

**MANYETİK SİLİKA PARTİKÜLLERLE MANYETİK ALAN
VARLIĞINDA BOYA AFİNİTE TEMELLİ ALBÜMİN
SAFLAŞTIRILMASI**

**DYE-AFFINITY BASED ALBUMIN PURIFICATION WITH
MAGNETIC SILICA PARTICLES UNDER MAGNETIC
FIELD**

NURHAK TATAR

PROF. DR. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Pusulası bilim olan tüm bilim insanlarına...

ÖZET

MANYETİK SİLİKA PARTİKÜLLERLE MANYETİK ALAN VARLIĞINDA BOYA-AFİNİTE TEMELLİ ALBÜMİN SAFLAŞTIRMASI

Nurhak TATAR

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan Yavuz ALAGÖZ

Ağustos 2020, 109 sayfa

İnsan serum albümini dolaşım sisteminde en fazla bulunan proteindir. Kanın ozmotik basıncının ayarlanması, safra asitleri, bilirubin, uzun zincirli yağ asitleri, amino asitleri, steroidler, metal iyonları ve ilaçlar gibi çok sayıda endojen ve eksojen maddenin taşınması, dağıtılması ve metabolizması gibi pek çok fizyolojik işlevi yerine getirir. Aşırı kan kaybı ve böbrek rahatsızlığı ile protein kayıpları durumunda tedavi amaçlı kullanılır ve kan türevli temel ürünlerden bir tanesidir. Plazmadan saflaştırma için genellikle Cohn fraksiyonlama yöntemi kullanılır. Ancak bu yöntem seçici değildir ve protein denatürasyonuna neden olabilir. Proteinlerin saflaştırılması için boya ligand adsorbentler, basit, hızlı ve ucuz ayırma olanağı sağladıkları için tercih edilirler ve tek seferde 20-80 kat saflaştırma ve ön işlem olmaksızın ham özütten yüksek oranda geri kazanım sağlayabilirler. Bu çalışmada manyetik silika partiküllerle albümine ilgisi bilinen Cibacron Blue F3GA ligand olarak bağlanmış ve manyetik sistemde albümin saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Spesifik yüzey alanı $222 \text{ m}^2/\text{g}$ olan silika partiküllerdeki magnetit varlığı ESR ve VSM yöntemleri ile gösterilmiş ve adsorbentin spektroskopik yarıma çarpanı, g, değeri 2.3153 olarak hesaplanmıştır. Manyetik partiküllere bağlanan Cibacron Blue F3GA miktarının, boya derişiminin artırılması

ile arttığı elementel analiz yöntemi ile belirlenmiş ve boyanın yapıya kovalent olarak bağlandığı FTIR ile gösterilmiştir. Farklı koşullarda gerçekleştirilen HSA adsorpsiyonu çalışmalarında en yüksek adsorpsiyonun pH 5.5'de 27.82 mg/g olarak gerçekleştiği ve 3.0 mg/mL HSA derişiminde plato değerine ulaştığı gözlenmiştir. Sıcaklık ve tuz derişiminin artmasının HSA adsorpsiyonunu azaltıcı yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Yapılan hesaplamalar boya bağlı manyetik partiküllere HSA adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğunu göstermiştir. Kinetik hesaplamalar adsorpsiyonun kimyasal olarak gerçekleştiğini göstermiştir. Desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmış ve 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin ardından adsorbentin kapasitesinde yalnızca %5 oranında bir azalma olmuştur. Yapay plazmadan yapılan adsorpsiyon çalışmalarında ise albümin adsorpsiyonu 48.6 mg/g'dır ve plazmadan toplam protein adsorpsiyonunun %97'si albümin olarak gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: Manyetik silika partikül, Cibacron Blue F3GA, albümin

ABSTRACT

DYE-AFFINITY BASED ALBUMIN PURIFICATION WITH MAGNETIC SILICA PARTICLES UNDER MAGNETIC FIELD

Nurhak TATAR

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

August 2020, 109 pages

Human serum albumin is the most abundant protein in the circulatory system. It performs many physiological functions such as the regulation, distribution and metabolism of a large number of endogenous and exogenous substances such as adjusting the osmotic pressure of the blood, bile acids, bilirubin, long chain fatty acids, amino acids, steroids, metal ions and drugs. It is used for therapeutic purposes in case of excessive blood loss and kidney disease and protein losses and is one of the basic products derived from blood. Cohn fractionation method is generally used for purification from plasma. However, this method is not selective and can cause protein denaturation. Dye ligand adsorbents for purification of proteins are preferred because they provide simple, fast and inexpensive separation and can provide high recovery from crude extract 20-80 times in one time without purifications and pretreatment. In this study, Cibacron Blue F3GA ligand, known to be associated with the albumin of magnetic silica particles, was ligated and albumin purification was carried out in the magnetic system. The presence of magnetite in the silica particles with a 222 m²/g surface area was shown by ESR and VSM techniques and the spectroscopic splitting

factor, g, was calculated as 2.3153. The amount of Cibacron Blue F3GA bound to the magnetic particles was increased with the increasing dye concentration and was determined by elemental analysis. The covalent binding of the dye was also shown by FTIR. The HSA adsorption studies were performed under different conditions. The maximum HSA adsorption was achieved at pH 5.5 as 27.82 mg/g and reached a plateau value at 3.0 mg/mL HSA concentration. The increase in the medium temperature and ionic strength was decreased the HSA adsorption. The mathematical calculations have shown that the adsorption of HSA onto the magnetic silica particles is consistent with the Langmuir isotherm and adsorption occurred chemically. 1.0 M of NaCl solution was used as a desorption agent and after 0 adsorption-desorption cycle the adsorption capacity of the adsorbent decreased only 5%. The adsorption of albumin from artificial plasma occurred as 48.6 mg/g and the 97% of total protein adsorption from plasma occurred as albumin.

Keywords: Magnetic silica particles, Cibacron Blue F3GA, Albumin

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez çalışması için beni laboratuvarına kabul eden ve süreç içinde bilimsel katkılarıyla, samimi yaklaşımıyla desteklerini esirgemeyen Prof.Dr. Adil Denizli hocama,

Çalışmanın tüm aşamalarında yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle içtenlikli davranışıyla süreci yürüten danışmanım Prof.Dr. Handan Yavuz Alagöz hocama,

Tezde emeğini, desteğini çok gördüğüm tüm aşamalarda bilgisi ile beni yönlendiren, laboratuvara uyum sağlamamı gerçekleştiren güzel yaklaşımıyla her zaman soru sorabilecek yakınlığı bulabildiğim soyadı gibi ak gönüllü Öğr.Gör.Dr. Semra Akgönüllü hocama,

ESR çalışmalarımda bana laboratuvarını açan, süreç içinde motivasyonumu hep diri tutan, bilimsel desteğini esirgemeyen Prof.Dr.Şeyda Çolak hocama,

Süreç boyunca güler yüzlerini esirgemeyip beni dinleyen, destek olan sevgili arkadaşlarım Öğr.Gör.Dr. Esra Kılıç, Dr. Monireh Bakhshpour Yücel ve yüksek mühendis Songül Kızgın Erkiz'e,

İlk defa gittiğim halde bana yabancılık çektirmeyen samimi yaklaşımlarıyla laboraturvarda geçirdiğim vakitleri güzel kılan tüm biokimya grubu arkadaşlarıma,

Ve

Tüm sıkıntılarımda yanımda olan ve süreçte etkin bir şekilde zaman geçirmekte eksik kaldığım kız arkadaşım Gül Parlak ve aileme,

Yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Albümin.....	2
2.2. Plazma Fraksiyonlanması: Geleneksel ve Kromatografik Albümin Saflaştırma Yöntemleri.....	5
2.2.1. Plazma Fraksiyonlama Yöntemleri.....	5
2.2.2. Etil Alkol Fraksiyonlaması.....	7
2.2.2. Isı Şoku ile Saflaştırma.....	9
2.2.3. Kromatograafi.....	10
2.2.4. Afinite Kromatografisi.....	10
2.4. Boya Ligandlar.....	11
2.4.1. Boya Ligandların Kimyasal Yapısı.....	13
2.5. Proteinler ve Boya Ligandlar Arasındaki Etkileşimler.....	14
2.6. Cibacron Blue F3GA.....	15
2.7. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Matriks Seçimi.....	17
2.8. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Ligand Seçimi.....	18
2.9. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Ligandların Matriks Yapılarına Bağlanması.....	20
2.10. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Adsorpsiyon	23
2.11. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Desorpsiyon	24
2.12. Manyetik Parçacıklar.....	25
2.12.1. Manyetik Parçacıkların Hazırlanışı.....	27

2.12.2. Demir Oksit Yapılar.....	27
2.12.3. Manyetik Polimer Partiküllerin Sentezi.....	29
2.12.4. Manyetik Polimerlerin Ayırıştırma İşlemlerinde Kullanımı.....	30
2.13. Ayırıştırma Çalışmalarında Akışkan Yatakların Kullanımı	30
2.13.1. Akışkan Yataklarda Manyetik Alan Kullanımı	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	33
3.1. Manyetik Silika Partiküllerinin Üretimi	33
3.2. Manyetik Silika Partiküllerin Cibacron Blue F3GA İle Bağlanması.....	34
3.3. Cibacron Blue F3GA Takılı Manyetik Silika Partiküllerin Yıkama ve Çöktürme İşlemleri.....	35
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları.....	35
3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Çalışmaları.....	35
3.4.2. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	35
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (ESR) Çalışmaları	35
3.4.4. Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) Ölçümleri.....	36
3.4.5. Elementel Analiz.....	36
3.4.6. Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) Analizi.....	37
3.4.7. FTIR Analizi.....	37
3.5. Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalışmaları.....	37
3.5.1. HSA Adsorpsiyonu.....	37
3.5.2. Manyetik Alan Varlığında HSA Adsorpsiyonunun İncelenmesi	39
3.5.3. Desorpsiyon ve Tekrarlanabilirlik.....	40
3.6. Yapay Plazma İle Saflaştırma ve SDS-PAGE.....	41
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları.....	42
4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskopu(SEM) Çalışmaları	42
4.1.2. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	45
4.1.3. Elektron Spin Rezonans (ESR) Çalışmaları.....	46
4.1.4. Titreşimli Örnek Magnetometresi (VSM) Ölçüm Sonuçları	48
4.1.5. Elementel Analiz Sonuçları.....	49
4.1.6. Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) Analizi	50
4.1.7. FTIR Analiz Sonucu.....	51

4.2. Cibacron Blue F3GA Takılı Manyetik Silika Partiküllere HSA Adsorpsiyonu	54
4.2.1. pH Etkisinin İncelenmesi	54
4.2.2. Boya Ligand Miktarının Etkisi	55
4.2.3. HSA Derişimi Etkisinin İncelenmesi	56
4.2.4. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	58
4.2.5. İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi	59
4.2.6. Adsorpsiyon İzotermi	60
4.2.7. Adsorpsiyon Kinetiği	63
4.2.8. Manyetik Alan Varlığında HSA Adsorpsiyonunun İncelenmesi	66
4.2.9. Desorpsiyon ve Tekrarlanabilirlik	69
4.2.10. SDS-PAGE Analizi	71
4.3. Literatür İncelemesi	73
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	78
6. KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Albüminin elipsoid yapısı.....	2
Şekil 2.2. HSA'nın moleküler yapısı	3
Şekil 2.3. Cohn fraksiyonlama yöntemi.....	8
Şekil 2.4. Cibacron Blue F3GA'nın kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.5. Matriks ile ligand arasındaki bağlanma yöntemleri.....	22
Şekil 2.6. Triazin boyanın matriksin hidroksil grubuna bağlanması.....	22
Şekil 2.7. Manyetik polimerlerin farklı morfolojik çeşitleri.....	29
Şekil 2.8. Manyetik akışkan yatakların deney düzeneği.....	31
Şekil 2.9. Manyetik partiküle etki eden kuvvetler.....	32
Şekil 3.1. Manyetik silika partiküllerin sentezi.....	33
Şekil 3.2. Cibacron Blue F3GA ve manyetik silika partiküllerin bağlanma mekanizması.....	34
Şekil 3.3. Adsorpsiyon işlemi için kullanılan deney düzeneği	38
Şekil 3.4. HSA için kalibrasyon grafiği.....	39
Şekil 3.5. Manyetik alan varlığında adsorpsiyon işlemi deney düzeneği.....	40
Şekil 3.6. SDS-PAGE düzeneği.....	41
Şekil 4.1. Manyetik silika partiküllerin 500 X büyütme SEM fotoğrafı.....	42
Şekil 4.2. Manyetik silika partiküllerin 1.00 X büyütme SEM fotoğrafı.....	43
Şekil 4.3. Manyetik silika partiküllerin 2.50 X büyütme SEM fotoğrafı.....	43
Şekil 4.4. Manyetik silika partiküllerin 10.00 X büyütme SEM fotoğrafı.....	44
Şekil 4.5. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin haritalandırılmış fotoğrafı.....	45
Şekil 4.6. Manyetik silika partiküllerin gözenek boyut dağılımı.....	46
Şekil 4.7. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin ESR spektrumu	48
Şekil 4.8. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin VSM spektrumu	49

Şekil 4.9. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin EDX spektrumu	50
Şekil 4.10. Silika kaplı demir oksit partiküllerin FTIR spektrumu.....	51
Şekil 4.11. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin FTIR spekturumu.....	52
Şekil 4.12. Cibacron Blue F3GA takılmış ve takılmamış manyetik silika partiküllerin FTIR spektrumu.....	52
Şekil 4.13. pH değişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.14. Cibacron Blue F3GA miktarının HSA adsorpsiyonuna etkisi.....	56
Şekil 4.15. HSA derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.16. Sıcaklık değişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.17. İyonik şiddetin adsorpsiyon üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.18. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin Langmuir İzotermi	61
Şekil 4.19. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin Freundlich İzotermi.....	62
Şekil 4.20. Deneysel verilerin izotermiler ile karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.21. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin pseudo birinci dereceden kinetiği.....	65
Şekil 4.22. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin pseudo ikinci dereceden kinetiği.....	66
Şekil 4.23. Manyetik alan varlığında HSA adsorpsiyon incelenmesi için kullanılan deney düzeneği.....	67
Şekil 4.24. Manyetik alan varlığında incelenen adsorpsiyon değerinin karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.25. Manyetik alan varlığında adsorpsiyon süresi.....	69
Şekil 4.26. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin adsorpsiyon miktarı ve desorpsiyon oranı ifadeleriyle tekrar kullanılabilirliği.....	70
Şekil 4.27. SDS-PAGE Analizi.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HSA ve BSA yapıları.....	3
Çizelge 2.2. Derişimi 1 g/L'den büyük olan plazma proteinleri.....	6
Çizelge 2.3. Plazmadan elde edilen terapötik proteinler ve dünya çapında üretici sayıları.....	7
Çizelge 2.4. Cohn yönteminin değişkenleri.....	8
Çizelge 2.5. Cohn fraksiyonlama sisteminde plazma proteinlerinin dağılımı.....	9
Çizelge 2.6. Cohn sisteminin avantaj ve dezavantajları.....	9
Çizelge 2.7. Farklı kromatografi tekniklerinin karşılaştırılması.....	13
Çizelge 2.8. Demir Oksit çeşitleri.....	28
Çizelge 3.1. ESR spektrometresi çalışma koşulları.....	36
Çizelge 4.1. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin yüzey analizi	46
Çizelge 4.2. Manyetizasyon analiz verileri.....	48
Çizelge 4.3. Elementel analiz verileri.....	50
Çizelge 4.4. FTIR spektrum sonucunda tespit edilen titreşim bantları.....	53
Çizelge 4.5. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik partiküllerin Langmiur ve Freundlich İzotermi.....	63
Çizelge 4.6. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin pseudo birinci dereceden ve pseudo ikinci dereceden kinetik hesapları	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

h	Plank sabiti
β	Evrensel sabit
γ	Frekans
H_r	Manyetik rezonans değeri

Kısaltmalar

BSA	Sığır serum albümin
CBF3GA	Cibacron Blue F3GA
CV	Boyut dağılımı değişim katsayısı
EDX	Enerji Dağılımlı X-ışını
ESR	Elektron spin rezonans spektrometrisi
FTIR	Fourier transform infrared spektrofotometresi
HSA	İnsan serum albümin
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PMMA	Polimetilmetakrilat
PS	Polistiren
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SDS-PAGE	Sodyum dedosil-poliakrilamid jel elektroforezi
UV Visible	Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi

1. GİRİŞ

Proteinlerin saflaştırılması amacıyla boyalar uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Özellikle Cibacron Blue F3GA, NAD⁺ bağımlı enzim ve proteinlere afinitesi ile sıklıkla kullanılan bir boya ligandır ve albümine afinitesi oldukça yüksektir. Antrakinon diaminobenzen sülfonat ve triazin halkaları sırası ile kofaktörün adenin, adenil riboz ve pirofosfat gruplarına benzer davranarak ilgili bölgelerden proteine bağlanmaktadır. Boyalar grup spesifik ligand sınıfında olmakla birlikte biyolojik ligandlara göre çok önemli avantajlara sahiptir. Özellikle saf albümin elde etmek yerine amaç albümini uzaklaştırarak serum proteomunu basitleştirmek olduğunda boya ligandların avantajları daha da öne çıkmaktadır.

Kimyasal olarak sentezlenen manyetik partiküller eş boyutlu olmalarına eşlik eden manyetik özellikleri nedeniyle manyetik rezonans görüntüleme, manyetik ilaç hedefleme, hipertermi anti kanser stratejisi ve protein-enzim immobilizasyonu ve saflaştırılması gibi pek çok biyoteknolojik ve medikal uygulamada dikkat çekmektedir. Manyetit (Fe₃O₄) parçacıkların silika ile kaplanması hem temel hem de teknolojik araştırmalarda önemli bir yaklaşımdır. Demir oksit parçacıklarının silika ile kaplanması çözeltide topaklaşmalarını önler ve kimyasal kararlılığını artırır. Diğer bir avantaj ise yüzeye kazandırılan silanol grupları sayesinde çeşitli bağlama ajanları kullanarak özgün ligandların yüzeye kovalent olarak bağlanabilmesidir. Son olarak silika kaplanmış manyetik partiküller biyolojik sistemlere karşı zararsız yapıdadırlar.

Manyetik partiküller ayırma işleminde iki farklı şekilde kullanılabilirler. Bunlardan biri adsorpsiyon işlemi tamamlandıktan sonra bir mıknatıs yardımı ile partiküllerin çözeltiden hızlı ve kolay şekilde ayrılmasıdır. Diğer bir kullanım ise özellikle proteinlerin büyük ölçekte saflaştırılmasına olanak sağlayan ve katı parçacıkların karıştırılmasına gerek olmaksızın dış manyetik alan uygulaması ile kütle transferinin kolaylaştırılmasıdır.

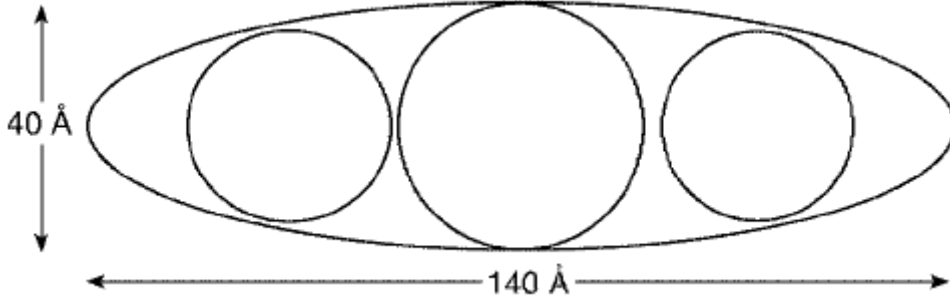
Bu çalışmada hazırlanan manyetik silika partiküllere, boya ligand Cibacron Blue F3GA silanol grupları üzerinden bağlanarak karakterize edilmesinin ardından manyetik alan varlığında albümin saflaştırma özellikleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Albümin

Kan plazması içinde en çok bulunan protein çeşidi albümindir. Yapılan çalışmalar albüminin plazma proteinlerinin yaklaşık yarısı kadar olduğunu göstermektedir. İnsan serum albümin (HSA) bir takım hastalıkların tedavisi için gereklilik arz etmektedir. HSA; denaturasyonu, pH karakteristiği ve elektrostatik özelliği bakımından farklılık sağlayacak üç büyük domaine sahiptir (Denizli, 2011).

Şekil 2.1'de temsili görünümü çizilen albümin yapısı çözelti içerisinde az oranda vizikozitesi olan elips geometrisine yakın bir durumdadır (Luensmann ve Jones, 2008).



Şekil 2.1. Albüminin elipsoid yapısı.

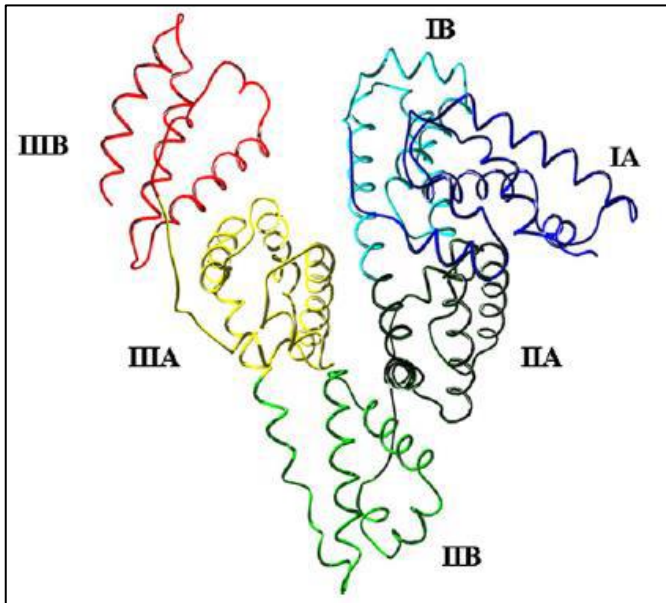
Yüksek çözünürlüklü kristalografik teknikler kullanılarak yapılan analizler sonucunda Şekil 2.2'de gösterildiği haliyle HSA'nın kristal formunda üç boyutlu olarak kalp yapısında bir görünüme sahip olduğu tespit edilmiştir. Fizikokimyasal özellikler bakımından incelendiğinde insan serum albümin ve sığır serum albümin (BSA) birbirine çok benzer bir yapı arz eder. Bu yapılar karşılaştırıldığında Çizelge 2.1'de belirtilen farklılıklar görülmektedir (Luensmann ve Jones, 2008).

Çizelge 2.1 HSA ve BSA yapıları.

	Moleküler Ağırlık (Da)	İzoelektrik Nokta	Aminoasit Sayısı
HSA	66.438	5.16	585
BSA	66.411	5.15	583

İnsanlarda serum proteinleri içerisindeki dağılıma bakıldığında %55-%60'lık bir oranla en çok paya sahip protein albümindir. Moleküler ağırlığı 66500 Da olan 585 aminoasit içeren tek polipeptid zincirinden oluşmuştur. Birçok α -heliks yapısı ve bunlara tutunmuş olan 17 sülfür köprüsü içeren bu moleküler yapı dolaşık bir yapı benzerliği göstermektedir (Nicholson, Wolmarans ve Park, 2000).

Lenf ve dolaşım sisteminin proteini olan albümin karaciğerde üretilmektedir. Kan pH'ının korunması ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bağlanma özellikleri dolayısıyla vitaminlerin taşınması ve dağıtılmasında da etkinlik gösteren albümin toksik yapılardan da korunma sağlamaktadır. Bağlanma özellikleri hidrofobik ve anyonik moleküller üzerinde etkili olan albümin bu özelliği bakımından önemli bir taşıyıcı işlevi görür. Şekil 2.2'den görüleceği gibi her bir bölge kendi içinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılmış üç bölgeden (domain) oluşan sarmal yapıya benzemektedir (Wang ve ark., 2013).



Şekil 2.2. HSA'nın moleküler yapısı.

Var olan 17 sülfür köprüsü HSA'nın kararlı bir yapı olmasına büyük katkılar sağlarken aynı zamanda biyolojik kararlılığına da olumlu katkı yapmaktadır. IIA alt bölgesi IA ve IB bölgelerini birbirine bağlayan ara kesit ile oluşturduğu bağlantı hidrojen bağı ve hidrofik etkileşim üzerinden oluşmaktadır. Böylece ortaya çıkan yapı I ve II bölgelerinin birbirine dik bir şekilde yer aldığı T görünümündür. III. Bölge ise IIB alt bölgesi ile etkileşim içerisinde. I. ve III. bölge, IIIB ve IIIA gibi alt bölgeler ile oluşturulan bir yol yardımıyla ayrı tutulur ve sadece birkaç bağlantı noktası mevcuttur. Bölgeler birbiri ile bir takım benzeşimler içerse de her bölge yakınındaki bölgeler ile kendine has etkileşimler içerisindedir. Sonuçta I ve II bölgelerinin oryantasyonu II ve III bölgelerine kıyasla farklı çeşitlilikte bağlanma noktaları barındıran asimetrik bir yapı gösterir. HSA yapısı değişen pH değerlerinde geri dönüşümlü olabilen bir takım geçişler gösterir. HSA, pH değerinin 2.7'den düşük olduğu ortamlarda genişlemiş bir yapı halindedir. pH 2.7-4.3 arasında yüksek viskoziteli, düşük çözünürlüklü bir yapı arz eden hızlı geçişli olarak nitelendirilen bir F formuna sahiptir. pH 4.3-8.0 arasında ise N formu olarak bilinen Şekil 2.3'de gösterildiği gibi kalp şeklini alır. pH 8.0 değerinin üzerinde ise N formuna kıyasla bir takım ligandlara daha fazla afinite gösteren ve α heliks içermeyen B formuna dönüşür (Fanili ve ark., 2012).

Albüminin, plazma proteinlerinin çeşidine ve hedef bölgeye bağlı olmakla birlikte ilaçlara afinite göstermektedir. Bu özellik ilaçların terapötik amaçlı kullanımlarda albüminin önemini daha fazla ortaya çıkarmıştır. Yağ asitlerinin taşınmasında önemli bir yere sahiptir. Bunun yanısıra ozmotik kan basıncını oluşturur, organlar arasındaki sıvı dağılımını sağlar ve nitrik oksit depolar. HSA, suda çözünebilen, monomerik ve pozitif yüklü bir proteindir. Bununla birlikte yüksek oranda ligand bağlama kapasitesine sahip olup genel olarak spesifik olmayan karışık bir bağlanma özelliğine sahip bir taşıyıcıdır (Lambrinidis, Vallianatou ve Tsantili-Kakoulidou, 2015).

Albümin yanıkların, kan kayıplarının, biyolojik şok gibi maruziyetlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla beraber aşı gibi farmakolojik yapılar ve hücre kültürleri içerisinde de yer almaktadır. Bu ortamlarda diğer proteinlerin ve nükleik asitlerin biyodağılımı ve farmakokinetiği gibi etkileri arttırmak için albümin

kullanılmaktadır. Küçük moleküllerin taşınması ile birlikte kontrollü salım teknolojileri için in-vivo ölçekte kullanıma açıktır (Theodore ve Alan, 2013).

2.2. Plazma Fraksiyonlanması: Geleneksel ve Kromatografik Albümin Safılaştırma Yöntemleri

Yaklaşık 180 yıl önce Ansell vücuttaki bir çok fonksiyon için hayati bir protein olan albüminin özelliklerini oldukça doğru bir şekilde tanımladı ve Lancet dergisinde şöyle yazdı: “Albümin kuşkusuz hayvana yakın özelliklerden en önemlilerinden birisidir; sadece kan serumunda değil, birçok vücut sıvısında bazen asit bazen baz kombinasyonlarını koruma gücü o kadar büyüktür ki albümin oranları ve seviyeleri 20-80 yaşları arasında tüm yüksek hayvanlarda hemen hemen aynıdır” (Ansell, 1839).

HSA plazmada en bol bulunan proteinlerden birisidir ve immünoglobülinlerle birlikte tüm plazma proteinlerinin %80’ini oluşturur. HSA ayrıca tüm dokularda ve salgılarda bulunur. Osmotik kan basıncının sağlanması, pek çok endojen ve eksojen toksinin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin taşınması ve metabolizmasına yardımcı olmak gibi bazı in-vivo fizyolojik görevleri vardır (He ve Carter, 1992). Bu ürünler safra asitleri, bilirubin, uzun zincirli yağ asitleri, amino asitler (özellikle sistein, triptofan ve tirozin), hormonlar (aldosterone, kortizol, progesterone, testosterone), bakır, kalsiyum, klor, magnezyum, çinko gibi iyonlar ve ilaçlar gibi kimyasal olarak çok farklı moleküllerdir (Peters, 1985).

2.2.1. Plazma Fraksiyonlama Yöntemleri

Plazma fraksiyonlaması, Cohn ve arkadaşları tarafından büyük ölçekte protein saflaştırılması için yaklaşık 70 yıl önce geliştirilmiş ilk işlemdir (Cohn ve ark, 1946, 1950). Günümüzde de plazma protein fraksiyonlaması küresel terapötik protein üretiminde açık ara en büyük endüstri segmentidir (Curling, 2002). Kan, hem hücresel elementleri (alyuvarlar, plateletler, lenfositler) hem de plazmayı içeren eşsiz bir biyolojik malzemedir. Plazma yaklaşık 60 g/L protein içerir ve bunun 57 gramı pek çok terapötik ürün için kullanılmaktadır. Plazma proteinleri Çizelge 2.2’de özetlendiği gibi plazma proteinleri genellikle 1 mg/mL veya üstü

derişimlerde bulunmaktadırlar (Andrade ve Hlady, 1990). HSA, IgG, α -1-antitripsin, transferrin, IgA, haptoglobin, fibrinojen toplam plazma protein kütesinin %90'ını teşkil etmekte; HSA ve IgG tek başına %80'ine karşılık gelmektedir. Plazma proteinlerinin geniş derişim aralığı ayırma ve saflaştırma işlemlerinin güçlüğünü yansıtmaktadır. Çizelge 2.3, insan plazmasından sağlanan terapötik proteinleri ve dünya çapındaki üretici sayılarını göstermektedir (Robert, 2011). Her yıl 34 milyon litreden daha fazla plazmadan 500 tondan fazla HSA ve 40 tondan fazla intravenöz immünoglobülin (IVIg) üretilmektedir (Curling ve Bryant, 2005). Gelişmiş dünyada her milyon nüfus başına ortalama 200-400 kg HSA ve 20-40 kg IgG tüketimi gerçekleşmekte ve her yıl artış göstermektedir.

Çizelge 2.2. Derişimi 1 g/L'den büyük olan plazma proteinleri (Curling ve Bryant, 2005).

Protein	Plazma Derişimi (mg/mL)	Moleküler Ağırlık (kD)
Albümin	40.0	66.5
IgG	12.5	150
LDL	4.0	2000
HDL	3.0	170
α -Makroglobulin	2.7	725
Fibrinojen	3.0	340
Transferrin	2.3	77
α 1-Antitripsin	2.0	51
Haptoglobulinler	2.0	100
Komplement 3	1.6	180
IgA	1-4	150
IgM	0.05-2	900

Çizelge 2.3. Plazmadan elde edilen terapötik proteinler ve dünya çapında üretici sayıları.

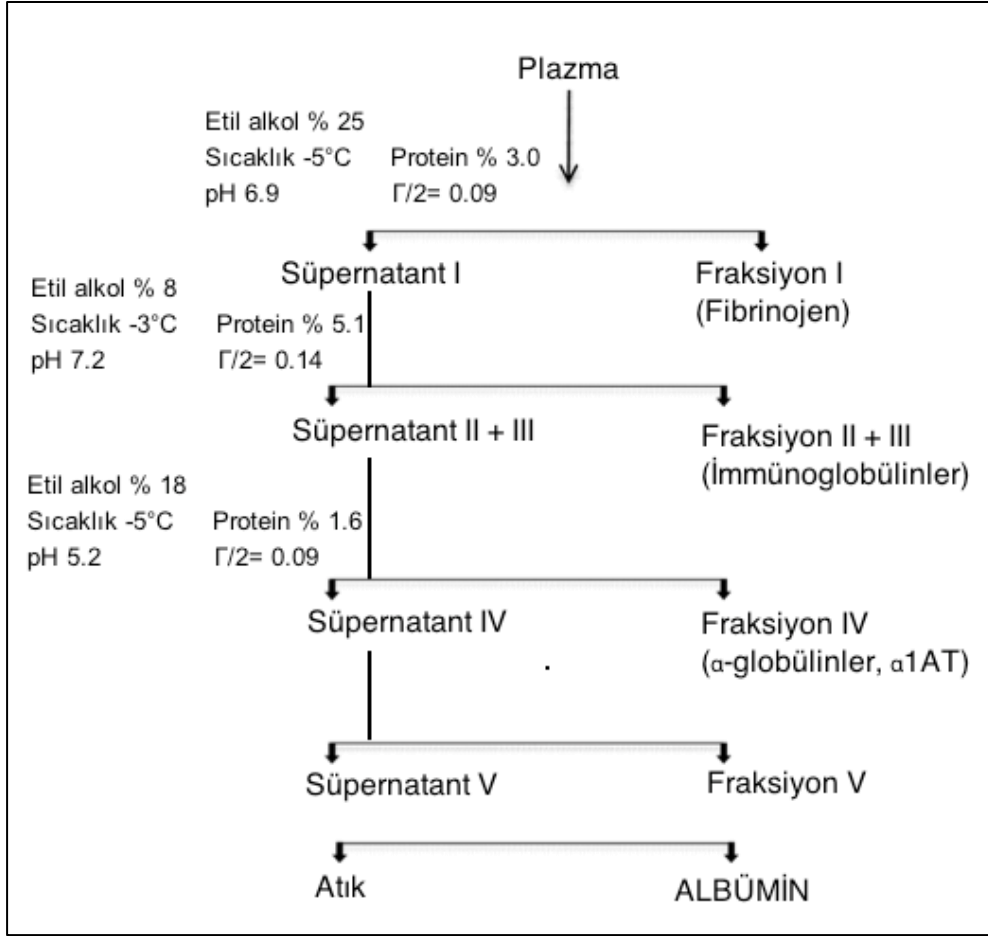
Albümin	> 20	Von Willebrandt faktör	6
İmmüoglobülin	> 20	Fibrinojen	6
Faktör VIII	>20	Trombin	3
Faktör IX	17	Fibrin	6
Faktör VII	3	Protrombin kompleksi	15
Faktör XIII	2	Antitrombin	15
Protein C	2	A1-Antitripsin	4
Aktive protein C	1	C1-Esteraz inhibitörü	2
Faktör VIIa	1	Haptoglobin	1
		Aktive protrombin kompleksi	1

Çizelge 2.3'de gösterilen terapötik ürünler plazmadan farklı yöntemlerle izole edilmektedir (Burnouf ve Radosevich, 2001). Serum veya plazmadan albümin elde edilmesi için üç klasik endüstriyel yöntem vardır: (i) etil alkol fraksiyonlaması (ii) ısı şoku (iii) kromatografi (Curling, 1980). Her biri %96 oranında elektroforetik olarak saf ürün sağlar. Geleneksel plazma fraksiyonlama yöntemleri etil alkol fraksiyonlamasına dayanmakla birlikte giderek daha fazla yöntem kromatografik basmak dahil olmaktadır (Burnouf, 1991-1998; Manuzza ve Montalto, 2010; Curling ve ark. 1977). Cohn yöntemi albümin için geliştirilmiştir ve doğal olarak yüksek verimde albümin elde edilmektedir.

2.2.2. Etil Alkol Fraksiyonlaması

Etil alkol fraksiyonlaması albümin üretimi için en yaygın yöntemdir (Buchacher ve Iberer, 2006). Etil alkol fraksiyonlama yöntemi proteinlerin etil alkol ve su karışımlarında farklı çözünürlüklerine dayalı ayırma biliminde eşsiz yöntemlerden birisidir. İkinci Dünya Savaşı sürecinde Cohn ve arkadaşları büyük ölçekli plazma fraksiyonları üretmek için bu yöntemi geliştirmişlerdir. Plazma proteinlerinin ayrılması için pH, iyonik şiddet, etil alkol içeriği ve sıcaklığa dayalı 5 aşamalı bir sistem geliştirmişlerdir (Şekil 2.3). En çok bulunan beş protein etil alkolün artan derişimi ile birlikte ardışık çöktürme ile Fraksiyon I-V'de zenginleştirilmişlerdir. Bu çalışmayı takiben HSA, 27 Ağustos 1941'de ilk defa lisanslanmıştır. Cohn

yönteminin değişkenleri Çizelge 2.4'te verilmiştir. Etil alkol derişimi ve pH derişimi ile birlikte her bir aşamada elde edilen proteinler Çizelge 2.5'te verilmiştir. Cohn yönteminin avantajı görece basit olmasıdır. Basit reaktifler kullanması ve güvenli olması kullanımının süregelmesini sağlamıştır. Cohn yönteminin işlem gereksinimleri, ürün gereksinimleri ve özelliklerini içeren bazı dezavantajları da vardır. Yöntemin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.6'da özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Cohn fraksiyonlama yöntemi (Stotz ve ark. 1990).

Çizelge 2.4. Cohn yönteminin değişkenleri (Curling 1982).

Değişken	Aralık
Etil alkol derişimi	% 8 – 40
pH	7.2 – 4.5
İyonik şiddet	0.14 – 0.01
Sıcaklık	-3 °C – -10 °C
Protein derişimi	% 5.1 – 0.8

Çizelge 2.5. Cohn fraksiyonlama sisteminde plazma proteinlerinin dağılımı (Curling, 1982).

Fraksiyon	Etil alkol (%)	pH	Proteinler
I	8-10	7.2	Fibrinojen, Faktör VIII, Fibronektin, C1q, C1r, C1s
II + III	25	6.9	IgG, IgA, IgM, Faktör II-VII-IX-X, globülinler
IV-1	18	5.2	α , β -globülinler, AT-III, α 1-antitripsin, IgM, complementler
IV-4	40	5.8	α , β -globülinler, transferrin, selüloplazmin, haptoglobin
V	40	4.8	Albümin, α - ve β - globülinler

Çizelge 2.6. Cohn sisteminin avantaj ve dezavantajları (Curling, 1982).

Avantajlar	Dezavantajlar
Etanol ucuz ve ulaşılabilir	2 L etil alkol /L plazma geri kazanılmalıdır
İşlemler ve ürün onaylanıp kabul edilmiştir	Soğutma sistemleri gereklidir
İşlemler bakteriyostatik koşullarda yürür	Soğuk alan ve soğutma tankları gerekir
Ürünler tarapötik kullanım için güvenlidir	Protein denatürasyonu olur (örn. IgG)
İşlem teknolojisi kesikli/sürekli mümkündür	Protein kayıpları gerçekleşir
Büyük ölçek üretime uygundur	Küçük ölçek üretime uygun değildir
Yaygın kullanıma sahiptir	Yüksek kalite başlangıç materyali gerekir

2.2.3. Isı Şoku ile Saflaştırma

Diğer plazma proteinlerine göre albüminin termal kararlılığı ısı şoku ile saflaştırılmasına olanak verir (Burnouf, 1998). Albümin kolaylıkla denatüre olmaz ve albümin çözeltileri potansiyel patojenlerin inaktive edilmesi için güvenle 60 °C'ye kadar ısıtılabilir (Rothschild ve ark. 1988). 0.04 M kaprilik asit ile stabilize edildiğinde albümin pH 5'te 60 °C'ye ayarlanmış serumdan geri kazanılabilir. Diğer serum proteinleri denatüre olmuşlardır ve bu koşullar altında çözünmezdirler. Toplanan albümin ultrafiltrasyon veya çöktürme ile deriştirilebilir. Tipik olarak ısı şoku ile elde edilen albüminin saflığı %98'den yüksektir.

2.2.4. Kromatografi

Etil alkol fraksiyonlaması kan proteinleri için en eski fraksiyonlama yöntemi olmakla birlikte yeterli saflıkta albümin elde edilemez (Stotz ve ark. 1990). Tüm saflaştırma yöntemleri içerisinde işlemde kaynaklı albümin heterojenitesini azaltmak için en uygun aday kromatografidir. Albümin saflaştırılması için çok çeşitli kromatografik yöntemler kullanılabilir. Oldukça spesifik moleküler tanıma tanıma temeline dayalı olan afinite kromatografisi bu yöntemler arasında protein saflaştırma için kuşkusuz en geniş uygulama bulandır. Son birkaç on yılda saflaştırma işleminin seçiciliği, özgünlüğü, tekrar kullanılabilirliği, ekonomisi, ürün geri kazanımı ve depolama anlamında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu da yeni afinite yaklaşımlarıyla bağlantılı yeni ligand ve adsorbentlerin geliştirilmesiyle mümkün olmuştur. Maliyet problemi dikkate alındığında biyospesifik afinite yönteminin yüksek maliyetini düşürmek güçtür ve daha ucuz grup-spesifik afinite ligandlarının kullanımı iyi bir alternatif olabilir.

2.2.5 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi makromoleküllerin tanımlanmasında, ayrıştırılması ve saflaştırılmasında sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem içeriğinde molekülü tanımaya özgü ligand adı verilen birim, bu birimin sabitlendiği polimerik malzeme veya zar formunda destekleyici unsur olan matriks yapısı mevcuttur. Uygun koşullar altında kromatografik kolondan geçirilen hedef molekül matrikse sabitlenmiş ligand tarafından yakalanarak adsorplanmış olur. Daha sonra hedef molekül uygun desorpsiyon koşulları altında çözücüler ile yıkanarak ilk haline geri getirilir.

Afinite kromatografisi protein ve proteinin bağlanabileceği bir ligand arasında gerçekleşen tersinir bir etkileşime dayanan biyokimyasal ayrıştırma tekniğidir. Ayırma işlemleri yıllar içerisinde özgüllük, seçicilik, tekrarlanabilirlik, ekonomi, depolama, rejenerasyon gibi kavramların gelişimi ile ligandların değişim seyri içinde ilerleme kaydetmiştir. Bu da afinite tekniklerinin gelişimini sağlayarak yeni bağlanma ve beraberinde sabitleme işlemleri tasarlanmıştır. Ayrıştırma işlemlerinde yüksek verim ve saflık elde edilirken dikkat edilecek hususlardan biri de ligandın bağlı olduğu matriks yapısıdır. Bir karışım içerisinde düşük yoğunlukta proteinlerin ayrıştırılmasında etkin bir ayırma yöntemi olarak manyetik

kürecikler kullanılabilir. Bu manyetik tabanlı teknoloji basit, hızlı, dayanıklı ve ucuzdur. Bu manyetik kürecikler hazırlanırken ligandın sabitleneceği agaroz veya polimerik bir malzemeye hapsedilerek işlem yapılır. Protein ve ligandın etkileşmesi sonucunda ve bir manyetik alan varlığında ayırma hızlı bir şekilde yapılmış olur (Ayyar ve ark., 2012).

2.4. Boya Ligandlar

Afinite kromatografisinde boya-ligandlar önemli bir yere sahiptir. Özellikle proteinlerle birçok şekilde bağlanma özelliği olduğundan boya-ligandların bu alandaki değeri artmaktadır. Kolay immobilize olması (takılması), ucuz ve ulaşılabilir olması önemli özelliklerine katkı sağlayan unsurlar arasındadır. Boyalar, ligand olarak vasıflandırılmaktadır. Bunun sebebi kofaktörler, substratlar ve bağlanma ajanları ile yapabildikleri etkileşmelerden dolayıdır. Bu boyalar çoğunlukla reaktif gruplara bağlanabilen renk veren yapılar iktiva eder.

Boya ligandlar ve proteinler arasındaki etkileşme elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağı şeklindedir. Boya afinite sistemlerinin önemli temel unsurlarından birisi destek matriksin seçimidir. Boya moleküllerini destek matrikse immobilize etmenin çeşitli yöntemleri vardır ama ilk başta adsorpsiyon ve desorpsiyon yöntemleri birbirinden iyi bir şekilde ayırt edilip optimize edilmelidir. Boya afinite sistemleri, özellikle protein ayrılmasında kullanılan sorbentler küresel yapılı adsorbentler veya afinite membranlardır. Moleküllerin yüksek oranda tanımlanmasında, ayrılmasında ve saflaştırılmasında afinite kromatografisi iyi bilinen bir yöntemdir. Kromatografik yöntemlerin çoğu albüminin saflaştırılması için kullanılmıştır. İlerleyen süreçler içinde seçicilik, özgünlük, tekrar kullanım gibi birçok konuda önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Boya ligandlarda bulunan reaktif boyalar proteinlerin aktif birimleriyle spesifik bir etkileşme veya geniş bir aralıkta spesifik olmayan etkileşme yapabilirler. Bu süreçte etkin bir şekilde etkileşmeler olması matriks tipi, ligand derişimi, kolon geometrisi, yıkama işlemi, etkileşme hızı gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu anlamda boya ligand kromatografi ekonomik ve geniş kullanıma sahip olması, kolay immobilize olması, yüksek kapasite içermesi, kolay çoğaltılabilmesi, tekrar kullanılabilmesi, bir aktivite kaybı olmadan adsorbentlerin depolanabilmesi,

biyolojik ve kimyasal ataklara karşı kararlı olması gibi özelliklerinden dolayı önemli bir yere sahiptir (Boyer ve Hsu, 1993).

Ligandların immobilizasyonunda kullanılacak ideal bir matriksin yapısı sabit, hidrofilik, kimyasal ve fiziksel olarak tutarlı ve seçici, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olmalıdır. Bunun yanısıra minimum düzeyde spesifik olmayan etkileşme yapmalıdır (Denizli, 2011).

Çoğu ligandın üretim ve saflaştırma aşamalarındaki maliyetlerin yanısıra biyolojik örneklerle özgü matriks ile birlikte sabitlenilmesindeki güçlükler dikkate alındığında boya ligandlar önemli avantajlar sağlamaktadır. Proteinlere bağlanmasının yanısıra birçok biyolojik moleküle bağlanabilen boya ligandların ulaşılabilir olması ve maliyet düşüklüğü önemli özelliklerindedir. Bununla beraber eğer matriks hidroksil grup barındırıyorrsa boya ligandın sabitlenmesi daha kolay olabilmektedir. Biyolojik örneklerde bulunan bağlanma noktalarına uygun bir özellik göstererek etkileşmeleri rahatça yapabilmektedirler. Bu anlamda afinite ligandı olarak da düşünülebilmektedir (Denizli ve Pişkin, 2001).

Boyalar ile proteinler arasındaki etkileşmelerin anlaşılması için X ışınları kristallografi, afinite işaretleme tekniği, kinetik çalışmalar ve farklı spektroskopik yöntemler kullanılmış olup bu etkileşimlerden doğan kompleks yapının tanımlanmasında aradaki kuvvetlerin anlaşılmasında önemli yol kat edilmiştir (Lowe ve ark., 1992).

Protein saflaştırmasında afinite ligandları olarak kullanılan reaktif boyaların avantajları arasında ekonomik ve geniş bir kullanımının olması, kolay bir şekilde takılması, yüksek kapasite, matriks aktivasyonunda kullanılan bir takım toksik kimyasalların elimine edilmesi, matriksin kayıp olmaksızın depolanması, tekrar kullanımlara karşı dayanıklı olması, farklı ölçeklendirme yapılabilmesi gibi etmenler sayılabilir (Denizli, 2011).

Spesifik moleküler tanıma açısından eşsiz olan afinite kromatografisi proteinleri tanıma açısından geniş bir kullanım alanına sahiptir. Saflaştırma işlemlerinde, özellikle seçicilik, özgüllük ve ekonomiklik gibi özellikler açısından önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişim yeni ligand ve absorbent tasarımında önemli adımlar atılmasını sağlamıştır. Çizelge 2.7'de görüldüğü üzere biyospesifik afinite

kromatografisi maliyeti açısından diğer teniklere göre daha yüksek olurken seçicilik bakımından yüksek bir verime sahiptir (Denizli, 2011).

Çizelge 2.7. Farklı kromatografi tekniklerinin karşılaştırılması.

Özellik	Biyosifesifik Afinite	Grup Spesifik Afinite	İyon değişimi	Hidrofobik Etkileşim
Adsorpsiyon kapasitesi	Düşük	Orta/Yüksek	Yüksek	Orta/Yüksek
Seçicilik	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük/Orta	Düşük/Orta
Geri kazanım	Orta	Yüksek	Yüksek	Orta
Yükleme	Yavaş	Yavaş	Yavaş	Bazen sert
Sağım	Sert	Yavaş	Yavaş	Yavaş
Rejenerasyon	Yetersiz	Yeterli	Yeterli	Yetersiz
Maliyet	Fazla	Düşük	Düşük	Düşük

Etil alkol ayırma tekniği 1940'ların başlarında plazmadan albümin ve globülin gibi temel yapı elementlerini ayırmada kullanılsa da halen temel tekniklerden birisidir. Çoğu endüstriyel işlemden plazma albümin ayrıştırılırken afinite kromatografi derişimin yüksek olması sebebiyle kullanılmaz. Bunun yerine albüminin doğrudan yakalanması yolu tercih edilir. Boya molekülleri özellikle Cibacron Blue F3GA, monoklorotriazin reaktif grubuna katılarak çok verimli sonuçlar alınmıştır (Burnouf ve Radosevich, 2001).

2.4.1. Boya Ligandların Kimyasal Yapısı

Triazin boyaların yapısına bakıldığında birimlerden biri rengi veren yapı olan kromofor ve diğer ise yapıya kovalent bağlatıyı sağlayan aktif birimdir. Reaktif birimin en iyi bilinen hali siyanürük klorür'dür (1,3,5-trikloro-sym-triazin). Yüksek bir reaktivite gösteren siyanürük klorür karbon atomlarının halkasındaki elektronların eksikliğinden ve karbon klorürü bağının polarizasyonundan oluşmaktadır. Diklorotriazinil boyaları pH 5-6 ve 0-5°C'de 0.5-1 saat süreyle amin

içeren kromoforların yoğunlaştırılmasıyla hazırlanmaktadır. Burada bulunan kromofor yapı, bağlanabilmeyi sağlayacak bir amino grubu ve su bazlı yapılar içinde çözünürlüğü oluşturacak sülfonik grup ihtiva etmelidir. Monoklorotriazinil boyalar ise, pH 6-8 ve 25-40°C'de bir diklorotriazinil boyanın triazinil halkasının ikinci klorun bir klor alkoksi, ariloksi, amino veya arilamino grubu ile arasındaki değişimi sonucunda oluşturulur. Genelde ticari boyalar, antrakinon, azo ve/veya ftalosiyanın kromoforları ihtiva etmektedir. Antrakinon kullanıldığı için yapı içerisinde mavi renk baskın olurken ftalosiyanın ise parlak turkuaz rengini oluşturur. Bu yapılar azo içerikleri ile eşleştiklerinde renk yeşil hal almaktadır (Labrou ve Clonis, 2002).

Biyomimetik boya olarak adlandırılan boyalar proteinler ile etkileşmesinin daha verimli hale gelebilmesi için dizayn edilmiş yapılardır. Bu yapılar modifikasyon geçirmemiş olup daha spesifik durum içerisinde dirler. Bu konsept ilk olarak 1980 yıllarında Lowe'un öncülüğünde başarılı bir şekilde uygulamaya konmuş ve diğer bilim insanları tarafından enzimlerin geri kazanımında uygulanmıştır. Çalışmalar biyomimetik boyaların protein saflaştırılmasında kullanımına olanak sağlamış ve böylece ilk olarak katyonik sarı ve anyonik mavi biyomimeteik boyalar oluşmuştur (Clonis ve ark., 2000).

İlk kullanım olarak kimotripsinin yapısından tripsin yapısını ayırtmak için kullanılan biyomimetik boyalar diaminometilbenzen grubu yoluyla benzamidini klorotriazin halkası ile ilişkilendirilerek oluşturulmuştur (Bode ve Schwager, 1975). Biyoteknolojinin gelişimi ve moleküler modellemelerin ivme kazanması neticesinde biyomimetik boya ligandlarda yeni tasarımlar oluşturulmuştur. Bunlar içinde bir çok protein ile bağ yapabilen Cibacron Blue 3GA veya F3GA örnek gösterilebilir (Labrou ve Clonis, 1995).

2.5. Proteinler ve Boya Ligandlar Arasındaki Etkileşimler

Proteinlerin yapısı içerisinde olan hidrofobik, iyonik ve polar gruplar stereokimyasal bir oluşum sonucu proteinin bağlanma özelliğini kazandırır ve beraberinde yüksek oranda esnekliği sağlarlar. Boya ligandlar kovalent olmayan bağlar yaparak proteinler ile özel ve sık bir etkileşimde olurlar. Çoğu kinetik çalışmalarda doğal ligand yapıları için bağlanma bölgeleri yoluyla enzimler ile etkileşmeleri görülmüştür (Wilson, 1976; Lowe ve ark., 1981; Clonis ve Lowe,

1981). Triazin boyalar indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH), indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NAD), lavinler, nükleotit monofosfat, nükleotit difosfatlar ve nükleotit trifosfatlar gibi doğal yapıları taklit ederler (Kaminska ve ark., 1999).

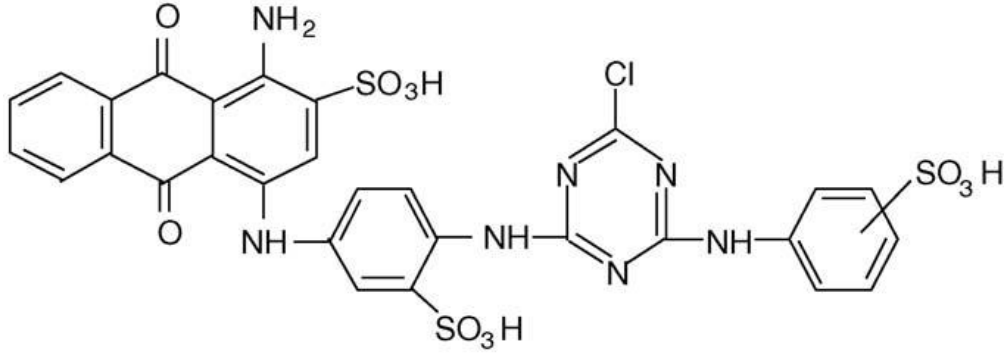
Fourier transform infrared spektrofotometresi (FTIR), elektron spin rezonans spektrometrisi (ESR), circular dichroism (CD), nükleer manyetik rezonans (NMR), ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi (UV Visible) gibi spektrofotometrik yöntemler kullanarak boyalar ile proteinler arasındaki etkileşimler daha iyi anlaşılmuştur. Bu anlaşılmalar göstermiştir ki, boyalar ve biyolojik birimlerden biri olan örneğin enzimler arasındaki etkileşim hidrofobik ve elektrostatik kuvvetlerin birleşimi olabilmektedir. Bu etkileşmeler ile birlikte enzimler ile bağlanmaları sağlayan boyalar üzerindeki benzen sülfanot halkalarının ve antrakininin önemidir. Moleküler modellemelerin gelişmesi yoluyla Cibacron Blue F3GA ve NAD arasındaki benzerlik kabaca gözlenmiştir. Bu benzerlik özellikle planar halkalar ile negatif gruplar arasındadır. Cibacron Blue F3GA özellikle protein bağlayıcılar için önemli bir boya ligand olarak kendini göstermektedir. Sonuç olarak, proteinler ve boya ligandlar arasındaki etkileşmeler baktığımızda ortaya çıkan sonuçlar, boya ligandlar ve bazı protein yapılarının bağlanması yapılarının aktif noktalarından yapılmaktadır ama bazı durumlarda boya ligand yapıları proteinler adsorplayabilmektedir. Bu da aslında ligandların proteinin diğer kısımları ile etkileşmesinde olanak sağlayabilmektedir. Bir çok proteinler, hidrofobik olarak, hidrojen bağı ile veya elektrostatik etkiyle, yük transferi yolu ile ve bunların karışımı yoluyla bağ yapabilmekte bu ise boyaların yapısı ile uyum gösterebilmektedir (Denizli ve Pişkin, 2001).

2.6. Cibacron Blue F3GA

Protein saflaştırma yöntemlerinden biri olan boya ligand kromatografisi kayda değer güçlü bir teknik olarak kendini göstermektedir. Bunun temel sebeplerinden sayabileceğimiz bir etki ise triazin boyaların matriks bileşenleri ve diğer birimler ile yapmış olduğu bağların sağladığı önemli avantajları olduğunu söyleyebiliriz. Bunlar, boyanın ucuz, basit, hızlı, toksik bileşen içermeyen bunun yanı sıra boya-ligand absorbentlerin biyolojik olarak çözülebilir olması örnek verilebilir.

Proteinler ile çeşitli bağlar yapabildiğinden dolayı boya ligandları içinde Cibocron Blue F3GA (CBF3GA) önemli bir yer sahiptir. CBF3GA molekülü hidrofobik bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla protein yapısındaki polar olmayan yüzeylerle bir etkileşime girebilmektedir bunun yanısıra CBF3GA, bir çok biyolojik yapının fosfatının karakteristik oryantasyonunu ve anyonik gruplarını taklit eden bir yapıya sahiptir. CBF3GA, negatif yüklü sülfonat aromatik halkaları sebebiyle boyalar proteinlerle elektrostatik etkileşme içinde katyon değişim yapabilirler. Boyalar kullanılan matriksler ile kovalent bir çift oluşturduklarından kolayca çözülemez bir yapı oluştururlar. Genellikle boya ve protein arasındaki bağlanma elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler üzerinden oluşabilmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki, proteinlerin bağlanma kapasiteleri iyonik gücün artmasıyla birlikte azalmış ve böylece elektrostatik etkileşmeler önem kazanmıştır. BSA ve CBF3GA BSA'nın izoelektrik noktasından daha büyük pH değerlerinde negatif yük taşırlar. İyonik kuvvetin artmasıyla BSA ve CBF3GA arasındaki itme kuvveti zayıflar ve böylece BSA adsorpsiyonu artar (Zhang ve Sun, 2001).

Kimyasal yapısı Şekil 2.4'de gösterilen Cibacron Blue molekülünün proteinlerle etkileşime girdiği aktif grupları NH, NH₂ ve SO₃H gruplarıdır. Cibacron Blue molekülü herhangi bir biyokimyasal yan etkiye sahip değildir. Fakat çoğu ticari boyalar biyokimyasal ve buna bağlı olarak yan etkilere sahiptir. Dolayısıyla bu tür boyaların çeşitli kromatografik teknikler ile saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırılmış boya kullanımı sadece saf olarak boya kullanımları için gereklidir bununla beraber eğer boya takılı bir şekilde kullanılacaksa bu tür saflaştırma gerekli değildir. Çünkü çok az safsızlık destek materyaline geçecek ve bunlarda yıkama işleminde uzaklaştırılmış olacaklardır. Cibacron Blue birçok protein ile denüklotid bağlanma bölgeleri üzerinden etkileşimde olur. Fakat HSA gibi denüklotid bağlanma bölgesi olmayan proteinler de Cibacron Blue ile etkileşebilmektedir (Yavuz ve ark., 2003). Cibacron Blue ile albümin etkileşmeler üzerinde çeşitli önermeler olmakla beraber bilribün bağlanma noktaları ile uyumlu olduğu söylenir. Bununla beraber Cibacron Blue ve bilribün arasında yapısal benzerlik dikkat çekicidir. İki molekül de planar aromatik halkaya sahip ve negatif grupların pozisyonları konumsal benzerlik göstermektedir (Leatherbarrow ve Dean, 1980).



Şekil 2.4. Cibacron Blue F3GA'nın kimyasal yapısı.

2.7. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Matriks Seçimi

Afinite kromatografisinde destek malzemeleri olan matriks yapıları seçimi önem arz etmektedir. Matriks liganda destek sağlayan bir etkisi vardır. İdeal bir matriks tekdüze, büyük gözenekli, suyu seven (hidrofilik), kimyasal ve mekanik olarak sabit, seçici, özel bağlanmalardan uzak, çözücü içinde çözülmeyen ve liganda bağlanmak için geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Ligand-matriks bağlanımını sağlayan birçok yapı çifti vardır. Bunlar genelde amin, sülfidil, aldehit, hidroksil ve kabroksi asit içeren yapılardır. Afinite kromatografisinde matriksler doğal, sentetik ve inorganik olmak üzere üç grupta incelenirler. Agaroz, dekstroz ve selüloz yapılar genellikle doğal olarak kullanılan matrikslerdir. Akrilamid, polistiren ve polimetakrilatın türevleri sentetik ve son olarakta gözenekli silika ve cam inorganik matriksler olarak söylenebilmektedir (Ayyar ve ark., 2012).

Matrikslerin yüksek gözenekli yapıda olması ligandların immobilizasyonunu arttırarak bağlanma kapasitelerini artışımlı olurlar. Çoğunlukla hedef veya ligandlar büyük moleküler yapıda olduğundan gözeneklerin büyük olması olmalıdır. Gözeneklilik ayrıştırma sırasında hedef molekülün kolay bir şekilde difüz etmesi etkileşimi hızlandırıcı bir etki yapmaktadır. Matriks yapıları değişken pH, sıcaklık gibi ve de organik, uyarıcı çözücülere karşı kimyasal ve fiziksel olarak kararlı olması gerekmektedir. Matriksin hidrofilik yapısı istenmeyen spesifik olmayan bağlanmaları azalttığı gibi sulu ortamda şişerek önceki durumuna göre daha fazla gözenekli yapı halini almasına imkan verir (Denizli ve Pişkin, 2001).

2.8. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Ligand Seçimi

Ligandlar afinite kromatografisinde özgünlük ve dayanıklılık noktasında önemli bir yere sahiptir. Protein ayrıştırma çalışmalarında birçok ligand bu anlamda çalışılarak geliştirilmiştir. Genel olarak ligandların karakteristiklerine bakıldığında hedef yapıyla çekimi, bağlanma kapasitesi, özgünlüğü, sabitlenmeye olan uygunluk, yıkanma esansında bağlanma dayanıklılığı gibi gösterilebilir. Ligandlarda sterik engellemeleri önlemek için genellikle ligandın yönlendirmek daha iyi bir bağlanma için gereklidir (Ayyar ve Arora, 2012).

Afinite ligandları çok geniş bir ölçekte bağlanma etkileşimleri gösterirler. Bunlar protein, enzim, antijen, DNA veya RNA, boyalar, enzim substratları veya inhibitörleri, ilaç ve hormonlar şeklinde sıralanabilir. Afinite kromatografisinde ligandın sabitlenmesi önemli bir işlemdir. Bu teknikte kullanılan bir çok ligand enzim, antibadi, protein ve karbonhidrat bağlı proteinlerden sağlanır. Bunun yanısıra metal iyon şelatları, boronatlar ve boyalar olarak bilinen sentetik ligandlar da kullanılmaktadır (Hage ve ark., 2012).

Ligandların geneline baktığımızda iki şekilde gruplandırma yapabiliriz. Monospesifik ve bir diğeri grupspesifik olandır. Monospesifik olan ligandlar vücut sıvısı içerisinde bulunan düşük miktarda proteinin yapıya bağlanması olarak bilinir. Bu bağlanma çoğunlukla spesifik olmayan bağlanma çeşidi içindedir. Bu bağlanma ligand ile etkileşimden veya uzatıcı koldan kaynaklanıyor olabilir. Bir diğeri ligand çeşidi olan grupspesifik ligandlar, biyomimetik boyalar, vitaminler ve aminoasitlerinde içinde olduğu geniş bir ölçekte yer alan ligand grubudur. Bu grup içinde bulunan yüksek mol kütleyle sahip olan ligandlar basit bir şekilde immobilizasyon yapabilirler. Yapılar arasında etkileşmelerin azalması durumunda matriksten ayrılmamayı sağlayan kovalent bağ aracılığı ile bir fonksiyon üzerinden türevlendirme yapılır. Bağlanan yapı eğer protein ise bu bağlanmalar birçok noktadan olabilmektedir. Düşük mol kütleyle sahip ligandların etkileşimlerini artırmak için içeriğinde hidrokarbon zincirleri barındıran fonksiyonel grupların oluşturduğu uzatıcı kol birimleri oluşturulabilmektedir. Bu uzatıcı kolun bir tarafı matriks yapısına bağlanırken diğeri tarafı ise liganda bağlanarak iletişim kurarlar. Uzatıcı kolların etkileşem yapan kısımları karboksil (-COO) veya amino

(-NH₂) kısımlarıdır. Kimyasal olarak yapı özelliklerine baktığımızda spesifik olmayan etkileşimler yapabilme potansiyeli barındıran hidrofobik ve polipeptit yapılı hidrofilik özellikleri mevcuttur. Bunun yanısıra uzatıcı birimlerin boyu etkileşimlerde önemli rol oynar. Uzun bir kol spesifik olmayan etkileşimler yapma ihtimaline sahip olabilirler. Yaygın olarak var olan uzatıcı birimler 6-aminohekzonik asit [H₂N-(CH₂)-COOH], hekzaetilen diamin [H₂N-(CH₂)-NH₂] ve 1,7-diamino-4-azoheptan'dır (3,3-diamino dipropilamin) (Öncel, 2004).

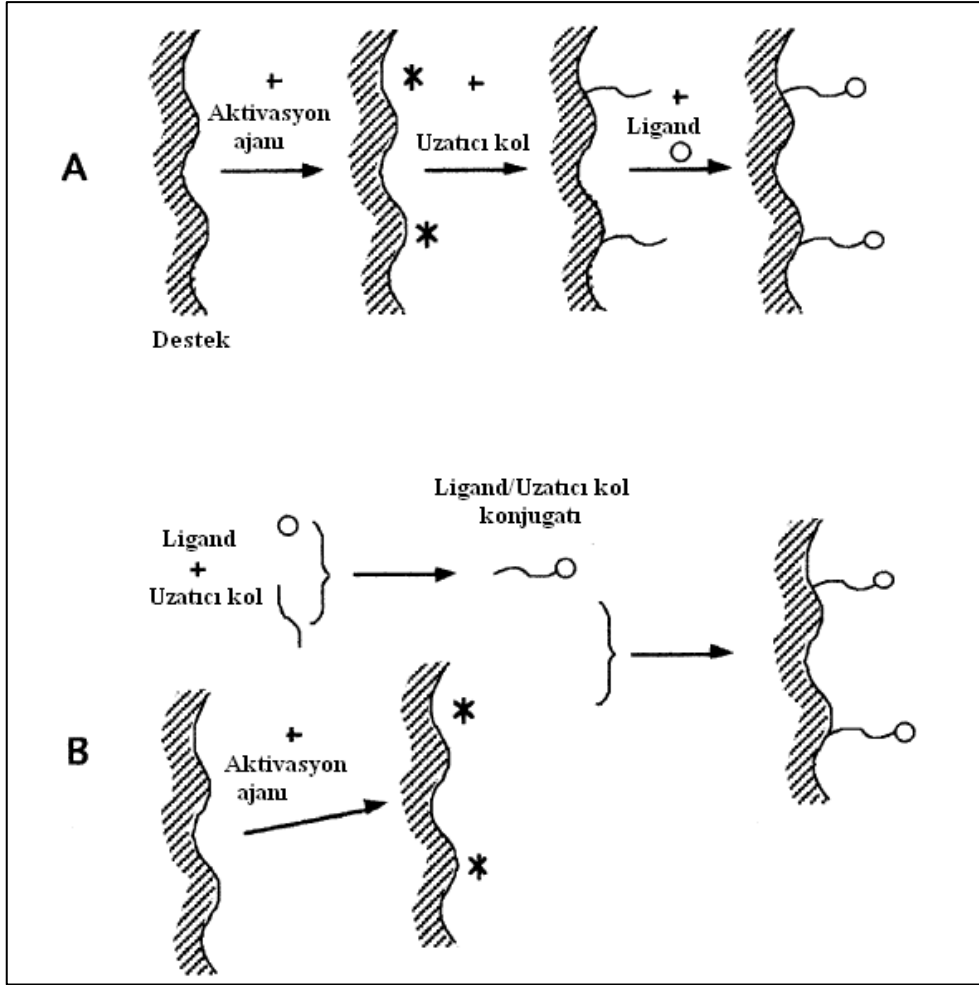
Proteinlerin saflaştırma ve ayırma işlemlerinde, bu yapıya ve buna ilişkin fonksiyonlara özgün ligand geliştirilmesi uygulamaları mevcuttur. Bunun için proteinlerin bağlanma bölgeleri yapısal bilgisi üzerinden yararlanılarak yapılmaktadır. Bu bölge aktif bir bölge olarak çözülebildiği çözelti içinde etkileşebilen bölge olabildiği gibi tamamlayıcı bir yapı arz eden bölge de olabilir. Özellikle proteinler ile bir etkileşim söz konusu ise iki önemli unsur vardır. Ligand tasarımının yapılırken düzenlemenin iyi yapılması ve bağlanmayı oluşturan afinitenin doğru bir şekilde belirlenmesidir. Protein yapısına bağlı ligand tasarımlar yapılırken temel fikir anahtar-kilit gibi teoriler varken bunlar daha gelişerek protein ve ligand yapıların esnekliği üzerinden şekillenmiştir.

Eğer proteinin üç boyutlu yapısı hakkında bilgimiz yoksa fakat ligand bazı özellikleri biliniyorsa bir takım tasarımlar yapılabilir. Ligandın bu özellikleri öncelikle uygun moleküler yapı içerikli olmasıdır. Örnek vermek gerekirse Cibacron Blue F3GA yapısı enzimlerin sahip olduğu nükleotid birimi ile iyonik ve hidrofobik özellikler bakımından uyumlu olduğundan etkin bir şekilde etkileşim yapabilmektedir. Ligandın işlevsel birimlere sahip olması proteinlerin yanısıra birçok yapının saflaştırılmasında kullanılabilir. Cibacron Blue F3GA benzeri ticari tekstil boyaları maliyetlerinin düşük olması, kolay elde edilebilir olması, sabitlemede gösterdikleri kolaylıklar bir diğer tercih sebebinin oluşturmuştur (Andaç ve ark., 2014).

2.9. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Ligandların Matriks Yapılarına Bağlanması

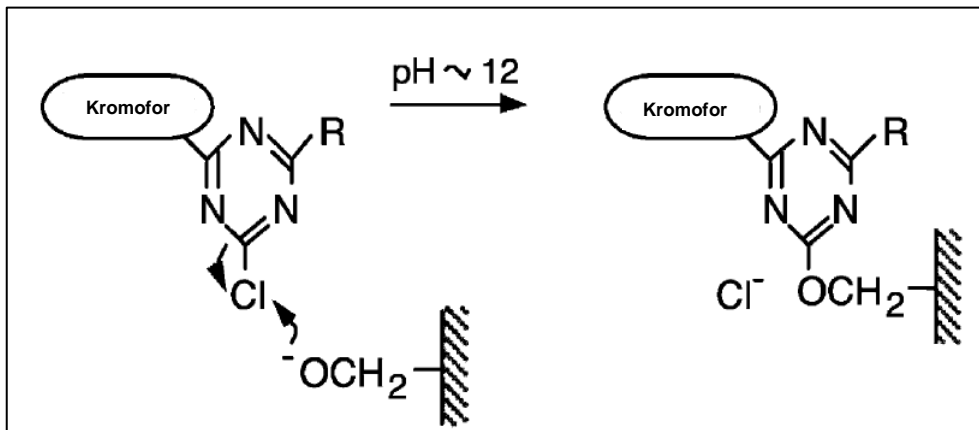
Ligandların destek matrikslerine bağlanması için bilinen birkaç yöntem mevcuttur. İyi bir şekilde bağlanmayı gerçekleştirebilmek ligand ve matriksin uygun bir çift oluşturan yönetmin ve bu oluşturan koşulların iyi belirlenmesini gerektirir. Hedef molekül ile sabitlenmiş ligand arasında etkileşmeleri en az bir durumda sağlamak için sabitlenme işlemi bir kritik bölge üzerinden yapılmalıdır. Deneyin yapıldığı koşullar ve bunun için kullanılan kimyasal ajanlar ligand moleküllerinin bozulmasına sebep olacağı için özenli davranılmalıdır. Moleküllerin üç boyutlu yapısına baktığımızda bu yapıların etkileşmeleri yapabilen bölgeleri olan aktif bölgeleri çoğunlukla iç bölgelerde yer almaktadır ve böylece bu durum hedef molekül ile ligand arasında bir takım engeller oluşturabilmektedir. Böyle durumlar için kısa alkali zincirli uzatıcı kol yardımıyla hedefe ulaşmanın kolaylığını sağlamak için ligand ve matriks yapıları arasına yerleştirilebilir. İlgili yönteme ilişkin şematik gösterim Şekil 2.5’de verilmiştir. Bu şekilde baktığımızda öncelikle aktivasyon ajanı yardım etkileştirilen matrikse kovalent bağ ile aktif noktalardan uzatıcı kol bağlanır ve böylece ligand uzatıcı kolun boşta kalan kısmına ulaşarak etkileşme yapar. Diğer bir durumda ise ligand ve uzatıcı kol çift oluşturacak şekilde sentezlenmesinin ardından matrikse bağlanır. Her iki bağlanma türlerinde de tekrar kullanımları düşünerek kararlılık önem arz etmektedir. Matriksler üzerinde bulunan reaktif grupların bir parçacı olan hidroksil grupları ve triazinil gruplarındaki Cl veya F yapıları ile etkileşmesi sonucunda boyalar matrikslere bağlanırlar. Buradaki bağlanma hidroksil grupları üzerinden gerçekleşmesi güvenli, ucuz ve basit bir yöntemdir. Bağlanma, boya moleküllerinde bulunan klor atomları ile matriks yapılarında bulunan hidroksil birimlerinin alkali bir ortamda yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Matriks yapılarının hidroksil birimleri artan pH değerleri altında iyonlaşarak bu yer değişmeyi oluştururlar. Şekil 2.6’de bu bağlanma gösterilmektedir. pH değerinin 12’nin üstü değerlerinde klorotriazin yapıların hidroliz olmasına neden olduğundan bu değerlerde bir ortam koşulları yaratılmamalıdır. pH değeri 10 – 11’de ve %2 değerinde boya içerikli bir ortamda matriks bekletilirse, matriksin hidroksil birimleri ile reaktif boyalar bağlanma yapabilirler. Benzer şekilde bir tuz çözeltisi de ilave etmek istersek %2’lik bir miktar ortam içinde olabilir ve bu da matriks yüzeyinde boya moleküllerinin daha

iyi tutulmasına ve hidrolizine imkân vermiş olur. Örneğin Cibacron Blue ve Procion H serileri gibi monoklorotriazin boyalar için bağlanma oda sıcaklığında pH değeri 10-12 arasında 2-3 gün içerisinde gerçekleşir. Buna karşılık Procion MX serileri gibi diklorotriazin boyalar reaktifliklerinin yüksek olması sebebiyle benzer durum altında bağlanma süreleri 1-2 saat dolaylarında olur. Monoklorotriazin boyalar ile bu sürede gerçekleştirmek istediğimizde sıcaklığı 80-90°C gibi değerlerde tutmalıyız. Bağlanmayı takip eden süre içerisinde istenmeyen veya kovalent bir şekilde bağ yapmayan bağlanmaları ortamdan ayrı tutmak için öncelikle su yardımıyla sonrasında ise 1M NaCl, etilen glikol, %20'lik etanol karışımı su gibi çözücülerle yıkama yapılmalıdır. Daha sonra pH düzeyi 8-9 civarında olan %25 etanol ve %0.02 sodyum azid içerikli bakteri öncleyici bir ortamda bağlanma gerçekleştirilmiş matriks yapı saklanmalıdır. Bağlanmalarda önemli olan bir diğer nokta kullanılacak olan boyanın saflığıdır. Tekstil boyalar genellikle fosfor, NaCl ve dodesiyalinbenzen gibi bir takım ajanlar barındırmaktadır. Bu ajanlar boyaların afinite ligandı olarak kullanırken özelliklerinde etki yapacağı ve bunun da bağlanmayı etkileyeceğinden dolayı bu tür yapıların çeşitli teknikler kullanarak uzaklaştırılması gerekir (Denizli ve Pişkin, 2001).



Şekil 2.5. Matriks ile ligand arasındaki bağlanma yöntemleri.

A) Uzatici kol ile B) Ligand ve uzatici kol çifti.



Şekil 2.6. Triazin boyanın matriksin hidroksil grubuna bağlanması.

2.10. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Adsorpsiyon

Boya ligand yapıları çözeltiler içerisinde genellikle antibakteriyel bir ortamda bulunurlar. Çözeltiler kromatografik kolondan geçirilmeden önce oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla dengeleyici tamponlar yardımıyla yıkanmalıdır. Benzer şekilde kolondan geçirilecek numunenin de kirleticilerden uzaklaşmasını sağlamak amacıyla filtre edilmesi gerekir. Proteinin bulunduğu çözelti ile tampon çözeltinin pH ve iyonik şiddet bakımından benzer olması bağlanacak protein değerini yükseltecektir. Bu bakımdan tampon çözeltiler seçilirken doğru bir tercih yapılmalıdır. Ayrıca bu tamponlar protein ve boya ligand bağlanmasındaki spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için de kullanılmaktadır. Tampon çözelti içindeki iyonik şiddetin derecesini artırmak istiyorsak çözeltiye potasyum ve sodyum içerikli tuzları eklenebilir. Proteinler ile boya ligandlar arasındaki etkileşimi arttırıp bağlanmayı maksimize edilmesi ve proteinleri kararlı bir ortamda tutabilmek amacıyla tampon çözeltiye Mg^{+2} , Zn^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} , Ca^{+2} gibi metal iyonları eklenebilir. Bunun yanısıra ortamdaki pH düzeyi metal iyonları için çökme durumu oluşturacağı sebebiyle dikkatli olunması gereklidir. Proteinler ve boya ligandlar arasındaki etkileşim mekanizmaları ortamın sıcaklık değerinden etkilenmektedirler. Bu bakımdan etkileşimleri doğru yönde ilerlemesini sağlamak amacıyla ortamın uygun sıcaklık değeri seçilmelidir. Bu nedenle adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinde uygun bir sıcaklık değerinde sabit tutularak yapılmalıdır. Absorbanların boyutları bağlanmaların daha iyi gerçekleşmesini sağlayan bir diğer önemli parametre olmaktadır. Boyutların küçük olması parçacıkların yüzey alanlarını arttırdıklarından dolayı etkileşim oranını arttıracak ve böylece daha hızlı bir adsorpsiyon sağlayacaktır. Fakat parçacık boyutlarının bu denli küçük olması beraberinde basınç düşüklüğüne sebep olacağından kolonda sıvı faz geçişi kolaylaşacak bu da absorbanlar üzerinde mekanik deformasyonlar oluşturabilmektedir. Yüzey alanını daha arttırtacak olan parçacıkların gözenekli yapısı ligand immobilizasyonu ve sonuç olarak protein adsorpsiyonunu daha etkin olmasını sağlayacaktır. Gözenekli yapılar proteinlerin büyük yapılı olmasından dolayı içeri ve dışarı kolayca girip çıkabilmektedirler. Kolonların içerisinden geçirilen tampon çözeltilerin geçiş hızları ayarlanabilmektedir. Yüksek geçiş hızı protein moleküllerinin adsorbanın aktif yerlerine ulaşımında hızlı olacaktır. Bunun yanı sıra geçiş hızlarının yüksek oluşu tek kolonlu yapılarda protein adsorpsiyonunun

azalmasına sebep olabilecektir. Ek olarak bir takım mekanik hasarlar verme potansiyeline sahiptir. Birçok uygulama göstermiştir ki, en uygun akış hızı 10-30 mL/h civarındadır. Kolon boyutları olan uzunluk ve çap oranı önemli bir diğer parametreler arasındadır. Yüksek boy çap oranı yüksek hızı bu da kütle transferi açısından yararlı olabilmektedir. Fakat bu şekilde basınç düşüşlerine sebep olacağından partiküllerin mekanik hasarına imkân yaratabilir (Denizli ve Pişkin, 2001).

2.11. Boya Ligand Afinite Kromatografisinde Desorpsiyon

Seçici olarak adsorplanarak sistemde kirletici bir etki yapan molekküller desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmeden önce yıkama işlemi yapılarak sistemden uzaklaştırılır. Yıkama yapılırken tamponun hacimi, akış hızı ve tampon çözeltinin içeriği iyi bir şekilde ayarlanmalıdır. Desorpsiyon işlemi küçük bir hacimde ve geri kazanımı yüksek oranda olacak şekilde yapılmalıdır. Desorpsiyon işlemi seçici veya seçici olmayan süreçler ile gerçekleştirilir. Burada ulaşılmaması istenen nokta protein ve beraberinde yıkanma sonucunda kalan diğer proteinleri de uzaklaştırmaktır. Bu işlemlerde polarite, pH ve iyonik şiddet gibi değişkenler ayarlanarak desorpsiyon tamponunun yapısı değiştirilebilir. Proteinlerin boya ligand yapılarından desorpsiyon işlemleri tek seferde veya kademeli olarak yapılabilir. Bağlı yapıları oluşturan etkileşimlerde eğer elektrostatik kuvvetler baskınsa pH değerinin artırılması proteinlerin desorpsiyon işlemi için yeterli olabilmektedir. Katyonik bir değişim baskınsa iyonik şiddetin kuvvetli bir etkisi söz konusudur. Diğer etkileşim olan hidrofobik kuvvetler baskın olduğunda ise etilen glikol veya gliserol yardımıyla desorpsiyon tampon çözeltisinin polaritesi düşürülerek işlem gerçekleştirilir. Üre, sodyum tiyosiyanat ve guanidin hidroklorür gibi bir takım ajanlar proteinlerin desorpsiyon işlemlerinde kullanılan etkin yapılardır. Fakat aynı zamanda bu yapılar proteinlerin bozulmasına da sebep olabilmektedirler. Bu bakımdan yıkama işlemlerinde kullanılması önerilmez. Bu yapılar tekrarlı kullanımlar için 2-8 M'lık bir değerde sistemi kalıntı proteinlerden arındırılmak için etkili olabilmektedir. Bağlanmayı oluşturan birimler arasında eğer metal iyonları mevcut ise bu iyonların yapıdan çıkarılması desorpsiyon işlemi sağlayacağı tespit edilmiştir. Protein boya ligandı ve metalin oluşturduğu güçlü yapılar için birlikteliği dağıtmak için tampon çözelti içine EDTA benzeri

ajanlar dahil edilebilmektedir. Afinite eleme uygulaması protein bağılı boya ligandlı yapılarda etkileşimin temel noktası aktif birimlerde olduğundan dolayı etkili bir teknik olmaktadır. Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH), Adenozin-monofosfat (AMP) ve Adenozin-trifosfat (ATP) gibi nükleotid kofaktör birimleri Cibacron Blue F3GA ve benzeri diğer reaktif immobilize edilmiş boyalardan enzimlerin uzaklaştırılması için kullanılmıştır (Denizli ve Pişkin, 2001).

2.12. Manyetik Parçacıklar

Manyetik parçacıklar mikro boyutlarından nano boyutlara geniş bir ölçekte üretilip incelenen dikkat çekici bir malzemelerdir. Eğer parçacık boyutları çok küçük boyutlara getirilebilirse beklenmeyen kimyasal ve fiziksel özellikler sergilediğinden birçok uygulama için ilgi toplamıştır (Goya ve ark., 2003).

Kromatografik ayırıştırma uygulamalarda olduğu gibi manyetik parçacıklar iyonik, hidrofobik ve hidrojen bağlanması gibi spesifik olmayan etkileşimler; boya ligand, sabit metal afinite kromatografisi (IMAC) gibi grup spesifik etkileşimler ve antijen-antibody, avidin-biyotin gibi spesifik afinite etkileşimleri gerçekleştirir. Buna benzer oluşan sistemlerde biyopolimer, inorganik iyonlar ve çeşitli hücre grupları gibi yapılar için ayırıştırma, saflaştırma ve analiz imkânı vermektedir. Uygulamalarda manyetik parçacıkların parçacık boyutu mikro veya nano boyutlara getirilip yüzey modifikasyonu iyonik gruplar ile güçlü veya zayıf şekilde yapılarak ve boya ligand yapıları seçilmesi sonucunda birleşik bir afinite yapısı oluşturulmuş olur. Genelde manyetik parçacıklar kor-kabuk tipine sahiptirler. Manyetik parçacık, yüksek veya düşük moleküler ağırlıkta inert bir birim ile kaplanarak istenmeyen etkileşimler önlenerek sabit bir yapı oluşması sağlanır. Bu tür yapılar oluşturulurken öncelikle gerekli boyutta ve manyetik özelliğe sahip parçacık alınır. Yüzeyine onu saran polimer veya inorganik yapıda malzeme ile kaplanır ve son olarak istenilen özellikteki uygulama için gerekli gruplar ile fonksiyonlaştırmayı sağlamaktır. Manyetik parçacıkları manyetik alan varlığı altında kontrolü ayırıştırma işlemlerinde kullanılabileceği gibi ilaç salınımı veya ısı ile tedavi (hypeterma) gibi uygulamalarda yapıldığı gibi parçacığı istenilen bir bölgede tutmak içinde kullanılabilir. Örneğin süper paramanyetik nanoparçacıklar sulu ortamlarda manyetik rezonans görüntüleme etiketli hücrelerin gözlenmesi için kullanılabilir. Tüm bu uygulamalarda önemli olan nokta manyetik

parçacıkların yüksek bir manyetik özelliğe, biyouyumluğu ve interaktif bir yüzey fonksiyonlarına sahip olmasını sağlamaktır.

Manyetik parçacıkların kullanıldığı malzemeler parçacığın manyetizmasına, boyutuna, eş dağılımına ve morfolojisine bağlı olarak pratikte önem kazanmaktadır. Çubuk, tel, levha gibi birçok fiziksel yapıda olsada eğer parçacıkların akışkanlık özelliği ön planda olması gerekli olursa bu durumda bilye şeklinde olan yapılar daha uygun olacaktır. Bu birçok ayrıştırma işleminde kolaylıklar sunacaktır. Yapılar eğer düzensiz bir halde ise aşınma ve dağılmaya küresel haldekinden daha fazla miktarda hassasiyet gösterecektir. Parçacıkların geniş bir dağılım gösteren boyutlarından ziyade düzgün dağılımlı dar bir boyut şekline sahip mikro küreler sabit kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olması yanısıra sıvı içerisinde kolayca topaklanmaması sebebiyle önemli bir ayrıcalığa sahiptir. Büyük boyutlu parçacıklarda küçük spesifik alan özelliğinde olduğundan fonksiyonel grup bağlanması ve bir takım biyomoleküllerin immobilizasyonunda dezavantajlara sahiptirler. Bu durum mikro ve daha az boyuttaki parçacıkların neden gerekli olduğunun bir sebebi niteliğindedir. Bunun yanısıra eğer çok küçük parçacık oluşturulduğunda manyetik özelliklerin hassasiyeti değişebilme ihtimali vardır. Manyetik parçacıkların manyetik hassasiyetlerinin yüksek tutulması gereği duyulur ve aktif yüzey yapısı ile bir uyum gözetilir.

Manyetik parçacıkların kullanıldığı ayırma tekniklerinde parçacıklar inorganik, doğal polimer veya sentetik yapılar ile kaplanmaktadır. Bu kaplama malzemelerin en bilinenleri Polistiren (PS) ve polimetilmetakrilat'tır (PMMA). Yaygın kullanımlarının aksine malzemelerin hidrofobite özellikleri bakımdan bir takım dezavantajları vardır. PS proteinler ile spesifik olmayan etkileşimler yaptığı için istenmeyen fon uyarımları oluşturur. PS'nin bir diğer dezavantajı ise ligandlara kimyasal olarak uyum sağlamayabilmesinin zor olmasıdır. Bunun yanında PS alkol ve su gibi çözücüler içinde hidrofobik yapısından dolayı şişmeyi önleyici bir özelliği de vardır. Bundan dolayı incelemelerin manyetik polihidroksietil-metakrilat (PHEMA) yönünde olmasına sebep olmuştur. PHEMA biyouyumluluk, düşük spesifik olmayan adsorpsiyon özelliği, toksik olmaması, mekanik kararlılık ve hidrofobik yapısından dolayı biyomedikal alanda önemli bir yere sahiptir. Fakat, bünyesinden bulundurduğu hidroksil gruplarının reaktiflik derecesi olması

sebebiyle ligandlara bağlanırken polietilenamin, amin gibi fonksiyon birimleri aracılığı ile mümkün olmaktadır. Diğer polimerler için ise fonksiyon grupları polisakkaritler, selüloz, dekstran ve albümin gibi yapılardır (Horak ve ark., 2007).

2.12.1 Manyetik Parçacıkların Hazırlanışı

Genellikle süperparamanyetik çekirdeğe sahip manyetik mikrokürelerin dışarıdaki analit çözeltinin metal ile direk temasını önlemek için polimer kabuk içine yerleştirilirler. Bu yapı yüzeyin fonksiyonel bir davranış kazanmasında ve hedef moleküle immobilize olması açısından bir avantaja sahiptir. Manyetik akışkan yapılar mikro veya nano boyutta manyetik polimer oluşturulmasında ilk adımı oluşturur. Bu yapıları sentezlerken çeşitli yöntem bulunmaktadır. Taşıyan birimin boyutsal büyüklüğü, hidrofobik veya hidrofilik özelliği, kimyasal içeriği, manyetik karakteri, minimum spesifik olmayan adsorpsiyon özelliği yanısıra immobilizasyon yöntemi de farklılıklar sergilemektedir. Manyetik malzeme tercihi, polimer içerisindeki oranı ve dağılımı, derişimi gibi özellikler manyetik parçacıkların yapı içindeki manyetizma davranışlarını belirleyen unsurlar arasındadır (Horak ve ark., 2007).

2.12.2. Demir Oksit Yapılar

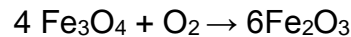
Farklı kimyasal birimler ve bunlarla birlikte değişkenlik gösteren farklı manyetik özellikler gösteren demir oksit yapıları mevcuttur. γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄, MO.Fe₂O₃ (M=Co, Mn, Ni, Cu) gibi çeşitlilik gösteren demir oksitler Ferrimanyetik bir yapıya sahiptir. Manyetik alan varlığından yanıt verme hassasiyetleri ferromanyetik yapılara göre daha iyi olan ferrimanyetik demir oksitler kararlı bir manyetik özellik gösterirler. Çizelge 2.8'de çeşitli demir oksit türleri ve bunların manyetik özellikleri verilmiştir. Bu demir oksit çeşitleri arasında manyetit (Fe₃O₄) ve maghemit (γ -Fe₂O₃) en yaygın kullanılan yapılardır. Bu demir oksitler benzer fiziksel özellik gösteren ferri manyetik birimlerdir. Bunun yanısıra maghemit manyetik özellik gösteren malzemeler mıknatıslanma doygunluğu düşük değerdedir. Bu davranışı etkileyen onların alt örgü etkileşimleri sebebiyledir. Maghemit yapısında yalnızca Fe⁺³ iyonları mevcuttur. Bu iyonların kristal yapısına baktığımızda terahedral ve oktahedral düzenleniş yarı yarıya bir orana sahiptir. Manyetit yapıda ise Fe⁺³ ve Fe⁺² iyonları mevcut olup oluşan yapı birimi içerisinde yarısını oluşturan oktahedral iyonlarının hepsi Fe⁺² iyonları oluşturmaktadır.

Çizelge 2.8. Demir Oksit çeşitleri.

Mineral	Formil	Manyetik Özellik
Goethite	α -FeOOH	Antiferromanyetik
Akaganeite	β -FeOOH	Antiferromanyetik
Lepidocrocite	γ -FeOOH	Antiferromanyetik
Feroksayt	δ -FeOOH	Ferrimanyetik
Ferrihidrit	$\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Antiferromanyetik
Hematit	α - Fe_2O_3	Zayıf ferrimanyetik
Maghemit	γ - Fe_2O_3	Ferrimanyetik
Manyetit	Fe_3O_4	Ferrimanyetik

Manyetit ters spinal yapı içerisinde oksijen atomlarının karşılıklı düzenli bir şekilde dizildiği kübik birim hücre merkezli bir yapıya sahiptir. Bu hücre içerisinde toplam 56 atomdan oluşarak 32 O^{2-} anyon, 16 Fe^{+3} katyon ve 8 Fe^{+2} katyonu şeklinde dağılım göstermektedir. $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ olarak bilinen manyetit Fe^{+3} iyonlarının yarısı tetrahedral yapıda olup arta kalan Fe^{+3} ve Fe^{+2} iyonlarının tamamı ise oktahedral şekilde kübik yapısı içinde yer almaktadır.

Manyetitin elektron dağılımına baktığımızda manyetik momentler sağlayan çiftlenmemiş 3d elektronları mevcuttur. Tetrahedral bir yapı şeklinde dizilmiş Fe^{+3} iyonlarının spinal durumları ile oktahedral olarak dizilmiş Fe^{+3} ve Fe^{+2} iyonlarının spinal durumları farklı büyüklükte ve ters paralel şekildedir. Hava koşullarında maghemit yapıya okside olarak manyetik özelliği aynı kalarak ferrimanyetik özellik gösterir. Sıcaklığı 300°C üzerinde olduğunda ise antiferromanyetik olan hematite yapı şekline geçişerek okside olur.

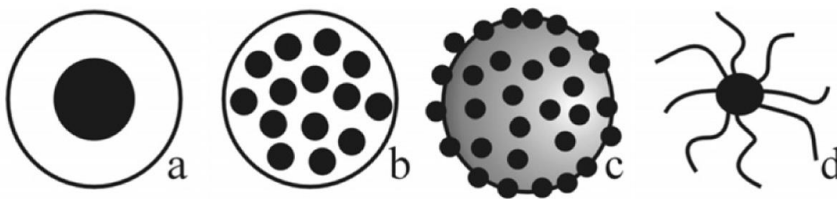


Manyetit parçacıkların kimyasal özelliğinin yanısıra yüzeysel yapısı da önem arz etmektedir. Su içerisindeki dağılımı çözeltilinin pH değerine bağlı olarak değişebilmektedir. İzolektrik noktası 6.8 olan manyetit sitrat veya silika kaplama yapılarak veya elektrostatik bir çift katman yapılarak stabil hale getirilmesi yapılabilmektedir. Benzer şekilde bu kaplama birçok uygulama içinde yarar sağlamaktadır. Fe^0 çekirdeğinin yükseltgenir olması bu yapıdaki tepkime oluşumunu gerçekleştiren unsurun olduğu bilinmektedir. Fe^0 çekirdeği boyutu ve

özgül alanı neticesinde havada oksitlenebilmektedirler. Bu oksitlenme tepkimesinden çekirdeği korumak amacıyla yapıları polimer, metal oksit, soy metaller veya organik yapılar ile kullanmışlardır. Bunlar sitozan, dekstra veya PEG gibi polimerler olabileceği gibi silika gibi inorganik malzemeler de olabilmektedir. Parçacıkların yüzey alanlarını değişime uğratabilecek şekilde kümelenme oluşturan çevresel koşullar mevcut olabilmektedir. Dolayısıyla parçacığın aktif yüzey ve buna bağlı olarak aktif alanlarını belirlemek önem arz etmektedir (Sarıbuğra, 2014).

2.12.3. Manyetik Polimer Partiküllerin Sentezi

Organik veya inorganik içerikli malzemelerle manyetik polimer yapılabilir. Yapım prosedürleri çeşitlilik arz etmekle birlikte malzeme içerisinde kullanılan manyetik birimlerin boyutu, dağılımı ve miktarı dikkate alındığında bir takım kısıtlanmalar mevcuttur. Herhangi bir prosedür istenen bütün koşulları sağlayamaz. Manyetik malzemenin gösterilmesi istenen afinite OH, NH₂, COOH; PO(OH)₂ gibi fonksiyon gruplarının varlığında veya oluşturulan ortamın uygun afinite uygunluğu ile veya elektrostatik etkileşim ile yapılabilir. Şekil 2.7'de gösterildiği gibi bu tür yapıların oluşturulmasında yöntemsel farklılıklar mevcuttur. Şekil 2.7.a'da polimer kabuk manyetik dolgu yapı, Şekil 2.7.b'de polimer bir matrisde homojen bir şekilde dağılan manyetik yapılar, Şekil 2.7.c'de polimerin üzerine sabitlenmiş manyetik yapılar ve son olarak da Şekil 2.7.d'de polimer zincirleri ile manyetik yapıya sabitlenmiş fırça modeli sunulmaktadır. Gösterilen bu yapılar polimerler ve manyetik parçacıkların faz ayırma, çözücü ile buharlaştırma gibi yöntemler ile elde edilebilir. Metal oksit çöktürme ile polimer yapıların içinde veya üstünde yapılarak farklı bir yöntemle de elde edilebilir. Kullanılan bu yöntemlerin haricinde manyetik parçacıklar ile heterojen polimerizasyon sık kullanılan yöntemler arasındadır (Horak ve ark., 2007).



Şekil 2.7. Manyetik polimerlerin farklı morfolojik çeşitleri.

2.12.4. Manyetik Polimerlerin Ayırıştırma İşlemlerinde Kullanımı

Manyetik yapılı parçacıklar bir ortam içerisinde hedeflenen birimin ayırıştırılması ve düzenlenmesini yapabilmektedirler. Ayırımı yapıp saflaştırılacak birimler proteinler, bakteriler, enzimler ve peptitler benzeri biyomolekül yapılar olabilmektedir. Bundan dolayı bu hedef molekülleri kan, dokular, toprak ve benzeri karmaşık yapılar içerisinde uzaklaştırmak olanaklı bir durumdur. Filtrasyon veya santrifüj benzeri ön işlemlerin yapılmama kolaylığını taşıyan manyetik ayırma işleminin hızlıca yapılabilen, makul ve derecelendirilebilir bir yapısı vardır. Fiilen uygulanabilir olmayan farklı tekniklerin yapılamadığı durumlarda rahatça yapılabilmektedir. Bu ayırma teknikleri başlıca iki şekilde incelenebilmektedir.

A) İyon değişimli ayırma

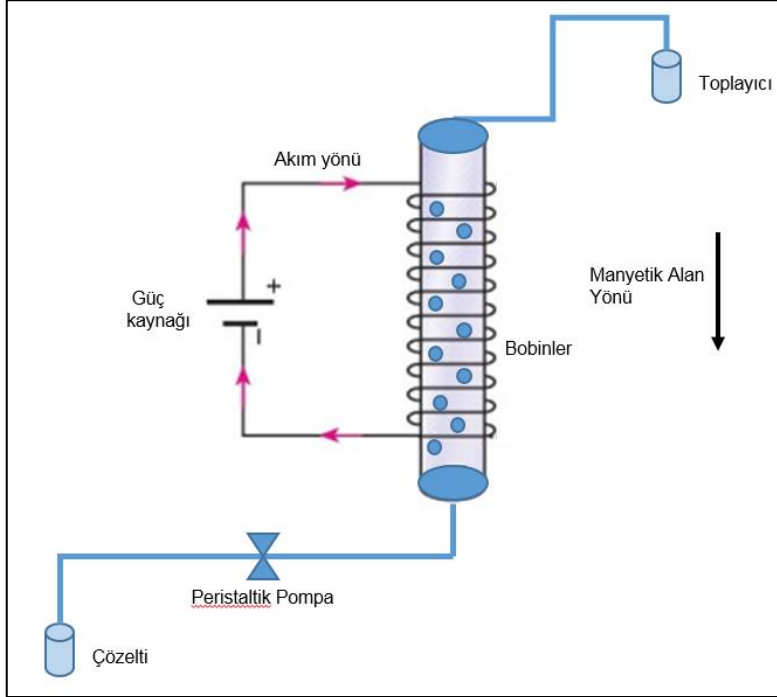
B) Afinitive bazlı ayırma : Nükleik asitlerin ayırımı, hücre ayırımı, enzimler ve proteinlerin ayırımı olarak üç grup altında incelenmektedir (Horak ve ark., 2007).

2.13. Ayırıştırma Çalışmalarında Akışkan Yatakların Kullanımı

Saflaştırma çalışmaları uygulamaları içerisinde akışkan yataklar kan örneği gibi direnç ortamlarından moleküler uzaklaştırmaya veya saflaştırma yaparken yapılan hızlı, yan etkisiz ve basit düzeneklerdir. Bu yataklar kullanılırken yüksek akış hızı partiküllerin kendi aralarında oluşturdukları sürtünme kuvvetini ile birlikte yer çekimi etkisine baskın gelerek bir denge oluştururlar. Bu denge durumundaki yatağa akışkanlanmış yatak ya da minimum akışkan durumundaki yatak adı verilir. Bu koşulda kabarcık oluşumu büyük boyutlarda olmadığından homojen bir nitelik kazanır. Böylece akışkan yatak üzerinde basınç düşmeleri değişkenlik göstermeyerek sabit duruma gelir.

2.13.1. Akışkan Yataklarda Manyetik Alan Kullanımı

Akışkan yataklarda manyetik alan kullanımı çözelti içindeki partiküllerin yoğunluğu, birbirleri üzerindeki etkileri, akışkan veya yer çekimi yönünde birçok dinamik etkinin kontrol edilebileceği sistemlerdir. Aşağıdaki Şekil 2.8’de görülen sistem bunlara tipik bir örnek teşkil etmektedir.

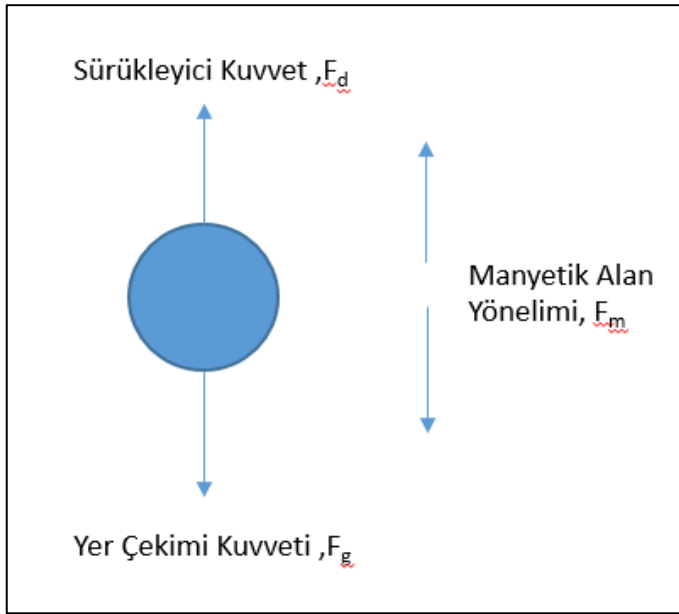


Şekil 2.8. Manyetik akışkan yatakların deney düzeneği.

Manyetik akışkan yataklarında manyetik alanın düzgün kurulabilmesi için gerekli homojen olarak sarılmış bobinler kullanılır. Kullanılan bobinlere farklı akım değerleri uygulanarak yatak üzerindeki manyetik alan değiştirilebilir ve böylece partiküllere etki eden kuvvet değiştirilmiş olur. Değişen kuvvet yardımıyla partiküller kümeleşip bir ağırlık oluşturabilirler. Bu etki akışkanlığı bozacağı ve yer çekimi etkisini de hesaba katınca akışkanın dinamiğini değiştireceği bunun da adsorpsiyon üzerine etki edeceği düşünülerek manyetik alan değerini bir denge oluşturacak şekilde düzenlemek önemlidir.

Manyetik alan altında akışkan içindeki partiküllere etki eden kuvvet Şekil 2.9’da gösterilmiştir. Bu etkiler incelendiğinde manyetik alan akımının dolayısıyla manyetik alanın yönüne bağlı olarak değişen manyetik alan kuvveti (F_m), yerçekimi kuvveti (F_g) ve akışkanın sürükleyici kuvveti (F_d) olmak üzere kuvvetler varlığını göstermektedir. Bu kuvvetler dengede olduğunda akış kararlı bir yapı sağlanmış

olur. Akışkanın ve yer çekimi etkisinin etki ettiği kuvvetler manyetik alanın sağlamış olduğu kuvvet ile oluşturulan bileşik kuvvet sonucunda akışkan içinde bir dengeleyici durum yaratılarak akışkan yatak içerisinde geçerek adsorpsiyonu gerçekleştirmiş olur. Burada önemli problemlerden biri matris malzemesinin seçilmesidir. Genel yaklaşımla kütle aktarımının hızlı olabilmesi için partiküllerin küçük boyutlarda olması istenir. Ayrıca, partiküllerin tıkanmaya ve basınç farklılıklarına sebep olabilecek yoğunluğu ve manyetik alana vermiş oldukları tepkiler de önemlidir. Örneğin sürekli bir manyetizasyona sahip olan parçacıklar akışkanın kontrollü bir şekilde sürmesine etki ederek yığılmalara sebep olacak böylece adsorpsiyon etkin bir şekilde gerçekleşmeyecektir. Matris malzemesini oluşturan partiküller ve ayrıştırılması istenen partikülün akışkan içerisindeki davranışını iyi bilmek ve akış içerisindeki hareketlerini etkileyen faktörlerin iyi belirlenerek sistemin tasarımını yapmak önemlidir (Öztürk ve ark., 2016).

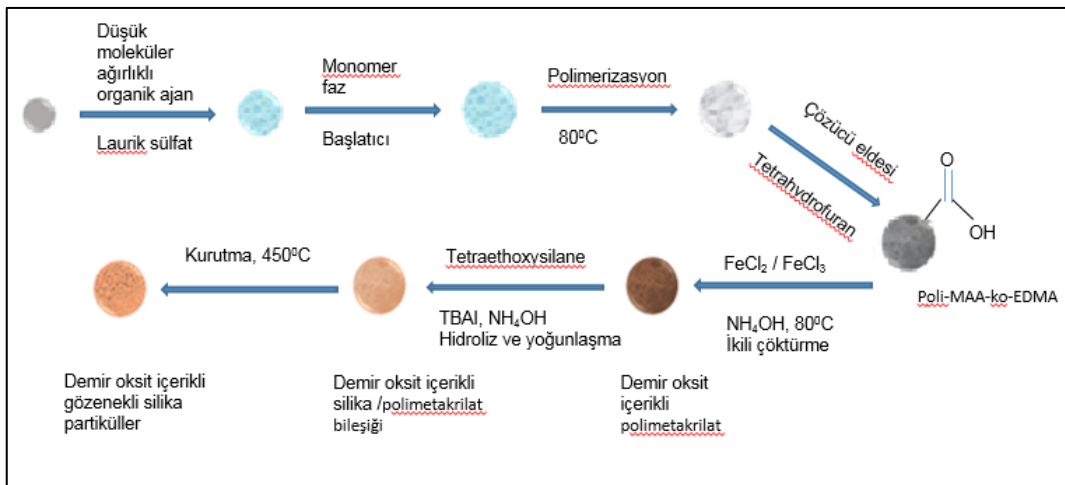


Şekil 2.9. Manyetik partiküle etki eden kuvvetler.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Manyetik Silika Partiküllerinin Üretimi

Manyetik silika partiküllerin sentezi Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1'de partiküllerin üretim aşamaları gösterilmiştir. Yapım aşaması, sabit olarak konumlanmış demir oksit partiküller, demir tuzlarının poli-MAA-ko-EDMA gözenekli iç yapısına alkali bir ortam içerisinde çöktürülmesi yoluyla üretilmiştir. Silika kaplı demir oksit partiküllerin sentezlenmesi, demir oksit partikül içerikli polimetakrilat parçacıkların aşamalı hidroliz ve yoğunlaştırma işlemi çerçevesinde oluşturulmuştur. 30 mL 2-propanol, 7.5 mL damıtık su, 0.4 mL 0.1 M NH_4OH çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 375 mg TBAI çözelti içerisinde çözülmüştür. İçerisinde 0.5 g demir oksit bulunan polimetakrilat parçacıklar, 180 W, 50 Hz değerinde 1 dakika süreyle ultrasonikasyon yoluyla dağıtılmış ve 30 dakika karıştırılmıştır. 3.0 mL 2-propanol ve 1.5 mL TEOS çözeltisi, hazırlanan demir oksit çözeltisi içerisine damlatılmış ve oda sıcaklığında bir karıştırıcı içerisinde gece süresince karıştırılmıştır. Bir mıknatıs yardımıyla çözelti içinde oluşan silika-jel polimetakrilat partiküller ayrılmıştır. Ayrılan partiküller etanol ve damıtık su ile yıkanarak 48 saat boyunca 70°C 'de vakum altında kurutulmuştur. Dakikada 2°C 'de ısıtma hızıyla 450°C olacak şekilde atmosfer basıncı altında 2 saat süreyle toz haline getirilen partiküller sonucunda gözenekli yapıda silika kaplı demir oksit partiküller elde edilmiştir.



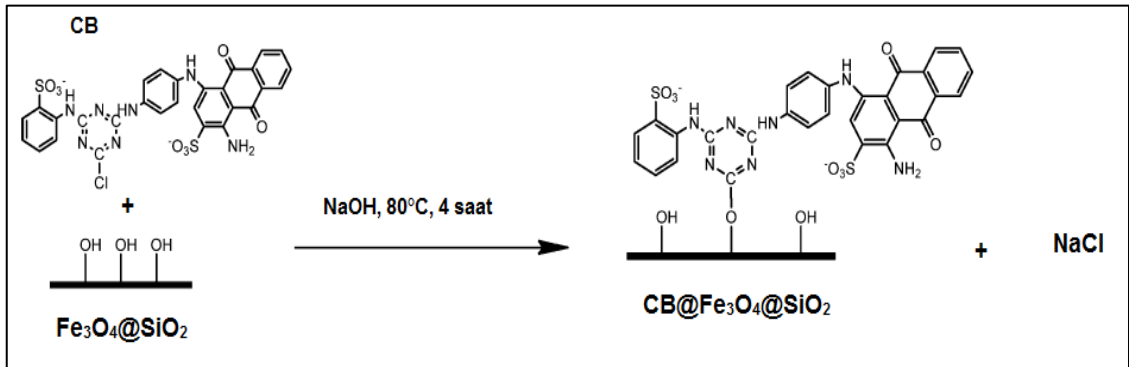
Şekil 3.1. Manyetik silika partiküllerin sentezi (Öğüt ve ark., 2019).

3.2. Manyetik Silika Partiküllere Cibacron Blue F3GA Bağlanması

Afinite ligandı olarak kullanılan monokloro triazin boya Cibacron Blue F3GA partiküllere kovalent olarak bağlanmıştır. Bu işlemde öncelikle 100 mg silika kaplı manyetit (Fe_3O_4) alınmıştır. 0.1 M NaOH içeren 10 mL çözeltilerde farklı miktarlarda Cibacron Blue F3GA çözülerek (0 – 5 mg/mL) toplam 100 mL olacak şekilde boya çözeltisi hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözelti partiküllere eklenerek 80°C 'de 4 saat boyunca bağlanma tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonrasında bağlanmayan Cibacron Blue F3GA kalıntılarını ortamdaki uzaklaştırmak için distile su ile defalarca yıkanmış ve ardından çöktürme işlemi yapılmıştır.

Cibacron Blue F3GA ve manyetik silika partiküller arasındaki bağlanma tepkimesi Şekil 3.2'de verilmiş olup tepkime sonucunda NaCl bileşiği oluşmaktadır.



Şekil 3.2. Cibacron Blue F3GA ve manyetik silika partiküllerin bağlanma mekanizması (Zhu ve ark., 2011).

3.3. Cibacron Blue F3GA Takılı Manyetik Silika Partiküllerin Yıkama ve Çöktürme İşlemleri

Boya ligand Cibaron Blue F3GA bağlanmış manyetik silika partiküllerin yıkama ve çöktürme işlemleri için santrifüj (Universal 320R, Hettich, Almanya) kullanılmıştır. Partiküller 10 mL'lik tüpe yerleştirilerek 8500 rpm hızda 15 dakika santrifüjlenmiştir. Çöken kısım mikropipet yardımıyla alınarak tekrar yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işlemi bu şekilde 30 defa tekrarlanmıştır. Santrifüjleme işlemi sonucunda elde edilen partiküller adsorpsiyon deneyleri için kurutularak hazır hale getirilmiştir.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Çalışmaları

Bölüm 3.1'de açıklandığı şekilde elde edilen partiküllere Cibacron Blue F3GA bağlandıktan sonra yüzey özelliklerini görebilmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. Örnek öncelikle kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Kaplama işlemi vakum altında, karbon ile yapılmış ve numuneler daha sonra SEM cihazında (SEM; Zeiss, EVO 50, Almanya) farklı büyütme oranlarında görüntülenmiştir.

3.4.2. Yüzey Alanı Ölçümleri

Manyetik silika partiküllerin yüzey alanı ölçümleri azot atmosferinde 210°C ve 100°C'de adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemi ile yapılmış ve elde edilen veriler hesaplanmıştır (Quantochrome, Nova 2200e, USA).

3.4.3. Elektron Spin Rezonans (ESR) Ölçümleri

Silika kaplı manyetik partiküllerin elektron spin rezonans (ESR) ölçümlerinde Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Bölümünde bulunan Bruker EMX 113X-Band ESR spektrometresi kullanılmıştır. ESR optimum deneysel çalışma koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu koşullar altında ESR spektrumlarının soğurma eğrilerinden yararlanarak elde edilen bulgular verilmiştir.

Çizelge 3.1. ESR spektrometresi çalışma koşulları.

Merkezi Alan	270 mT
Süpürme Alanı	500 mT
Mikrodalga Frekansı	9.78 GHz
Mikrodalga Gücü	0.1 mW
Modülasyon Frekansı	100 kHz
Modülasyon Genliği	1 G
Kazanç	3.17×10^3
Süpürme Zamanı	83.89 s
Zaman Sabiti	81.92 s
Dönüşüm Zamanı	163.84
Sıcaklık	24°C

3.4.4. Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) Ölçümleri

Silika kaplı manyetik partiküllerin manyetik özellikleri bir diğer yöntem olan titreşimli örnek manyetometresi ile de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Süperiletkenlik ve Nanoteknoloji Grubu Laboratuvarındaki Quantum Design Model 600 Fiziksel Özellikler Ölçüm Düzeneği (PPMS) VSM seçeneği kullanılarak oda sıcaklığında, ± 20 kOe şiddeti altında, 50 Θ e değerindeki basamaklarla gerçekleştirilmiştir. Ölçüm duyarlılığı $1 \mu\text{emu}$ değerindedir.

3.4.5. Elementel Analiz

Elementel analiz için öncelikle silika partiküller (1.0 mg) elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum örnek hücrelerine yerleştirilerek ± 0.0001 g hassaslıkla tartılmıştır. Daha sonra Cibacron Blue F3GA takılı silika partiküller cihaza yerleştirilerek yakma işlemi ile % kükürt (S) analizi yapılmıştır.

3.4.6. Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) Analizi

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin EDX analizi ile yapının temel bileşenleri olan Si, Fe atomlarının varlığı araştırılmıştır.

3.4.7. FTIR Analizi

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküller ile boya bağlanmamış manyetik silika partiküllerden 2 mg olacak şekilde örnekler alınarak zayıflatılmış Toplam Yansımali Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (ATR-FTIR) cihazına (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) yerleştirilerek 400 – 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrum kaydedilmiştir.

3.5. Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalışmaları

3.5.1. HSA Adsorpsiyonu

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyon deneyleri aşağıda verildiği şekilde farklı durumlar için incelenmiştir. Öncelikle pH değişiminin adsorpsiyon üzerindeki etkisini görebilmek için pH değerleri 4.0- 8.0 aralığında çalışılmıştır. HSA başlangıç derişiminin etkisini görebilmek için derişimi 0.25-3.00 mg/mL arasında olan HSA çözeltileri ile adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkilerini görebilmek için ortam sıcaklığı 4-40 °C arasında değiştirilmiştir. İyonik şiddetin adsorpsiyona etkisini belirlemek üzere HSA çözeltilisinde NaCl derişimi 0-1.0 M arasında değiştirilmiştir. Bağlanan boya ligand miktarının etkisini görebilmek için farklı miktarlarda boya içeren manyetik partiküllerle bağlanma deneyleri de gerçekleştirilmiştir.

Adsorpsiyon çalışmaları için Şekil 3.3'de verilen sistem kullanılmıştır. Adsorpsiyon deneyleri 20 rpm karıştırma hızında ve 2 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Adsorpsiyon işlemi için kullanılan deney düzeneği.

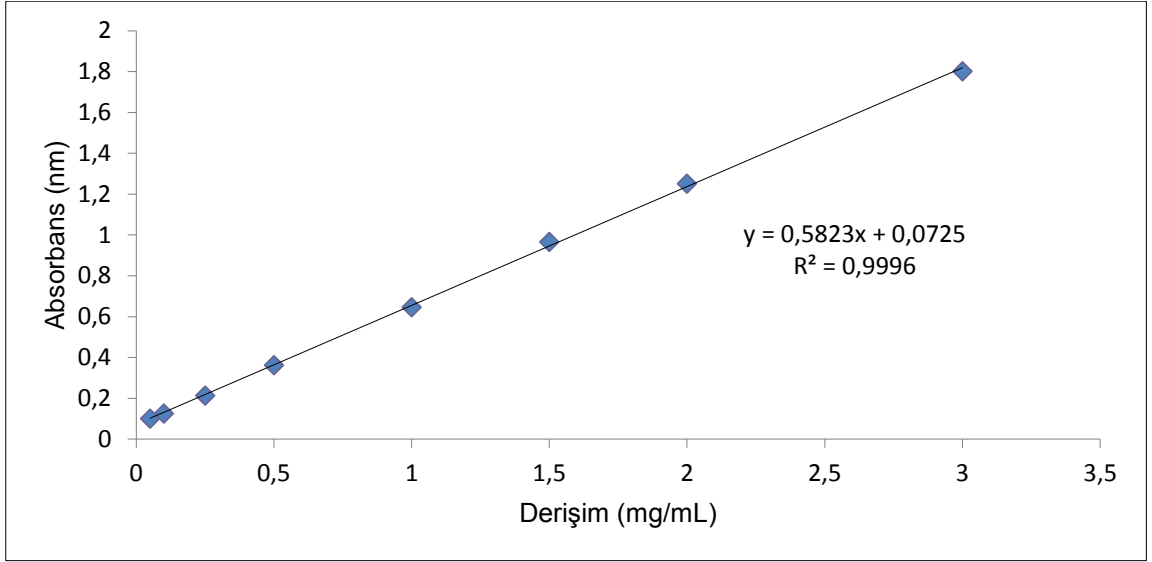
Adsorplanan HSA miktarı, adsorpsiyon öncesi ve sonrasında HSA derişimlerinin 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir. Eşitlik 3.2. yardımıyla adsorplanan HSA miktarı mg/g cinsinden hesaplanmıştır.

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

Bu eşitlikteki q , partikül başına adsorplanan HSA kütlesi (mg/g); C_0 , HSA çözeltisinin adsorpsiyondan önce başlangıç derişimi (mg/mL); C , HSA çözeltisinin adsorpsiyon sonrası derişimi (mg/mL); V , mL cinsinden hacim ve m ise partikülün g cinsinden kütlesini göstermektedir.

Bu eşitlikte C_0 ve C değerleri sisteme ilişkin kalibrasyon doğrusu yardımıyla tespit edilmiştir. Bunun için 10 mL tampon çözelti içerisinde (pH: 7.0; fosfat tamponu) 30 mg HSA çözülerek 3 mg/mL HSA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti gerekli oranlarda seyreltilerek 3.0-0.05 mg/mL derişim aralığında çözeltiler elde

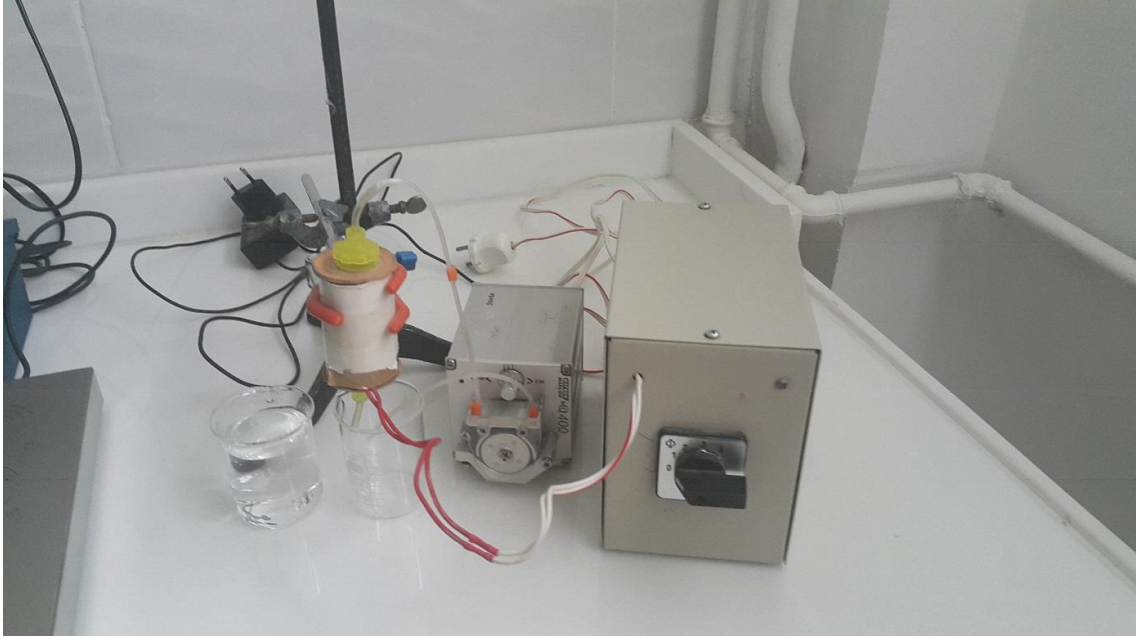
edilmiştir. Elde edilen çözeltilerin spektrofotometrik olarak 280 nm dalga boyunda absorbansları tespit edilerek Şekil 3.4.'de gösterilen kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.4. HSA için kalibrasyon grafiği.

3.5.2. Manyetik Alan Varlığında HSA Adsorpsiyonunun İncelemesi

İncelenen parametreler altında yapılan adsorpsiyon deneylerinde elde edilen optimum koşullarda Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyonu Şekil 3.5'deki deney düzeneği yardımıyla manyetik alan varlığında yapılmıştır. Bu çalışmalarda 1.0 mg/mL derişimde HSA çözeltisi (pH 5.5) kullanılmıştır. Kurulu sistemde akım değeri 1.33 A ve bobinler üzerindeki manyetik alan şiddeti merkezde 25 mT değerindedir. Manyetik alan şiddetinin HSA adsorpsiyonuna etkisinin belirlenmesi için farklı manyetik alan şiddetlerinde çalışmalar tekrarlanmıştır.



Şekil 3.5. Manyetik alan varlığında adsorpsiyon işlemi deney düzeneği.

3.5.3. Desorpsiyon ve Tekrarlanabilirlik

Bağlanan HSA'nın desorpsiyonu için 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi adsorpsiyon işleminde de yapıldığı gibi Şekil 3.3'de verilen sistem yardımıyla 20 rpm hızında oda sıcaklığında 2 saat karıştırılarak yapılmıştır. Desorpsiyon işleminin ardından partiküller saf su ve tamponla yıkanarak tekrar kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Desorpsiyon ve yıkama işlemleri sonrası sıvı faz 15.000 rpm altında 1 saat santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır.

Desorpsiyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = (\text{Desorplanan HSA miktarı} / \text{Adsorplanan HSA miktarı}) \times 100$$

Bir diğer önemli parametre olan tekrarlanabilirlik özelliğine bakmak için Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere 10 kere adsorpsiyon ve desorpsiyon döngüsü uygulamıştır. Her bir döngü sonunda partiküllere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6. Yapay Plazma İle Saflaştırma ve SDS-PAGE Analizi

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyonu yapay plazma kullanılarak incelenmiştir (Tokra Medical, Ankara, Türkiye). Yapay plazma içerisine toplam albümin derişimi 1.0 mg/mL olacak şekilde HSA eklenmiştir. Saflaştırılan HSA'nın saflığını belirlemek üzere sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde mini-protein TGX Stain-Free Precast Gels kullanılmıştır. 1mL yapay plazma çözeltisi Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküller ile 2 saat boyunca etkileştirilmiştir. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası plazma ile desorbe edilen çözeltiden 10 µL örnek kuyucuklara yerleştirilerek elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından jel Coomassie Blue G-250 boyası ile 12 saat süre ile bekletilerek boyanmış ve ardından %20 metanol, %20 asetik asit ve %60 oranında su içeren çözelti kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.



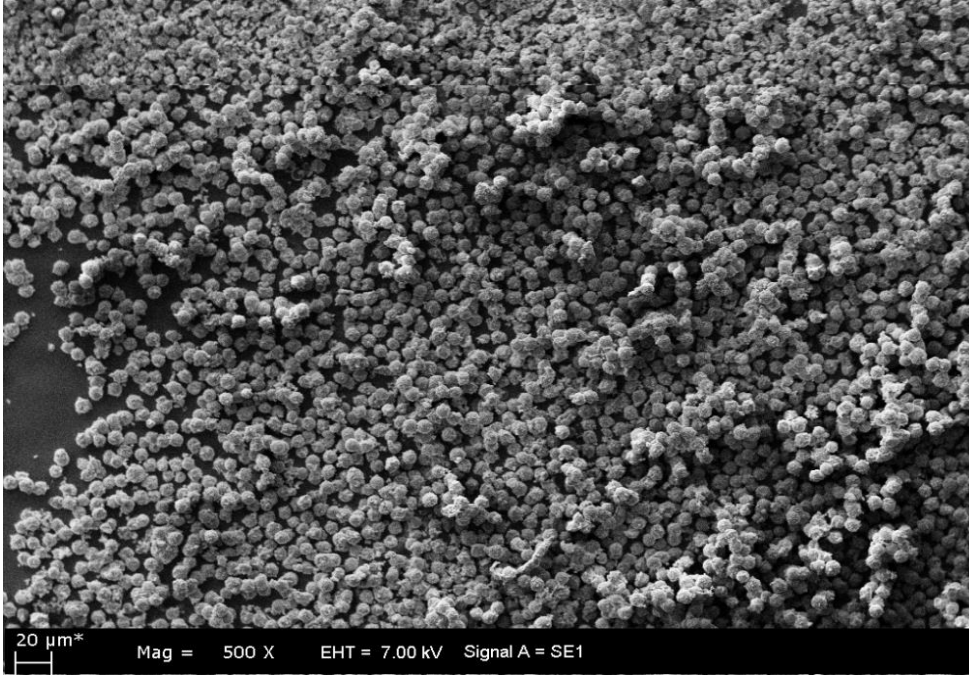
Şekil 3.6. SDS-PAGE düzeneği.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

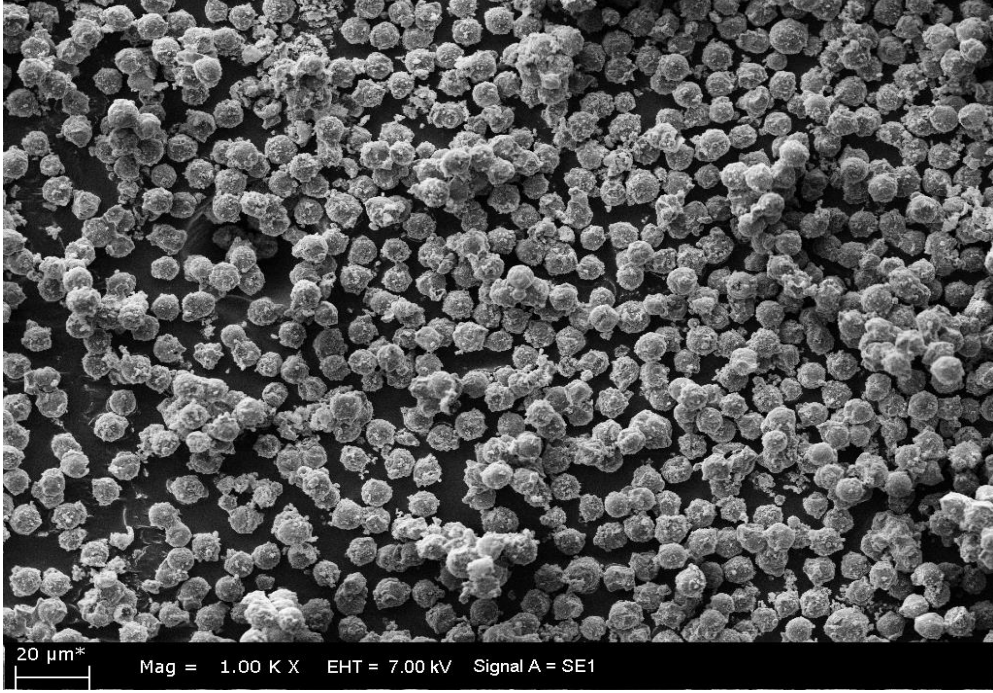
4.1.Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Çalışmaları

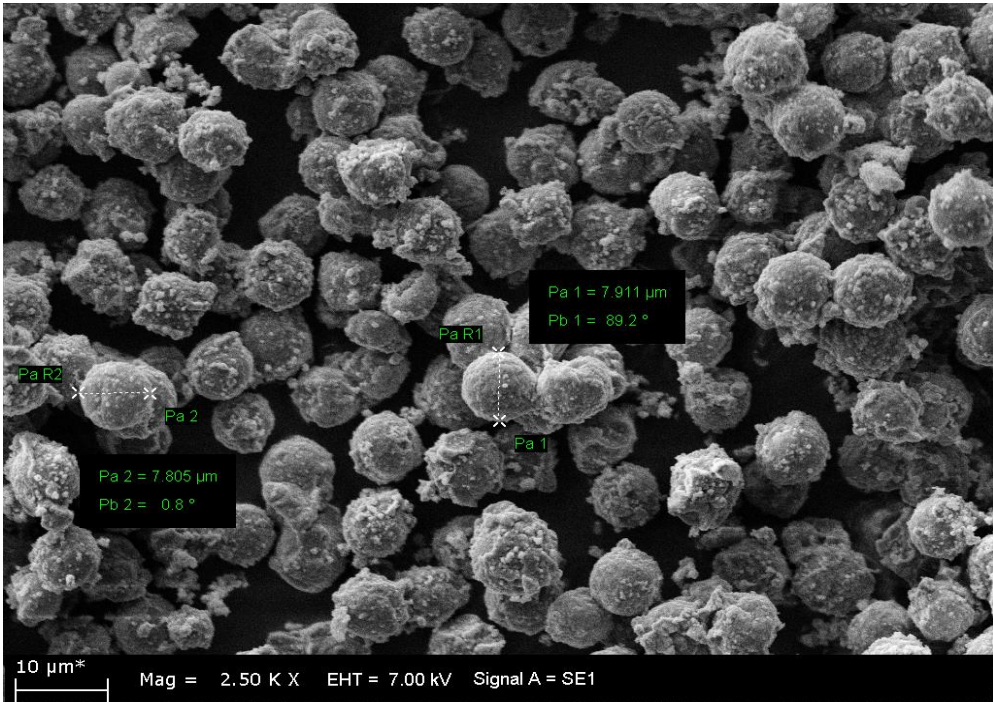
Yüzey bilgisinin detaylı bir şekilde verildiği analizlerden biri olan taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş olan Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin farklı büyütme oranlarındaki SEM fotoğrafları Şekil 4.1-4.4'te gösterilmiştir.



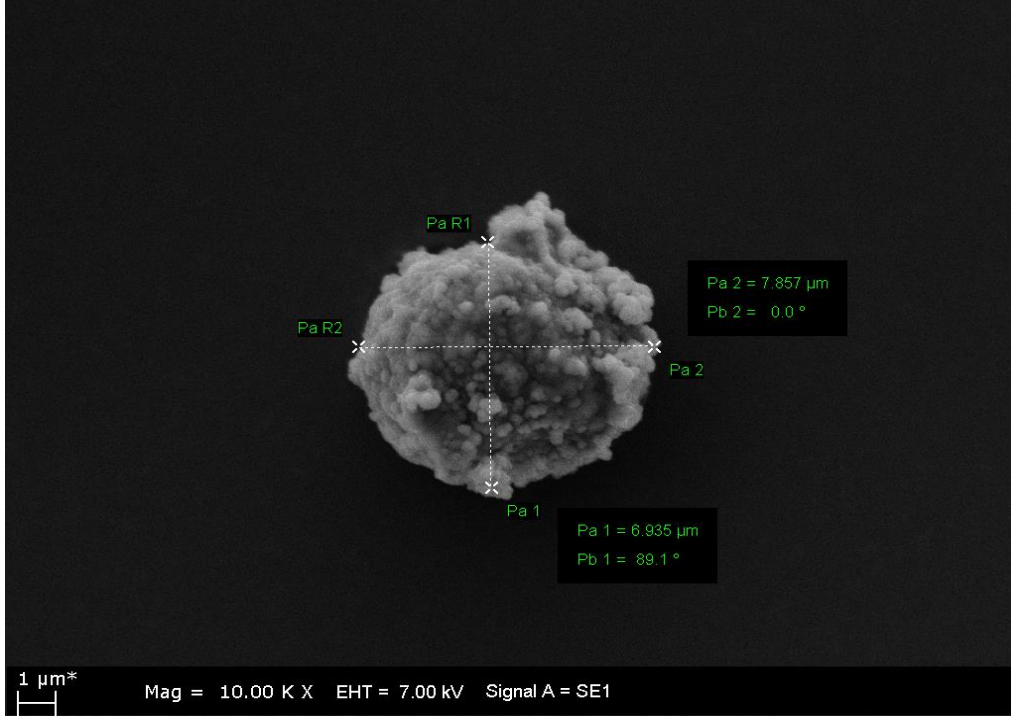
Şekil 4.1. Manyetik silika partiküllerin 500 X büyütme SEM fotoğrafı.



Şekil 4.2. Manyetik silika partiküllerin 1.00 X büyütmeli SEM fotoğrafı.



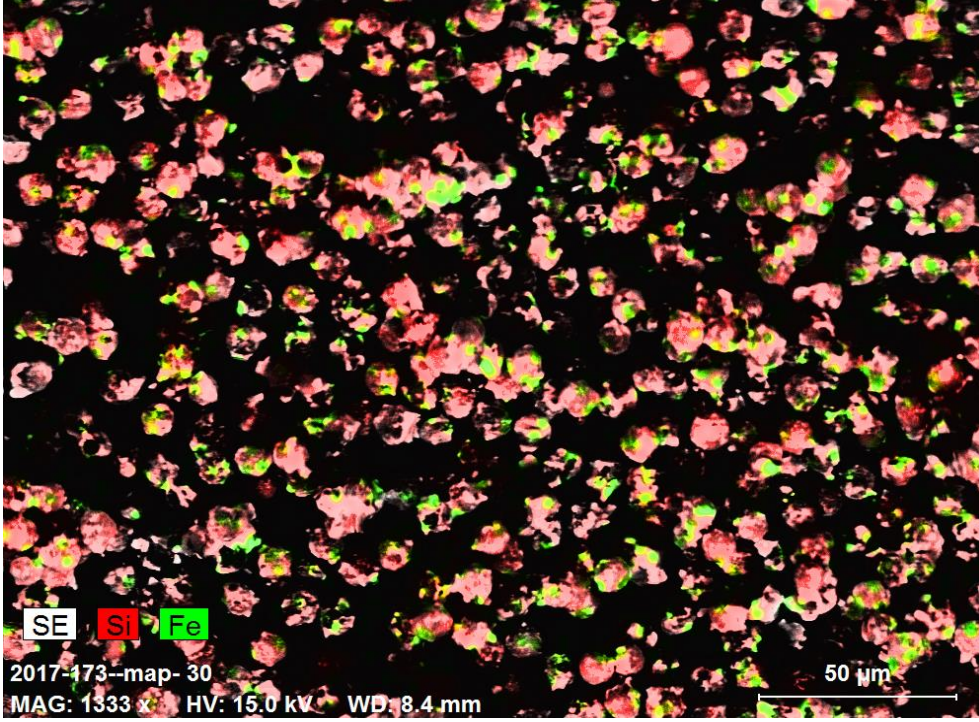
Şekil 4.3. Manyetik silika partiküllerin 2.50 X büyütmeli SEM fotoğrafı.



Şekil 4.4. Manyetik silika partiküllerin 10.00 X büyütme SEM fotoğrafı.

Görüntülerden partiküllerin boyutunun ortalama 7000 nm ve küresel yapıda olduğu görülmektedir.

SEM cihazı üzerinde yapılan bir diğer inceleme olan haritalama çalışması Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin içerdiği silika ve demir yapıları belirgin olarak görülmektedir.



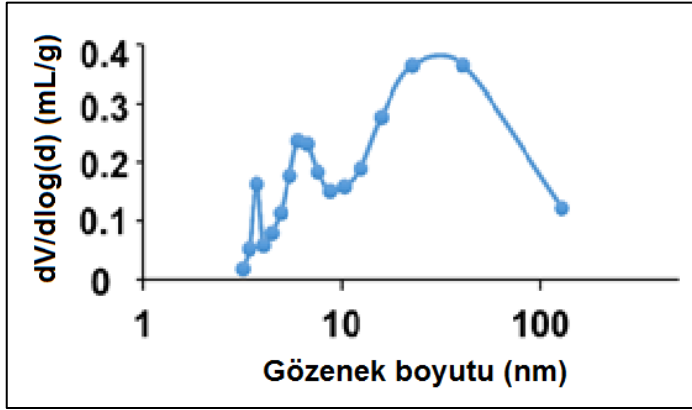
Şekil 4.5. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin haritalandırılmış fotoğrafı.

4.1.2. Yüzey Alanı Ölçümleri

Gözeneklilik dağılımı azot adsorpsiyon/desorpsiyon yönetimiyle elde edilmiştir. Elde edilen sonuç Çizelge 4.1'de verilmiştir. Sonuçlara baktığımızda gözenek yapısı ortalama boyutu 41 nm düzeyinde olup yapıda makro ve mezo gözenekler kendi göstermektedir. Sonuçlar üzerinden boyut dağılımına baktığımızda Şekil 4.6'da verilen bir dağılım oldu tespit edilmiştir. Manyetik silika partiküllerinin spesifik yüzey alanı 222 m²/g olarak belirlenmiştir. Bu değer partiküllerin yüksek bir yüzey alanına sahip olduğunu göstermektedir ve böylece silika mezo gözeneklerine yeterli yüksek sayıda demir oksit bağlanması beklenmektedir. Manyetik silika partiküllerin boyut dağılımı değişim katsayısına (CV) baktığımızda % 4.5 ile dar bir aralıkta kendini gösterdiği sonucuna varılabilmektedir. Bu değer boyut dağılımı değişim aralığının yüksek olmadığı bir yapının var olduğunu göstermektedir (Öğüt ve ark., 2019).

Çizelge 4.1. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin yüzey analizi.

CV (%)	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)	Gözenek Hacmi (cc/g)	SSA (m ² /g)
4.50	41.00	0.43	222.00



Şekil 4.6. Manyetik silika partiküllerin gözenek boyut dağılımı.

4.1.3. Elektron Spin Rezonans (ESR) Çalışmaları

Partikülün manyetik özelliğinin incelenmesi ESR spektrometresi yardımıyla yapılmıştır. Partikülde manyetik özellik gösteren bir bileşen bulunduğunun kanıtı olarak Şekil 4.7'de verilen ESR spektrumu gösterilmiştir. Spektrum incelendiğinde dışarıdan uygulanan manyetik alan şiddetinin değişimi ESR sinyalinde değişime neden olmaktadır. Öyle ki, alan arttıkça yerel manyetik alan değeri artarak sinyal şiddetinde artış eğilimi göstermektedir. Artma devam ederken bir tepe değerine ulaşan sinyal azalma eğilimi göstererek rezonans manyetik alan (H_r) değerinde sıfıra ulaşmaktadır. Manyetik alan artışın devam etmesiyle birlikte sinyal ters yönde artarak belirli bir tepe değerinden sonra azalarak sıfıra ulaşmaktadır. Bu aslında dışarıdan uygulanan mikro dalganın soğurma spektrumunun birinci türevidir.

Spektroskopik yarıma çarpanı olan g sabiti 2.3153 olarak elde edilmiştir. Bu değeri elde ederken rezonans şartının gerçekleştiği Eşitlik 4.1 kullanılmıştır.

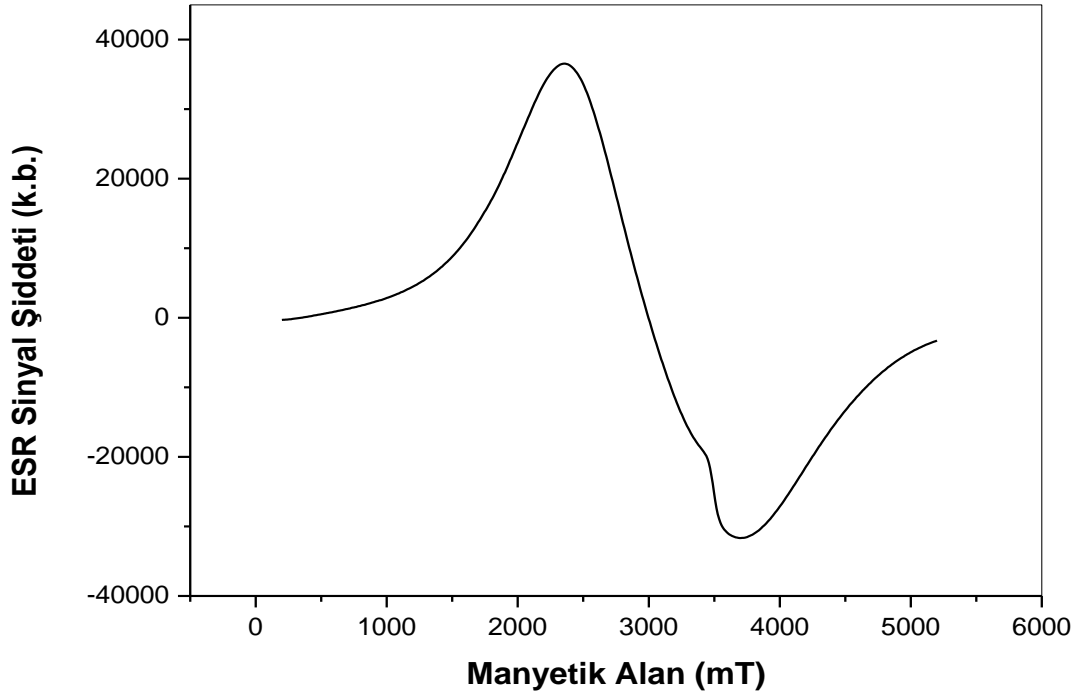
$$g = h.v / \beta.H_r \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte h (Planck sabiti) = 6.626×10^{-34} J.s, β (Bohr magnetonu) = 9.274×10^{-24} J/T, v (frekans) = 9.707×10^9 Hz ve H_r manyetik alanın rezonans değeridir.

Spektrumdan elde edilen bir diğer nicelik ise tepeden tepeye çizgi genişliğidir:

$$\Delta H_{pp} \cong 135 \text{ mT}$$

Önceki çalışmalar göstermiştir ki, düşük spin şiddeti içeren yapılarda Fe^{+3} iyonları için g sabitinin değişim aralığı 1.4 – 3.1 arasında olup, yüksek şiddet içeren yapılarda Fe^{+3} iyonları için g sabitinin değişim aralığı ise 2.0 – 9.7 değerlerindedir (Sarı ve ark., 2006). İncelenen örneğin belirlenen g değeri, referans değerler dikkate alındığından partikül içinde ferrimanyetik özellik gösteren Fe komplekslerinin bulunduğu söylenebilir. Spektrum incelendiğinde, ferrimanyetik karakterde Fe atomlarına sahip geniş sinyale ek olarak, 3500 G civarında ($g \sim 2.002$), şiddeti daha düşük olan ve paramanyetik karaktere sahip bir başka sinyal oluşumu daha gözlenmektedir. Bu sinyal demir atomlarının kaplandığı polimere ait olabileceği gibi, örneğin hazırlaması aşamasında kullanılan malzemelerden ve/veya safsızlıklardan da kaynaklanabilir.



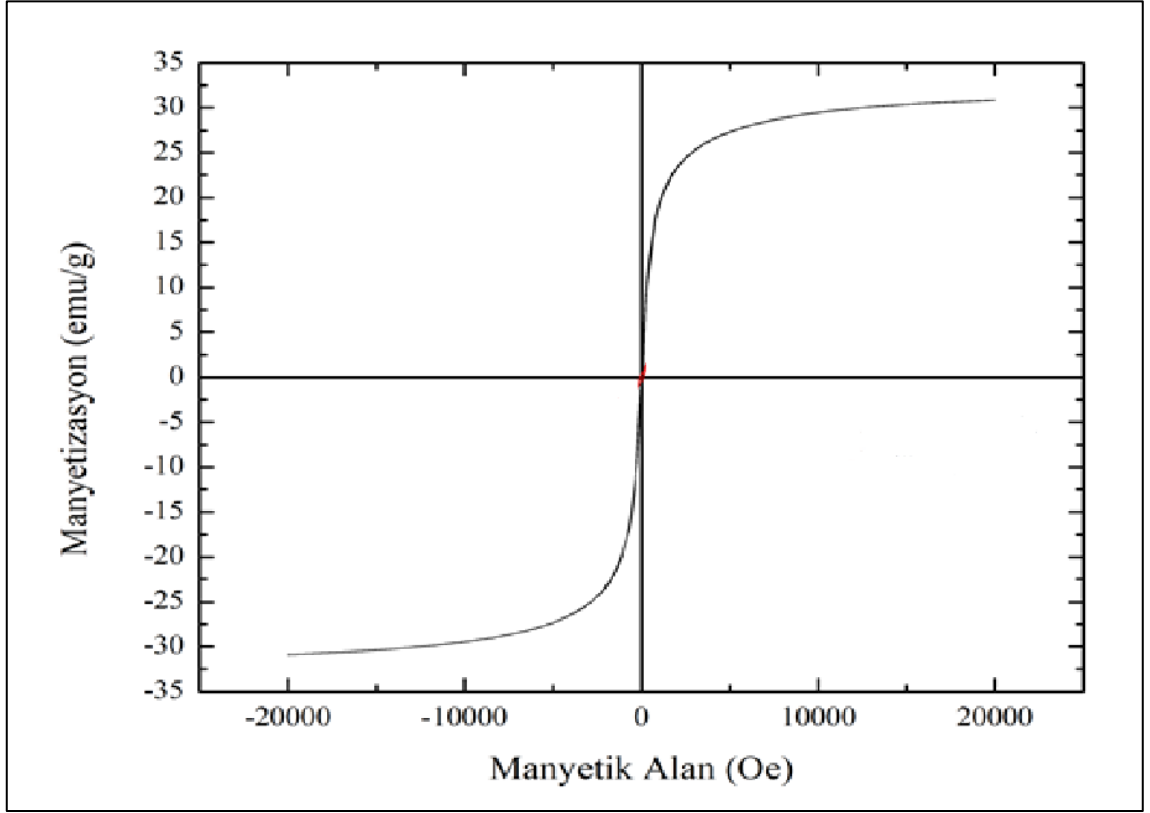
Şekil 4.7. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin ESR spektrumu.

4.1.4. Titreşimli Örnek Magnetometresi (VSM) Ölçüm Sonuçları

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin titreşimli örnek manyetometresi yöntemiyle oda sıcaklığında ölçümü sonucunda elde edilen farklı manyetik alan altında manyetizasyon değişim etkisi Şekil 4.8’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre partiküllerin doyum manyetizasyonu 30 emu/g olarak gözlenmiştir. Ayrıca herhangi bir değerde koerzivite gözlenmemiştir. Oda sıcaklığında partiküllerde zorlayıcı alanın olmadığı ve yüksek manyetizasyon değerini de dikkate aldığımızda spinleri rastgele yönelttiği süperparamagnetik davranış sergilediği söylenebilir.

Çizelge 4.2. Manyetizasyon analiz verileri.

Doyum Manyetizasyonu (M_s)	30 emu/g
Rezidual Manyetizasyon (M_r)	0 emu/g
Bağıl doyunluk remanansı ($m_r = M_r/M_s$)	0 emu/g
Zorlayıcı Manyetik Alan (H_c)	0 O _e



Şekil 4.8. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin VSM spektrumu.

Manyetik partiküllerden magnet sızıntısının olmadığına anlaşılması için partiküller yıkama, adsorpsiyon ve desorpsiyon çözeltileri içerisinde dört saat süre ile manyetik olarak karıştırılmış ve ardından çözeltiler grafit fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi ile demir analizine tabi tutulmuştur (ICE 3400 AAS, Thermo Fischer Scientific, Cambridge, UK). Ölçüm sonuçları yapıdan magnet sızıntısının olmadığını göstermiştir.

4.1.5. Elementel Analiz Sonuçları

Manyetik silika partiküllere bağlanan Cibacron Blue F3GA miktarı kükürt sitokiyometrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Farklı derişimlerde boya çözeltileri ile etkileştirilen manyetik silika partiküllere bağlanan boya ligand miktarı Çizelge 4.1'de verilmiştir. Manyetik silika partiküllerine Cibacron Blue F3GA bağlandıktan sonra yapı içerisinde tüm N, C, H ve S atomlarında artış görülmektedir. Bu da bu atomların bağlanan boyadan kaynaklı olduğu ve böylece boyanın varlığını

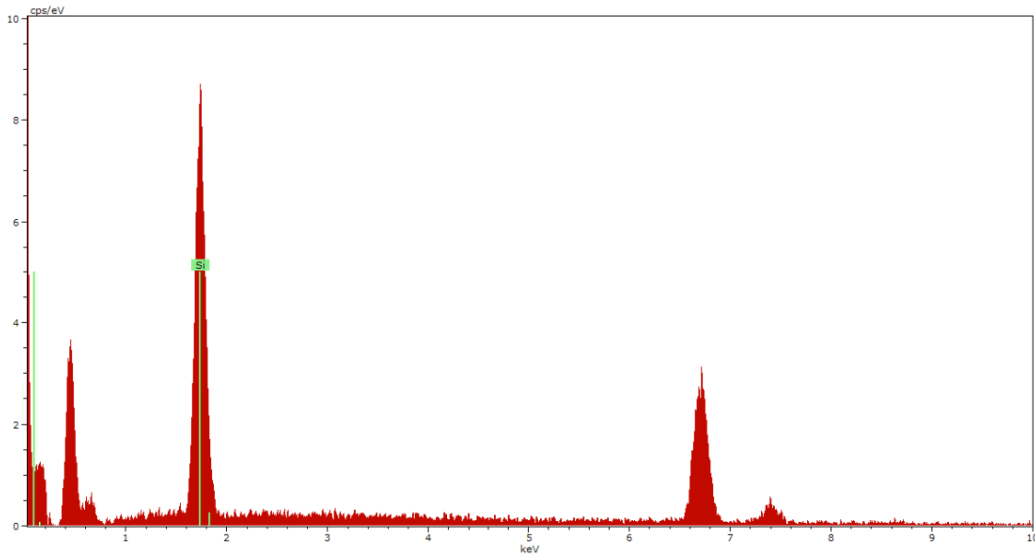
gösterir niteliktedir. Ayrıca boya derişiminin artması ile partiküllere bağlanan boya miktarının arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.3. Elementel analiz verileri.

Cibacron Blue F3GA Derişimi (mg/mL)	Bağlanan Cibacron Blue F3GA Miktarı (mmol/g)
0.5	0.13
1.0	0.28
3.0	0.62
5.0	0.76

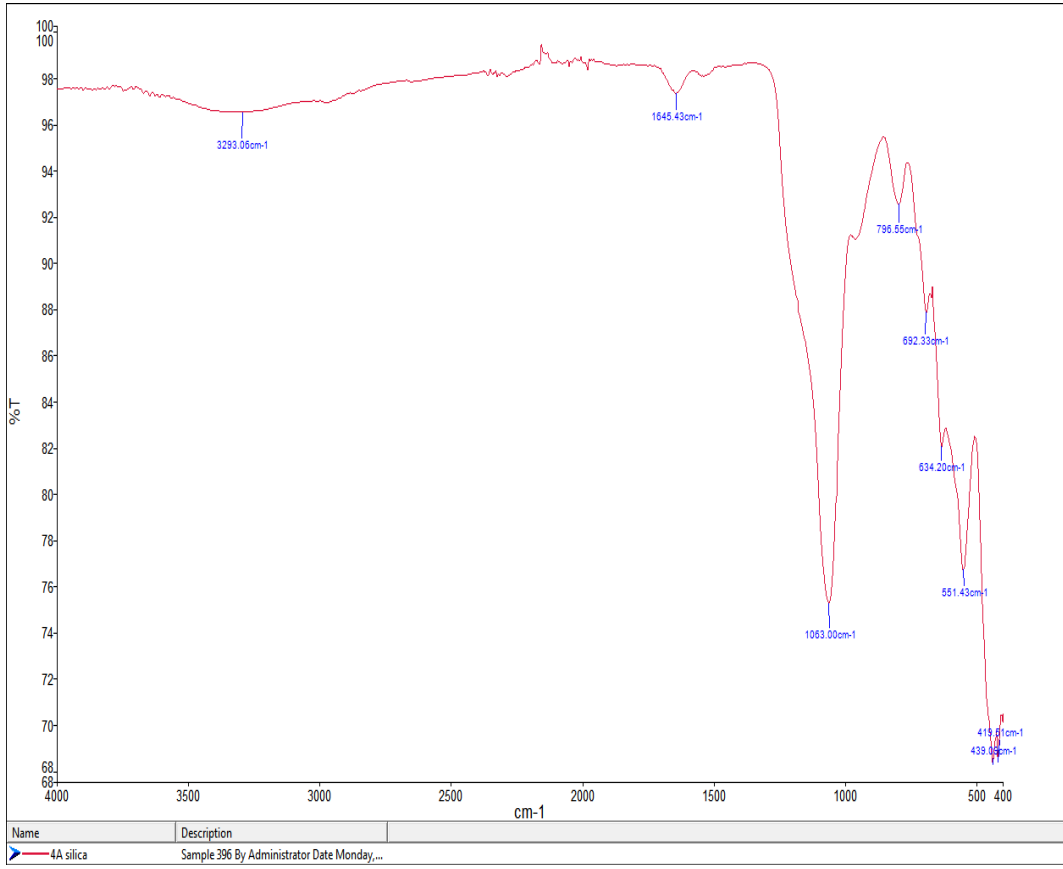
4.1.6. Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) Analizi

Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi EDX analizi sonucunda oluşan spektrumda partiküllerin içeriği ile ilgili bilgi sunarken belirgin bir şekilde kendini gösteren yapıdaki silika'dır. Böylece yapı içerisindeki silika kaplanma durumu da tespit edilmiş olmaktadır.

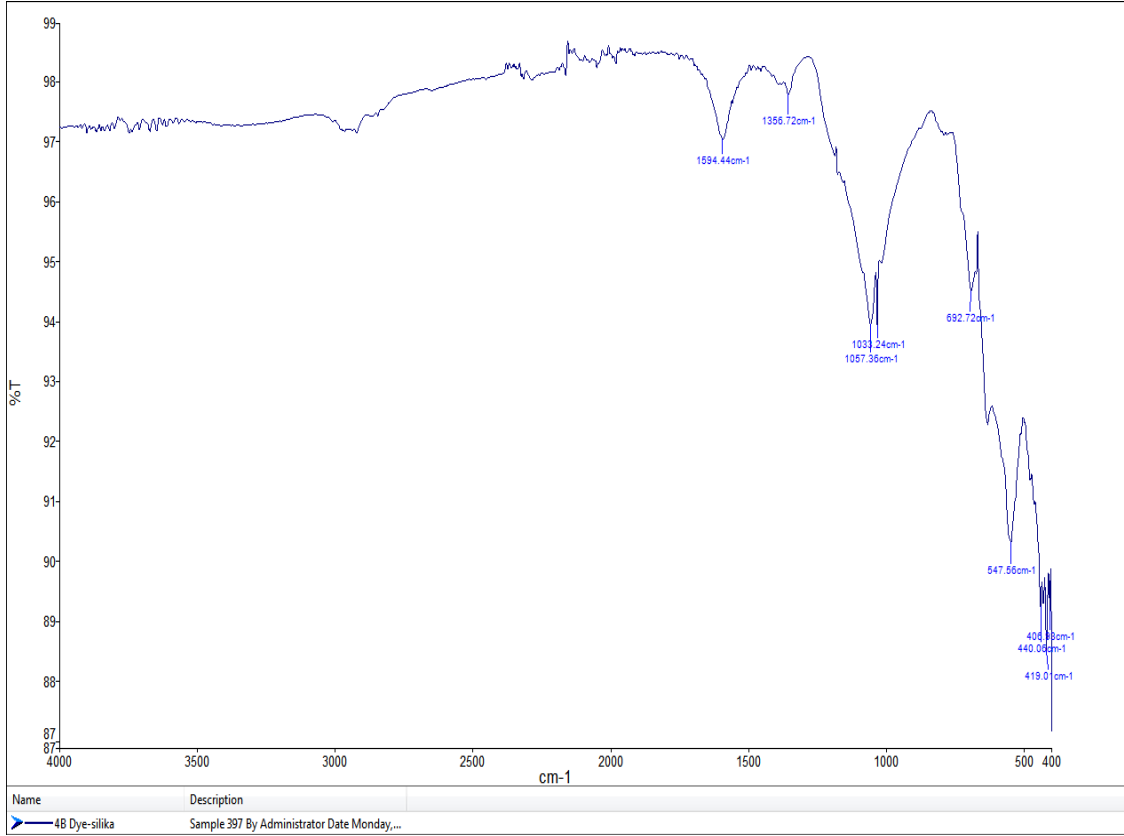


Şekil 4.9. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin EDX spektrumu.

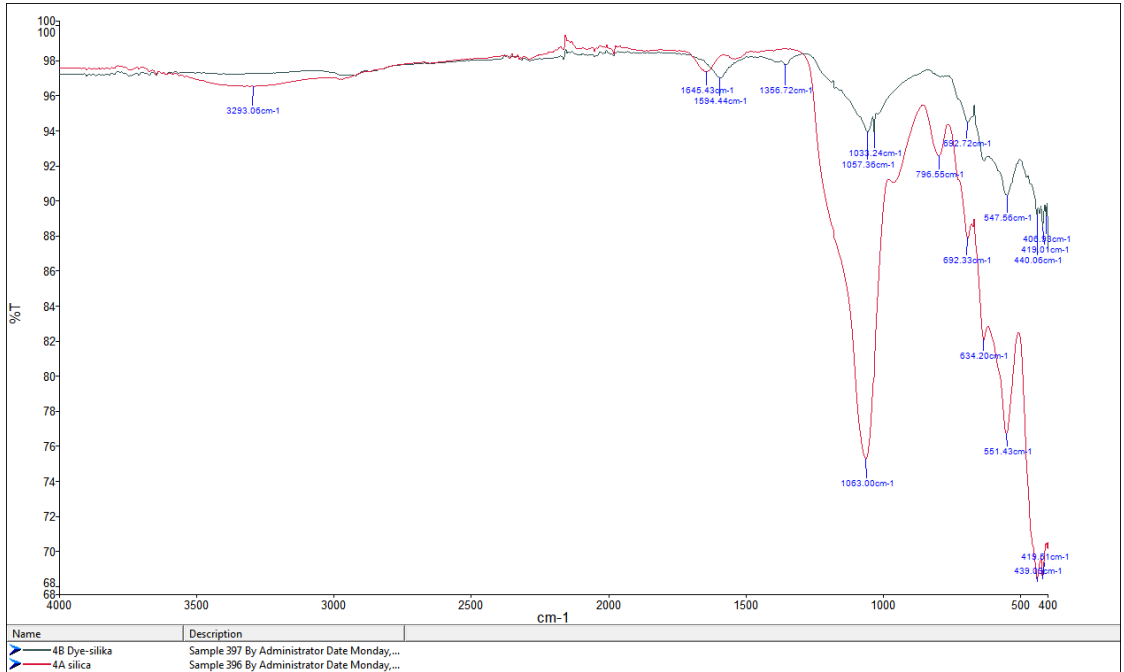
4.1.7. FTIR Analiz Sonucu



Şekil 4.10. Silika kaplı demir oksit partiküllerin FTIR spektrumu.



Şekil 4.11. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin FTIR spektrumu.



Şekil 4.12. Cibacron Blue F3GA takılmış ve takılmamış manyetik silika partiküllerin FTIR spektrumu.

Çizelge 4.4. FTIR spektrum sonucunda tespit edilen titreşim bantları.

	Dalga Sayısı(cm^{-1})	Karakteristik Bant
Silika kaplı demir oksit	3293 1645 1053 790 - 410	Si-O-Si O-H Si-O-Si Fe-O
Cibacron Blue F3GA takılı silika kaplı demir oksit	1594 1355 1057 1033 592 - 406	C=N S=O C-Cl S=O C-Cl

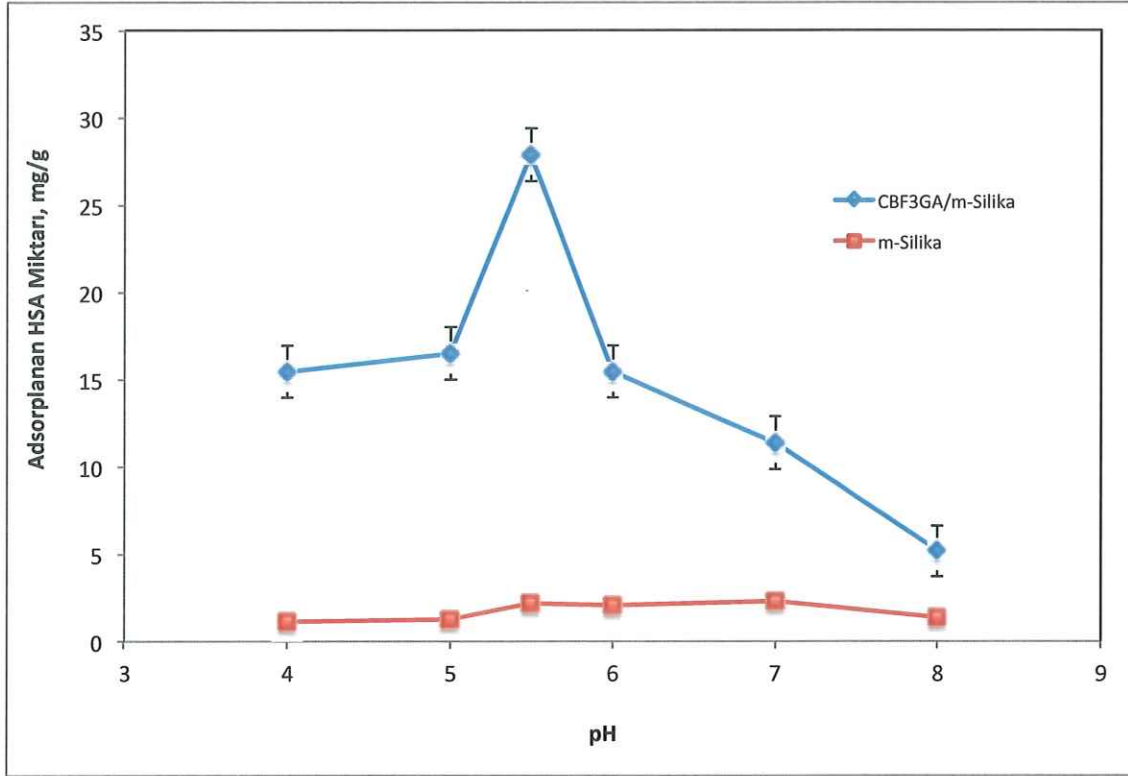
FTIR analizi sonucunda silika kaplı demir oksit malzemenin boya takılı olduğunda ve olmadığına elde edilen spektrumları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir. İki spektrum Şekil 4.12’de birlikte gösterilmektedir. 3293 cm^{-1} ve 1053 cm^{-1} yapı içerisindeki silanol gruplarının simetrik ve asimetric gerilme titreşimini temsil etmektedir. Bu da demir oksit parçacıklarının silika ile kaplandığının bir göstergesi olmaktadır. 1645 cm^{-1} dalga sayısında görülen bant hidroksil grupların içerisinde bulunan H bağlarının kendi arasındaki etkileşimlerinin yanı sıra demir iyonları ile -OH grupları arasında oluşan elektrostatik etkileşim de katkı sağlamaktadır. 790 cm^{-1} ile 410 cm^{-1} arasında kalan tüm diğer pikler demir ve oksijen arasındaki titreşim bantlarını göstermektedir. Bu da yapının manyetik özelliğinin bir kanıtını oluşturmaktadır.

Cibacron Blue F3GA takılı yapının spektrumuna baktığımızda Çizelge 4.4.’de gösterilen bantlar kendini göstermektedir. 1594 cm^{-1} dalga sayısındaki pik boyanın triazin halkasındaki karbon ile azot atomları arasındaki gerilme titreşimini temsil etmektedir. 1355 cm^{-1} ’deki pik S ve O arasındaki gerilme titreşimlerini göstermekte olup yapıya Cibacron Blue F3GA bağlanmasına bir ipucu teşkil etmektedir. Cibacron Blue F3GA bağlanmasına en büyük kanıt 1057 cm^{-1} ’de bariz olarak gördüğümüz Cl içeren amino benzen halkasındaki C-Cl gerilme titreşim bandıdır. Bu bant ve beraberindeki $592 \text{ cm}^{-1} - 406 \text{ cm}^{-1}$ bant aralığında görülen zayıf şiddetteki diğer bantlar ile birlikte yapıya Cibacron Blue F3GA boya maddesi katılımının birer göstergesi olarak ifade edilebilir.

4.2. Cibacron Blue F3GA Takılı Manyetik Silika Partiküllere HSA Adsorpsiyonu

4.2.1. pH Etkisinin İncelenmesi

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyonu pH 4.0-8.0 arasında incelenmiştir.



Şekil 4.13. pH değişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi. Çalışma koşulları: HSA derişimi: 1.0 mg/mL, Partikül miktarı: 25 mg, Sıcaklık: 25°C, Zaman: 2 saat.

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi HSA adsorpsiyonu pH'nın artması ile artmış ve pH 5.5 değerinde en yüksek adsorpsiyon miktarı gözlenmiştir (27.82 mg/g). Daha yüksek pH değerlerinde HSA adsorpsiyonunun azaldığı gözlenmiştir.

Adsorpsiyon etkileşmelerinden biri olan elektrostatik kuvvet değişen asidik ve alkali koşullarda kendini daha belirgin olarak göstermektedir. Bu sebeple en yüksek noktaya kadar olan etkileşimde HSA molekülü daha çok pozitif yüklü olduğundan Cibacron Blue F3GA'nın yüklü grupları arasındaki elektrostatik

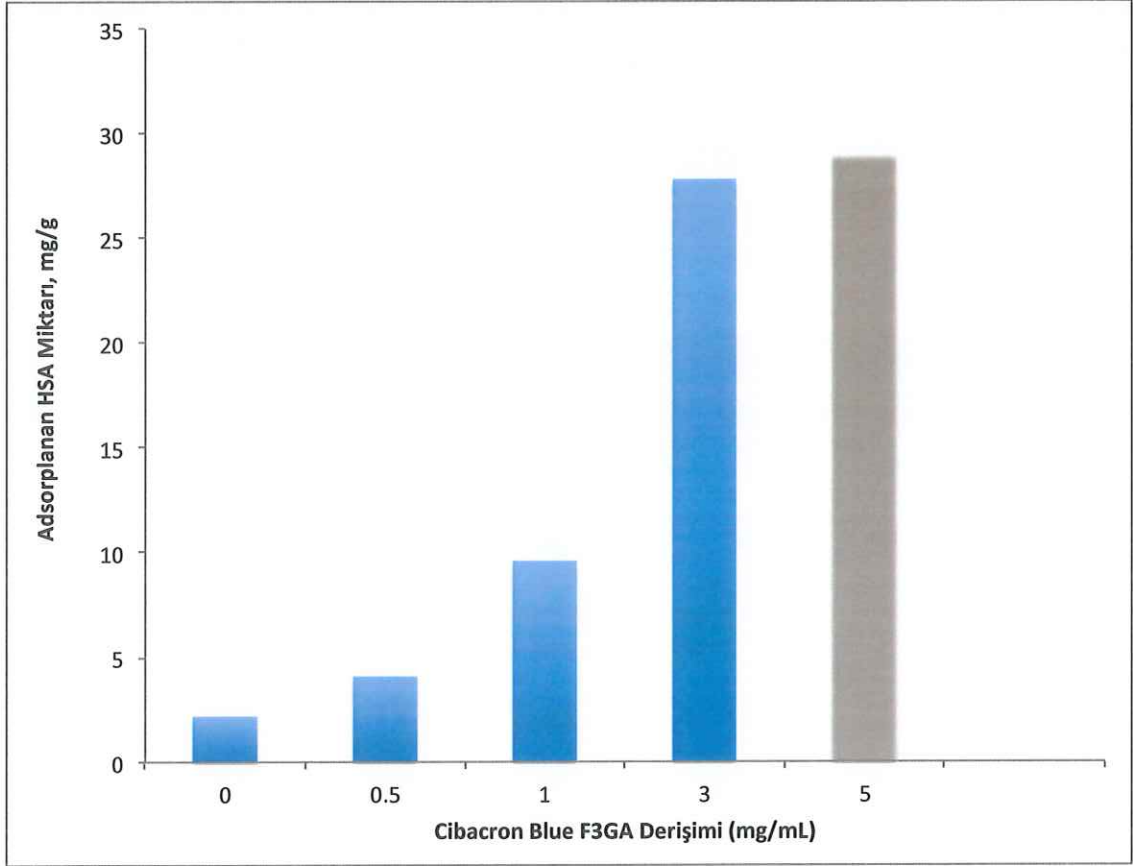
çekim sonucunda artış göstermiştir. Çekim etkisi pH 5.5 değerinde maksimum noktaya ulaşmıştır ki bu pH değeri HSA'nın izoelektrik noktasıdır. Bu noktada net yük miktarı sıfırdır ve HSA molekülü boya ligand ve moleküller arası etkileşimler için en uygun konformasyondadır. Böylece adsorpsiyon artış göstermiştir. İzoelektrik noktadan sonra artan pH değerinde bir azalma eğilimi görülmektedir. Bu azalmada HSA molekülünün izoelektrik noktadan sonra sahip olduğu negatif yükü ile Cibacron Blue F3GA boyasının negatif yük grupları arasındaki elektrostatik itme kuvveti etkili olmaktadır. Bu etkileşimlerin yanı sıra HSA'nın amino asit yan zincirleri ve Cibacron Blue F3GA boyasının benzen halkalarının iyonlaşma durumları ile HSA molekülünün değişen pH koşullarında konformasyonunda ve dolayısıyla etkileşim noktalarının değişimi de adsorpsiyonda etkili olmuştur. Buna ilaveten şunu da eklemek gerekir ki, etkileşimler spesifik olarak gerçekleşmiş olsa da spesifik olmayan etkileşimler de bağlanma dinamiğine katkı sunmaktadır ve spesifik olmayan etkileşimler pH değerinden bağımsız olarak her durumda mevcut olmaktadır. Bu çalışmalarda boya bağlanmamış manyetik silika partiküllere de aynı koşullarda HSA bağlanması incelenmiştir. Grafikten görüleceği üzere boya ligand içermeyen partiküllere HSA bağlanması ihmal edilebilir düzeydedir. Bu da etkileşimin boya molekülleri üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Böylece diğer koşullar altında gerçekleştirilecek adsorpsiyon çalışmaları için kullanılacak pH değeri 5.5 (asetat tamponu) olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Boya Ligand Miktarının Etkisi

Proteinlerin afinite ayırma işlemlerinde ligand yükleme miktarı önemli bir parametredir. Bu çalışmada bağlanan Cibacron Blue F3GA miktarının etkisinin belirlenmesi için farklı derişimlerde boya çözeltisi ile etkileştirilen manyetik silika partiküllere bağlanan boya miktarının HSA adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.14'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 3 mg/mL değerine kadar boya derişiminin artması ile bağlanan HSA miktarı artmakta daha yüksek boya derişimlerinde ise bağlanan boya miktarı ve dolayısıyla bağlanan HSA miktarında önemli bir artış gözlenmemektedir. Bu durum yüzeyde boya ligandın bağlanabileceği grupların doygunluğa ulaşmış olması ile açıklanabilir. Dolayısıyla diğer çalışmalarda 3

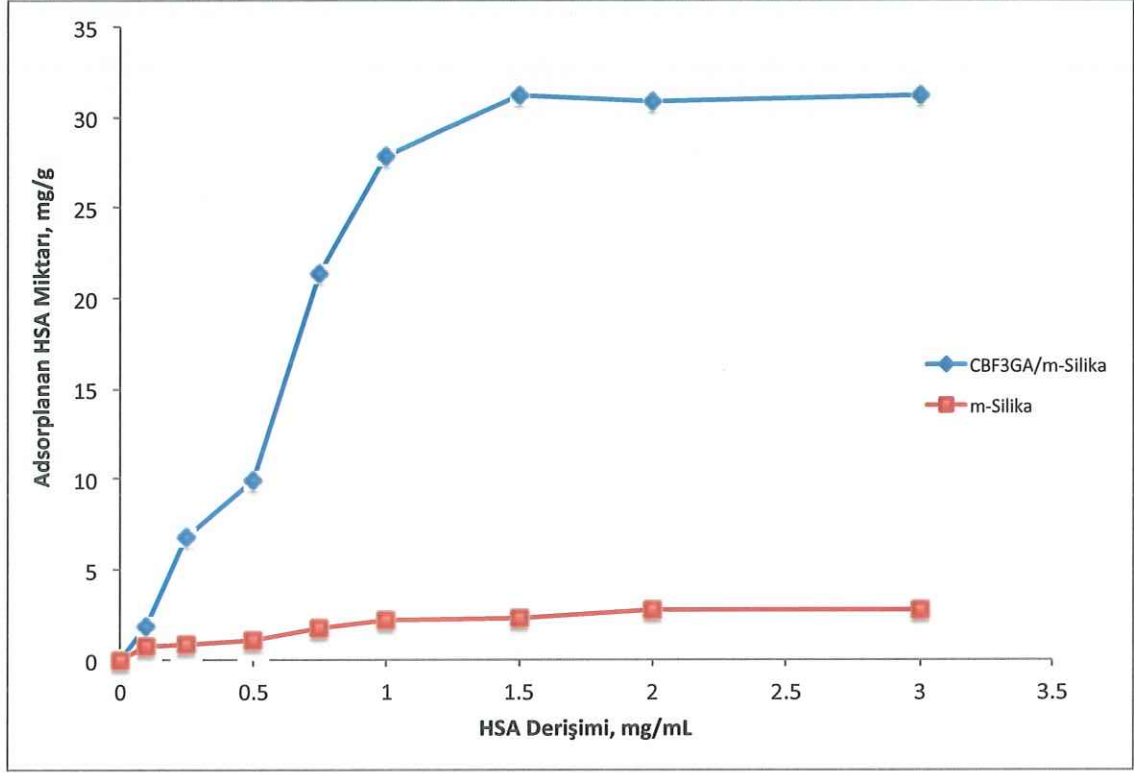
mg/mL Cibacron Blue F3GA çözeltisi ile boyanan manyetik silika partiküller kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Cibacron Blue F3GA miktarının HSA adsorpsiyonuna etkisi.

4.2.3. HSA Derişimi Etkisinin İncelenmesi

HSA derişiminin adsorpsiyon üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 0.10-3.50 mg/mL arasında değişen derişimlerde HSA çözeltileri pH değeri 5.5'de Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerle etkileştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'de verilmiştir.



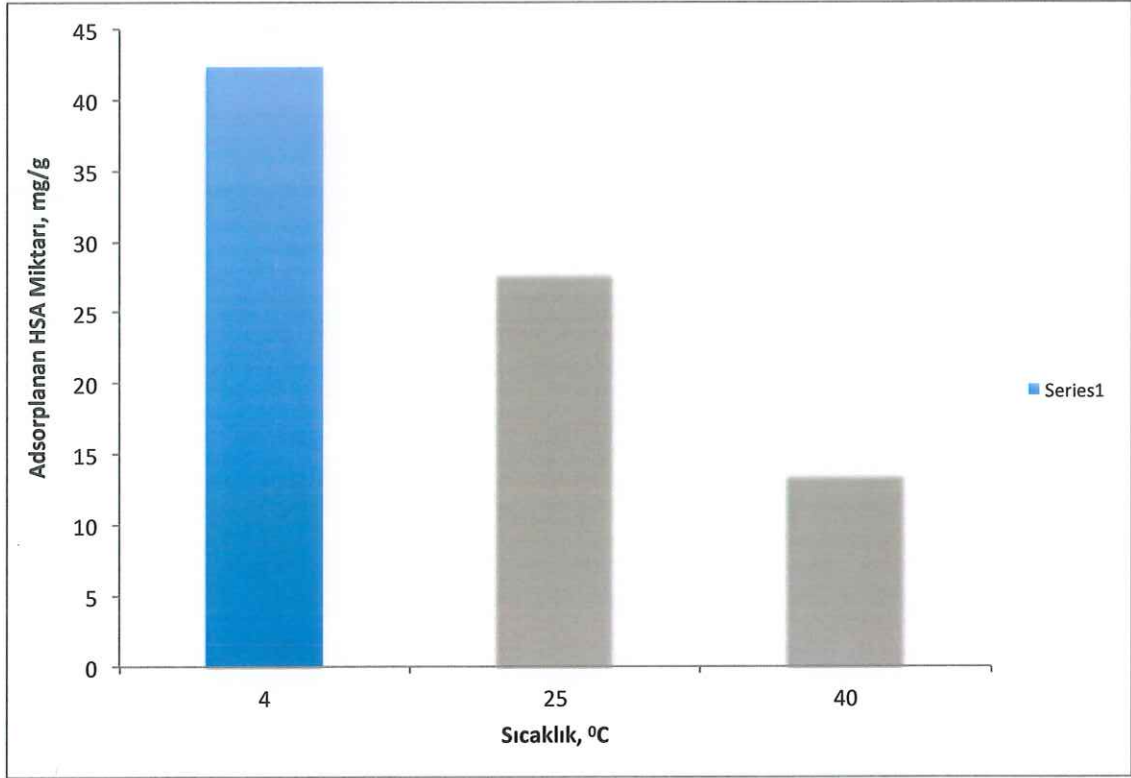
Şekil 4.15. HSA derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi. Çalışma koşulları: pH: 5.5, Partikül miktarı: 25 mg, Sıcaklık: 25°C, Zaman: 2 saat.

Şekil 4.15'de görüldüğü gibi HSA derişimindeki artış ile adsorplanan HSA miktarı da artmıştır. 1.5 mg/mL HSA başlangıç derişiminde adsorplanan HSA miktarı en yüksek değere ulaşmış (31.22 mg/g) ve bu değerden sonra derişimin artmasının adsorpsiyon miktarına önemli bir etkisi olmamıştır.

Ortamdaki HSA derişimi adsorpsiyon için sürücü kuvvettir. Dolayısıyla HSA derişiminin artması ile adsorplanan HSA miktarının artması beklenen bir durumdur. Fakat bu bağlanma bölgeleri belirli bir doyum noktasına ulaştığında derişim artışı etkisini göstermemektedir. Boya ligand bağlanmamış manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyonu da HSA derişiminin artması ile artış gösterme eğiliminde olmakla birlikte toplam adsorpsiyon miktarı ihmal edilebilir düzeydedir.

4.2.4. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Sıcaklığın Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyonu üzerindeki etkilerini incelemek için çalışmalar +4°C, +25°C ve +40°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir.



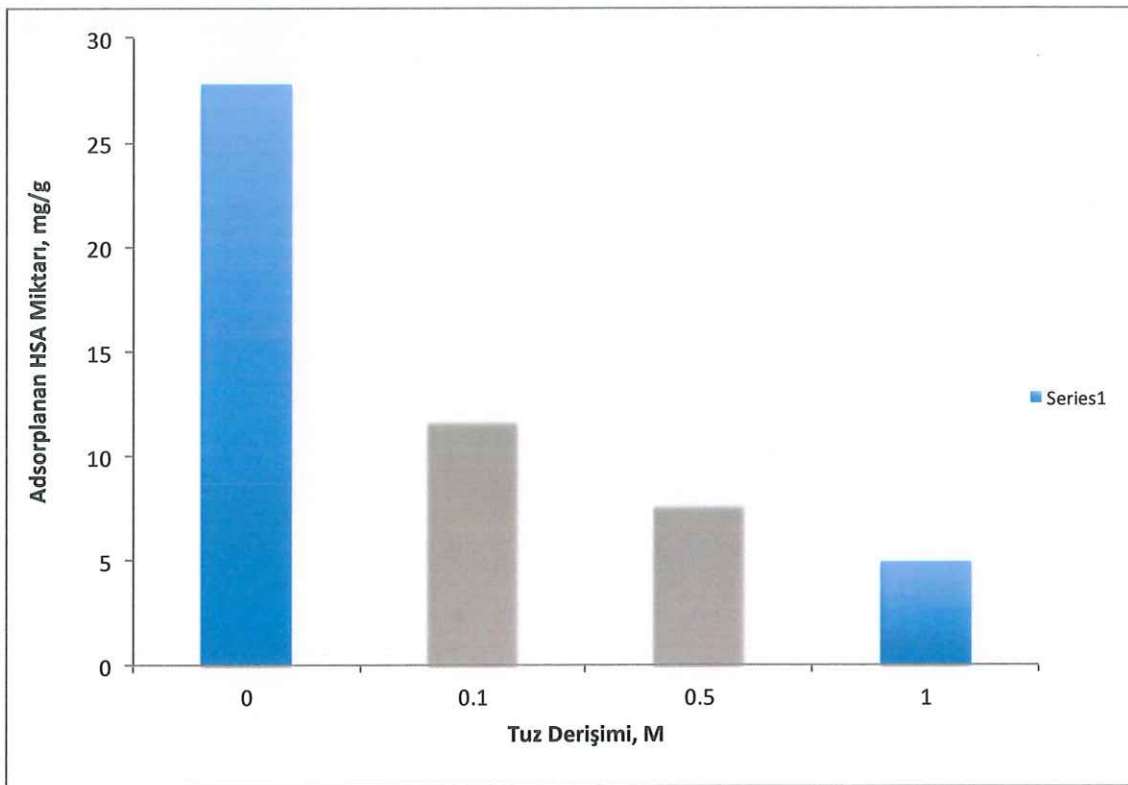
Şekil 4.16. Sıcaklık değişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi. Çalışma koşulları: pH: 5.5, HSA derişimi: 1.0 mg/mL, Partikül miktarı: 25 mg, Zaman: 2 saat.

Şekil 4.16 incelendiğinde sıcaklık artışının HSA adsorpsiyon miktarını azalttığı gözlenmiştir. Protein ve ligand arasındaki etkileşimlerden hidrofobik katkılar sıcaklık artışı ile daha belirgin hale gelerek artış ile orantılı bir şekilde değişmektedir. Sıcaklık artışı, protein doğal yapıları üzerinde etki ederek tekrar düzenlenmesini sağlamakta ve böylece adsorpsiyon kapasitesini etkilemektedir. Bunun yanı sıra adsorpsiyon işlemi ekzotermik bir etkileşim olduğundan sıcaklık artışı ile ters orantılı olacak şekilde azalma eğilimi göstermektedir. Bu çalışmada sıcaklık artışının adsorpsiyon miktarını azalttığı gözlenmiştir.

Dolayısıyla Cibacron Blue F3GA ile HSA molekülleri arasındaki etkileşimde hidrofobik etkileşimden daha çok elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu söylenebilir.

4.2.5. İyonik Şiddet Etkisinin İncelenmesi

Ortamın iyonik şiddetinin HSA adsorpsiyonuna etkisi 0 ve 1.0 M NaCl içeren adsorpsiyon ortamları kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.17'de elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Şekil 4.17. İyonik şiddetin adsorpsiyon üzerine etkisi. Çalışma koşulları: HSA derişimi: 1.0 mg/mL, Sıcaklık: 25°C, Partikül miktarı: 25 mg, Zaman: 2 saat.

Çalışmalar sonucunda iyonik şiddetin artmasının adsorpsiyon kapasitesini azaltıcı yönde etkisi gözlenmiştir. En yüksek adsorpsiyon miktarı çözelti içerisinde tuz bulunmadığı durumda elde edilmektedir. Tuz derişiminin 0.1 M değerinden 1.0 M değerine artırılmasıyla adsorpsiyon miktarının % 58.3 oranında düştüğü belirlenmiştir. Tuzun adsorpsiyon üzerindeki ters etkisi, iyonik şiddet artışının çözeltide Na iyonlarının varlığının çoğalması ve bunun da

Cibacron Blue F3GA üzerinde bulunan sulfonat gruplarının üzerinde birikerek yapıyı nötralize etmesi yoluyla ligand ve protein arasındaki etkileşimleri azaltması ile açıklanabilir. Benzer şekilde Na iyonları yapılar arasında Debye perdeleme etkisi olarak bilinen bir durum yaratarak etkileşimlerin azalmasına yol açmış ve böylece adsorpsiyon miktarını azaltmıştır.

Adsorpsiyon miktarının azalmasına katkı sağlayan bir diğer etki iyonik şiddetin artması ile proteinin doğal yapısının değişkenlik göstermesidir. İyonik şiddetin artmasının protein ve ligand arasındaki etkileşim üzerinde yansımalarının diğer yolu da var olan tuz köprülerinin iyonik şiddet içinde deforme olmasıdır.

4.2.6. Adsorpsiyon İzotermi

Proteinlerin adsorbentler ile etkileşimlerini karakterize için kullanılan yöntemlerden biri de adsorpsiyon izotermelerini incelemektir. Bu amaçla Freundlich ve Langmuir izotermi kullanılmaktadır.

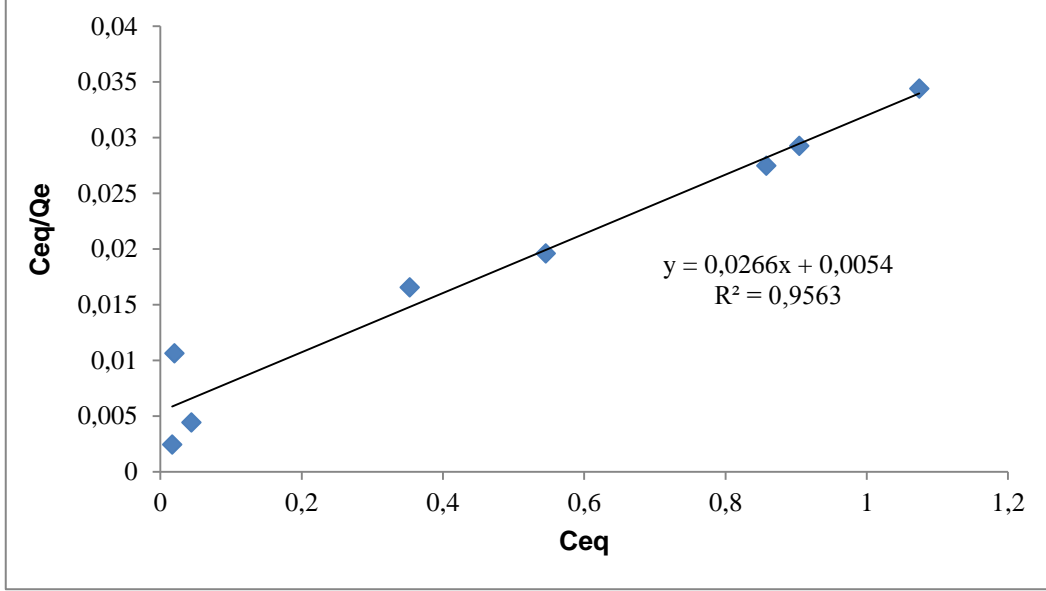
Langmuir adsorpsiyon izotermi, benzer enerji değerlerinde olan bağlanma bölgeleri ile etkileşimde olan moleküllerin yalnızca tek biri ile bağlanmasıyla oluşan modeldir. Dolayısıyla homojen bir dağılım gösterdiği varsayılır. Burada moleküllerin diğer bölgeler ile olası etkileşimleri dahil edilmez. Langmuir yaklaşımı Eşitlik 4.2'de verildiği şekliyle kullanılmaktadır.

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{maks.} \cdot b) + C_{eq}/Q_{maks} \quad (4.2)$$

Verilen eşitlikte C_{eq} çözelti içerisinde bulunan HSA'nın denge derişimini (mg/mL), Q , adsorplanan HSA miktarını (mg/g), Q_{maks} maksimum HSA adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) ve son olarak b değeri de Langmuir sabitini (mL/mg) göstermektedir. C_{eq}/Q değerinin C_{eq} değerine karşı grafiğinin eğimi yoluyla Q_{maks} değerine ve y eksinini kestiği noktadan $Q_{maks} \cdot b$ değerine buradan da b değerine ulaşılabilir (Andaç ve ark., 2014).

Deneyimiz için Langmuir izotermi gösteren grafik Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Grafik yardımıyla teorik olarak hesaplanabilen maksimum adsorpsiyon katsayısı

Q_{maks} değeri 37.59 mg/g ve Langmuir sabiti ise 4.93 mL/mg olarak bulunmuştur. R^2 olarak ifade edilen korelasyon katsayısı 0.98 değerindedir.



Şekil 4.18. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin Langmuir İzotermi

Freundlich adsorpsiyon yaklaşımında kullanılan matematiksel ifade Eşitlik 4.3'de verilmiştir.

$$Q_{eq} = K_f C_{eq}^{1/n} \quad (4.3)$$

Eşitlikte C_{eq} çözelti içerisinde bulunan HSA'nın denge derişimi (mg/mL), K_f adsorpsiyon kapasitesinin bir ölçütü, $1/n$ adsorpsiyon şiddetinin göstergesi ve Q_{eq} ise dengedeki adsorbent derişimini (mg/g) temsil etmektedir. Eşitliğin her iki tarafını logaritmik olarak düzenlersek Eşitlik 4.4'de verilen halini alır.

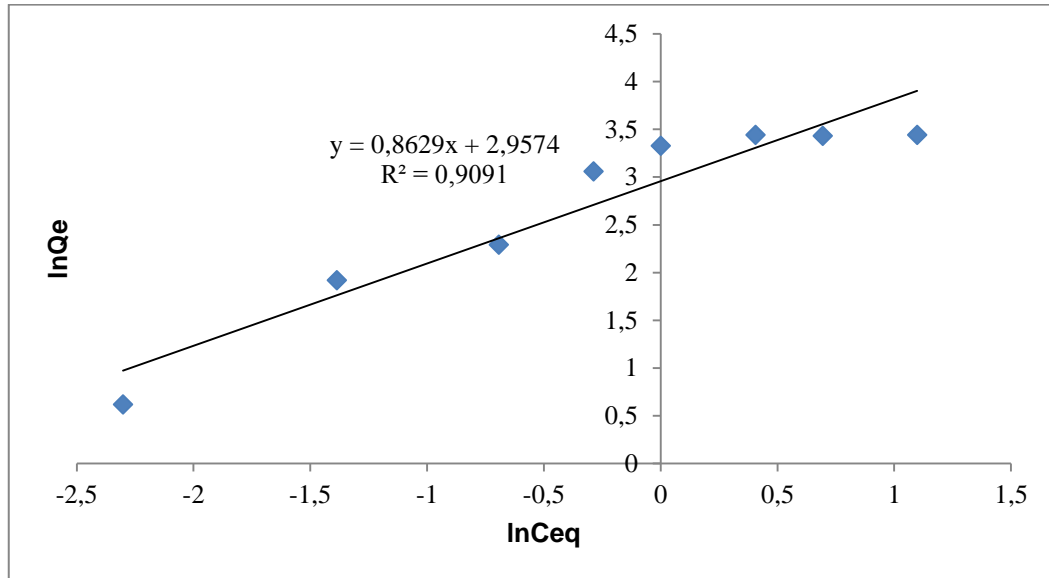
$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.4)$$

Bu denkleme göre $\ln C_{eq}$ 'nin $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiği Şekil 4.19'da verilen şekilde tespit etmiş oluruz. Elde edilen bu doğrunun y eksenini kestiği noktadan K_f

değerine, doğrunun eğimini bularak $1/n$ değerine ulaşılabilmektedir (Andaç ve ark., 2014).

Hesaplanan tüm değerler Çizelge 4.5'de gösterilmektedir. Değerlere bakıldığında korelasyon katsayıları bakımından karşılaştırdığımızda bu çalışma Şekil 4.20'den de görüleceği gibi Langmuir adsorpsiyon yaklaşımına daha fazla uygunluk sağlamaktadır ve maksimum adsorpsiyon değeri deneysel olarak elde edilen değerlere daha yakındır.

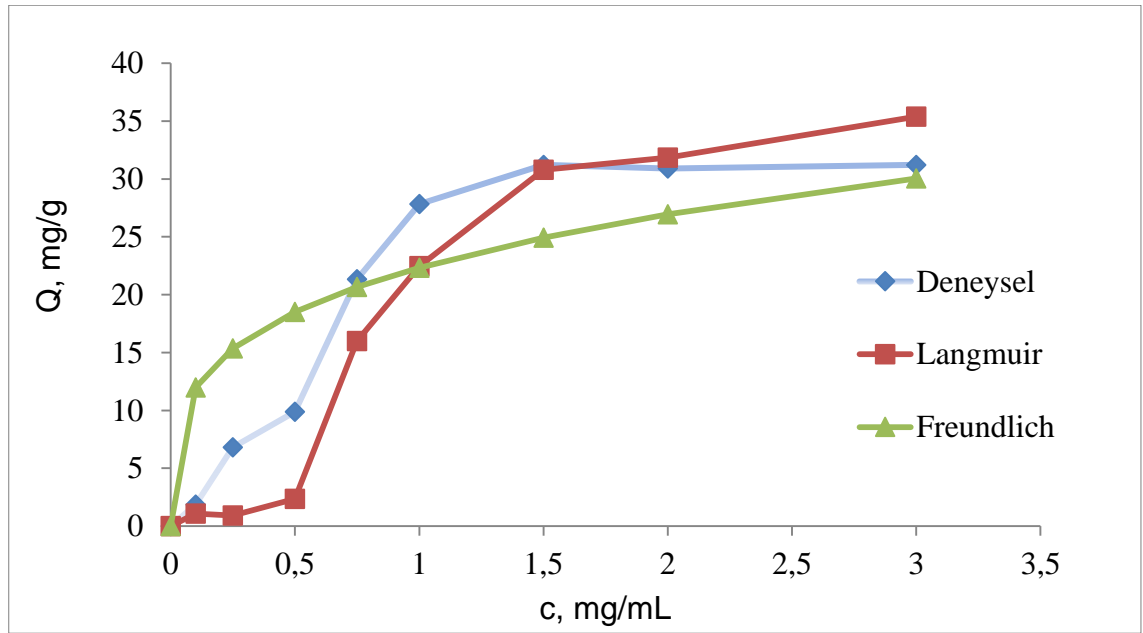
Bu sonuçlara göre sistemin homojen, manyetik silika yüzeyinin Cibacron Blue F3GA ile takılı olduğu, tüm albümin moleküllerinin Cibacron Blue F3GA ile bağlandığı ve adsorplanan albüminler arası bir etkileşim olmadığı sonucuna varılabilir (Uygun, 2014).



Şekil 4.19. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin Freundlich İzotermi.

Çizelge 4.5. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin Langmuir ve Freundlich İzotermi.

Deneysel	Langmuir Değerleri			Freundlich Değerleri		
	Q (mg/g)	Qmaks (mg/g)	b(mL/mg)	R ²	K _f	n
31.22	37.59	4.93	0.9782	18.17	1.17	0.9091



Şekil 4.20. Deneysel verilerin izotermi ile karşılaştırılması.

4.2.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Kinetik modeller, birinci ve ikinci dereceden olmak üzere iki şekilde adsorpsiyon işlemlerinde kimyasal reaksiyonlar ile kütle transferi gibi niceliklerin belirlenmesinde önemli yaklaşımdır. Bu amaçla pseudo (yalancı) birinci ve ikinci derece modellerden yararlanılmıştır. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği herhangi bir çözelti içerisinde çözünen maddeler için adsorpsiyonu incelemek için kullanılan en pratik yaklaşımdır. Bu yaklaşımın matematiksel modeli Eşitlik 4.5'de verildiği gibidir.

$$dq_t/dt = k_1(Q_{eq} - q_t) \quad (4.5)$$

Eşitlikteki $Q_{eq}-q_t$ değerleri denge halinde ve bir t anında mg/g cinsinden adsorplanan madde miktarını ve k_1 değeri ise $1/dk$ cinsinden pseudo birinci dereceden adsorpsiyon hız sabitini göstermektedir ($t = 0$ anında $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$).

$t = 0$ zamanında $q_t = 0$ ve $t = t$ zamanında $q_t = q_t$ sınır değerleri altında integral alınıp eşitliği logaritmik olarak tekrar düzenlendiğinde aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\ln(Q_{eq}-q_t) = \ln(Q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.6)$$

Eşitlik 4.6'nın $t - \ln(Q_{eq}-q_t)$ grafiğine baktığımızda eğim bize $k_1/2.303$ niceliğini, y eksenini kestiği yere ise $\ln Q_{eq}$ niceliğine ulaşılmaktadır. Eşitlik 4.6'nın grafiği Şekil 4.21'de verilmektedir.

Pseudo ikinci dereceden denklem ise aşağıdaki haliyle ifade edilmektedir.

$$dq_t/dt = k_2 (Q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.7)$$

Denklem içerisinde verilen k_2 değeri $g.mg^{-1}.dk^{-1}$ cinsinden hız sabitini vermektedir. Yine benzer şekilde $t = 0$ zamanında $q_t = 0$ ve $t = t$ zamanında $q_t = q_t$ sınır değerleri uygulanıp denklem tekrar düzenlenirse aşağıdaki şekilde haline ulaşılabilmektedir.

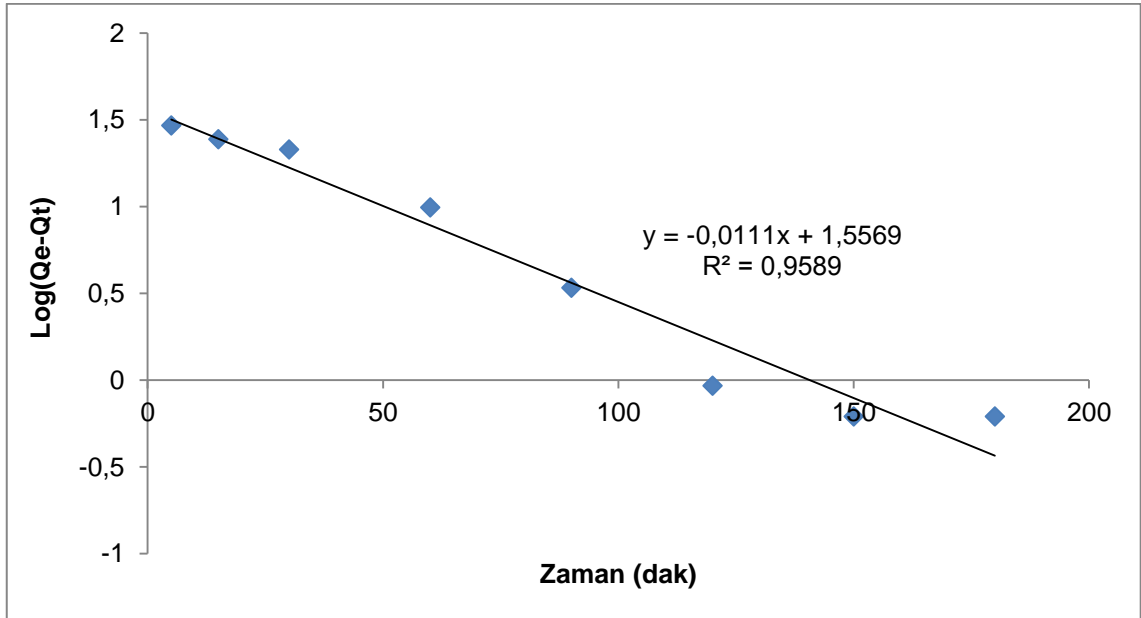
$$(t/q_t) = (1/k_2 Q_{eq}^2) + (1/Q_{eq})t \quad (4.8)$$

$t - t/q_t$ grafiğine bakarsak y eksenini kestiğini noktadaki değeri $1/k_2 Q_{eq}^2$ değerini ve eğim değeri ise $1/Q_{eq}$ niceliğini verecektir. Eşitlik 4.8'in grafiği Şekil 4.22'de verilmektedir (Andaç ve ark., 2014).

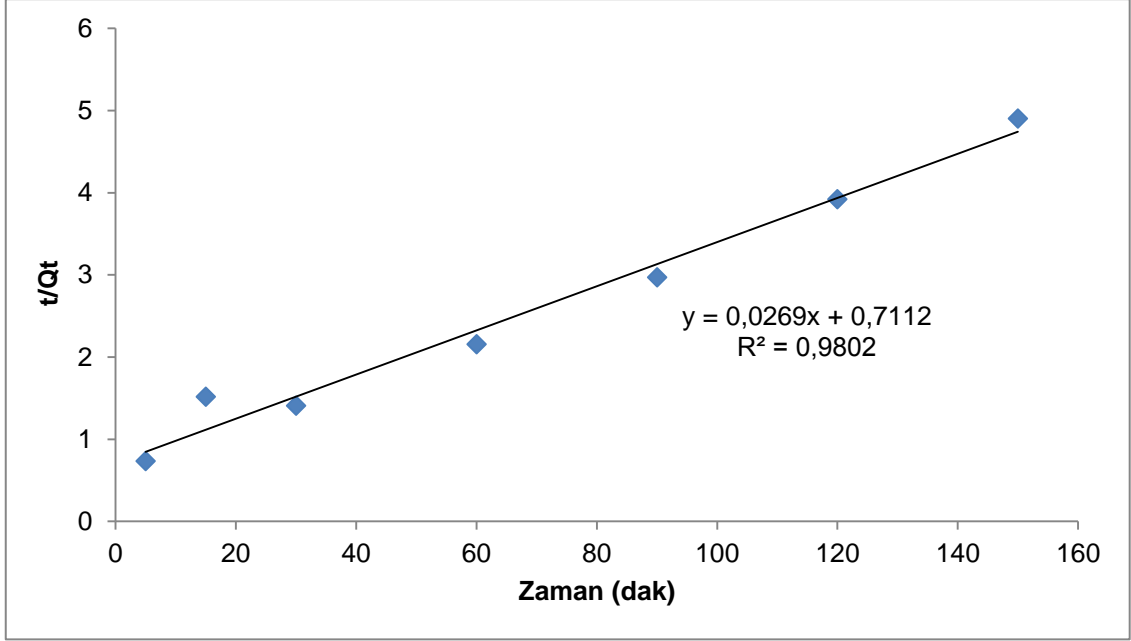
Pseudo birinci ve ikinci dereceden kinetiklerden elde edilen grafikler yardımıyla hesaplanan tüm değerler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin pseudo birinci dereceden ve pseudo ikinci dereceden kinetik hesapları.

Başlangıç Derişimi mg/mL	Deneysel Q_{eq} (mg/g)	Pseudo birinci dereceden kinetik değerleri			Pseudo ikinci dereceden kinetik değerleri		
		Q_{eq} (mg/g)	k_1 (dk ⁻¹)	R^2	Q_{eq} (mg/g)	k_2 (g/mg. dk)	R^2
1.50	31.22	4.71	0.0094	0.9589	38.16	0.0077	0.9802



Şekil 4.21. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin pseudo birinci dereceden kinetiği.

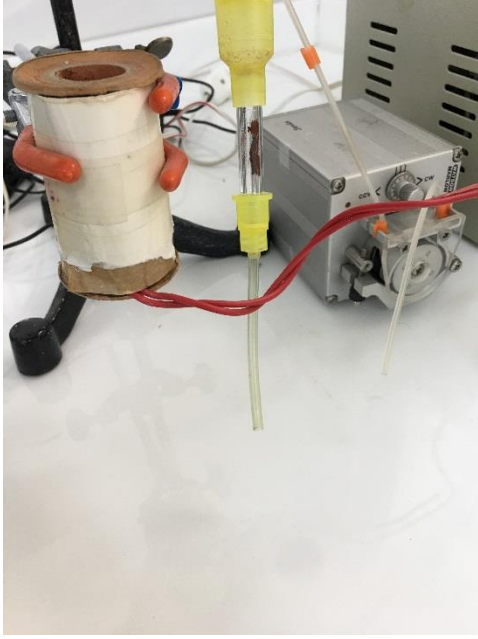


Şekil 4.22. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin pseudo ikinci dereceden kinetiği.

Çizelge 4.6'da gösterilen hesaplanan değerlere bakıldığında sistemimiz için ikinci dereceden kinetik yaklaşımın deneysel veriler ile uyduğu belirlenmiştir. Böylece adsorpsiyonun kimyasal olarak kontrollü gerçekleştiğinin göstergesidir.

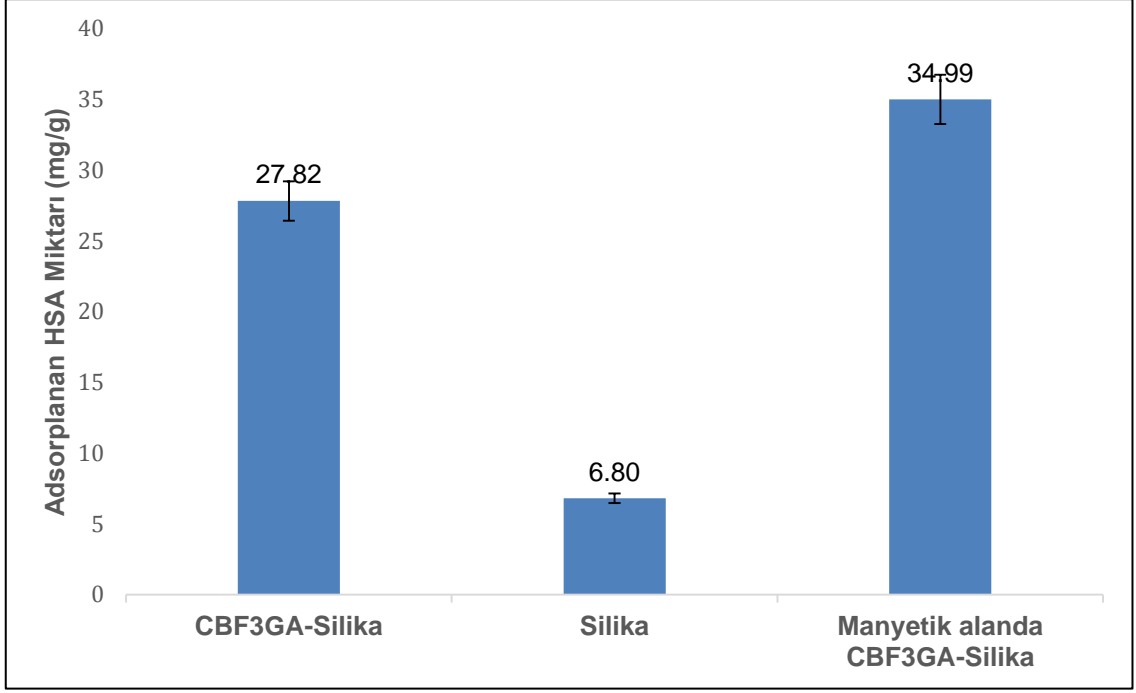
4.2.8. Manyetik Alan Varlığında HSA Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Değişen fiziksel şartlar altında adsorpsiyon koşulları incelenerek elde edilen optimal durumlar baz alınarak Şekil 4.23'deki deney düzeneği kurularak manyetik alan varlığı altında HSA adsorpsiyonu incelenmiştir



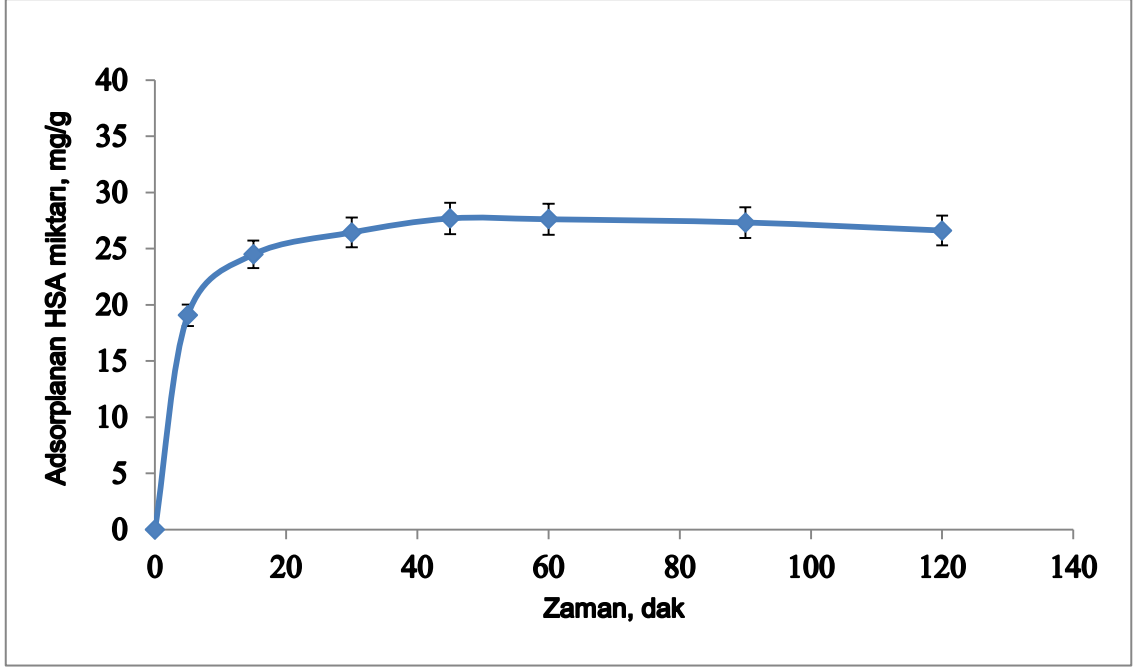
Şekil 4.23. Manyetik alan varlığında HSA adsorpsiyonunun incelenmesi için kullanılan deney düzeneği.

Adsorpsiyon işlemi 2 saat boyunca 0.5 mL/dk akış hızında sürdürülerek süreç sonunda adsorpsiyon miktarları tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Silika kaplı manyetik partiküller ile yapılan incelemede adsorpsiyon 6.8 mg/g iken Cibacron Blue F3GA bağlanması sonucu bu değer 27.8 mg/g'a ulaşmıştır. Manyetik alan varlığında aynı partiküllerin HSA adsorpsiyonunu daha etkin sağlayarak 34.9 mg/g değerine ulaştığı gözlenmiştir. Bu sonuç iki şekilde açıklanabilir; (i) kesikli sistemde protein ve ligandın ayrışma hızı manyetik sistemde bağlanma hızından daha yüksektir; (ii) Boya ligand Cibacron Blue F3GA manyetik silika partiküllerin hem yüzeyinde hem gözeneklerinde bulunmaktadır. Akış ve manyetik alan varlığı proteinlerin gözeneklere ulaşımını kolaylaştırmakta ve böylece adsorpsiyon miktarını artırmaktadır.



Şekil 4.24. Manyetik alan varlığında incelenen adsorpsiyon değerinin karşılaştırılması. Çalışma koşulları: pH: 5.5, HSA derişimi: 1.0 mg/mL, Partikül miktarı: 25 mg, Sıcaklık: 25°C, Zaman: 2 saat, Manyetik alan: 25 mT

Manyetik alan varlığında adsorpsiyon koşulları incelenirken zaman ile değişen adsorpsiyon Şekil 4.25’de verilmiştir. Grafikte görüleceği gibi adsorpsiyon süresi arttıkça adsorpsiyon miktarı artarak 35 mg/g değerine ulaştıktan sonra sabit kalmaktadır. Deney düzeneğinde, akım halkaları içerisinde maksimum akımın sağlandığı 1.33 A değerinde çalışılmıştır. Ayrıca düzeneğin içinde kolonun sabitlenerek çözeltinin kolon içinden geçirildiği süreçte ısınmadan kaynaklı olarak 120 dakika ötesine gidilememiştir. Bu ısınma silika kaplı demir oksit partiküllerin manyetik alan altında adsorpsiyonunu sağlarken belirli bir azalım göstermiş olsa da toplamda manyetik alan olmadan yapılan deneysel sonuçlardan daha iyi verim elde edilmiştir.

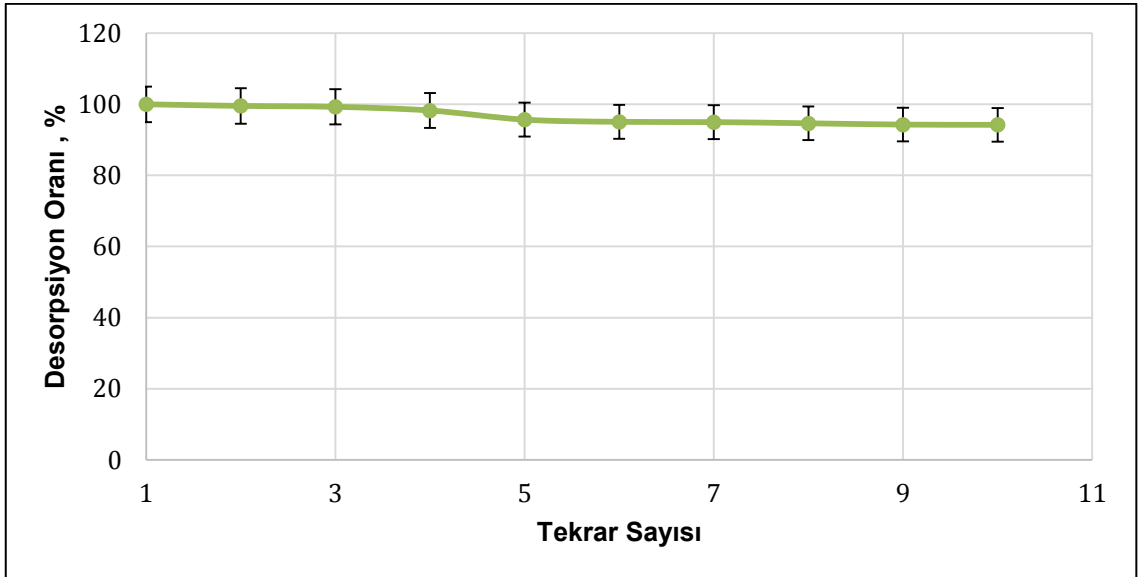
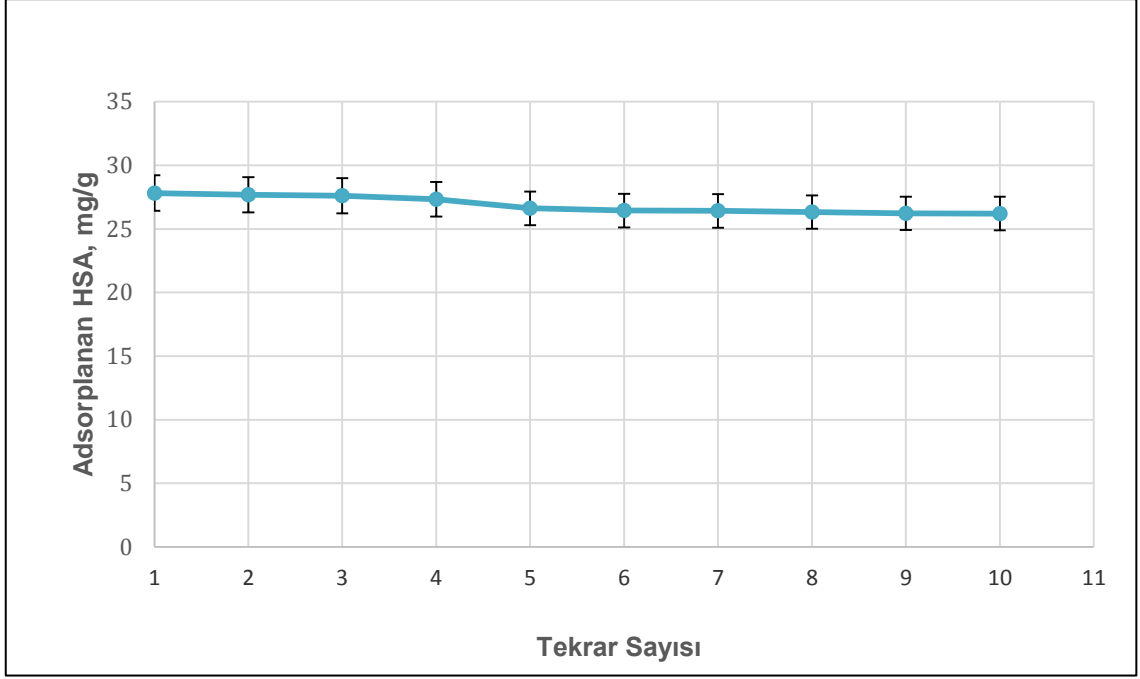


Şekil 4.25. Manyetik alan varlığında adsorpsiyon süresi. Çalışma koşulları: pH: 5.5, HSA derişimi: 1.0 mg/mL, Partikül miktarı: 25 mg, Sıcaklık: 25°C, Manyetik alan: 25 mT

4.2.9. Desorpsiyon ve Tekrarlanabilirlik

Tekrar kullanılabilirlik, adsorbentler üzerinde yapılan çalışmalarda dikkat edilecek unsurlar arasındadır. Adsorbentin tekrar kullanımı ve buna bağlı olarak azalan maliyetler tasarımda büyük önem arz etmektedir. Bu beraberinde tasarımda yenilenen koşullar altında sürekliliği getirmektedir. Böylece değişkenlik azalacağından adsorbentten beklenen etkinlik maksimum düzeye çıkacaktır.

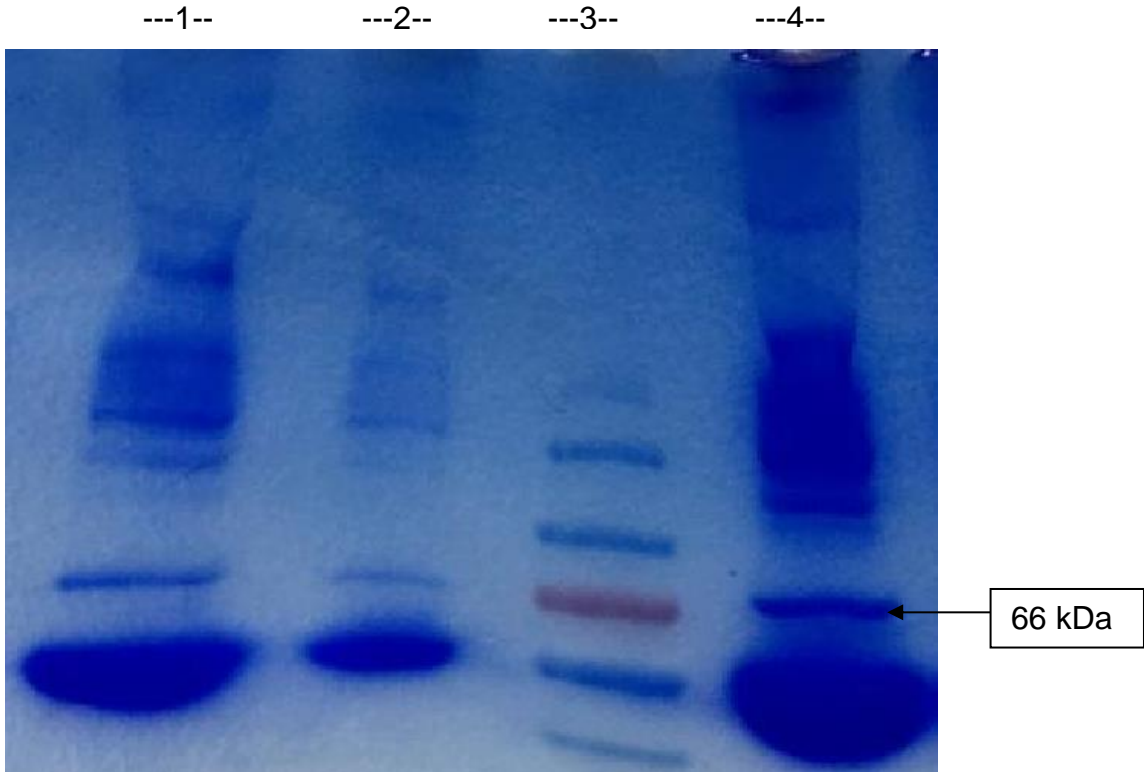
Deney içinde belirtilen adsorpsiyon koşulunda altında 1.0 mg/mL HSA derişiminde 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon desorpsiyon işlemine tabi tutularak tekrarlanabilirlik belirlenmeye çalışılmıştır. Desorpsiyon işleminde 1.0 M NaCl çözeltisinden yararlanılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.26'da gösterildiği gibidir. Elde edilen sonuca göre her bir desorpsiyon işlemi sonucunda yaklaşık %95 oranında HSA adsorpsiyon kapasitesinin var olduğu böylece azalmanın %5 civarında kaldığı tespit edilmiştir. Bu da adsorbent için 1.0 M NaCl çözeltisinin iyi bir desorpsiyon ajanı olduğu ve ayrıca hazırlanan partiküllerin iyi bir kararlılık gösterdiği ve tekrar kullanımlarda etkinlik açısından önemli bir başarı gösterdiği anlamına gelmektedir.



Şekil 4.26. Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerin adsorpsiyon miktarı ve desorpsiyon oranı ifadeleriyle tekrar kullanılabilirliği. Çalışma koşulları: pH: 5.5, HSA derişimi: 1.0 mg/mL, Desorpsiyon ajanı: 1M NaCl, Sıcaklık: 25°C.

4.2.10. SDS-PAGE Analizi

Farklı deneysel koşullar altında gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmalarında elde edilen sonuçların yardımıyla oluşturulan optimal koşullar altında Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküller ile yapay plazmadan HSA adsorpsiyonu incelenmiştir. Saflaştırılan HSA'nın saflık derecesi SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Şekil 4.27'de 1 numaralı kolon 1/3 oranında seyreltilmiş yapay plazma, 2 numaralı kolon adsorpsiyon sonrası yapay plazma, 3 numaralı kolon belirteç ve 4 numaralı kolon ise adsorpsiyon öncesi yapay plazmayı göstermektedir. Adsorpsiyon sonrası plazmanın kolondaki gösterimine baktığımızda moleküler ağırlık ölçeğinde albümin yoğunluğu azalmış ve neredeyse belirsiz hale gelmiştir.



Şekil 4.27. SDS Analizi. 1-Desorpsiyon sonrası yapay plazma,
2- Adsorpsiyon sonrası yapay plazma, 3- Biomarker,
4- Adsorpsiyon öncesi yapay plazma

Yapay plazmadan albümin adsorpsiyonunun belirlenmesi için adsorpsiyon sonrası plazma örneklerinde albümin tayini kolorimetrik yöntemle Olympus AU 2700 (Mishima, Japonya) analizörü ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre Cibacron Blue F3GA takılı manyetik partiküllere bağlanan serum albümin miktarı 48.6 mg/g olarak belirlenmiştir. Toplam protein miktarı dikkate alındığında yapay plazmadan protein adsorpsiyonunun yaklaşık %97'si albümin olarak gerçekleşmiştir.

4.3. Literatür İncelemesi

Literatürde protein saflaştırma üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında özet şeklinde çizelge 4.7’de belirtilmiştir. Kronolojik olarak incelemek gerekirse, Zhao ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladığı çalışmada proteinlerin ve küçük moleküllerin adsorbent olarak belirlenmesinde 3D krojeller kullanılmıştır. Bu metodta işlevsellği ile ön planda bir polimer olan krojel katı faz ekstraksiyonu monoliti şeklinde bir şırınga içinde oluşturulmasına dayanmaktadır. Oluşturulan yapı ile BSA ve diğer küçük moleküller üzerinde seçicilik etkisi incelenmiştir. Üç boyutlu yapısı seçiciliğe önemli katkıda bulunmuştur. 10 defa seyretme işlemi yapılan HSA ile yapılan örnek üzerinden yapılan çalışmada fiziksel koşullar altında 10 dakikada %95 oranında adsorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Bu döngü 3 defa tekrarlandığında adsorpsiyon %90 yüksek oranlarında kalmaktadır. HSA yapısına 4 küçük molekül eklenmesi ile elde edilen çalışmalarda geri kazanım %65.6 - %81.8 oranlarında olmaktadır (Zhao ve ark., 2019).

Santos ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada, HSA yakalama kapasitesine sahip ligand tasarımı geliştirilmiştir. Bu tasarım geliştirilirken HSA’ya bağlanabilen 64 triazin bazlı ligand üzerinden gidilerek uygun koşullarda bağlanma yapabilen ligand üzerinde çalışılmıştır. %50 üzerinde bağlanma yapabilen A3A2 ve A6A5 adlı triazin bazlı kurşun ligandlar üzerinde durulmuştur. Özellikle A6A5 ligandı elüsyon koşullarında %98 saflık düzeyinde HSA saflaştırması gerçekleştirilmiştir (Santos ve ark., 2018).

Raoufinia ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada, HSA saflaştırılması incelenmiştir. Bu araştırma içinde etanolün soğutulması yoluyla saflaştırma çalışması yapılmış olup daha sonra kromatografik yöntemler uygulanmıştır. HSA’nın saflık oranı selüloz asetat zar elektroforez ve SDS-PAGE analizleri yoluyla yorumlanmıştır. Isıl stabilite ve WB (western blotting) analizleri ile de stabilite değerlendirmeleri yapılmıştır. Sonuç olarak HSA saflaştırma oranı %99 olduğu tespit edilerek WB analiz yoluyla da sağlanması yapılmıştır (Raoufinia ve ark., 2018).

Wu ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada, proteinlerin sülfidil grupları ile saflaştırılan ısıl duyarlılığı olmakla birlikte geri dönüşümlü bir polimer protein bileşiği çalışmalarda kullanılmıştır. Başlatıcı olarak disülfid kullanılırken hedef

protein üzerindeki bulunan sisteinden yola çıkarak modifikasyon yapılmıştır. Sonuç olarak %76.4 oranında bir verime ulaşılmıştır (Wu ve ark., 2018).

Liu ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada, grafen nano yüzeyler üzerine farklı anyon ve katyonlar yardımıyla oluşturulan iyonik polimerik sıvılara silika nano partiküller bağlanarak elde edilen kompozit yapının proteinlere karşı adsorpsiyon özelliği incelenmiştir. Özellikle BSA'ya karşı pH 5'de yüksek seçicilik gösteren bu nano kompozit yapı Britton-Robinson tampon çözeltisi içinde %98'e varan oranda adsorpsiyon verimi sağlanmıştır. Böylece polimerik iyonik sıvılar ile birlikte grafen yüzeyler kullanılarak kompleks matrisler içinden proteinlerin ayırımı kolaylıkla yapabilecek yeni kombinasyonlar oluşturulabilmektedir (Liu ve ark., 2018).

Amiri ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada, agaroz küreciklerine kapsüllenen Fe_3O_4 nano partikülleri yardımıyla oluşturulan nano kompozit manyetik parçacıklarla saflaştırma etkinliği araştırılmıştır. Yapının karakterizasyonu yapılması sonucunda düzenli boyut dağılımı sergileyen küresel şekilde kürelerden oluşmuş partiküller yaklaşık 10nm gözenek yapısına sahiptir. Partiküllere daha sonra bağlanmış olan Cibacron Blue F3GA ile BSA adsorpsiyonu incelendi. Sonuç olarak manyetik %8 agaroz partiküllerinin adsorpsiyon etkinliği daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanısıra manyetik %4 agaroz partiküllerin dinamik performanslarının daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca manyetik nanoparçacık kompozitler yüzey alanlarının, gözenek yapısının ve dolayısıyla pürüzlüğün arttığı sonucuna gidilmiştir (Amiri ve ark., 2017).

Bhakta ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada, silika kaplı manyetik nanopartiküller ile oluşturulan yüzeysel nanocepler yardımıyla HSA uzaklaştırılması yapılmıştır. Nanopartiküller organo silan tek tabakalı yapılar ile oluşturulan karmaşık düzende tabakalar üzerine 200 nm büyüklükte silika kaplı manyetik nanoküreler bağlanarak elde edilmiştir. Oluşturulan tek tabakalı yapılar, antikora ait olan bağlanma alanlarını taklit edecek şekilde hidrofobik, hidrofilik ve H bağlanması yoluyla etkileşim kurabilen zincir özelliği gösterirler. Sonuçta elde edilen böyle bir yapı ile HSA bağlanma kapasitesi 21 mg/g olarak bulunmuş ve bir çok deneme sonucu uzaklaştırılan HSA miktarı %88 olarak tespit edilmiştir (Bhakta ve ark., 2017).

Alkan ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmada, monolitik krojeller içinde hapsolmuş Cu+2 bağlı sünger taşı parçacıklara ait HSA kromatografik özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre başlangıç derişimi 3 mg/ml olan HSA adsorpsiyon kapasitesi pH 8 fosfat tamponu içinde 549.5 mg/g elde edilmiştir. Oluşturulan bu matris yapısı yüksek orandaki yüzey alanı sayesinde çok amaçlı bir protein saflaştırma çalışmasında yüksek performansa sahip olduğu görülmüştür (Alkan ve ark., 2016).

Qu ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmada, Cibacron Blue F3GA takılı manyetik PMMA nanoküreleri kullanılarak BSA adsorpsiyon yapılmıştır. Mini emülsiyon tekniği ile hazırlanan boyut dağılımı geniş olmayan ve çap oranına bakıldığında 76 nm boyutundaki manyetik poli metil metakrilat malzemesine Cibacron Blue F3GA takılarak numune elde edilmiştir. BSA karşı gösterilen adsorpsiyon sonuçlarına bakıldığında 121.98 mg/g değerinde bir yüksek kapasite göstermiştir. Spesifik olmayan etkileşmelerin az olduğu çalışmada yüksek iyonik çözelti içerisinde kolayca desorpsiyon göstermiştir. Böylece protein saflaştırmada manyetik poli metil metakrilat yüksek kapasiteye sahip önemli bir malzeme olduğu gösterilmiştir (Qu ve ark., 2016).

Zhang ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmada, manyetik mikro küreler üzerindeki CB'ye dahil farklı uzatıcı kol tasarımlarıyla etkinlik ve protein adsorpsiyon incelemesi yapılmıştır. Çalışmayı yaparken poli metil metakrilat (PMMA) mikro partiküller hazırlanarak onlar üzerine poli etilen glikol (PEG), poli vinil alkol (PVA) aynı zamanda etilendiamin (EDA) kolları eklenmiştir. Daha sonra bu kollar üzerine Cibacron Blue F3GA boyası takılarak adsorpsiyon kinematığı incelenmiştir. Numuneler içindeki Cibacron Blue F3GA yoğunluğuna bakıldığında PMMA-EDA-CB numunesi için 266.0 µmol/g, PMMA-PVA-CB numunesi için 209.7 µmol/g ve PMMA-PEG-CB numunesi için ise 138.1 µmol/g olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu numuneler ile BSA adsorpsiyon etkinliğine bakılarak PMMA-EDA-CB numunesinin adsorpsiyon performansının daha iyi olduğu görülmüştür. Niceliksel olarak bakıldığında 114.0 mg/g olan adsorpsiyon oranı ile en iyi performansı gösteren bu numune ile protein saflaştırma çalışmalarında önemli bir yere sahip olduğu belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2016)

Andaç ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada, poli hidroksietilen metakrilat krojellere CB takılması ile elde edilen numunenin HSA'dan albümin

seçiciliği üzerine yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 345mg/g olarak belirlenen Langmuir adsorpsiyon kinetiği çok benzerlik gösteren sonuç verisi 343 mg/g olarak bulunmuştur. Aynı kolon için seyerilmemiş serum örneği için bakıldığında maksimum adsorpsiyon kapasitesi 950 mg/g olarak tespiti edilmiştir. Bu numunenin önemli bir üstünlüğü ise diğer yapılar ile etkileşimde bulunarak amacın gerçekleştirilmesinde engel teşkil etmeden hızlıca HSA'yı bütün halinde ayrıştırabilmesidir. Ayrıca serum içerisindeki HSA'nın tükenme oranı olarak da %77 olarak belirlendiği gösterilmiştir (Andaç ve ark., 2012).

Odabaşı'nın 2011 yılında yaptığı çalışmada, takılı manyetik poli vinil alkol (mPVAL) mikro küreleri yardımıyla albümin saflaştırılması yapılmıştır. Bunun için hazırlanan mikro kürelerin çapı 100 ila 150 µm boyutlarındadır. Mikro kürelere Cibacron Blue F3GA takılmasıyla elde edilen numune ile çalışmalar yapılmıştır. Adsorpsiyon performansı incelenirken Cibacron Blue F3GA takılı olmayana göre daha fazla etkinlik gösteren numune maksimum adsorpsiyon kapasitesine pH 5.0'da göstermiştir. Spesifik olmayan etkileşme niceliği 1.7 mg/g olarak belirlenerek çok düşük oranda olduğu tespit edilmiştir. Albümin için elde edilen adsorpsiyon değeri 88.7 mg/g iken diğer protein olan fibronojen için 1.5 mg/g ve γglobülin için ise bu değer 3.8 mg/g olarak tespit edilmiştir. Toplam protein miktarı üzerinden bakıldığında bu değer 96.3 mg/g'dır. SDS-PAGE analizi yardımıyla da adsorpsiyon verimi daha net bir şekilde gösterilmiştir. 10 kez tekrarlanan ölçümler sonucunda adsorpsiyon etkinliğinde görünür biçimde değişim gözlenmemiştir (Odabaşı, 2011).

Tamahkar ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada, bakteriyel nanofiber selüloz yapıların insan serumundan albümin uzaklaştırılması incelemesi yapmışlardır. Bakteriyel selüloz nanofibere Cibacron Blue F3GA yoğunluğu toplamda 178 µmol/g olacak şekilde takılmıştır. Spesifik yüzey alanı 914 m²/g olarak tespit edilmiştir. Nanofiber numuneler üzerinde gerçekleşen spesifik olmayan adsorpsiyon miktarı 1.4 mg/g olarak çok düşük miktarda kalmıştır. Numuneye Cibacron Blue F3GA takılması ile adsorpsiyon miktarında artış görülerek pH 5 ortam koşulunda 1800 mg/g değerine ulaşmıştır. Denge durumundaki HSA çözeltisine 1 M NaCl eklenmesiyle elüsyon yapılarak sürecin geri dönüş karakterinde olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada her konsantrasyon

için tükenme etkinliklerine bakıldığından %96.5'i aşan değerlerde olduğu görülmüştür (Tamahkar ve ark., 2010).

Yapılan bu tez çalışmasında, silika kaplı Fe₃O₄ malzemesi üzerine Cibacron Blue F3GA boya takılarak manyetik alan varlığı altında albümin saflaştırması yapılmıştır. Boya takılarak elde edilen sonuçlara bakıldığında adsorpsiyon miktarı 27.8 mg/g iken boya takılmazsızın yapılan çalışmada ise bu miktar 6.8 mg/g değerine kadar düşmektedir. Dolayısıyla boyanın yüksek bir afinite gösterdiği görülmektedir. Boya ile yapılan çalışmayı manyetik alan varlığında incelendiğinde ise 34.9 mg/g değerine ulaşarak adsorpsiyon performansının %25.5 oranında arttığı gözlenmiştir. Yapay plazma ile çalışma yapıldığında yapay plazmadan protein adsorpsiyonu % 97'ye ulaşmaktadır. Böylece çalışılan numune ve fiziksel koşullar tekrarnabilirliği yüksek, ucuz, hızlı bir şekilde literatürde yer alan diğer yöntemler ile kıyaslanabilecek ölçüdedir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Albüminin yüksek kapasitede basit, hızlı, ucuz ve aktif bir halde saflaştırılması amacıyla Cibacron Blue F3GA boya ligand takılı manyetik silika partiküllerin elde edilmesi ilk aşama olmuştur. Manyetik silika partiküllere belirtilen koşullar altında ligand bağlanması sağlanarak protein karışımlarından tek basamakta ve yüksek geri kazanımlı albümin saflaştırılmasına olanak verecek kararlı ve tekrar kullanılabilir adsorbent hazırlanmıştır. Hazırlanan bu adsorbent daha sonra morfolojik analizi yapılmak üzere SEM; manyetik analiz için ESR ve VSM; kimyasal yapı analizi için FTIR, EDX ve elementel analizler yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlara göre elde edilen adsorbent ortalama 7000 nm boyutunda, küresel yapıda bir dağılıma sahiptir.

Absorbentın etkinliğini belirleyen bir özellik de gözeneklilik yapısı olduğundan örneğimiz için gözenek boyutu dağılımı incelediğinde ortalama boyutu 41 nm düzeyinde makro ve mezo gözenekler kendi göstermektedir. Buradan hareketle spesifik yüzey alanı değerlendirildiğinde 222 m²/g olarak belirlenmiştir. Bu değer numunenin yüksek oranda yüzey alanına sahip olduğunu ve böylece adsorbenti oluştururken gözenekli yapı ile silika ve demir oksit bağlanmasının daha etkin bir şekilde yüksek oranda gerçekleşeceği anlaşılabilmektedir. Boyut dağılımı değişimi katsayısı (CV) %4.5 ile dağılımın dar bir aralıkta gerçekleştiği görülebilmekte böylece numune küresel yapısı korunarak istenmeyen bağlanma çeşitlerine imkan vermeyecektir. Bu da bağlanmanın etkin bir şekilde gerçekleşeceğini göstermektedir. Ayrıca adsorbentın haritalandırılmış fotoğrafına bakıldığında manyetik partiküllerin silika takılı olduğu net bir şekilde görülebilmek ve böylece numune içinde silika varlığı kanıtlanmış olmaktadır.

Numunenin manyetik özelliklerini incelemek üzere Elektron Spin Rezonans (ESR) analizi yapıldığında, manyetik alan değişimine karşı ESR sinyalinde bir değişim gösterdiği görülebilmektedir. Bu değişim alan arttıkça manyetik alan değeri de artarak sinyal şiddetinde artış gözlenmiş ve bir noktada azalma eğilimi göstererek rezonans manyetik alan (H_r) değerinde sifıra ulaşmaktadır. Bu spektrum bize ferrimanyetik karakterde demir atomlarının sahip bir sinyal olduğunu göstermektedir. Manyetik karakterizasyonda önemli parametrelerden biri g olarak bilinen spektroskopik yarıma çarpanıdır. Bu çarpan numune için

hesaplandığında 2.3153 değerine ulaşılmaktadır. Yüksek şiddet içeren yapılarda demir iyonları için g değeri 2.0 – 9.7 aralığında değişmektedir. Kullanılan numune referans değerler dikkate alındığında ferrimanyetik özelliğe sahip demir kompleksleri olduğu söylenebilir.

Numunenin manyetik karakterizasyonunu gösteren bir diğer özelliğine bakmak için titreşimli örnek manyetometresi yöntemiyle incelenmesi gerekli görülmüştür. Oda sıcaklığında yapılan ölçüm sonucunda manyetik alan altında manyetizasyon değişimi bakıldığında doyum manyetizasyonu 30 emu/g olarak gözlenmiştir. Bu değer yüksek bir manyetizasyonu göstermekte dolayısıyla dış bir manyetik alan içerisinde numune manyetik alana hızlıca tepki vereceğinden manyetik alan kaynaklı olarak adsorpsiyon işleminde bir engel yaşamayacak böylece daha etkin bir sonuç alınabilecektir. Bu verilerin yanı sıra herhangi bir değerde koerzivite gözlenmemiştir. Koerzivitinin gözlenmemesi numunenin manyetik alan varlığından adsorpsiyon işlemi gerçekleşirken alanın varlığı ortadan kalktığında kalıntı manyetizasyon olmaması adsorpsiyon işleminin sonlandırılması açısından önem taşımaktadır böylece desorpsiyon işlemi yapılırken istenmeyen bağlanma gözlenmesi açısından önem taşımaktadır. Oda sıcaklığında partiküllerde zorlayıcı alanın olmadığı ve yüksek manyetizasyon değerini de dikkate aldığımızda spinleri rastgele yönelttiği süperparamagnetik davranış sergilediği söylenebilmektedir. Süperparamagnetizm yüksek bir manyetizasyon etkisi göstermesi ve dış manyetik alan olmadığında sıfır manyetizasyon göstermesi açısından önem taşımaktadır.

Karakterizasyon çalışmalarında bir diğer nokta adsorbent oluşturmak için numuneye bağlanacak Cibacron Blue F3GA miktarını belirlemektir. Bunu tespit edebilmek için kükürt sitokiyometersi kullanılmıştır. Farklı derişimlerde boya çözeltileri ile etkileştirilen manyetik silika partiküllere bağlanan boya ligand miktarları değişen Cibacron Blue F3GA miktarına göre incelenmiş ve artan derişimler göre bağlanan Cibacron Blue F3GA miktarı da arttığı gözlenmiştir. Manyetik silika partiküllerine Cibacron Blue F3GA bağlandıktan sonra yapı içerisinde tüm N, C, H ve S atomlarında artış görülmektedir. Bu da bu atomların bağlanan boyadan kaynaklı olduğu ve böylece boyanın varlığını gösterir niteliktedir.

Enerji Dağılımlı X-ışını incelesi yapıldığında elde edilen spektrum incelendiğinde silika partiküllerinin varlığı belirgin olarak görülmektedir. Bu da silikanın yapı içerisinde bulunan demir oksit bileşiğine bağlanma göstermiş olduğu belirlenmektedir. Böylece adsorbenti oluştururken Cibacron Blue F3GA takılmasını etkin bir şekilde yapabilmek için silika partiküllerin varlığı önem arz ettiğinden numune içerisinde bulunması gerekliliği giderilmiştir.

Adsorbent için yapılan son karakterizasyon çalışması da FTIR analizidir. FTIR analizi sonucunda silika kaplı demir oksit malzemenin boya takılı olup olmadığı tespit edilmesinde önemli bir çalışmadır. Cibacron Blue F3GA takılı yapının FTIR spektrumunda 1594 cm^{-1} dalga sayısındaki pik boyanın triazin halkasındaki karbon ile azot atomları arasındaki gerilme titreşimini temsil etmektedir. 1355 cm^{-1} 'deki pik S ve O arasındaki gerilme titreşimlerini göstermekte olup yapıya Cibacron Blue F3GA bağlanmasına bir ipucu teşkil etmektedir. Cibacron Blue F3GA bağlanmasına en büyük kanıt 1057 cm^{-1} 'de bariz olarak görülen Cl içeren amino benzen halkasındaki C-Cl gerilme titreşim bandıdır. Bu bant ve beraberindeki $592\text{ cm}^{-1} - 406\text{ cm}^{-1}$ bant aralığında görülen zayıf şiddetteki diğer bantlar ile birlikte yapıya Cibacron Blue F3GA boya maddesi katılımının birer göstergesi olarak ifade edilebilir.

Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere albümin adsorpsiyonu için optimum koşulları belirlemek üzere pH, iyonik güç, sıcaklık, derişim, manyetik alan gibi farklı mikroçevre içinde incelemeler yapılmıştır. Bu inlemelerin ilki olarak adsorpsiyon koşullarını belirlemek üzere pH etkisi tespit edilmek istenmiştir. Böylece Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllere HSA adsorpsiyonu pH 4.0-8.0 değişim aralığında incelenmiştir. İnceleme sonucunda pH 5.5 değerinde en yüksek adsorpsiyon miktarı gözlenmiştir (27.82 mg/g). Daha yüksek pH değerlerinde HSA adsorpsiyonunun azaldığı gözlenmiştir. Adsorpsiyon etkileşmelerinden biri olan elektrostatik kuvvet değişen asidik ve alkali koşullarda kendini daha belirgin olarak göstermektedir. Bu kuvvetin etkisi altında HSA molekülü ve Cibacron Blue F3GA molekülü üzerindeki yüklü gruplar marifetiyle gerçekleştirilerek adsorpsiyon miktarı artış ve daha sonrasında azalış göstermiştir. Artışın maksimum olduğu nokta aynı zamanda HSA'nın izoelektrik noktasıdır.

pH değişiminin gerçekleşen etkileşimler spesifik olarak olmuş olsa da spesifik olmayan etkileşimler de bağlanma dinamiğine katkı sunmaktadır ve spesifik olmayan etkileşimler pH değerinden bağımsız olarak her durumda mevcut olmaktadır. Böylece diğer koşullar altında geekleştirilecek adsorpsiyon çalışmaları için kullanılacak pH değeri 5.5 olarak belirlenmiştir.

Boya ligandın adsorpsiyon üzerindeki etkisi incelendiğinde ligandın yükleme miktarı önemli parametreler arasındadır. Bu sebeple farklı derişim miktarlarında hazırlanan Cibacron Blue F3GA boya çözeltisi ile etkileşimim sonucunda oluşan adsorpsiyon değerlerine bakıldığında 3 mg/mL değerine kadar boya derişiminin artması ile bağlanan HSA miktarı artmakta daha yüksek boya derişimlerinde ise bağlanan boya miktarı ve dolayısıyla bağlanan HSA miktarında önemli bir artış gözlenmemektedir. Bu durum yüzeyde boya ligandın bağlanabileceği grupların doygunluğa ulaşmış olması ile açıklanabilmektedir.

HSA derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisine bakılması amacıyla 0.10 - 3.50 mg/mL arasında değişen derişimlerde HSA özeltisi pH değeri 5.5'te Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküllerle etkileştirilmiş ve sonucunda artan HSA değerlerinde adsorpsiyonda artış gözlenerek 31.22 mg/g değerinde maksimum noktaya ulaşmış ve bu değerden sonra sabit kalmıştır. Bu sabit değer doyuma ulaştıktan sonra adsorpsiyonun gerçekleşmediğini göstermektedir. Bunun yanı sıra Cibacron Blue F3GA boya bağlanmamış manyetik silika partiküllerin adsorpsiyon üzerindeki etkisi ihmal edilebilir düzeyde kalmış olduğundan Cibacron Blue F3GA boyanın etkisinin çok yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ortam koşullarının adsorpsiyon üzerinde etkisini görmek için öncelikle sıcaklık etkisine +4°C, +25°C ve +40°C sıcaklık değerlerinde bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, adsorpsiyon miktarının artan sıcakluğa karşı azaldığı tespit edilmiştir. Sıcaklık artışı, protein doğal yapıları üzerinde etki ederek tekrar düzenlenmesini sağlamakta ve böylece adsorpsiyon kapasitesini etkilemektedir. Bununla birlikte adsorpsiyon işleminin ekzotermik bir etkileşim olduğundan sıcaklık artışı ile ters orantılı olacak şekilde azalma eğilimi göstermektedir. Bu bilgiler ışığında bakıldığında deneysel veriler ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

Ortam koşulları içerisinde bir diğer dikkat edilecek parametre ortamın iyonik şiddetidir. Bu sebeple 0 M, 0.1 M, 0.5 M ve 1.0 M NaCl içerikli ortamlarda adsorpsiyon çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre artan iyonik şiddet karşısında adsorpsiyon miktarı azalmıştır. NaCl derişiminin 0.1 M değerinden 1.0 M değerine artırılmasıyla adsorpsiyon miktarının % 58.3 oranında düştüğü belirlenmiştir. İyonik şiddet artışının çözeltide Na iyonlarının varlığının çoğalması ve bunun da Cibacron Blue F3GA üzerinde bulunan sulfonat gruplarının üzerinde birikerek yapıyı nötralize etmesi yoluyla ligand ve protein arasındaki etkileşimleri azaltması ile açıklanabilir. Yine Na iyonları birimler arasında perdemele yaparak etkileşimleri azaltma etkisi gösterdiği söylenebilir. Böylece iyonik şiddet ile adsorpsiyon arasında ters orantılı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Absorbentlerin etkileşimlerini karakterize için kullanılan yöntemlerden biri de adsorpsiyon izotermelerini incelemektir. Bu amaçla Freundlich ve Langmuir izotermeleri incelenmiştir. Langmuir izotermelerinden elde edilen sonuçlara göre maksimum adsorpsiyon katsayısı Q_{maks} değeri 37.59 mg/g ve Langmuir sabiti ise 4.93 mL/mg olarak bulunmuştur. R^2 olarak ifade edilen korelasyon katsayısı 0.98 değerindedir. Freundlich izotermesinde ise adsorpsiyon kapasitesi 18.17 mg/g ve R^2 olarak ifade edilen korelasyon katsayısı 0.90 olarak belirlenmiştir. Böylece deneyden elde edilen veriler göre adsorpsiyon Langmuir adsorpsiyon yaklaşımına daha fazla uygunluk sağladığı tespit edilmiştir. Bu uygunluk maksimum adsorpsiyon değeri ve korelasyon katsayısına bakılarak deneysel olarak elde edilen değerlere daha yakın olduğundan çıkarılmıştır.

Adsorpsiyon işlemlerinde kimyasal reaksiyonlar ile kütle transferi gibi niceliklerin belirlenmesinde önemli yaklaşım olan kinetik modeller birinci ve ikinci dereceden kinetik modeller üzerinden değerlendirilmiş ve sonuçta hesaplanan değerlere göre sistem ikinci dereceden kinetik yaklaşımın deneysel veriler ile uyduğu tespit edilmiştir. Bu adsorpsiyonun kimyasal olarak kontrollü gerçekleştiğinin bir göstergesi olarak söylenebilmektedir.

Adsorpsiyonu etkileme özelliği bakımından incelenen son parametre manyetik alan uygulanarak elde edilen adsorpsiyon miktarları olmuştur. Bu bakımdan, 0.5 mL/dk akış hızında 2 saat boyunca yapılan adsorpsiyon çalışmasında, silika kaplı manyetik partiküller ile yapılan incelemede adsorpsiyon 6.8 mg/g iken Cibacron Blue F3GA bağlanması ile elde edilen numune için bu sonuç 27.8 mg/g'a

değerine ulaşmıştır. 25 mT'lık sabit bir manyetik alan varlığından elde edilen adsorpsiyon miktarı 35 mg/g değerine kadar çıkmıştır. Bu sonuca değerlendirildiğinde kesikli sistemde protein ve ligandın ayrışma hızı manyetik sistemde bağlanma hızından daha yüksek olduğu ve bunun yanı sıra akış ve manyetik alan varlığı proteinlerin gözeneklere ulaşımını kolaylaştırmakta ve böylece adsorpsiyon miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Zamanın bu adsorpsiyon üzerindeki etkisi ise artan zamanla adsorpsiyon miktarının doğru orantılı olarak arttığı ve belirli bir süre sonunda bu artışın sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu sabit adsorpsiyon ilişkisi gözeneklere ile proteinler arasındaki etkileşimin doyuma ulaştığının bir sonucu olarak görülebilmektedir.

Genel olarak adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan adsorbentlerin tekrar kullanılarak maliyet düşüklüğü sağlanması istenmektedir. Deneyde adsorpsiyon koşulunda altında 1.0 mg/mL HSA derişiminde 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon desorpsiyon işlemine tabi tutularak tekrarlanabilirlik belirlenmeye çalışılmıştır. Desorpsiyon işleminde 1.0 M NaCl çözeltisinden yararlanılmıştır ve sonuçlar olarak yaklaşık %95 oranında HSA adsorpsiyon kapasitesinin var olduğu böylece azalmanın %5 civarında kaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, adsorbent için 1.0 M NaCl çözeltisinin iyi bir desorpsiyon ajanı olduğu ve ayrıca hazırlanan partiküllerin iyi bir kararlılık göstererek tekrar kullanımlarda önemli bir etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Adsorpsiyon çalışması yapay plazmadan HSA adsorpsiyonu gerçekleştirilerek incelenmiştir. Bu inceleme adsorpsiyon sonrası plazma örneklerinde albümin tayini kolorimetrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerle adsorplanan albümin miktarı 48.6 mg/g olarak belirlenmiştir. Toplam protein miktarı dikkate alındığında yapay plazmadan protein adsorpsiyonunun yaklaşık %97'si albümin olarak gerçekleşmiştir. SDS-PAGE analizi yardımıyla da yapay plazmanın adsorplanması görsel olarak tespit edilmiştir.

Böylece elde edilen sonuçlara göre, Cibacron Blue F3GA takılı manyetik silika partiküller HSA saflaştırılmasında yüksek kapasitede basit, hızlı, ucuz ve aktif bir halde saflaştırılmasına olanak vermesi ile birlikte geliştirilen manyetik sistem altında daha yüksek oranda adsorpsiyon imkanı vererek diğer çalışmalar için referans olarak alınacak bir adsorbent örneği olmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Alkan, H., Cömert, Ş.C., Gürbüz, F., Doğru, M., Odabaşı, M., Cu²⁺-attached pumice particles embedded composite cryogels for protein purification, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45 (2017) 90–97.
- Ancell, H., Course of lectures on the physiology and pathology of the blood and other animal fluids, *Lancet*, 1 (1839) 222 (from the *Am. J. Dig. Dis.* 14 (1969) 711-744.
- Andaç, M., Galaev, I., Denizli, A., Dye attached poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for albumin depletion from human serum, *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 1173-1182.
- Andrade, J.D., Hlady, V., Plasma protein adsorption: the big twelve, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1990), 158-172.
- Amiri, S., Mehrnia, M.R., Roudsari, F.P., Enhancing purification efficiency of affinity functionalized composite agarose micro beads using Fe₃O₄ nanoparticles, *Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 1041-1042 (2017) 27-36.
- Ayyar, B.V., Arora, S., Murphy C., O’Kennedy, R., Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Methods* 56 (2012) 116–129.
- Bhakta, S., Dixit, C.K., Bist, I., Macharia, J., Shen, M., Kadimisetty, K., He, J., Dutta, B., Suib, S.L., Rusling, J.F., Albumin removal from human serum using surface nanopockets on silica coated magnetic nanoparticles, *Chem Commun (Camb)*, 53 (2017) 9254-9257.
- Biellmann, J.F., Samama, J.P., Branden, C.I., Eklund, H., X-ray studies of the binding of Cibacron Blue F3GA to liver alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 102 (1979) 107-110.
- Boyer, M.P., Hsu, J.T., Protein purification by dye-ligand chromatography, *advance in Biochemical Engineering Biotechnology*, 49 (1993) 1-44.
- Buchacher, A., Iberer, G., Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma-aspects of yield and virus safety, *Biotechnol. J.*, 1 (2006) 148- 163.

- Burnouf, T., Integration of chromatography with traditional plasma protein fractionation methods, *Bioseparation*, 1 (**1991**) 383-396.
- Burnouf, T., Goubran, H.A., Radosevich, M., Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large scale fractionation of human plasma, *J. Chromatogr.*, 715 (**1998**) 715-765.
- Burnouf, T., Radosevich, M., Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (**2001**) 575-586.
- Clonis, Y.D., Labrou N.E., Kotsira, V.Ph., Mazitsos, C., Melissis, S., Gogolas, G., Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme Purification, *Journal Chromatography A*, 891 (**2000**) 33-44.
- Clonis, Y.D, Lowe, C.R., Affinity chromatography on immobilized triazine dyes: studies on the interaction with multinucleotide-dependent enzymes, *Biochim Biophys Acta*, 659 (**1981**) 86–98.
- Cohn, E.J., Gurd, F.R.N., Surgenor, D.M., Barnes, B.A., Brown, R.K., Deoaux, G., A system for the separation of the components of human blood, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (**1950**) 465-474.
- Cohn, E.J., Strong, L.E, Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylor, H.L., Preparation and properties of serum and plasma proteins: a system for the preparation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (**1946**) 459-475.
- Curling, J., Integrating new technology into blood plasma fractionation, *BioPharm.*, 15 (9) (**2002**) 16-26.
- Curling, J., *Methods of Plasma Protein Fractionation*, Academic Press, London, **1980**.
- Curling, J., Current practice and future possibilities in plasma protein fractionation, Plenary Lecture Notes, The Joint Meeting of the 19th Congress of the Int. Soc. Haematol. And 17th Congress of the Int. Soc. Blood Transf., Budapest, 1-7 August **1982**.

- Curling, J., Berglöf, J.H., Lindquits, L.O., Eriksson, S., A chromatographic procedure for the purification of human plasma albumin, *Vox. Sanguinis*, 33 (1977) 97-107.
- Curling, J., Bryant, C., The plasma fractionation industry: new opportunities to move forward, *Bioprocess Int.*, (2005)18-27.
- Denizli, A., Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 39 (2011) 315-341.
- Denizli, A., Pişkin, E., Dye-ligand affinity systems, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49 (2001) 391-416.
- Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., Ascenzi, P., Human serum albumin: From bench to bedside, *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (2012) 209-290.
- Goya, G.F., Berquo, T.S., Fonseca, F.C., Morales, M.P., Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles, *Journal of Applied Physics*, 94 (2003) 3520-3528.
- Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments, 69 (2012) 93–105.
- He, X.M., ve Carter, D.C., Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, 358 (1992) 209.
- Horak, D., Babic, M., Mackova, H., Benes, M.J., Preparation and properties of magnetic nano and microsized particles for biological and environmental separations, *Journal of Separations Science*, 30 (2007) 1751-1772.
- Kaminska, J., Dzieciol, J., Koscielak J., Triazine dyes as inhibitors and affinity ligands of glycosyltransferases, *Glycoconjugate J.*, 16 (1999) 719–723.
- Kassab, A., Yavuz, H., Odabaşı, M., Denizli, A., Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GAderived microporous polyamide hollow-fiber affinity membranes, *Journal of Chromatography B*, 746 (2000) 123–132.

- Labrou, N.E., Clonis, Y.D., Biomimetic dye affinity chromatography for the purification of bovine heart lactate dehydrogenase, *Journal of Chromatography A*, 718 (1995) 35-44.
- Labrou, N.E., Clonis, Y.D., Immobilised synthetic dyes in affinity chromatography, *Biochromatography Theory and Practice*, Vijayalakshmi, M. A. (Ed), CRC Press, London, Chapter 8 , 2002.
- Lambrinidis, G., Vallianatou, T., Tsantili-Kakoulidou, A. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86 (2015) 27-45.
- Leatherbarrow, R.B., Dean, P.D.G., Studies on the Mechanism of Binding of Serum Albumins to Immobilized Cibacron Blue F3GA, *Biochem.J.*, 189 (1980) 27-34.
- Liu, J., Liang, Y., Shen, J., Bai, Q., Polymeric ionic liquid-assembled graphene-immobilized silica composite for selective isolation of human serum albumin from human whole blood, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (2018) 573–584.
- Lowe, C. R., Burton, S. J., Burton, N. P., Alderton, W. K., Pitts, J.M., Thomas, J. A., Designer dyes, 'biomimetic' ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography. *Trends Biotechnol.* 10 (1992) 442-448.
- Lowe, C.R., Gald, M., Larsson, P.O., Ohlson, S., Small, D.A.P., Atkinson, T., Mosbach, K., High performance liquid affinity chromatography of proteins on Cibacron Blue F3GA bonded silica, *Journal Chromatography*, 215 (1981) 303-316.
- Luensmann, D., Jones, L., Albumin adsorption to contact lens materials: A review, *Contact Lens and Anterior Eye*, 31 (2008) 179-187.
- Mannuzza, F.J., Montalto, J.G., Is bovine albumin complex too complex to be just a commodity, *BioProcess Int.*, 8(2) (2010) 40-42.
- Nicholson, J. P., Wolmarans, M.R., Park G.R., The role of albumin in critical illness, *British Journal of Anaesthesia*, 85 (2000) 599-610.

- Odabaşı, M., Magnetic dye-affinity beads for human serum albumin purification, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 41 (2011) 287–304.
- Öğüt, E., Kip, Ç., Gökçal, B., Tuncel, A., Aggregation-resistant nanozyme containing accessible magnetite nanoparticles immobilized in monodisperse-porous silica microspheres for colorimetric assay of human genomic DNA, *Journal of Colloid and Interface Science*, 550 (2019) 90-98.
- Öncel, S., Fenilalanin İçeren Hidrofobik Etkileşim Kromatografi Sorbentlerinin Sentezlenmesi ve Lizozim Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
- Öztürk, N., Türkmen, D., Karakoç, V., Denizli, A., Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, A. Denizli (Editör), 3. Baskı, Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Ankara, 9.Bölüm, 2016.
- Peters, T., Serum Albumin, *Adv. Protein Chem.*, 37 (1985) 161-245.
- Qu, F., Guan Y., Mac, Z., Zhanga, Q., Synthesis of Cibacron Blue F3GA- coupled magnetic PMMA nanospheres and their use for protein affinity separation, *Polym. Int.*, 58 (2009) 888–892.
- Raoufinia, R., Balkani, S., Keyhanvar, N., Mahdavi-pora, B., Abdolalizadehc, J., Human albumin purification: a modified and concise method, *Journal of immunoassay and immunochemistry*, 39 (2018) 687-695.
- Rothschild, M.A., Oratz, M., Schreiber, S.S., Serum Albumin, *Hepatology*, 2 (1988) 385-401.
- Santos, R.D., Figueiredo, C., Viecinski, A.C., Pina, A., Barbosa, A.J.M., Cecília, A., Roque, A., Designed affinity ligands to capture human serum albumin, *Journal of Chromatography A*, 1583 (2019) 88–97.
- Sarıbuğra S., Manyetik Nanopartiküllerin Analitik İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2014.
- Stead, C. V. The use of reactive dyes in protein separation processes, *J. Chem. Tech. Biotechnol* 37 (1987) 55-71.

- Stotz, J.F., Rivat, C., Geschier, C., Colosetti, P., Streiff, F., Chromatography purification of a high purity human plasmatic albumin for clinical or biological uses, *Swiss Biotech.*, 8 (1990) 7-10.
- Tamahkar, E., Babaç, C., Kutsal, T., Pişkin, E., Denizli, A., Bacterial cellulose nanofibers for albumin depletion from human serum, *Process Biochemistry*, 45 (2010) 1713-1719.
- Theodore, P. Jr., Alan, J.S., Albumin research in the 21st century, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (2013) 5351-5353.
- Uygun, M., Dye attached cryogels for reversible alcohol dehydrogenase immobilization, *Journal of Chromatography B*, 959 (2014) 42–48.
- Wang, Z., Ho, J.X., Ruble, J., Rose, J., Rüker, F., Ellenburg, M., Murphy, R., Click, J., Soistman, E., Wilkerson, L., Carter, D.C., Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (2013) 5356-5374.
- Wilson, J.E., Applications of Blue dextran and Cibacron Blue F3GA in purification and structural studies of nucleotide requiring enzymes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 72 (1976) 816-820.
- Wu, Y., Cai, Z., Wu, S., Xiong, W., Ma, S., Protein purification by chemo-selective precipitation using thermoresponsive polymers, *Biopolymers*, 109 (2018) 1-6.
- Yavuz, H., Duru, E., Genç, Ö., Denizli, A., Cibacron Blue F3GA incorporated poly(methylmethacrylate) beads for albumin adsorption in batch system, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 223 (2003) 185-193.
- Zhang, D.H., Chen, N., Yang, M.N., Dou, Y.F., Sun, J., Liu, Y.D., Zhi, G.Y., Effect of different spacer arms on Cibacron Blue modification and protein affinity adsorption on magnetic microspheres, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133 (2016) 136-143.
- Zhang, S., Sun, Y., Further Studies on the Contribution of Electrostatic and Hydrophobic Interactions to Protein Adsorption on Dye-Ligand Adsorbents, *Biotechnology And Bioengineering*, 75 (2001) 710-717.

- Zhao, S., Wang, D., Zhu, S., Liu, X., Zhang, H., 3D cryogel composites as adsorbent for isolation of protein and smallmolecules, *Talanta*, 191 (2019) 229–234.
- Zhu, J., Yang, J., Sun, G., Cibacron Blue F3GA functionalized poly(vinyl alcohol-co-ethylene) (PVA-co-PE) nanofibrous membranes as high efficient affinity adsorption materials, *Journal of Membrane Science*, 385– 386 (2011) 269– 276.