



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

KİMYA ANABİLİM DALI

**PHEMA MİKROKÜRE GÖMÜLÜ SÜPER MAKROGÖZENEKLİ
KRİYOJEL KOMPOZİT MEMBRANLARIN ÜRETİLMESİ VE
PROTEİN ADSORPSİYON KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyda CEYLAN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

OCAK-2011

AKSARAY

Her hakkı saklıdır.

T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KABUL VE ONAY BELGESİ

Şeyda CEYLAN'ın PHEMA Mikroküre Gömülü Süpamakrogözenekli Kriyojel Kompozit Membranların Üretilmesi ve Protein Adsorpsiyon Kapasitelerinin İncelenmesi başlıklı Lisansüstü tez çalışması, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12.12.2011..... tarih ve 2011/014 sayılı kararı ile oluşturulan aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS** Tezi olarak **Oy Birliği** ile kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI (Aksaray Ün.)
1. Jüri : Doç. Dr. Handan YAVUZ (Hacettepe Ün.)
2. Jür. : Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGIN (Aksaray Ün.)

İmza

M. Odabaşı
Handan Yavuz
Erzengin

Tezin Savunulduğu Tarih :10.01.2011

ONAY

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12.1.2011.....tarih ve 2011/03-1 sayılı kararı ile Şeyda CEYLAN'ın Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans/Doktora** derecesi alması onaylanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof Dr. Ayşegül YILDIZ

Ayşegül Yıldız

ÖNSÖZ

Protein, peptit ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin yüksek miktarda ve yüksek saflıkta üretilebilmesi, özellikle biyoteknolojik alanda yapılan tüm çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin hızlı gelişimi ile, büyük ölçekte enzimlerin ve proteinlerin üretilmesi ve kaynağından (biyolojik sıvılar ya da dokular) verimli bir şekilde elde edilme çalışmaları hız kazanmıştır. Bu protein ve enzimlerin yüksek oranda sıvı kültür ortamları ve serum gibi biyolojik akışkanlardan toplanması, basit kromatografik ayırma teknikleri ile mümkün olmaktadır. Kromatografi ile yapılan ayrımlar, moleküllerin yük, büyüklük, şekil ve yüzey karakteristiği gibi özelliklerine dayanır (Porath vd., 1975; Davankov vd., 1977). Kromatografik uygulamalarda, membran yapıdaki afinite desteklerinin adsorpsiyon özelliklerinin geliştirilmesi ve daha etkili ayırmanın yapılması için farklı yöntemler benimsenmiştir. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanıma sahip olan afinite kromatografisi, yüksek seçicilikte moleküler düzeyde tanımayaya dayalı olan bir ayırma tekniğidir. Afinite kromatografisinde yalancı spesifik ligandlar özellikle boyalar, amino asitler ve metal şelatlar biyospesifik ligandların yerine kullanılmaktadır. Metal şelat afinite kromatografisinde, katı destek malzemesine kovalent olarak bağlanan metal iyonları, hedef molekülle etkileşerek molekülün adsorbente bağlanmasını sağlamaktadır. Afinite membran teknikleri arasında en aygın olarak; yüzeyde açığa çıkan histidin, sistein, triptofan ve tirozin ya da polihistidin kuyruklu biyomolekülleri içeren proteinlerin saflaştırılmasında çoğunlukla uygulanan, ‘İmmobilize metal afinite membranları’dır (İMAM). Bu yöntemin üstünlüğü, immobilize metal iyonu ile biyomoleküllerin yüzeyinde yer alan bu aminoasitler arasındaki seçici etkileşimden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, afinite membranına immobilize edilen metal iyonlarının ancak EDTA (etilendiamintetraasetikasit) gibi çok güçlü şelatörlerle yüzeyden uzaklaştırılabilmesi ve immobilize metal afinite membranının kolay rejenerasyonları dolayısı ile protein ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde defalarca kapasitesinde önemli bir değişme olmaksızın kullanıma olanak tanınması bu yöntemin sunduğu diğer avantajlardır.

TEŞEKKÜR

Hayata ve bilime olan sevgisiyle bana örnek olan, çalışmalarımın her aşamasında sahip olduğu bilgi ve tecrübe ile bana yol gösteren çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN, Yrd. Doç. Dr. Muhsin KARAASLAN, Yrd. Doç. Dr. Nuri ÜNLÜ, Doç. Dr. Ayfer MENTEŞ ve Prof. Dr. Yaşar Kemal YILDIZ'a, birlikte çalışmaktan ve birlikte olmaktan mutluluk duyduğum Mehmet GEDİKLİ, Arş. Grv. Tüliden KALBURCU, İdris SARGIN, Arş. Grv. Nuray YILMAZ, İsmihan GÜNEŞ, Arş. Grv. Cem Burak YILDIZ ve aynı bölümde olmasak da bana her zaman destek olan arkadaşım Elif DÜZEL'e, bütün hayatım boyunca sevgi ve anlayışlarıyla her zaman yanımda olan ve bana her konuda destek olan annem, babam, ablam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şeyda CEYLAN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	SAYFA NO
ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kromotografi ve Kromatografik Teknikler.....	1
1.2. Biyoafinite Kromatografisi.....	2
1.2.1. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi	4
1.2.2. İMAK' ın kimyasal prensipleri.....	10
1.2.2.1. İMAK için kromatografik destekler (Matriksler).....	10
1.2.2.2. İMAK'de şelat oluşturuucu ligandlar.....	11
1.2.3. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki amino asit metal etkileşimleri	15
1.2.4. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki protein-metal etkileşimleri.....	16
1.2.5. İMAK'da peptid ve proteinlerin adsorbsiyon-desorbsiyon mekanizmaları	18
1.2.5.1. pH etkisi.....	19
1.2.5.2. Tuz etkisi	20
1.2.5.3. Yarışmalı ajanlar.....	21
1.2.6. İMAK'de proteinlerin alıkonma davranışları.....	22
1.2.7. Protein saflaştırılmasında İMAK uygulamaları.....	24
1.2.8. İMAK' ın bazı avantajları.....	27
1.2.8.1. Denatürasyon ve renatürasyon durumunda İMAK kullanımı.....	28
1.2.9. İMAK' ın bazı dezavantajları	29

1.2.7.1. Kolon içinde olması muhtemel redoks tepkimeleri	29
1.2.7.2. Metal toksisitesi	30
1.3. Kriyojeller	30
1.3.1. Kriyojellerin hazırlanışı ve karakterizasyonu	33
1.3.2. Kriyojellerin uygulamaları	37
1.4. Lizozim	37
1.4.1. Lizozim enziminin yapısı	38
2. KAYNAK ÖZETLERİ	40
3. MALZEME VE YÖNTEM	41
3.1. Malzeme	41
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	41
3.2. Yöntem.... ..	42
3.2.1. PHEMA mikrokürelerin hazırlanması	42
3.2.1.1. Polimerizasyon sistemi	42
3.2.1.2. Polimerizasyon yöntemi	43
3.2.1.3. PHEMA mikrokürelerin temizlenmesi	44
3.2.1.4. PHEMA mikrokürelerin yüzeyine iminodiasetik asit bağlanması	45
3.2.1.5. PHEMA mikrokürelere Cu^{2+} iyonlarının takılması	45
3.2.2. Cu^{2+} Bağlı PHEMA mikroküreler gömülü Poli(2-Hidroksietil Metakrilat) kriyojellerin hazırlanması	46
3.2.3. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu	46
3.2.4. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	48
3.2.5. Kriyojelin karakterizasyonu	48
3.2.5.1. Şişme deneyi	48
3.2.5.2. Yüzey morfolojisi	49
3.2.5.3. Yüzey alanı ölçümleri	49
3.2.5.4. FTIR çalışmaları	50
3.2.5.5. Elementel analiz	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	50

4.1. Cu²⁺-takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakrogözenekli	
Kriyojellerin Karakterizasyonu	50
4.1.1. Şişme deneyi.....	50
4.1.2. Elementel analiz.....	51
4.1.3. Yüzey alanı ölçümleri.....	51
4.1.4. Yüzey morfolojisi.....	52
4.1.5. FTIR çalışmaları.....	52
4.2. Cu²⁺-takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakro Gözenekli	
Kriyojellere Sulu Çözeltilerden Lizozim Adsorpsiyonu.....	55
4.2.1. pH etkisi.....	55
4.2.2. Lizozim adsorpsiyonuna tampon etkisi.....	56
4.2.3. Lizozim başlangıç derişiminin etkisi.....	57
4.2.4. Adsorpsiyon izotermi.....	57
4.2.5. Adsorpsiyonun kinetik modellemesi.....	60
4.2.6. Lizozim adsorpsiyonuna Cu ²⁺ -takılı PHEMA mikrokürelerinin	
miktarının etkisi.....	62
4.2.7. Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	63
4.2.8. Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi	64
4.2.9. Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	65
4.2.10. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	65
5. SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PHEMA Mikroküre Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojel Kompozit Membranların
Üretilmesi ve Protein Adsorpsiyon Kapasitelerinin İncelenmesi

Şeyda CEYLAN

T.C

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

Bu çalışmada, lizozimin etkin bir şekilde ayrılması için Afinite kromatografisi yöntemleri arasında, son yıllarda yoğun bir uygulama alanı bulan, İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) kullanılmıştır. Bu amaçla, yaklaşık 2 µm çapında poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) mikroküreler hazırlanmış, bu kürelere iminodiasetik asit (İDA) kovalent olarak bağlanmış, daha sonra da İDA üzerinden Cu^{2+} takılmıştır. Son olarak hazırlanan bu partiküller ile PHEMA partikül gömülü süpermakrogözenekli kriyojel kompozitler hazırlanmıştır.

Bu amaçla, monomer olarak poli(2-hidroksietil metakrilat), çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid, başlatıcı/aktivatör olarak N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED)/amonyum persülfat (APS) kullanılmış ve radikal kriyo-kopolimerizasyon yöntemiyle 5 mL'lik plastik tüplerde sentezlenmiştir. Hazırlanan Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojeller yüzey alan tayini, şişme testleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM), FTIR ile karakterize edilmiştir. Sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonuna pH'nın, tamponun derişimin, akış hızının, iyonik şiddetinin, ligand miktarının ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 9 tris-baz tamponunda, 5 mg/mL başlangıç lizozim derişiminde 107,14 mg/g polimer olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojeller üzerine enzimin defelarca adsorplanıp desorplanabildiği belirlenmiştir.

2011-76 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Afinite, Lizozim, Kriyojel, İMAK, Adsorpsiyon
Bilim Kodu: 1.020

ABSTRACT

Master of Science

The Production of PHEMA Microbead Embedded Supermacroporous Cryogel
Composit Membranes and Investigation of Their Protein Adsorption Capacities

Şeyda CEYLAN

T.C

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

In this study, Immobilized Metal Affinity Chromatograph (IMAC) finding a wide application area among affinity chromatography methods was used for removal of lysozyme efficiently from aqueous solutions. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads with the size of about 2 μm were prepared, and than iminodiacetic acid (IDA) was covalently attached to these beads. Then, Cu^{2+} ions were attached to PHEMA beads modified by IDA. And finally, supermacroporous poly (2-hydroxyethyl methacrylate) base monolithic cryogel column embedded with PHEMA-IDA- Cu^{2+} beads.

For this purpose, supermacroporous composite cryogels were prepared by free radical polymerization using *N,N,N',N'*-tetramethylene diamine (TEMED) and ammonium persulfate (APS) as initiator/activator pair, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (MBAAm) as cross-linker in a plastic syringe of 5 mL. Prepared supermacroporous cryogels with embedded PHEMA-IDA- Cu^{2+} beads were characterized by FTIR, SEM, swelling tests and surface area measurements. The effect of pH, buffer, ionic strength, initial lysozyme concentration, temperature and flow rate on adsorption were investigated. The maximum amount of lysozyme adsorption from aqueous solution was at 107,14 mg/g polymer in Tris-Base buffer at pH 9 with initial lysozyme concentration of 5 mg/mL. It was also observed that enzyme could be repeatedly adsorbed and desorbed on the supermacroporous cryogels with embedded PHEMA-IDA- Cu^{2+} beads.

2011-76 Pages

Keywords: Lysozyme, Cryogel, Affinity, IMAC, Adsorption

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin alt başlıkları.....	3
Şekil 1.2. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.3. İDA Metal-Protein Kompleksi. İmmobilize bir Cu^{++} iyonuna bağlı bir proteinin histidin rezidüsünün şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.4. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi. a. Protein yüzeyindeki histidin grupları ile metal-şelat etkileşimi b. Proteinin C veya N terminaline ilave edilen His-etiketi ile metal-şelat etkileşimi.....	7
Şekil 1.5. İMAK' daki şelatlayıcı ligandlar.....	14
Şekil 1.6. İMAK'da kullanılan bazı boyaların metal iyonları ile yaptıkları kompleksler.....	15
Şekil 1.7. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi.....	34
Şekil 1.8. Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı.....	35
Şekil 1.9. Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri.....	36
Şekil 1.10. Bakteri hücre duvarlarının NAM-NAG polisakkarit birimleri.....	38
Şekil 1.11. Yumurta akı lizoziminin birincil yapısı.....	39
Şekil 3.1. PHEMA mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sisteminin şematik görünümü.....	43
Şekil 3.2. Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküreler ile lizozim molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.....	47
Şekil 4.1. Şişmiş ve kurutulmuş Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojel.....	51
Şekil 4.2. PHEMA ve Cu^{2+} -takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojellerin SEM mikrofotografı.....	53
Şekil 4.3. A; İDA'nın FTIR spektrumu B; Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelerin FTIR spektrumu.....	54
Şekil.4.4. Lizozim adsorpsiyonuna trizma-baz tamponunda pH'nın etkisi.....	55
Şekil.4.5. Lizozim adsorpsiyonuna tampon etkisi.....	56
Şekil.4.6. Lizozim adsorpsiyonuna lizozim başlangıç derişiminin etkisi.....	57

Şekil 4.7. Lizozimin Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	59
Şekil.4.8. Lizozim adsorpsiyonuna Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelerin miktarının etkisi.....	62
Şekil.4.9. Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	63
Şekil.4.10. Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi.....	64
Şekil.4.11. Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler.....	2
Çizelge 1.2. Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması.....	9
Çizelge 1.3. İMAK’da immobilizasyon için şelat oluşturuıcı bazı bileşikler.....	12
Çizelge 1.4. Protein yüzeyindeki uygun histidin ve triptofan uzantılarına dayanan protein metal afinite tahminleri.....	23
Çizelge 1.5. Protein alıkonmasında yer alan amino asitlerin bireysel dağılımı.....	23
Çizelge 1.6. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri.....	32
Çizelge 1.7. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış.....	33
Çizelge 3.1. Polimerizasyonda kullanılan kimyasal maddeler.....	42
Çizelge 3.2. PHEMA mikrokürelerin polimerizasyon reçetesi ve koşulları.....	44
Çizelge 4.1. Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.....	59
Çizelge 4.2. Langmuir eşitliğine dayalı R_L değerleri.....	60
Çizelge 4.3. Cu^{2+} -takılı PHEMA partikül gömülü kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri.....	62

SİMGELER DİZİNİ

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

KISALTMALAR DİZİNİ

AAm	Akrilamid
APS	Amonyum Persülfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartik Asit
ATR	Attenuated Total Relectance
BET	Yüzek Karakterizasyon Cihazı
BPO	Benzoil Peroksit
β-ME	β-Merkaptoetanol
BSA	Sığır Serum Albumin
CB	Cibacron Blue
CM-Asp	Karboksimetil Aspartik Asit
CR	Cibacron Red

Cys	Sistein
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FTIR	Fourier Transform Infrared
Glu	Glutamik Asit
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
His	Histidin
HP-IMAK	Yüksek Performans İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi
HSA	Human Serum Albumin
IgG	İmmunoglobulin
IEC	İyon Değişim Kromatografisi
İDA	İminodiasetik Asit
İMAM	İmmobilize Metal Afinite Membranları
İMAK	İmmobilize Metal iyon Afinite Kromatografisi
kDA	Kilodalton
KGC	Gözenekli Cam Kromatografisi
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
MBAAm	N,N-Metilen-Bis-Akrilamid
Me	Metal
NAG	N-Asetilglukozamin
NAM	Nasetilmuramik Asit
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
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
UFLMP	Sıvı mikrofaz

1. GİRİŞ

1.1. Kromatografi ve Kromatografik Teknikler

Kromatografi, maddelerin, farklı ortamlardaki davranışlarının, birbirlerinden ayrılmalarına yol açması esasına dayanır. 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 ayrımlar gerçekleştirilebilmektedir (Porath vd., 1975; Otto vd., 1993). Bu ayrımlarda 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 ayrımı ve ürün elde edilmesi, kompleks biyolojik örneklerden başarılı şekilde, endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilebilmektedir (Yılmaz, 2006; 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).

1.2. Biyoafinite Kromatografisi

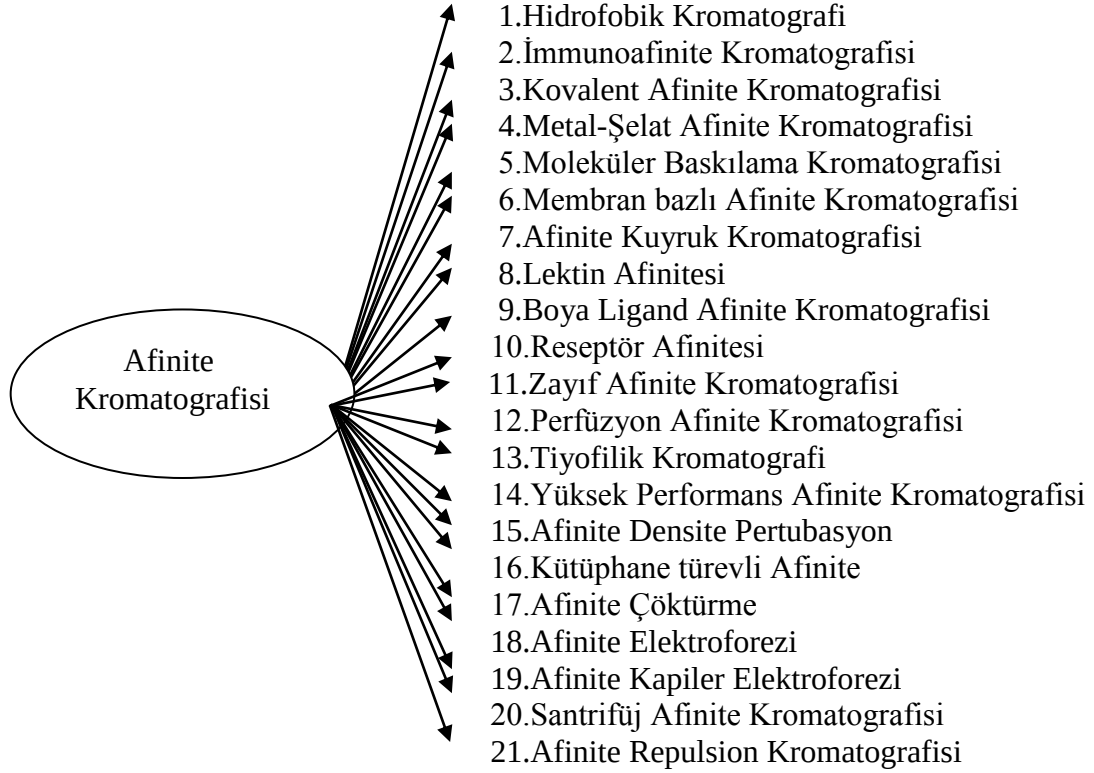
Biyoafinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir.

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 antikorları 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

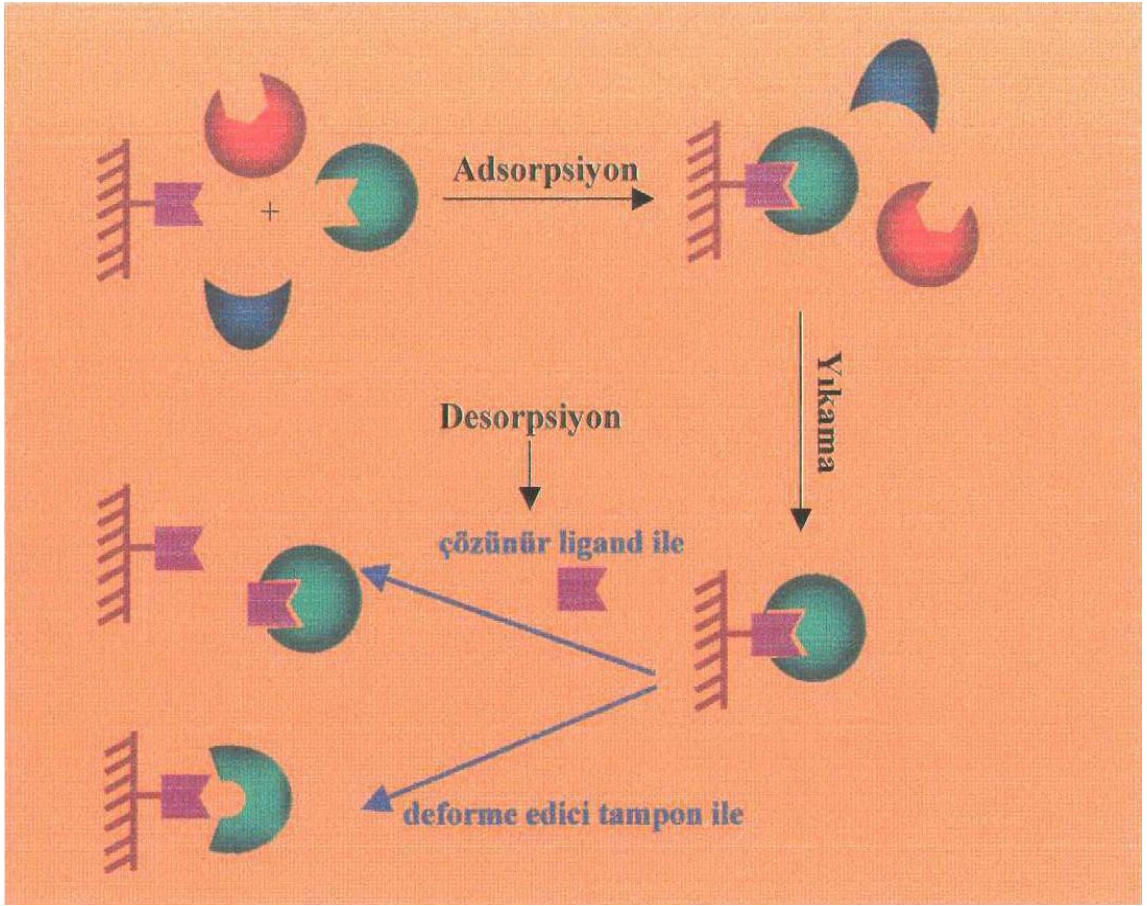
Ligand	Ligandla Etkileşen Protein
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör çeşitleridir)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asite bağlı protein (enzim veya histon)
Hormon, Vitamin	Reseptör,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

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



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin alt başlıkları

Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.2’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 1.2. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi

1.2.1. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi

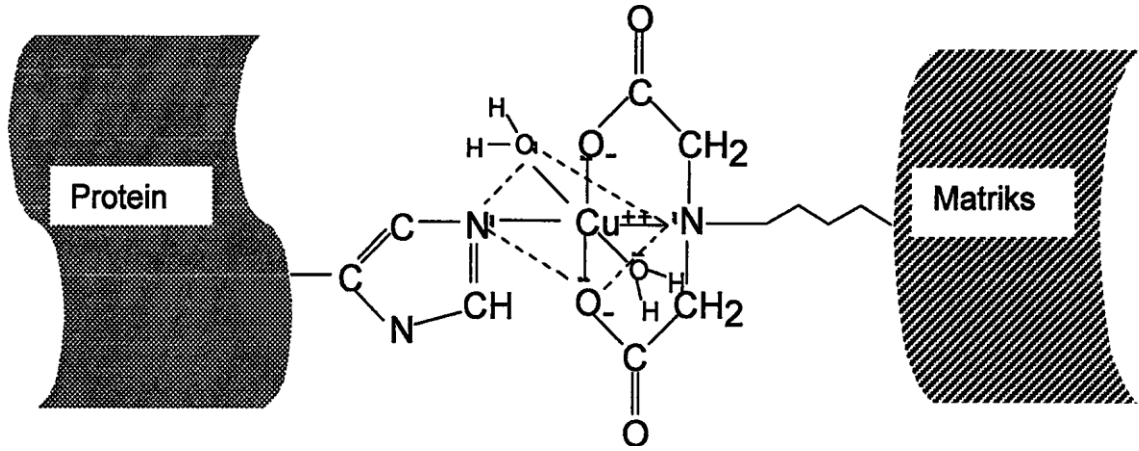
İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi (İMAK)' nin başlangıcı, Helfferich' in küçük moleküllerin “ligand değişim kromatografisi” ni öne sürdüğü 1961'e kadar uzanabilmektedir (Porath vd., 1975). Bu tekniğin temeli ve uygulamaları, Davankov ve Semechkin tarafından etraflıca gözden geçirilmiştir. 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.

Katı bir destek üzerine metal iyonunu immobilize etmek için şelatlayıcı bir ajanın kullanımı, protein-metal etkileşimlerinin serbestlik derecesini azaltır. Bu kısıtlama, proteinlerin zengin saflaştırılması ve ayrılmasına olanak sağladığı gibi, denatürasyonu azaltabilir ve aktivitesini devam ettirebilir. Çözeltideki metal kompleks çalışmaları üzerine kurulu şematik bir resim Şekil 1.3' de gösterilmektedir.



Şekil 1.3. İDA Metal-Protein Kompleksi. İmmobilize bir Cu^{++} iyonuna bağlı bir proteinin histidin rezidüsünün şematik gösterimi. Metal, katı bir desteğe bağlı İDA ile şelat oluşturuyor

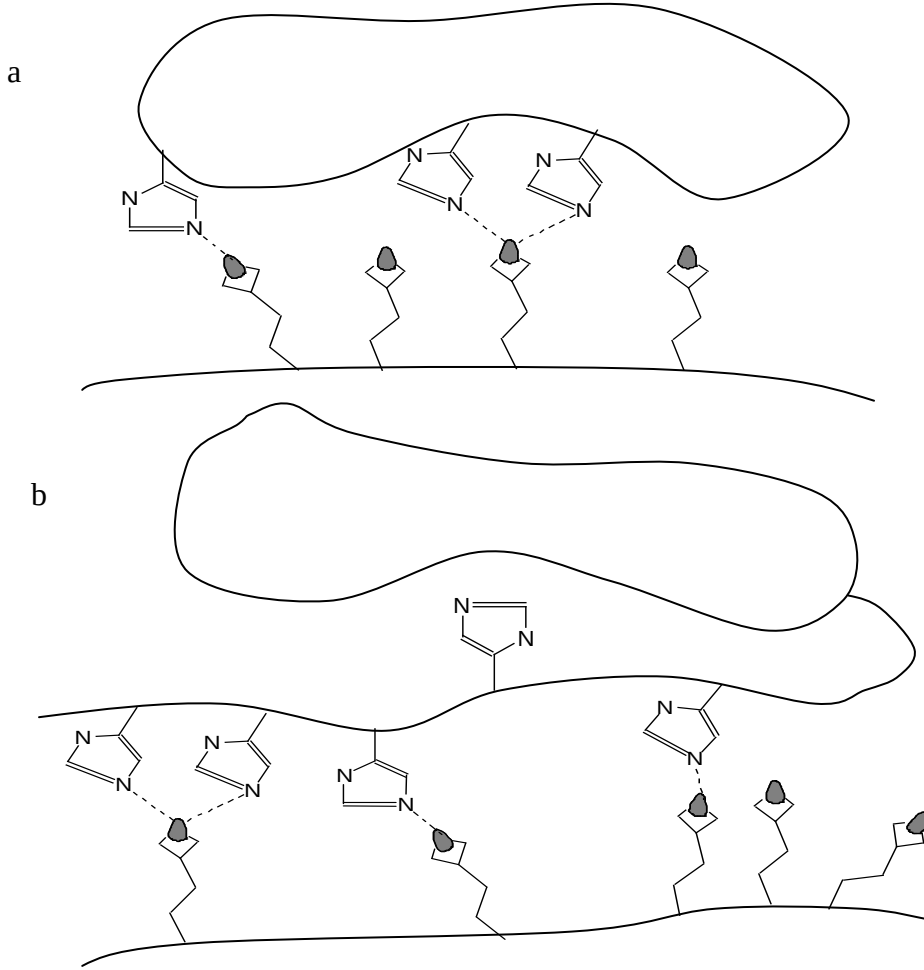
Bir İMAK kolonu, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} gibi herhangi bir iyon çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle yüklenebilir. Çözeltiyi kolondan geçirme işlemine, çözeltideki metal iyonu ile sabit fazda şelat oluşturan metal iyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam edilir.

İminodiasetik asit (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 histidinin imidazol grubu gibi elektron verici amino asit rezidüleri, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Biyopolimerlere ligandın bağlanması, metal şelasyonunun yanısıra elektrostatik, hidrofobik ve vander wall's etkileşimlerini de içermektedir. Proteinler, immobilize metal ile aralarındaki afinite sabitini azaltan bazı şartlarda, komplekslerinden ayrılabilirler. Tuz derişiminin ve pH'nın değışimi veya bağlanmada görev alan amino asit rezidülerine benzerliğı bulunan yarışmalı bir ajanın ortama eklenmesi, proteini bağı bulunduğı kompleksten uzaklaştırabilir. İmidazol ve histidin, İMAK' de bağı 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 düşünülebilen ve elektron çifti kabul edilen Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), 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 bağı 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 değıştirebilir. 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., 1992; Sulkowski, 1985). Şekil 1.4 Afinite desteğe şelatlanmış bir metale proteinin bağlanmasını göstermektedir (Ueda vd., 2003).



Şekil 1.4. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi.
a. Protein yüzeyindeki histidin grupları ile metal-şelat etkileşimi
b. 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 oluşturunucu 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 oluşturunca ajanların kullanılması da bağlı proteinlerin desorpsiyonunu sağlar; fakat bu durumda sorbentin bağlama etkisi tahrip edildiği için, bir daha ki ayırmadan önce matriks tekrar şelat oluşturunca iyon ile yüklenmelidir.

Protein ayırmadaki seçicilik, uzatıcı kolla, ligand yoğunluğu, tuz derişimi ve yarışmacı ajanların değişmesi ile veya şelat oluşturunca 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 oluşturunca ligand üzerine immobilize edilebilir ve daha güçlü şelat yapan başka bir ajan ile ortamdan uzaklaştırılabilir. Metal bağlama özellik kaybını minimum düzeyde tutmak için, şelat oluşturunca jel sabitleştirilmelidir. Özel ayırma metotları, uygun metal seçimi ile çalışılabilir ve protein ile ligand arasında farklı adsorpsiyon özellikleri, şelat oluşturunca 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 ve arkadaşları tarafından yayınlandı. Porath'ın çalışması, destek materyali olarak agaroz veya dekstran çapraz bağlı polimerik matrikslerin kullanımı, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ve 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 (Chaouk ve Hearn, 1999; Porekar ve Menart, 2001).

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

1.2.2. İMAK' ın kimyasal prensipleri

1.2.2.1. 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 ölçeğe 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.

1.2.2.2. İMAK’de şelat oluşturuıcı ligandlar

Bir kromatografik teknik olarak İMAK’ın çalışma prensibi şelat oluşturuıcı bir liganda takılı olan metal iyonu ile bir proteinin dış yüzeyine yönlenmiş 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-hidroksişuinolin (8-HQ) vb.), üç dişli (iminodiasetik 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 kullanılanlarıdır. Bu güne kadar pek çok şelat oluşturuıcı 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; Garberc vd., 2001). Bu bağlanma davranışı metal ile şelat oluşturuıcı ligand arasındaki sağlamlılığı artırır (metal iyon sızması önlenmiş olur). Fakat diğer yandan metal ile şelat oluşturuıcı 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; Garberc vd., 2001).

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’da immobilizasyon için şelat oluşturuca bazı bileşikler

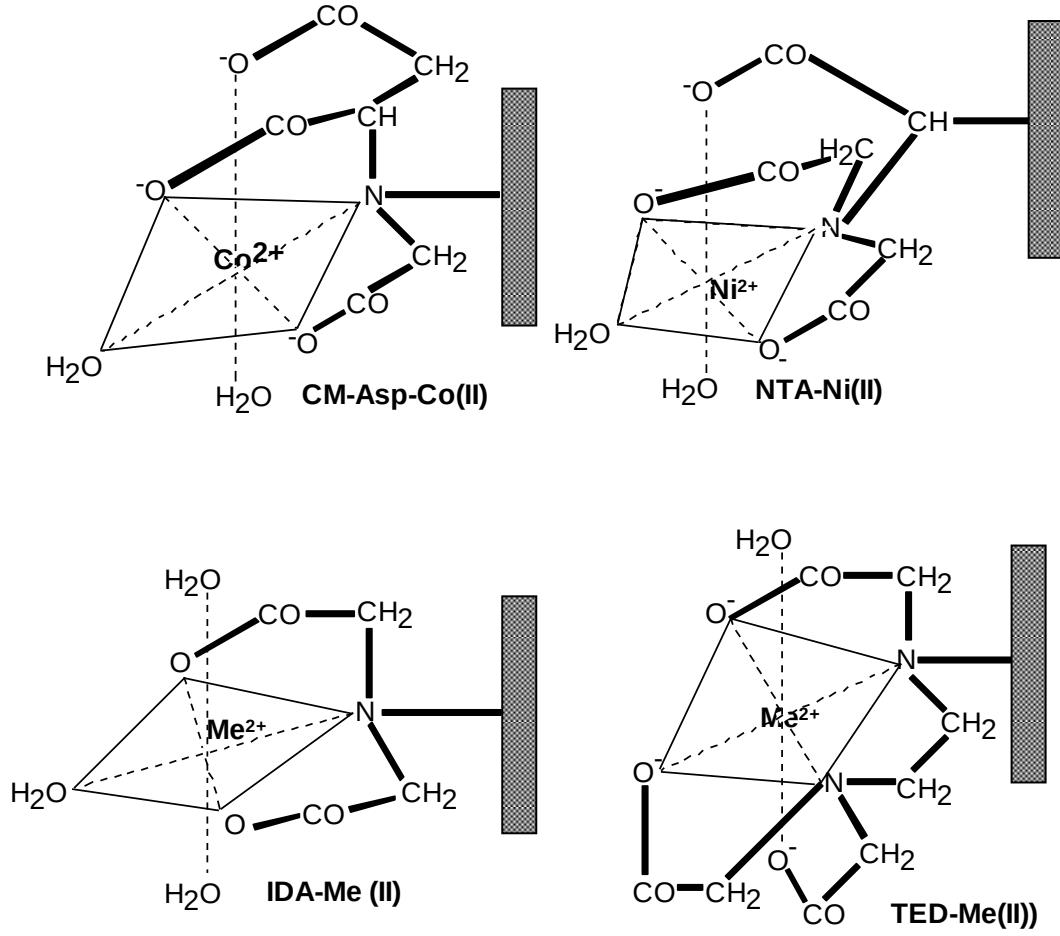
Şelatlayıcı Bileşik	Koordinasyon	Metal İyonu
Salisilaldehit	İki dişli	Cu^{2+}
8-Hidroksikinolin	İki dişli	$\text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$
N-Metakriloil (L) histidin metil ester (MAH)	İki dişli	Fe^{3+}
Dipikolamin (DPA)	Üç dişli	$\text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$
İminodiasetik asit (İDA)	Üç dişli	$\text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Ga}^{2+}$
o-Fosfoserin (im-OPS)	Üç dişli	$\text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$
Tris (2-aminoetil) amin (TREN)	Üç dişli	Cu^{2+}
1,4,7 Trisiklononan	Üç dişli	$\text{Cu}^{2+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}$
Nitrilotriasetik 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		Fe^{3+}

Bir liganda metal iyonunun bağlanması, bir metal komplekse nazaran metal şelatla daha güçlüdür. Bir metal şelatın daha büyük olan dayanıklılığı, çok dişli ligandtan 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 sayı ve büyüklüğü ile kombinasyondaki şelat halkasının sayı, dağılım ve büyüklüğü, şelat enerjisi için entropik katkıda bulunur.

İMAK'da bugüne kadar en fazla kullanılan şelat oluşturunca ligandlar arasında İDA güncelliğini korumaktadır. Porath ve Olin, agaroz bazlı bir sabit faz üzerine tris (karboksi metil) etilen diamin (TED) gibi diğere bir şelatlayıcı da sentezlediler. Ramadan ve Porath, Fe^{3+} 'ü immobilize edebilen mono-, di-, tri- ve hegzahidroksamat gibi şelat oluşturunca ligandlar ile bağlanan agaroz tipini ve sentezlerini tanımlayan bir dizi çalışma yapmışlardır (Ramadan ve Porath, 1985). İMAK'da şelat oluşturunca ligandların bazıları Şekil 1.5'de gösterilmektedir.

İMAK'da kullanılan etkili ligandlar olmasına rağmen (Şekil 1.5), 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 katyon 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.

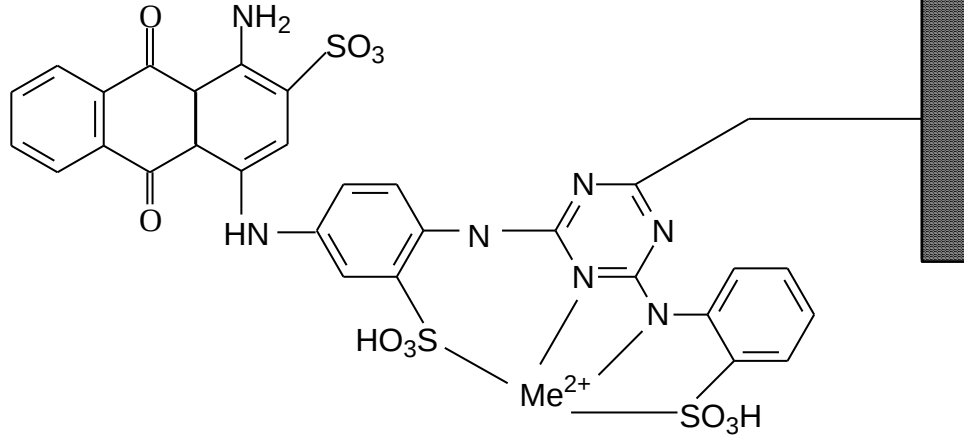


Şekil 1.5 İMAK' daki şelatlayıcı ligandlar

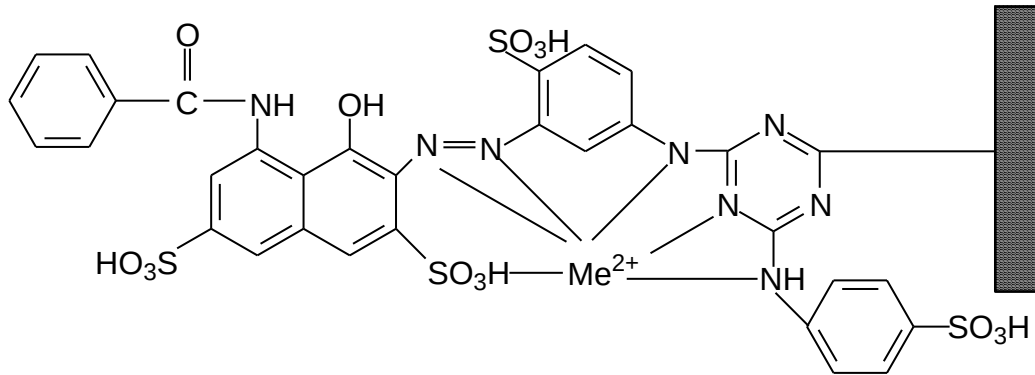
Cibacron blue (CB), Cibacron red (CR), Procion Brown (PB) gibi triazin boyalar İMAK'da uygulanabilen diğer şelat oluşturuç ajanlardandır (Şekil 1.6) (Arica vd., 1998; Denizli ve Pişkin, 2001). Fakat metal iyonlarını immobilize etmek için kullanılan boya şelatlayıcılar, dişli şelatlayıcı ligandlar kadar 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



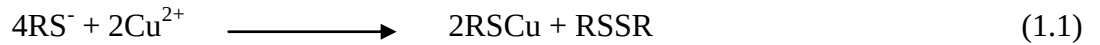
Şekil 1.6 İMAK’da kullanılan bazı boyaların metal iyonları ile yaptıkları kompleksler

1.2.2.3. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki amino asit metal etkileşimleri

Amino asitler çözeltideki pek çok metal iyonu ile dayanıklı sürekli şelat halkalarını oluştururlar (Hansen ve Linberg 1995; Williams, 1971). Amino asitlerin genel yapısı α amino ve karboksil grubundan ibaret olan $\text{NH}_2\text{CH(R)COO}^-$ yapısında olup, her iki grup da şelat oluşumuna katılır.

Bazı amino asitler yan R zincirinde bulunan ve kompleks oluşturmada α -amino ve karboksil gruplarıyla yarışan, etkili verici atomlara sahiptir. Amino asitlerin NH_2 ve 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. Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi iyonlar amino asitlerin imidazol, tiyol ve indol fonksiyonel gruplarını hedef alır. Bu sınır metal iyonları şelat halkası oluşturmaya tercih ederken, Mg^{2+} ve 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 α -amino gruplarını içine alan 5 üyeli halka, α -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 histidinin bütün verici gruplarının birleştiği bir yapıyı da oluşturabilirler. Oluşan yapı pH'nın bir fonksiyonudur (Hansen ve Linberg 1995; Williams, 1971). 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 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.

α -amino asitlerin tutunma davranışı silika bazlı jele bağlanmış metal yüklü İDA ve çıplak İDA ile karşılaştırıldığında, Cu^{2+} -İDA-silikanın bütün α -amino asitleri tuttuğunu ve tutunmanın pH 6'da daha yüksek olduğunu bulunmuş ve Cu^{2+} -İDA kolonlarındaki α -amino asitlerin tutunma süreleri ve serbest çözeltideki Cu^{2+} ile amino asitten elde edilen komplekslerin denge sabitleri karşılaştırılmıştır.

Serbest çözeltide en güçlü kompleksleri oluşturan, α -amino asitlerden olan histidin ve sistein, Cu^{2+} -İDA kolonlarında daha güçlü bir şekilde tutunmaktadır.

1.2.2.4. Serbest çözeltide ve immobilize formdaki protein-metal etkileşimleri

Serbest çözeltideki protein-metal iyonu etkileşimlerinde göz önünde bulundurulacak olan birkaç faktör vardır (Williams, 1991). 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 (Garberc vd., 2001).

İMAK kolonlarına protein bağlanması, değişik tuz derişimlerinde 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).

1.2.3. İMAK'da peptid ve proteinlerin adsorbsiyon-desorbsiyon 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 ve arkadaşları, İMAK' de alıkonma 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.

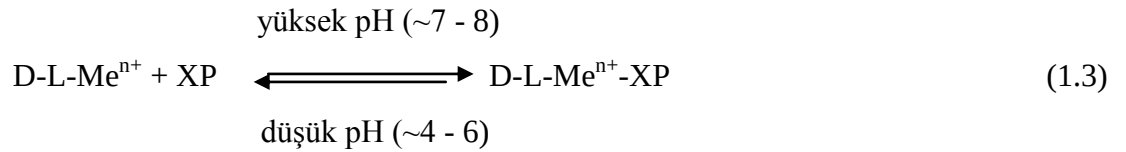
Protonlama, desorpsiyon için yaygın bir prosedürdür. Protein yüzeyindeki elektron verici grubun protonlanması, koordinasyonu tersine çevirerek proteinin ayrılmasını sağlar.

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; Grisshammer 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 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).

1.2.3.1. 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, 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.

Kosmotropik tuzlar, denature proteinlerin yeniden doğal yapılarına dönme oranını arttırır ve protein denatürasyonunun hassasiyetini azaltır. Bu tuzlar proteinin yüklü gruplarıyla direk etkileşmezler ve protein yüzeyinden ayrı dururlar. Çözücüye kosmotropik tuzların katılması proteinin hidrofobik etkileşmelerini arttırır. Polar olmayan grupların, bir proteinin sulu çözeltisine etkimesi su moleküllerinin bu gruplar etrafında düzenli bir yapı almasına ve böylece istenmeyen bir şekilde, sistemin entropisinin düşmesine neden olur. Kosmotropik tuzun eklenmesi suyun daha da farklı bir yapı almasına neden olabilir. Su molekülleri bu tuzların etrafında sıkı bir hidrasyon küresi oluşturur ve proteinin apolar grupları çevresinde daha fazla su toplanır.

Hidrofobik etkileşmeler, yalnızca proteinin kararlılığına katkıda bulunmaz, aynı zamanda kromatografik matriks yüzeyine adsorpsiyonu destekler.

Kozmotropik tuz-destekli adsorpsiyon; proteinin, çözeltilerinden matrix yüzeyine doğru hareket ettirilmeye zorlanmasıyla meydana gelir. İMAK de, sıvı faz çok hidrofilik tuzlarla yüklendiğinde, immobilize metal iyonları ile kaplanmış hidrofobik özellikli polimerik veya silika matrikslerine yakın bölgeler, proteinlerce zenginleşir. Eğer tutturulmuş ligandlar yeterince esnek ise, o zaman bunlar protein molekülünde bulunan çatlak ve yarıklara girebilirler. Sonuç olarak kısa düzeyli çekici kuvvetler etkili olur. Adsorpsiyon, proteinin elektron verici amino asit gruplarının, metalin koordinasyon küresinin dış tarafına yaklaşmasıyla oluşur. Bu oluşum yük transferini ve metalin bağ kuvvetlerinin etkinlik kazanmasını sağlar.

1.2.3.3. 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) imidazol 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 substratının etkinliğini tahrip eder ve eluentdeki proteini denature edebilir.

1.2.4. 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). İMAC deki tutunma prosesinin fizikokimyasal özellikleri tam olarak anlaşılmış 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 peptitin amino asit kompozisyonu bilindiğinde, hangi çeşit metal iyonlarının İMAK'ta alıkonmaya neden olacağı Çizelge 1.4'deki kurallar kullanılarak bulunabilir. İMAK'ta protein adsorpsiyonunda yer alan başlıca amino asitlerin alıkonma kuvveti Çizelge 1.5'da gösterilmiştir (Ueda vd., 2003).

Çizelge 1.4. Protein yüzeyindeki uygun histidin ve triptofan uzantılarına dayanan protein metal afinite tahminleri

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

Çizelge 1.5. Protein alıkonmasında yer alan amino asitlerin bireysel dağılımı

Fonksiyonel Grup	Alıkonma Kuvveti
Histidin	+ + + +
Sistein ^a	+ + + +
Aspartik asit, Glutamik asit	----
Lizin, Arjinin	+
Triptofan, trozin, fenilalanin	+
N-Terminal	+

^asistein indirgenmiş formda

Hemdan ve arkadaşları 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. 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 bağı 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), kalmmodolin (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 Me^{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 ve arkadaşları his-trp, his-tyr-NH₂ ve his-gly-his dizinlerine sahip olan peptitlerin Co²⁺, Ni²⁺ ve Cu²⁺ immobilize İDA-sefadeks kolonlar için yüksek afiniteye sahip olduklarını göstermişlerdir. His-trp dizinlerden birini içeren şelatlı peptit ve genetik olarak düzenlenmiş proinsülin, Ni²⁺-İDA sefadex kolonunda önemli derecede tutunma göstermektedir (Ljungquist vd., 1989; Grisshammer ve Tucker, 1997). Hochuli ve arkadaşları, fare dihidrofolat redüktaz ile muamele edilmiş polihistidin ile şelat oluşturu bir peptidin, Ni²⁺-NTA sefaroze üzerinde alıkonduğunu gösterdiler.

1.2.5. 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 Co²⁺, Ni²⁺ ve Cu²⁺ yüklü İDA-İMAK kolonlarına karşı yüksek afinite gösterdiklerini saptanmıştır. Şelat oluşturu peptit, ilgili proteini şelat oluşturu peptidi içeren, birbirinin içine dağılmış bir proteinin, NH₂ terminal ucuna klonlanabilir. Daha sonra şelat oluşturu peptit, ayırma teknikleri kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılabilir. Bu çalışmanın önemi, tercih edilen bağlanma bölgesinin, saflaştırmayı kolaylaştırmak için birbirinin içinde bulunan bir protein ile birleşebilirliğini gösterebilmektir.

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 ve arkadaşları, polihistidin şelatlı peptit ve fare dihidrofolat redüktaz dan oluşan bir protein karışımı ve Ni^{2+} -NTA adsorbent ile benzer yaklaşımı araştırdılar (1988). 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, tercihli şelat oluşturu peptitler olduğunu göstermektedir. Karboksipeptidaz A, protein uçlarından şelat oluşturu peptidi uzaklaştırmak için kullanılıyordu.

AL-Masiki ve Nakai kan serumundan ve kan plazmasından proteinleri ayırmak için Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} yüklü İDA-BGE sefaroze 6B/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 (1988).

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.

Al-Mashiki ve arkadaşları da (1988), peynir suyundan gelen immunoglobulin ve laktoferrinin ayrılmasında benzer şekilde modifiye edilmiş histidin gruplarını 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 ve arkadaşları, filizlenmiş buğdaydan α -amilazları saflaştırmak için Cu^{2+} -İDA Sepharose 6B kolonunu kullandılar.

Allen ve arkadaşları, 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 İMA kolonlarıyla uygun ve nitel olarak uzaklaştırılması işlemi başarılmasına rağmen, Zn^{2+} -İDA yükü İMA 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.

Wunderwald ve arkadaşları, aktif endoproteinazları, biyolojik sıvılardan uzaklaştırmak için, α_2 -makroglobulinin, Zn^{2+} -bis-karboksimetil-amino sefaroza immobilize edilmesini içeren yeni bir yöntem tanımlamışlardır (1982). El-Rassi ve arkadaşları ise, concanavalin A'yı (Con-A) Cu^{2+} -İDA ile silika destek üzerine immobilize etmişlerdir (1986). Con A'nın İMA 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'DA halen, cevap bekleyen can alıcı sorular vardır. Belew ve arkadaşları, 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.

Belew ve arkadaşları, 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.

İMAK adsorbentlerinin protein adsorplama kapasiteleri genellikle, küçük iyon adsorplama kapasitelerinden oldukça düşüktür. Bu durumun, adsorpsiyon merkezleri ile, proteinler arasındaki sterik etkilerden kaynaklandığı görülmektedir. Hutchens ve arkadaşlarının sonuçları, bazı ligandların, proteinlerin büyüklüğünden dolayı kullanılamaz olabileceğini göstermektedir. Wang, en yüksek yükleme oranında, her bir lizozim, miyogloblin 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 bazı dizilimleri ihtiva eden ticari klonlama vektörleri elde edilebildiği gibi, histidin işaretli proteinlerin spesifik belirlenmesi için antiserumlar da 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. Bazılar üzerindeki girişim yapabilen azotlardan dolayı RNA ve oligonükleotidler, İMAK matriksine sıkıca bağlanırken, doğal DNA, İMAK matriksine 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.

1.2.6. 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 μ M/mL jel).
3. EDTA veya EGTA 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 sıyırmasına 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.

1.2.6.1. 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. İlaveten ardı ardına gelen histidinler ile afinite oluşturma, tek İMAK basamağında etkin bir saflaştırma ve renatürasyonu mümkün kılar.

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 bağılyken katropik ajan konsantrasyonu düşürülmesiyle, biyolojik olarak aktif formu olan renature formlarında İMAK kolonlarından elue edilmiştir.

1.2.7. İMAK' ın bazı dezavantajları

1.2.7.1. 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 β -merkaptoethanol (β -ME) veya dithiotreitol (DTT) gibi indirgeyici ajanlar ilave edilir (Leo vd., 1996).

1.2.7.2. 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, His6-işaretli restriksiyon endonükleaz Eco-RV'ın 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).

1.3. 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.

Kritropik 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).

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.

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 (Tablo 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

Polimerik Jeller			
Tür	Jel Oluşumu	Örnekler	Yorumlar
Kemotropik Jeller	Moleküller arası kimyasal bağlar sonucu oluşan 3 boyutlu kovalent örgü	Poliakrilamit 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-polilisın 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 bileşeninin 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 selüloz asetatlardan.	Çözücü olmayan bir madde polimer çözeltisi ortamına eklendiğinde ortama olan afinitesini düşürülerek ve kovalent olmayan polimer-polimer 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, Agaro 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 kromatografik malzemeler ve elektroforez matriksleri olaak kullanıldığı gibi hücre kültürlemesi için katı ortam olarak da sıkça kullanılır.
Kryotropik jeller	Başlangıç sisteminin dondurulmasıyla elde edilir.	Bu çalışmanın içeriğini oluşturmaktadır.	

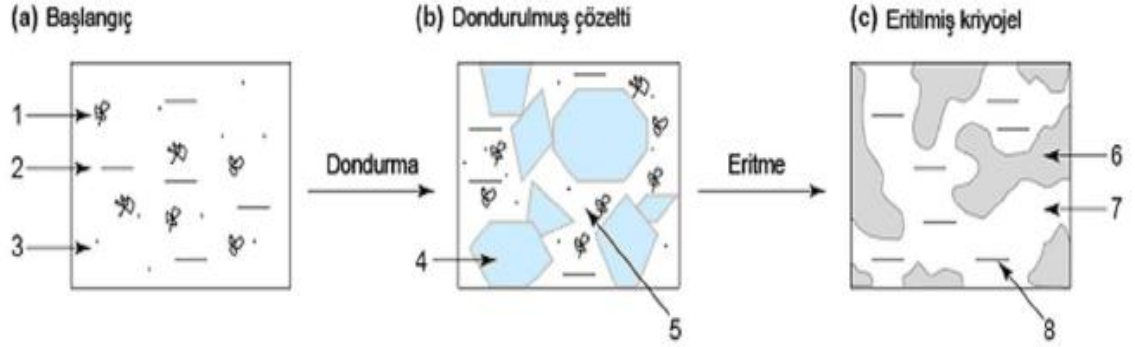
Çizelge 1.7. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış (Plieva vd., 2007)

Monomer/ Polimer Öncülleri	Gösterim	Por Boyutu (µm)	Morfoloji	Kullanım İşlemleri
Akrilamid	pAAM	1-200	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Akrilamid	Aşı-pAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromatografisi
Dimetilakrilamid	Pdmaa	1-120	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Polivinilalkol	m-PVA	1-80	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulmayan veya monolitik kromatografi ortamı için kalıplar
Polivinilalkol	b-PVA	0,1-1	Elastik	Mekanik olarak kafesleme yoluyla hücrenin immobilizasyonu. Enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonu
Hidroksietilmetakrilat	HEMA	1-200	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Dekstran metakrilat	Dex-MA	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Hidroksietilmetakrilat	HEMA-	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulabilen 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

1.3.1. Kriyojellerin hazırlanışı ve karakterizasyonu

Çözücünün kristallenme hızı ve kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının uygun bir şekilde kontrol edilmesi uygun özelliklere sahip kriyojellerin hazırlanmasına olanak sağlar. Kriyojel sistemde, büyüyen buz kristalleri porojen olarak ve erimesinden sonra birbirine bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandıklarından dolayı tipik olarak kriyojeller, -10 ile -20 °C gibi düşük sıcaklıklarda sulu ortamda üretilir. Reaksiyon karışımı soğutulduğunda donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur.

Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı mikrofaz içinde gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözücünün kristalleri donma sırasında büyür, donmuş çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşir. Kimyasal reaksiyonlar bittikten sonra erime ile birlikte sistem sıvı çözücü ile dondurulmuş sürekli makrogözenekli kanallar içeren bir matriksten oluşur (Şekil 1.7) (Plieva vd., 2007). Yarıdonmuş 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 1.7. 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

Kriyotropik jelleşme işleminin temel karakteristik özellikleri;

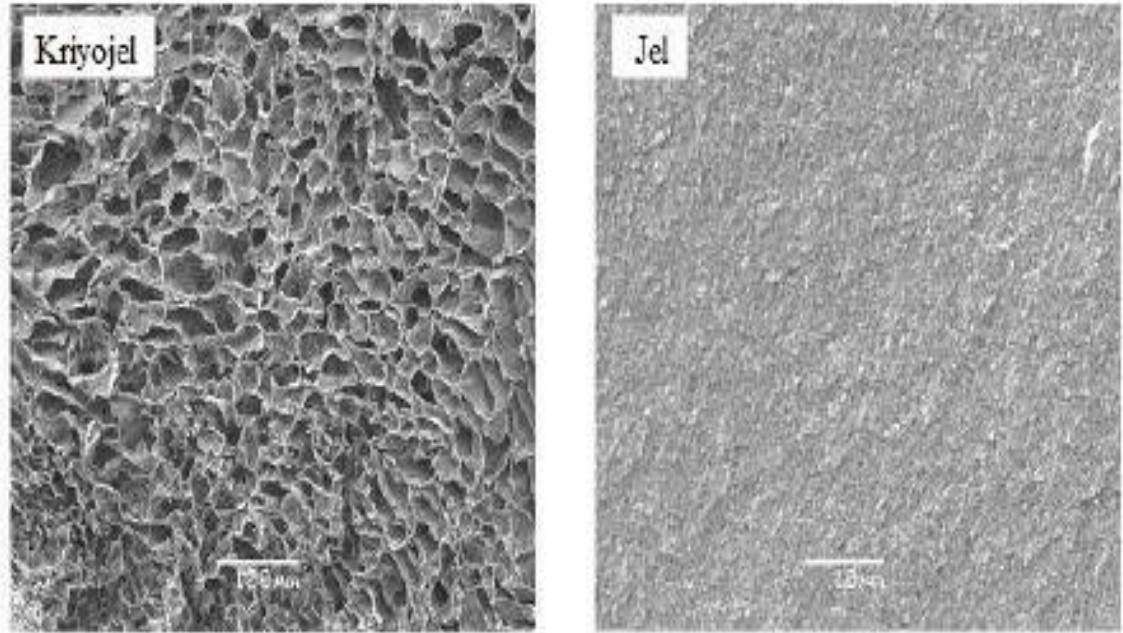
1) Jel oluşum ajanlarını içeren reaksiyon karışımı, çözücünün donma noktasının bir kaç derece altında dondurulur. Donmuş haldeki sistem, tek parça katı blok gibi görünmesine rağmen donmamış sıvı mikrofaz (UFLMP) içeren heterojen bir karışımdır.

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 oluşturunca 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 1.5).

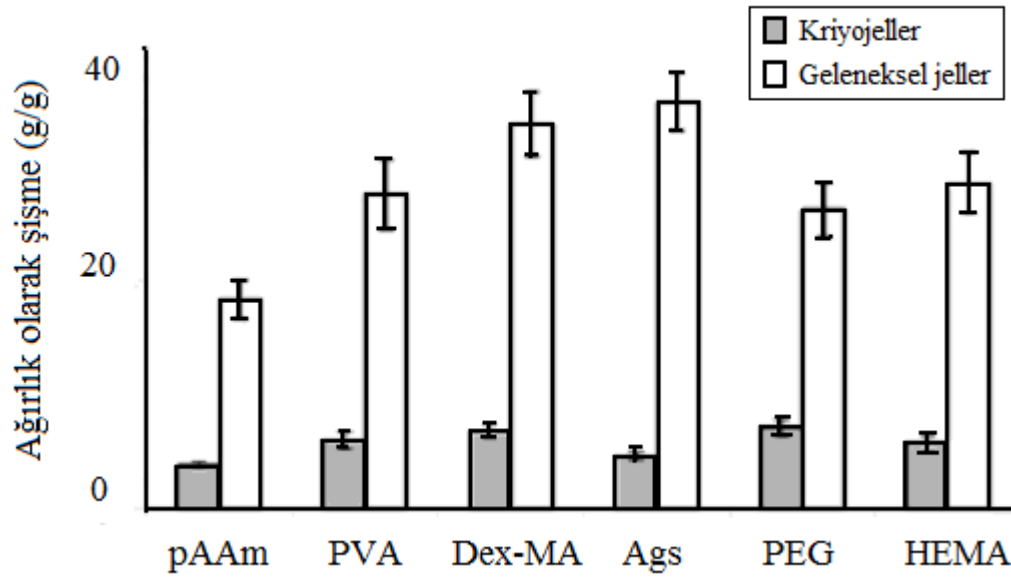
-20 °C’ de sulu ortamda serbest radikal polimerleşmesi ile hazırlanan kriyojel monolitlerinin tipik gözenekli yapıları ve aynı yolla ama atmosfer sıcaklığında (20 °C) hazırlanan klasik bir jelin yapısı Şekil 1.8 ’de gösterilmiştir (Plieva vd., 2007).



Şekil 1.8. 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 1.9.) (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 kurutularak saklanabilmesi en önemli özelliklerini oluşturur (Plieva vd., 2007).



Şekil 1. 9. 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).

1.3.2. 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 - 100µm'lik gözenekli) virüslerin, hücre organellerinin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin ayrılmasında kalıp olarak kullanılmaktadır (Plieva vd., 2007).

1.4. Lizozim

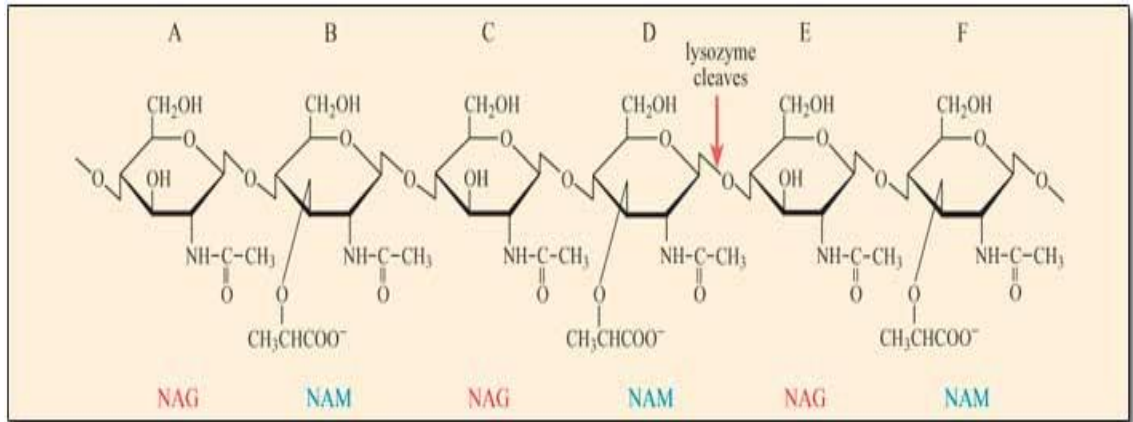
Lizozim, ilk olarak Londra'da Bakteriyolog Alexander Fleming tarafından 1922'de keşfedilen bir hidroliz enzimidir. O, kendi burun mukozasındaki örneklerle petri kültüründeki bakteriyi muamele etmiş ve bir süre sonra mukusun etrafındaki bakterinin dağılmaya başladığını görmüştür. Bakteri hücreleri dağılmaya başlamıştır çünkü hücreler parçalanmaya veya patlamaya başlamıştır. Böylece o, enzimi lizozim olarak adlandırmıştır (Freeman ve Stryer, 1995). Lizozimin tamamen antibiyotik amaçlı kullanılması ispatlanmamasına rağmen, sonradan lizozimin bakteriyofajları, bakterileri, bitkileri ve hayvanları içeren çok çeşitli organizmalarca üretildiği bulunmuştur. Alexander Fleming, 1945 yılında penisilini keşfinden dolayı Fizyoloji ve Tıp alanındaki Nobel ödülünü almıştır. Daha sonraki çalışmalarda, lizozim vücut salgılarında, gözyaşında, tükürükte, rahim boynunda, bitkilerde ve yumurta beyazında bulunduğu tespit edilmiştir. Gözyaşındaki lizozim, gözdeki enfeksiyonlara karşı savunma görevi yapar. Mide salgılarındaki lizozim, eritme yeteneği sayesinde koruma görevi yapar. Yumurta beyazındaki lizozim ise, embriyoyu ve besin maddelerini, bakteriyel etkilere karşı korur. Tavuk ile hindi, ve orangutan ile keseli sıçanlarda var olan lizozim, amino asit dizisinde benzerlikler gösterir (Matsushima vd, 1969).

1965 yılında David Phillips, X-ışınları kullanılarak tavuk yumurta akından ekstrakte edilen lizozimin üç boyutlu yapısını tanımlamıştır.

Lizozim, X-ışını kristalografisi kullanılarak yapısı aydınlatılan üçüncü (1962’de won John Kendrew’in miyoglobin ve Max Perutz’un hemoglobini tanımlayarak Nobel ödülleri almasından sonra), karbonhidrat bağlayan bir protein ve enzim olması açısından ilk proteindir. Lizozim, Protein Veri Bankasında depolanan en yaygın proteindir.

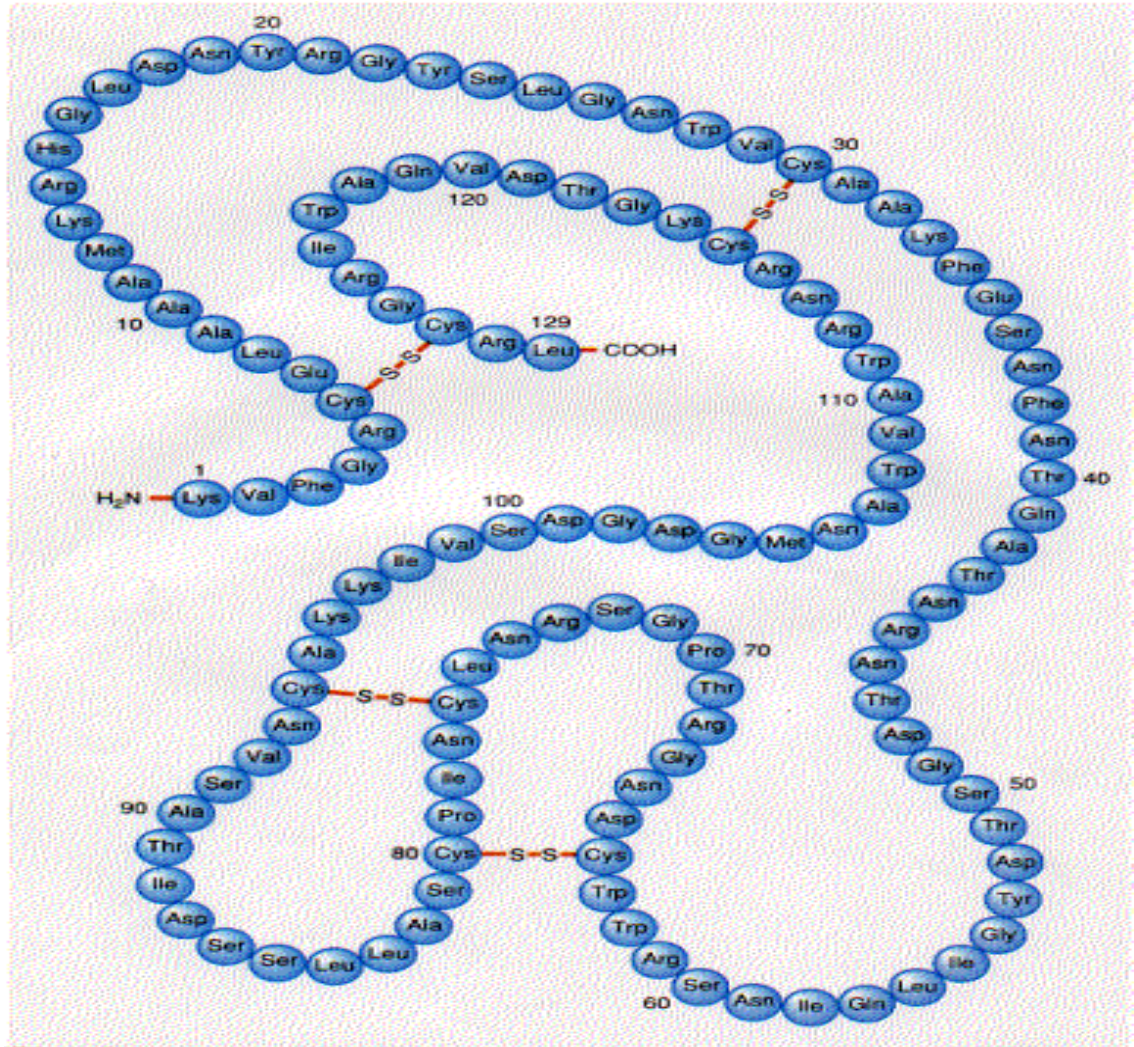
1.4.1. Lizozim enziminin yapısı

Lizozim (EC 3.2.1.7) bakteri hücre duvarlarını parçalayan bir enzimdir. Nasetilmuramik asit (NAM) ile N-asetilglukozamin (NAG) arasındaki β (1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağı hidrolizleyerek, hücre duvarı peptidoglikanlarının NAM-NAG polisakkarit bileşenini değiştirerek bunu yapar (Şekil 1.10). Lizozim, hücrelerde ve omurgalıların salgılarında yaygın olarak bulunur. Lizozim, bakterileri öldürebildiğinden dolayı sıkça insanın kendi antibiyotiği olarak da adlandırılan bir enzimdir. Biyolojik sıvıların ve dokuların yaygın bileşenidir, yumurta akında, gözyaşında, terde, geviş getiren hayvanların sindirim sisteminde bulunur. Bakteri hücre duvarları gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki tiptir. Gram pozitif bakteriler, teikoik asidin ince bir tabakasıyla sarılmış kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşmuş bir hücre duvarına sahiptir. Gram negatif bakteriler, ikinci bir lipid tabakasıyla kaplı olan ince bir peptidoglikan tabakaya sahiptir. Lizozim, peptidoglikan tabakaya ulaşılabilirliğinden dolayı gram pozitif bakterilere karşı çok etkilidir. İlaveten lizozimin bazı gram negatif bakterilere ve virüslere karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Baker vd., 2007).



Şekil 1.10. Bakteri hücre duvarlarının NAM-NAG polisakkarit birimleri

Tavuk yumurtası akı lizozimi, lizozimin çok yaygın çalışılmış türlerinden biridir ve mekanistik olarak en iyi anlaşılmış enzimlerden biridir. İçte çapraz bağlı 4 disülfid bağı ve 129 amino asit birimi içeren (Şekil 1.11) tek polipeptid zincirinden oluşmuş oldukça küçük bir proteindir (14,6 kDA). Zincirin üç kısa zinciri 5 ve 15, 24 ve 34, 88 ve 96, amino asitler arasında bir α -heliks oluşturmaktadır. Zincirin 41 ve 45 ile 50 ve 54 amino asitleri β tabakasını oluşturur ve 46 ile 49 amino asitleri saç tokası meydana getirirler. Lizozimin substratı, bakteri hücre duvarıdır. Yumurta akı lizozimi, substratının hidrolizini katalizlenmemiş reaksiyonunkinden 1010 kat daha büyük bir hızda hidrolizler. Yalnızca N-asetilglukozamin birimlerinden yapılmış olan bir oligosakkarit üzerine lizozimin etkisi oldukça yavaştır (El-Agamy vd., 1996).



Şekil 1.11. Yumurta akı lizoziminin birincil yapısı

1965’de David Phillips tarafından Yumurta akı lizoziminin X-ışını yapısı aydınlatıldığında bu, yüksek rezolüsyonda yapısı aydınlatılan ikinci protein, birinci enzimdi. Bu protein molekülü 30x30x45 Å’luk boyutları ile kabaca elipsoidal bir şekildedir. Yapının en dikkat çekici özelliği, molekülün bir yüzünü boydan boya yaran substrat bağlanma bölgesiydi. Polipeptid zinciri bağıl olarak küçük düzenli sekonder yapıya sahipti: Yapı birçok az veya fazla helikal yapı gösteren kısımlara, bunun yanında da bağlanma bölgesinin bir duvarını oluşturan üç sarmallı anti paralel β tabakaları bulundurmaktaydı. Beklendiği gibi nonpolar yan zincirlerinin çoğu sulu çözgenle temas etmeksizin molekülün içindedir (Voet vd., 1990).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bereli ve arkadaşları (2009); Serum proteinlerinin analizinde faydalı olabilecek albümin ve immunoglobulin (IgG) saflaştırılması için Cibacron Blue F3GA ve iminodiasetik asit (İDA)-Cu²⁺ içeren poli(glisidil metakrilat) (PGMA) mikroküreler (yaklaşık 1,6 μ 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 arkadaşları (2008); İnsan plazmasından bilirubinin seçici olarak ayrılması için bilirubin baskılanmış partiküller gömülü süpermakrogözenekli kriyojeller hazırlamışlardır. Bilirubinin maksimum adsorpsiyon kapasitesini 10,3 mg/g polimer olarak bulmuşlardır.

Panping ve arkadaşları (2010); SiO₂ nanopartikülleri gömülü süpermakrogözenekli kriyojelleri, akrilamid (AAm) ve *N,N*-metilen-bis-akrilamiFd (MBAAm) reaktif monomer karışımının radikal kriyojenik kopolimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Model protein olarak lizozim ile çalışmışlardır. 2-akrilamido-2-metil-1-puopansülfonik asit ile aşıl原因 kompozit kriyojelde lizozimin kromatografik prosesini protein atılım ve desorpsiyon özelliklerini değerlendirmek için gerçekleştirmişlerdir. Kromatografi, gömülü nanopartiküllerinden dolayı yeterli mekanik güç gösteren yüksek yüzeyel hızda gerçekleştirebileceğini göstermişlerdir.

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

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

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

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzeme

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri Fluka A.G'den alındı (Buchs,Switzerland) ve hidrokinon inhibitörü varlığında indirgenmiş basınçta damıtılarak kullanılmaya kadar 4 °C de saklandı. N'-metilen-bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametilen daimin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) Sigma'dan sağlandı (St. Louis, USA). Lizozim Aldrich (Munich, Germany) 'den satın alındı. İminodiasetik asit (İDA), Tris-baz, glisin Aldrich (Munich, Germany) 'den sağlandı. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) komonomeri Sigma (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Polimerizasyonda başlatıcı ve stabilizör olarak kullanılan benzoil peroksit ve poli(vinil alkol) (PVAL; MA: 100,000, % 98 hidrolize) Aldrich (USA) firmasından satın alınmıştır. Asetik asit ve çeşitli kimyasallar Merck (Darmstadt, Germany) 'den tedarik edildi.

Deneyde kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA) RO pure LP[®] yüksek akış selüloz membranla ters osmos ünitesi (Barnstead D2731) Barnstead 3804 NANOPURE[®] organik kolloid uzaklaştırılması ve iyon değişim dolgu yatak sistemiyle devam eden aletinden kullanıldı. Polimerizasyon deneylerinde organik faz olarak tolüen (Merck, Germany) seçilmiştir. Dağıtma ortamı ise damıtık sudur. Aşağıda verildiği gibi süspansiyon kopolimerizasyonu tekniğiyle hazırlanmıştır. Polimerizasyon sonra elde edilen mikrokürelerin temizlenmesi amacıyla damıtık su, tolüen (Birpa, Türkiye) ve etil alkol (Tekel, Türkiye) kullanılmıştır. Polimerizasyon deneylerinde kullanılan kimyasal maddelerin yapıları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Polimerizasyonda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal	Kimyasal Yapı
HEMA	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
EGDMA	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{O})\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$
Benzoil Peroksit	$[\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})]_2\text{O}_2$
Poli(vinil alkol)	$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_n$

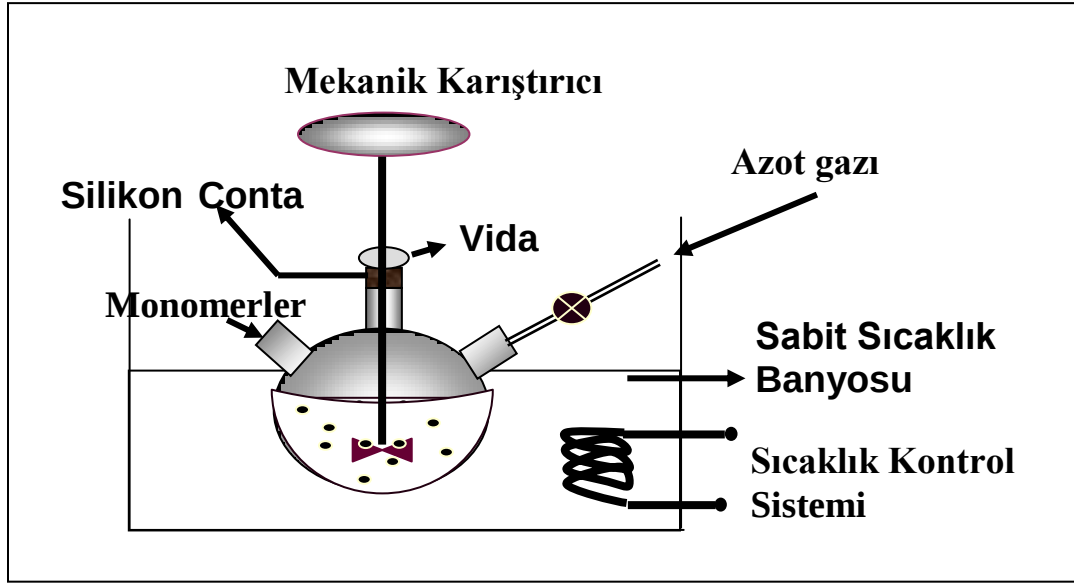
3.2. Yöntem

3.2.1 PHEMA mikrokürelerin hazırlanması

3.2.1.1. Polimerizasyon sistemi

PHEMA mikroküreler, HEMA monomerinin EGDMA monomeri ile çapraz bağlanma/kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu hazırlanmıştır. Bu çalışmada modifiye süspansiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır. Polimerizasyon sistemi ve kontrol elemanları Şekil 3.1’de şematik olarak gösterilmiştir. Polimerizasyon reaktörü 100 ml hacmindeki, pyrex camdan yapılmış, iki girişi olan bir cam balondur. Karıştırma işlemi, reaktör tabanından 3 cm yüksekliğe yerleştirilen bıçak tipi pervane taşıyan bir mekanik karıştırıcı (IKA, Germany) ile sağlanmıştır. Karıştırıcı mil reaktörün boyun kısmındaki cam vida ile reaktöre monte edilmiş ve silikon conta kullanılarak reaktörde sızdırmazlık sağlanmıştır. Reaktörün üst girişlerinin birinden sabit akış hızında azot gazı geçirilirken, diğer girişten sisteme monomer ve gerekli kimyasal maddeler ilave edilmiştir.

Isıtma sabit sıcaklık banyosunda yapılmış, su banyosu sıcaklığı bir termostat aracılığı ile (± 0.1 °C) kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1. PHEMA mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sisteminin şematik görünümü

3.2.1.2. Polimerizasyon yöntemi

PHEMA mikrokürelerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir: HEMA ve EGDMA monomerleri organik çözücü toluen ile karıştırılmış ve başlatıcı (benzoil peroksit, BPO) bu homojen karışımda tamamen çözülmüştür. Bu karışım, stabilizör (polivinil alkol, PVAL) içeren sulu ortamda homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Kopolimerizasyon iki kademeli bir sıcaklık program uygulanarak yüksek karıştırma hızında yapılmıştır. Polimerizasyon ilk 4 saat 65 °C'de sonraki 2 saat 90 °C'de devam ettirilmiştir. Oksijenin polimerizasyon reaksiyonu üzerindeki durdurucu etkisini bertaraf etmek için reaksiyon azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda ısıtma işlemi durdurulmuş ve karıştırma işlemi polimerizasyon ortamı oda sıcaklığına düşünceye kadar devam ettirilmiştir. Uygun boy ve boy dağılım aralığına sahip PHEMA mikrokürelerin hazırlanmasında, yapılan ön denemeler ışığında komonomerlerin oranı, başlatıcı ve stabilizör miktarları sabit tutulmuştur. Modifiye süspansiyon polimerizasyon reçetesi ve koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PHEMA mikrokürelerin polimerizasyon reçetesi ve koşulları

Bileşen	Miktar
HEMA	4,0 mL
EGDMA	8,0 mL
Benzoilperoksit	60 mg
Damıtık su	50 mL
Polivinil alkol	200 mg
Toluen	12,0 mL
Karıştırma hızı	600 rpm
Sıcaklık program	4 saat 65 °C + 2 saat 90 °C

3.2.1.3. PHEMA mikrokürelerin temizlenmesi

Polimerik mikrokürelerin temizlenmesi amacıyla kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir. Polimerizasyon sonrası dağıtma ortamı dekantasyon yoluyla uzaklaştırıldıktan sonra PHEMA mikroküreler 100 mL su ilavesiyle ultrasonik banyoya (Branson 2211, Japonya) konulmuş ve burada 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra sulu faz dekantasyon yoluyla uzaklaştırılmış ve yeniden 100 mL damıtık su ilavesiyle yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Polimerik mikroküreler etil alkol ortamında yarım saat ultrasonik banyoda bekletilmiş, daha sonra etil alkol dekantasyonla uzaklaştırılarak ortama 50 mL toluen ilavesi yapılmıştır. Manyetik karıştırıcıda yarım saat süreyle 1000 devir/dk hızında polimer örneği toluen varlığında karıştırılmıştır. Daha sonra toluen dekante edilerek yeniden etil alkol ilavesi (50 mL) yapılmıştır. Onbeş dakika süreyle manyetik karıştırıcıda 1000 devir/dk hızla karıştırılan polimer örneğinden etil alkol dekantasyon yoluyla uzaklaştırılmış ve örneğe 100 mL damıtık su ilave edilmiştir. Yıkama işlemi tamamlanan polimerik mikroküreler vakum etüvünde 60 °C sıcaklıkta 48 saat süre ile kurutulmuştur.

3.2.1.4. PHEMA mikrokürelerin yüzeyine iminodiasetik asit bağlanması

Aktivasyon prosesinden önce, PHEMA mikroküreler yaklaşık 24 saat distile suda bekletildi ve sistemin dengeye ulaşması için su ve 0,5 M NaCl çözeltisi ile cam filtre üzerinde yıkandı. PHEMA mikroküreleri (~ 1.0 g), 2,5 mL epiklorohidrin, 25 mL 2 M NaOH ve 0,1 g NaBH₄ içeren çözeltide oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, PHEMA mikroküreler distile su ile çalkalandı. İminodiasetik asitin (İDA) kovalent olarak bağlanması için, reaksiyon karışımı (0,8 g 50 mL İDA, 2 M Na₂CO₃, pH 11 ve epiklorohidrin bağlı mikroküreler) 12 saat süre ile manyetik karıştırıcılı ortamda 70 °C reaktör sıcaklığında inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, membranlar sırası ile % 5 asetik asit çözeltisi ve distile su ile yıkandı.

3.2.1.5. PHEMA mikrokürelere Cu²⁺ iyonlarının takılması

PHEMA mikrokürelere, Cu²⁺ iyonlarının şelatlanması için şu işlemler yapıldı: 1,0 g PHEMA mikroküreler oda sıcaklığında Cu²⁺ in şelatlanması için pH 4,1'de (HCl veya NaOH ile ayarlanır), 30 ppm Cu²⁺ iyonları içeren 50 mL sulu çözeltiye karıştırıldı. Cu²⁺ iyonları kaynağı olarak 1000 ppm atomik absorpsiyon standart çözeltisi (% 10 HNO₃ içeren) kullanıldı. Beher 100 rpm'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı (dengeye gelmesi için yeterli bir süredir). Sonuçta oluşan çözeltideki Cu²⁺ iyonlarının konsantrasyonu grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AA800, Perkin Emler, Bodenseewerk, Germany) yardımı ile bulundu. Adsorblanan Cu²⁺ iyonları, başlangıç çözeltideki Cu²⁺ iyonları ve denge çözeltideki Cu²⁺ iyonları kullanılarak bulundu (Eşitlik 3.1).

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

Burada, Q; 1 g mikroküreye adsorblanan metal iyon miktarını (mg/g); C_o ve C sırasıyla sulu çözeltideki metal iyonunun başlangıç ve son derişim değerini (mg/mL); V sulu fazın hacmi (mL); m ise kullanılan mikrokürelerin miktarını (g) vermektedir.

Cu²⁺ şelatlı PHEMA mikrokürelerden Cu²⁺ sızması 1,0 M NaSCN içeren ve pH 4 - 8 arasında olan ortamda incelendi. PHEMA mikroküre süspansiyonu 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

Cu^{2+} iyon derişimi Atomik Adsorbsiyon Spektrofotometre kullanılarak süpernatanttan hesaplandı. Şuna da dikkat edilmelidir ki immobilize metal içeren mikroküreler, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponuyla % 0,02 sodyum azid içeren çözeltide mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için 4 °C saklandı.

3.2.2. Cu^{2+} bağı PHEMA mikroküreler gömülü Poli(2-Hidroksietil Metakrilat) kriyojellerin hazırlanması

Poli(HEMA) kriyojelin hazırlanması aşağıda açıklanmaktadır:

Monomer (0,350 mL HEMA) ve çapraz bağlayıcı *N,N'*-metilen-bisakrilamid (70 mg (MBAAm)) diiyonize suda (5 mL) çözünmüştür. Çözünmüş oksijeni elimine etmek için bu karışım 5 dakika vakumda bırakılmıştır. Serbest radikal polimerleşmesi amonyumpersülfat (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 karıştırılmıştır. Bu adımda, 20 mg Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküreler polimerizasyon karışımına eklenmiştir. Sonra reaksiyon karışımı altında kapalı bir çıkış olan plastik şırıngaya (5 mL, iç çapı 0,8 cm) bırakılmıştır. 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 çözeltisi olarak 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.

3.2.3. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu

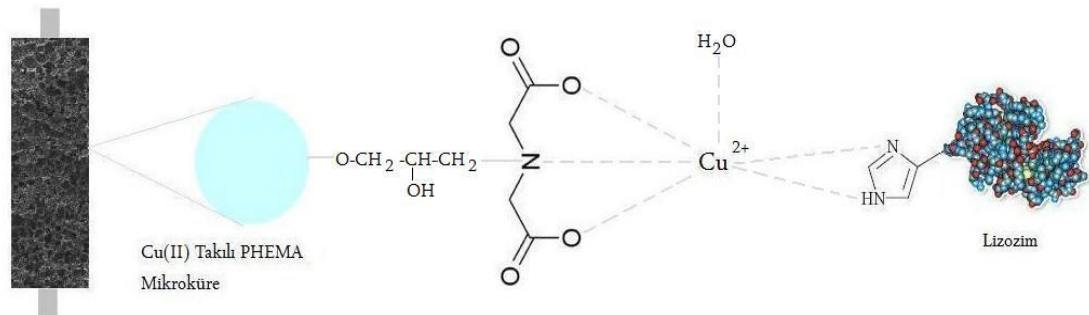
Lizozim adsorpsiyonuna; pH, tampon, sıcaklık, başlangıç lizozim konsantrasyonu, akış hızı ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyon davranışı incelenirken, sıcaklık kontrolü için su ceketli cam kolon içeren bir sürekli sistem kullanıldı. Kriyojel 30 mL su ile yıkandıktan sonra 30 mL Trizma-baz tamponuyla (pH 9) 1,0 ml/dk akış hızında 30 dakika etkileştirildi. Tüm adsorpsiyon deneyleri, 1,0 mL/dk akış hızı, 25 °C, 0,5 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda 40 mL lizozim çözeltisinin 40 dk süre ile kolondan geçirilmesiyle gerçekleştirildi.

İMAM üzerine adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında adsorpsiyon ortamından alınan çözeltilerin 280 nm’de UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) kullanılarak değerlendirildi. Lizozimin 0,025 - 1,0 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve 3.2 Eşitliği kullanılarak protein miktarı hesaplandı.

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

Bu eşitlikte: Q; İMAM üzerinde adsorblanan lizozim miktarını (mg/g), C_0 ; lizozimin çözeltideki başlangıç derişimini (mg/mL), C; adsorpsiyon sonrası sulu fazın lizozim derişimini (mg/mL), V; çözeltinin hacmini (mL) ve m ise kullanılan poli(HEMA) kriyojellerin ortalama kütesidir (g).

Adsorpsiyon ortamının pH’sının, lizozim adsorpsiyonuna etkisi, pH 8,0 ile 11,0 arasında, çalışıldı. Fosfat, glisin ve Trizma-baz tamponları ile tampon etkisi incelendi. Sulu ortamdan Lizozim adsorpsiyonu davranışının sıcaklıkla değişimi 5 °C, 15 °C, 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında araştırıldı. İyonik şiddetin etkisi tampon içerisinde farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren (0,025 - 0,2 M) çözeltileri ile 25 °C ortam sıcaklığında gerçekleştirildi. Akış hızının etkisi 0,5 - 4 mL/dk arasında değiştirilerek incelendi. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonuna adsorbent dozunun etkisi adsorpsiyon ortamında çözelti hacmi sabit tutularak farklı miktarlarda katı faz kullanılarak gerçekleştirildi. Deneysel adsorpsiyon izotermi ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin belirlenebilmesi için 0,1 - 4,0 mg/mL başlangıç konsantrasyonuna sahip lizozim ile çalışıldı.



Şekil 3.2. Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküreler ile lizozim molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi

3.2.4. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

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

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

Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojelin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 35 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işlemi sonrasında, Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojel, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH çözeltisi ile yıkanmış 0.05 M tris-baz tamponu (pH 9) ile dengeye getirilmiştir.

3.2.5. Kriyojelin karakterizasyonu

3.2.5.1. Şişme deneyi

Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli 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 ± 0.5 °C’de 2 saat bekletildikten sonra, kriyojeller ortamdan alınmış ve SCALTEC marka terazi (Germany) ile (1×10^{-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. 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.

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

3.2.5.2. Yüzey morfolojisi

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli 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.

3.2.5.3. Yüzey alanı ölçümleri

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET cihazı (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, USA) kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojel örnekleri dikkatlice tartılmış ve örnek haznesine yerleştirilmiştir.

Daha sonra, örneklerin azot atmosferinde 150 °C’de 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -196 °C’ de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar, spesifik yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır. Kriyojellerin sahip olduğu gözenek hacmi ve ortalama gözenek çapı Barrett, Joyner, Halenda (BJH) modeli 183 uygulanarak belirlenmiştir.

3.2.5.4. FTIR çalışmaları

Cu²⁺-takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellerin yapı analizi FTIR-ATR spektrofotometresi (Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kriyojel örnekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, kriyojel örnekleri havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnek FTIR-ATR cihazının örnek haznesinde preslenmiş, böylece yüzeyden gelen toplam ışık yansıması 650-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ve 2 cm⁻¹ çözünürlükle ölçülmüştür.

3.2.5.5. Elementel analiz

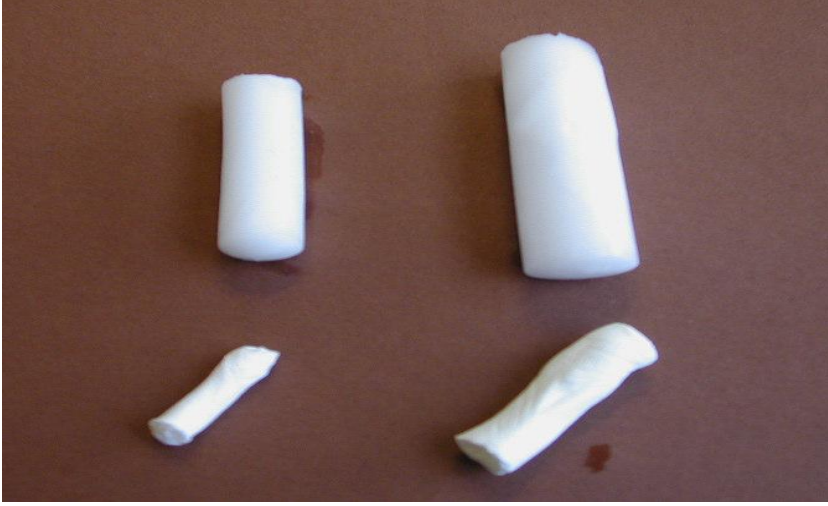
Mikrokürelere bağlanan İDA miktarı, İDA’da bulunan azottan fayadalanılarak elementel analiz cihazı (Leco, CHNS-932, USA) ile ölçüldü.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Cu²⁺-takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Karakterizasyonu

4.1.1. Şişme deneyi

Cu²⁺-takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojeller, çapraz bağlı ve hidrofilik yapıda matrikslerdir. Ayrıca bu kriyojeller, opak, süngerimsi ve elastiktir. Çapraz-bağ derecesine ve matriksin hidrofilitesine bağlı olarak yapılarına su alarak şişerler. Bu kriyojellerin gözenekleri içerisindeki su elle kolaylıkla sıkılabilmektedir. Sıkılan kriyojel parçası suya daldırıldığı zaman 1 - 2 saniye içerisinde orijinal boyut ve şekline tekrar dönebilmektedir. Cu²⁺-takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojelin denge şişme oranı 7,51 g H₂O/g kuru kriyojel makrogözenek miktarı ise % 71,6 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Şişmiş ve kurutulmuş Cu^{2+} -takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojel

4.1.2. Elementel analiz

Metal-şelat ligand İDA, epiklorhidrinin epoksit grupları ile İDA'nın primer amin grupları arasındaki reaksiyon üzerinden PHEMA mikrokürelerine kovalent olarak bağlanmıştır. Elde edilen en yüksek İDA yüzey yoğunluğu $327 \mu\text{m}$ İDA/g polimerdir. PHEMA mikrokürelerden İDA sızıntısı çalışması, bu çalışma boyunca kullanılan herhangi bir ortamda, uzun depolama süresinde bile İDA sızıntısının olmadığını gösterdi.

4.1.3. Yüzey alanı ölçümleri

Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı kromatografik destek malzemeleri için önemli parametrelerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot absorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve $0,05 - 1,0$ arası bağıl basınçları (P/P_0) ile ölçülmüştür. Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı $21,36 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojellerin spesifik yüzey alanı ise $38,75 \text{ m}^2/\text{g}$ bulunmuştur. Bu artış polimerik kriyojellere Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelerin gömülmesi sonucunda kriyojelin yüzey alanının artması ile açıklanabilir.

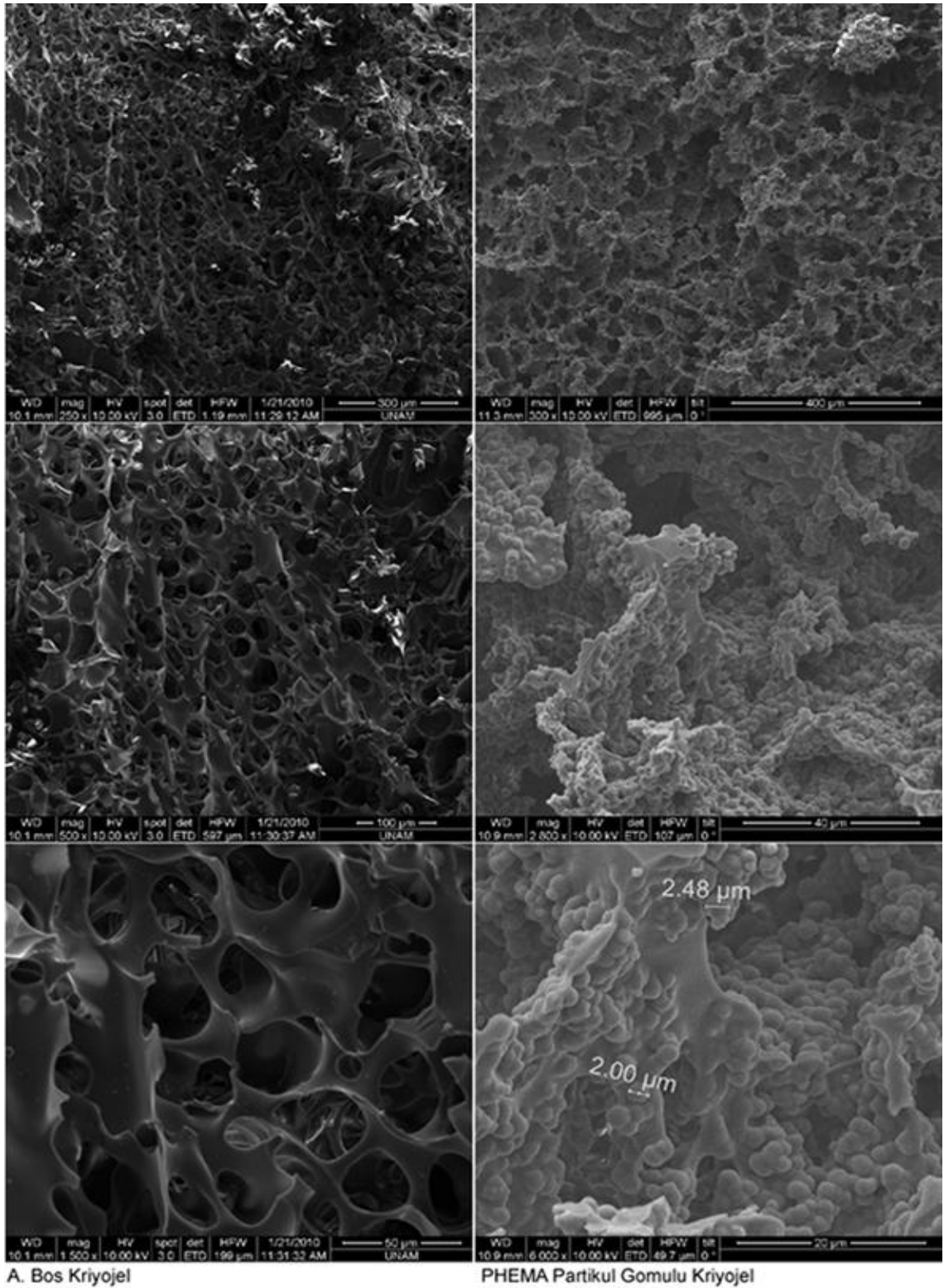
4.1.4. Yüzey morfolojisi

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojeller gözenekli ve ince polimerik duvarlara ve hareketli fazın kolaylıkla akabildiği bağlantılı geniş gözeneklere (10 - 100 μm çap aralığında) sahiptirler. SEM fotoğrafları gösteriyor ki, Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler PHEMA kriyojel yüzeyine düzenli bir şekilde dağılmıştır. Matrisin gözenek boyutu, lizozim moleküllerinin boyutundan büyüktür ve böylece moleküller kolaylıkla gözeneklerden geçebilmektedir.

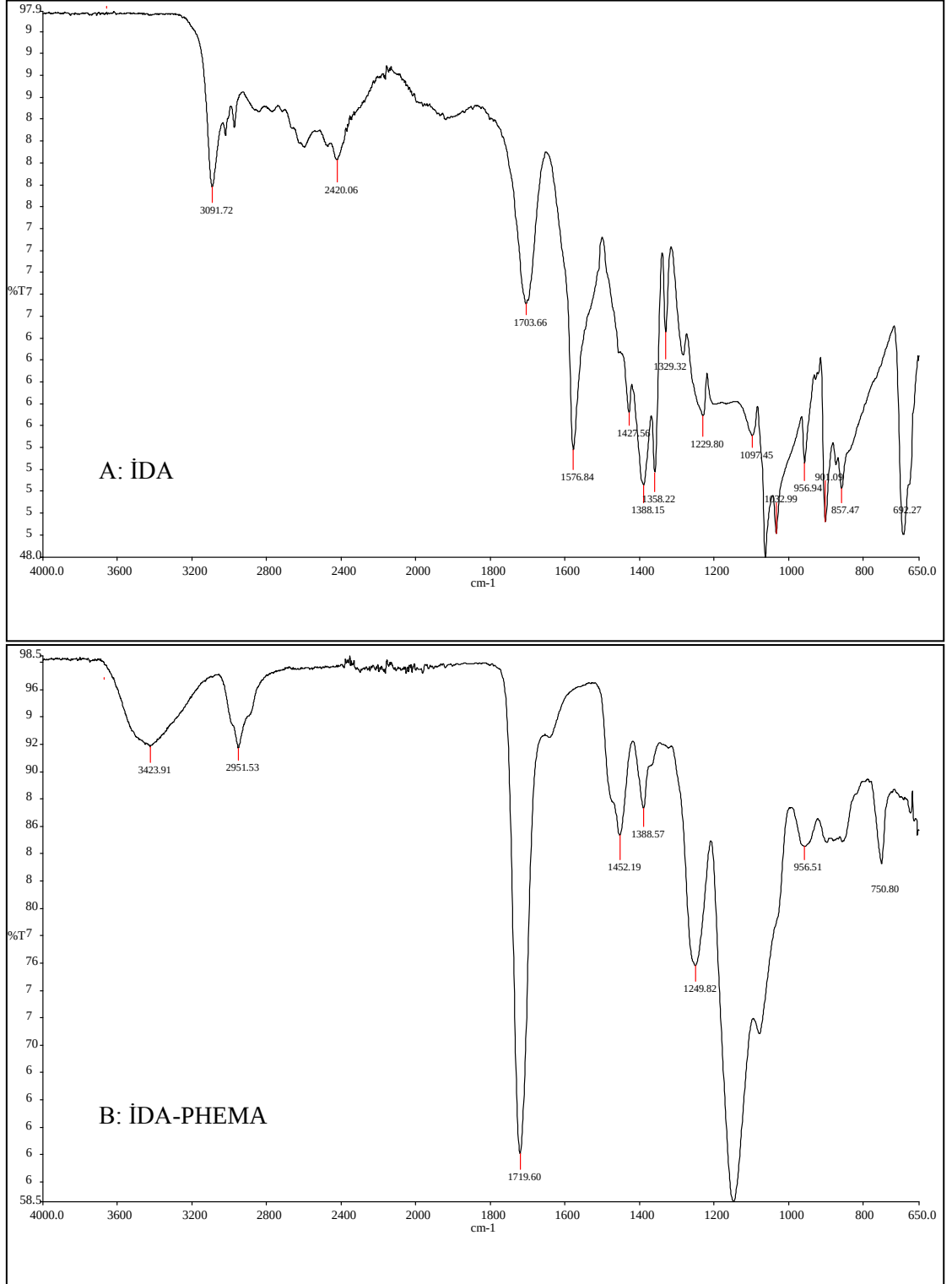
Ayrıca Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler protein adsorpsiyonu için geniş yüzey alanı sağlamaktadır ve gözenekliliği artırmaktadır. Hareketli fazın gözeneklerde konvektif akışı nedeniyle kütle aktarım direnci pratik olarak ihmal edilebilir derecededir.

4.1.5. FTIR çalışmaları

PHEMA mikrokürelere İDA'nın bağlandığını test etmek amacı ile saf İDA ve İDA bağlı PHEMA mikroküreler ile FTIR-ATR incelenmiştir. Spektrumları Şekil 4.3' de verilmiştir. Şekil 4.3. B'de, 3423 cm^{-1} ve 1719 cm^{-1} de sırasıyla PHEMA'da karakteristik $-\text{OH}$ ve $\text{C}=\text{O}$ gerilme bantları görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.3 A'da 1032 cm^{-1} de bulunan C-N gerilme bandının Şekil 4.3 B' de de bulunması İDA'nın PHEMA yapısına girdiğini göstermektedir.



Şekil 4. 2. Cu^{2+} -takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojelin ve boş kriyojelin SEM mikrofotografı

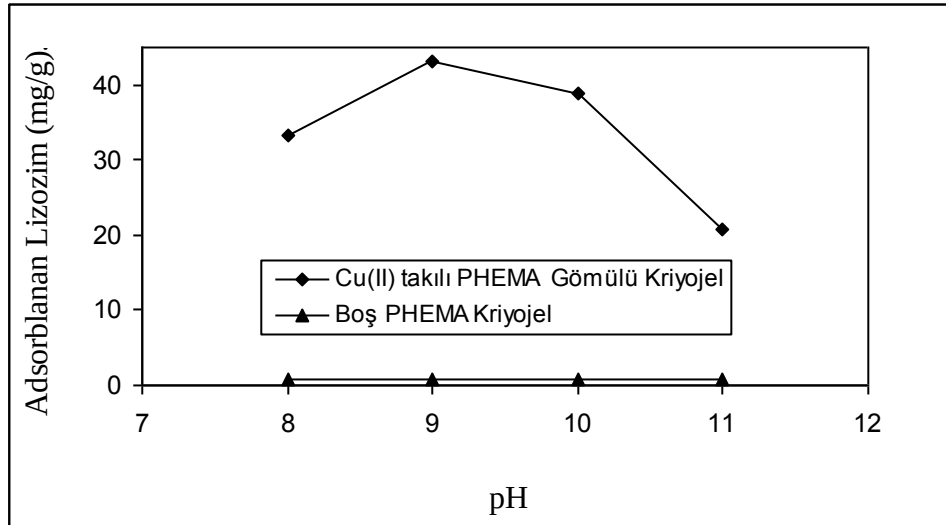


Şekil 4.3. A: İDA 'nın FTIR-ATR spektrumu
B: İDA bağlanmış PHEMA mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumu

4.2. Cu^{2+} -Takılı PHEMA Mikroküreler Gömülü Süpermakrogözenekli Kriyojellere Sulu Çözeltiden Lizozim 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 4.4'de Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere lizozim adsorpsiyonu pH 9'da maksimuma ulaşmaktayken (43,12 mg/g polimer), bunun altında ve üzerinde pH larda adsorpsiyon düşmektedir. İMAK' da protein adsorpsiyonu immobilize metal ile protein yüzeyindeki aminoasit rezidüleri arasında gerçekleşmektedir.



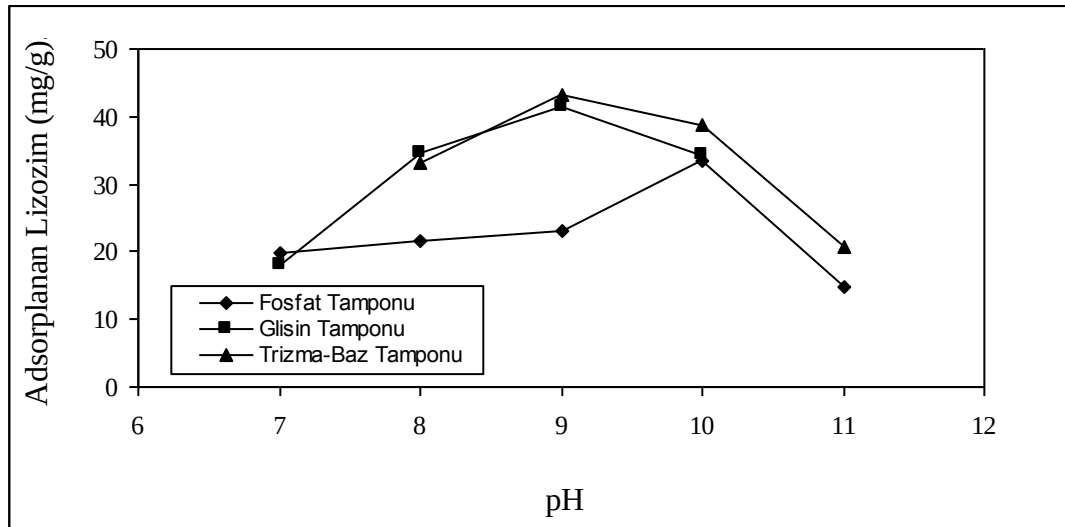
Şekil.4.4. Lizozim adsorpsiyonuna trizma-baz tamponunda pH'nın etkisi. Lizozim başlangıç derişimi: 0,5 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

Protein molekülleri ile immobilize metal iyonu arasındaki etkileşim, zayıf bazik ortamda protein yüzeyindeki iyonlaşabilen aminoasit rezidülerinden dolayı artmaktadır (Wong vd., 1991).

Lizozim yüzeyinde bulunan bir histidin rezidüsü İMAK' da etkin rol oynamaktadır ve histidinin pKa değeri çoğu proteinde 6 - 7 aralığındadır (Porath vd., 1983; Arnold 1991; Gutierrez vd., 2007). pH 7' nin üzerinde histidin aminoasidinin imidazol grubunun deproton olmasından dolayı metal iyonu ile protein arasında elektrostatik etkileşimler olmakta ve bu da yüksek protein adsorpsiyonu ile sonuçlanmaktadır. pH 9' dan sonra ise protein molekülleri arasındaki lateral elektrostatik itmelerden dolayı adsorpsiyon kapasitesinde düşüş meydana gelmektedir.

4.2.2. Lizozim adsorpsiyonuna tampon etkisi

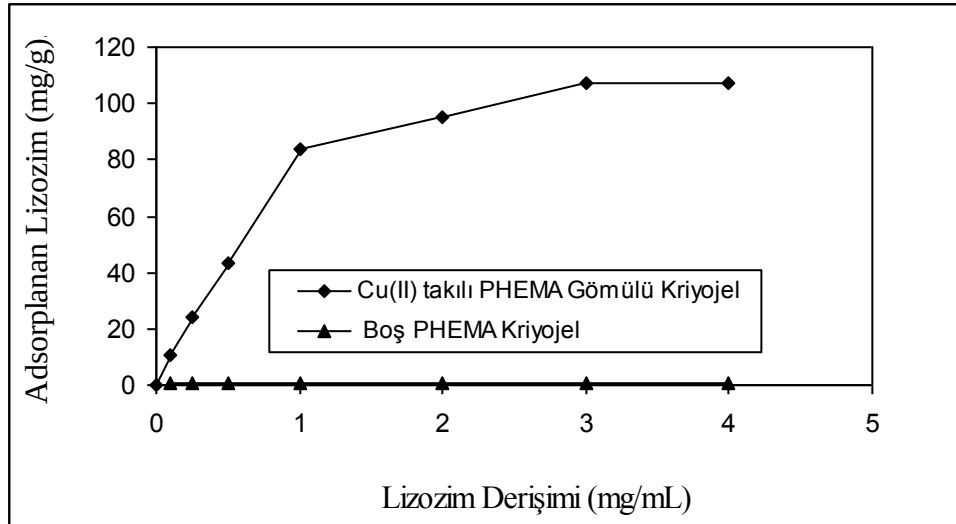
Şekil 4.5'de Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna trizma-baz, glisin ve fosfat tamponlarının etkisi incelenmiştir. Maksimum lizozim adsorpsiyonu pH 9'da, trizma-baz tamponunda 43,12 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Organik tamponlar ile kıyaslandığında, fosfat tamponunda adsorpsiyonun düşük olduğu görülmektedir. Bunun muhtemel sebebi fosfat iyonlarının, protein ve matriks üzerindeki iyonik bağlanma bölgelerini, iyon-iyon etkileşimi ile maskeleyesinden kaynaklanabileceği söylenebilir.



Şekil.4.5. Lizozim adsorpsiyonuna tampon etkisi. Lizozim başlangıç derişimi: 0,5 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

4.2.3. Lizozim başlangıç derişiminin etkisi

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna lizozim başlangıç derişiminin etkisi Şekil 4.6'da verilmiştir. Boş PHEMA kriyojellere lizozim adsorpsiyonu düşük olmasına rağmen, Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere lizozim adsorpsiyonu oldukça yüksektir (107,14 mg/g polimer). Şekilde görüldüğü gibi bağlanma aktif bölgelerinin doygunluğundan dolayı, 3 mg/mL lik başlangıç lizozim derişiminde adsorpsiyon dengesine ulaşılmıştır. Belirli bir konsantrasyondan sonra Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelerin spesifik etkileşim gruplarının, lizozim molekülleri ile doygun hale gelmesi ile adsorpsiyon hızında yavaşlama olduğu düşünüldü.



Şekil.4.6. Lizozim adsorpsiyonuna lizozim başlangıç derişiminin etkisi. pH 9 Trizma-baz tamponu, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

4.2.4. Adsorpsiyon izotermi

Bazı araştırmacılar protein ve protein bağlayıcı bölgeler arasındaki etkileşimin Langmuir tipi izoterm ile tanımlanabileceğini göstermişlerdir (Langmuir, 1918). Chase (Chase, 1984) Langmuir izotermi ile uyumlu aşağıdaki kütle-transfer hız 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 ve ark., 1995).

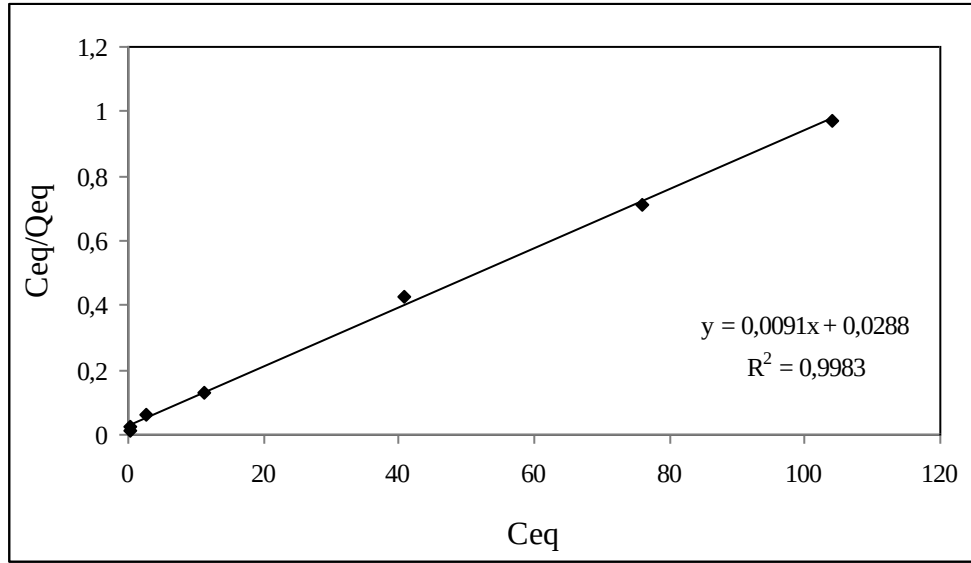
$$q^* = q_m C^* / (K_d + C^*) \quad (4.2)$$

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 4.7’de verilmiştir. Burada gösterildiği gibi lineer grafik Cu^{2+} -takılı PHEMA partikül gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonunun Lagmuir modeli ile uyumunu göstermektedir.

Doğrunun kesim noktası ve eğiminden K_d ve q_m (maksimum adsorpsiyon kapasitesi) değerleri sırası ile 3,11 mg/mL ($2,13 \times 10^{-4}$ M) ve 111,11 mg/g olarak belirlenmiştir, R^2 değeri 0,998’dir. İdeal bir adsorbentte K_d değerinin küçük olması kuvvetli bağlanmayı ifade etmektedir.



Şekil 4.7. Lizozimin Langmuir adsorpsiyon izotermi

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

Langmuir izoterminin önemli özellikleri boyutsuz bir sabit olan ayırma faktörü veya denge parametresi, Eşitlik 4.4’deki gibi R_L cinsinden belirtilebilir:

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

C_0 : Başlangıç lizozim 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
$0 < R_L < 1$	İstemli
$R_L = 0$	Tersinmez

Cu^{2+} -takılı PHEMA partikül gömülü kriyojellere lizozim 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, Cu^{2+} -takılı PHEMA partikül gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonunun istemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. Langmuir eşitliğine dayalı R_L değerleri

Lizozim derişimi (mg/mL)	R_L
0.1	0.9999
0.25	0.9999
0.5	0.9998
1.0	0.9997
2.0	0.9995
3.0	0.9993
4.0	0.9991

4.2.5. Adsorpsiyonun kinetik modellemesi

Kütle transferi ve kimyasal tepkime gibi adsorpsiyon prosesinin kontrol mekanizmalarına bakılmak istendiğinde deneysel sonuçlar için kinetik modeller (pseudo birinci ve ikinci dereceden denklemler) uygulanır (Ho vd., 1999). Bu denklemler, ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimlerine eşit olduğu kabulüne dayanır. Eşitlik 4.5’te gösterildiği gibi Lagergen’in birinci dereceden hız denklemi, çözeltiden çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan denklemdir (Chaouk ve Hern, 1999).

$$dq_t/dt = k_1(q^* - q_t) \quad (4.5)$$

k_1 yalancı birince dereceden kinetiğin hız sabiti ve q^* ile q_t ise sırasıyla denge ve t zamanında adsorplanan protein miktarıdır (mg/g). sınır koşulların uygulanmasıyla integrasyondan sonra $t = 0$ ’da $q_t = 0$, $t = t'$ ’de $q_t = q_t$, durumunda Eşitlik 4.6 bulunur:

$$\log[q^*/(q^* - q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.6)$$

Eşitlik 4.6’nın yeniden düzenlenmesiyle lineer form olan Eşitlik 4.7 oluşur:

$$\log(q^* - q_t) = \log(q^*) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.7)$$

Kinetik modelin kabuledilebilirliği için, $\log q^*$ 'nin t 'ye karşı çizilen grafiği bir doğru vermelidir. Gerçek bir birinci derece işlemde $\log q^*$, $\log(q^* - q_t)$ 'in t 'ye karşı çizilen grafiğin kesim noktasına eşit olmalıdır.

İlaveten, denge adsorpsiyon kapasitesine dayanan ikinci dereceden bir eşitlik de Eşitlik 4.8'deki gibi ifade edilebilir :

$$dq_t/dt = k_2 (q^* - q_t)^2 \quad (4.8)$$

k_2 ($\text{g.mg}^{-1}.\text{dk.}^{-1}$) yalancı ikinci dereceden adsorpsiyon işleminin hız sabitidir. Eşitlik 4.8'in integrasyonu ve sınır şartlarına uygulanmasıyla ($t = 0$ 'da $q_t = 0$, $t = t$ 'de $q_t = q_t$), Eşitlik 4.9,

$$[1/(q^* - q_t)] = (1/q^*) + k_2 t \quad (4.9)$$

veya bunun lineer formu Eşitlik 4.10,

$$(t/q_t) = (1/k_2 q^{*2}) + (1/q^*) t \quad (4.10)$$

oluşur. t/q_t 'nin t 'ye karşı grafiğinin ikinci dereceden kinetiği sağlaması için bir doğru vermesi gerekir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyon değeri (q^*) sırasıyla kesim ve eğimden hesaplanabilir. Kinetik çalışmaların sonuçları Çizelge 4.3'de özetlenmiştir.

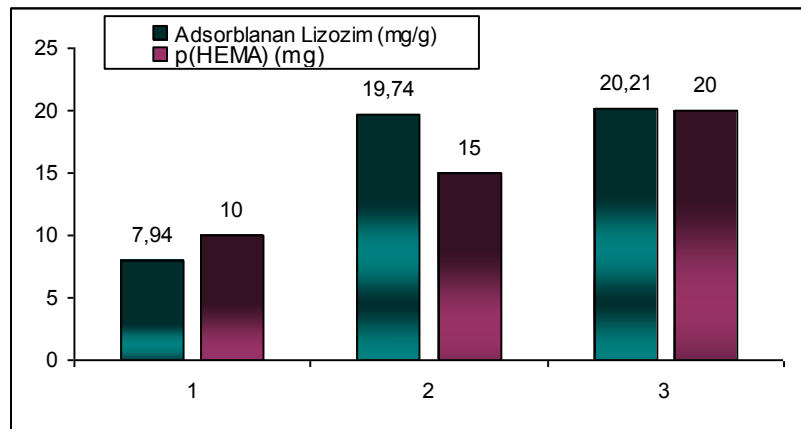
Çizelge 4.3'de yüksek R^2 değerleri dikkate alındığında, yalancı ikinci derece reaksiyonların baskın olduğu görülmektedir. Bu da adsorpsiyon prosesini kontrol eden hız sınırlayıcı basamağın kimyasal adsorpsiyon olabileceğini önermektedir. Adsorpsiyon işlemi süresince hız sınırlayıcı mekanizma değişebilmektedir. Üç olası mekanizma olabilir (Uzun vd., 2004). Bir dış yüzey kütle transferi veya adsorpsiyon prosesinin erken aşamasını kontrol eden film difüzyon prosesi vardır. Bu da bir reaksiyon veya sabit hız evresi ve sonunda adsorpsiyon işleminin önemli oranda azaldığı bir difüzyon aşaması ile izlenebilir (Allen vd., 2005).

Çizelge 4.3. Cu^{2+} -takılı PHEMA partikül gömülü kriyojeller için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri

C_0	Deneysel Q^*	Yalancı birinci derece kinetik			Yalancı ikinci derece kinetik		
(mg/ml)	(mg/g)	k_1 (1/min)	q^* (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.min)	q^* (mg/g)	R^2
0,1	10,502	0,07830	18,71	0,976	0,003021	15,87	0,994
0,25	24,007	0,12205	73,45	0,956	0,001446	37,04	0,982
0,5	43,1203	0,09902	111,43	0,897	0,000356	83,33	0,993
1,0	83,515	0,10824	251,18	0,847	0,00017	166,67	0,959
2,0	95,1295	0,11054	287,08	0,854	0,000234	166,67	0,942
3,0	107,067	0,10133	293,09	0,826	0,000179	200	0,963
4,0	107,133	0,11284	328,09	0,881	0,000179	200	0,963

4.2.6. Lizozim adsorpsiyonuna Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelerinin miktarının etkisi

Cu^{2+} takılı farklı miktarlarda PHEMA mikroküre gömülü kompozit kriyojellere adsorplanan lizozim miktarları Şekil 4.8’de verilmektedir.



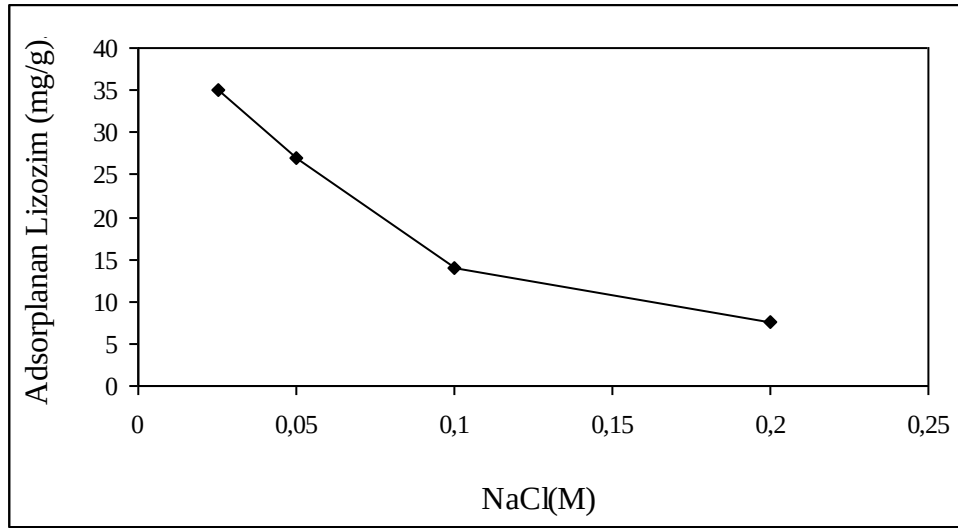
Şekil.4.8. Lizozim adsorpsiyonuna Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelerinin miktarının etkisi. Lizozim derişimi:0,5 mg/mL, pH 9 Trizma-baz tamponu, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

Şekilden de açıkça görülmektedir ki, sulu ortamdan uzaklaştırılan lizozim miktarı, kriyojellerdeki mikrokürelerin artan miktarı ile artmakta ve 20 mg Cu^{2+} -takılı PHEMA Mikroküre varlığında 20,21 mg değerine ulaşmaktadır. Mikroküre miktarının artması ile sulu ortamdan adsorplanan lizozim miktarının artması, kriyojeldeki yüzey alanının artması ile açıklanmaktadır (Erzengin vd., 2010).

4.2.7. Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna tuz derişiminin (NaCl) etkisi de incelenmiştir. Yüksek iyonik şiddet ile bağlanma zayıflamaktadır (Şekil 4.9). Bu durum iki şekilde açıklanabilir:

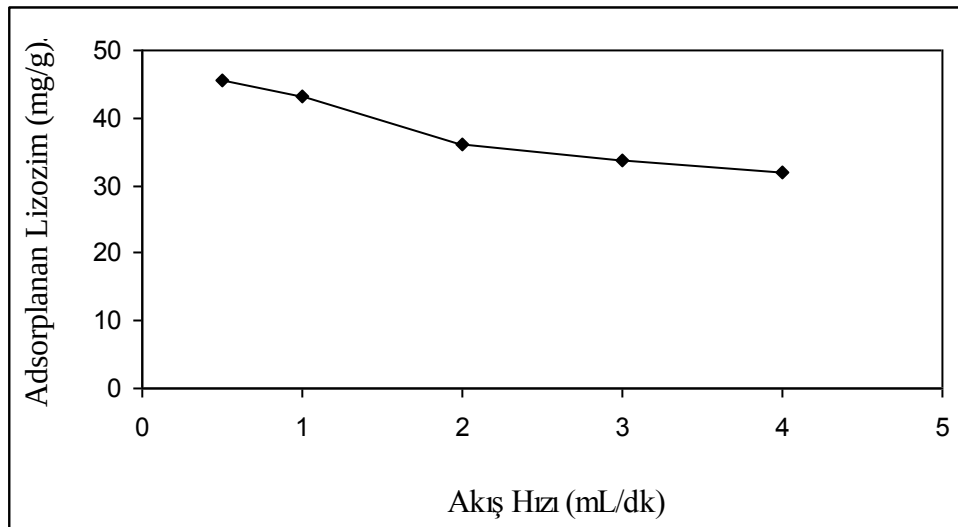
1. Tuz iyonları yük-yük etkileşimine girerek bağlanma bölgelerini maskelemektedirler.
2. İyonik şiddet arttıkça Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojeller ve lizozim arasında elektrostatik itişmeler nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Adsorpsiyon ortamında tuz derişiminin artması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



Şekil.4.9. Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Lizozim derişimi: 0,5 mg/mL, pH 9 Trizma- baz tamponu, akış hızı: 1 mL/dk, T: 25 °C

4.2.8 Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi

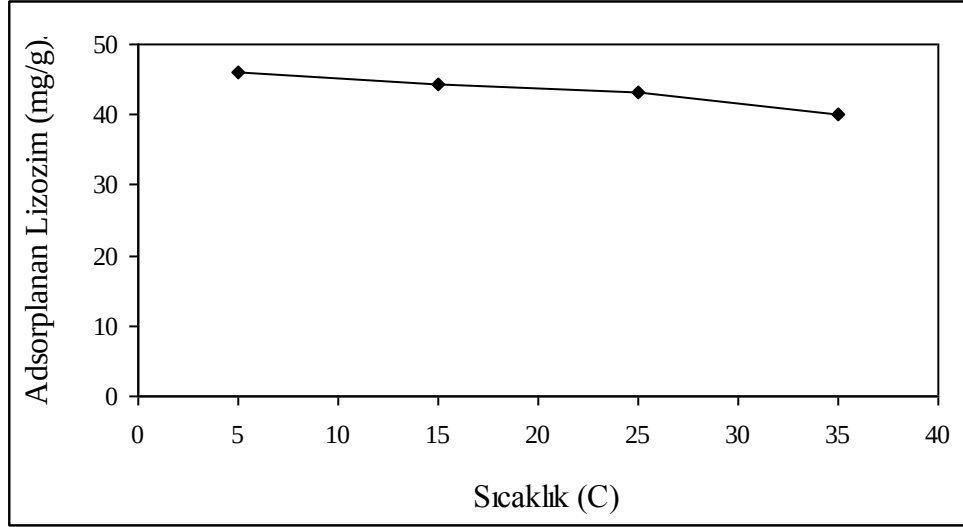
Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü PHEMA kriyojellere adsorplanan lizozim miktarına akış hızının etkisi Şekil 4.10’da verilmiştir. Akış hızının 0,5 mL/dk’ dan 4 mL/dk’ ya artmasıyla lizozim adsorpsiyon kapasitesi 45,65 mg/g ‘den 21,88 mg/g’ ye düşmektedir. Akış hızının artması ile birim zamanda kolondan geçen protein çözelti hacmi artmakta ve bundan dolayı proteinin kriyojel kolonundan alıkonma zamanı azalmaktadır. Akış hızı azalmasıyla kolon içinde protein ile ligand arasındaki etkileşim süresi uzar. Böylece lizozim moleküllerinin kriyojel gözenek duvarlarına yayılması ve Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelere bağlanması için yeterli süre alacağından daha iyi bir lizozim adsorpsiyon kapasitesi elde edilir. Ayrıca kolonun çalışması için kriyojel sürekli olarak taze bir lizozim çözeltisiyle etkileştirilmektedir. Sonuç olarak kolon içindeki Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojel tabakasıyla temasta olan çözelti içindeki lizozim derişimi nispeten sabittir. Ayrıca kriyojel yapısı içindeki makrogözenekler açık, birbirine bağlı ve geniş bir kanal oluşturacak şekildedir. Hareketli lizozim fazı, bu kanallardan geçerek lizozim moleküllerini konveksiyon yoluyla aktif bağlanma merkezlerine (Cu^{2+} iyonlarına) taşır. Bu olay, hareketli lizozim fazı ile sabit Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojel fazı arasında hızlı bir şekilde kütle aktarılmasını sağlar.



Şekil 4.10. Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Lizozim derişimi: 0,5 mg/mL, pH 9 Trizma- baz tamponu, T: 25 °C

4.2.9. Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5 °C – 35 °C arasında çalışıldı. Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojellere denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalmıştır ve maksimum adsorpsiyona 5 °C’de ulaşılmıştır (Şekil 4.11). Sıcaklığın artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde % 20 civarında azalma görülmüştür. Bunun olası nedeni ise adsorpsiyon prosesinin ekzotermik olması şeklinde açıklanabilir (Sarıkaya ,2000).



Şekil.4.11. Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Lizozim derişimi: 0,5 mg/mL, pH 9 Trizma- baz tamponu, akış hızı: 1mL/dk, T: °C

4.2.10. 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 lizozimin % 95’inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak 0,5 M NaSCN kullanılarak 30 dakikada desorbe edildi. Desorpsiyon sonuçları, NaSCN’nin, lizozim için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu gösterdi. Kriyojel kolonlarının tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için, adsorpsiyon-desopsiyon döngüsü, aynı mikroküreler kullanılarak 35 kez ardarda uygulanmıştır. Bu döngülerden sonra, kapasite % 5 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. SONUÇLAR

Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında, lizozim enziminin sulu ortamdan adsorpsiyonu için, yeni bir immobilize metal afinite matriksi tasarlandı. Bunun için PHEMA mikrokürelere, reaktif epoksi grupları kullanılarak, metal iyonunun şelatlanması sağlanması için, üçdişli bir ligand olan iminodiasetik asit (İDA) ile kovalent olarak bağlandı. Daha sonra Cu^{2+} metal iyonunu içeren çözelti ile etkileştirilmesiyle, İDA ve Cu^{2+} arasında, koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı ve hazırlanan Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelere kriyojelle gömülmesiyle lizozime spesifik, Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelere gömülü PHEMA kriyojeller hazırlandı.

Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelere gömülü PHEMA kriyojeller, çapraz-bağlı ve hidrofilik yapıda matrikslerdir. Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelere gömülü PHEMA kriyojeli için makrogözenek miktarı % 71,6 olarak bulunmuştur. Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelere gömülü PHEMA kriyojellerin denge şişme oranı ise 7,51 $\text{H}_2\text{O/g}$ polimer olarak bulunmuştur.

Kriyojelin iç yapısının taramalı elektron mikroskop görüntüleri alınmıştır. Poli(HEMA) kriyojeller, geniş akış kanallarına, süpermakrogözeneklere, düşük basınç düşmesi ve kısa difüzyon yolu gibi özelliklere sahiptir. Ancak düşük adsorpsiyon kapasitesine sahiptirler. Cu^{2+} takılı PHEMA mikrokürelere gömülerek yüzey alanının ve dolayısı ile adsorpsiyon kapasitesinin artırılması sağlanmıştır.

Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı 21,36 m^2/g olarak bulunmuştur. Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelere gömülü kriyojellerin spesifik yüzey alanı ise 38,75 m^2/g bulunmuştur.

Yapıya İDA'nın katılma derecesini belirleyebilmek için, sentezlenen Cu^{2+} -takılı PHEMA mikrokürelere elementel analizi yapılmış ve İDA miktarı 327 $\mu\text{mol g}^{-1}$ polimer olarak bulunmuştur.

PHEMA mikrokürelere İDA'nın bağlandığını test etmek amacı saf İDA ve İDA bağlı PHEMA mikrokürelere FTIR-ATR spektrumları incelenmiştir.

Kriyojellerin karakterizasyonu tamamlandıktan sonra sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon ortamının pH'nın, lizozim adsorpsiyonuna etkisi araştırılmış olup, maksimum lizozim adsorpsiyonu pH 9 trizma-baz tamponunda 43,12 mg/g polimer olarak bulunmuştur.

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü süpermakrogözenekli kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna lizozim başlangıç derişiminin etkisi incelenmiş ve maksimum lizozim adsorpsiyonu 4 mg/mL'de 107,14 mg/g polimer olarak bulunmuştur.

Langmuir adsorpsiyon modeli ile q_m ve K_d ve R^2 değerleri sırasıyla 111,11 mg/g ve 3,11 mg/mL, 0,989 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir.

Cu^{2+} takılı farklı miktarlarda PHEMA mikroküre gömülü kompozit kriyojellere lizozim adsorpsiyon miktarları incelenmiştir. Sulu ortamdan uzaklaştırılan lizozim miktarı, kriyojellerdeki mikrokürelerin artan miktarı ile artmış ve 20 mg Cu^{2+} takılı PHEMA mikroküre varlığında 20,21 mg değerine ulaşmıştır.

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna tuz derişiminin (NaCl) etkisi de incelenmiştir. Yüksek iyonik şiddet ile bağlanmanın zayıfladığı gözlemlenmiştir.

Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü PHEMA kriyojellere adsorplanan lizozim miktarına akış hızının etkisi incelenmiştir. Akış hızının 0,5 mL/dk' dan 4 mL/dk' ya artmasıyla lizozim adsorpsiyon kapasitesi 45,65 mg/g dan 21,88 mg/g a düştüğü gözlemlenmiştir.

Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5 °C - 35 °C arasında incelenmiştir. Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü kriyojellere denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalmıştır ve maksimum adsorpsiyona 5 °C'de ulaşılmıştır.

Lizozimin % 95'inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak 0,5 M NaSCN kullanılarak 30 dakikada desorbe edilmiştir. Desorpsiyon sonuçları, NaSCN'nin, lizozim için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu, elde edilen Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü PHEMA kriyojellerin, literatürde yer alan immobilize metal afinite çalışmalarıyla kıyaslanabilecek ölçüde, protein adsorpsiyon performansına ulaştığı görülmüştür. İlâveten spesifik olmayan adsorpsiyonun ise düşük olduğu bulunmuştur.

Lizozimin, kriyojellerden desorpsiyonunun yüksek oranda olması ve kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olması, önemli bir avantaj sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada sentezlenen, yeni Cu^{2+} -takılı PHEMA mikroküreler gömülü PHEMA kriyojellerin sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonunda etkin bir şekilde uzaklaştırılması sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Akkaya, B., 2005. Sitokrom-c adsorpsiyonu için manyetik metal şelat afinite sorbentlerin hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Akgöl, S., Denizli, A., 2004. Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption, J. Mol. Catal. B-Enzym, 28, 7-14.
- Aktaş, U. D., 2008. Protein saflaştırılması için magnetic nano yapıların hazırlanması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Alkan, M. H., 2009. Romatoid artrit tedavisine yönelik protein-A takılı poli(HEMA) kriyojellerin hazırlanması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Altuner, D. S., 2006. Sığır serum albüminin immobilize metal afinite membranları kullanılarak sulu ortamdan adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- Apeztegula, I., Calligaris, R., Bottardi, S., Santro, C., 1994. Expression, purification and functional characterization of the two zing-finger domain of the human GATA-1. Protein Expression Purif., 5, 541-546.
- 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, 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, B. J. Chromatogr. A., 986, 275-290.
- Baker, A.S., Jimenez, T., Dong, Z., Ruth, P. ve Islam, M.R. 2007. Purification of lysozyme from hen eggs using sand, Eur. J. Sci. Res., 16(3): 358-366.
- 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.

- 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.
- Chaga, G.S., 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography, past, present and future, *J. Biochem. Biophys. Methods*. 49, 313-334.
- Chauk, H. ve Hearn, M.T.W., 1999. Examination of the protein binding behaviour of immobilised copper (II)-2,6-diaminomethylpyridine and its application in the immobilised metal ion affinity chromatographic separation of several human serum proteins, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 39, 161-177.
- 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., Jacobsen, J., 1998. An electrophoretic ink for all-printed reflective electronic displays, *Nature*, 394, 53.
- Çimen, H.S., 2006. Lizozimin saflaştırılması işleminde kullanılmak üzere yeni afinite destek materyallerinin hazırlanması: destek materyalinin yüzey özelliklerinin, adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması, Yüksek Lisans Tezi Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- Davankov, V.A., Semechkin, A.V., 1977. Ligand-Exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, 141, 313-353.
- Denizli, A., ve Pişkin, E., 2001. Dye-ligand affinity systems, *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 49, 391-416.
- Denizli, A. ve Küfrevioğlu, İ. Ö., 2010. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Diltemiz, E.S., 2002. Poli(2-hidroksimetakrilat-co-metakriloamidohistidin) mikrokürelere Cu(II) şelasyonu ve sitokrom-c adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Doğan, A., 2010. Rekombinant insan interferon- α 'nın afinite adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

- El-Agamy, E.I., Ruppanner, R., Ismail, A., Champagne, C.P, Assaf, R., 1996. Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk, *Intl. Dairy J.* 6, 129-145.
- El-Rassi, Z. ve Horvath, C., 1986. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support, *J. Chromatogr.*, 6, 360.
- Erzengin, M., Ünlü, N., Odabaşı, M., 2011. A Novel Adsorbent for Protein Chromatography: Supermacroporous Monolithic Cryogel Embedded with Cu^{2+} -Attached Sporopollenin Particles, *J. Chromatogr. A*, 1218, 484-490
- Freman, W.H., Stryer, L., 1995. *L. Biochem.* 3d Ed., New York.
- Gaberc-Porekar V., Menart V., 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *J. Biochem. Bioph. Meth.* 49, 335–360.
- 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. ve Tucker, J., 1997. Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography, *Protein Expres. Purif.* 11, 53-60.
- Gutiérrez, R., Martín del Valle, E.M., Gala'n, M.A., 2007. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status, *Sep. Purif. Reviews*, 36, 71-111.
- 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.
- Hansson, H. ve Kaageda, L., 1981. Adsorption and desorption of proteins in metal chelate affinity chromatography. Purification of albumin, *J. Chromatogr.* 215, 333-339.
- Helferich, 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.
- Hu, T., Su, Z., 2003. A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate, *J. Biotechnol.*, 100, 267-275.
- Huiting, X., Plieva, F., Galaev, I.Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B., 2006. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure, *J. Mater. Chem*, 16, 4065-4073.
- 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.
- Khossravi, M. ve Borchardt, R.T., 1998. Chemical pathways of peptide degradation, IX Metal-catalyzed oxidation of histidine in model peptides, *Pharm. Res.*, 15, 1096-1102
- 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.
- Matsushima, Y., Miyazaki, T., Kasai, S., 1969. Chemical Evidence for the Phillips Model of the Action of Hen Egg White Lysozyme, *Nature*, 219-265.
- 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.
- Lakhtin, V.M., Kostanova, E.A., Arbatskii, N.P., 1995. Isolation and characterisation of multiple forms of papaya latex lysozyme. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 31, 214-220.
- 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 β -mercaptoethanol as a reducing agent, *Clontechniques*, 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., ve Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.*, 10, 445-451.
- Lönnerdal, B.O. ve Keen, C., 1982. Metal chelate affinity chromatography of proteins, *J. Appl. Biochem.*, 4, 203-208.
- Martell, A.E. ve Hancock, R.D., 1996. Metal Complexes in Aqueous Solutions, Chapter 5, 160, Springer, Netherland.
- 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. ve 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. ve 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 SiO₂ nanoparticles, *Chinese J. Chem. Eng.*, 18, 667-671.

- 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., Mikhailovsky, S., Galaev, I. Y., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303-309.
- Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergenshl, 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., ve Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*, 258, 598–599.
- Porath, J. ve Olin, B., 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biometarials, serum protein affinities for gel-immoblized iron and nickel ions, *Biochem.*, 22, 1621-1630.
- Ramadan, N. ve Porath, J., 1985. Fe^{3+} -hydroxamate as immobilized metal affinity-adsorbent for protein chromatography, *J. Chromatogr. A*, 321, 93-104.
- 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 recombinat proteins, *J. Biol. Chem.*, 263, 7211-7215.
- 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.

- Ueda, E.K.M., Gout, P.W., ve Morganti, L., 2003. Current and prospective applications of metal ion-protein binding, *J. Chromatogr. A*, 988, 1-23.
- 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.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W., 1999. *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley ve Sons, Inc., New York, USA.
- Wan Ngah, W.S, Endud, C.S, Mayanar, R., 2002. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads, *Reactive Funct. Polym.*, 50, 181-190.
- 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.
- 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., ve 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., ve Denizli A., 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochem. Eng. J.*, 43, 272-279.
- Zoroddu, M. A., Kowalik, J. T., Kozlowski, 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.
- Zou, H., Luo, Q., Zhou, D., 2001. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 49, 199- 240.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyda CEYLAN

Doğum Yılı : 05.08.1987

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Selçuk Üniversitesi; 2005-2009

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi; 2009-2011

Haberleşme Bilgileri

Adres : Coğlaki Mah. Özgüneş Ap. Kat: 4 No: 21

Telefon : 0545 304 27 67

E-posta : seydaceylan@hotmail.com