



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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Cu<sup>2+</sup>-TAKILI SPOROPOLLENİN GÖMÜLÜ  
SÜPERMAKROGÖZENEKLİ MONOLİTİK PHEMA KRİYOJEL  
AFİNİTE MEMBRANLAR İLE SİTOKROM C ADSORPSİYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehmet GEDİKLİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN**

**AKSARAY, 2012**

## ÖNSÖZ

Organizmada en yüksek oranda bulunan makromoleküller proteinlerdir. Mikrobiyal hücre yaklaşık 10.000 farklı protein içerir. Bunların içerisinde saf olarak sadece bir protein gerekli olabilir. Gerekli olan proteini elde edebilmek için kromatografi gibi çözünürlüğü yüksek bir teknik gereklidir. Proteinlerin saflaştırılması hem bazı fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının aydınlatılması hem de in vitro koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması açısından büyük önem taşır. Ayrılacak moleküllerin biri sabit diğeri hareketli iki faz arasında dağılmasıyla karakterize edilen bir grup ayırma yöntemidir. Sabit fazlar hareketli fazdan kromatografik kolon kullanılarak ayrılırlar. Enzim, hormon, vb spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Kolonun dolgu maddesine, (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb) spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinler kolonu terk ederler. Bağlı protein, daha sonra, pH değişikliği/tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilir. Saflaştırmanın verimi protein tayini ile kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim proteinin kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatografisi ile uzaklaştırılır.

## TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden sonra on iki yıllık öğretmenlik tecrübesi üzerine gerekli gördüğüm yüksek lisans eğitimimde bana her konuda destek ve yardımını esirgemeyen, tecrübe kazanabilmem için çok çaba sarfeden, çalışmalarımızda yol gösterici olan başta saygıdeğer danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGIN'e, aynı zamanda her zaman yanımda olduğunu hissettiğim ve saygı duyduğum Yrd. Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Nuri ÜNLÜ'ye, Yrd. Doç. Dr. Muhsin KARAASLAN'a ve Doç. Dr. Ayfer MENTEŞ'e teşekkürden daha çok şey borçlu olduğumu söylemek isterim.

Her çalışmada yanımda olan, çalışmaktan ve paylaşmaktan ve onları tanımaktan çok mutlu olduğum Şeyda CEYLAN'a, Arş. Grv. Tülden KALBURCU'ya, İdris SARGIN'a, İsmihan GÜNEŞ'e ve Talat BARAN'a gönülden sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince bana olan destek, yardım ve sabırlarını esirgemeyen eşime, özellikle teşekkürü bir borç bilirim.

**Mehmet GEDİKLİ**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Proteinler.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Oksidatif fosforilasyon ve sitokrom c .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Stikrom c ve yapısı.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Sporopolleninin yapısı ve kimyası .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Kromatografi ve kromatografik teknikler .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6. Biyoafinite kromatografisi .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.1. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi .....</b>	<b>21</b>
<b>1.6.2. İMAK' ın kimyasal prensipleri .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6.2.1. İMAK için kromatografik destekler (matriksler) .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6.2.2. İMAK'de şelat oluşturucu ligandlar.....</b>	<b>26</b>
<b>1.6.2.3. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki amino asit metal etkileşimleri .....</b>	<b>31</b>
<b>1.6.2.4. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki protein-metal etkileşmeleri .....</b>	<b>32</b>
<b>1.6.3. İMAK'de peptid ve proteinlerin adsorbsiyon-desorbsiyon mekanizmaları.....</b>	<b>33</b>
<b>1.6.3.1 pH etkisi.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.3.2. Tuz etkisi.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.3.3. Yarışmalı ajanlar.....</b>	<b>36</b>
<b>1.6.4. İMAK'de proteinlerin alıkonma davranışları .....</b>	<b>36</b>
<b>1.6.5. Protein saflaştırılmasında İMAK uygulamaları .....</b>	<b>38</b>
<b>1.6.6. İMAK' ın bazı avantajları.....</b>	<b>41</b>
<b>1.6.7. Denatürasyon ve renatürasyon durumunda İMAK kullanımı .....</b>	<b>42</b>
<b>1.6.8. İMAK' ın bazı dezavantajları .....</b>	<b>42</b>
<b>1.6.8.1. Kolon içinde olması muhtemel redoks tepkimeleri.....</b>	<b>42</b>



<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>80</b>

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### $\text{Cu}^{2+}$ - TAKILI SPOROPOLLENİN GÖMÜLÜ SÜPERMAKROGÖZENEKLİ MONOLİTİK PHEMA KRIYOJEL AFİNİTE MEMBRANLAR İLE SİTOKROM C ADSORPSİYONU

Mehmet GEDİKLİ

T.C

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN

Bu çalışmada  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli monolitik PHEMA kriyojel afinite membranlar ile sitokrom c adsorpsiyonu incelenmiştir. Bu amaçla, ilk olarak 20  $\mu\text{m}$  çapındaki sporopollenin partikülleri, 150 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  çözeltisi (pH 5) ile muamele edilmiştir. Daha sonra, 15 mg  $\text{Cu}^{2+}$ - takılı sporopollenin gömülü PHEMA bazlı monolitik kriyojeller, monomer olarak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak *N,N'*-metilen-bis-akrilamid'in (MBAAm) radikal kriyokopolimerizasyonu yöntemiyle 5 mL'lik plastik şırıngalarda sentezlenmiştir.  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojel afinite sorbentler farklı koşullarda (pH, başlangıç sitokrom c konsantrasyonu, sıcaklık, akış hızı ve iyonik şiddet) adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmıştır. Hazırlanan kriyojeller, şişme testleri ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Sulu çözeltiden maksimum sitokrom c adsorpsiyonu pH 7,0'de gözlenmiştir. Yapılan derişim taramasında yaklaşık 3,0 mg/mL konsantrasyonda dengeye ulaşılmıştır. Ayrıca, sitokrom c adsorpsiyonunun artan akış hızı ve sıcaklık ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir.  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı olmayan sporopollenin gömülü kriyojel afinite sorbentlere non-spesifik sitokrom c adsorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir. Kriyojel afinite sorbentlere, adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın 30 defa adsorpsiyon/desorpsiyon işlemleri uygulanmıştır.

**2012,80 Sayfa**

**Anahtar Sözcükler:** Kriyojel, PHEMA, Sporopollenin, Sitokrom c, İMAK, Adsorpsiyon

## ABSTRACT

Master of Science

### CYTOCHROME C ADSORPTION BY SUPERMACROPOROUS MONOLITHIC PHEMA AFFINITY CRYOGEL MEMBRANES EMBEDDED WITH $\text{Cu}^{2+}$ – ATTACHED SPOROPOLLENIN PARTICLES

Mehmet GEDİKLİ

T.R.

Aksaray University Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mahmut ERZENGIN

In this study, adsorption of cytochrome c onto supermacroporous monolithic PHEMA affinity cryogels embedded with  $\text{Cu}^{2+}$  - attached sporopollenin was investigated. For this purpose, firstly, sporopollenin particles, with size of 20  $\mu\text{m}$ , were treated with 150 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  solution at pH 5,0 to bond  $\text{Cu}^{2+}$  ions to the structure. Then, PHEMA based monolithic affinity cryogels containing 15 mg of embedded  $\text{Cu}^{2+}$ - sporopollenin were synthesized by free radical polymerization using, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as a monomer and *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (MBAAm) as a cross-linker in a plastic syringe of 5 mL. Monolithic affinity cryogel sorbents embedded with  $\text{Cu}^{2+}$ -sporopollenin were used in adsorption studies by changing the conditions (pH, initial cytochrome c concentration, temperature, flow rate and ionic strength). The prepared cryogels were characterized by swelling tests and scanning electron microscopy (SEM). The maximum amount of cytochrome c adsorption from aqueous solution was observed at pH 7,0. In concentration studies, the equilibrium was established about 3,0 mg/mL of cytochrome c concentration. In addition, it was observed that cytochrome c adsorption was inversely proportional to flow rate and temperature. It was also observed that non-specific adsorption of cytochrome c onto affinity cryogel membranes containing sporopollenin particles, without attached  $\text{Cu}^{2+}$ , was ignoreable degree. Adsorption/desorption processes were applied 30 times with these affinity cryogel sorbents without noticeable loss in their adsorption capacity.

**2012,80 Pages**

**Keywords:** Cryogel, PHEMA, Sporopollenin, Cytochrome c, IMAC, Adsorption.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Bir polipeptidi stabilize eden bağlar .....	2
Şekil 1.2. Bir peptid bağının oluşumu .....	2
Şekil 1.3. Bir disülfid bağının oluşumu .....	3
Şekil 1.4. $\alpha$ -sarmal yapıdaki H bağları.....	4
Şekil 1.5. Proteinlerin yapısal organizasyonu .....	6
Şekil 1.6. Besin maddelerinin katabolizma safhaları.....	7
Şekil 1.7. Solunum zincirlerinde yer alan elektron taşıyıcıları. ....	8
Şekil 1.8. At kalbi sitokrom c'nin yapısı .....	11
Şekil 1.9. Sitokrom c'de hem grubu. Protein yapısında bulunan iki sisteinin –SH gruplarının hem'in vinil gruplarına katılmasıyla ile oluşan tiyoeter bağları hem'i proteine bağlar.....	12
Şekil 1.10. Sporopolleninin karotenoidlerden türetilen yapısı .....	14
Şekil 1.11. Çam polenlerinden elde edilmiş exine yapının SEM fotoğrafı .....	15
Şekil 1.12. Çam poleninden saflaştırılmış exine yapının Floresan çözelti içerisindeki görünümü .....	15
Şekil 1.13. Çam exininde bulunan sporopollenin şematik yapısı.....	15
Şekil 1.14. Çam polenlerinden elde edilen exine yapıya ait Taramalı Elektron Mikroskopu görüntüleri.....	17
Şekil 1.15. Afinite kromatografisinin alt başlıkları.....	20
Şekil 1.16. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	21
Şekil 1.17. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi.....	23
Şekil 1.18. İMAK' deki şelatlayıcı ligandlar.....	29
Şekil 1.19. İMAK'de kullanılan bazı boyaların metal iyonları ile yaptıkları kompleksler.....	30
Şekil 1.20. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi.....	48
Şekil 1.21. Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı .....	49
Şekil 1.22. Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri .....	50
Şekil 3.1. $\text{Cu}^{2+}$ - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojel ile sitokrom c molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi .....	56
Şekil 4.1. Şişmiş ve kurutulmuş $\text{Cu}^{2+}$ -takılı PHEMA Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojel.....	60

<b>Şekil 4.2.</b> Cu <sup>2+</sup> -takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojelin ve boş kriyojelin SEM mikrofotoğrafi.....	61
<b>Şekil 4.3.</b> Sitokrom c adsorpsiyonuna pH'nın etkisi.....	62
<b>Şekil 4.4.</b> Sitokrom c adsorpsiyonuna sitokrom c başlangıç derişiminin Etkisi.....	63
<b>Şekil.4.5.</b> Sitokrom c'nin Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	64
<b>Şekil.4.6.</b> Freundlich Adsorpsiyon izotermi.....	66
<b>Şekil.4.7.</b> Sitokrom c adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	67
<b>Şekil 4.8.</b> Sitokrom c adsorpsiyonuna akış hızının etkisi .....	68
<b>Şekil.4.9.</b> Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. ....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler.....	19
Çizelge 1.2. Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması .....	25
Çizelge 1.3. İMAK'da immobilizasyon için şelat oluşturuıcı bazı bileşikler.....	28
Çizelge 1.4. Protein yüzeyindeki uygun histidin ve triptofan uzantılarına dayanan protein metal afinite tahminler .....	37
Çizelge 1.5. Protein alıkonmasında yer alan amino asitlerin bireysel dağılımı. <sup>a</sup> Sisteinn indirgenmiş formda.....	37
Çizelge 1.6. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri.....	45
Çizelge 1.7. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış .....	47
Çizelge 4.1. Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.....	64
Çizelge 4.2. Langmiur eşitliğine dayalı $R_L$ değeri.....	65

## SİMGELER DİZİNİ

<b>Å</b>	Angström
<b>cm</b>	Santimetre
<b>dk</b>	Dakika
<b>k</b>	Kilo
<b>L</b>	Litre
<b>m</b>	Mili
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molarite
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>nm</b>	Nanometre
<b>ppm</b>	mg Çözünen/L
<b>rpm</b>	Dakikadaki Devir Sayısı
<b>°C</b>	Santigrat Derece

## KISALTMALAR DİZİNİ

AAm	Akrilamid
APS	Amonyum Persülfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartik Asit
BSA	Sığır Serum Albumin
CB	Cibacron Blue
CM-Asp	Karboksimetil Aspartik Asit
CR	Cibacron Red
Cys	Sistein
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FTIR	Fourier Transform Infrared
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
His	Histidin
HSA	Human Serum Albumin
IgG	İmmunoglobulin
IEC	İyon Değişim Kromatografisi
İDA	İminodiasetik Asit
İMAM	İmmobilize Metal Afinite Membranları
İMAK	İmmobilize Metal iyon Afinite Kromatografisi
kDa	Kilodalton
KGC	Gözenekli Cam Kromatografisi
MBAAm	N,N-Metilen-Bis-Akrilamid
Me	Metal
NTA	Nitriloasetik Asit
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
SP	Sporopollenin
ŞP-İMAK	Şelatlı Peptid-İmmobilize Metal İyonu Afinite Kromatografisi
TED	<i>N,N,N'</i> -Tris-Karboksimetil Etilen Dimin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametilen Diamin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamit Jel
UFLMP	Sıvı mikrofaz

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Proteinler

Protein ismi Yunanca *proteo* (anlam olarak 'ilk' veya 'baştaki') kelimesinden türetilmiştir (Telefoncu, 1998). Proteinler bütün hücrelerde ve hücrelerinde tüm bölümlerinde en çok bulunan biyolojik makro moleküllerdir. Proteinler, amino asit (a.a)'lerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında birbirlerine kovalent bağlanmasıyla (peptid bağları ile) oluşmuş polipeptidlerdir. Kısaca, proteinler monomeri a.a olan polimerleridir.

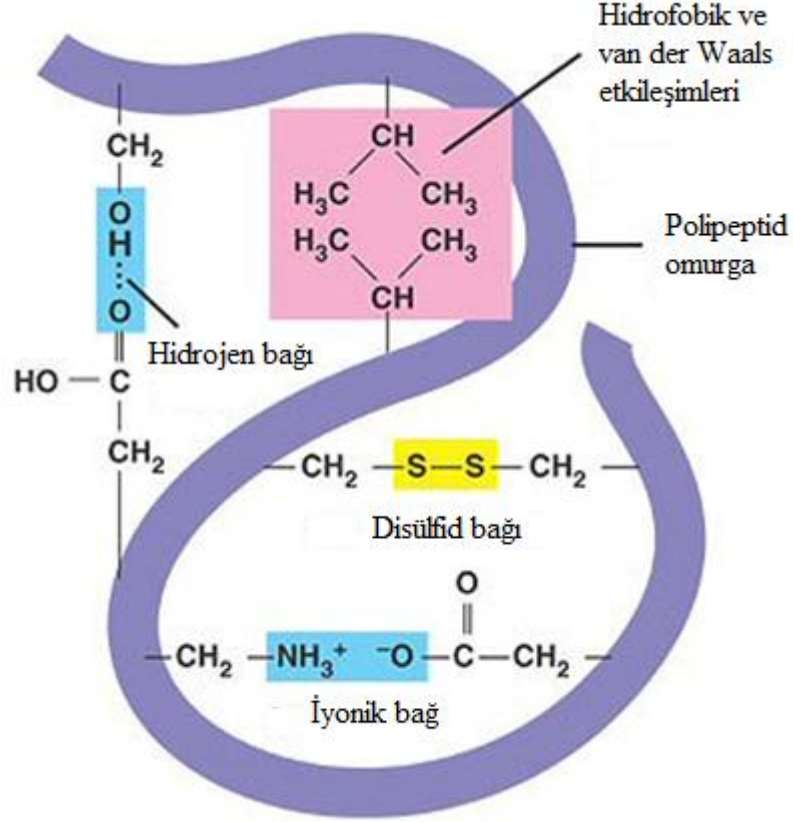
Proteinler, genetik bilginin ifadelendiği moleküler araçlardır. Tüm proteinler, bakterilerden en kompleks canlılara kadar, var olan aynı 20 standart a.a'nın karakteristik doğrusal diziler halinde kovalent olarak bağlanmasıyla oluşur. Amino asitlerin yan zincirlerinin belirleyici kimyasal özelliklerinden dolayı bu 20 standart a.a, protein yapısının dilinin yazıldığı bir alfabe gibi düşünülebilir.

Proteinler, bütün hücrelerde ve hücrelerin bütün kısımlarında bulunurlar. Tek bir hücrede bile binlerce farklı çeşitte ve büyüklüğü ufak peptidlerden, milyonlarca molekül ağırlığına sahip büyük polimerlere değişebilen proteinler bulunur. Bir bakteri hücresinde yaklaşık 4000 tür protein bulunmaktadır. Bazı proteinlerin molekül ağırlıkları; insulin 5.500, ribonükleaz 13.700, tripsin 23800, hemoglobin 68000, fibrinojen 450000, tiroglobin 630000 ve virüsler birkaç milyon olduğu tespit edilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Proteinler, biyolojik işlevlerde aşırı çeşitlilik gösterir ve inanılmaz derecede birçok işlev görürler; yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır. Enzimler ve polipeptid hormonlar, metabolizmanın düzenlenmesinde önemlidirler. Kastaki kontraktıl proteinler hareketi sağlarlar. Kemikte kollagen, kalsiyum fosfat kristallerinin depolanmasını sağlar. Kanda albümin ve hemoglobin taşıma görevi alırken; immünoglobülinler bakteri ve virüslerin yıkılmasında görev alırlar. Canlıların yapılarında bulunan proteinlerin başlıca biyolojik fonksiyonları; enzimatik katalizleme, taşıma ve depolama, mekanik hareket, mekanik destek, sinir uyarılarının üretimi ve iletimi, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü, hormonlar ve bağışıklık şeklinde sıralanabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

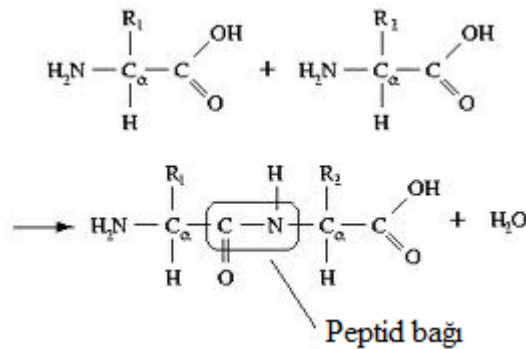
Proteinlerin % 50'si karbon, % 7'si hidrojen, % 23'ü oksijen, % 16'sı azot ve % 0-3'ü kükürttten ibarettir. Bunların yanı sıra fosfor, demir, iyot, bakır, çinko ve mangan gibi bazı elementler de birtakım spesifik proteinlerde bulunur. Proteinler, konformasyon (fibröz ve globüler) ve bileşimlerine (basit ve bileşik) göre iki türlü sınıflandırılır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Proteinlerin yapılarında kovalent ve kovalent olmayan bağlar vardır. Proteinlerin yapılarındaki kovalent bağlar, peptid bağları ve disülfid bağlarıdır; kovalent olmayan bağlar ise hidrojen bağları, iyon bağları, dipol-dipol bağları, hidrofobik bağlar (apolar bağlar) ve van der Waals etkileşimleridir. (Şekil 1.1)



**Şekil 1.1.** Bir polipeptidi stabilize eden bağlar (<http://alevelnotes.com/protein-structure>).

**Peptid bağı** , bir  $\alpha$ -amino asidin  $-\text{NH}_2$  grubu ile bir başka  $\alpha$ -amino asidin  $-\text{COOH}$  grubu arasından bir mol  $\text{H}_2\text{O}$  açığa çıkmasıyla oluşan kovalent bağa denir. Peptid bağı bir çeşit amid bağıdır. Yan grupları  $\text{R}_1$  ve  $\text{R}_2$  olan iki a.a arasındaki peptid bağı oluşumu reaksiyonu aşağıdaki gibidir (Şekil 1.2).

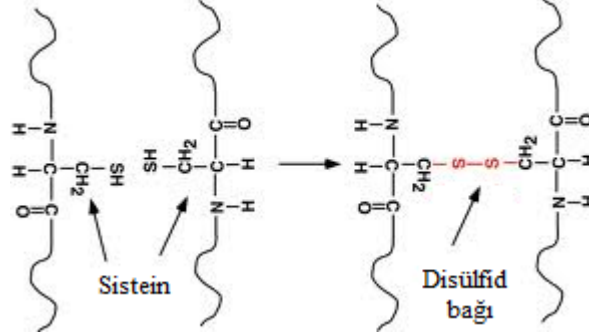


**Şekil 1.2.** Bir peptid bağının oluşumu.



Bir C–N tek bağıнын uzunluğu 1,49 Å (149 pm) ve bir C=N çift bağıнын uzunluğu 1,27 Å (127 pm) olduğu halde peptid bağıнын uzunluğu 1,32 Å (132 pm) kadardır. Peptid bağıнын uzunluğunun C=N çift bağıнын uzunluğundan büyük C–N tek bağıнын uzunluğundan küçük olması bu bağıın karbonil grubundaki rezonans kararlılığından dolayı kısmi çift bağı özelliği taşımasındandır. Bundan dolayı, peptid bağıındaki karbonil karbon atomuyla azot atomu arasındaki bağıın serbestliği yoktur. İki amino asitten dipeptid, üç amino asitten tripeptid, 10'a kadar olan amino asitten oligopeptid, daha çok amino asitten ise polipeptid meydana gelir. Proteinler, yüzlerce amino asitten oluşan polipeptidlerdir. Bir peptid zincirini oluşturan amino asitlerin her birisine rezidü (kalıntı) denir. Bir protein zinciri üzerinde a.a'ler arasında peptid ve disülfid bağılarından başka kovalent bağılanma yoktur. Peptidin bir ucunda serbest  $\alpha$ -amino grubuna sahip amino asit kalıntısı bulunur ki bu uca amino-terminal uç veya N-terminal uç denir. Peptidin diğer ucunda ise serbest  $\alpha$ -karboksil grubuna sahip amino asit kalıntısı bulunur ki bu uca da karboksil-terminal uç veya C-terminal uç denir.

**Disülfid bağıları**, iki sistein kalıntısı arasında, sülfhidril (tiyol, —SH) gruplarının H kaybetmeleri sonucu oluşan S—S bağılarıdır (şekil 1.3).

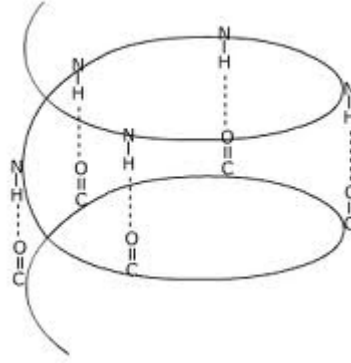


**şekil 1.3.** Bir disülfid bağıının oluşumu.

Disülfid bağılarının bir protein molekülünün şeklinin oluşmasında ve korunmasında önemli etkisi vardır. Disülfid bağıları, bir polipeptid zinciri içerisinde kurulabilir veya çeşitli polipeptid zincirlerinin birbirine bağılanmasını sağlayabilir.

**Hidrojen bağıları**, polipeptid zinciri oluşturan peptid bağılarındaki rezonans veya mezomeri durumundan dolayı, oksijenlerin bilinen keto gruplarından daha negatif, azotların ise pozitif özellik taşımasının sonucu olarak, bir polipeptid zincirdeki bir peptid düzleminde bulunan oksijen atomu ile bir başka peptid bağı veya düzlemindeki azot atomu arasında, aradaki uzaklık yaklaşık 2,7 Å olduğunda, hidrojen köprüsü

şeklinde ( $C=O \cdots H \cdots N$ ) oluşan bağlardır (Şekil 1.4) (<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-07.pdf>).



Şekil 1.4.  $\alpha$ -sarmal yapıdaki H bağları.

**İyonik bağlar**, polipeptid zincirlerindeki asidik ve bazik amino asit kalıntılarının fonksiyonel gruplarının fizyolojik pH'da tamamen veya kısmen iyonlaşmış halde bulunmalarının sonucu olarak, elektronegatif ve elektropozitif gruplar arasında gelişen *elektrostatik çekim kuvveti* ile ( $COO^- \cdots H_3N^+$ ) oluşan bağlardır (<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-07.pdf>).

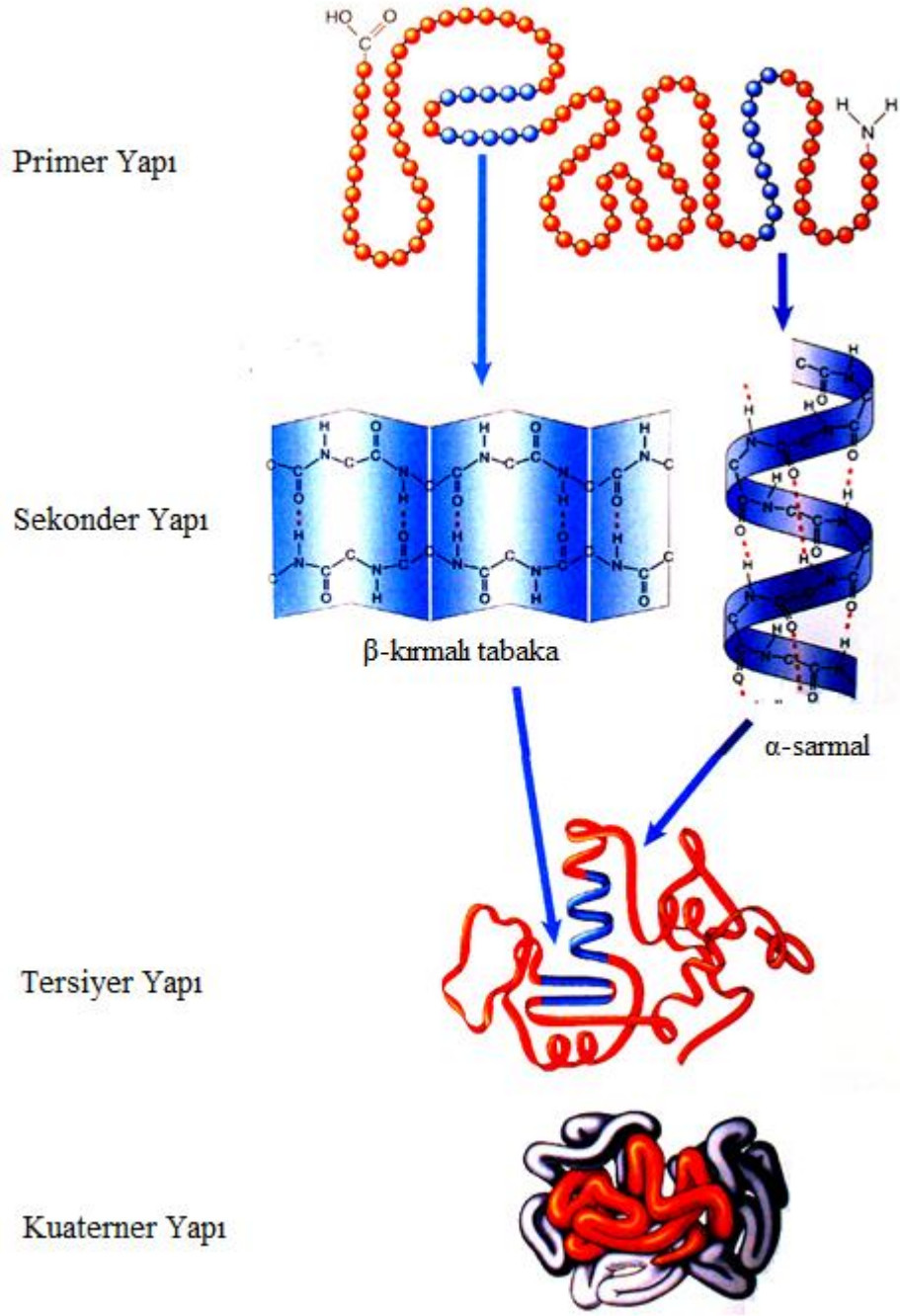
**Hidrofobik etkileşimler (Apolar bağlar):** Polipeptid zincirindeki amino asit kalıntılarının metil grubu, alifatik grup, siklik grup gibi apolar kısımlarının birbirlerine yeter derecede yakın olmaları halinde geçici bir polarite göstermelerinin sonucu ortaya çıkan ve *van der Waals-London çekme kuvveti* diye bilinen zayıf çekme kuvveti ile ( $CH_3 \cdots CH_3$ ) oluşan bağlardır. Hidrofobik etkileşimler gerçek bağ değildirler; elektron paylaşımı yoktur. Hidrofobik etkileşimler, proteinlerin iç kısımlarının kararlı olarak devamlılığının sağlanmasında rol oynar (<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-07.pdf>).

Proteinlerin yapısal organizasyonu dört şekilde tanımlanmıştır. Bunlar; primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuaterner (dördüncül) yapılarıdır (Şekil 1.5). Kovalent bağlarla (başlıca peptid bağları ve disüfit bağları) polipeptid zinciri **birincil (primer) yapıdır**. **ikincil (sekonder) yapıda** ise amino asit rezidüleri kısmen kararlı düzenlemelerle tekrarlayan yapısal modeller oluşturur. **Üçüncül (tersiyer) yapı** polipeptidin tüm üç boyutlu katlanmalarının bir görüntüsüdür. Bir protein iki veya daha çok sayıda polipeptid altbirimi içerdiğinde uzaysal düzeni **dördüncül (kuaterner) yapı** olarak tanımlanır.

**Primer yapıyı** sadece a.a'lerin peptid bağı oluşturması sonucu oluşan yapıdır. Buna ek olarak eğer polipeptid zinciri sistein a.a rezidüleri ihtiva ediyor ise disülfid bağları da oluşur. Primer yapı bir üç boyutlu yapı değildir, dolayısı ile bu yapıya sahip olan bir proteinin biyolojik bir aktivite göstermesi söz konusu değildir. Proteinler, vazifelerini yani biyolojik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için kendilerine özgün üç boyutlu yapıya sahip olmaları gerekir. Bir proteinin fonksiyonel karakterini onun üç boyutlu yapısı belirlemektedir. **Sekonder yapı** üç boyutlu yapının ilkidir. Bu yapı lineer dizilişte birbirine yakın a.a rezidüleri arasındaki sterik etkileşmeler sonucu meydana gelir. Bu etkileşimlerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliكتedir.  $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -kırmalı tabaka ve kollagen sarmal proteinlerde sıklıkla karşılaşılan sekonder yapılara örnektir. Sterik etkileşimlerin çoğunluğunu H bağları oluşturur.

Bir proteinin **tersiyer yapısının** oluşmasına ve bu yapının sürdürülmesine, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlara ek olarak van der Waals çekimleri ve iyonik bağlar da katılır. Böylece, üç boyutlu ve tam konformasyonlu globüler protein molekülü meydana gelir. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz.

Bir proteinin **kuarterner yapısı**, primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptid zincirlerinin daha büyük yapıli agregatlar halinde biraraya gelmesiyle oluşan yapıdır. Proteinlerin kuarterner yapısını oluşturan polipeptid zincirlerinin her birine alt birim veya **monomer** denir; bu monomerler, hidrojen bağları, Van der Waals çekimleri ve iyon bağları etkisiyle polimerize olmuşlardır. Bir proteinin kuarterner yapısını oluşturan monomerlerin reverzibl düzleşmeleri veya ayrılmaları, konformasyon değişikliğine yol açar. Proteinlerin spesifik biyolojik fonksiyonları bunların konformasyonlarına bağlı olduğundan, konformasyonda meydana gelen değişiklik, proteinin biyolojik aktivitesinin kaybolmasına neden olabilir.

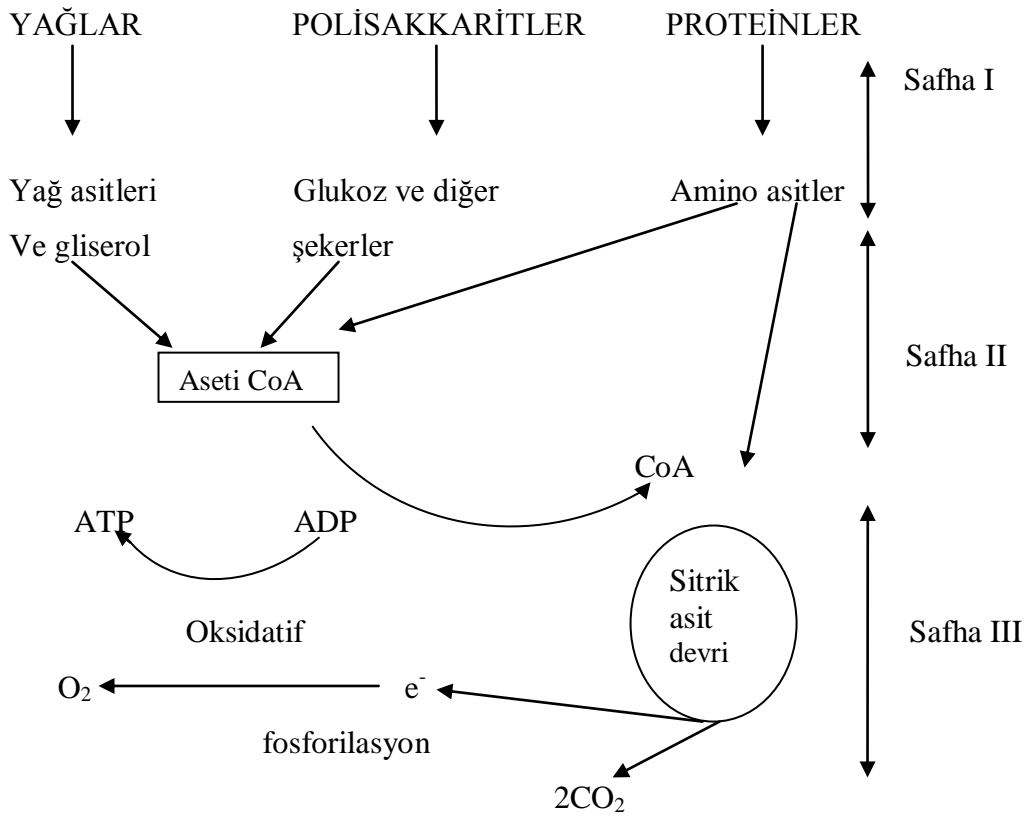


**Şekil 1.5.** Proteinlerin yapısal organizasyonu (<http://schoolworkhelper.net/2010/11/protein-structures-primary-secondary-tertiary-quaternary/>).

## 1.2. Oksidatif Fosforilasyon ve Sitokrom c

Metabolizma, katabolizma ve anabolizma olarak ikiye ayrılır. Katabolizma, hücrenin çevresinden aldığı veyahut kendi depolarından kullandığı büyük besin moleküllerini (karbonhidratlar, lipidler ve proteinler) çoğunluğu oksidatif mahiyetteki enzimatik reaksiyonlarla, laktik asit, asetik asit,  $\text{CO}_2$ , amonyak veya üre gibi bir seri daha küçük moleküllere parçalanması olayıdır. Bu esnada da büyük organik bileşiklerin yapısında bulunan serbest enerjinin açığa çıkmasıyla yüksek enerjili fosfat bağları (ATP) oluşur.

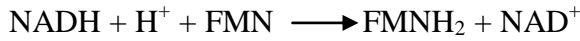
Hans Krebs, besin maddelerinin oksidasyonundan enerji üretiminin, yani katabolizmanın üç safhada gerçekleştiğini ileri sürmüştür. Birinci safhada besin maddelerindeki büyük moleküller daha küçük birimlere parçalanır. Proteinler yirmi çeşit amino asitlere, polisakkaritler glukoz gibi basit şekerlere ve yağlar da gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlenirler. Bu safhada iş görecektir enerji üretilmez. İkinci safhada ise, bu çok sayıdaki küçük moleküller, metabolizmada merkezi rolleri olan birkaç basit birimlere dönüştürülürler. Gerçekten şekerler, yağ asitleri, gliserol ve bazı amino asitler asetil CoA'nın asetil grubuna çevrilirler. Bu basamakta birkaç ATP sentezlenir, fakat asetil CoA'nın tümünün oksidasyonundan elde edilecek ATP miktarının yanında çok az kalır. Üçüncü safhada, sitrik asit devri ve oksidatif fosforilasyondan ibarettir ve yakıt moleküllerinin yıkımındaki son ortak yolu teşkil ederler. Bu devire asetil CoA şeklinde getirilen asetil birimleri, tamamen CO<sub>2</sub>'ye yükseltgenir ve bu arada beher asetil başına dört çift elektron, NAD<sup>+</sup> ve FAD'ye transfer edilir. Daha sonra da bu elektronların NADH ve FADH<sub>2</sub>'dan O<sub>2</sub>'ye kadar akışı sonucu oksidatif fosforilasyon adı verilen prosesle ATP sentezlenir. Besin maddelerinin yakılmasıyla meydana gelen ATP'nin büyük bir bölümü bu üçüncü safhada oluşur (Şekil 1.6) (Keha ve Küfrevioğlu, 1997)



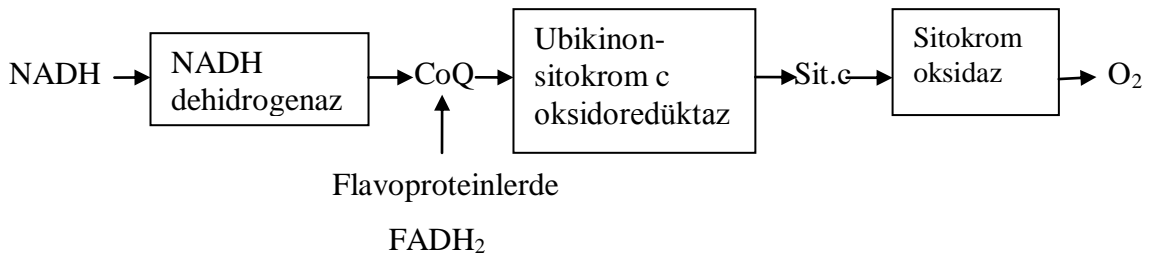
Şekil 1.6. Besin maddelerinin katabolizma safhaları (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Glikoliz, yağ asitleri oksidasyonu ve sitrik asit devrinde oluşan NADH ve FADH<sub>2</sub>, enerjice zengin moleküllerdir. Çünkü her biri yüksek bir transfer potansiyeline sahip bir elektron çifti ihtiva eder. Bu elektronlar O<sub>2</sub>'ye aktarıldığı zaman büyük miktarda enerji salınır. Bu enerji de ATP sentezinde kullanılabilir. İşte NADH ve FADH<sub>2</sub>'den elektronların bir seri elektron taşıyıcıları vasıtasıyla O<sub>2</sub>'ye transferi beraberliğinde ATP'nin sentezlendiği olaya oksidatif fosforilasyon adı verilir. Aerobik organizmlarda ATP'nin en önemli kaynağı budur. Mesela glukozun CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya oksidasyonunda elde edilen 36 ATP'den 32'si oksidatif fosforilasyonla sağlanır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Elektronlar NADH'tan O<sub>2</sub>'ye flavinlerden, Fe-S protein komplekslerinden, kinonlardan ve hem gruplarından ibaret elektron taşıyıcıları tarafından aktarılır. (Şekil 1.7) Kinonların dışında bu elektron taşıyıcılarının tamamı proteinlerin prostetik gruplarıdır. İlk reaksiyon NADH'ın NADH dehidrogenaz multienzim kompleksi tarafından yükseltgenmesidir. Bu kompleks en az 16 polipeptit zincirinden ibarettir. NADH'dan iki elektron enzimin prostetik grubu olan flavin mononükleotid (FMN)'e aktarılarak FMNH<sub>2</sub>'ye indirgenir. Flavın nükleotidler (FMN ve FAD), flavoproteinler veya flavoenzimler olarak bilinen redoks enzimlerinin prostetik gruplarıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).



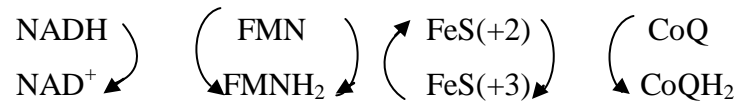
Daha sonra elektronlar FMNH<sub>2</sub>'den NADH dehidrogenaz kompleksinin bir başka prostetik grubunu teşkil eden bir seri demir-kükürt (FeS olarak gösterilir) komplekslerine aktarılır. Burada demir atomları "hem" grubuna ait değildir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).



**Şekil 1.7.** Solunum zincirinde yer alan elektron taşıyıcıları (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Son yıllarda yapılan araştırmalar demir-kükürt proteinlerinin biyolojik sistemlerdeki birçok redoks reaksiyonlarında çok önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. Üç tip FeS merkezi bilinmektedir. Bunların en basitinde, tek bir Fe atomu, protein yapısındaki sisteinlerin –SH gruplarına tetrahedral koordinasyon bağları ile bağlanmış halidir. Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> ile gösterilen ikinci tipte; iki Fe atomu, iki inorganik kükürt ve dört sistein –SH grubu vardır. Üçüncü tip merkez Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> şeklinde gösterilir ve dört Fe atomu dört inorganik kükürt ve dört de sistein –SH grubu ihtiva eder. Bu komplekslerde demir atomu, Fe<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> yükseltgenme basamaklarındadır. NADH dehidrogenaz sisteminde hem Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> hem de Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> tipindeki merkezler vardır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

NADH dehidrogenaz enzimidaki demir-kükürt merkezlerinden elektronlar, koenzim Q'ya transfer edilir. Koenzim Q (CoQ) uzun bir izopren zinciri takılı bir kinon türevidir olup, ubikinon adı da verilir. İzopren birimlerinin sayısı türden türe değişir. Memelilerde en bol bulunan 10 izopren birimine sahiptir ve CoQ<sub>10</sub> olarak gösterilir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

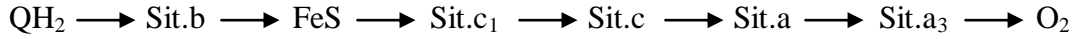


Süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından sitrik asit devrinde, süksinatın fumarata yükseltgenmesiyle, FADH<sub>2</sub>'nin oluştuğunu biliyoruz. Bu enzim süksinat-CoQ redüktaz enzim kompleksinin bir bileşeni olup, diğer bileşeni de bir FeS proteinidir. Bu kompleks de NADH dehidrogenaz gibi iç mitokondri membranının integral proteindir. FADH<sub>2</sub>'deki yüksek potansiyele sahip elektronlar kompleksteki FeS merkezlerine ve oradan da solunum zincirindeki CoQ'ya aktarılır. Aynı şekilde glikoliz olayında meydana gelen NADH elektronlarını devralan gliserol fosfat dehidrogenaz ve yağ asitlerinin oksidasyonunda görev alan yağ açıl CoQ dehidrogenaz enzimleri de, FADH<sub>2</sub> prostetik gruplarındaki elektronlarını farklı yollarla CoQ'ya aktararak CoQH<sub>2</sub>'yi oluştururlar (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

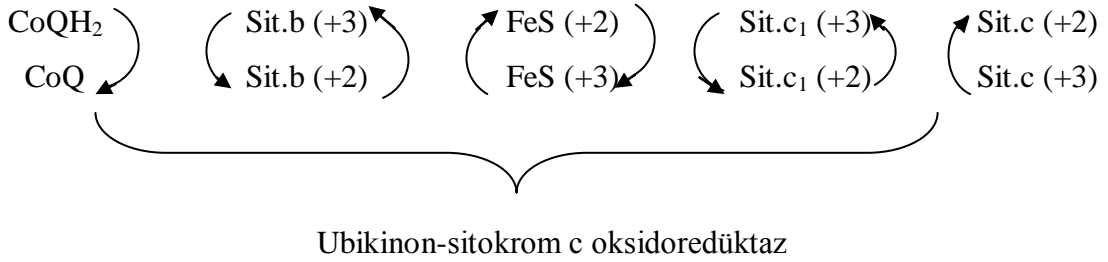
CoQH<sub>2</sub> ile O<sub>2</sub> arasındaki elektron taşıyıcılarının bir tane FeS proteininin dışında, hepsi sitokromlardır. Sitokromların solunum olayındaki önemi rolü 1925 yılında David Keilin tarafından keşfedilmiştir. Sitokromlar prostetik grup olarak "hem" grubu ihtiva eden elektron taşıyıcı proteinlerdir. Sitokromlardaki Fe atomları indirgenmiş Fe<sup>+2</sup> hali ile, yükseltgenmiş Fe<sup>+3</sup> hali arasında mekik dokur. Hem grubu bir FeS merkezi gibi tek elektron taşıyabilir. Fakat NADH, flavinler ve CoQ iki elektron transfer edebilir.

Nitekim bir  $\text{CoQH}_2$  molekülü yüksek potansiyelli iki elektronunu solunum zincirinin daha sonraki üyesi olan iki adet sitokrom b'ye aktarır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

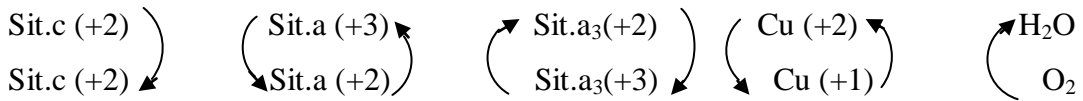
$\text{CoQH}_2$  ile  $\text{H}_2$  arasında beş sitokrom vardır. Sitokrom b ve  $c_1$ , bir tane FeS proteini ile beraber ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz multienzim kompleksinin bileşenleridir. Sitokrom c, elektronları bu kompleksten, bileşen olarak sitokrom a ve  $a_3$  ihtiva eden, sitokrom oksidaz kompleksine transfer ederler. Bu sitokromların redoks potansiyelleri sırasıyla yükselir:



Bu sitokromların birbirinden farklı yapı özellikleri vardır. Sitokrom b,  $c_1$  ve c de prostetik grup "hem" adı verilen bir demir-protoporfirin IX'dur. Bu, hemoglobin ve miyoglobindeki hem grubu ile aynıdır. Ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz kompleksi elektronları  $\text{CoQH}_2$ 'den, suda çözünebilen bir periferik membran proteini olan sitokrom c'ye transfer eder.

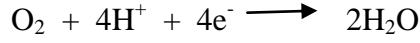


Daha sonra indirgenmiş sitokrom c, sitokrom oksidaz kompleksine aktarır. Sitokrom c'nin rolü  $\text{CoQ}$ 'ya benzemektedir ve solunum zincirindeki kompleksler arasında hareketli bir elektron taşıyıcısı görevini görür (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).



Elektronlar önce kompleksin sitokrom a bileşenine, oradan da bakır ihtiva eden sitokrom  $a_3$ 'e aktarılır. Bu bakır atomu  $\text{sit.a}_3$ 'den  $\text{O}_2$ 'ye elektronu transfer ederken +2 ve +1 yükseltgenme basamakları arasında mekik dokur. Bir  $\text{O}_2$  molekülünden iki  $\text{H}_2\text{O}$  molekülünün oluşumu dört elektron gerektiren bir olaydır, fakat hem grupları birer elektron aktarabilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

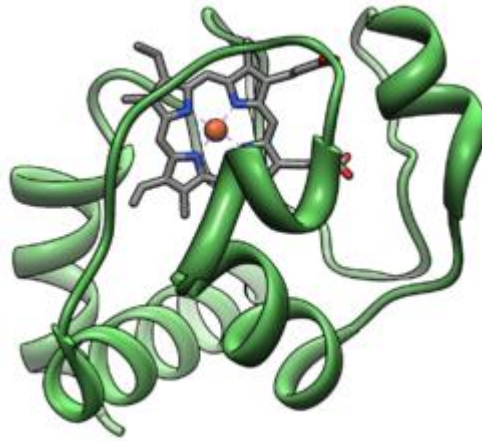




Dört elektronun bir O<sub>2</sub> molekülünü indirgemek üzere bir araya nasıl geldiği henüz tam aydınlanmış olmamakla birlikte, çok düşük sıcaklıklarda spektroskopik araştırmalara göre sitokrom oksidaz tamamen indirgenmiş durumda iki değerlikli (Fe<sup>+2</sup>) olarak bulunur, bakır da bir değerliklidir. Oksijen bağlandığında bakırdan ve sitokrom oksidazdan birer elektron aktarılarak peroksit iyonu(O<sup>-2</sup>) oluşur. İki elektron ve iki H<sup>+</sup>'nin ek transferiyle 2OH<sup>-</sup> oluşur. Bunlar da tekrar 2H<sup>+</sup> ile birleşerek 2H<sub>2</sub>O molekülünü oluşturur (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

### 1.3. Stikrom c ve yapısı

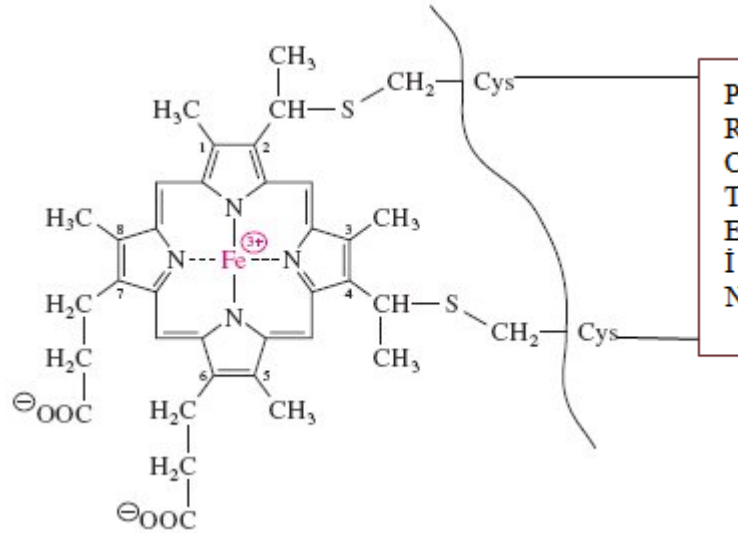
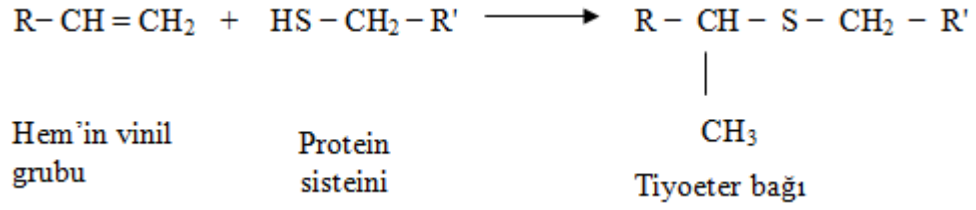
Aerobik organizmalar için çok önemli bir madde olan sitokrom c, fotosentez veya solunumun elektron transfer zincirinde bir elektron transferi ile görevlidir. Sitokrom c, oksijenli solunum yapan hücrelerin metabolizmasında önemli rol oynayan bir enzimdir. İnsandan küf mantarına kadar, birbirinden son derece farklı organizmalarda bulunur (Şekil 1.8).



**Şekil 1.8.** At kalbi sitokrom c'nin yapısı (<http://schoolworkhelper.net/2010/11/protein-structures-primary-secondary-Tertiary-quaternary/>).

Sitokrom c (mol kütlesi 12400 Da) 104 aminoasit uzantısından oluşan tekli polipeptid zincirine sahiptir ve hem grubuna kovalent olarak bağlanır. Sitokromlar kendilerine has görünür bölge spektrumlarına sahip kırmızı kahverengi hem proteinleridir. Hemoglobinin hem halkasına benzer şekilde porfirin halkasına bağlı demir atomu içerir. Çapı yaklaşık 34 Å olan pürüzlü ve küresel bir molekül olup yapısındaki hem grubu hidrofobik yan zincirler tarafından sıkıca sarılmıştır. Sitokrom c'nin hem grubu hemoglobin ve myoglobinin hem grubundan 2 vinil grubu yerine tiyometil gruplarının girmesiyle farklılık kazanır. Sitokrom c 'de hem, proteine tiyoeter bağlarıyla

bağlanmıştır. Bu bağlar, protein yapısında bulunan iki sisteinin –SH gruplarının hem'in vinil gruplarına katılmasıyla oluşur (Şekil 1.9.).



**Şekil 1.9.** Sitokrom c'de hem grubu. Protein yapısında bulunan iki sisteinin –SH gruplarının hem'in vinil gruplarına katılmasıyla oluşmuş tiyoeter bağları hem'i proteine bağlar (Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Sitokromlar  $\text{Fe}^{+3}$ 'ü  $\text{Fe}^{+2}$ 'ye geri dönüşümlü olarak değiştirebilen mitokondrideki tek elektron taşıyıcı proteinlerdir. Sitokromlar içerdikleri metal iyonu üzerinden yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarına uğrarlar. Sitokrom c elektron transferini sitokrom redüktaz kompleksinden sitokrom oksidaz'a elektron taşıyarak gerçekleştirir. Sitokrom c bu elektron transferini üzerindeki demir iyonu sayesinde yürütür. Sitokrom c yüzeyi pozitif yüklü gruplara sahiptir. Sitokrom redüktaz ve sitokrom oksidazın ise negatif yüklü grupları vardır. Böylece elektrostatik etkileşimler sayesinde sitokrom c elektron transferini gerçekleştirir (Şekil 1.7).

#### 1.4. Sporopolleninin Yapısı ve Kimyası

Yosun, eğrelti otu sporları ve birçok polen tanecikleri bir biyopolimer olan sporopollenini de içeren bir tabakaya sahiptir (Ünlü, 2004). Bu tabakaya sporoderm, exine denir. Sporopollenin enzimatik parçalanmalara ve kuvvetli asidik veya bazik ortamlardaki hidrolitik bozunmalara karşı oldukça dayanıklıdır (Martin ve Juniper,

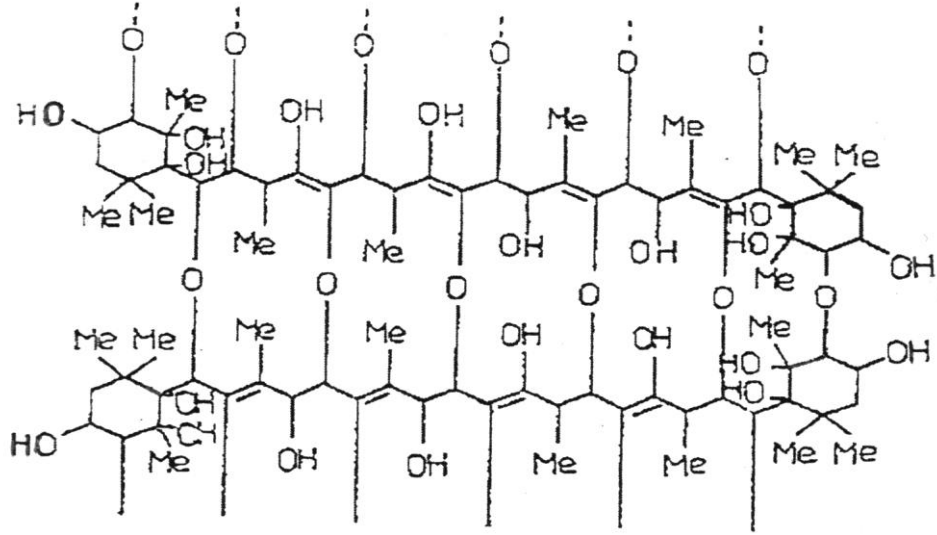
1970). Sporopollenini tek tip bir makromolekül olarak tanımlamak mümkün değildir. Pteridophyta ve spermatophyta'dan türetilen sporopollenin üzerine yapılan Infrared spektroskopi ve <sup>13</sup>C NMR spektroskopisi çalışmaları, sporopolleninin yapısında alifatik, aromatik, hidroksil, karbonil/karboksil ve eter fonksiyonel gruplarının değişik oranlarda var olduğunu göstermiştir (Wilmesmeier vd., 1993). Sporopollenin büyük ölçüde açıl lipit ve fenilpropanoid prekürsörlerden (yapılardan) oluşur (Piffanelli vd., 1998; Ahlers vd., 2000). Sporopolleninin polimerik yapısı içerdiği çapraz bağlar da dahil olmak üzere belirsizliğini hala korumaktadır.

Sporopolleninin sentez mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bileşimlerindeki benzerlik dolayısıyla suberine benzer bir biyosentetik orijine sahip olduğu düşünülmektedir (Kroken vd., 1996). Fakat Suberinin aksine sporopollenindeki exine yapı genellikle selülöz/pektin yapıda olan intine yapının üzerinde yer alır. Exine yapı kısmen veya tamamen aminoetanol ile çözünürleştirilebilmektedir (Southworth, 1974). Spor ve polenleri saran çok tabakalı sporopollenin, yapısal olarak çok çeşitlilik gösterir. Ayrıca gözenekli yapısı simetrik (Bohne, G. vd., 2003).

Polen ve spordardan elde edilen sporopolleninler yüksek pH değerlerine dayanıklı olmaları, nispeten eşboyutlu yapıları ve mekanik dayanıklılıkları dolayısıyla bir adsorban olarak avantajlara sahiptir. Sporopollenin yüksek hidrofilik grup içeriğiyle primer gurupların takılmasına ve katıfaz biyopolimerlerin sentezine imkan tanır (Mackenzie ve Shaw 1980; Adamson vd. 1983). Ayrıca sporopollenin yapısına kromatografik uygulamalara uygun ligand immobilizasyonu da mümkün olmaktadır (Ersöz vd., 1995; Vural vd., 1995; Çengelöglü vd., 1998).

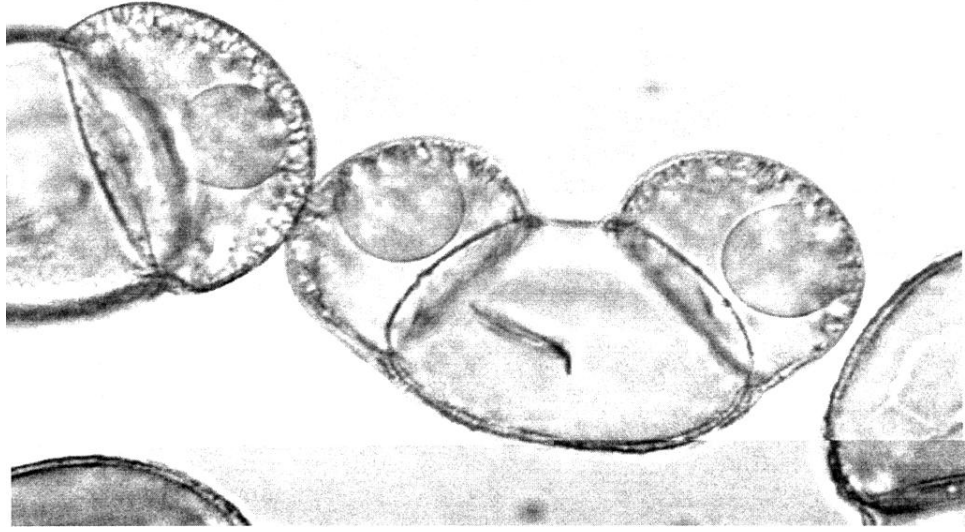
Yapılan bir çalışmada saccinin dış yüzeyinde yer alan sexine yapının oldukça geçirgen, büyük moleküllerin geçişine müsaade eden bir mikrofiltre olduğu belirtilmiştir. Kromotografik uygulamalar ve immobilizasyon için sacci yapısında bulunan iç spropollenin yüzeyinin geniş ve kolay erişilebilir olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca saccinin mekanik olarak sağlam olduğu gözlemlenmiştir. Nexine, yapısının ise ultrafiltre membran özellikte olduğu belirtilmiştir (Bohne, G., 2003).

Spor büyüklüğünün tanecikten taneciğe değişmediği bilinmektedir. *Lycopodium Clavatum* sporları 20 mikronluk eş boyutlu tanecikli yapıya sahiptir (Pehlivan, 1991). *Lycopodium Clavatum* yapısında bulunan sporopolleninin C<sub>90</sub>H<sub>144</sub>O<sub>27</sub> şeklinde bir stokiyometriye sahiptir. Sporopolleninin karotenoidlerden türetilen yapısı aşağıda Şekil 1.10'da verilmiştir (Pehlivan, 1991).

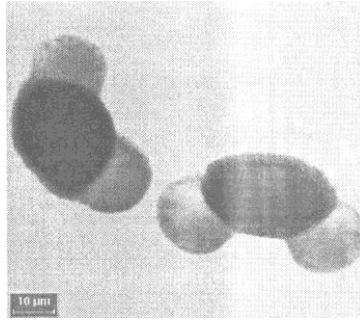


**Şekil 1.10.** Sporopolleninin karotenoidlerden türetilen yapısı (Pehlivan,1991).

Sporopollenin hem hidrofobik hem de hidrofilik fonksiyonlar gösterir. Suda kolaylıkla ıslanabilir olmasına rağmen şişme özelliği azdır. Alkoller ve aminler gibi amfifilik sıvılarda çok iyi şişer. Amfifilik moleküller arasında alkolleri, fenolik bileşikleri, asit ve alkali aromatik molekülleri, proteinleri sayabiliriz. Bu moleküller sporopollenin üzerine sulu çözeltilerden tersinir bir bağlanma ile immobilize edilebilir (Woehlecke vd., 2002). Exine yapıda genelde iki hava keseciği ve bir merkez mikro kapsül yapı bulunur (Şekil 1.11). Yapılan bir çalışmada floresan bir madde ile muamele edilen çam polenlerinden elde edilmiş exine yapıdaki hava kesecikleri herhangi bir lag faz bile tespit edilemeden floresan maddeyi yapısına almıştır. Bu da oldukça geçirgen yapısından kaynaklanmaktadır (Şekil 1.12). Merkezi mikro kapsül yapı için geçirgenlik katsayısı geniş bir aralıkta yer alır. Geçirgenlik katsayısı çoğunlukla Stokes yarı çapına bağlıdır (Ehwald vd., 2002).

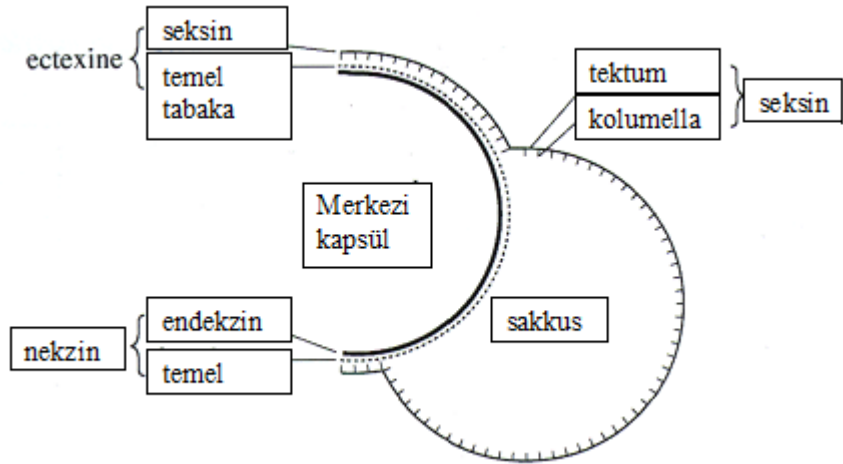


Şekil 1.11. Çam polenlerinden elde edilmiş exine yapının SEM fotoğrafı (Ehwald vd., 2002).



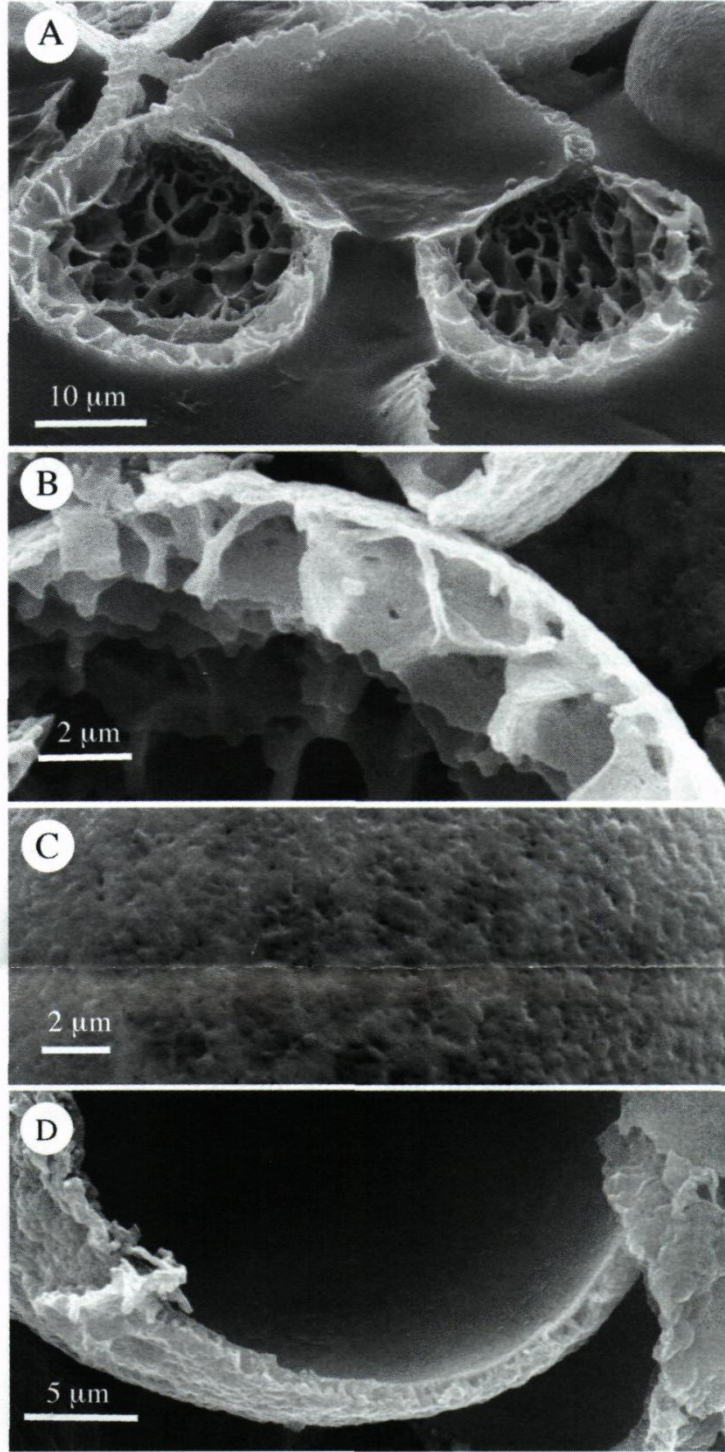
Şekil 1.12. Çam poleninden saflaştırılmış exine yapının Floresan çözelti içerisindeki görünümü (Ehwald vd., 2002).

Şekil 1.13’de çam exininde bulunan sporopollenin yapısı şematik olarak gösterilmiştir (Bohne vd., 2003).



Şekil 1.13. Çam exininde bulunan sporopollenin şematik yapısı (Ünlü, 2004).

Şekil 1.14’de çam polenlerinden elde edilen exine yapıya ait Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleri görülmektedir (Bohne vd., 2003). Şekil 1.14 (A)’da merkez kapsüle ait bir parçadan çekilmiş, merkez kapsül tabakasına ait tek taraflı sacci’li görüntüsü görülmektedir. Şekil 1.14 (B) saccus’a ait bal peteği şeklinde ki destek yapısında gösteren yakın plan yüzey görüntüsüdür. Şekil 1.14 (C) saccus’ u çevreleyen sexine yapının yüzey görüntüsüdür. Şekil 1.14 (D)’de merkez kapsülün yoğun yapısı olan nexine yapı ve dış yüzeydeki gözenekli sexine yapının birlikte görüntüsü görülmektedir.



**Şekil 1.14.** Çam polenlerinden elde edilen exine yapıya ait Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleri (Ünlü, 2004).

### **1.5. Kromatografi ve Kromatografik Teknikler**

Kromatografi kelimesi Yunanca “chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında görünür renkli bitki pigmentlerin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir. genel anlamda bir karışımı oluşturan bileşiklerin veya maddelerin iki ayrı faz arasında ve bu fazlardaki hareket hızlarının farklılıklarına dayanarak hem nitelik hem de nicelik olarak ayrıştırılması işlemidir. Modern



kromatografide karışımın ayrıştırılmasında iki farklı faz kullanılır, bunlar sabit faz ve hareketli fazlardır. Sabit faz sıvı da olabilir katı faz da olabilir. Hareketli veya taşıyıcı denilen faz ise hem sıvı hem de gaz fazında olabilir. Hareketli fazın gaz olması durumunda sistem Gaz Kromatografisi (GC) diye tanımlanmaktadır. Taşıyıcı ya da hareketli kısmın sıvı olması durumunda ise Sıvı Kromatografisinden (LC) söz etmek mümkündür. Hedef moleküllerin, çoklu bir karışımdan ayrıştırılması ve/veya saflaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılabilir. Maddelerin dağılma oranları değişiktir. Yeni geliştirilen yöntemlerle, moleküllerin izomerleri gibi çok küçük farklılıklara dayanan ayırmalar gerçekleştirilebilmektedir (Porath vd., 1975; Otto vd., 1993). Bu ayırmalarda ölçümler, mikrogram seviyesindedir ve çok hassastır. Kromatografik ayırma teknikleri özellikle klinik kimya, biyokimya ve farmasötik kimya, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromatografik tekniklerle ürün ayırımı ve ürün elde edilmesi, kompleks biyolojik örneklerden başarılı şekilde, endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilebilmektedir (Yılmaz, 2009; Ohkubo vd., 1980).

Kromatografik ayırım farklı maddelerin, destek materyali tarafından alıkonma derecesine bağlı olarak, farklı derecelerde dağılması prensibine dayanır. Moleküllerin çeşitli karışımlardan yüksek saflıkta ve tek basamakta ayrıştırılabilmesi için klasik ayırma tekniklerine alternatif yeni yöntemler arayışı halen devam etmektedir. Kromatografinin ilk kez kullanımından (1906) itibaren ayırım özelliklerine bağlı olarak farklı yöntemler geliştirilmiştir. Jel filtrasyonu ya da moleküler dışlama (size exclusion) kromatografisi, proteinlerin şekil ve büyüklük özelliklerine göre ayırım prensibine dayanmaktadır. Bu sistemde farklı gözenek boyutuna sahip destek materyalleri kullanılmaktadır. Gözeneklerin büyüklüğü protein ayırımının esasını oluşturmaktadır. İyon değişim kromatografisi (IEC), yüklü moleküllerin yüklü destek materyalleriyle etkileşimine dayanmaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ise (HIC) hedef molekül ile destek materyalin sahip olduğu hidrofobik grupların etkileşimini içermektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip bir diğer kromatografik teknik ise, protein ve afinite destek materyalinin yüzey özelliklerine dayanan ayırım şeklidir. Afinite kromatografisi olarak isimlendirilen bu yöntemde, birbirine yüksek afinite sergileyen matriks ve hedef molekül, anahtar-kilit modeline uygun olarak etkileşmektedir (Ghosh, 2004; Lönnerdal, 1982).



## 1.6. Biyoafinite Kromatografisi

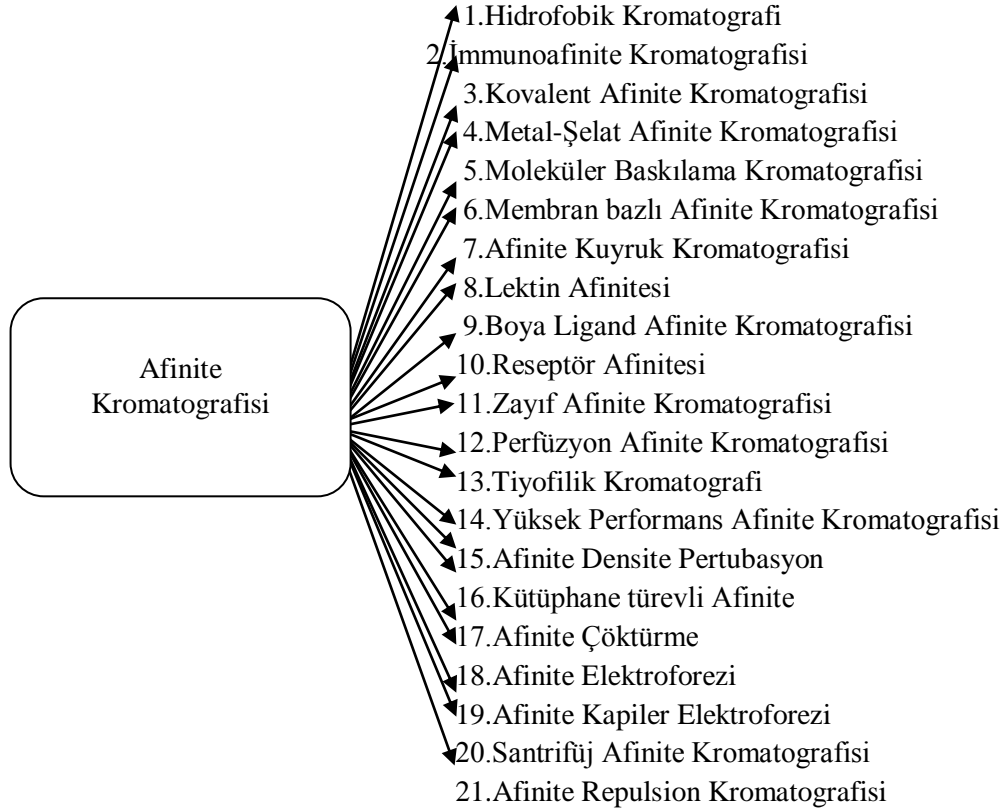
Biyoafinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir.

Proteinler büyüklük ve şekil, toplam yük, yüzeyde bulunan hidrofobik gruplar, kullanılan durağan faz ile bağlanma kapasitesi gibi farklı özelliklere sahip olduklarından, bu karakteristik özelliklerden biri temel alınarak gerçekleştirilen kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler. İyon değişim kromatografisi protein yüküne dayanır. Jel geçirgenlik kromatografisi veya moleküler elek kromatografisi adı ile de bilinen ancak genelde jel filtrasyonu terimi kullanılan kromatografi tekniğinde ise proteinleri ayırmak için şekil ve boyutlarını kullanır. Hidrofobik uzantılar gibi protein yüzey özellikleri, hidrofobik etkileşim kromatografisinin temelini oluşturur. Afinite kromatografisi proteinlerin yüzey özelliklerine bağlıdır. Afinite kromatografisi bir biyolojik ligand (örneğin: substrat, enzim ya da hormon) ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında olan özgün etkileşimi esas alan güçlü bir protein saflaştırma yöntemidir. Burada söz konusu etkileşim antikoları antijenlerle, enzimlerin substrat analoglarıyla ve de hormonların reseptörleri ile olan etkileşimleri türündendir. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler Çizelge 1.1’ de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler (Ceylan, 2011).

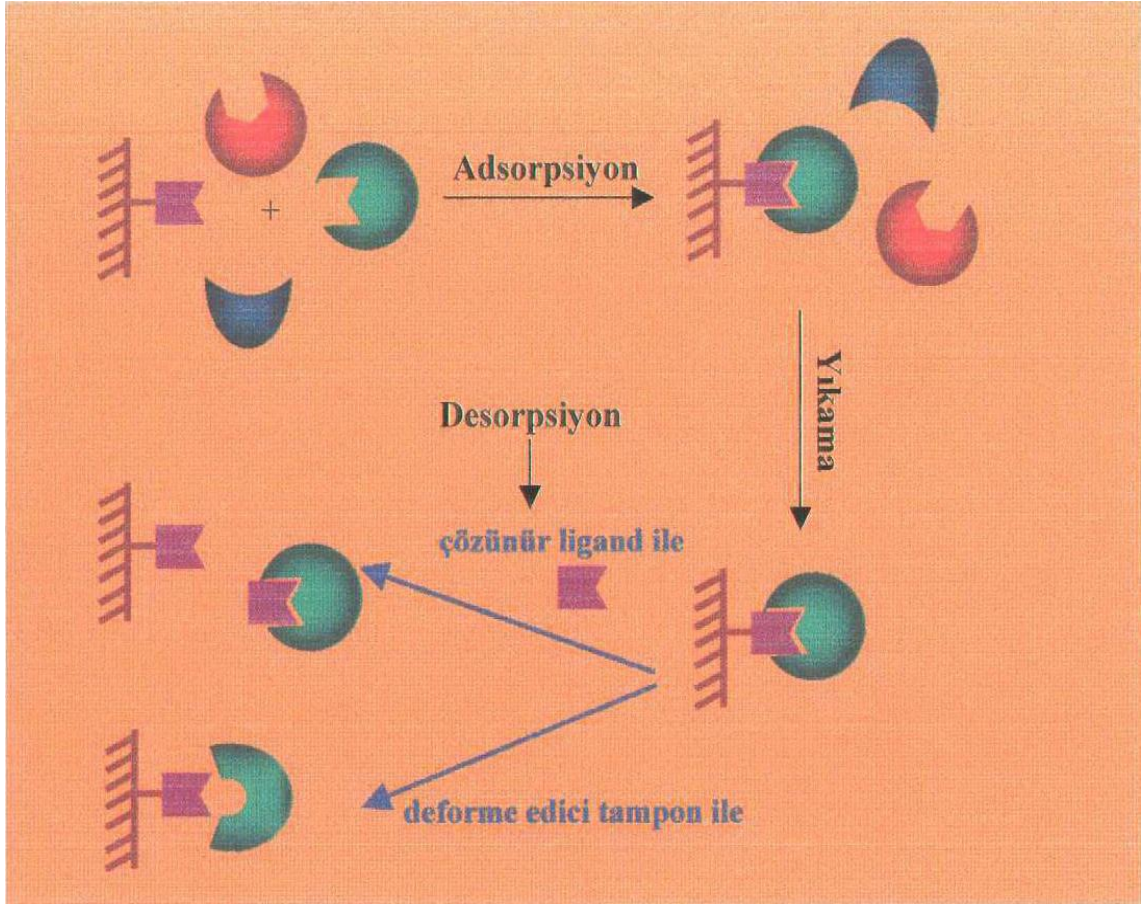
<b>Ligand</b>	<b>Ligandla Etkileşen Protein</b>
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör çeşitleridir)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asite bağlı protein (enzim veya histon)
Hormon,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

Afinitenin geniş alanda değişik uygulamaları nedeniyle alt afinite teknikleri ortaya çıkmış ve bazıları kendilerine özel isimler almışlardır. Şekil 1.15 ‘de bu tekniklerden bazıları verilmiştir.



**Şekil 1.15.** Afinite kromatografisinin alt başlıkları (Ceylan, 2011).

Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.16’de verilmiştir. Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Ayrılacak olan biyomolekülü içeren ham karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Daha sonra adsorplanan biyomolekül ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık değişimi veya üre, guanidin gibi ayrıştırıcı ajanlar ile) veya ligandın çözeltisi kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dispersiyon kuvveti, dipol dipol etkileşimi veya yük-transfer etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliği ve etkinliğini oluşturan en temel etmendir.



Şekil 1.16. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi (Ceylan, 2011).

### 1.5.1. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi

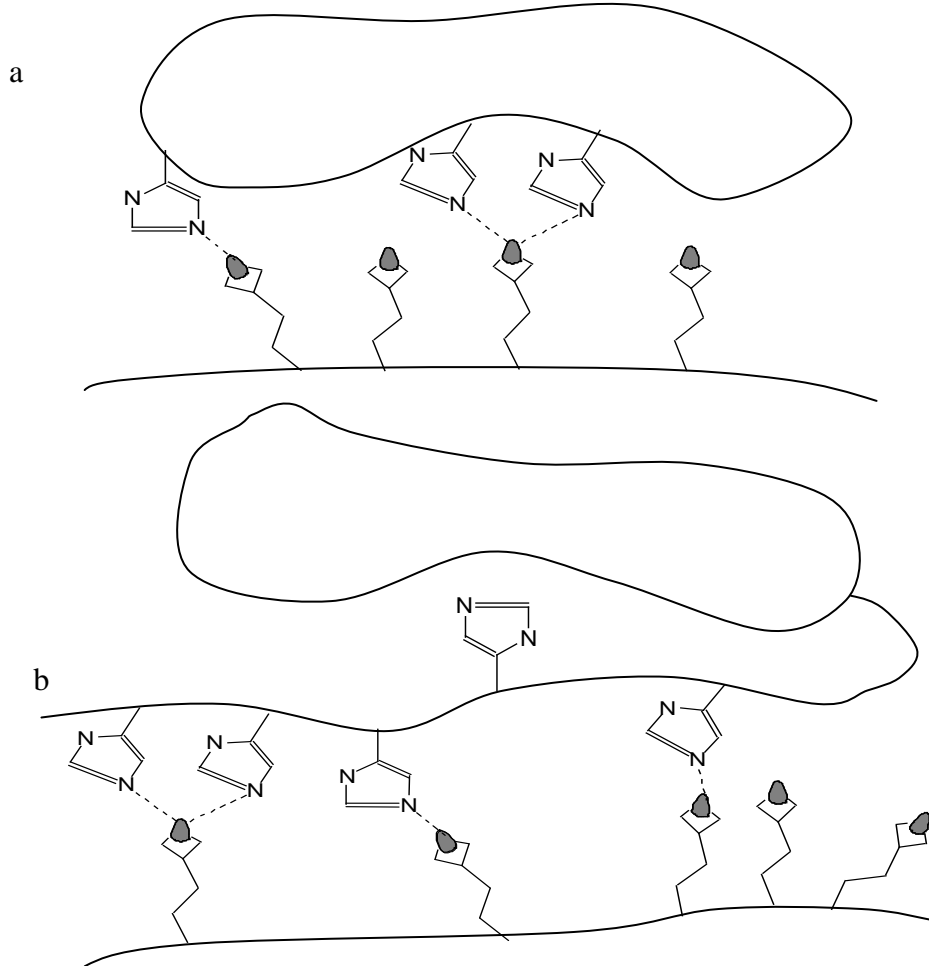
Sabit bir destek üzerine kovalent olarak bağlanmış şelat oluşturuvcu bir grup tarafından tutulan bir metal iyonuna, sistein, histidin ve triptofan gibi dışarı ulaşabilir ve elektron verebilen amino asitlere sahip proteinleri bağlamak suretiyle fonksiyon görür. Genel olarak kullanılan iyonlar  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  gibi sınırdaki hafif metallerdir. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi (İMAK)' nin başlangıcı, Helfferich' in küçük moleküllerin "ligand değişim kromatografisi" ni öne sürdüğü 1961'e kadar uzanabilmektedir (Porath vd., 1975). Bu tekniğin temeli ve uygulamaları, Davankov ve Semechkin tarafından etraflıca gözden geçirilmiştir (Davankov ve Semechkin, 1977). Daha sonra Porath, ligand değişimini de içine alan metal şelat etkileşim kromatografisinin bütün şekillerini kapsayan "immobilize metal iyon afinitesi" terimini ortaya koymuştur. Porath, bir protein molekülünün, metal iyon afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak, saflaştırılabildiğini gözlemlemiştir (Porath vd., 1983). Çoğu protein, metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilir. Bunlardan bir çoğu çok dişli kompleksler olup, İMAK'la proteinlerin saflaştırılmasını sağlarlar. Birçok durumda İMAK'ın yüksek spesifikliğini arttıran, oluşan kompleksin kuvvetidir ve proteinden

proteine değişmektedir. Proteinlerin (veya peptitlerin), metal iyonlara bağlanması, protein yüzeyindeki elektron verici gruplar ile bir veya daha çok koordinasyon merkezi olan metal iyonları arasındaki etkileşime dayanır. İMAK'ta, metal şelatlayıcı grubun kovalent bağlandığı matriks veya sorbent kullanılır. Bir İMAK kolonu,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  gibi herhangi bir iyon çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle yüklenebilir. Çözeltiyi kolondan geçirme işlemine, çözeltideki metal iyonu ile sabit fazda şelat oluşturan metal iyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam edilir. İminodiasetikasit (İDA) gibi bir ligand, silika veya polimer bazlı olan katı destek materyale bağlanır. Kolon birkaç kez aşırı metal çözeltisiyle doldurulur ve uygun bir tampon ile dengeye getirilir. İlgilenilen biyolojik olarak aktif ürünleri ihtiva eden bir karışım, kolondan geçirilir. Karışımında bulunan bileşiklerden, liganda eşlenik olmayan moleküller kolondan geçer. İmmobilize metal-ligand kompleksi için afinite gösteren ürünler kolonda tutunur.

Bir İMAK kolonu,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  gibi herhangi bir iyon çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle yüklenebilir. Çözeltiyi kolondan geçirme işlemine, çözeltideki metal iyonu ile sabit fazda şelat oluşturan metal iyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam edilir. İminodiasetikasit (İDA) gibi bir ligand, silika veya polimer bazlı olan katı destek materyale bağlanır. Kolon birkaç kez aşırı metal çözeltisiyle doldurulur ve uygun bir tampon ile dengeye getirilir. İlgilenilen biyolojik olarak aktif ürünleri ihtiva eden bir karışım, kolondan geçirilir. Karışımında bulunan bileşiklerden, liganda eşlenik olmayan moleküller kolondan geçer. İmmobilize metal-ligand kompleksi için afinite gösteren ürünler kolonda tutunur. Metal afinite ile protein adsorpsiyonunda triptofanın indol, sistenin tiyol ve histidin imidazol grubu gibi elektron verici amino asit rezidüleri, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Biyopolimerlere ligandın bağlanması, metal şelasyonunun yanısıra elektrostatik, hidrofobik ve van der Waals etkileşimlerini de içermektedir. Proteinler, immobilize metal ile aralarındaki afinite sabitini azaltan bazı şartlarda, komplekslerinden ayrılabilirler. Tuz derişiminin ve pH'nın değişimi veya bağlanmada görev alan amino asit rezidülerine benzerliği bulunan yarışmalı bir ajanın ortama eklenmesi, proteini bağlı bulunduğu kompleksten uzaklaştırabilir. İmidazol ve histidin, İMAK' de bağlı proteinleri uzaklaştırmak için yaygın olarak kullanılan iki yarışmalı ajandır.

İMAK' de proteinlerin adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupları ile immobilize bir metal iyonu arasındaki koordinasyon oluşumuna dayanır. Çoğunlukla kullanılan metaller, Lewis asitleri olarak düşünölebilen ve elektron çifti kabul edilen  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Ni(II)}$ ,  $\text{Zn(II)}$ ,  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Fe(II)}$  gibi geçiş metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlanan şelat oluşturuıcı bileşiklerde bulunan (N, S, O) gibi elektron verici gruplar,

ortamda bulunan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak, iki dişli, üç dişli vb. olabilen metal şelatları oluşturarak, metal iyonları ile koordinasyon bağı yapabilirler. Geride kalan metal koordinasyon bölgeleri normalde su molekülleri tarafından işgal edilir. Daha sonra proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilir. Bazı amino asitler, özellikle yan zincirlerindeki elektron verici atomlarından dolayı bağlanma için uygundur. Glu, His, Arg, Lys, Asp, Tyr, Cys ve Met gibi çoğu artıkların bağlanmaya katılabilmesine rağmen, İMAK' de proteinin gerçekte alıkonması histidil kalıntılarının varlığı temeline dayanır. Trp, Phe, ve Tyr gibi aromatik yan zincire sahip amino asitlerde, eğer dışarı uzanabilen histidil artıklarına yakın iseler onlarda bağlanmaya katkıda bulunabilir (Porath vd., 1983; Sulkowski, 1985). Şekil 1.17 Afinitesteğe şelatlanmış bir metale proteinin bağlanmasını göstermektedir (Ueda vd., 2003).



**Şekil 1.17.** Metal şelat afinitesteğe protein bağlanmasının gösterimi (Denizli, 2009).

- Protein yüzeyindeki histidin grupları ile metal-şelat etkileşimi
- Proteinin C veya N terminaline ilave edilen His-etiketi ile metal-şelat etkileşimi

İMAK desteklerine protein adsorpsiyonu, histidil artıklarındaki imidazol azotunun, nötral veya hafif bazik ortamlarda protone olmadığı pH'larda gerçekleşir. Genellikle relativ olarak spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri indirgemek için 0,1-1,0 M NaCl içeren yüksek iyonik şiddetli tamponlar kullanılır. Hedef proteinin desorpsiyonu ortamın protonlanması, ligand değişimi veya EDTA gibi güçlü bir şelat oluşturucu ile metal iyonunun uzaklaştırılması yöntemleri ile yapılır. Hedef protein desorpsiyonu için düşürülen pH gradientleri veya düşük pH'lı desorpsiyon tamponları kullanılır. Düşük pH'a hassas proteinler için nötral pH civarında imidazol ile ligand değişimi daha uygundur. Bu durumda imidazolun protonlanarak meydana getirdiği pH düşmesinden sakınmak için İMAK kolonları kromatografik ayırmalarda önce imidazol ile doyurulur ve dengeye getirilir (Sulkowski,1996). EDTA gibi güçlü şelat oluşturucu ajanların kullanılması da bağlı proteinlerin desorpsiyonunu sağlar; fakat bu durumda sorbentin bağlama etkisi tahrip edildiği için, bir daha ki ayırmadan önce matriks tekrar şelat oluşturucu iyon ile yüklenmelidir. Protein ayırmadaki seçicilik, uzatıcı kolla, ligand yoğunluğu, tuz derişimi ve yarışmacı ajanların değişmesi ile veya şelat oluşturucu ajanların değişimi ve metal ligandların seçimi gibi değişik yaklaşımlardan etkilenebilir. Mesela, insan büyüme hormonunun ayırımında, sorbent üzerindeki İDA, Cu(II) ligand yoğunluğunun düşürülmesi, daha yüksek protein saflığı ve artan bir ürün ile sonuçlanır (Liesiene vd., 1997). Bir metal şelat için proteinin görünen afinitesi koordinasyonda görev alan metal iyonlarına bağlıdır. İDA şelatlayıcı ajan kullanıldığında, alıkonan proteinlerin çoğunun afinitesi ve alıkonma süreleri genellikle  $Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) \geq Co(II)$  şeklindedir. Ekstra azot ihtiva eden amino asitler için bir önceliği olan güncel olarak çoğunlukla kullanılan bu metallerin aksine, Al(III), Ca(II), Fe(III), Yb(III) gibi güçlü Lewis asidi metal iyonları aspartat ve glutamik asit gibi oksijence zengin grupları veya fosfat gruplarını tercih ederler (Liesiene vd., 1997). Afinite kromatografisinde, geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında, İMAK pek çok avantaja sahiptir (Porath ve Olin, 1983; Sulkowski, 1985). Farklı metal iyonları, şelat oluşturucu ligand üzerine immobilize edilebilir ve daha güçlü şelat yapan başka bir ajan ile ortamdaki uzaklaştırılabilir. Metal bağlama özellik kaybını minimum düzeyde tutmak için, şelat oluşturucu jel sabitleştirilmelidir. Özel ayırma metotları, uygun metal seçimi ile çalışılabilir ve protein ile ligand arasında farklı adsorpsiyon özellikleri, şelat oluşturucu liganda farklı metal iyonlarının immobilize edilmesiyle başarılabılır. Çoğu durumda proteinler, İMAK kolonlarından desorbe edildikten sonra bile hala aktivitelerine sahiptirler.

Bir çözelti aynı zamanda, içinde metal iyonları olmayan bir İMAK kolonundan geçirildiğinde çözelti, içindeki metal iyonlarının uzaklaştırılmasıyla sterilize edilebilir. Bu basamak, bakterilerce ihtiyaç duyulan metal besinlerinin uzaklaştırılmasıyla bakteriyel kontaminasyon riskini önler (Porath ve Olin, 1983; Sulkowski, 1985).

İMAK çalışmalarının büyük bir çoğunluğu Porath vd. tarafından yayınlandı. Porath'ın çalışması, destek materyali olarak agaroz veya dekstran çapraz bağlı polimerik matrislerin kullanımı,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  immobilizasyon için kullanılan metal iyonlarının seçimi (Porath ve Olin, 1983; Sulkowski, 1985), şelat yapan ajanların seçimi ve İMAK adsorpsiyon/desorpsiyon kimyası gibi İMAK temelleri üzerine odaklanmıştır. Porath'ın, protein ayırmalarında İMAK üzerine çalışmaları, serum proteinlerinin saflaştırılması, metalloproteinlerin karakterizasyonu ve serbest formlarının hazırlanması, fosfoproteinlerin ayrılması, yüksek performans immobilize metal iyon afinite kromatografisi (HP-İMAK) ve bir protein molekülü üzerindeki histidin rezidülerinin topografyasındaki İMAK' nın bir prob olarak kullanılması gibi uygulamaları içermektedir.

İMAK uygulamalarının sunduğu avantajlar; diğer afinite sorbentlerine göre ligand kararlılığı, yüksek oranda protein yükleme kapasitesi, yıkama şartlarının uygunluğu, rejenerasyonu, düşük maliyetli olması, endüstriyel uygulamalara açık olması, geniş ölçekli saflaştırmalar için kullanılabilmesi olarak sıralanabilir (Çizelge 1.2) (Chaga, 2001; Comiskey vd., 1998).

**Çizelge 1.2.** Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması (Chaga, 2001).

Özellik	Kromatografik Teknikler			
	İMAK	Afinite	IEC	HIC
Kapasite	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek-Orta
Yeniden Kullanım	Yüksek	Orta	Yüksek	Orta
Yükleme	Yüksek-Orta	Orta	Orta	Orta
Desorpsiyon	Yüksek	Zor	Yüksek	Yüksek
Seçicilik	Yüksek	Yüksek	Düşük-Orta	Düşük-Orta
Maliyet	Düşük	Yüksek- Orta	Düşük	Düşük

## **1.5.2. İMAK' ın kimyasal prensipleri**

### **1.5.2.1. İMAK için kromatografik destekler (matriksler)**

Destek matriksinin seçimi afinite sistemlerindeki ilk dikkat edilecek noktadır. Matriks, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Matriks, hidrofilik ve nötral davranış, iyi bir kimyasal, mekanik, biyolojik kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilmeye izin vermelidir.

Afinite ortamındaki tutuklanmış ligand ile hedef molekül arasında spesifik etkileşim gerçekleşebilmelidir. Bir kromatografik destek iyi bir kolon dolgusu için aynı form büyüklük ve şekle sahip olmalı, yüksek kapasite için etkili yüzey alanı ve mekanik dayanıklılığı olmalıdır. Küçük partiküllü destekler, akış hızına karşı büyük bir direnç gösterirler ve kolon tıkanabilir. Geniş partiküller, akış rezistansını düşürürler fakat kolon etkinliğini (ayırma kapasitesini) azaltırlar.

Farklı formdaki partiküller, düzensiz bir dolgu oluşturabilirler ve bu da kanallaşmaya neden olabilir. Kolon dolgu maddelerinin bakterilere karşı göstereceği direnç de önemli bir özelliktir. Destek matriksi küresel, çubuk veya membran formunda hazırlanabilir. Kolon kromatografisinde kullanılan küçük küreler ve sıkıştırılmış yumuşak jeller, kolon içerisinde yüksek basınç ve akış hızının azalmasına neden olur. Membran tipi destek malzemeleri ile düşük basınç, yüksek akış hızı ve yüksek verimlilik gibi sonuçlar elde edilir. Bunların yanında kolay paketleme imkânı, büyük ölçüğe uygulanabilirliği, tıkanma sorunun olmaması gibi üstünlükler de sayılabilir. Bu yüzden membran yapıda hazırlanabilen kromatografi matriksi protein ve enzimlerin geri kazanılması, saflaştırılması, izolasyonu için büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde dikkat çekicidir.

Afinite matriksinin hazırlanması;

- i) membranların sentezlenmesi,
- ii) sentezlenen membranların aktivasyonu ve/veya
- iii) aktive edilen membrana ligandın bağlanması işlem basamaklarından oluşur.

### **1.5.2.2. İMAK'de şelat oluşturucu ligandlar**

Bir kromatografik teknik olarak İMAK'ın çalışma prensibi şelat oluşturucu bir liganda takılı olan metal iyonu ile bir proteinin dış yüzeyine yönlendirilmiş olan amino asitlerin spesifik bölgeleri arasında meydana gelen koordinasyon etkileşimlerine dayanır. Şelatlayıcı ajanlar olarak çok dişli ligandlar, ticari olarak bulunabilen ve bilimsel çalışmalarda en fazla kullanılan moleküllerdir. Dört farklı türden dişli ligand genel olarak kullanılmaktadır. Bunlardan iki dişli (8-hidroksi quinolin (8-HQ) vb.), üç dişli



(imminodiasetik asit (İDA)), dört dişli (nitrilotriasetik asit (NTA)), karboksimetil aspartic asit (CM-Asp vb.) ve beş dişli (*N,N,N'*-tris-karboksimetil etilen diimin (TED) vb.) yaygın olarak kullanılanlardır. Bu güne kadar pek çok şelat oluşturuvcu ligand sentezlenmiş ve başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Akgöl ve Denizli, 2004; Odabaşı vd., 2007) (Çizelge 1.3).

Çok dişlilerin moleküler yapı ve şelat oluşturma mekanizmasına göre metal iyonu ile güçlü bağ oluşturma sırası beş dişli>dört dişli>üç dişli>iki dişli olarak düzenlenebilir (Porath ve Olin, 1983). Bu bağlanma davranışı metal ile şelat oluşturuvcu ligand arasındaki sağlamlılığı artırır (metal iyon sızması önlenmiş olur). Fakat diğer yandan metal ile şelat oluşturuvcu ligand arasındaki etkileşim şiddeti arttıkça metal ile protein arasındaki etkileşim zayıflar (Porath ve Olin, 1983). Bundan dolayı biyomolekül adsorpsiyonu için kullanılacak dişli ligandlar için üç dişli> dört dişli> beş dişli gibi bir sıralama yapabiliriz (Porath ve Olin, 1983).

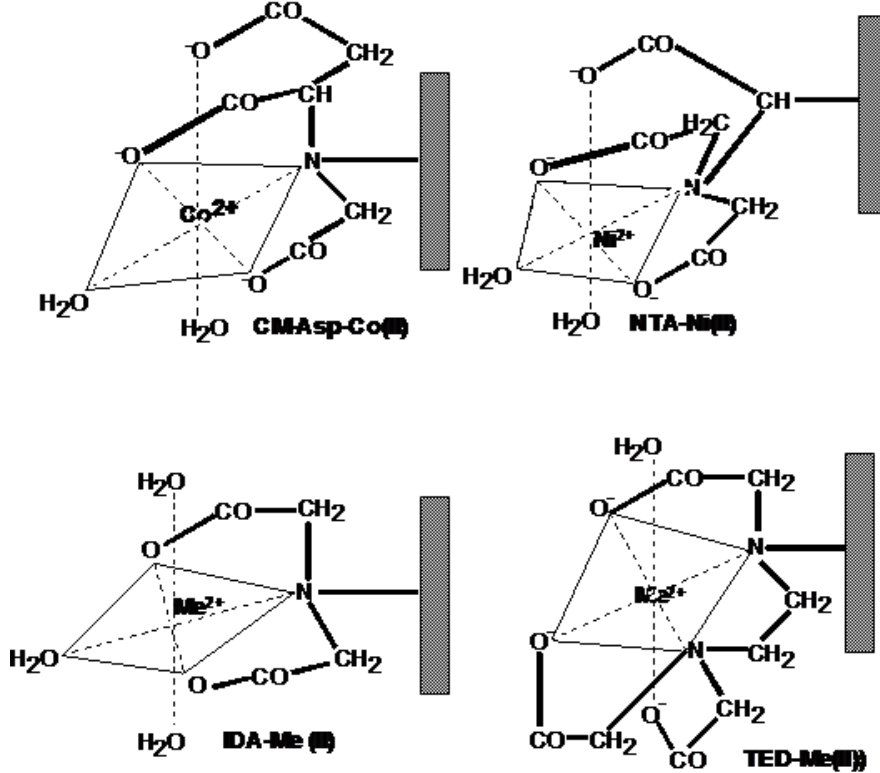
Sulu bir ortamda metal iyonları, su molekülleri tarafından çevrilerek çözünür. Metal iyonu bir Lewis asiti, su ise Lewis bazı gibi davranır. Su daha güçlü bir baz ile yer değiştirdiği zaman, bir koordinasyon kompleksi oluşur. Azotdaki elektronlardan dolayı amonyak gibi bir baz, bir metal kompleks ile sonuçlanan tek dişli bir ligand oluşturabilir.

**Çizelge 1.3.** İMAK’de immobilizasyon için şelat oluşturuca bazı bileşikler (Ceylan, 2011).

Şelatlayıcı Bileşik	Koordinasyon	Metal İyonu
Salisilaldehit	İki dişli	$\text{Cu}^{2+}$
8-Hidroksikinolin	İki dişli	$\text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$
N-Metakriloil (L) histidin metil ester (MAH)	İki dişli	$\text{Fe}^{3+}$
Dipikolamin (DPA)	Üç dişli	$\text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$
İminodiasetik asit (İDA)	Üç dişli	$\text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Ga}^{2+}$
<i>o</i> -Fosfoferin (im-OPS)	Üç dişli	$\text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$
Tris (2-aminoetil) amin (TREN)	Üç dişli	$\text{Cu}^{2+}$
1,4,7 Trisiklononan	Üç dişli	$\text{Cu}^{2+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}$
Nitrolotriasetik asit	Dört dişli	$\text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$
Karboksi metakrilat aspartik asit (CM-Asp)	Dört dişli	$\text{Ca}^{2+}, \text{Co}^{2+}$
N-Metakriloil (L) sistein metil ester		$\text{Fe}^{3+}$

Bir liganda metal iyonunun bağlanması, bir metal komplekse nazaran metal şelatla daha güçlüdür. Bir metal şelatın daha büyük olan dayanıklılığı, çok dişli ligandan halka oluşumu ile üretilen serbest enerjinin kaybı ile artar. Bu termodinamik dayanıklılık şelat etkisi olarak adlandırılır. Aynı tek dişli ligandlarla oluşan benzer metal komplekslere kıyasla, şelatın daha düşük serbest enerji kapasitesi,  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  için hem entalpi hem de entropideki değişimlerden artar. Beş veya altı üyeli küçük halka oluşumu için, uygun metal kompleksinden gelen metal şelat oluşumundan dolayı entropideki artma, daha düşük enerji kapasitesi için baskın bir şekilde yardım eder. Büyük halka oluşumu için entropideki artmadan gelen küçük yardım ile kompleks üzerindeki metal şelatın entalpisindeki artma, büyük itici güçtür. Entalpi değişimine neden olan kuvvetlerin bazıları orbital çakışması, ligand alan etkileri, kompleksteki ligandlar arasında statik ve elektrostatik itmeler ve şelatdaki halka oluşumundan ortaya çıkan kulomb etkileşimleridir. Halka oluşumu ile koordine olmuş metal iyonları ve ligandlardan

salınan çözücü moleküllerinin sayısı ve büyüklüğü ile kombinasyondaki şelat halkasının sayısı, dağılım ve büyüklüğü, şelat enerjisi için entropik katkıda bulunur. İMAK'da bugüne kadar en fazla kullanılan şelat oluşturucu ligandlar arasında İDA güncelliğini korumaktadır. Porath ve Olin, agaroz bazlı bir sabit faz üzerine tris (karboksi metil) etilen diamin (TED) gibi diğer bir şelatlayıcı da sentezlediler. Ramadan ve Porath,  $Fe^{3+}$ 'ü immobilize edebilen mono-, di-, tri- ve hegzahidroksamat gibi şelat oluşturucu ligandlar ile bağlanan agaroz tipini ve sentezlerini tanımlayan bir dizi çalışma yapmışlardır (Ramadan ve Porath, 1985). İMAK'da şelat oluşturucu ligandların bazıları Şekil 1.18'de gösterilmektedir. İMAK'da kullanılan etkili ligandlar olmasına rağmen (Şekil 1.14), İMAK uygulamaları için yeni ligandlar geliştirilebilir. Hancock ve Martel, çözeltideki metal iyonlarının seçici kompleksleşmesini sağlayacak ligand tasarımı için mantıklı bir yaklaşıma ihtiyaç duyulduğunu belirttiler (Martell ve Hancock, 1996). Seçicilik prensiplerinin anlaşılması, biyolojik kation taşınma sistemlerindeki metal iyon seçiciliğini anlamada önemli olabilir.  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ , ve  $K^+$  gibi geçiş metallerinden başka metal iyonlarını içeren İMAK'ın yayılması, İMAK uygulamalarına daha fazla özellik getirebilir.



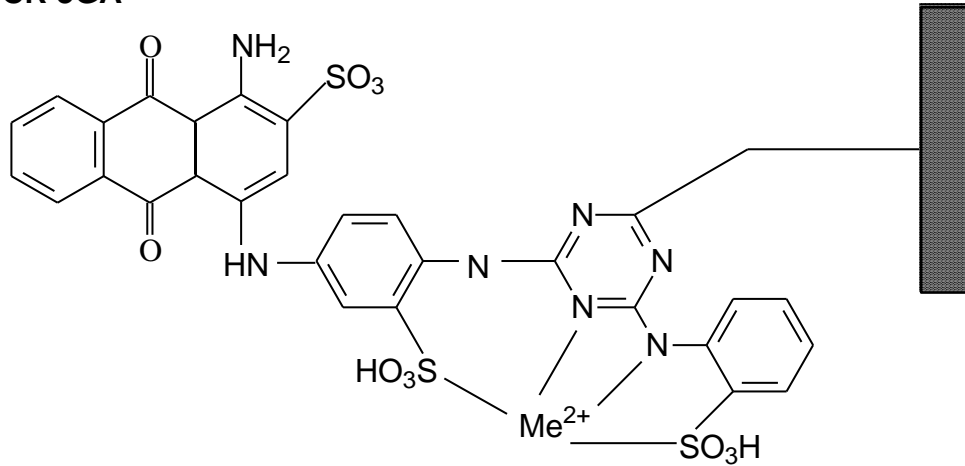
Şekil 1.18. İMAK' deki şelatlayıcı ligandlar (Ceylan 2011).

Cibacron Blue (CB), Cibacron Red (CR), Procion Brown (PB) gibi triazin boyalar İMAK'da uygulanabilen diğer şelat oluşturu ajanlardandır (Şekil 1.19) (Arıca vd., 1998; Denizli ve Pişkin, 2001). Fakat metal iyonlarını immobilize etmek için kullanılan boya şelatlayıcılar, dişli şelatlayıcı ligandlar kadar kararlı değildirler (Suen vd, 2003).

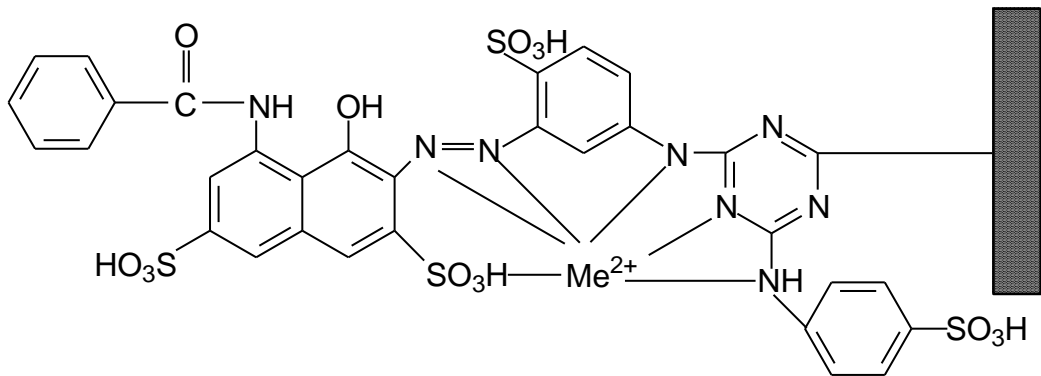
Triazin boyaların şelatör etkinlik yüzdesi (İmmobilize metal iyon kapasitesi/şelatör kapasitesi) düşüktür. Bununla birlikte CR 3BA kullanılması durumunda %100'den daha yüksek bir etkinlik yüzdesine ulaşılabilir; çünkü bir CR 3BA molekülü üzerinde metal iyonu bağlanması için iki aktif bölge vardır (Wu vd., 2003).

Dikkate alınması gereken diğer önemli bir nokta boyaların yalnız metal iyonu olmaksızın kendi başlarına da biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında biyoafinite ligand olarak kullanılmalarıdır. Böylesine yüksek bir etkinliğin sadece immobilize metalden kaynaklanmayacağı vurgulanmalıdır (Arıca vd., 1998; Denizli ve Pişkin, 2001).

### CR 3GA



### CR 3BA



**Şekil 1.19.** İMAK'de kullanılan bazı boyaların metal iyonları ile yaptıkları kompleksler (Ceylan, 2011).

### 1.5.2.3. Serbest çözeltilerde ve immobilize formdaki amino asit metal etkileşimleri

Amino asitler çözeltilerdeki pek çok metal iyonu ile dayanıklı sürekli şelat halkalarını oluştururlar (Hansen ve Linberg 1995). Amino asitlerin genel yapısı  $\alpha$  amino ve karboksil grubundan ibaret olan  $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COO}^-$  yapısında olup, her iki grup da şelat oluşumuna katılır.

Bazı amino asitler yan R zincirinde bulunan ve kompleks oluşturmada  $\alpha$ -amino ve karboksil gruplarıyla yarışan, etkili verici atomlara sahiptir. Amino asitlerin  $\text{NH}_2$  ve  $\text{COO}^-$  olmak üzere iki verici atom grubu vardır. Amino asitler hem metal-karboksilat tuzu hem de amin-metal gruplarıyla kompleks oluştururlar veya her ikisiyle birlikte beş üyeli halka oluştururlar.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  gibi iyonlar amino asitlerin imidazol, tiyol ve indol fonksiyonel gruplarını hedef alır. Bu sınır metal iyonları şelat halkası oluşturmayı tercih ederken,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  gibi daha kuvvetli metal iyonları karboksilat anyonlarıyla tuz oluştururlar. Eğer amino asitin R yan grubu arjinin ve glutamin gibi pozitif yüklü ise, oluşacak kompleks, pozitif yüklü metal ile itici etkileşimden dolayı daha az dayanıklı olur. Eğer yan grup aspartat ve glutamat gibi negatif yüklü olursa, ekstra yük, metal ile güçlü dayanıklı bir kompleks vermek üzere dimerizasyon yapar.

Histidin ve sistein, reaktif yan gruplara sahiptirler ve güçlü kompleks ajanları oluştururlar. Histidin, 5, 6 ve 7 üyeli halkaları da kapsayan dört farklı yolla kompleks oluşturabilir. Histidin, karboksilat ve  $\alpha$ -amino gruplarını içine alan 5 üyeli halka,  $\alpha$ -amino ve imidazol gruplarını içine alan 6 üyeli halka veya karboksilat ve imidazol grupları 7 üyeli bir halka aracılığıyla bir metal iyonu ile birleşebilir ayrıca, bir metal iyonu ile histidin bütünü verici gruplarının birleştiği bir yapıyı da oluşturabilirler. Oluşan yapı pH'nın bir fonksiyonudur (Hansen ve Linberg 1995). Sistein, yan grubundaki bir sülfür atomundan dolayı diğer, amino asitlerden daha kuvvetli bir şekilde asitlerle birleşir. Bakır iyonu ile oluşan bir redoks tepkimesi, Eşitlik 1.1'deki gibi kolaylıkla sisteini sistine yükseltir.



İMAK kolonları üzerinde amino asit adsorpsiyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Nötral pH'da yüklenen  $\text{Ni}^{2+}$ -İDA-Sephadex G-250 kolonlarında nötral amino asitlerden olan L-histidin ve L-triptofanın tutunduğu gözlenir. Ayrıca L-aspartat hiç tutunmazken, L-sistein güçlü bir şekilde tutunur. Aynı zamanda L-arjinin ve L-lisin bu kolon dolgusu üzerinde bağıl olarak yüksek bir tutunma gösterir. İyonik şiddet ve NaCl derişimindeki artış, amino asitlerin tutunmasını artırır.  $\alpha$ -amino asitlerin tutunma davranışı silika bazlı jele bağlanmış metal yüklü İDA ve çıplak İDA ile karşılaştırıldığında,  $\text{Cu}^{2+}$ -İDA-silikanın bütün  $\alpha$ -amino asitleri tuttuğunu ve tutunmanın pH 6'da daha yüksek olduğunu

bulunmuş ve  $\text{Cu}^{2+}$ -İDA kolonlarındaki  $\alpha$ -amino asitlerin tutunma süreleri ve serbest çözeltideki  $\text{Cu}^{2+}$  ile amino asitten elde edilen komplekslerin denge sabitleri karşılaştırılmıştır. Serbest çözeltide en güçlü kompleksleri oluşturan,  $\alpha$ -amino asitlerden olan histidin ve sistein,  $\text{Cu}^{2+}$ -İDA kolonlarında daha güçlü bir şekilde tutunmaktadır.

#### **1.5.2.4. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki protein-metal etkileşimleri**

Serbest çözeltideki protein-metal iyonu etkileşimlerinde göz önünde bulundurulacak olan birkaç faktör vardır. Karboksil, imidazol ve sülfhidril gibi yan zincir grupları, terminal amino ve karboksil gruplarına metal iyonu bağlamada daha etkindir. Ligand grupları üzerindeki yükler, metal iyonu ile bağlanma afinitesine etki eder. Metal iyonları için bağlanma sabitleri pH'nın düşmesiyle azalır, çünkü:  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}^-$  ve  $-\text{COO}^-$  gibi ligandlara bağlanmak için protonlar, metal iyonlarıyla yarışmaya başlarlar. Protonlanmış amino grupları üzerindeki pozitif yük, pozitif yüklü metal iyonlarını uzaklaştırır, ayrıca karboksilat ve sülfür gruplarının protonlanması, metal iyonlarına olan çekici gücü yok eder. Çözeltideki doğal bir proteinin üçüncül yapısı, protein üzerindeki fonksiyonel ligandların bir metal iyonuna yaklaşmasını engeller. Proteinler pek çok ligand gruplarına sahip olmasına rağmen, ancak bir veya iki metal iyonu onlara bağlanabilir. Bazen bir metal iyonu sadece bir grup tarafından tutulabilir. Belirli proteinlerde aktif merkez olarak isimlendirilen bazı ligand grupları, bir metal iyonu ile yapılan şelat oluşturmada düzenleyici rol oynar. Diğer proteinlerde ligand vericiler, o kadar iyi düzenlenmeyebilir ve metal iyonu iki farklı grup arasında tutunabilir. Bir metal iyonuna elektronlarını verebilen herhangi bir grup, bunu bir proteine de yapabilir; bundan dolayı, metal iyonlarıyla proteinler arasındaki yarışma çok önemlidir. Sonuç olarak, immobilize bir metale protein bağlanması pH ve iyonik şiddete bağlıdır.

İMAK kolonlarına protein bağlanması, değişik tuz derişimlerinde  $\text{Ni}^{2+}$  yüklü kolonlar kullanılmasıyla nitel olarak da çalışılmış ve peptid bağlanmasının pH yükselmesiyle arttığı bulunmuştur (Hemdan ve Porath, 1985).

Metalin aminoasite bağlanma gücü, ligand ile metalin orbital çakışmasına bağlıdır. Metal iyonu ile protein arasında koordinatif kovalent oluşturarak meydana gelen etkileşimleri, Porath ve Belew, üç grupta karakterize etmişlerdir; bunlar: Yük kontrollü iyonik adsorpsiyon (iyon paylaşma), koordine bağ oluşumu (elektronca zengin ligand ile metalin koordinasyonu) ve kovalent bağ oluşumudur (iki sülfhidril grubunun bağlanması).

### 1.5.3. İMAK'de peptid ve proteinlerin adsorpsiyon-desorpsiyon mekanizmaları

Afinite kromatografisinde, proteinlerin ayrılması nicel olarak, proteinlerin sıvı afinite ekstraksiyonuna benzer şekilde, Eşitlik 1.2'deki gibi çeşitli katkıların toplamı olarak tanımlanabilir;

$$\ln(K) = \ln(K_{\text{elektrostatik}}) + \ln(K_{\text{hidrofilik}}) + \ln(K_{\text{konformasyon}}) + \ln(K_{\text{ligand}}) \quad (1.2)$$

Burada indisler, elektrostatik, hidrofilik/hidrofobik yüzey etkileşimleri ve protein ligand etkileşimleriyle oluşan konformasyon değişimlerini gösterir.

İMAK' de proteinlerin metal iyonlarına bağlanmasının elektronca zengin ligandların, metal komplekslerindeki, su gibi zayıf bağlı ligandlarla yer değiştirmesiyle gerçekleştiğine inanılmaktadır. Porath vd. , İMAK' de alikonma davranışının açıkta olan histidin, triptofan ve sistein merkezlerinin yüzey yoğunluğuyla kontrol edildiğini öne sürmüşlerdir (Porath ve Olin, 1983). Spesifik metal iyon-protein koordinasyon kompleksleri oluşumunda, elektrostatik, hidrofobik ve yük-transfer etkilerinin yanında, metal-iyon protein etkileşimleri de etkin olabilir. Proteinlerin bağlanması, bu elektronca zengin amino asitlerin, metal komplekslerindeki zayıf koordine olmuş su ile yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Metal, bu amino asitlere elektron verebilir veya bunlardan elektron alabilir. Bir protein, sabit bir matriks ile şelat oluşturmuş bir metalle etkileştirildiğinde, koordinasyon bağları ve çok noktalı bağlanma yapabilir. Bu bağlanma, yüksek tuz derişimlerinde seçimlidir. Çünkü yüksek iyonik güç, elektrostatik etkileşimlerin olasılığını azaltır (Simith vd., 1988).

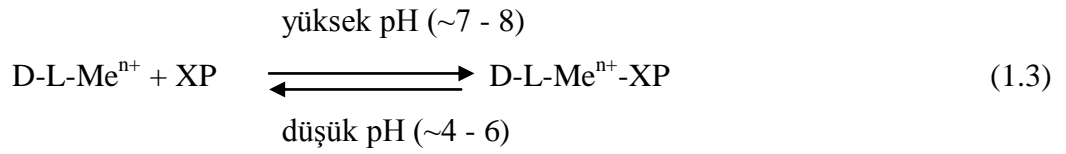
Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri, protonlama, iyonik şiddet değişimi, ligand değişimi veya şelat oluşumunu engelleyerek gerçekleştirilebilir. Protonlama, desorpsiyon için yaygın bir prosedürdür. Protein yüzeyindeki elektron verici grubun protonlanması, koordinasyonu tersine çevirerek proteinin ayrılmasını sağlar.

Bakır, çinko, kobalt veya nikel gibi sınır Lewis asitleri kullanıldığında, adsorpsiyon, yüksek tuz derişiminde gerçekleşir. Adsorpsiyon kapasitesi ve seçimliliği tampondaki tuz derişimi arttıkça artar. Tuz derişimini azaltmak, bazı proteinler için desorpsiyona neden olabilir (Ljungquist vd., 1989; Grishammer ve Tucker, 1997). Elektrolitlerin tutunma üzerindeki etkisi, metal iyonlarının solvate olmuş su moleküllerine ilgisiyle bağlantılıdır. Metal iyonlarıyla su molekülleri arasındaki çekim gücünün, tuz tarafından zayıflatılması, adsorpsiyon prosesini kolaylaştırır. İyonik şiddet arttıkça adsorpsiyon seçiciliği arttığına göre, proteinlerin kısmi ve seçimli desorpsiyonu, elüentteki tuz derişimini azaltarak gerçekleştirilebilmelidir. Bununla birlikte çeşitli proteinlerin adsorpsiyonu ve desorpsiyonu  $\text{Fe}^{3+}$  gibi kuvvetli bir Lewis asidinin, bir İDA kolonuna

immobilizasyonu ve NaCl derişiminin 0' dan 1 M'a kadar arttırılmasıyla gerçekleştirilir (Grisshammer ve Tucker, 1997).

### 1.6.3.1 pH etkisi

Proteinlerin İMAK jeline adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupların, protonlarını kısmen kaybettikleri bir pH' da gerçekleşir. Protein adsorpsiyonu genellikle zayıf bazik bir pH' da yapılır. Spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltmak için, pH tamponuna bir tuz katılır. Fosfat ve asetat tamponları yaygın olarak kullanılır. "Tepkime" Eşitlik 1.3'deki gibi gösterilebilir:



Burada D desteği, L ligandı,  $\text{Me}^{n+}$  immobilize metal iyonu ve X, P proteininin aktif yan gurubunu gösterir. pH, alıkonma ve desorpsiyon proseslerinde karışık bir rol oynar, çünkü tampon bileşenlerinin nükleofilik davranışını, çözücülerin elektron alıcı-verici özelliklerini ve metallerin kararlılığını etkiler. Histidin veya sistein seçiciliğinin pH 6 - 8 aralığında yüksek olmasından dolayı, bu grupları taşıyan proteinlerin adsorpsiyonu bu pH aralığında gerçekleşir. Bazik bir pH değerinde, amino gruplarıyla koordinasyon gerçekleşir; böylece adsorpsiyon daha etkin fakat daha az seçimli olur (Wong vd., 1991).

Sulkowski, 20 mM sodyum fosfat, 1,0 M sodyum klorür içinde, İDA- $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose matriksi üzerinde sığır serum albumin (BSA) adsorpsiyonunu çeşitli pH' larda çalışmıştır (Sulkowski vd., 1996). BSA alıkonması pH 7,0'de en yüksek iken, pH 6,0'da ihmal edilebilir düzeydedir ki bu, erken desorpsiyona neden olabilir. pH 7,0'den pH 6,0'ya doğru olan adsorbsiyondaki azalma pH 6,5'ta ani bir geçiş göstermiştir. BSA'nın İDA- $\text{Ni}^{2+}$ -Sefaroz'daki bu davranışı,  $\text{pK}_a$  değeri 6,5 olan histidinin etkisini göstermiştir.

### 1.6.3.2. Tuz etkisi

Proteinlerin yüksek pH (7 veya 8) ve yüksek tuz derişiminde koordine veya kovalent bağlanmaya dayalı adsorpsiyonunun karakteristikleri İMAK' yi iyon değişim kromatografisinden farklı kılar. İMAK bazı yönlerden hidrofobik etkileşim kromatografisine benzer, çünkü: Sınır metalleriyle protein adsorpsiyonu, ortama tuz katılmasıyla artar.





### 1.6.3.3. Yarışmalı ajanlar

Seçici desorpsiyon yapmanın diğer yaygın bir metodu, protein üzerindeki adsorpsiyon bölgelerine, immobilize edilmiş metalden daha yüksek afiniteye sahip bazı maddeleri, yürütücü faza ilave etmek veya adsorpsiyon bölgelerine proteinler ile yarışmalı bir şekilde bağlanan maddeler kullanmaktır. Nötral pH ve düşük derişimlerde (50 mM) imidozol veya histidin içeren seçici gradientin kullanılması, bağlanmış proteinleri yerinden çıkarmak için etkin bir metottur.

İmmobilize proteinlerin desorpsiyonundaki son çare, immobilize şelat oluşturmuş metal komplekslerini düşük pH larda bozmak yada histidin veya EDTA gibi güçlü bir şelatlayıcı ajan eklemektir.

Şelatlar oluşturmuş metalin ortama salınması proteinleri desorbe eder, fakat kolon subsratının etkinliğini tahrip eder ve eluentdeki proteini denature edebilir.

### 1.6.4. İMAK'de proteinlerin alıkonma davranışları

Proteinlerin tutunma davranışları eluentin değişen pH değerine ve sabit fazdaki metallerin şelatlaşmasına bağlı olarak değişmektedir (Hemdan vd., 1989; El-Rassi vd., 1986). İMAK deki tutunma prosesinin fizikokimyasal özellikleri tam olarak anlaşılması değildir. İmmobilize metal iyonuna protein bağlanmasının, elektron verici atomları vasıtası ile bu metallere koordine olabilen triptofan, sistein ve histidin yan zincirlerinden dolayı arttığına dair güçlü kanıtlar vardır. İmmobilize bir metal ile bir protein içindeki amino asit rezidüsü arasındaki etkileşim, sadece bu amino asitin durgun fazdaki metal şelatın fonksiyonel gruplarına ulaşabilmesi ile mümkündür. Bu konu, değişik histidin, triptofan ve sistein içeriğine sahip birkaç proteinin alıkonma davranışlarını inceleyen Sulkowski tarafından tartışılmıştır.

Bir dizi homolog proteinin gözlenen alıkonma davranışlarının, yüzey ile temasta bulunan histidin sayısının artması ile arttığı belirlenmiştir. Bir proteindeki histidin merkezlerinin sayısı ile proteinlerin kolon alıkonma davranışları tahmin edilebilir. Yüzeyde bulunan bir veya daha fazla sayıdaki histidin merkezleri genellikle alıkonmanın artmasına neden olduğu halde, protein yüzeyindeki histidin merkezlerinin yetersizliği genellikle alıkonmanın yetersizliği ile ilişkilendirilir. Sulkowski İMAK ile özel bir proteini ayırmak istendiğinde hangi metallerin kullanılacağını da tanımlamıştır. Kabaca, bir protein  $Ni^{2+}$ -İDA kolonunda tutunması için en az iki histidin merkezine ihtiyaç duyar. Oysa  $Cu^{2+}$  şelatlanmış metal kullanıldığında sadece bir merkezin olması yeterlidir.

Protein veya peptidin amino asit kompozisyonu bilindiğinde, hangi çeşit metal iyonlarının İMAK'ta alıkonmaya neden olacağı çizelge 1.4'de ki kurallar kullanılarak bulunabilir. İMAK'ta protein adsorpsiyonunda yer alan başlıca amino asitlerin alıkonma kuvveti çizelge 1.5'de gösterilmiştir (Ueda vd., 2003).

**Çizelge 1.4.** Protein yüzeyindeki uygun histidin ve triptofan uzantılarına dayanan protein metal afinite tahminler (Ceylan, 2011).

<b>Protein yüzeyindeki Histidin ve Triptofan uzantıları</b>	<b>Adsorbsiyona Neden Olan Metal İyonu</b>
His/Trp yoksa	.....
Bir His	$\text{Cu}^{2+}$
Birden fazla His	$\text{Cu}^{2+}$ (kuvvetli ads.), $\text{Ni}^{2+}$
Bir küme His	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$
Birkaç Trp varsa, His yoksa	$\text{Cu}^{2+}$

**Çizelge 1.5.** Protein alıkonmasında yer alan amino asitlerin bireysel dağılımı.

<b>Fonksiyonel Grup</b>	<b>Alıkonma Kuvveti</b>
Histidin	++++
Sistein <sup>a</sup>	++++
Aspartik asit, Glutamik asit	----
Lizin, Arjinin	+
Triptofan, trozin, fenilalanin	+
N-Terminal	+

<sup>a</sup>sisteinn indirgenmiş formda (Ceylan, 2011).

Hemdan vd., İMAK in bir protein molekülündeki histidin kalıntısının topografyası için bir prob olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Tiredoksin, ubiquitin, kalmodulin, lizozim, sitokrom c ve miyogloblin gibi model proteinlerin immobilize geçiş metal matriksleri ile etkileşiminin değerlendirilmesi, proteinlerdeki histidin merkezlerinin yoğunluğunun yüzey lokalizasyonunun ve çokluluğunun alıkonmaya nasıl etki ettiği konusunda bilgi sağlamaktadır.

Bir proteindeki tüm histidin merkezleri aynı değildir. Tek bir histidin kalıntısı içeren model proteinlerin afinitelerini içeren çalışmalar, İMAK adsorbentlerine ulaşabilirliğin alıkonma için önemli bir kriter olduğunu göstermiştir.  $\text{Cu}^{2+}$ -İDA sefaroz kolonunda desorpsiyon sıralaması, tek histidin taşıyan protein serileri için, tiredoksin (E.Coli), sitokrom c (at), kalmodulin (sığır), ubiquitin (sığır) ve lizozim (tavuk) şeklindedir.

Lizozim gibi daha güçlü bağlı proteinlerin desorpsiyonu için, 7,0 den 6,0 ve 5,0 e doğru azalan bir pH gradienti gerekir. İMAK kolonunun lizozime daha güçlü afinite göstermesi yapıdaki His-15 ilaveten 62. ve 123'üncü pozisyonlarda bulunan triptofanın varlığı ile açıklanır. Diğer proteinler, bağlanmalarına katkıda bulunan, dış ortamla etkileşebilen histidin rezidülerine sahiptir. Bu proteinlerdeki tutunma sırası ise histidin gruplarının pK değerlerindeki farklara dayandırılmaktadır. Histidin gruplarının bağlanma potansiyeli, sitokrom c ( His-33, pK 6,5), kalmodolin (His-107, pK 6,1), ve lizozim (His-15, pK 5,2) sıralamasında belirtildiği gibi pK değerinin azalması ile artar. Bu model, histidin gruplarının protonlanmamış  $\text{Me}^{\text{n}+}$ -İDA ile, daha güçlü koordine olduğu teorisinden hareketle uygulanır. Bir protein molekülü içinde uygun bir şekilde konumlanmış bir histidin grubunun alıkonmada daha başarılı olduğu görünür.

Simith vd., his-trp, his-tyr- $\text{NH}_2$  ve his-gly-his dizinlerine sahip olan peptitlerin  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  immobilize İDA-sefadex kolonlar için yüksek afiniteye sahip olduklarını göstermişlerdir. His-trp dizinlerden birini içeren şelatlı peptit ve genetik olarak düzenlenmiş proinsülin,  $\text{Ni}^{2+}$ -İDA sefadex kolonunda önemli derecede tutunma göstermektedir (Ljungquist vd., 1989; Grisshammer ve Tucker, 1997). Hochuli vd., (1988), fare dihidrofolat redüktaz ile muamele edilmiş polihistidin ile şelat oluşturucu bir peptidin,  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA sefaroz üzerinde alıkonduğunu gösterdiler.

#### **1.6.5. Protein saflaştırılmasında İMAK uygulamaları**

İMAK genetik olarak düzenlenmiş proteinlerin saflaştırılmasında etkindir. Rekombinant peptit zinciri sonunda bulunacak olan ve bağlanma için immobilize metal iyonu tercih edecek olan spesifik metal şelatlı peptit kabulü temeline dayanan şelatlı peptid-immobilize metal iyonu afinite kromatografisi geliştirilmiştir (ŞP-İMAK). Rekombinant peptitlerin  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  yüklü İDA-İMAK kolonlarına karşı yüksek afinite gösterdiklerini saptanmıştır. Şelat oluşturucu peptit, ilgili proteini şelat oluşturucu peptidi içeren, birbirinin içine dağılmış bir proteinin,  $\text{NH}_2$  terminal ucuna klonlanabilir. Daha sonra şelat oluşturucu peptit, ayırma teknikleri kullanılarak ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu çalışmanın önemi, tercih edilen bağlanma bölgesinin,

saflaştırmayı kolaylaştırmak için birbirinin içinde bulunan bir protein ile birleşebilirliğini gösterebilmektir (Ceylan, 2011).

Bir peptit olan insülinin ön maddesi, bu teknik kullanılarak saflaştırılmaktadır. Bu ön madde, diğer histidin rezidülerini de içerir fakat, onlar peptitin primer yapısı içindeki konumları dolayısıyla, immobilize metale bağlanmada küçük bir paya sahiptirler (Smith vd., 1998).

Hochuli vd., (1988), polihistidin şelatlı peptit ve fare dihidrofolat redüktaz dan oluşan bir protein karışımı ve  $Ni^{2+}$ -NTA adsorbent ile benzer yaklaşımı araştırdılar. Polihistidin peptidi, amino veya karboksil terminaline bağlı üç ile altı arasında ki histidin kalıntılarından oluşmaktadır. Onlar bu yaklaşım ile,  $Ni^{2+}$ -NTA dolgulu kolonunda, birbiri içinde bulunan proteinler için etkili bir saflaştırma elde etmişlerdir. Bu sonuçlar, karboksil ucuna bağlı iki histidin ve karboksil veya amino ucuna bağlı altı histidinin, tercihi şelat oluşturucu peptitler olduğunu göstermektedir. Karboksipeptidaz A, protein uçlarından şelat oluşturucu peptidi uzaklaştırmak için kullanılıyordu.

Al-Mashiki ve Nakai, (1988) kan serumundan ve kan plazmasından proteinleri ayırmak için  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  yüklü İDA-BGE sefaroze 613/sefakril S-300 kolonlarını kullanmışlardır. Farklı metalleri taşıyan dolgular, immunoglobulin ve transferin saflaştırılmasında karşılaştırılmışlardır. Ayrılan proteinlerin immunokimyasal analizleri, biyolojik aktivitelerinde kayıp olmadığını göstermiştir.  $Cu^{2+}$  yüklü kolonlar, en yüksek IgG aktivitesi (>%95) veren ve en ılımlı koşullarda kullanılan kolonlardır.

Histidin aminoasiti modifiye proteinler ile, metal iyonu arasındaki bağlanmanın azalması, İMAK' daki protein bağlanmasında histidinin önemli rolünü gösteriyor. Bu sonuçlar, protein ile metal arasındaki etkileşimde, histidinin baskın bir rol oynadığına dair Porath' ın yaptığı ilk gözlemleri desteklemektedir (Ceylan, 2011).

Al-Mashiki vd., (1988), peynir suyundan gelen immunoglobulin ve laktoferrinin ayrılmasında benzer şekilde modifiye edilmiş histidin guruplarını İMAK' a uyguladılar. Histidinin, immobilize metal için önemli bir bağlanma bölgesi olarak bulunmasına rağmen, DEP-Ig' nin küçük bir miktarının kolona adsorbe olduğu bulundu. Bu sonuç, immobilize metal ile diğer aminoasitlerin (büyük olasılıkla sistein) etkileşimi ileri sürmektedir.

Zawitowski vd., filizlenmiş buğdaydan  $\alpha$ -amilazları saflaştırmak için  $Cu^{2+}$ -İDA Sepharose 6B kolonunu kullandılar. Allen vd., kontrollü gözenekli cam (KGC) kromatografisi ile kısmi bir saflaştırma takip ederek, çinko şelat afinitesi ile sığır fibroblast (kök hücre) interferonunun (SF-IFN) saflaştırmayı denediler. İnsan fibroblast

interferonlarının,  $Zn^{2+}$ -yükü İMAK kolonlarıyla uygun ve nitel olarak uzaklaştırılması işlemi başarılmasına rağmen,  $Zn^{2+}$ -İDA yükü İMAK kolonlarıyla daha fazla saflaştırma yapılamamıştır. SI-IFN'nin birincil yapısında histidin rezidüleri bulunmasına rağmen, saflaştırma işleminde İMAK'ın başarısız olması konusunda olası nedenler vardır. Bunlardan biri: İmmobilize  $Zn^{2+}$  ile etkileşen histidin rezidülerinin yeterince açıkta bulunmamasıdır. İnsan fibroblast interferon ve sığır fibroblast interferonların karşılaştırılması, her bir protein yapısında farklı histidin sayı ve dağılımını göstermektedir. Sulkowski, interferonların evrimsel örneklerinin, metal bağlamaları arasındaki farkları İMAK'la açıklamıştır (Ceylan, 2011).

Wunderwald vd., aktif endoproteinazları, biyolojik sıvılardan uzaklaştırmak için,  $\alpha_2$ -makroglobulinin,  $Zn^{2+}$ -bis-karboksimetil-amino sefaroza immobilize edilmesini içeren yeni bir yöntem tanımlamışlardır (1982). El-Rassi vd., concanavalin A'yı (Con-A)  $Cu^{2+}$ -İDA ile silika destek üzerine immobilize etmişlerdir (1986). Con A'nın İMAK kolonuna kuvvetli bir şekilde bağlandığı ve ancak pH'yı düşürerek veya nötral pH'da EDTA eklenmesiyle uzaklaştırılabildiği gözlenmiştir. Con A- $Cu^{2+}$ -İDA kolonları, çeşitli proteinlerin saflaştırılması ve ayrılması için, ayrıca çeşitli glikoproteinlerin ve karbonatların uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır. İMAK'de halen, cevap bekleyen can alıcı sorular vardır. Belew vd., Hutchens, Yip, Porath ve Wang tarafından çalışılan bir konu, proteinlerin küçük veya büyük ölçekte saflaştırılmasında hayati olabilecek kromatografik parametrelerin, nicel olarak saptanması üzerinedir. Nicel veriler, küçük ölçek ayırma sistemlerinin dizaynında önemlidir (Ceylan, 2011).

Belew vd., beş model proteinin, Chelating Sepharose Fast Flow ve TSK-gel Chelate 5PW sorbentleri üzerindeki etkileşimlerini incelemişler, adsorpsiyon izotermeleri kullanarak, bu sorbentler için, sorbentlerin afinite sabitlerini ve kapasitelerini saptamışlardır. Sorbentlerin, protein için afinitesi arttıkça, adsorpsiyon kapasitelerinin düştüğünü gözlediler. Bu olay, proteinlerin adsorpsiyon yüzeyine çok noktadan bağlanması ve adsorpsiyon sonucu proteinlerin konformasyonunda meydana gelen değişimlerden kaynaklanıyor olabilir (Ceylan, 2011).

İMAK adsorbentlerinin protein adsorplama kapasiteleri genellikle, küçük iyon adsorplama kapasitelerinden oldukça düşüktür. Bu durumun, adsorpsiyon merkezleri ile, proteinler arasındaki sterik etkilerden kaynaklandığı görülmektedir. Hutchens vd., sonuç olarak bazı ligandların, proteinlerin büyüklüğünden dolayı kullanılamaz

olabileceğini göstermektedir. Wang, en yüksek yükleme oranında, her bir lizozim, miyoglobin ve kimotripsinojen moleküllerinin sırasıyla 5, 9 ve 11 merkezini kapladığını bulmuştur. İMAK'ın diğer bazı uygulamaları ise, laboratuvar düzeyinde özellikle bilimsel veya araştırma çalışmaları için gün geçtikçe daha popüler olmakta. Piyasada histidin kodlayan baz dizilimleri ihtiva eden ticari klonlama vektörleri elde edilebildiği gibi, histidin işaretli proteinlerin spesifik belirlenmesi için antitadiler de elde edilebilmektedir (Lindner vd., 1997).

İMAK, Ni-NTA şelat reçinesi ile seçici adsorpsiyona aracılık eden 6 tane ardarda gelen 6-histaminil purinli bir afinite etiketini kullanarak DNA gibi protein içermeyen moleküllerin de saflaştırılmasında kullanılabilir. Bazlar üzerindeki girişim yapabilen azotlardan dolayı RNA ve oligonükleotidler, İMAK matrisine sıkıca bağlanırken, doğal DNA, İMAK matrisine zayıfça bağlanır (Murphy vd., 2000).

İMAK'ın fosfoproteinlerin tanımlanması için, fosfopeptitlerin metal afinitesine dayanan spesifik metod geliştirilmiş ve Fe(III)-İMAK kısmen, fosforlanmış protein ve peptitlerin değiştirilmesi ve seçici olarak saflaştırılmasında kullanılmıştır (Ceylan, 2011).

#### **1.6.6. İMAK'ın bazı avantajları**

İMAK, aşağıdaki bazı önemli özelliklere sahiptir (Ueda vd., 2003):

1. İMAK tek basamaklı saflaştırma sağlar.
2. Diğer afinite kromatografik tekniklere kıyasla protein doldurma kapasitesi oldukça yüksektir (0,1 - 10 µM/mL jel).
3. EDTA veya EDTA gibi kuvvetli şelatlayıcı ajanlarla, metal iyonları reçineden kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Böylece, aynı şelatlayıcı reçineyi kullanarak, ilgili proteinin ayrılmasında en iyi ligandı saptamak için farklı metal iyonları test edilebilir.
4. İMAK up-scaling oldukça kolaydır ve endüstriyel uygulamada tekrar üretilebilir.
5. İMAK, seyreltik protein çözeltilerinin deriştirilmesinde kullanılır.
6. İMAK, karışık bileşenler veya yüksek iyonik kuvvet içeren birçok sayıda tampona uygundur.
7. İMAK, genelde protein yapısını tersi yönde etkilemez. Birkaç durumda metalloenzimlerin kendi asıl metal iyon sıyrmasına sahip olduğu rapor edilmiştir. Cu(II)-İDA kolonunda İMAK'ta proteinin zarara uğradığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir, fakat bu zarar; Cu(II) tarafından katalizlenen oksidatif proteolizin sebep olduğu indirgeyici ajanlar tarafından başlatılır.

8. Yüklü olmayan kolon boyunca çözeltiler geçici olarak sterile edilir, bakteriyel gelişmeye hazır bütün metal iyonları şelatlamayla uzaklaştırılır.
9. Bir İMAK reçinesi, kromatografik özelliğini kaybetmeden birkaç yüz kere rejenere edilebilir. İMAK jelleri pH 4'ün altında kullanılmayacak şekilde oldukça kuvvetlidir.

### **1.6.7. Denatürasyon ve renatürasyon durumunda İMAK kullanımı**

Bugün pek çok rekombinant proteinler, E. Coli de genetik olarak üretilen heterolog genlerin hücre içi ekspresyonu ile üretilir. Hücre içinde toplanan rekombinant proteinler sık sık hatalı katlanmış proteinlerin çözünmez agregatları formunda depolanırlar. Saf, biyolojik olarak aktif proteinlerin üretimi, klasik olarak diyaliz veya dilüsyon gibi küçük etkinliği olan teknikleri birleştiren denatürasyon ve renatürasyon işlemlerini içermektedir. İMAK guanidin-HCl veya denature edici üre konsantrasyonları varlığında histidin işaretli proteinleri etkili olarak ayırabilme avantajına sahiptir. İlâveten ardı ardına gelen histidinler ile afinite oluşturma, tek İMAK basamağında etkin bir saflaştırma ve renatürasyonu mümkün kılar (Ceylan, 2011).

Gata-1 protein (Apezteguia, 1994), Mycobacterium tuberculosis antijenleri (Collangeli, 1998) ve iki farklı membran proteini denature edici şartlar altında saflaştırılan histidin işaretli proteinlere örneklerdir. Bu proteinler halen katı desteğe bağlıyken katropik ajan konsantrasyonu düşürülmesiyle, biyolojik olarak aktif formu olan renature formlarında İMAK kolonlarından elue edilmiştir.

### **1.6.8. İMAK' ın bazı dezavantajları**

#### **1.6.8.1. Kolon içinde olması muhtemel redoks tepkimeleri**

Özellikle His, Lys, Cys, Pro, Arg ve Met gibi amino asitler, çeşitli proteinlere zarar verebilen yüksek oranda reaktif radikal moleküller üreten metal-katalizli oksidasyon tepkimelerine karşı hassastırlar. Dikkat edilmelidir ki, Cu(II) iyonları gibi metal şelatlar, proteinlerin belirli bölgelerinin ayrılması için kullanılabilir. Proteinlerin temel yapılarının bozulması ve amino asit yan zincirlerinin tahribi çok da sürpriz değildir ve kromatografi süresince provoke edilir. Böyle bir durumda, Zn(II) gibi daha az aktif bir metal iyonunun, Cu(II) gibi yüksek redoks-aktif bir iyon ile yer değiştirmesi protein tahribatını önleyebilir veya en azından minimize edebilir. Rutin İMAK ayırmalarının çoğu, örnek veya tamponda çözünen oksijenden dolayı aerobik ortamda yani hafifçe oksidatif şartlarda yürütülür. İMAK kolonunda metal katalizli tepkimeler veya reaktif oksijen türevinin proteinler üzerindeki potansiyel tahribatı bugüne kadar yeterince



çalışılmamıştır. Hidrojen peroksit veya askorbat veya özellikle bu kombinasyonun ikisi birlikte desorpsiyon tamponuna ilave edildiği zaman, Cu(II) –İDA kolonlarında protein aktivitesinde önemli bir kayıp gözlenir (Krishnamurthy vd., 1995). Bu olay, Fenton tepkimesi ( $Mn^{+} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Mn^{(n+1)+}$ ) ile üretilen hidroksil radikalleri tepkimelerine atfedildi. Kısa model peptidler ile yapılan deneyler, histidinin bu tür tepkime tipleri ile çabucak etkileştiğini göstermiştir. Bundan dolayı, gerçek İMAK kolonlarında oksidatif radikallerin oluşturduğu bir potansiyel zarar mevcuttur. Özellikle hidroperoksi bileşikler ile kontamine olan Tween 80 veya Triton X-100 gibi çoğunlukla kullanılan deterjanlar ile yapılan desorpsiyonlarda, protein tahrip olur. Düşük kolon temas süresi ve süper akış matrikslerinin kullanılması böyle durumlarda tercih edilir. İMAK denatüre edici şartlarda kullanıldığında, virüs ile enfekte edilen bir hayvan hücresi içindeki virüs partiküllerini çözmek için kullanılan tamponlara ve aynı zamanda disülfid bağlı agregatların oluşumunu önlemek için kromatografi süresince genellikle  $\beta$ -merkaptοethanol ( $\beta$ -ME) veya dithiotreitol (DTT) gibi indirgeyici ajanlar ilave edilir (Leo vd., 1996).

#### **1.6.8.2. Metal toksisitesi**

Her İMAK kolonunda metal iyonları sızması, desorpsiyonunun tarzına ve şelatlayıcı ajanın türüne bağlı olarak meydana gelir. Ni-NTA gibi dört dişli şelatlayıcı ajanlar, üç dişlilere nazaran daha üstündür. Ni-NTA sızması 1 ppm gibi çok küçük bir değerdedir (Schafer vd., 2000). Bunun yanında Ni-NTA agarozu kullanma, His 6-işaretli restrüksiyon endonükleaz Eco-RV'nin 1 molü başına 2 mol Ni(II) kontaminasyonunu göstermektedir (Ball vd., 2000).

Ni(II) bileşiklerinin kanserojen olduğu düşünülmektedir. Bu etki henüz kesinleşmemesine rağmen, bazı moleküler modeller Ni(II)'nin, hücre çekirdeğindeki histonlar ile etkileştiğini ve DNA tahribatına neden olduğunu ileri sürmekte. İnsan H4 histonlarının N-terminal bölgesini taklit eden sentetik oligopeptitlerin analizi, histidinin bir metal bağlayıcı bölge olarak hareket ettiğini teyit etmekte ve buda Ni(II) toksisitesinden sorumludur (Zoroddu vd., 2000).

#### **1.7. Kriyojeller**

Makrogözenekli polimerik materyaller biyoteknolojide, biyomedikalde ve eczacılık biliminde büyük ilgi görmektedir (Chen vd., 1995; Hentze vd., 2002). Makrogözenekli polimerik materyallerin sentezine klasik yaklaşımlar, indüklenmiş faz dağılmasını, gaz veya sıvı porojenlerin kullanımı, süper kritik uygulamalar veya kalıp sentezlerini içerir

(Chen vd., 1995; Kabiri vd., 2003). Son zamanlarda kriyotropik jelleşme tekniği negatif sıcaklıklarda hidrofilik makrogözenekli materyallerin hazırlanmasında kullanılır (Hentze vd., 2002; Plieva vd., 2006). Bu polimerik gözenekli materyaller kriyojeller olarak bilinirler. Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilir ve birçok değişik morfoloji ve gözeneklere sahiptirler (Ceylan, 2011).

Kriotropik jelleşme (kriyoyapılanma) potansiyel olarak jelleşme kapasitesi olan sistemlerin kriyojenik işleme sokulmasıyla meydana gelen spesifik türdeki jel oluşumudur. Kriyojelin temel özelliği; sıcaklığın düşürülmesiyle jelleşme meydana geldiğinde, kriyojelleşmeyi soğutmayla oluşan jelleşmeden ayırt eden çözücünün zorunlu kristallenmesidir (örneğin çözücünün herhangi bir faz geçişi olmadan meydana gelen agaroz ya da jelatin çözeltisinin jelleşmesi) (Ceylan, 2011).

Kriyojellerin (makrogözenekli jeller olarak tanımlanabilir) oluşumunda yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri gözenekli bir yapı oluşturur. Kalıp buz kristallerin erimesinden sonra gözenekler birbiriyle bağlanmış olur. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiriyle bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir (Ceylan, 2011).

Klasik jellerin (çözeltileri homofaz sistemler iken) aksine kriyojeller heterofaz sistemde polimerleşir. Kriyojellerde makro ve mikrogözenekli yapılar da olabilir (Plieva vd., 2007). Kriyojeller yüksek esneklik ve süngersi morfolojisiyle, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı öncüllerle hazırlanır ve sulu ortamda serbest radikal polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta üretilir (Plieva vd., 2005). Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAm), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), dextranmetakrilat, polivinilalkol (PVA) temeline dayanır (Çizelge 1.7) (Arvidsson vd., 2003). 1980' li yıllarda bilinmesine rağmen biyoayırma özellikleri son zamanlarda fark edilen kriyojeller disk, monolitik kolon ve tabaka şeklinde dizayn edilir (Lozinsky vd., 2003).

**Çizelge 1.6.** Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri (Ceylan, 2011).

<b>Polimerik Jeller</b>			
<b>Tür</b>	<b>Jel Oluşumu</b>	<b>Örnekler</b>	<b>Yorumlar</b>
Kemotropik Jeller	Moleküller arası kimyasal bağlar sonucu oluşan 3 boyutlu kovalent örgü	Poliakrilamid jeller Polistiren temelli iyon değişim reçineleri veya poliakrilat matriksler Sephadexler olarak bilinen çapraz bağlı dekstran	Büyük bir jel grubudur. Monomerik öncüllerin dallanmış polimerizasyonu sırasında ya da polimerik öncüllerin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Biyoteknoloji alanında yaygın kullanılır.
İyonotropik Jeller	Moleküller arası iyonik bağlara (tuzlar) kararlılık veren iyon değişim tepkimeleri	Aljinat-polilislin veya kitosan-polifosfat karışımı matriksler gibi polielektrolit kompleksler	Bu jeller belli kompozisyona sahip ortamda kararlıyken sıvı ortamın pH veya iyonik bileşeni değiştirildiğinde kolaylıkla çözünürler. İmmobilize mikrobiyel, bitki veya hayvan hücresi taşıyıcıları olarak kullanılırlar.
Şelatotropik Jeller	Moleküller arası koordinasyon bağlarına kararlılık veren şelatlanma tepkimeleri	Jel oluşumu çok dişli güçlü koordinasyon yapan metal iyonlarının eklenmesiyle sağlanır. Cu(II) veya Co(II) ile kitosan çözeltileri, Cr(III) ile karboksimetil selüloz çözeltileri veya Ca iyonları ile çapraz bağlanmış aljinat jelleri.	Ca-aljinat jeller hücre immobilizasyonu için kullanılırlar. Diğer şelatotropik jeller için henüz biyoteknolojik uygulamalar bulunamamıştır.
Solvatotropik jeller	Çözücü bileşenin değiştirilmesiyle oluşan jeller	Koaservasyon olgusu diye bilinen olay sonucu oluşur. Bu tür jelleşme filmlerin veya fiberlerin ıslak oluşumu sırasında bir ara basamaktır. Örn; selüloz nitratlardan ve	Çözücü olmayan bir madde polimer çözeltisi ortamına eklendiğinde ortama olan afinitesini düşürülerek ve kovalent olmayan polimer- polimer

		selüloz asetatlardan.	etkileşimleri oluşturarak jel oluşumunu sağlar.
Termotropik Jeller	Başlangıç polimer sisteminin ısıtılmasıyla elde edilirler.	Hidrofobik olarak modifiye edilmiş hidroksietil selüloz, ovalbümin ve yumurta beyazı jelleri, Jelatin jeller, Nişasta jelleri, Agaroz ve agar agar jelleri, Carrageenan jelleri	Moleküller arası hidrofobik etkileşimler jel oluşumunda önemli yere sahiptir.
Psikotropik jeller	Jelleşme başlangıç polimer sisteminin soğutulmasıyla elde edilir		Biyoteknolojide kromotografik malzemeler ve elektroforez matrisleri olarak kullanıldığı gibi hücre kültürlemesi için katı ortam olarak da sıkça kullanılır.
Kryotropik jeller	Başlangıç sisteminin dondurulmasıyla elde edilir.	Bu çalışmanın içeriğini oluşturmaktadır.	

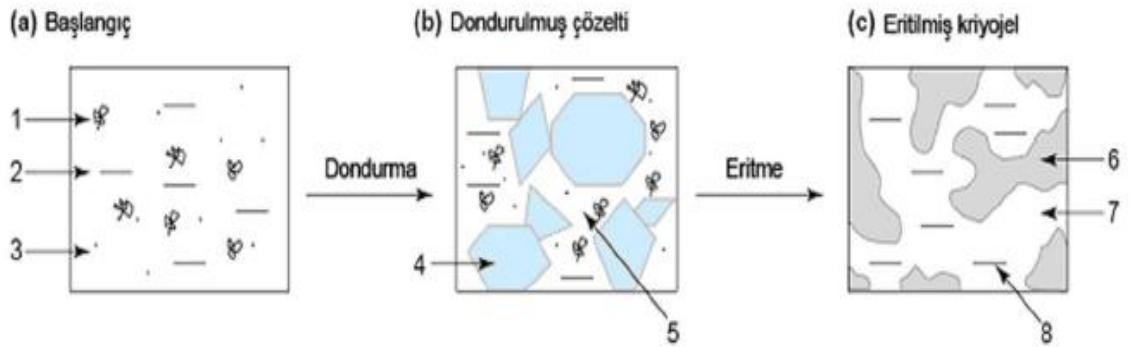
**Çizelge 1.7.** Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış (Plieva vd., 2007).

Monomer/ Polimer Öncülleri	Gösterim	Por Boyutu ( $\mu$ m)	Morfoloji	Kullanım İşlemleri
Akrilamid	pAAm	1-200	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromotografisi; hücre kültürü için kalıplar
Akrilamid	Aşı- pAAm	1-100	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromotografisi
Dimetilakrilamid	Pdmaa	1-120	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromotografisi; hücre kültürü için kalıplar
Polivinilalkol	m-PVA	1-80	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulmayan veya monolitik kromotografi ortamı için kalıplar
Polivinilalkol	b-PVA	0,1-1	Elastik	Mekanik olarak kafesleme yoluyla hücrenin immobilizasyonu. Enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonu
Hidroksietilmetakri lat	HEMA	1-200	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Dekstran metakrilat	Dex-MA	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Hidroksietilmetakri lat	HEMA-	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulanbilen kalıplar
LL-asetat-Dekstran	LLA-D			
Dekstran Agaroz	Ags-MG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Polietilenglikol	PEG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
N-izopropil akrilamid	NIPAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar

### 1.7.1. 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 projen 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 1.20) (Plieva vd., 2007). Yaridonmuş 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 1.20.** Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: 1, çözeltideki makromolekül; 2, çözücü; 3, düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri; 4, dondurulmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, polimerik kriyojel; 7, makrogözenekler; 8, çözücü (Ceylan, 2011).

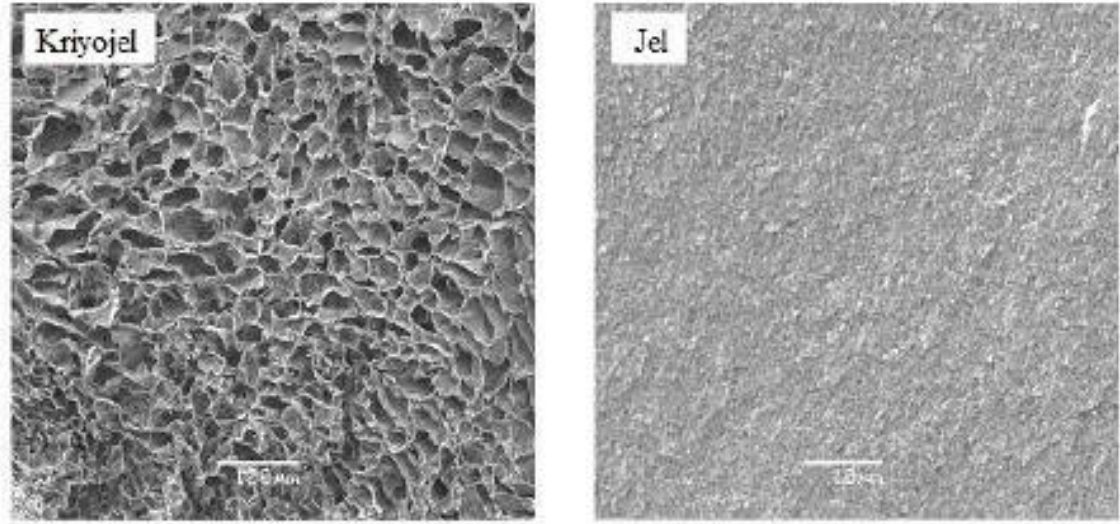
Kriyotropik jelleşme işleminin temel karakteristik özellikleri;

- 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 en önemli etki eden faktörlerdir.

4) Kriyojellerin polimerik fazında mikrogözenek oluşumları gözlenmektedir. Bundan dolayı, kriyojeller hem heterofaz hem de heterogözenekli bir yapıya sahiptirler (Şekil 1.21).

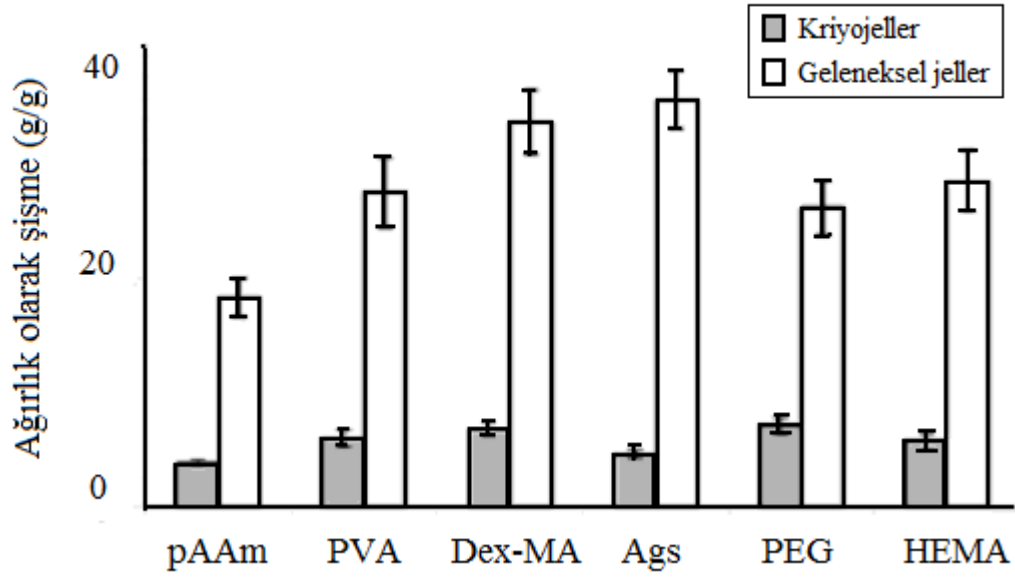
-20 °C' de sulu ortamda serbest radikal polimerleşmesi ile hazırlanan kriyojel monolitlerinin tipik gözenekli yapıları ve aynı yolla ama atmosfer sıcaklığında (20 °C) hazırlanan klasik bir jelin yapısı Şekil 1.21 'de gösterilmiştir (Plieva vd., 2007).



**Şekil 1.21.** Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı (Plieva vd., 2007).

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 1.22) (Plieva vd., 2007). Negatif sıcaklıklarda jelleşmeyle hazırlanan değişik kriyojeller Çizelge 1.7'de verilmiştir. Hazırlanan kriyojellerin çoğu esnektir, süngersi yapıdadır ve negatif sıcaklıklarda sulu ortamda serbest radikal polimerleşme reaksiyonuyla uygun bir şekilde kontrol altında tutularak kriyojeller istenen özellikte üretilebilir (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 1.22.** Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri (Plieva vd., 2007).

Kriyojeller oldukça elastik maddelerdir. Esnek ve süngersi yapılarından dolayı pAAm kriyojeller büyük deformasyonlara dayanabilirler ve mekanik olarak zarar görmeden % 80'e kadar kolayca sıkıştırılabilirler. Ancak klasik pAA jeller %30'dan az sıkıştırıldıklarında kolayca tahrip olurlar. Sıkıştırılma kalktığında kriyojeller hemen eski şekline geri dönerler (Plieva vd., 2007; Plieva vd., 2004).

### 1.7.2. Kriyojellerin 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 matriks olarak biyomedikal uygulamaları bulunmaktadır. Mikroküre formunda hazırlanan kriyojeller ise özellikle mikrobiyal hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Makrogözenekli monolitler (1 – 100 µm'lik gözenekli) virüslerin, hücre organellerinin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin ayrılmasında kalıp olarak kullanılmaktadır (Plieva vd., 2007).



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Emir vd., (2004), makalelerinde 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve metakriloamidohistidin (MAH) monomerlerini kullanarak, süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile, ortalama çapı 75-125 µm olan poli(2-hidroksietilmetakrilat-co-metakriloamidohistidin) [p(HEMA-co-MAH)] mikrokürelerini sentezlemişlerdir. Daha sonra, MAH'ın yapısında bulunan histidinin imidazol halkası vasıtasıyla Cu<sup>2+</sup> iyonları ile şelat oluşturularak hazırlanan p(HEMA-co-MAH)-Cu<sup>2+</sup> mikroküreler (658,2 µmol Cu<sup>2+</sup>/g polimer) ile sulu çözeltilerden sitokrom c adsorpsiyonunu çalışılmıştır. Elde edilen mikroküreler ile yapılan çalışmalar sonucunda maksimum sitokrom c adsorpsiyonu, pH 10'da, 31,7 mg/g olarak tespit edilmiştir.

Türkmen vd., (2006), makalelerinde süspansiyon polimerizasyonu ile ortalama çapı 100-140 µm, ortalama gözenek boyutu 819 nm ve spesifik yüzey alanı 50 m<sup>2</sup>/g olan magnetik poli(2-hidroksietilmetakrilat) [m-pHEMA] mikroküreler sentezlemişlerdir. Daha sonra, m-PHEMA yapısındaki ester grupları, NaH varlığında, poli(etilenimin) (PEI) ile reaksiyona sokularak imin gruplarına dönüştürülmüştür. PEI takılı m-pHEMA mikro kürelerin amino (-NH<sub>2</sub>) içeriği 120 mgPEI/g olarak tespit edilmiştir. Son olarak, Cu<sup>2+</sup> iyonları ile magnetik kürelerin şelat oluşturması sonucu sentezlenen matriksin (m-PHEMA-PEI-Cu<sup>2+</sup>) sulu ortamdan maksimum sitokrom c adsorpsiyonu, pH 10.6'da, 40,1 mg/g olarak bulunmuştur.

Akkaya vd., (2007), makalelerinde süspansiyon polimerizasyonu ile, ortalama çapı 50-100 µm ve spesifik yüzey alanı 80 m<sup>2</sup>/g olan, magnetik poli(etilenglikoldimetakrilat-co-metakrilamidohistidin) [m-p(EGDMA-MAH)] mikroküreler sentezledikten sonra, MAH'ın yapısında bulunan histidinin imidazol halkası vasıtasıyla Cu<sup>2+</sup> iyonları ile şelat oluşturularak hazırlanan m-p(EGDMA-MAH)-Cu<sup>2+</sup> mikroküreler (68 µmol Cu<sup>2+</sup>/g polimer) ile sulu çözeltilerden sitokrom c adsorpsiyonunu çalışmışlardır. Maksimum sitokrom c adsorpsiyonunun, pH 8.0'de, 222 mg/g olduğunu bildirmişlerdir.

Bayramoğlu vd., (2007), makalelerinde glutamik asit immobilize edilmiş magnetik poli(metilmetakrilat-co-glisidilmetakrilat)-A-GA [m-p(MMA-co-GMA)-A-GA] mikroküreler ile sulu çözeltilerden sitokrom c'nin adsorpsiyon davranışını incelemişlerdir ve maksimum sitokrom c adsorpsiyonunu, pH 7.0 fosfat tamponunda, 140,3 mg/g olarak bulmuşlardır.

Çimen ve Denizli (2012), makalelerinde fare karaciğer homojenatından sitokrom c adsorpsiyonunu çalışmak amacıyla, 113,7 µmol MAH/g ve 58,7 µmol Cu<sup>2+</sup>/g içeren poli(2-hidroksietilmetakrilat -N- metakriloamidohistidin metil ester) [p(HEMAH)-Cu<sup>2+</sup>] monolitik kriyojeller hazırlamışlardır. Sulu çözeltilerden maksimum sitokrom c

adsorpsiyonunu, pH 8,0 fosfat tamponunda, 20,8 mg/g olarak bulmuşlardır. Fare karaciğer homojenatı ile yapılan çalışmalarda ise sitokrom c adsorpsiyonunun, 93,8 % saflıkta, 37,7 mg/g olduğunu bildirmişlerdir.

Erzengin vd., (2010), makalelerinde yüksek protein adsorpsiyon kapasitesi için geniş yüzey alanına sahip olan  $\text{Cu}^{2+}$  takılı sporopollenin partikülleri gömülü süpermakrogözenekli afinite kriyojellerini serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Bu kriyojelleri HSA (insan serum albümin)'nin saflaştırılmasında kullanmışlardır. HSA'nın maksimum adsorpsiyonunu, pH 8 fosfat tamponunda, 677,4 mg/g polimer olarak bulmuşlardır. İMAK kullanılarak, sitokrom c dışında çalışılan proteinlerle ilgili belli başlı maddeler ise aşağıdaki gibidir.

Bereli vd., (2009), serum proteinlerinin analizinde faydalı olabilecek albümin ve immunoglobulin (IgG) saflaştırılması için Cibacron Blue F3GA ve iminodiasetik asit (İDA)- $\text{Cu}^{2+}$  içeren poli(glisidil metakrilat) (PGMA) mikroküreler (yaklaşık 1,6  $\mu\text{m}$  çapında) gömülü PHEMA kriyojelleri serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlemişlerdir. Albuminin maksimum adsorpsiyon kapasitesini 342 mg/g polimer ve IgG'in maksimum adsorpsiyon kapasitesini 257 mg/g polimer olarak bulmuşlardır.

Baydemir ve vd., (2008), insan plazmasından bilirubinin seçici olarak ayrılması için bilirubin baskılanmış partiküller gömülü süpermakrogözenekli kriyojeller hazırlamışlardır. Bilirubinin maksimum adsorpsiyon kapasitesini 10,3 mg/g polimer olarak bulmuşlardır.

Wang vd., (2008), cam kolonunun içinde iminodiasetik asit (İDA) bağlı poliakrilamid kriyojeller hazırlamışlardır (~16 mm çapında). Bu kriyojelleri  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  ile yüklemişler ve  $\text{Zn}^{2+}$ -İDA-kriyojeller ve  $\text{Ni}^{2+}$ -İDA-kriyojeller elde etmişlerdir. Bu kriyojellerin çeşitli koşullar altında adsorpsiyon ve desorpsiyon davranışlarını açıklamak için model protein olarak albümini seçmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda  $\text{Zn}^{2+}$ -İDA ve  $\text{Ni}^{2+}$ -İDA-kriyojellerin birbirine bağlı süpermakrogözeneklere ve yüksek su geçirgenliklerine sahip olduklarını gözlemlemişlerdir.

Alkan vd., (2009), romatoid artrit tedavisine yönelik protein A takılı-poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojeller 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 edildiğini bildirmişlerdir (98,7 mg/g).

Panping vd., (2010),  $\text{SiO}_2$  nanopartikülleri gömülü süpermakrogözenekli kriyojelleri, akrilamid (AAm) ve *N,N*-metilen-bis-akrilamid (MBAAm) reaktif monomer karışımının radikal kriyojenik kopolimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Model protein olarak lizozim

ile çalışmışlardır. 2-akrilamido-2-metil-1-puopansülfonik asit ile aşılana kompozit kriyojelde lizozimin kromotografik prosesini protein atılım ve desorpsiyon özelliklerini değerlendirmek için gerçekleştirmişlerdir. Kromotografi, gömülü nanopartiküllerinden dolayı yeterli mekanik güç gösteren yüksek yüzeysel hızda gerçekleştirebileceğini göstermişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Malzeme

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Sitokrom c, 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri Fluka A.G'den alındı (Buchs, Switzerland) ve kullanılıncaya kadar 4 °C de muhafaza edilmiştir. N'-metilen-bis-akrilamid (MBAAm), N,N,N',N'-tetrametilen daimin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) Sigma'dan sağlandı (St. Louis, USA). Lycopodium Clavatum sporları Fluka A.G'den (Buchs, Switzerland) temin edildi. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların hepsi Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmistir ve analitik saflıktadır. Denede 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. Denedelerde kullanılacak cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Taramalı Elektron Mikroskobu	: JEOL JSM-5600 SEM, Tokyo, Japan
UV-VIS Spektrofotometresi	: Shimadzu corporation UV- mini-1240
Ultrasonik Banyo	: Bandelin electronic RK 100H
pH metre	: J.P. SELECTA, s.a PH-2006 pH METER
Otomatik Pipetler	: Eppendorf research
Vakum Etüvü	: Memmert D06836
Peristaltik Pompa	: TETRA 210A20020 TRIS MODEL
Classic Vortex Mixer	: VELP SCIENTICIFA
Analitik Terazı	: METTLER TOLEDO AB204S
Manyetik Karıştırıcı	: IKA RT 5P
Derin Dondurucu	: GTP 455A Vestel
Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi	: AA800, Perkin Emler, Bodenseewerk, Germany

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Monolitik afinite adsorbentin hazırlanması

#### 3.2.1.1. Sporopollenin hazırlanması

*Lycopodium Clavatum* sporlarından sporopolleninin hazırlanması literatürde belirtildiği şekilde yapılmıştır (Erzengin vd., 2010). *Lycopodium Clavatum* (10 gr), 75 mL asetonla birlikte 4 saat kadar kaynatılmaya bırakıldı. Yağı çıkarılan sporlar filtrasyonla biriktirildi. Yağı çıkarılan *Lycopodium Clavatum* 2 M'lık 100 mL potasyum hidroksitle 24 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılarak muamele edildi. Sporlar su (5x50 mL), etanolle ve son olarak 50 mL eter ile yıkandı. Sporlar filtrasyonla toplandı ve 60 °C'de vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen son ürün kahverengi toz halinde sporexine (dış kabuklar) olan sporopollenindir.

#### 3.2.1.2. Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin hazırlanması

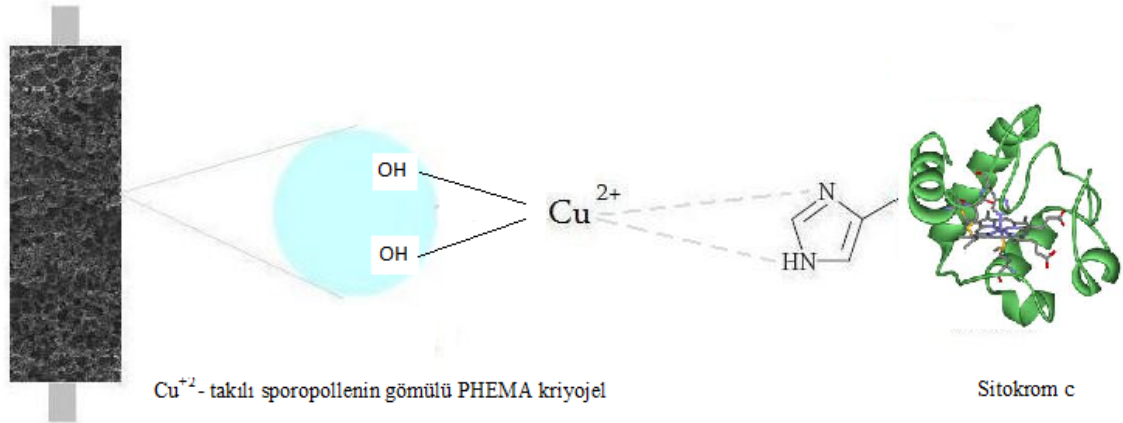
Sporopollenin yüzeyine Cu<sup>2+</sup> iyonlarının optimum adsorpsiyon şartları daha önce çalışılmıştır (Ünlü ve Ersöz, 2006). 0,150 gr sporopollenin pH'sı 5 (HCl veya NaOH ile ayarlanmış) olan 150 mg/L Cu<sup>2+</sup> çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Cu<sup>2+</sup> iyonları kaynağı olarak 1000 ppm'lik atomik adsorpsiyon standart çözeltisi kullanıldı. Süpernatandaki Cu<sup>2+</sup> iyonlarının derişimi grafit fırınlı atomik adsorpsiyon spektrofotometresi (AA800, Perkin Emler, Bodenseewerk, Germany) yardımı ile bulundu. Cihazın hassasiyeti derişimi bilinen standart çözeltiler ile periyodik olarak test edildi. Deneyler üç kez tekrar edildi. Adsorblanan Cu<sup>2+</sup> iyonları, başlangıç çözeltideki Cu<sup>2+</sup> iyonları ve denge çözeltideki Cu<sup>2+</sup> iyonları kullanılarak bulundu (Eşitlik 3.1).

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

Burada, Q; 1 g sporopollenine adsorblanan metal iyon miktarını (mg/g); C<sub>o</sub> ve C sırasıyla sulu çözeltideki metal iyonunun başlangıç ve son derişim değerini (mg/mL); V sulu fazın hacmi (mL); m ise kullanılan sporopollenin miktarını (g) vermektedir. Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopolleninden Cu<sup>2+</sup> sızması 1,0 M NaSCN içeren bir ortamda ve ayrıca pH 4 - 8 arasında değişen tampon çözeltiler ile incelendi. Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin süspansiyonu 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponuyla % 0,02 sodyum azid içeren çözeltide mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için 4 °C saklandı.

### 3.2.1.3. Cu<sup>2+</sup>- takılı sporopollenin gömülü poli(2-hidroksietil metakrilat) monolitik kriyojellerin hazırlanması

Monomer 2-hidroksietil metakrilat (0,3 mL HEMA) ve çapraz bağlayıcı *N,N'*-metilen-bisakrilamid (50 mg (MBAAm)) deiyonize suda (5 mL) çözünmüştür. Çözünmüş oksijeni elimine etmek için bu karışım 5 dakika vakuma maruz bırakılmıştır. Serbest radikal polimerleşmesi amonyum persülfat APS-TEMED çifti ile oluşturulmuştur. APS (100 µL) (% 10 (w/v)) eklendikten sonra çözelti bir buz banyosunda 4 - 5 dakika soğutulmuştur. TEMED (20 µL) eklenip reaksiyon karışımı 1 dakika süre vorteks edilmiştir. Bu adımda, 15 mg Cu<sup>2+</sup>- takılı sporopollenin polimerizasyon karışımına eklenmiştir. Daha sonra, reaksiyon karışımı, altında kapalı bir çıkış olan plastik şırıngaya (5 mL, iç çapı 0,8 cm) dökülmüştür. Polimerleşme çözeltisi 24 saat -12 °C' de dondurulup sonra oda sıcaklığına getirilmiştir. Reaksiyona girmeyen monomer ve başlatıcının uzaklaştırılması için uzun bir yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkama çözeltileri olan seyreltik HCl çözeltisi ve su-etanol karışımı, monolitik kriyojel kolondan geçirilmiştir. Kriyojelin temiz olduğu tesbit edilene kadar yıkama işlemi devam ettirilmiştir. Yıkama işleminden sonra monolitik kriyojel % 0,02 sodyum azid içeren çözelti içerisinde +4 °C'da saklanmıştır. Şekil 3.1'de Cu<sup>2+</sup>- takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojel gösterilmektedir.



**Şekil 3.1.** Cu<sup>2+</sup>- takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojel ile sitokrom c molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.

### 3.2.2. Sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu

Sitokrom c adsorpsiyonuna; pH, tampon, sıcaklık, başlangıç sitokrom c derişimi, akış hızı ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyon davranışı incelenirken, sıcaklık kontrolü için su ceketli cam kolon içeren bir sürekli sistem kullanıldı. Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan monolitik kriyojel 30 mL deiyonize su ile yıkandıktan sonra 30 mL ilgili çalışma tamponu ile 1,0 ml/dk akış hızında 30

dakika etkileştirildi. Tüm adsorpsiyon deneyleri (sıcaklık çalışmaları hariç), 1,0 mL/dk akış hızı, 25 °C, 0,04 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda 40 mL sitokrom c çözeltilisinin 40 dk süre ile kolondan geçirilmesiyle gerçekleştirildi. İMAK üzerine adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında adsorpsiyon ortamından alınan çözeltilerin 280 nm’de UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu corporation UV-mini-1240) kullanılarak değerlendirildi. 0,025 - 1,0 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan sitokrom c çözeltileri 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 sitokrom c miktarını (mg/g),  $C_0$ ; sitokrom c’nin çözeltideki başlangıç derişimini (mg/mL), C; adsorpsiyon sonrası sulu fazın sitokrom c derişimini (mg/mL), V; çözeltilinin hacmini (mL) ve m ise kullanılan poli(HEMA) kriyojellerin ortalama kütesidir (g). Adsorpsiyon ortamının pH’sının, sitokrom c adsorpsiyonuna etkisi, pH 6,0 ile 11,0 arasında, çalışıldı. Sulu ortamdan sitokrom c 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 - 0,3 M) çözeltileri ile 25 °C ortam sıcaklığında gerçekleştirildi. Akış hızının etkisi 0,5 - 3 mL/dk arasında değiştirilerek incelendi. Sulu ortamdan sitokrom c 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 sitokrom c ile çalışıldı.

### 3.2.3. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Sitokrom c desorpsiyonu için 0,5 M NaSCN desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Sitokrom c adsorplanmış  $Cu^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojellerden desorpsiyon ajanı 1 mL/dk akış hızında 30 dakika süreyle kolondan geçirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki sitokrom c miktarı 280 nm’ de spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Desorpsiyon ortamındaki sitokrom c konsantrasyonu ile kriyojeldeki adsorbe olmuş sitokrom c miktarından desorpsiyon oranı Eşitlik 3.3’den yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan sitokrom c}}{\text{Adsorblanan sitokrom c}} \quad (3.3)$$

$\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojelin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 35 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işlemi sonrasında,  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojel, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH çözeltisi ile yıkanmış 0,05 M fosfat tamponu (pH 7) ile dengeye getirilmiştir.

### 3.2.4. Kriyojelin karakterizasyonu

#### 3.2.4.1. Şişme deneyi

$\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojellerin şişme davranışları, deiyonize su içerisindeki denge şişme oranlarının belirlenmesi ile hesaplanmıştır. Denge şişme oranının belirlenmesinde uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir; başlangıçta kuru olan kriyojel dikkatlice tartıldıktan sonra, 50 mL damıtık su içeren bir behere konulmuştur. Sabit sıcaklıkta  $25 \pm 0.5$  °C'de 2 saat bekletildikten sonra, kriyojeller ortamdaki alınmış ve METTLER TOLEDO AB204S marka terazi ile ( $1 \times 10^{-4}$  hassasiyetli) tartılmıştır. Kuru ve şişmiş kriyojellerin ağırlıkları kaydedilmiştir. Polimerik kriyojellerin su içeriği Eşitlik 3.4'de verilen denklem ile hesaplanmıştır:

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

Burada;  $W_o$ : kriyojelin kuru ağırlığı (g)  $W_s$ : kriyojelin şiştikten sonraki ağırlığı (g). Kriyojellerin makrogözeneklilik yüzdesinin belirlenmesi için uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir; denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel örnekleri ( $W_1$ ) tartılmıştır ve daha sonra şişmiş kriyojel örneği bir enjektör içerisine alınmıştır. Kriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan suyun uzaklaştırılması için kriyojel enjektör yardımıyla sıkılmış ve kriyojeller ( $W_2$ ) tartılmıştır. Eşitlik 3.5'de verilen eşitlik kullanılarak kriyojellerin sahip olduğu makrogözeneklerin yüzdesi hesaplanmıştır.

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

#### 3.2.4.2. Yüzey morfolojisi

$\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojellerin kesit yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JSM 5600, Tokyo, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak, kriyojellerin gözenek yapısının korunması için kriyojeller kararlı hale getirilmiştir. Bu amaç için, kriyojel örnekleri gece boyu 0,15 M sodyum kokadilat çözeltisi içerisinde (% 2,5 glutaraldehit içeren) bekletilmiştir. % 1'lik osmiyum tetraoksit içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, kriyojel örnekleri kademeli olarak etanol içerisinde dehidrate edilmiş ve kritik sıcaklık kurutucusunda +10 °C'de



ısıtılmıştır. Bu aşama, geçiş sıvısı olan etanolün sıvı karbondioksit ile değişimi için yapılmıştır. Sıcaklık daha sonra, +40 °C' ye (100 atm basınç altında) yükseltilmiştir. Bu işlem sırasında; sıvı karbondioksit doğrudan gaz formuna geçirilmiş ve örneğin buharlaşma ısısı veya yüzey gerilim kuvvetleri dolayısıyla zarar görmesi önlenmiştir. Basıncın 1 atm'ye yükseltilmesi ile birlikte kuru kriyojel örnekleri elde edilmiştir. Son aşama olarak, kriyojel örnekleri ince altın tabaka ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

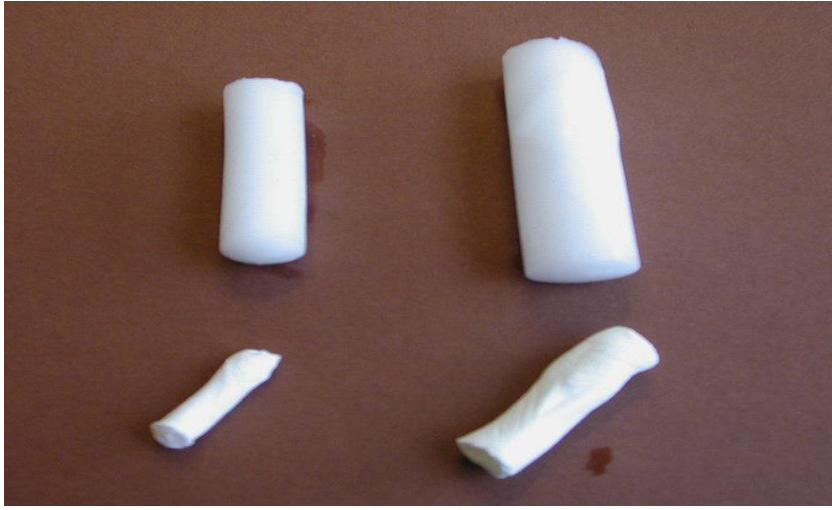
## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojellerin karakterizasyonu

#### 4.1.1. Şişme deneyi

Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojeller, çapraz bağlı ve hidrofilik yapıda matrislerdir. Ayrıca bu kriyojeller, opak, süngerimsi ve elastiktir. Çapraz-bağ derecesine ve matrisin 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 (Şekil 4.1).

Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojelin denge şişme oranı 5,5 g H<sub>2</sub>O/g kuru kriyojel makrogözenek miktarı ise % 63,28 olarak bulunmuştur. Kriyojelimizin Cu<sup>2+</sup> takılı olmadan şişme testi yaptığımızda denge şişme oranının 5,71 g H<sub>2</sub>O/g kuru kriyojel makrogözenek miktarının ise % 58 olduğu hesaplanmıştır.

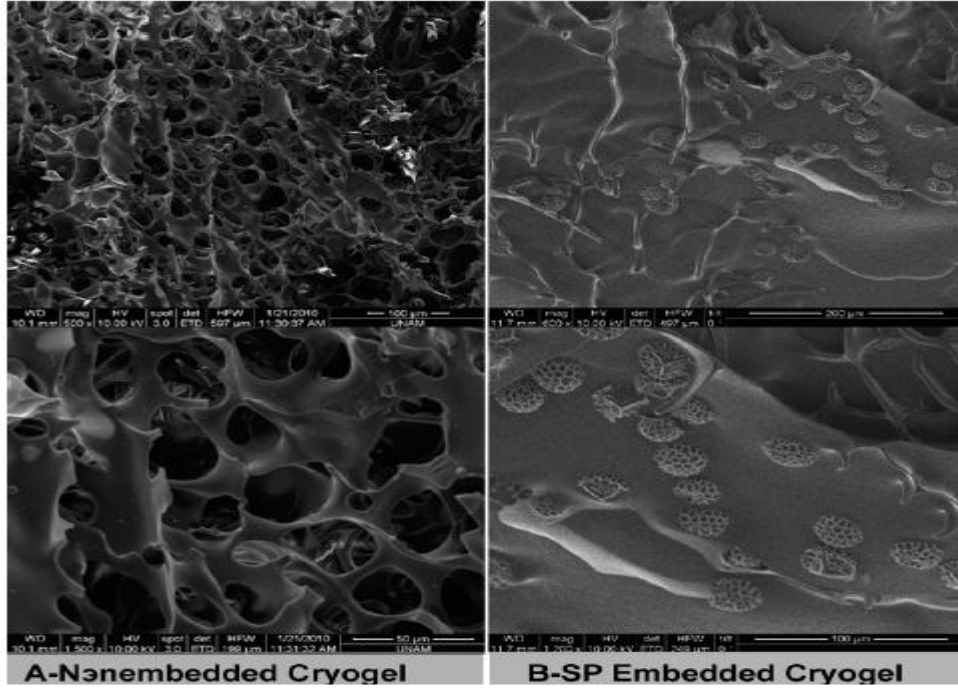


Şekil 4.1. Şişmiş ve kurutulmuş süpermakrogözenekli Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojeller.

#### 4.1.2. Yüzey morfolojisi

Sporopollenin yapısında bulunan aromatik, fenolik, hidroksil, karboksil/karbonil gruplarının metal iyonlarının bağlama başlıca rol aldığı düşünülmektedir (Ünlü, 2004). Sporopollene şelatlanmış Cu<sup>2+</sup> miktarı 14,1 mg/g SP olarak ölçülmüştür. Sporopollenden Cu<sup>2+</sup> sızması hiçbir adsorpsiyon/desorpsiyon deneyinde tespit edilmemiştir, bu da yıkama işleminin Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopolleninden nonspesifik Cu<sup>2+</sup> iyonlarını uzaklaştırmada yeterli olduğunu göstermiştir. Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojeller gözenekli ve ince polimerik

duvarlara ve hareketli fazın kolaylıkla akabildiği bağlantılı geniş gözeneklere (10 - 50  $\mu\text{m}$   $\text{çap}$  aralığında) sahiptirler (Şekil 4.2). SEM fotoğrafları gösteriyor ki,  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojel yüzeyine düzenli bir şekilde dağılmıştır. Matriksin gözenek boyutu, sitokrom c moleküllerinin boyutundan büyüktür ve böylece moleküller kolaylıkla gözeneklerden geçebilmektedir. Ayrıca,  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojeller protein adsorpsiyonu için geniş yüzey alanı sağlamaktadır ve gözenekliliği artırmaktadır. Hareketli fazın gözeneklerde konvektif akışı nedeniyle kütle aktarım direnci pratik olarak ihmal edilebilir derecededir.



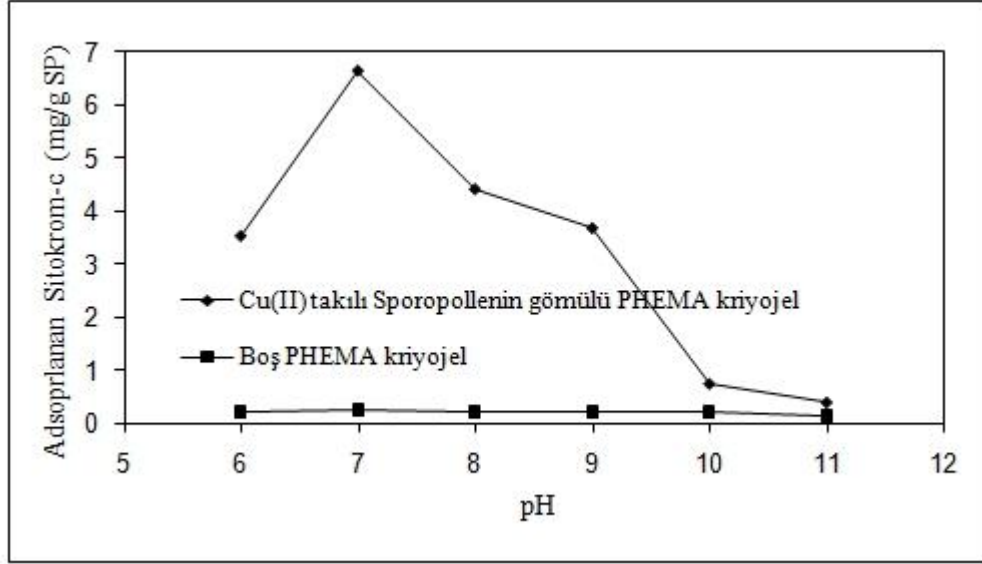
**Şekil 4.2.**  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojelin (A) ve boş kriyojelin (B) SEM fotoğrafı.

## 4.2. $\text{Cu}^{2+}$ takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojellerle sulu çözeltiden sitokrom c adsorpsiyonu

### 4.2.1. pH etkisi

pH ve iyonik şiddet, arayüzeyde bulunan kovalent olmayan etkileşimlerle yönetilen afinite kromatografi sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Hedef molekül yüzeyinde iyonize olabilen gruplar dolayısı ile oluşan yüzey yük dağılımı, afinite destek materyalindeki bağlanma bölgeleri ile spesifik afinite etkileşimlerinde pH'nın oldukça önemli bir faktör olmasına yol açmaktadır. Şekil 4.3'de  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonuna pH'nın etkisi verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonu pH 7'de maksimuma

ulaşmaktayken (6,65 mg/g SP), bunun altında ve üzerinde pH larda adsorpsiyon düşmektedir (sitokrom c'nin izoelektrik noktası 10,2 dır). İMAK' de protein adsorpsiyonu immobilize metal ile protein yüzeyindeki aminoasit rezidüleri arasında gerçekleşmektedir.



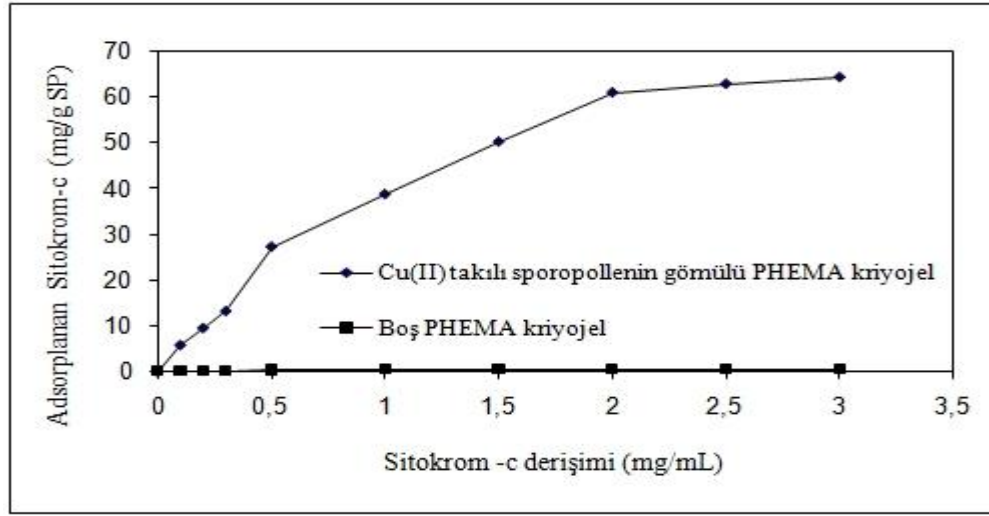
**Şekil 4.3.** Sitokrom c adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Sitokrom c başlangıç derişimi: 0,04 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

Protein molekülleri ile immobilize metal iyonu arasındaki etkileşim, zayıf bazik ortamda protein yüzeyindeki iyonlaşabilen aminoasit rezidülerinden dolayı artmaktadır (Wong vd., 1991). Sitokrom c yüzeyinde bulunan histidin rezidüsü İMAK' de etkin rol oynamaktadır ve histidin pKa değeri çoğu proteinde 6 - 7 aralığındadır (Porath vd., 1983; Arnold 1991). pH 7 civarında histidin aminoasidinin imidazol grubunun deproton olmasından dolayı metal iyonu ile protein arasında elektrostatik etkileşimler olmakta ve bu da yüksek protein adsorpsiyonu ile sonuçlanmaktadır. pH 7'den sonra ise protein molekülleri arasındaki lateral elektrostatik itmelerden dolayı adsorpsiyon kapasitesinde düşüş meydana gelmektedir.

#### 4.2.2. Sitokrom c başlangıç derişiminin etkisi

Cu<sup>2+</sup>-takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonuna sitokrom c başlangıç derişiminin etkisi Şekil 4.4'de verilmiştir. Boş PHEMA kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonu düşük olmasına rağmen, Cu<sup>2+</sup>-takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonu oldukça yüksektir (64,16 mg/g SP). Şekilde görüldüğü gibi bağlanma aktif bölgelerinin doygunluğundan dolayı, 3 mg/mL lik başlangıç sitokrom c derişiminde adsorpsiyon

denmesine ulaşılmıştır. Belirli bir konsantrasyondan sonra  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin spesifik etkileşim gruplarının, sitokrom c molekülleri ile doygun hale gelmesi ile adsorpsiyon hızında yavaşlama olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 4.4.** Sitokrom c adsorpsiyonuna sitokrom c başlangıç derişiminin etkisi. pH 7 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, Langmuir izotermi ile uyumlu aşağıdaki kütle-transfer hız eşitliğini tanımlamıştır (Eşitlik 4.1).

$$dq/dt = k_1 C^*(q_m - q^*) - k_2 q^* \quad (4.1)$$

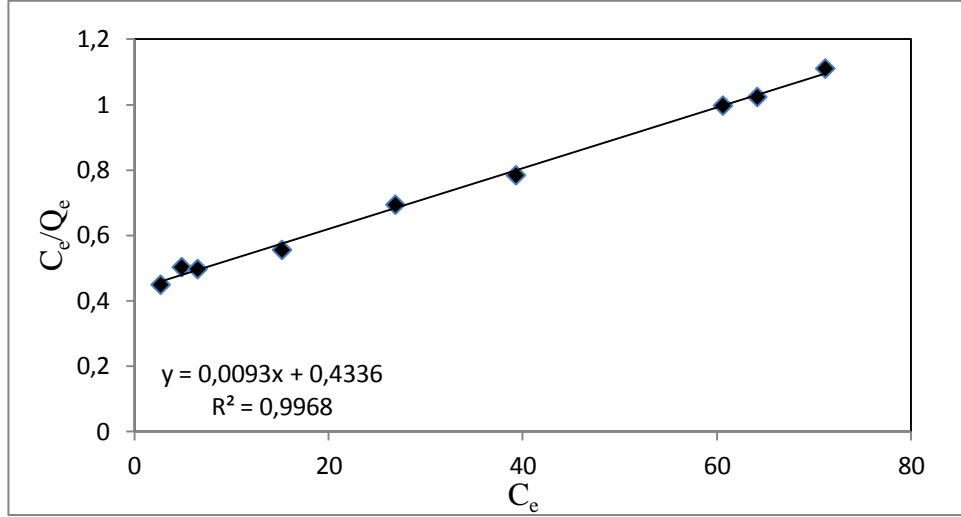
Eşitlikte  $C^*$  serbest molekül,  $q^*$  bağlanan molekül derişimi,  $q_m$  molekülün maksimum bağlanma kapasitesi, ve  $t$  zamandır. Hız sabitleri  $k_1$  ve  $k_2$  kütle transfer kısıtlamalarını da göz önünde bulundurarak molekülün bağlanma bölgelerine adsorpsiyon ve desorpsiyonu yansıtan “toplu” 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).

$$q^* = q_m C^* / (K_d + C^*) \quad (4.2)$$

$K_d$  ayrışma sabitidir [ $(k_2/k_1)$ ; ileri ve geri reaksiyon hızlarının oranı].  $K_d$  derişimin bir boyutudur ve küçük olduğunda molekülün bağlanması kuvvetlidir. \* indisi denge değerini ifade etmektedir. Polimer yüzeyinde bağımsız etkileşim bölgelerinin varlığının geçerliliğini göstermek eşitlik 4.3 teki için semireciprocal (Hanes, 1932) denklemi çalışılmıştır.

$$\frac{C^*}{q^*} = \frac{K_d}{q_m} + \frac{C^*}{q_m} \quad (4.3)$$

Eşitlik 4.3' ten elde edilen grafik Şekil 4.5'de verilmiştir. Burada gösterildiği gibi lineer grafik  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonunun Langmuir modeli ile uyumunu göstermektedir. Doğrunun kesim noktası ve eğiminden  $K_d$  ve  $q_m$  (maksimum adsorpsiyon kapasitesi) değerleri sırası ile 45,3 mg/mL ve 107,5 mg/g olarak belirlenmiştir,  $R^2$  değeri 0,9968'dir. İdeal bir adsorbentte  $K_d$  değerinin küçük olması kuvvetli bağlanmayı ifade etmektedir.



Şekil 4.5. Sitokrom c'nin Langmuir adsorpsiyon izotermi.

İzoterm şeklinin adsorpsiyon sisteminin “tercihli” veya “tercihsiz” olduğunu tahmin etmenin de bir ölçüsü olabileceği rapor edilmiştir. Langmuir izoterminin önemli özellikleri boyutsuz bir sabit olan ayırma faktörü veya denge parametresi, Eşitlik 4.4'deki gibi  $R_L$  cinsinden belirtilebilir:

$$R_L = 1/(1 + bC_0) \quad (4.4)$$

$C_0$ : Başlangıç sitokrom c derişimi (M) ve  $b$  ( $1/K_d$ ) Langmuir adsorpsiyon denge sabitidir ( $M^{-1}$ ). Parametre Çizelge 4.1'e göre izoterm şeklini göstermektedir.

Çizelge 4.1. Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.

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

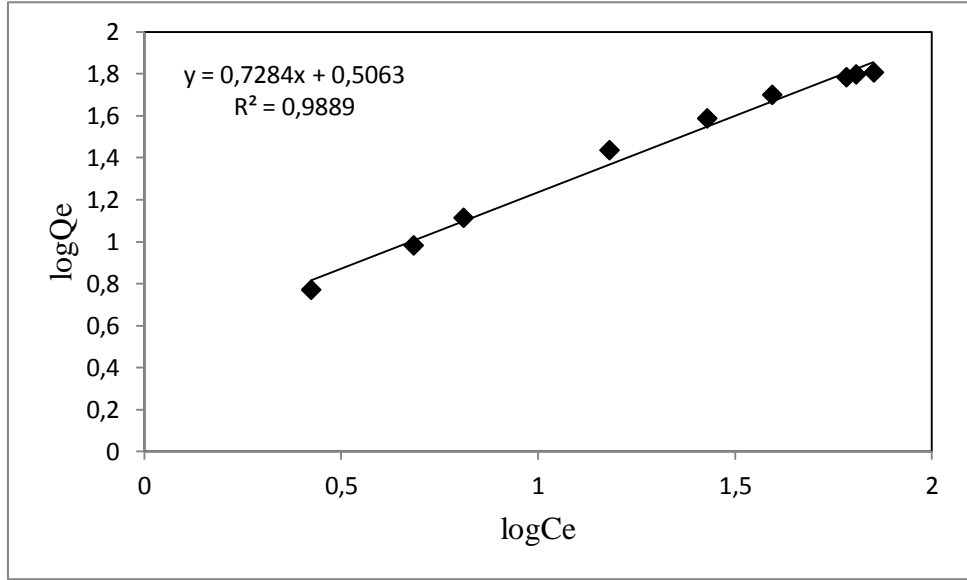
$\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonuna, protein başlangıç derişimleri için hesaplanan  $R_L$  değerleri çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi  $R_L$  değerlerinin 0 ile 1 arasında oluşu,  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı PHEMA partikül gömülü kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonunun istemli olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.2.** Langmuir eşitliğine dayalı  $R_L$  değerleri.

Sitokrom c derişimi (mg/mL)	$R_L$
0,1	0,9979
0,2	0,9958
0,3	0,9937
0,5	0,9896
1	0,9794
1,5	0,9694
2	0,9596
2,5	0,9501
3	0,9407

Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline göre çizilen grafik şekil 4.6'de gösterilmiştir. Ancak Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline göre yapılan hesaplamalarda  $R^2$  değerinin daha büyük (0,9968) olması, adsorpsiyonun Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu şeklinde yorumlanabilir.

Langmuir izotermi için hesaplanan denge parametresinin ( $R_L$ ) uyumlu olduğunu görmektedir. Buradan sitokrom c moleküllerinin  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü PHEMA bazlı kriyojel membranların homojen yüzeyine tek tabakalı olarak adsorplandıkları, adsorban üzerindeki adsorpsiyon aktif noktalarının homojen ve eşit enerjili oldukları sonucuna ulaşılabilir.



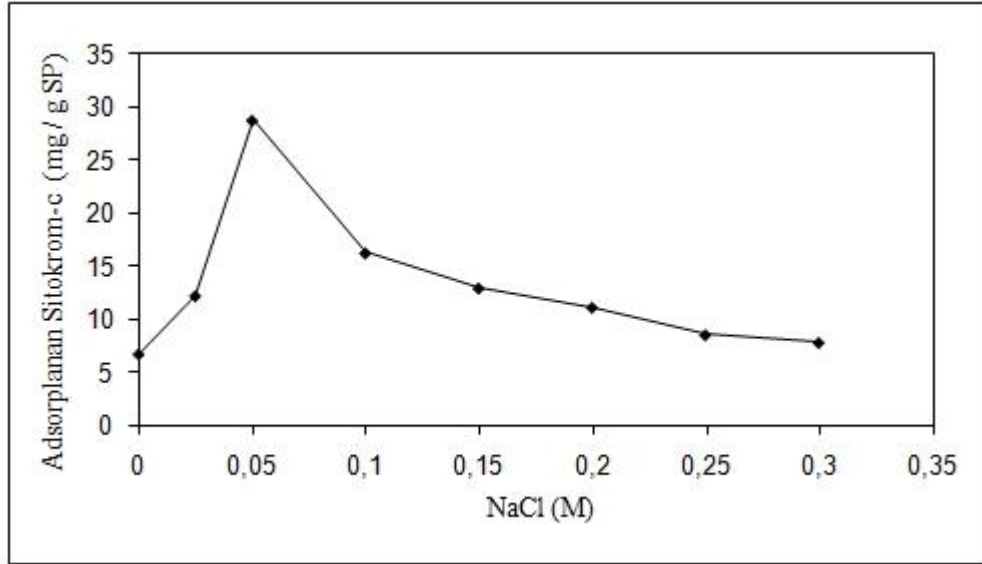
Şekil 4.6. Freundlich adsorpsiyon izotermi.

#### 4.2.4. Sitokrom c adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

$\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonuna tuz derişiminin (NaCl) etkisi de incelenmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, tuz derişimi artıkça sitokrom c adsorpsiyon kapasitesi 0,05 M NaCl tuz derişimine kadar biraz artış göstermiş, bu değerden sonra ise adsorpsiyon kapasitesi önemli oranda azalmıştır. Tuz derişimi 0,05 M değerinde iken sitokrom c adsorpsiyonu 28,77 mg/g SP olarak bulunmuştur. Yüksek iyonik şiddet ile bağlanma zayıflamaktadır (Şekil 4.7). Bu durum iki şekilde açıklanabilir:

1. Tuz iyonları yük-yük etkileşimine girerek bağlanma bölgelerini maskeleymektedirler.
2. İyonik şiddet arttıkça  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojeller ve sitokrom c 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.

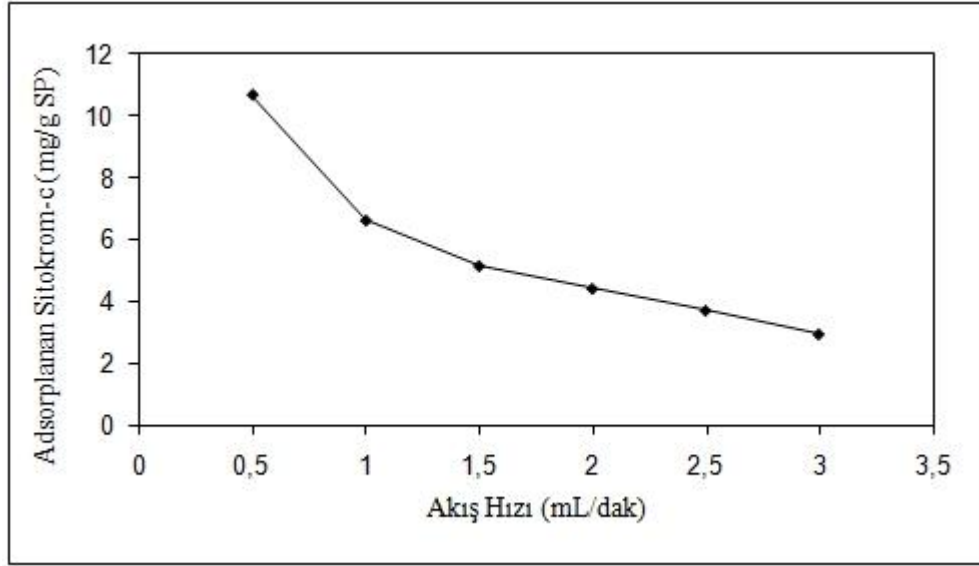




**Şekil 4.7.** Sitokrom c adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Sitokrom c derişimi: 0,04 mg/mL, pH 7 fosfat tamponu, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

#### 4.2.5. Sitokrom c adsorpsiyonuna akış hızının etkisi

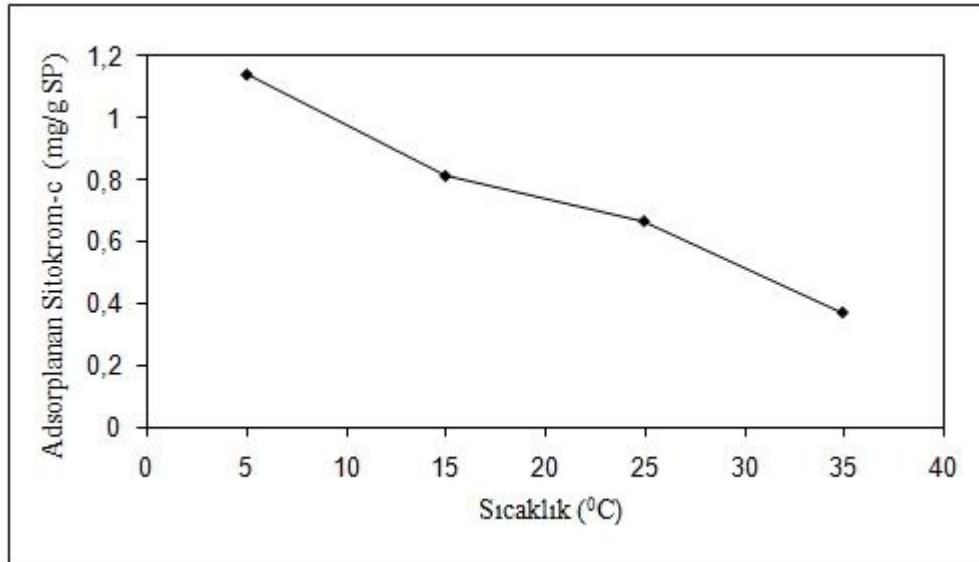
$\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojellere adsorplanan sitokrom c miktarına akış hızının etkisi Şekil 4.8'de verilmiştir. Akış hızının 0,5 mL/dk' dan 3 mL/dk' ya artmasıyla sitokrom c adsorpsiyon kapasitesi 10,69 mg/g'den 2,94 mg/g' a düşmektedir. Akış hızının artması ile birim 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 sitokrom c moleküllerinin kriyojel gözenek duvarlarına yayılması ve  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin bağlanması için yeterli süre alacağından daha iyi bir sitokrom c adsorpsiyon kapasitesi elde edilir. Ayrıca kolonun çalışması için kriyojel sürekli olarak taze bir sitokrom c çözeltisiyle etkileştirilmektedir. Sonuç olarak kolon içindeki  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojel tabakasıyla temasta olan çözelti içindeki sitokrom c derişimi nispeten sabittir. Ayrıca kriyojel yapısı içindeki makrogözenekler açık, birbirine bağlı ve geniş bir kanal oluşturacak şekildedir. Hareketli sitokrom c fazı, bu kanallardan geçerek sitokrom c moleküllerini konveksiyon yoluyla aktif bağlanma merkezlerine ( $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarına) taşır. Bu olay, hareketli sitokrom c fazı ile sabit  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojel fazı arasında hızlı bir şekilde kütle aktarılmasını sağlar.



**Şekil 4.8.** Sitokrom c adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Sitokrom c derişimi: 0,04 mg/mL, pH 7 fosfat tamponu, T: 25 °C

#### 4.2.6. Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5 °C – 35 °C arasında çalışıldı. Cu<sup>2+</sup>-takılı sporopollenin gömülü kriyojellere denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalmıştır ve maksimum adsorpsiyona 5 °C’de ulaşılmıştır (Şekil 4.9). Sıcaklığın artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde % 33 civarında azalma görülmüştür. Bunun olası nedeni ise adsorpsiyon prosesinin ekzotermik olması şeklinde açıklanabilir (Sarıkaya, 2000).



**Şekil 4.9.** Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Sitokrom c derişimi: 0,04 mg/mL, pH 7 fosfat tamponu, akış hızı: 1 mL/dk.

#### **4.2.7. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik**

Biyoafinite ayırmasının son basamağında amaç, adsorplanan proteinin en kısa sürede ve mümkün olan en yüksek derişimde desorplanmasıdır. Bu, her döngüden sonra afinite adsorbentlerinin rejenerasyon veriminin belirlenmesi için gereklidir. Bu çalışmada, adsorblanan sitokrom c'nin % 95'inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl kullanılarak 35 dakikada desorbe edildi. Desorpsiyon sonuçları, NaCl'ün, sitokrom c için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu gösterdi. Kriyojel kolonlarının tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için, adsorpsiyon-desopsiyon döngüsü, aynı kriyojeller kullanılarak 30 kez ardarda uygulanmıştır. Bu döngülerden sonra, kapasite % 7 oranında azalmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarından sonra ise kriyojellerin şeklinde açık bir değişim gözlenmedi. Bu sonuçlar ise bize var olan metal şelat afinite sorbentlerin kararlılığını gösterir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Sitokromlar elektron taşıyan proteinler olup, hemoglobin ve miyoglobindeki hem grubuna benzer şekilde porfirin halkasına bağlı demir atomu içerir. Mitokondri solunum zinciri birçok değişik tip sitokrom (a, a<sub>3</sub>, c, c<sub>1</sub>, b) içerir. Sitokrom c mitokondri iç zarından kolaylıkla izole edilebilen tek elektron taşıyıcı proteindir. Sitokrom c molekül kütlesi 12,4 kda olup, 104 amino asitten oluşan bir polipeptit zinciri ve proteine tiyoeter bağlarıyla kovalent olarak bağlanmış bir hem grubu içerir.

Yosun, eğrelti otu sporları ve birçok polen tanecikleri bir biyopolimer olan sporopollenini de içeren bir tabakaya sahiptir. Bu tabakaya sporoderm, exine denir. Sporopollenin enzimatik parçalanmalara ve kuvvetli asidik veya bazik ortamlardaki hidrolitik bozunmalara karşı oldukça dayanıklıdır. Sporopollenini tek tip bir makromolekül olarak tanımlamak mümkün değildir. Pteridophyta ve spermatophyta'dan türetilen sporopollenin üzerine yapılan infrared spektroskopisi ve <sup>13</sup>C NMR spektroskopisi çalışmaları, sporopolleninin yapısında alifatik, aromatik, hidroksil, karbonil/karboksil ve eter fonksiyonel gruplarının değişik oranlarda var olduğunu göstermiştir.

Metal şelat afinite kromatografisinin temel ayırma özelliği, proteinlerin geçiş metal iyonlarına olan yüksek ilgisidir. Çok sayıda geçiş metal iyonu (özellikle Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup>) protein zincirinde bulunan histidin, sistein ve triptofan gibi aminoasitlere bağlanabilirler. Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında;

- Sitokrom c proteininin sulu çözeltiden adsorpsiyonu için, immobilize metal afinite membranları (İMAM) sentezlenmiştir.
- Bunun için sporopolleninin taneciklerine Cu<sup>2+</sup> metal iyonunu içeren çözelti ile etkileştirilmesiyle, sporopollenin ve Cu<sup>2+</sup> arasında, koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı ve hazırlanan Cu<sup>2+</sup> takılı sporopolleninin kriyojele gömülmesiyle sitokrom c'ye spesifik, Cu<sup>2+</sup>-takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA monolitik afinite kriyojeller hazırlanmıştır.
- Sporopollenin yapısında bulunan aromatik, fenolik, hidroksil, karboksil/karbonil gruplarının metal iyonlarının bağlanmasında başlıca rol aldığı düşünülmektedir.
- Sporopollenine şelatlanmış Cu<sup>2+</sup> miktarı 14,1 mg/g SP olarak ölçülmüştür.
- Sporopolleninden Cu<sup>2+</sup> sızması hiçbir adsorpsiyon/desorpsiyon deneyinde tespit edilmemiştir, bu da yıkama işleminin Cu<sup>2+</sup> - takılı sporopolleninden nonspesifik Cu<sup>2+</sup> iyonlarını uzaklaştırmada yeterli olduğunu göstermiştir.

- $\text{Cu}^{2+}$  takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli monolitik PHEMA afinite kriyojeller hidrofilik yapıda matrikslerdir.
- $\text{Cu}^{2+}$  takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojeli için makrogözenek miktarı % 63,28 olarak bulunmuştur.  $\text{Cu}^{2+}$ - takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojellerin denge şişme oranı ise 5,5g  $\text{H}_2\text{O}$ /g polimer olarak bulunmuştur.
- PHEMA kriyojeller, geniş akış kanallarına, süpermakrogözeneklere, düşük basınç düşmesi ve kısa difüzyon yolu gibi özelliklere sahiptir. Ancak düşük adsorpsiyon kapasitesine sahiptirler.  $\text{Cu}^{2+}$ - takılı sporopollenin gömülerek yüzey alanının ve dolayısı ile adsorpsiyon kapasitesinin artırılması sağlanmıştır.
- Kriyojelin iç yapısının taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri alınmıştır.  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojeller; gözenekli ve ince polimerik duvarlara ve hareketli fazın kolaylıkla akabildiği bağlantılı geniş gözeneklere (10 - 50  $\mu\text{m}$  çap aralığında) sahiptirler. SEM fotoğrafları gösteriyor ki,  $\text{Cu}^{2+}$ - takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli PHEMA kriyojel yüzeyine düzenli bir şekilde dağılmıştır.
- Matriksin gözenek boyutu, sitokrom c moleküllerinin boyutundan büyüktür ve böylece moleküller kolaylıkla gözeneklerden geçebilmektedir. Hareketli fazın gözeneklerde konvektif akışı nedeniyle kütle aktarım direnci pratik olarak ihmal edilebilir derecededir.
- Kriyojellerin karakterizasyonu tamamlandıktan sonra sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sitokrom c adsorpsiyonuna pH'nın etkisi araştırılmış ve maksimum sitokrom c adsorpsiyonu pH 7 fosfat tamponunda 6,65 mg/g SP olarak bulunmuştur.
- $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonuna sitokrom c başlangıç derişiminin etkisi incelenmiş ve maksimum sitokrom c adsorpsiyonu 3 mg/mL'de 64,16 mg/g SP olarak bulunmuştur.
- Langmuir adsorpsiyon modeli ile  $q_m$ ,  $K_d$  ve  $R^2$  değerleri sırasıyla 107,5 mg/g ve 45,3 mg/mL, 0,9968 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir.
- $\text{Cu}^{2+}$ - takılı farklı miktarlarda sporopollenin gömülü (5 mg, 10 mg ve 15 mg) kriyojellere sitokrom c adsorpsiyon miktarları incelenmiştir. Sulu ortamdan uzaklaştırılan sitokrom c miktarı, kriyojellerdeki  $\text{Cu}^{2+}$ - takılı sporopollenin artan miktarı ile artmış ve 15 mg  $\text{Cu}^{2+}$  - takılı sporopollenin varlığında en yüksek

değerine ulaşmıştır. Bu yüzden bütün deneylerde, 15 mg  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojeller kullanılmıştır.

- $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojellere sitokrom c adsorpsiyonuna tuz derişiminin (NaCl) etkisi de incelenmiştir. Yüksek iyonik şiddet ile bağlanmanın zayıfladığı gözlenmiştir.
- $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojellere adsorplanan sitokrom c miktarına akış hızının etkisi incelenmiştir ve akış hızının 0,5 mL/dk' dan 3 mL/dk' ya artmasıyla sitokrom c adsorpsiyon kapasitesinin 10,69 mg/g'dan 2,94 mg/g'a düştüğü tespit edilmiştir.
- Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5 °C - 35 °C arasında incelenmiştir.  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü kriyojellere denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalmıştır ve maksimum adsorpsiyona 5 °C'de ulaşılmıştır.
- Sitokrom c'nin % 95'inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl kullanılarak 35 dakikada desorbe edilmiştir. Desorpsiyon sonuçları, NaCl'ün, sitokrom c için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu göstermiştir.
- Yapılan çalışmalar sonucunda; sentezlenen  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü PHEMA kriyojellerin, literatürde yer alan immobilize metal afinite çalışmalarıyla kıyaslanabilecek ölçüde, protein adsorpsiyon performansına ulaştığı görülmüştür. Buna ilaveten, spesifik olmayan adsorpsiyonun ise düşük olduğu bulunmuştur.
- Sitokrom c'nin, kriyojellerden desorpsiyonunun yüksek oranda olması ve kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olması, önemli bir avantaj olarak tespit edilmiştir.
- Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan,  $\text{Cu}^{2+}$ -takılı sporopollenin gömülü süpermakrogözenekli monolitik PHEMA afinite kriyojeller ile sulu çözeltiden sitokrom c adsorpsiyonu etkin bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Adamson, R., Gregson, S., Shaw, G., 1983. New application of sporopollenin as a solid phase support for peptide synthesis and the use of sonic agitation, *Int. J. Peptide and Protein Research*, 22, 560.
- Ahlers, F., Bubert, H., Stevernagel, S., Wiermann, K., 2000. The nature of oxygen in sporopollenin from the pollen of *typha angustifolia*, *Zeitschrift für Naturforschung*, 55C, 129.
- Akkaya, B., Uzun, L., Candan, F, Denizli, A., 2007. N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester carrying porous magnetic beads for metal chelate adsorption of cytochrome c, *Materials Science and Engineering C* 27, 180-187.
- Akgöl, S., Denizli, A., 2004. Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption, *J. Mol. Catal. B-Enzym*, 28, 7-14.
- Alkan, M.H., 2009. Romatoid artrit tedavisine yönelik protein-A takılı poli(HEMA) kriyojellerin hazırlanması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Al-Mashiki SA, Nakai S., Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. *J. Dairy Sci.* 1988;71:174
- Apezteguia I, Calligaris R, Bottardi S, Santoro C., Protein expression Purif 1994; 5:541-6.
- Arnold, F.H., 1991. Metal-affinity separations - a new dimension in protein processing, *Bio. Technol.*, 9, 151.
- Arıca, M.Y., Testereci H.N., ve Denizli, A., 1998. Dye–ligand and metal chelate poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for affinity separation of proteins, *J. Chromatogr. A*, 799, 83-91.
- Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., 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, 275-290.
- Ball, W., Kozłowski, H., Kasprzak, K.S., 2000. Molecular models in nickel carcinogenesis, *J. Inorg. Biochem.*, 79, 213-218.
- Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev., I. Y., Denizli, A., 2008. Supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles, *React. Funct. Polym.*, 69, 36-42.
- Bayramoğlu, G., Loğoğlu, E., Arıca, M.Y., 2007. Cytochrome c adsorption on glutamic acid ligand immobilized magnetic poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) beads, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 297, 55-62.

- Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E.B., Yavuz, H., Denizli, A., 2010. Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G, *Mater. Sci. Eng. C*, 30, 323-329.
- Bohne, G., Richter, E., Woehlecke, E.R., 2003. Exchange of submicrometer particles, polymers and low-molecular-weight solutes with tripartite sporopollenin microcapsules prepared from pine pollen, *Annals of Botany*, 92, 289.
- Ceylan, Ş., 2011. PHEMA mikroküre gömülü süpamakrogözenekli kriyojel kompozit membranların üretilmesi ve protein adsorpsiyon kapasitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Chaga, G.S., 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography, past, present and future, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 313-334.
- Chen, J., Jo, S., Park, K., 1995. Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery, *Carboh. Polym.*, 28, 69-76.
- Collangeli, R., Heijbel, A., Williams, A.M., Manca, C., Chan, J., Lyashchenko, K., 1998. Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of mycobacterium tuberculosis, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 714, 223-235.
- Comiskey, B., Albert, J.D., Yoshizawa, H., Jacobsan, J., 1998. An electrophoretic ink for all-printed reflective electronic displays, *Nature*, 394, 53.
- Çengelöglü, Y., Mecimek, B., Kara, H., Ersöz, M., 1998. Sorption of target anions by ligand exchange, *J. Appl. Polym. Sci.*, 69, 771.
- Çimen, D., Denizli, A., 2012. Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 29-35.
- Davankov, V.A., Semechkin, A.V., 1977. Ligand-exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, 141, 313-353.
- Denizli, A., Pişkin, E., 2001. Dye-ligand affinity systems, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 49, 391-416.
- Denizli, A., Küfrevioğlu, İ.Ö., 2010. Protein kromatografisi ve yeni nesil polimerik sistemler, Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Ehwald, R., Bohne, G., Richter, E., Woehlecke, H., Lerche, D., Permeability of sporopollenin capsules prepared from birch and pine pollen, *Proceedings of the X. International BRG Workshop on Bioencapsulation "Cell Physiology and Interactions of Biomaterials and Matrices"*, pp 123-126, 26-28 April 2002, Prague, Czech Republic.
- El-Rassi, Z., Horvath, C., 1986. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support, *J. Chromatogr.*, 6, 360.



- Emir, S., Say, R., Yavuz, H., Denizli., 2004. A new metal chelate affinity adsorbent for cytochrome c, *Biotechnol. Prog.*, 20, 223-228.
- Ersöz, M., Pehlivan, E., Yıldız, S., 1989. Ligand-exchange chromatography of nucleosides, nucleic acid bases and amines on copper (II) glyoximated-lycopodium clavatum with refractive index detection, *Anal. Lett.*, 22(7), 1829.
- Erzengin, M., Ünlü, N., Odabaşı, M., 2010. A novel adsorbent for protein chromatography: supermacroporous monolithic cryogel embedded with  $\text{Cu}^{2+}$ -attached sporopollenin particles, *J. Chromatogr. A*, 1218, 484-490.
- Ghosh, R., 2004. Separation of human albumin and IgG by a membrane-based integrated bioseparation technique involving simultaneous precipitation, microfiltration and membrane adsorption, *J. Membr. Sci.*, 237, 109-117.
- Grisshammer, R., Tucker, J., 1997. Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography, *Protein Express. Purif.* 11, 53-60.
- Hanes, C.S., 1932. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, *J. Biochem.*, 26, 1406-1421.
- Hansen, P., Lindeberg, G., Andersson, L., 1995. Immobilized metal ion affinity chromatography of synthetic peptides. Binding via the alpha-amino group, *J. Chromatogr.*, 627, 125-135.
- Helfferrich, F., 1961. Ligand exchange: a novel separation technique, *Nature*, 189, 1001-1002.
- Hemdan, E.S., Porath, J., 1985. Development of immobilized metal affinity chromatography, 1. comparison of 2 iminodiacetate gels, *J. Chromatogr.*, 323, 247-254.
- Hemdan, E.S., Zhao, Y.J., Sulkowski, E., Porath, J., 1989. Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 1811-1815.
- Hentze, H.P., Antonietti, M., 2002. Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 90, 27-53.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Doebeli, H., Gentz, R., Stueber, D., *Bior Technologi*, 1988, 1321-1325.
- Kabiri, K., Omidian, H., Zohuriaan-Mehr, M., 2003. Novel approach to highly porous superabsorbent hydrogels: synergistic effect of porogens on porosity and swelling, *J. Polymer Int.*, 52, 1158- 1164.
- Keha, E., Küfrevioğlu, İ., *Biyokimya*, 1997. Sekizinci Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum.

- Krishnamurthy, R., Madurawe, R.D., Bush, K.D., Lumpkin, J.A., 1995. Conditions promoting metal-catalyzed oxidations during immobilized Cu-iminodiacetic acid metal affinity chromatography, *Biotechnol. Prog.*, 11, 643–650.
- Kroken, S.B., Ctraham, L.E., Cook, M.E., 1996. Occurrence and evolutionary significance of resistant cell walls in charophytes and bryophytes, *American J. Botany.*, 83, 1241.
- Labrou, N. E., Karagouni, A., Clonis, Y. D., 1995. Biomimetic-dye affinity adsorbents for enzyme purification: application to the one-step purification of candida boidinii formate dehydrogenase, *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 278.
- Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.*, 40, 1361-1403.
- Leo, C., Nelson, P., Kain, S., Yang, T., 1996. Talon resin offers 6xhis protein purification under native conditions using  $\beta$ -mercaptoethanol as a reducing agent, *Clontechiques*, 19.
- Liesiene, J., Racaityte, K., Morkeviciene, M.P., Bumelis, V., 1997. Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone effect of ligand density, *J. Chromatogr. A.*, 764, 27–33.
- Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., 1997. Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions, *Biotech.*, 22, 140-149.
- Ljungquist, C., Breitholtz, A., Brink-Nilsson, H., Moks, T., Uhlen, M., Nilsson, B., 1989. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions, *Eur. J. Biochem.*, 18, 563-569.
- Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.*, 10, 445-451.
- Lönnerdal, B.O., Keen, C., 1982. Metal chelate affinity chromatography of proteins, *J. Appl. Biochem.*, 4, 203-208.
- Mackenzie, C.T., Shaw, G., 1980. Sporopollenin, *Int. J. Peptide and Protein Research*, 15, 298.
- Martell, A.E., Hancock, R.D., 1996. Metal complexes in aqueous solutions, Chapter 5, 160, Springer, Netherland.
- Martin, J.T., Juniper, B.E., 1970. *The cuticles of plants*, R. and R. Clark Ltd., Edinburgh.
- Murphy, J.C., White, K.I., Willson, R.C., 2000. Nucleic acid separation using immobilized metal affinity chromatography, ACS national meeting in San Francisco, 26-30.

- Odabaşı, M., Uzun, L., Denizli, A., 2004. Porous magnetic chelator support for albumin adsorption by immobilized metal affinity separation, *J. Appl. Poly. Sci.*, 93, 2501-2510.
- Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A., 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Mat. Sci. Eng. C*, 27, 90-99.
- Ohkubo, I., Kondo, T., Taniguchi, N., 1980. Purification of nucleoside diphosphatase of rat liver by metal-chelate affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta.*, 616, 89-93.
- Otto, A., Birkenmeier, G., 1993. Recognition and separation of isoenzymes by metal chelates, immobilized metal ion affinity partitioning of lactate dehydrogenase isoenzymes, *J. Chromatogr.*, 644, 25-33.
- Panping, X., Yuchen, Y., Shaochuan, S., Junxian, Y., Kejan, Y., 2010. Preparation of supermacroporous composite cryogel embedded with SiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Chinese J. Chem. Eng.*, 18, 667-671.
- Pehlivan, E., 1991. *Lycopodium clavatum*'dan elde edilen ligand değiştirici reçinelerin hazırlanması ve sıvı kolon kromatografisinde kullanılarak nükleosid, nükleik asit bazları, aminlerin ayrılması ve kinetiğinin incelenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Piffanelli, P., Ross, J.H.E., Murphey, D.J., 1998. Biogenesis and function of lipidic structures of pollen grains, *Sex Plant Report*, 11, 65.
- Plieva, F., Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2004. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor, *J. Sep. Sci.*, 27, 828-836.
- Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303-309.
- Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergenthil, B., Mattiasson, B., 2006. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure, *J. Mater. Chem.*, 16, 4065-4073.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *J. Sep. Sci.*, 30, 1657- 1671.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*, 258, 598-599.
- Porath, J., Olin, B., 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biometarials, serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions, *Biochem.*, 22, 1621-1630.
- Ramadan, N., Porath, J., 1985. Fe<sup>3+</sup>-hydroxamate as immobilized metal affinity-adsorbent for protein chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 321, 93-104.

- Sarıkaya E., 2000. Determination of Starch Hydrolysis Splits by Bacillus  $\alpha$ -Amylase Enzyme Depend on Time. *Biyoteknoloji*, 24(2):15-19.
- Schafer, F., Blümer, J., Römer, U., Steinert, K., 2000. Ni-NTA for large-scale IMAC processes systematic investigation of separation characteristics, storage and CIP conditions, and leaching, *Qiagen News*, 11-15.
- Smith, M.C., Furman, T.C., Ingolia, T.D., Pidgeon, C., 1998. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography, a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins, *J. Biol. Chem.*, 263, 7211-7215.
- Southworth, D., 1974. Solubility of pollen, exines, *American J. Botany*, 61, 36.
- Suen, S.Y., Liu, Y.C., Chang, C.S., 2003. Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species, *J. Chromatogr. B.*, 797, 305-319.
- Sulkowski, E., 1985. Purification of proteins by IMAC, *Trends Biotechnol.*, 3, 1-7.
- Sulkowski, E., 1996. Immobilized metal-ion affinity chromatography, imidazole proton pump and chromatographic sequelae, I. Proton pump, *J. Mol. Recognit.*, 9, 389-393.
- Sulkowski, E., 1996. Immobilized metal-ion affinity chromatography, imidazole proton pump and chromatographic sequelae, II. Chromatographic sequelae, *J. Mol. Recognit.*, 9, 494-498.
- Telefoncu, A., *Enzimoloji*, 1998. Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Basımevi, İzmir.
- Türkmen, D., Yavuz, H., Denizli, A., 2006. Synthesis of tentacle type magnetic beads as immobilized metal chelate affinity support for cytochrome *c* adsorption, *International Journal of Biological Macromolecules*, 38, 126-133.
- Ueda, E.K.M., Gout, P.W., Morganti, L., 2003. Current and prospective applications of metal ion-protein binding, *J. Chromatogr. A*, 988, 1-23.
- URL-1, <http://alevelnotes.com/Protein-Structure/61>
- URL-2, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-07.pdf>
- URL-3, <http://schoolworkhelper.net/2010/11/protein-structures-primary-secondary-Tertiary-quaternary/>
- Uzun, L., Yavuz, H., Say, R., Ersöz, A., Denizli, A., 2004. Poly(ethylene dimethacrylate glycidyl methacrylate) monolith as a stationary phase in dye-affinity chromatography, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 43, 6507-6513.
- Ünlü, N., 2004. Bazı toksik metallerin fonksiyonel grup bağlanmış sporopollenin üzerine adsorpsiyonlarının optimizasyonu ve termodinamik özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Ünlü, N., Ersöz, M., 2006. Adsorption characteristics of heavy metal ions onto a low cost biopolymeric sorbent from aqueous solutions, *J. Hazard. Mater.*, 136, 272-280.
- Vural, U.S., Ersöz, M., Pehlivan, M., 1995. Ligand sorption kinetics of aromatic amines on new ligand-exchanger sporopollenin in cobalt form, *J. Appl. Poly. Sci.*, 58, 2423.
- 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.
- Wilmesmeier, S., Steuernagel, S., Wiermann, R., 1993. Comparative FTIR and <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopic investigations on sporopollenin for different systematic origins, *Zeitschrift für Naturforschung*, 48, 697.
- Woehlecke, H., Lerche, D., Ehwald, R., 2002. Sporopollenin microcapsules-application for chromatography and encapsulation, *Proceedings of the X. International BRG Workshop on Bioencapsulation "Cell Physiology and Interactions of Biomaterials and Matrices"*, pp 183-186, 26-28 April, Prague, Czech Republic Poster P-19, 183-186.
- Wong, J.W., Albright, R.L., Wang, N.H., 1991. Immobilized metal-ion affinity chromatography: chemistry and bioseparation applications, *Sep. Purif. Meth.*, 20, 325-330.
- Wu, C.Y., Suen, S.Y., Chen, S.C., Tzeng, J.H., 2003. Analysis of protein adsorption on regenerated cellulose-based immobilized copper ion affinity membranes, *J. Chromatogr. A.*, 996, 53-70.
- Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochem. Eng. J.*, 43, 272-279.
- Zoroddu, M. A., Kowalik, J. T., Kozłowski, H., Molinari, H., Salnikow, K., Broday, L., 2000. Interaction of Ni(II) and Cu(II) with a metal binding sequence of histone H4: akhrk, a model of the H4 tail, *Biochim. Biophys. Acta*, 1475, 163-168.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Mehmet GEDİKLİ

**Doğum Yılı** : 26.01.1974

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lisans** : Selçuk Üniversitesi; 1993-1997

**Yüksek Lisans** : Aksaray Üniversitesi; 2009-2012

### **İletişim Bilgileri**

**Adres** : Paşacık mah. Atatürk Bulvarı Birlik apt. Kat:4 No:14  
Aksaray

**Telefon** : 05057888276

**E-posta** : mehmetgedikli@mynet.com

Mehmet GEDİKLİ	YÜKSEK LİSANS TEZİ	2012
----------------	--------------------	------