibi guanidinyum grubu MIP jel hazırlanması prosesinde kalıp molekül ile kararlı bir kompleks oluşturmuştur.



Şekil 1.18. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler tirozin ve arjininin yan zincirleri arasındaki olası etkileşimler

Kaynak: Pasetto ve ark. 2005

Sentezlenen katalitik jel kullanılarak karbonat hidrolizine yönelik gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar MIP-temelli katalitik hidrojelin p-nitrofenil karbonata karşı yüksek derecede hidrolitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Başka bir çalışmada ise, Chen ve arkadaşları (Chen ve ark. 2002) p-nitrofenil asetat için amidin ve imidazol fonksiyonel gruplarına sahip MIP-temelli enzim geliştirmişlerdir. Yapay enzimin hazırlanmasında p-nitrofenil fosfat kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Yapay enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidrolitik aktivite çalışmaları sonucunda MIP-temelli enzimin oldukça iyi bir performans sergilediği görülmüştür.

Literatürde yer alan ve hidroliz reaksiyonlarında kullanılan bazı MIP temelli yapay enzimler Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2. *Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan MIP temelli yapay enzimler*

MIP kompozisyonu	Hedef bileşik	Substrat	Referans
<i>N</i> -metakriloil-L-serin, <i>N</i> -metakriloil-L-aspartik asit ve <i>N</i> -metakriloil-L-histidin monomerleri ile Co(II)-kalıp molekül koordinasyonu	<i>N</i> -nikotinoiltirozil benzilester	<i>N</i> -benziloksikarbonil-tirozil- <i>p</i> -nitrofenil ester	Lele ve ark. 1999
Kobalt iyonu ile alkil imidazol arasında kompleks oluşumu	<i>N</i> - α - <i>t</i> -boc-l-histidin	<i>N</i> - <i>t</i> -boc-l-alanin- <i>p</i> -nitrofenil ester	Toorisaka ve ark. 2003
Kiral kalıp molekülün silika partikül yüzeyinde immobilizasyonu ve MIP oluşumu	Etil-Boc-S-(-)-fenillalanin-4-(Boc-imino)benzil fosfonat	Boc-S-(-)-fenillalanin- <i>p</i> -nitrophenylester	Volkman ve Brüggemann, 2006
Amidinyum ve bakır iyonu etkileşimi	Fenilpiridil fosfat	Fenil-2-piridil-karbonat ve di-(2-piridil)-karbonat	Liu ve Wulff, 2004
<i>N</i> -metakriloilhistidin-Cu ²⁺ kompleks fonksiyonel monomeri kullanarak disülfid ester-modifiye polistiren yüzeyinde grafting	Metil paraokson	Paraokson	Guo ve ark. 2011
İyon baskılanmış poli(2-akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit) p(AMPS)hydrojel	Co (II) , Ni (II) ve Cu(II)	NaBH ₄ ve NH ₃ BH ₃	Seven ve Şahiner, 2013
Fonksiyonel monomer Çinko dimetakrilat kullanılarak vinil içeren silika mikroküreler yüzeyinde çift baskılanmış polimer	Paraokson	Paraokson	Guo, 2013; Guo ve ark. 2014
Fonksiyonel monomer 4-[(3-metakriloillamino)etil]imidazol'ün kalıp molekül varlığında polimerizasyonu	Phenyl-1-undesillkarbonilamino-3-metilbütill fosfonat	<i>N</i> -dodekanoil lösin- <i>p</i> -nitrofenil ester	Sagawa ve ark. 2004

Tablo 1.2. (Devam) *Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan MIP temelli yapay enzimler*

MIP kompozisyonu	Hedef bileşik	Substrat	Referans
Metil N-akrilol-L-histidin ve akrilamid'in radikal ko-polimerizasyonu	1-benziloksikarbonilamino-3 metilpentilfosfonat	<i>p</i> -nitrofenil N-benziloksikarbonil-L-lösinat	Ohkubo ve ark. 1995
L-histidin ve quaternar trimetilamonyum gruplarına sahip polimer	Fenil 1-benziloksikarbonil-3-metilpentilfosfonat	<i>p</i> -nitrofenil N-(benziloksikarbonil)-L (veya D)-lösin (Z-L (veya D)-Leu-PNP)	Ohkubo ve ark. 1996
Metil N-akrilol-L-histidin ve akrilamid'in radikal ko-polimerizasyonu	1-benziloksikarbonilamino-3 metilpentilfosfonat	<i>p</i> -nitrofenil N-(benziloksikarbonil)-L (veya D)-lösin (Z-L (veya D)-Leu-PNP	Ohkubo ve ark. 2001a
Metil N-akrilol-L-histidin ve akrilamid'in hidrofobik stiren monomer ile kopolimerizasyonu	Fenil 1-benziloksikarbonil-3-metilpentilfosfonat	<i>p</i> -nitrofenil N-(benziloksikarbonil)-L (veya D)-lösin (Z-L (veya D)-Leu-PNP	Ohkubo ve ark. 2001b
HEMA, MAA ve N-metakrilol-L-histidin'in ko-polimerizasyonu ile hazırlanmış hidrojel	2-(6-izobutirilamino) kaproil) fenilalanil)2-amino)piridin	6-metakrilolaminokaproil)-L-fenilalanil)- <i>p</i> -nitrofenol	Karmalkar ve ark. 1996
Vinil imidazol ile divinilbenzen'in radikal ko-polimerizasyonu	<i>p</i> -nitrofenil fosfat	<i>p</i> -nitrofenil asetat	Kawanami ve ark. 1999
N,N'-dietil(4-vinilfenil) amidin'in geçiş hali analogu (fosfat) varlığında polimerizasyonu	Kolesterol 4-nitrofenil fosfat	Kolesterol 4-nitrofenil karbonat	Kim ve ark. 2001
N,N'-dietil-4-vinilbenzamidin'in metil metakrilat ile kalıp molekül varlığında radikal ko-polimerizasyonu	4-karboksibenzil fosfonik mono-(3,5-dimetilfenil) ester	N-(4-karboksibenzoil)- α -amino asit (3,5-dimetil fenil)esteri türevi	Emgenbroich ve Wulff, 2003

1.5.2. Eliminasyon reaksiyonları

MIP'ler eliminasyon reaksiyonlarında da yapay enzim olarak kullanılmıştır. Bu konuda ilk çalışmalar Beach ve Shea tarafından yayınlanmıştır (Beach ve Shea, 1994). Çalışmalarında 4-floro-4-nitrofenilbütan-2-on'un dehidroflorinasyonuna yönelik MIP temelli biyomimetik katalizör geliştirilmiştir. Bu amaçla, benzilmalonik asit kalıp molekül olarak kullanılmış ve fonksiyonel monomer N-(2-aminoetil)-metakrilamit ile çapraz bağlayıcı EDMA varlığında polimerleştirilmiştir. Sonuçlar hazırlanan MIP'in eliminasyon reaksiyonlarında etkin bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Eliminasyon reaksiyonlarına yönelik bir başka çalışma Müller ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Müller ve ark. 1993). Gerçekleştirilen çalışmada, N-izopropilbenzil amin ve metakrilik asit sırasıyla kalıp molekül ve fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. Kovalent olmayan baskılama tekniği ile elde edilen MIP β -eliminasyon reaksiyonunda etkili bir performans sergilemiştir.

Mosbach ve araştırma grubu da MIP'lerin eliminasyon reaksiyonlarında mimic enzim olarak kullanıldığı çalışma yayınlamıştır (Liu ve Mosbach, 1998). Çalışmada, benzisoksazollerin dekarboksilasyonu için MIP-temelli enzim geliştirilmesi hedeflenmiştir. Kovalent baskılama stratejisi kullanılarak hazırlanan MIP-temelli enzim 5-nitro-3-karboksibenzisoksazol dekarboksilasyonu reaksiyonunda yüksek katalitik aktivite göstermiştir.

1.5.3. C-C bağ oluşum reaksiyonları

C-C bağ oluşum reaksiyonları hidroliz ve eliminasyon reaksiyonları ile karşılaştırıldığında katalizin istenmeyen yollar aracılığı ile ilerlemesi nedeniyle en zor kimyasal dönüşümlerden birisidir. O nedenle MIP'lerin bu tür reaksiyonlarda katalizör olarak kullanımı oldukça sınırlıdır.

MIP'lerin C-C bağ oluşum reaksiyonlarında kullanımına yönelik ilk çalışma Matsui ve ekibi tarafından literatüre rapor edilmiştir (Matsui ve ark. 1996). Çalışmalarında maya ve bakteri hücrelerinde bulunan Sınıf 2-aldolaz enziminin taklit edildiği MIP-temelli yapay enzim sistemi hazırlanmıştır. Bu amaçla, Co^{+2} ve

dibenzoilmetan'ın oluşturduğu bir kompleks olan geçi hali analogu kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Hazırlanan moleküler baskılanmış vinilpiridin-stiren-divinilbenzen kopolimeri benzaldehit ve asetofenon arasında gerçekleşen reaksiyonda yüksek katalitik aktivite özelliği göstermiştir. Elde edilen sonuçlar hazırlanan MIP-temelli enzimin reaksiyon hızını kontrol polimerine göre 8 kat daha fazla arttırdığını göstermiştir.

Başka bir çalışmada, Chen ve arkadaşları (Chen ve ark. 2007), homovanilik asit (HVA) oksidasyonu için peroksidaz benzeri çözünür moleküler baskılanmış nanojel hazırlamışlardır. Gerçekleştirilen çalışmada, hemin, akrilamit ve 4-vinilpiridin fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. Sentezlenen moleküler baskılanmış nanojellerin karakterizasyonları jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar moleküler baskılanmış nanojellerin H_2O_2 varlığında HVA oksidasyonunda etkin bir yapay enzim olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Carboni ve araştırma grubu (Carboni ve ark. 2008) ise C-C bağ oluşum reaksiyonlarında katalitik aktivite gösteren Sınıf 1-aldolaz benzeri MIP nanojelleri literatüre ilk kez rapor etmişlerdir. MIP-temelli enzim hazırlanmasında pirolin türevi fonksiyonel monomer, diketon ise kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Radikalik polimerizasyon ile hazırlanan çözünür MIP nanojellerin partikül boyutunun 20 nm civarında olduğu görülmüştür ve C-C bağ oluşum reaksiyonunda yüksek katalitik aktivite sergilediği gözlenmiştir.

1.6. Polimer Sentezi

Polimerler serbest radikal polimerizasyonu ve kondenzasyon polimerizasyonu olmak üzere başlıca iki ana polimerizasyon tekniği ile hazırlanır.

1.6.1. Serbest radikal polimerizasyonu

Bu polimerizasyon tekniği serbest radikalleri üzerinden yürüyen bir prosestir. Serbest radikaller ise genellikle başlatıcıların sıcaklık ya da UV ışık altında parçalanmasıyla oluşurlar. Başlatıcı olarak redox çiftleri, benzoil peroksit ve 2,2'-azodiizobütironitril (AIBN) ve 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril) (ABDV) gibi

moleküller kullanılabilir. Daha sonra oluşan serbest radikal monomer üzerindeki çift bağa saldırarak polimerizasyon işlemini başlatır. Sonrasında oluşan yeni radikaller polimerizasyon ortamında bulunan diğer monomerler ile yeniden reaksiyona girerek polimerik zincirin büyümesini sağlarlar. Büyüyen polimerik zincir molekül ağırlığının artmasına neden olur ve bu aşamada ortamda reaksiyona girecek monomer sayısı çok azdır. Bundan dolayı serbest radikallerin etkisi azalır ve dallanma, başka bir radikal ile etkileşime girme gibi çeşitli yollar ile sönümlenirler ve polimerizasyon işlemi tamamlanır. MIP'lerin hazırlanmasında kolay olması, çok yönlü uygulama alanı, düşük maliyeti ve ılımlı polimerizasyon koşulları nedeniyle serbest radikal polimerizasyonu daha çok tercih edilir

1.6.2. Kondenzasyon polimerizasyonu

Kondenzasyon ya da basamaklı polimerizasyonda, NH_2 , COOH ve OH gibi fonksiyonel gruplardan en az iki tanesine sahip fonksiyonel monomerlerin amitleşme, esterleşme gibi reaksiyonları sonucunda yan ürün olarak H_2O , CO_2 gibi küçük moleküller açığa çıkar.

Bu polimerizasyon türünde ilk önce monomerlerin reaksiyona girmesiyle dimerler oluşur. Bunu takip eden aşamada dimerler fonksiyonel monomerle ile reaksiyona girerek trimerleri oluşturur ve polimer zinciri bu şekilde uzar. Polimerik zincirin aşamalı şekilde uzaması kondenzasyon polimerizasyonunu radikalik zincir polimerizasyonundan ayıran en temel farktır.

1.7. Polimerizasyon Yöntemleri

Polimerler yığın (bulk) polimerizasyonu, süspansiyon polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonu gibi farklı yöntemlerle hazırlanabilirler.

1.7.1. Yığın (bulk) polimerizasyonu

Yığın polimerizasyonunda monomerler doğrudan polimerizasyon prosesine katılırlar. Başlatıcı, monomerler ve çapraz bağlayıcı uygun bir çözücü (porojen)

içerisinde çözülür. Polimerizasyon verimini olumsuz etkileyen çözünmüş oksijen ortamdan uzaklaştırılıp inert bir atmosfer sağlandıktan sonra kullanılan başlatıcı türüne göre polimerizasyon sıcaklık ya da UV ışık etkisi ile başlatılır. Yaklaşık 18-24 saat sonra polimerizasyon prosesi tamamlanır ve elde edilen blok polimer kütlesi öğütülerek toz haline getirilir. Elde edilen polimerik partiküller düzensiz bir yapıya sahip olup şekil ve büyüklük bakımından birbirinden farklıdır.

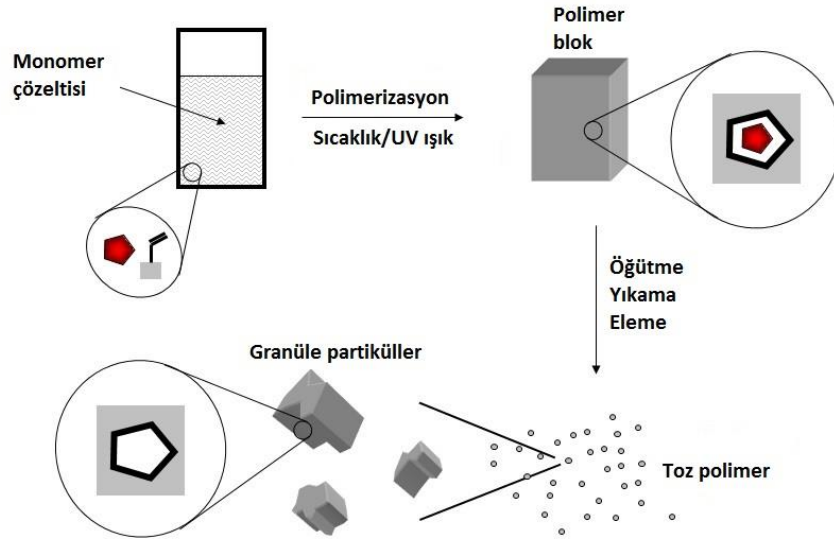
Bu yöntem diğer polimerizasyon yöntemlerine göre bazı avantajlara sahiptir. Bunlar;

- ❖ Uygulanmasının kolay olması
- ❖ Ucuz bir yöntem olması
- ❖ Prosesin hızlı olmasıdır.

Yukarıda bahsedilen üstünlüklerine rağmen, aşağıda verilen dezavantajlarda söz konusudur.

- ❖ Polimerizasyon süresince viskozite artar. Bu da karıştırmayı ve ısı aktarımının zorlaşmasına neden olur.
- ❖ Reaksiyona girmeyen monomerlerin yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılması gerekir.
- ❖ Polimerizasyon sonrası, istenilen boyutta partiküllerin elde edilebilmesi için sentezlenen monolitik polimerin kırılması, öğütülmesi ve belirli boyuta eleklerden (25-50 µm gibi) geçirelmesi gerekir.
- ❖ Öğütme ve eleme işlemleri sonrasında elde edilen malzemenin bir kısmı kaybedilebilir.

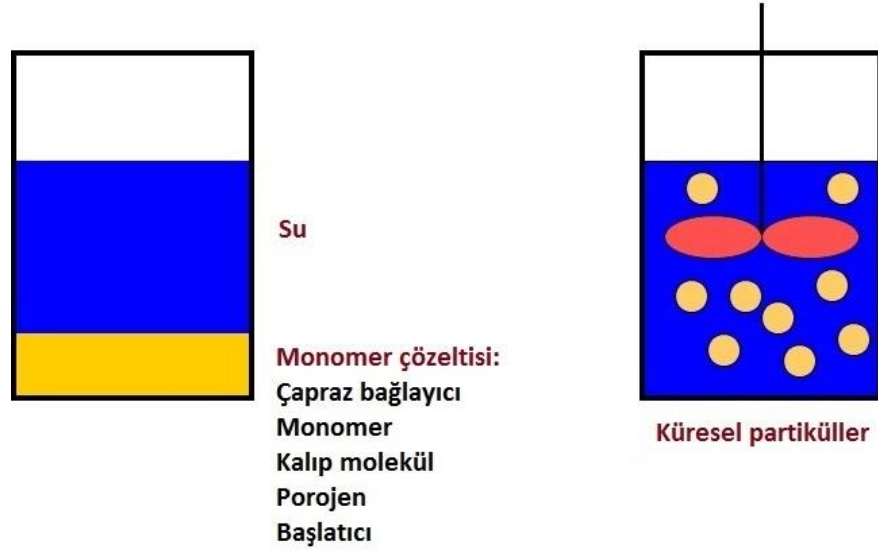
Bu dezavantajlar nedeni ile yığın polimerizasyonu özellikle büyük ölçekte polimer sentezinde çok tercih edilmez. Kullanımı laboratuvar ölçeğinde polimerlerin hazırlanması ile sınırlıdır. Şekil 1.19’da yığın polimerizasyonu ile MIP hazırlanmasının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.19. Yığın polimerizasyonu ile MIP hazırlanmasının şematik gösterimi

1.7.2. Süspansiyon polimerizasyonu

Yığın polimerizasyonu tekniğinin sahip olduğu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için alternatif bir yöntem olan süspansiyon polimerizasyonu tekniği geliştirilmiştir. Bu teknikte iki faz bulunmaktadır. Bunlardan birincisi monomerin süspansiyonunun yapıldığı bir çözücüdür (örneğin su). Bu faza dağıtma ortamı da denir. Bir diğeri ise monomer, çapraz bağlayıcı ve gözenek oluşturucu (porojen) gibi bileşenlerin oluşturduğu fazdır. Polimerizasyon sonunda her bir monomer damlası bir küresel polimer partikülüne dönüşür. Polimerizasyon ortamı sürekli karıştırılarak süspansiyon sisteminin devamlılığı sağlanır. Oluşan küresel partiküllerin birbirleri ile etkileşerek agregat oluşturmaması için stabilizatör (örneğin poli (vinil alkol)) kullanılır. Stabilizatörler taneciğin etrafını koruyucu bir tabaka oluşturarak ve tanecik yüzeyindeki ara yüzey gerilimini düşürerek olası bu topaklaşmayı engellerler. Polimerizasyon şartlarına bağlı olarak 10 μm 'den 10 mm'ye kadar değişen boyut aralığında küresel partiküller elde edilir. Süspansiyon polimerizasyonu ile MIP hazırlanması şematik olarak Şekil 1.20'de verilmiştir.

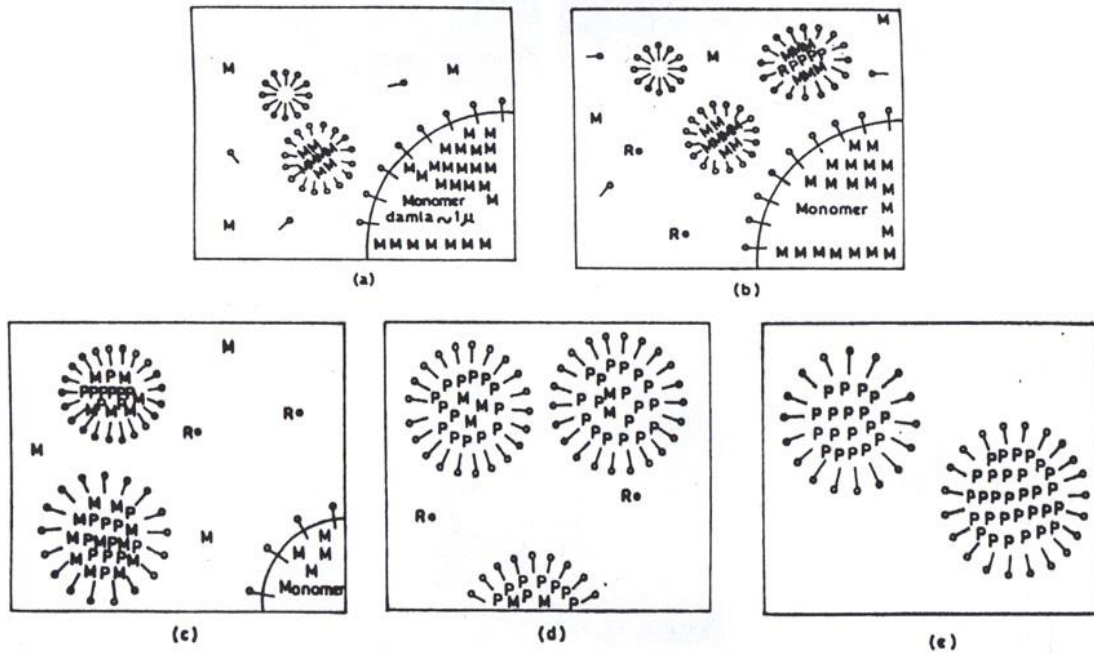


Şekil 1.20. Süspansiyon polimerizasyonu ile MIP hazırlanmasının şematik gösterimi

Süspansiyon polimerizasyonu yığın polimerizasyonu ile kıyaslandığında ortam viskozitesinin düşük olması ve sürekli karıştırma sayesinde sıcaklık kontrolünün kolay olması gibi önemli üstünlüklere sahiptir.

1.7.3. Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu tekniğinde birbiri ile karışmayan iki faz bulunur. Bunlardan ilki monomer fazı, diğeri ise dağıtma fazı olarak adlandırılır. Monomer fazı dağıtma fazı içerisinde emülsiyon halinde dağılmış haldedir. Süspansiyon polimerizasyonu tekniğinden farklı olarak emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcı molekül dağıtma fazında çözülür. Dağıtma fazı ya da dispersiyon fazı olarak da bilinen emülsiyon ortamı genellikle sudur. Emülsiyon yapıcı olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi yüzey aktif maddeler kullanılır. Emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile polimerler sentezlenirken ilk aşamada emülsiyon yapıcı ajan-su karışımı hazırlanır. Karışım içerisinde bir kısım emülsiyon yapıcı ajan çözünürken bir kısmı da biraraya gelerek küresel miselleri meydana getirir. Sonraki aşamada, ortama monomerler eklenir. Monomerlerin bir kısmı su içerisinde çözünür, bir kısmı da bir önceki aşamada oluşan misellerin içerisine girerek onları şişirir. Başlatıcı sayesinde oluşan serbest radikaller (R) polimerizasyonu başlatır. Serbest radikallerin saldırısına uğramayan ortamdaki miseller çözünürler ve oluşan polimerik partiküllerin yüzeyine adsorbe olurlar. Şekil 1.21' de emülsiyon polimerizasyonun aşamaları şematik olarak verilmiştir.



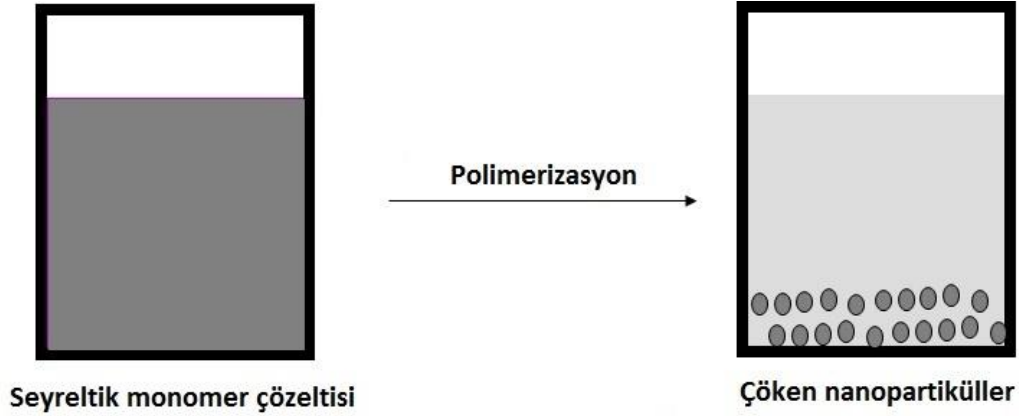
Şekil 1.21. Emülsiyon polimerizasyonunun aşamaları (o- emülsiyon yapıcı ajan;
M: monomer, P: polimer, R: serbest radikal)

Şekil 1.21’de; (a) polimerizasyon öncesi (b) polimerizasyon prosesinin başladığı an; (c) polimerizasyon prosesinin devam ettiği süreç (d) monomer damlalarının bittiği aşama (e) polimerizasyon prosesinin tamamlanması aşamalarını göstermektedir.

1.7.4. Çöktürme polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonu nanoboyutta polimerik partiküllerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte oldukça seyreltik monomer çözeltisi kullanılır (monomer konsantrasyonu % 2 v/v oranında). Polimerleşme süreci süresince oluşan polimerik zincirler bir araya gelerek agregat oluşturmazlar ve polimerizasyon ortamından monomer ve oligomerin yapıya katılması devam eder ve boyutları polimerizasyon ortamında çözünemez duruma geldiğinde dibe çökme işlemi gerçekleşir. Çöktürme polimerizasyon tekniği kolay uygulanabilir ve diğer polimerizasyon tekniklerine göre daha az zaman alır (Poma ve ark., 2010).

Şekil 1.22’de çöktürme polimerizasyonu ile nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi vermiştir.



Şekil 1.22. Çöktürme polimerizasyonu ile nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi

1.8. Lipaz ve Uygulama Alanları

Endüstriyel ölçekte kullanılan enzim gruplarından biri lipazlardır (Gliserol ester hidrolazlar E.C. 3. 1. 1. 3). Lipazlar sulu ortamda esterlerin hidroliz reaksiyonlarını, organik ortamda da esterleşme/transesterleşme reaksiyonlarını kataliz edebilirler. Substratlara karşı gösterdikleri seçicilik lipazların farklı uygulama alanlarında kullanılmalarını sağlamaktadır ve bu alan gün geçtikçe genişlemektedir (Vulfson ve ark., 1994). Lipazlar süt endüstrisinde, yağ endüstrisinde, tat ve aroma bileşenlerinin üretiminde kullanılırlar (Knežević ve ark., 1998; Lortie 1997; Bornscheuer ve ark.,2002). Ayrıca lipazlar, deri ve deterjan endüstrisinde sürfaktant üretiminde ve bazı analitik uygulamalarda da kullanılırlar (Siler-Marinković ve ark., 1995). Lipazların önemli bir uygulama alanı da optikçe aktif bileşiklerin üretilmesinde kullanımıdır (Zaks ve Dodds, 1997; Rasor ve Voss, 2001).

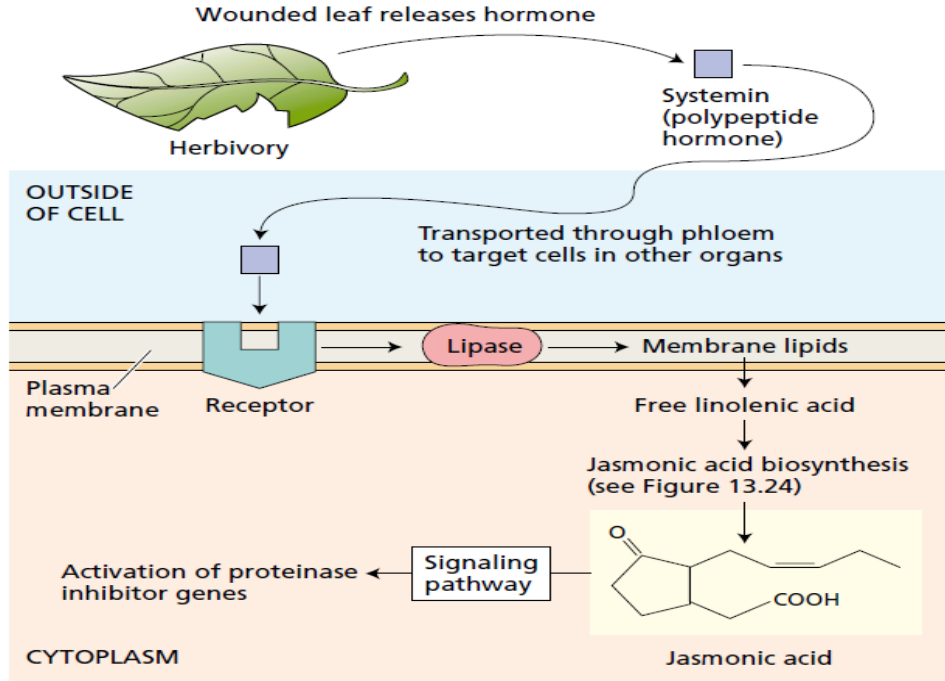
Lipazların en dikkat çeken uygulamalarından birisi de katalitik transesterifikasyon reaksiyonlarındaki kullanımlarıdır (Desai ve ark. 2004). Lipazlar daha önce biyodizel üretiminde (An-Fei Hsu ve ark. 2002), enantiyomerik ilaç sentezinde (Massolini, 2003) ve poliestерlerin enzimatik polimerizasyonunda (Gübitz ve Paulo, 2003) kullanılmıştır. Bu çalışmalarda lipaz immobilize edilmiş polimerler transesterifikasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Diğer taraftan düşük kararlılığı ve yüksek seçiciliğe sahip enzimin üretim maliyetinin yüksek olması lipazın geniş ölçekteki endüstriyel uygulamalarında önemli bir problem oluşturmaktadır. Bu amaçla

kararlılığı artırmak ve maliyeti düşürmek için enzim benzeri bileşikler ya da enzim analogları biyomimetik lipaz tasarlanmasında kullanılmıştır. Yeni ve etkili katalizörlerin geliştirilmesi sentetik biyolojide anahtar rol oynamaktadır. Özellikle enzim-mimik katalizörler yüksek termal ve kimyasal kararlılıklarının yanı sıra yüksek katalitik aktivitelerinden dolayı oldukça önemlidir. Bu tür katalizörlerin geliştirilmesinde, enzimin aktif bölgesinin kimyasal yapısı, şekli ve kavitesine benzer özelliklerde materyallerin hazırlanmasına dikkat edilir.

1.9. Jasmonik Asit ve Metil Jasmonat

Jasmonik asit ve metil jasmonat bitki savunma sisteminde bulunan moleküllerdir. Jasmonik asit ilk kez yasemin bitkisinin (*Jasminum grandiflorum*) yağında bulunmuştur (Sembdner ve Parthier, 1993) . Bitkiler oldukça kompleks olan savunma sistemleri sayesinde patojen atağını algılar ve karşı atağa geçebilirler. Bitki savunma sistemlerinin aktive olabilmesi için reseptörlerden bitki hücresi genomuna sinyal transdüksiyonun olması gereklidir. Bu yolda savunma sistemini tetikleyen en önemli unsurlardan birisinin jasmonik asit (JA) olduğu ortaya koyulmuştur.

Bitki mekanik olarak ya da böcekler tarafından herhangi bir saldırıya maruz kaldığında reseptör hücre membranlarında bulunan enzimler aktive olarak jasmonik asitin öncülü olan linolenik asit salınımı artar (Şekil 1.23). Daha sonra lipoksidasyon, siklizasyon ve β -oksidasyon aşamalarını içeren ve oldukça kompleks bir reaksiyon mekanizması sonrası bitkide jasmonik asit biyosentezi gerçekleşir (Şekil 1.24). Daha sonra jasmonik asit cis-jasmon ve metil jasmonata dönüşür. Metil jasmonat jasmonik asitten daha uçucu bir bileşik olduğu için, saldırıya uğramış bitki tarafından zarar görmemiş komşu bitkilere tehlikeyi haber vermede mesajcı sinyal molekülü olarak kullanılır.

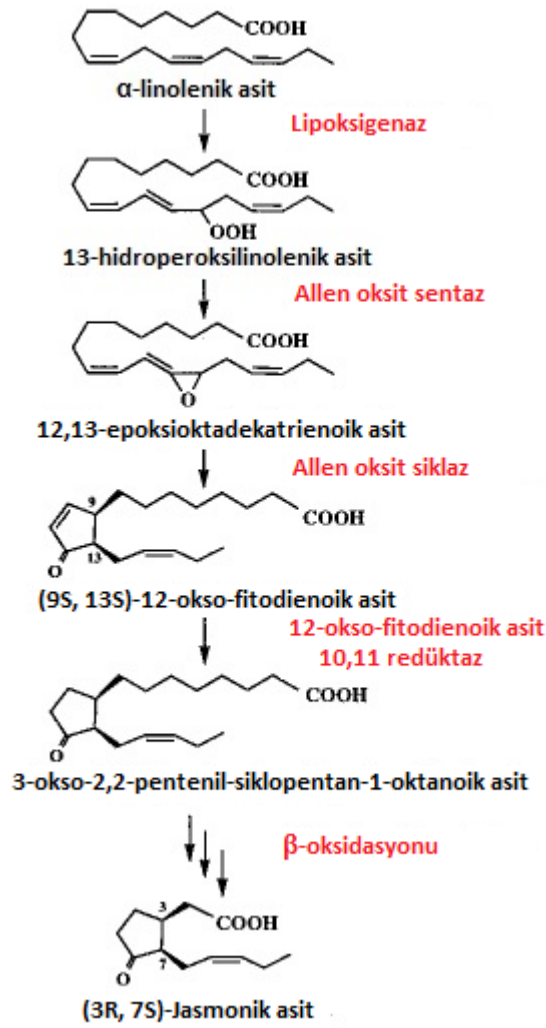


Şekil 1.23. Saldırıya maruz kalmış bitki yapraklarında jasmonik asit ve diğer savunma hormonlarının sentezini başlatan sinyal mekanizması

Metil jasmonat, bitkileri böcek, bakteri ve mantar saldırılarına ve sıcaklık değişimlerine karşı koruduğu gibi, yapılan araştırmalar metil jasmonatın birçok meyve-sebzenin rengini ve tazeliğini korumada yardımcı olduğunu göstermiştir. Örneğin elma ve armut üretiminde hasat öncesi meyvelerin aromatik bileşik metil jasmonat ile spreyleneşmesi kalite ve renk uniformluğunu artırma açısından yeni bir metot olarak düşünülmüştür (Suszkiw, 2003).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda bitki stres hormonlarından jasmonat ve bazı sentetik türevlerinin in-vivo ve in-vitro olarak anti-kanserojen aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmalarda jasmonatların bu aktivitelerini aşağıdaki yollarla gösterdikleri gözlenmiştir.

- ❖ Kanserli hücrelerde mitokondrial pertürbasyon ile ATP tüketimini ani olarak tetiklemeleri
- ❖ Hidrojen peroksit üreterek reaktif oksijen türleri ile apoptosise yol açmaları (Flescher, 2007).



Şekil 1.24. Bitki bünyesinde jasmonik asitin biyosentez mekanizması

1.10. Metil Oleat

Oleik asit esterifikasyonu ile elde edilen metil oleat endüstride geniş uygulama alanı bulmaktadır. Bu uygulamalar aşağıda verilmiştir.

- ❖ Metil oleat mükemmel çözünürlük özelliklerine sahiptir ve bu özelliği nedeni ile yağlar, yüzey aktif maddeleri ve yağda çözünür malzemelerle kolayca formüle edilebilir.
- ❖ Mürekkepler için köpük giderici, kaplamalar için çözücü madde olarak ve katran giderici olarak kullanılır.
- ❖ Gıda ve kozmetik sektörlerinde yüzey aktif madde olarak kullanılır.
- ❖ Pestisit endüstrisinde metilbenzen yerine kullanılır.

Bu tez çalışması kapsamında hazırlanan mikro ve nano tabanlı yapay enzim sistemleri kullanılarak bu denli önemli kullanım potansiyeline sahip metil oleat bileşiği oleik asit transesterifikasyonu ile elde edilebilmiştir.

1.11. Biyodizel

Fosil temelli enerji kaynaklarının her geçen gün azalması, Dünya nüfusunun hızla büyümesi ve endüstrileşme gibi sebepler nedeniyle alternatif olarak çevre dostu ve yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelimi hızlandırmıştır. Bu alternatif kaynaklardan birisi olan biyodizel ayçiçek, kanola ve aspir gibi tohumunda yüksek oranda yağ içeren bitkilerden elde edilen yağların veya hayvansal yağların kısa zincirli bir alkol ile (metanol, etanol vb) bir katalizör eşliğinde (enzim, asidik veya bazik katalizörler) esterifikasyon reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan üründür.

Biyodizel günümüzde üç farklı yöntemle üretilmektedir. Bunlar;

- ❖ Enzimatik Metot
- ❖ Gliseroliz Metodu
- ❖ Asit-kataliz metodudur.

Günümüzde enzimatik yolla biyodizel üretimi düşük kararlılık ve yüksek seçiciliğe sahip enzimlerin üretiminin maliyeti arttırması açısından ayrıca biyodizel üretiminde yüksek sıcaklık gibi ekstrem koşullar gerektiğinden endüstriyel boyuttaki uygulamalarda tercih edilmemektedir. Bunun yerine katı-asit katalizörler kullanılmaktadır. Son yıllarda biyodizel üretimindeki transesterifikasyon reaksiyonlarında katalizör olarak biyomimetik enzimler kullanılmaya başlanmıştır. Endüstriyel alanda biyomimetik yapay enzimlerin kullanımı ile katalizör ayırımında, ürün ayırımında ve saflaştırılmasında karşılaşılan güçlükler ortadan kaldırılmıştır. Özellikle enzim kararlılığının sağlanması için ekstra koşullar sağlanması gerekliliği ve enzimlerin pahalı oluşu sentetik enzim teknolojilerinin geliştirilmesini öne çıkarmıştır.

Transesterifikasyon reaksiyonu sonucu çevre dostu yakıt olarak kullanılan biyodizelin yanında ortamda gliserin de oluşur. Gliserinin başta kozmetik olmak üzere, tekstil gıda ve ilaç endüstrisi gibi birçok kullanım alanı vardır. Asit katalizörlerin

kullanıldığı transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan gliserin bu noktada pek tercih edilmemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında hazırlanan mimik-lipaz enzim sistemleri ile birçok zararlı kimyasal kullanıma gerek duymaksızın tamamen çevre dostu ve ılımlı koşullarda biyodizel ve diğer esterifikasyon ürünleri (metil jasmonat, metil oleat) elde edilebilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan lipaz, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenol, oleik asit, jasmonik asit, metil oleat, metil jasmonat, benzotriazol, etilen glikol dimetakrilat (EDMA), poli(vinil alkol) (PVA) (MW:100.000), azobisisobutyronitril (AIBN) ve HPLC saflıkta kullanılan tüm çözücüler Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) firmasından temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Sentezlenen fonksiyonel monomerler ve hazırlanan moleküler baskılanmış mikroküreler, moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküller ve kil-polimer nanokompozitlerin karakterizasyonları 500 MHz Bruker UltraShield Sıvı NMR spektrometresi, FEI -Tecnai™ G² Spirit/Biotwin geçirimli elektron mikroskobu, Zeiss Ultra Plus taramalı elektron mikroskobu, Perkin Elmer 8000 model FT-IR, Leco-CHNS-932 model elementel analiz cihazı ve ASAP 2000 model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazları ile gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi çalışmalarında ise Shimadzu 1601 model spektrofotometre kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

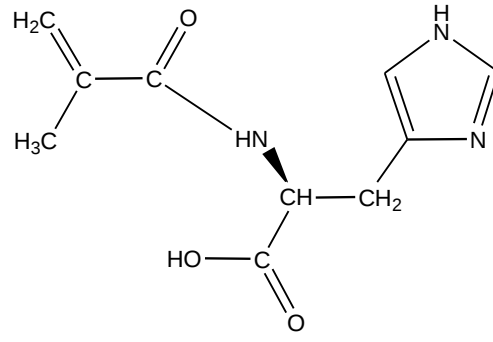
2.2.1. Aminoasit içeren fonksiyonel monomerlerin sentezi

Fonksiyonel monomerler metakriloil amidohistidin (MAH), metakriloil amidoserin (MASE) ve metakriloil amidoglutamik asit (MAGA) literatüre Hür ve arkadaşları tarafından rapor edilen ve aşağıda detaylıca verilen prosedüre göre sentezlenmiştir (Hür ve ark. 2007).

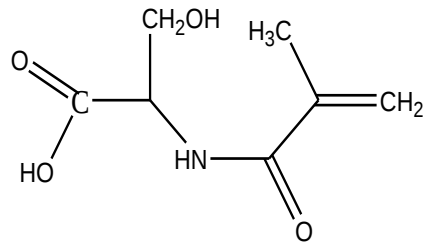
Uygun miktarda aminoasit (L-Histidin, L-Serin ya da L-Glutamik asit) (5.52 mmol, 1 eq.) 1 M NaOH (1eq) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Daha sonra metaakroil benzotriazol'ün (MA-Bt) (5, 52 mmol, 1eq) 1,4-dioksan içerisinde 25 mL'lik çözeltisi

hazırlanmış ve öncesinde hazırlanan aminoasit çözeltisi içerisine yavaşça ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 20 dk boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyonun tamamlanması ince tabaka kromatografisi ile izlenmiştir. Reaksiyon sonunda ortamdaki 1,4-dioksan vakum altında döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Kalan kısım reaksiyona giremeden ortamda kalan 1*H*- benzotriazolü uzaklaştırmak için su içerisinde çözülerek etil asetat ile ekstrakte edilmiştir (3x 50 mL). Daha sonra, toplanan sulu fazlar %10'luk sulu HCl çözeltisi ile nötralize edilmiştir (Metakrilol gruplarının asidik ortamda olası polimerizasyonunu engellemek için ortam pH'ının 6-7 civarında tutulması gerekmektedir. En son aşamada, su vakum altında döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılarak fonksiyonel monomer elde edilmiştir.

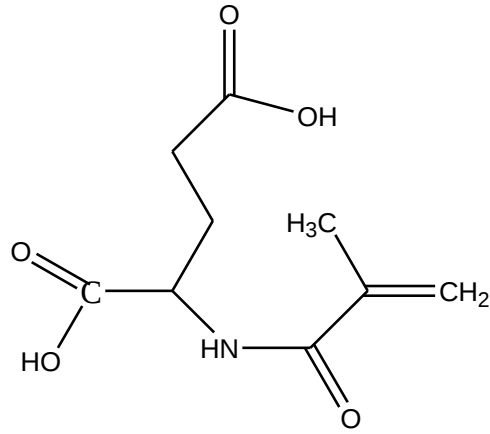
Sentezlenen fonksiyonel monomerlerin açık yapıları Şekil 2.1'de verilmiştir.



MAH monomeri



MASE monomeri

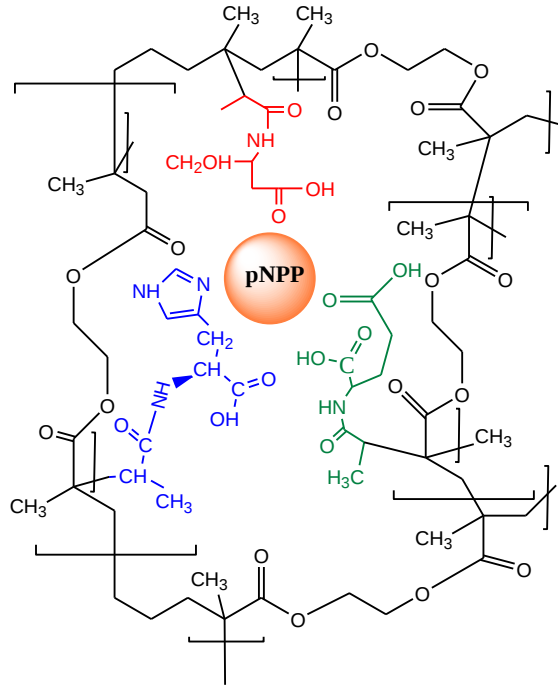


MAGA monomeri

Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan fonksiyonel monomerlerin açık yapıları

2.2.2. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin hazırlanması

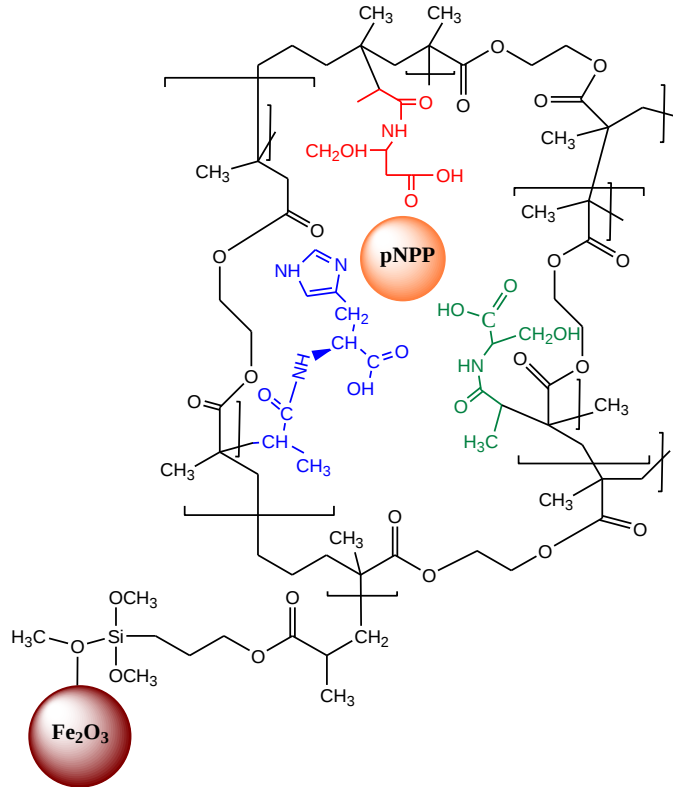
p-Nitrofenil palmitat baskılanmış mimik lipaz mikrokürelerin sentezi için uygulanan yöntemde; monomer olarak 0.1'er mmol metakriloilamido histidin (MAH), metakriloilamido serin (MASE) ve metakriloilamido glutamik (MAGA), kalıp molekül olarak ise 0.1 mmol p-nitrofenil palmitat kullanılarak süspansiyon polimerizasyon tekniği ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Etilenglikol dimetakrilat (EDMA) ve 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN) sırasıyla çapraz bağlayıcı ve başlatıcı olarak kullanılmıştır. Kalıp molekülün uzaklaştırılması ise metanolik-KOH ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.2'de p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimerin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.2. p-Nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimerin şematik gösterimi

2.2.3. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin hazırlanması

p-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin hazırlanmasında ilk aşamada, Fe_2O_3 yüzeyine trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM) ile metakrilat grupları bağlanmıştır. Bu amaçla 0.2 g Fe_2O_3 nanopartikül 1 mL TMSPM ile 5 mL toluen içerisinde 1 gün boyunca etkileştirilmiştir. Daha sonra reaksiyona girmemiş TMSPM'nin uzaklaştırılması için nanopartiküller birkaç kez toluen ile yıkanmıştır. Daha sonra, silil grupları ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin yüzeyi herbiri 0.1 mol olan MASE, MAH ve MAGA monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat (EDMA) ve başlatıcı olarak 2,2-dimetoksi-2-fenil asetofenon kullanılarak kalıp molekül p-nitrofenil palmitat (0.1 mol) varlığında polimerleştirilmiştir. Kalıp molekülün uzaklaştırılması ise 3 M metanolik-KOH ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.3'de yüzeyinde p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimer bulunan superparamenyetik nanopartiküllerin şematik gösterimi verilmiştir.



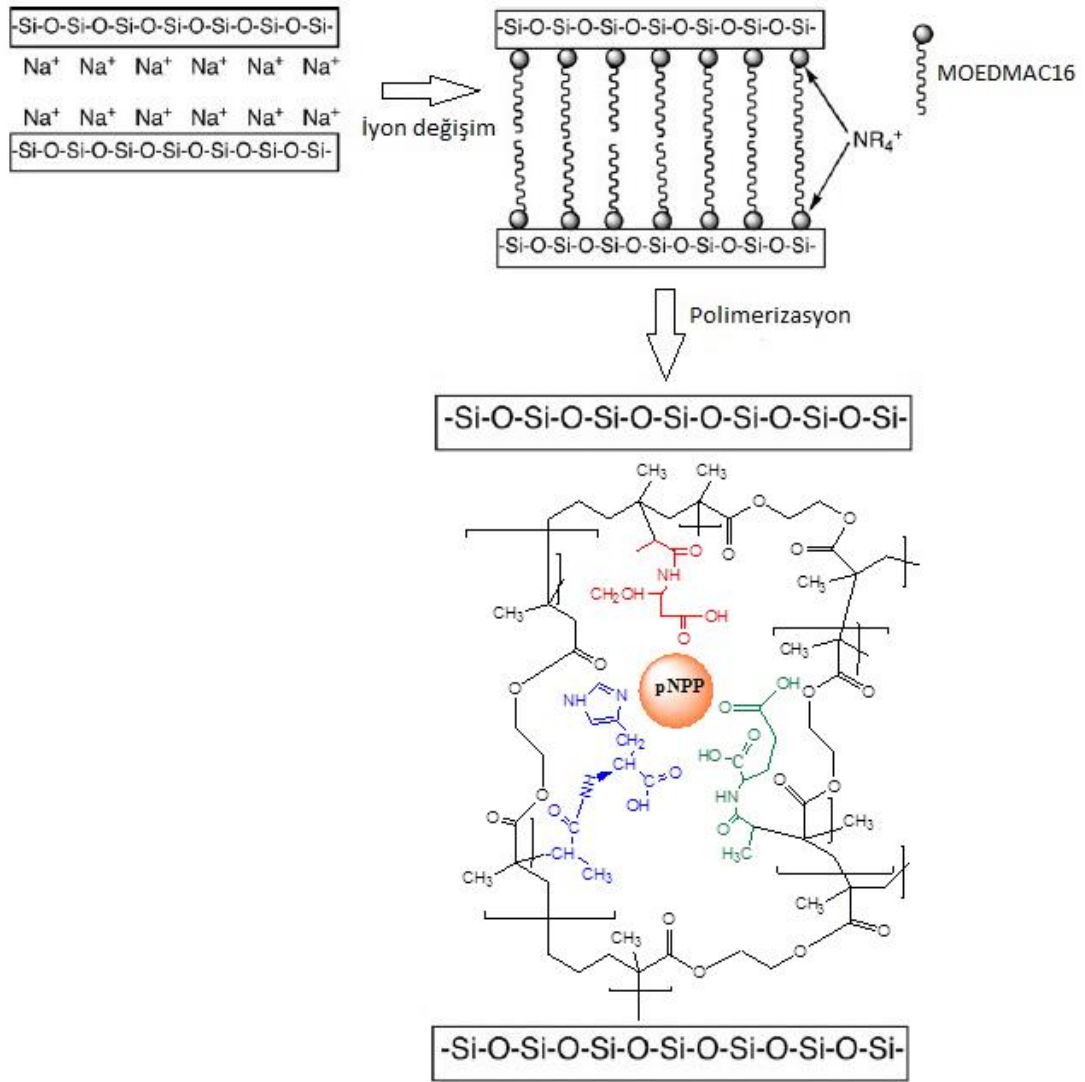
Şekil 2.3. Yüzeyinde p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllerin şematik gösterimi

2.2.4. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan simektit kili Türkiye kökenli olup Kuzey Anadolu simektitlerinden sağlanmıştır. Partikül büyüklükleri 200 µm olacak şekilde öğütülmüş ve elekten geçirilmiştir. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-organokil nanokompozit aşamalı bir işlemle hazırlanmıştır:

Birinci aşamada 20 g simektit tartılmış ve bunun üzerine 500 mL deiyonize su ilave edilerek magnetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra simektit siyah bant süzgeç kâğıdından süzölmüştür. İkinci aşamada, birinci aşamadan süzölmüş halde elde edilen simektit üzerine 0,05 mol metakriloiloksietil dimetilhekzadesil amonyumbromür, 5,0 mL hidroklorik asit ve 500 mL deiyonize su ilave edilerek magnetik karıştırıcıda 60 °C sıcaklıkta 3 saat karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra kil siyah bant süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Üçüncü aşamada ikinci aşamadan süzölmüş halde elde edilen simektit sıcak ve soğuk su ile klor kalmayınca kadar yıkanmıştır. Yıkanmış simektit 55 °C sıcaklıktaki etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

Sonraki aşamada, 10 mL % 50`lik (V/V) etanol-su karışımı içerisinde 0,1 mmol MASE, MAH ve MAGA monomerleri ve kalıp molekül olarak 0.1 mmol p-nitrofenil palmitat içeren çözelti 1.0 mL etilenglikol dimetakrilat (EDMA) (çapraz bağlayıcı) ve 0,05 g AIBN (başlatıcı) ile karıştırılmıştır. Daha önce modifiye edilen 8,0 g kil 60 mL asetonitril içerisinde süspansiyon haline getirilerek hazırlanan monomer karışımı içerisine ilave edilmiştir. Karışım cam polimerizasyon reaktörüne transfer edilerek 600 rpm karıştırma hızında 70 °C`de 6 saat ve 85 °C`de 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Polimerizasyon sonrası p-nitrofenil palmitat baskılı polimer-kil nanokompozit reaksiyon ortamından ayrılmış, etanol ve su ile yıkanarak vakum etüvünde 70 °C`de 24 saat suresince kurutulmuştur. Polimerik yapıdan p-nitrofenil palmitat uzaklaştırılması metanolik-KOH ile gerçekleştirilmiştir. Nanotabakalarında p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimer bulunan polimer-kil kompozit malzemelerin hazırlanışı şematik olarak Şekil 2.4`de gösterilmiştir.



şekil 2.4. Nanotabakalarında *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) baskılanmış polimer-kil kompozit malzemelerin hazırlanmasının şematik gösterimi

2.2.5. Karakterizasyon çalışmaları

2.2.5.1. Yüzey morfolojisi

p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin yüzey morfolojisine yönelik karakterizasyon işlemleri SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir. SEM analizi öncesinde numuneler 50 °C sıcaklıkta etüvde 24 saat boyunca bekletilerek kurutulmuştur. Daha sonra, numuneye iletkenlik kazandırılması için numune 2 dk süreyle 50 mA’lık bir akımla vakum altında altın film tabakası ile kaplanmıştır. Altın film kaplanmış numunelerin SEM görüntüleri Zeiss Ultra Plus taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınmıştır.

Diğer taraftan, p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin yüzey morfolojisine yönelik karakterizasyon işlemleri ise FEI -Tecnai™ marka G² Spirit/Biotwin model TEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, manyetik nanopartiküller aglomerasyonun minimuma indirilmesi için EtOH içerisinde disperse edilerek 15 dk boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra TEM görüntüleri alınmıştır.

2.2.5.2. NMR analizleri

Sentezlenen fonksiyonel monomerlerin karakterizasyonları için ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları Bruker-UltraShield 500 MHz NMR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Fonksiyonel monomerler DMSO-d₆ içerisinde çözülmüştür. Kimyasal kaymalar (δ) ppm olarak DMSO-d₆ referans alınarak kaydedilmiştir.

2.2.5.3. Yüzey alanı ölçümü

Hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler ve polimer/kil nanokompozitlerin spesifik yüzey alanı ölçümleri BET cihazı (ASAP2000, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.4. Şişme testi

Hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler ve polimer/kil nanokompozitlerin karakterizasyonları için şişme testleri de gerçekleştirilmiştir. Denge şişme oranlarının tespiti için belirlenmesinde aşağıda kısaca özetlenen prosesür uygulanmıştır.

Belirli miktar kuru numune 50 ml saf su içeren beher içerisine konulmuştur. Beher 24 saat süre ile laboratuvar sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra polimer sudan alınmış ve süzme işlemi sonrası tartılmıştır. Kuru ve ıslak numune ağırlıkları belirlenerek eşitlik 2.1 yardımı ile şişme oranları hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0)/W_0] \times 100 \quad (2.1)$$

W_0 ve W_s sırası ile p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler ve polimer/kil nanokompozitlerin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.

2.2.5.5. Elementel analiz

Sentezlenen fonksiyonel monomerlerin karbon, hidrojen, oksijen ve azot içerikleri elementel analiz sistemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla aşağıda verilen yöntem kullanılarak elementel analiz sonuçları elde edilmiştir.

Yaklaşık 1 mg fonksiyonel monomer elementel analiz sisteminin (Leco, CHNS–932, ABD) alüminyum hücre sine konulmuştur. Sonraki aşamada ise monomer numunesi cihaza yerleştirilerek yakma işlemi gerçekleştirilmiş ve örneğin karbon, hidrojen, oksijen ve azot içeriği tespit edilmiştir.

2.2.5.6. FT-IR analizleri

Sentezlenen hazırlanan MIP'lerin FT-IR analizleri FT-IR spektrometresi (Shimadzu FTIR 8000 Series) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spatül ucu ile az miktarda alınan kuru numune KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FT-IR spektrumu çekilmiştir.

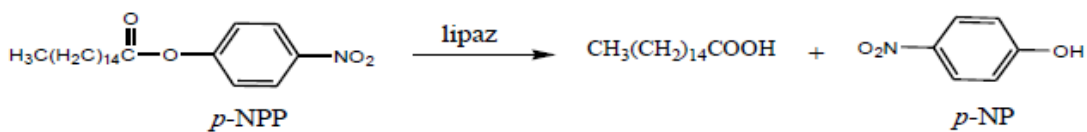
2.2.6. Hazırlanan mikro ve nanoplatformların p-nitrofenil palmitat hidrolizinde kullanımı

Tez çalışmasının bu aşamasında, hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler, manyetik nanopartiküller ve polimer-kil nanokompozitlerin p-nitrofenil palmitat hidrolizinde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Hidroliz reaksiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Bu amaçla, izopropanol içerisinde hazırlanan 20 mM p-nitrofenil palmitat 20 kat tris-HCl pH 8.0 tamponu ile seyreltilerek hazırlanan 1 mL substrat çözeltisi 100 mg p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler, manyetik nanopartiküller ve polimer-kil nanokompozitler ile etkileştirilmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonunda ürün olarak oluşan p-nitrofenol miktarı spektrofotometrik olarak 405 nm’de ölçülmüştür. Bununla birlikte, p-nitrofenil palmitat hidrolizine pH ve sıcaklık etkisi incelenmiştir. Hazırlanan lipaz benzeri p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler, manyetik nanopartiküller ve polimer-kil nanokompozitlerin tekrar kullanılabilirlikleri de araştırılmıştır.

2.2.7. Enzim aktivitesi çalışmaları

Lipaz aktivitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalar, Narwal ve arkadaşları’nın (Narwal ve ark., 2012) literatürde rapor ettikleri prosedür ile gerçekleştirilmiştir.

Bu prosedüre göre; ilk önce stok substrat çözeltisi olarak izopropanol içerisinde 20 mM p-nitrofenil palmitat (p-NPP) hazırlanmıştır. Daha sonra stok çözelti 1:20 oranında 20 mM Tris HCl pH 8,0 tamponu ile seyreltilerek çalışma substratı hazırlanmış ve aktivite deneylerinin tüm aşamalarında çalışma substratı kullanılmıştır. Lipaz aktivitesi belirlenirken 1 mL çalışma substratı 50 mg p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküre (manyetik nanopartikül veya polimer-kil nanokompoziti) ile 40 °C’de 30 dk boyunca etkileştirilmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonunda ürün olarak oluşan p-nitrofenol’ün (p-NP) absorbansı 405 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hidroliz reaksiyonu Şekil 2.5’de verilmiştir.



Şekil 2.5. Lipaz katalizli *p*-NPP hidroliz reaksiyonu

Lipaz enzim aktivitesi (IU) dakikada 1 μ mol p-NP oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.2.8. Transesterifikasyon reaksiyonları

Oleik asit ve jasmonik asit esterifikasyonunda Pang ve arkadaşlarının (Pang ve ark. 2007) önerdiği prosedür uygulanmıştır. Bu amaçla, 3,2 ml oleik asit ve 8,1 ml metanol bir balon içerisine alınarak üzerine 100 mg p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküre (manyetik nanopartikül veya polimer/kil nanokompoziti) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 40 °C’de sabit karıştırma hızıyla 20 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra mimik katalizör ortamdan ayrılmıştır (Polimerik mikroküreler ve polimer-kil nanokompozitler için için süzme işlemi ile, manyetik nanopartiküller için mıknatıs kullanılarak). Son aşamada transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan ürün metil oleat gaz kromagrafisi kütle spektrometrisi) cihazı ile Bölüm 2.2.9’da detaylıca verilen metot uygulanarak tespit edilmiştir.

Biyodizel üretiminde ise 5 g Ayçiçek yağı, 6 g metanol ve hacimce % 0.5 oranında (v/v) su bir balon içerisine alınarak üzerine 100 mg p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküre (manyetik nanopartikül veya polimer-kil nanokompoziti) ilave edilerek transesterifikasyon reaksiyonu ve sonrasında oluşan ürünlerin analizi yukarıda verilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir.

2.2.9. GC-MS analizleri

Hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler, manyetik nanopartiküller ve polimer/kil nanokompozitleri kullanılarak gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler (yağ asidi metil esterleri (biyodizel), metil jasmonat ve metil oleat) gaz kromagrafisi kütle spektrometrisi (GC-MS) cihazı ile tespit edilmiştir. Bu amaçla reaksiyon sonucu reaksiyon balonunda üst fazda toplanan kısımdan 1 μ L hacminde numune polar kolona (HP-Innowax Fused Silica Kapiller Kolon (Uzunluk 60 m; iç çap 0,25 μ m) sahip Shimadzu GCMS QP5050A marka cihaza enjekte edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz süresince aşağıdaki program uygulanmıştır.

Taşıyıcı gaz: Helyum

Enjeksiyon sıcaklığı: 250 °C

Sıcaklık Programı: 60°C// 2°C/dak//180 °C-10 dk

Kütle aralığı: 40-400 m/z

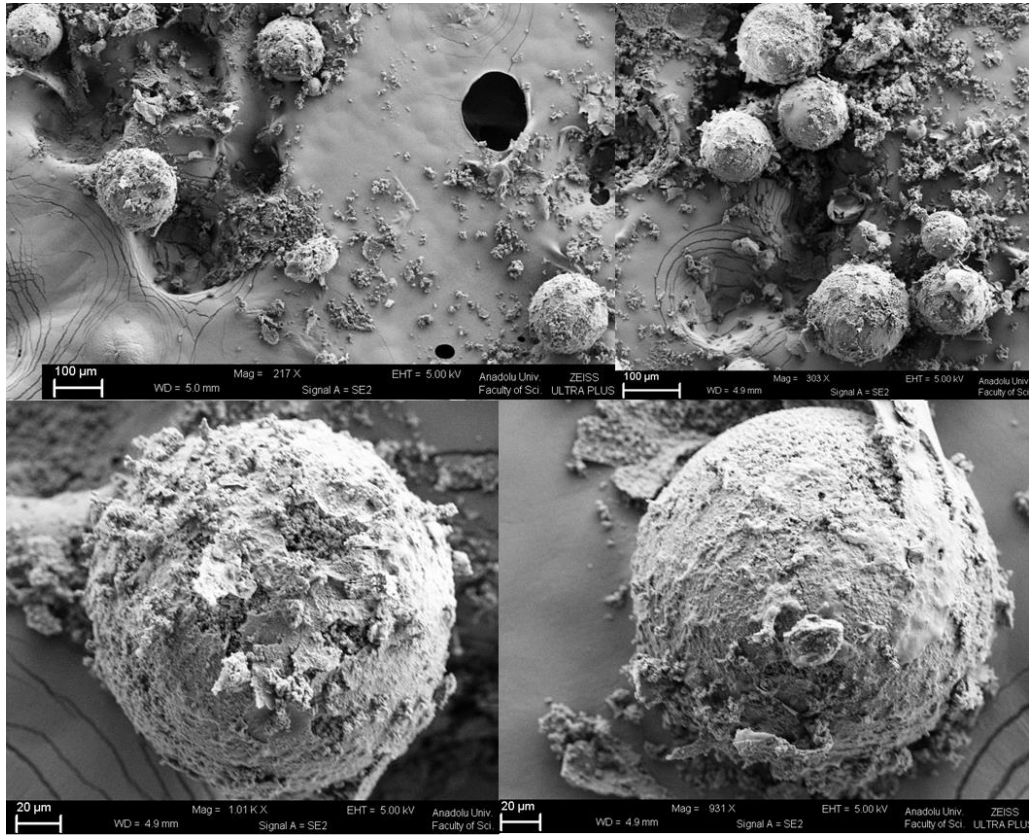
Elektron enerjisi: 70 eV

3. BULGULAR

3.1. Hazırlanan Moleküler Baskılanmış Mikro ve Nanoplatformların Karakterizasyonu

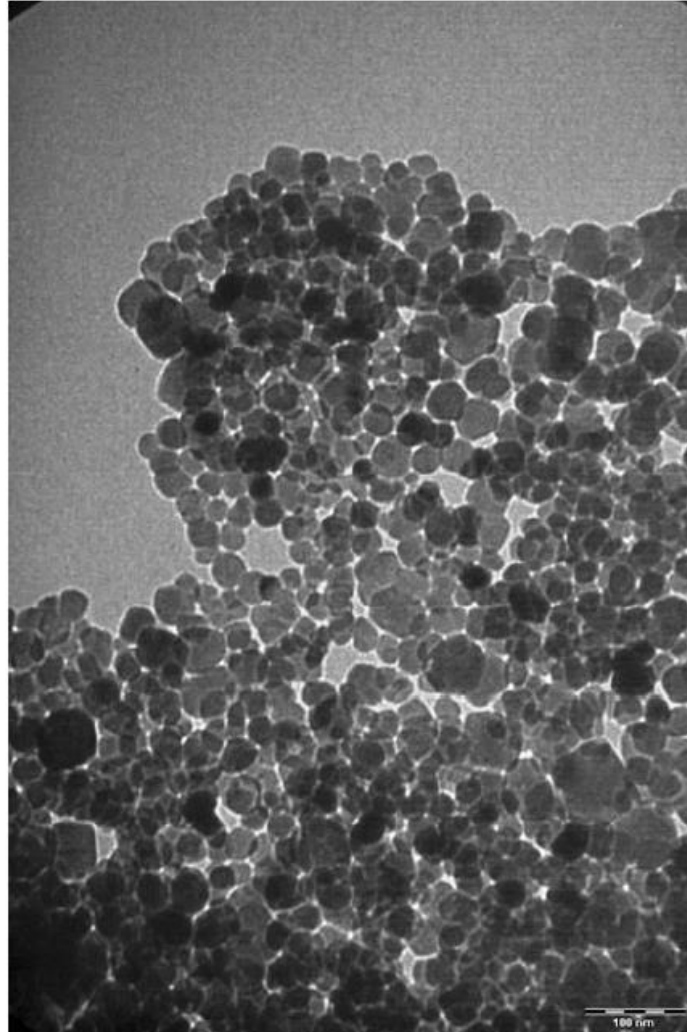
3.1.1. Yüzey morfolojisi

Süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik mikrokürelerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Mikrokürelere ait SEM görüntüleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi elde edilen mikroküreler yaklaşık 100 µm civarında olup gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu gözenekli yapı mikrokürelerin yüzey alanının da artmasını sağlamaktadır ve dolayısı ile difüzyon direnci azalmakta ve hedef moleküllerin kütle transferi kolaylaşmaktadır. Kütle transferinin kolaylaşması sayesinde de bağlanan molekül sayısı artmakta ve polimerin hedef molekülü bağlama kapasitesi artmaktadır.



Şekil 3.1. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik mikrokürelere ait SEM fotoğrafları

Diğer taraftan yüzeyinde p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik kabul bulunan manyetik nanopartiküllerin yüzey morfolojilerinin karakterizasyonunda ise geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Şekil 3.2’de p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllere ait TEM görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsünden de görüldüğü gibi hazırlanan nanopartiküllerin boyutu yaklaşık 30-50 nm aralığındadır.



Şekil 3.2. *Yüzeyinde p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllere ait TEM görüntüsü*

3.1.2. Yüzey alanı ölçümü

BET yöntemi ile yüzey alanı ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik mikrokürelerin, kil ve polimer-kil nanokompozitlerin spesifik yüzey alanları sırası ile $135,4 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, $57,1 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ve $84,4 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

3.1.3. Şişme testi

p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik mikroküreler ve kil nanokatmanlarında p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimer bulunan kompozit malzemeler yüksek oranda çapraz bağlı, hidrofilik bir matrikse sahiptir. Sulu içerisinde çözünmez, fakat çapraz bağ derecesine ve polimerik iskeletin hidrofilik derecesine bağlı olarak polimerik örgü içerisinde su alarak şişme özelliği sergilerler. Bu çalışma kapsamında hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimerik mikrokürelerin ve polimer-kil nanokompozitlerin denge şişme oranları sırasıyla % 67 ve % 55 olarak bulunmuştur.

3.1.4. Elementel analiz

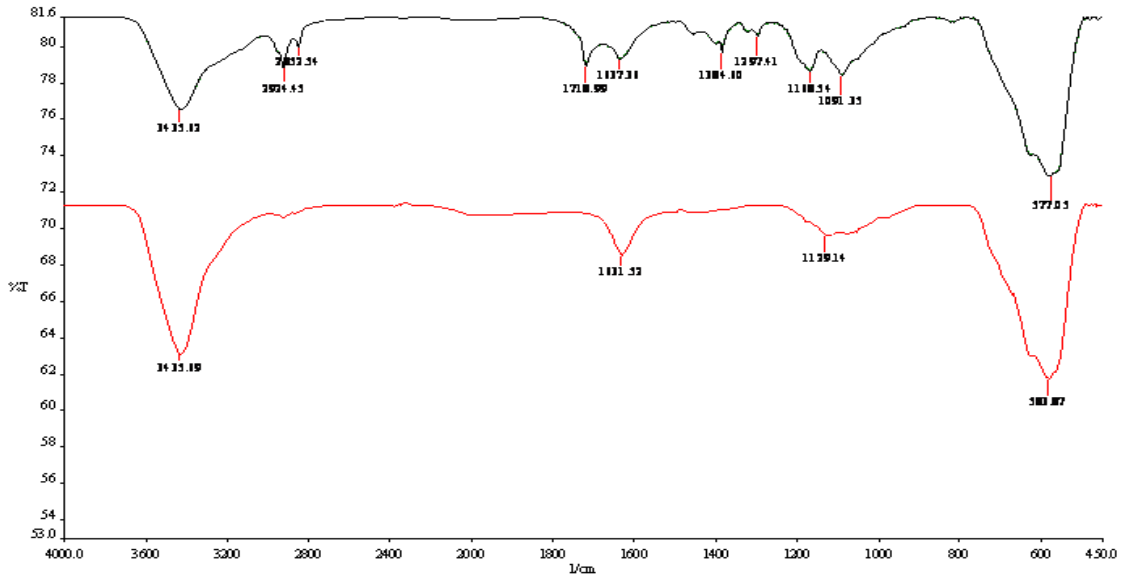
Sentezlenen fonksiyonel monomerlere ait elementel analiz sonuçları Tablo 3.1’de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi deneysel olarak elde edilen sonuçlar teorik olarak hesaplanan sonuçlar ile uyum içerisinde

Tablo 3.1. Sentezlenen fonksiyonel monomerlere ait elementel analiz sonuçları

	Monomer	%C	%H	%N
Teorik	MA-Bt	64,14	4,85	22,45
	MAH	53,80	5,87	18,82
	MASe	48,55	6,40	8,09
	MAGA	57,46	6,06	7,98
Deneysel	MA-Bt	63,80	4,73	22,32
	MAH	53,43	6,40	18,53
	MASe	48,21	6,31	7,97
	MAGA	58,60	5,89	7,90

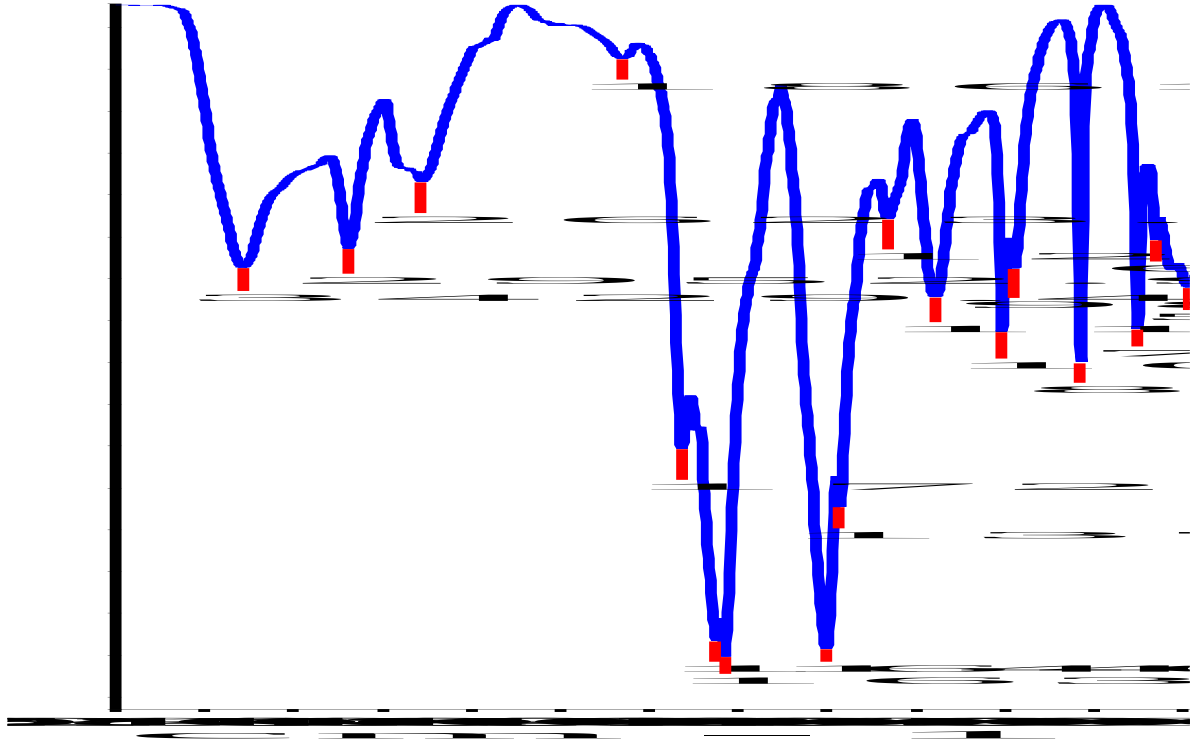
3.1.5. FT-IR analizleri

Şekil 3.3'te manyetik nanopartiküllerin TMSPM modifikasyonu öncesi (siyah spektrum) ve sonrası (kırmızı spektrum) FT-IR spektrumu verilmiştir. FT-IR spektrumundan da görüldüğü gibi, anti simetrik ve simetrik CH gerilimi 2924 cm^{-1} 'de, O'ye bağlı CH_3 2852 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1168 cm^{-1} ve 1091 cm^{-1} de gözlenen pikler ise Si-O-C gerilimine ait olup TMSPM yapısına ait karakteristik piklerdir

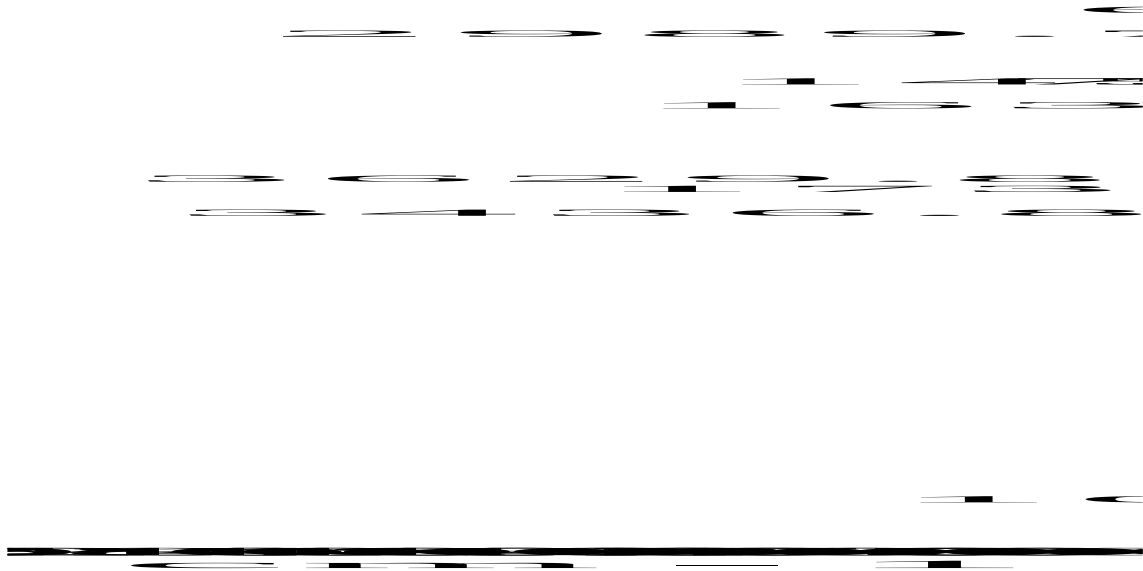


Şekil 3.3. Manyetik nanopartiküllerin TMSPM modifikasyonu öncesi (siyah spektrum) ve sonrası (kırmızı spektrum) FT-IR spektrumu

Şekil 3.4'te yüzeyinde p-nitrofenil palmitat (pNPP) baskılı polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu verilmiştir. FT-IR spektrumunda manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde moleküler baskılama sonrasında bazı yeni pikler ortaya çıkmıştır. Örneğin, yapıdaki imidazol grubuna ait C=C gerilme ve aromatik C-H eğilme titreşimlerine ait pikler 1402 ve 1007 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 2623 cm^{-1} 'de gözlenen pik N-H gerilmesine aittir.



Şekil 3.4. *Yüzeyinde pNPP baskılı polimerik kabuk bulunan manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu*



Şekil 3.5. *pNPP baskılanmış polimer-kil nanokompozitin FT-IR spektrumu*

Şekil 3.5.'te pNPP baskılanmış polimer-kil nanokompozitin FT-IR spektrumu verilmiştir. 523, 796 ve 1039 cm^{-1} 'de kile ait karakteristik pikler gözlenmiştir. 2989 cm^{-1} 'de gözlenen metil grubu titreşimlerine ait pik yapıdaki C16 gruplarının varlığına işaretler.

3.1.6. NMR analizleri

MABt için elde edilen sonuçlar

¹H (500 MHz, CHCl_3 -d6); 8,23 (d, 1H, Ar-H, J=8.2Hz), 8,09 (d, 1H, Ar-H, J=8,2Hz), 7,62 (t, 1H, Ar-H, J=8,20, 15,40Hz), 7,49 (t, 1H, Ar-H, J=8,20, 16,38Hz), 6,26 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 6,05 (d, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$, J=1,52Hz), 2,45 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
¹³C (125 MHz, CHCl_3 -d): 19,8; 114,5; 120,0; 126,1; 129,6; 130,2; 132,0; 137,2; 145,7; 167,5

MAH için elde edilen sonuçlar

¹H, (500 MHz, DMSO- d6); 7,60 (d, 1H, N-H, J= 5,40 Hz), 7,42 (s, 1H, Ar-H), 6,85 (s, 1H, Ar-H), 5,65 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 5,10 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)$), 4,05 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$, J= 5,70; 12,00 Hz), 3,35 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$, J= 3,92; 8,80 Hz), 3,05 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$, J= 3,92; 15,26 Hz); 2,95 (s, 3H, CH_3)
¹³C (125 MHz, DMSO- d6): 18,6; 28,4; 55,8; 119,6; 124,0; 133,8; 135,4; 141,3; 168,8; 174,6

MASe için elde edilen sonuçlar

¹H (500 MHz, DMSO- d6); 7,35 (d, 1H, N-H, J= 5,35 Hz), 5,70 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 5,35 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 3,75 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$, J=2,10; 5,50 Hz); 3,60 (dd, 1H, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CHNH}$, J= 5,24; 9,40Hz), 3,35 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CHNH}$, J=7,60; 9,40Hz); 1,85 (s, 3H, CH_3); 1,72 (s, 1H, O-H)
¹³C (125 MHz, DMSO- d6): 19,0; 55,0; 60,3; 120,0; 140,0; 167,0; 173,0

MAGA için elde edilen sonuçlar

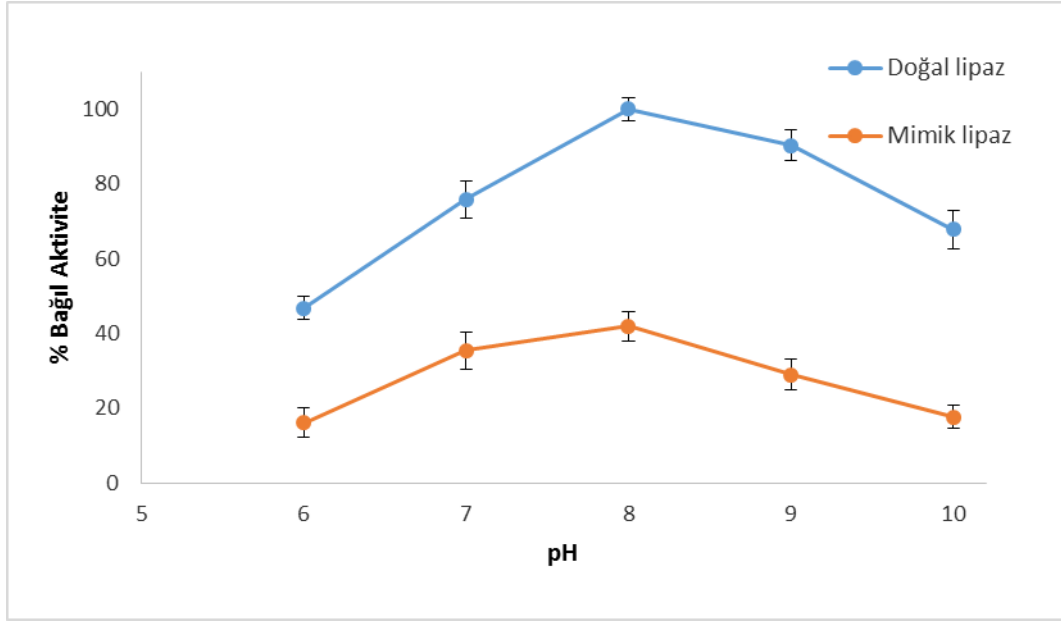
¹H (500 MHz, H₂O- d₆); 5,55 (s, 1H, =CH₂), 5,27 (s, 1H, =CH₂), 4,00 (dd, 1H, HOOC-CH-(NH-)CH₂-), J=8.96 Hz), 2,10-2,06 (m, 2H, CH-CH₂-COOH), 1,96-1,86 (m, 2H, -NHCH-CH₂-CH₂-), 1,76 (s, 3H, CH₃-(C-)CH₂)

¹³C (125 MHz, H₂O- d₆); 17,6; 27,9; 33,7; 55,4; 121,0; 138,8; 171,3; 178,7; 181,7

3.2. Moleküler Baskılanmış Mikrokürelerin p-Nitrofenil Palmitat Hidrolizinde Kullanımı

3.2.1. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi

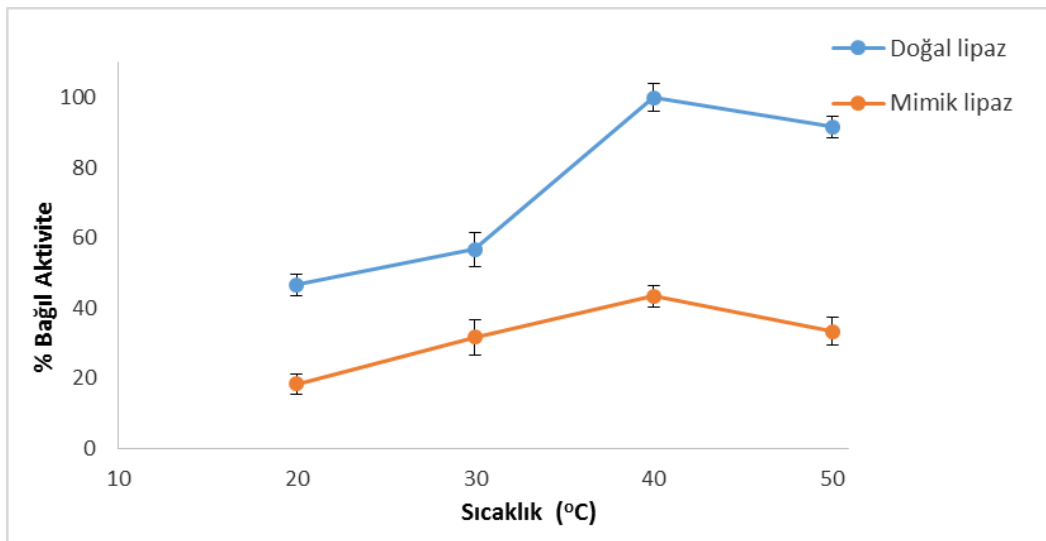
pH enzimatik aktivetinin değişiminde rol olan önemli faktörlerden biridir. Bu çalışmada pH aralığı 0,1 M fosfat tamponu (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) ile 6,0 ve 10,0 arasında değiştirilmiş ve sonuçlar Şekil 3.6'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, maksimum aktivite hem doğal lipaz hem de lipaz benzeri p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler için pH 8,0 değerinde gözlemlenmiştir. Bu pH değeri literatürde yer alan değerlerle uyumludur. Milasinovic ve arkadaşları (Milasinovic ve ark. 2014) lipaz immobilizasyonu için poli(N-izopropilakrilamid-ko-itakonik asit) hidrojeller hazırlamışlardır. Hazırlanan *Candida rugosa* lipaz immobilize polimerik jeller izobütirik asit esterifikasyonuna karşı pH 8,0'de maksimum aktivite göstermiştir. Başka bir çalışmada ise, lif kabağından hazırlanan süngerimsi malzeme yüzeyine lipaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Zhu ve ark, 2013). Bu çalışmada da immobilize lipaz aktivitesi için optimum pH değeri 8,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.6. *p*-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi

3.2.2. *p*-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi

Şekil 3.7’de *p*-nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi verilmiştir. Bu çalışmada optimum sıcaklık 20 °C ile 50 °C arasında değişen değerlerde sıcaklıklar uygulanarak belirlenmiştir. Şekilde görüldüğü gibi optimum sıcaklık doğal lipaz ve mimik lipaz için yaklaşık 40 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 3.7. *p*-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi

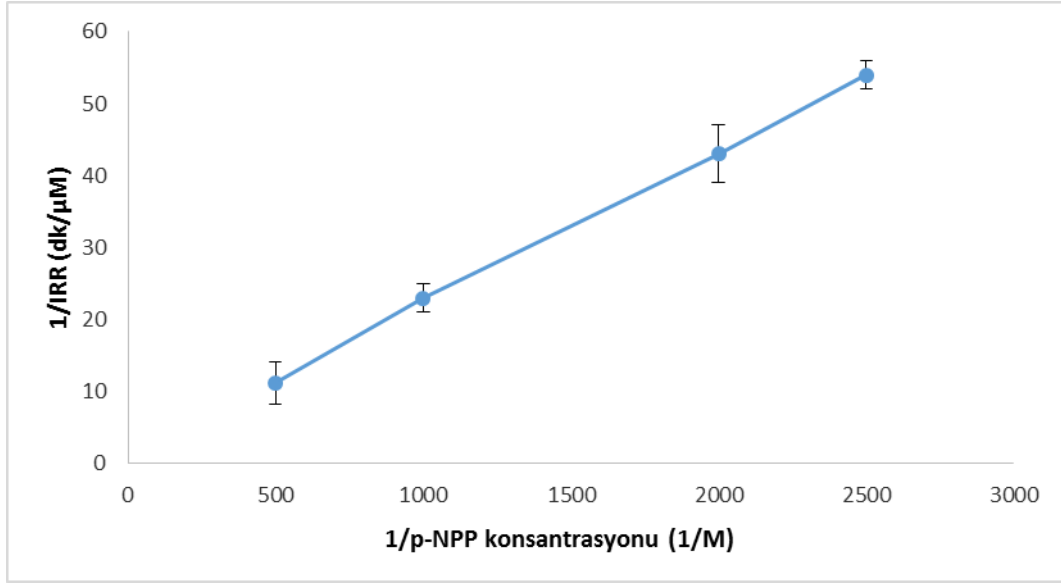
Literatüre Narwal ve arkadaşları tarafından rapor edilen bir çalışmada (Narwal ve ark. 2014), silika yüzeyine lipaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan lipaz-immobilize silika partiküllerin p-nitrofenil palmitat hidrolizinde etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, serbest ve immobilize lipaz pH 8,0'de ve 40 °C 'de maksimum hidrolitik aktivite göstermiştir.

3.2.3. Enzim kinetiği

Literatürde yer alan birçok çalışmada lipazın Michealis-Menten enzim kinetiği ile uyumlu olduğu belirtilmiştir (Gui ve ark. 1991; Malcata ve ark. 1992). Michealis-Menten enzim kinetiği aşağıda verilen eşitlik ile tanımlanır.

$$V = V_{\max} \cdot S / (K_m + S) \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte, V reaksiyonun başlangıç hızını, $V_{\max}$ reaksiyonun maksimum hızını ve S substrat konsantrasyonunu ifade eder. K_m ise enzimin substrata karşı olan afinitesini gösterir. K_m değeri ne kadar düşük ise substrata karşı olan afinite o kadar yüksektir. Hazırlanan lipaz benzeri moleküler baskılanmış mikrokürelerin p-nitrofenil palmitat hidrolizindeki enzim kinetiğinin belirlenmesi için Michealis-Menten modeli uygulanmıştır. Bu amaçla, substrat konsantrasyonu 2 mM ile 20 mM arasında değişen oranlarda p-nitrofenil palmitat hazırlanmıştır. Her bir substrat konsantrasyonunda hidroliz reaksiyonuna ait başlangıç reaksiyon hızları (IRR) belirlenmiştir. Daha sonra substrat konsantrasyonun tersine ($1/M_{\text{substrat}}$) karşı $1/IRR$ değerleri grafiğe geçirelerek Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiği'nin eğim ve kesiminden faydalanılarak lipaz benzeri *p*-nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda K_m değeri 1,40 mM V_{max} değeri ise 0,68 mMdk⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Literatürde yer alan bir çalışmada, Öztürk ve arkadaşları (Öztürk ve ark 2007) metakriloilamido fenilalanin (MAPA) monomeri kullanarak hazırladıkları nanokürelere lipaz adsorpsiyonu çalışmışlardır. Çalışmalarında serbest lipaz ve immobilize lipazın K_m değerleri sırası ile 4,6 mM ve 8,0 mM olarak bulunmuştur.

Narwal ve arkadaşlarının (Narwal ve ark. 2014) çalışmalarında silika partikülleri yüzeyine çapraz bağlayıcı glutaraldehit varlığında lipaz immobilize edilmiştir. Serbest lipazın K_m değeri 0,13 mM iken lipaz-immobilize silika partiküllerin K_m değeri ise 0,349 mM olarak bulunmuştur.

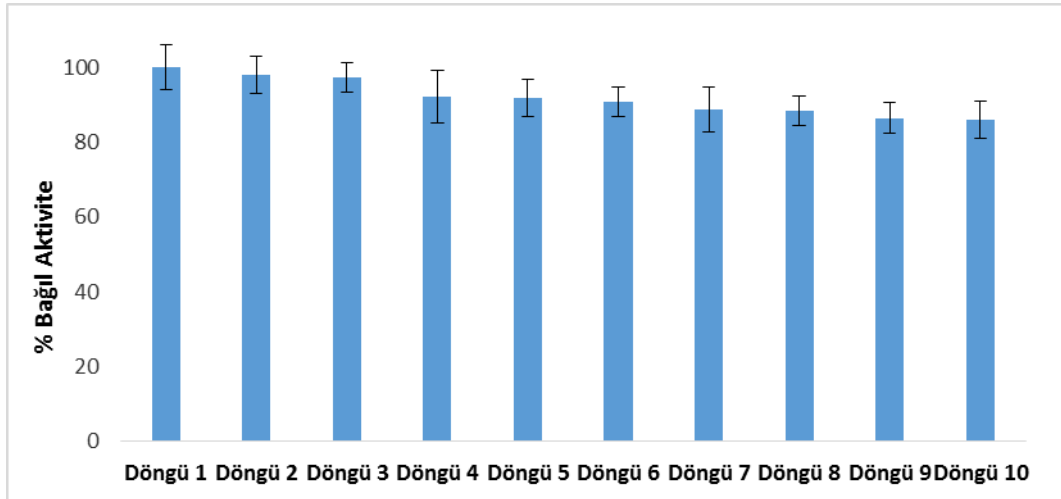
Uygun ve arkadaşlarının (Uygun ve ark 2010) literatüre rapor ettikleri çalışmada ise lipaz adsorpsiyonu için poli(hidroksimetakrilat-ko-metakriloilamido triptofan) nanoküreleri hazırlanmıştır. Enzim kinetiği çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre serbest lipazın K_m değeri 10,34 mM iken immobilize lipazın K_m değeri ise 16,26 mM olarak bulunmuştur.

Lipaz immobilizasyonuna yönelik başka bir çalışmada ise polivinil alkol-aljinat (PVA-Alj) ve polietilenoksit/aljinat (PEO-Alj) nanofiberler Doğaç ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır (Doğaç ve ark. 2011). Serbest lipaz, PVA-Alj'ye immobilize

lipaz ve PEO-Alj'ye immobilize lipazın K_m değerleri sırası ile 0,114 mM, 0,191 mM ve 0,191 mM olarak bulunmuştur.

3.2.4. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği

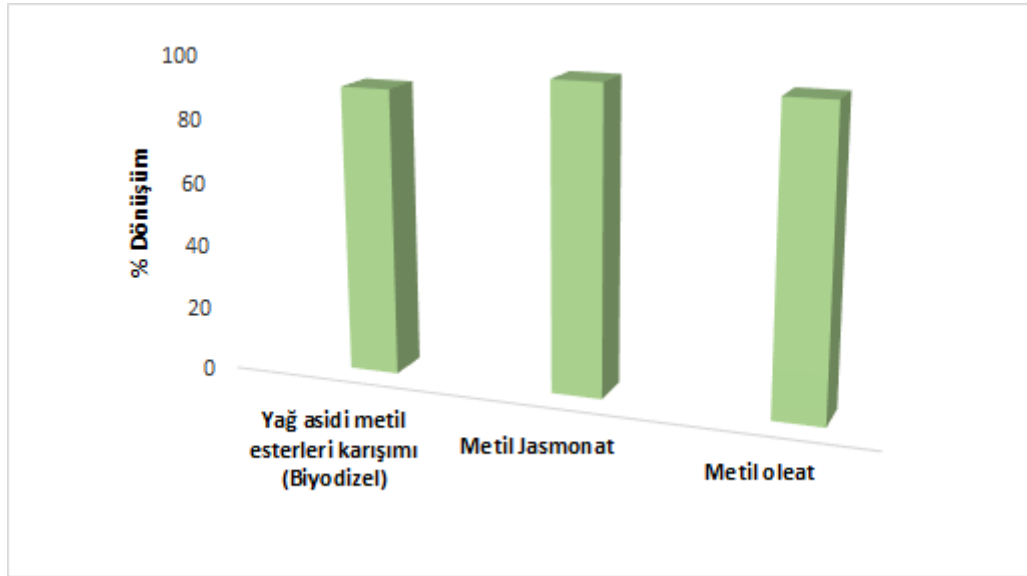
MIP-temelli yapay enzimlerde aranılan en önemli özelliklerden birisi de, hazırlanan malzemelerin hedeflenen kataliz reaksiyonlarında defalarca kullanılabilmesidir. Tekrar kullanılabilirlik veya rejenerasyon olarak da ifade edilen bu özellik sonucunda aynı malzeme çok kez kullanılarak katalitik prosesin maliyeti önemli ölçüde düşürülür. Hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla aynı polimer p-nitrofenil palmitat hidrolizi reaksiyonunda 10 defa ardarda kullanılmıştır. Her işlem sonrası polimer 1 M NaOH, distile su ve daha sonra fosfat pH 8,0 tamponu ile yıkanmıştır. Şekil 3.9'da p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, 10 kez tekrarlanan p-nitrofenil palmitat hidroliz reaksiyonu sonrasında p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin hidrolitik aktivite performansında önemli ölçüde bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 3.9. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği

3.2.5. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı

p-Nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler Ayçiçek yağı kullanılarak biyodizel sentezinde, jasmonik asit kullanılarak metil jasmonat sentezinde ve oleik asit kullanılarak metil oleat sentezinde katalizör olarak kullanılmıştır. Esterifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen dönüşümler Şekil 3.11’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi hazırlanan lipaz benzeri p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler esterifikasyon reaksiyonlarında oldukça yüksek katalitik performans sergilemiştir. Elde edilen sonuçlara göre dönüşümler biyodizel, metil jasmonat ve metil oleat için sırasıyla % 90, % 96 ve % 94 olarak bulunmuştur.



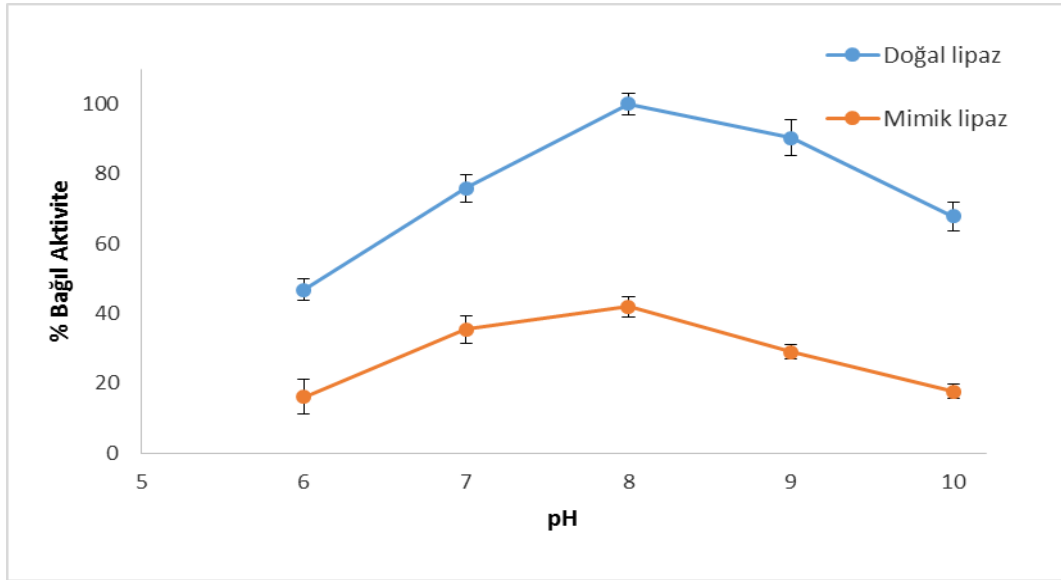
Şekil 3.10. Transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler

Tez çalışmasının bu aşaması MIP temelli yapay lipaz geliştirilmesi açısından bir ilktir ve grubumuz tarafından *Polymer* dergisinde yayınlamıştır (Keçili ve ark. 2012).

3.3. Moleküler Baskılanmış Manyetik Nanopartiküllerin p-Nitrofenil Palmitat Hidrolizinde Kullanımı

3.3.1. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi

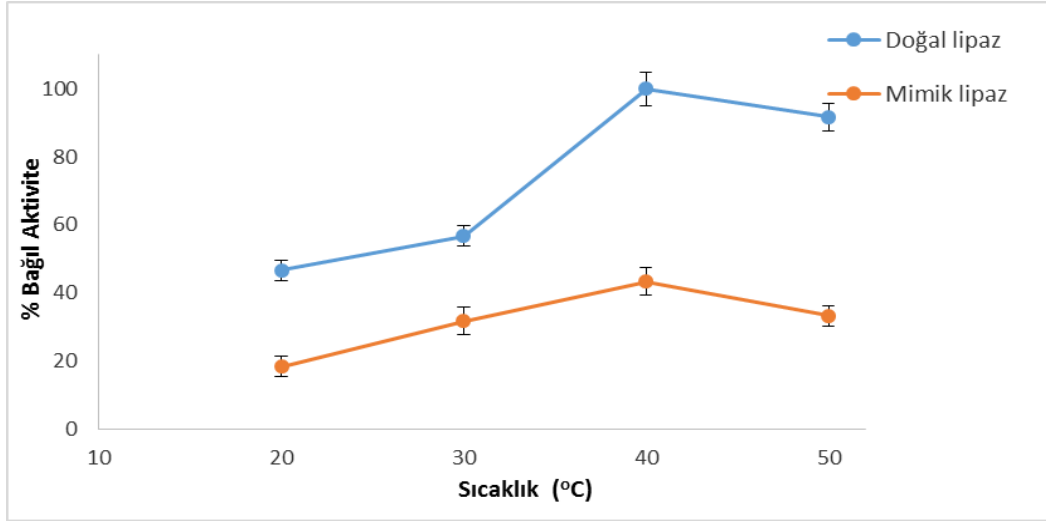
Moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküllerin p-nitrofenil palmitat hidrolizinde etkinliğini araştırmak için ortam pH'ı fosfat tamponu (0,1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) kullanılarak 6,0 ve 10,0 arasında değiştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.11'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, maksimum hidrolitik aktivite hem doğal lipaz hem de lipaz benzeri p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküller için pH 8,0 değerinde bulunmuştur.



Şekil 3.11. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi

3.3.2. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi

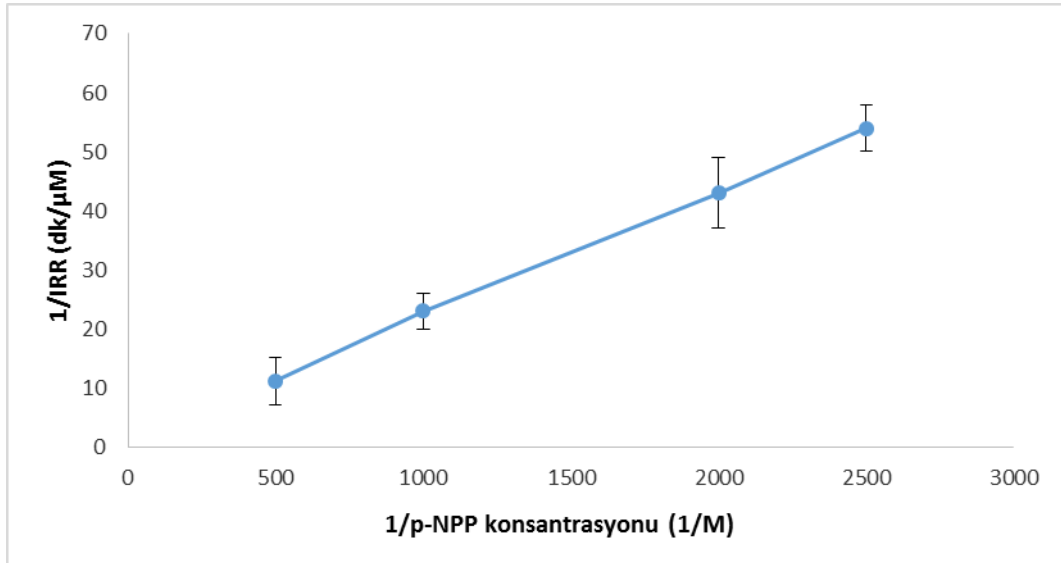
Şekil 3.13'de ise p-nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi verilmiştir. Lipaz aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla, ortam sıcaklığı 20 °C ile 50 °C arasında değişen değerlerde tutulmuştur ve optimum sıcaklık belirlenmiştir. Şekil 3.12'de görüldüğü gibi doğal lipaz ve lipaz benzeri p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküller kullanılarak p-nitrofenil palmitat hidrolizi reaksiyonu sonunda maksimum ürün (p-nitrofenol) oluşumu yaklaşık 40 °C'de gerçekleşmiştir.



Şekil 3.12. *p*-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi

3.3.3. Enzim kinetiği

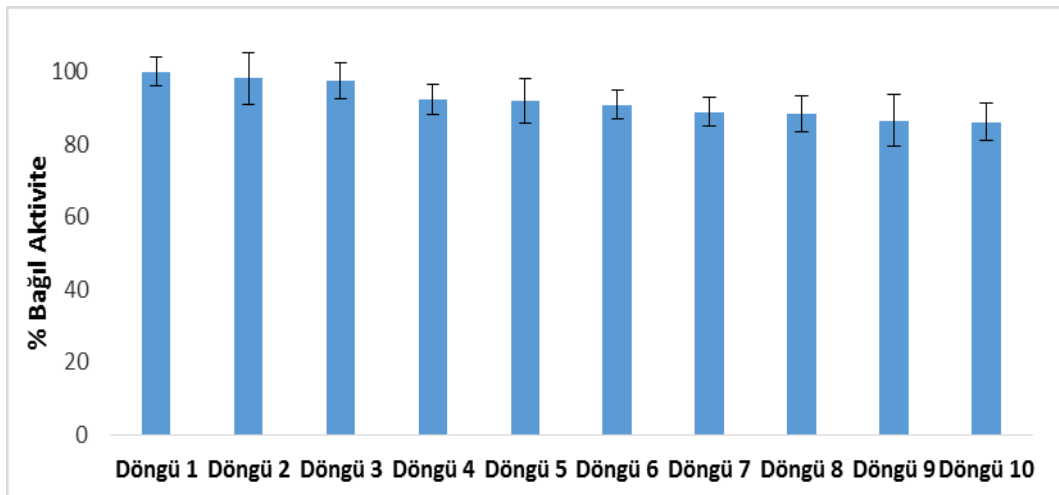
Hazırlanan lipaz benzeri moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküllerin *p*-nitrofenil palmitat hidrolizindeki enzim kinetiğinin belirlenmesi için Michealis-Menten modeli uygulanmıştır. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküller için Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.13'te verilmiştir. Kinetik verilerden elde edilen sonuçlara göre K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 0,96 mM ve 1,02 mMdk⁻¹ olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.13. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküller için Lineweaver-Burk grafiği

3.3.4. Moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği

Hazırlanan lipaz benzeri MIP temelli manyetik nanopartiküllerin en önemli özelliklerinden birisi de katalizlenen reaksiyonda defalarca kullanılabilmeye olanak sağlamasıdır. Hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin p-nitrofenil palmitat hidrolizindeki tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla aynı nanopartiküller 10 defa ardarda kullanılmıştır. Her döngü sonrası nanopartiküller 1 M NaOH, distile su ve daha sonra fosfat pH 8,0 tamponu ile yıkanmıştır. Şekil 3.14’de p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği yönelik deneylerden elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, 10 kez tekrarlanan p-nitrofenil palmitat hidroliz reaksiyonu sonrasında p-nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin p-nitrofenil palmitat’a karşı hidrolitik aktivite performansında kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.



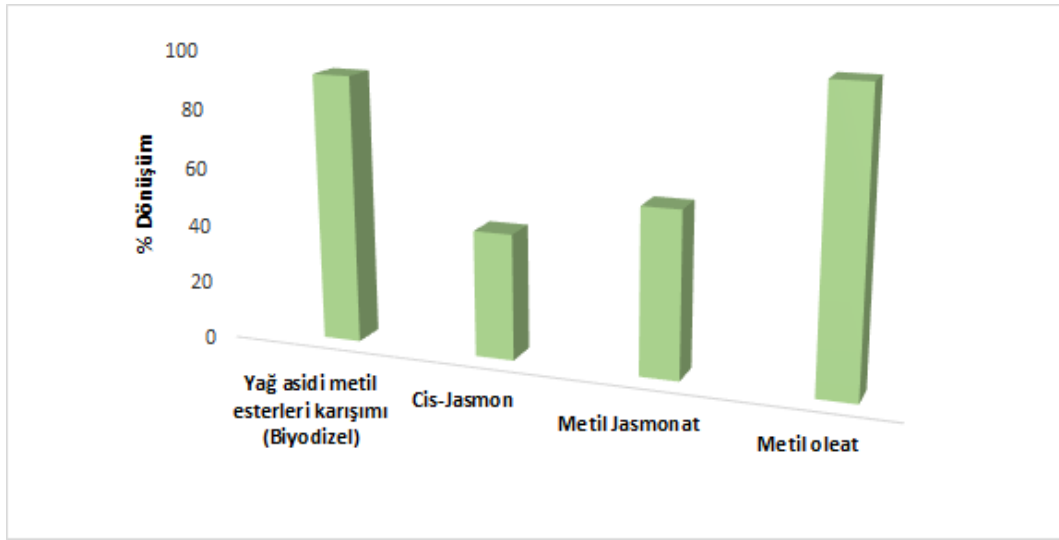
Şekil 3.14. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği

3.3.5. Moleküler baskılanmış manyetik nanopartiküllerin transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı

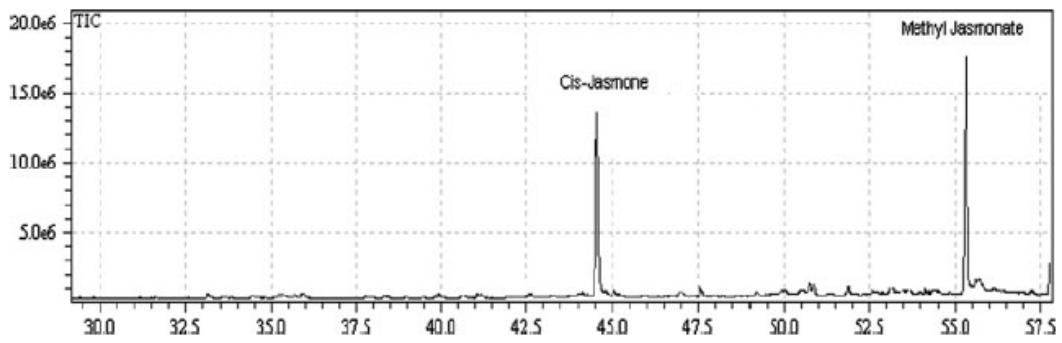
p-Nitrofenil palmitat baskılanmış manyetik nanopartiküllerin esterifikasyon reaksiyonlarındaki kullanılabilirliğini araştırmak için ayçiçek yağı, jasmonik asit ve oleik asitin metanol varlığında esterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ayçiçek yağının metanol varlığında % 92’sinin biyodizele,

jasmonik asit ve oleik asitin tamamının esterifikasyon reaksiyonu sonucunda ürünlere (% 43,29 cis-jasmon & % 56,71 metil jasmonat ve % 100 metil oleat) dönüştüğü görülmüştür (Şekil 3.15). Tez çalışmasının bu aşaması 2011 yılında grubumuz tarafından *Journal of Nanoparticle Research* dergisinde yayınlanmıştır (Keçili ve ark. 2011).

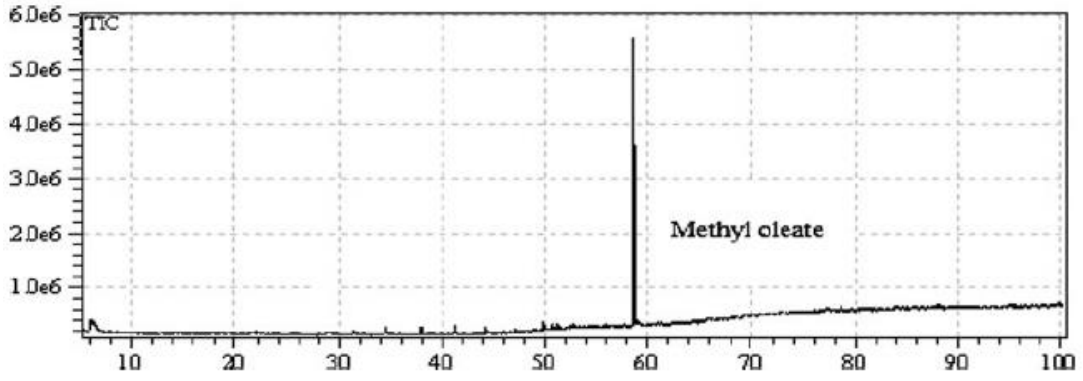
Şekil 3.16 ve 3.17’de jasmonik asit ve oleik asit esterifikasyonu sonrası oluşan ürünlere ait GC-MS kromatogramları verilmiştir.



Şekil 3.15. Transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler



Şekil 3.16. Jasmonik asit'in esterifikasyon reaksiyonu sonunda oluşan ürünlere ait GC-MS kromatogramı

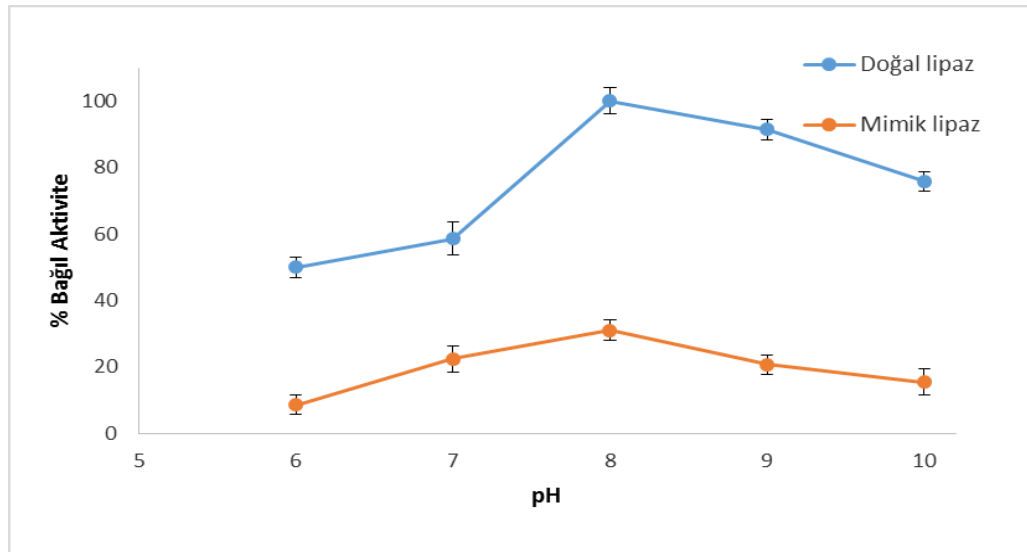


Şekil 3.17. Oleik asit'in esterifikasyon reaksiyonu sonunda oluşan ürüne ait GC-MS kromatogramı

3.4. Moleküler Baskılanmış Polimer-Kil Nanokompozitlerin p-Nitrofenil Palmitat Hidrolizinde Kullanımı

3.4.1. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi

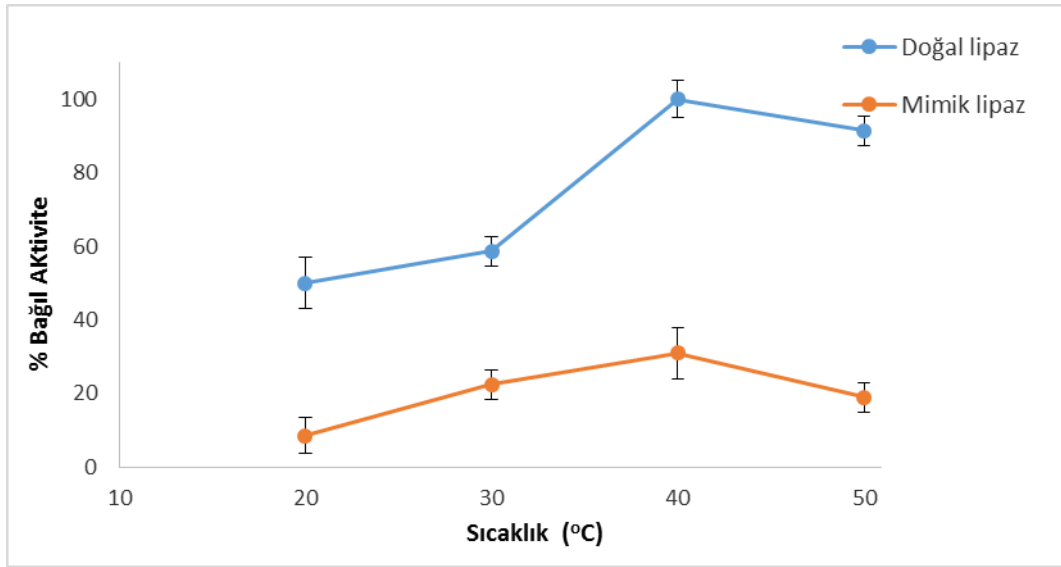
Moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitleri kullanılarak p-nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisini araştırmak amacıyla ortam pH'ı fosfat tamponu kullanılarak (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) 6,0 ve 10,0 aralığında değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.18'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, doğal lipaz ve p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitleri pH 8,0'de maksimum aktivite göstermiştir.



Şekil 3.18. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine pH etkisi

3.4.2. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi

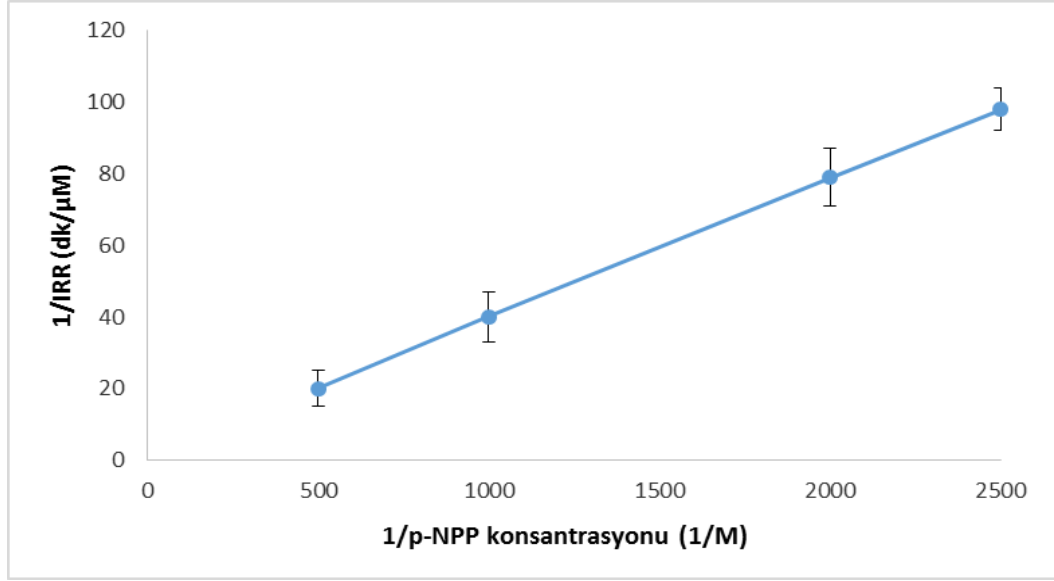
Moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitleri kullanılarak p-nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla reaksiyon ortamı sıcaklığı 20 °C ile 50 °C arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.19’da p-nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi verilmiştir. Şekil 3.17’den de görüldüğü gibi maksimum hidrolitik aktivitenin gözlemlendiği optimum sıcaklık doğal lipaz ve lipaz benzeri p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitleri için yaklaşık 40 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 3.19. p-Nitrofenil palmitat hidrolizine sıcaklık etkisi

3.4.3. Enzim kinetiği

Hazırlanan lipaz benzeri moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin p-nitrofenil palmitat hidrolizindeki enzim kinetiğinin belirlenmesi için Michealis-Menten modeli uygulanmıştır. p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitler için Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.20’de verilmiştir. Kinetik verilerden elde edilen sonuçlara göre K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 2,04 mM ve 0,48 mMdk⁻¹ olarak belirlenmiştir.

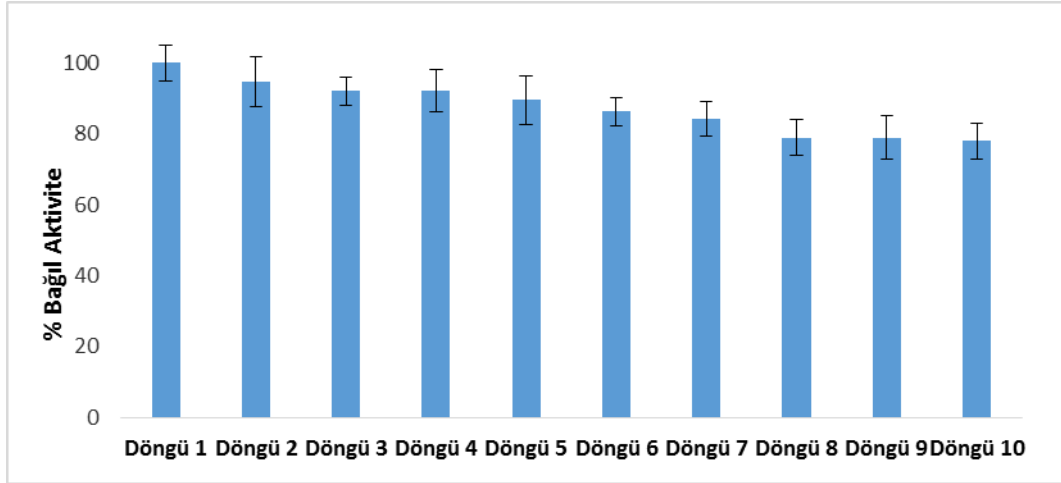


Şekil 3.20. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitler için Lineweaver-Burk grafiği

Literatürde yer alan bir çalışmada, Aghababaie ve arkadaşları (Aghababaie ve ark. 2016) lipazın kovalent immobilizasyonu için Fe₃O₄ ve SiO₂ nanopartikülleri modifiye edilmiş nanokompozit membranlar hazırlamıştır. Elde edilen sonuçlar immobilize lipazın substrata karşı olan afinitesinin serbest lipaza göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Serbest lipaz ve immobilize lipazın K_m değerleri sırası ile 0,213 mM ve 0,111 mM olarak bulunmuştur.

3.4.4. Moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin tekrar kullanılabilirliği

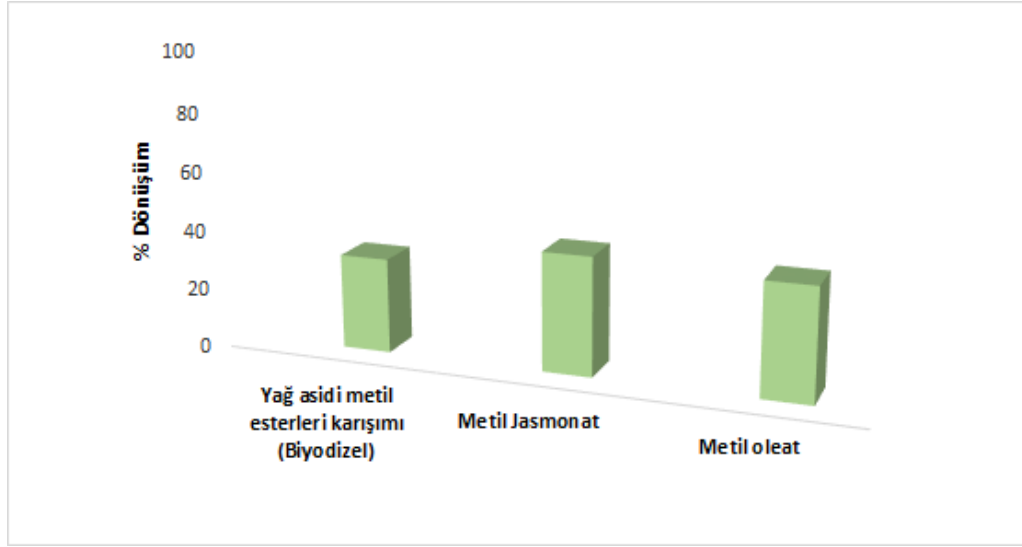
p-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin *p*-nitrofenil palmitat hidrolizi reaksiyonunda tekrar kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla aynı malzeme hidrolizi reaksiyonunda 10 defa ardarda kullanılmıştır. Her döngü sonrası polimer-kil nanokompoziti 1 M NaOH, distile su ve daha sonra pH 8,0 fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Şekil 3.21’de *p*-nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin tekrar kullanılabilirliği yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, 10 kez tekrarlanan *p*-nitrofenil palmitat hidroliz reaksiyonu sonrasında *p*-nitrofenil palmitat baskılanmış nanokompozitlerin hidrolitik aktivite performansında önemli ölçüde bir kayıp gözlenmemiştir.



Şekil 3.21. *p*-Nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin tekrar kullanılabilirliği

3.4.5. Moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı

Şekil 3.22’de lipaz benzeri moleküler baskılanmış polimer-kil nanokompozitlerin katalizlediği transesterifikasyon reaksiyonlarından elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, esterifikasyon reaksiyonları sonucunda ayçiçek yağının biyodizele dönüşümü % 32, jasmonik asidin metil jasmonata dönüşümü % 40, oleik asitin metil oleata dönüşümü ise % 38 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değerlerin *p*-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler ve manyetik nanopartiküllere kıyasla düşük olmasının nedeninin hedef molekülerin killerin nanotabakalarında bulunan bağlanma bölgelerine zor ulaşması ve etkin bir bağlanma sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 3.22. *Transesterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler*

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışma mikro ve nano yüzeylerde lipaz enziminin aktif bölgesinin taklit edilmesi için yeni nesil moleküler tanımlama teknolojilerinin geliştirilmesine yöneliktir. Gerçekleştirilen çalışmada, doğal enzimiyle yarışabilir düzeyde aktif bölgelere sahip lipaz benzeri mikro ve nano yapılar geliştirilerek biyodizel üretiminde ve diğer esterifikasyon ürünlerinin üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tez çalışması kapsamında p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler, manyetik nanopartiküller ve polimer-kil nanokompozitler olmak üzere üç farklı mikro ve nano-mimik enzim platformu hazırlanmıştır.

Hazırlanan mikro ve nano mimik enzim platformlarının p-nitrofenil palmitat hidrolizinde kullanılabilirlikleri kesikli sistemde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan yapay enzim sistemlerinin tamamı pH 8’de ve 40 °C’de substrat p-nitrofenil palmitata karşı maksimum hidrolitik aktivite göstermiştir. Ayrıca, hazırlanan p-nitrofenil palmitat baskılanmış mikroküreler ve manyetik nanopartiküller esterifikasyon reaksiyonlarında oldukça yüksek katalitik performans sergilemiştir. Diğer taraftan p-nitrofenil palmitat baskılanmış polimer-kil nanokompozitler, mikroküreler ve manyetik nanopartiküllere kıyasla daha düşük hidrolitik aktivite göstermiştir. Bunun nedeninin hedef molekülün killerin nanotabakalarında bulunan bağlanma bölgelerine zor ulaşması ve etkin bir bağlanma sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında geliştirilen lipaz benzeri mikro ve nano platformlar farklı enzimatik reaksiyonlarda (hidroliz, transesterifikasyon vb) uygulamaları ve tekrar tekrar kullanılabilme özelliğine sahip yapay enzim sistemleri olmaları açılarından literatürde bir ilktir.

KAYNAKÇA

- Aghababaie, M., Beheshti, M., Razmjou, A. and Bordbar, A.K. (2016). Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on a novel functionalized Fe₃O₄@SiO₂ dip-coated nanocomposite membrane, *Food Bioprod. Process*, 100, 351-360.
- Alexander, C., Davidson, L. and Hayes, W. (2003). Imprinted Polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis, *Tetrahedron*, 59, 2025-2057.
- Arshady, R. and Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Makromol. Chem.* 182, 687-692.
- Asahara, H., Iwamoto, T., Kida, T. and Akashi, M. (2013). Unique catalytic effect of a cyclodextrin host on photodimerization of coumarin in nonpolar solvents, *Tetrahedron Lett.*, 54, 688-691.
- Beach, J.V. and Shea, K.J. (1994). Designed catalysts. A synthetic network polymer that catalyses the dehydrofluorination of 4-fluoro-4(p-nitrophenyl) butan-2-one, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 379-380.
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srivinas, R. and Krishna, S.H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, *Trends Biotechnol.*, 20 (10), 433-437.
- Breslow, R. and Fang, Z. (2002). Hydroxylation of steroids with an artificial P-450 catalyst bearing synthetic cyclophanes as binding groups, *Tetrahedron Lett.*, 43, 5197-5200.
- Breslow, R. and Nesnas, N. (1999). Burst kinetics and turnover in an esterase mimic, *Tetrahedron Lett.*, 40, 3335-3338.
- Carboni, D., Flavin, K., Servant, A., Gouverneur, V. and Resmini M. (2008). The first example of molecularly imprinted nanogels with aldolase type I activity, *Chem. Eur. J.*, 14, 7059-7065.
- Chapuis, F., Pichon, V. and Hennion, M.C. (2004). Molecularly imprinted polymers: Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials, *LC.GC Europe*, 17 (7), 408-417.

- Chen, W., Han, D.K., Ahn, K.D. and Kim, J.M. (2002). Molecularly imprinted polymers having amidine and imidazole functional groups as an enzyme-mimetic catalyst for ester hydrolysis, *Macromol. Res.*, 10, 122-126.
- Chen, Z., Wang, M., Fu, Y., Yu, H. and Di, D. (2012). Preparation of quercetin molecularly imprinted polymers, *Des. Monomers Polym.*, 15, 93–111.
- Chen, Z. Hua, Z. Wang, J., Guan, Y., Zhao, M. and Li, Y. (2007). Molecularly imprinted soluble nanogels as a peroxidase-like catalyst in the oxidation reaction of homovanillic acid under aqueous conditions, *Appl. Catal. A*, 328, 252-258.
- Cheong, W.J., Yang, S.H. and Ali, F. (2013). Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews, *J. Sep. Sci.*, 36, 609–628.
- Cormack, P.A.G. and Elorza A.Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *J. Chrom. B*, 804, 173-182.
- Desai, P.D. , Dave, A.M. and Devi, S. (2004). Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic System, *J. Mol. Catal B: Enzym.*, 31: 143-150
- Desper, J.M. and Breslow. R. (1994). Catalysis of an intramolecular aldol condensation by imidazole-bearing cyclodextrins, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 12081-12082.
- Doğaç, Y., Deveci, İ., Mercimek, B. and Teke, M. (2017). A comparative study for lipase immobilization onto alginate based composite electrospun nanofibers with effective and enhanced stability, *Int. J. Biol. Macromol.*, 96, 302-311.
- Emgenbroich, M. ve Wulff, G. (2003), *A new enzyme model for enantioselective esterases based on molecularly imprinted polymers*. *Chem. Eur. J.*, 9, 4106-4117.
- Erdem, M., Say, R., Ersöz, A., Denizli, A. ve Türk, H. (2010), *Imprinted polymer/organo-smectite nanocomposites for paraoxon hydrolysis*, *App. Clay Sci.*, 47, 223-228.
- Erdem, M., Say, R., Ersöz, A., Denizli, A. and Türk, H. (2010). Biomimicking, metal-chelating and surface-imprinted polymers for the degradation of pesticides, *React. Funct. Polym.*, 70, 238-243.
- Ersöz, A., Emir Diltemiz, S., Atılır Özcan, A., Denizli, A. and Say, R. (2009). 8-OHdG sensing with MIP based solid phase extraction and QCM technique, *Sens. Act. B*, 137, 7-11.
- Gordon, E.M. and Kerwin, J.F. (1998). Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery, *John Wiley & Sons*

- Guerreiro, J.R.L., Freitas, V. and Sales, M.G.F. (2011). New sensing materials of molecularly-imprinted polymers for the selective recognition of chlortetracycline, *Microchem J.*, 97, 173-181.
- Guo, Y., Yang, Y., Zhang, L. and Guo, T.Y. (2011). Core/shell molecular imprinting microparticles prepared using RAFT technology for degradation of paraoxon, *Macromol. Res.*, 19, 1202-1209.
- Guo, Y. and Guo, T. (2013). A dual-template imprinted capsule with remarkably enhanced catalytic activity for pesticide degradation and elimination simultaneously, *Chem. Commun.*, 49, 1073-1075.
- Guo, Y., Wang, R., Chi, W., Liu, S., Shi, H., and Guo, T. (2014). One-step synthesis of reactant-product-dual-template imprinted capsules as phosphotriesterase mimetic enzymes for pesticide elimination, *Chem. Commun.*, 4, 7881-7884.
- Gübitz, M. and Paulo, A.C. (2003). New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers, *Curr Opin Biotechnol*, 14, 577-582.
- Hall, A.J., Emgenbroich, M. and Sellergren, B. (2005). Imprinted polymers. *Top Curr. Chem.*, 249, 317-349.
- Hsu, A.F., Jones, K., Foglia T.A. and Marmer, W.N. (2002). Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel, *Biotechnol. Appl. Biochem*, 36, 181-186.
- Ibrahim, A.S.S., Al-Salamah, A., El-Toni, A.M., El-Tayeb, M.A. and Elbadawi, Y.B. (2014). Cyclodextrin glucanotransferase immobilization onto functionalized magnetic double mesoporous core-shell silica nanospheres, *Electron. J. Biotechnol.*, 17, 55-64.
- Ikeda, H., Horimoto, Y., Nakata, M. and Ueno, A. (2000). Artificial holoenzymes for benzoin condensation using thiazolio-appended β -cyclodextrin dimers, *Tetrahedron Lett.*, 41, 6483-6487.
- Karmalkar, R.N., Kulkarni, M.G. and Mashelkar, R.A. (1996). Molecularly imprinted hydrogels exhibit chymotrypsin-like activity, *Macromolecules*, 29, 1366-1368.
- Kawanami, Y., Yunoki, T., Nakamura, A., Fujii, K., Umano, K., Yamauchi, H. ve Masuda, K. (1999). Imprinted polymer catalysts for the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate, *J. Mol. Catal. A.*, 145, 107-110.

- Keçili, R. Özcan, A. Ersöz, A. Hür, D. Denizli, A. and Say, R. (2011). Superparamagnetic nanotraps containing MIP based mimic lipase for biotransformations uses, *J. Nanopart. Res.*, 13, 2073-2079.
- Keçili, R., Say, R., Ersöz, A., Hür, D. and Denizli, A. (2012). Investigation of synthetic lipase and its use in transesterification reactions, *Polymer*, 53, 1981-1984.
- Kim, J.M., Ahn, K.D. and Wulff, G. (2001). Cholesterol esterase activity of a molecularly imprinted polymer, *Macromol. Chem. Phys.*, 202, 1105-1108.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. and Asanuma, H. (2003). Molecular imprinting from fundamentals to applications, *John Wiley & Sons*
- Knežević, Z., Šiler-Marinković, S. and Mojović, L. (1998). Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil in lecithin/isooctane reversed micelles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49 (3), 267–271.
- Kupai, J., Razali, M., Büyüktiryaki, S., Keçili, R. and Szekely, G. (2017). Long-term stability and reusability of molecularly imprinted polymers, *Polym. Chem.*, 8(4), 666-673.
- Kryscioa, D.R. and Peppas, N.A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomater.*, 8, 461–473.
- Lai, E.P.C. and Feng, S.Y. (2003). Molecularly imprinted solid phase extraction for rapid screening of metformin, *Microchem J.*, 75, 159-168.
- Lele, B.S., Kulkarni, M.G. and Mashelkar, R.A. (1999). Molecularly imprinted polymer mimics of chymotrypsin-1. Cooperative effects and substrate specificity, *React. Funct. Polym.*, 39, 37-52.
- Lele, B.S., Kulkarni, M.G. and Mashelkar, R.A. (1999). Productive and nonproductive substrate binding in enzyme mimics, *Polymer*, 40, 4063-4070.
- Leonhardt, A. and Mosbach, K. (1987). Enzyme-mimicking polymers exhibiting specific substrate binding and catalytic functions, *React. Polym.*, 6, 285-290.
- Li, S., Ge, Y., Tiwari, A., Wang, S., Turner A.P.F. and Piletsky, S.A. (2011). ‘On/off’-switchable catalysis by a smart enzyme-like imprinted polymer, *J. Catal.*, 278, 173-180.
- Li, M.Y. and Wang X.D. (2014). The influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the enantioselective hydrolysis of 2-amino phenylpropionitrile catalyzed by recombinant nitrilase, *Bioresour. Bioprocessing*. 1, 1-6.

- Lindbäck, E., Zhou, Y., Pedersen, C.M. and Bols, M. (2012). Artificial enzymes based on cyclodextrins with phenol as the catalytic active group, *Tetrahedron Lett.*, 53, 5023-5026.
- Liu, J.Q. and Wulff, G. (2004). Functional mimicry of the active site of carboxypeptidase a by a molecular imprinting strategy: cooperativity of an amidinium and a copper ion in a transition-state imprinted cavity giving rise to high catalytic activity, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 7452-7453.
- Liu, X.C. and Mosbach, K. (1998). Catalysis of benzisoxazole isomerization by molecularly imprinted polymers, *Macromol. Rapid Commun.*, 19, 671-674.
- Lortie, R. (1997). Enzyme catalyzed esterification, *Biotechnol. Adv.*, 15 (1), 1-15.
- Markowitz, M.A., Kust, P.R., Deng, G., Schoen, P.E., Dordick, J.S., Clark, D.S. and Gaber, B.P. (2000). Catalytic silica particles via templated-directed molecular imprinting, *Langmuir*, 16, 1759-1765.
- Massolini, G. (2003). Lipases for biocatalysis: development of a chromatographic bioreactor, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32, 715-724.
- Matsui, J., Nicholls, I.A., Karube, I. and Mosbach, K. (1996). Carbon-carbon bond formation using substrate selective catalytic polymers prepared by molecular imprinting: An artificial class II aldolase, *J. Org. Chem.*, 61, 5414-5417.
- Motherwell, W.B. Bingham, M.J. and Six, Y. (2001). Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes, *Tetrahedron*, 57, 4663-4686.
- Müller, R., Andersson, L.I. and Mosbach, K. (1993). Molecularly imprinted polymers facilitating a β -elimination reaction, *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, 14, 637-641.
- Nakajima, H., Sakabe, Y., Ikeda, H. and Ueno, A. (2004). Cyclodextrin trimers as receptors for arranging ester and catalyst at optimized location to achieve enhancement of hydrolytic activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1783-1786.
- Nassimbeni, L. (2000). Useful techniques in host-guest chemistry, *Supramol. Chem.*, 12, 161-167.
- Ohkubo, K., Urata, Y., Hirota, S., Funakoshi, Y. Sagawa, T., Usui, S. and Yoshigana, K. (1995). Catalytic activities of novel L-histidyl group-introduced polymers imprinted by a transition state analogue in the hydrolysis of amino acid esters, *J. Mol. Catal. A.*, 101, L111- L114.

- Ohkubo, K., Funakoshi, Y. and Sagawa, T. (1996). Catalytic activity of a novel water-soluble cross-linked polymer imprinted by a transition-state analogue for the stereoselective hydrolysis of enantiomeric amino acid esters, *Polymer*, 37, 3993-3995.
- Ohkubo, K., Sawakuma, K. and Sagawa T. (2001). Shape- and stereo-selective esterase activities of cross-linked polymers imprinted with a transition-state analogue for the hydrolysis of amino acid esters, *J. Mol. Catal. A.*, 165, 1-7.
- Ohkubo, K., Sawakuma, K. and Sagawa T. (2001). Influence of cross-linking monomer and hydrophobic styrene comonomer on stereoselective esterase activities of polymer catalyst imprinted with a transition-state analogue for hydrolysis of amino acid esters, *Polymer*, 42, 2263-2266.
- Pasetto, P., Maddock, S.C. and Resmini, M. (2005). Synthesis and characterization of molecularly imprinted catalytic microgels for carbonate hydrolysis, *Anal. Chim. Acta*, 542, 66-75.
- Piletsky, S. and Turner, A. (2006). Molecular imprinting of polymers, *Landes Bioscience*
- Poma, A., Turner, A. P.F. and Piletsky, S.A. (2010). Advances in the manufacture of MIP Nanoparticles, *Trends Biotechnol.*, 28, 629-637.
- Rasor, J.P. and Voss, E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry, *Appl. Catalysis A: General*, 221 (1-2), 145–158.
- Sagawa, T., Togo K., Miyahara, C., Ihara, H. and Ohkubo, K. (2004). Rate-enhancement of hydrolysis of long-chain amino acid ester by cross-linked polymers imprinted with a transition-state analogue: evaluation of imprinting effect in kinetic analysis, *Anal. Chim. Acta*, 504, 37-41.
- Sellergren, B. (2001). Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry: Techniques and instrumentation in analytical chemistry, *Elsevier Science*
- Sellergren, B. and Shea, K.J. (1994). Enantioselective ester hydrolysis catalyzed by imprinted polymers, *Tetrahedron: Asymmetry*, 5, 1403-1406.
- Sembdner, G and Parthier, B. (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44, 569-589.

- Seven, F. and Şahiner, N. (2013). Metal ion-imprinted hydrogel with magnetic properties and enhanced catalytic performances in hydrolysis of NaBH_4 and NH_3BH_3 , *Int. J. Hydrogen Energ.*, 38, 15275-15284.
- Siler-Marinković, S., Mojović, L., Knežević, Z. and Antonović, N. (1995). Enzymatic production of monoacylglycerol in microemulsion, *J. Serb. Chem.Soc.*, 60 (7), 567-574.
- Strikovsky, A.G., Kasper, D., Grün, M., Green, B.S., Hradil, J. and Wulff, G. (2000). Catalytic molecularly imprinted polymers using conventional bulk polymerization or suspension polymerization: Selective hydrolysis of diphenyl carbonate and diphenyl carbamate, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 6295-6296.
- Tanaka, F. (2002). Catalytic antibodies as designer proteases and esterases, *Chem. Rev.*, 102, 4885-4906.
- Tang, S.P., Chen, S., Wu, G.F., Chen, H.Y., Mao, Z.W. and Ji, L.N. (2011). Ester catalytic hydrolysis by a tridentate $\text{N}_3\text{N}'\text{N}''$ -copper bridged cyclodextrin dimer, *Inorg. Chem. Commun.*, 14, 184-188.
- Tong, K. Xiao, S., Li, S. and Wang, J. (2008). Molecular recognition and catalysis by molecularly imprinted polymer catalysts: thermodynamic and kinetic surveys on the specific behaviors, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 18, 426-433.
- Toorisaka, E. Uezu, K. Goto, M. and Furusaki, S. (2003). A molecularly imprinted polymer that shows enzymatic activity, *Biochem. Eng. J.*, 14, 85-91.
- Tsutsumi, H., Hamasaki, K., Mihara, H. and Ueno, A. (2000). Cyclodextrin-peptide hybrid as a hydrolytic catalyst having multiple functional groups, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 741-743.
- Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S. and Mele, G. (2011). Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 5908–5945.
- Wackerlig, J. and Schirhagl, R. (2016). Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: A Review, *Anal. Chem.*, 88 (1), 250–261.

- Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E. Villar, P. E. and Vulfson, N. (1995). A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (27), 7105-7111.
- Wilson, S.R. and Czarnik, A.W. (1997). Combinatorial chemistry: Synthesis and application, *John Wiley & Sons*
- Voet, D. and Voet, J.G. (1995). Biochemistry, *John Wiley & Sons*
- Volkman, A. and Brüggemann O. (2006). Catalysis of an ester hydrolysis applying molecularly imprinted polymer shells based on an immobilized chiral template, *React. Funct. Polym.*, 66, 1725-1733.
- Wulff, G. and Sarhan, A. (1972). Über die anwendung von enzymanalog gebauten polymeren zur racemattrennung, *Angew. Chem.*, 84, 364-365.
- Wulff, G., Sarhan, A. and Zabrocki, K. (1973). Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Lett.* 44, 4329-4332.
- Wulff, G., Vesper, R., Grobe-Einsler, R. and Sarhan, A. (1977). Enzyme-analogue built polymers, On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates, *Makromol. Chem.* 178, 2799-2816.
- Wulff, G. and Schauhoff, S. (1991). Enzyme-analog-built polymers. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements, *J. Org. Chem.*, 56, 395-400.
- Wulff, G. (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates-A way towards artificial antibodies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34, 1812-1832.
- Wulff, G. and Biffis A. (2001). Molecular imprinting with covalent or stoichiometric non-covalent interactions. In Sellergren B. (ed.), *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry, Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier
- Yilmaz, E., Ramström, O., Möller, P., Sanchez, D. and Mosbach, K. (2002). A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates, *J.Mater. Chem.* 12, 1577-1581.

- Yu, S., Huang, X., Miao, L., Zhu, J., Yin, Y., Luo, Q., Xu, J., Shen, J. and Liu, J. (2010). A supramolecular bifunctional artificial enzyme with superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, *Bioorg. Chem.*, 38, 159-164.
- Zaks, A. and Dodds, D.R. (1997). Application of biocatalysts and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals, *Drug Discov Today*, 2 (12), 513–531.
- Zhou, Y., Lindbäck, E. Pedersen, C.M. and Bols, M. (2014). Cyclodextrin based artificial oxidases with high rate accelerations and selectivity, *Tetrahedron Lett.*, 55, 2304-2307.