



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAKTERİYEL KÖKENLİ EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMERLERİN
PROTEİN ADSORPSİYON DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ İÇİN
İMAK UYGULAMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurullah BANİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2018



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAKTERİYEL KÖKENLİ EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMERLERİN
PROTEİN ADSORPSİYON DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ İÇİN
İMAK UYGULAMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurullah BANİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2018

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 152305402 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Nurullah BANİ tarafından hazırlanan "BAKTERİYEL KÖKENLİ EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMERLERİN PROTEİN ADSORPSİYON DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ İÇİN İMAK UYGULAMALARI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~



Üye: Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

Erciyes Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~



Üye: Dr. Öğrt. Üyesi Erkut YILMAZ

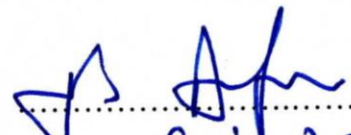
Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum.~~



Tez Savunma Tarihi: 19/07/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.


Prof. Dr. Engin DELİGÖZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

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



Nurullah BANI

ÖNSÖZ

Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin son zamanlardaki büyük gelişimi, geniş çapta proteinler ile yapısında protein bulunduran enzimlerin, hormonların, tamamlayıcı nükleik asit zincirleri ve antikor gibi yapıların saflaştırılması, üretilmesi ve orijininin farklı şekillerde kullanıma geçilmesinde çok hızlı ilerleme sağlamıştır. Bu gelişmeler vücut sıvılarından, sıvı kültürlerden, serum yapısındaki biyolojik sıvılardan veya laboratuvar ortamında üretilmiş organizmalardan protein ve yapısında protein bulunan enzim, hormon vb. yapıların saflaştırılmasıyla kromatografik yöntemlerle yapılmaktadır. Kromatografi, karmaşık yapıdaki karışımlarda birbirine yakın niteliğe sahip maddeleri ayırmak üzere kullanılan çeşitli sayıda metodu içerisinde bulundurmaktadır. Bu metodlar arasında afinite kromatografisi önemli bir yer teşkil eder. Afinite kromatografisi, saflaştırılması istenen hedef molekülün veya biyolojik yapının seçici olarak afinite destek materyali üzerinde bulunan liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir ayırma metodudur. Afinite kromatografisinde yalancı spesifik ligandlar olarak özellikle boyalar, amino asitler ve metal şelatlar biyospesifik ligandların yerine kullanılmaktadır. Metal şelat afinite kromatografisinde ise katı yapıdaki destek malzemesine kovalent olacak şekilde tutunan metal iyonlarına, ortamdaki istenen moleküllerin etkileşimiyle molekülün adsorbente tutunmasını sağlamaktadır. Afinite membran metodları çoğunlukla; molekülün yüzeyinde bulunan histidin, sistein, triptofan, tirozin ve polihistidin gibi aminoasitler bulunduran kuyruklu biyomolekülleri içeren genellikle proteinlerin saflaştırılmasında genellikle kullanılan yöntem 'İmmobilize Metal Afinite Membranları'dır (İMAM). Avantaj olarak bu metodun ön plana çıkması, sabitlenmiş metal iyonları ile biyolojik yapıların yüzeyinde yer alan bu aminoasitlere spesifik bir ilgi duymasından ve tutunmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir avantajı ise immobilize metal afinite membranlarının basit şekilde sentezlenmesi ve tekrar tekrar kullanılmasına rağmen protein ayrıştırılması ve saflaştırılması çalışmalarında yapısında fazla bir bozulma olmadan kullanılabilmesidir. Metal şelat afinite kromatografisinde, çok zor olan çok sayıda saflaştırma gerektiren prosedürü kısa zamanda yerine getirmekte ve yüksek verimle hedef molekülün saflaştırılarak elde edilmesine imkân sunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bilime ve hayata bakış açısı ile bize ışık tutan ve bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, Prof. Dr. Fatma GÜRBÜZ'e bilgilerinden her zaman faydalandığımız Ömür ACET'e, Dr. Demet ERDÖNMEZ'e, Burcu ÖNAL'a ve Sema AKAY'a, tüm arkadaşlarıma, hayatım boyunca her konuda yanımda olan aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurullah BANİ
AKSARAY, 2018



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Afinite Kromatografisi	1
1.2 Afinite kromatografisinin tamamlayıcı unsurları.....	3
1.2.1 Matriks	4
1.2.2 Ligandlar	5
1.2.2.1 Biyospesifik ligandlar	6
1.2.2.2 Sentetik ligandlar	6
1.2.2.3 Psödospesifik (Yalancı) ligandlar	6
1.2.3 Uzatici kol	7
1.3 İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK)	7
1.4 Afinite kromatografisini etkileyen hususlar ve uygulamaları.....	9
1.5 Ekstraselüler polimerik maddeler (EPS).....	9
1.6 α -Amilaz.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MALZEME VE YÖNTEM	14
3.1 Malzemeler.....	14
3.2 Yöntem.....	14
3.2.1 EPS üretimi	14
3.2.2 EPS katkılı polimer membranların (EPS-PM) sentezi.....	14
3.2.3 EPS katkılı polimer membranlara (EPS-PM) Cu^{2+} iyon immobilizasyonu	15
3.2.4 Karakterizasyon çalışmaları	16
3.2.4.1 Şişme testleri	16
3.2.4.2 Yüzey alanı ölçümleri	16
3.2.5 Sulu ortamdan α -amilaz adsorpsiyonu.....	17
3.2.6 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	19
4.1 EPS-PM ile EPS Katkısı Polimer Membran Karakterizasyonu	19
4.1.1 Şişme testleri	19
4.1.2 EPS katkılı ve EPS'siz polimerik membranların SEM analizleri	20
4.2 Adsorpsiyon Çalışmaları	21
4.2.1 pH'nın etkisi	21
4.2.2 Başlangıç derişiminin etkisi	21
4.2.3 Adsorpsiyon izotermeleri.....	22
4.2.4 İyonik şiddetin etkisi	26
4.2.5 Sıcaklığın etkisi.....	27
4.2.6 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	33

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKTERİYEL KÖKENLİ EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMERLERİN PROTEİN ADSORPSİYON DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ İÇİN İMAK UYGULAMALARI

Nurullah BANİ

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

İkinci Danışman: Prof. Dr. Fatma GÜRBÜZ

ÖZET

Bu çalışmada, endüstriyel açıdan son derece önemli bir enzim olan α -amilazın efektif bir yöntemle ortamdan saflaştırılması için afinite kromatografisi metotlarından popüler bir yöntem olan immobilize metal afinite kromatografisinden (İMAK) yararlanılmıştır. Polimerizasyon için, monomer olarak poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), ko-monomer olarak glisidil metakrilat (GMA), çapraz bağlayıcı olarak N,N' -metilen-bis-akrilamid, metal bağlayıcı olarak ekstraselüler polimerik maddeler (EPS), başlatıcı/aktivatör olarak N,N,N',N' -tetrametilen diamin (TEMED)/amonyum persülfat (APS) ve gözenek oluşturucu olarak da etanol kullanılmıştır. Radikal kopolimerizasyon yöntemiyle PHEMA bazlı kompozit membranlar, petri kabında sentezlenmiştir. Daha sonra Cu^{2+} iyonları membranlara EPS'ler üzerinden takılmıştır. Hazırlanan Cu^{2+} -takılı EPS katkılı membranlar taramalı elektron mikroskobu (SEM), şişme testleri ile karakterize edilmiştir. Sulu ortamdan α -amilaz adsorpsiyonuna pH'nın, α -amilaz başlangıç derişiminin, sıcaklık ve iyonik şiddet gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Cu^{2+} -takılı EPS katkılı polimer membranlar üzerine (Cu^{2+} -EPS-EM) en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 25°C'da pH 5 sodyum asetat tamponunda, 2 mg/mL'lik başlangıç α -amilaz derişiminde 54,2 mg/g polimer, olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Cu^{2+} -EPS-PM üzerine enzimin defalarca adsorplanıp desorplanabildiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Afinite, α -amilaz, Membran, İMAK, Adsorpsiyon, Ekstraselüler Polimerik Maddeler (EPS).

Temmuz, 2018; 33 sayfa

M.Sc. THESIS

**IMAC APPLICATIONS FOR THE INVESTIGATION OF PROTEIN
ADSORPTION BEHAVIORS OF BACTERIAL ORIGINATED
EXTRACELLULAR BIOLOPOLIMERS**

Nurullah BANİ

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

Co- Supervisor: Prof. Dr. Fatma GÜRBÜZ

ABSTRACT

In this work, IMAC, a popular method of affinity chromatography, has been utilized effectively, for the purification of α -amylase, which is an important enzyme industrially. For the polymerization, poly (2-hydroxyethyl methacrylate) as monomer, glycidyl methacrylate (GMA) as co-monomer, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide as crosslinker, extracellular polymeric materials (EPS) as metal binding, *N,N,N',N'*-tetramethylenediamine (TEMED)/ammonium persulfate (APS) as activator/initiator and ethanol as porogen were used. PHEMA based composite membranes were synthesized in the petri dish by radical copolymerization method. Then, Cu^{2+} ions were attached to the membranes via EPSs. Prepared Cu^{2+} attached EPS-mixed membranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM), swelling tests. The influence of parameters such as pH, α -amylase starting concentration, temperature, and ionic strength in α -amylase adsorption from aqueous medium is investigated. The highest adsorption capacity on Cu^{2+} attached-EPS mixed polymer membranes (Cu^{2+} -EPS-PM) was determined as 54,2 mg /g polymer at pH 5 sodium acetate buffer at 25°C in an initial α -amylase concentration of 2 mg/mL. Furthermore, it has been determined that the enzyme can be adsorbed and desorbed repeatedly on Cu^{2+} -EPS-PM.

Keywords: Affinity, α -amylase, Membrane, IMAC, Adsorption, Extracellular Polymeric Materials (EPS).

July, 2018; 33 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1:	Afinite kromatografisi aşamalarının şematik gösterimi.....	1
Şekil 1.2:	Afinite kromatografisi tamamlayıcı unsurlarının şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.3:	İmmobilize metal afinite kromatografisi şematize gösterimi.....	8
Şekil 1.4:	Ekstraselüler polimerik maddeler (EPS).	9
Şekil 1.5:	α -amilazın üç boyutlu yapısı.....	11
Şekil 3.1:	EPS katkılı polimer membran.....	15
Şekil 3.2:	EPS katkılı polimer membran diskler.....	15
Şekil 3.3:	EPS katkılı polimer membran disklere Cu^{2+} bağlanması.....	16
Şekil 4.1:	EPS'li ve EPS'siz mernbranların zamana karşı bağıl şişme testleri.....	19
Şekil 4.2:	EPS katkılı (A) ve EPS'siz (B) polimerik membranların SEM görüntüleri.	20
Şekil 4.3:	α -amilaz adsorpsiyonuna pH'nın etkisi; pH 4-5 Asetat tamponu pH 6-8 Fosfat tamponu; α -amilaz derişimi: 0.5 mg/mL, Rotatör hızı: 12 rpm/dk., T:25°C.....	21
Şekil 4.4:	α -amilaz adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi; pH 5 Asetat tamponu, Rotatör hızı: 12 rpm/dk., T: 25°C.....	22
Şekil 4.5:	Cu^{2+} takılı EPS-PM'nin α -amilaz için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	24
Şekil 4.6:	Cu^{2+} takılı EPS-PM'nin α -amilaz için Freundlich adsorpsiyon izotermi....	25
Şekil 4.7:	α -amilaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. α -amilaz derişimi: 0,5 mg/mL, pH 5 Asetat tamponu, Rotatör hızı: 12 rpm/dk T: 25 °C.....	27
Şekil 4.8:	α -amilaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. α -amilaz derişimi: 0,5 mg/mL, pH 5 Asetat tamponu, Rotatör hızı: 12 rpm/dk.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1:	Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler.	2
Çizelge 1.2:	Afinite kromatografisinde kullanılan farklı matrisler.....	5
Çizelge 4.1:	α -amilazın Cu^{2+} takılı EPS-PM için Langmuir ve Freundlich izoterm verileri.....	25
Çizelge 4.2:	Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.....	26
Çizelge 4.3:	Langmuir eşitliğine bağlı R_L değerleri.....	26



SİMGELER VE KISALTMALAR

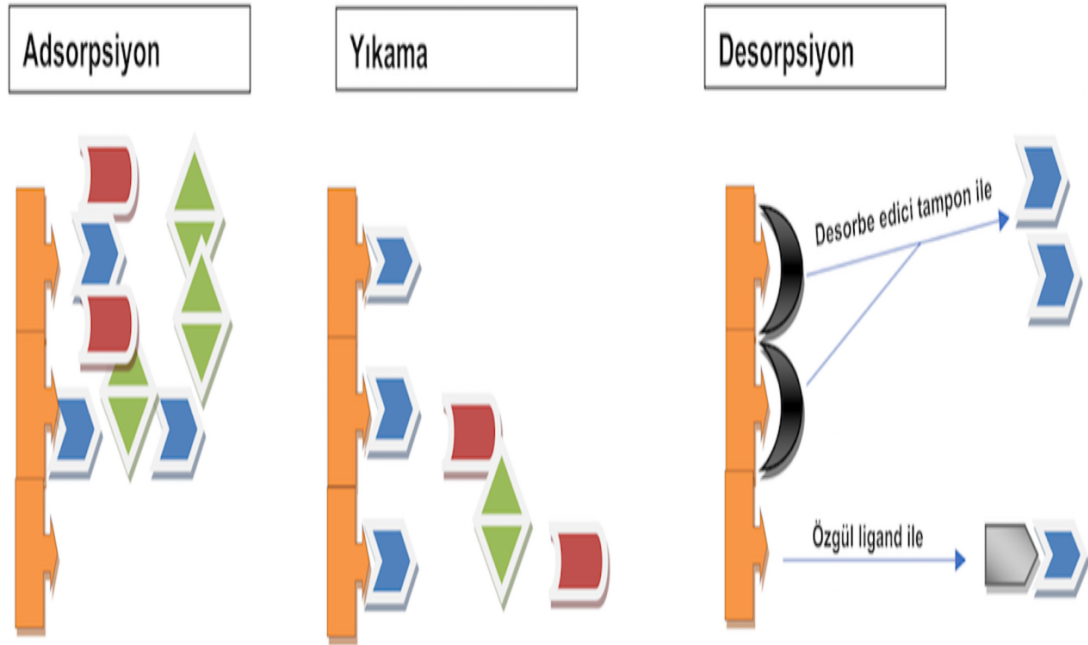
AAm	Akrilamid
APS	Amonyum Persülfat
BET	Yüzey Karakterizasyon Cihazı
cm	Santimetre
Cu²⁺-EPS-PM	Cu ²⁺ takılı EPS katkılı polimer membran
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
EPS-PM	Ekstra Selülerik Polimerik madde katkılı Polimerik Membranlar
gr	Gram
İMAK	İmmobilize Metal iyon Afinite Kromatografisi
Kg	Kilogram
L	Litre
MBAAm	<i>N,N'</i> -Metilen-Bis-Akrilamid
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
pAAM	Poliakrilamid
PGMA	Poli(glisidil metakrilat)
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
PPM	mg çözünen/L
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametilen Diamin
V	Hacim
v/v	Hacimce Yüzde
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

1.1 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi 1910'lu yıllarda Starkenstein tarafından çözünmeyen nişasta yardımıyla α -amilazın izole edilmesi ile başlayan, Camobell ve arkadaşlarının 1951'li yıllarda kovalent bağlı antijen ile antikor izolasyonu ile devam eden, 1953'lü yıllarda Lerman tarafından enzimlerin izolasyonu için kullanılan ve günümüze kadar gelen bir yöntem olmuştur. Ligand ile izole edilecek ürün arasında etkileşimin az olması ya da çözünemeyecek kadar güçlü olması hidrofobik veya iyonik gruplara sahip olan destekler kullanıldığında spesifik olmayan adsorpsiyonlardan dolayı kullanımı bir süre yavaşlamıştır. Porath ve arkadaşlarının siyanojen bromürle aktive edilen agaroz jelini bulmasıyla büyük bir ivme kazanarak bugünkü şeklini almıştır [1].

Afinite kromatografisi, istenen organik bileşikler saflaştırmak veya analiz etmek için sabit bir faz olarak biyolojik yapıda ajan kullanan yöntemdir [2].



Şekil 1.1: Afinite kromatografisi aşamalarının şematik gösterimi.

Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Çizelge1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1: Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler [3].

Ligand	Saflaştırılacak Materyal
Antikorlar	Hormonlar, peptitler, proteinler, virüsler, ilaçlar
Nükleik asitler	Tamamlayıcı nükleik asit zincirleri, DNA/RNA'ya
Enzim inhibitörleri ve kofaktörler	Enzimler
Lektinler	Şekerler, polisakkaritler, glikoproteinler, glikolipidler
proteini A ve proteini G	Bozulmamış antikorlar ve Fc parçaları
Boronatlar	Polisakkaritler, kateşoller, glikoproteinler
Metal şelatlar	Metal bağlayıcı aminoasitler, peptitler, proteinler
Sentetik boyalar	Dehidrogenazlar, kinazlar

Afinite kromatografisinin uygulama şekline ve kullanılan materyallerden dolayı birçok alt başlık ortaya çıkmıştır:

- İmmunoafinite Kromatografisi
- Afinite Kapiler Elektroforezi
- Metal-Şelat Afinite Kromatografisi
- Moleküler Baskılama Kromatografisi
- Afinite Elektroforezi
- Perfüzyon Afinite Kromatografisi
- Afinite Densite Pertubasyon
- Zayıf Afinite Kromatografisi

- Kovalent Afinite Kromatografisi
- Boya Ligand Afinite Kromatografisi
- Hidrofobik Kromatografi
- Yüksek Performans Afinite Kromatografisi
- Afinite Çöktürme
- Kütüphane Türevli Afinite
- Membran Bazlı Afinite Kromatografisi
- Afinite Kuyruk Kromatografisi
- Lektin Afinite
- Reseptör Afinite
- Tiyofilik Kromatografi

1.2 Afinite kromatografisinin tamamlayıcı unsurları

Afinite kromatografisinde saflaştırılacak proteine has tanıma ve tutunma özelliklerinden faydalanılır. Bu özellik saflaştırılacak proteine özgü ligandın kimyasal olarak doğrudan veya bir ayırıcı kol vasıtasıyla bağlandığı afinite sorbentlerinin hazırlanması için kullanılmaktadır. Protein ile ligand arasındaki etkileşim, kütle eylem yasası tarafından yönetilir; özgülüğü afinite ayrılma sabitine bağlıdır; bu olasılık, moleküler ortakların (ayırarak için protein ve ligand) arasındaki etkileşimin her ortağın konsantrasyonunun artmasıyla ne kadar hızlı olduğunu gösteren olasılık terimidir [4].

Afinite Kromatografisi yapısında matriks, ligand ve gerekiyor ise uzatıcı kol olmak üzere üç önemli temel unsur bulunmaktadır.

İyi bir afinite kromatografisinde spesifiklik, seçicilik, tekrarlanabilirlik, kimyasal bağlanma şekli ve bu bileşenlerin uygun maliyeti de önemli unsurlardandır [5, 6].



Şekil 1.2: Afinite kromatografisi tamamlayıcı unsurlarının şematik gösterimi.

1.2.1 Matriks

Afinite kromatografisinin ilk ortaya çıktığı dönemlerde matriksler hem ligandlar için hem de hedef yapılar için bir destek sistemi olarak kullanılmıştır. Günümüzde kullanılan biyolojik maddelerden yapılmış matriks seçeneklerinin çoğalması nedeniyle yeni maddelere ihtiyaç duyulmuştur.

Matriksten istenen özelliklerin bazıları;

- Ekonomik olması
- İstenmeyen tutunmaların olmaması
- Tamponla reaksiyon vermemesi
- İşlem yapılan çözeltinin akış özelliklerini etkilememesi
- Yapısında ligandı bağlayabilecek fonksiyonel grupların bulunması
- İşlem yapılacak ligandın kolayca tutunması ve işlem sırasında bırakmaması
- Bir kolonda eşit olarak dağıtılabılır olması
- Farklı kimyasal ve mekanik streslere dayanacak kararlılıkta olması
- Makroporlara ve hidrofiliteye sahip olmasıdır.

Kullanıma hazır hale getirilmiş matriksler, birincil aminler, sülfidriller, aldehitler, hidroksiller ve ligandları matrikslere kovalent bağlamak için karboksilik asitler içeren kimyasallar kullanarak geliştirildi. Günümüzde afinite kromatografisinde

kullanılan matriksler üç sınıfa ayrılmıştır. Bunlar yapılarına göre doğal, sentetik ve inorganiktir (Çizelge 1.2) [5, 6].

Çizelge 1.2: Afinite kromatografisinde kullanılan farklı matriksler [6].

<u>Matriks</u>	<u>Sınıf Örnekleri</u>	<u>Ticari İsimler</u>
Doğal	Agaroz Dekstranlar Selülozlu boncuklar	Sepharose Sephadex ve Superdex Selülozlu boncuklar
Sentetik	Akrilamid Polisitren Polimetakralat	Biyo-Jel Polisitren Separon HEMA
İnorganik	Gözenekli silika Cam elyafı TiO ₂	Gözenekli silika Cam elyafı TiO ₂

1.2.2 Ligandlar

Bir afinite kromatografisinde iyi sonuç almak, ilgili madde ile immobilize ligand arasındaki biyo-spesifik etkileşime bağlıdır. Solüsyonun içerisindeki diğer tüm bileşenler, ligand için az veya hiç etkileşim göstermemelidir [7].

Afinite kromatografisinde iyi bir ligand için aranan tipik özelliklerden bazıları şunlardır: adsorpsiyon sırasında hedefe yakınlık, özgünlük, immobilizasyon, sert yıkama ve elüsyon koşulları kararlılığı ile matrikse tutturulduktan sonra hedef afinite kapasitesine ulaşmaktır. Ligandlar üç çeşit gruba ayrılır: biyospesifik ligandlar, sentetik ligandlar ve psödobiyospesifik ligandlar [6].

1.2.2.1 Biyospesifik ligandlar

Biyospesifik afinite de enzimler, proteinler, antikorlar, antijenler, aminoasitler, peptit dizileri, nükleik asitler, DNA veya RNA sekansları gibi biyo-fonksiyonel çeşitliliği olan ligandlar kullanılabilir [8].

Bunlar doğal yollarla türetilmiş yapılardır ve genellikle antikorlara yüksek bağlanma afinitesi gösteren antijen, anti-antikorlar, lektinler veya bakteri kökenli proteinler gibi yapılardır. Biyospesifik ligandlar yüksek afinite sabitine ($K_a \approx 10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1}$) ve seçiciliğe sahiptir. Bakterilerden türetilerek immobilize edilmiş bakteri yüzey proteinleri, antikorların ve genetik olarak türetilen moleküllerin saflaştırılması için en sık kullanılan afinite ligand olmasına karşın biyospesifik ligandlar, daha fazla uygulama için üretilmesi ve izole edilmesi gereken zahmetli ve pahalı biyolojik maddelerdir. Biyoaktif bölgenin aktif kalabilmesi için matrikse ligand immobilizasyonu dikkat edilmesi gereken bir husustur. Biyospesifik ligandların antikor benzeri moleküllere karşı yüksek afinitesi, seçiciliği arttırması gibi pozitif özelliklerinin yanında çözünme sorunları, ligand ile ürünün ayrılması biyolojik maddeler olması nedeniyle çabuk bozulması gibi negatif özellikleri de bulunmaktadır [9].

1.2.2.2 Sentetik ligandlar

Sentetik ligandların X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi yöntemlerde yüksek çözünürlüğe sahip olması, yüksek verimlilikle sonuç vermesine öncülük etmiş, üretiminde ve taramada ilerleme sağlanmasıyla doğal ligandlarla ilgili kırılganlık ve aşırı maliyet gibi sıkıntıların ortadan kalmasına yardımcı olmuştur. Sentetik ligandların yapısal ve işlevsel yönü göz önüne alındığında istenen özelliklerde farklı kombinasyonlarda tasarlanabilmektedir. Böylece üretilen ürün, arzu edilen özgüllük ve afinite elde etmek için daha da modifiye edilebilir ve proses optimizasyonundaki çabaları en düşük seviyeye kadar çekilebilir. Yapılarına göre sentetik ligandlar peptidil ve non-peptidil olarak ikiye ayrılır [6].

1.2.2.3 Psödospesifik (Yalancı) ligandlar

Psödospesifik (Yalancı) ligandlar, immünoglobülinlerin afinite ligandlarıyla etkileşiminde yer alan çok sayıda kovalent olmayan kuvvetler temelinde geliştirildiği için immünoglobülinlere has özelliklerini kullanır. Bu ligandlar, daha sağlıklı, daha

az toksik, yapısal olarak iyi tanımlanmış, sert koşullara ve sterilizasyon koşullarına karşı kararlı olduğu için umut vermektedir. Afinitesi biyospesifik ligandlara göre düşük olmasına rağmen, hedef moleküle spesifite ve seçicilik sağlamak için yeterlidir. En yaygın kullanılan psödospesifik ligandlardan bazıları arasında tiyofilik, L-histidin, immobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) ve karışık mod ligandları yer almaktadır [6].

1.2.3 Uzatici kol

Afinite kromatografisinde o proteine has ligandları tanıma ve kenetleme özellikleri kullanılır. Bu özellik saflaştırılacak protein için spesifik ligandın kimyasal olarak doğrudan veya bir uzatici kol vasıtasıyla bağlandığı afinite sorbentlerinin hazırlanması için kullanılmaktadır [4].

Matriksin yüzey kuvvetinin afinitedeki spesifik etkileşimlerin önüne geçmesini en aza indirmek için hedef makromolekül ile etkileşiminde kritik olan ligand moleküllerinin kimyasal grupları destek yüzeyinden etkilenmeyeceği bir uzaklıkta olmalıdır. Matriks yüzeyi ve ligand molekülü arasındaki istenmeyen etkileşimi bir uzatici kol vasıtasıyla çözülebilir. Böylece ligand moleküllerinin tüm alanı iyi bir etkileşim için uygun hale getirilmiş olur [10].

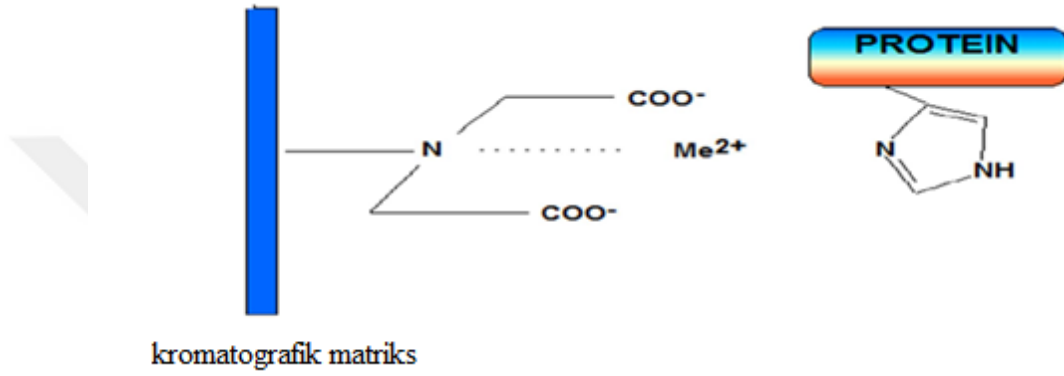
Enzimlerde spesifik bağlanmanın olacağı aktif bölgeleri genellikle molekülün iç kısımlarında olduğundan dolayı uzatici kol önemlidir. Bir diğer önemli husus ise uzatici kolun uzunluğudur. Kol kısa ise etkisiz olur, çok uzun ise spesifik olmayan etkiler fazla olur ve böylece ayırmanın seçiliği azalır. Bazı çalışmalar, çok uzun uzatici kolların numunedeki maddelere hidrofobik etkileşimlerle bağlandığını göstermiştir ve hidrofobik etkileşimler afinite kromatografisinde istenilen bir durum değildir [11].

1.3 İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK)

İmmobilize metal iyonu afinite kromatografisi (İMAK), solüsyon içindeki biyolojik kökenli polimerler ile genellikle bir hidrofilik çapraz bağlı polimer olan katı bir desteğe sabitlenmiş metal iyonları arasındaki ara yüzey etkileşimlerine dayanan çok yönlü bir ayırma yöntemidir [12].

Bilimsel olarak immobilize metal afinite kromatografisinde metaloproteinlerin ayrılma immobilizasyonunu tasarlayan ilk kişiler Everson ve Parker'dır [13].

Geçiş metallerinden olan Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} elementleri protein yapısındaki imidazol ve tiol gruplarıyla etkileşime girebilmekte ve bu özellikleri sayesinde hidrofilik jeller histidin ve sistein içeren peptitler ve proteinler için seçici adsorbanlar olabilmektedir. Proteinler için şelat oluşturan adsorbentleri sentezlemek kolay olduğundan, ilk olarak metal iyon ligandları, yüksek geçirgenlikte sahip çapraz bağlanmış agaroz da denenmiştir [14].



Şekil 1.3: İmmobilize metal afinite kromatografisi şematize gösterimi.

İmmobilize edilmiş metal iyonları izole edilecek yapıdaki koordinasyon oluşturacak elektron verici atomlar (N, S, O) ile iki veya üçlü ya da daha fazla metal şelat bağ oluşturma yeteneğine sahiptirler. Biyospesifik afinite tekniklerine göre bu tür İMAK'ın diğer bir avantajı, yapısı gereği denatüre edici koşullardan etkilenmemesidir [15].

İMAK'ın kromatografik yöntemler arasında en çok kullanılan yöntem olmasının nedeni, düşük maliyeti, kullanım kolaylığı ve hem doğal hem de denatüre edici koşullar altındaki sağlamlığı, yüksek afinite ve özgünlüğü, düşük protein varlığında dahi yüksek yakalama verimi ile saflaştırma prosedürünün ölçeklenebilirliğini sağlaması söylenebilir. Büyük ölçüde avantaja sahip olmasına rağmen metaloproteazların güçlü bir inhibitörü olan EDTA metal iyonlarının immobilizasyonunu bozması nedeniyle sadece düşük konsantrasyonlarda uygulanabileceğinden, şelatlayıcı ajanlardan kaçınılmalıdır ki bu da bir dezavantaj olması nedeniyle İMAK'ı sınırlamaktadır [16].

1.4 Afinite kromatografisini etkileyen hususlar ve uygulamaları

Afinite kromatografisi fikrinin ortaya atılmasından günümüze kadar saflaştırma yöntemini iyileştirmek için pH, iyonik şiddet, sıcaklık, rekabet eden türlerin varlığı ve akış karakteristikleri gibi çeşitli faktörler kullanılmıştır. Afinite kromatografisinin amacı maksimum verim ve saflık elde etmek için emici yapının hazırlanması, numune adsorpsiyonu, yıkama ve elüsyon olmak üzere dört temel aşamaya dayanır ve her adım optimize edilebilir [17].

1.5 Ekstraselüler polimerik maddeler (EPS)

Ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) bakterilerin farklı koşullar altında hücre yüzeylerinde biriktirdikleri metabolik ürünlerdir [18]. Mikroorganizmaların salgıları, makromoleküllerin hücresel yıkımı ve hidroliz sonucunda ortaya çıkan polisakarit, protein, nükleik asit, lipid yapısındaki ve çeşitli mikrobiyal agregaların içlerinde sunulan diğer polimerik bileşiklerin geneli ekstraselüler polimerik maddeler kısaca ise EPS olarak adlandırılmaktadır [19].



Şekil 1.4: Ekstraselüler polimerik maddeler (EPS).

EPS'nin en önemli fonksiyonları: açlık döneminde karbon ve enerji rezervleri olarak görev yapmak ve bu reaksiyonlar için gerekli enzimatikleri bünyesinde tutmak, yüzeylere tutunmak, bakteriyel hücreleri floklarda biriktirmek, flok yapısının stabilizasyonu sağlamak, biyositlere ve zorlu çevre koşullarına karşı koruyucu

özellik göstermek, su tutmak, hücrelerin metal, besin maddeleri alımına yardımcı olmak, mikrobiyal ekler sağlamak, hücreler arası işbirliği ve iletişimi sağlamaktır [20].

EPS'nin iyonik yapıdaki ağır metaller ile adsorpsiyon yapma özelliği farklı uygulamalar için kullanılmaktadır [21]. *Cyanobacteria Arthrospira platensis* EPS üretiminde büyük bir öneme sahip büyük miktarda hücre dışı polimerik maddeler (EPS) salgırlar ve bu maddeler büyük oranda (Glikoz, galaktoz, fruktoz, ramnoz, ksiloz manoz ve arabinoz) polisakaritler, proteinler ve uronik asitlerden oluşurlar. *A.maxima* 'dan besi yeri kullanılarak EPS üretimleri gerçekleştirilebilmektedir [22, 23].

Her geçen gün çevremizin işlenmiş polimerlerle kirlenmesi nedeniyle yeni doğal ürün arayışı oluşmaktadır. EPS'ler yapıları gereği petrol, ilaç, kozmetik, kağıt, boya ve tekstil endüstrisinde geniş bir uygulama sahası bulmuştur [24].

1.6 α -Amilaz

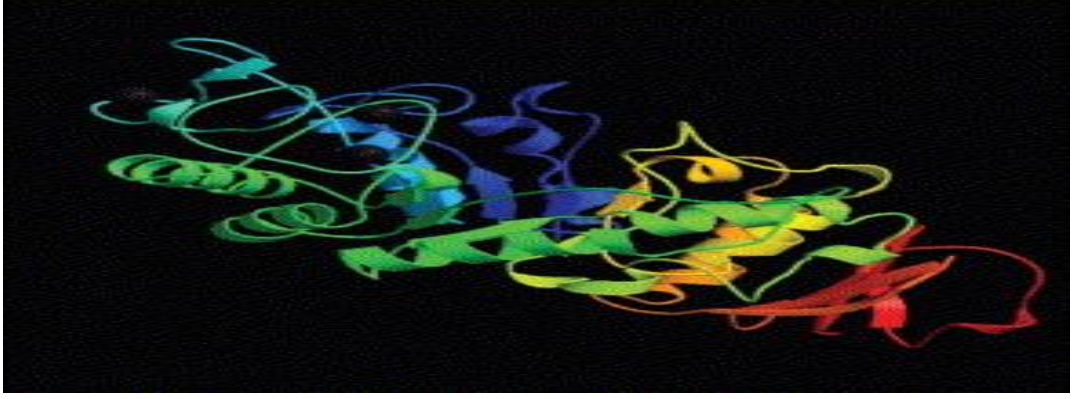
α -Amilaz enzimi (EC 3.2.1.1) ilk olarak 1811 yılında Kirchhoff tarafından keşfedilen bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan karbonhidrat metabolizmasında önemli bir yere sahip enzim türüdür [25].

α -amilaz canlılar için önemli enerji kaynağı olan şekerlerin, özellikle de glikozun parçalanmasından ve glikolizden sorumlu önemli bir araçtır. Glikoz doğada bitkilerde selüloz ($\beta 1 \rightarrow 4$ bağlı) ve nişasta ($\alpha 1 \rightarrow 4$ bağlı) hayvanlarda glikojen ($\alpha 1 \rightarrow 4$ bağlı) olarak şeker depolama polimeridir [26].

İnsanlarda pankreas ve tükürük bezlerinden üretilen α -amilaz enzimi glikoz $\beta 1 \rightarrow 4$ bağlarını parçalayamadığından dolayı bitkisel ürün olan selülozu sindiremezken nişasta içeren bitkileri tükürükte ve gastrointestinal sistemde salgılanan α -amilaz ile çok iyi sindirebilirler [27].

Metabolizmada α -amilaz aktivitesi, yapısal bütünlüğü ve stabilitesi için kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarına ihtiyaç duyar [28]. Mikroplar, hayvanların ve bitkilerin sindirim suları, amilazların başlıca kaynaklarıdır [29].

Günümüzde α -amilaz; gıda, ilaç, deterjan, fermentasyon, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi alanlarda büyük öneme sahiptir [30].



Şekil 1.5: α -amilazın üç boyutlu yapısı [29].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Baran vd., (2017) hemoglobin (Hb) saflaştırmak için makro gözenekli poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA)'a bentonit ekleyerek Cu^{2+} bağlı hibrid monolitik kriyojel kolonlar (Cu^{2+} -ABPs EHMC) hazırlamışlardır. Daha sonra, yapılan ölçümlerde polimer adsorpsiyon kapasitesi pH 6'da 521,6 mg/g olarak tespit edilmiştir [31].

Çimen vd., (2015) bakteriyel lizattan plazmid DNA'nın (pDNA) saflaştırılması için monolitik bir kriyojel kolon sentezlemişlerdir. Yöntem olarak serbest radikal kriyokopolimerizasyon yöntemini kullanarak Poli (hidroksietil metakrilat)tan membran diskler üretmiş ve ligand olarak Cibacron Blue F3GA kullanarak 32,5 mg/g polimer gibi bir maksimum DNA adsorpsiyonuna ulaşmışlardır [32].

Farzi-Khajeh vd., (2017) sığır sütünden (kazeinin çöktürülmesinin ardından) α -amilazın saflaştırılması için modifiye Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller hazırlamış ve bu çalışmada p-aminofenol modifiye manyetik nanokarbonların etkinliğini değerlendirmek için farklı uzunluklarda farklı bağlayıcılara sahip üç farklı nanokarbon taşıyıcı türü test etmişlerdir. Sonuçlara göre, uzun bağlayıcılarla bağlanan p-aminofenol ligandı, α -amilazın kazeinsiz kaynağı alınmış süttten % 49.66 daha iyi ayrıldığı ve arıtma verimliliğinin % 48.18 kat fazla olduğu tespit edilmiştir [33].

Pandey vd., (2017) α -amilazın immobilizasyonu için haloisit nanotüpleri (Hal nanotüpleri) APTES ile yüzey fonksiyonelleştirme işlemi sonrası kullanmış ve bu yapılar TEM ile karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada İmmobilize α -amilaz için optimum pH 7.4 ve sıcaklık 40°C olarak tespit edilirken; Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının varlığında serbest enzime kıyasla immobilize amilaz için enzimatik aktivitede hafif artış görülmüştür [34].

Başka bir çalışmada, SiO_2 nanopartiküller gömülü süper makro gözenekli kriyojeller, akrilamid (AAM) ve *N,N*-metilen-bis-akrilamid (MBAAM) reaktif monomer karışımının radikal kriyojenik kopolimerizasyonu ile hazırlanmış, model protein olarak lizozim ile çalışılmıştır [35]. 2-Akrilamido-2-metil-1-puopansülfonik asit ile aşıl原因 kompozit kriyojel ile lizozimin kromatografik olarak protein adsorpsiyon ve desorpsiyon özellikleri değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerde nanopartikül gömülü

kriyojellerin literatür ile kıyaslanabilecek seviyede adsorplama kapasitelerinin olduğu saptanmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), *N,N'*-metilen-bis-akrilamid, *N,N,N',N'*-tetrametilen diamin (TEMED), α -amilaz (EC:3.2.1.1) (*Aspergillus oryzae*), ethanol, NaCl, ve amonyum persülfat (APS) Sigma Aldrich firmasından alınmıştır (St. Louis, USA). Glycidyl Methacrylate TCI'den sağlanmıştır (Tokyo, Japonya). Barnstead (Dubuque.IA) ROPure LP® saf su ünitesi, yüksek akış hızlı selüloz membranlar ters osmos ünitesine sahip (Barnstead D2731) Barnstead 3804 NANOPURE® cihazından temin edildi. Ekstraselüler Polimerik Madde (EPS), kültüre *Arthrospira maxima*'dan elde edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 EPS üretimi

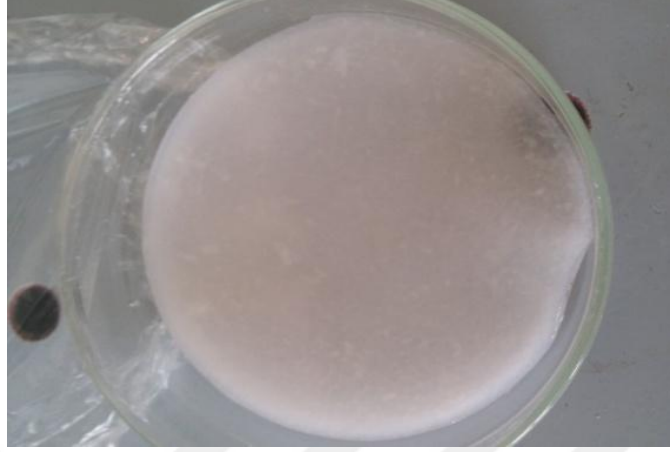
Ekstraselüler polimerik madde için *Siyanobakteri Arthrospira maxima* Zorrouk besi yerinde üretilmiştir. Bakterinin EPS üretimini sağlamak için stres şartları (besi elementi eksiliği) oluşturulduktan sonra, iki haftalık hücre kültüründen EPS elde edilmiştir.

EPS'nin eldesinde öncelikle, besi yerini siyanobakterial hücre kitlesinden uzaklaştırmak için 1500 rpm 2 dakika santrifuj yapılmıştır. Daha sonra vakum altında Whatman GF/C filtre kullanılarak saf su ile yıkama yapılmıştır. Tuzdan arındırılan kitleye 1 mL ultra saf su eklenerek ultrasonikasyonla hücre ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen EPS, çalışmalarda kullanılmak üzere +4 C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 EPS katkılı polimer membranların (EPS-PM) sentezi

Ekstraselüler polimerik maddeler katkılı polimer membran disklerin hazırlanması için bir cam tüp içerisine 2 mL 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve 20 mg *N,N'*-metilen-bisakrilamid (MBAAm) katılarak 1 mL saf su ilave edildikten sonra vorteks ile karıştırıldı. Bu karışım üzerine, 750 mg EPS cam tüpe koyularak karıştırılmaya devam edilerek homojen yapı oluşturuldu. 40 μ L glisidil metakrilat (GMA) eklendi, bu işlemlerin ardından ortama 1 mL etanol eklenerek karıştırılmaya devam edildi. Daha önce 200 μ L saf suda çözülmüş 20 mg amonyumpersülfat (APS) ile son olarak

30 µL TEMED katılarak 2 dk süre karıştırıldıktan sonra petri kabına dökülüp 24 saat EPS-PM oluşması için beklenildi. Daha sonra aynı yöntemle EPS-PM ile karşılaştırmak için EPS'siz polimer membranlar sentezlendi.



Şekil 3.1: EPS katkılı polimer membran.

Polimer oluşumundan sonra yapı, perforatör yardımı ile 0,5 cm çapında ortalama ağırlığı 32,5 mg olacak şekilde kesilip, küçük diskler haline getirilerek küçük tüplere alındı.

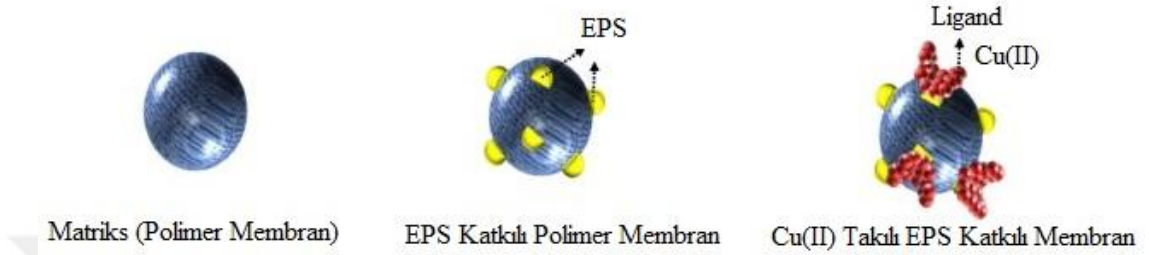


Şekil 3.2: EPS katkılı polimer membran diskler.

3.2.3 EPS katkılı polimer membranlara (EPS-PM) Cu²⁺ iyon immobilizasyonu

Tüpler içerisinde bulunan EPS-PM disklerle Cu²⁺ iyonlarının şelatlanması için şu işlemler yapıldı: 50 ppm lik bakır nitrat penta hidrat'ın (Cu(NO₃).5H₂O) 100 mL lik çözeltisi hazırlanıp pH: 5'e (HCl veya NaOH ile) ayarlandı. Tüpler içersine EPS-PM diskleri ve üzerine 5 mL Cu²⁺ çözeltisi eklenerek rotatör ile 40 rpm'de 8 saat süreyle karıştırılarak Cu²⁺ iyonlarının immobilizasyonu sağlandı. Cu²⁺ iyonu bağlandıktan sonra EPS-PM diskleri bir gün boyunca saf su ile yıkandı. Yıkama çözeltileri ile

adsorpsiyon sonrası çözeltiler birleştirilerek başlangıç çözeltisine kıyasla yapıya bağlanan Cu^{2+} iyonları miktarı hesaplandı. Daha sonra hazırlanan membranlar kullanıma kadar %0,2 lik sodyum azid çözeltisinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. EPS-PM disklerin Cu^{2+} iyonu sızma tesleri pH 4-8 aralığında (pH 4-5 Asetat tamponu; pH 6-8: Fosfat tamponu) farklı ortamlarda çalışıldı, Cu^{2+} iyonu sızması görülmedi.



Şekil 3.3: EPS katkılı polimer membran disklerle Cu^{2+} bağlanması.

3.2.4 Karakterizasyon çalışmaları

3.2.4.1 Şişme testleri

EPS katkılı polimer membranlar ile EPS katkısız polimer membranların şişme hareketleri, saf su içerisinde bekletilerek şişme denge oranlarının bulunmasıyla tespit edilmiştir. Oda koşullarında kurutulan EPS-PM ve EPS katkısız polimer membranlar kuru ağırlıkları tartıldıktan sonra 15 mL'lik saf su bulunan ortam içerisine bırakılmıştır. Oda koşullarında 5'er dakikalık arayla su emme hızları ve maksimum şişme oranları hassas terazi ile ölçülmüştür.

Polimerin yapılarındaki su içeriği Eşitlik 3.3 ile sırayla ölçülmüştür:

$$\text{Şişme oranı} = [(W_s - W_o)/W_o] \times 100 \quad (3.3)$$

Denklikteki; W_o : Polimerlerin kurutulduktan sonraki ağırlığını (g), W_s : Polimerlerin su içerisinde bekletildikten sonraki ağırlığını (g) vermektedir.

3.2.4.2 Yüzey alanı ölçümleri

EPS-PM ve EPS katkısız polimer membran por yoğunluğu ile ortalama por çapı cıva porozimetresiyle incelenmiştir (Carlo Erba Model 2000, İtalya). Spesifik yüzey alanı

ise BET (Brunauer-Emmett-Teller) yöntemiyle yüzey analizi cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5 Sulu ortamdan α -amilaz adsorpsiyonu

α -Amilaz adsorpsiyonuna; pH, başlangıç α -amilaz konsantrasyonu, iyonik şiddet, sıcaklığın etkisi gibi parametreler araştırıldı. Sıcaklığın etkisini incelemek için termometreli sıcak su banyosu kullanıldı. Polimer membranlar saf su ile temizlenerek 10 mL sodyum asetat tamponu ile (pH: 5) 30 dakika etkileştirildi. Tüm adsorpsiyon deneyleri, 25°C'de ve 5 mL' lik 0,5 mg/mL derişiminde α -amilaz çözeltisinde, 30 dk süreyle, 12 rpm rotatör hızında yürütüldü.

Cu^{2+} -EPS-PM'nin α -amilaz adsorplama oranı, adsorpsiyon öncesi ve sonrasında protein çözeltisinden alınan numunelerin 280 nm'de UV-VIS spektrofotometre (Genesys 10S UV-VIS) kullanılmasıyla değerlendirildi. 0,1-2 mg/mL aralığında hazırlanan α -amilaz çözeltilerinin konsantrasyonu ile kalibrasyon eğrisi saptandı ve Eşitlik 3.1 denkleminde faydalananarak protein oranı tespit edildi.

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

Yukarıdaki denklemde: Q; Cu^{2+} -EPS-PM tarafından adsorplanan α -amilaz miktarı (mg/g), C_o ; α -amilazın çözelti içerisindeki ilk derişimini (mg/mL), C_s ; adsorpsiyon sonrasında sulu ortamda kalan α -amilazın derişimi (mg/mL), V; kullanılan çözeltinin hacmini (mL) ve m; ise polimer membranların kütlesinin ortalamasıdır (g).

pH'nın α -amilaz adsorpsiyonuna etkisi, pH 4, 5, 6, 7 ve 8 arasında çalışıldı. pH 4-5 için asetat ve 6, 7 ve 8 için ise fosfat tamponunda çalışıldı. Yine sıcaklığın α -amilaz adsorpsiyonuna etkisi 5, 15, 25 ve 35°C'da incelendi. İyonik şiddetin α -amilaz adsorpsiyonuna etkisi tampon içerisinde çeşitli derişimlerde NaCl içeren (0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 M) çözeltileri ile 25°C ortam sıcaklığında yapıldı. α -Amilazın maksimum adsorpsiyon kapasitesinin saptanabilmesi ile deneysel adsorpsiyon izotermi için 0,1, 0,2, 0,5, 1,5 ve 2,0 mg/mL derişimine sahip çözeltilerde çalışıldı.

3.2.6 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

α -Amilazın desorpsiyonunda 1M NaCl kullanılmıştır. α -Amilazın adsorplanmış Cu^{2+} takılı EPS-PM 1M NaCl ile 15 dk süre etkileştirilmiş, desorpsiyon ortamındaki α -

amilazın değeri 280 nm’de spektrofotometre ile belirlenmiştir. α -Amilazın desorbe edilen miktarıyla Cu^{2+} takılı EPS-PM’ye adsorplanan değerinden desorpsiyon miktarı Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan } \alpha\text{-amilaz} \times 100}{\text{Adsorblanan } \alpha\text{-amilaz}} \quad (3.2)$$

Cu^{2+} takılı EPS-PM tekrar kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi için aynı adsorbentlere adsorpsiyon-desorpsiyon defalarca uygulanmıştır. Yapılan desorpsiyon uygulamalarından sonra, Cu^{2+} takılı EPS-PM, saf su ile yıkamadan sonra 0,05 M asetat (pH 5) tamponuyla dengelenmiştir.

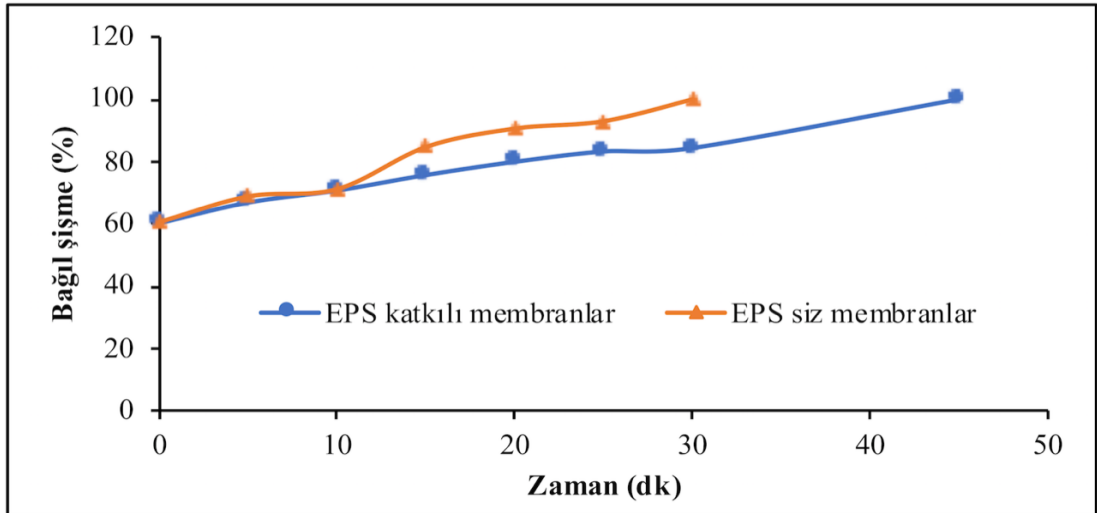
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 EPS-PM ile EPS Katkısı Polimer Membran Karakterizasyonu

EPS katkı ve EPS'siz polimerik membranlar, yapılarına bağlanacak Cu^{2+} iyonları miktarı açısından incelendiğinde EPS katkı polimerik membranlara bağlanan iyon miktarının ($27,1 \mu\text{g/g}$ polimer) EPS'siz yapıya ($3,5 \mu\text{g/g}$ polimer) oranla yaklaşık 8 kat fazla olduğu görülmüştür. İki polimerik yapının BET yöntemi ile alınan yüzey alan ölçümleri sonuçları ise EPS katkı ve EPS'siz polimerik membranlar için sırasıyla $26,4$ ve $2,7 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. İki polimerik yapının Şekil 4.2'deki SEM görüntüleri de dikkate alındığında bu sonuçların sürpriz olmadığı açıktır. Polimerik yapıya EPS'nin katılmasıyla gözeneklilik artmış ve dolayısıyla adsorpsiyon yüzeyi de genişlemiştir.

4.1.1 Şişme testleri

EPS'li ve EPS'siz membranların her ikisi de şeffaf yapıda olmakla birlikte ayrıca, EPS'li polimer içerisine hapsedilmiş EPS'ler membranların hidrofilisitesini ve dolayısıyla elastikiyetini de arttırmıştır. EPS'li ve EPS'siz membranların şişme test sonuçları Şekil 4.1'de verilmiştir.



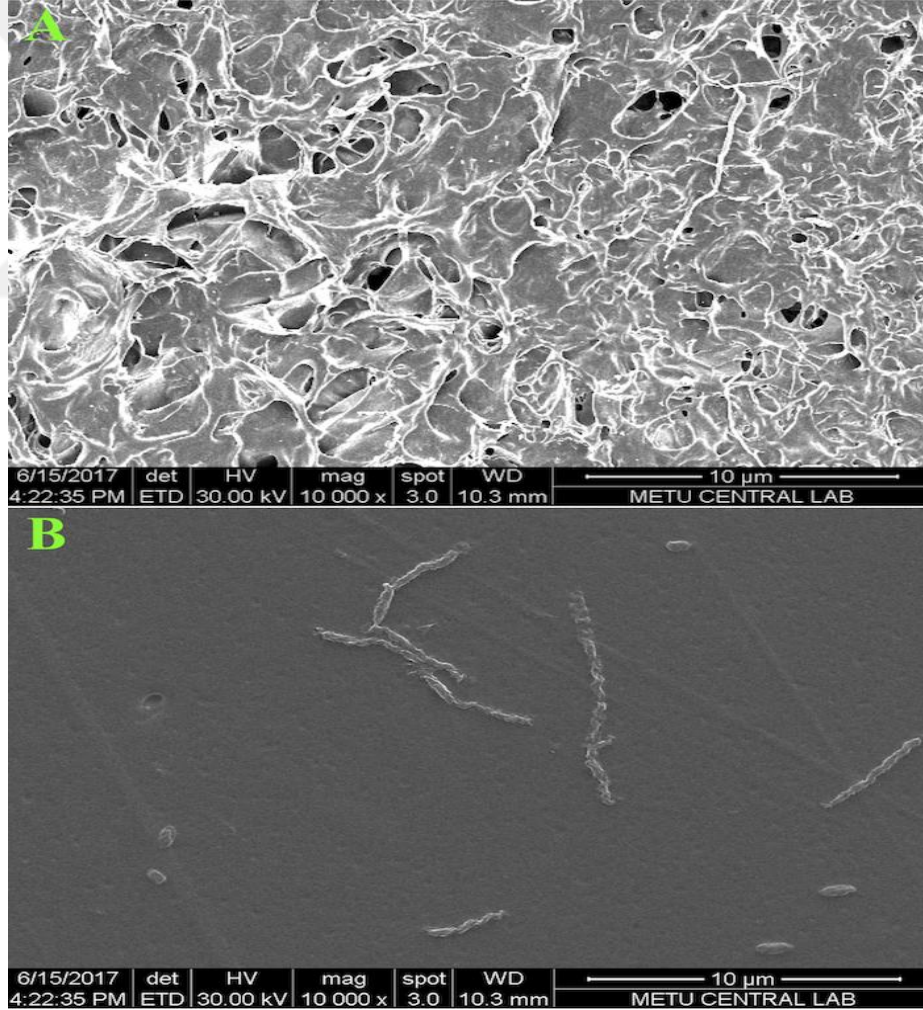
Şekil 4.1: EPS'li ve EPS'siz membranların zamana karşı bağıl şişme testleri.

Şekilde görüldüğü gibi, EPS'siz membranlar 30 dakikanın sonunda bağıl şişme doyumluklarına ulaşırken, EPS'li membranlar 45'inci dakikada ulaşmışlardır. Ancak EPS'siz membranlar %24,3'lük bir şişme değerine sahipken, bu değer EPS'li

membranlarda %44,9 olarak hesaplanmıştır. İki polimerik membran arasındaki %20,1'lik bu fark, EPS'li yapının hidrofilitatesini arttırmakla birlikte daha gözenekli olmasını da sağlamıştır.

4.1.2 EPS katkılı ve EPS'siz polimerik membranların SEM analizleri

EPS katkılı EPS'siz polimerik membranların yüzey yapılarının incelenmesi için taramalı elektron mikroskobundan (SEM) yararlanılmış ve görüntülemeler Şekil 4.2 A ve B'de gösterilmektedir. EPS'siz membranların yüzeyleri (Şekil 4.2B) çok düşük bir gözenek yapısına sahipken, yapıya EPS'nin girmesiyle polimerin gözenek yapısında önemli farklılıklar meydana gelmiştir (Şekil 4.2A). Yaklaşık 10 µm çapa sahip bu yeni gözenekli yapı, kütle transfer kısıtlamasını ortadan kaldırarak daha geniş bir yüzey alanı ile adsorpsiyon kapasitesinin artışına neden olmuştur.

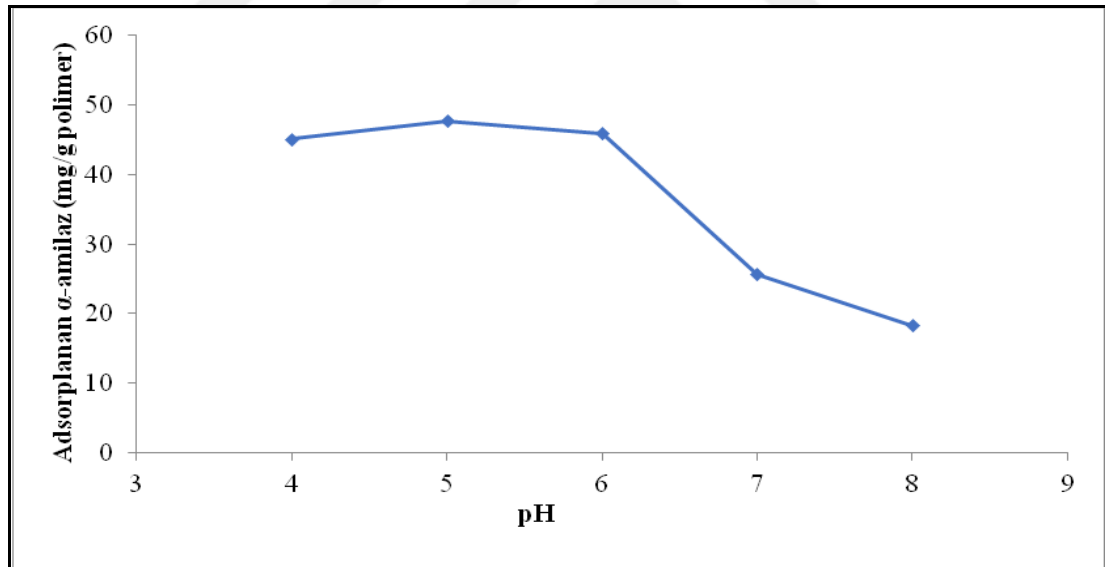


Şekil 4.2: EPS katkılı (A) ve EPS'siz (B) polimerik membranların SEM görüntüleri.

4.2 Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1 pH'nın etkisi

Cu^{2+} takılı EPS katkılı polimerik membranlara α -amilaz adsorpsiyonuna pH'nın etkisi 4-8 aralığında (pH 4-5 Asetat tamponu; pH 6-8: Fosfat tamponu) incelenmiştir. Şekil 4.3'te görüleceği üzere α -amilaz adsorpsiyonu pH 5'de üst seviyeye ulaşmaktayken, bu değerin altında ve üzerindeki pH'larda adsorpsiyonun düştüğü gözlenmektedir. Biyolojik moleküllerin bir yüzeye tutunmasında hidrofobik, elektrostatik vb. etkileşimler ile hidrojen bağları adsorpsiyondan sorumlu olan faktörlerdendir. Protein adsorpsiyonu, İMAK'ta immobilize metal ile protein yüzeyindeki aminoasit yapıları arasında oluşmaktadır. Adsorpsiyonun gerçekleştiği pH'da protein yüzeyindeki aspartat ve glutamat gibi aminoasitlerin deprotona yapıdaki karboksil grupları, protein yüzeyinde negatif yük yoğunluğuna sahip bölgeler oluşturmaktadır. Bu negatif yükler ile Cu^{2+} takılı EPS-PM arasındaki elektrostatik etkileşimlerden dolayı adsorpsiyonun gerçekleştiği düşünülebilir.

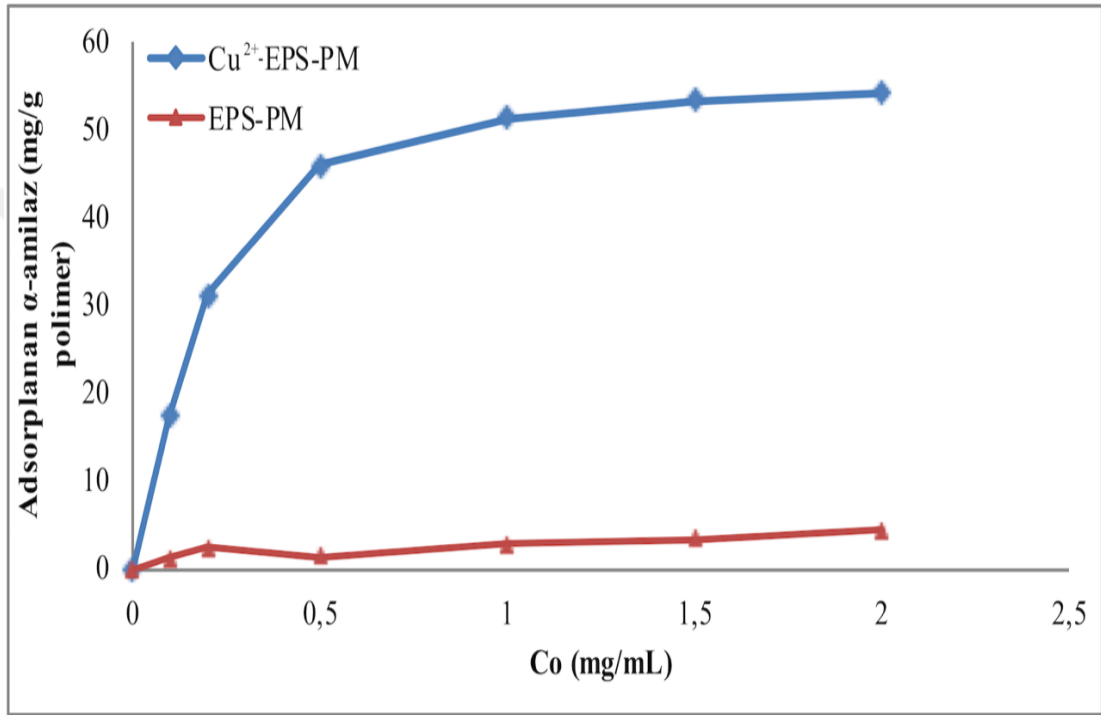


Şekil 4.3: α -amilaz adsorpsiyonuna pH'nın etkisi; pH 5 Asetat tamponu- pH 6-8 Fosfat tamponu; α -amilaz derişimi: 0,5 mg/mL, Rotatör hızı: 12 rpm/dk, T: 25°C.

4.2.2 Başlangıç derişiminin etkisi

Cu^{2+} takılı EPS katkılı polimerik membranlara α -amilaz adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi 0,1 ile 2 mg/mL lik α -amilaz derişimlerinde incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi bağlanma aktif bölgelerinin doygunluğundan dolayı, 2 mg/mL lik başlangıç α -amilaz derişiminde ve 8 dk.'da

adsorpsiyonda dengeye ulaşılmıştır. Maksimum adsorpsiyon 1 mg/mL lik başlangıç α -amilaz derişiminde 54,2 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Ligand olarak kullanılan Cu^{2+} iyonlarının adsorpsiyona olan etkisini görmek için Cu^{2+} takılı olmayan EPS-PM'nin de α -amilaza karşı davranışı incelenmiş ve ihmal edilebilecek kadar düşük olduğu görülmüştür. EPS-PM spesifik etkileşim gruplarının α -amilaz ile belirli bir konsantrasyona ulaşması nedeniyle adsorpsiyon hızının büyük oranda azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.4: α -amilaz adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi; pH 5 Asetat tamponu, Rotatör hızı: 12 rpm/dk, T: 25°C.

4.2.3 Adsorpsiyon izotermeleri

Adsorpsiyon izotermeleri, çözeltide bulunan maddenin adsorbe edilenin miktarı ile adsorbe eden yapı arasındaki ilişkiyi matematiksel olarak anlatan yöntemlerdir. Bu izoterm yöntemleri arasında en çok kabul gören ve en sık kullanılanlar Langmuir ve Freundlich izoterm tipleridir. Geliştirilen bu yöntemler adsorpsiyondaki tutunmanın tek düzeyde tabaka mı yoksa çok katmanlı bir adsorpsiyon mu olduğunun matematiksel hesaplamasını ortaya koymaktadır.

Adsorpsiyon reaksiyonunda ligand ile ilgili molekül arasında bir denge vardır. Çözelti ortamındaki söz konusu moleküller uygun koşullarda ligand ile karşılaştığında, çözeltide tutunan miktarın derişimi, ligandın yüzeyindeki grupların

oraniyla doğru orantılıdır. Tutunan madde maksimum seviyesine ulaştıktan sonra çözeltinin konsantrasyonu artsa bile tutunan madde miktarında değişiklik görülmez. Bunun nedeni olarak her bir ligand aktif bölgelerinin bir kez adsorpsiyon yapabileceği ve adsorplanan maddenin kendi arasında bir yapı oluşturmadığı varsayılmaktadır. Bu izoterm tipi Langmuir olarak tanımlanmaktadır [36].

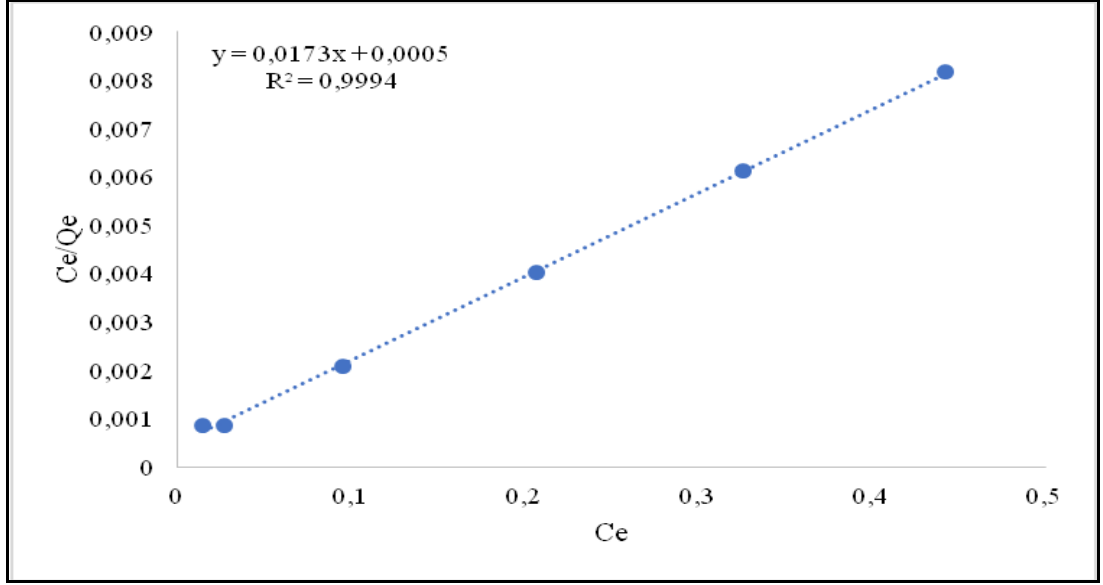
Çoğunlukla tutunan yapı düzeyi, uygun sıcaklıkta konsantrasyonun bir sonucu olarak gerçekleşir. Uygun sıcaklık, uygun denge koşullarında çözeltide tutunan madde fazlası konsantrasyonuna karşı, birim adsorplayıcı madde ağırlığında, adsorplanan çözünen madde miktarı grafiği çizilerek adsorpsiyon izotermi adı verilen bir fonksiyon oluşturulur. Bu fonksiyonun Langmuir izotermine uygunluğunun belirlenmesinde Eşitlik 4.1 kullanılır.

$$Q = Q_{max} \cdot b \cdot Ce / (1 + b \cdot Ce) \quad (4.1)$$

Yukarıdaki denklem eşitlik 4.2'ye uyarlanabilir.

$$Ce/Qe = Ce / Q_{max} + 1/(Q_{max} \cdot b) \quad (4.2)$$

Eşitlikte Q : adsorbente bağlanan α -amilaz miktarı (mg/g), Ce : çözeltideki denge α -amilaz derişimi (mg/mL), b : adsorbanın adsorbente olan ilgisini gösteren Langmuir sabiti (mL/mg) ve Q_{max} : adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. Eşitlik 4.2, deney sonuçlarına göre grafiğe taşındığında Şekil 4.5 ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.5: Cu²⁺ takılı EPS-PM'nin α-amilaz için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Adsorpsiyon davranışlarının incelenmesinde kullanılan diğer bir yöntem olan Freundlich adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyonun sadece liganda bağlı olmayıp yan bağlanma bölgelerinin bulunması ve bu bölgelerin işlem süresince oluşmasının devam etmesiyle adsorpsiyon sürecinin devam ettiğini kabul etmektedir [37].

Yapılan çalışmanın Freundlich izoterminin uygunluğunun belirlenmesinde Eşitlik 4.3 ve logaritmasının da alınmasıyla Eşitlik 4.4 kullanılmaktadır.

$$Q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (4.3)$$

$$\ln Q_e = 1/n \cdot \ln C_e + \ln K_f \quad (4.4)$$

Burada;

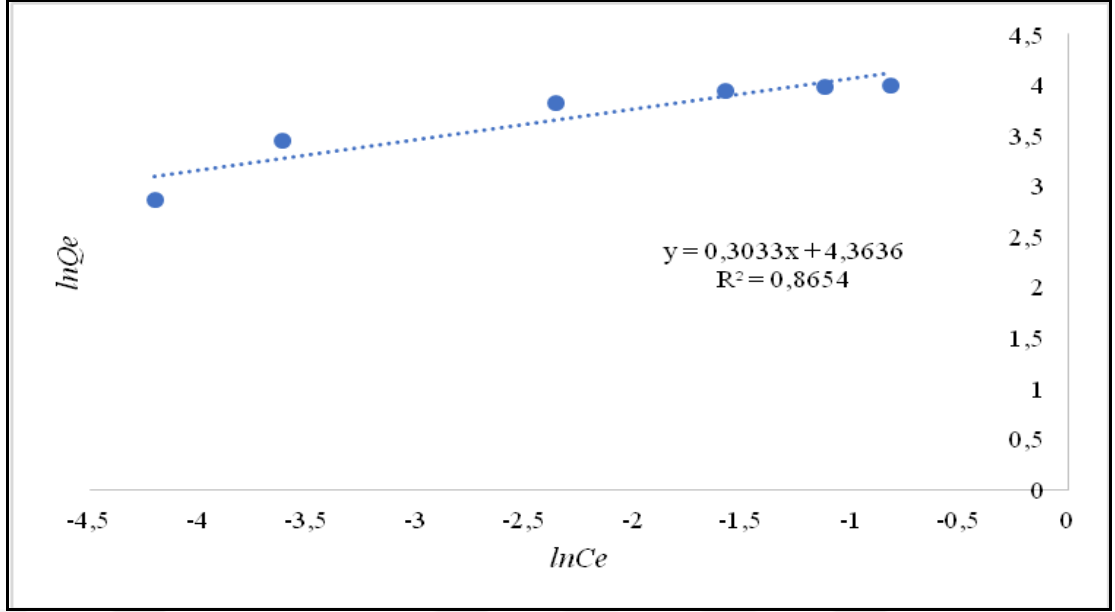
C_e: Adsorpsiyon işlem sonrası çözeltideki analit derişimi (mg/mL)

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

K_f: Adsorpsiyon kapasitesi(mg/g)

n : Heterojinite katsayısı (1'den büyük olmalıdır)

Eşitlik 4.4, deneysel sonuçlara göre grafiğe aktarıldığında Şekil 4.6 ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.6: Cu^{2+} takılı EPS-PM'nin α -amilaz için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Langmuir ve Freundlich izoterminden çıkan sonuçlar Çizelgede 4.1'de verilmektedir.

Çizelge 4.1: α -amilazın Cu^{2+} takılı EPS-PM için Langmuir ve Freundlich izoterm verileri.

Langmuir sabitleri			Freundlich sabitleri		
Q_{max}	b	R^2	K_f	n	R^2
57,80347	0,028902	0,9994	75,54	3,29	0,8654

Çizelge 4.1'den her iki izotermine lineer regresyon katsayıları (R^2) incelendiğinde Langmuir adsorpsiyon izotermine yapılan bu çalışmaya daha uygun olduğu görülmektedir.

Adsorbe olan α -amilazın Cu^{2+} -EPS-PM'a olan ilgisini gösteren b Langmuir sabitinin K_d (disosiyasyon:ayırışma sabiti; M) türünden hesaplanmasıyla, $7,68 \times 10^{-4}$ M gibi bir değere ulaşılmaktadır. 10^{-4} - 10^{-8} aralığında K_d 'lere sahip olan adsorpsiyon sistemlerinin ideal afinite sistemler olduğu literatür bilgisine dayanarak [38], ürettiğimiz Cu^{2+} takılı EPS katkılı polimerik membranların α -amilazın adsorpsiyonu için uygun oldukları görüşünü ileri sürebiliriz.

Yaptığımız çalışmada adsorpsiyon sisteminin “elverişli” veya “elverişsiz” olup olmadığının belirlenmesi için izoterm şeklinin etkisinin belirlenmesi Langmuir izoterminin ana nitelikleriyle tanımlanan boyutsuz bir sabit ayırma faktörü veya denge parametresi olan, Eşitlik 4.5'deki gibi R_L cinsinden tanımlanabilir [39]:

Çizelge 4.2 Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.

R_L Değeri	İzoterm türü
$R_L > 1$	Elverişsiz
$R_L = 1$	Doğrusal
$0 < R_L < 1$	Elverişli
$R_L = 0$	Tersinmez

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

C_0 : Başlangıç α -amilaz derişimi (mg/mL)

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

Cu^{2+} takılı EPS-PM'nin α -amilaz adsorpsiyonuna, α -amilaz başlangıç derişimleri için deneysel değerlerinin R_L sonuçları Çizelge 4.3'de belirtilmiştir.

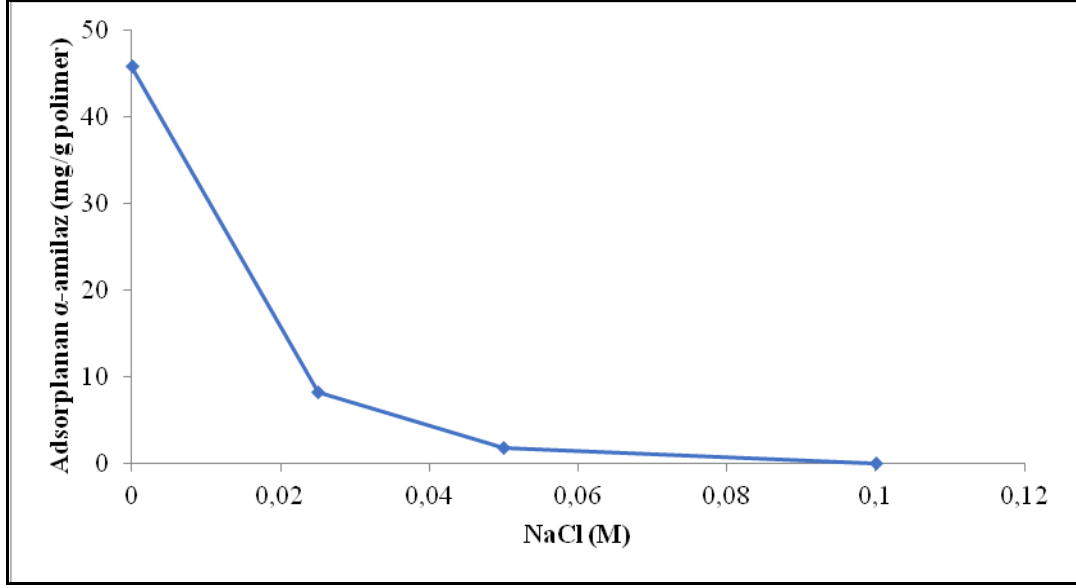
Çizelge 4.3: Langmuir eşitliğine bağlı R_L değerleri.

C_0	R_L
0,1	0,224
0,2	0,126
0,5	0,055
1	0,028
1,5	0,019
2	0,014

Çizelge 4.3 incelendiğinde; R_L değerlerinin 0 ile 1 arasında oluşu Cu^{2+} takılı EPS-PM'nin α -amilaz adsorpsiyonuna karşı istemli olduğunu göstermektedir.

4.2.4 İyonik şiddetin etkisi

α -Amilazın Cu^{2+} takılı EPS-PM'ye karşı adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi ortama adsorpsiyon ortamına farklı derişimlerde NaCl eklenmesiyle incelenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: α-amilaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. α-amilaz derişimi: 0,5 mg/mL, pH 5 Asetat tamponu, Rotatör hızı: 12 rpm/dk T: 25 °C.

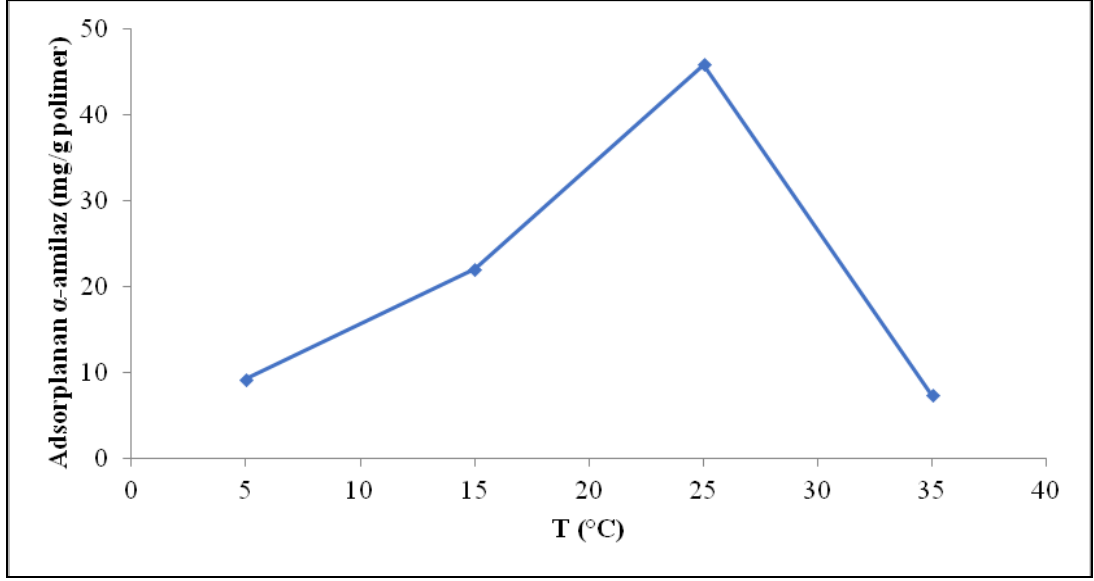
Şekilden de görüleceğı gibi tuz iyonları derişimi arttıkça adsorpsiyonda keskin bir düşüş görölmektedir.

Bunun nedeni iki şekilde izah edilebilir:

1. Tuzun iyonik yapısı yük-yük etkileşimine sebep olduğundan Cu^{2+} bağlanma bölgelerini baskılamaktadır.
2. Tuzun arttırılmasıyla doğru orantılı olarak iyonik şiddette artacağından Cu^{2+} takılı EPS-PM ile α-amilaz arasında elektrostatik itmeler nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Adsorpsiyon sırasında tuz konsantrasyonundaki artış nedeniyle tuzda bulunan Cl^- iyonlarının Cu^{2+} iyonları ile Na^+ iyonlarının ise protein yüzeyindeki negatif yükler ile etkileşime girmesi sonucunda adsorpsiyonda düşüş görölmektedir.

4.2.5 Sıcaklığın etkisi

α-Amilaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5-35°C arasında çalışıldı. Cu^{2+} takılı EPS-PM denge adsorpsiyonu sıcaklığın yükselmesiyle bir süre artmıştır ve maksimum adsorpsiyona 25°C’de ulaşılmıştır (Şekil 4.8). Bu sıcaklığının üzerinde adsorpsiyon kapasitesinde düşüş görölmüştür. Sıcaklığın artması ile adsorpsiyondaki düşüş, bağlanmada elektrostatik etkileşimlerin baskınlığına dikkat çekmektedir.



Şekil 4.8: α -amilaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. α -amilaz derişimi: 0,5 mg/mL, pH 5 Asetat tamponu, Rotatör hızı: 12 rpm/dk.

4.2.6 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Afinite kromatografisinde hedef, en kısa zamanda en verimli şekilde adsorpsiyon işleminin gerçekleşmesidir. Cu^{2+} takılı EPS-PM ile yapılan işlemlerde, desorbe edici ajan olarak 1 M NaCl kullanılmış olup, kullanılan NaCl ile adsorbe edilen α -amilazın %95 oranında bir desorpsiyonu sağlanmıştır. Yüksek bir desorpsiyon oranının sağlanması, NaCl'ün, Cu^{2+} takılı EPS-PM'den α -amilazı elüe etmede uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu göstermiştir.

Cu^{2+} takılı EPS katkı polimerik membranların tekrar kullanılabilirliğinin incelemesi için 30'dan fazla adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde polimer diskler değiştirilmeden defalarca aynı döngüde kullanılmıştır. İşlemler sonrasında Cu^{2+} takılı EPS-PM kapasitesi sadece %5 oranında azalmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri sonrasında Cu^{2+} takılı EPS-PM disklerin yapısında bozulma oluşmamıştır.

İşlemlerin sonucunda sentezlenen Cu^{2+} takılı EPS katkı polimerik membranların yapısının metal şelat afinite kromatografisinde kullanışlı ve kararlı yapıya sahip olduğu gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, bir bakteri türü olan *Arthrospira maxima* (A. Maxima) dan elde edilen ve hücre dışı polimerik yapılar (Extracellular Polymeric Substances, EPS) olarak isimlendirilen farklı fonksiyonel gruplara sahip yapılar PHEMA ve glisidil metakrilat ile muamele edilerek EPS katkılı polimerik membranlar hazırlanmış ve daha sonra fonksiyonel gruplara Cu^{2+} metali immobilize edilmiştir. Sorbent olarak kullanılan Cu^{2+} takılı EPS-PM'ların α -amilaz enzimine karşı adsorpsiyon performansları incelenmiştir.

EPS'siz membranların şişme değerleri %24,3 iken EPS katkılı membranlarda bu değer %44,9 olarak görülmüştür. EPS katkılı ve EPS'siz polimerik membranların yüzey alanları sırasıyla 26,4 ve 2,7 m^2/g olarak bulunmuştur. Ayrıca, her iki yapıya bağlanan Cu^{2+} iyonları da kıyaslandığında, EPS katkılı polimerik membranlara bağlanan iyon miktarının yaklaşık 8 kat fazla olduğu hesaplanmıştır. EPS katkılı polimerik membranların yüzey alanlarındaki değişim ve gözenek yapıları taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri ile de teyit edilmiştir.

Sulu ortamdan α -amilazın adsorpsiyon çalışmalarında, maksimum adsorpsiyonun pH 5 asetat tamponunda 47,7 mg/g polimer şeklinde olduğu görülmüştür. Başlangıç derişiminin adsorpsiyona etkisi incelenirken Cu^{2+} takılı EPS-PM'ların α -amilaza doygunluğunun 2 mg/mL'lik başlangıç derişiminde, yaklaşık 8 dk.'lık zaman diliminde 54,2 mg/g polimer olduğu bulunmuştur. Yüzeye bağlı α -amilaz moleküllerinin desorpsiyonu ılımlı şartlarda NaCl ile gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın adsorpsiyona etkisi incelendiğinde, 25°C'ta maksimum adsorpsiyonun olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, Cu^{2+} takılı EPS katkılı polimerik membranların yapısının metal şelat afinite kromatografisi için kullanışlı ve kararlı bir yapıya sahip olduğu ve afinite kromatografisi için olası kullanılabilirliği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Turková, J., 1993. Bioaffinity chromatography. Vol. 55. Elsevier.
2. Fanali, S., Haddad, P.R., Poole, C. ve Riekkola, M. L., 2017. Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation. Elsevier.
3. Konak, Ü.İ., Turhan, İ. ve Certel, M., 2014. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması, Academic Food Journal/Akademik GIDA. 12, 2.
4. Perret, G. ve Boschetti, E., 2017. Aptamer affinity ligands in protein chromatography, Biochimie.
5. Cuatrecasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads, Journal of Biological Chemistry. 245, 12, 3059-3065.
6. Arora, S., Saxena, V. ve Ayyar, B.V., 2017. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification, Methods. 116, 84-94.
7. Chaiken, I.M., 1983. Molecular Interactions, Affinity Methods, and the Developing Synergism Between Affinity Chromatography and Biological Recognition, in Affinity Chromatography and Biological Recognition, Elsevier. p. 3-6.
8. Odabaşı, M., 2000. DNA carrying magnetic bioaffinity sorbents for systemic lupus erythematosus disease, Yüksek Lisans Tezi Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı., Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
9. Roque, A.C., Silva, C.S. ve Taipa, M.Â., 2007. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives, Journal of Chromatography A. 1160, 1-2, 44-55.
10. Bayramoglu, G., Celik, G. ve Arica, M.Y., 2006. Immunoglobulin G adsorption behavior of l-histidine ligand attached and Lewis metal ions chelated affinity membranes, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 287, 1-3, 75-85.
11. O'carra, P., Barry, S. ve Griffin, T., 1974. Spacer arms in affinity chromatography: Use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects, FEBS Letters. 43, 2, 169-175.
12. Porath, J., 1988. IMAC—immobilized metal ion affinity based chromatography, TrAC Trends in Analytical Chemistry. 7, 7, 254-259.
13. Everson, R. ve Parker, H., 1974. Zinc binding and synthesis of eight-hydroxy-quinoline-agarose, Bioinorganic Chemistry. 4, 1, 15-20.
14. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. ve Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, Nature. 258, 5536, 598.
15. Gaberc-Porekar, V. ve Menart, V., 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, Journal of biochemical and biophysical methods. 49, 1-3, 335-360.
16. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. ve Schäfer, F., 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC), a review, in Methods in enzymology., Elsevier. p. 439-473.
17. Ayyar, B.V., Arora, S., Murphy, C. ve O'Kennedy, R., 2012. Affinity chromatography as a tool for antibody purification, Methods. 56, 2, 116-129.

18. Morgan, J., Forster, C. ve Evison, L., 1990. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges, *Water research*. 24, 6, 743-750.
19. Nielsen, P.H. ve Jahn, A., 1999. Extraction of EPS, in *Microbial extracellular polymeric substances*, Springer. p. 49-72.
20. Comte, S., Guibaud, G. ve Baudu, M., 2006. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: soluble or bound, *Process biochemistry*. 41, 4, 815-823.
21. Brown, M.J. ve Lester, J., 1979. Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers, *Water research*. 13, 9, 817-837.
22. Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C. ve Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides, *Biotechnology advances*. 34, 7, 1159-1179.
23. Zarrouk, C., 1966. Contribution a l'etude d'une Cyanophyce. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima*, Thesis. University of Paris, France.
24. Becker, A., Katzen, F., Pühler, A. ve Ielpi, L., 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 2, 145-152.
25. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. ve Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process biochemistry*. 38, 11, 1599-1616.
26. Nielsen, J.E. ve Borchert, T.V., 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1543, 2, 253-274.
27. Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. ve Levine, M., 1996. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 52, 3, 435-446.
28. Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N. ve Fischer, E.H., 1959. Metal content of α -amylases of various origins, *Journal of Biological Chemistry*. 234, 11, 2901-2905.
29. Muralikrishna, G. ve Nirmala, M., 2005. Cereal α -amylases—an overview, *Carbohydrate Polymers*. 60, 2, 163-173.
30. Kandra, L., 2003. α -Amylases of medical and industrial importance, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 666, 487-498.
31. Baran, N.Y., Acet, Ö., ve Odabaşı, M., 2017. Efficient adsorption of hemoglobin from aqueous solutions by hybrid monolithic cryogel column, *Materials Science and Engineering: C*. 73, 15-20.
32. Çimen, D., Yılmaz, F., Perçin, I., Türkmen, D. ve Denizli, A., 2015. Dye affinity cryogels for plasmid DNA purification, *Materials Science and Engineering: C*. 56, 318-324.
33. Farzi-Khajeh, H., Safa, K.D. ve Dastmalchi, S., 2017. Preparation of p-aminophenol modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles for purification of α -amylase from the bovine milk, *Journal of Chromatography B*. 1068, 210-217.
34. Pandey, G., Munguambe, D.M., Tharmavaram, M., Rawtani, D. ve Agrawal, Y., 2017. Halloysite nanotubes-An efficient 'nano-support' for the immobilization of α -amylase, *Applied Clay Science*. 136, 184-191.

35. Panping, X., Yuchen, Y., Shaochuan, S., Junxian, Y. ve Kejian, Y., 2010. Preparation of supermacroporous composite cryogel embedded with SiO₂ nanoparticles, Chinese Journal of Chemical Engineering. 18, 4, 667-671.
36. Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, Journal of the American Chemical Society. 40, 9, 1361-1403.
37. Redlich, O. J. D. L., ve Peterson, D. L. 1959. A useful adsorption isotherm. Journal of Physical Chemistry, 63(6), 1024-1024.
38. Gurbuz, F., Ceylan, Ş., Odabaşı, M. ve Codd, G. A. 2016. Hepatotoxic microcystin removal using pumice embedded monolithic composite cryogel as an alternative water treatment method. Water research, 90, 337-343.
39. Ngah, W.W., Endud, C. ve Mayanar, R., 2002. Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads, Reactive and Functional Polymers. 50, 2, 181-190.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Nurullah BANİ
Doğum Tarihi ve Yeri: 1987 - Tufanbeyli
E-posta adresi : nurullahbani@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, 2007-2012
Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015-

MESLEKİ DENEYİM VE VE ÖDÜLLERİ

1. Uygulamalı Biyokimyada Güncel Konular-3, Aksaray Üniversitesi, Aksaray 12-14 Temmuz 2017/Yaz Okulu
2. Uygulamalı Biyokimyada Güncel Konular-4, Trakya Üniversitesi, Edirne 27-29 Haziran 2018/Yaz Okulu