

136272

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROCION BROWN MX5-BR VE PROCION GREEN H-4G BAĞLI pHEMA
SORBENTLERİNİN LİZOZİM ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASINDA
KULLANILMASI VE SAFLIK DERESESİNİN YBSK'DE TAYİNİ

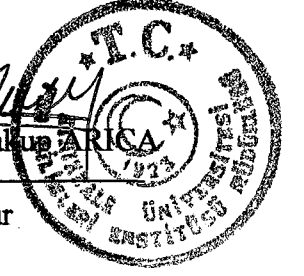
MELTEM YILMAZ

ŞUBAT 2003

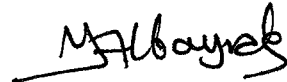
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

Prof. Dr. M. Yakup ARICA
Müdür



Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.


Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.


Prof. Dr. M. Yakup ARICA

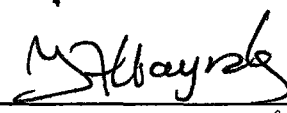
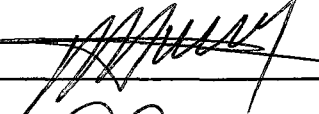
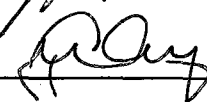
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Yrd. Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

ÖZET

PROCION BROWN MX5-BR VE PROCION GREEN H-4G BAĞLI pHEMA SORBENTLERİNİN LİZOZİM ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILMASI VE SAFLIK DEREJESİNİN YBSK'DE TAYİNİ

YILMAZ, Meltem

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

ŞUBAT 2003, 86 sayfa

Bu çalışmada, yumurta beyazından doğrudan lizozim enziminin saflaştırılması için, yeni bir boya ligand afinite kromatografisi yöntemi geliştirildi. Destek materyali olarak, pHEMA membranları kullanıldı. pHEMA destek materyali, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinden, α - α '-azoizobütironitril (AIBN) başlatıcısı varlığında, azot ortamında, UV ışığında fotopolimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. Boya ligand olarak, reaktif triazin grubu bir boya olan Procion Brown MX-5BR (Reactive Brown 10) ve Procion Green H-4G (Reactive Green 5) reaktif boyaları, alkali ortamda nükleofilik yer değiştirme reaksiyonuyla, pHEMA üzerine kovalent olarak bağlandı ve afinite sorbent olarak, lizozim enziminin saflaştırılmasında kullanıldı. Kesikli sistemde bu afinite adsorbentleri üzerine farklı pH'larda farklı miktarda lizozim içeren sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu

davranışı incelendi. Lizozimin afinite adsorbentlerine adsorpsiyonu için optimal pH değeri, 4,0-8,5 değerleri arasında araştırıldı. Sıcaklık ve iyonik şiddetin, adsorbentlerin, adsorpsiyon kapasiteleri üzerindeki etkisi belirlendi. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarının lizozimi adsorpsiyon kapasitesi, sırasıyla 60,56 ve 80,21 mg/ml olarak belirlendi. pHEMA membranının lizozim adsorpsiyon kapasitesi 1,87 mg/ml olarak bulundu. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligandı immobilize edilmiş pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunun, pHEMA membranlarından, sırasıyla, yaklaşık 32,4 ve 42,9 kat fazla olduğu görüldü. Lizozim adsorpsiyonu için optimum pH değerinin 7,0 olduğu gözlemlendi. Yumurta beyazından doğrudan lizozim enziminin saflaştırılması sonuçları YBSK ile tayin edildi. Procion Brown 10 ve Reactive Green 5 ligandı bağlı membranların, lizozim enziminin yumurta akından saflaştırılmasında kullanılmasından sonra, lizozim enziminin 0,5 M NaCl ile elüsyonları yapıldı. Lizozimin yumurta akından saflaştırma oranı, Reactive Brown 10 bağlı sorbentler için %63,4 ve Reactive Green 5 bağlı sorbentler için %77,2 olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler : Boya-ligand, Yumurta beyazı, pHEMA, Membran, Lizozim

ABSTRACT

THE USE OF PROCION BROWN MX5-BR AND PROCION GREEN H-4G
IMMOBILIZED pHEMA SORBENTS IN THE PURIFICATION OF THE
LYSOZYME ENZYME AND DETERMINATION OF PURITY DEGREE OF THE
LYSOZYME BY HPLC

YILMAZ, Meltem

Kırıkkale University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

FEBRUARY 2003, 86 pages

In this study, for direct purification of lysozyme enzyme from egg white, a new dye ligand affinity chromatography method was developed. pHEMA membranes were used as support material. It was prepared from 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) via UV initiated photo-polymerization, in the presence of an initiator α - α' -azoisobutyronitrile (AIBN) in the nitrogen atmosphere. Procion Brown MX-5BR (Reactive Brown 10) and Procion Green H-4G (Reactive Green 5) which are reactive triazine dyes, were covalently attached onto pHEMA membrane by nucleophilic substitution reaction in the base medium and were used in the purification of lysozyme enzyme as affinity sorbents. Behaviour of lysozyme adsorption onto these affinity adsorbents, from aqueous solutions containing

different amounts of lysozyme at different pH, was investigated in a batch system. The optimal pH values for adsorption of lysozyme on the affinity adsorbents, were investigated in the pH range of 4,0-8,5. The effects of temperature and ionic strength, on the adsorption capacities of the adsorbents, were determined. The lysozyme adsorption capacities of the Reactive Brown 10 and Reactive Green 5 immobilized pHEMA membranes, were found as 60,56 and 80,21 mg/ml, respectively. The adsorption of the lysozyme on the plain pHEMA membrane, was found as 1,87 mg/ml. Lysozyme adsorptions of Reactive Brown 10 and Reactive Green 5 dye ligands immobilized pHEMA membranes, were greater than the lysozyme adsorption of plain pHEMA membranes about 32,4 and 42,9 times, respectively. The optimum pH value of the lysozyme adsorption, was observed as pH 7,0. The results of direct lysozyme enzyme purification from egg white were determined by HPLC. After usage of Reactive Brown 10 and Reactive Green 5 immobilized membranes in the purification of the lysozyme enzyme from the egg white, lysozyme enzyme was eluted by 0,5 M NaCl solution. The removal ratios for the Reactive Brown 10 and Reactive Green 5 immobilized sorbents, were 63,4% and 77,2%, respectively.

Keywords: Dye-ligand, Egg white, pHEMA, Membrane, Lysozyme

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana yol gösteren, değerli Hocam Sayın Prof. Dr. M. Yakup ARICA'ya, teşekkür ederim.

Araştırmanın bütün deneysel çalışma, ölçüm ve değerlendirme aşamalarında, bilgi, emek ve zamanı ile beni destekleyen Sayın Yard. Doç. Gülay BAYRAMOĞLU'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda bana yardımcı olan Arş. Gör. Bülent KAYA'ya ve Arş. Gör. Emine YALÇIN'a teşekkür ederim.

Maddî ve manevî desteklerinden dolayı, Annem Melek YILMAZ, Babam Yaşar YILMAZ ve Kardeşim Kayıhan İlter YILMAZ'a teşekkür ederim.

Meltem YILMAZ

Kırıkkale, Şubat 2003

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Adsorpsiyon kromatografisinin çalışma prensibi	7
Şekil 1.2. Afinite kromatografisinde bağlanma ve elüsyon işlemleri.....	13
Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin çalışma prensibi	14
Şekil 1.4. Bazı Reactive boya moleküllerinin yapıları	18
Şekil 1.5. Boya ligandın destek materyali üzerine bağlanması.....	23
Şekil 1.6. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı uzatıcı moleküllerin yapıları ...	24
Şekil 1.7. Triazin boyaların matrikse bağlanması	25
Şekil 1.8. Reactive Brown 10 boyasının yapısı	29
Şekil 1.9. Reactive Green 5 boyasının yapısı.....	29
Şekil 1.10. Lizozimin üç boyutlu yapısı	31
Şekil 1.11. Lizozimin hidroliz aktivitesi.....	32
Şekil 3.1. pHEMA membranlarının su içeriği	45
Şekil 3.2. pHEMA membranlarının yüzeyinin SEM fotoğrafı	47
Şekil 3.3. pHEMA membranlarının yan yüzeyinin SEM fotoğrafı	47
Şekil 3.4. Reactive Brown 10 boyası bağlı sorbentler için FTIR spektrumu	48
Şekil 3.5. Reactive Green 5 boyası bağlı sorbentler için FTIR spektrumu	49
Şekil 3.6. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligand bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi.....	50
Şekil 3.7. Reactive Brown 10 boya ligandı bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisi	52

Şekil 3.8. Reactive Green 5 boya ligandı bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisi	52
Şekil 3.9. Reactive Brown 10 boya ligandı bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda iyonik şiddet etkisi.....	53
Şekil 3.10. Reactive Green 5 boya ligandı bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda iyonik şiddet etkisi.....	53
Şekil 3.11. Reactive Brown 10 bağlı pHEMA membranlarının adsorpsiyon hızı.....	55
Şekil 3.12. Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarının adsorpsiyon hızı.....	56
Şekil 3.13. Boya ligand bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonuna başlangıç lizozim derişiminin etkisi.....	56
Şekil 3.14. Freundlich izoterm modelinin sorbentlerle elde edilen deney sonuçlarına uygulması.....	58
Şekil 3.15. Temkin adsorpsiyon izoterm modelinin sorbentlerle elde edilen deney sonuçlarına uygulması.....	58
Şekil 3.16. Reactive Brown 10 bağlı pHEMA membranları için çizilen ($\ln K - 1/T$) grafiği.....	59
Şekil 3.17. Farklı sıcaklıklarda elde edilen adsorpsiyon kapasitelerinin $\log C'$ 'ye göre değişimleri.....	60
Şekil 3.18. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranları için birinci derece kinetiği.....	62
Şekil 3.19. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarına lizozim adsorpsiyonunun ikinci derece kinetiğine uygulanması.....	63

Şekil 3.20. Boya ligand bağlı membranlara adsorplanan lizozimin desorpsiyonu.....	65
Şekil 3.21. Sorbentlerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde adsorpsiyon kapasitesindeki değişim.....	66
Şekil 3.22. Standart 1 mg/ml lizozim solüsyonunun kromatogramı.....	69
Şekil 3.23. %50 oranında fosfat tamponuyla seyreltilmiş yumurta beyazının kromatogramı.....	70
Şekil 3.24. Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarından lizozimin elüsyonunun kromatogramı.....	71



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması	6
Çizelge 1.2. Afinite desteklerine ligand bağlanması için kullanılan ajanlar	22
Çizelge 3.1. Freundlich adsorpsiyon izoterm modelinin sabiteleri.....	59
Çizelge 3.2. Temkin adsorpsiyon izoterm modelinin dört farklı sıcaklık için hesaplanan adsorpsiyon kapasiteleri ve Temkin parametreleri	61
Çizelge 3.3. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunun birinci ve ikinci derece kinetik sabiteleri.....	64
Çizelge 3.4. Yumurta beyazından doğrudan lizozim adsorpsiyon deneyi sonuçları.....	72
Çizelge 3.5. Yumurta beyazından doğrudan lizozim adsorpsiyon deneyinde desorpsiyon sonuçları.....	73

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Kromatografi.....	3
1.1.1. Kromatografinin Tanımı	3
1.1.2. Kromatografinin Tarihsel Gelişimi	4
1.1.3. Kromatografik Ayrılma Prensibi.....	4
1.1.4. Kromatografik Tekniklerin Sınıflandırılması	5
1.2. Adsorpsiyon Kromatografisi	7
1.2.1. Adsorpsiyon Terminolojisi	8
1.2.2. Adsorpsiyon Prensipleri.....	8
1.2.3. Adsorplayıcı Katılar.....	9
1.2.4. Adsorpsiyon İzotermi	10
1.2.4.1. Langmuir Denklemi	10
1.2.4.2. Freundlich Denklemi.....	11
1.2.4.3. Temkin Denklemi	12
1.3. Afinite Kromatografisi	12

1.3.1. Afinite Kromatografisinin Prensipleri	14
1.3.2. Ligand	15
1.3.3. Matriks	16
1.4. Boya Ligand Afinite Kromatografisi	17
1.4.1. Boya Ligand	18
1.4.2. Matriks	19
1.4.3. Boyanın Membrana Tutuklanması	20
1.4.4. Boyanın Proteine Bağlanması	25
1.4.5. pHEMA Membranın Özellikleri.....	28
1.5. Lizozim	30
1.5.1. Lizozimin Fonksiyonu	31
1.5.2. Lizozimin Kullanım Alanları	33
2. MATERYAL ve YÖNTEM	34
2.1. Materyaller	34
2.1.1. Kimyasal Malzemeler	34
2.1.2. Cihazlar	34
2.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre.....	34
2.1.2.2. FTIR Spektrofotometre	34
2.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	35
2.1.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK).....	35
2.1.2.5. Kullanılan Diğer Cihazlar.....	35
2.2. Yöntem	36
2.2.1. pHEMA Membranın Sentezi.....	36
2.2.2. pHEMA Membranlarına Boya Ligandın Tutuklanması	36
2.2.3. Membranların Karakterizasyonu	37

2.2.3.1. Membranların Su İçeriği.....	37
2.2.3.2. Membranların Kalınlığı.....	37
2.2.3.3. Membranların SEM Yüzey Analizleri	37
2.2.3.4. Membranların Elemental Analizi.....	38
2.2.3.5. Membranların FTIR Spektrası.....	38
2.2.4. Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları.....	38
2.2.4.1. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi.....	38
2.2.4.1.1. pH Etkisi	39
2.2.4.1.2. Sıcaklık Etkisi	39
2.2.4.1.3. İyonik Şiddet Etkisi	39
2.2.4.1.4. Adsorpsiyon İzotermi	40
2.2.4.1.5. Adsorpsiyon Kinetikleri.....	41
2.2.4.1.6. Lizozimin Desorpsiyonu.....	42
2.2.4.1.7. Tekrar Kullanılabilirlik Deneyleri.....	43
2.2.4.2. Yumurta Beyazından Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi...	43
2.2.4.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Çalışmaları.....	44
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
3.1. Boya Ligand Bağlı Membranların Özellikleri	45
3.1.1. pHEMA Membranlarının Denge Su İçeriği.....	45
3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu İle Yüzey Analizleri.....	46
3.1.3. Elemental Analiz	46
3.1.4. FTIR Spektrası	46
3.2. Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyonu	50
3.2.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH Etkisi	50
3.2.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi.....	51

3.2.3. Lizozim Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi	51
3.2.4. Adsorpsiyon Hızı.....	53
3.2.5. Adsorpsiyon İzotermi	54
3.2.6. Adsorpsiyon Kinetikleri.....	62
3.2.7. Lizozimin Desorpsiyonu.....	65
3.2.8. Tekrar Kullanılabilirlik	66
3.3. Yumurta Akından Lizozim Adsorpsiyonu	67
3.3.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Çalışmaları	67
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
KAYNAKLAR	80



1. GİRİŞ

Son yirmi yıl içinde, besin kimyası, klinik kimya, biyokimya, farmosotik kimya, nöroloji, molekül biyoloji ve çevre kimyası ile ilgili problemlerin çözümünde, küçük miktarlardaki analitlerin hızlı, tekrarlanabilir ve doğru analiz edilebilmesi gereğinin artması, kromatografik tekniklere, klinik laboratuvarlarda geniş bir kullanım alanı sağlamıştır.

Bu bağlamda afinite kromatografisi, çok çeşitli biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Yaklaşık otuz yıldan beri bir biyolojik ligand için, bazı proteinlerin spesifik afinite gösterdiği bilinmektedir. Proteinlerin kromatografik yolla ayrıştırılması için, bazı kriterlerin yerine getirilmesi ile bu spesifik afinite işletilmiştir.

Afinite kromatografisi yönteminin temel prensipleri, spesifik tanıma kapasitesine sahip bir ligand molekülünün, bir destek materyalinin üzerine tutuklanmasından sonra, ligand ile biyolojik molekül arasında oertaya çıkan kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanır. Uygun şartlar altında, hedef biyolojik molekül adsorpsiyon ortamından, matrikse tutuklanmış ligand tarafından adsorplanır. Bu işlem, sürekli veya kesikli sistemlerde, hedef molekül içeren ortamın, matrikse tutuklanmış ligandla teması ile sağlanır. Daha sonra adsorplanan molekül, farklı pH, iyonik güç veya uygun spesifik elüentler kullanılarak, biyolojik molekül ve ligand arasındaki kovalent olmayan ilişkinin bozulması ile desorbe edilir^(1,2).

Fonksiyonel moleküllerden enzimler, koenzimler, kofaktörler, antikorlar, amino asitler, farklı sorbentlerin hazırlanmasında çoğunlukla ligand olarak kullanılmıştır. Fakat bu ligandların kararsızlığı, yapıdan sızması, desorpsiyon koşulları ve yüksek

maliyeti gibi bazı unsurlar, farklı ligand molekülleri arayışına yol açmış ve boya-ligandları, en önemli seçeneklerden biri haline getirmiştir.

Boya-ligandlar, biyospesifik ligandlara göre bazı üstünlüklere sahiptir. Bu boya-ligandların, ucuz olması, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı kararlılığa sahip olması ve protein adsorplama kapasitelerinin yüksek olması, ligand olarak daha çok tercih edilmelerini sağlamıştır. Kolay tutuklanmaları da, boya ligandların diğer bir üstün yönüdür. Boya ligandların en önemli gruplarını oluşturan reaktif triazin boyalar, taşıdıkları klor grupları ile, matrikslerin OH gruplarına kolaylıkla bağlanırlar.

Boya ligand afinite sistemlerinde kullanılan boya ligandlar, reaktif bir gruba bağlanan bir kromofor içerirler. Kromofor grubunda bulunan sülfonik asit grupları pKa değerlerinin üzerinde negatif yüklüdürler. Boya ligandlar karboksil, amin, klorid veya metaller ile kompleks oluşturabilen gruplar içerirler. Bu ligandlar proteinlere spesifik veya non-spesifik olarak bağlanırlar. Bağlanma tipine göre farklı yöntemler kullanılarak elüsyonları yapılır⁽³⁻⁷⁾.

Destek materyalleri küresel, çubuk veya membran formunda hazırlanabilir. Membran formundaki destek materyalinin hazırlanışında, polimerin bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Polimerler doğal olabilir ya da deneye uygun özellikler kazandırılarak sentetik olarak hazırlanabilir. Sentetik bir polimer olan poli(hidroksietil metakrilat) (pHEMA), mekanik gücü yüksek, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli bir materyaldir. pHEMA'nın yüzey yapısı, gözenekli hazırlanmaya uygun olduğundan, geniş bir yüzey alanı elde etmek ve yüksek oranda ligand bağlamak mümkündür. Yüzeyinde hidroksil gruplarının bulunması, ligandların bağlanmasına olanak tanımaktadır⁽⁸⁻¹⁰⁾.

1.1. Kromatografi

Kromatografi, karışımı oluşturan maddelerin, değişik ortam ya da fazlardaki hareketlerinin farklılığından yararlanılarak, birbirlerinden ayrılmasını sağlayan analitik bir tekniktir. Bu özelliği dolayısıyla, hedef moleküllerin saflaştırılmasında ve karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kromatografik tekniklerin, analitik biyokimya, klinik biyokimya, farmosotik kimya, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında kullanım sahası çok geniştir. Kromatografi, özel olarak da, bitki kemotaksonomisinde, plasmid DNA'ya dayalı sınıflandırma çalışmalarında, alttür tespitinde, genetik uzaklıkların belirlenmesinde ve adli tıpta kullanılmaktadır⁽¹¹⁻¹⁶⁾.

1.1.1. Kromatografinin Tanımı

Kromatografi terimi, Latince renk (chromo) ve şekil, yazmak (graphy) kelimelerinden oluşmaktadır. Bu terim, bitkilerden renk pigmentlerinin ayrılması işleminden kaynaklanmıştır. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından yapılan kromatografi tanımı, kimyasal maddelerin biri durağan, diğeri ise hareketli olan iki ortam arasında dağılmaları ile gerçekleşen, fiziksel bir ayırma tekniği şeklindedir.

Kromatografi, farklı ortamlarda, maddelerin davranışlarının birbirlerinden ayrılmalarına yol açması esasına dayanır. Maddelerin dağılma oranları değişiktir. Yeni geliştirilen yöntemlerle, moleküllerin izomerleri gibi çok küçük farklılıklara dayanan ayırmalar gerçekleştirilebilmektedir. Bu ayırmalarda ölçümler, mikrogram seviyesindedir ve çok hassastır. Kromatografik tekniklerle ürün ayırımı ve ürün elde edilmesi, endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilebilir⁽¹⁷⁾.

1.1.2. Kromatografinin Tarihsel Gelişimi

Bilinen ilk kağıt kromatografisi uygulaması, Mısır'da (M.Ö. 500) boyanın papirüs üzerine damlatılmasıyla, renklerine ayrıştırılması olarak kabul edilmektedir. Biyomoleküllerin ayrımı da, oldukça eskiye dayanmaktadır. Ancak ilk yapılan ürün ayrımı için bir kayıt yoktur. Suyun, kireçli kayalardaki ve kil oranı yüksek topraklardaki davranış farkı sebebiyle, kireçli kayaların daha yüksek kalması ve suyun topraktan süzülmesi gibi doğal olaylar, kromatografik dağılıma örnektir.

Martin ve Syngge, 1941'de kromatografik kavramı, ayrılma kromatografisi (partition chromatography) teorisini yayınlamaya tanımladılar ve bu çalışmalarlarıyla Nobel Ödülü'ne lâyık bulundular. Bunu, 1944'de Consten, Gordon ve Martin tarafından filtre kağıdına uygulanan örnek üzerinden, çözgenin geçirilmesi ile bileşenlerin ayrıldığı kağıt kromatografisinin tanımlanması izler. Kromatografik çalışmalarda, 1950'lerde gaz kromatografisinin, 1960'larda, ince tabaka kromatografisinin ve 1970'lerde, örnek ve çözgenin, basınç altında adsorbanla dolu dar bir kolondan geçirildiği, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin (YBSK) gelişmesi ile hız kazanılmıştır⁽¹⁸⁾.

1.1.3. Kromatografik Ayrılma Prensibi

Karışımı oluşturan bileşenler, kromatografik sistemi oluşturan iki faz arasında dağılır ve ayrılırlar. Bu ayrım, durağan fazla, hareketli faz arasındaki dağılıma farkından kaynaklanır. Moleküllerin hareketi, hareketli fazın itici gücü ile durağan fazın alıkoyucu gücü arasındaki dengeye bağlıdır. Sıvı ya da gaz olabilen hareketli faz, molekülleri, sıvı ise çözünürlüklerine; gaz ise, uçuculuklarına bağlı olarak gelişen

afinite ile taşır. Durağan fazın alıkoyma gücü, adsorpsiyon, çözünürlük, bağlanma, iyonik etkileşim gibi etkilere dayanmaktadır.

Bileşenler, ortamlarda farklı hızlarda ilerlediklerinden, kromatografik işlemin sonunda sistemi farklı zamanlarda terk ederler. Adsorpsiyon/desorpsiyon hareketi devamlı surette tekrarlanır. Kromatografik işlem sırasında, adsorbent tarafından bileşene gösterilen afinite, bileşenin sistemden çıkış süresini etkilediğinden, ayırım gerçekleştirilmiş olur⁽¹⁹⁾.

1.1.4. Kromatografik Tekniklerin Sınıflandırılması

Kromatografi ile yapılan tüm ayırımlar, maddelerin yük, büyüklük ya da şekil ve yüzey karakteristiği gibi moleküler özelliklerine dayanır. İyon değiştirme kromatografisi proteinin yüküne dayanır. Jel filtrasyonu ya da dışlama kromatografisi proteinleri ayırmak ve saflaştırmak için proteinlerin büyüklük, moleküler ağırlık ve şekil özelliklerini kullanır. Hidrofobik artıkların sabiteleri gibi protein yüzey özellikleri, hidrofobik etkileşim kromatografisi için temel teşkil eder. Tutuklanmış metal iyon afinite kromatografisi, proteinlerin ayrılması için metal ve protein etkileşimini kullanır. Dağılma Kromatografisi ise polariteye dayanır. Afinite kromatografisi ayırımları da, proteinlerin spesifik molekül bağlanma özellikleri gibi yüzey özelliklerine dayanır⁽¹¹⁾.

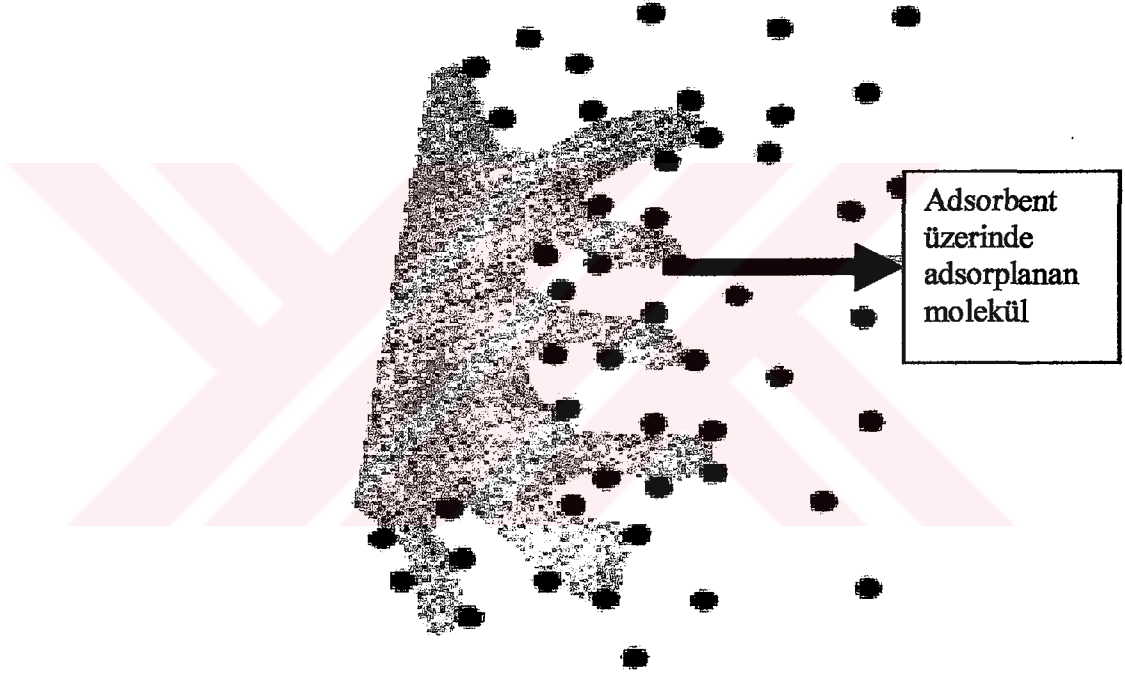
Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması, hareketli ve durağan fazların yapısı ve ayırma prensipleri dikkate alınarak, çeşitli şekillerde yapılır. Çizelge 1.1'de kromatografik sınıflandırmalar gösterilmiştir⁽¹⁸⁾.

Çizelge 1.1. Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması

Temel Prensiplere Dayalı Yöntemler	Frontal Kromatografi (FK) Yerdeğişim Kromatografisi Zonal Kromatografi (ZK)
Kromatografik Yatağın Şekline Göre Sınıflandırma	Kolon Kromatografisi (KK) Düzlemsel Kromatografi (DK)
Hareketli Fazın Fiziksel Durumuna Göre Sınıflandırma	Gaz Kromatografisi (GK) Sıvı Kromatografisi (SK) Süper Kritik Sıvı Kromatografisi
Ayrılma Mekanizmasına Göre Yapılan Sınıflandırma	Adsorpsiyon Kromatografisi Dağılma Kromatografisi (DK) İyon Değişim Kromatografisi Dışlama Kromatografisi Afinite Kromatografisi

1.1.Adsorpsiyon Kromatografisi

Bu işlemde genel olarak, katı durağan faz yüzeyine tutuklanmış, sıvı ya da gaz olabilen bir hareketli faz kullanılmaktadır. Hareketli ve durağan fazlar arasındaki denge, farklı solutların ayrımını belirler⁽²⁰⁾. Şekil 1.1’de adsorpsiyon kromatografisinin çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Adsorpsiyon kromatografisinin çalışma prensibi

1.2.1. Adsorpsiyon Terminolojisi

Atom, iyon veya moleküllerin katı yüzeylerde tutunmasına “adsorpsiyon”, tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına “desorpsiyon”, üzerinde ayrılacak bileşen ile dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı ve/veya Van der Waals etkileşimleri nedeni ile adsorpsiyonun gerçekleştiği gözenekli katıya “adsorplayıcı ya da adsorbent” ve katı yüzeyinde tutunan maddeye ise “adsorplanan” adı verilir. Bu bileşikler bir çözgen veya çözgen sistemi yardımıyla adsorban katıdan desorbe edilirler⁽²¹⁾.

1.2.2. Adsorpsiyon Prensipleri

Adsorbent ile temas ettirilen moleküller, adsorbentin bazı kimyasal gruplarıyla etkileşime girerler. Durağan fazda meydana gelen bu reaksiyonlar, dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı ve Van der Waals etkileşimleri gibi çeşitli çekim kuvvetleridir. Durağan faz, hareketli faz ile yıkandığında, adsorbe edilmeyen moleküller uzaklaşır ve böylece adsorbe edilen hedef moleküllerden ayrılırlar. Bir kez elüsyon yapıldıktan sonra, hareketli faz değiştirildiğinde bu kez moleküller yeni hareketli faza geçme eğilimi gösterirler. Tercihteki bu değişim, yeni hareketli fazın, değişmeden kalan durağan faza göre, daha çok olan çekim kuvvetinden kaynaklanır⁽²²⁾.

Adsorpsiyon olayı daima ekzotermiktir. Adsorpsiyon, moleküllerin adsorplandıkları yüzeyle etkileşim biçimine bağlı olarak, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon şeklinde ikiye ayrılır. Adsorpsiyon ısı da denilen adsorpsiyon entalpisinin -20 kJmol^{-1} civarında olduğu etkileşmeler sonunda meydana gelen tutunmalara “fiziksel adsorpsiyon” denir. Fiziksel adsorpsiyonda, adsorpsiyon kuvveti düşük olduğu için adsorpsiyon enerjisi de düşüktür, Van der Waals çekim

kuvvetleri etkindir, adsorpsiyon çok tabakalı yani multimoleküler olabilir ve tersinir olarak yürüyebilir. Adsorpsiyon enerjisi -200 kJmol^{-1} civarında olan etkileşmeler sonunda meydana gelen tutunmalara ise “kimyasal adsorpsiyon” denir. Kimyasal adsorpsiyonda moleküller adsorbent yüzeyine kovalent bağ büyüklüğündeki kuvvetlerle tutunurlar, adsorpsiyon yalnızca bir tabakalı yani monomoleküler olabilir, tersinmezdir^(18,21-23).

1.2.3. Adsorplayıcı Katılar

Metaller ve plastikler de dahil olmak üzere, bir kristal yapıya sahip olsun ya da olmasın tüm katılar, az veya çok adsorplama gücüne sahiptirler. Adsorplama gücü yüksek olan bazı katılar alumina, silika jel, aktif kömür, selüloz, nişasta, kalsiyum fosfat jeller, hidroksiapatit, sakkaroz, talk, kieselguhr, selit, killer, zeolitler ve seramikler şeklinde sıralanabilir.

Adsorplama gücü yüksek olan ideal bir adsorban, şu özelliklere sahip olmalıdır:

- a) Adsorban, hareketli fazda çözünmemelidir.
- b) Adsorban, gözenekli yapıya sahip olmalıdır. Genişliği 2 nm'den küçük olanlara mikrogözenek, 2 nm ile 50 nm arasında olanlara mezogözenek, 50 nm 'den büyük olanlara ise makrogözenek adı verilmiştir. Katının bir gramında bulunan gözeneklerin toplam hacmine “özellik gözenek hacmi”, bu gözeneklerin sahip olduğu duvarların toplam yüzeyine ise “özellik yüzey alanı” denir.
- c) Sistemdeki maddelerle kimyasal reaksiyona girmemelidir, inert olmalıdır.
- d) Parçacık büyüklükleri eşit bir dağılım göstermelidir.

e) Ayrılacak olan maddelere ve hareketli faza bağı olarak aktivitesi istenen düzeyde olmalıdır. Eğer adsorban çok aktifse, maddelerin sürüklenmesi çok yavaş olur, madde adsorban yüzeyine çok sıkıca tutunur. Az aktif adsorbanlarda ise tutunma çok zayıftır.

1.2.4. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorplayıcı ve adsorplanan yanında, sıcaklık da sabit tutulduğunda; gaz fazından adsorpsiyon, yalnızca basınca; çözülden adsorpsiyon ise, yalnızca derişime bağıdır. Bu durumda yüzeye adsorplanan madde miktarının, basınçla ya da derişimle değışimini veren çizgilere “adsorpsiyon izotermi” denir.

Deneysel yoldan elde edilen adsorpsiyon izotermelerini değerlendirebilmek için, çok sayıda teorik adsorpsiyon izoterm modeli geliştirilmiştir. Adsorplanan ve adsorplayıcı maddelerin özelliklerine göre, bir adsorpsiyon için bu eşitliklerden biri ya da birkaçı daha uygun olmaktadır.

Afinite adsorpsiyonu tek tabakalı bir adsorpsiyon işlemidir. Bunun anlamı, bütün ligand molekülleri, hedef moleküllerle birleştiğı zaman adsorpsiyon dengesine ulaşılmasıdır. Bu fenomen, Langmuir ve Freundlich eşitlikleri denen, basit adsorpsiyon dengesi ifadeleri ile açıklanabilir. Bu eşitlikler afinite sorbentlerinin adsorpsiyon kapasitelerini belirlemede kullanılırlar⁽²¹⁻²⁸⁾.

1.2.4.1. Langmuir Denklemi

Yüzey kimyası alanındaki çalışmalarından dolayı 1932 yılında Nobel Ödülü alan Amerikalı Bilim Adamı Irving Langmuir (1881-1957) tarafından 1916 yılında kimyasal adsorpsiyon için çok basit bir izoterm denklemi türetilmiştir. Tek tabakalı

fiziksel, homojen adsorpsiyon ve çözültiden adsorpsiyon için de geçerli olan bu eşitliğe “Langmuir denklemi” denir.

$$q^* = q_m C^* / (K_d + C^*) \quad (1)$$

Yukarıdaki eşitlik ile verilen Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde; q_m , membranın maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g katı); C^* , sulu ortamdaki solut konsantrasyonunu (mg/ml); q^* , membrana dengede adsorplanan solut miktarını (mg/g katı); ve K_d ise ayrılma sabitesini (mg/ml) göstermektedir.

Langmuir adsorpsiyon kuramında, katı yüzeyinin her noktasının aynı özellikte olduğu, adsorbe olan moleküllerin katı yüzeyini monomoleküler (tek molekül kalınlığında) örttüğü, katı yüzeyinde kapatılmamış bölgeler bulunabileceği varsayılır. Langmuir modeli, eşit olarak ulaşılabilir adsorpsiyon yerleri, tek tabakalı yüzey kaplaması ve adsorbe edilen türle etkileşim olmaması gibi, homojen yüzey adsorpsiyonuna dayanır^(21,22,28,29).

1.2.4.2. Freundlich Denklemi

Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich (1880-1941) tarafından, heterojen adsorpsiyonlar için, Langmuir denkleminde türetilen, Freundlich adsorpsiyon izotermi kullanılır.

$$q = K_F (C)^n \quad (2)$$

Burada q , dengedeki adsorbe edilen solut derişimini (mg/g katı); C^* , dengedeki sulu ortamdaki solut derişimini (mg/ml); K_F ve n , sistemin karakteristiği olan Freundlich sabiteleridir. K_F , Freundlich izoterm modelindeki kapasite parametresi

(mg/g katı); n, Freundlich izoterm modelindeki adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren üssel parametredir.

Freundlich eşitliği, bir proteinin, bir adsorbent üzerindeki bir yere bağlanmasının adsorpsiyon enerjisinin, komşu yerlerin zaten işgal edilip edilmemesine bağlı oluşunu belirten deneysel bir bağıntıdır. Freundlich modelinin bir sınırlaması, solüsyondaki solutun konsantrasyonu ile tanımlanmadan adsorbe edilen solutun miktarının artmasıdır. log C'ye karşı log q grafiği, çizildiğinde, kayma değeri K_F ve eğim de n'dir^(21,28,29).

1.2.4.3. Temkin Denklemi

Heterojen adsorpsiyonlar için türetilen bir diğer adsorpsiyon izoterm modeli de Temkin adsorpsiyon izotermidir. Temkin denklemi, kimyasal adsorpsiyon için türetilmiştir ve aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$q = q_T \ln (1 + K_T C) \quad (3)$$

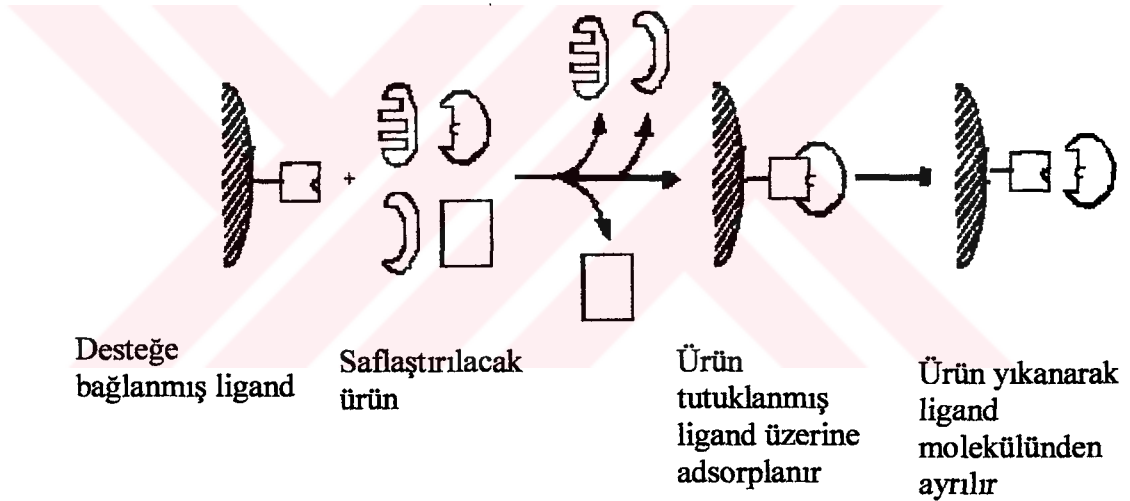
Burada q_T , protein adsorpsiyonu için, bağlanma enerjisi başına yüzey kapasitesi, K_T , denge bağlanma sabitesi ve C ise, denge derişimidir⁽²¹⁾.

1.3. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, hâlen makromoleküllerin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrımı için oluşturulmuş en iyi metottur ve yüksek özgün moleküler tanımayaya dayanır. Bu yöntemde, Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi, özgün tanıma yeteneğine sahip olan bir molekül (ligand ya da bağlayıcı) uygun, çözünmeyen, genellikle polimerik malzemeden, küresel ya da membran formunda olan bir destek (matriks ya da

taşıyıcı) üzerine tutuklanır. İzole edilecek olan molekül, analit ya da hedef olarak isimlendirilir. Hedef molekülü içeren çözeltinin, kromatografik kolondan uygun şartlar altında geçirilmesi ile hedef moleküller, matriks üzerine tutuklanmış olan, tamamlayıcı ligand tarafından, seçici olarak yakalanır ve adsorbe edilir⁽²⁸⁾.

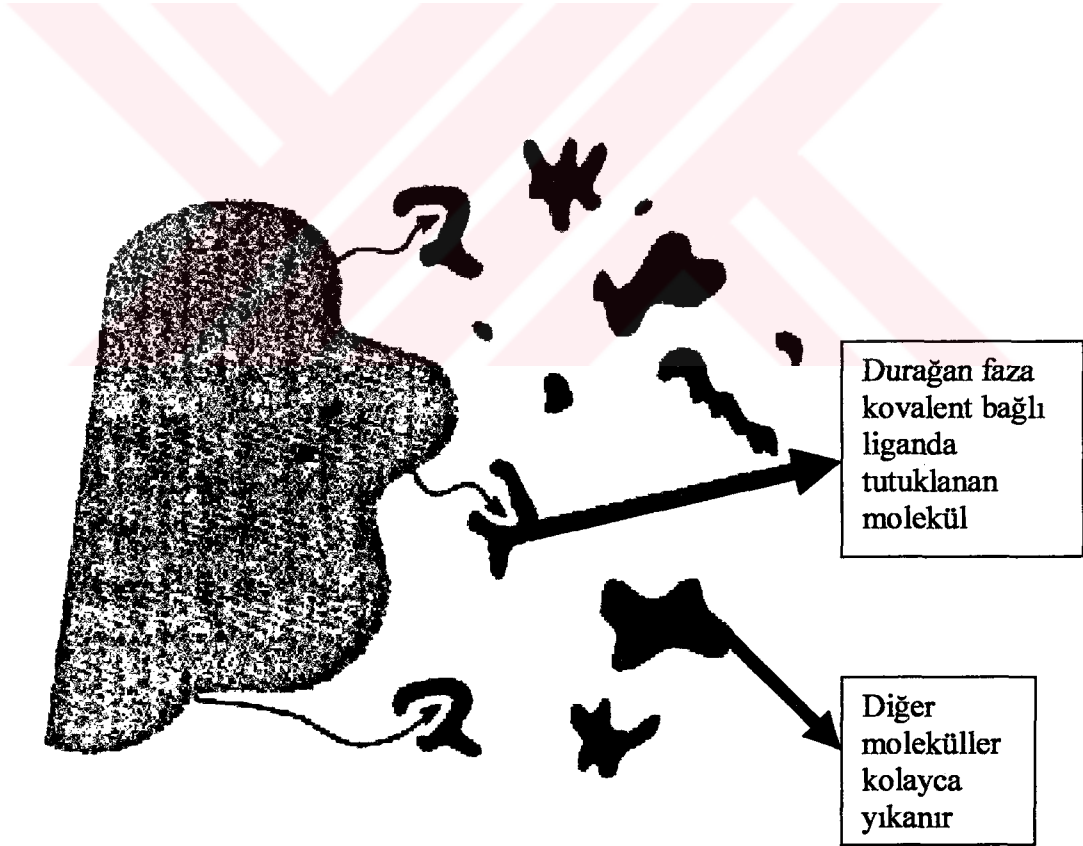
Cuatrecasas ve arkadaşları, çok sayıda değişik makromolekülü (protein, RNA, DNA, bakteri, virus ve çeşitli hücreler) afinite kromatografisi yöntemi ile ayırdılar ve saflaştırdılar⁽³²⁻³⁶⁾.



Şekil 1.2. Afinite kromatografisinde bağlanma ve elüsyon işlemleri

1.3.1. Afinite Kromatografisinin Prensipleri

Afinite kromatografisi çalıştırılan kromatografik yöntemlerden en seçicisidir. Spesifik etkileşim, durağan faza tutuklanmış ligand molekülüyle, solut arasında gerçekleşir. Örneğin immobilize edilmiş molekül belli bir protein için özel koenzim, inhibitör veya antibadi olabilir. Bir protein karışımı içeren solüsyon, bu molekül ile temas ettirilince sadece liganda özel olan protein tutuklanır. Bu protein iyonik şiddetin veya pH'ın değişimi ile daha sonra ekstrakte edilir. Şekil 1.3.'de afinite kromatografisinin çalışması şematize edilmiştir⁽²⁰⁾.



Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin çalışma prensibi

Spesifik etkileşimin şiddetinin çok yüksek ya da çok zayıf olmaması gerekir. Çok zayıf bir etkileşim, ligandın, hedefi etkili bir şekilde tutuklayamamasına ve özgün olmayan kontaminantların yıkama ile uzaklaştırılması sırasında, hedef molekülün de ayrılmasına sebep olur. Ancak, çok güçlü bir etkileşim de, hedef molekülün elüsyonuna izin vermeyebilir. Etkileşim, elüentlerle uygun şartlar altında elüsyonuna izin verebilmelidir.

Afinite kromatografisi, kullanılan ligandların hedef molekülle girdiği etkileşime göre, hidrofobik kromatografi, kovalent kromatografi, tutuklanmış metal şelat kromatografisi gibi gruplara ayrılır. Tekstil sanayinde kullanılan boyalar gibi doğal ligandları taklit eden sentetik moleküllerin, hedef moleküle bağlanmasına dayanan psödobiyospesifik ligand kromatografisi, klâsik afinite kromatografisinin çok ilgi gören yeni bir çeşididir⁽³¹⁻³⁷⁾.

1.3.2. Ligand

Ligandlar, monospesifik ya da grup-spesifik ligandlar olarak sınıflandırılırlar. Bazı durumlarda düşük moleküler ya da makro-moleküler ligandlar olarak da alt bölümlere ayrılırlar. Mono spesifik terimi, tek bir proteine ya da çok az sayıda proteine bağlanan ligandlar için kullanılır.

Grup spesifik terimi ise, bir çok farklı proteine bağlanma yerlerine sahip olan, kofaktör gibi ligandlar için kullanılır. Hedef enzim, genellikle NAD ya da NADP bağlayan dehidrojenazlar gibi enzimlerdir. Grup-spesifik ligandlar örnek olarak, amino asitleri ve vitaminleri içerir. Makro-moleküler grup-spesifik ligandlardan lektinler ve IgG bağlı olan proteinler önemlidir^(38,39).

Ligand, tutuklama ve elüsyon şartları altında kararlı olmalıdır. Kimyasal tutuklama işlemi için uygun fonksiyonel gruplar içermelidir. pH, iyonik şiddet ve yüksek konsantrasyondaki denatüre edici ajanlar, sıklıkla elüsyon için kullanıldıklarından, bu faktörlere direnebilmelidir⁽⁴⁰⁾.

1.3.3. Matriks

Matriks, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Matriks, hidrofilik ve nötral davranış, iyi bir kimyasal, mekanik, biyolojik kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilmeye izin vermelidir.

Protein saflaştırması için, büyük gözenekli bir matriks tercih edilir. Matriksin gözenekli bir yapıda olması, yüksek miktarda ligand tutuklanmasına olanak sağlar ve böylece hedef molekül için yüksek adsorpsiyon kapasitesi sağlanmış olur. Ligandın ve adsorbent molekülün, kolaylıkla gözenek yüzeyine bağlanması için matriksin gözenek yapısı yeterli boyutta olmalıdır.

Agaroz, gözeneklilik bakımından en çok tanınan matrikstir. Proteinlerin afinite kromatografisi için, ideal matriks özelliklerine sahiptir. Desteklerin bir sakıncası, gözeneklerin, doğal difüzyonal kütle transferine engel olmasıdır. Poliakril, polistiren ve uygun monomerlerin, özel kopolimerlerine dayanan sentetik polimerler, ligand tutuklanması için ideale yakın matrislerin gelişmesine yol açmıştır⁽⁴¹⁾.

1.4. Boya Ligand Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi tekniğinin tanıtımı, proteinlerin özel biyolojik fonksiyonlarının saflaştırma için ilk kez kullanılmasıyla yapılmıştır. Otuz yıldır bu güçlü tekniğin kullanımı artarak devam etmektedir. Boya-ligand afinite kromatografisi, fosfofrüktokinazlar ile Blue Dekstran (Cibacron Blue F3-GA) arasındaki beklenilmeyen bir etkileşimin görülmesi ile başlamıştır ve boya ligand afinite kromatografisi protein saflaştırmasında çok güçlü bir teknik olarak kabul edilmiştir⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Bu yöntem, proteinlerin saflaştırılması işleminde, pratikte çok başarılı sonuçlar veren, düzenli ve basit bir yöntemdir. Fakat, tüm iyi fikirler gibi, bazı problemlere de yol açmıştır. Çoğu durumda, çözülmesi zor sorunlar ortaya çıkarmıştır. Uygun adsorbentlerin oluşturulmasının zorluğu, spesifik olmayan adsorpsiyon, düşük kapasite ve yüksek maliyet gibi problemler, bir çok afinite kromatografisi işleminin, işe yaramaz hale gelmesine yol açmıştır⁽⁴⁵⁾.

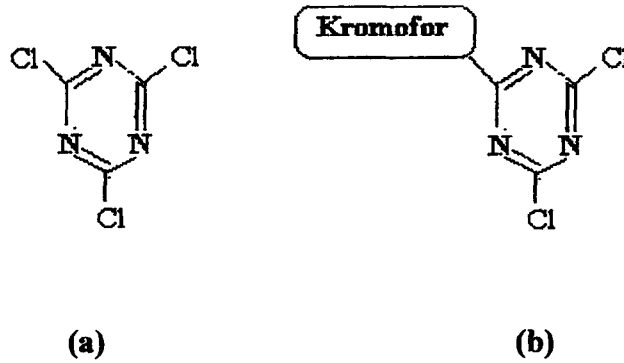
Blue Dekstran ve çeşitli kinazlar arasında, beklenmedik etkileşimler yoluyla tesadüfen keşfedilen; dikkate değer miktarda boya ligand vardır. Daha sonraları, geniş bir seri boya ve benzer bileşikler, diğer afinite fırsatlarının olup olmadığının belirlenmesi için izlenmiştir. Biyospesifik duyarlılıkta, gerçekten afinite adsorbentleri olmayan, pek çok adsorbent bildirilmiştir^(46,47).

Boya-ligandlar, biyo-spesifik ligandlara önemli seçeneklerden biridir. En önemli üstünlüğü çok yüksek derecedeki saflığın, tek adımda elde edilebilmesidir⁽⁴³⁾.

1.4.1. Boya Ligand

Cibacron Blue F3-GA ve onun benzerleri olan Procion Blue H-B, Blue MX-R ve MX-3G, NAD ve diğer pürin nükleotitlere benzerlik gösterirler ve proteinlere özel nükleotit bağlanma yerlerinden bağlanırlar^(48,49).

Siyanurik klorür (1,3,5-trikloro-sim-triazin) temel madde olarak, bu boyaların sentezinde kullanılır (Şekil 1.4). Kromofor molekülleri, diklorotriazinil boya molekülüne kolayca bağlanır. Procion MX serisi boyalar, bu gruba iyi bir örnek teşkil eder. İyi bilinen kromoforlar kolayca sentezlenmiştir. Bir reaktif grup, bileşiğin, selülozdaki birincil hidroksil grupları ile kovalent olarak bağlanması için kullanılmıştır. Hidroksil grupları çok iyi reaktif değildir, fakat alkalın şartlar altında, çok az iyonize olurlar (pK_a yaklaşık 14) ve boyaların selüloz fiberlerinin yüzeyine güçlü saldırısı, bölgesel yüksek boya konsantrasyonuna sebep olur. Böylece reaksiyon, iyonize olmuş hidroksillerle gerçekleşir.



Şekil 1.4. Bazı reaktif boya moleküllerinin yapıları

(a) Siyanurik klorür; (b) Procion MX serisi

Protein saflaştırılmasında çok yaygın olarak kullanılan reaktif boyalar, triazinil boyalardır. Orijinal olarak çalışılan boyalar, hidroksil grubu taşıyan polimerler üzerine kolayca tutuklanan, ticarî tekstil klorotriazin polisülfonathı moleküllerdir. Triazin reaktif boyalar, protein saflaştırmasında çok kullanışlı olan çeşitli kimyasal yapılarıyla, afinite ligandlarının bir sınıfıdır. Rekombinant polipeptit hormonlarından, kan proteinlerine ve tüm enzim sınıflarına kadar, protein izolasyonları serisinin büyük çeşitliliği için, en az otuz farklı boya örneği kullanımdadır. Günümüzde, boya-ligandlar, büyük çapta protein saflaştırılmasında kullanılmaktadır⁽⁵⁰⁾.

1.4.2. Matriks

Destek matriksinin seçimi afinite sistemlerindeki ilk dikkat edilecek noktadır. İdeal bir membran tipi destek malzemesi bazı özelliklere sahip olmalıdır. Destek malzemeleri, çok düşük spesifik olmayan adsorpsiyon göstermelidir. Bu esas dikkat edilecek husustur, çünkü hedef molekülün, diğer moleküllerden ayırımında, afinite ortamındaki tutuklanmış ligand ile hedef molekül arasındaki spesifik etkileşim temel teşkil eder.

Matriks materyalinin yüzeyine ligandın tutuklanması için, bağlanmayı sağlayacak fonksiyonel gruplar bulundurulmalıdır. Fazla miktarda ligand tutuklanmasının sağlanabilmesi için, yüzey alanını genişletmek açısından yüksek derecede gözenekli bir yapıda olmalıdır. Gözenekler yeterli genişlikte olmalıdır, çünkü çoğu durumda ligand ve hedef molekül, büyük moleküllerdir.

Matriks yüksek veya düşük pH, iyonik şiddet, sıcaklık, organik çözücüler, deterjanlar ve özellikle zor elüsyon ve rejenerasyon şartlarında, hem fiziksel hem de kimyasal kararlılığa sahip olmalıdır. Destek materyali, kolondaki akış için basınca

dayanıklı olmalı, sterilize edilebilmeli ve geniş çapta kullanım için de düşük maliyetle üretilebilmelidir⁽²⁸⁾.

Membran kromatografisinde kullanılan mikrogözenekli veya makrogözenekli membranlar, gözenek yüzeylerinin iç kısımlarında fonksiyonel ligandlar içerirler. Kolon kromatografisinde kullanılan küçük küreler ve sıkıştırılmış yumuşak jeller, kolon içerisinde yüksek basınç ve akış hızının azalmasına neden olur. Membran tipi destek malzemeleri ile düşük basınç, yüksek akış hızı ve yüksek verimlilik gibi sonuçlar elde edilir. Bunların yanında kolay paketlenme imkânı, büyük ölçekte uygulanabilirliği, tıkanma sorunun olmaması gibi üstünlükler de sayılabilir. Bu yüzden membran kromatografisi, protein ve enzimlerin geri kazanılması, saflaştırılması, izolasyonu için büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde umut vericidir. Gözenek yapısı, kalınlık, ligand yoğunluğu ve gözenek boyutu, membran kromatografisinin verimliliğini etkileyen faktörlerdir⁽⁵¹⁾.

1.4.3. Boyanın Membrana Tutuklanması

Boya ligandların matrikse bağlanması için pek çok yöntem vardır. Matriks, ligandın bağlanabilmesi için gerekli olan reaktif gruplarla aktive edilir. Bu aktif noktalardan bir uzatıcı kolun tutuklanması gerçekleştirilir.

En yaygın olarak kullanılan aktivasyon yöntemlerinden olan siyanojen bromür (CNBr) aktivasyonu, Axen ve arkadaşları tarafından tanıtılmıştır⁽⁵²⁾. CNBr aktivasyonu, basit bir yöntemdir ancak güçlü karsinojenik etkisi olduğu bildirilmiştir.

Diğer bir aktivasyon yöntemi epoksit aktivasyonudur. Bu yöntemde, epiklorhidrin ya da epoksibromopropan kullanılarak, OH gruplarının reaksiyonu ile

destek oksiran gruplarıyla aktive edilir⁽⁵³⁾. Epoksit ajanı, CNBr'e göre daha az toksiktir ve kolay elde edilebilir. Basit bir yöntemdir ve ayırım teknolojilerinde çok önemli bir yer tutmaktadır.

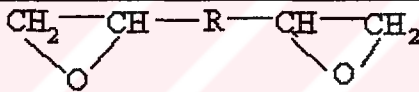
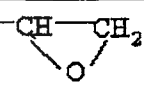
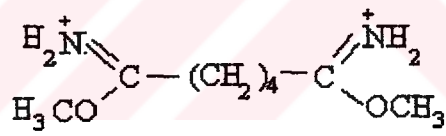
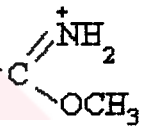
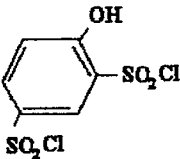
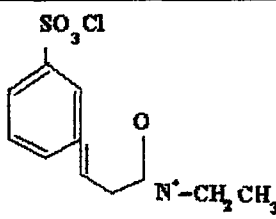
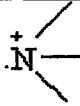
Periyodat oksidasyonu ise, polisakkarit destek malzemelerinin oksidasyonuna dayanan bir aktivasyon yöntemidir⁽⁵⁴⁾. Matriks sodyum periyodat ile muamele edilerek modifiye edilir. Triazin aktivasyonu, destek malzemelerinin, 2-amino-4,6-trikloro-s-triazin ile aktivasyonuna dayanır⁽⁵⁵⁾. Bu reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir.

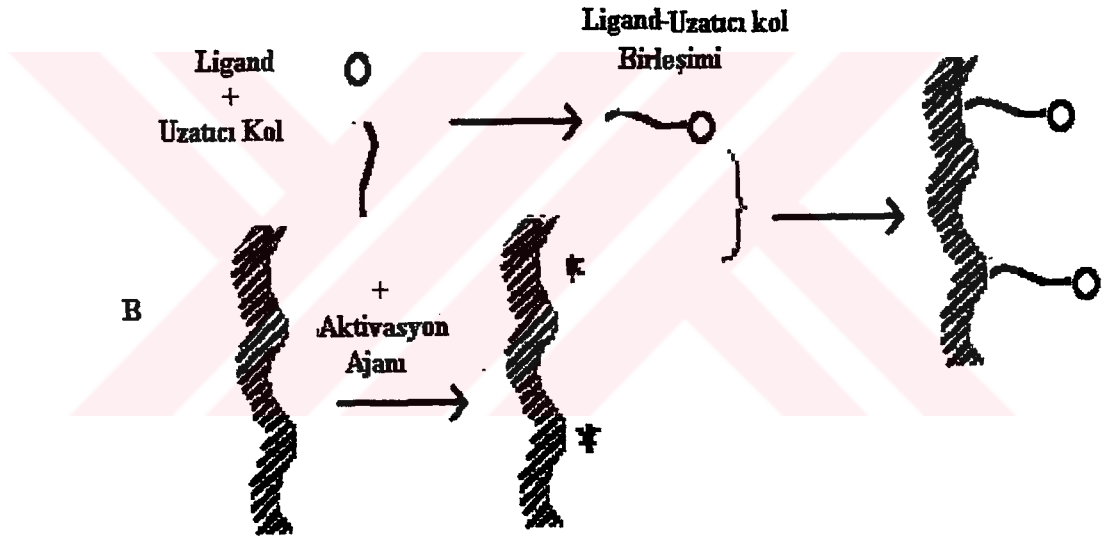
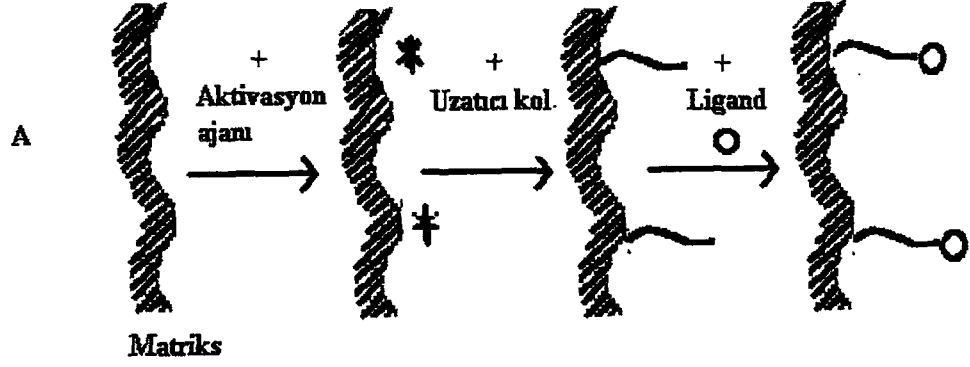
Karbodiimid bağlanması, ligand üzerindeki serbest karboksi grubuyla, destek yüzeyindeki serbest amino grupları arasında bir peptit bağının oluşmasına dayanır⁽⁵⁶⁾. Diğer önemli aktivasyon yöntemleri olarak, karbonilasyon⁽⁵⁷⁾, 2,2,2-trifluoroethanesulfonil klorid, diglikolik anhidrat yöntemi, glutarik dialdehit yöntemi, sülfonik asit klorid yöntemi ve Woodward K yöntemi sayılabilir⁽⁵⁸⁾.

Çizelge 1.2'de çeşitli aktivasyon ajanları gösterilmiştir⁽³⁾. Matriksin aktive edilmesini takiben, bir uzatıcı kolun matrikse tutuklanması yapılabilir⁽⁵⁹⁾.

Boya ligandların matrikse bağlanması Şekil 1.5'de görüldüğü üzere, bir aktivasyon ajanı kullanarak matriksin aktive edilmesi, bir uzatıcı kolun matrikse ve daha sonra ligandın, uzatıcı kola bağlanması veya diğer yolda ise matriksin aktivasyonu sonucunda ligandın ve uzatıcı kolun beraber olarak aktive olmuş bölgeye bağlanmasıyla olmaktadır. Şekil 1.6'da uzatıcı kol olarak kullanılan bazı moleküller gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Afinite desteklerine ligand bağlanması için kullanılan ajanlar

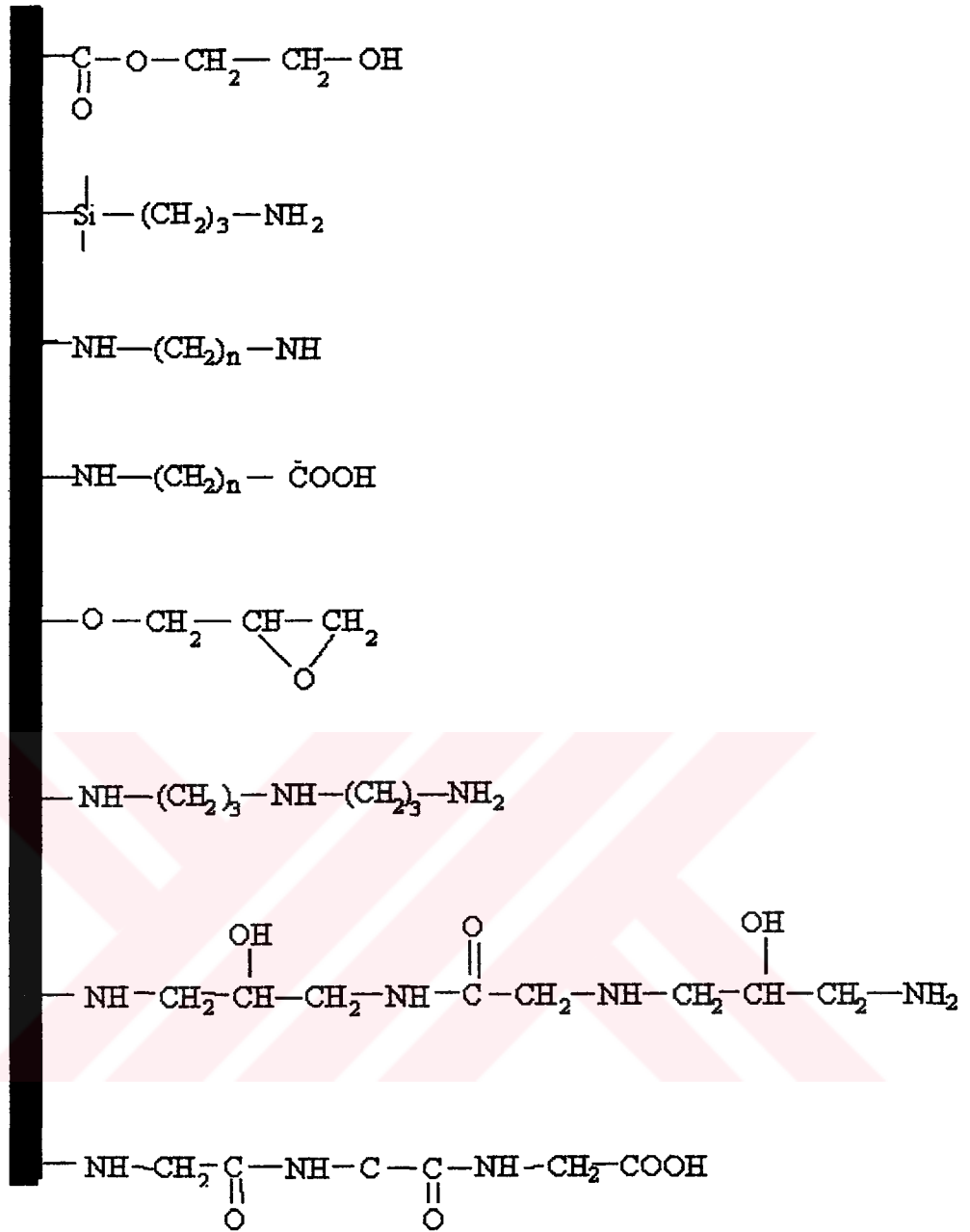
Aktivasyon ajanı	Kimyasal Yapısı	Substratın fonksiyonel grupları	Reaktif Grup
2,2,2-trifluoroetan sülfonil klorid	$\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$	-SH, -NH ₂ , -OH	-CF ₃
Glutarik dialdehit	$\text{HOC}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$	-SH, -NH ₂ , -OH	-COH
Sülfonil klorid	SOCl_2	-SH, -NH ₂	-SOCl
Bioksiran		-NH ₂ , -OH	
1,6-dimetoksi heksandiamin		-NH ₂	
2,4-disülfonik asit klorid		-NH ₂ , -OH	-SO ₂ Cl
Woodward K		-NH ₂ , -COOH	



Şekil 1.5. Boya ligandın destek materyali üzerine bağlanması

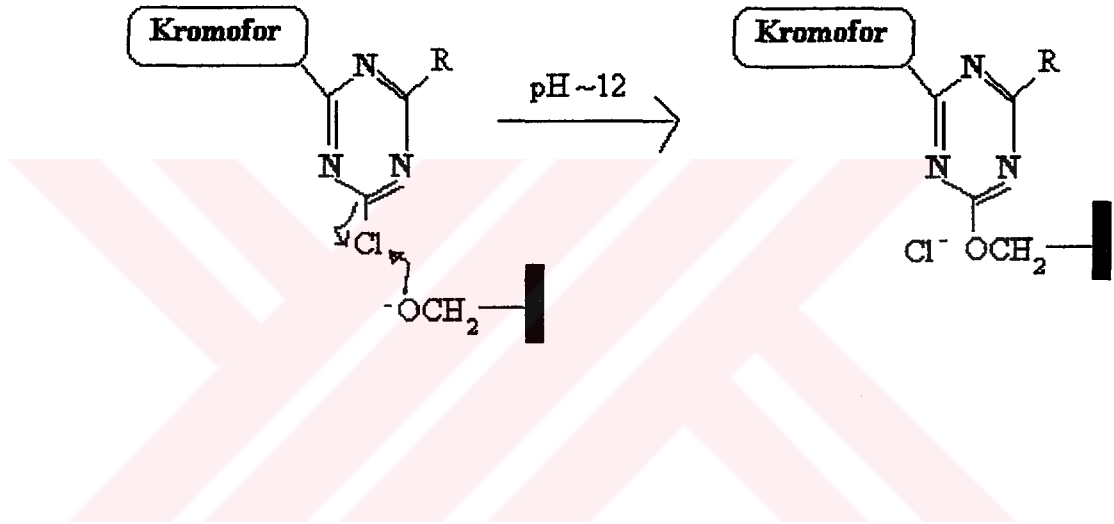
A) Matrikse uzatıcı kol bağlandıktan sonra ligand bağlanması

B) Matrikse uzatıcı kol ve ligandın birlikte bağlanması



Şekil 1.6. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı uzatıcı molekülerin yapıları

Reaktif triazin boyalar, genel olarak destek malzemelerine alkali ortamlarda doğrudan bağlanmaktadır. Reaksiyon, boya-ligand moleküllerinin reaktif klor veya flor grupları ile matriksin hidroksil veya amin gruplarının, nükleofilik katılma reaksiyonu ile bazik ortamda gerçekleşmektedir. Şekil 1.7’de reaktif grupların, destek yüzeyine tutuklanmaları gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Triazin boyaların matrikse bağlanması

1.4.4. Boyanın Proteine Bağlanması

Boya-ligandlar, substrat veya kofaktör yüzeylerini taklit ederler. Bu şekilde bir çok proteinin aktif yerlerine uyum gösterirler. Tekstil boyaları, proteinlere bağlanma özelliğine sahiptir. Boya-ligandların bağlanmaları, geri dönüşümlü ve seçici olduğundan; proteinlerin adsorpsiyon ve desorpsiyonlarında kullanılırlar. Boya-ligandların yapısında bulunan sülfonik asit grupları, sulu ortamda, boya-ligand

moleküllerinin çözünmesini sağlar. Bu gruplar pH 4,0 değerinin üzerinde negatif yük taşırlar . Reaktif boyalar, heterosiklik triazin halkası üzerindeki reaktif klor ile çeşitli substratlara kolayca tutuklanır. Boya-ligand ve protein arasında polar, iyonik ve hidrofobik etkileşimler gerçekleşir⁽⁶⁰⁾.

Boya-ligandlar, ucuz ve ticarî olarak kolayca elde edilebilir. Kolayca tutuklanabilirler. Boya ligandların, çok sayıda protein ile dikkate değer bir seçicilikte etkileştiği gösterilmiştir. Boya-ligandlar taşıyıcı matrikslere çok kolaylıkla tutuklanır ve biyolojik ligandlara göre daha ucuz ve kararlıdır. Bu boyaların düşük maliyetli olması, kolay tutuklanabilmesi, biyolojik ve kimyasal degradesyona dayanıklı olması ve yüksek protein bağlama kapasitesi, verimli bir afinite kromatografisi sağlar⁽⁶¹⁾.

Reaktif boyaların pek çok üstünlüğü vardır. Reaktif boyalar pahalı değildir, birleşme işlemi hızlıdır, basittir ve toksik kimyasallar içermezler. Ayrıca, biyolojik bozulmaya karşı dirençli olup, proteinlere yüksek bağlanma kapasitesine sahiptirler. Reaktif boyalar, tekstil boyaların kararsızlığından kaynaklanan yıkama ile akıp gitme eğilimi probleminin bertaraf edilmesi için geliştirilmiştir. Çoğu boyalar, bizim anlayışımıza göre, afinite adsorbenti olduğunu belirler nitelikte davranır. Bu durum, yüksek özgünlük anlamına gelmez. Pek çok protein için özgün olmayan bağlanma ve bazı şartlar altında, pratikte, tüm proteinlerin adsorblanması gerçekleşebilir. Böylece boya moleküllerinin yapıları, sadece doğal ligandlara benzemez, proteinlerin yüzeyindeki diğer kısımlarla başka etkileşimler için sayısız fırsatlar da sağlar. Bir protein için, bir boya ligand adsorbentine, tek bir biyospesifik etkileşim yolu ile bağlanmış olmak nadirdir⁽⁴²⁾.

Her ne kadar tekstil boyaları, bazı durumlarda, proteinlerle dikkate değer özgünlük derecesinde etkileşebiliyorsa da⁽⁶²⁻⁶⁴⁾, bu etkileşimler, görünüşe göre pek

çok ilgisiz proteinlerle kaçınılmaz olarak ta bağlanır. Tutuklanan boyaların özgünlüğünün olmayışıyla başa çıkmak için tek yol, hedef proteini en az safsızlıkla elüe eden özel elüentleri kullanmaktır. Bu yaklaşım “afinite elüsyonu” olarak bilinir ve tutuklanan boya ligandlarıyla sayısız afinite saflaştırmalarında kullanılmıştır.

Boya, hedef enzimin aktif yeri ile etkileşime giriyorsa, enzimin özel bir elüenti olarak uygun yarışmalı bir madde (ligand) kullanılmalıdır. Bununla birlikte, boya ve enzim arasındaki etkileşimin modunda belirsizlik varsa, pek çok madde, seçici bir rakip olarak hareket etmesi ve enzimin özgün elüsyonunu sağlaması umuduyla elüsyon ajanı olarak denenebilir. Tekstil boyalarının sorunlarıyla baş edebilmek için diğer bir strateji, hedef protein için gelişmiş afinite ve özgünlüğe sahip yeni boya ligandlar tasarlamaktır.

Prensipite, hedeflenen proteinin doğal biyolojik ligandlarının bağlanışını ve yapısını taklit eden sentetik boyaların tasarlanması başarılmaktadır. Bu yeni tip ligandlar, biyomimetik boya ligand olarak adlandırılır⁽⁶¹⁾.

Çoğu proteinler elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağı, yük değişim etkileşimleri, boya yapılarının mümkün kıldığı tüm etkileşimlerin karmaşık bir kombinasyonu olarak sadece biyospesifik olmayarak bağlanmıştır. Bazı proteinler bununla birlikte, doğal ligand bağlanma yerleri yoluyla spesifik olarak etkileşime girerler ve bazı spesifik olmayan etkileşimlerle birlikte, toplam bağlanma enerjisi, kolonda proteini geciktirmek için etkili olur.

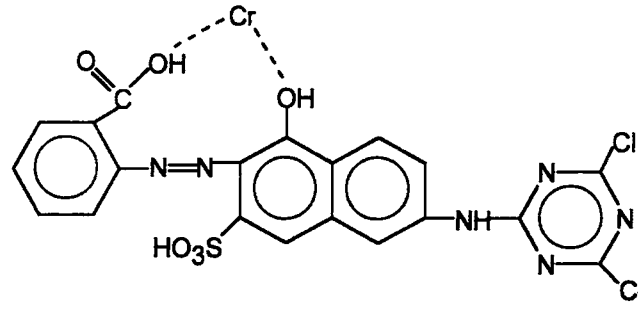
Bu sınıfta en yaygın olarak kullanılan boya, Cibacron Blue F3G-A'dır. Adenil taşıyan kofaktörlerin bir analogu olarak, başarılı bir şekilde kinazların, fosfatazların ve dehidrojenazların saflaştırılmasında kullanılmaktadır⁽⁶⁵⁾.

Cibacron Blue F3G-A, çok çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında afinite ligandı olarak kullanılmıştır. Boya ligand afinite kromatografisi, nükleotit bağlanma bölgeleri taşıyan, kinazlar, dehidrojenazlar, serum albumin, lipoproteinler ve kan koagülasyon proteinleri gibi proteinler için kullanılır⁽⁶⁶⁻⁷⁴⁾. Boyanın kompleks aromatik halka yapısı, hidrofobik etkileşimlerini, yük değişim etkileşimlerini ve katyon değişim mekanizmasını mümkün kılar.

Kinazlara ve dehidrojenazlara (bu sınıf proteinler, nükleotit kofaktörler, NAD⁺, NADP⁺ ve ATP'yi kullanır) boyanın bağlanması, kofaktör bağlanma yerlerinde spesifik bağlanma olanağını sunan bu kofaktörlerin, düşük konsantrasyonda eklenmesi ile geri dönüşebilir. Diğer proteinlerin, boyadan salınabilmeleri için yüksek derişimde kofaktör ya da tuz gereklidir. Bu aynı zamanda, tutuklanan boyanın katyon değiştiricisi olarak da işlev gördüğünü gösterir. Şekil 1.9'da bu çalışmada kullanılan Reactive Brown 10 ve Şekil 1.10'da da Reactive Green 5 boyalarının yapıları gösterilmiştir.

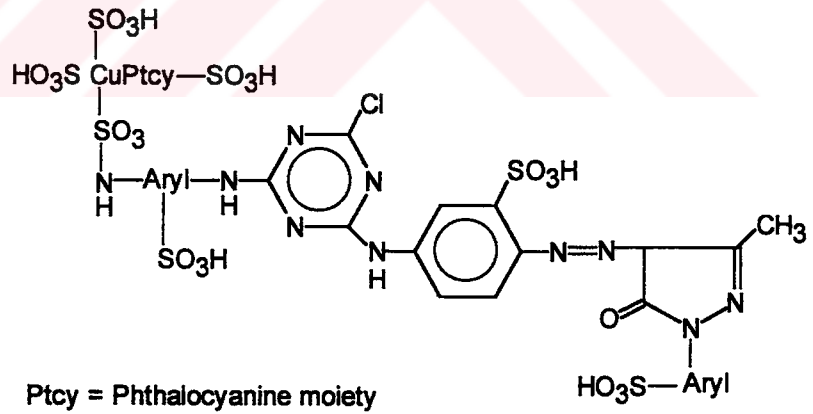
1.4.5. pHEMA Membranın Özellikleri

pHEMA, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin, polimerleştirilmesi ile hazırlanan ve membran formunda kullanılabilen bir polimerdir. pHEMA hidrofilik bir polimerdir, çok fazla miktarda su içirme kapasitesine ve aynı zamanda yüksek bir mekanik güce sahiptir. Gözenekliliğinin yüksek olması, yüzey alanını arttırmış ve bu sayede çok fazla miktarda boya ligand molekülünü yüzeyine tutuklamak mümkün olmuştur. Ayrıca matriksin gözenekliliği düşük difüzyon direnci sağlamıştır⁽⁷⁵⁾.



Reactive Brown 10

Şekil 1.8. Reactive Brown 10 boyasının yapısı



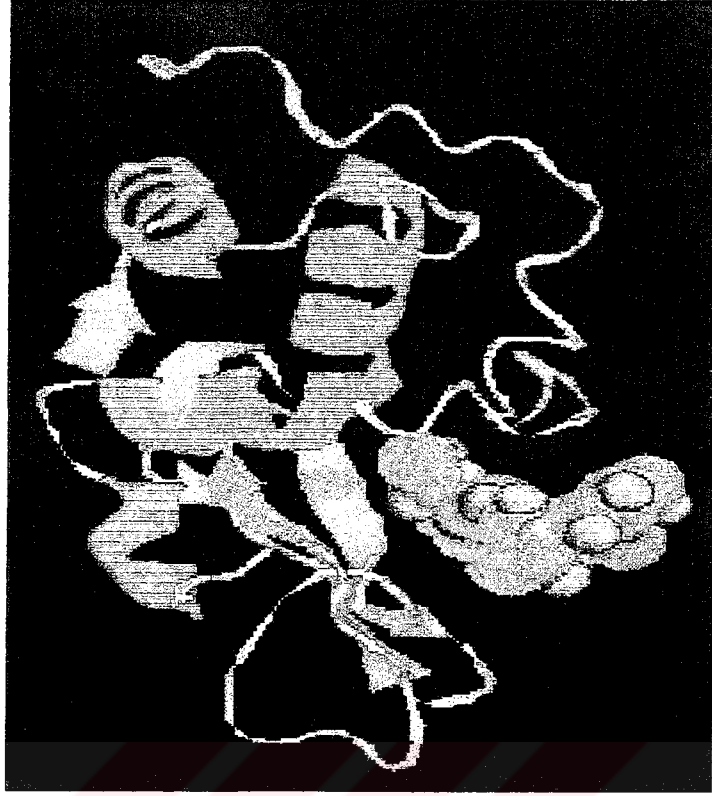
Reactive Green 5

Şekil 1.9. Reactive Green 5 boyasının yapısı

1.5. Lizozim

Lizozim, ilk olarak Londra'da Bakteriolog Alexander Fleming tarafından 1922'de keşfedilen bir hidroliz enzimidir. Fleming soğuk algıngında, mukus salgısından birkaç damlayı bakteriyel kùltüre yerleştirmiş ve bakterilerin bir süre sonunda parçalandığını keşfetmiştir. Bakterileri parçalayan, mukustaki bu antibakteriyel madde lizozimdi⁽⁷⁶⁾. Daha sonraki çalışmalarda, lizozimin vücut salgılarında, gözyaşında, tükürükte, rahim boynunda, bitkilerde ve yumurta beyazında bulunduğu tespit edilmiştir. Gözyaşındaki lizozim, gözdeki enfeksiyonlara karşı savunma görevi yapar. Mide salgılarındaki lizozim, eritme yeteneği sayesinde koruma görevi yapar. Yumurta beyazındaki lizozim ise, embriyoyu ve besin maddelerini, bakteriyel etkilere karşı korur. Tavuk ile hindi, ve orangutan ile keseli sıçanlarda var olan lizozim, amino asit dizisinde benzerlikler gösterir⁽⁷⁷⁾.

Enzimin yapısı, 1965 yılında David Phillips tarafından, X ışınları kullanılarak açıklanmıştır. Tavuk yumurtası lizozimi, elipsoidal şekildedir. Boyutları yaklaşık olarak 45x30x30 Angstrom olan, 129 amino asit kalıntısından oluşmuş küçük bir proteindir. Şekil 1.10'da lizozimin X-ışınları kullanılarak elde edilmiş yapısı görölmektedir. Lizozimin bir birim ağırlığı yaklaşık 14600 daltondur. Üç kısa zinciri mevcuttur ve 4 disülfid bağı içermektedir⁽⁷⁸⁾. Proteinin haritasındaki, alfa heliks yapısı 129 amino asit kalıntısından 52'si tarafından (%42) oluşturulmuştur. 41 ve 45 ile 50 ve 54 amino asitleri, β tabakasını oluşturur ve 46 ile 49 amino asitleri saç tokası meydana getirirler⁽⁷⁹⁾.

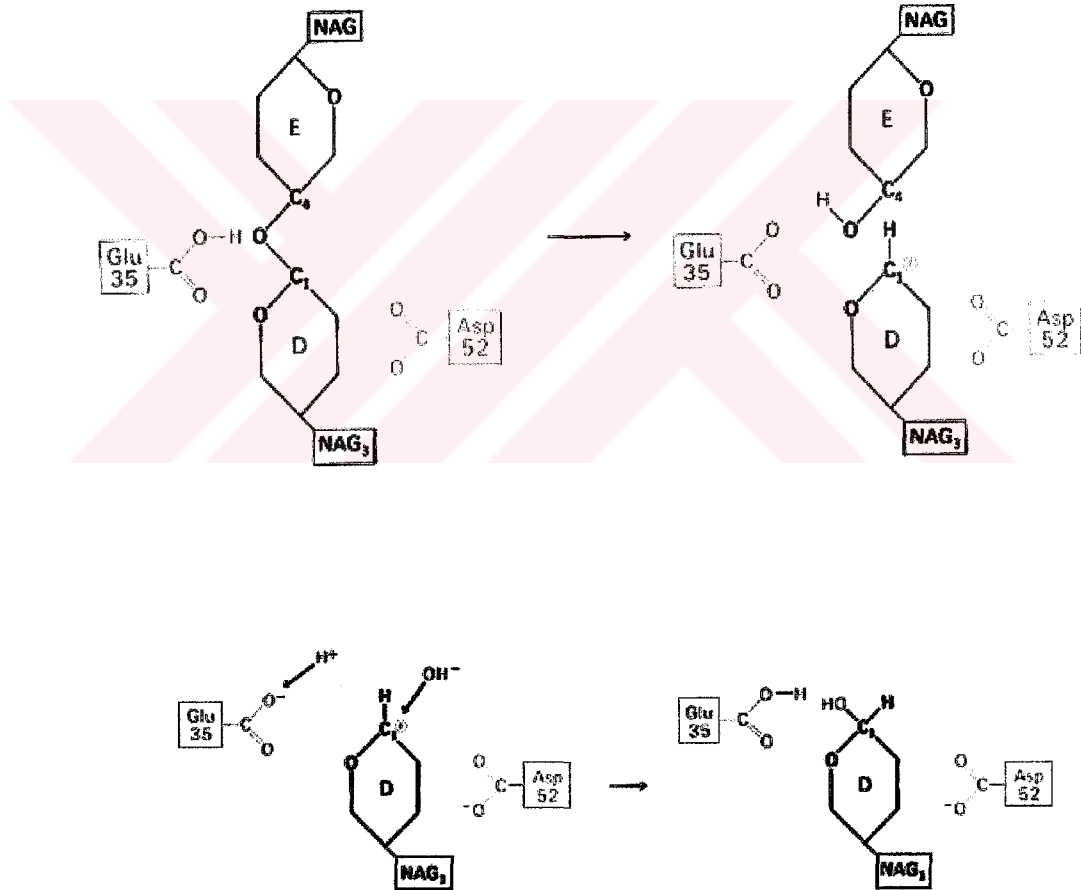


Şekil 1.10. Lizozimin üç boyutlu yapısı

1.5.1. Lizozimin Fonksiyonu

Lizozimin önemli bir özelliği, protein analizinde görülebilen, hidrofobik kısımlarının hidrofilik kısımlardan çok daha baskın olmasıdır. Lizozim prostetik grup içermez. Lizozim aynı zamanda asidik virüslerle çözünmeyen bir kompleks oluşturarak çeşitli virüsleri inaktive edebilme yeteneğindedir. Lizozimin bakteri hücre duvarının polisakkarit kısmını parçalayarak bakterileri öldürür. Lizozimin aktif yeri, peptidoglikanın N-asetil muramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) arasındaki bağı ayırır. Göreceli olarak lizozimin hidrolitik aktivitesi yavaştır, fakat yüksek osmotik basınç altında hücre duvarındaki sadece birkaç çentik, yırtılmaya neden olur⁽⁸⁰⁾. Lizozimin aktif yeri altı şeker kalıntısına (ABCDEF) yer sağlar ve D

ve E şekerleri arasındaki bağı kırar. Bu bağ Glu-35 ve Asp-52'nin yakınında bulunur. Glu-35, D şekerinin birinci karbonuna bir proton verir ve pozitif bir yük meydana getirir. Bu pozitif yük, Asp-52 tarafından stabilize edilir. Bunun sonucunda C—O bağı ayrılır⁽⁸¹⁾. E-F artıklarını içeren NAG dimeri enzimden uzaklaşır. Karbonyum iyonu, çözücüdeki -OH ile reaksiyona girer ve Glu-35 tekrar protone hale gelir ve dört NAG (ABCD) enzimden uzaklaşır. Şekil 1.11'de lizozimin hidrolitik aktivitesi gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Lizozimin hidroliz aktivitesi

1.5.2. Lizozimin Kullanım Alanları

Lizozimin kullanım alanları, gıda pazarında olduğu kadar, eczacılıkta da fazladır. Lizozimin güçlü bir antibakteriyel aktiviteye sahip olması eczacılıktaki ticarî değerini arttıran önemli bir özelliğidir. Bu enzim, klinik uygulamalarda ülserlerin, enfeksiyonların, yanıkların tedavisinde ve bazı antibiyotiklerin bir destekleyicisi olarak muazzam bir potansiyele sahiptir⁽⁸²⁾.

Gıda endüstrisinde ise, paketlenme filmlerinin antiseptik duruma getirilmesi için kullanılır. Sosis, sucuk, diğer etler ve süt tozu gibi yiyeceklere, koruyucu olarak eklenebilir⁽⁸³⁾. Lizozim, gıdaların konserve yapılması sırasındaki sterilizasyon için gerekli olan sıcaklığı düşürmekte ve immobilize enzim kolonlarının lizozim ile birlikte immobilize edilerek otosterilizasyonunda da kullanılmaktadır⁽⁸⁴⁾. Lizozim hâlihazırda, peynir olgunlaştırılması, mayalanması sırasında bütirik asit fermentasyonuna sebep olan bakteriyel türlerin, bir inhibitörü olarak mandıra teknolojisinde kullanılmaktadır. Lizozimin pıhtılaşma zamanını kısaltmak ve ürünü arttırmak için kullanılması da mümkündür⁽⁸⁵⁾.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

Lizozim (tavuk yumurtası beyazından EC 3.2.1.7), Sigma Chem. Co. (St. Louis.MO, ABD) firmasından alındı. 2- hidroksietil metakrilat (HEMA), Fluka AG'den (İsviçre) temin edildi, kullanılmadan önce indirgenmiş basınç altında damıtıldı ve kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. α α Azoisobutironitril (AIBN) ve Reactive Brown 10 (Procion Brown MX 5BR) ve Reactive Green 5 (Procion Green H-4G) Sigma Chem Co.'dan satın alındı. Diğer tüm analitik derecede saflıktaki kimyasallar, Merck AG (Darmstadt,Almanya) firmasından alındı.

2.1.2. Cihazlar

2.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre

Sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonu çalışmalarında, lizozim miktarları, Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601, UV-VIS spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda belirlenmiştir.

2.1.2.2. FTIR Spektrofotometre

pHEMA membranları, triazin boya bağlı membranlar ve boya ligandların FTIR spektrumları, FTIR spektrofotometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde

edildi. Burada kullanılacak tabletler, 0,1 gram kuru membran parçası ile 0,1 gram KBr karıştırılarak elde edildikten sonra spektrumları alındı.

2.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Kurutulmuş PHEMA membranları, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve membranların elektron mikrografları, JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

2.1.2.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

YBSK'ni oluşturan üniteler:

- a) Dionex Pompa serisi P580A LPG (düşük basınç gradient pompası),
- b) Dionex UV-VIS diyot dizi dedektörü 340S,
- c) Dionex otomatik örnek enjeksiyon ünitesi ASI-100,
- d) Dionex kolon firması STH 585

Bütün sistem, CHROMELLEON veri programı ile Windows işletim sistemi altında, otomatik olarak kontrol edildi. Protein karışımının ayrıştırılmasında kullanılan kolon, VYDAC 259 VHP 5415 (iç çapı 0,46 cm, uzunluğu 15 cm olan) polimer polipeptit kolonudur.

2.1.2.5. Kullanılan Diğer Cihazlar

Manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), vakum etüvü (Nüve EV018, Türkiye), ultrasantrifüj (SİGMA, 3K30, Almanya)

2.2. Yöntem

2.2.1. pHEMA Membranın Sentezi

pHEMA membranlarının sentezi için, UV fotopolimerizasyon yöntemi kullanıldı. Başlatıcı olarak 20 mg AIBN içeren, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri (2,0 ml) ile 3,0 ml fosfat tamponu (50mM pH 7,0) karıştırıldı. Monomer karışımı, 9 cm çaplı daire şeklindeki cam kap içine konuldu. Azot atmosferinde, UV ışığı altında, 1 saat süreyle, oda sıcaklığında fotopolimerizasyon yöntemi ile membranlar sentezlendi. Polimerizasyon sonucunda oluşan ürün damıtık su ile yıkandı. Bu yolla hazırlanan membranlar 1 cm çaplı perfarator ile disk halinde kesilerek, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda + 4°C 'da bekletildi. Mikrobiyal bozunmaya karşı, saklama tamponuna %0,02 oranında sodyum azid eklendi.

2.2.2. pHEMA Membranlarına Boya Ligandın Tutuklanması

HEMA'nın yapısında bulunan hidroksil grupları ile reaktif boyaların triazin halkasındaki klor arasında, alkali ortamda, nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile boyalar, kovalent olarak membran üzerine bağlandı.

10 ml suda çözülen 300 mg triazin boya, içerisinde membran diskler (6,0 g) bulunan ortama aktarıldı (60 ml, 1,0 M NaCl). Çalkalamalı su banyosunda 80 °C'de 1 saat süre ile inkübe edildi. Bu süre sonunda, ortama, sodyum karbonat çözeltisi (30 ml, 3,2 M Na₂CO₃) ilave edilerek aynı şartlarda, boyama işlemine 4 saat süre ile devam edildi.

Boyama işleminden sonra, membranlar damıtık su ile yıkandı ve kullanılabilecek kadar fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) içerisinde +4°C 'de saklandı. Membranlardan

kullanılan adsorpsiyon ortamına, boya salınımının, spektrofotometrik olarak kontrolü yapıldı.

2.2.3. Membranların Karakterizasyonu

2.2.3.1. Membranların Su İçeriği

pHEMA membranların su içeriği, oda sıcaklığında gravimetrik yöntemle, fosfat tamponu (50mM, pH 7,0) kullanılarak tayin edildi. pHEMA membranların denge su içerikleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Denge Su İçeriği (w/w)} = [(W_s - W_k) / W_k] \times 100 \quad (4)$$

Burada, W_k kuru membranın ağırlığı, W_s ise denge su içeriğine ulaşmış membranların ağırlığıdır.

2.2.3.2. Membranların Kalınlığı

pHEMA membranlarının kalınlığı, dijital kumpas yardımı ile belirlendi.

2.2.3.3. Membranların SEM Yüzey Analizleri

Vakum etüvünde kurutulmuş pHEMA membranları, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve membranların elektron mikrografları, JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

2.2.3.4. Membranların Elemental Analizi

pHEMA membranlarının üzerine, kovalent olarak bağlanmış triazin boyaların miktarları, azot ve kükürt sitokiyometrisi ile bir elemental analiz cihazıyla (Leco, CHNS-932, ABD) tayin edildi.

2.2.3.5. Membranların FTIR Spektrasi

pHEMA membranları üzerine, boyaların tutuklandığının görülmesi için, FTIR spektrumları alındı. pHEMA membranları, triazin boya bağlı membranlar ve boya ligandların FTIR spektrumları, FTIR spektrofotometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Burada kullanılacak tabletler, 0,1 gram kuru membran parçası ve 0,1 gram KBr karıştırılarak elde edildikten sonra spektrumları alındı.

2.2.4. Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları

2.2.4.1. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi

Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 triazin boyaları tutuklanmış pHEMA membranlarına, sulu ortamdan lizozimin adsorpsiyon davranışı incelendi. Lizozimin adsorpsiyonuna; pH'ın, sıcaklığın, başlangıç lizozim konsantrasyonunun ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Adsorpsiyon deneyleri, 280 nm'de UV-VIS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam hacim 7,5 ml ve karıştırma hızı 100 rpm'dir.

2.2.4.1.1. pH Etkisi

Adsorpsiyon ortamının pH'sının, lizozim adsorpsiyon kapasitesine etkisi, pH 4,0 ile 8,5 arasında, farklı tampon sistemleri kullanılarak çalışılmıştır. pH 4,0-5,0 aralığında asetat tamponu (50 mM CH₃COONa / CH₃COOH, 1 mg lizozim/ml, 7,5 ml) ve pH 6,0-8,5 aralığında fosfat tamponu (50 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄, 1 mg lizozim/ml, 7,5 ml) kullanılmıştır. Her deneyde, başlangıç derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde lizozim tartılarak, tampon içinde çözüldü. Adsorpsiyon deneyleri 25°C'da gerçekleştirildi ve 2 saat süreyle 100 rpm hızda, manyetik karıştırıcı ile devamlı karıştırılarak yapıldı. pHEMA membranları üzerine adsorplanan lizozim miktarı; başlangıç derişiminden, 2 saat sonunda adsorpsiyon ortamında kalan lizozimin farkı alınarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisi için dört farklı derişimde standart lizozim çözeltileri (0,05-2,0 mg ml⁻¹) hazırlandı. Başlangıçtaki ve deney sonrasındaki lizozim çözeltilerinin derişimi, çift ışık demetli UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak 280 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.2.4.1.2. Sıcaklık Etkisi

Lizozim adsorpsiyonu davranışının sıcaklıkla değişimi incelendi. Sıcaklığın lizozim adsorpsiyonuna etkisi, fosfat tamponunda (7,5 ml, 1 mg lizozim/ml, 50 mM, pH 7,0) 5°C, 15°C, 25°C ve 35°C sıcaklıklarda çalışılmıştır.

2.2.4.1.3. İyonik Şiddet Etkisi

Lizozim adsorpsiyonu üzerine iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için adsorpsiyon şartları 7,5 ml, 1 mg lizozim/ml olan fosfat tamponunun, NaCl içeriği

0,0 M, 0,1 M, 0,5 M ve 1,0 M olacak şekilde değiştirildi. Adsorpsiyon deneyleri 25°C'de gerçekleştirildi.

2.2.4.1.4. Adsorpsiyon İzotermi

Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 triazin boya ligandları bağlanmış pHEMA membranlarının adsorpsiyon kapasiteleri, 0,05-2,0 mg ml⁻¹ lizozim derişimlerinde araştırıldı. Adsorpsiyon deneyleri 7,5 ml, 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponunda, 25°C'de, 2 saat sureyle, 100 rpm hızla devamlı karıştırılarak yapıldı. Lizozimin başlangıç derişiminin artması ile adsorpsiyon miktarında artış gözlendi. Denge adsorpsiyonuna 90 dakikada ulaşıldı ve 120 dakikalık adsorpsiyon deneyi boyunca sabit kaldığı gözlendi. Deney sonunda membran diskleri, lizozim çözeltisinden uzaklaştırıldı ve adsorplanan lizozim miktarı, aşağıdaki eşitlikten hesaplandı.

$$q = [(C_o - C) V_s] / V_m \quad (5)$$

Bu eşitlikte, q, pHEMA membranları üzerinde adsorblanan lizozim miktarı (mg/cm²), C_o, lizozimin çözeltideki başlangıç derişimi (mg/ml), C, adsorpsiyon sonrası, sulu fazın lizozim derişimi (mg/ml), V_s, çözeltinin hacmi (ml) ve V_m adsorpsiyon ortamındaki membranların hacmidir (ml).

Adsorbentler için sulu ortamdan lizozim adsorpsiyon davranışının, deneysel olarak elde edilen adsorpsiyon izoterminin, teorik olarak turetilen Langmuir, Freundlich ve Temkin adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı.

2.2.4.1.5. Adsorpsiyon Kinetikleri

Adsorbent yüzeyinde, boya tutuklanmasından sonra çeşitli fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Fonksiyonel gruplarla, lizozimin çok sayıda farklı etkileşimi gerçekleşebilir. Birinci derece hız denklemi, sıvı bir çözülden, solutun adsorpsiyonu için en yaygın kullanılan eşitliktir.

pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda elde edilen deney sonuçları, birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanarak, adsorpsiyon sisteminin kinetiği araştırılmıştır.

Sulu ortamlardan adsorpsiyon için kullanılan birinci dereceden kinetik eşitlik aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (6)$$

Bu eşitlikte k_1 , birinci dereceden biyoadsorpsiyon hız sabitesi (dk^{-1}), q_{eq} ve q_t sırası ile denge ve t anında adsorplanan lizozim miktarıdır ($mg\ ml^{-1}$). Eşitliğin integre edilmesi ile ($t = 0$ anında $q_t = 0$ ve $t = t$ olduğunda ise $q_t = q_t$) aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\log (q_{eq} - q_t) = \log q_{eq} - (k_1 \cdot t) / 2,303 \quad (7)$$

Bu eşitlik deneysel veriler kullanılarak t 'ye karşı $\log (q_{eq} - q_t)$ grafiğe geçirilir. Bu grafiğin düz bir doğru vermesi gerekmektedir. Elde edilen doğrunun eğiminden k_1 ve kaymadan da q_{eq} değerleri belirlenir.

İkinci derece kinetik model ile elde edilen adsorpsiyon denge kapasitesi aşağıda verilen eşitlikten elde edilir.

$$dq_t/dt = k_2(q_{eq} - q_t)^2 \quad (8)$$

Burada k_2 ($\text{ml}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{dak}^{-1}$) ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabitesidir. Yukarıdaki eşitlik, sınır koşullarda integre edilerek, ikinci dereceden doğru denklemi elde edilir.

$$(t / q_t) = (1 / k_2 q_{eq}^2) + (1 / q_{eq}) t \quad (9)$$

Membranlarla elde deneysel veriler, ikinci dereceden kinetik denkleminde uygulanarak, hız kinetiği belirlendi. Bu kinetik modelin uygulanması ile çizilen grafiğin ($t-t/q_t$ grafiği) eğiminden q_{eq} ve kaymasından da k_2 belirlenir⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾.

2.2.4.1.6. Lizozimin Desorpsiyonu

Adsorbentlere tutuklanan lizozimin, desorpsiyonu çalışıldı. Desorpsiyon deneyleri 1,0 M KSCN içeren ve pH 8,0 olan tampon çözeltilerinde yapıldı. Lizozim adsorplamış olan adsorbentler, desorpsiyon ortamına yerleştirilerek 100 rpm'de 25°C'de, 2 saat süreyle devamlı karıştırılarak desorpsiyon gerçekleştirildi ve UV-VIS spektrofotometre ile 280 nm'de ölçüm yapıldı.

Desorpsiyon ortamındaki lizozim miktarı, spektrofotometre ile 280 nm'de tayin edildi. Desorpsiyon oranı, pHEMA membranlarında adsorbe edilen lizozim miktarından, desorpsiyon sonucunda ortama geçen lizozimin çıkarılması ile hesaplandı.

Lizozimin desorpsiyon oranı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

Desorpsiyon oranı = [Desorbe olan lizozim miktarı x 100] / [Membranlar üzerine adsorbe olan lizozim miktarı]

2.2.4.1.7. Tekrar Kullanılabilirlik Deneyleri

Boya-ligand tutuklanmış pHEMA membranlarının, tekrar kullanılabilirliğine karar vermek için, adsorpsiyon ve desorpsiyon aşamaları, aynı membranlarla sekiz defa tekrarlandı.

2.2.4.2. Yumurta Beyazından Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi

Yumurta beyazından lizozimin adsorpsiyonu için; kabuğu alkolle silinen günlük yumurtalardan, 100 ml yumurta beyazı ayrılarak, 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. Yumurta beyazı, buz banyosunda, mikserle karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra ultrasantrifüj ile 4 °C'de, 12000 rpm'de, 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve süpernatant alındı.

Yumurta beyazının başlangıçta içerdiği lizozimin miktarı, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile tayin edildi.

Adsorpsiyon deneyleri ise, yumurta beyazı içinde, pHEMA ve boya ligandı bağlı pHEMA membranları ile toplam 7,5 ml hacimde, 25°C'de, 5 saat süreyle 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak yapıldı. Adsorpsiyondan sonra yumurta akında kalan lizozim miktarı yine YBSK ile belirlendi. pHEMA membranları üzerinde adsorbe edilen lizozimin elüsyonu pH 8,0, 1,0 M KSCN solüsyonu ve ayrıca 0,5 M NaCl ile yapıldı. 2 saat süreyle, 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak elüe edilen lizozimin saflığı, YBSK ile tespit edildi.

2.2.4.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışmaları

Adsorpsiyon çözeltilerinden, adsorpsiyon deneyi başlamadan önce ve deneyin beşinci saatinde alınan örnekler, YBSK ile analiz edildi.

Çalışmada kullanılan YBSK'yi oluşturan üniteler:

- a) Dionex Pompa serisi P580A LPG (düşük basınç gradient pompası),
- b) Dionex UV-VIS diyot dizi dedektörü 340S,
- c) Dionex otomatik örnek enjeksiyon ünitesi ASI-100,
- d) Dionex kolon firması STH 585

Bütün sistem CHROMELLEON veri programı ile Windows işletim sistemi altında otomatik olarak kontrol edildi. Protein karışımının ayrıştırılmasında kullanılan kolon VYDAC 259 VHP 5415 (iç çapı 0,46 cm, uzunluğu 15 cm) polimer polipeptit kolonudur.

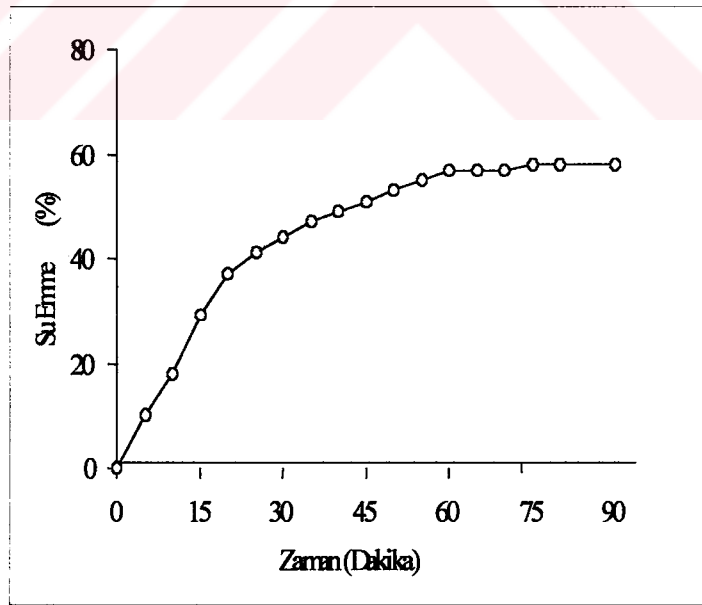
Proteinlerin ayrıştırılmasında taşıyıcı faz olarak A hattında; ultra saf su içerisinde % 0,1 Trifluoroasetik asit (TFA) ve B hattında ise % 95 asetonitril (AcN) ve % 5 ultra saf su içerisinde % 0,1 oranında TFA kullanıldı. B hattı taşıyıcı fazı, A fazına oranla 20 dakika içerisinde % 25'ten % 60'a çıkarıldı. 4,5 dakika sonunda ise % 60'tan % 25'e indirildi. Hareketli fazın akış hızı 1 ml dakika⁻¹ olarak seçildi. Kolon fırın sıcaklığı 25 °C'ye ayarlandı. Her bir örnekten 20 µl enjekte edildi. Kolondan ayrılan proteinlerin derişimi, UV-VIS Diyot-dizi dedektörü ile 220 nm'de tayin edildi. Her bir proteinin miktarı, kalibrasyon eğrilerinden CHROMELLEON veri programı kullanılarak hesaplandı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Boya Ligand Bağlı Membranların Özellikleri

3.1.1. pHEMA Membranlarının Denge Su İçeriği

pHEMA membranlarının denge su içeriği % 58'dir. Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi membranlar, denge su içeriğine 60 dakikada ulaşmaktadır. pHEMA membranları, hidrofilik özelliğe sahiptir. HEMA'nın yapısında bulunan hidrofilik -OH grupları, membranın su emme özelliğini arttırmıştır. Aynı zamanda pHEMA mekanik olarak güçlü bir polimerdir. Adsorpsiyon çalışmalarında destek malzemesinin hidrofilik olması önemli bir avantajdır.



Şekil 3.1. pHEMA membranlarının su içeriği

3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu İle Yüzey Analizleri

pHEMA membranlarının yüzey morfolojisinin incelenmesi için, membranlar vakum etüvünde kurutuldu. Membranların yüzey (Şekil 3.2) ve yan kesitinin (Şekil 3.3) SEM mikrografları elde edildi. Membranların gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Membranların mikrogözenekli olması, adsorpsiyon alanını arttıran bir özelliktir. Geniş yüzey alanı sebebiyle, membranlara yüksek ligand tutuklanması ve dolayısıyla protein adsorpsiyon kapasitesinin artması mümkün olmaktadır. Ayrıca matrikste, düşük difüzyon direnci elde edilir. pHEMA membranlarının kalınlığı 600 µm ve 1 ml ıslak pHEMA membranının yüzey alanı 38,5 cm² olarak ölçülmüştür.

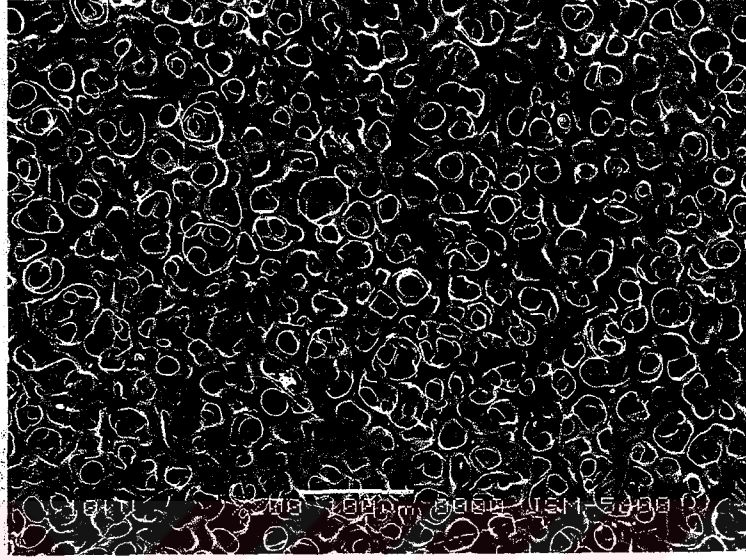
3.1.3. Elemental Analiz

pHEMA ve triazin boya bağlanmış membranların, elemental analizleri yapıldı. Reactive Brown 10 miktarı, azot ve kükürt sitokiyometresinden, membran mililitresi başına 0,361 µmol olarak bulundu. Reactive Green 5 miktarı ise 0,285 µmol olarak bulundu.

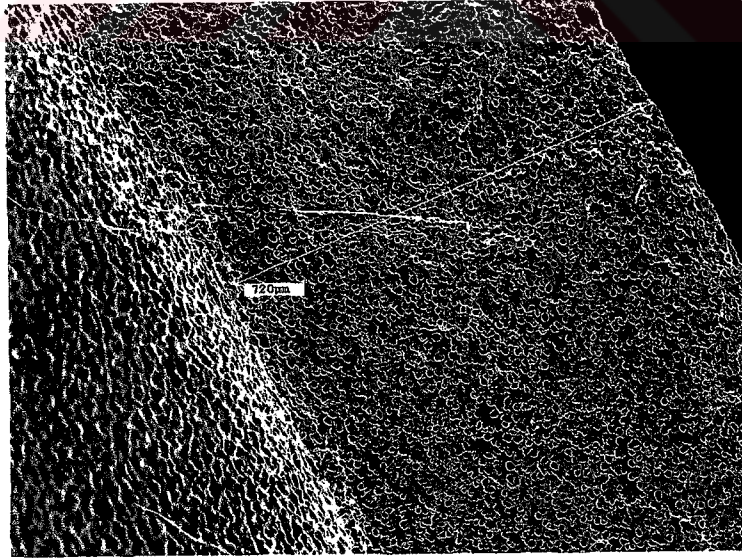
3.1.4. FTIR Spektrasi

pHEMA'nın, triazin boyaların ve boya-ligandı bağlı pHEMA FTIR spektrasi elde edildi. Şekil 3.4. ve Şekil 3.5'te gösterildiği üzere, Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligandı bağlı pHEMA membranının FTIR spektrumu, pHEMA'nın 1575 cm⁻¹ spektrumundan, değişik adsorpsiyon bandı gösterdi.

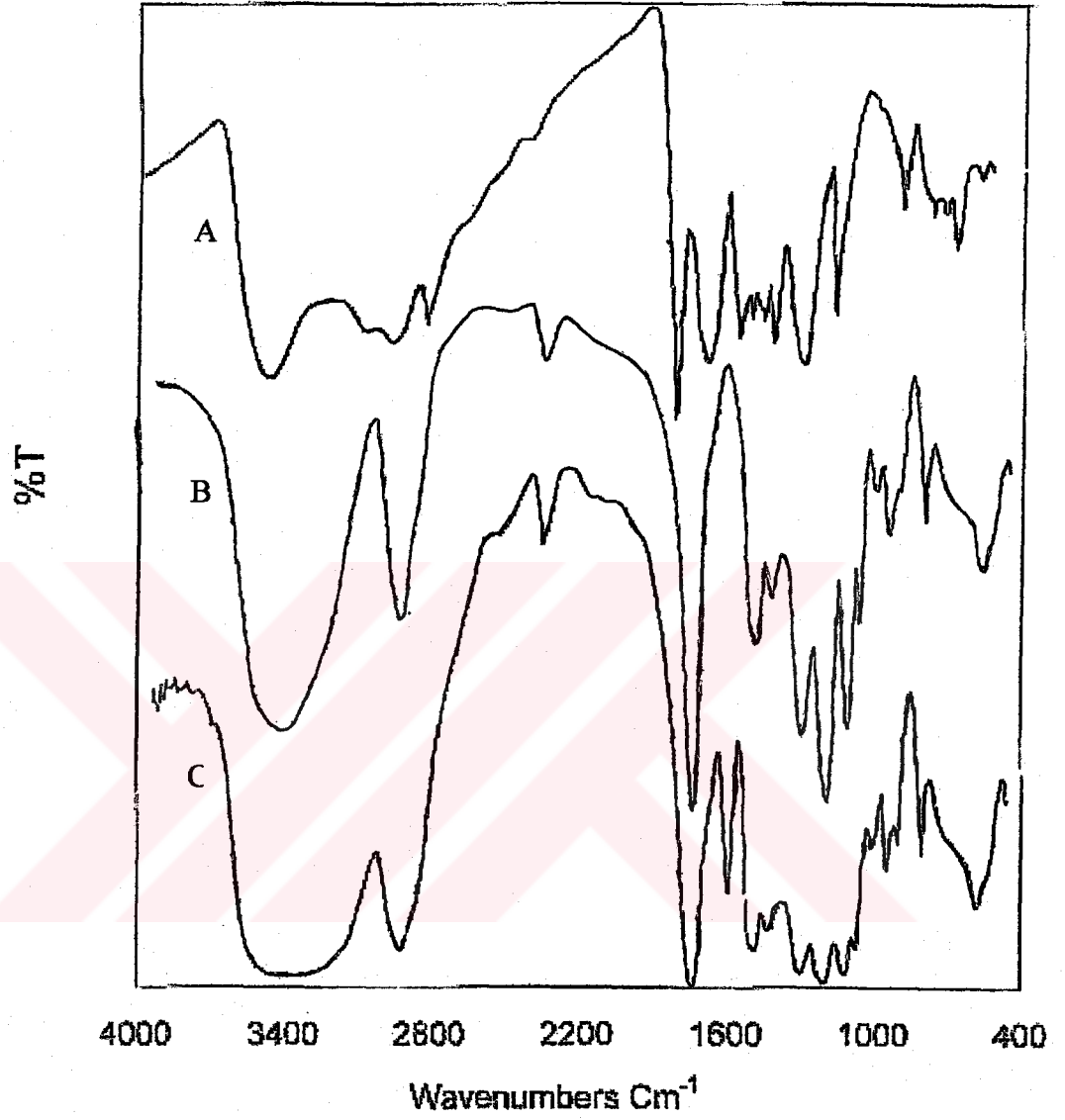
Buradaki titreşim bandı membranın üzerindeki boya molekülünün (C....C) aromatik halkasından kaynaklanmıştır.



Şekil 3.2. pHEMA membranlarının yüzeyinin SEM fotoğrafı

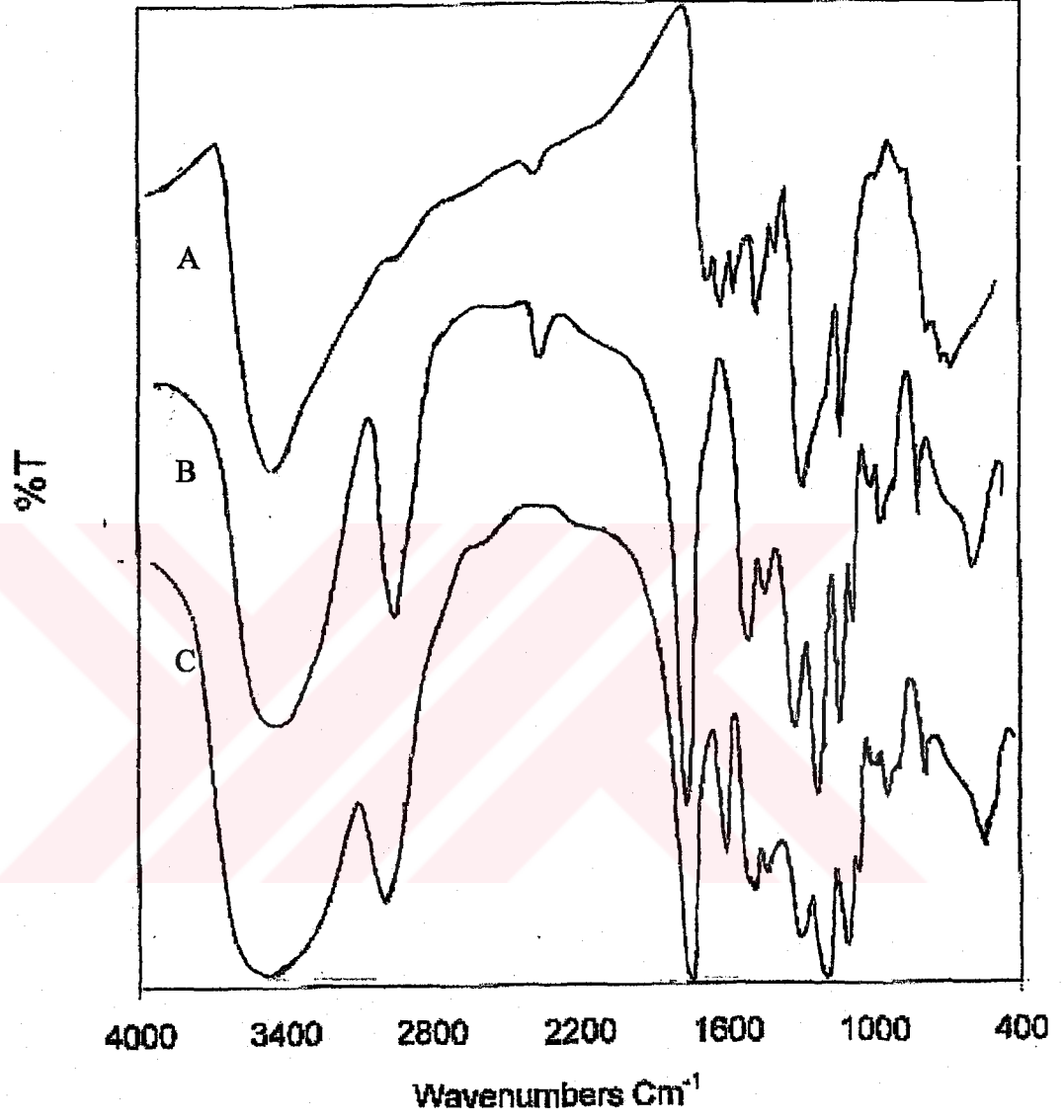


Şekil 3.3. pHEMA membranlarının yan yüzeyinin SEM fotoğrafı



Şekil 3.4. Reactive Brown 10 boyası bağlı sorbentler için FTIR Spektrumu

A) Reactive Brown 10, B) pHEMA, C) Reactive Brown 10 bağlı pHEMA



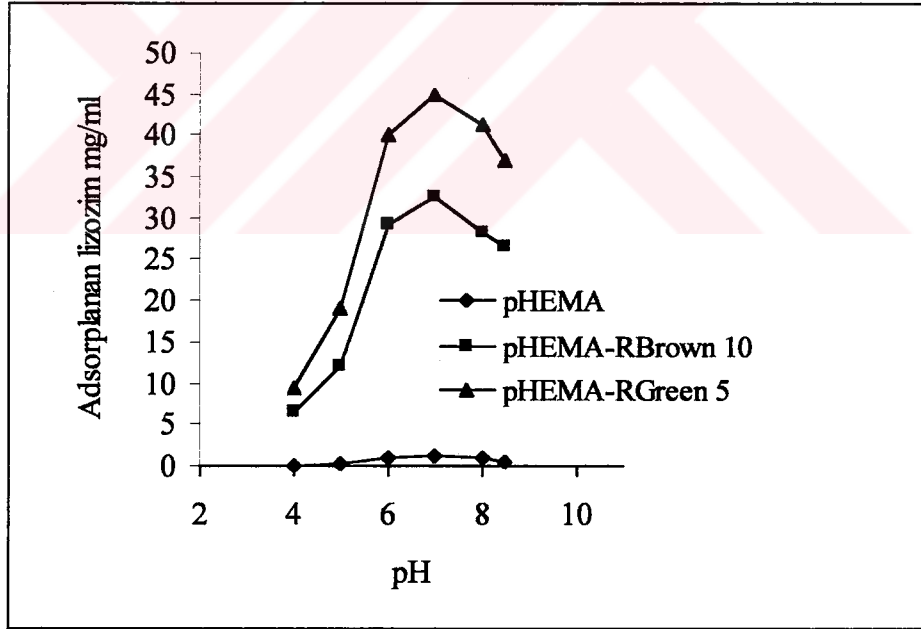
Şekil 3.5. Reactive Green 5 boyası bağlı sorbentler için FTIR Spektrumu

A) Reactive Green 5, B) pHEMA, C) Reactive Green 5 bağlı pHEMA

3.2. Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyonu

3.2.1. Lizozim Adsorpsiyonuna pH Etkisi

Boya ligandı bağlanmış pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyon kapasitesine, pH'nın etkisi, pH 4,0-8,5 aralığında araştırıldı. Şekil 3.6'da boya tutuklanmış membranların, farklı pH değerlerinde adsorpladığı, lizozim miktarları gösterilmiştir. Denenen tüm membranlar için maksimum adsorpsiyon pH 7,0'de elde edildi. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligandı bağlı membranlar için adsorpsiyon kapasitesi sırası ile 32,64 ve 45,0 mg lizozim ml⁻¹ olarak bulundu. Diğer pH'larda düşük lizozim adsorpsiyonu gözlemlendi. Lizozimin pI değeri 11,2'dir ve bu değer altındaki pH değerlerinde katyonik özelliktedir.



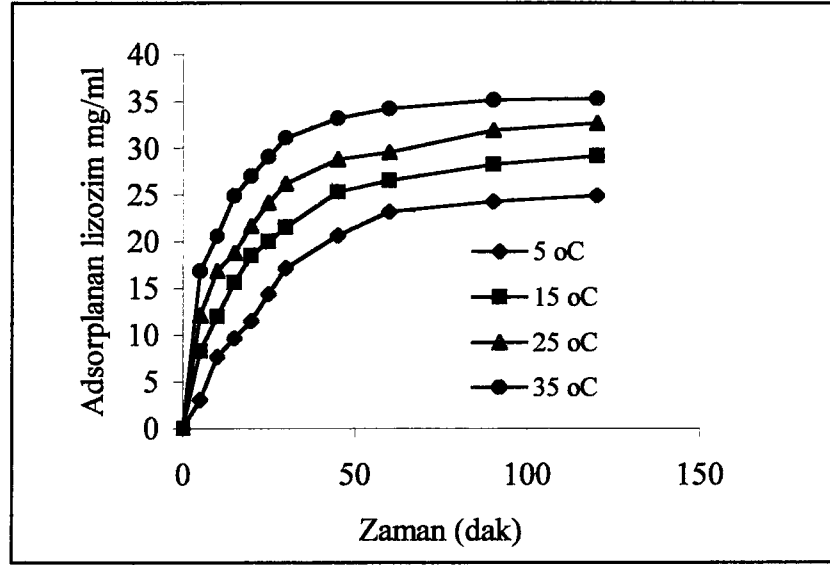
Şekil 3.6. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya-ligand bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonuna, pH'nın etkisi

3.2.2. Lizozim Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

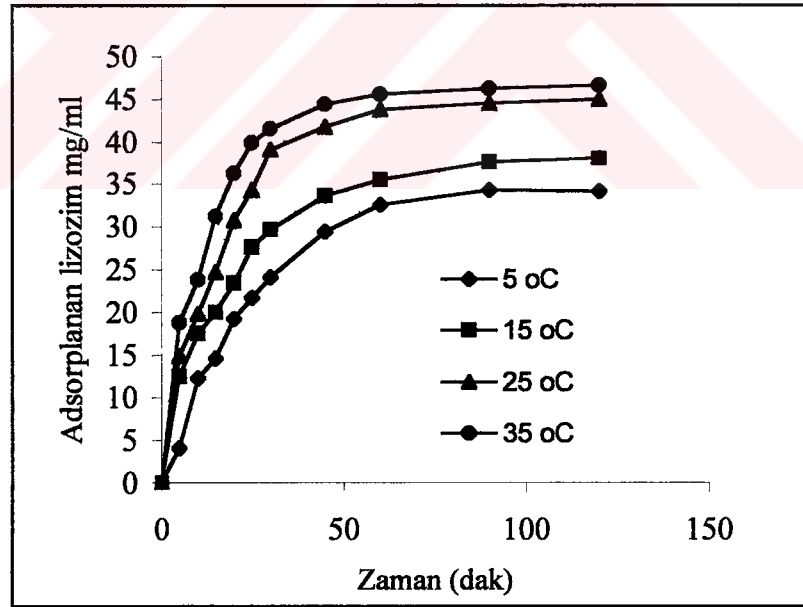
Boya ligand ve lizozim arasındaki etkileşim, 5°C-35°C sıcaklık aralığında araştırıldı. Sıcaklığın artması ile protein ve ligandın fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim alanı artacaktır. Boya tutuklanmış membranların adsorpsiyon kapasitesi, sıcaklıkla beraber artmaktadır. Sıcaklığın, adsorpsiyona etkisi Şekil 3.7'de ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Boya tutuklanmış membranların, lizozim için adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklıkla artması, lizozim molekülünün üç boyutlu konformasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Lizozim molekülü, dört aspartik asit, iki glutamik asit ve iki tirozin zincirine sahiptir. Sıcaklığın artması ile, proteinin içe dönük hidrofobik yan grupları, yüzeye çıkmakta ve boyanın yapısında bulunan hidrofobik gruplarla etkileşimi artmaktadır. Lizozimin sistein artıkları ile Reactive Green 5 boyasının Cu(II) iyonu arasında, etkileşim oluşmaktadır.

3.2.3. Lizozim Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi

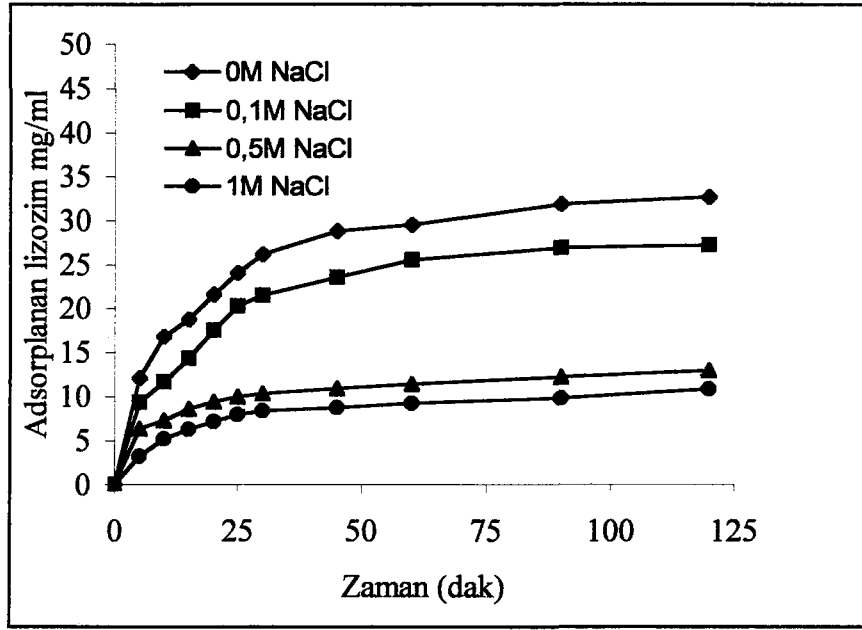
İyonik şiddetin, lizozim adsorpsiyonu üzerine etkisi Şekil 3.9'da ve Şekil 3.10'da gösterilmiştir. İyonik şiddet etkisi, tamponun NaCl içeriği 0,0-1,0 M arasında değiştirilerek incelendi. İyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı gözlemlendi. Adsorpsiyon ortamında tuz derişimi arttırıldığında, kuvvetli elektrolit olan NaCl'ün, membranlarla iyonik etkileşime girerek, adsorpsiyon kapasitesini azalttığı düşünüldü.



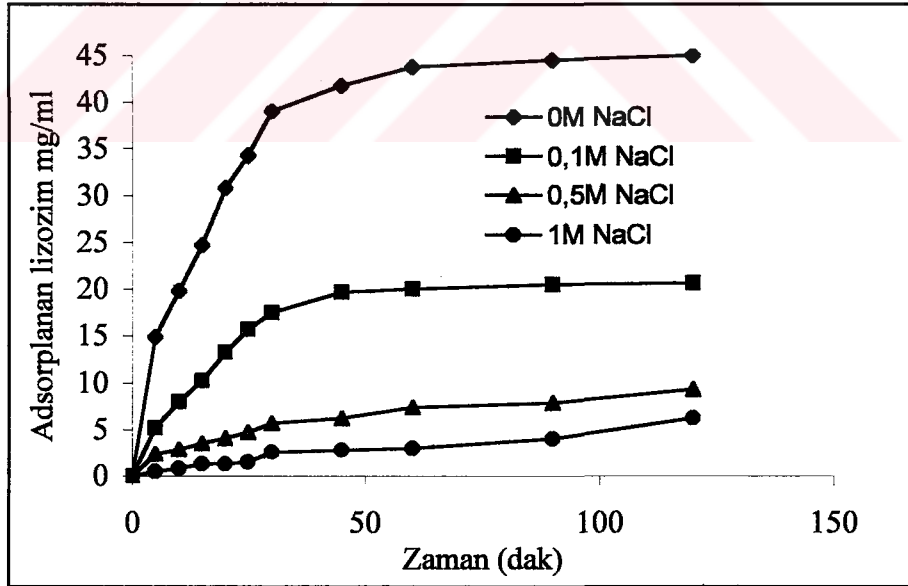
Şekil 3.7. Reactive Brown 10 boya ligandı bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisi



Şekil 3.8. Reactive Green 5 boya ligandı bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisi



Şekil 3.9. Reactive Brown 10 boya ligandı bağılı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi



Şekil 3.10. Reactive Green 5 boya ligandı bağılı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi

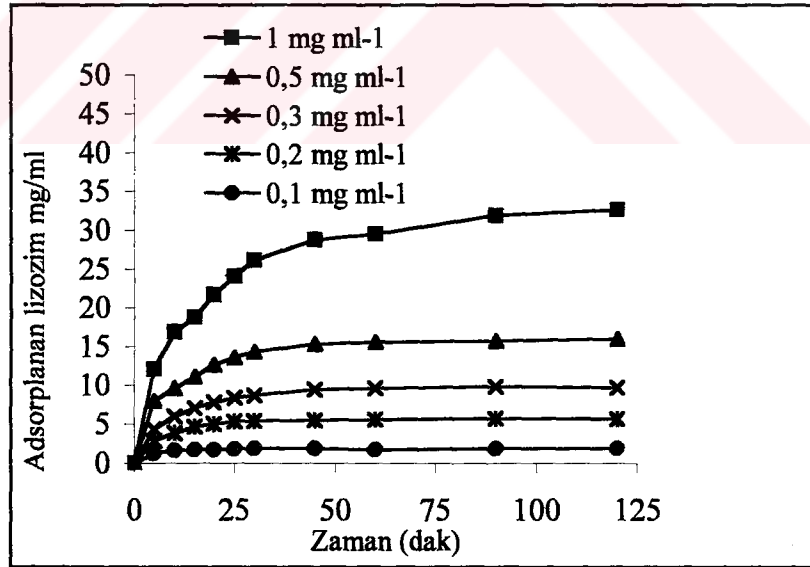
3.2.4. Adsorpsiyon Hızı

Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya-ligandları bağlanmış pHEMA membranlarına, lizozimin adsorpsiyon hızı Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de gösterildi. Şekillerden de görüldüğü gibi, her iki boya ligand bağlı membran için, adsorpsiyon işleminin başlangıcında hızlı bir adsorpsiyon gözlemlendi. Adsorpsiyon hızı, yaklaşık 60 dakikada plato değere ulaşmıştır. Diğer taraftan, adsorpsiyon ortamındaki lizozim derişimindeki artış, adsorpsiyon hızında da artışa neden olmuştur. Proteinin yüzeyinde sistein dizilerinin sınırlı sayıda olmasına karşın, yüzey histidin dizileri, afinite bölgelerini oluşturur. Lizozim yüzeyinde etkileşime girecek bir histidin yan grubunun, imidazol halkası bulunmaktadır. Lizozimin, boya-ligand bağlanmış membranlara bağlanması, bir iyon değişim etkileşimi ile gerçekleşmektedir. Ayrıca, boya-ligand bağlı membran ve lizozim arasındaki etkileşim aromatik yapılar tarafından da oluşturulan, hidrofobik etkileşimlerle de desteklenmektedir.

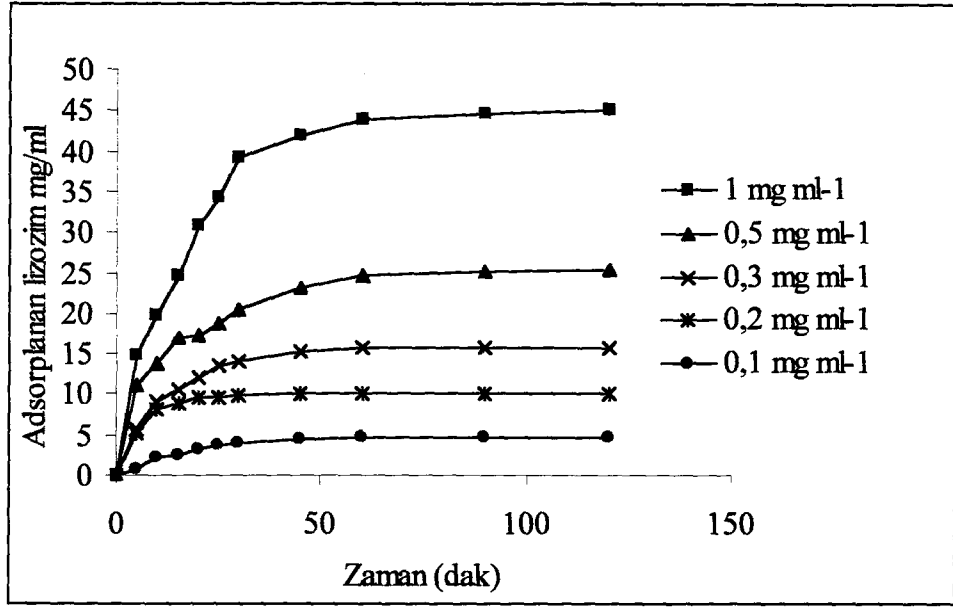
3.2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligandları tutuklanmış pHEMA membranlarının, lizozimin adsorpsiyon izotermi Şekil 3.13’de gösterilmiştir. Adsorpsiyon ortamındaki lizozim derişiminin artması ile boya ligand tutuklanmış membranlar tarafından adsorplanan lizozim miktarında artış gözlemlendi. 2.0 mg ml⁻¹’lik lizozim başlangıç derişiminde maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldı.

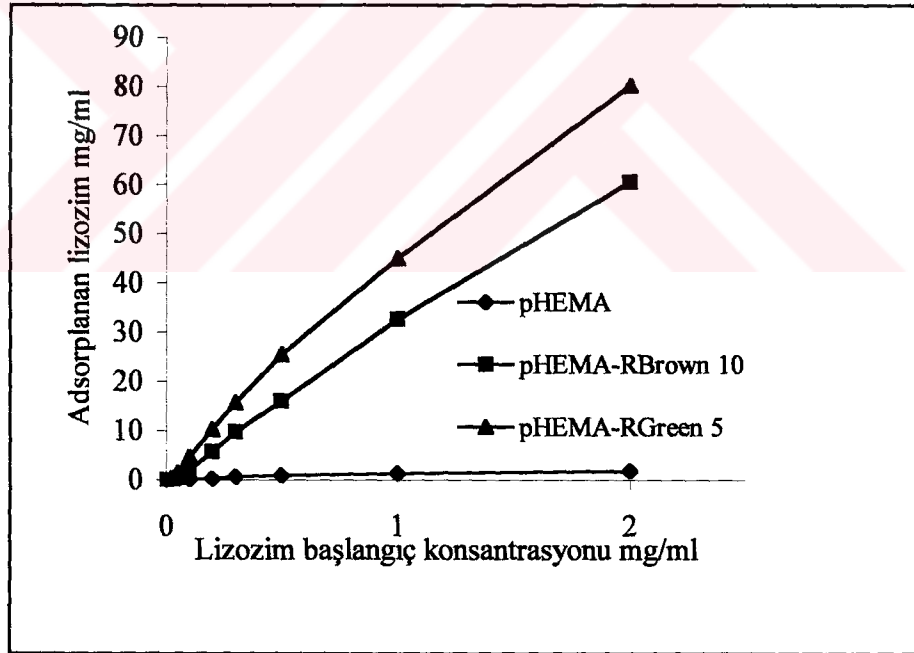
pHEMA membranları üzerine lizozimin adsorpsiyon miktarı, $1,87 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA'nın lizozim adsorpsiyonu ise sırasıyla $60,56$ ve $80,21 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. pHEMA membranının üzerine Reactive Brown 10 boya-ligandın tutuklanması lizozimin adsorpsiyonunda, yaklaşık olarak 32,4 katlık bir artış sağlamıştır. Reactive Green 5'in bağlanması ise yaklaşık 42,9 katlık bir artış sağlamıştır. pHEMA membranları tarafından nonspesifik olarak adsorplanan lizozim miktarı, ihmal edilebilir düzeyde bulundu. Lizozim, yüzeyinde bir histidin dizisine sahiptir, Bu yüzeyde açığa vurulan histidin amino asidinin yan imidazol halkası, afinite bölgelerini oluşturur. Lizozimin yüzeyinde tirozin, glutamik asit ve aspartik asitin varlığı baskın bir afinite bölgesi sağlamaktadır. Böylece protein üzerindeki bağlanma bölgelerinin sayısı, ligand-polimer yapısının etkileşimine bağlıdır.



Şekil 3.11. Reactive Brown 10 bağlı pHEMA membranlarının adsorpsiyon hızı



Şekil 3.12. Reactive Green 5 bağı pHEMA membranlarının adsorpsiyon hızı



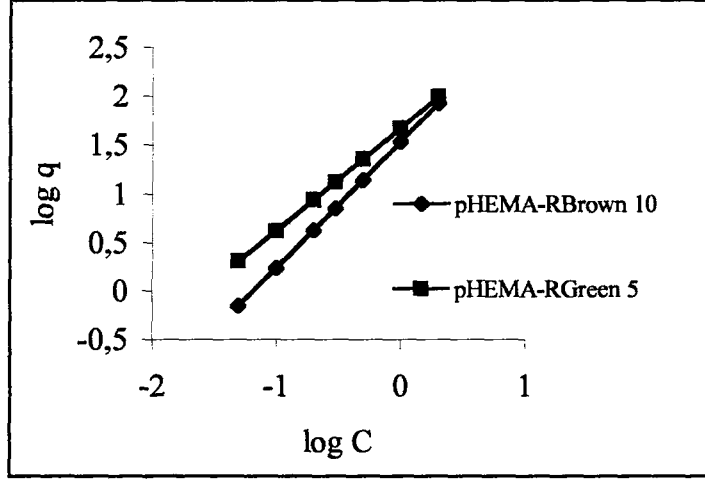
Şekil 3.13. Boya ligandı bağı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonuna başlangıç lizozim derişiminin etkisi

Lizozimin, boya ligand bağı pHEMA membranlarına adsorpsiyonunun, Langmuir, Freundlich ve Temkin izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı. Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli, homojen adsorpsiyonlar için kullanılır. Bu model, adsorplanan türler arasında etkileşimin olmadığı, yüzey kaplamanın tek tabakalı olduğu ve eşit dağılımlı adsorpsiyon bölgeleri için geçerlidir. Deneyle elde edilen sonuçlar, Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline uygulanarak, C/q 'ya karşı C grafiği ve Scatchard ($q-q/C$) grafiği çizildi ancak bir doğru elde edilemedi. Doğru elde edilememesi, pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunun, homojen olmadığını, heterojen olduğunu göstermektedir. Heterojen, çok tabakalı adsorpsiyonlar için Freundlich ve Temkin adsorpsiyon izoterm modelleri kullanılır. Deneysel sonuçların, Freundlich ($\log C - \log q$ grafiği çizilerek) modeline uygunluğu araştırıldı.

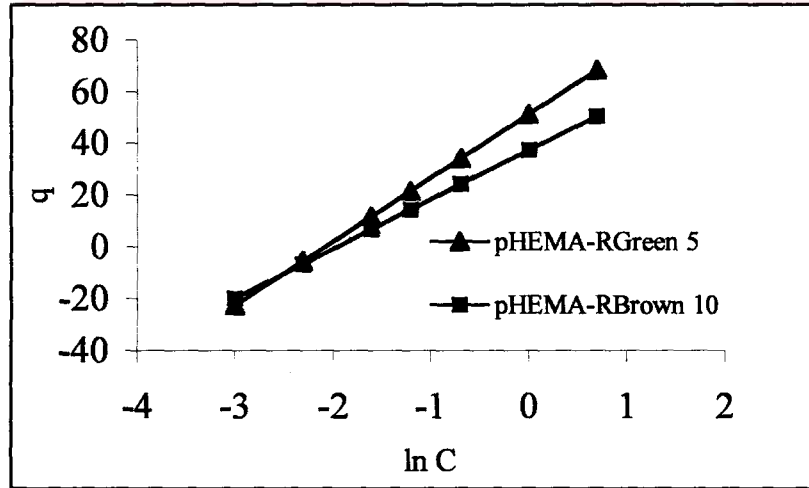
Reactive Brown 10 bağı pHEMA membranları için, 1 mg/ml başlangıç lizozim derişiminde $q = 32,64 \text{ mg ml}^{-1}$ ve elde edilen Freundlich parametreleri ise, $n=1,3$ ve $K_F = 34,12 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Reactive Green 5 bağı pHEMA membranları için ise $q = 45 \text{ mg ml}^{-1}$ ve $n= 1,01$ ve $K_F = 47,23 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). Freundlich grafiği Şekil 3.14'te verilmiştir.

Deney sonuçlarının Temkin modeline uygunluğu, $q - \ln C$ grafiği çizilerek ve Temkin adsorpsiyon sabiteleri bulunarak belirlendi (Şekil 3.15). Çizilen grafikten belirlenen K_T kullanılarak, ΔG_{\max} , maksimum bağlanma enerjisi ($K_T = \exp(-\Delta G_{\max} / RT)$) belirlendi. ΔS 'nin hesaplanması için, denklem üslü ifadeden kurtarılır. $\ln K_T$ 'ye karşılık $1/T$ grafiği çizilir (Şekil 3.16). Bu grafiğin eğimi $-\Delta H / R$ 'ye eşittir. Buradan ΔH bulunur ve $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 'den, ΔS hesaplanır. Araştırılan dört farklı

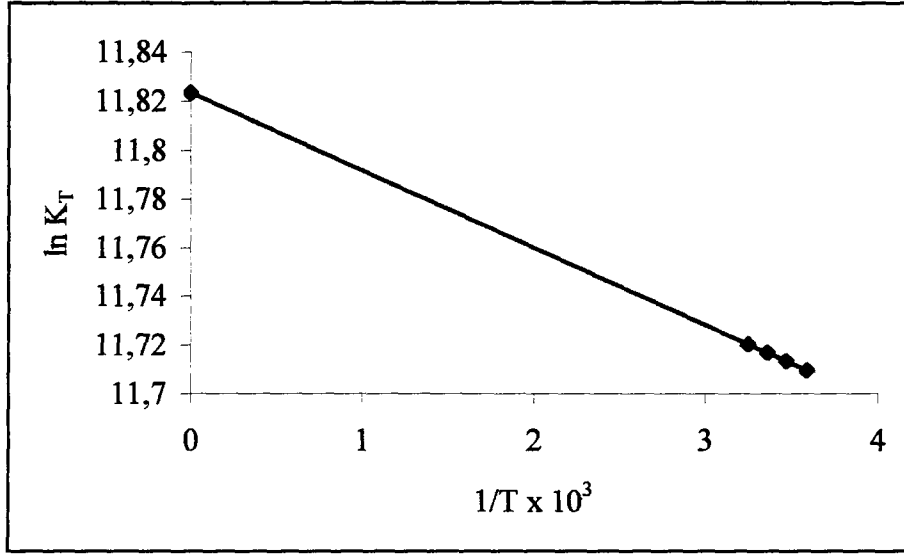
sıcaklık için elde edilen adsorpsiyon kapasitelerinin $\log C$ 'ye göre değişimleri Şekil 3.17'de verilmiştir. Hesaplanan bu değerler Çizelge 3.2'de sunulmuştur.



Şekil 3.14. Freundlich izoterm modelinin sorbentlerle elde edilen, deney sonuçlarına uygulanışı



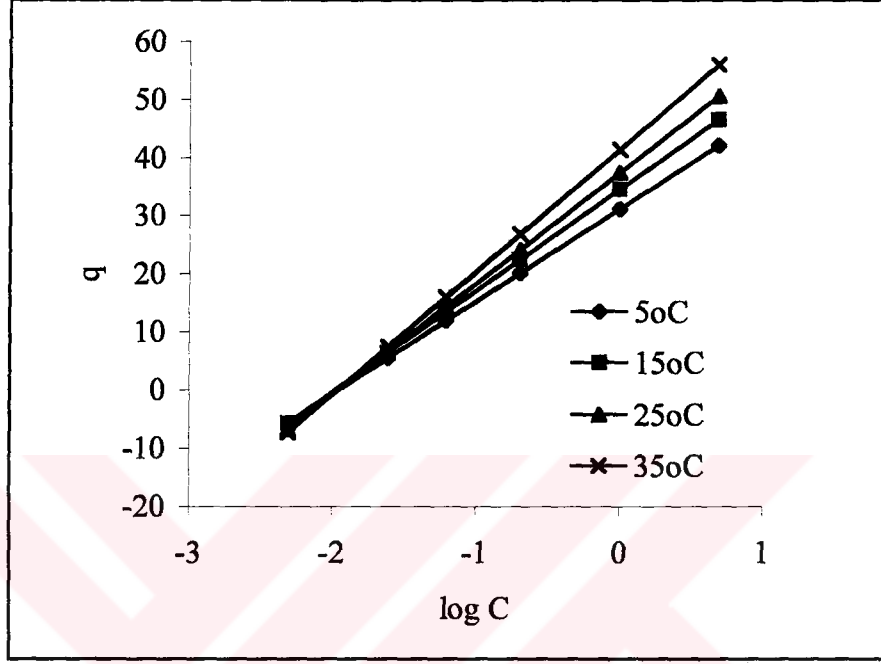
Şekil 3.15. Temkin adsorpsiyon izoterm modelinin sorbentlerle elde edilen deney sonuçlarına uygulanışı



Şekil 3.16. Reactive Brown 10 bağlı pHEMA membranları için çizilen ($\ln K_T - 1/T$) grafiği

Çizelge 3.1. Freundlich adsorpsiyon izoterm modelinin sabiteleri

Sorbentler	Freundlich Parametreleri		
	K_F (mg/ml)	n	R^2
pHEMA-Reactive Brown 10	34,12	1,3	0,984
pHEMA- Reactive Green 5	47,23	1,01	0,989



Şekil 3.17. Farklı sıcaklıklarda elde edilen adsorpsiyon kapasitelerinin $\log C$ 'ye göre değişimleri

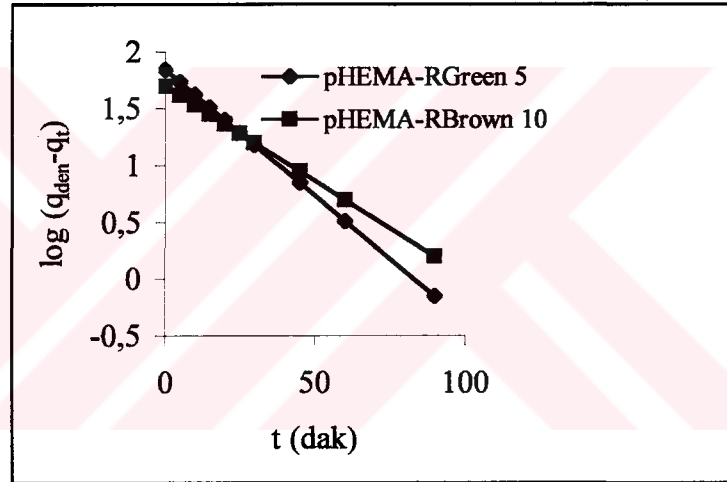
Çizelge.3.2. Temkin adsorpsiyon izoterm modelinin dört farklı sıcaklık için hesaplanan adsorpsiyon kapasiteleri ve Temkin parametreleri

Sorbent	T (°C)	Q _T	K _T (ml/mg)	ΔG (kJ/mol)
pHEMA Reactive Brown 10	5	15,94	7,0468	-27,07
	15	17,46	7,06	-28,05
	25	19,114	7,082	-29,03
	35	21,106	7,1136	-30,012

$$R^2 = 0,989, \Delta H = 264 \text{ J/mol}, \Delta S = 98 \text{ J/mol}$$

3.2.6. Adsorpsiyon Kinetikleri

Lizozimin boya ligand bağlanmış olan pHEMA membranları üzerine adsorpsiyon kinetiği, birinci ve ikinci dereceden kinetik modeller uygulanarak araştırıldı. Deney sonuçları, birinci dereceden kinetik modeline uygulanarak, Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligandı bağlı sorbentler için, $\log(q_{den} - q_t)$ değerleri hesaplandı. $\log(q_{den} - q_t)$ 'ye karşı t grafiği çizildi ve lineer doğrular elde edildi (Şekil 3.18).

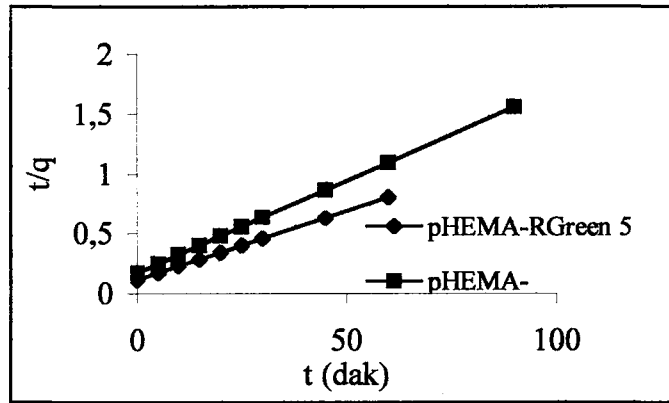


Şekil 3.18. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranları için birinci derece kinetiği

Deney sonuçlarından hesaplanan q değerleri ile birinci dereceden kinetik modelin uygulanması ile elde edilen teorik denge adsorpsiyon kapasiteleri (q_{den}) karşılaştırıldı. Her iki boya ligandı bağlı sorbentler için teorik denge adsorpsiyon

kapasitelerinin, deneysel adsorpsiyon kapasitelerinden daha düşük olduğu görüldü. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya ligandı bağlı membranların korelasyon katsayısı sırasıyla, 0,9928 ve 0,959 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı yüksek olmakla birlikte, adsorpsiyon kapasitelerinin yakın çıkmaması, adsorpsiyon sisteminin birinci dereceden kinetik modeli ile açıklanamayacağını göstermiştir.

Deney sonuçlarından hesaplanan adsorpsiyon kapasitelerinin, ikinci dereceden kinetik modeliyle elde edilen, denge adsorpsiyon kapasitelerine uygunluğu araştırıldı. Teorik olarak belirlenen denge adsorpsiyon kapasitesi (q_{den}) ile deneysel verilerden elde edilen denge adsorpsiyon kapasitesi (q) değerlerinin çok yakın olduğu gözlenmiştir. Birinci ve ikinci derece kinetik sabiteleri Çizelge 3.3’de gösterilmiştir. Şekil 3.19’da t/q ’ya karşı t grafiği gösterilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, lizozimin adsorpsiyonunu, ikinci dereceden kinetik model ile açıklamanın uygun olduğu düşünölmüştür.



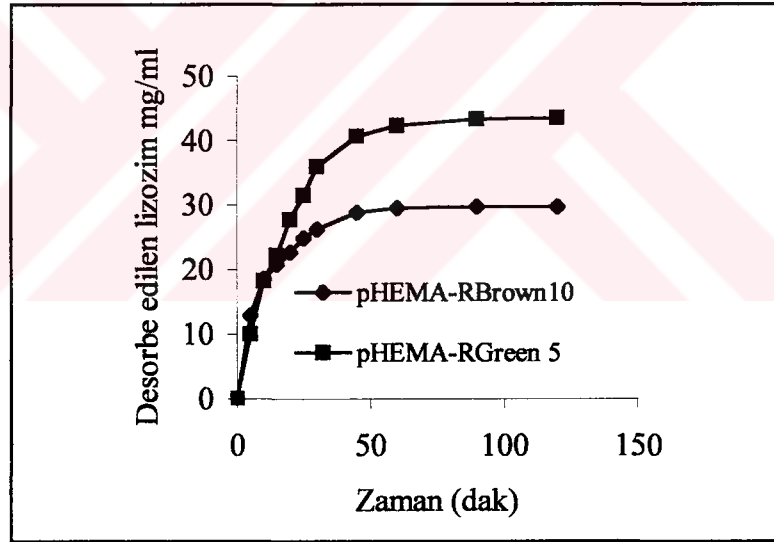
Şekil 3.19. Reactive Brown 10 ve Reactive Green5 bağlı pHEMA membranlarına lizozim adsorpsiyonunun ikinci derece kinetiğine uygulanması

Çizelge 3.3. Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarının lizozim adsorpsiyonunda birinci ve ikinci derece kinetik sabiteleri

Sorbentler	Deneysel denge adsorpsiyon kapasitesi		Birinci derece kinetik modeli			İkinci derece kinetik modeli		
	$Q_{deneyssel}$ ($mgml^{-1}$)	$Q_{deneyssel}$ ($mgml^{-1}$)	k_1 (dak^{-1})	Q_{denge} ($mgml^{-1}$)	R^2	k_2 $\times 10^{-3}$	$Q_{deneyssel}$ ($mgml^{-1}$)	R^2
pHEMA-Reactive Brown10	60,56	60,56	0,0385	50,21	0,9928	1,414	64,27	0,9927
pHEMA-Reactive Green 5	80,21	80,21	0,0511	69,98	0,959	1,179	86,96	0,9946

3.2.7. Lizozimin Desorpsiyonu

Boya-ligand bağı pHEMA membranlarına, sulu ortamdan adsorbe edilen lizozimin desorpsiyonu, kesikli sistemde çalışıldı. Lizozim yüklenmiş membranların desorpsiyonu için, 1M KSCN, pH 8,0 ortamında, 2 saat boyunca, 100 rpm'de devamlı karıştırılarak yapıldı. Reactive Green 5 bağı pHEMA membranlarına adsorbe edilen lizozimin % 100'ü ve Reactive Brown 10 bağı pHEMA membranlarına adsorbe edilen lizozimin ise %98'i geri kazanıldı. Şekil 3.20'de sorbentlerin desorpsiyonu gösterilmiştir.

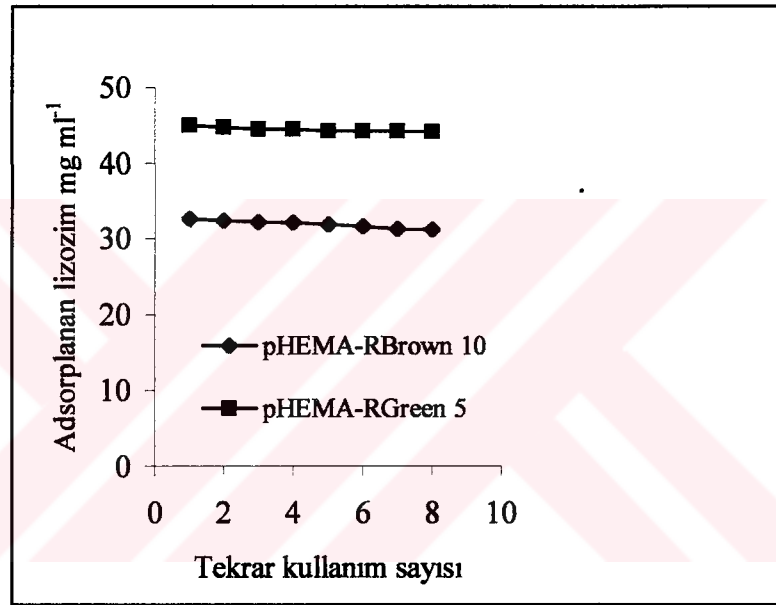


Şekil 3.20. Boya ligand bağı membranlara adsorplanan lizozimin desorpsiyonu

(1M, pH 8,0 KSCN, 2 saat, 100 rpm)

3.2.8. Tekrar Kullanılabilirlik

KSCN adsorbentler için uygun bir desorpsiyon ajanıdır ve tekrar kullanıma izin verir. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi, sekiz kere, aynı membranlar kullanılarak tekrarlandı. Boya tutuklanan membranların adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları sırasında, adsorpsiyon kapasitelerindeki değişim Şekil 3.21’de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. Sorbentlerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde adsorpsiyon kapasitesindeki değişim

3.3. Yumurta Akından Lizozim Adsorpsiyonu

Yumurta beyazından lizozimin adsorpsiyonu deneyleri için, yumurta beyazı 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. Adsorpsiyon işlemi yumurta beyazı çözeltisine, kontrol olarak pHEMA ve boya ligandı bağlı pHEMA membranları ile yapıldı. Deneyler toplam 7,5 ml hacimde, 25 °C'de ve 5 saat süreyle 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak gerçekleştirildi. Başlangıçtaki ve adsorpsiyondan sonraki yumurta akı çözeltisinde kalan lizozim miktarı, YBSK ile belirlendi. Desorpsiyon ajanı olarak, pH 8,0 , 1,0 M KSCN solüsyonu ve 0,5 M NaCl kullanıldı. 2 saat süreyle, 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak elüe edilen lizozimin saflığı yine YBSK ile belirlendi.

3.3.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışmaları

Adsorpsiyon solüsyonlarından, adsorpsiyondan önce ve adsorpsiyonun beşinci saatinde alınan örnekler, YBSK ile analiz edildi.

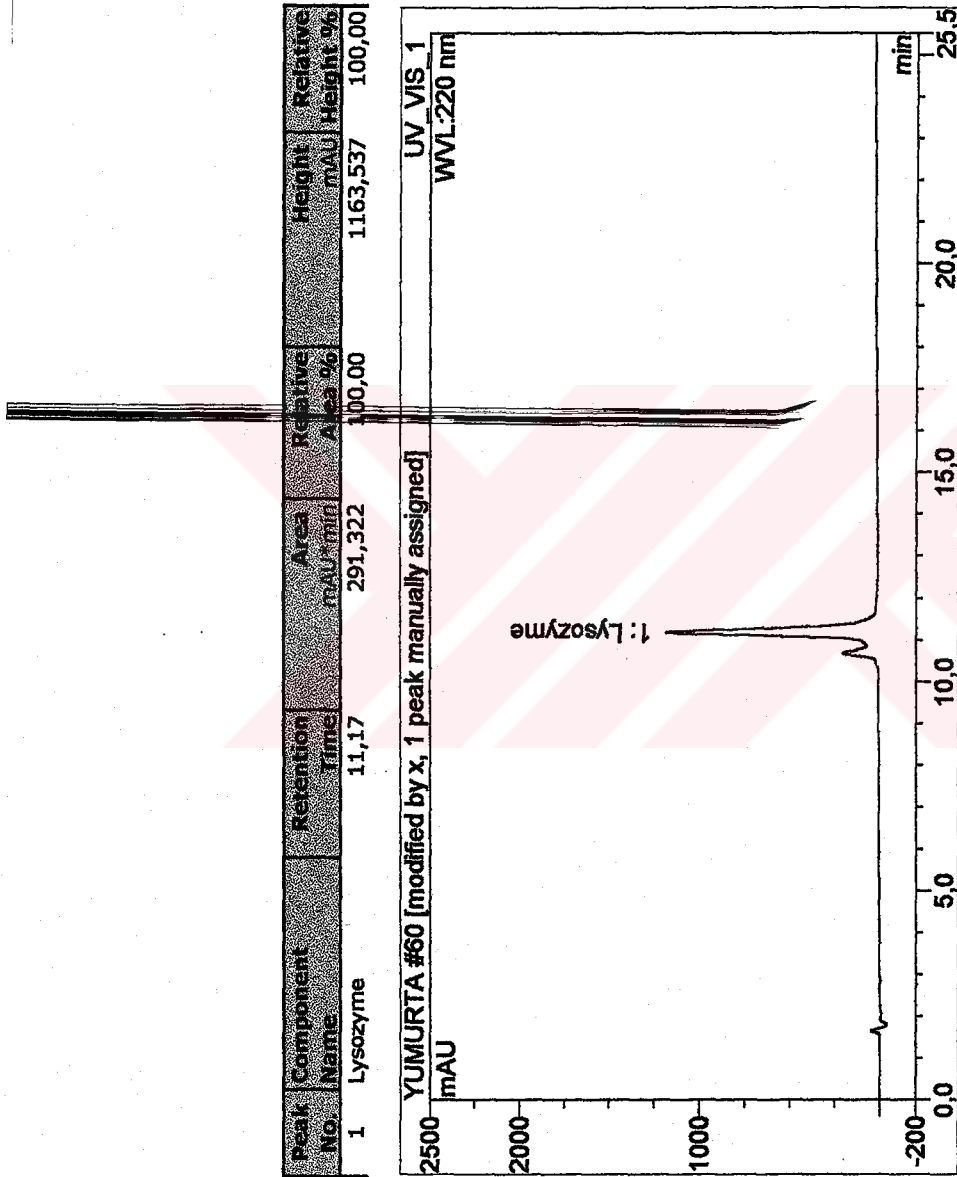
Hareketli fazın akış hızı 1 ml dakika⁻¹ olarak seçildi. Kolon fırın sıcaklığı 25°C ve enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlendi. 220 nm'de tayin edilen proteinin miktarı, kalibrasyon eğrilerinden Chromelleon veri programı kullanılarak hesaplandı.

Lizozimin alıkonma zamanının belirlenmesi için; sistem, standart lizozim çözeltileri ile kalibre edildi. Standart lizozim çözeltileri, derişimi 1-0,25 mg ml⁻¹ arasında olacak şekilde, 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Şekil 3.22'de 1mg ml⁻¹'lik standart lizozim solüsyonunun, YBSK ile elde edilen kromatogramıdır.

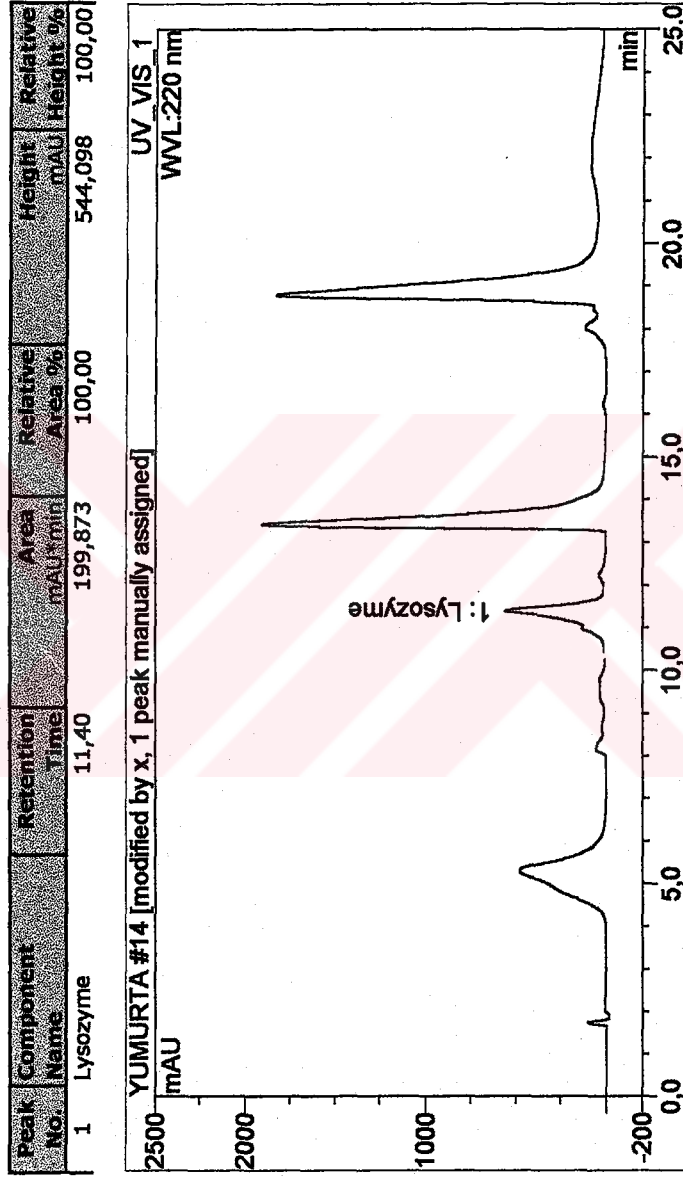
Standart solüsyonlardan, lizozim için dört değer kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak, yumurta akındaki başlangıç ve adsorpsiyon sonrası lizozim konsantrasyonları hesaplandı. Lizozimin alıkonma zamanı 11,36 dakika olarak bulundu.

Yumurta beyazının başlangıçta içerdiği lizozim miktarının belirlenmesi için, adsorpsiyon öncesinde alınan örnek yüklendi. Şekil 3.23’de yumurta akının kromatogramı gösterildi. Standart lizozim çözeltilerindeki, alıkonma zamanı ile karşılaştırılarak, yumurta akı çözeltilisindeki lizozim piki tespit edildi. Elde edilen lizozim pikinin integrasyonu yapılarak, pik alanı hesaplandı ve lizozimin başlangıç miktarı tayin edildi.

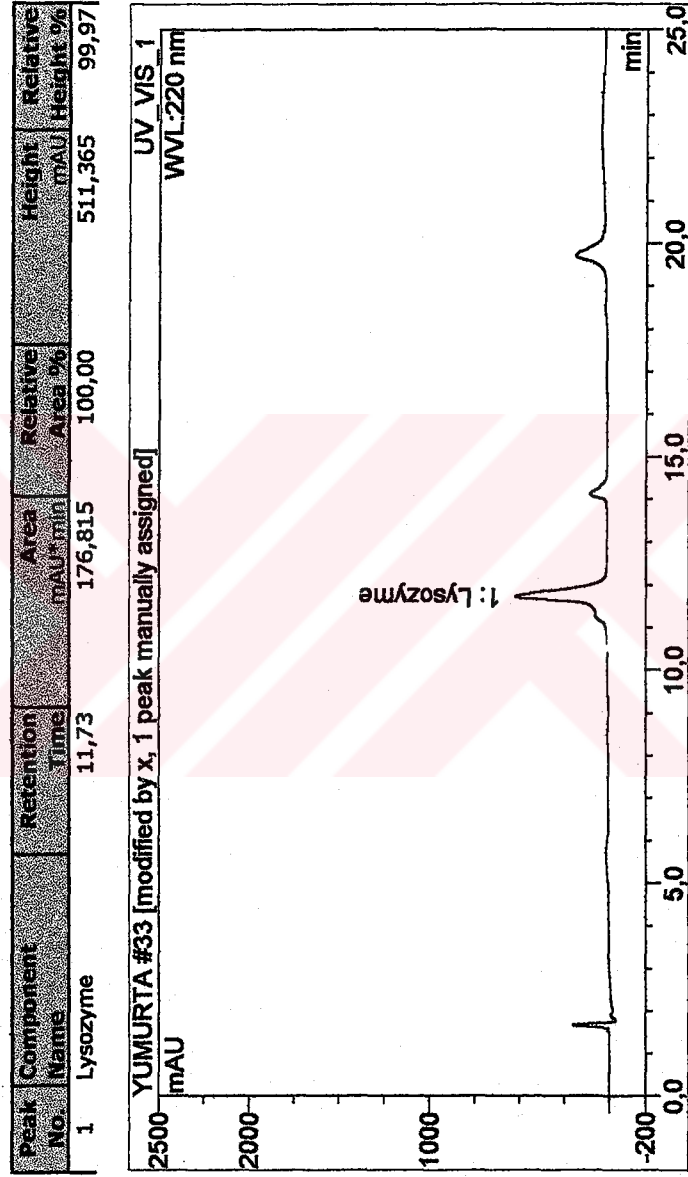
Yumurta beyazından, doğrudan adsorpsiyon deneyinde, Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 bağlı membranlar için, elde edilen adsorpsiyon sonuçları, Çizelge 3.4’te ve desorpsiyon sonuçları da Çizelge 3.5’te sunuldu. Şekil 3.24’te Reactive Green 5 bağlı sorbentlerle yapılan adsorpsiyon sonrasındaki elüsyon çözeltilisinin kromatogramı gösterildi. YBSK analizi ile, boya ligand bağlı membranlara spesifik olarak lizozimin adsorplandığı, nonspesifik bir adsorpsiyonun gerçekleşmediği görüldü.



Şekil 3.22. Standart 1 mg/ml lizozim solüsyonunun kromatogramı



Şekil 3.23. %50 oranında fosfat tamponuyla seyreltilmiş yumurta beyazının kromatogramı



Şekil 3.24. Reactive Green 5 bağlı pHEMA membranlarından lizozimin elüsyonunun kromatogramı

Çizelge 3.4. Yumurta beyazından doğrudan lizozim adsorpsiyon deneyi sonuçları

Sorbentler	Başlangıç Miktarı (mg/ml)	Lizozim	Membrana Adsorplanan Lizozim Miktarı (mg/ml)	Lizozimin akından oranı (%)	yumurta saflaştırma
pHEMA	1,07		0,048	4,49	
pHEMA-Reactive Brown 10	1,07		0,732	63,4	
pHEMA-Reactive Green 5	1,07		0,826	77,2	

Çizelge 3.5. Yumurta beyazından doğrudan lizozim adsorpsiyon deneyinde desorpsiyon sonuçları

Sorbentler	Membrana Adsorplanan Lizozim Miktarı (mg/ml)	Elüe Lizozim Miktarı (mg/ml)	Edilen Lizozim Miktarı	%Desorpsiyon	
				Oranı	Oranı
pHEMA	0,048	0,042		88	-
pHEMA-Reactive Brown 10	0,732	0,615		84	98
pHEMA-Reactive Green 5	0,826	0,819		99	100

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

pHEMA membranları, azot atmosferinde, UV ışığında fotopolimerizasyon yöntemi⁽⁸⁸⁾ ile hazırlandı. Başlatıcı olarak AIBN kullanılan 2-hidroksietil metakrilat monomeri ile karıştırıldı. Azot atmosferinde, UV ışığı altında, 1 saat süre ile oda sıcaklığında membranlar sentezlendi.

pHEMA, hidrofilik yapıdaki bir polimerdir. Yüksek mekanik ve kimyasal dayanıklılığa sahiptir. Destek malzemesi olarak kullanılan polimerlerin çoğu doğal polisakkaritlerdir. Agaroz, dekstran ve selüloz türevli destek malzemeleri, ucuz ve kolay elde edilebilir olmakla birlikte, zayıf bir mekanik güce sahiptirler⁽⁸⁹⁾. pHEMA membranı gözenekli ve hidrofilik bir yapı göstermektedir. Gözenekli yapı, adsorpsiyon alanı için geniş bir yüzey alanı sunar.

Boya ligand olarak kullanılan Reactive Green 5 ve Reactive Brown 10 boyları polimerizasyon işleminden sonra kovalent olarak membrana bağlandı ve membrana bağlanan boya ligandı faz konsantrasyonunun sırasıyla 0,361 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ve 0,285 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ olduğu bulundu.

Reactive Brown 10 ve Reactive Green 5 boya-ligand bağlanmış membranların lizozim adsorpsiyon kapasitesi, sırasıyla 60,56 ve 80,21 mg ml^{-1} olarak belirlendi, kontrol pHEMA membranlarına göre, sırasıyla 32,4 ile 42,9 kat civarında bir artış görüldü. Literatürde boya-ligand afinite kromatografisi çalışmaları yapılmıştır.

Denizli ve arkadaşları⁽⁹⁰⁾, Cibacron Blue F3GA tutuklanmış pHEMA membran üstündeki $135 \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik lizozimin adsorbe edildiğini rapor etmişlerdir. Ratnayake ve Regnier⁽⁹¹⁾, akrilat aşılınmış silika membrana dayalı, adsorbentlerin üstüne 12,2-21,6 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik lizozimin adsorbe olduğunu sunmuştur. Finette ve arkadaşları⁽⁹²⁾, Cibacron Blue F3GA tutuklanmış gözenekli silika ile $30 \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik lizozimin adsorbe edildiğini rapor etmişlerdir. Buijs ve Hlady⁽⁹³⁾ kuaterner aminopropil dimethylsilyl metillendirilmiş silika ile $4-25 \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik bir adsorpsiyon kapasitesine ulaşmayı başarmışlardır. Champluvier ve Kula⁽⁹⁴⁾, yaptıkları deneylerde, pseudo-afinite adsorbentleri olarak mikrofiltrasyon membran kullanmış ve Cibacron Blue F3GA, Procion Blue MX 5B ve Procion Red HE3B gibi farklı boyalar içeren ultipor membran ile $78-122 \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik adsorpsiyon kapasitelerine ulaşmayı başardılar. Tennikova ve arkadaşları⁽⁹⁵⁾, sülfon ile modifiye edilmiş poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) makro gözenekli polimerik membran ile $260 \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik lizozimin adsorbe edildiğini rapor etmişlerdir. Ruckenstein ve Zeng⁽⁹⁶⁾, lizozimin, bir lizozim ve ovalbumin karışımından ayrılması için makrogözenekli kitin afinite membranı kullanmışlar ve 50 mg ml^{-1} 'lik bir adsorpsiyon kapasitesini sağlamayı başarmışlardır. Nash ve Chase⁽⁹⁷⁾, modifiye poli(stiren-divinil benzen) ve Procion Yellow HE-3G ekli poli(vinil alkol)'ün lizozim adsorpsiyon kapasitesinin, $0,01-0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ mertebesinde olduğunu rapor etmişlerdir. Arıca ve arkadaşları⁽⁹⁸⁾, Procion Green H-4EBD bağlı pHEMA membran üzerine lizozim adsorpsiyon kapasitesini, $13,33 \text{ mg/ml}$ olarak bildirdiler.

Literatürdeki yumurta beyazından doğrudan lizozim adsorpsiyonu çalışmalarından, Ahvenainen ve arkadaşları⁽⁹⁹⁾, Duolite C-464 kullanarak, yumurta akından % 95-98 verimle, lizozim adsorbe etmiştir. Li-Chan ve arkadaşları⁽¹⁰⁰⁾,

Duolite C-464 adsorbentini kullanarak $8,3 \text{ g l}^{-1}$ lizozim adsorpsiyon kapasitesini ve $1,5 \text{ g l}^{-1}$ lizozim elüsyonunu sağlamışlardır. Ming ve arkadaşları⁽¹⁰¹⁾, Productiv™ CM kolonu kullanmışlar ve 45 g l^{-1} adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir. Grasselli ve arkadaşları⁽¹⁰²⁾, Red HE-3B bağlanmış hollow fiber kullanarak, $7,5 \text{ g l}^{-1}$ adsorpsiyon kapasitesine ve 1 g l^{-1} lizozim elüsyonuna ulaşmışlardır. Owen ve Chase⁽¹⁰³⁾, polivinilalkol ile kaplanmış bir perfluorokarbon matrise bağlanmış Red HE-7B kullanmışlar ve % 90,5 verimle lizozim elde etmişlerdir.

Reactive Green 5 boyası, kromofor fitalosiyanın grubu ve yedi asidik sülfon grubu ve üç sekonder amino grubuna (oranı 7:3) sahip bir boyadır. Ayrıca yapısındaki fitalosiyanın grubunda, Cu(II) iyonu taşımaktadır. Lizozimin, histidin kalıntısındaki imidazol halkasındaki azot ile sistein kalıntısındaki -SH gruplarının, yumuşak Lewis asiti olan Cu(II) iyonu ile etkileşime girdiği düşünülmektedir. Adsorpsiyonda ayrıca lizozimin hidrofobik yan gruplarının, boyanın aromatik gruplarıyla, hidrofobik etkileşimin de rolü olduğu düşünülmüştür.

Procion Brown MX 5 BR boyası, sülfon, karboksil, hidroksil ve iki sekonder amino grubuna sahiptir. Ayrıca Cr(II) iyonu da şelatlanmıştır. Lizozim molekülünün yüzey erişilebilir yan grupları, bir histidin, dört aspartik asit, iki glutamik asit, iki tirozin, sekiz sistein artığıdır. Bu amino asit artıkları aynı zamanda Cr(II) iyonuyla etkileşebilir. Metal koordinasyonu ve iyon değişim etkileşimleri, lizozimin adsorpsiyonunda rol oynamaktadırlar.

Membranlara adsorplanan lizozim pH 8,0 , 1 M KSCN desorpsiyon ajanı kullanılarak % 98 oranında geri kazanılabildi. Membranların, hedef bir proteini, biyolojik sıvılardan, yüksek bir kapasite ile ayırma gücüne sahip olduğunu gösterdi.

Sulu solüsyondan lizozim adsorpsiyonu çalışmalarından sonra, yumurta beyazından, doğrudan lizozim adsorpsiyon davranışı incelendi. Yumurta beyazının viskozitesi yüksektir. Bundan dolayı, kütle transfer direnci yüksektir ve dolayısıyla etkili lizozim adsorpsiyonu için uzun temas süreleri gerekmektedir⁽⁸⁶⁾. Bu sebeple, adsorpsiyon deneyinde, yumurta beyazı % 25 oranında fosfat tamponu ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Yumurta beyazından adsorbe edilen lizozim miktarı ve sorbentlerden desorbe edilen lizozim miktarları, YBSK analizi ile tespit edildi.

Tavuk yumurtası beyazı, lizozim için esas kaynaktır⁽⁸²⁾. Yumurta beyazı proteinleri arasında lizozim, % 3,5'luk bir oranı teşkil etmektedir. Yumurta beyazındaki protein kompozisyonunda avidin, ovalbumin ve konalbumin yer almaktadır.

Literatürde yumurta beyazından, boya-ligand afinite kromatografisi yanında farklı tekniklerle de lizozim adsorpsiyonu çalışılmıştır. Klasik lizozim hazırlanması, yumurta beyazından, pH 9,5'ta % 5'lik NaCl çözeltisinin eklenmesiyle doğrudan kristallendirme yöntemini içerir. Bu şekilde lizozim kazanımı % 60-80 civarında olmaktadır. Bununla birlikte, muamele gören yumurta akının işlevselliği de hasara uğramaktadır. Bu sakıncayı bertaraf etmek için, yumurta akından lizozim ayrımı, ultrafiltrasyonla, iyon değiştiricilerle ya da afinite kromatografisi ile yapılmaktadır.

Lizozim, ovalbumin ve konalbumin, iyon değiştirme kolon kromatografisi kullanılarak, tek basamaklı işlemle saflaştırılmıştır. Fakat yöntemlerin çoğunun, yumurta beyazını yıkıcı, parçalayıcı bir ön muameleyi gerektirdiği, kolon kirlenmesinden ve engellemesinden kaçınmak için de seyreltmeye ihtiyaç duyulduğu rapor edilmiştir⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾.

Yumurta beyazından, kolon iyon değiştirme kromatografisi ile doğrudan lizozim geri kazanımını içeren, sadece bir kaç yöntem yayınlanmıştır^(107,108). Yüksek derişimlerde ve geleneksel belirli materyallerden daha yüksek akış hızlarında kullanılabilen, işletilebilen yeni bir reçine, son zamanlarda, distile suyla % 25'e kadar seyreltilmiş yumurta beyazına başarılı Şekilde uygulanmıştır⁽¹⁰⁹⁾.

Boya afinite kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisine alternatif bir tekniktir. Bu yöntem, protein pseudobiyospesifik etkileşimin üstünlüğüne sahiptir ve aynı zamanda geniş ölçekli işlemler için, geleneksel afinite ve immünoafinite kromatografisi açısından; düşük maliyet ve reaktif boyaların erişilebilirliği, biyolojik ve kimyasal değredasyona dayanıklılık ve kolay tutuklanma gibi sayısız stnlkler sunmaktadır^(110,111).

Eczacılıkta ve besin endüstrisinde, lizozimin uygulamaları için artan bir potansiyel, lizozim üretimi için basit ve etkili bir yöntemin ivedilikle geliştirilmesini gerektirmiştir. Lizozimle ilgili devam eden araştırmalar, bu enzimin geniş ölçeklerde izolasyonu için ticarî metotların gelişimini teşvik edecektir. Lizozim içermesi yanında, yumurta beyazı, Őekerleme imalatı için ticarî olarak çok önemlidir. Bundan dolayı, lizozim ayırımının, yumurta beyazının fonksiyonel özelliklerine geri dönüşümüne izin vermesi önemlidir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde, lizozimin ayrılması için, boya-ligand kromatografisinin kullanılmasının, diğer yöntemlere kıyasla, daha düşük maliyet ve daha az zaman aldığı grlmektedir. Destek materyali olarak membran formunun tercih edilmesi, difüzyon direncini düşürdüğü gibi, geniş yüzey alanı sağlaması bakımından da adsorpsiyon kapasitesini arttırmıştır. Boya ligand

afinite kromatografisi, lizozimin elüsyon kolaylığı, elüe edilen lizozim miktarı, lizozimin saflığı gibi özellikler bakımından, olumlu sonuçlar sağlamıştır.

Bu çalışma ile yumurta beyazı gibi viskozitesi yüksek besin maddelerinden proteinlerin doğrudan ayrımı için, boya afinite membranlarının kullanımının uygun olduğu gösterilmiştir.



KAYNAKLAR

1. P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, Proc. Natl. Acad. Sci., **61**, 636 (1968).
2. J. Carlsson, J.-C. Janson, M. Sparrman, Protein Purification VCH Publishers, Inc., New York, Weinheim, Cambridge, (1989).
3. H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, J. Biochemical Biophysical Methods, **49**,199-240, (2001).
4. L. Miribel, E. Gianazza, P. Arnaud, Journal of Biochem Biophys Met, **16**, 1, (1988).
5. N.E. Labrou, Molecular Biotechnology, **20**, 77, (2002).
6. J. Kaminska, J. Dzieciol, J. Koscielak, Glycoconjugate Journal, **16**, 719, (1999).
7. C.R. Lowe, S. J. Burton, N. P. Burton, W. K. Alderton, J. M. Pitts, J. A. Thomas, Tibtech December, **10**, 442, (1992).
8. S.Y. Suen, R.L. Chen, Y.D. Tsai, J. Liq. Chromatogr. Relat Technol., **23**, 223, (2000).
9. N. E. Labrou, E. Eliopoulos, Y.D. Clonis, Biochem J. **315**, 695, (1996).
10. S. Brandt, R.A. Goffe, S.B: Kessler, J.L.O'Connor, S.E.Zale, Biotechnology, **6**, 779,(1988).
11. M.Y. Arıca, A. Denizli, B.Salih, E.Pişkin, V.Hasırcı, J. Membr Sci, **129**, 65,(1997).
12. M.Y. Arıca, J. Appl. Polym. Sci., **77**, 2000, (2000).
13. M.Y.Arıca, H.N. Testereci, A.Denizli, J. Chromatogr. A., **799**, 83, (1998).
14. N. Pazarlıoğlu, Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler s.128, Kuşadası, Tırkiye, 2000.

15. A. Seidman, C.J. Moore, Basic Laboratory Methods for Biotechnology, Textbook and Laboratory Reference, Prentice Hall, UK, (2000).
16. F. Colin, Poole, Journal of Chromatography A, **856**: 1-2: 399-427, (1999).
17. F.E. Regnier, Nature, **350**, 634, (1991).
18. R. K. Scopes, J. Chromatogr. **376**, 131, (1986).
19. G. Ghielmetti, C. Trinhere, Lysozyme production from egg white. Brit Pat 11104666, (1968).
20. Kevin Yip, Introduction to Biochemical Engineering, 1997.
21. Y.Sarıkaya, Fizikokimya, Gazi Büro Kitabevi, Ankara 1993.
22. M. Saçak, Kimyasal Kinetik, Gazi Kitabevi, Ankara 2002.
23. N.E. Labrou, Y.D. Clonis, Arch. Biochem. Biophys. **365**, 17, (1999).
24. S. Subramanian, Arch. Biochem. Biophys. **216**, 116-125, (1982).
25. C.R. Lowe, S.J. Burton, J. Pearson, Y.D. Clonis, C.V. Stead, Design and application of biomimetic dyes in biotechnology. J Chromatogr., **376**, 121-126, (1986).
26. G.E. McCrcath, H.A.Chase, R.O. Owen, C.R. Lowe, **48**, 341-354, (1995).
27. J. Salnikow, Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler, s.194, Kuşadası, Türkiye,(2000).
28. A. Denizli, E. Pişkin, J. Biochem. Biophys. Methods **49**, 391, (2001).
29. H.A.Chase, Tibtech August **12**, 296, (1994).
30. J. Kohn, M. Wilchek, Appl. Biochem. Biotechnol. **9**, 285, (1984).
31. W.C. Lee, C. H. Chen, J. Biochem. Biophys. Methods **49**, 63, (2001).
32. N. E. Labrou, E. Eliopoulos, Y.D. Clonis, Biochem J. **315**, 687, (1996).
33. K. Sproule, p. Marrill, J.C. Pearson, S.J.Burton, New Strategy for the design of ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography, (2000).

34. N. Garg, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *J. Mol Recognit*, **9**, 259, (1996).
35. R.O. Owen, G.E: McCreath, H.A. Chase, *Biotechnol Bioeng* **53**, 427, (1997).
36. A. Denizli, G. Köktürk, H. Yavuz, E. Pişkin, *React Funct Polym* **40**, 195, (1999).
37. S.A.Camperi, M. Grasselli, O. Cascone, *Biotechnol Tech* **10**, 211, (1996).
38. T. Zhang, H. Liu, J. Chen, *Sep Sci Technol* **35**, 143, (2000).
39. E. Ruckenstein, X.F. Zeng, *J Membr Sci.*, **142** ,13-26, (1998).
40. J. Thömmes, MR. Kula, *Biotechnol Prog* **11**, 357, (1995).
41. M. Kamihira, R. Kaul, B. Mattiasson, *Biotechnol Bioeng* **40**, 1381, (1992).
42. R. K. Scopes, *Analytical Biochemistry* **165**, 235, (1987).
43. H. A. Chase *Journal of Chromatography*, **297**, 179, (1984).
44. H.A. Chase, Adsorption separation processes for protein purification. In: Mizrahi A, editor. *Downstream processes: equipment and techniques*. London: Alan R. Liss. p.159-204, (1988).
45. W. Noppe, I. Hanssens, M.D. Cuuper, *J Chromatogr A* **719**, 327, (1996).
46. H.A. Chase, N.M. Draeger, *J. Chromatogr.*, **597**, 129, (1992).
47. J. Thommes, M. Halfar, S. Lenz, M.R: Kula, *Biotechnol Bioeng*, **45**, 205, (1995).
48. M. Costaferrreira, J.C. Duarte, *J. Chromatogr.*, **539**, 507, (1991).
49. F. Charton, R.M.Nicoud, *J. Chromatogr.A*, **702**, 97, (1995).
50. N.F. Gordon, H.Tsujimura, C.L. Cooney, *Bioseparation*, **1**, 9, (1990).
51. S.F: Teng, K.Sproule, A. Husain, C.R.Lowe, *J. Chromatogr. B*, **740**, 1, (2000).
52. R. Axen, J. Porath, S. Ernback, *Nature*, **214**, 1302, (1967).
53. L. Sundberg, J. Porath, *J. Chromatogr.*, **90**, 87, (1974).
54. J. Turkova, J. Vajcner, D. Vancurova, J. Stamberg, *Collect Czech Chem Commun*, **44**, 3411, (1979).

55. P.J.Neame, J. Parikh, *Appl Biochem Biotechnol*, **7**, 295, (1982).
56. W. H. Scouten, *Affinity chromatography*, New York: Wiley, 1981.
57. E. Klein, *Affinity Membranes*, New York, Wiley, 1991.
58. T.M. Phillips, *Analytical techniques in immunochemistry*, New York, Marcel Dekker, 1992.
59. F. Ahmed and K.D. Cole, *Separation and Purification Methods*, **29**, 1, (2000).
60. C. Jones, A.Patel, S. Griffin, J. Martin, P.Young, K.O'Donnell, C.Silverman, T.Porter, I.M Chaiken, *J. Chromatogr.A* , **707**, 3, (1995).
61. Y.D. Clonis, N.E. Labrou, V.Ph. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis, G. Gogolas, *Journal of Chromatography A* , **891**, 33-44, (2000).
62. N.E. Labrou, E. Eliopoulos, Y.D. Clonis, *Biotech Bioeng.* **63**, 322,(1999).
63. N.E. Labrou, Y.D. Clonis, *Arch. Biochem. Biophys.* **365**,17 (1995).
64. K.Sproule, P. Morrill, J.C. Pearson, S.J. Burton, K.R. Hejnaes, H. Valore, S. Ludvigsen, C.R:Lowe, *J.Chromatogr. B* **740**, 17, (2000).
65. E.V. Groman M. Wilchek, *Trends Biotechnol.*, **5**, 220, (1987).
66. R.N. Narayanan, L.J. Crane, *Trends Biotechnol.*, **8**, 12, (1990).
67. H.H. Weetall, *Adv, Mol. Cell Biol.*, **15A**, 161, (1996)
68. D.J. O'Shannessy, W.L. Hoffman, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**, 488, (1987).
69. A.Murayama, K.Shimada, T. Yamamoto, *Immunochem.*, **15**, 523, (1978).
70. I. West, O. Goldrind, *Mol. Biotechnol.*, **2**, 147, (1994).
71. H.W.Jarrett, *J.Chromatogr.*, **618**, 315, (1993).
72. Y.D. Clonis, T. Atkinson, S.J. Burton, C.R. Lowe, *Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology*, Stockton Pres, New York, 1987.
73. K. Mosbach, O. Ramström, *Biotechnol.* **14**, 163, (1996).
74. Porath, K.D. Caldwell, *J.Chromat.* **133**, 180 , (1977).

75. M.Y. Arıca, V. Hasırıcı, *Biomaterials*, **8**, 489-495, (1987).
76. WH Freeman ve Stryer, L. *Biochemistry*. Co. New York 1995.
77. Y. Matsushima, T. Miyazaki, and S. Kasai, *Nature*. Chemical Evidence for the Phillips Model of the Action of Hen Egg White Lysozyme, July, (1969).
78. C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, and V. R. Sarma, *Nature*. Structure of Hen-Egg White Lysozyme. May (1965).
79. R. Diamond, D.C. Phillips, C.C.F. Blake, A.C. North, Protein Data Bank Structure Explorer-6LYZ, Real-Space Refinement of the Structure of Hen Egg White Lysozyme. February (1975).
80. Garrett and Grisham, *Biochemistry*, 446-451,(1995).
81. D. M. Chipman, and N. Sharon, *Science*. Mechanism of Lysozyme Action, Aug (1969).
82. G. Alderton, W.H. Ward, H.L. Fevold, *J. Biol chem* 164, 1 , (1964)
83. L. S. Reid, Canada Patent 221046, 1987.
84. V. Procton, F.E. Cunningham, *CRC Critical Rew in Food Sci and Nutr* 26, 359, (1988).
85. R. Giangiacomo, F. Nigro, G. Messina, T.M.P. Cattaneo, *Food Additives and Contaminants* **9**, 427, (1992).
86. M. Grasselli, O. Cascone, *Neth Milk Dairy J.* **50**, 551, (1996).
87. G. Bayramoğlu, M.Y. Arıca, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **202**, 41, (2002).
88. M.Y. Arıca, A. Denizli, *Separation Science & Technology*, **35**, 2243, (2000).
89. S.Şenel, R.Say, M.Y.Arıca, A.Denizli, *Coloids Surfaces A* 182, 161, (2001).
90. A. Denizli, S.Şenel, M.Y.Arıca, *Colloids Surf. B* 11, 113, (1998).
91. C.K. Ratnayake, F.E. Regnier, *J. Chromatography. A*, **743**, 25, (1996).

92. G.M.S. Finette, Q.M. Mao, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr. A* **763**, 71, (1997).
93. J. Buijs, V. Hlady, *J. Colloid Interface Sci.* **190**, 171, (1997).
94. B. Champluvier, M.R. Kula, *J. Chromatogr. A.*, **539**, 315, (1991).
95. T.B. Tennikova, M. Bleha, F. Svec, T.V. Almazova, B.G. Belenkii, *J.Chromatogr.A*, **555**, 97, (1991).
96. E. Ruckenstein, X.Zeng, *J. Membr. Sci.* **142**, 13, (1998).
97. D.C. Nash, H.A. Chase, *J. Chromatogr. A* **776**, 65, (1997).
98. M.H.Hasnaoui, M. Debbia, S. Cochet, J.P. Cartron, P. Lambin, O. Bertrand, *J. Chromatogr. A* **766**, 49-60, (1997).
99. R. Ahvenainen, M. Heikonen, M. Kreula, M. Linko, P. Linko, *Food Process Engr*, **2**, 301, (1980).
100. E. L. Chan, S. Nakai, J. Sim, D.B. Bragg, K.V. Lo, *Journal of food Science* **51**, 4, 1032, (1986).
101. F. Ming, J. Howell, F. Acosta, J. Hubble, *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 1086, (1993).
102. M. Grasselli, S. A. Camperi, A.A. Navarro Canizo, O. Cascone, *J. Sci Food Agric* **79**, 333, (1999).
103. R. O. Owen, H.A. Chase, *Journal of Chromatography A*, **757**, 41, (1997).
104. I. Lane, M.L. Kosciely, P.R. Levison, D.W. Toome, E.T. Butts, *Bioseparation* **1**, 141, (1990).
105. P.R. Levison, D.W:Toome, S.E. Badger, B.N.Brook, D. Carcary, *Chromatography* **28**,170, (1987).
106. P.R. Levison, S.E. Badger, D.W:Toome, D. Carcary, E.T. Butts, *Studies on the use of anion-exchange cellulose at process-scale, in Advances in Separation*

Processes, Institution of Chemical Engineers, Hemisphere Publishing, UK, 1990.

107. G. Alderton, W.H. Ward, H.L. Fevold, *J. Biochem* **157**, 143, (1945).
108. T. D. Durance, S. Nakai, *J Food Sci* **53**, 1096, (1988).
109. F. Ming, J.A. Howell, *Bioseparation* **2**, 289, (1992).
110. R.K. Scopes, *Protein Purification, Principles & Practice*, Springer-Verlag, New York, (1982).
111. P.M. Boyer, J.T. Tsu, *Adv Biochem Eng Biotechn* **49**, 1, (1993).

