



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**Cu²⁺ TAKILI O-KARBOKSİMETİL KİTOSAN SCHİFF BAZI
KOMPLEKSLERİ GÖMÜLÜ KOMPOZİT MEMBRANLARIN
HAZIRLANMASI VE PROTEİN ADSORPSİYON
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ömür ACET

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2015



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**Cu²⁺ TAKILI O-KARBOKSİMETİL KİTOSAN SCHİFF BAZI
KOMPLEKSLERİ GÖMÜLÜ KOMPOZİT MEMBRANLARIN
HAZIRLANMASI VE PROTEİN ADSORPSİYON
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ömür ACET

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2015

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 132305403 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, Ömür ACET, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Cu²⁺-takılı O-Karboksümetil Kitosan Schiff Bazı Kompleksleri Gömülü Kompozit Membranların Hazırlanması ve Protein Adsorpsiyon Davranışlarının İncelenmesi" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI
Aksaray Üniversitesi

.....*M. Odabaşı*.....

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Fatma GÜRBÜZ
Aksaray Üniversitesi

.....*Fatma Gürbüz*.....

Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. M. Hüseyin ALKAN
Dicle Üniversitesi

.....*M. Hüseyin Alkan*.....

Teslim Tarihi: 17 Kasım 2015

Savunma Tarihi: 02 Aralık 2015

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Ömür ACET



ÖNSÖZ

Protein, peptit ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin yüksek miktarda ve yüksek saflıkta üretilebilmesi terapötik, endüstriyel ve analitik açıdan önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, gelişen teknoloji ve bilim dalları ile büyük ölçekte enzimlerin ve proteinlerin üretilmesi ve kaynağından (biyolojik sıvılar ya da dokular) verimli bir şekilde elde edilme çalışmaları hız kazanmıştır. Bu protein ve enzimlerin yüksek oranda sıvı kültür ortamları ve serum gibi biyolojik akışkanlardan toplanması, basit kromatografik ayırma teknikleri ile mümkün olmaktadır. Ayırıştırma adımlarında proteinlerdeki büyüklük, fizikokimyasal özellikler, bağlanma afinitesi ve biyolojik etkinlik gibi unsurlardaki farklılıklardan yararlanılır. Kromatografi ile yapılan ayrımlar, moleküllerin yük, büyüklük, şekil ve yüzey karakteristiği gibi özelliklerine dayanır (Porath vd., 1975; Davankov vd., 1977). Kromatografik uygulamalarda, membran yapıdaki afinite desteklerinin adsorpsiyon özelliklerinin geliştirilmesi ve daha etkili ayırmanın yapılması için farklı yöntemler benimsenmiştir. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanıma sahip olan afinite kromatografisi, yüksek seçicilikte moleküler düzeyde tanımaya dayalı olan bir ayırma tekniğidir. Afinite kromatografisi, moleküler biçime (konformasyona) bağlı olan bir ayırıştırma yöntemidir, genelde her protein için farklı bir kromatografi reçinesi kullanılır. Bu reçinelerin yüzeyinde ayırıştırılacak proteinlere özgül ligandlar bağlıdır. Katı destek malzemesine kovalent olarak bağlanan metal iyonları, hedef molekülle etkileşerek molekülün adsorbente bağlanmasını sağlamaktadır. Afinite membran teknikleri arasında en aygın olarak; yüzeyde açığa çıkan histidin, sistein, triptofan ve tirozin ya da polihistidin kuyruklu biyomolekülleri içeren proteinlerin saflaştırılmasında çoğunlukla uygulanan, 'İmmobilize metal afinite membranları'dır (İMAM). Bu yöntemin üstünlüğü, immobilize metal iyonu ile biyomoleküllerin yüzeyinde yer alan bu aminoasitler arasındaki seçici etkileşimden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, afinite membranına immobilize edilen metal iyonlarının ancak EDTA (etilendiamintetraasetikasit) gibi çok güçlü şelatörlerle yüzeyden uzaklaştırılabilmesi ve immobilize metal afinite membranının kolay rejenerasyonları dolayısı ile protein ayırıştırılması ve saflaştırılması işleminde defalarca kapasitesinde önemli bir değişme olmaksızın kullanıma olanak tanınması bu yöntemin sunduğu diğer avantajlardır.

Bu tez KBAG-113Z296 Nolu Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ve 2015-080 Nolu Aksaray Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi ile desteklenmiştir.



TEŞEKKÜR

Hayata ve bilime olan sevgisiyle bana örnek olan, çalıŐmalarımın her aşamasında sahip olduğu bilgi ve tecrube ile bana yol gosteren çok değerli hocamız Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaŐan ve bu çalışmada bana desteğini esirgemeyen başta Prof. Dr. Ayfer MENTEŞ hocam ve sayın Doç. Dr. Berkant KAYAN , Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN, Doç. Dr. Nuri ÜNLÜ, Yrd. Doç. Dr. Didem BALUN KAYAN, Yrd. Doç. Dr. Muhsin KARAASLAN ve birlikte çalıŐmaktan ve birlikte olmaktan mutluluk duyduğum tezimi yazmam konusunda yardımını esirgemeyen başta ArŐ. Grv. Dr. Talat BARAN, ArŐ. Grv. Dr. Erkut YILMAZ, ArŐ. Grv. Dr. Neslihan TEKİN, ArŐ. Grv. Dr. Tülden KALBURCU, ArŐ. Grv. Dr. Cem Burak YILDIZ, ArŐ. Grv. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŐİNT, Dr. Őeyda CEYLAN CÖMERT'e, laboratuvar arkadaŐlarım Gökhan YÜKSEL, Samir A. A.NOMA, Özlem ARSLAN ve Miren ŐEN'e bütün hayatım boyunca sevgi ve anlayıŐlarıyla her zaman yanımda olan ve bana her konuda destek olan aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Ömür ACET

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	i
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Kromatografi ve Kromatografinin Prensipleri.....	1
1.1.1 Kromatografi nedir?.....	1
1.1.2 Kromatografik yöntemler.....	2
1.1.3 Enzimlerin saflaştırılması.....	3
1.2 Afinite Kromatografisi.....	4
1.2.1 İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi.....	6
1.2.2 İMAK'ın kimyasal prensipleri.....	7
1.2.2.1 İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel ilkeleri.....	7
1.2.2.2 İMAK nasıl yapılır ?.....	9
1.2.2.3 Protein-metal iyon afinitesindeki kullanım farklılıkları.....	9
1.2.2.4 İMAK uygulamalarının avantaj ve dezavantajları.....	11
1.2.3 Kitosan.....	13
1.2.3.1 Karboksimetil kitosan.....	14
1.2.3.2 Destek matriksleri.....	15
1.2.3.3 Metal şelatlayıcıların seçimi.....	15
1.2.3.4 Hareketli faz seçimi.....	16
1.2.3.5 Çözücü karışımın etkisi.....	17
1.2.3.6 Yarışmacı ajanların eklenmesi.....	17
1.3 Metal İyonları ile Adsorpsiyon Merkezleri ve İMAK'da Seçiciliğin Önemi.....	18
1.3.1 Uygulamalar.....	20
1.3.1.1 Yüzey histidinleri ve proteinler.....	21
1.3.1.2 His etiketli proteinler.....	21
1.4 Kriyojeller.....	22
1.4.1 Kriyojel oluşumu.....	23
1.4.2 Donma hızı ve donma sıcaklığı.....	24
1.4.3 Kriyojel gözenekli yapısı üzerindeki başlatıcı içeriğin etkisi.....	24
1.4.4 Kriyojel ve gözenek yapısı üzerindeki çözücü etkisi.....	24
1.4.5 Sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyon üzerindeki kontrolü.....	25
1.4.6 Serbest radikal polimerizasyonu ile kriyojel hazırlanması.....	25
1.4.6.1 Kriyojellerin hazırlanışı ve karakterizasyonu.....	26
1.4.6.2 Kriyojel uygulamaları.....	29
1.5 Lizozim.....	30
1.5.1 Lizozimin kullanım alanları.....	31
2. LİTERATÜR ÖZETİ	32
3. MALZEME VE YÖNTEM	34
3.1 Malzeme.....	34

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	34
3.2 Yöntem.....	34
3.2.1 O-karboksümetil kitosan Schiff bazı (O-CMCS-4a) gömülü partiküllerin sentezi.....	34
3.2.2 O-karboksümetil kitosan Schiff bazı komplekslerine Cu ²⁺ iyonlarının takılması...35	
3.2.3 Cu ²⁺ bağlı O-karboksümetil kitosan Schiff bazı kompleksleri gömülü poli (2-hidroksietil metakrilat) kriyojellerin hazırlanması.....	36
3.2.4 Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu.....	36
3.2.5 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik.....	37
3.2.6 Kriyojelin karakterizasyonu.....	38
3.2.6.1 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partiküllerin ve kompozit kriyojelin şişme testleri.....	38
3.2.6.2 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partiküllerin ve kompozit kriyojel yapılarının SEM analizi.....	38
3.2.6.3 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partiküllerin ve kompozit kriyojel yapılarının FT-IR analizleri.....	39
3.2.6.4 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojeller ile sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları.....	39
3.2.6.5 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik.....	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a Partikül ve Kompozit Kriyojelin Karakterizasyonu.....	41
4.1.1 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin şişme testleri.....	41
4.1.2 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin FT-IR analizleri.....	42
4.1.3 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin SEM karakterizasyonu.....	43
4.2 Cu ²⁺ -O-CMCS-4a Partikül Gömülü Poli(2-hidroksietil metakrilat) Kriyojellere Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları.....	45
4.2.1 pH'ın etkisi.....	45
4.2.2 Lizozim başlangıç derişiminin etkisi.....	45
4.2.3 Adsorpsiyon izotermleri.....	46
4.2.4 İyonik şiddet etkisi.....	50
4.2.5 Akış hızının etkisi.....	51
4.2.6 Sıcaklığın etkisi.....	52
4.2.7 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik.....	53
5. SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET

Cu²⁺ TAKILIO-KARBOKSİMETİL KİTOSAN SCHİFF BAZI KOMPLEKSLERİ GÖMÜLÜ KOMPOZİT MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE PROTEİN ADSORPSİYON DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

Bu çalışma kapsamında, lizozimin etkin bir şekilde ayrılması için afinite kromatografisi yöntemleri arasında, son yıllarda yoğun bir uygulama alanı bulan, İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (İMAK) kullanılmıştır. Bu amaçla, suda çözünebilir O-karboksimetil kitosan Schiff bazı-4a kompleksleri sentezlenmiştir ve Cu²⁺ iyonu takılmıştır. Monomer olarak poli(2-hidroksietil metakrilat), çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid, başlatıcı/aktivatör olarak N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED)/amonyum persülfat (APS) kullanılmış ve radikal kriyo-kopolimerizasyon yöntemiyle 5 mL'lik plastik tüplerde sentezlenmiştir. Hazırlanan Cu²⁺ takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı kompleksleri gömülü kompozit kriyojel şişme testleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM), FT-IR ile karakterize edilmiştir. Sulu çözümden lizozim adsorpsiyonuna pH'nın, başlangıç protein derişiminin, akış hızının, iyonik şiddetin ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Maksimum adsorpsiyon pH 8 fosfat tamponunda, 3 mg/mL başlangıç lizozim derişiminde, 0,5 mL/dak akış hızında ve 25°C ortam sıcaklığında 103,3 mg/g partikül olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca, süpermakro-gözenekli kriyojellere proteinin defelarca adsorplanıp desorplanabildiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Afinite, Lizozim, Kriyojel, İMAK, Karboksimetil Kitosan, Adsorpsiyon

ABSTRACT

PREPARATION OF COMPOSITE MEMBRANE EMBEDDED WITH Cu^{2+} - ATTACHED O-CARBOXYMETHYL CHITOSAN SCHIFF BASE COMPLEXES AND INVESTIGATION FOR PROTEIN ADSORPTION PERFORMANCE

In this study, Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) finding a wide application area among affinity chromatography methods was used for removal of lysozyme efficiently from aqueous solutions. For this purpose, water soluble O-carboxymethyl chitosan complexes was synthesised, Cu^{2+} ions was attached onto them. The composite cryogels were prepared by free radical polymerization using *N,N,N',N'*-tetramethylene diamine (TEMED) and ammonium persulfate (APS) as initiator/activator pair, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (MBAAm) as cross-linker in a plastic syringe of 5 mL. Prepared composite cryogel embedded with Cu^{2+} -attached O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes was characterized by FT-IR, SEM, swelling tests measurements. The effect of pH, ionic strength, initial lysozyme concentration, temperature and flow rate on adsorption were investigated. The maximum amount of lysozyme adsorption from aqueous solution was at 103,3 mg/g particles in phosphate buffer at pH 8 with initial lysozyme concentration of 3 mg/mL. On the other hand, the most efficient adsorption was carried out at 0,5 mL/min, at 25°C temperature. It was also observed that enzyme could be repeatedly adsorbed and desorbed on the Cu^{2+} attached O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes cryogels.

Keywords: Lysozyme, Cryogel, Affinity, IMAC, Carboxymethyl Chitosan, Adsorption

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1: Afinite kromatografisinin alt başlıkları.....	5
Şekil 1.2: Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.3: İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel prensibi.....	8
Şekil 1.4: İMAK uygulamalarında yer alan protein adsorpsiyon ve desorpsiyonunu içeren mekanizmaların diyagramı.....	10
Şekil 1.5: Kitosanın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.6: Karboksimetil kitosanın kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.7: Biyoteknolojide immobilize metal iyon afinite kullanımı.....	21
Şekil 1.8: Kriyojel oluşum şeması.....	23
Şekil 1.9: Kriyojel üretiminin şematik gösterimi.....	27
Şekil 1.10: Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı (Plieva vd., 2007).....	28
Şekil 1.11: Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri (Plieva vd., 2007).....	29
Şekil 1.12: Lizozimin üç boyutlu yapısı.....	30
Şekil 4.1: Şişmiş ve kurutulmuş Cu^{2+} -O-CMCS-4a kompozit kriyojel.....	42
Şekil 4.2: Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin FT-IRspektrumları...43	
Şekil 4.3: A. O-CMCS-4a partiküller SEM mikrofotografı.....	44
Şekil 4.3: B. Cu^{2+} -O-CMCS-4a partiküller gömülü kompozit kriyojelin SEM mikrofotografı.....	44
Şekil 4.4: Lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi (pH 6-8: Fosfat tamponu; pH 9-10: Karbonat tamponu. Co: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C.....	45
Şekil 4.5: Lizozim adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi; pH 8.0 fosfat tamponu; akış hızı: 1 mL/dk; T: 25 °C.....	46
Şekil 4.6: Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	47
Şekil 4.7: Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim için Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	48
Şekil 4.8: Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Lizozim derişimi: 1mg/mL; pH 8 fosfat tamponu; akış hızı:1 mL/dk; T:25 °C.....	51
Şekil 4.9: Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi, lizozim derişimi:1 mg/mL; pH 8 Fosfat tamponu; T:25 °C.....	52
Şekil 4.10: Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi, lizozim derişimi:1 mg/mL, pH 8 fosfat tamponu; akış hızı:1mL/dk; T: °C.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1: Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler.....	4
Çizelge 1.2: İMAK'da proteinlerin bağlanmasına histidin topografisinin etkisi.....	8
Çizelge 1.3: Metallerin ve ligandların sınıflandırılması.....	20
Çizelge 1.4: Serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanan makrogözenekli fonksiyonlu kriyojel.....	26
Çizelge 4.1: Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.....	49
Çizelge 4.2: Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.....	49
Çizelge 4.3: Langmuir eşitliğine dayalı R_L değerleri.....	50

SİMGELER DİZİNİ

Å	Angtröm
cm	Santimetre
dk	Dakika
k	Kilo
L	Litre
m	Mili
mM	Milimolar
M	Molarite
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
ppm	mg Çözünen/L
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
°C	Santigrat Derece
w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

AAm	Akrilamid
APS	Amonyum Persülfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartik Asit
ATR	Attenuated Total Relectance
BET	Yüzek Karakterizasyon Cihazı
BPO	Benzoil Peroksit
β -ME	β -Merkaptoetanol
BSA	Sığır Serum Albumin
CB	Cibacron Blue
CM-Asp	Karboksimetil Aspartik Asit
CR	Cibacron Red
Cys	Sistein
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FT-IR	Fourier Transform Infrared
Glu	Glutamik Asit
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
His	Histidin
HP-İMAK	Yüksek Performans İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi
HSA	Human Serum Albumin
IgG	İmmunoglobulin
IEC	İyon Değişim Kromatografisi
İDA	İminodiasetik Asit
İMAM	İmmobilize Metal Afinite Membranları
İMAK	İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi

kDA	Kilodalton
KGC	Gözenekli Cam Kromatografisi
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
MBAAm	N,N-Metilen-Bis-Akrilamid
Me	Metal
NAG	N-Asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik Asit
NTA	Nitriloasetik Asit
O-CMCS-4a	Oksijen karboksimetil kitosan-4a Schiff bazı kompleksi
pAAM	Poliakrilamid
PB	Procion Brown
PEG	Polietilenglikol
PGMA	Poli(glisidil metakrilat)
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
Phe	Fenilalanin
PVA	Polivinilalkol
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SF-IFN	Sığır Fibroblast (kök hücre) İnterferonunu
ŞP-İMAK	Şelatlı Peptid-İmmobilize Metal İyonu Afinite Kromatografisi
TED	N,N,N'-Tris-Karboksimetil Etilen Dimin
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen Diamin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UFLMP	Sıvı mikrofaz

1. GİRİŞ

1.1 Kromatografi ve Kromatografinin Prensipleri

1.1.1 Kromatografi nedir ?

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan, kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlere verilen addır. Kromatografik yöntemler genel olarak iki prensibe dayanır. Bu bileşenlerden ilki sabit faz (stationary phase) ve ikincisi hareketli faz ya da mobil faz (mobile phase) olarak adlandırılır. Mobil fazda yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Bu şekilde bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerlemelerinden dolayı, birbirinden ayrılmış şekilde sabit fazdan farklı zamanlarda ayrılırlar. Böylece sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür. Zamana veya mobil fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir. Kromatografik yöntemler birçok temel prensipten oluşur ve şöyledir :

a. Mobil faz (mobile phase): Örnekteki bileşenleri, sabit faz (kolon) boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan çözelti veya çözücü karışımlarına mobil faz denir. Kullanılacak mobil fazın seçiminde, analizi yapılacak örnek madde bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri vb. birçok parametreye dikkat edilmelidir.

b. Sabit faz (stationary phase): Mobil faza gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve alıkonuldukları fazdır. Kromatografi tekniğinin modeline göre dizayn edilip ve çok değişik materyallerden çok farklı ölçülerde imal edilmiş ve “kolon” olarak adlandırılmış sabit fazlar mevcuttur. Özellikle gaz ve sıvı kromatografileri için ticari amaçla oldukça fazla marka ve boyutta kolon üretimi yapılmaktadır. Sıvı

kromatografisi olarak nitelendirilen yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamalarında kullanılan kolonlar daha çok 30-300 mm uzunluğunda yaklaşık 5 µm iç çapında metalik boru şeklinde olup iç yüzeyleri çok değişik özelliklerde kaplama materyalleri ile kaplanarak, analizi yapılacak madde grupları için modifiye edilebilmektedir.

c. Alıkonma (retention): Analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin mobil faza ulaşması ile belirli bir etkileşim oluşur ve böylece sabit faz ile belirli oranda tutulma meydana gelir ve bununla birlikte alıkonan madde daha geç olarak sabit fazı terk etmesi gerçekleşir. Bu özellikten yola çıkılarak, belirli analitik koşullar altında, her kimyasal madde için parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retention time- t_R) tanımı vardır. Bu tanım belirli deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin sabit fazı terketmesi için geçen süreyi göstermektedir.

t_0 = kolona ait ölü zaman (column dead time)

t_R = alıkonma zamanı (retention time)

$t'R$ = net alıkonma zamanı (net retention time) $t_R = t_0 + t'R$

1.1.2 Kromatografik yöntemler

Kromatografik yöntemler kullanılan mobil faza göre değişiklik gösterebilir. Sıvı veya gaz olmasına göre; Sıvı Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Bunun dışında kromatografik yöntemler, alıkonulma mekanizması ve çalışma metoduna göre de iki şekilde sınıflandırılabilir:

A. Alıkonma sistemlerine göre;

- **Adsorpsiyon Kromatografisi** (Analize girecek madde hem mobil faz hem de sabit fazı oluşturan moleküllerle etkileşim içerisinde. Polarite önemli etkidir.)

- **Partisyon (Dağılım) Kromatografisi** (Adsorpsiyon kromatografisinden farklılık gösterdiği nokta sabit fazın da sıvı olmasıdır. Sabit fazın sıvı olmasının yaratacağı sorunlar nedeni ile pek ilgi duyulmamaktadır.)

- **Size Exclusion Kromatografisi** (Analize girecek maddenin molekülleri boyutlarına göre ayrılmaktadır. Bu işlem için çok değişik por çapları içeren dolgu maddesiyle doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Böylece değişik çaplardaki porlar elek gibi davranarak maddeleri boyutlarına göre alıkoymaktadır.)

- **Afinite Kromatografisi** (Anahtar-kilit modeline uygun biyolojik materyaller dolgu malzemesi olarak kullanılabilmeyle birlikte alıkonma mekanizması maddeye özgüdür.)

- **İyon Değişim Kromatografisi** (Yüklü bir maddenin ters yükle yüklenmiş katı bir sabit fazla tutulması prensibine dayanır.)

B. Çalışma sistemlerine göre;

(Daha az kullanılan, örneğin kolondan uzaklaştırılma mekanizmasına göre yapılmış bir sınıflandırmadır.)

-**Elüsyon Oluştumu Kromatografisi** (Elution development chromatography)

-**Yerdeğiştirme Oluşumu Kromatografisi** (Displacement Development Chromatography)

- **Frontal Analiz Kromatografisi** (Frontal Analysis Chromatography)

1.1.3 Enzimlerin saflaştırılması

Biyoteknoloji ve biyokimya alanındaki gelişmelerin etkisi ile enzimlerin saflaştırılması için önemli çalışmalar yapılmış ve yeni uygulama alanlarının da ortaya çıkması ile enzimlerin saf olarak elde edilmesi daha büyük önem kazanmıştır (Erarslan vd., 2001). Proteinleri saflaştırmak her daim son basamak olmayabilir. Saflaştırılacak protein daha sonraki çalışmalara da ışık tutabilir. Saflaştırma aşamasından sonra proteinin aktivitesi, yapısı ya da işlev ilişkileri üzerinde çalışmalar yapılabilmektedir. Proteinlerin saflaştırılması proteinlerin yapısını aydınlatarak kullanım kolaylığı sağlayacaktır. Proteinlerin saflaştırılmasıyla proteinlerin, aminoasit dizilerini, proteinler arasındaki evrimsel ilişkilerini belirleyebilir ve farklı organizmalardaki bir proteinin biyokimyasal fonksiyonlarını inceleyebilmekteyiz. Bu prosesle amaç; model proteini en düşük maliyet, yüksek derecede saflık ve verimle elde etmek olmalıdır. Saflaştırma aşamalarını düşürmek hem verimi hem de büyük ölçeklerde zaman kazancı sağlayabilir. Hedef protein için saflaştırma yöntemi ve izlenecek yol, deneysel yöntem her protein için değişebilir. Saflaştırılacak protein, molekül büyüklüğü esasına göre saflaştırılacaksa jel filtrasyonu kromatografisi, elektriksel yük esasına göre saflaştırma yapılacaksa iyon değişimi kromatografisine göre saflaştırma yapılmalıdır. Ayrıca saflaştırılacak enzim ya da reseptör ise bunun aktivitesini bir substratı, çalışmamızda olduğu gibi

ligandı ya da bir substrat analogu üzerinde yönlendirerek kromatografik saflaştırma tekniği olan afinite kromatografisi ile saflaştırma sağlanabilir. Uygulanan yöntem için uygun destek maddesi aynı zamanda şartların belirlenmesiyle hedef proteinimiz karışımdan saflaştırılabilir.

1.2 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, spesifik makromoleküllerin veya hücre bileşenlerinin ham biyolojik numunelerden seçimli ekstraksiyonunda, ayırımında, saflaştırılmasında, analizinde veya etiketlenmesinde kullanılan biyolojik olarak aktif ya da yapısal olarak özgün ve tamamlayıcı moleküller arasında biyospesifik ve tersinir reaksiyonları kapsayan farklı bir sıvı kromatografisidir. Bu yöntem, 30 yıl önce enzimleri ve proteinleri saflaştırma prosedürü olarak kullanılmıştır. Afinite kromatografisi, moleküler tanıma dayandır ve bugün fizyolojik ve yapısal olarak etkileşen proteinleri saflaştırmak için kullanılan en güçlü tekniklerdendir. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan proteinler ayrıca genetik mühendisliğinde karşılaşılan enzim ve hormonların çalışma mekanizması, protein-protein veya hücre-hücre etkileşimleri ve diğer etkileşimler gibi birçok biyolojik prosede kaçınılmaz bir araç olmuştur. Moleküler tanıma (veya biyotanimaya) dayalı birçok ilgili metodun ortaya çıkması, biyolojik bilimlerin neredeyse bütün araştırma alanlarını etkilemiştir.

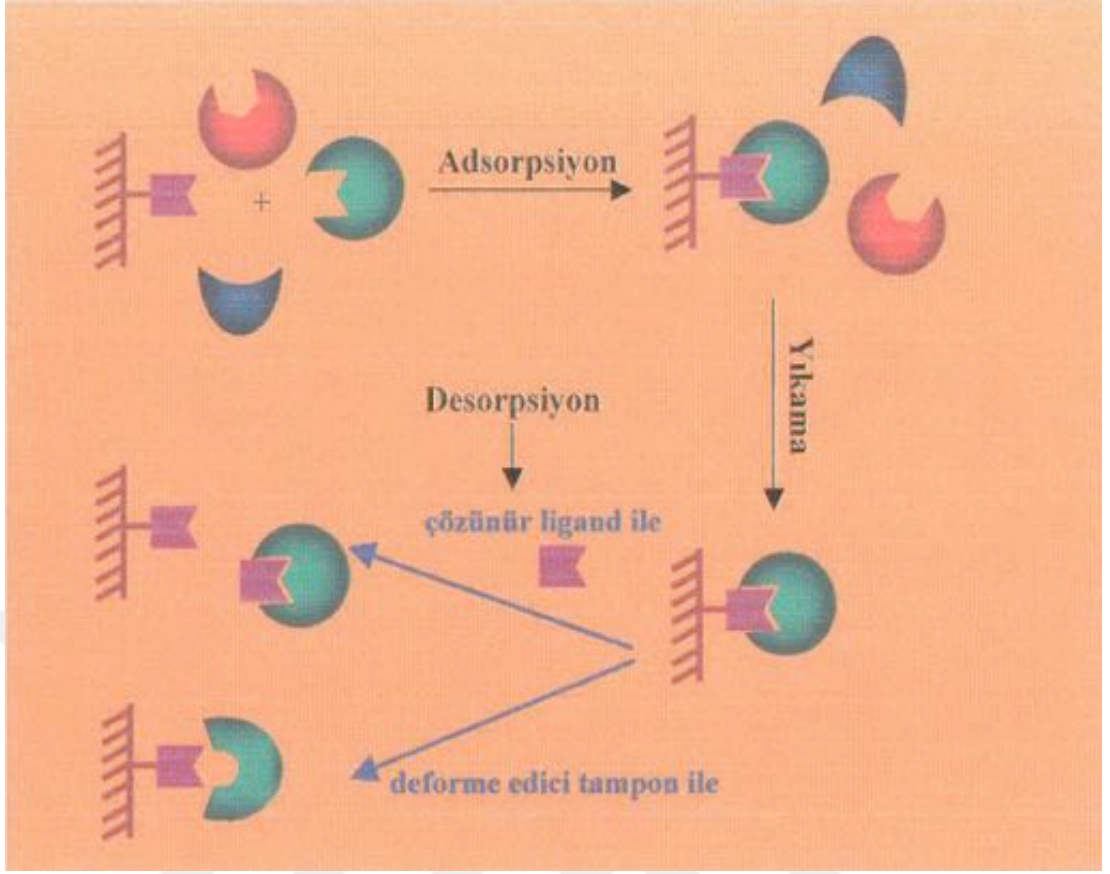
Çizelge 1.1: Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler.

Ligand	Ligandla Etkileşen Protein
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör çeşitleridir)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asite bağlı protein (enzim veya histon)
Hormon, Vitamin	Reseptör, Taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlı proteinler

Afinite kromatografisinin geniş alanda değişik uygulamaları nedeniyle alt afinite teknikleri ortaya çıkmış ve bazıları kendilerine özel isimler almışlardır. Şekil 1.1'de bu tekniklerden bazıları verilmiştir.



Şekil 1.1: Afinite kromatografisinin alt başlıkları.



Şekil 1.2: Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterim.

1.2.1 İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi

1960'ların başlarında aminoasitler, nükleik asitler, peptitler ve proteinlerin ayrılması için immobilize metal-şelat kompleksleri kullanma fikri ortaya çıkmıştır (Goldstein vd., 1967). 1975 yılında Porath ve arkadaşları biyomoleküller için bir saflaştırma yöntemi olarak metal iyon afinite kromatografisini (İMAK) sunmuşlardır (Porath vd., 1975). İMAK biyolojik moleküller ve proteinler ile şelatlanmış metal iyonlarının etkileşimlerine dayanmaktadır. Bir başka deyişle metal-şelat kromatografi veya metal-iyon etkileşim kromatografisidir.

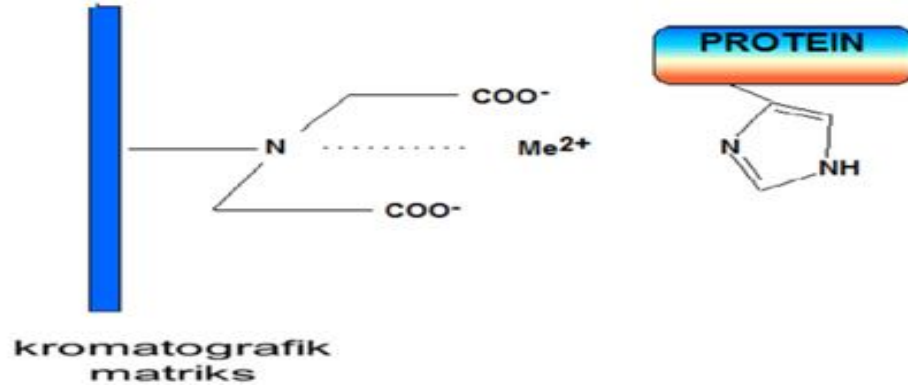
İMAK'da immobilizasyon işlemi; metal iyonlarının, hidrofilik desteğe kovalent olarak bağlanan, metal şelatlayıcı bileşiklerle kompleksleştirilmesi ile elde edilir. Protein karışımı İMAK kolonundan geçerken, dış yüzeyinde elektron verici aminoasit kalıntıları içeren bazı proteinler, şelatlanmış metallere koordinasyon bağlarıyla bağlanarak tutulur. Tutulmayanlar ise kolondan dışarı çıkar. İMAK uygulamaları aminoasit (Hemdan vd., 1985), nükleotidler (Hubert vd., 1981,

Fanovayı vd., 1983) ve aminler gibi (Liv vd., 1990) küçük moleküllerin ayrılması ve membran glikoproteinleri gibi (Carrodini vd., 1988) çeşitli proteinlerin saflaştırılmasına kadar uzanır (Sulkowski vd., 1985). Metal temelli afinite saflaştırılmasının yüksek çözünürlük potansiyeli; tek bir seferde aminoasit konfigürasyonundaki D-L farklılığı ile birbirinden ayrılan 19 peptid hormonunu ayırmasıyla gösterilmiştir (Nakagawa vd., 1988).

1.2.2 İMAK'ın kimyasal prensipleri

1.2.2.1 İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel ilkeleri

Aminoasitler, peptitler, proteinler, rekombinant proteinler ve hatta hücrelerin ayrılması için immobilize metal afinite kromatografisi geliştirilmiştir (Goubran-Botros vd., 1989, Mrabet vd., 1992, Laboureau vd., 1997). Rekombinant yöntemlerle histidin ile birlikte üretilen proteinlerin saflaştırılmasında İMAK en yaygın yöntemdir (Hochuli vd., 1988). Saflaştırma basamaklarından sonra histidin enzimatik olarak uzaklaştırılarak saf protein elde edilmektedir. Proteinlerin yüzey topografyasının belirlenmesi için de İMAK'dan yararlanılmaktadır (Berna vd., 1997, Boden vd., 1998). İMAK'da ayırma için birincil temel, immobilize-metal afinitesi (İMA) olarak bilinen etkidir. Bu etki proteinlerde bulunan bazı aminoasitlerin veya nükleik asitlerin pürin ve pirimidin bazlarının şelatlanmış metal iyonlarına bağlanma özelliğinden kaynaklanır (Şekil 1.3). İMAK'da bu etkileşimden faydalanmak için, metal iyonları çözünmez bir matrikse kovalent olarak bağlı metal şelatöre koordinasyon bağları ile immobilize edilir. Prensip olarak, İMAK'da kullanılacak çok sayıda metal iyonu bulunmakla birlikte protein-metal etkileşim çalışmalarında sıklıkla kullanılanlar, bakır (Cu(II)), çinko(Zn(II)), nikel (Ni(II)) ve kobalt (Co(II)) gibi sınır geçiş metallere aittir (Porath vd., 1975, Lönerdal vd., 1982, Porath vd., 1983).



Şekil 1.3: İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel prensibi.

Çizelge 1.2: İMAK'da proteinlerin bağlanmasına histidin topografisinin etkisi.

Ligand	Metal İyon Tipi			
	Cu (II)	Ni (II)	Zn (II)	Co (II)
Histidin (His) yokken veya Histidinsiz	-	-	-	-
Tek Histidin	+	-	-	-
His-(X)n-His	++	-	-	-
His-(X)n-His (n: 2,3 ile α -heliks)	+++	-	-	-
---His...His--- (proteinin 3-D yapısına benzer konumda)	+++	-	-	-

Metal afinite kromatografisinde; belirli bir metal katyonu için belirli bir seçicilik ile ayrı biyopolimerler kullanılarak ligand değişim kromatografisi kullanılmaktadır. Genellikle bakır (II), çinko (II) ve demir (II) gibi özel metal katyonları için metal afinite kromatografisi kullanılmaktadır (Majors vd., 2001). Bir proteinde elektron verme özelliği ile ulaşılabilir yüzey aminoasit kalıntısı varsa İMAK kolonunda uygulandığında muhafaza edilmektedir. Porath'ın üçlüsü olarak adlandırılan “triptofan, histidin ve sistein” bu tür kalıntı örnekleridir. Bu yöntem α -amin grubu ile ilişkilidir (Andersson vd., 1992). Bu kalıntılar, histidin incelemelerinde muhtemel aminoasitler; nötral pH'ya yakın ve yüksek iyonik şiddet veya geçiş metal şelatının proteine bağlanmasında yol gösterici olmaktadır (Elektrostatik etkileşimleri

bastırmak için İMAK kullanılmaktadır.) (Sulkowski vd., 1987). Bir proteinde histidin kalıntıları sayısı, onların yüzey erişilebilirliği ve bunların mikro yapısı bütün metal şelatlı bir proteini alıkoymanın belirlenmesinde önemlidir. Birden çok proteinle çalışmasında, Sulkowski iminodiasetik asit, İMAK kolonlarında kullanılan ortak bir ajan şelatlanmaları geçiş metal iyonları ile protein tanınması için temel kuralları belirlemiştir (Sulkowski vd., 1989). Nükleotid-geçiş metal etkileşimleri de İMAK ile incelenmiştir. Örneğin, pirimidin ve pürin mono- ve di- nükleotid grup fraksiyonları agaroz veya silika bazlı bakır şelat adsorbant kullanılarak elde edilmiştir (Hubert vd., 1980, Willson vd., 2001). Bu elektron verici-alıcı etkileşim gibi hidrofobik ve elektrostatik etkileşimi de içermektedir. Ancak bakır iyonları pirimidin için daha fazladır. Pürin için seçiciliği bulunmaktadır (adenin > guanin ile ve kabaca timin ve urasil aynı olan sitozin).

1.2.2.2 İMAK nasıl yapılır?

Adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon gibi üç parametre dikkate alınarak adsorpsiyon temelli afinite kromatografisi uygulanır..

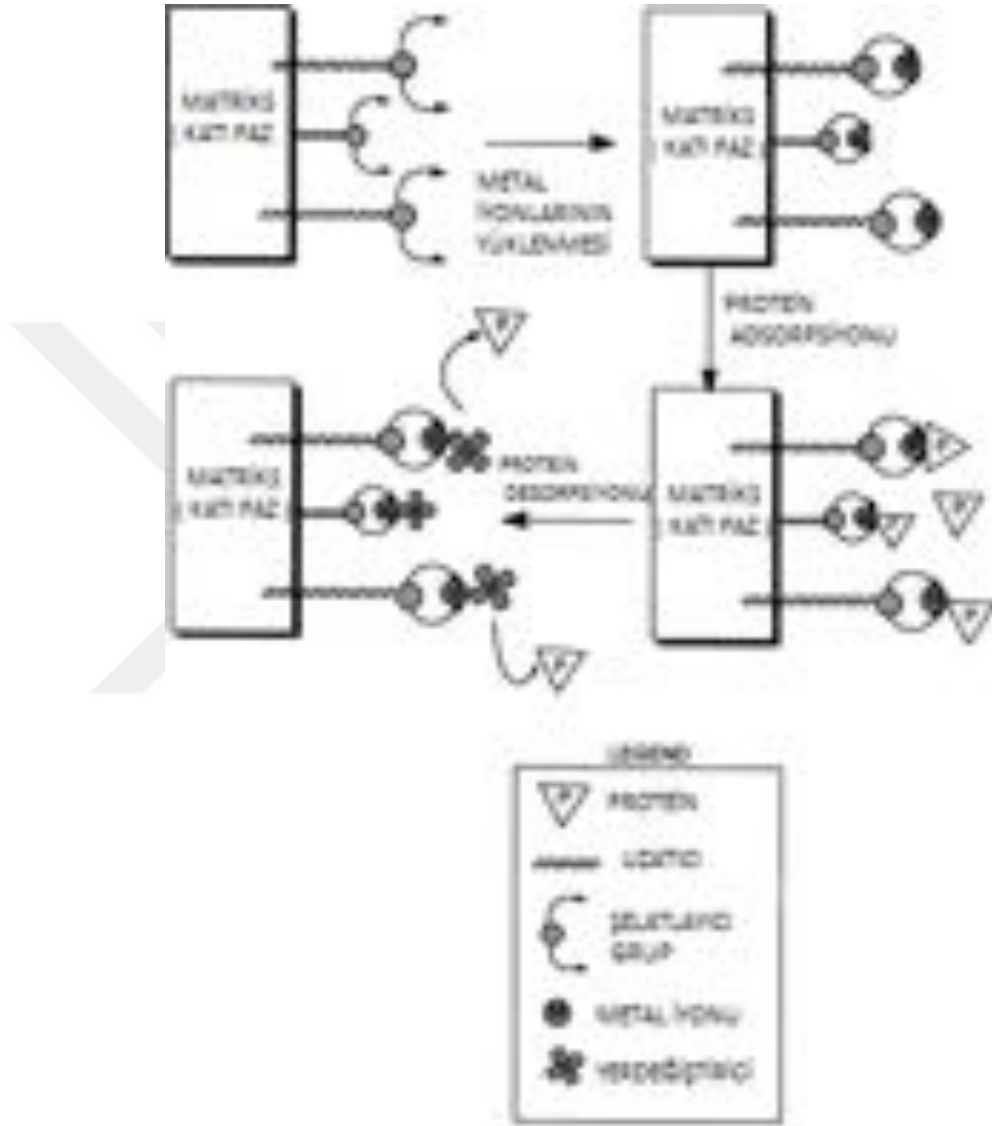
Bu üç parametre;

- Ligand yapısına,
- Kromatografi için çözülmüş madde olan protein / polipeptid yapısına,
- Psikokimyasal etkileşime,
- Ligand-protein, birleşme - ayrışmanın termodinamik ve kinetik parametrelerine,
- Adsorbent ve ligandın dayanıklılık ve sabitliğine bağlıdır.

1.2.2.3 Protein-metal iyon afinitesindeki kullanım farklılıkları

Metal iyonlarına proteinlerin (ya da peptitlerin) bağlanması, protein yüzeyi üzerinde bulunan elektron-veren bir grup ile bir ya da daha fazla erişilebilir koordinasyon bölgesi sunan bir metal iyonu arasındaki etkileşime dayanmaktadır. İMAK'da uygulanması, metal bağlayıcı gruplara eşdeğerli bir şekilde eklenen bir sorbent ya da matriksten yapılmaktadır. Metal iyonlar eklendiğinde (yüklendiğinde), multidentat bağlayıcılar ve metal iyonlar, çözülecek bileşimlerle daha sonraki etkileşimi için korunan metal iyonlar içeren kompleksler oluşturmaktadır. Bunun için komplekslerdeki metal iyonlar solvent ya da çözünen moleküllerin onlara bağlanabilmesi için bağımsız koordinasyon bölgelerine sahip olmalıdırlar. Protein ve

metal iyonların etkileşiminin ardından bağlı proteinler bir yerdeğiştirici (ör. imidazol) kullanılarak serbest bırakılabilir. Metal-protein bağının gücü proteinden proteine farklılık göstermektedir ve birçok durumda bu farklılık belirli proteinlerin etkili biçimde ayrılması ve izolasyonunu sağlamak için kullanılabilir (L. Kagedal vd., 1998).



Şekil 1.4: İMAK uygulamalarında yer alan protein adsorpsiyon ve desorpsiyonunu içeren mekanizmaların diyagramı.

1.2.2.4 İMAK uygulamalarının avantaj ve dezavantajları

İMAK uygulamaları benzerlik olarak yüzey tutunmasına dayanır ve böylece bu tarz ayırma teknolojileriyle ilgili dezavantaja olduğu kadar avantaja da sahiptir.

- (i) İMAK çoğunlukla tek kademeli saflaştırmaya izin vermektedir.
- (ii) Protein yükleme kapasitesi diğer kromatografik teknikler ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (0.1–10 μ M/ml jel).
- (iii) Metal iyonlar EDTA ya da EGTA gibi güçlü bir şelatlı madde ile reçineden kolaylıkla alınabilir. Bu nedenle, ilgili proteinin ayrılması için uygun olan en iyi liganda karar vermek amacıyla farklı metal iyonlar aynı şelatlı reçine kullanılarak test edilebilir.
- (iv) İMAK up-scaling endüstriyel uygulamalar için de oldukça kolay ve tekrarlanabilir.
- (v) İMAK seyreltik protein çözeltilerini konsantre etmek için faydalıdır.
- (vi) İMAK, yüksek iyonik güç ya da kaotropik bileşenler içeren birkaç tamponla uyumludur.
- (vii) İMAK genelde proteinlerin yapısını olumsuz yönde etkilememektedir. Metaloenzimlerin önemli metal iyonlarını çıkardığı birkaç durum bildirilmiştir. Bir Cu(II)–IDA kolonu üzerindeki İMAK ile tahrip edilen bir protein olduğu durum da bildirilmiştir ancak buradaki tahribat Cu(II) ile katalizlenmiş oksidatif proteolize neden olan redüktör tarafından tetiklenmiştir.
- (viii) Yüklü olmayan bir İMAK kolonundan geçiş üzerine çözeltiler kısa sürede arınık hale gelirler çünkü bakteriyel büyüme için gerekli olan bütün metal iyonlar şelatlaşma ile hareket ettirilir.
- (ix) Bir İMAK reçinesi kromatografik özelliklerde kayıp yaşanmadan yüzlerce kez yenilenebilmektedir. Aynı zamanda İMAK jelleri, 4'ün altındaki pH değerlerinde kullanılmadığı takdirde oldukça dayanıklıdır .

Bazı olası İMAK dezavantajları ise şunlardır:

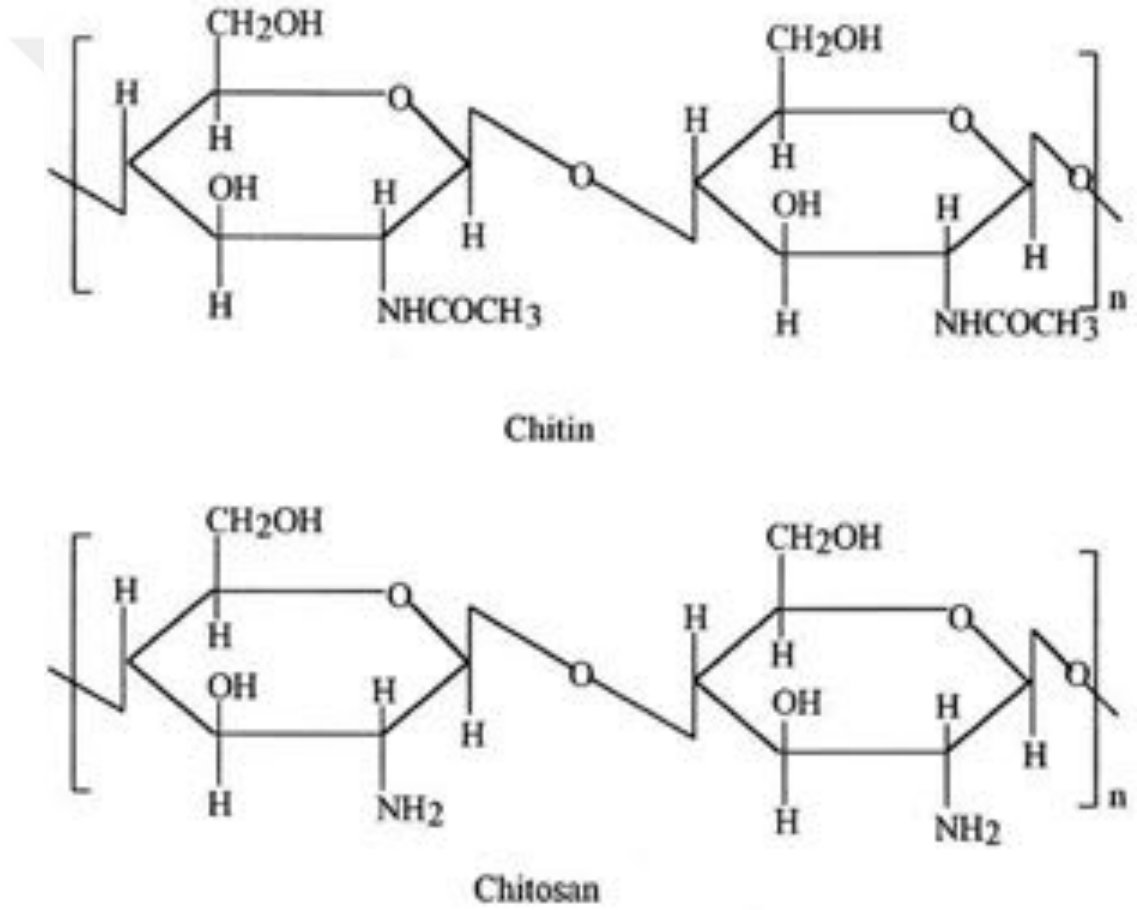
- (i) Bu konudaki tek problem protein kaybına ve düşük protein verimine neden olan metal iyon transferi (MIT) olayı değildir. Hedef protein yakaladığı metal iyonunu yapısı içerisinde tutarsa soruna neden olabilir. Bu durumda tutulmuş iyon proteinin bioaktivitesini engelleyebilir hatta durdurabilir; ancak MIT belirli bir proteini istenilen bir metal ile doldurmak için de uygulanabilir. Protein tedavi amaçlı

seçildiyse, protein ile ayrılan metal iyonu tehlike oluşturabilmektedir. Çünkü İMAK'da çoğunlukla kullanılan bazı metallerin kanserojen olduğu düşünülmektedir. Arsenik ya da hekzavalan krom ile karşılaştırıldığında zayıf mutajenler olarak düşünülse de İMAK'da genellikle kullanılan Co(II) ya da Ni(II) metal iyonları kanserojen madde olarak bilinmektedirler. Nikel kanserin başlangıç aşamasında pek çok sayıda genin hatalı ekspresyonuna bağlanmaktadır. Örn; istenilmeyen metali TED [tri(karboksilmetil)etilendiamin) gibi güçlü bir şelatlı adsorban ile doldurulmuş metalsiz bir şelatlı kolon kullanarak proteinden ayırabilir.

(ii) Son ürünün metal iyon kontaminasyonuna neden olan ve destek matrisinde gerçekleşen metal iyon sızıntısı, özellikle tedavi hazırlığında İMAK'ın kullanılmasında önemli olabilecek bir problemdir. Nihai ürünün metal kontaminasyonuna dair açık tehdit dışında temel bir problem de tedavi edici proteinin raf ömrü olacaktır çünkü metal iyonların yalnızca katalizör olarak oksidatif reaksiyonları tetiklemediği, aynı zamanda, metalik iyonların şekerler ile birlikte liyofilizasyon üzerinde protein stabilitesini arttırmak için katkı maddesi olarak kullanılmasına rağmen, liyofilize protein preparatlarının stabilizasyonunu engellediği bilinmektedir. Metal iyonların proteinler üzerindeki stabilize edici etkilerinin farkında olan bazı yazarlar onların protein stabilitesini arttırmak için kullanılmasını önermişlerdir. Metalin destabilize edici etken olduğu durumlarda stabilite gelişimi için şelatlı maddeler eklenebilir . Metaller ile bozulan protein örnekleri de bazı kaygılar ortaya çıkaracaktır çünkü metal yerdeğiştirmesi bir İMAK aşaması sırasında gerçekleşebilir ve terapötik proteinler söz konusu olduğunda metal toksisitesi istenilemez; ancak saflaştırma protokollerinin genellikle İMAK'dan sonra çeşitli aşamaları vardır ve takip eden proses çoğunlukla metal içermez. Bütün eser metallerin gönderildiğinden emin olması istenmesi durumunda, MIT protein örnekleri için önerilen aynı tedavi sonrası duruma güvenmeli ve protein karışımından kontamine edilen metal iyonlarını yakalamak için doldurulmamış bir TED kolonu olan bir İMAK uygulanmalıdır. Metal özütleme problemini engellemek için diğer yol da şelatlamayı ya da bu gibi metal kaybını önleyen güçlü iyon bağlayıcı stabil metal immobilize edici destekleri kullanmaktır (E.K.M Ueda vd., 2003).

1.2.3 Kitosan

Kitosan; özellikle deniz kabuklularının yapısında yer alan ve kitin adı verilen doğal polimerin deasetile edilmesiyle elde edilmektedir. Yapı itibarıyla kitin doğada en çok selüloz olarak bulunur ve doğal polimerler içinde doğada en çok bulunan ikinci doğal polimer ya da biyopolimerdir (Shahidi vd., 1999). Bu nedenle ekonomik olarak son derece ucuz ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilmesi nedeniyle oldukça tercih edilen bir biyopolimerdir. Benzer şekilde kitosan da sahip olduğu birçok emsalsiz fizikokimyasal özellikten dolayı özellikle biyomedikal uygulamalarda son yıllarda üzerine odaklanılan önemli alternatiflerden biri olmuştur (Kumar vd., 2000).



Şekil 1.5: Kitosanın kimyasal yapısı.

Kitosan diğer polisakkaritlere göre farklıdır. Kitosanın metallerle bağ yapma özelliği vardır. Ayrıca doğada bulunan diğer polisakkaritler asidik karakterde iken kitosan bazik karakter göstermektedir (Sudheesh vd., 2013).

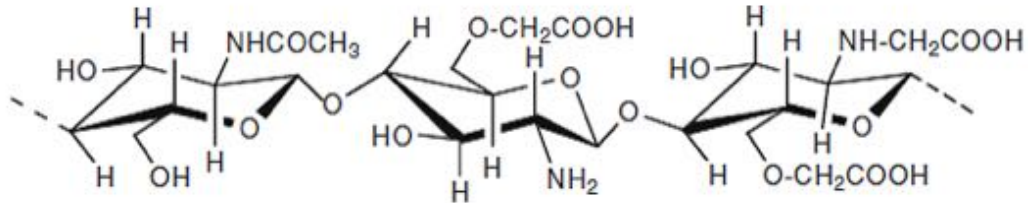
Kitosanın biyomedikal uygulamalara uygun bir polimerik yapı olmasını sağlayan biyolojik özellikler sırasıyla;

- biyolojik uyumluluğunun yüksek olması
- biyolojik olarak bozunabilmesi
- antifungal ve antibakteriyel etkisinin olması
- yağ tutucu özelliğinden dolayı kolesterol düşürücü ajan olması
- hemostatik özelliğe sahip olması olarak sıralanabilir (Papadimitriou vd., 2008).

1.2.3.1 Karboksimetil kitosan

Kitosanın sudaki sınırlı çözünürlüğü kimyasal modifikasyon ile giderilebilen bir problemdir (Jayakumar vd., 2007). Kitosanın kimyasal yapısı çeşitli yollarla modifiye edilebilir. Kimyasal modifikasyon ; kimyasal, radyasyon, fotokimyasal, plazma kaynaklı ve enzimatik aşılama ile olur. Kimyasal modifikasyonun çalışması yoğun şekilde nitrasyon, alkilasyon sülfanasyon, fosforilasyon, ksantasyonun, Schiff bazformasyonu ve alkilasyon, asilasyon, hidroksilasyon, ve aşı kopolimerizasyonu ile olur (Sudheesh vd., 2013).

Kitosanın modifikasyonları çözünürlük, antimikrobiyal aktivite ve diğer maddelerle etkileşim özelliklerini değiştirmek amacıyla gerçekleştirilmektedir (Singh vd., 2008). Örneğin, karboksimetilleme önemli bir kimyasal modifikasyon yöntemidir.



Şekil 1.6: Karboksimetil kitosanın kimyasal yapısı (Singh vd., 2008).

Şekil 1.6 Karboksimetil kitosan (O-CMCS)'nin kimyasal yapısı Karboksimetil kitine ve kitosanın N-asetil glukozamin içeren orijinal yapıları, biyoyumluluk, hidrofilite, biyobozunurluk ve farklı formlar alabilme özelliklerini arttırmaktadır (Muzzarelli, 1988). Bu karboksimetillenmiş türevlerin nanopartikülleri, ilaç taşınımı gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere sentezlenmektedir (Shi vd., 2005). Baran ve arkadaşları tarafından O-karboksimetil kitosan Schiff bazı sentezlenmiş ve

karakterizasyonu yapılmıştır. Sentezlenen polimer kullanılarak metal kompleksleri elde edilmiştir (Baran vd., 2015).

1.2.3.2 Destek matriksleri

Her afinite kromatografi metodunda destek matriksi seçiminde temelde;

- Mekanik, fiziksel ve kimyasal dayanıklılık,
- Ligand bağlantısı için basit türevlendirme,
- Birleşmiş ligandın yüksek kapasitesinde iyi gözeneklilik (Bu temelde matriksin gözeneklilik ve polimer yoğunluğu arasında değişimi gösterir.),
- Sabit hacimli yatak,
- Basit yenilenme ve yıkama olanakları

1.2.3.3 Metal şelatlayıcıların seçimi

Metaller, şelat grupların koordinasyonu ile immobilize olurlar. Metaller mevcut protein peptid bağının serbest koordinasyon grupların kontrol altında tutulmasına rağmen kararlılık için en az İDA tipi 3 dişli ligand gerekmektedir. En çok kullanılan geçiş metal iyonlarının bağ enerjisi 15-25 kcal/mol'dür.

Genel olarak N, O ve S gibi koordine atomlar, değişen oranları ve şelatların ayrıntılı yapıları İMA adsorbent için karboksimetilat alifatik amin ile farklı numaraya sahip NH₂ ve -COOH grupları rapor edilerek üretilmiştir (Porath,1992). Adsorbent merkezli İDA en çok kullanılmaktadır. İMAK'da metal iyonları immobilizasyonu için başka yaygın şelat tris(karboksimetri)etilendiamin (TED)'dir. TED-Me(II)'de ligand koordinasyonu için solda kalan tek liganddan dolayı tek koordinasyon kompleks oluşmuştur. Buna karşılık 3 koordinasyon merkezine kadar yapılan mevcut (İDA-Me) gerçek şelat yapısı bu ligand ile protein bağında oluşmuştur. Ayrıca TED temelli jeldeki proteinlerin zayıf bırakımına bu metal İDA-Me(II)'den TEDMe(II) daha fazla katkıda bulunmaktadır. Diğer farklı şelatlar arasında genel tris-amin bağımlılığı gerekmektedir. Teorik olarak da bu şelatörler 4 dişli fakat İMAK adsorbentlerin 3 ya da 4'lü olup olmadığına belli değildir (Porath vd., 1983).

1.2.3.4 Hareketli faz seçimi

İMAK'da hareketli faz için çözücü seçimi, protein veya molekül ayrılmasında önemlidir. Hedef protein için kısmen protonlanmamış ve onun yüzeyinde bir elektron verici grup bulunmaktadır. Protein içeren bu yöntemde; nötr pH'ya yakın veya İMAK kolonda uygulanması gerekmektedir. Fakat bazı proteinler de düşük pH değerlerinde muhafaza edilmektedir (Krishnan vd., 1986). Histidinin çözünen yan zinciri pKa: 6'dır. Böylece, pH: 6'ya yakın protein üzerinde yüzey histidinlerin yarısı protonlanmamış ve şelatlı metallere koordinasyon bağları ile kurulabilecektir. Buna karşılık, elektron verici grupları içeren diğer aminoasitlerin çok yüksek pKa değerleri vardır. Örneğin, sistein tiyol grup hakkında pKa: 9 ve triptofanın yan zincir azot için pKa: 15'dir (Mrabet vd., 1992). Nötr pH'ya yakın, histidin baskın aminoasit olduğu ve İMAK'da bir proteinin birikimine neden olmaktadır. Bu nedenle, yüzey histidinleri, bir protein üzerinde varsa İDA ve şelatlı +2 metal iyonu içeren tipik bir İMAK kolon için bağlamak gerekmektedir.

İMAK'da hareketli faz için başka gereksinim; bir tuz içermektir (genellikle >0.5 M NaCl). Bu sadece örnek bileşenleri ve kolon arasında elektrostatik etkileşimleri gidermek için yardımcı olmaktadır. Ama o da seçiciliği arttırmaktadır. Proteinin yüzeyinde metal şelat ve aminoasitler arasında oluşan elektron verici ve alıcı kompleksin kararlılığını arttırmaktadır (Sulkowski vd., 1985). İMAK'da basit adsorpsiyon için kullanılan hareketli faz; fosfat tuzları ya da asetat MOPS, MES, HEPES içeren sulu tampondur. Tris tamponu, İMAK kolonunda metal koordinasyon merkezinde zayıf yarışmacı olarak hareket etmektedir (Berna vd., 1997). İMAK kolonunda proteinlerin desorpsiyonu, hareketli fazın pH azaltılması ile elde edilmektedir. Histidin azalan pH ile protonlandırılmış olduğundan dolayı bu grubun bir metal şelat bağlayıcı olarak proteinin sabit faz çıkışı serbest bırakılana kadar zayıflatılmaktadır. MOPS, MES ve asetik asit (20 mM) içeren tampon karışımlarının hazırlanması pH: 4-8 aralığını kapsayacak şekilde kullanılmaktadır (Mrabet vd., 1992, Krishnan vd., 1986).

İMAK'da tutulan maddelerin desorpsiyonun da immobilize metal şelat için bir rekabet aracı olarak imidazol kullanılmaktadır. Bu durumda imidazol ve aktif türler protonlanmamış şeklindedir. Dolayısıyla, desorpsiyon tamponu bir yarışmacı ajan olarak imidazol kullanımında pH alkali olmaktadır.

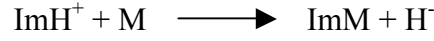
1.2.3.5 Çözücü karışımın etkisi

İMAK'da protein adsorpsiyon ve desorpsiyonu pH ve iyonik şiddete bağlı olmaktadır. Proteinlerin yüzeyinde elektron verici gruplara mevcut olan alkali pH'da şelat jel proton eklenmemiş olması istenmektedir. Literatürde peptid veya protein adsorpsiyonu pH: 5'den daha azdır. Yan yüz zinciri histidin olan imidazol solventi pKa: 6 civarındadır ve bu pH'da yarı protonlanmamıştır. Bu yüzden şelat koordinasyon bağımlı kurabilmektedir. Şelat matrikslerin bağlanmasından dolayı, protonlanmamış türlerin oluşuna doğru denge yön değiştirmektedir.

İMAK'da bağlı proteinleri yıkamada geleneksel olarak; ya pH'da azaltma ya da imidazol gibi yarışmalı ligand uygulamaları gerekmektedir. İmidazol kullanıldığı zaman önerilen tekrarlanabilirlik amacıyla benzer çözücü kullanılmaktadır. İlk protein numunesinin kolonda ilerlemesi uygulanmadan önce metal şelat ile imidazol içeren tampon çözelti dengelenmektedir. Eğer metal koordinasyon geometrisi oktahedral ise, imidazol moleküllerine katılan kompleks oluşumunda sayı İDA-Me(II)' de 0'dan 3'e kadar ayrılarak yapılmaktadır. Kompleks oluşumu yaygın hale gelirken reaksiyon dengelenmeli ve tam karşıtı değerler 0 ile 3 arasında takip edilmektedir. Proteinin desorpsiyon kontrolünü yapabilmek için çok kuvvetli bağlanma olmamaktadır. Onun yerine denge tamponunda imidazol ve tris gibi yarışmalı ligand derişimi artırılarak ve uygun pH indirgeyicilerle ayarlanabilmektedir. Proton, çok küçüktür ve bu yüzden belki en iyi kimyasal yarışmacı ajandır. Çözücüde örneğin; amonyak ve imidazol gibi diğer uzaklaştırıcı gibi önemli etkiye sahiptir.

1.2.3.6 Yarışmacı ajanların eklenmesi

Nötr pH veya İMAK kolonunda proteinlerin desorpsiyonu elektron vericiler gibi yarışmacı ajanlar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. İmidazol (Im) genellikle bu amaç için kullanılmaktadır. Ancak, imidazol formları bir İDA desteği ile nispeten kararlı bir metal komplekslerinde örneğin ilk doyurma kolonu ile imidazol çözeltisi (100 mM Im) ve tampon içeren (1mM Im) bir kolon ile dengelemek gerekmektedir (Sulkowski vd., 1985). Son zamanlarda İDA-Me(II) metal şelat kolonu ile imidazol kompleksleşme hareketli fazın asitlenmesiyle sonuçlanmaktadır (Sulkowski vd., 1996a, Sulkowski vd., 1996b). 8-8.5'den daha düşük pH'da imidazolun protonlanmış şekli proton ve bir şelatlı metal ile birleşmektedir.



Bu İDA-Me(II) imidazol “proton pompası” İMAK içinde desorpsiyonu profillerin yorumlanmasında hatalara neden olmaktadır. Adsorbe protein desorpsiyonu imidazol tarafından yarışmacı yerdeğişimi yerine protonasyon değişiklikleri olmaktadır. Bu nedenle, bu etkiyi en aza indirmek için 1 mM Im sütun dengeleme tampon ilave edilmesi tavsiye edilmektedir.

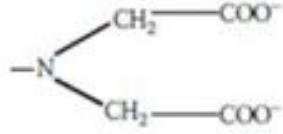
Olin ve Porath tarafından insan serum proteinleri ayırtmak için yarışmacı ajan olarak amonyak tuzu kullanılmaktadır (Porath vd., 1983). Glisin, histidin ve histamin İMAK'da yarışmacı ajan olarak kullanılmaktadır. Ancak bir yarışmacı ajan olarak histidin kullanımı gibi kolonlardan metal iyonlarının azalmasına neden olabileceği unutulmamalıdır.

1.3 Metal İyonları ile Adsorpsiyon Merkezleri ve İMAK'da Seçiciliğin İpuçları

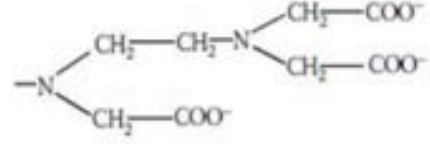
Pearson'a göre metaller sert, yumuşak ve orta olarak sınıflandırılmıştır. Her bir grup biyomoleküllerde O, N ve S ortamlarını daha seçici olarak tanımaktadır. Porath'ın çalışmalarında İDA şelatı için belirtilen geçiş metal iyonları Cu(II), Ni (II), Zn(II) ve Co(II)'dir. Yüksek biyolojik ilgisi olan Co(II), Mg(II) gibi sert metallere kadar uzayabilir. Yumuşak metaller özellikle Au ve Pd'un elde edilmesi önemlidir. Sülfür içeren protein, polipeptid ve aromatik aminoasit kalıntılarının seçici olarak tanımlanmasında Au ve Pd önemlidir. Metallerin geçiş serisinde Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) ve bir ölçüde Fe(III) biyolojik bileşimde seçici peptid dizileri enzimde ya geçiş merkezli ya da sabit merkezli olduğu bilinmektedir. 3 peptidli Gly-Gly-His, N metilamid türevi ve Gly-His-Lys olduğu bakır bağlı kısımlara sahip ve insan serum albümin Cu(II) taşıma bağlanma yapmaktadır. Zn için; koordinasyon kompleksleri onun stereokimyasal uyumluluğuna karakterize edilmiştir.

Genelde, 3 aminoasit kalıntı kombinasyonu vardır.

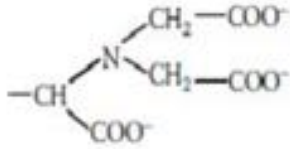
- 1; His, Glu, Asp'den seçilen kalıntıdır.
- 2; Cys 3'lü Zn bağlama içeren histidinli Zn enzim/proteinidir.
- 3; Yapısal bölgede histidinli Zn içeren önemli koordinasyon kalıntısı olan Cys'dir.



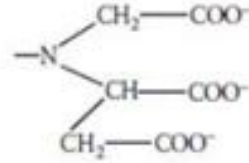
İminodiasetik asit (IDA)



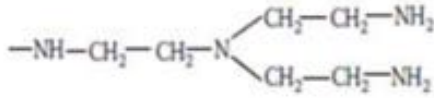
Tris(karboksimetil)etilendiamin (TED)



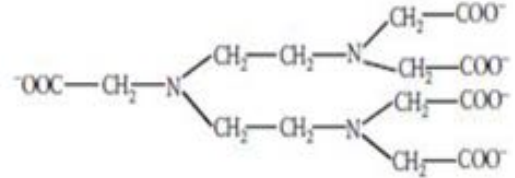
Nitriлотriasetik asit (NTA)



Karboksimetilatasetik asit (CM-Asp)



Tris(2-aminoetil)amin(TREN)



Dietilentriaminpentaasetat(DTPA)

İMAK, metallerin immobilizasyonunda matriks ile şelat arasında kullanılmaktadır. Bu yüzden; karşılıklı etkileşen metal ligand, şelat formda adsorpsiyon merkezi olarak adlandırılmaktadır. Tanıma mekanizmasında aynı tip His, Asp, Glu gibi aminoasit kalıntıları proteinde ortaya çıkmaktadır. Buna rağmen daha çok metalloproteinde serbest metallerin etkileşimleri karşılaştırıldığında peptid-protein molekülleriyle olan etkileşimleri dikkate alınması gerekmektedir.

İlk önce yapıların;

- 1) Metal iyonların doğası ve şelat fonksiyonları,
- 2) Tampon ve faz kullanılmış çözücü şartlarına bağlı olması istenmektedir.

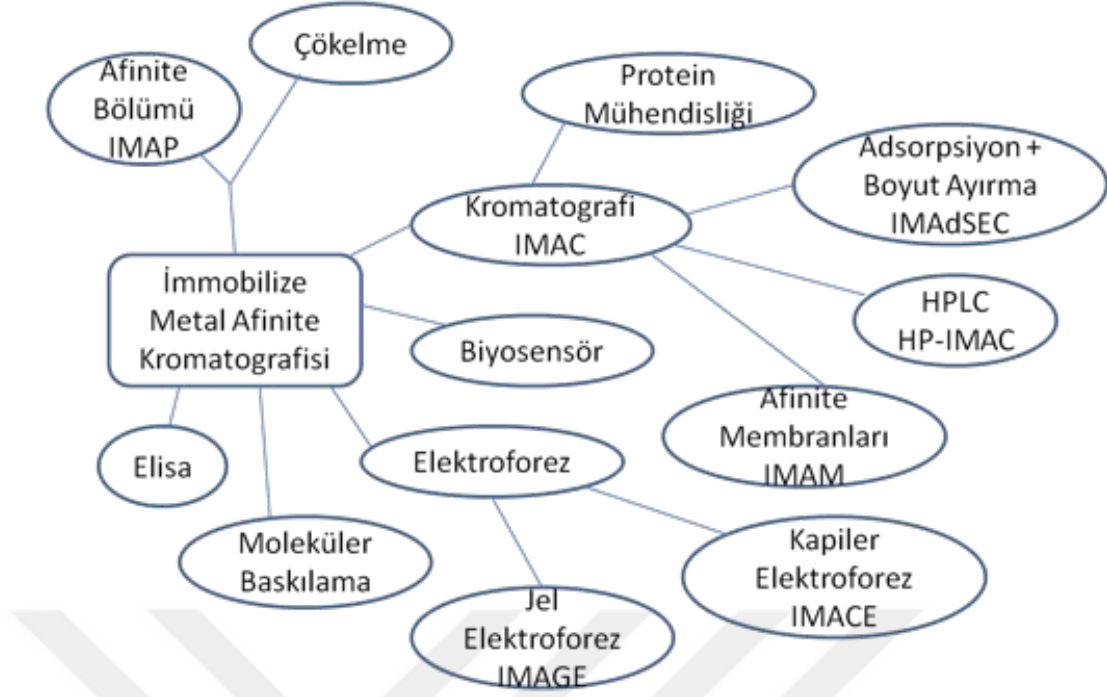
Çizelge 1.3: Metallerin ve ligandların sınıflandırılması.

Sınıf	Metal İyonu (Lewis Asit)	Başlıca Ligandlar
Sert	H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Nd ³⁺ , Cr ³⁺ , Co ³⁺ , Al ³⁺ , Ga ³⁺ , La ³⁺ , Eu ³⁺	H ₂ O, OH, OH ⁻ , RO ⁻ , NH ₃ , RNH ₂ , CO ₃ ²⁻ , FCOO ⁻ (oksijen ligandları)
Yumuşak	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Ti ⁺ , Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Cd ²⁺ , Hg ⁺ , Hg ²⁺	PSH, PS, R ₂ S, CN ⁻ , H ⁻ , I ⁻ (sülfür ligand)
Sınır	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Ni ²⁺ , Co ³⁺ , Sn ²⁺ , Pb ²⁺ , Rh ³⁺ , Ir ³⁺ , In ³⁺ , Ru ³⁺	İmidazol pridin, N ₂ , N ₂ ⁻ , N ₃ ⁻ , Br ⁻ (azot ligandları)

- İMAK'da proteinin özel durumunu önceden bildiren ipuçları; ilk grup geçiş metal iyon kompleksleri ile immينو asedik asit kullanılarak,
- Protein bağlı immobilize metal şelat kompleks elektron verici grubun ulaşılabilirlik ve bulunması,
- Protein yüzeyi birçok elektron verici grubu, immobilize metal şelat kompleksin saflaştırılmasını arttırmak istenmesi,
- Elektron verici mikro çevre içerisinde protein pKa ve bundan dolayı büyük belirleyiciler elektron verici kuvvet ve bağlanma isteğini etkilemesi,
- Protein yüzeyin ligand küreleri, şelat etkisinden dolayı şelat metal iyonları güçlü bağlanma olması,
- İDA-Cu(II) şelat metal kompleksin toplam net yükü negatiftir. Bu elektrostatik ve metalik koordinasyon etkileşimlerin etkisi altında ligand bağlanmasını önermektedir.

1.3.1 Uygulamalar

İMAK için çeşitli uygulamalar vardır. Vijayalakshmi tarafından; immobilize metaller, boyalar ve pseudobiyoafinite kromatografisinde histidinler ile protein arasında etkileşimde mekanik ve pratik sonuçlar incelenmiştir (Vijayalakshmi vd., 1989). Winzerling ve Porath protein ayırma ile ilgili İMAK temel ilkelerini tartışmıştır. Chaga, İMAK tarihsel gelişmeler ve genomik ve postgenomik çalışmalarda bazı yeni uygulamaları anlatmaktadır.



Şekil 1.7: Biyoteknolojide immobilize metal iyon afinite kullanımı.

1.3.1.1 Yüzey histidinleri ile proteinler

Proteinlerin aminoasit dizilimlerinde histidin grupları bulunur. Histidin çok yaygın bir aminoasit olmadığı halde biyolojik aktivite çok önemli rol oynar. Proteinlerin histidin kalıntısı ile proteinlerin üç boyutlu yapısı daha da iyi anlaşılmıştır. 1985 yılında Sulkowski bilinen yapının model proteinleri (sığır pankreas RNaz A, sitokrom c, lizozimler, albüminleri ve interferonlar gibi) ile çalışmış ve protein-metal-şelat tanınması için önemli kurallar belirlenmiştir (Sulkowski vd., 1985). Sulkowski'nin yaptığı çalışma histidin kalıntılarının düzenlenmesi veya proteinlerin biyolojik aktivitesinde kalıntıları üzerine bilgi vermektedir (Sulkowski vd., 1989, Berna vd., 1996, Krishnan vd., 1986).

1.3.1.2 His etiketli proteinler

İMAK'da protein saflaştırılması; histidinli, karboksi terminal uçlu veya onların amino grup içeren histidin kümelerine bağlanması geniş popülarite kazanmaktadır. Bu proteinler genellikle; His etiketli proteinler olarak adlandırılmaktadır. Böyle bir protein yapımında, proteinin yüzeyinde histidin etiketine erişilebilirlik ve onun verimli bir metal şelat bağlaması için önemlidir.

1.4 Kriyojeller

Makrogözenekli polimerik malzemeler; biyoteknolojik ve biyotıp alanında büyük ilgi görmektedir. Makrogözenekli materyalleri hazırlamak için; donma-kurutma, mikro emülsiyon oluşumu, gaz üfleme tekniği ve faz ayrışması gibi farklı yaklaşımlar vardır. Açık gözenekli yapı ve kontrollü gözenekler ile makrogözenekli polimerik malzemeler kriyojelleşme teknolojisi ile üretilmektedir. Kriyojelleşme, hemen hemen her türlü jel şekillendirme sistemleri ile gerçekleşen geniş çaplı gözenekli formlar ile makrogözenekli hidrojel hazırlamak mümkündür. Makrogözenekli hidrojel; sulu ortamda sentezlenen buz kristalleri ve erime sonrası makro yapı için bir kalıp uygulanarak sentezlenir. Geleneksel jellerin aksine, kriyojeller, içte birbirine bağlı makrogözenekçiçeren çözücü ve polimer ağa bağlı heterofaz sistemlerdir. 0.1 ile 200 µm ile gözenek boyutları ile kriyojel kullanılan jel öncüleri ve kimyasal reaksiyona bağlı olarak oluşabilir (Lozinsky vd., 2002, Plieva vd., 2007). Kriyojellerin en önemli özelliklerinden biri; virüs ve hücre süspansiyonlarının, ham hücre homojenatlarında, atık su olmak üzere sıvı içeren partikül işlemleri için yeterli makrogözenekleri olmasıdır. (Lozinsky vd., 2003, Noppe vd., 2007) .

Makrogözenekli kriyojel; çapı uygun koşullarda olan geniş sulu ortamda tipik olarak vinil ve divinil monomerlerin serbest radikal kopolimerizasyonu ile üretilmiştir. Kullanılan monomerlerin esas akrilamid gibi akrilik asit, N-izopropilakrilamid, dimetilakrilamid ve metakrilik asit türevleri vardır. Makrogözenekli kriyojellerin özellikleri, reaksiyon karışımları ve kriyojelleşme koşulları birçok parametreye bağlıdır ve serbest radikal çapraz bağlanma polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Yararlı seçici ligandlarla makrogözenekli kriyojel hazırlanması iki şekilde elde edilebilir.

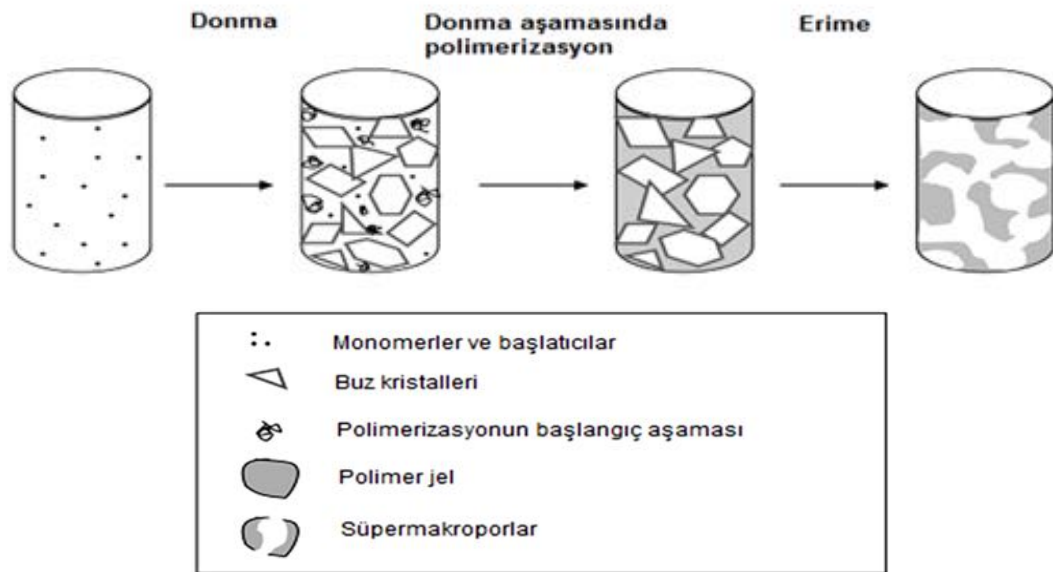
Fonksiyonel gruplar hazır kriyojel modifikasyonu ile eklenebilir (polimerizasyon sonra değişiklik) veya uygun monomerlerin kriyojel sentezi sırasında diğer monomerlerle kopolimerizasyon olabilir.

Kriyojellerin avantajları; hidrofobik ortamda geniş ve büyük ölçüde birbirine bağlı gözeneklere sahip olmasıdır. Bu, onların gözeneklerine mikrop veya hayvan hücrelerinin, protein içeren ve çeşitli boyutlarda maddeye ulaşılabilirliğini gösterir (Arvidsson vd., 2003, Arvidsson vd., 2002). Kriyojelde gözenekler; genellikle diğer jellere göre 100'den 1000 kat kadar daha geniştir (Diğer jeller için gözeneklilik 0.03 - 0.4 µm aralığındadır). Bununla beraber; kriyojeller düşük geri basınç ile diğer

kromatografik desteklere göre yüzey alanını azaltmayı sağlamaktadır. Bu değişim, afinite ayrışmalarda kriyojel kullanıldığında düşük toplam kapasite ve immobilize ligandların küçük miktarıyla meydana gelmektedir (Arvidsson vd., 2003, Arvidsson vd., 2002).

1.4.1 Kriyojel oluşumu

Kriyojel prosesi; Çözünmüş maddelerin kimyasal reaksiyonu ve jel oluşumu devam ederken küçük donmamış bölgelerde yoğunlaşan kriyojel ve donmuş çözücünün sıfırın altındaki sıcaklıklarda jelleşmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Tüm reaktifler donmamış sıvı mikrofazda yoğunlaşmış iken, çözücünün bir kısmı donmadan kalır ve reaksiyonları gerçekleştirmek için yeterli moleküler veya segmental hareketlilik ile donmamış parça halinde birikmiş çözünen bulunmaktadır. Donmamış sıvı mikrofazda yapılan kimyasal reaksiyonların hızlandırılmasında; genellikle negatif bir sıcaklıkta tanımlanmış aralık görülmektedir.



Şekil 1.8: Kriyojel oluşum şeması.

Buz kristallerinin erime sonrası (sulu ortamda buz); sürekli birbirine bağlı gözenek sistemleri oluşmaktadır. Şekil ve kristallerin büyüklüğü buz çözüldükten sonra oluşan gözeneklerin şekil ve büyüklüğü ile belirlenmektedir. Gözenek donma oranı, donma sıcaklığı ve çözeltide monomer/makromerler, çapraz bağlayıcı, reaksiyon karışımının ısı ön tarihi, örnek büyüklüğü, çekirdeklenme ajanların varlığı gibi

içeriğın ilk yoğunluğuna bağlıdır (Plieva vd., 2005, Ozmen vd., 2005, Plieva vd., 2004, Lozinsky vd., 2002). Tekrarlanabilir bir donma kalıp elde etmek için tüm deneysel koşullarda dikkatli bir kontrol gerekmektedir.

1.4.2 Donma hızı ve donma sıcaklığı

Donma hızı, kriyojel hazırlanması sırasında kontrol edilecek önemli parametrelerinden biridir. Yavaş dondurma hızı, büyüyen buz kristallerinin daha büyük boyutu ve bunun sonucu olarak, kriyojeller daha büyük gözenek boyutu ile hazırlanmıştır (Plieva vd., 2006, Ozmen vd., 2005, Plieva vd., 2004, Lozinsky vd., 2002). Aynı zamanda, donma sıcaklığı yeterince donma üzerindeki sorunları aşmak için düşük olmaktadır. Aşırı donma, buz kristalleri oluşturarak suyun ilk donma noktasının altında soğutma olarak tanımlanmaktadır.

1.4.3 Kriyojel gözenekli yapısı üzerindeki başlatıcı içeriğın etkisi

Serbest radikal polimerizasyon reaksiyonları olarak, başlatıcı amonyum persülfat ve aktivatör, N,N,N',N';-tetrametiletilediamin konsantrasyonları moleküler ağırlılığının yanı sıra polimerizasyon oranı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Polimerizasyon oranı;reaksiyon karışımında başlatıcı sistem miktarı ile kontrol edilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu başlaması ile APS ve TEMED arasındaki reaksiyon vinil ve divinil monomerlerin polimerizasyon reaksiyonu serbest radikalleri oluşturur. APS/TEMED sistemi başlatırken sıfırın altındaki sıcaklıklarda serbest radikal polimerizasyonu gerçekleştirmek için çok etkin bir başlatıcı sistemidir. Diğer başlatıcı sistemlerin kullanılma girişimleri sıfırın altındaki sıcaklıklarda serbest radikal polimerizasyonu tetiklemeleri başarılı olamamıştır. Sıfırın altındaki sıcaklıklarda serbest radikal polimerizasyonu ile makrogözenekli kriyojel hazırlarken çözeltinin donarak jelleşmesi gerçekleşmeden önce jelleşmiş karışım önceden dondurulmalıdır.

1.4.4 Kriyojel ve gözenek yapısı üzerindeki çözücü etkisi

Sıfırın altındaki sıcaklıklarda jel hazırlama durumunda donmuş çözücünün kristalleri gözenek oluşturucu olarak rol oynar. Böylece sudan başka diğer çözücülerin varlığı,hem polimer ve monomer çözünürlüğünü yarı donmuş sistemlerde çözücü kristallerinin büyüklük ve şekillerini etkilediği gibi donmamış bölgelerin hacmini de

etkiler. Kriyojel hazırlanması için çözücü seçimi esas çözücülerin erime noktası tarafından belirlenir (Çözücüler; orta derecede düşük sıcaklıkta dondurulabilir olmalıdır.). Çözücüler iki kategoriye ayrılabilir; çözücüler polimerik ağda meydana gelen ve polimerizasyon işlemi sırasında faz ayrılmasına sebep olan çözücüler ile karışabilir. Polimerizasyona bağlı faz ayrılmasında; hangi monomerin başlangıçta homojen çözelti olduğu ve polimerizasyonun çözücü halinde faz ayrılması sırasında izlendiği bir süreci göstermektedir.

Organik çözücülerin kullanımı ya da organik çözücü karışımı ile kriyojelin sentezi içinsu, suda çözünmeyen monomerler veya çapraz bağlayıcı durumunda gereklidir. Formamid gibi saf organik çözücüler, 1,4-dioksan ve dimetil sülfoksit veya bunların su ile karışımları kriyojel sentezi için kullanılmıştır (Plieva vd., 2006).

1.4.5 Sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyon üzerindeki kontrolü

Polimerizasyon reaksiyonu üzerinden zaman kontrolü; jelleşme verimi veya dönüşüm değerlendirilmesi yapılabilmektedir (Lozinsky, 2002). Dekstran tabanlı kriyojel için jelleşme verimi; reaksiyon karışımı 20°C'de tutulmuş ve 5-6 saat sonra %92-96 kadar ulaştığı zaman bağlı olduğu görülmüştür. (Plieva vd., 2006).

Zamanla monomerlerin reaksiyon kontrolü için etkili yol; H-NMR analizi uygulamaktır. Su; iyi yapılandırılmış kriyojel oluşumu için çok önem taşımaktadır. H-NMR; su ve donmamış su fazında çözünen çalışma için ideal bir tekniktir.

1.4.6 Serbest radikal polimerizasyonu ile kriyojel hazırlanması

Fonksiyonel komonomer ile doğrudan kopolimerizasyon üzerinde en basit yaklaşımlardan birisi makrogözenekli kriyojel sentezlemektir. Böylece, donma çözünme döngüsü kriyojel sentezi sırasında kurulmuştur. Genellikle fonksiyonel komonomer, bir reaksiyon karışımı için toplam monomerlerin %5-10 mol derişimindedir (Arvidsson vd., 2002, Ceylan vd., 2005, Plieva vd., 2006, Plieva vd., 2004, Plieva vd., 2008). Alternatif fonksiyonel komonomer, kriyojel hazırlanması için monomer temel olarak kullanılır (Ozmen vd., 2005). Böylece, %29 0-5 mol kadar başlangıç reaksiyon karışımında iyonik komonomerin (2-akrilamido-2-metilpropanol sülfonik asit) konsantrasyon özellikleri çok daha hızlı büyüme - şişme özellikleri ile iyonik kriyojellerin hazırlanmasına neden olur (Ceylan vd., 2005). Hem piyasada satılan (Arvidsson vd., 2002, Ozmen vd., 2005, Ceylan vd., 2005, Plieva

vd., 2004, Plieva vd., 2008) hem de sentezlenen fonksiyonel komonomerler fonksiyonlu makrogözenekli kriyojel hazırlanması için kullanılmıştır.

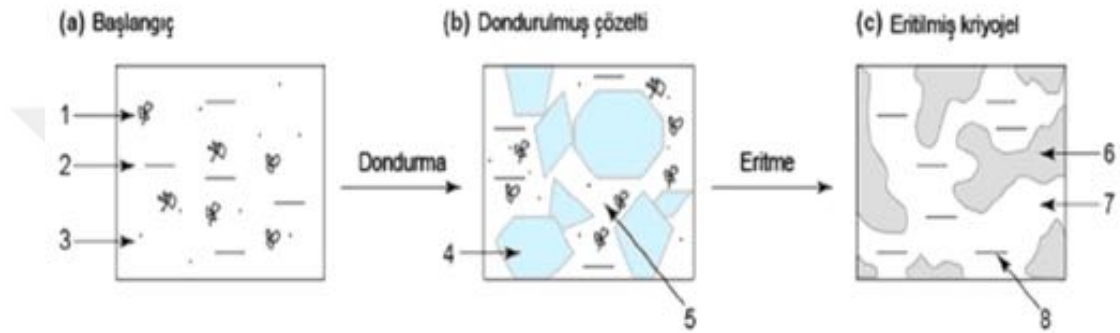
Çizelge 1.4: Serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanan makrogözenekli fonksiyonlu kriyojel.

Kriyojellerin Hazırlanması için Etkin Monomer Kullanımı	Fonksiyonel Komonomer	İşlevsellik	Referans
Akrilamid	2-dimetilaminoetil metakrilat	Zayıf anyon değişimi	12,53
2-akrilamido-2-metilpropanol	Akrilik asit	Katyon değişimi	58
Akrilamid	1-(N,N bis(karboksimetil) amino-3-alil gliserol	Metal şelat	55
Akrilamid	2-akrilamid-2-metilpropanolsülfonik asit sodyum tuzu	Kuvvetli kation değişimi	23

1.4.6.1 Kriyojellerin hazırlanışı ve karakterizasyonu

Çözücünün kristallenme hızı ve kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının uygun bir şekilde kontrol edilmesi uygun özelliklere sahip kriyojellerin hazırlanmasına olanak sağlar. Kriyojel sistemde, büyüyen buz kristalleri porojen olarak ve erimesinden sonra birbirine bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandıklarından dolayı tipik olarak kriyojeller, -10 ile -20°C gibi düşük sıcaklıklarda sulu ortamda üretilir. Reaksiyon karışımı soğutulduğunda donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur. Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı mikrofaz içinde gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözücünün kristalleri donma sırasında büyür, donmuş çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşir. Kimyasal reaksiyonlar bittikten sonra erime ile birlikte sistem sıvı çözücü ile dondurulmuş sürekli makrogözenekli kanallar

içeren bir matriksten oluşur (Şekil 1.9) (Plieva vd., 2007). Yarı donmuş reaksiyon ortamında çözünmüş reaktifler (jel öncülleri) kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği donmamış sıvı mikrofaz içinde yoğunlaşır. Böylece polimer zincirleri gözeneklerden gözenek duvarlarına taşınarak kriyojeller oluşturulur. Klasik bir jel içindeki polimer derişimi ile karşılaştırıldığında gözenek duvarları daha yüksek bir polimer konsantrasyonuna sahip olur. Gözenek duvarları içindeki artan polimer konsantrasyonu kriyojelin mekanik sertliğinin yeterli olmasını sağlar (Plieva vd., 2005; Arvidsson vd., 2003).



Şekil 1.9: Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: 1; çözültideki makromolekül, 2; çözücü, 3; düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri, 4; dondurulmuş çözücünün polikristalleri, 5; donmamış sıvı mikrofaz, 6; polimerik kriyojel, 7; makrogözenekler; 8; çözücü.

Kriyotropik jelleşme işleminin temel karakteristik özellikleri;

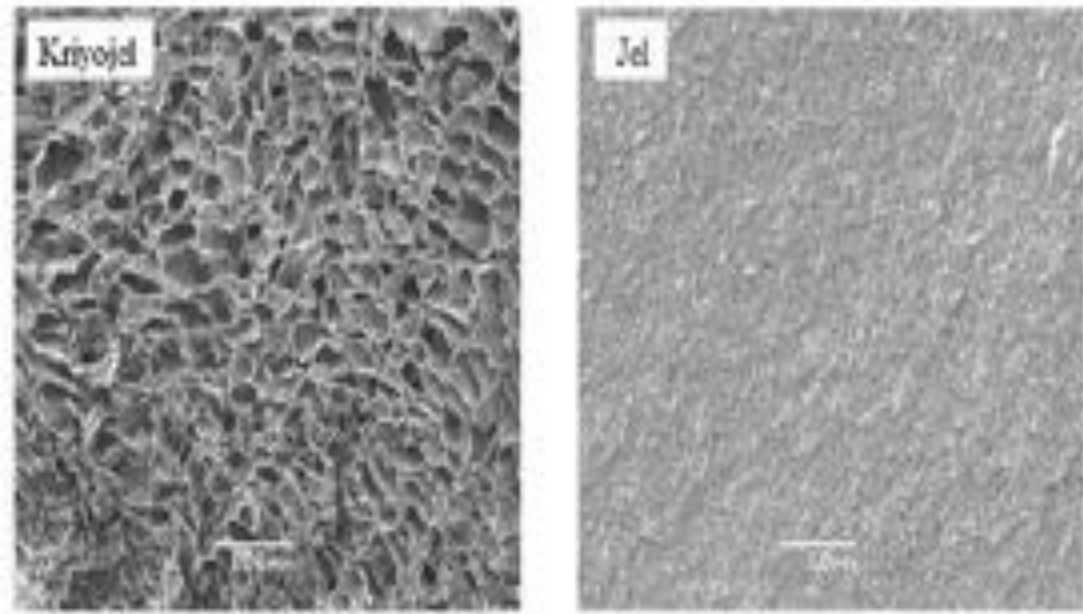
1) Jel oluşum ajanlarını içeren reaksiyon karışımı, çözücünün donma noktasının bir kaç derece altında dondurulur. Donmuş haldeki sistem, tek parça katı blok gibi görünmesine rağmen donmamış sıvı mikrofaz (UFLMP) içeren heterojen bir karışımdır.

2) UFLMP içerisindeki jel oluşum ajanlarının derişimi çözücünün donmasının etkisiyle yükselmiştir. Kriyoderişme olarak adlandırılan bu olay, donmuş sistemlerde jel oluşumunun hızlanmasına sebep olmaktadır. Aynı derişime sahip sıvı monomer çözeltilerine göre jelleşme oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir.

3) Çözücü kristalleri, gözenek oluşturucu ajan olarak işlev görmektedir. Çözücü eritildiğinde, boşluklar oluşmakta, makrogözenekler çözücü ile dolmaktadır. Çözücü ve jel faz arasındaki yüzey gerilimi, gözeneklerin yapısının yuvarlaklaşmasına ve gözenek yüzeylerinin daha düzenli olmasına sebep olmaktadır. Donma işlemi gerçekleştiğinde, çözücü kristalleri diğer kristallerle birleşene kadar büyümektedir.

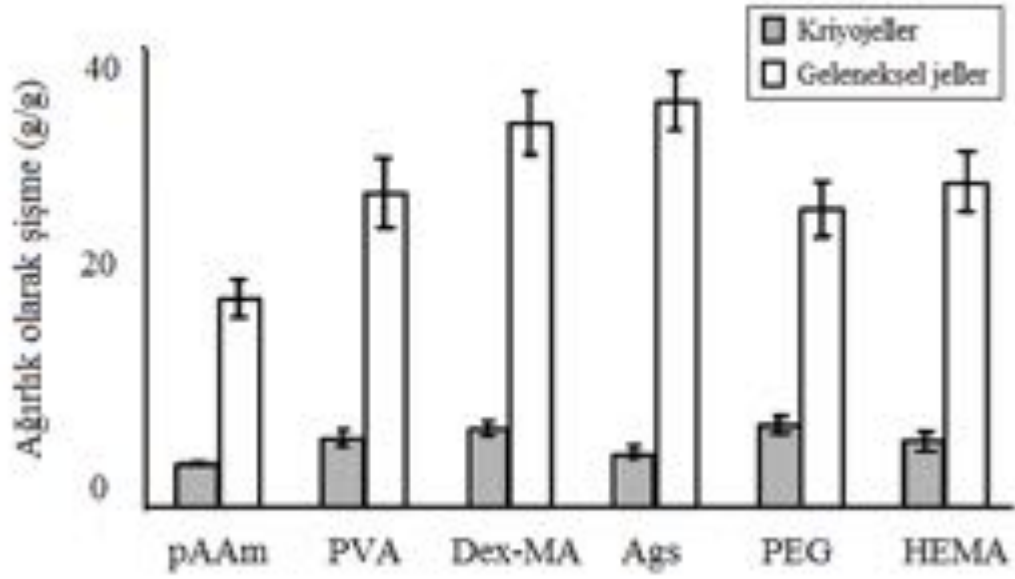
Eritme işleminden sonra jel içerisinde birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bir ağ sistemi oluşmaktadır. Gözeneklerin şekil ve boyutları, birçok faktöre bağlıdır; monomer derişimi ve kriyotropik uygulama sıcaklığı başta gelen faktörlerdir.

4) Kriyojellerin polimerik fazında mikrogözenek oluşumları gözlenmektedir. Bundan dolayı, kriyojeller hem heterofaz hem de heterogözenekli bir yapıya sahiptirler. -20°C'de sulu ortamda serbest radikal polimerleşmesi ile hazırlanan kriyojel monolitlerinin tipik gözenekli yapıları ve aynı yolla ama atmosfer sıcaklığında (20°C) hazırlanan klasik bir jelin yapısı Şekil 1.10'da gösterilmiştir (Plieva vd., 2007).



Şekil 1.10: Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı.

Kriyojelin gözenek yapısı 100 µm'ye kadar büyüklüğü olan geniş, birbirine bağlı makrogözeneklerden oluşurken, klasik jel homojen ve mikrogözeneklidir. Değişik jel öncüllerinden hazırlanan kriyojellerin şişme derecesi aynı koşullarda ama yüksek sıcaklıkta hazırlanan jellerin şişme derecesinden en az 3 - 6 kez daha azdır (Şekil 1.11) (Plieva vd., 2007). Hazırlanan kriyojellerin çoğu esnektir, süngersi yapıdadır ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda sulu ortamda serbest radikal polimerizasyonu ile uygun bir şekilde kontrol altında tutularak istenen özellikte kriyojeller üretilebilirler (Plieva vd., 2006; Plieva vd., 2004). Büyük (kapiler boyutta) ve birbirine oldukça bağlı gözeneklerin varlığından dolayı kriyojellerin çoğu gözenekli yapıya zarar vermeden kurutulabilir ve sonra hızla tekrar şişirilebilirler. Kriyojellerin kurutulması en önemli özelliklerini oluşturur (Plieva vd., 2007).



Şekil 1. 11:Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri.

Kriyojeller elastik özellikli maddelerdir. Esnek ve süngerimsi yapılarından dolayı pAAm kriyojellerin avantajı büyük deformasyonlara dayanabilirler ve mekanik olarak zarar görmeden yüksek oranda (%80'e kadar) kolayca sıkıştırılabilir olmalarıdır. Ancak klasik pAA jeller %30'dan az sıkıştırıldıklarında kolayca tahrip olurlar. Sıkıştırılma kalktığına kriyojeller hemen eski şekline geri dönerler (Plieva vd., 2007; Plieva vd., 2004).

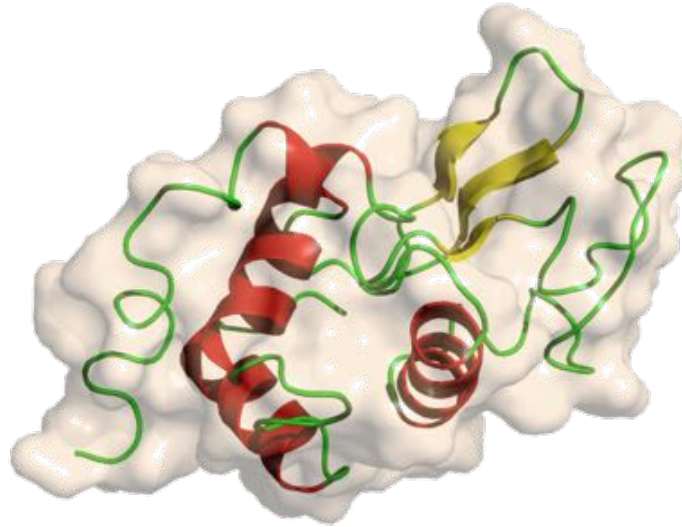
1.4.6.2 Kriyojel uygulamaları

Temel olarak immobilize hücreler ve enzimlerle yapılan biyokatalizde, partikül içeren akışkanlardan hedef moleküllerin ayrılmasında, hücre organellerinin, virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografisinde ve memeli hücre kültürleri için üç boyutlu matris olarak biyomedikal uygulamaları bulunmaktadır. Mikroküre formunda hazırlanan kriyojeller ise özellikle mikrobiyal hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Makrogözenekli monolitler (1 - 100µm'lik gözenekli) virüslerin, hücre organellerinin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin ayrılmasında kalıp olarak kullanılmaktadır (Plieva vd., 2007).

1.5 Lizozim

Lizozim, ilk olarak Londra'da Bakteriyolog Alexander Fleming tarafından 1922'de keşfedilen bir hidroliz enzimidir. Fleming soğuk aldığında, mukus salgısından birkaç damlayı bakteriyel kültüre yerleştirmiş ve bakterilerin bir süre sonunda parçalandığını keşfetmiştir. Bakterileri parçalayan, mukustaki bu antibakteriyel madde lizozimdi (Freeman ve Stryer 1995). Daha sonraki çalışmalarda, lizozim vücut salgılarında, gözyaşında, tükürkte, rahim boynunda, bitkilerde ve yumurta beyazında bulunduğu tespit edilmiştir. Gözdeki enfeksiyonlara karşı gözyaşındaki lizozim savunma görevi yapar. Sindirim özelliği sayesinde mide salgılarında koruma görevi yapar. Yumurta beyazındaki lizozim ise antibakteriyel özelliğinden dolayı embriyoyu ve besin maddelerini bakteriyel etkilere karşı korur. Tavuk, hindi, orangutan ve keseli sıçanlarda bulunan lizozim, amino asit dizisinde benzerlikler gösterir (Matsushima vd., 1969).

Enzimin yapısı, X ışınları kullanılarak 1965 yılında David Phillips tarafından açıklanmıştır. Tavuk yumurtasından elde edilen lizozim, elipsoidal yapıdadır. Boyutları yaklaşık olarak $45 \times 30 \times 30$ Angstrom olan ve 129 aminoasit kalıntısından oluşan küçük bir proteindir. Lizozimin bir birim ağırlığı yaklaşık 14600 daltondur. Üç kısa zinciri mevcuttur ve 4 disülfid bağı içermektedir (Blake vd., 1965). Proteinin haritasındaki, alfa heliks yapısı 129 aminoasit 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 (Diamond vd., 1965).



Şekil 1.12: Lizozimin üç boyutlu yapısı.

1.5.1 Lizozimin kullanım alanları

Ticari değeri olan lizozimin kullanım alanları, gıda alanında olduğu kadar eczacılıkta da fazladır. Lizozimin güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olması eczacılıkdaki ticari önemini artıran önemli bir özelliğidir. Bu enzim, klinik uygulamalarda hastalıklar ve yaralanmaların tedavisinde, ülser, enfeksiyonlar, yanıkların tedavisinde ve bazı antibiyotiklerin bir destekleyicisi olarak, muazzam bir potansiyele sahiptir (Alderton vd., 1964, Arıca vd., 2004). Gıda endüstrisinde ise, paketlenme filmlerinin antiseptik duruma getirilmesi için kullanılır. Sosis, sucuk, diğer etler ve süt tozu gibi yiyeceklere, koruyucu olarak eklenebilir (Reid 1987). Lizozim, gıdaların konserve yapılması sırasındaki sterilizasyon için gerekli olan sıcaklığa düşürmekte ve immobilize edilerek otosterilizasyonunda da kullanılmaktadır (Procton ve Cunningham 1988). Lizozim, peynir olgunlaştırılması, mayalanması sırasında bütirik asit fermantasyonuna sebep olan bakteriyel türlerin, bir inhibitörü olarak mandıra teknolojisinde kullanılmaktadır. Lizozimin pıhtılaşma süresini kısaltmak ve ürünü miktarını artırmak için kullanılması da mümkündür (Giangicomo vd., 1992).

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Baydemir ve arkadaşları (2012); poli (hidroksietilmetakrilat-metaakriolil-L-triptofan) (PHEMATrp) nanopartikülleri yüzey aktif madde serbest emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra, Cu (II) iyonları lizozim adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere PHEMA Trp nano partiküllere şelatlanmıştır. pH 7,0'da 326,9 mg/g polimer adsorpsiyon kapasitesi olarak ölçülmüştür.

Çimen ve arkadaşları (2012); sıçan karaciğer homojenatından sitokrom c saflaştırmak için kriyojel kolonu hazırlamışlardır. Başlatıcı/aktivatör olarak N,N,N,N-tetrametilen diamin (TEMED)/amonyum persülfat (APS) kullanılmış ve serbest radikal kriyo-kopolimerizasyon yöntemiyle Poli (hidroksietil metakrilat- N-methacryloyl-(I)-histidine metil ester, [PHEMAH] kriyojel üretilmiştir. N-Methacryloyl-(I)-histidine metil ester (MAH) metal şelatlayıcı ligand olarak kullanılmıştır. PHEMAH kriyojele Cu^{+2} iyonları şelatlanmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 20,8 mg/g polimer olarak bulmuşlardır.

Başar ve arkadaşları (2007); manyetik koşullar altında boya afinite küreleri oluşturup lizozim saflaştırmışlardır. Nano boyutta Fe_3O_4 mevcudiyetinde Cibacron blue F3GA taşıyan manyetik poli (2 -hidroksietil metakrilat) mPHEMA küreler süspansiyon polimerizasyonu yardımı ile kriyojel hazırlamışlardır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesini 342 mg/g polimer olarak bulmuşlardır.

Andaç ve arkadaşları (2013); insan serumuda albümin azaltımı için moleküler baskılanmış poli (hidroksietil metakrilat) bazlı kriyojeller tasarlamışlardır. Burada HSA baskılanmış kriyojellerde %90'a varan bir başarı elde edilmiştir.

Wang ve arkadaşları (2008); Cam kolonunun içinde iminodiasetik asit (İDA) bağlı poliakrilamid kriyojeller hazırlamışlardır (~16 mm çapında). Bu kriyojelleri Zn^{+2} ve Ni^{+2} ile yüklemişler ve Zn^{2+} -İDA-kriyojeller ve Ni^{2+} -İDA-kriyojeller elde etmişlerdir. Bu kriyojellerin çeşitli koşullar altında adsorpsiyon ve desorpsiyon davranışlarını açıklamak için model protein olarak albümini seçmişlerdir. Yapılan

çalışmalar sonucunda Zn^{2+} -İDA ve Ni^{2+} -İDA-kriyojellerin birbirine bağlı süpermakrogözeneklere ve yüksek su geçirgenliklerine sahip olduklarını gözlemlemişlerdir.

Erzengin ve arkadaşları (2010); Yüksek protein adsorpsiyon kapasitesi için geniş yüzey alanına sahip olan Cu^{2+} bağlı sporopolen partikülleri gömülü süper makrogözenekli kriyojelleri serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Bu kriyojelleri HSA (human serum albümin)'in saflaştırılmasında kullanmışlardır. HSA'nın maksimum adsorpsiyonunu pH 8 fosfat tamponunda 676,6 mg/g sporopolen olarak bulmuşlardır.

Alkan ve arkadaşları (2009); Romatoid artrit tedavisine yönelik protein A takılı-Poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojel hazırlamışlardır. Protein A takılı-poli (HEMA) kriyojelinde maksimum immünoglobülin G (IgG) adsorpsiyonu pH 7,4'te 83,2 mg/g olarak bulmuşlardır. İnsan plazmasından adsorpsiyon incelendiğinde ise daha da yüksek adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir (98,7 mg/g).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

3.1.1 Kullanılan kimyasal malzemeler

Deneyde kullanılan ligand O-CMCS-4a ligandı 'Suda Çözünebilir O-Karboksimetil Kitosan Schiff Bazı Partikülleri' TÜBİTAK, KBAG-113Z296 projesi kapsamında sentezlenmiş ve temin edilmiştir. 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri Fluka A.G'den alındı (Buchs,Switzerland) ve hidrokinon inhibitörü varlığında indirgenmiş basınçta damıtılarak kullanılmaya kadar 4°C'de saklanmıştır. N'-metilen-bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametilen daimin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) Sigma'dan sağlanmıştır (St. Louis, USA). Lizozim Aldrich (Munich, Germany)'den satın alınmıştır. Deneyde kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA) RO pure LP® yüksek akış selüloz membranla ters osmos ünitesi (Barnstead D2731) Barnstead 3804 NANOPURE® organik kolloid uzaklaştırılması ve iyon değişim dolgu yatak sistemiyle devam eden aletinden kullanıldı. Polimerizasyon deneylerinde organik faz olarak toluen (Merck, Germany) seçilmiştir. Dağıtma ortamı ise damıtık sudur. Aşağıda verildiği gibi süspansiyon kopolimerizasyonu tekniğiyle hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 O-karboksimetil kitosan Schiff bazı (O-CMCS-4a) kompleks partiküllerinin sentezi

O-CMCS-4a partiküller TÜBİTAK projemiz kapsamında hazırlandı ve literatüre verildi (Baran ve ark, 2015). 0.50 g CS (kitosan) 40 mL asetik asit (%2) çözeltisinde çözünmesinin ardından, 20 mL etanol ilave edilerek karışıma devam edildi. Önceden sentezlenmiş olan monoimin bileşiğinin fazlasının (yaklaşık CS'nin 3 katı) 50 mL etanolde hazırlanmış çözeltisi reaksiyon ortamına ilave edilerek, 80°C de 12 saat reflaks edildikten monoiminin-kitosan kodenzasyonu gerçekleştirildi. 10 mL

etanolda hazırlanmış 2.50 g monokloroasetik asidin çözeltisi reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi ve 60°C'de 5 gün karıştırma işlemine devam edildi. İşlem sonunda, reaksiyonda çöken katı (kahverengi-turuncu) süzildükten sonra reaksiyona fazlası (monoimin) sıcak alkol ile birkaç kez yıkanarak ortamdaki uzaklaştırıldı ve 6 saat süreyle 50°C'de etüvde kurutuldu. Suda çözünebilen O-karboksimetil kitosan Schiff bazı (O-CMCS-4a) %52 verimle elde edilmiş olundu.

3.2.2 O-karboksimetil kitosan Schiff bazı komplekslerine Cu²⁺ iyonlarının takılması

Cu²⁺ takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı kompleksleri, Cu²⁺ iyonlarının şelatlanması için şu işlemler yapıldı; oda sıcaklığında Cu²⁺'in şelatlanması için pH 4,1'de (HCl veya NaOH ile ayarlanır), 30 ppm Cu²⁺ iyonları içeren 50 mL sulu çözeltiye karıştırıldı. Cu²⁺ iyonları kaynağı olarak 1000 ppm atomik absorpsiyon standart çözeltisi (%10 HNO₃ içeren) kullanıldı. Beher 100 rpm'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı (dengeye gelmesi için yeterli bir süredir). Sonuçta oluşan çözeltideki Cu²⁺ iyonlarının konsantrasyonu grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AA800, Perkin Emler, Bodenseewerk, Germany) yardımı ile bulundu. Adsorblanan Cu²⁺ iyonları, başlangıç çözeltideki Cu²⁺ iyonları ve denge çözeltideki Cu²⁺ iyonları kullanılarak bulundu (Eşitlik 3.1).

$$Q = [(C_0 - C)V]/m \quad (3.1)$$

Burada, Q; 1 g O-karboksimetil kitosan Schiff bazı kompleksi adsorblanan metal iyon miktarını (mg/g); C₀ ve C sırasıyla sulu çözeltideki metal iyonunun başlangıç ve son derişim değerini (mg/mL); V sulu fazın hacmi (mL); m ise kullanılan kompleks miktarını (g) vermektedir.

Cu²⁺ şelatlı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı komplekslerinden Cu²⁺ sızması 1,0 M NaSCN içeren ve pH 4-8 arasında olan ortamda incelendi. O-karboksimetil kitosan Schiff bazı kompleksleri süspansiyonu 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

Cu²⁺ iyon derişimi AAS kullanılarak süpernatanttan hesaplandı. Şuna da dikkat edilmelidir ki immobilize metal içeren kompleksler, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponuyla %0,02 sodyum azid içeren çözeltide mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için 4°C saklandı.

3.2.3 Cu²⁺ bağı O-karboksümetil kitosan Schiff bazı kompleksleri gömülü Poli (2-Hidroksietil metakrilat) kriyojellerin hazırlanması

Cu²⁺-takılı O-karboksümetil kitosan Schiff bazı (Cu²⁺-O-CMCS-4a) partikül gömülü kompozit kriyojelin hazırlanması aşağıda açıklanmaktadır: 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA, 1.75 mL) monomer olarak ve *N,N'*-metilen-bisakrilamid (MBAAm, 40 mg) çapraz bağlayıcı olarak deiyonize suda (2.2 mL) çözündü. Çözünmüş oksijeni elimine etmek için bu karışım 5 dakika azot atmosferinde bekletildi. 65 mg Cu²⁺-O-CMCS kompleksleri polimerizasyon karışımına eklendi. Karışıma %10'luk amonyum persülfat (APS, 0,1 mL) çözeltisi eklendikten sonra çözelti bir buz banyosunda 4-5 dakika soğutuldu ve daha sonra karışım alt çıkış kapalı olan plastik şırıngaya (5 mL, iç çapı 0,8 cm) döküldü. Tetraetilmetilendiamin (TEMED, 0,01 mL) eklenerek serbest radikal polimerizasyonu başlamadan şırıngalar, 24 saat süreyle -12°C'de bekletildi. Daha sonra polimerizasyon çözeltisi oda sıcaklığına getirilerek reaksiyonun tamamlanması sağlandı. Reaksiyona girmeyen monomer ve başlatıcının uzaklaştırılması için uzun bir yıkama işlemi uygulandı. Yıkama çözeltisi olarak seyreltik HCl çözeltisi ve su-etanol karışımı, monolitik kriyojel kolondan geçirildi. Hazırlanan kompozit kriyojelin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yüzey morfolojisi incelendi. Kompozit kriyojele karşı, model protein olarak seçilen lizozimin adsorpsiyonuna pH, derişim ve sıcaklığın etkisi incelendi. Kullanılmadığı zamanlarda kriyojel, %0,02 sodyumazid içeren çözeltide +4°C'de korunmuştur.

3.2.4 Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu

Lizozim adsorpsiyonuna; pH, tampon, sıcaklık, başlangıç lizozim konsantrasyonu, akış hızı ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyon davranışı incelenirken, sıcaklık kontrolü için su ceketli cam kolon içeren bir sürekli sistem kullanıldı. Kriyojel 30 mL su ile yıkandıktan sonra 30 mL fosfat tamponuyla (pH: 9) 1,0 ml/dk akış hızında 30 dakika etkileştirildi. Tüm adsorpsiyon deneyleri, 1,0 mL/dk akış hızı, 25°C, 0,5 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda 30 mL lizozim çözeltisinin 30 dk süre ile kolondan geçirilmesiyle gerçekleştirildi.

İMAM üzerine adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında adsorpsiyon ortamından alınan çözeltilerin 280 nm'de UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) kullanılarak değerlendirildi. Lizozimin

0,1-3,0 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve 3.2 Eşitliği kullanılarak protein miktarı hesaplandı.

$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte: Q; İMAM üzerinde adsorblanan lizozim miktarını (mg/g), C_0 ; lizozimin çözeltideki başlangıç derişimini (mg/mL), C; adsorpsiyon sonrası sulu fazın lizozim derişimini (mg/mL), V; çözeltilerin hacmini (mL) ve m ise kullanılan Cu^{2+} takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı kompleksleri gömülü kriyojellerin ortalama kütlesidir (g). Adsorpsiyon ortamının pH'sının, lizozim adsorpsiyonuna etkisi, pH 6,0 ile 10,0 arasında, çalışıldı. Fosfat, tamponu ile tampon etkisi incelendi. Sulu ortamdan Lizozim adsorpsiyonu davranışının sıcaklıkla değişimi 5°C, 15°C, 25°C ve 35 °C sıcaklıklarında araştırıldı. İyonik şiddetin etkisi tampon içerisinde farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren (0,025-0,2 M) çözeltileri ile 25 °C ortam sıcaklığında gerçekleştirildi. Akış hızının etkisi 0,5–3 mL/dk arasında değiştirilerek incelendi. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonuna adsorbent dozunun etkisi adsorpsiyon ortamında çözelti hacmi sabit tutularak farklı miktarlarda katı faz kullanılarak gerçekleştirildi. Deneysel adsorpsiyon izotermi ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin belirlenebilmesi için 0,1-3,0 mg/mL başlangıç konsantrasyonuna sahip lizozim ile çalışıldı.

3.2.5 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Lizozim desorpsiyonu için 1 M NaCl desorpsiyon ajanı olarak kullanıldı. Lizozim adsorplanmış Cu^{2+} takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı-4a gömülü kriyojellerden desorpsiyon ajanı 1 mL/dk akış hızında 30 dakika süreyle kolondan geçirildi. Desorpsiyon ortamındaki lizozim miktarı 280 nm'de spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Desorpsiyon ortamındaki lizozim konsantrasyonu ile kriyojeldeki adsorbe olmuş lizozim miktarından desorpsiyon oranı Eşitlik 3.3'deki gibi hesaplandı.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan lizozim}}{\text{Adsorblanan lizozim}} \times 100 \quad (3.3)$$

Cu^{2+} takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı-4a gömülü kriyojelin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 35 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işlemi sonrasında, Cu^{2+} takılı

O-karboksümetil kitosan Schiff bazı-4a gömülü kriyojel, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH çözeltisi ile yıkanmış 0.05 M fosfat tamponu (pH: 9) ile dengeye getirilmiştir.

3.2.6 Kriyojelin karakterizasyonu

3.2.6.1 Cu²⁺-O-CMCS-4a Schiff bazı partiküllerin ve kompozit kriyojelin şişme testleri

Cu²⁺-O-CMCS-4a Schiff bazı partikül ve kompozit kriyojelin şişme davranışları, deiyonize su içerisindeki denge şişme oranlarının belirlenmesi ile hesaplanmıştır. Denge şişme oranının belirlenmesinde uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: 60°C'da vakum etüvünde kurutulan Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojeller dikkatlice tartıldıktan sonra, 20 mL damıtık su içeren bir beherlere konulmuştur. Sabit sıcaklıkta 25±0.5°C'de 2 saat bekletildikten sonra, Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojel ortamdan alınmış ve SCALTEC marka terazi (Germany) ile (1x 10⁻⁴ hassasiyetli) tartılmıştır. Kuru ve şişmiş Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojel ağırlıkları kaydedilmiştir. Her bir yapının su içeriği Eşitlik 3.4'de verilen denklem ile ayrı ayrı hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme oranı} = (W_s - W_o) / W_o \times 100 \quad (3.4)$$

Burada; W_o: kuru ağırlık (g) W_s: şiştikten sonraki ağırlığı (g) göstermektedir.

Ayrıca kompozit kriyojelin makrogözeneklilik yüzdesinin belirlenmesi için uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir:

Denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel örnekleri (W₁) tartılmıştır. Daha sonra şişmiş kriyojel örneği bir enjektör içerisine alınmıştır. Kriyojelin makrogözeneklerinde bulunan suyun uzaklaştırılması için kriyojel enjektör yardımıyla sıkılmış ve kriyojeller (W₂) tartılmıştır. Kriyojellerin sahip olduğu makrogözeneklilik yüzdesi Eşitlik 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.6.2 Cu²⁺-O-CMCS-4a Schiff bazı partiküllerin ve kompozit kriyojel yapılarının SEM analizleri

Cu²⁺-O-CMCS-4a partiküller ve kompozit kriyojel polimerik yapıların yüzey

morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla örnekler, şişirildikten sonra %98'lik etanolde bekletilmiş böylece gözeneklerdeki suyun alkol ile yer değiştirmesi sağlanmıştır. Daha sonra, etanol difüze olmuş polimerik yapılar 50°C'da vakum etüvünde kurutulmuştur. Kurutulmuş yapılar altın kaplama cihaz haznesine yerleştirilmiş ve vakumda çok ince bir altın tabaka ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskop kullanılarak (EVO LS 10 ZEISS, Japonya) görüntüleri alınmıştır.

3.2.6.3 Cu²⁺-O-CMCS-4a partiküllerin ve kompozit kriyojel yapılarının FT-IR analizleri

Cu²⁺ takılı O-karboksümetil kitosan Schiff bazı-4a gömülü kriyojellerin yapı analizi FT-IR-ATR spektrofotometresi (Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kriyojel örnekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, kriyojel örnekleri havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnek FT-IR-ATR cihazının örnek haznesinde preslenmiş, böylece yüzeyden gelen toplam ışık yansıması 625-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ve 2 cm⁻¹ çözünürlükle ölçülmüştür.

3.2.6.4 Cu²⁺-O-CMCS partikül gömülü kompozit kriyojeller ile sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları

Lizozim adsorpsiyonuna; pH, başlangıç lizozim konsantrasyonu, sıcaklık, akış hızı ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Sulu ortamdaki lizozim adsorpsiyon davranışı incelenirken, sıcaklık kontrolü için su ceketli cam kolon içeren bir sürekli sistem kullanıldı. Kriyojel 30 mL deiyonize su ile yıkandıktan sonra 30 mL çalışma tamponuyla 1,0 ml/dk akış hızında 30 dakika süreyle etkileştirildi. İMAK üzerine adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında adsorpsiyon ortamından alınan çözeltilerin 280 nm'de UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) kullanılarak değerlendirildi. Lizozimin 0,1-3,0 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve 3.2 Eşitliği kullanılarak protein miktarı hesaplandı.

$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte: Q; İMAK üzerinde adsorblanan lizozim miktarını (mg/g), Co; lizozimin çözeltideki başlangıç derişimini (mg/mL), C; adsorpsiyon sonrası sulu fazın lizozim derişimini (mg/mL), V; çözeltinin hacmini (mL) ve m ise kriyojele gömülen **Cu²⁺-O-CMCS-4a partiküllerin miktarını (g)** göstermektedir. Adsorpsiyon ortamının pH'sının, lizozim adsorpsiyonuna etkisi, fosfat tamponunda pH 6,0 ile 10,0 arasında çalışıldı. Sulu ortamdaki Lizozim adsorpsiyonu davranışının sıcaklıkla değişimi 5-25°C sıcaklıklarında araştırıldı. İyonik şiddetin etkisi tampon içerisinde farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren (0,025-0,2M) çözeltileri ile 25°C ortam sıcaklığında gerçekleştirildi. Akış hızının etkisi 0,5–3 mL/dk arasında değiştirilerek incelendi. Sulu ortamdaki lizozim adsorpsiyonuna adsorbent dozunun etkisi adsorpsiyon ortamında çözelti hacmi sabit tutularak farklı miktarlarda katı faz kullanılarak gerçekleştirildi. Deneysel adsorpsiyon izotermi ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin belirlenebilmesi için 0,1-3,0 mg/mL başlangıç konsantrasyonlarındaki lizozim çözeltileri ile çalışıldı.

3.2.6.5 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojellere adsorbe olan lizozimin desorpsiyonu için, 1 M NaCl desorpsiyon ajanı olarak kullanıldı. Desorpsiyon çözeltisi 1 mL/dk akış hızında 30 dakika süreyle kolondan geçirildi. Desorpsiyon ortamındaki lizozim miktarı 280 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Desorpsiyon ortamındaki lizozim konsantrasyonu ile adsorbe olmuş lizozim miktarından desorpsiyon oranı Eşitlik 3.3'deki gibi hesaplandı.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan lizozim}}{\text{Adsorplanan lizozim}} \times 100 \quad (3.3)$$

Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojeller, rejenerasyon ve sterilizasyon amacıyla 50 mM NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş ve çalışma tamponlarıyla dengeye getirilmiştir.

Tüm adsorpsiyon deneyleri, 1,0 mL/dk akış hızı, 25°C, 0,5 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda 30 mL lizozim çözeltisinin 30 dk süre ile kolondan geçirilmesiyle gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Cu²⁺-O-CMCS Partikül ve Kompozit Kriyojelin Karakterizasyonu

4.1.1 Cu²⁺-O-CMCS partikül ve kompozit kriyojelin şişme testleri

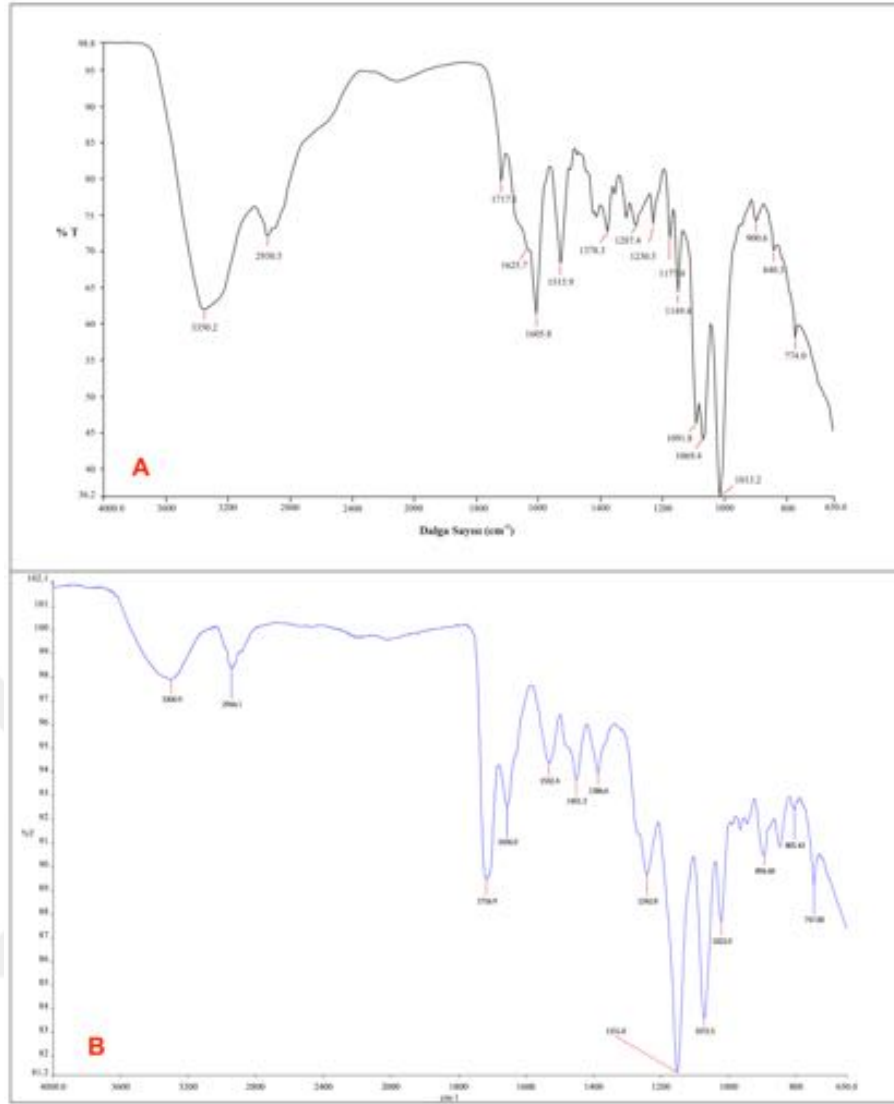
Cu²⁺ takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı-4a gömülü kriyojeller, çapraz bağlı ve hidrofilik yapıda matrikslerdir. Ayrıca bu kriyojeller, opak, süngerimsi ve elastiktir. Çapraz-bağ derecesine ve matriksin hidrofilitesine bağlı olarak yapılarına su alarak şişerler. Bu kriyojellerin gözenekleri içerisindeki su elle kolaylıkla sıkılabilmektedir. Sıkılan kriyojel parçası suya daldırıldığı zaman 1-2 saniye içerisinde orijinal boyut ve şekline tekrar dönebilmektedir. Cu²⁺-O-CMCS partikül ve kompozit kriyojelin şişme davranışları, deiyonize su içerisindeki denge şişme oranlarının belirlenmesi ile hesaplanmıştır ve sırasıyla %71,7 ve %91,7 olarak bulunmuştur. Cu²⁺-O-CMCS-4a partiküllerin, kompozit kriyojel oluşturduktan sonra denge şişmelerindeki bu düşüş, kompozit kriyojelde kullanılan çapraz bağlayıcıdan dolayıdır. Denge şişme kompozit kriyojellerin şişme değeri kompozit kriyojelin makrogözenek miktarı ise %72,2 olarak bulunmuştur. Yukarıdaki denge ve makrogözeneklilik yüzde değerleri arasındaki farktan mikrogözenek değerini %19,5 olarak hesaplayabiliriz.



Şekil 4.1: Kurutulmuş ve şişmiş Cu²⁺-O-CMCS-4a kompozit kriyojel.

4.1.2 Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin FT-IR analizleri

Cu²⁺-O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin FT-IR spektrumları sırası ile Şekil 4.2 A ve B'de verilmiştir. Şekil 4.1 A ve B'de 1717 cm⁻¹'de görülen pikler karboksimetil gruplarındaki C=O gruplarına aittir. 3300 cm⁻¹ ve 3350 cm⁻¹ dalga boylarındaki pikler, yapılarıdaki O-H ve N-H gruplarından gelmektedir. 1378 cm⁻¹ 1386 cm⁻¹ partikül ve kompozitteki C-N gerilme bantlarını göstermektedir. Spektrum verilerinden, Cu²⁺-O-CMCS-4a partiküllerinin, kriyojeller ile kompozit bir yapı oluşturduğu görülmektedir.

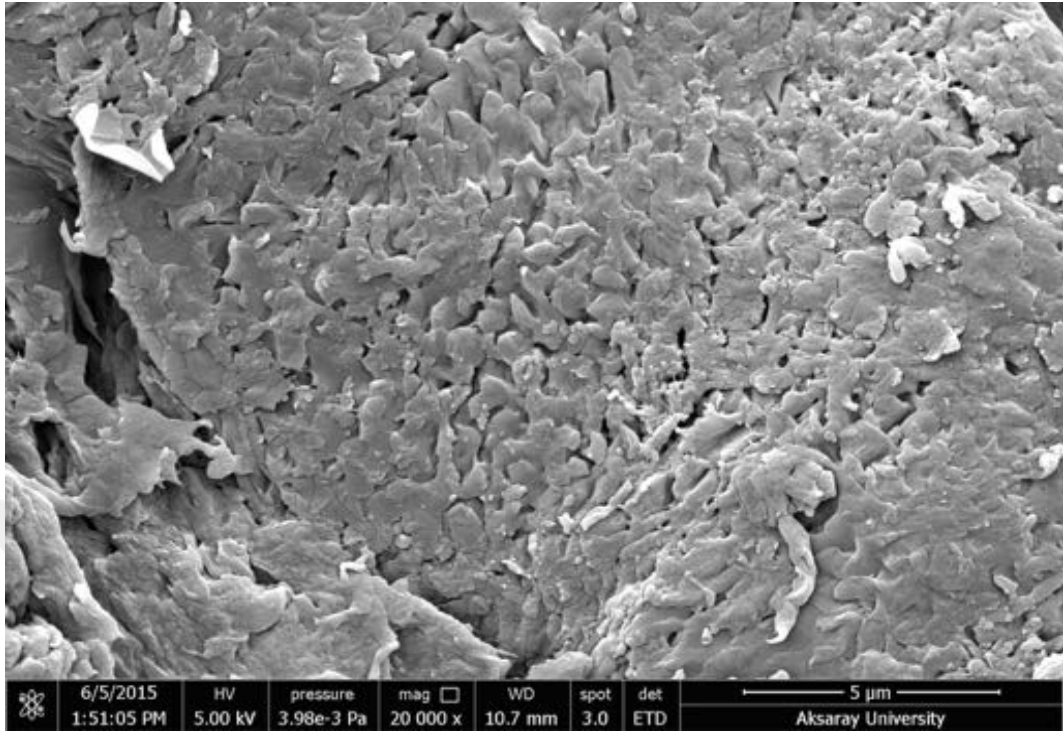


Şekil 4.2: Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin FT-IR spektrumları.

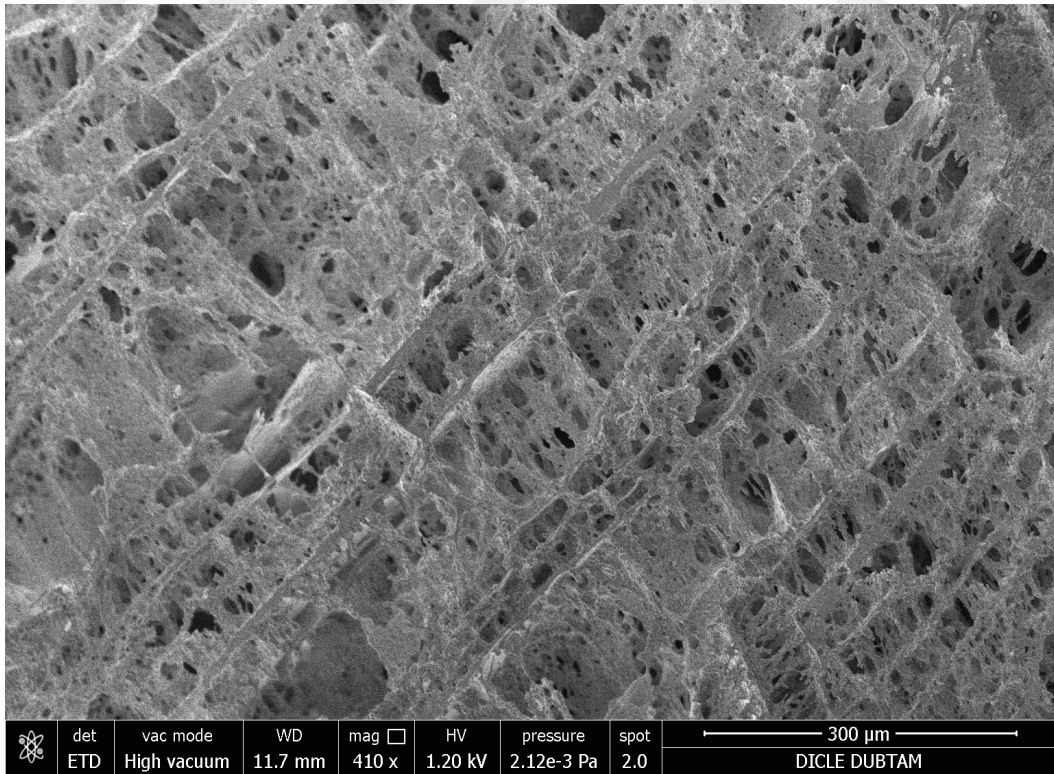
4.1.3 Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojelin SEM karakterizasyonu

Cu^{2+} takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı gömülü partiküller ve kompozit kriyojeller yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve Şekil 4.3 A ve B'de verilmiştir. Şekilden, Cu^{2+} -O-CMCS-4a partiküllerinin yaklaşık 500 nm lik blokların biraraya gelmesiyle oluştuğu görülmektedir. Partiküller içindeki bu blok yapılar partiküllere dolayısıyla kriyojele geniş bir yüzey alanı ve yüksek bir adsorpsiyon kapasitesi sunmaktadır. Şekil 4.2 B'de görülmektedir ki, Cu^{2+} takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı gömülü partiküller, kriyojelin ince duvarlarına düzenli dağılarak, boşa göre daha geniş bir yüzey alanı sağlamıştır. Hareketli fazın gözeneklerde konvektif akışı nedeniyle kütle

aktarım direnci pratik olarak ihmal edilebilir derecededir. Bu durum adsorplanan protein miktarını artmasıyla sonuçlanmıştır.



Şekil 4.3: A. O-CMCS-4a partiküller SEM mikrofotografı.

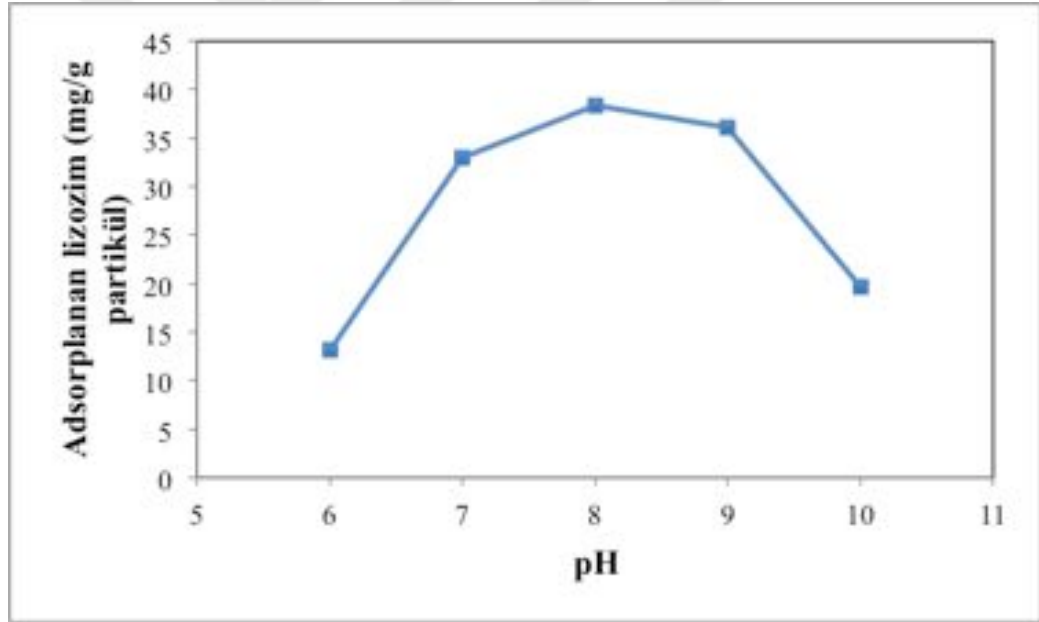


Şekil 4.3: B. Cu²⁺-O-CMCS-4a partiküller gömülü kompozit kriyojelin SEM mikrofotografı.

4.2 Cu²⁺-O-CMCS-4a Partikül Gömülü Poli(2-hidroksietil metakrilat) Kriyojellere Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1 pH'nın etkisi

Şekil 4.4'te Cu²⁺-O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojele lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi lizozim adsorpsiyonu pH 8'de maksimuma ulaşmaktayken, bunun altında ve üzerindeki pH' larda adsorpsiyon düşmektedir. İMAK' da protein adsorpsiyonu immobilize metal ile protein yüzeyindeki aminoasit rezidüleri arasında gerçekleşmektedir. Bu pH'da deprotonasyon olan sistin, histidin, aspartat ve glutamat gibi aminoasitlerin fonksiyonel grupları ile ligant olarak kullanılan metal iyonu arasında elektrostatik etkileşimler, yüksek bir adsorpsiyon ile sonuçlanmaktadır.

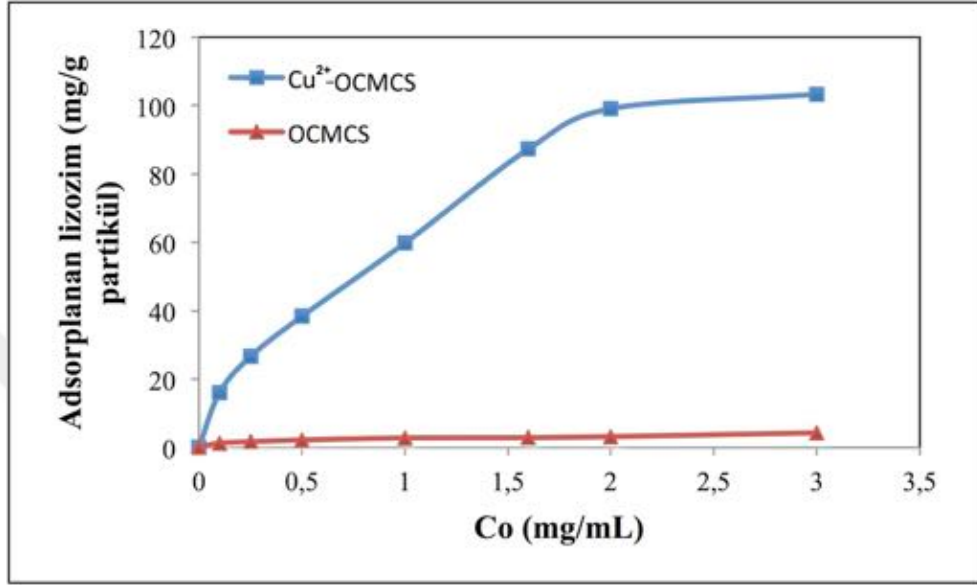


Şekil 4.4: Lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi (pH 6-8: Fosfat tamponu; pH 9-10: Karbonat tamponu. Co: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25°C.

4.2.2 Lizozim başlangıç derişiminin etkisi

Cu²⁺-O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna lizozim başlangıç derişiminin etkisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Referans (metal ligant bulunmayan) kriyojellere lizozim adsorpsiyonu düşük olmasına rağmen (4,3 mg/g partikül), Cu²⁺-O-CMCS-4a gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonu oldukça

yüksektir (103.3 mg/g partikül). Şekilde görüldüğü gibi bağlanma aktif bölgelerinin doygunluğundan dolayı, 3 mg/mL'lik başlangıç lizozim derişiminde adsorpsiyon dengesine ulaşılmıştır. Belirli bir konsantrasyondan sonra Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojelin spesifik etkileşim gruplarının, lizozim molekülleri ile doygun hale gelmesi ile adsorpsiyon hızında yavaşlama olduğu görülmüştür.



Şekil 4.5: Lizozim adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi; pH 8.0 fosfat tamponu; akış hızı: 1 mL/dk; T: 25°C .

4.2.3 Adsorpsiyon izotermi

Bazı araştırmacılar protein ve protein bağlayıcı bölgeler arasındaki etkileşimin Langmuir tipi izoterm ile tanımlanabileceğini göstermişlerdir (Langmuir, 1918). Chase (Chase, 1984), Langmuir izotermi ile uyumlu aşağıdaki kütle-transfer hız eşitliği tanımlanmıştır (Eşitlik 4.1).

$$dq/dt = k_1 Ce(Q_m - Q_e) - k_2 Q_e \quad (4.1)$$

Eşitlikte C_e serbest molekül, Q_e bağlanan molekül derişimi, q_m molekülün maksimum bağlanma kapasitesi ve t zamandır. Hız sabitleri k_1 ve k_2 kütle transfer kısıtlamalarını da göz önünde bulundurarak molekülün bağlanma bölgelerine adsorpsiyon ve desorpsiyonu yansıtan “toplu” parametrelerdir. Tüm bağlanma bölgelerinin aynı enerjiye sahip ve bağımsız olduğu ve dengede etkileşimin tek noktadan gerçekleştiği varsayılırsa, Eşitlik 4.1, Eşitlik 4.2'de verilen adsorpsiyon izotermine dönüştürülebilir (Labrou vd., 1995).

$$Q_e = Q_m C_e / (K_d + C_e) \quad (4.2)$$

K_d ayrışma sabitidir [(k_2/k_1) ; ileri ve geri reaksiyon hızlarının oranı]. K_d derişimin bir boyutudur ve küçük olduğunda molekülün bağlanması kuvvetlidir. Polimer yüzeyinde bağımsız etkileşim bölgelerinin varlığının geçerliliğini göstermek Eşitlik 4.3 teki için semireciprocal (yarım-terafı düzenleme) (Hanes, 1932) denklemi çalışılmıştır ve elde edilen grafik Şekil 4.6'da verilmiştir.

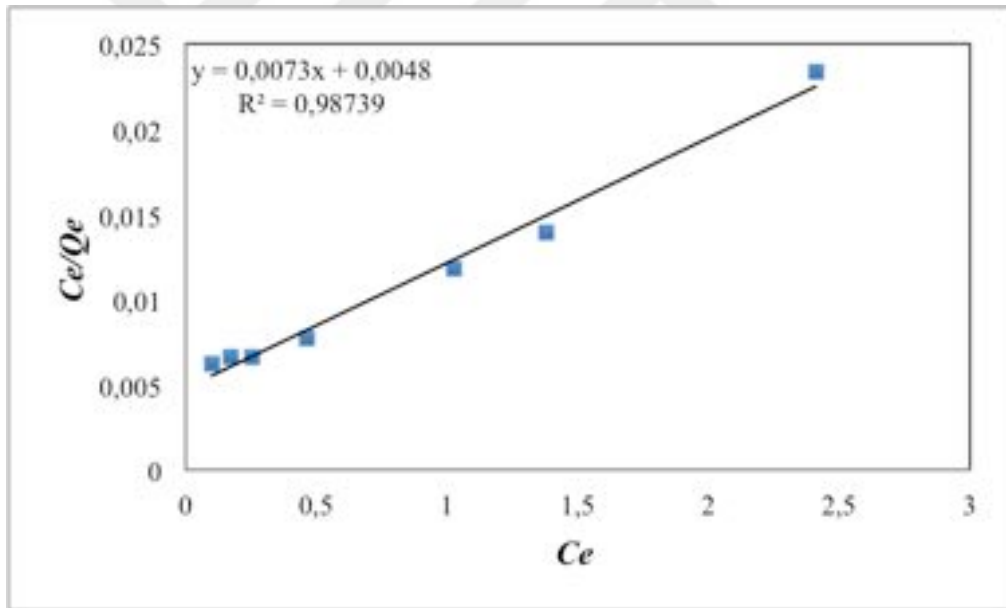
$$\frac{C^*}{Q^*} = \frac{K_d}{Q_m} + \frac{C^*}{Q_m} \quad (4.3)$$

C_e : Adsorpsiyon sonrası dengede kalan maddenin derişimi (mg/mL)

Q_e : Birim adsorbent üzerine tutunan madde miktarı (mg/g adsorbent)

Q_m : Adsorbentin maksimum tutma kapasitesi

K_d : Ayrışma sabitidir



Şekil 4.6: Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim için Langmuir adsorpsiyon izoterminin grafiği.

Grafikteki eğim $1/Q_m$ 'yi doğrunun y eksenini kestiği nokta ise K_d/Q_m 'yi vermektedir. Adsorpsiyon davranışlarını tanımlamak için kullanılan diğer en çok bilinen izoterm ise Freundlich adsorpsiyon izotermidir. Langmuir adsorpsiyon izoterminin tek tabaka adsorpsiyona dayalı iken, Freundlich adsorpsiyon izoterminin tek tabaka ile sınırlı değildir. Freundlich çözeltilerin adsorpsiyon davranışını açıklamak için Eşitlik 4.4'ü

türetmiştir. Bu eşitlik, Eşitlik 4.4.1'deki gibi düzenlenmiş elde edilen grafik Şekil 4.5'te verilmiştir

$$Q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (4.4)$$

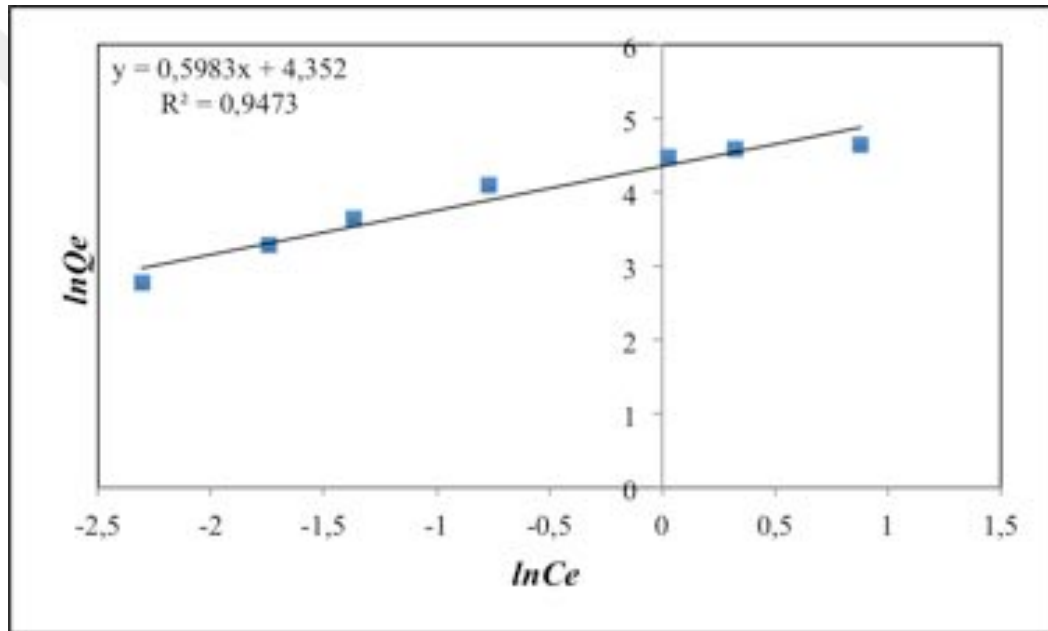
$$\ln Q_e = 1/n \cdot \ln C_e + \ln K_f \quad (4.4.1)$$

C_e : Adsorpsiyon sonrası dengede kalan maddenin derişimi (mg/mL)

Q_e : Birim adsorbent üzerine tutunan madde miktarı (mg/g adsorbent)

K_f : Freundlich adsorpsiyon sabiti (mg/g)

n : Adsorpsiyon yoğunluğu



Şekil 4.7: Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim için Freundlich adsorpsiyon izotermini.

Şekil 4.7'de doğrunun y eksenini kestiği nokta K_f değerini verirken, eğim $1/n$ 'yi vermektedir. $n > 1$ değeri adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir (Chiou vd., 2002).

Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1: Cu²⁺-O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

Langmuir sabitleri			Freundlich sabitleri		
Q_m	b	R^2	K_f	n	R^2
136,98	1,52	0.9874	77.63	1.67	0.9473

Şekil 4.5'deki korelasyon katsayılarını dikkate aldığımızda, Langmuir adsorpsiyon modelinin bu çalışma için daha uygun olduğunu görmekteyiz.

İzoterm şeklinin adsorpsiyon sisteminin “tercihli” veya “tercihsiz” olduğunu tahmin etmenin de bir ölçüsü olabileceği rapor edilmiştir (Mayanar vd., 2002).

Langmuir izoterminin önemli özellikleri boyutsuz bir sabit olan ayırma faktörü veya denge parametresi, Eşitlik 4.5'deki gibi R_L cinsinden belirtilebilir:

$$R_L = 1/(1 + bC_0) \quad (4.5)$$

C_0 : Başlangıç lizozim derişimi (mg/mL)

b : ($1/K_d$) Langmuir adsorpsiyon denge sabitidir (mL/mg)

Çizelge 4.2 Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.

R_L Değeri	İzoterm Türü
$R_L > 1$	İstemsiz
$R_L = 1$	Lineer
$0 < R_L < 1$	İstemli
$R_L = 0$	Tersinmez

Cu²⁺-O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim adsorpsiyonuna, protein başlangıç derişimleri için hesaplanan R_L değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3: Langmuir eşitliğine dayalı R_L değerleri.

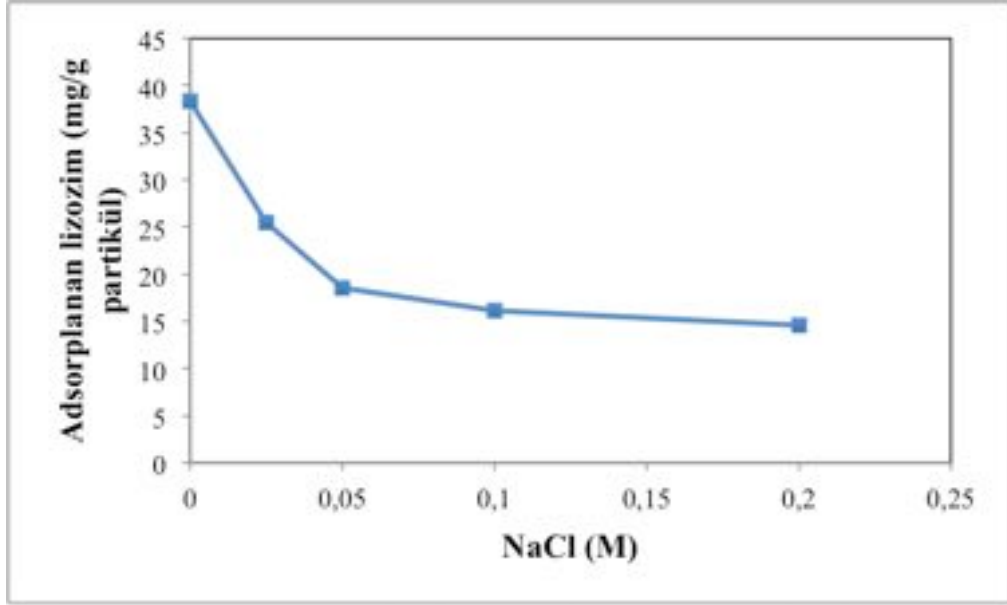
Lizozim Derişimi (mg/mL)	R_L
0.1	0,763366
0.25	0,654107
0.5	0,566299
1.0	0,435796
1.6	0,291954
2.0	0,244999
3.0	0,175862

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi R_L değerlerinin 0 ile 1 arasında oluşu Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kompozit kriyojellerin lizozim adsorpsiyonuna karşı istemli olduğunu göstermektedir.

4.2.4. İyonik şiddetin etkisi

Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna tuz derişiminin (NaCl) etkisi de incelenmiş ve yüksek tuz derişiminde bağlanmanın zayıfladığı görülmüştür (Şekil 4.8). Bu durum iki şekilde açıklanabilir:

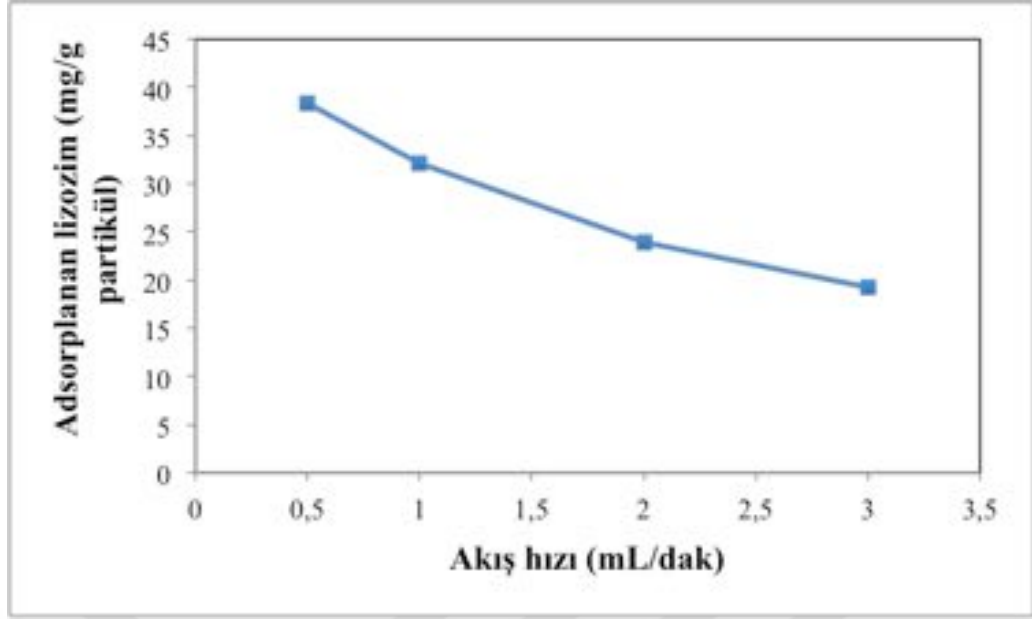
1. Tuz iyonlarının yük-yük etkileşimine girerek bağlanma bölgelerini maskeleyeri;
2. İyonik şiddet arttıkça Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojeller ve lizozim arasında elektrostatik itişmeler nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Adsorpsiyon ortamında tuz derişiminin artması tuzdaki klor iyonları ile bakırın koordinasyonuna neden olmakta bu da düşük protein adsorpsiyonuna yol açmaktadır.



Şekil 4.8: Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Lizozim derişimi: 1 mg/mL; pH 8 fosfat tamponu; akış hızı: 1 mL/dk; T: 25°C.

4.2.5. Akış hızının etkisi

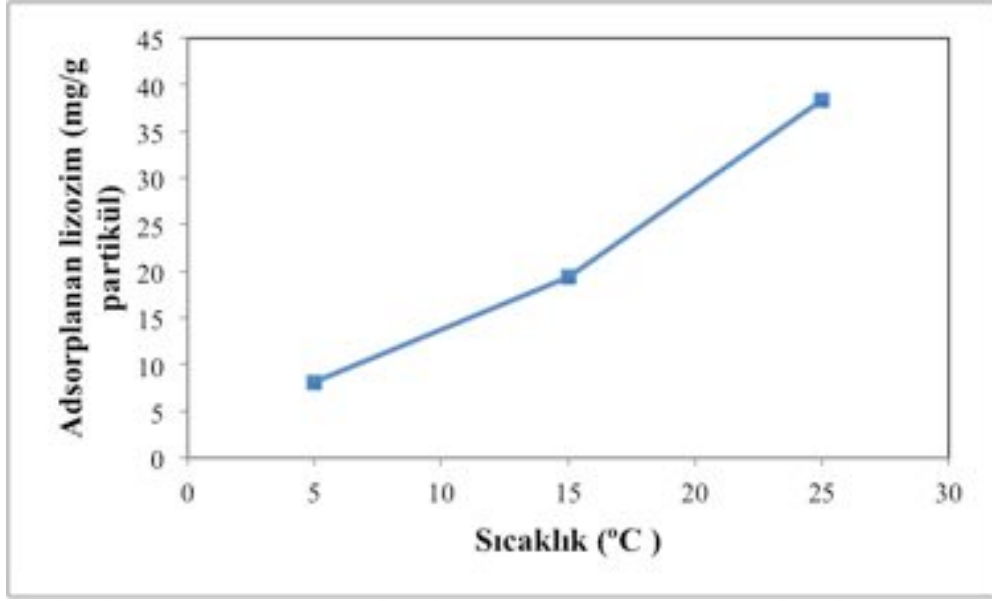
Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojellere adsorplanan lizozim miktarına akış hızının etkisi Şekil 4.9'da verilmiştir. Akış hızının 0,5 mL/dk'dan 3 mL/dk'ya artmasıyla lizozim adsorpsiyon kapasitesi 38,36 mg/g'dan 14,6 mg/g'a düşmektedir. Akış hızının artması ile birim zamanda kolondan geçen protein çözelti hacmi artmakta ve bundan dolayı proteinin kriyojel kolonundan alıkonma zamanı azalmaktadır. Akış hızı azalmasıyla kolon içinde protein ile ligand arasındaki etkileşim süresi uzar. Böylece lizozim moleküllerinin kriyojel gözenek duvarlarına yayılması ve Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojellere bağlanması için yeterli süre alacağından daha iyi bir lizozim adsorpsiyon kapasitesi elde edilir. Ayrıca kolonun çalışması için kriyojel sürekli olarak taze bir lizozim çözeltisiyle etkileştirilmektedir. Sonuç olarak kolon içindeki Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojel tabakasıyla temasta olan çözelti içindeki lizozim derişimi nispeten sabittir. Ayrıca kriyojel yapısı içindeki makrogözenekler açık, birbirine bağlı ve geniş bir kanal oluşturacak şekildedir. Hareketli lizozim fazı, bu kanallardan geçerek lizozim moleküllerini konveksiyon yoluyla aktif bağlanma merkezlerine (Cu^{2+} iyonlarına) taşır. Bu olay, hareketli lizozim fazı ile sabit Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojellere fazı arasında hızlı bir şekilde kütle aktarılmasını sağlar.



Şekil 4.9: Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi, lizozim derişimi: 1 mg/mL; pH: 8 Fosfat tamponu; T: 25°C.

4.2.6. Sıcaklığın etkisi

Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5°C-25°C arasında çalışıldı. Cu^{2+} -O-CMCS-4a gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonu denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalmıştır ve maksimum adsorpsiyon 25°C'de gerçekleşmiştir (Şekil 4.10). Sıcaklığın artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde %78,8'lik bir artış görülmüştür. Adsorpsiyon genelde ekzotermik bir procestir. Bu çalışmada, sıcaklığın artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin artmasının muhtemel nedeni, hidrate protein molekülleri ile yüzey arasındaki adsorpsiyon süresince açığa çıkan ısının, adsorpsiyon için gerekli olan hidrate suların yer değıştirmesi için ihtiyaç duyulan ısının karşılanamamasından dolayı ek ısıya ihtiyaç duyulması olabilir.



Şekil 4.10: Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi, lizozim derişimi: 1 mg/mL, pH 8 fosfat tamponu; akış hızı: 1mL/dk; T: °C.

4.2.7 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Afinite kromatografisindeki hedeflerden birtanesi, adsorplanan proteinin en kısa sürede ve mümkün olan en yüksek oranda geri kazanımıdır. Bu, her döngüden sonra afinite adsorbentlerinin rejenerasyon veriminin belirlenmesi için gereklidir. Bu çalışmada, adsorplanan lizozimin %95'inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl kullanılarak 30 dakikada desorbe edilmiştir. Sonuçlar, NaCl'nin lizozim için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu göstermiştir Kriyojel kolonlarının tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için, adsorpsiyon-desopsiyon döngüsü, aynı sorbent ile 35 kez tekrarlanmıştır. Bu döngülerden sonra, kapasite %5 oranında azalmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarından sonra ise kriyojellerin şeklinde açık bir değişim gözlenmemiştir.

5. SONUÇLAR

Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında, lizozim enziminin sulu ortamdan adsorpsiyonu için, yeni bir immobilize metal afinite matriksi olan Cu^{2+} -takılı O-karboksimetil kitosan Schiff bazı-4a (Cu^{2+} -O-CMCS-4a) partikül gömülü kompozit kriyojeller tasarlanmıştır. Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül ve kompozit kriyojellerin denge şişme oranları, makrogözenek miktarı ve mikrogözenek miktarları sırasıyla %717, %91,7 ve %72,2 olarak bulunmuştur. Kriyojelin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntülerinden yapının, geniş akış kanalları, süper makrogözenekler gibi özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojeller ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Maksimum adsorpsiyon pH 8 fosfat tamponunda, 3 mg/mL başlangıç lizozim derişiminde, 0,5 mL/dak akış hızında ve 25°C ortam sıcaklığında 103,3 mg/g partikül olarak gerçekleşmiştir. Adsorpsiyon modelini incelemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi incelenmiş ve 0,9874 korelasyon katsayısıyla Langmuir modelinin bu çalışma için adsorpsiyon modeli olduğu görülmüştür. Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojellere lizozim adsorpsiyonunda ortamın tuz derişimin etkisi incelendiğinde, tuz derişiminin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlenmiş; ayrıca sıcaklık etkisinin adsorpsiyona etkisi incelendiğinde prosesin endotermik olduğu, adsorpsiyonun sıcaklıkla arttığı gözlenmiştir. Lizozimin %95'inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl kullanıldığında 30 dakikada desorbe edilmiştir. Desorpsiyon sonuçları, NaCl'nin, lizozim için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucu, elde edilen Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojellerin, literatürde yer alan immobilize metal afinite çalışmalarıyla kıyaslanabilecek ölçüde, protein adsorpsiyon performansına ulaştığı görülmüş, ilaveten spesifik olmayan adsorpsiyonun ise düşük olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışmada sentezlenen yeni Cu^{2+} -O-CMCS-4a partikül gömülü kompozit kriyojellerin, sulu çözeltilerden lizozim adsorpsiyonunda etkin bir şekilde kullanılabilirliği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Andersson, L., Sulkowski, E., 1992. Evaluation of the interaction of protein groups with M(II) by immobilized metal ion affinity chromatography, *J. Chromatogr.*, 604, 13-17.

Alkan H., Bereli N., Baysal Z., Denizli A., 2009. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel, *J. Biochem. Microbol.*,45,201-208.

Andaç M., Galaev Y. I., Denizli A., 2013. Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*.

Arıca, M.Y., G. Bayramoğlu, N. Bıçak., 2004. Characterization of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process biochemistry*, 39, 2007-2017.

Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I. Yu., Mattiasson, B., 2002. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *J. Chromatogr. A*, 977, 27–38.

Arvidsson P., Plieva, F. M. , Lozinsky, V. I. , Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *J. Chromatogr. A*, 986, 275–90.

Baran T., Menteş A., Arslan H., 2015. 12. Synthesis and characterization of water soluble O-carboxymethyl Chitosan Schiff bases and Cu(II) complexes. *J. Biol.Macromol*, 72, 94-103.

Başar N., Uzun L., Güner A, Denizli A., 2007. Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. *Int. J Biol Macromol*, 41, 234-242.

Baydemir G., Andaç M., Derazshamshir A., Aktaş U. D., Özçalışkan E., Akgöl S., Denizli A., 2013. Synthesis and characterization of amino acid containing Cu(II) chelated nanoparticles for lysozyme adsorption. *J. Mat Sci*, 33,532-536.

Berna, P.P., Moraes, F.F., Barbotin, J.N., Thomas, D., Vijayalakshmi, M.A., 1996. One step affinity purification of a recombinant cyclodextrin glycosyl transferase by Cu(II), Zn(II) tandem coloumn)immobilized metal ion affinity chromatography. *Adv. Mol. Cell Biol*, 15, 523–537.

Berna, P.P., Mrabet, N.T., Van Beumen, J., Devreese, B., Porath, J., Vijayalakshmi, M. A., 1997. Residue accessibility, hydrogen bonding, and molecular recognition: metal-chelate probing of active site histidines in chrymotrypsins. *Biochemistry*, 3.

Berna, P.P., Mrabet, N.T., Van Beumen, J., Devreese, B., Porath, J., Vijayalakshmi, M. A., 1997. Residue accessibility, hydrogen bonding, and molecular recognition: metal-chelate probing of active site histidines in chymotrypsins. *Biochemistry*, 36,6896–6905.

Blake, C.C.F., D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma.1965. *Nature*.Structure of Hen Egg White Lysozyme,May.

Çimen D., Denizli A., 2012. Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012–Elsevier.

Çimen, D., 2011.,Sitokrom c saflaştırılması için süpermakrogözenekli immobilize metal afinite kromatografi adsorbentler Yüksek Lisans Tezi Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Diamond, R., D.C. Phillips, C.C.F. Blake, A.C. North.1975. *Protein Data Structure Explorer-6LYZ,Real- Space Refinement of the Structure of Hen Egg WHDTE Lysozyme*. February.

Erarslan, A., Kazan,B., Denizci,A. A., Karahan, N., 2001, “Enzim Saflaştırılmasında Temel Yöntemler”, Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Arastırma Ens., Kocaeli.

Erzengin, M., Ünlü, N., Odabaşı, M., 2011. A Novel Adsorbent for Protein Chromatography: Supermacroporous Monolithic Cryogel Embedded with Cu²⁺-Attached Sporopollenin Particles, *J. Chromatogr. A*, 1218, 484-490.

Fanou-Ayi, L., Vijayalakshmi, M.A., 1983. Metal-chelate affinity chromatography as a separation tool. *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 413, 300–306.

Freman,W.H. ve L.Stryer.1995. *L.Biochemistry.Co.New York*.

Giangiaco, R., F.Nigro,G. Messina, T.M.P. Cattaneo.1992. *Food*.

Goubran-Botros, H.G., Vijayalakshmi, M., 1989. Cell surface interactions with metal chelates. *J. Chromatogr.*, 495, 113–122.

Goldstein,G., 1967. Ligand exchange chromatography of nucleotides, nucleosides and nucleic acid bases, *Anal. Biochem.*, 20, 477–483.

Hemdan, E.S., Porath, J., 1985. Development of immobilized metal affinity chromatography II. Interaction of aminoacids with immobilized nickel imino diacetate. *J. Chromatogr.*, 323, 255–264.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., Stuber, D., 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent, *Bio-Technology*, 6, 1321–1325.

Hubert P., Porath, J., 1980. Metal chelate affinity chromatography, I: Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds, *J.Chromatogr.*, 198, 247–255.

Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., & Tamura, H., 2007. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials, *Int. J. Biol. Macromol.*, 40, 175-181.

Krishnan S., Vijayalakshmi, M.A., 1986. Purification and some properties of three serine carboxy peptidases from *Aspergillus niger*. *J. Chromatogr.*, 370,315–326.

Laboureau, E., Vijayalakshmi, M.A., 1997. Concerning the separation of mammalian cells in immobilized metal ion partitioning systems: A matter of selectivity, *J. Mol. Recogn.*, 10, 262–268.

Liu, Y., Yu, S., 1990. Copper(II)-iminodiacetic acid chelating resin as a stationary phase in the immobilized metal ion affinity chromatography of some aromatic amines. *J. Chromatogr.*, 515, 169–173.

Lozinsky, V.L, Galaev, I.Yu., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol.*, 21,445–51.

Lozinsky, V.L, Plieva, F. M. , Galaev I.Yu., Mattiasson B., 2002. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*,10, 163–88.

Lönerdal, B., Keen, C.L., 1982. Metal chelate affinity chromatography of proteins, *J. Appl. Biochem.*, 4, 203–208.

Matsushima, Y., T. Mdyazaki, S. Kasad. 1969. Chemical Evidence for the Phillips Model of the Action of Hen Egg White Lysozyme, July.

Majors, E., Carr, P.W., 2001. Glossary of liquid-phase separation terms, *LC GC*, 19,125–162.

Muzzarelli, R. A. A., 1988. Carboxymethylated chitin and chitosans, *Carbohydrate Polymers*, 8, 1–21.

Ozmen, M.M, Okay, O., 2005. Superfast responsive ionic hydrogels with controllable pore size. *Polymer*, 46, 8119–27.

Plieva, F.M, Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., 2004, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *J. Chromatogr. B*, 807, 129-37.

Plieva, F.M, Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Yu., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*, 1, 303–9.

Plieva, F.M., Karlsson, M., Aquilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., 2006. Porous structure of macroporous agarose gels prepared at subzero temperatures. *Macromol. Biosci.*

Plieva, F.M, Seta, E.D., Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., 2008. Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: Processing under compression and scale-up. *Sep. Purific. Technol.*, 65, 110–16.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, B., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fraction, *Nature*, 258, 598–599.6896–6905.

Porath, J., Olin, B., 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: Serum protein affinities for gelimmobilized iron and nickel ions, *Biochemistry*, 22, 1621–1630.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, B., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fraction, *Nature*, 258, 598–599.

Porath, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.*, 3, 263–281.

Porath, J., Olin, B., 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: Serum protein affinities for gelimmobilized iron and nickel ions, *Biochemistry*, 22, 1621–1630.

Shi, X., Du, Y., Yang, J., Zhang, B., & Sun, L., 2005. Effect of degree of substitution and molecular weight of carboxymethyl chitosan nanoparticles on doxorubicin Delivery, *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 4689–4696.

Singh, J., Dutta, P. K., Dutta, J., Hunt, A. J., Macqarrie, D. J., & Clark, J. H., 2008. Smeaton William A., 1986. Carl Wilhelm Scheele (1742–1786), *Endeavour*, 1.

Smith, M., Furman, T.C., Ingolia, T.D., Pidgeon, C., 1988. Chelating peptide immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *J. Biol Chem.*, 263, 7211–7215.

Sulkowski, E., 1987. Protein Purification-Micro to Macro(UCLA Symposia o Molecular and Cellular Biology, New Series (R.Burgess, ed.) vol. 68, pp.149–162, Alan R.Liss, New York.

Sulkowski, E., 1989. Application of metal- chelate affinity chromatography to the study of the phosphoproteome, *BioEssays*, 10, 170–175.

Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., Yao, S.- J., 2008. Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds, *Biochem. Eng. J.*, 42, 237-242.

Willson, R.C., Murphy, J.C., Jewell, D., 2001. Immobilized-metal affinity separation of nucleicacids, in *Proceedings of 14th Symposium on Affinity Technology and Biorecognition*, Cancun, Mexico, p. 218.

Chiou, M.S., Li, H.Y., 2002. Equilibrium and Kinetic Modeling of Adsorption of Reactive Dye on Cros Linked Chitosan Beads. *Chemosphere*, 50: 1095-1105.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ömür ACET
Doğum Tarihi ve Yeri: 19.06.1990 - MERSİN
E-posta adresi : omuracetbio@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2009-2013
Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2013-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Petrolyum Petrol Ürünleri Paz. Dağ. San.Tic. Ltd. Şti/ Yaz Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

1. **Acet, Ö.,** Cömert, C.Ş., Yüksel, G., Arslan, Ö., Baran, T., Menteş, A., Odabaşı, M., “Synthesis of PHEMA-Water Soluble Imine-Chitosan-Cu²⁺ Composites and Its Use for Lysozyme Adsorption “Pittcon 2015, 8-12 March 2015 New Orleans, LA, USA.
2. **Acet, Ö.,** Cömert, C.Ş., Yüksel, G., Arslan, Ö., Baran, T., Menteş, A., Odabaşı, M., ‘Suda Çözünebilir İmin-Kitosan- Cu²⁺ Komplekslerinin Protein Adsorpsiyon Performansları’, 2. Biyomalzeme Günü, 30 Nisan 2014, Hacettepe Üniversitesi, Fen-Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara/Türkiye.