

**PROTEİN İZOLASYONU İÇİN İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ BAZLI KESİKLİ SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF IMMOBILIZED METAL AFFINITY
CHROMATOGRAPHY BASED BATCH SYSTEMS FOR
PROTEIN ISOLATION**

BUKET ÇELİKKAYA

PROF. DR. S. ALİ TUNCEL
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

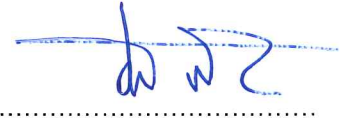
2017

Buket elikkaya' nın hazırladığı **"Protein İzolasyonu İçin İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Bazlı Kesikli Sistemlerin Geliştirilmesi"** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN
Başkan



Prof. Dr. Süleyman ALİ TUNCEL
Danışman



Prof. Dr. Osman SERMET KABASAKAL
Üye



Doç. Dr. Eylem GÜVEN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/02/2017



BUKET ÇELİKKAYA

ÖZET

PROTEİN İZOLASYONU İÇİN İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ BAZLI KESİKLİ SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Buket ÇELİKKAYA

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL

Şubat 2017, 68 sayfa

Proteinler vücutta enzimsel, hormonal, yapısal ve savunma fonksiyonlarında yer alan makromoleküllerdir. Proteinlerin buldukları ortamdan izolasyonu ve saflaştırılması, işlevlerinin belirlenmesi ve biyokimyasal reaksiyonlarının açıklanabilmesi günümüzde önem kazanan konular arasındadır. İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK); rekombinant proteinlerin saflaştırılması, serum proteinlerinin izolasyonu, protein ve peptidlerin karakterizasyonu, fosfopeptidlerin izolasyonu, oligonükleotid, RNA, DNA gibi makromoleküllerin izolasyonunu sağlayarak vücutta gerçekleşen biyolojik tepkimeleri açıklamak için kullanılmaktadır.

Çalışma kapsamında, elde edilen manyetik silika mikrokürelerin yüzeyi polidopamin (PDA) ile kaplanmış ve bu moleküllere Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiştir. Bunun için öncelikle dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilen poli(glisidil metakrilat) çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu için çıkış lateksi olarak kullanılmış ve monodispers-gözenekli yapıdaki poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) mikroküreler elde edilmiştir. Sentezlenen mikroküreler, Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları kullanılarak ikili çöktürme ile manyetik forma dönüştürülmüştür. Bu mikroküreler üzerine hidroliz-kondenzasyon reaksiyonu yöntemiyle TEOS yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Böylece 6

µm ortalama boy dağılımına ve 8.6 nm ortalama gözenek boyutuna sahip monodispers-gözenekli manyetik silika mikroküreler sentezlenmiştir. PDA, silika mikroküreler üzerine ince bir tabaka halinde kaplanmıştır. Manyetik silika mikroküreler ve PDA kaplanmış mikrokürelere ait doygunluk manyetizasyon değerleri ise sırasıyla 25 ve 21 emu/g olarak bulunmuş ve bu değerlerin manyetik alan ile ayırma için gerekli değerlerin (16.3 emu/g) üzerinde olduğu görülmüştür. İMAK uygulamalarında kromatografik sorbent olarak kullanılabilmeleri için partiküllerin PDA katmanında yer alan hidroksil grupları üzerinden Ni²⁺ iyonlarının immobilizasyonu sağlanmıştır.

Elde edilen kromatografik sorbent ile kesikli sistemde protein adsorpsiyon-desorpsiyon prosesleri gerçekleştirilmiştir. Sorbentlerin, serum albumin (BSA), hemoglobin (HB) ve lizozim proteinlerine karşı afinitenin belirlenmesi için, adsorpsiyon kapasiteleri, desorpsiyon ve izolasyon verimleri ölçülmüştür. Artan sorbent derişimi ile adsorpsiyon kapasitesi ve desorpsiyon veriminde azalma gözlenmiştir. Bütün proteinler için 2 mg/mL başlangıç derişimi ile maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır. Bu değerler HB, Lizozim, BSA için sırası ile 80, 70 ve 54 mg/g olarak belirlenmiştir. Desorpsiyon verimleri artan protein konsantrasyonu ile artarken, izolasyon verimlerinde maksimum değer 0.5 ve 1.0 mg/mL protein konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Aynı çalışmalar Ni²⁺ iyonunun protein izolasyonundaki fonksiyonunu belirlemek amacıyla Ni²⁺ iyonu immobilize edilmemiş PDA kaplı mikroküreler ile tekrarlanmıştır. Bu çalışmalarda Ni²⁺ içeren sorbente kıyasla daha düşük adsorpsiyon kapasitesi değerleri elde edilmiştir. Desorpsiyon ile izolasyon verimleri ise Ni²⁺ iyonu içeren mikrokürelere göre daha düşük düzeyde kalmıştır. Kullanılan iki tür mikropartikül türü için farklı proteinler ile adsorpsiyon izotermi oluşturulmuştur. Sonuçta her iki partikül türü için proteinlerin mikroküreler üzerine adsorpsiyonunun Langmuir izotermi ile uyumlu olduğu ve homojen yapıda, tek tabaka şeklinde gerçekleştiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İMAK, Protein İzolasyonu, Serum Albumin, Lizozim, Hemoglobin

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF IMMOBILIZED METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY BASED BATCH SYSTEMS FOR PROTEIN ISOLATION

Buket ÇELİKKAYA

Graduate Degree, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL

February 2017, 68 pages

Proteins are macromolecules that have functions as hormone, enzyme, structure and defense. Today, the isolation and purification of proteins, determination of their functions and explanation of their biochemical reactions are developing issues. For the identification of biological processes in organisms, a new approach is getting important called 'immobilized metal affinity chromatography (IMAC)'. Purification of recombinant proteins, isolation of serum proteins and phosphopeptides, characterization of proteins and peptides, isolations of macromolecules like RNA, DNA, oligonucleotide are major applications of IMAC.

In the scope of this study, the magnetic silica microspheres were coated with a polydopamine (PDA) layer and Ni²⁺ ions were immobilized on the PDA coating. In the first step of the synthesis, the product of the dispersion polymerization process, poly(glycidyl methacrylate), was used as seed latex in the multistage microsuspension polymerization. Then, the monodisperse-porous poly(methacrylic acid-co-ethylene dimethacrylate) microspheres were obtained. The magnetization of

microspheres was performed by the impregnation of Fe^{2+} ve Fe^{3+} ions into the particles. Next, monodisperse-porous magnetic silica microspheres were synthesized using the sol-gel templating protocol, with 6 μm in size and the average pore size of 8.6 nm. The magnetic SiO_2 microspheres were coated with a thin layer of PDA for functionalization. The magnetic SiO_2 microspheres and PDA coated microspheres had the saturation magnetization values of 25 and 21 emu/g, respectively, those were higher than the sufficient value for magnetic separation (16.3 emu/g). Finally, Ni^{2+} ions were immobilized via the functional hydroxyl groups of PDA layer on the magnetic microspheres and the final product was used as the chromatographic sorbent in IMAC process.

The chromatographic sorbent was used in the successive adsorption-desorption in batch fashion. The adsorption capacity, and the desorption and isolation efficiencies were determined to demonstrate the affinity of sorbent against to bovine serum albumin (BSA), hemoglobin (HB) and lysozyme. The results indicated that the adsorption capacity and the desorption efficiency decreased with the increasing sorbent concentration. The adsorption capacity took its maximum value for all proteins at a protein concentration of 2.0 mg/mL. The corresponding values were 80, 70 and 54 mg/g for HB, lysozyme and BSA, respectively. The maximum isolation efficiencies were obtained at 0.5 and 1.0 mg/mL protein concentrations. All analyses were repeated with PDA coated microspheres not containing Ni^{2+} ions to figure out the function of Ni^{2+} ions during the protein isolation. The results showed that the sorbent not containing Ni^{2+} ions had lower adsorption capacity when compared to Ni^{2+} immobilized one. The desorption and isolation efficiencies were also lower with the sorbent not containing Ni^{2+} ions. The adsorption isotherms were plotted for all proteins. As a result, the adsorption of proteins onto the synthesized sorbent was adequately described by Langmuir isotherm. This model demonstrated that the adsorption was homogeneous and occurred in the form of a monolayer on the sorbent surface.

Keywords: IMAC, Protein Isolation, Serum Albumin, Lysozyme, Hemoglobin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, eşsiz bir bilim insanı olan, engin bilgi ve deneyimleri ışığında bana sürekli yol gösteren, bu alanda ilerlemem için beni teşvik eden, bitmeyen çalışma azmini ve istikrarını örnek aldığım tez danışmanım, saygıdeğer hocam Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e sonsuz teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteği sağlayan, bitmeyen sorularıma verdiği cevaplar ve birlikte yaptığımız çalışmalar sırasında kendisinden çok şey öğrendiğim, disiplinli kişiliğini örnek aldığım Dr. Kouroush Salimi'ye; deneysel çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, büyük bir sabır ve emek ile bana çok şey öğreten, çalışmamın her anında desteğini ve yardımını eksik etmeyen laboratuvar arkadaşım Duygu Deniz Usta' ya; birlikte birçok deneysel çalışma yürüttüğümüz Ecem Hatipoğlu, Merve Gündoğan, Ege Ediz, Koray Çakır ve Merve Durmaz' a; aynı laboratuvarı paylaşmaktan büyük keyif aldığım Dr. Özlem Hamaloğlu, Aykut Bilir, Eda Ögüt, Ebru Sağ, Gülçin Günal, Gözde Güçlü, Cihan Demir, Özlem İpek, Gülten Necip, Fatma Çambay, Anıl Kuban'a; yüksek lisans boyunca muhabbetleri ile beni hep mutlu eden, iki dakika sohbet etmek için çay ve kahve molaları yarattığımız Ebru Tamahkar, Gökçe Erdem ve Pınar Kızıltaş' a;

Doğduğum günden bugüne kadar hayatımın her anında, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan, yorulmadan, bıkmadan beni destekleyen, bana güvenen, maddi manevi her konuda yanımda olan, bir gün bile sevgisini eksik etmeyen, yürüdüğüm her yolda elimi tutan abime ve canımın içi anneme,

Bana her türlü lojistik imkanı sağlayan, yemek yapamadığımda karnımı doyuran ve en önemlisi gülen gözlerinin sıcaklığı ile hep yanı başımda hissettiğim Salih Karabulut' a; kafama takılan her türlü soru işaretini çözmeme yardımcı olan ve çay-kahve ikramında sınır tanımayan filozof Arda Bilgin' e; anlattığı olaylar olaylar ile günümüze heyecan katan portakal kralı Hüseyin Özen' e; sahip olduğu olumlu bakış açısıyla beni sürekli motive eden pastaları ağılatan Hakan Keskin' e; girdiği her ortama neşe katan Samet Yanar' a; hayatıma girdiklerinden bu güne kadar beni hiç yalnız bırakmayıp bana kardeş olan Fazilet Tekşan, Elif Orhan, Burçin Furan Cihan' a,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ VE MİNNET DUYGULARIMI SUNUYORUM...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Proteinlerin Saflaştırma Teknikleri	4
2.2. Afinite Kromatografisi	4
2.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi	8
2.3.1. Katı Destek Olarak Kullanılan Matrisler	9
2.3.2. Ligandlar	10
2.3.3. Ligandlar Üzerine İmmobilize Edilen Metal İyonları	14
2.3.4. Kromatografik Sorbentler Kullanılarak Gerçekleştirilen Adsorpsiyon- Desorpsiyon Mekanizması	15
2.3.5. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisinin Avantajları ve Dezavantajları	17
2.4. Polimerizasyon Teknikleri	19
2.4.1. Dispersiyon Polimerizasyonu	19
2.4.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu	20
2.5. Adsorpsiyon İzotermi	21
2.5.1. Langmuir İzotermi	22
2.5.2. Freundlich İzotermi	22
2.5.3. Temkin İzotermi	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Kullanılan Malzemeler	24
3.2. Monodispers-Gözenekli Manyetik Silika Bazlı İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Sorbentlerinin Eldesi	25

3.2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu ile Poli(glisidil metakrilat) Üretimi	25
3.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspanسیون Polimerizasyonu ile Poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) Üretimi	25
3.2.3. Poli(MAA-co-EDMA) Küresel Mikropartiküllerin Manyetik Forma Dönüştürülmesi	27
3.2.4. Silika Bazlı Manyetik Mikrokürelerin Sentezi	28
3.2.5. Silika Bazlı Manyetik Mikroküreler Üzerine Polidopamin Kaplanması	29
3.2.6. PDA Kaplanmış Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Ni ²⁺ İyonlarının İmmobilizasyonu.....	30
3.3. Üretilen Kromatografik Sorbentlerin Karakterizasyonu.....	31
3.4. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile Protein İzolasyonu	31
3.4.1. Sorbent Miktarı Etkisinin Tespiti İçin Sabit Başlangıç Protein Konsantrasyonunda Gerçekleştirilen Adsorpsiyon İşlemi.....	32
3.4.2. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Etkisinin Tespiti İçin Sabit Sorbent Miktarında Gerçekleştirilen Adsorpsiyon İşlemi.....	32
3.4.3. Desorpsiyon İşlemi	33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Karakterizasyon	34
4.2. Sorbent Miktarının Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi	38
4.3. Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi (Ni ²⁺ -PDA@Manyetik-SiO ₂ Mikroküreler İçin).....	40
4.4. Mikropartiküller Üzerine İmmobilize Edilen Ni ²⁺ İyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi.....	44
4.4.1. Ni ²⁺ İyonunun Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi	44
4.4.2. Ni ²⁺ İyonunun Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi	48
4.4.3. Ni ²⁺ İyonunun İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.....	50
4.5. Adsorpsiyon İzotermi.....	52
4.5.1. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Mikrokürelere Ait Adsorpsiyon İzotermi.....	52
4.5.2. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmemiş Mikrokürelere Ait Adsorpsiyon İzotermi..	55
5. GENEL SONUÇLAR.....	58
KAYNAKLAR.....	61

ÖZGEÇMİŞ	66
----------------	----

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Protein Saflaştırma Tekniklerinin Tarihsel Süreci [8]	5
Çizelge 2.2. Fizikokimyasal Özelliklere Göre Uygulanan Kromatografik Yöntemler [11]	6
Çizelge 2.3. Afinite Kromatografisi Alt Birimleri [12]	8
Çizelge 4.1. Manyetik-SiO ₂ ve PDA@ Manyetik-SiO ₂ Mikropartiküllerine Ait Morfolojik Özellikler.....	36
Çizelge 4.2. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir, Freundlich ve Temkin İzoterm Sabitleri ve R ² Değerleri.....	54
Çizelge 4.3. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir, Freundlich ve Temkin İzoterm Sabitleri ve R ² Değerleri.....	57

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. Genel Amino Asit Gösterimi ve Peptid Bağı Oluşumu [1]	1
Şekil 2.1. Afinite Kromatografisi Prensipleri [3].....	7
Şekil 2.2. Çeşitli Ligandların Yapısal Gösterimi [5].....	12
Şekil 2.3. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş NTA ve TED Ligandlarının Histidin Grupları ile Etkileşimi [17]	13
Şekil 3.1. Poli(MMA-co-EDMA) Mikropartiküllerinin Manyetikleştirilmesi [34].....	27
Şekil 3.2. Manyetik Poli(MAA-co-EDMA) Mikroküreler Üzerine Silika Bağlanması [34]	29
Şekil 3.3. Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Polidopamin Kaplanması [34]	30
Şekil 3.4. PDA@Manyetik-SiO ₂ Mikroküreler Üzerine Ni ²⁺ İyonlarının İmmobilizasyonu [34]	31
Şekil 4.1. Manyetik-SiO ₂ Mikrokürelerin SEM Görüntüsü	35
Şekil 4.2. PDA@Manyetik-SiO ₂ Mikrokürelerin SEM Görüntüsü	36
Şekil 4.3. Manyetik-SiO ₂ ile PDA@Manyetik-SiO ₂ Mikrokürelerine Ait VSM Cihazı ile Elde Edilmiş Manyetizasyon Eğrileri.....	37
Şekil 4.4. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Sorbent Miktarının Protein (BSA, Lizozim, HB) Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Protein Konsantrasyonu: 1 mg/mL; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).....	38
Şekil 4.5. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Sorbent Miktarının Protein (BSA, Lizozim, HB) Desorpsiyon Verimine Etkisi. (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1,5 mL; Protein Konsantrasyonu: 1 mg/mL; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1,5 saat).....	39
Şekil 4.6. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Sorbent Miktarının Protein (BSA, Lizozim, HB) İzolasyon Verimine Etkisi.....	40

Şekil 4.7. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Başlangıç Protein (BSA, Lizozim, HB) Konsantrasyonu Değişiminin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)	41
Şekil 4.8. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Başlangıç Protein (BSA, Lizozim, HB) Konsantrasyonu Değişiminin Desorpsiyon Verimine Etkisi. (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat)	42
Şekil 4.9. Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Başlangıç Protein (BSA, Lizozim, HB) Konsantrasyonu Değişiminin İzolasyon Verimine Etkisi.	43
Şekil 4.10. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç BSA Konsantrasyonlarında Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).	45
Şekil 4.11. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç Lizozim Konsantrasyonlarında Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).....	46
Şekil 4.12. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç HB Konsantrasyonlarında Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).	47
Şekil 4.13. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç BSA Konsantrasyonlarında Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat).	48
Şekil 4.14. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç Lizozim Konsantrasyonlarında Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu,	

0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat).....	49
Şekil 4.15. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç HB Konsantrasyonlarında Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat).	49
Şekil 4.16. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç BSA Konsantrasyonlarında İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.....	50
Şekil 4.17. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç Lizozim Konsantrasyonlarında İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.....	51
Şekil 4.18. Ni ²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç HB Konsantrasyonlarında İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.....	51
Şekil 4.19. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir Adsorpsiyon İzotermleri. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).....	52
Şekil 4.20. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Freundlich Adsorpsiyon İzotermleri. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).....	53
Şekil 4.21. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Temkin Adsorpsiyon İzotermleri. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).....	54
Şekil 4.22. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir Adsorpsiyon İzotermleri. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)	55
Şekil 4.23. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni ²⁺ İyonu İmmobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Freundlich Adsorpsiyon	

İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7;
Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

..... 56

Şekil 4.24. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni²⁺ İyonu İmmobilize Edilmemiş
Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Temkin Adsorpsiyon
İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7;
Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

..... 56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Π	Pi
α	Alfa
A _T	Temkin İzoterm Denge Bağlanma Sabiti (L/g)
A ₀	Başlangıç Protein Konsantrasyonu
A ₁	Adsorplama İşlemi Sonrası Protein Konsantrasyonu
Ag	Gümüş
Al	Aluminyum
β	Beta
b _T	Temkin İzoterm Sabiti
B	Adsorpsiyon Isısı İle İlişkili Sabit (J/mol)
C _e	Adsorbatın Denge Konsantrasyonu (mg/L)
C ₀	Adsorbatın Başlangıç Konsantrasyonu (mg/L)
Ca	Kalsiyum
Co	Kobalt
Cu	Bakır
CV	Değişim Katsayısı
D _n	Ortalama Gözenek Çapı
D ₁	İlk Desorpsiyon İşlemi Sonrası Desorbe Edilen Protein Miktarı
D ₂	İkinci Desorpsiyon İşlemi Sonrası Desorbe Edilen Protein Miktarı
D ₃	Üçüncü Desorpsiyon İşlemi Sonrası Desorbe Edilen Protein Miktarı
emu/g	Manyetizasyon Kütlesi
Fe	Demir
Ga	Galyum
Hg	Civa

K_F	Freundlich İzoterm Sabiti
K_L	Langmuir Adsorpsiyon Sabiti (L/mg)
m	Adsorbent Miktarı (g)
m^2	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
M	Molar
n	Adsorpsiyon Yoğunluğu
nm	Nanometre
Ni	Nikel
q_e	Birim Adsorbanın Adsorpladığı Miktar (mg/g)
q_m	Adsorbentin Maksimum Adsorplama Kapasitesi (mg/g)
R	Gaz Sabiti (J/mol/K)
R^2	Varyasyon Katsayısı
T	Sıcaklık (K)
V	Adsorbat Çözeltinin Hacmi (L)
Zn	Çinko
Zr	Zirkonyum

Kısaltmalar

AIBN	2,2' - Azobisizobütronitril
$-AsO_3^{2-}$	Arsenat
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BET	Gözenek Boyutu Analizörü
BPO	Benzoil Peroksit
BSA	Sığır Serum Albumin
CM-Asp	Karboksimetil Aspartik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

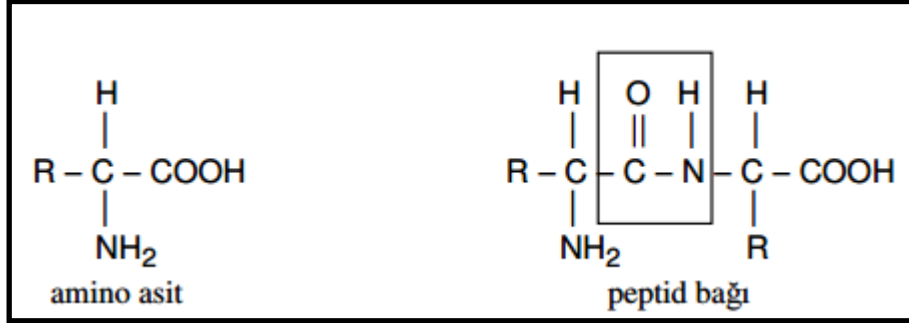
EB	Etilbenzen
EDMA	Etilendimetakrilat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtOH	Etanol
Fe ₃ O ₄	Demiroksit
FeCl ₂ .4H ₂ O	Demir (II) Klorür Tetrahidrat
FeCl ₃ .6H ₂ O	Demir (III) Klorür Hekzahidrat
GMA	Glisidil Metakrilat
HB	Hemoglobin
HCl	Hidroklorik Asit
HQ	Hidroksiquinolin
İDA	İminodiasetik Asit
İMAK	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
İPA	İzo-Propanol
MAA	Metakrilik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
NiCl ₂ .6H ₂ O	Nikel (II) Klorür Hekzahidrat
NTA	Nitrilotriasetik Asit
PDA	Polidopamin
-PO ₃ ²⁻	Fosfat
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Polivinil Prolidon
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Devir / Dakika
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SiO ₂	Silika
TBAI	Tetrabutil Amonyum İyodür
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
TED	N,N,N'-Tris-Karboksimetil Etilen Dimin

THF
VSM

Tetrahidrofuran
Titreşimli Örnek Magnetometresi

1. GİRİŞ

Hücrelerin kuru kütlelerinin yarısından fazlasını oluşturan proteinler, gen aktarımını sağlayan DNA ve RNA moleküllerinin ortak çalışması ile sentezlenen makro boyuttaki biyomoleküllerdir. Varolan 20 çeşit amino asit (alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glutamin, glutamik asit, glisin, histidin, izolösin, lösin, lizin, methionin, fenilalanin, prolin, serin, threonin, triptofan, tirozin, valin) kondenzasyon polimerasyonu sonucu peptid bağları ile çeşitli formlarda birleşerek enzimsel, hormonal, yapısal ve savunma görevleri olan farklı proteinlerin oluşmasını sağlamaktadır. Amino asitler Şekil 1.1' de sunulduğu üzere yapılarında amino ve karboksil grupları barındırmaktadır [1]. Peptid bağları ise bir amino asit üzerindeki amino grubu ile diğer amino asitteki karboksil grubunun birleşip su açığa çıkardığı sentez reaksiyonu sonucu meydana gelmektedir [2].



Şekil 1.1. Genel Amino Asit Gösterimi ve Peptid Bağı Oluşumu [1]

Amino asitlerin birleşmesi sonucu birbirinden farklı proteinlerin ortaya çıkmasını sağlayan dört farklı yapısal form mevcuttur. Birincil yapı; amino asitlerin peptid bağları (kovalent bağlar) aracılığıyla bağlanırken oluşturdukları dizilim farkından kaynaklanan polipeptid zinciridir. İkincil yapı ise polipeptid yapının farklı kısımlarında yer alan -H ve -O atomları arasındaki kuvvetli hidrojen bağları ile oluşan farklı konfigürasyonlardaki katlanma şekilleridir. En yaygın görülen ikincil yapı α -heliks ve β -tabaka modelleridir. İkincil yapı modellerinin değişik parçaları arasında oluşan tuz köprüleri, hidrojen ve kovalent disülfid bağları, hidrofobik ve iyonik etkileşimler sonucu proteinin üçüncül yapısı ortaya çıkmaktadır. Dördüncül yapı ise her proteinde şart olmayan, birden fazla üçüncül yapıdaki polipeptid zincirin aktif bir protein oluşturmak amacı ile meydana getirdiği yeni bir yapıdır [2].

Bitkisel dokular, hayvansal dokular ve mikroorganizmalar gibi değişik birçok biyolojik yapıyı içeren çeşitli protein kaynaklarından, belli bir protein türünü izole etmek için farklı saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Elde edilen proteinler laboratuvarlarda karakterizasyon analizleri, işlevsel özelliklerinin tespiti ve biyokimyasal tepkimelerinin analizi için kullanılırken kimya ve ilaç endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanım amacına göre, izole edilen proteinin saflık oranı ve miktarı farklılık göstermektedir. Bir laboratuvar çalışmasında % 100' e yakın saflıktaki protein için gerekli olan miktar mikrogram cinsinden ölçülürken, endüstriyel kullanım alanlarında daha az saflıkta ve tonlarca protein gerekmektedir [3].

Protein moleküllerinin buldukları ortamdan izolasyonu sırasında çözünürlükleri, moleköl boyutları, hidrofobik özellikleri (polar özellikleri), afinite özellikleri ve elektrik yükleri gibi sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özellikler büyük önem taşımaktadır. Proteinler saflaştırılırken seçilecek metoda karar vermek için bir diğer önemli husus proteinlerin denatürasyon şartlarıdır. Proteinlerin denatürasyonuna yol açan parametreler pH, sıcaklık, organik solventler, deterjan ve ağır metal gibi inhibitörler, katotrofik tuzlar ve protein yapısındaki hidrojen bağlarını inaktive ederek birincil yapıya dönmesine neden olan diğer maddelerdir. Her proteinin bu parametreler için inaktif olduğu aralıklar farklıdır ve bu özelliklerine göre saflaştırma yöntemleri değişmektedir [3, 4].

İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK), protein saflaştırılmasında ve ayrıştırılmasında 40 yıldır kullanılmakta ve hala geliştirilmekte olan bir metottur. Rekombinant proteinlerin saflaştırılması, serum proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılması, birçok proteinin ve peptidin (metallo proteinler gibi) karakterizasyonu, fosfopeptidlerin ayrılması, çeşitli enzimlerin biyo-sıvılardan tecrit edilmesi, vücuttaki birçok biyolojik olayın anlaşılmasına aracılık eden ve protein barındırmayan nükleotid, oligonükleotid, RNA, DNA gibi makromoleküllerin izolasyonu bu yöntem kullanılarak yapılmaktadır [5, 6].

Sunulan tezde amaçlanan, farklı proteinlerin izolasyonu için kullanılabilecek bir İMAK sorbentinin geliştirilmesidir. Bu amaçla silika bazlı monodispers gözenekli mikropartiküller üzerine dopamin kaplanmış ve Ni²⁺ immobilizasyonu ile sorbent

sentezi tamamlanmıştır. Çalışmada geliştirilen sorbent ile farklı proteinlerin, adsorpsiyon kapasiteleri, desorpsiyon ve izolasyon verimleri ölçülmüştür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Proteinlerin Safılaştırma Teknikleri

Proteinlerin safılaştırılması ilk olarak 1789 yılında, çöktürme metodu ile albumine benzeyen bir maddenin bitkilerden elde edilmesi ile ortaya atılmıştır. 20. yüzyıla kadar çöktürme metoduna ilave olarak kullanılan diğere teknikler ise filtrasyon ve kristalizasyondan oluşmaktadır. 1906 yılında ise Michail Tswett tarafından kromatografi teriminin tanımlanması ile çeşitli kromatografik yöntemler ortaya çıkmaya başlamıştır. Ayrıca bu yıllarda santrifüjleme ve elektroforez gibi yöntemler de protein safılaştırmasında kullanılmıştır. Çizelge 2.1' de protein safılaştırma metodlarının 1789 yılındaki çöktürme işleminden, günümüzdeki ileri kromatografik yöntemlere kadar izlediği süreç ayrıntılı bir şekilde verilmiştir [7]. Sahip oldukları özellikler çerçevesinde proteinler, bu yöntemlerden bir veya birkaç tanesinin kombinasyonu ile safılaştırılabilmektedir. Protein safılaştırma işlemi verimli bir şekilde başarıya ulaştırmak için safılaştırılacak proteinin özelliklerine ve miktarına göre bu teknikler arasından ideal olanını seçmek, proses parametrelerini optimize ederek verimi arttırmak, işlem adımlarını en aza indirip olası kayıpları azaltmak dikkat edilmesi gereken en önemli unsurlardır [3, 4].

2.2. Afinite Kromatografisi

Kelime anlamı olarak 'renk yazmak' olan kromatografi, kavramsal olarak birden fazla maddeden oluşan karışım içerisindeki bileşiklerin, heterojen karışım oluşturan iki farklı faz içerisinde dağılarak ayrılmalarını sağlayan fiziksel bir metottur. Çoğunlukla bu fazlardan bir tanesi sabit faz iken, diğere faz hareketli faz olarak adlandırılmaktadır [4, 8]. Ayrıştırılacak olan homojen karışımdaki asıl bileşik ile sabit faz arasında yüzeye tutunma etkileşimi olan kromatografi, adsorpsiyon kromatografisidir [9]. Bu tutunma sonrasında ortamda yer alan tutunamayan hedef bileşik molekülleri ile safsızlıkların ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Ardından desorpsiyon işlemi ile elde edilmeye çalışılan bileşik, sabit faz üzerinden geri kazanılmaktadır [4, 8]. Adsorpsiyon ve desorpsiyon mekanizmalarındaki farklılık sonucu, kromatografik yöntemler gruplara ayrılmaktadır. Mekanizmalardaki bu farklılığı yaratan ise ayrıştırılacak biyomoleküllerin biyofiziksel özelliklerindeki (boyut, yük, polarite gibi)

çeşitlilikten kaynaklanmaktadır [3]. Çizelge 2.2' de, ayrıştırılacak örneğin sahip olduğu özelliklere göre, seçilebilecek kromatografik yöntemler özetlenmiştir [10].

Çizelge 2.1. Protein Saflaştırma Tekniklerinin Tarihsel Süreci [7]

KULLANILAN TEKNİKLER	YIL
Çöktürme	1789
Yumurta Albumin Kristalizasyonu	1889
Kromatografi	1903
Ultrasantrifüjleme	1924
Serbest Çözelti Elektroforezi	1937
İyon Değişim Kromatografisi	1940'lar
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	1941
Büyükölçek Ayırma Kromatografisi	1955
Hidroksiapatit Kromatografisi	1956
Sefadex (jel filtrasyon ortamı)	1959
Poliakrilamid Jel Elektroforez	1959
İzoelektrik Odaklama	1959
Sefaroz	1967
Afinite Kromatografisi	1968
Ters-Faz Kromatografisi	1970'ler
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1973
İki-Boyutlu Kromatografi	1975
İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi	1975
Kapiler Elektroforez	1981
Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi	1982
Histidin Afinite Tag	1988

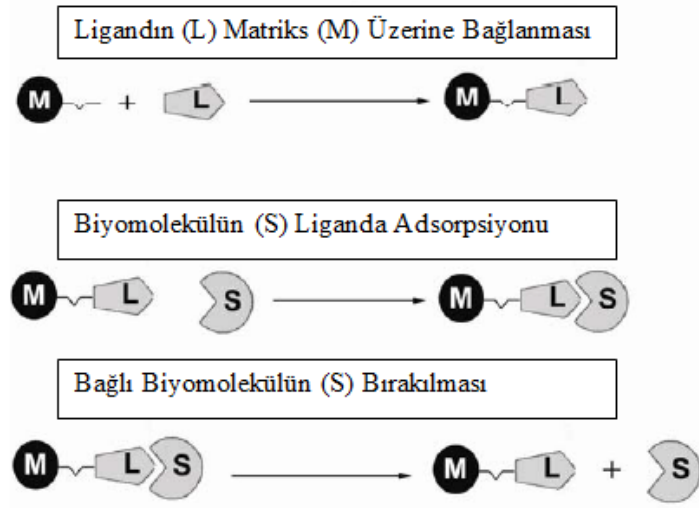
Çizelge 2.2. Fizikokimyasal Özelliklere Göre Uygulanan Kromatografik Yöntemler [10]

FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLER	KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER
Elektriksel Yük	İyon Değişim Kromatografisi
Hidrofobisite	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
	Ters Faz Kromatografisi
Spesifik Bağlanma	Afinite Kromatografisi
Moleküler Boyut	Jel Filtrasyon Kromatografisi
Elektriksel Mobilite	Elektroforez Kromatografisi
Sedimentasyon Hızı	Santrifüj Kromatografisi

Afinite kromatografisi, immobilize liganda özel afiniteye sahip biyomoleküller ile ligand arasındaki spesifik adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinin birbirini takip etmesi (tersinir) işlemidir. Sadece afinite kromatografisi, biyomoleküller ile ligandlar arasında gerçekleşen spesifik tutunma işlemini baz alarak gerçekleştirilmektedir [11, 12]. Biyomoleküllerin fiziksel ve kimyasal fonksiyonları üzerine temellendirilmeyen afinite kromatografisi, biyolojik özellikleri sayesinde moleküllerin tanınması esasına dayanmaktadır [4]. İlk olarak 1968 yılında Cuatrecasas ve arkadaşlarının katı matriks üzerinde kovalent bağlı bulunan bir inhibitör aracılığı ile o inhibitöre özel enzimin saflaştırılabileceğini ispatlaması sonucu uygulamaya geçirilmiştir [10].

Afinite kromatografisinde, Şekil 2.1' de detaylandırıldığı gibi katı matriks üzerine kovalent olarak bağlanan liganda özel biyomolekül, ayrıştırılacak olan karışım içerisinde ayrılarak liganda tutunmaktadır [3]. Bu tutunma hidrofobik kuvvetler, iyonik etkileşim, London dağılma kuvveti, dipol-dipol kuvvetler ve yük-aktarım etkileşimlerinden bir veya birkaçının aynı anda oluşması ile gerçekleşmektedir. Bağlanan bu moleküllerin ortamdan ayrıştırılması ise, ortam pH'sında, iyonik gücünde

veya sıcaklığında yapılan değişiklikler ya da ortama eklenen spesifik solventler veya yarışmacı ligandlar ile olmaktadır. Ancak yapılan bu değişiklikler, hedef proteinin denatürasyonuna sebep olmayacak şekilde olmalıdır [2, 11]. Afinite kromatografisi, temel prensip etrafında farklılaşan metodlara göre Çizelge 2.3' te belirtildiği gibi birçok alt birime ayrılmıştır [11].



Şekil 2.1. Afinite Kromatografisi Prensibi [3]

Enzim, hormon, reseptör, vitamin, antijen, antikor, protein, karbonhidrat, bakteri, virüs ve hücre gibi birçok makro boyutta molekül afinite kromatografisi aracılığı ile ayrıştırılmakta veya saflaştırılmaktadır [11, 12]. Bu kadar çok alanda etkin olarak kullanılabilir olmasına rağmen, ligand olarak kullanılan moleküllerin çalışma koşullarındaki kararsızlıkları, afinite kromatografisinin endüstriyel boyutta kullanılmasına engel teşkil etmektedir. Ancak son yıllarda üretilen yapay ligandlar aracılığı ile daha kararlı yapılar elde edilerek afinite kromatografisinin endüstriyel amaçlı kullanımı yaygınlaştırılmıştır [12].

Çizelge 2.3. Afinite Kromatografisi Alt Birimleri [11]

No.	Alt Birimler
1	Hidrofobik Afinite Kromatografisi
2	İmmünoafinite Kromatografisi
3	Kovalent Afinite Kromatografisi
4	Metal-Şelat Afinite Kromatografisi
5	Moleküler Baskılama Afinite Kromatografisi
6	Membran Temelli Afinite Kromatografisi
7	Afinite Fraksiyonlama Kromatografisi
8	Lektin Afinite Kromatografisi
9	Boya-Ligand Afinite Kromatografisi
10	Reseptör Afinite Kromatografisi
11	Akışkan Afinite Kromatografisi
12	Perfüzyon Afinite Kromatografisi
13	Tiyofilik Afinite Kromatografisi
14	Yüksek Performans Afinite Kromatografisi
15	Afinite Yoğunluk Pertürbasyon Kromatografisi
16	Türevlendirilmiş Afinite Kromatografisi
17	Afinite Bölümlleme Kromatografisi
18	Afinite Elektroforez Kromatografisi
19	Afinite Kapiler Elektroforez Kromatografisi
20	Santrifüj Afinite Kromatografisi

2.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi

İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) prensibi ilk olarak Porath ve arkadaşları tarafından 1975 yılında ortaya atılmıştır. Yaptıkları çalışmada agarose matriksinin üzerine iminodiasetik asit (İDA) ligandı kaplanmış ve çinko, bakır, nikel, kobalt geçiş metallerinin bu ligand üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan kromatografik sorbent ile immobilize metallerin, insan serumu içerisindeki sistein, histidin ve triptofan amino asitlerine gösterdikleri afinite incelenmiştir [13, 14]. Genel olarak bu prensip Hellferich tarafından 'ligand değişim kromatografisi' adı altında 1961 yılında ortaya atılmış olmakla birlikte, yaptıkları çalışmada sadece küçük moleküller için ayrıştırma gerçekleştirilmiştir. İlk kez Porath ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ligand değişim kromatografisi türevlendirilerek, yeni sistem ile proteinlerin ayrıştırıldığı ve saflaştırıldığı gösterilmiş ve 'immobilize metal iyon afinitesi' kavramı olarak isimlendirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem, sonraki yıllarda hem laboratuvar ölçekli hem de endsütriyel ölçekli birçok proteinin kompleks biyolojik sistemlerden, yüksek seçicilik ile saflaştırılmasında ve izolasyonunda önemli bir araç haline gelmiştir [15]. Proteinlerin kromatografik sorbent üzerinde adsorplanması için, protein yüzeylerinde histidin, sistein, triptofan gibi spesifik aminoasit rezidülerinin bulunması gerekmektedir. Bu sebeple histidin işaretli kullanılan proteinlerde, İMAK performansı artmakta ve saflaştırma yüksek etkinlikte gerçekleşmektedir. Ayrıca proteinlerin yapısal konfigürasyonları (ikincil, üçüncül, dördüncül yapıları) da buldukları ortamdaki ayrıştırılmalarında büyük öneme sahip olmaktadır. Elektriksel yükleri, moleküler boyutları, aminoasit kompozisyonları birbiri ile aynı olan iki protein yapısal konfigürasyonundaki farklılıklardan dolayı kolayca ayrıştırılabilmektedir. Proteinlerin, adsorbe oldukları metal ile aralarında oluşan afiniteyi azaltıp ortamdaki elue olmalarını sağlayan farklı parametreler bulunmaktadır. pH gradienti, tuz derişimi, yarışmacı ligandlar, sıcaklık, elektrostatik güç, şelat ajanları ve organik çözücüler bu parametrelerin bazılarıdır [15].

2.3.1. Katı Destek Olarak Kullanılan Matrisler

İmmobilize metal afinite kromatografisinde katı destek olarak kullanılan çok çeşitli organik ve inorganik matrisler mevcuttur. Bu yapılar, polimerik olduğu gibi inorganik bazlı da olabilmektedir. Proteinlere afinite gösteren metal immobilize olmuş son yapının yüksek verimlilik gösterebilmesi için bu matrisin belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Katı destek, kullanılan solvent ortamlarında kesinlikle çözünür olmamalı ve tüm koşullarda fiziksel, kimyasal ve mekanik olarak kararlı olmalıdır. İmmobilize olacak ligandın yüksek verimlilikte bağlanabilmesi için matris gözenekli yapıya (yüksek yüzey alanı) ve bu liganda uygun fonksiyonel gruplara (karboksil,

amid, hidroksil gibi) sahip olmalıdır. Bunun yanında spesifik ligand dışındaki maddelerle etkileşime girmemelidir. Kromatografik proses boyunca şişme veya büzölmeye maruz kalmamalıdır. Kolon kromatografilerinde hareketli fazın akış hızının yüksek olduğu durumlarda ve kullanımından sonraki rejenerasyon işlemlerinde deforme olmamalıdır. Türevlendirilmesi basit olmalı ve hidrofilik yapıda olmalıdır [2, 15].

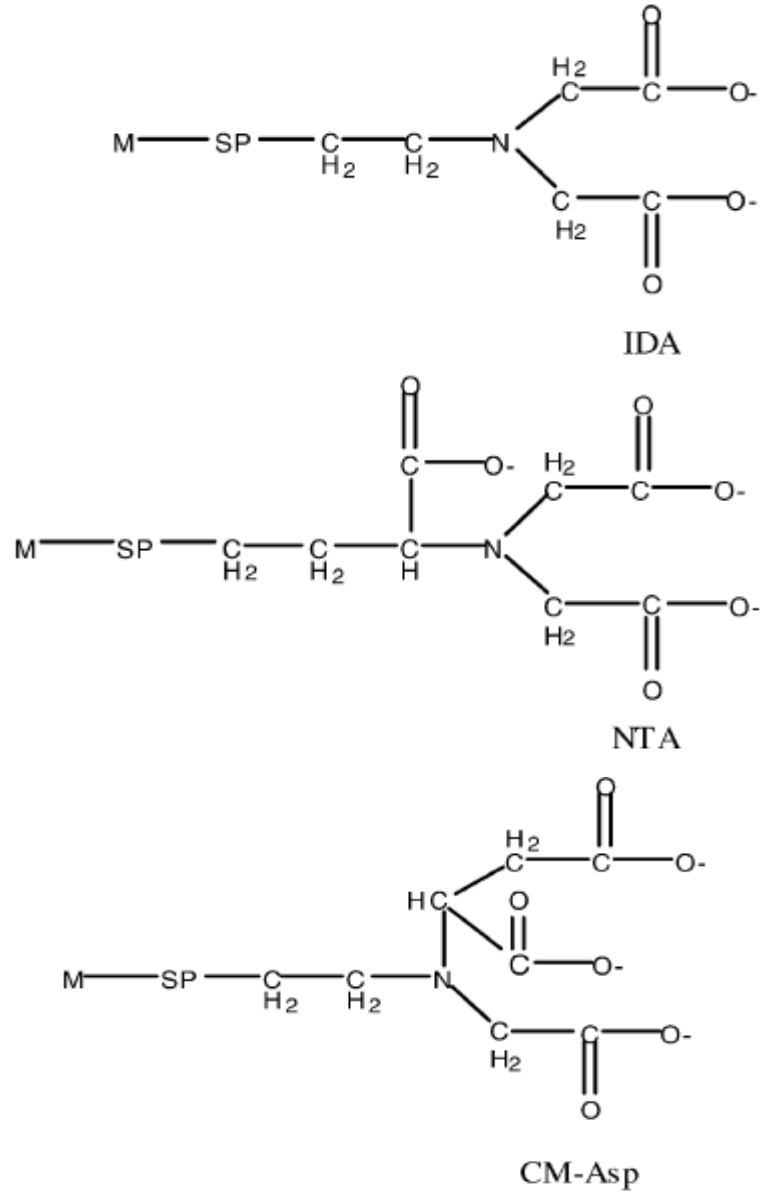
İMAK uygulamalarında ilk olarak kullanılan katı destek malzeme organik yapıdaki agarozdur. Agaroz belli sıcaklıklarda suda çözünme özelliği olan polimer yapıdaki bir karbonhidrattır. Bu yapılar hidrofilik karakterde, çeşitli ortam koşullarına dayanım gösteren ve göreceli olarak etrafındaki diğer materyallerle reaksiyona girmeyen maddelerdir [6]. Organik olarak kullanılan diğer matrikslere dekstran ve selüloz gibi örnekler verilebilmektedir. Organiklerin yanı sıra poliakrilamid, polistiren, poli(hidroksietil metakrilat), gözenekli cam, demir oksit, silika gibi çeşitli inorganik matrikslerde kullanılmaktadır [2]. Organik polimerlerin yapısal zayıflıkları, sentetik yapıdakiler veya silika bazlı matriksler ile giderilmekte ve bu yapıdakileri avantajlı konuma getirmektedir. Mekanik dayanımının yüksek olması, yapısal ve şekilsel olarak daha güçlü olması sebebiyle bu maddeler, prosesi etkilemeyecek kadar düşük miktarda deforme olmaktadır. Silika kullanılan İMAK uygulamalarının düşük veya yüksek pH seviyelerinde çalışılması ise silanol açığa çıkmasına ve bu matriksin olumsuz sonuçlar doğurmasına yol açmaktadır [6].

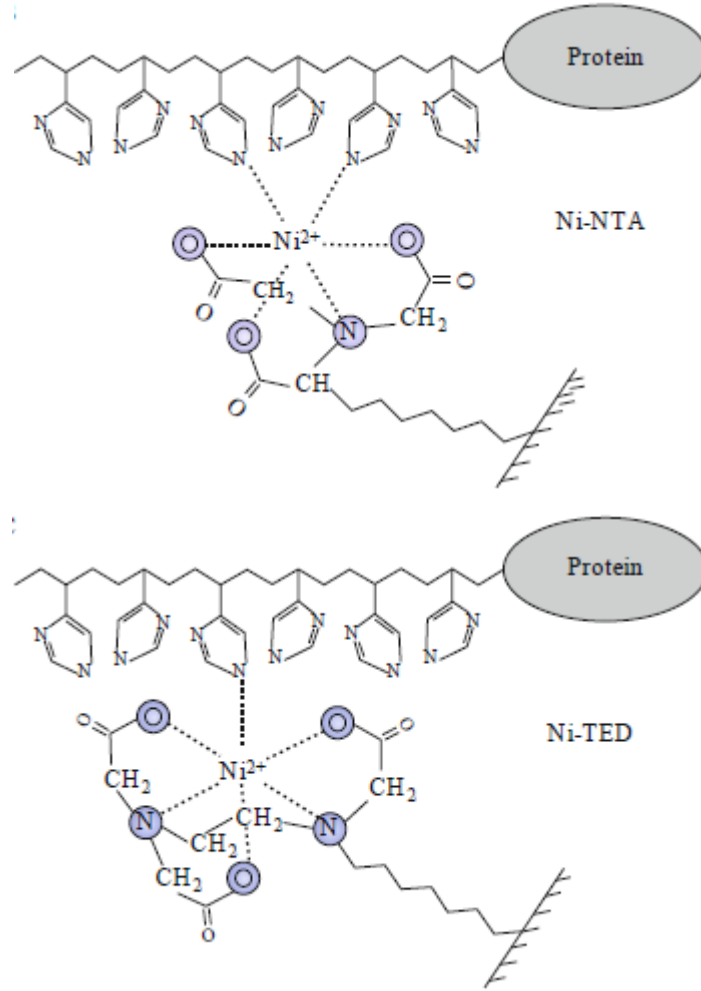
Silika (SiO_2), ilk olarak 1968 yılında Stöber tarafından geliştirilen, birçok açıdan etkin ve güçlü bir malzemedir. En önemli özellikleri arasında yüksek yüzey alanına sahip olması, denetlenmiş morfolojilerinin olması, makro veya mezo gözeneklilik gibi ayarlanabilir özelliklere sahip olması, hidrofilik özelliğinin çok başarılı olması, üstün modifiye edilebilme yeteneğinin olması, yapısal formunun kararlı olması sayılmaktadır [16].

2.3.2. Ligandlar

Katı matriks üzerine immobilize olan ligandlar, katı matriks yüzeyini kaplayarak metal iyonlarının immobilizasyonu için koordinasyon kompleksi oluşturmaktadır. Bu koordinasyonlar ligandların sahip olduğu oksijen, azot ve kükürt gibi elektron

vericilerin varlığında gerçekleşmektedir [5]. Ligandlar içerisinde en çok tercih edilen grup çok uçlu (beş, dört, üç, iki uçlu) ligandlardır. Şekil 2.2 ile bazılarının gösterildiği çok uçlu ligandlardan geniş kullanım alanına sahip 8-hidroksiquinolin (8-HQ) iki uçlu, İDA üç uçlu, nitrilotriasetik asit (NTA) ve karboksimetil aspartik asit (CM-Asp) dört uçlu, N,N,N'-tris-karboksimetil etilen dimin (TED) beş uçludur [5, 6].





Şekil 2.3. Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş NTA ve TED Ligandlarının Histidin Grupları ile Etkileşimi [17]

İMAK işlemlerinde kullanılan çok uçlu ligandlara ilaveten birçok farklı ligand türü geliştirilmektedir. Özellikle geçiş metallerine göre toksikliği daha az olan alkali ve toprak alkali metaller ile kullanıma yönelik geliştirilen ligandlar, İMAK kullanımının daha yaygın hale gelmesi için büyük önem taşımaktadır. Diasitler ve taç eterler bu amaçla üretilen ligand yapılarındandır. Yapılan çalışmalarda Ca^{2+} , K^+ gibi metallerin bu ligandlara bağlanması ile nükleik asit, protein gibi biyomoleküllerin ortamdaki ayrıştırılması sağlanmaktadır. Ligand olarak kullanılan bir diğer yapı ise triazin boyalardır. Ancak triazin boyaların stabiliteyi, genellikle uçlu ligandlar kadar yüksek olmamakta ve metal immobilize etme kapasiteleri daha az olmaktadır. Bu negatifliğine rağmen, boya liganlarının biyomoleküllere gösterdikleri afinite sayesinde, yalnızca

metal immobilizasyonunun sağladığı etkiye göre daha yüksek bir kapasite beklenmektedir [6].

NTA, göreceli olarak pahalı ve temin edilmesi zor bir ligandır. İDA' nın ise mikroküreler üzerine kaplanma işlemi çok basamaklıdır. Ayrıca fonksiyonel gruplarının da az olması sebebiyle partiküller üzerinde yüksek metal yoğunluğu için gerekli olan sürekli tabaka oluşturmamaktadır [18]. Geleneksel ligandların bu dezavantajları, daha yüksek şelatlama kapasitesine sahip olan ligandların geliştirilmesini sağlamıştır. Dopamin, arsenat ($-AsO_3^{2-}$), fosfat ($-PO_3^{2-}$), adenosin trifosfat (ATP) İMAK alanında yeni yeni kullanılmaya başlanan ligand türleridir [16].

Dopamin, demiroksit partikülleri (Fe_3O_4), grafen, ependorf tüp ve gözenekli silika partikülleri gibi birçok matriks üzerine basit bir adımda kaplanma özelliği taşımaktadır. Ayrıca alkali ortamda gerçekleşen bu kaplanma sırasında, kendiliğinden polimerizasyona uğrayıp partikül üzerinde polidopamin (PDA) formunda tabaka oluşturmaktadır. Biyo-uyumlu olan hidrofilik yapıdaki bu ligandın sahip olduğu katekol hidroksil grubu sayesinde, immobilize olacak metal iyonu ile arasında güçlü bir şelat oluşmaktadır. Oluşan bağın kuvvetinin yanısıra partikül yüzey alanını genişlettiği için immobilize olacak metal iyonu yoğunluğu artmaktadır [16, 19].

2.3.3. Ligandlar Üzerine İmmobilize Edilen Metal İyonları

İMAK, proteinlerin immobilize metal iyonlarına karşı gösterdiği afinite farkından kaynaklanan ve proteinler üzerindeki elektron donör grupları ile elektron akseptörü olan metal iyonları arasında oluşan çok noktalı etkileşim prensibine dayanan ayırma metodudur. Dolayısı ile kullanılan metal iyonunun çeşidi ve immobilize olan miktar oldukça önemlidir. İmmobilize metal iyonlarının yoğunluğu, kromatografik sorbentin kapasitesi ve seçiciliği üzerinde etkin rol oynamaktadır [5].

İMAK proseslerinde kullanılan metaller nükleofillere karşı gösterdikleri ilgi dolayısıyla, Pearson tarafından yapılan gruplandırılmadan faydalanılarak üç kısma ayrılmaktadır. Birincisi ligandda yer alan oksijen iyonlarına ilgisi olan Fe^{3+} , Ca^{2+} , Al^{3+} gibi sert metal iyonlarıdır. İkincisi kükürt iyonlarına ilgisi olan Cu^+ , Hg^{2+} ve Ag^+ gibi yumuşak metal iyonlarıdır. Son olarak ise geçiş metalleri olarak adlandırılan ve elektron çifti afinitesi olan Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Fe^{2+} iyonları yer almaktadır. Bunlar farklı ligandlarda

birinin veya birkaçının birlikte bulunduğu azot, oksijen ve kükürt iyonlarının hepsine karşı ilgi gösterme yeteneğine sahip olduklarından immobilize metal iyonu olarak en yaygın kullanılan metallerdir [5]. Bununla beraber immobilize metal iyonu olarak seçilen metal, İMAK yönteminin uygulama alanına göre veya saflaştırılacak olan proteine göre değişebilmektedir. Üç değerlikli Al^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} ve dört değerlikli Zr^{4+} gibi iyonlar fosfoproteinlerin saflaştırılmasında tercih edilirken, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} gibi iki değerlikli iyonlar çoğunlukla histidin-işaretli proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır [13]. Farklı açıdan değerlendirilen bir çalışmada ise İDA ligandı ile şelat oluşturan metal iyonlarının, birçok proteine karşı gösterdiği afinite ve alıkonma süresi bakımından sıralaması $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \geq Co^{2+}$ olarak gösterilmektedir [6].

2.3.4. Kromatografik Sorbentler Kullanılarak Gerçekleştirilen Adsorpsiyon-Desorpsiyon Mekanizması

İMAK proseslerinde genel mantık, matriks ile kovalent bağlı ligand üzerinde immobilize olmuş metal iyonu ile proteinlerin yüzeylerine ulaşan aminoasitlerdeki özel tanımlanmış kısımların arasındaki afinite prensibine dayanmaktadır. Bu özel tanımlanmış kısımlar glutamik asit, aspartik asit, tirozin, triptofan, sistein, histidin, arjinin, lizin, metionin gibi aminoasit kalıntılarının yüzeylerinde yer alan imidazol, indol ve tiyol grupları gibi elektron vericilerdir [6, 20, 21].

Metal iyonlarının, ligand yapılarının azot, kükürt ve oksijen gibi elektron donor grupları üzerinde immobilizasyonu sonrasında açıkta kalan koordinasyon noktaları, normal şartlar altında su molekülleri ile bağ yapmaktadır. Kromatografik sorbentlerin bulunduğu ortama protein dahil edildiğinde bu su molekülleri, proteinler üzerindeki elektron donor grupları ile yer değiştirebilme özelliğine sahiptir. İmidazol, tiyol ve indol grupları içeren yukarıda sayılan amino asitlerin birçoğu İMAK proseslerine uygun olmalarına rağmen, metal iyonlarına karşı en yüksek afiniteyi gösteren histidin kalıntıları protein adsorpsiyonlarında olması gereken temel aminoasit grubudur. Sisteinler, yüksek kararsızlıktaki yapılarından dolayı immobilize metal iyonları ile bağ oluşturma işlemini nadiren gerçekleştirirlerken, aromatik zincirler içeren triptofan, tirozin ve fenilalanin aminoasitleri çevrelerinde histidin kalıntıları var ise adsorpsiyona destek olabilmektedirler. Immobilize metal iyonlarının ve aminoasit gruplarının birbirine erişimi, protein üzerinde adsorpsiyona katılan kalıntının sayısı, türü, mikro

düzeydeki çevresi ve komşu aminoasit grupları ile ortaklığı, proteinin yapısal özellikleri bağlantının gücü ve adsorpsiyon verimi için önemli role sahiptir [20-22].

Proteinlerin kromatografik destek üzerine adsorpsiyonu, histidin zincirlerindeki imidazol nitrojenlerinin protonlanmamış formda olacağı pH değerinde gerçekleşmektedir. Bu değer nötr veya hafif bazik değerlerdir. Adsorpsiyon tamponu olarak, protein ve metal iyonu arasındaki spesifik etkileşim dışındaki spesifik olmayan etkileşimleri engellemek veya azaltmak için yüksek iyonik güçteki tamponlar (0.1-1.0 M arasındaki NaCl çözeltileri gibi) kullanılmaktadır [21]. Bunlar genellikle asetat veya fosfat tamponlarıdır. Tuz ilavesi ile gelen elektrolitler, metal iyonlarının koordinasyon noktalarındaki su molekülleri ile iyonlar arasındaki çekim kuvvetini azaltarak bu noktalara proteinlerin adsorbe olmasını sağlamaktadır [6].

Aminoasit yan zincirleri ve metal iyonları arasındaki interaksyonun tersinir olması, adsorpsiyonun ardından, aralarındaki afiniteyi düşüren belirli koşullar sağlandığında desorpsiyonun oluşmasını sağlamaktadır. Bu koşullardan bir tanesi hidrojen konsantrasyonunun artması ile pH değerini düşürmektir. Hidrojen iyonları, immobilize metal iyonları ile proteinler üzerindeki bağlantı bölgeleri için rekabet etmektedirler. Bu sayede histidin üzerindeki nitrojenlerde protonasyon gerçekleşmekte ve immobilize metal iyonu ile protein arasında oluşan bağ zayıflayarak zarar görmektedir. Sonuç olarak protein desorpsiyona uğramaktadır [5, 20]. Metal iyonları ile protein arasındaki bağın oluşmasına destek olan yüksek tuz derişimini azaltmak, protein elüsyonu için kullanılan metodlardandır [6]. Desorpsiyon işleminde uygulanabilecek bir diğer metod, düşük pH değerlerinde denatüre olabilecek proteinin bağlanmasında görevli aminoasit kalıntılarının benzeri olan yarışmacı ajanları ortama eklemektir. Bu ajanlar, nötr pH veya düşük konsantrasyonlardaki imidazol ya da histidin barındıran ortamlardır. İmidazol varlığında oluşan rekabet ise immobilize metal iyonlarına karşı olmaktadır. Proteinler üzerindeki imidazol grupları ile ortama eklenen imidazol veya histidin üzerindeki imidazol grupları, metal iyonlarına bağlanmak için yarışmaktadır. Bu rekabet sonucunda ise protein ve immobilize metal iyonu arasındaki bağlantı zayıflamaktadır [6, 20]. Düşük pH değerlerine karşı duyarlı ve immobilize metal iyonları ile bağı kuvvetli olan proteinler için, güçlü bir şelat bileşiği olan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) kullanılabilir. Ancak bu şekilde proteinler sorbent

üzerinden alınırken, metal iyonlarının ligand üzerindeki bağlantısı da zarar görmekte ve bir sonraki kullanım için, metal immobilizasyonunun tekrarlanarak ligandın immobilize metal iyonu ile doyurulması gerekmektedir [20, 21].

2.3.5. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisinin Avantajları ve Dezavantajları

İmmobilize metal afinite kromatografisi diğer protein saflaştırma yöntemlerine göre çok çeşitli avantajlara sahiptir. En önemli avantajlarından biri, histidin-işaretili proteinleri, herhangi bir agregasyon ve denatürasyona sebep olmadan, ayırma kapasitesi düşük olan diyaliz ve dilüsyon proseslerinin aksine yüksek verimlilikte ayırmaktır. İMAK ile üre veya guanidin-HCl ortamlarının proteinlerin denatürasyonuna yol açabilecek konsantrasyonlarında bile etkili bir şekilde ayırma yapmak mümkündür [21].

Bu kromatografi ile pH değeri 5 ila 8.5 aralığında çalışılabilmektedir. Ligand üzerine immobilize olan metal iyonlarının bağlantısı sonlandırılarak farklı metal iyonları aynı şelat üzerinde tekrar tekrar denenmektedir. Endüstriyel boyuta uygulanabilen bir yöntemdir. Kromatografik sorbentler ile yüksek spesifiklikte adsorpsiyon gerçekleşmektedir. pH değerinde değişiklik yapılarak, protein yerine geçebilen bileşikler veya şelatlayıcı ajanlar kullanarak elüsyon işlemi farklı şekillerde gerçekleştirilmektedir. İmünoafinite kromatografisi ile küçük boyutlu proteinler için saflaştırma yapılamazken, İMAK ile bu başarılmaktadır. Histidin-işaretili proteinlerin hepsi İMAK ile saflaştırılabildiğinden, orjinal hali ile ayrıştırılmayan proteinler üzerine yapılan histidin ilavesi sayesinde tüm proteinler İMAK ile saflaştırılabilmektedir [13, 20].

İMAK için sayılan birçok avantajın yanında bazı dezavantajları ve uygulama zorlukları mevcuttur. Histidin, sistein, lizin, prolin, arginin ve methionin gibi aminoasitler, metal ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonuna girebilmektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda protein iskeletini parçalayan ve proteine zarar veren reaktif radikal ara ürünler oluşmaktadır. Geçiş metallere olan Cu^{2+} , yüksek redoks aktivitesine sahip bir metaldir. Dolayısıyla İMAK proseslerinde kullanıldığında aminoasitlerin ve protein yapısının bozulmasına yol açmaktadır. Bu durumu önlemek veya minimize etmek için Cu^{2+} iyonunu, daha az aktif olan Zn^{2+} gibi bir iyon ile değiştirmek mümkündür [21].

Bir diğerk dezavantaj ise immobilize metal iyonlarının yol açtığı toksisitedir. Ni²⁺ ve Co²⁺ iyonları insan vücudunda kanserojen etki yarattığı bilinen metallerdir. Yapılan bazı araştırmalarda, Ni²⁺ iyonunun hücre çekirdeği üzerinde yer alan histidin yapıları ile bağlanarak DNA molekülüne zarar verdiği gösterilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı, özellikle tedavi amaçlı kullanılacak proteinlerin saflaştırılmasında, İMAK uygulaması sırasında Ni²⁺ iyonlarının ayrıştırılan protein içerisinde yer almamasına dikkat edilmedilir. Bunun için protein desorpsiyonu sırasında uygulanan elüsyon yöntemleri, immobilize durumdaki metal iyonlarını şelat üzerinden koparmayacak şekilde dizayn edilmelidir [13, 21].

Proteinlerin İMAK uygulamasında etkin şekilde kullanılabilmesi için eklenen histidin yapıları, genel olarak proteinlerin biyolojik yapısı ile uyumlu değildir. Ayrıca sonradan eklenen histidin zincirlerinin immünojenik olmadığı ve teröpatik uygulamalarda kullanılmasının sakıncalı olduğu birçok araştırmada ortaya konmuştur. Bu proteinlerin tedavi amacıyla kullanılabilen saflıkta elde edilebilmesi için, İMAK prosesi için sonradan modifiye edilmiş histidin-işaretili kısımlarının uzaklaştırılması ve proteinin orjinal haline dönmesi gerekmektedir. Bunun için proteinlerin kromatografi işlemi ile saflaştırılmasından sonra ikinci bir proses ile histidin uzantılarının kırılması sağlanmaktadır. Bu kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilebileceği gibi enzimatik yollarla da yapılabilmektedir. Kimyasal ajanların proteinin yapısına zarar verme ihtimali ve toksisitesi sebebiyle çoğunlukla enzimatik işlemler tercih edilmektedir. Enzim kullanılan uygulamalarda ise, ürünün kontaminasyonunu engellemek için ara madde olarak kullanılan enzimin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir [13, 21].

Birden fazla basamakta saflaştırılabilen proteinlerde, İMAK yönteminde kullanılan yüksek tuz konsantrasyonu içeren tamponlar, sonraki adım iyon-değişim kromatografisi gibi bir yöntem olduğunda dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca yoğun tuz çözeltileri, saflaştırılan proteinler kristalografik analize ihtiyaç duyduğunda dezavantajdır [13].

İmmobilize metal afinite kromatografilerinde hala anlaşılmamış bazı konular mevcuttur. İmmobilize metal iyonları-protein bileşiklerinin yapısal özelliklerinin tamamen açığa çıkmamış olması bu konudaki çalışmalara olan ilgiyi arttırmıştır. Bu

yapı anlaşıldığında kromatografik sorbentin optimum koşullarda üretilmesi sağlanacaktır. Ayrıca protein adsorplama işlemi tam anlamıyla aydınlığa kavuşacaktır [6].

2.4. Polimerizasyon Teknikleri

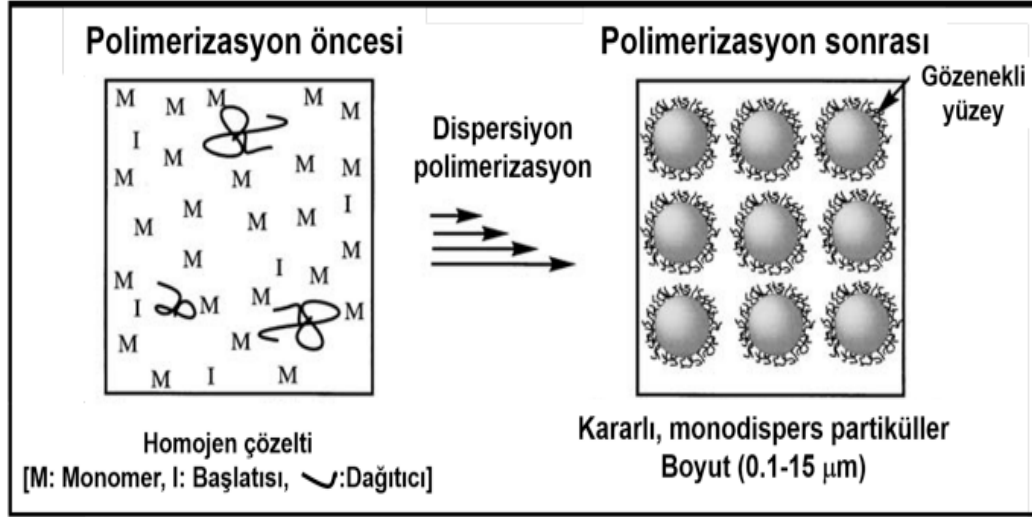
Kromatografik yöntemlerde dolgu malzemesi, biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarında tanılama, izleme ve hücre analizleri, mikroskoplarda kalibrasyon gibi birçok farklı amaç için kullanılan polimerik partiküller, emülsiyon, dispersiyon, çöktürme, çok basamaklı mikrosüspansiyon gibi farklı polimerleştirme teknikleri ile elde edilmektedir. 10 nm ve 10000 nm boy skalasına sahip, monodispers yapıdaki küresel partiküllerin talep edilen boyutta ve yapısal özellikte üretiminin mümkün olması, kuvvetli asidik veya bazik ortamlarda ve geniş sıcaklık aralıklarında stabil olması birçok alanda kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu yapıların hangi alanlarda kullanılacağına göre, polimerizasyon yöntemine, partikül boyutuna, gözenek yapısına, içereceği fonksiyonel yapıya, çapraz bağlı olup olmayacağına karar verilmektedir [23, 24].

2.4.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

Dağıtma fazı içerisine eklenen ve polimerizasyonun temel bileşenleri olan monomer, başlatıcı ve stabilizörün homojen bir faz halini aldığı, genellikle 1-10 µm boyutunda eş-boyutlu partiküllerin olduğu polimerizasyon işlemidir. Kullanılan dağıtma fazı, monomeri çözdüğü halde, oluşan polimeri çözmemektedir. Hidrofobik özellikteki vinil ve akrilat grupları içeren monomerler, dağıtma ortamı olan alkol (metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol) veya alkol-su karışımı içerisinde çözünür haldedir. Polimerizasyon işlemi başlatan ajan olarak benzoil peroksit, azobisisobutironitril, azobisisiyanoverik asit, azobisamidinopropandihidroklörür gibi kimyasallar kullanılırken; polivinilpirolidon, poliakrilik asit, polietilenimin, polivinil alkol gibi polar yapıdaki maddeler de stabilize edici olarak kullanılmaktadır [23].

Dispersiyon polimerizasyonu, gerekli ajanlar dağıtma ortamında biraraya geldikten sonra yeterli ısı enerjisi ile başladıktan sonra monomer-başlatıcı radikalleri oluşmaktadır. Bu radikaller birleşerek kritik molekül ağırlığına geldiğinde, radikalik oligomer zincirleri halini almaktadırlar. Bu zincirler ortamda çözünmez yapıda olup stabilize edici ajan zincirleri ile karışıp birincil partikülleri oluşturmakta ve

çekirdeklenme olayını tamamlamaktadırlar. Çözünmez haldeki partiküllere, dağıtma fazından monomer geçişi ile monodispers yapıdaki polimer partikülleri oluşmaktadır [23]. Şekil 2.4' te özetlenen dispersiyon polimerizasyonunda, dağıtma ortamına eklenen başlatıcı ve stabilize edici ajanın çeşidi ve yoğunluğu, dağıtma fazının çeşidi ve monomer ile göreceli miktarı, polimerleşme için kullanılan sıcaklık ve karıştırma işleminin özellikleri (hız, tür) oluşan polimerik yapının partikül boyutunda ve eş boyutlu olmasında etken olan faktörlerdir [24].



Şekil 2.4. Dispersiyon Polimerizasyonu [24]

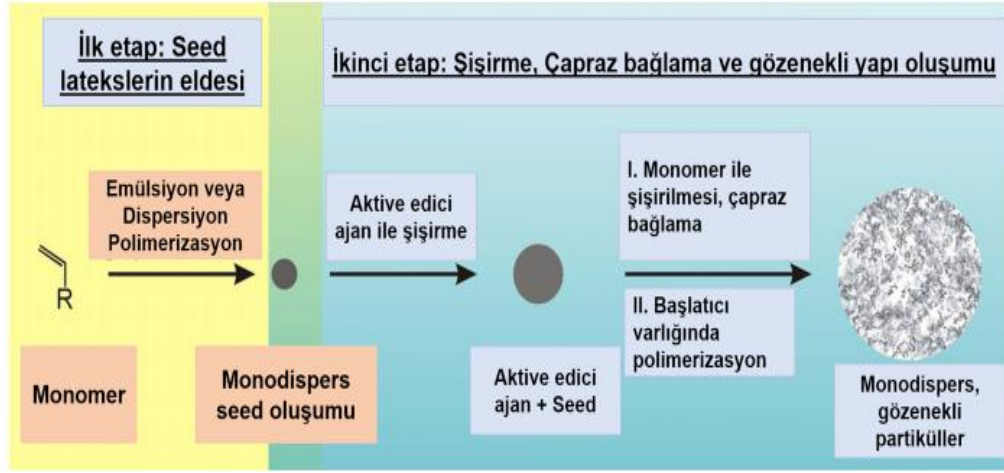
2.4.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu

Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile üretilen 1-5 µm boyutlarındaki monodispers gözenekli partiküller, kromatografik kolonlarda dolgu malzemesi, iyon değiştirici resin, kserografik toner olarak kullanılmaktadır [25].

Bu yöntemde ilk adım, genellikle stiren veya vinil/akrilat bazlı monomerlerden herhangi biri kullanılarak gerçekleştirilen emülsiyon yapıcı ajansız emülsiyon polimerizasyonu veya dispersiyon polimerizasyonu sonucu elde edilen çıkış lateksi (seed lateks) üretimidir. Elde edilen çıkış lateksi iki aşamada şişirilmektedir. İlk aşamada gözenek yapıcı çözücü aracılığıyla, emülsiyon ajanı bulunan sulu fazdaki çıkış lateksi şişirilmiş olmaktadır. İkinci adımda ise aynı emülsiyon ortamında bulunan çıkış lateksine, monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenip şişirme işlemi tamamlanmaktadır. Çıkış lateksi, şişirme işlemlerinin ardından polimerizasyon için hazır hale gelmektedir. Isı ile aktifleşen bir başlatıcının varlığında, karışımın sıcaklığı

yeteri kadar yükseltildikten sonra şişmiş lateks partiküller içerisinde polimerizasyon gerçekleşmektedir [23].

Şekil 2.5 ile açıklanan mikrosüspansiyon polimerizasyonu tekniği ile elde edilen partiküller, emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyonlarında elde edilen ürünlerde olduğu gibi monodispersiteye sahiptir. Ayrıca gözeneklilik ve fonksiyonellik açısından sahip olduğu pozitif özellikleri ile de geleneksel süspansiyon polimerizasyonu ürünlerinin özelliğini taşımaktadır [24]. Gözenek yapıcı çözücü ve monomer miktarlarının çıkış lateks miktarına oranları ve çapraz bağlayıcının konsantrasyonu, oluşan polimerik partiküllerin gözenek dispersiyonunu ve gözeneklilik yapılarını denetleyen mekanizmalardır [23].



Şekil 2.5. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu [24]

2.5. Adsorpsiyon İzotermi

İMAK sorbentleri kullanılarak biyomoleküllerin yakalanması adsorpsiyon işlemi ile gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, katı veya sıvı olarak kullanılabilen adsorplayan maddenin (adsorban, adsorbent veya sorbent), sınır yüzeyinde meydana gelen derişim değişimidir. Konsantrasyonu değişen madde, adsorplanan maddedir (adsorbat) [26].

Adsorpsiyon mekanizmasının optimizasyonu ve adsorbent maddenin yüzey özellikleri ile farklı adsorbatlara karşı adsorplama kapasitesinin açıklanması için adsorpsiyon izotermiinden yararlanılmaktadır [27, 28]. Bu izotermi, sabit sıcaklıkta, adsorplanan madde konsantrasyonunun dengeye ulaştığı anda, birim adsorbanın adsorpladığı miktar (q_e) ile adsorbat maddenin denge konsantrasyonu (C_e) (ya da

basıncı) arasındaki ilgiyi açıklamaktadır [26]. Q_e değerinin hesaplanması için 2.1 eşitliği kullanılmaktadır [27].

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte; q_e , denge konsantrasyonunda birim adsorbanın adsorpladığı miktar (mg/g); C_0 , adsorbatın başlangıç konsantrasyonu (mg/L); C_e , adsorbatın denge konsantrasyonu (mg/L); V , adsorbat çözeltisinin hacmi (L) ve m , adsorbent miktarıdır (g).

Adsorpsiyon izotermelerini oluşturan dataları açıklayabilmek için çeşitli matematiksel modeller önerilmiştir. Bunlar arasında en yaygın kullanılanları Langmuir, Freundlich ve Temkin modelleridir [28].

2.5.1. Langmuir İzotermi

Irving Langmuir tarafından geliştirilen bu izoterm, kimyasal adsorpsiyonu açıklamak için en iyi önermedir. Adsorplanan maddenin, adsorbentin dış yüzeyinde tek bir tabaka oluşturduğunu ve bu tabaka oluştuğundan sonra adsorpsiyon işleminin sonlandığını ileri sürmektedir. Bu izoterm denklem 2.2 ile açıklanmaktadır [29].

$$q_e = \frac{q_m \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (2.2)$$

Bu eşitlik lineer forma dönüştürüldüğünde ise denklik 2.3 elde edilmektedir.

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{q_m \cdot K_L \cdot C_e} \quad (2.3)$$

Q_m (adsorbentin maksimum adsorplama kapasitesi, mg/g) ve K_L (Langmuir adsorpsiyon sabiti, L/mg) değerleri, $1/C_e$ ' ye karşılık $1/q_e$ için çizilen grafikte yer alan doğruya ait olan sırasıyla kayma ve eğim değerlerinden hesaplanmaktadır.

2.5.2. Freundlich İzotermi

Heterojen yüzeylerin adsorpsiyon karakteristiklerinin belirlenmesi için çoğunlukla Freundlich izotermi tercih edilmektedir. Bu izoterm, denklik 2.4 ile ifade edilmektedir [29].

$$q_e = K_f \cdot C_e^{\frac{1}{n}} \quad (2.4)$$

K_f değeri Freundlich izoterm sabiti, n ise adsorpsiyon yoğunluğu sabitidir. 2.4 deklemini doğrusallaştırıldığında 2.5 denklemini elde edilmektedir [28].

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \cdot \ln C_e \quad (2.5)$$

Bu denklemde yer alan $\ln C_e$ ' ye karşı $\ln q_e$ değerleri üzerinden grafik oluşturulmaktadır. Doğrunun eğiminden n değeri hesaplanırken, kayma değerinden ise K_f değeri hesaplanmaktadır.

2.5.3. Temkin İzotermi

Temkin izotermi, adsorban üzerinde oluşan tabakada yer alan bütün moleküllerin adsorpsiyon ısı düşüşünün logaritmik değil lineer olduğunu ileri sürmektedir. Bu izoterm denklik 2.6 ve 2.7 ile ifade edilmektedir [29].

$$q_e = \frac{R.T}{b_T} \cdot \ln A_T + \left(\frac{R.T}{b_T} \right) \cdot \ln C_e \quad (2.6)$$

$$q_e = B \cdot \ln A_T + B \cdot \ln C_e \quad (2.7)$$

Bu eşitliklerde yer alan A_T , Temkin izotermi denge bağlanma sabiti (L/g); b_T , Temkin izoterm sabiti; $B = \frac{RT}{b_T}$, adsorpsiyon ısı ile ilişkili sabit (J/mol); R , gaz sabiti (8.314 J/mol/K); T , sıcaklığı (298 K) göstermektedir. Denklik 2.6' dan elde edilen veriler ile $\ln C_e$ ' ye karşı çizilen q_e doğrusundan, Temkin izoterm denge bağlanma sabiti (A_T) ve adsorpsiyon ısı ile ilişkili sabit (B) sırası ile doğrunun kayma değerinden ve eğiminden hesaplanmaktadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Malzemeler

Çok basamaklı emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilen monodispers-gözenekli yapıdaki poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) mikrokürelerin sentezinde kullanılan glisidil metakrilat (GMA) ile metakrilik asit (MAA) monomerleri ve etilendimetakrilat (EDMA) Aldrich Chem. Co., ABD'den temin edilmiştir. Aldrich firmasından temin edilen diğer malzemeler arasında, dispersiyon ortamı olarak kullanılan mutlak etanol (EtOH), gözenek yapıcı olarak kullanılan etilbenzen (EB) ve stabilizör olarak kullanılan polivinil alkol (PVA, ortalama molekül ağırlığı: 85000-146000 Da) yer almaktadır. Stabilizör olarak dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan polivinil piroolidon (PVP K-30, ortalama molekül ağırlığı: 40000 Da) ve mikrosüspansiyon polimerizasyonunda kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) ise Sigma Chemical. Co., ABD'den temin edilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonlarında başlatıcı olarak kullanılan 2,2'- azobisisobütronitril (AIBN) ve benzoil peroksit (BPO) sırası ile Merck A.G. ve Sigma Chemical. Co. firmalarından sağlanmıştır. Elde edilen partiküllerin yıkama işlemi sırasında kullanılan tetrahidrofur (THF) Aldrich Chem. Co.'dan temin edilmiştir. Manyetikleştirme reaksiyonlarında Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları için gerekli olan demir (II) klorür tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) ve demir (III) klorür hekzahidrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ile Ni^{2+} immobilizasyonunda kullanılmış olan nikel (II) klorür hekzahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) Sigma Chemical Co.'dan sağlanmıştır. Silika mikropartiküllerin sentezi sırasında çeşitli amaçlarla kullanılan tetrabutyl amonyum iyodür (TBAI), tetraetil ortosilikat (TEOS), izo-propanol (İPA), amonyum hidroksit (NH_4OH) Sigma firmasından alınmıştır. Silika mikrokürelerin üzerine dopamin kaplanırken kullanılan dopamin klorür Sigma'dan; tris-HCl çözeltisi hazırlanırken kullanılan hidroklorik asit (HCl) ve tris(hidroksimetil)aminometan ise sırası ile Sigma ve Aldrich firmalarından alınmıştır. Elde edilen Ni^{2+} immobilize edilmiş polidopamin kaplı silika mikroküreler ile gerçekleştirilen İMAK uygulaması sırasında, biyomolekül olarak kullanılan sığır serum albumin (BSA), lizozim, hemoglobin (HB) proteinleri ve adsorpsiyon desorpsiyon tamponlarının hazırlanmasında kullanılan sodyum klorür (NaCl) Sigma, imidazol ise Aldrich tarafından temin edilmiştir.

3.2. Monodispers-Gözenekli Manyetik Silika Bazlı İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Sorbentlerinin Eldesi

3.2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu ile Poli(glisidil metakrilat) Üretimi

Dispersiyon polimerizasyonu ile üretilen poli(glisidil metakrilat), bir sonraki aşama olan çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunda kullanılacak çıkış lateksidir [30]. İlk olarak cam bir reaktör içerisine 30 mL çözücü ortam olan mutlak etanol eklenmiştir. Çözücü ortama stabilizör olarak eklenen 0.45 g polivinil pirolidonun (PVP K-30) ultrasonikasyon ile tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çıkış lateksi üretimi için monomer ve başlatıcı olarak sırasıyla akrilik bazlı glisidil metakrilat (GMA) ve 2,2'- azobisisobütronitril (AIBN) kullanılmıştır. Çözücü ortamın onda biri oranında eklenen monomerin miktarı 3 mL iken ısı ile aktiveleşen AIBN 0.24 g olarak çözücü ortam içine eklenmiş ve sonra tekrar ultrasonik su banyosu ile reaktör içerisindeki karışımın homojenizasyonu sağlanmıştır. Reaktör, çalkalamalı bir su banyosunda polimerizasyon için gerekli olan 70 °C sıcaklık ve 24 saat süre koşullarında dakikada 120 devir olacak şekilde karıştırılmıştır.

Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından, reaktör sıcaklığı oda sıcaklığına ulaşana kadar beklenmiş ve polimerizasyona katılmayan girdiler ile çözücü ortamın uzaklaştırılması için santrifüj cihazı kullanılarak 2000 rpm döndürme hızı ile 3 dakikalık yıkamalar yapılmıştır. Bu yıkamalarda 2 kez teknik etanol, 2 kez saf su kullanılmıştır.

3.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu ile Poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) Üretimi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile amaç, dispersiyon polimerizasyonu sonucu elde edilen çıkış lateksi ile monodispers-gözenekli yapıdaki poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat), poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin sentezlenmesidir [31, 32]. Polimerizasyonun ilk adımında 250 mL hacimli cam bir şişede emülsiyon ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 50 mL saf su ile stabilizör olarak 0.125 g sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi hazırlanmış, gözenek yapıcı organik çözücü olarak 3.5 mL etilbenzen eklenerek sonikatör ile 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. 0.3 g poliGMA eklenen karışım ilave olarak 2 dakika daha sonikleme maruz bırakılmıştır. 250 rpm'de çalışan çoklu manyetik karıştırıcı ile gözenek yapıcı

etilbenzenin çıkış lateksi içerisinde tamamen absorplanması amaçlanmıştır. Bu aşama oda sıcaklığında ve 24 saatte gerçekleşmiştir.

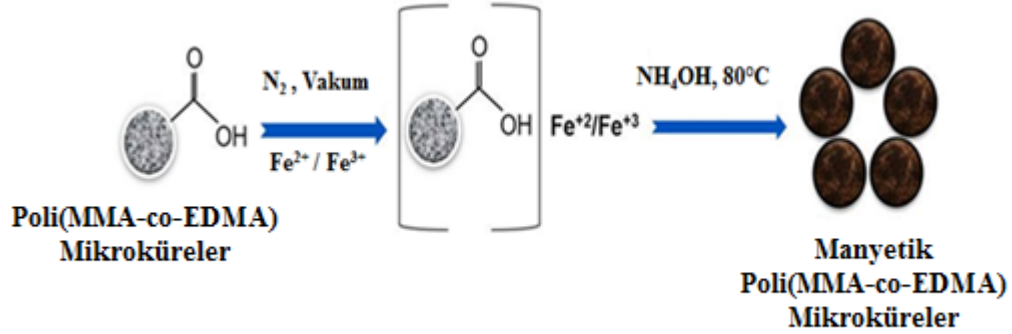
Süspansiyon polimerizasyonunda ikinci aşama etilbenzeni absorplayan çıkış lateksinin şişirildiği aşamadır. İlk önce monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 2 mL metakrilik asit (MAA) ve 4 mL etilendimetakrilat (EDMA) ile bir karışım hazırlanmıştır. İçerisine polimerizasyon işlemini başlatacak olan BPO' dan 0.25 g ilave edilip homojenize edilene kadar soniklenmiştir. Ayrı bir şişede 50 mL saf suda 0.125 g SDS çözülerek içerisine, hazırlanan monomer-co-monomer-başlatıcı karışımı ilave edilmiştir. 12 dakika sonikatör ile tamamıyla homojen bir karışım oluşturulmuştur. Oluşan bu homojen faz, mikrosüspansiyon polimerizasyonunun ilk adımında hazırlanan poliGMA çözeltisinin içerisine eklenip 24 saat daha aynı koşullarda manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam etmiştir. Bu adımda ilave edilen monomerler, etilbenzen ile şişmiş olan çıkış lateksi içerisine absorbe olarak daha fazla şişmesini sağlamıştır.

Polimerizasyonun üçüncü aşamasında, 48 saat süresince manyetik karıştırıcıda karışmakta olan lateks çözeltisinin üzerine, hazırlanan 10 mL saf su ve 0.8 g polivinil alkolden (PVA) oluşan homojen karışım eklenmiştir. Burada kullanılan PVA stabilizör olarak kullanılmıştır. Elde edilen bu çözelti 24 saat karıştırılmak üzere 80 °C'deki su banyosunda 120 rpm'de çalkalanmıştır. Böylece etilbenzen ve monomerler ile şişirilmiş çıkış lateksi içerisinde mikrosüspansiyon polimerizasyonu gerçekleşmiştir.

Üretilen poli(MMA-co-EDMA) partiküller, safsızlıklarından ayrıştırılması amacı ile oda sıcaklığına geldikten sonra yıkanmıştır. Yıkama fazı olarak sırası ile 2 kez teknik etanol, 2 kez tetrahidrofur (THF), 2 kez teknik etanol ve son olarak 2 kez saf su kullanılmıştır. Herbir yıkama santrifüj yardımı ile dakikada 5000 devirde 5 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Santrifüjleme sonlarında falkonun dibinde kalan katı faz muhafaza edilirken üstteki sıvı faz atılmıştır. Elde edilen poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin içerisinde ortalama partikül boyutu dışında kalan daha büyük veya daha küçük mikropartiküller, monodispersiteye ulaşmak için santrifüjleme ile ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Petri kabına alınan partikül çözeltisi 80 °C'deki etüvde kurutulup sonraki işlemler için hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. Poli(MAA-co-EDMA) Küresel Mikropartiküllerin Manyetik Forma Dönüştürülmesi

Elde edilen monodispers yapıdaki poli(MAA-co-EDMA) partiküller, demir iyonlarının ikili çöktürme işlemi sonucunda oluşan manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin bu partiküller içerisinde immobilize edilmesi ile manyetik forma dönüştürülmüştür [33]. Şekil 3.1' de özetlenen bu işlem için Nuçe erleninin içerisine 0.7 g polimerik partikül ve 100 mL saf su eklenmiştir [34]. Erlen buz banyosuna konup manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak partiküllerin su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. 10 dakika süren karıştırma işleminde erlen içerisine azot gazı verilmiştir. Cam bir beherde 20 mL saf su içerisinde tek faz halinde demir tuzları çözeltisi hazırlanmış ve nuçe erlenindeki mikropartiküllerin üzerine eklenerek 10 dakika daha azotlama işlemine devam edilmiştir. Demir tuzu olarak 3 mmol $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve 2.7 mmol $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ kullanılmıştır. Azot gazı (N_2) kesildikten sonra buz banyosundan alınan erlenin ağzı sıkıca kapatılmıştır. Erlenin vakum borusuna bağlanan vakum pompası ile karışım, 15 dakika vakumlama işlemine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1. Poli(MMA-co-EDMA) Mikropartiküllerinin Manyetikleştirilmesi [34]

Vakumlama işlemi bittiğinde, erlen 80 °C'deki yağ banyosuna alınmış ve içerisine 25 mL amonyum hidroksit (NH_4OH) ilave edilmiştir. 300 rpm'de 1 saat süren mekanik karışma sırasında, manyetikleşme reaksiyonu ile birlikte Poli(MAA-co-EDMA) partikülleri manyetik hale dönüşmüştür.

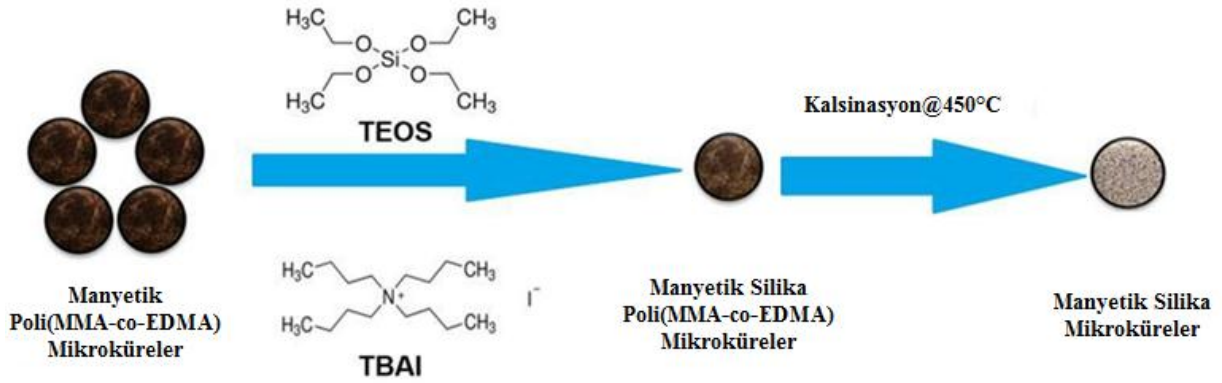
Manyetikleştirme işlemi tamamlandıktan sonra, bir magnet yardımı ile erlendeki sıvı faz uzaklaştırılıp kalan katı faz 2 kez saf su, 2 kez 0.1 M HCl ile yıkanmıştır. Yıkama işleminde amaç manyetikleşmeyen partikülleri ve fazla amonyum hidroksiti ortamdaki uzaklaştırmak olduğundan üst faz berrak hale gelene kadar yıkamaya devam

edilmiştir. Elde edilen manyetik poli(MAA-co-EDMA) mikropartikülleri bir krozeve alınıp etüvde 80 °C'de kurutulmuştur.

3.2.4. Silika Bazlı Manyetik Mikrokürelerin Sentezi

Elde edilen monodispers yapıdaki küresel manyetik partiküllerin içerisine hidroliz-kondenzasyon reaksiyonu ile tetraetil ortosilikat (TEOS) yükleme işlemidir [35]. Öncelikli olarak 250 mL'lik cam şişede 50 mL izo-propanol (İPA), 5 mL saf su içerisinde çözülmüştür. Oluşan homojen çözelti içerisine 0.25 g tetrabutyl amonyum iyodür (TBAI), 0.25 mL amonyum hidroksit ve 0.4 g manyetik mikropartikül eklenerek her ilaveden sonra ultrasonik su banyosu ile çözeltinin tekrar homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım, 400 rpm'deki manyetik karıştırıcı ile 25 °C'de 1 saat karıştırılmıştır. Aynı bir cam beherde hazırlanan 1.25 mL TEOS ile 3.75 mL İPA çözeltisi, manyetik karıştırıcıda karışmakta olan karışıma damla damla eklenmiştir. Cam şişe 30 °C'deki su banyosuna yerleştirildikten sonra manyetik karıştırıcı ile 24 saat karışmaya devam etmiştir.

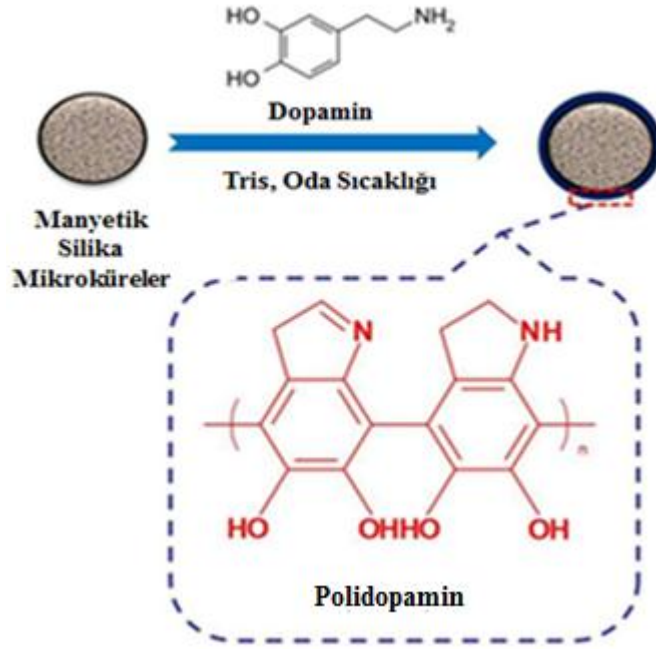
Bu işlem sonrasında elde edilen eş-boyutlu silika bazlı polimerik partiküller, safsızlıkların uzaklaştırılması için İPA ve saf su ile 2'şer kez santrifüj cihazında çöktürerek yıkanmıştır. Yıkama işlemleri bittikten sonra kalan katı faz, 24 saat boyunca 70 °C'deki etüvde bırakılarak kurutulmuştur. Silika bazlı polimerik partikül, mikropartiküllere gözenek kazandırılması amacıyla çok yüksek sıcaklıkta kalsinasyon işlemine tabi tutulmuştur. Böylece polimer kısmı yanarak uzaklaşmış ve geriye SiO₂ kısmı kalmıştır. Bu işlem 450 °C'de 6 saat sürmüştür. Kalsinasyondan alınan ürün, immobilize metal afinite kromatografisinde kullanılacak kromagrafik sorbentin destek maddesi olan eş-boyutlu mezogözenekli ve manyetik yapıdaki silika bazlı mikropartiküllerdir (Manyetik-SiO₂). Şekil 3.2 ile manyetik poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler üzerine silika bağlanması ve kalsinasyon sonucunda Manyetik-SiO₂ oluşumu açıklanmıştır [34].



Şekil 3.2. Manyetik Poli(MAA-co-EDMA) Mikroküreler Üzerine Silika Bağlanması [34]

3.2.5. Silika Bazlı Manyetik Mikroküreler Üzerine Polidopamin Kaplanması

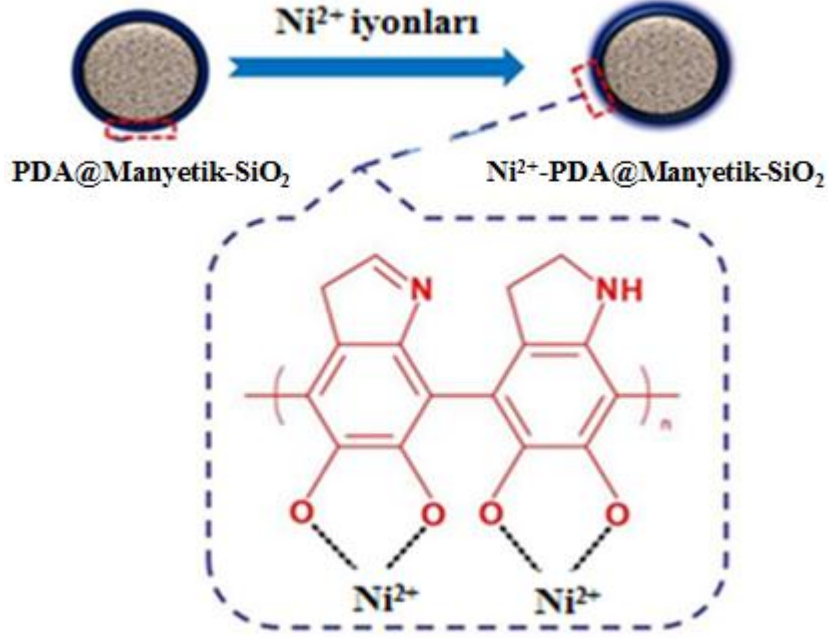
Monodispers gözenekli yapıdaki silika bazlı katı destek üzerine şelatlayıcı ajan olarak polidopamin maddesi kaplanmıştır [17]. Şekil 3.3' te sunulduğu gibi polidopaminin iskeletinde metal immobilizasyonu için fonksiyonel görev alacak hidroksil grupları bulunmaktadır [34]. Polidopamin kaplanması 10 mM tris-HCl tampon çözeltisi ortamında gerçekleşmiştir. 1 M HCl ile karışımın pH değeri 8.5 olarak ayarlanmıştır. Küresel partiküllerin yüzeyine polidopamin kaplanması prosesi için 250 mL'lik cam şişe içerisine, hazırlanan tris-HCl çözeltisinden 100 mL aktarılmıştır. İçerisine eklenen 0.2 g dopamin klorürün sonikatör ile tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu karışıma, ürettiğimiz silika mikropartiküllerden 0.2 g eklenmiştir. Elde edilen karışımın mekanik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 6 saat karıştırılmasıyla manyetik silika partiküller üzerine polidopamin kaplanması (PDA@Manyetik-SiO₂) gerçekleştirilmiştir. 6 saat sonrasında bir magnet ile çöktürülerek karışımın sıvı fazı atılıp 3 kez saf su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.3. Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Polidopamin Kaplanması [34]

3.2.6. PDA Kaplanmış Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Ni^{2+} İyonlarının İmmobilizasyonu

Şekil 3.4 ile açıklanan proseste, şelatlayıcı ajan üzerinde yer alan hidroksil gruplarındaki H^+ iyonları ile Ni^{2+} iyonlarının yer değiştirmesi ile metal immobilizasyonu (Ni^{2+} -PDA@Manyetik-SiO₂) gerçekleştirilmiştir [17, 34]. Bunun için 50 mL'lik cam bir beherde 25 mL saf su içerisinde 0.25 M $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ tuzu çözünmüştür. Bu çözeltiliye 0.2 g polidopamin kaplı silika partikül eklenmiştir. Mekanik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırma gerçekleşmiştir. Ni^{2+} iyonu immobilizasyonunun gerçekleştiği bu işlem sonrasında bir magnet aracılığıyla çöktürme gerçekleşmiş ve üst faz atılmıştır. Partiküller 3 kez saf su ile yıkanmış ve bir miktar saf su içerisinde sonraki işlemlerde kullanılmak üzere beklemeye alınmıştır. Elde edilen bu ürün İMAK sorbenti olarak protein adsorpsiyonunda kullanılacak yapıdır.



Şekil 3.4. PDA@Manyetik-SiO₂ Mikroküreler Üzerine Ni²⁺ İyonlarının İmmobilizasyonu [34]

3.3. Üretilen Kromatografik Sorbentlerin Karakterizasyonu

Elde edilen manyetik-SiO₂ mikroküreler ile PDA@manyetik-SiO₂ mikrokürelerin ortalama boyutları ve boy dağılımları ile yüzey yapıları taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope, SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, U.S.A.) ile tayin edilmiştir. Sıvı N₂ adsorpsiyon prensibi ile çalışan yüzey alanı ve gözenek boyutu analizörü (Brunauer-Emmett-Teller, BET) (Quantachrome, Nova 2200 E, U.K.) aracılığıyla partiküllere ait özgül yüzey alanı ve ortalama gözenek boyutu belirlenmiştir. Manyetik karakterizasyon için kullanılan titreşimli örnek magnetometresi (vibrating sample magnetometer, VSM) (Cryogenic Limited, PPM system, U.K.) kullanılarak partiküllerin manyetizasyon özellikleri ve doyumluk manyetizasyon değerleri elde edilmiştir. Bu değerler, histerisis eğrilerinden tespit edilmiştir. Yapılan tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [36].

3.4. İmmobilize Metal Afinité Kromatografisi ile Protein İzolasyonu

İmmobilize metal afinité kromatografisi için üretilen sorbentler aracılığıyla, birbirini takip eden adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri ile BSA, lizozim ve HB proteinlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Sorbent Miktarı Etkisinin Tespiti İçin Sabit Başlangıç Protein Konsantrasyonunda Gerçekleştirilen Adsorpsiyon İşlemi

Monodispers gözenekli yapıdaki manyetik silika bazlı mikroküreler, şelatlayıcı dopamin üzerine Ni^{2+} iyonu immobilize olmuş halde adsorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Mikropartiküller iki kez saf su ile iki kez adsorpsiyon tamponu ile ortamda olabilecek safsızlıkların uzaklaştırılması için yıkanmıştır. Adsorpsiyon tamponu olarak 1 M NaCl içeren 20 mM fosfat tamponu hazırlanmıştır. Çözeltinin pH değeri ise 7 olarak ayarlanmıştır. Yıkama işlemi, behere alınan partiküller üzerine yıkama fazlarının eklenmesi, iyice çalkalanması ve magnet aracılığıyla çöktürülerek üst fazların atılması şeklinde yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından 2 mL' lik 5 farklı ependorfa farklı miktarlardaki (1 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg) partikül pay edilmiştir. 1 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonu 5200 μ L hacminde hazırlanmıştır. Bu karışımdan 1 mL (adsorpsiyon hacmi), mikrokürelerin bulunduğu her ependorfun içerisine eklenmiş, kalan 200 μ L ise başlangıç konsantrasyonunun (A_0) tayini için ultraviyole/görünür spektrofotometre cihazında (Biodrop Duo, İngiltere) kullanılmıştır. Her protein için ayrı çalışma setleri düzenlenmiştir. Ependorflardaki karışım vorteks cihazı ile tamamen karıştırıldıktan sonra rotator ile 2 saat 40 rpm hızında döndürülüp proteinlerin mikroküreler üzerine adsorpsiyonu sağlanmıştır. Adsorpsiyon işlemi tamamlandıktan sonra, ependorf içindeki karışımlar bir magnet ile çöktürülmüş ve üst fazların tamamı farklı ependorflar içerisine aktarılmıştır. Toplanan bu üst fazlarda yapılan spektrofotometre ölçümlerinin ardından, adsorsiyon tamponu içerisindeki protein miktarının, adsorplama işleminden sonraki değeri (A_1) ölçülmüştür.

3.4.2. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Etkisinin Tespiti İçin Sabit Sorbent Miktarında Gerçekleştirilen Adsorpsiyon İşlemi

Partiküllerin pay edilmesine kadar olan kısım, sorbent miktarı tayini aşamasında olduğu gibi tekrar edilmiştir. Başlangıç protein konsantrasyonların değiştiği bu aşamada, iki adet farklı uygulama mevcuttur. Bunlar sabit partikül miktarı kullanımı ve farklı protein derişimi hazırlanmasıdır. 2 mL' lik 6 farklı ependorfa partiküller eş miktarda (10 mg) dağıtılmıştır. 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/mL olmak üzere 6 farklı protein konsantrasyonu 1200 μ L hacminde hazırlanmıştır. Adsorpsiyon işleminin gerçekleşmesi için gerekli olan hacim 1 mL olarak sabit kalmıştır. A_0 ve A_1

değerlerinin ölçülme amacıyla toplanması aynı prosedürlerle ve aynı koşullarda gerçekleşmiştir.

Bu aşamada ayrıca, Ni^{2+} -PDA@Manyetik-SiO₂ mikropartiküllere ilaveten Ni^{2+} iyonu immobilize edilmemiş dopamin kaplı mikropartiküllerin de (PDA@Manyetik-SiO₂), proteinlere olan afiniteleri tayin edilmiştir.

3.4.3. Desorpsiyon İşlemi

Adsorpsiyon işlemleri farklı iki analizde değişen prosedürlere sahip olmasına rağmen, sonrasında uygulanan desorpsiyon işlemi benzerdir. Ayrıca Ni^{2+} immobilize edilmiş ve Ni^{2+} takılmamış dopaminli mikroküreler aynı desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur.

Adsorpsiyon işlemi sonrasında ependorflarda kalan mikropartiküller üzerine 500 µL desorpsiyon tamponu eklenmiştir. Desorpsiyon tamponu olarak 50 mM fosfat çözeltisi içerisine 0.5 M NaCl ve 0.5 M imidazol ilavesi ile kullanılmıştır. Vorteks cihazı ile ependorf içinde oluşan çökelti kısım dispers hale ulaştıktan sonra 40 rpm ile 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin ardından ependorf içerisindeki partiküller bir magnet ile çöktürülmüş ve üst fazlar ayrı ependorflara (D₁) toplanmıştır. İlk desorpsiyon adımından sonra ne kadar proteinin desorpsiyon tamponuna elue edildiği, toplanan D₁ fazları ile spektrofotometre cihazında yapılan ölçümler sonucu belirlenmiştir. Üst fazları alınan partiküller üzerine, tekrar aynı miktar desorpsiyon tamponu ilave edilerek aynı işlemler toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Bu işlemler sonucunda D₁, D₂, D₃ olmak üzere üç ayrı desorpsiyon sonucuna ulaşılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında, monodispers, gözenekli ve yüksek manyetik özellikte silika bazlı mikroküreler sentezlenmiştir. Bu mikroküreler, immobilize metal afinite kromatografisi aracılığıyla histidin-işaretli BSA, lizozim ve HB proteinlerinin ortamdaki izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. Bu amaç için öncelikle manyetik silika mikroküreler, fonksiyonellik kazanmak için PDA ligandı ile kaplanmıştır. Daha sonra Ni^{2+} iyonları PDA üzerinde yer alan hidroksil gruplarına takılarak metal-şelat formu elde edilmiştir.

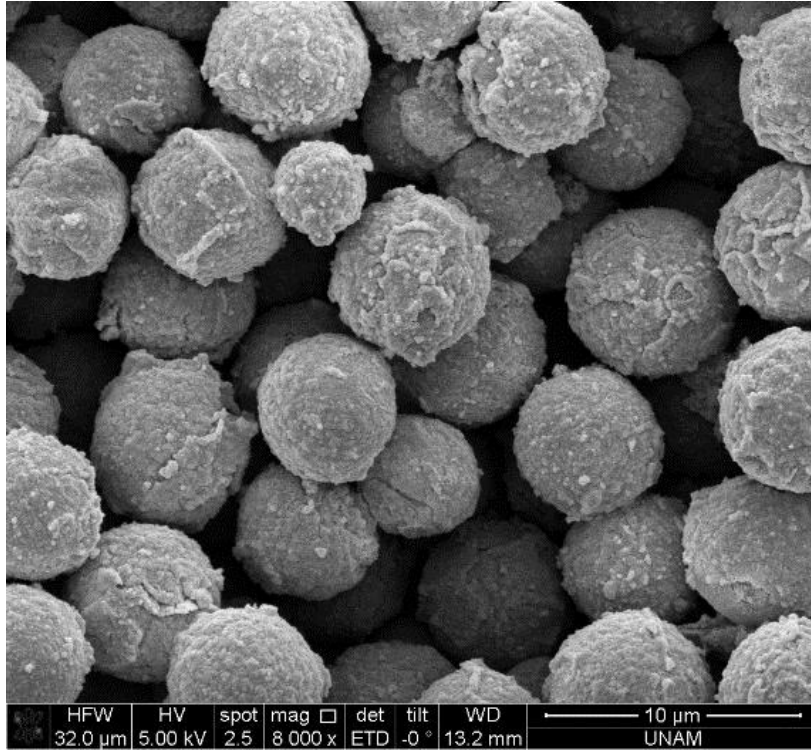
İMAK sorbenti olarak kullanılmak üzere sentezlenen bu partiküller aracılığı ile Ni^{2+} iyonlarına karşı yüksek afiniteye sahip histidin içerikli proteinlerin izolasyonlarını gerçekleştirmek üzere ardışık adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri uygulanmıştır. Öncelikle bu işlemlerde maksimum verime ulaşılan partikül miktarına çeşitli adsorbent miktarlarında çalışılarak karar verilmiştir. Daha sonra tespit edilen bu miktar ile farklı protein konsantrasyonları için setler oluşturularak bu değişimin adsorpsiyon kapasitesine ve desorpsiyon ile izolasyon verimlerine olan etkisi incelenmiştir. Aynı işlem Ni^{2+} iyonlarının fonksiyonelliğini göstermek amacıyla, Ni^{2+} iyonu takılmamış PDA kaplı manyetik silika mikroküreler ile tekrar edilmiştir.

4.1. Karakterizasyon

İMAK prosesinde katı matriks olarak kullanılacak olan silika mikrokürelerin üretimi için dispersiyon polimerizasyonu ve çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonları art arda uygulanarak modispers-gözenekli yapıda poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler elde edilmiştir. Demir iyonlarının, mikropartiküllerin karboksil grupları ile oluşturduğu kompleksler, partiküllerin gözenekli yapısı içerisinde adsorplanmıştır. Bunun sonucu olarak yüksek manyetizasyon değerine ulaşmış ve kararlı yapıdaki manyetik mikroküreler üretilmiştir.

Manyetik poli(MAA-co-EDMA) polimerik partiküllerin üzerine NH_4^+ katyonlarının varlığında hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonu ile silika öncül TEOS, mikroküreler üzerine bağlanarak kompozit bir yapı oluşturmuştur [36]. Bu yapı kalsinasyonda $450^{\circ}C$ ' de yakılarak İMAK sorbenti olarak kullanılacak ortalama 6 μm boyutundaki monodispers-gözenekli manyetik- SiO_2 formuna dönüşmüştür. Kalsinasyonda

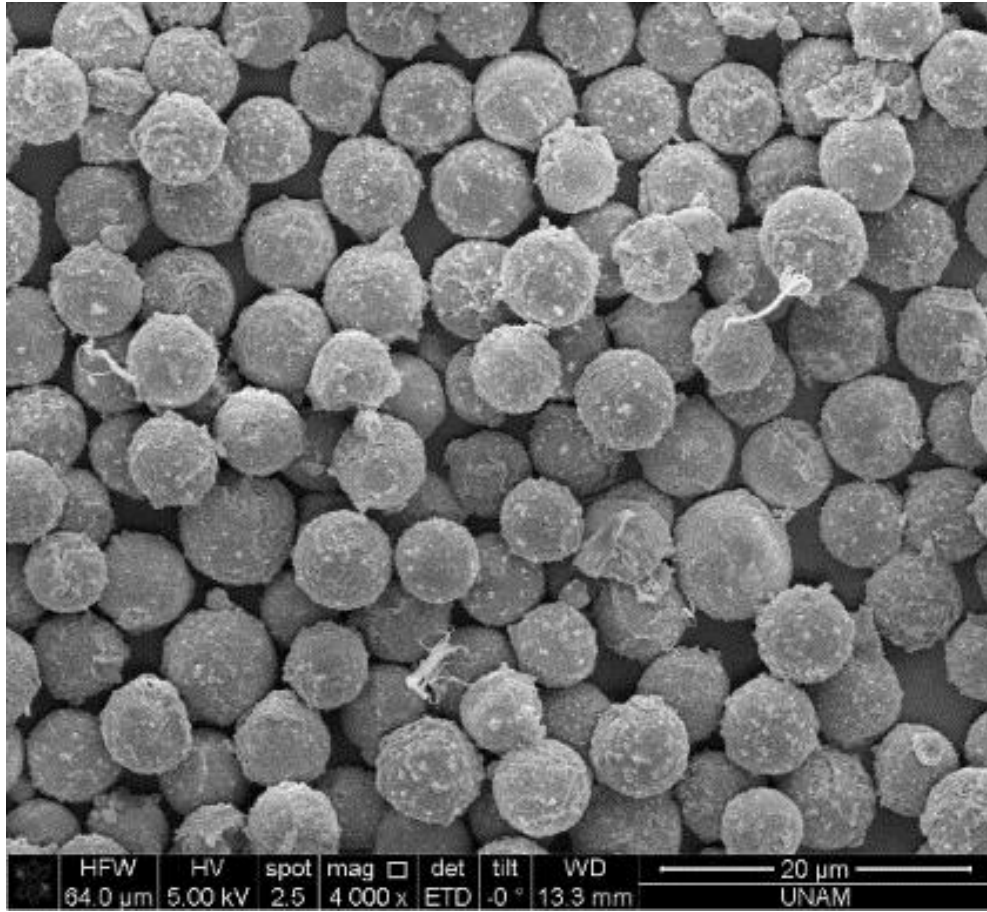
polimerik kısmı yanan ve gözeneklilik yapısı artan SiO₂ mikroküreler 249 m²/g yüzey alanına ulaşmıştır (Çizelge 4.1). Ardından silika mikroküreler PDA ile kaplanmıştır. Şekil 4.1 ile verilen SEM görüntüsü üzerinden yapılan hesaplama ile manyetik-SiO₂ mikrokürelerin boyut değişim katsayısı % 4.3 olarak tespit edilmiştir. Bu değer manyetik-SiO₂ mikrokürelerin dar boy dağılımına sahip olduklarını (monodispersite) göstermiştir. Ayrıca aynı görsel üzerinden partiküllerin gözenekli yüzey morfolojisine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Yüzey alanı ve gözenek boyutu analizörü (BET) ile ölçülen gözenek boyut dağılımına göre mezogözenekli mikropartiküllerin ortalama gözenek çapı (D_n) 8.6 nm olarak verilmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Manyetik-SiO₂ Mikrokürelerin SEM Görüntüsü

Monodispers gözenekli formda elde edilen manyetik-SiO₂ partiküllerinin üzerinde pH=8.5 10 mM tris-HCl tampon ortamında dopaminin PDA' ya dönüşmesi ile birlikte gerçekleşen kovalent bağlanma sayesinde partiküller üzerinde ince bir tabaka olarak kaplanmıştır. Şekil 4.2' de sunulduğu gibi PDA@Manyetik-SiO₂ mikroküreleri ile Manyetik-SiO₂ mikrokürelerin morfolojilerinde ve ortalama partikül boyutunda önemli bir fark oluşmamıştır. Gözenekli mikropartikülün yüzeyinin yaklaşık 300 nm'lik ince bir tabaka ile kaplanması sebebiyle PDA@Manyetik-SiO₂ partiküllerinin yüzey alanı 18

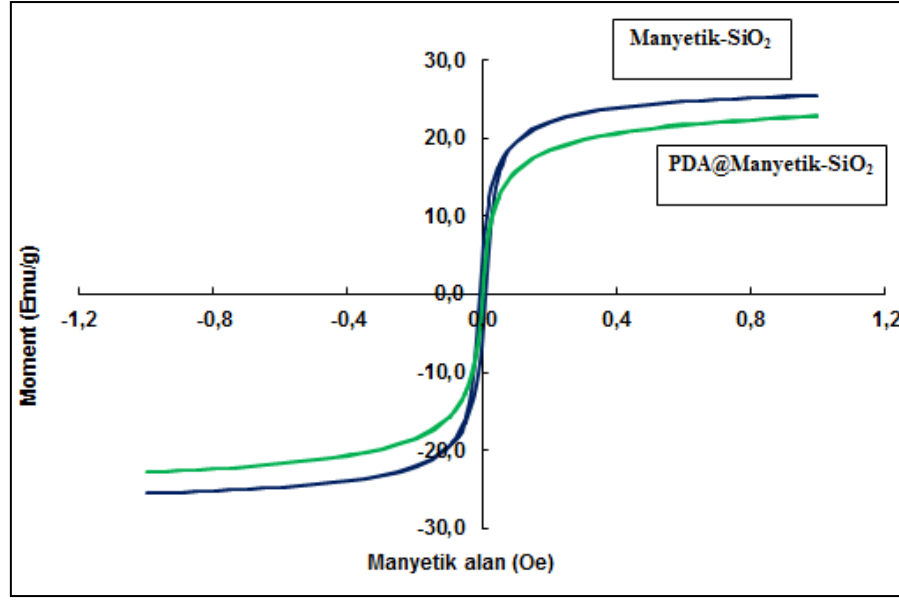
m^2/g olacak şekilde düşmüştür. Ayrıca ortalama gözenek çapı BET cihazı ile 2.01 nm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2. PDA@Manyetik-SiO₂ Mikrokürelerin SEM Görüntüsü

Çizelge 4.1. Manyetik-SiO₂ ve PDA@ Manyetik-SiO₂ Mikropartiküllerine Ait Morfolojik Özellikler

Mikroküre Türü	Ortalama Boy (µm)	Değişim Katsayısı (CV%)	Yüzey Alanı (m ² /g)	D _n (nm)
Manyetik-SiO ₂	6.0	4.3	249	8.61
PDA@Manyetik-SiO ₂	6.3	4.1	18	2.01



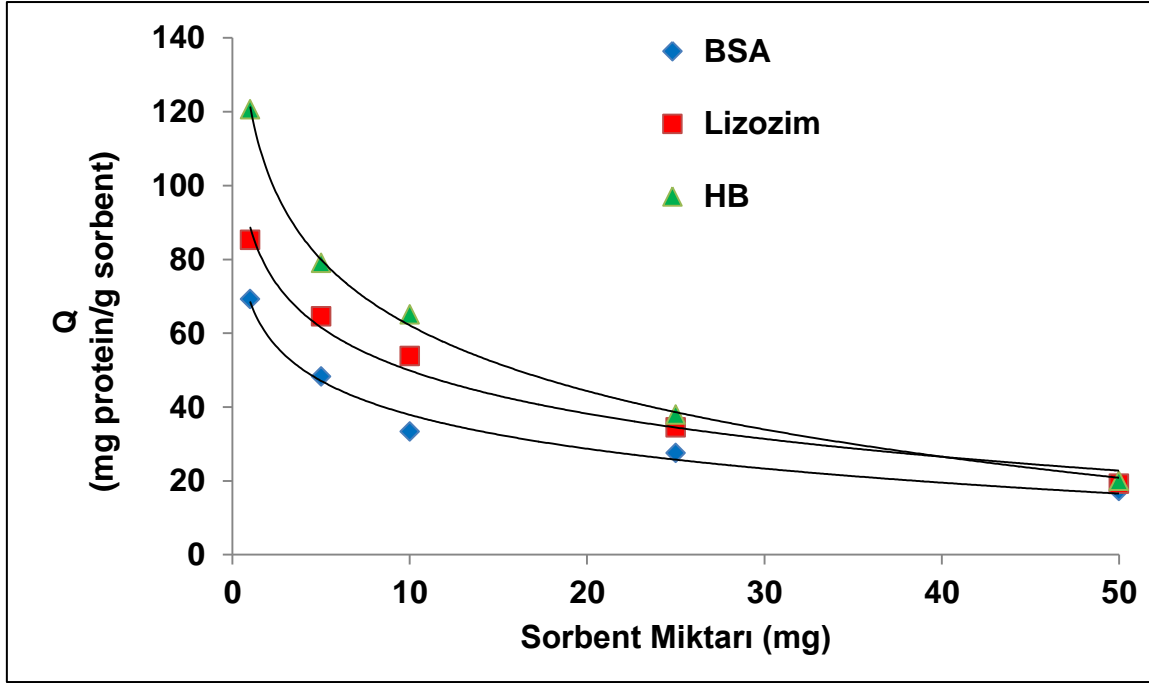
Şekil 4.3. Manyetik-SiO₂ ile PDA@Manyetik-SiO₂ Mikrokürelerine Ait VSM Cihazı ile Elde Edilmiş Manyetizasyon Eğrileri

Şekil 4.3 ile sunulan titreşimli örnek magnetometresi sonuçlarında yer alan S şeklindeki eğriler ile elde edilen manyetik-SiO₂ ve PDA@manyetik-SiO₂ mikrokürelerinin manyetizasyon değerleri elde edilmiştir. Manyetik özellikteki bir sorbent ile etkin bir ayrıştırma sağlayabilmek için minimum doygunluk manyetizasyon değerinin 16.3 emu/g olması gerektiği bilinmektedir [37]. Elde edilen mikrokürelerin doygunluk manyetizasyon değerleri ise 25 (manyetik-SiO₂) ve 21 emu/g (PDA@manyetik-SiO₂) olarak tespit edilmiştir. PDA kaplanmış partiküllerin manyetik-SiO₂ partiküllerine göre daha düşük doygunluk manyetizasyon değerine sahip olmasının sebebinin, PDA kaplanırken oluşan tabakanın yol açtığı kütle artışı olduğu tespit edilmiştir.

Kromatografik sorbent olarak kullanılacak katı desteklerin manyetikleştirilmesi uygulama kolaylığı ile yüksek izolasyon sağladığı için önem taşımaktadır. Partiküller protein adsorpsiyonu gerçekleştikten sonra dahi dışarıdan uygulanan bir manyetik alan ile kolayca ayrıştırılabilmekte ve manyetik alan ortadan kalktığında herhangi bir deformasyon olmaksızın dispers forma geri dönmektedirler (süper-paramanyetik özellik). Bu uygulamanın hata payı çok düşük olduğu için ayrıştırılacak olan biyomoleküllerin ve sorbent partiküllerin yer aldığı sulu fazdan minimum biyomolekül ve partikül kaybı yaşanmaktadır [17, 38].

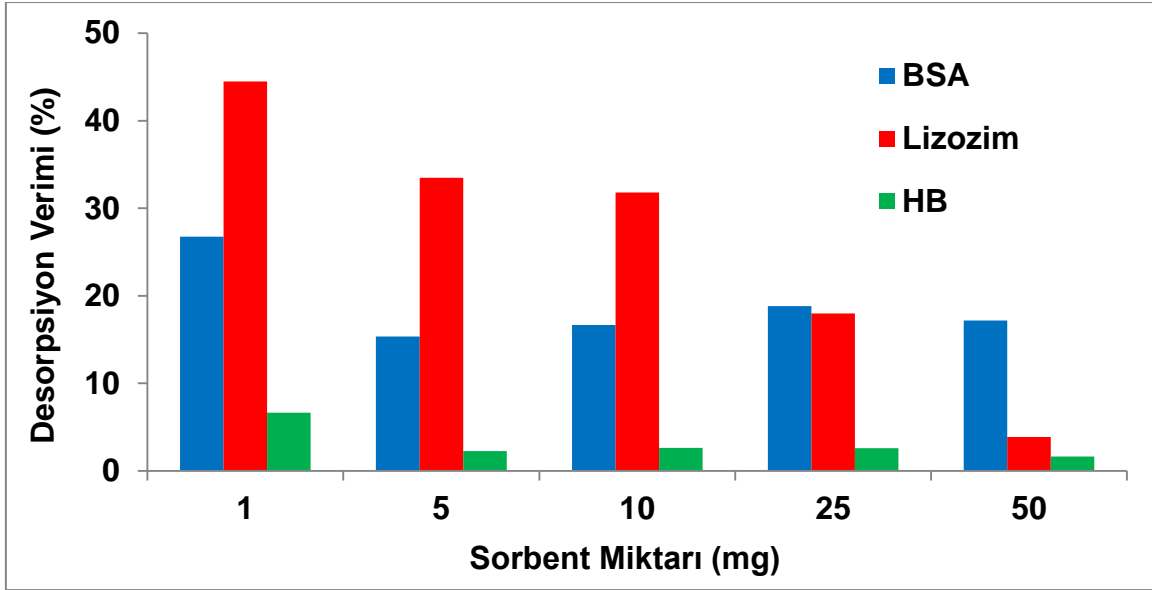
4.2. Sorbent Miktarının Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi

Sorbent olarak kullanılan Ni^{2+} -PDA@manyetik-SiO₂ mikrokürelerin miktarları değiştirilerek, bu durumun protein izolasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. BSA, Lizozim ve HB proteinleri 1 mg/mL konsantrasyonu ile 1 mL adsorpsiyon ortamında, 1, 5, 10, 25 ve 50 mg sorbent adsorpsiyon ortamına eklenmiştir.



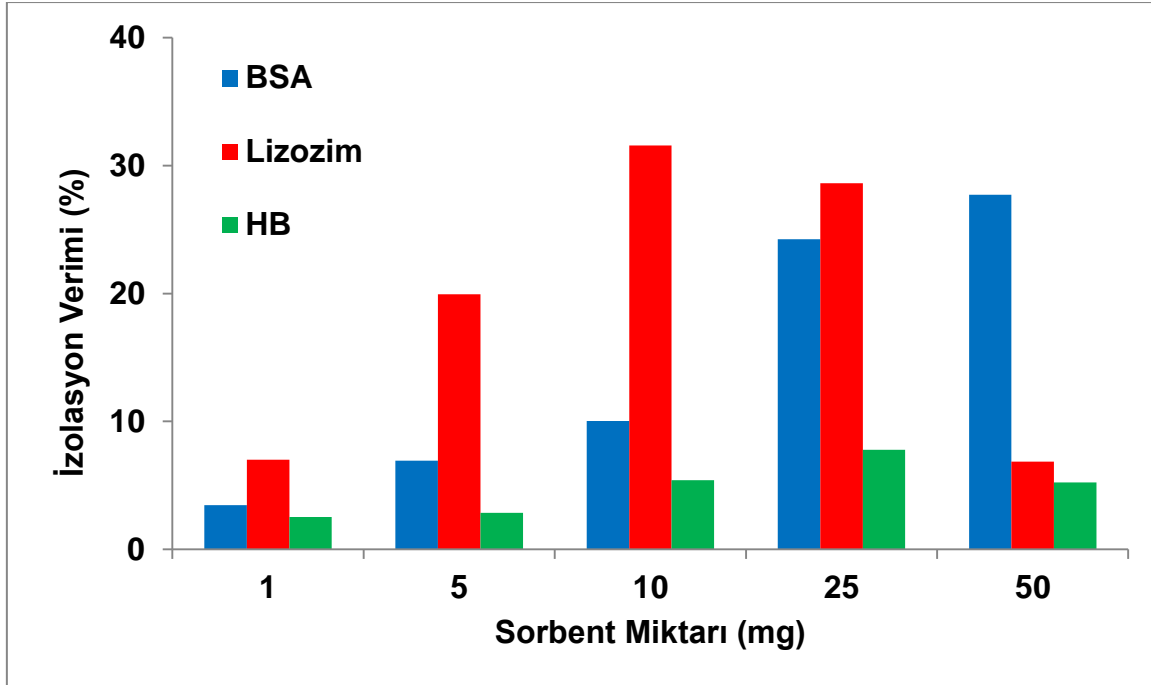
Şekil 4.4. Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş manyetik silika mikroküreler ile gerçekleştirilen uygulamalarda sorbent miktarının protein (BSA, Lizozim, HB) adsorpsiyon kapasitesine etkisi. (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Protein Konsantrasyonu: 1 mg/mL; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.4 üzerinde izlendiği gibi, artan sorbent miktarı ile birim sorbentin adsorpladığı protein miktarı ters orantılı olarak değişmiştir. Proteinler maksimum adsorpsiyon kapasitesini 1 g sorbent ortamında sağlarken (örneğin 120 mg HB/g sorbent), minimum değere 50 mg sorbent ile ulaşmıştır (örneğin 20 mg HB/g sorbent). Bunun sebebi olarak; ortama eklenen protein başlangıç konsantrasyonu sabit iken, buna karşılık ortamdaki sorbent miktarının artması ile birim sorbente düşen protein miktarının çok az olması gösterilmiştir. Şekil 4.4 aracılığıyla da anlaşılacağı gibi sorbent miktarının 10 mg'ı geçmesiyle birlikte grafik plato değerine ulaşarak adsorplama kapasitesindeki değişim giderek azalmıştır.



Şekil 4.5. Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Sorbent Miktarının Protein (BSA, Lizozim, HB) Desorpsiyon Verimine Etkisi. (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1,5 mL; Protein Konsantrasyonu: 1 mg/mL; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1,5 saat)

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 ile verilen grafiklerde ise sorbent olarak kullanılan Ni^{2+} -PDA@manyetik-SiO₂ mikrokürelerin miktarının desorpsiyon ve izolasyon verimlerine olan etkisi verilmiştir. Genel izlenim olarak desorpsiyon verimlerinin sorbent miktarı ile azaldığı gözlenmiştir. Sorbent miktarının artışı ile adsorplanan protein miktarı artmaktadır. Dolayısıyla adsorplanan protein miktarının artışı ile ters orantılı olan desorpsiyon verimi için bu grafik beklenen bir durumdur.

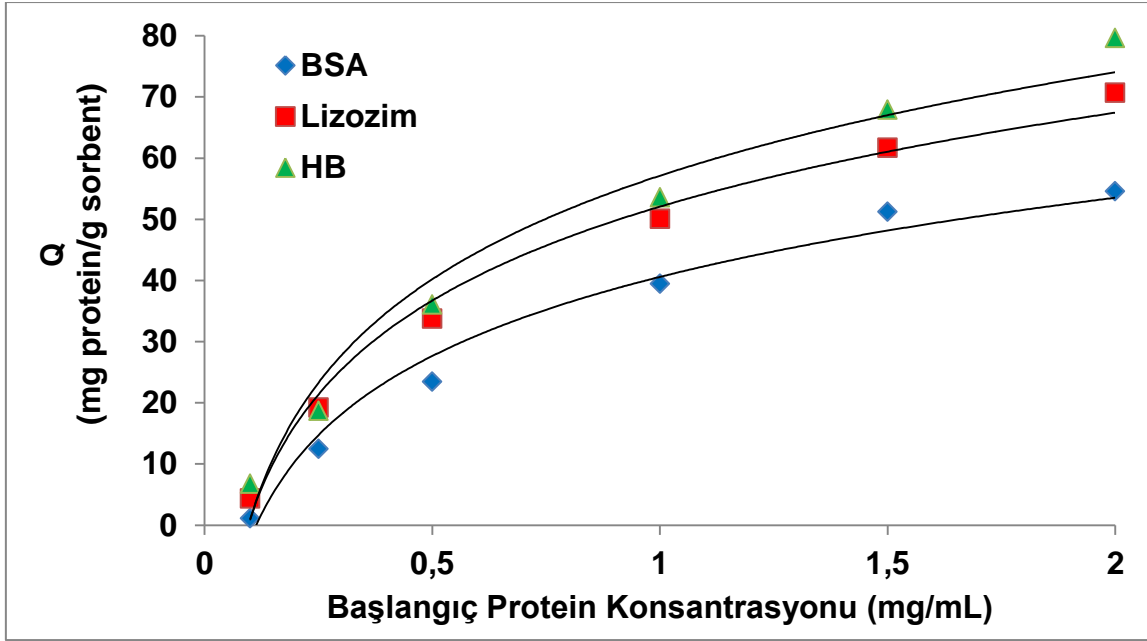


Şekil 4.6. Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Sorbent Miktarının Protein (BSA, Lizozim, HB) İzolasyon Verimine Etkisi.

Şekil 4.6 ile proteinlerin izolasyonunda en yüksek verimin lizozim için 10 mg, HB için 25 mg, BSA için ise 50 mg sorbent ile sağlandığı görülmüştür. Ancak 50 mg ve 25 mg sorbent kullanıldığında tüm proteinler için adsorplama kapasitesi çok düşük olduğundan tez çalışmasının ileriki aşamalarında yapılan tayinlerde 10 mg sorbent kullanımı seçilmiştir.

4.3. Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi (Ni^{2+} -PDA@Manyetik-SiO₂ Mikroküreler İçin)

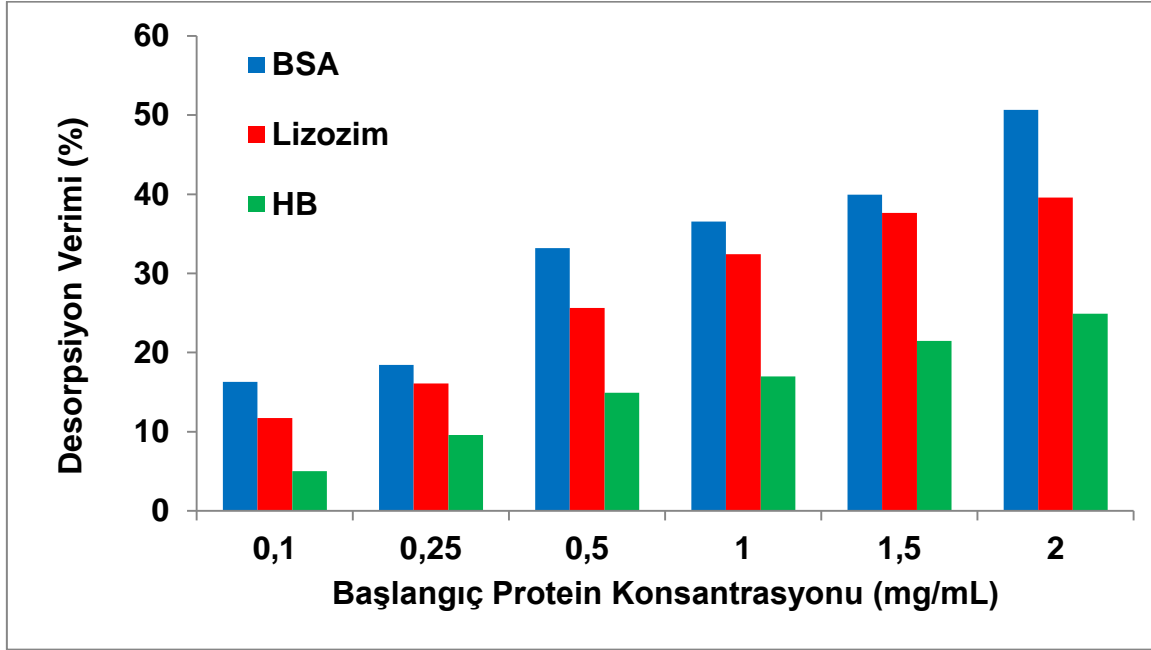
Sorbent olarak kullanılan Ni^{2+} -PDA@manyetik-SiO₂ mikrokürelerin miktarının 10 mg olarak tayin edilmesinin ardından, sabit sorbent miktarı ile başlangıç protein konsantrasyonları değiştirilerek ortaya çıkan farklılıklar incelenmiştir. Ni^{2+} -PDA@manyetik-SiO₂ mikrokürelerin 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/mL başlangıç konsantrasyonlarındaki proteinler ile etkileşimi 1 mL adsorpsiyon ortamında başlatılmıştır.



Şekil 4.7. Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Başlangıç Protein (BSA, Lizozim, HB) Konsantrasyonu Değişiminin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.7'den anlaşılacağı gibi tüm protein türlerinde artan başlangıç protein konsantrasyonu ile adsorplama kapasitesi artmıştır. Proteinlerin Ni^{2+} iyonları üzerine adsorpsiyonu histidin birimlerinde yer alan imidazol grupları sayesinde olmaktadır. Bu yüzden protein molekülü üzerinde yer alana histidin sayısı adsorpsiyon etkinliği için önem taşımaktadır. Yapılan çalışmada maksimum adsorpsiyonun 24 yüzeysel histidine sahip olan HB proteininde ve 2 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda yaklaşık 80 mg/g olarak gerçekleştiği belirlenmiştir [39]. Aynı şekilde lizozim ve BSA' da en yüksek adsorpsiyon kapasitesine 2 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda, sırasıyla 70 mg/g ve 54 mg/g şeklinde ulaşmışlardır. Lizozim ve BSA' nın içerdiği yüzeysel histidin sayısı sırasıyla 1 ve 2'dir [39, 40]. Burada beklenen durum BSA' nın adsorpsiyon kapasitesinin lizozime göre daha yüksek olmasıdır. Ancak Şekil 4.7' de sunulan veriler bunun aksini göstermektedir. Bölüm 2.3.4' te açıklandığı üzere, immobilize metal iyonlarının ve amino asit gruplarının birbirine erişimi, protein üzerinde adsorpsiyona katılan kalıntının sayısı, türü, mikro düzeydeki çevresi ve komşu aminoasit grupları ile ortaklığı ile proteinin yapısal formları adsorpsiyon kapasitesine katkı sağlayan durumlardır [22]. Lizozimin amino asit dizisinde yer alan 6

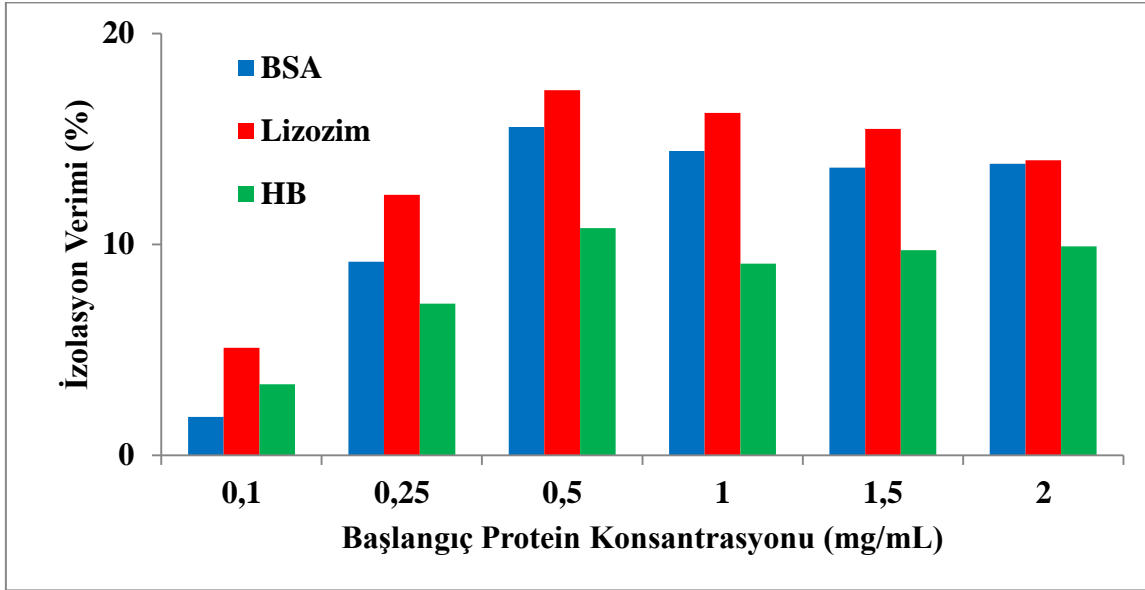
triptofan aminoasiti adsorpsiyon prosesine katkı sağlamaktadır [41]. Ayrıca lizozime ait izoelektrik noktanın değeri 10.6' dır ve bu değer adsorpsiyon çalışma pH' sının üzerindedir. Proteinlerin sahip oldukları izoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde adsorplama kapasitesi üstündeki pH değerlerine göre daha yüksektir. BSA' nın izoelektrik noktası ise 4.7' dir [40, 42]. Dolayısıyla pH=7 ile yapılan adsorpsiyon lizozimin izolasyonu için pozitif etki sağlamıştır [40, 42]. Bu durumlar histidin sayılarının birbirine yakın olması sebebiyle lizozim adsorpsiyonunun BSA'ya göre daha yüksek olmasına neden olmuştur.



Şekil 4.8. Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş manyetik silika mikroküreler ile gerçekleştirilen uygulamalarda başlangıç protein (BSA, Lizozim, HB) konsantrasyonu değişiminin desorpsiyon verimine etkisi. (Desorpsiyon ortamı: 50 mM Fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon hacmi: 1.5 mL; Adsorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat)

Desorpsiyon işlemi sırasında tampon çözeltide yer alan imidazol molekülleri, proteinlerin yüzeyindeki histidil kalıntılarındaki yer alan imidazol gruplarına karşı yarışmacı ajan olarak kullanılmıştır. Bu sayede proteinlerin immobilize iyonlardan koparılması ve desorpsiyon tamponuna geçmesi sağlanmıştır. Şekil 4.8 ile sunulduğu gibi maksimum desorpsiyon verimi 2 mg/mL protein konsantrasyonu ile sağlanmış ve bu durum aynı konsantrasyon değerindeki protein adsorpsiyonunun maksimum olması ile açıklanmıştır. 2 mg/mL konsantrasyonunda mikropartiküller daha fazla

protein adsorpladığı için daha fazla desorplama sağlamışlardır. Proteinler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise adsorpsiyon kapasitesinin aksine bir ilişki ortaya çıkmıştır. 2 mg/mL protein konsantrasyonu için adsorplama kapasitesi HB > lizozim > BSA iken desorplama kapasitesi BSA > lizozim > HB'dir. Bu durum proteinlerin özellikleri açısından beklenen bir durumdur. En yüksek adsorplama kapasitesi, içerdiği histidin sayısı itibari ile HB ile gerçekleşmiştir. Dolayısıyla HB ile mikropartiküller arasındaki bağın diğer proteinlere göre daha yüksek olması ve desorpsiyon verimi ile adsorplama kapasitesinin ters orantılı olması bu sonucu açıklamaktadır. Desorpsiyon veriminin artan başlangıç protein konsantrasyonu için artması ise adsorpsiyon başlangıcında ortamdaki protein derişiminin daha fazla olması sebebiyle birim adsorbent üzerinde daha fazla proteinin tutunması ve buna bağlı olarak daha fazla proteinin desorbe olması ile açıklanmaktadır.



Şekil 4.9. Ni²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler ile Gerçekleştirilen Uygulamalarda Başlangıç Protein (BSA, Lizozim, HB) Konsantrasyonu Değişiminin İzolasyon Verimine Etkisi.

Şekil 4.9' a bakıldığında izolasyon verimlerinin 0.1 mg/mL değeri hariç birbirine yakın değerler aldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte maksimum izolasyon verimlerinin 0.5 ve 1.0 mg/mL konsantrasyonlarında elde edildiği tespit edilmiştir. İzolasyon verimi ortama yüklenen başlangıç protein miktarı ile ters, desorbe edilen protein miktarı ile doğru orantılı olduğu için maksimum değerlere ortalama konsantrasyonlarda

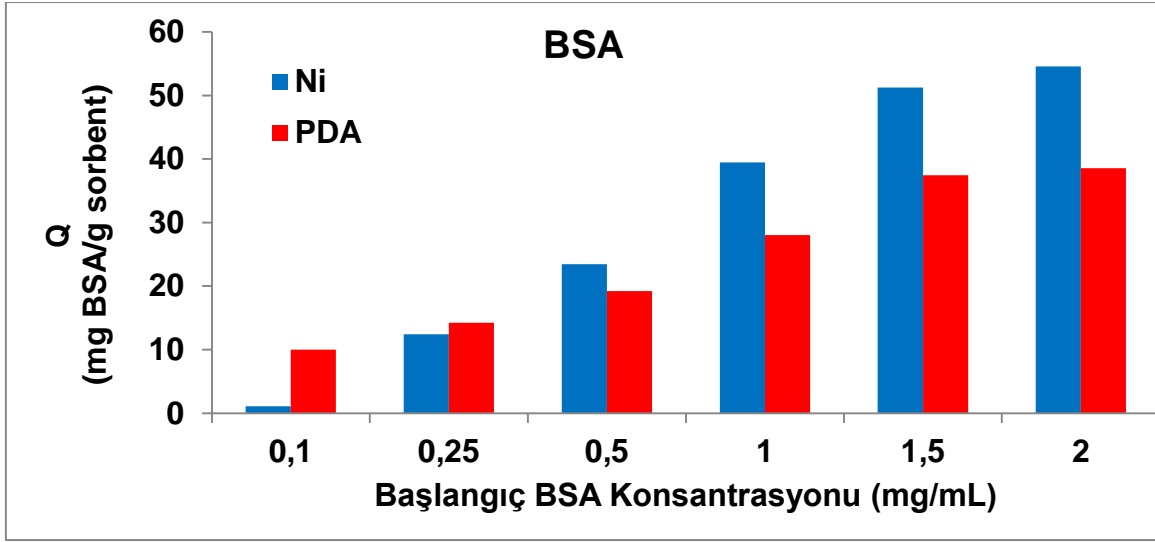
ulaşılması beklenen bir durumdur. HB için maksimum izolasyon verimi % 10 iken BSA ve lizozim için bu değer sırası ile % 15 ve % 17' ye ulaşmıştır.

4.4. Mikropartiküller Üzerine İmmobilize Edilen Ni²⁺ İyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi

Ni²⁺ iyonu immobilize edilmemiş PDA kaplı mikroküreler ile İMAK uygulamaları, Ni²⁺ immobilize edilmiş mikroküreler ile aynı çalışma koşullarında gerçekleştirilmiştir. Burada amaç Ni²⁺ iyonlarının proteinlerin (BSA, lizozim, HB) adsorpsiyonundaki fonksiyonelliğini tespit etmektir. Bu deney setlerinde; sorbent miktarı olarak 10 mg PDA@Manyetik-SiO₂ kullanılmıştır. Sabit sorbent miktarı ile farklı başlangıç protein konsantrasyonlarının (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL) etkileşimi adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri aracılığıyla incelenmiştir. Sonuçlar Ni²⁺ immobilize olmuş sorbentlere ait sonuçlar ile karşılaştırılmış ve Ni²⁺ iyonlarının protein izolasyonu üzerindeki etkinliği araştırılmıştır.

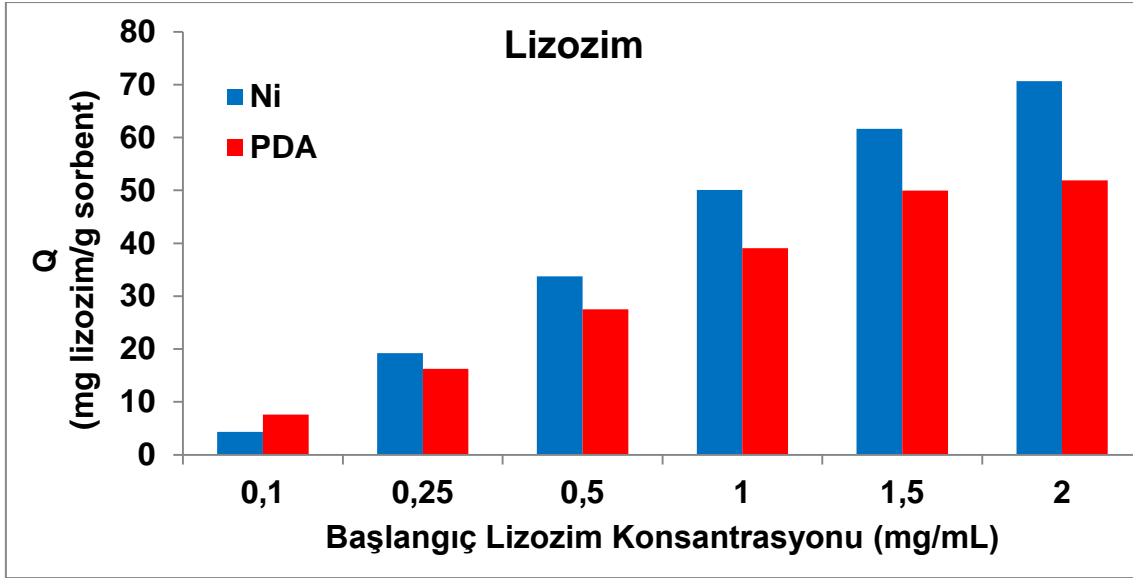
4.4.1. Ni²⁺ İyonunun Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi

Ni²⁺ iyonu immobilize edilmemiş olan çalışmalarda, Manyetik-SiO₂ mikrokürelerin proteinler ile etkileşimi, mikrokürelerin yüzeyine kaplanmış polidopamin ile proteinler arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler, $\pi - \pi$ etkileşimleri ve hidrojen bağlarının bütünleşik etkisi ile olmaktadır [43]. Bu etkilerin sonucu olarak PDA ile proteinler arasında spesifik olmayan adsorpsiyon meydana gelmektedir [44, 45]. Ni²⁺ iyonlarında varolan imidazol-Ni²⁺ etkileşimi aksine, PDA ile proteinler arasında gelişigüzel bir etkileşim söz konusudur.



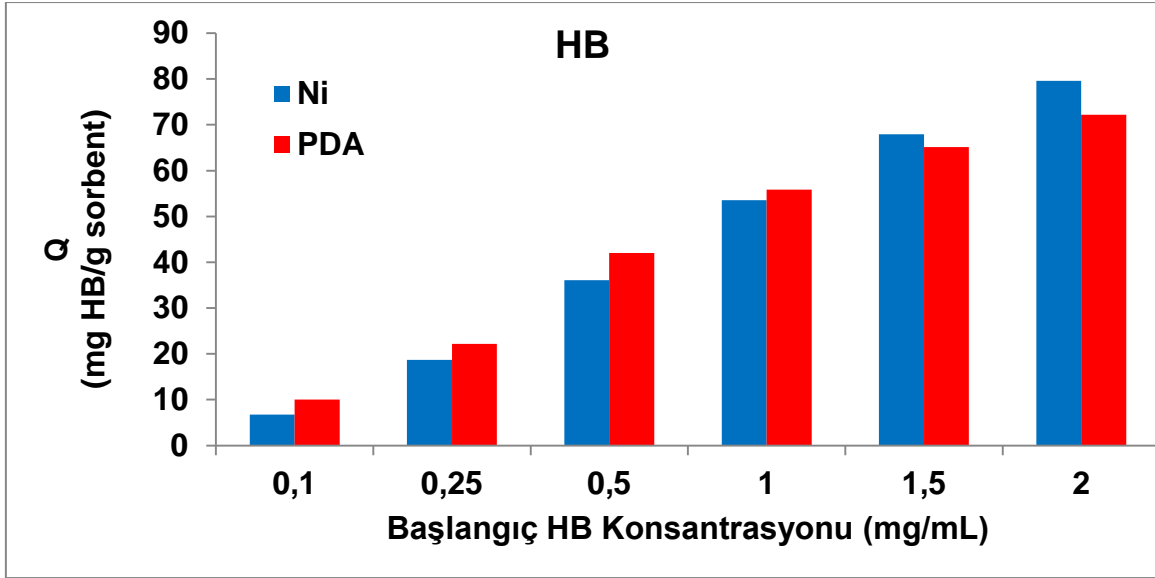
Şekil 4.10. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç BSA Konsantrasyonlarında Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).

Yalnızca PDA kaplı mikroküreler ile Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş mikrokürelerin BSA proteinini adsorplama kapasitelerine ait grafik Şekil 4.10 ile verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde 0.1 ve 0.25 mg/mL konsantrasyonların Ni²⁺ iyonlarının protein adsorplama konusunda PDA'ya göre yetersiz kaldığı görülmüştür. Ancak protein konsantrasyonunun artması ile PDA yapısının adsorplama yetisinde azalma olduğu görülmektedir. 0.1 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonu için, Ni²⁺ iyonuna sahip mikroküreler ile PDA kaplı mikrokürelere ait adsorplama kapasiteleri sırasıyla 1.1 ve 10 mg BSA/g sorbent iken; 2 mg/mL için bu değer 54.6 ve 38.6 mg BSA/g sorbent olarak ölçülmüştür. Bu durum polidopaminin BSA'ya karşı istikrarlı bir afinite göstermediğini, Ni²⁺ iyonlarının genel durum itibari ile daha etkin bir adsorplama gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11. Ni^{2+} İyonunun Değişen Başlangıç Lizozim Konsantrasyonlarında Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).

BSA proteini ile Ni^{2+} iyonları arasındaki seçici adsorpsiyon, lizozim proteini ile Ni^{2+} iyonları arasında da geçerlidir. Şekil 4.11 ile lizozim proteinine ait verilen grafik, PDA yapısının Ni^{2+} iyonlarına göre sadece 0.1 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonunda daha yüksek adsorplama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

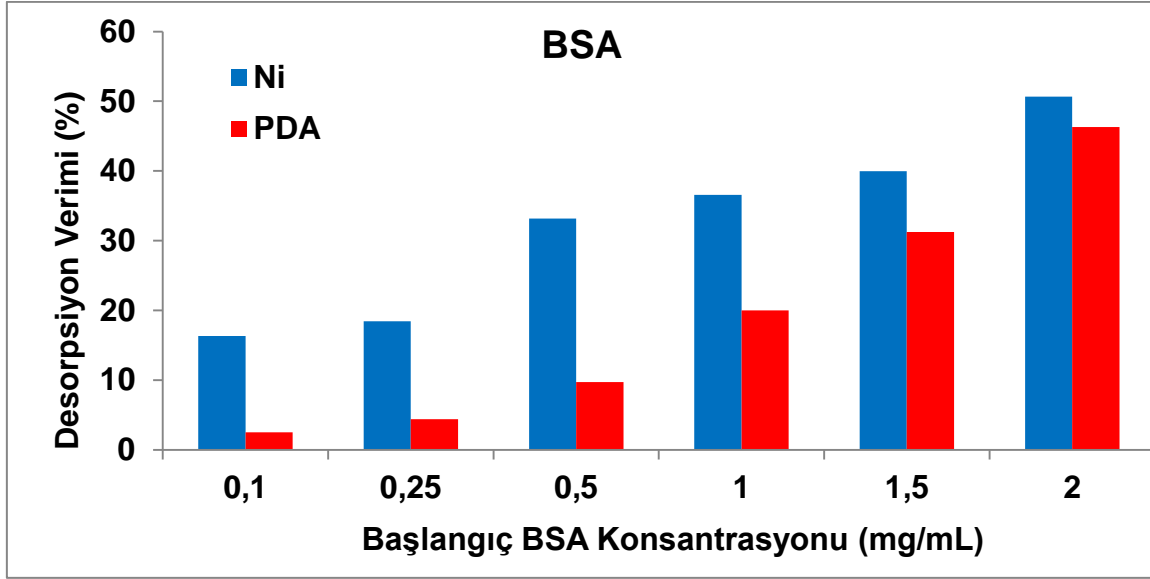


Şekil 4.12. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç HB Konsantrasyonlarında Adsorpsiyon Kapasitesi Üzerindeki Etkisi (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat).

Şekil 4.12 ile verilen HB proteinine ait grafik, HB'nin BSA ile lizozime göre PDA'ya karşı afinitesinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Başlangıçtaki dört protein konsantrasyonu (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL) için PDA kaplı mikroküreler Ni²⁺ iyonlarına göre daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olmuştur. Bu durumun hemoglobinin yapısal konfigürasyonundaki, aminoasit dizilimindeki ya da elektriksel yüklerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği ve dolayısıyla PDA ile bağ yapma kapasitesinin diğer proteinlere göre daha yüksek olduğu öngörülmüştür.

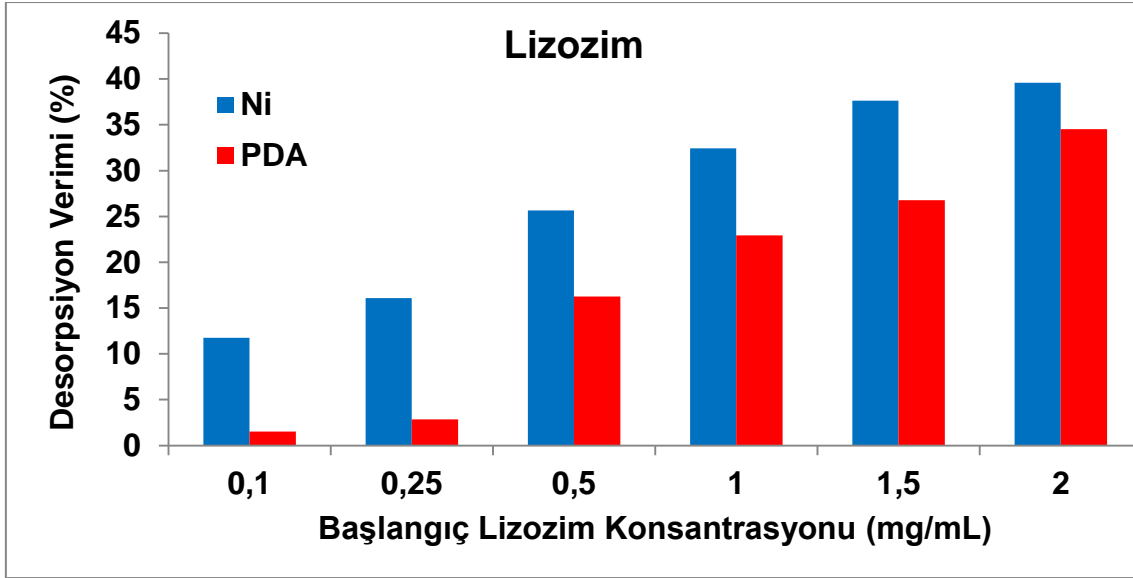
Genel olarak PDA kaplı mikroküreler Ni²⁺ iyonu içeren mikrokürelere göre, düşük başlangıç protein konsantrasyonlarında daha fazla adsorpsiyon gerçekleştirirken artan konsantrasyonlar için bu istikrar gözlenmemektedir. Bu da PDA yapısı ile proteinler arasında düzenli ve verimli bir ilişki olmadığını; proteinlerin Ni²⁺ iyonlarına karşı olan afinitelerinin PDA'ya karşı gösterdikleri afiniteden daha kararlı olduğunu göstermektedir.

4.4.2. Ni²⁺ İyonunun Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi

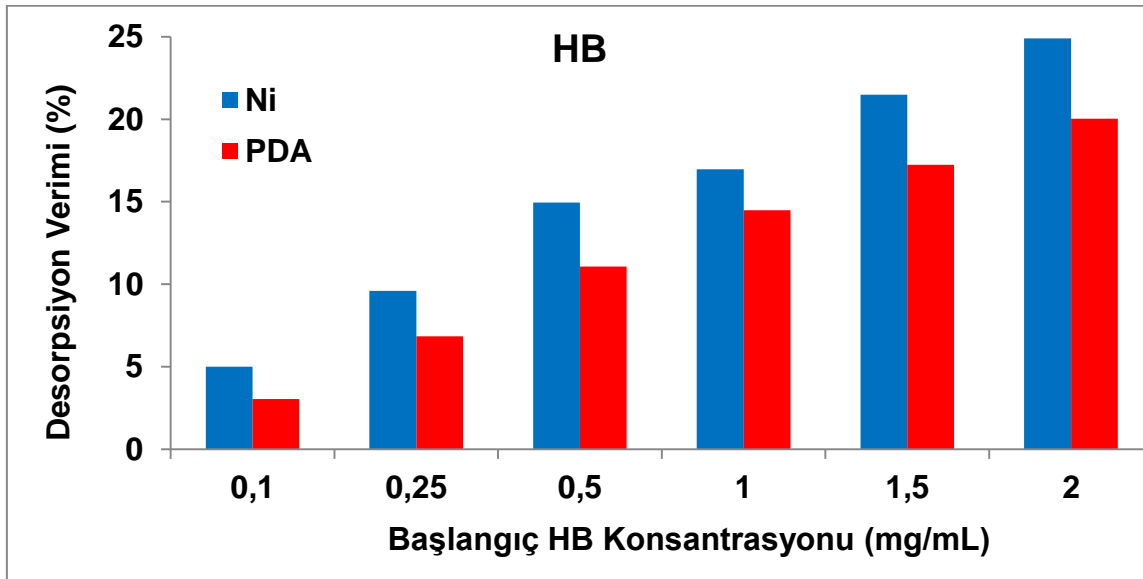


Şekil 4.13. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç BSA Konsantrasyonlarında Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat).

Ni²⁺ iyonları immobilize edilmiş mikropartiküllerde desorpsiyon tamponundaki imidazol molekülleri yarışmacı ajan olarak kullanılmakta ve histidin gruplarında yer alan imidazoller ile yer değiştirmektedir. Bu sayede Ni²⁺ iyonları ve proteinler arasındaki elektrostatik etkileşim, kullanılan desorpsiyon tamponu ile sonlandırılmakta ve proteinlerin sorbent üzerinden desorbe edilmesi sağlanmaktadır. Ancak PDA kaplı mikroküreler ile proteinler arasında spesifik bir bağlanma gerçekleşmediği için kullanılan desorpsiyon tamponu ile proteinlerin desorpsiyonu verimli bir şekilde yapılamamıştır. Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15 ile verilen grafiklerde değişen başlangıç protein (BSA, lizozim, HB) konsantrasyonlarına karşı Ni²⁺ iyonu takılmış mikroküreler ile PDA kaplı mikrokürelerin desorpsiyon verimleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Üç grafikte de görüldüğü gibi, başlangıç protein konsantrasyonlarının herbiri için immobilize Ni²⁺ iyonu içeren mikrokürelerin desorpsiyon verimleri PDA kaplı mikrokürelere göre daha yüksek olmuştur. Bu durum sunulan gerekçelerden anlaşılacağı üzere beklenen bir durumdur.

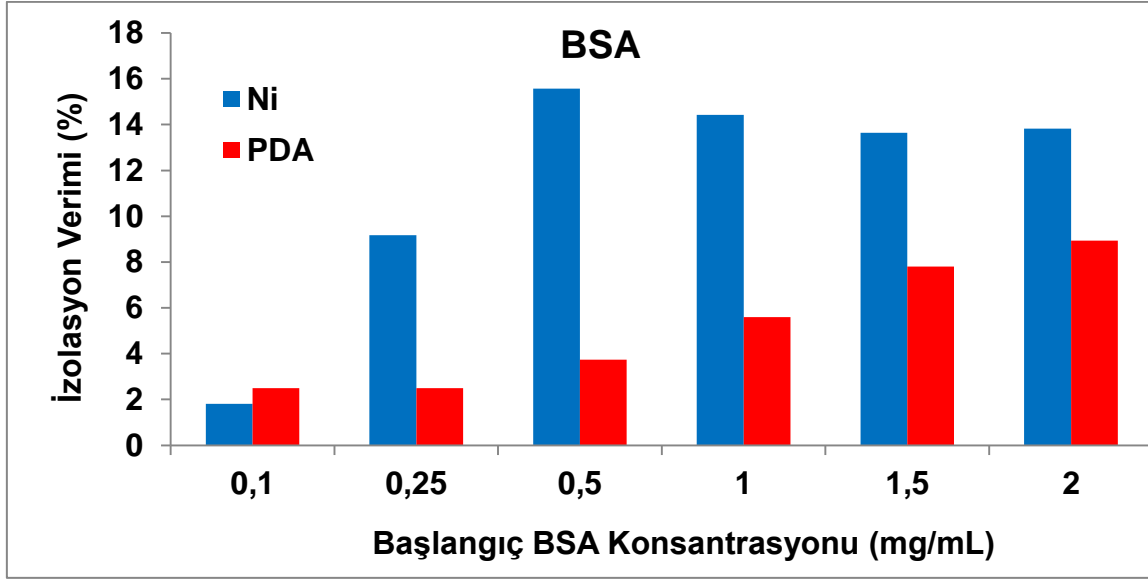


Şekil 4.14. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç Lizozim Konsantrasyonlarında Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat).



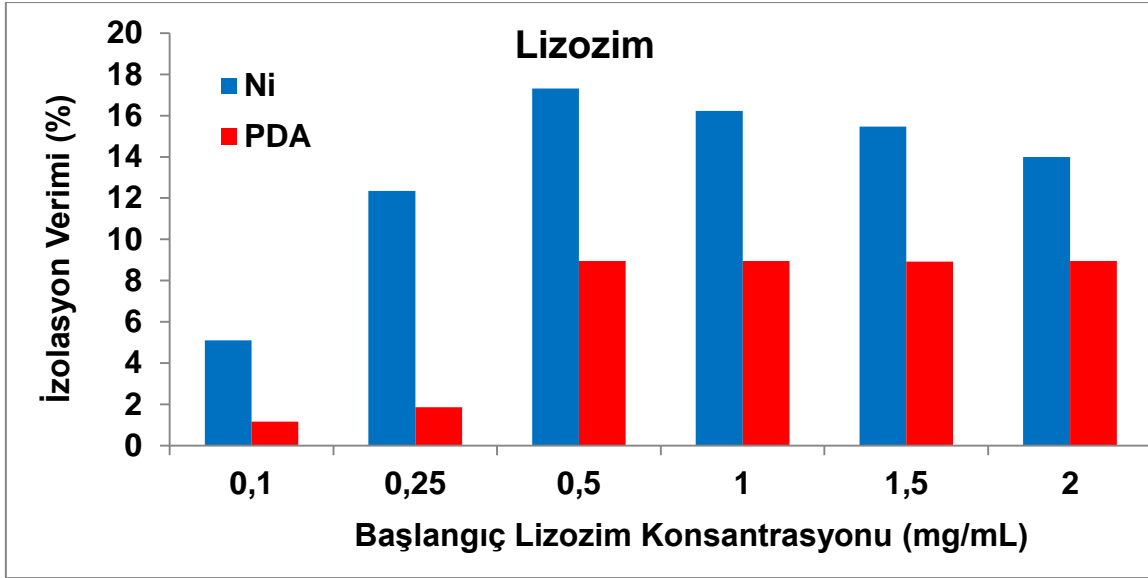
Şekil 4.15. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç HB Konsantrasyonlarında Desorpsiyon Verimi Üzerindeki Etkisi (Desorpsiyon Ortamı: 50 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, 0.5 M İmidazol; Desorpsiyon Hacmi: 1.5 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 1.5 saat).

4.4.3. Ni²⁺ İyonunun İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi

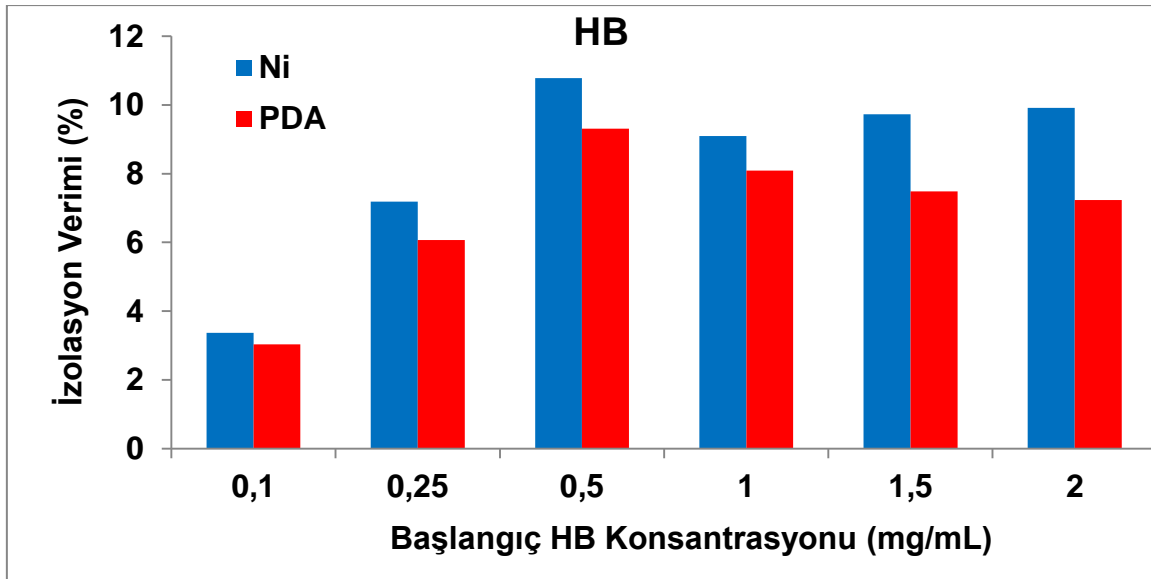


Şekil 4.16. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç BSA Konsantrasyonlarında İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.

Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18' de yer alan grafikler ile Ni²⁺ iyonunun artan başlangıç BSA, lizozim ve HB konsantrasyonlarına karşı izolasyon verimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Veriler dikkatle incelendiğinde 0.1 mg/mL başlangıç BSA konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarda Ni²⁺-PDA@Manyetik-SiO₂ mikropartiküllerinin PDA@Manyetik-SiO₂ sorbentine göre daha yüksek izolasyon verimine sahip olduğu görülmüştür. İzolasyon verimi ortama yüklenen protein miktarı ile ters orantılı iken desorplanan protein miktarı ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Her protein başlangıç konsantrasyonu için ortama yüklenen protein miktarı aynı olduğundan iki partikül türü arasında karşılaştırma yapılırken sadece desorbe edilen protein miktarının dikkate alınması yeterli olmaktadır. Ni²⁺ iyonunun adsorpsiyon kapasiteleri üzerindeki etkisi incelenirken, düşük konsantrasyonlarda PDA@Manyetik-SiO₂ mikrokürelerinin adsorplama kapasitelerinin daha yüksek olmasından bahsedilmektedir. Dolayısıyla bu konsantrasyonlarda Ni²⁺-PDA@Manyetik-SiO₂ sorbentleri için desorpsiyon verimi daha yüksek elde edilmesine rağmen, ortama desorbe edilen protein miktarı daha düşük olabilmektedir. BSA proteininin 0.1 mg/mL başlangıç konsantrasyonundaki istisnası bu sebeple oluşmaktadır.



Şekil 4.17. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç Lizozim Konsantrasyonlarında İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.



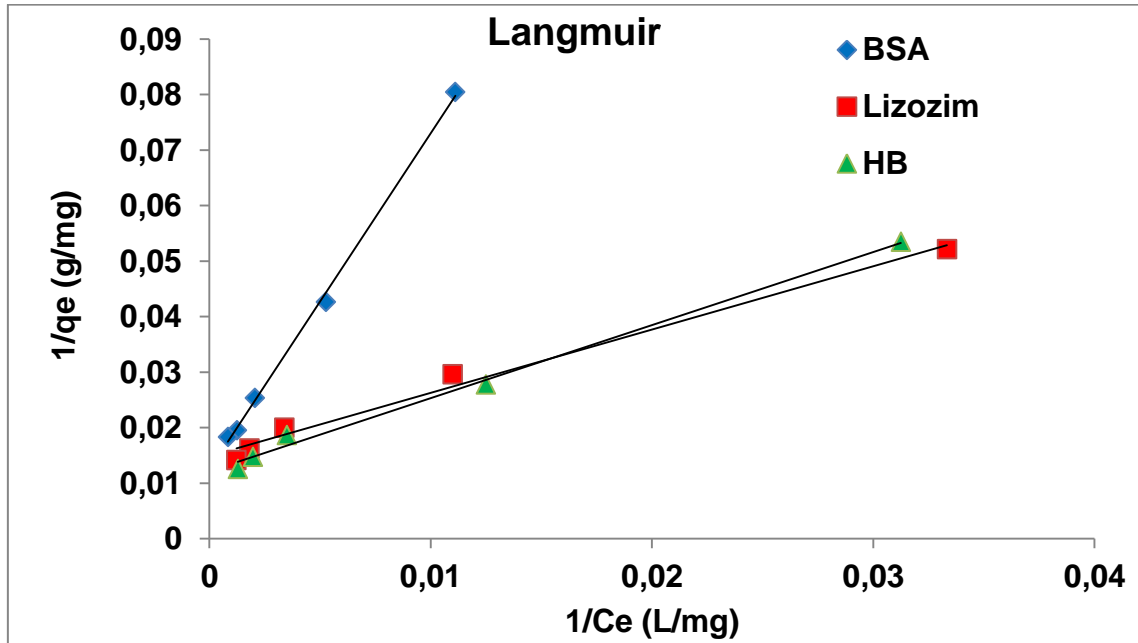
Şekil 4.18. Ni²⁺ İyonunun Değişen Başlangıç HB Konsantrasyonlarında İzolasyon Verimi Üzerindeki Etkisi.

Sonuç olarak Ni²⁺-PDA@Manyetik-SiO₂ mikrokürelerinin sorbent olarak kullanıldığı kesikli sistem ile çalışılan İMAK uygulamalarında, PDA@Manyetik-SiO₂ mikrokürelerine göre her bir konsantrasyon için daha yüksek izolasyon verimi elde edilmiştir. Böylece İMAK uygulanan BSA, lizozim ve HB izolasyonlarında immobilize Ni²⁺ iyonunun etkinliği kanıtlanmıştır.

4.5. Adsorpsiyon İzotermi

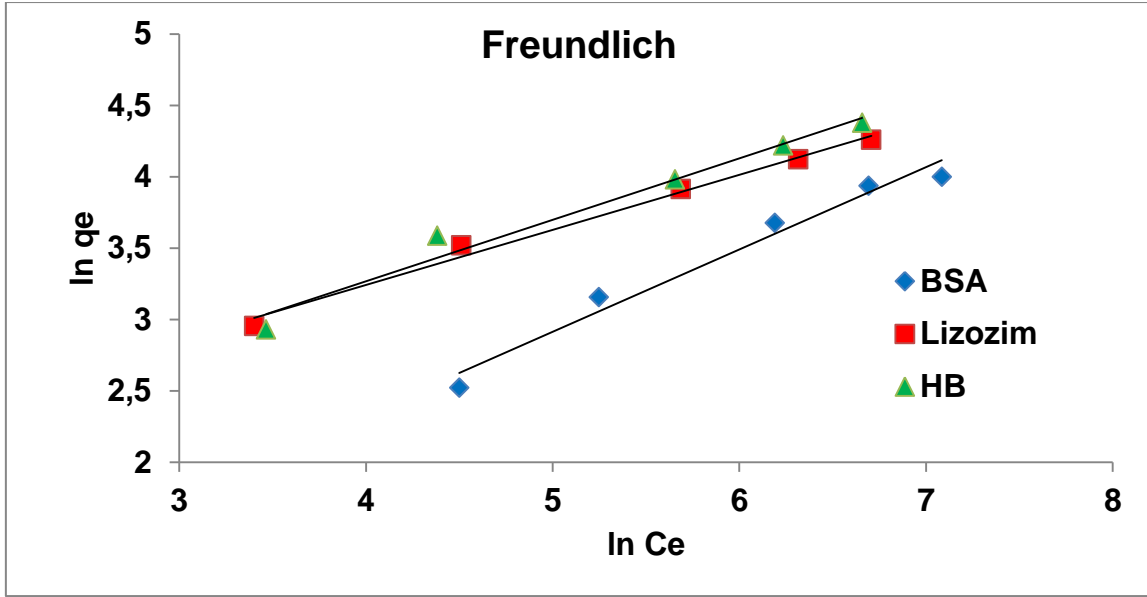
4.5.1. Ni²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Mikrokürelere Ait Adsorpsiyon İzotermi

Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş PDA kaplı manyetik silika mikrokürelere ait adsorpsiyon işleminin özellikleri Langmuir, Freundlich ve Temkin izotermi kullanılarak incelenmiştir. Bu izotermi, adsorplanan proteinlerin derişimi dengeye eriştiğinde, bu konsantrasyon (C_e) ile mikrokürelere ait birim miktarının adsorpladığı protein miktarı (q_e) arasındaki bağıntı kullanılarak çizilmiştir.



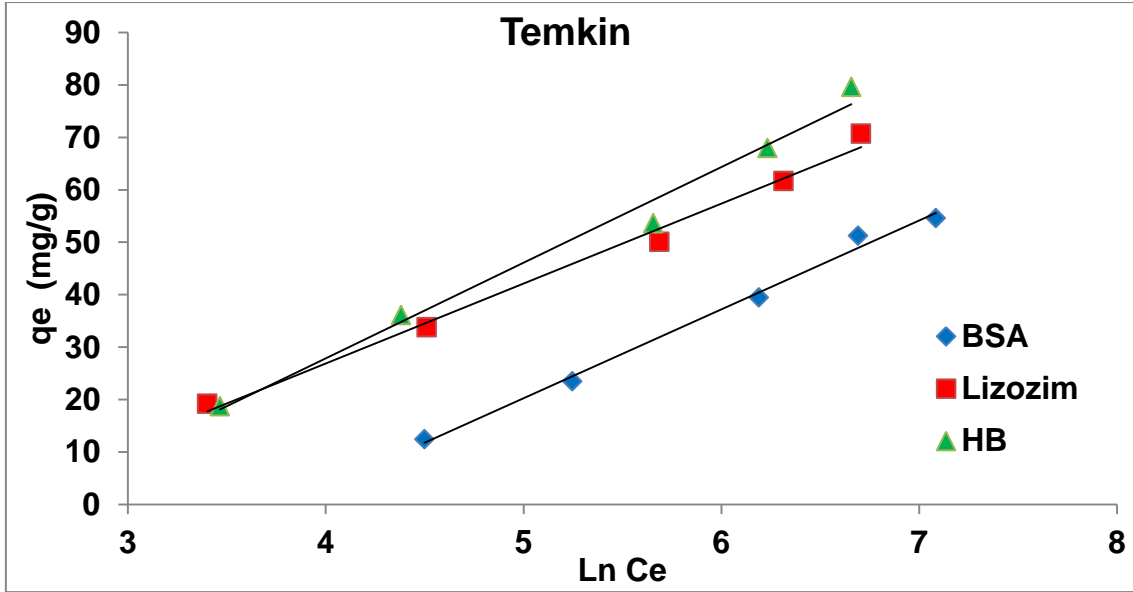
Şekil 4.19. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni²⁺ İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikrokürelere Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir Adsorpsiyon İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.19' da çizilen grafikte yer alan doğruların eğim ve kayma değerleri ile denklik 2.3 kullanılarak Ni²⁺ immobilize edilmiş mikrokürelere ait her proteine ait maksimum adsorplama kapasitesi (Q_m) ve Langmuir adsorpsiyon sabiti (K_L) hesaplanmış ve Çizelge 4.2 ile sunulmuştur. Ayrıca doğrulara ait R² değerleri de bu çizelgede verilmiştir. HB, BSA ve lizozim için maksimum adsorplama kapasiteleri sırası ile 82.6 mg/g, 80.6 mg/g ve 67.6 mg/g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Freundlich Adsorpsiyon İzotermleri. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

Freundlich izotermleri proteinlere ait ölçülen değerler (C_e , q_e) kullanılarak $\ln C_e$ ' ye karşılık $\ln q_e$ Şekil 4.20' de görülen şekilde çizilmiştir. Proteinlere ait adsorpsiyon yoğunluğu $n_{BSA} = 1.73$, $n_{HB} = 2.32$, $n_{lizozim} = 2.59$ olacak şekilde hesaplanmıştır. Freundlich izotermine ait n ve K_f değerleri ile R^2 değerleri Çizelge 4.2 ile sunulmuştur.



Şekil 4.21. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Temkin Adsorpsiyon İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.21 ile verilen, $\ln C_e$ ve q_e değerleri ile oluşturulan Temkin izoterm doğrularının eğiminden adsorpsiyon proses ısı ile bağıntılı sabit (B ; J/mol) ve kayım değerinden proteinlere ait denge derişimindeki bağlanma sabiti (A_T ; L/g) hesaplanmış ve Çizelge 4.2 ile verilmiştir. Ayrıca aynı çizelge üzerinde doğrulara ait R^2 değerleri de sunulmuştur.

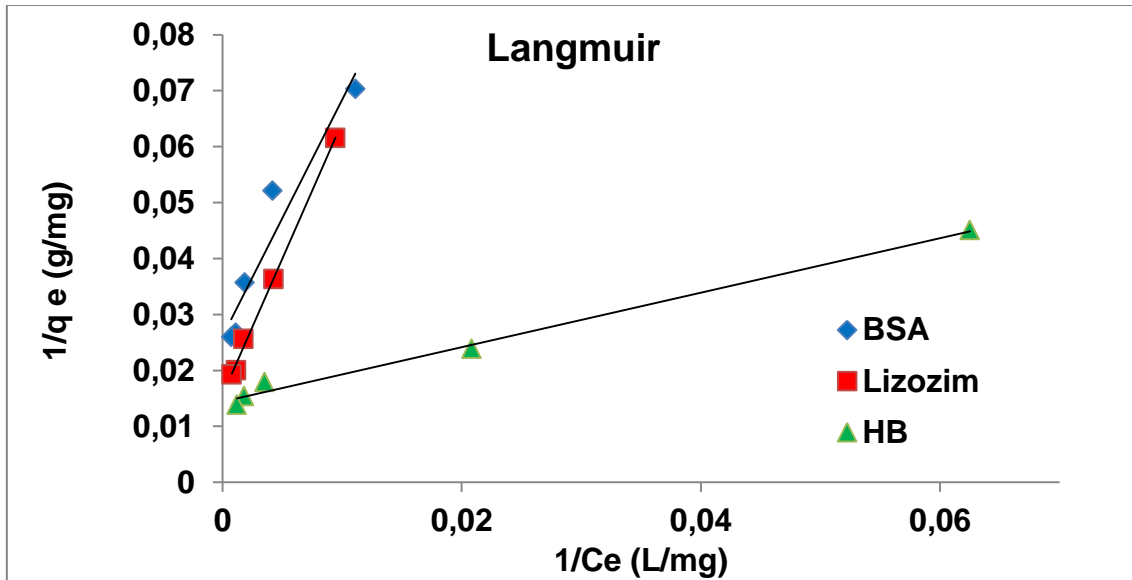
Çizelge 4.2. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir, Freundlich ve Temkin İzoterm Sabitleri ve R^2 Değerleri

Protein	LANGMUIR			FREUNDLICH			TEMKIN		
	q_m (mg/g)	k_L (L/mg)	R^2	n	k_f (mg/g)	R^2	B (J/mol)	A_T (L/mg)	R^2
BSA	80.65	0.002	0.998	1.73	1.027	0.973	16.958	0.022	0.993
Lizozim	67.57	0.013	0.988	2.59	5.473	0.990	15.253	0.107	0.991
HB	82.65	0.009	0.995	2.32	4.684	0.973	18.234	0.084	0.986

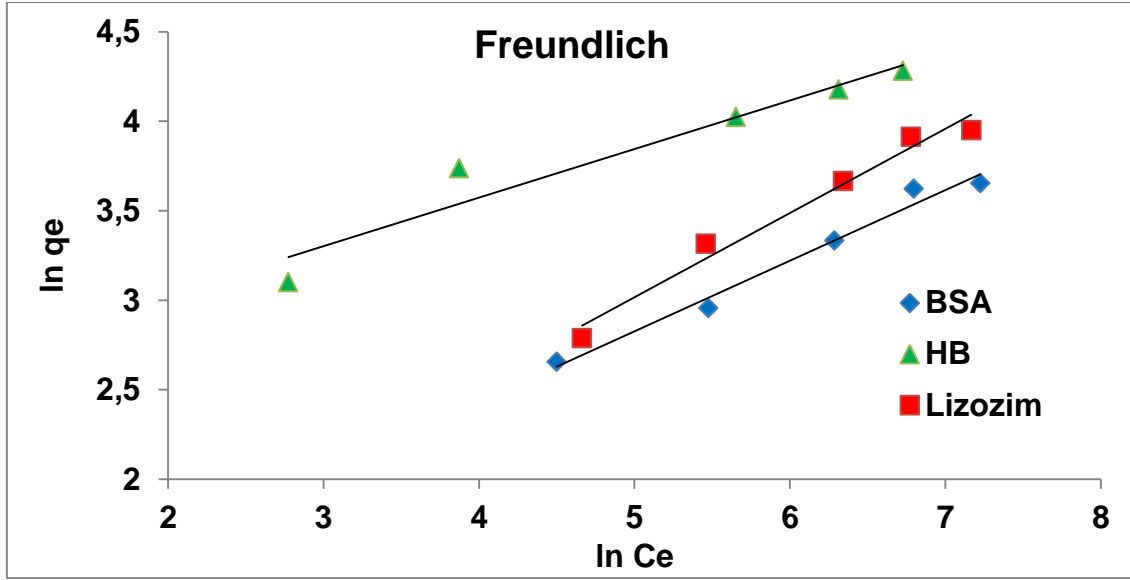
Çizelgede yer alan R^2 değerleri kıyaslandığında, en yüksek değerlerin Langmuir izoterminde sağlandığı görülmüştür. Dolayısıyla Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş manyetik silika mikrokürelerin adsorplama davranışlarının Langmuir modeline uygunluğu söz konusudur. Bu sebeple sorbent madde üzerindeki adsorplamanın tek tabaka halinde gerçekleştiği ve homojen yapıda olduğu söylenebilir.

4.5.2. Ni^{2+} İyonu Immobilize Edilmemiş Mikrokürelere Ait Adsorpsiyon İzotermi

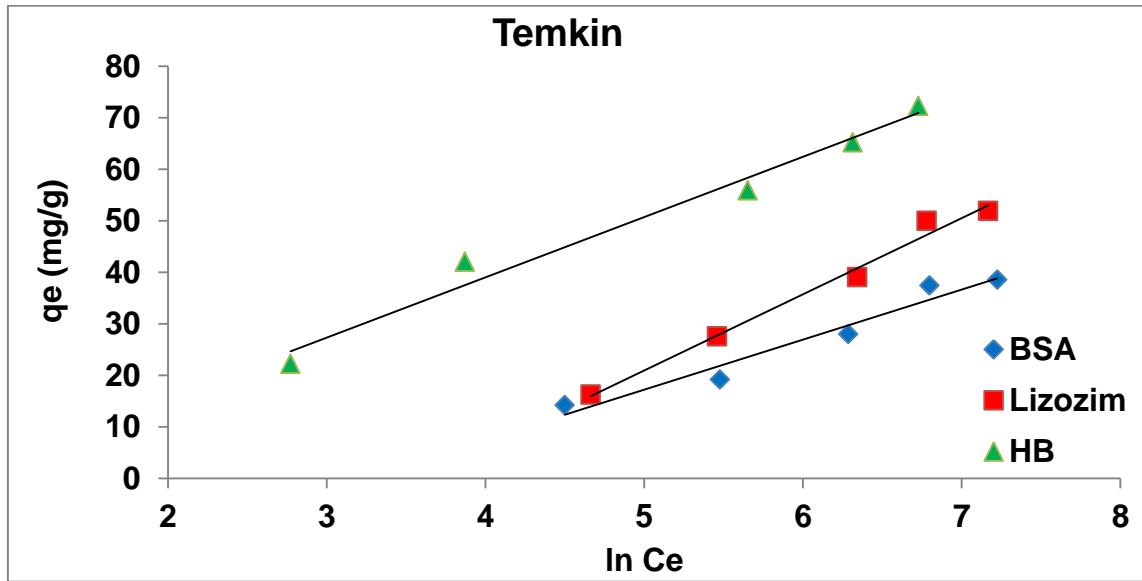
Ni^{2+} iyonu immobilize edilmemiş PDA kaplı manyetik silika mikroküreler için adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, elde edilen denge derişim değerleri (C_e) ve birim adsorbentin adsorpladığı protein miktarı (q_e) tespit edilerek adsorpsiyon izotermi oluşturulmuştur. Bölüm 4.5.1' de ayrıntısıyla açıklanarak çizilen bu izoterm, Ni^{2+} iyonu immobilize edilmemiş partiküllerin adsorpsiyon özelliklerini belirlemek için tekrar çizilmiş ve Şekil 4.22 (Langmuir izoterminde), Şekil 4.23 (Freundlich izoterminde) ve Şekil 4.24 (Temkin izoterminde) ile sunulmuştur.



Şekil 4.22. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni^{2+} İyonu Immobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir Adsorpsiyon İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)



Şekil 4.23. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Freundlich Adsorpsiyon İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)



Şekil 4.24. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni^{2+} İyonu İmmobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Temkin Adsorpsiyon İzotermi. (Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM Fosfat Tamponu, 0.5 M NaCl, pH=7; Adsorpsiyon Hacmi: 1 mL; Adsorbent Miktarı: 10 mg; Sıcaklık: 22 °C; Zaman: 2 saat)

Çizelge 4.3. BSA, Lizozim ve HB Proteinlerinin Ni²⁺ İyonu İmmobilize Edilmemiş Manyetik Silika Mikroküreler Üzerine Adsorpsiyonu İçin Langmuir, Freundlich ve Temkin İzoterm Sabitleri ve R² Değerleri

Protein	LANGMUIR			FREUNDLICH			TEMKIN		
	q _m (mg/g)	k _L (L/mg)	R ²	n	k _f (mg/g)	R ²	B (J/mol)	A _T (L/mg)	R ²
BSA	38.31	0.006	0.925	2.54	2.359	0.981	9.71	0.04	0.955
Lizozim	64.10	0.003	0.997	2.13	1.949	0.976	14.78	0.028	0.987
HB	69.44	0.03	0.992	3.69	12.05	0.932	11.68	0.517	0.978

Çizelge 4.3'te verilen R² değerleri karşılaştırıldığında, Ni²⁺ iyonu immobilize edilmemiş manyetik silika mikrokürelerin adsorpsiyon davranışlarının, Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş mikroküreler ile aynı olduğu ve Langmuir modeline uyum sağlayarak tek tabaka halinde ve homojen yapıda olduğu tespit edilmiştir.

5. GENEL SONUÇLAR

Yapılan tez çalışmasında;

- Manyetik poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) mikroküreler hidroliz kondenzasyon yöntemi kullanılarak TEOS ile yüklenmiştir. Sonuç olarak immobilize metal afinite kromatografisi sorbenti olarak kullanılmak üzere 6 µm ortalama boy dağılımına ve 8.6 nm ortalama gözenek boyutuna sahip manyetik silika mikroküreler elde edilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri sayesinde, mikropartiküllerin dar boy dağılımına ve gözenekli yüzey morfolojisine sahip oldukları gözlenmiştir.
- 249 m²/g yüzey alanına sahip kararlı yapıdaki manyetik silika mikroküreler, fonksiyonellik sağlamak için hidroksil grupları içeren PDA ile ince bir tabaka halinde kaplanmış ve 6.03 µm ortalama boy dağılımına ve 2 nm ortalama gözenek boyutuna ulaşmıştır.
- Titreşimli örnek magnetometresi ile yapılan ölçümlerde manyetik-SiO₂ ve PDA kaplı manyetik-SiO₂ mikrokürelerin doygunluk manyetizasyon değerleri sırası ile 25 ve 21 emu/g şeklinde tayin edilmiştir. Partiküllere ait elde edilen bu değerlerin, uygulanan manyetik alan içerisinde başarılı bir ayrıştırma gerçekleştirebilmek için gerekli olan değerden (16.3 emu/g) yüksek olduğu görülmüştür.
- Partiküllerin fonksiyonelliği Ni²⁺ iyonu immobilizasyonu ile tamamlanmış ve BSA, HB ve lizozim proteinlerinin izolasyonu sırasında kullanılacak olan İMAK sorbenti hazır hale getirilmiştir.
- Kesikli sistemde yapılan adsorpsiyon desorpsiyon uygulamaları ile öncelikle optimum sorbent miktarı tayin edilmiştir. Artan sorbent miktarı ile adsorplama kapasitesinin azaldığı görülmüştür. Desorpsiyon ve izolasyon verimleri de göz önünde bulundurularak 10 mg sorbent miktarının optimum değer olduğu görülmüştür.
- 10 mg olarak kullanılan Ni²⁺-PDA@manyetik-SiO₂ mikroküreler ile başlangıç protein konsantrasyonunun etkisini belirlemek için; artan protein konsantrasyonunda pH=7' de 20 mM fosfat tamponu ile adsorpsiyon işlemi

gerçekleştirilmiştir. Herbir protein için adsorplama kapasitelerinin artan başlangıç protein derişimi ile arttığı görülmüştür. En yüksek adsorplama kapasitesi 2 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonunda HB ile elde edilirken, bu değer 80 mg/g olarak tespit edilmiştir. Lizozim ve BSA için ise adsorplama kapasiteleri 70 ve 54 mg/g değerlerine ulaşmıştır.

- Artan başlangıç protein derişiminin desorpsiyon üzerindeki etkisi incelendiğinde, protein konsantrasyonunun artması ile desorpsiyon veriminin de arttığı görülmüştür. Maksimum desorplamanın 50 % ile BSA proteini için oluştuğu görülmüştür.
- İzolasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi incelendiğinde ise optimum başlangıç protein konsantrasyonunun 0.5 ve 1 mg/mL olduğu gözlenmiştir. Sırası ile maksimum izolasyon verimleri lizozim, BSA ve HB için 17 %, 15 % ve 10 % olarak hesaplanmıştır.
- Ni²⁺ iyonlarının protein izolasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Ni²⁺ iyonu immobilize edilmemiş PDA kaplı mikroküreler ile tekrarlanan çalışmalarda tüm koşulların, Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş sorbent ile yapılan çalışmalar ile aynı olması sağlanmıştır. PDA kaplı mikrokürelerin proteinler ile bağlanma şeklinin gelişigüzel olduğu ve bir istikrar sağlamadığı görülmüştür. Düşük başlangıç protein konsantrasyonlarında Ni²⁺ iyonu içeren mikrokürelere göre daha yüksek adsorplama kapasitesi elde edilirken, yüksek protein konsantrasyonlarında bu değer daha düşük elde edilmiştir. 2 mg/mL başlangıç BSA konsantrasyonunda, Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş sorbentler de adsorplama kapasitesi 54 mg/g iken Ni²⁺ iyonu içermeyenlerde 38.6 mg/g değerine düşmüştür. Lizozim için bu değerler sırası ile 70 ve 51 mg/g iken, HB için 80 mg/g değerinden 72 mg/g değerine düşmüştür.
- Ni²⁺ iyonunun desorpsiyon ve izolasyon verimleri üzerindeki etkisi incelendiğinde ise hemen hemen tüm başlangıç protein konsantrasyonlarında ve çalışılan herbir protein için, Ni²⁺ iyonu içeren mikrokürelerde elde edilen verimlerin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda maksimum izolasyon verimleri BSA, lizozim ve HB için sırası ile 8.9, 8.9 ve 9.3 % olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş partiküller için elde

edilen izolasyon verimlerine göre daha dūşūktür (Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş partiküller için izolasyon verimleri aynı sıra ile 15, 17 ve 10 % idi.). Sonuç olarak Ni^{2+} iyonunun protein izolasyonu üzerindeki pozitif katkısı ispatlanmıştır.

- Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş ve edilmemiş haldeki her iki tür sorbentin adsorplama proseslerinin özelliklerini incelemek için çizilen Langmuir, Freundlich ve Temkin izotermi arasında uygunluğu en fazla olan model Langmuir modeli olmuştur. Adsorplanan proteinlerin sorbent üzerinde tek ve homojen bir tabaka oluşturduğu ve sonrasında adsorplamanın devam etmediği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Ası, T., *Tablolarla Biyokimya Cilt 1*, Nobel Tıp Kitabevi, **1996**.
- [2] Uzun, L., Yavuz, H., Denizli A., Protein kromatografisi, genel prensipler. *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 7-25, **2014**.
- [3] Tuncer, M., *Protein Safılaştırma-1 Kromatografik Yöntemler*, Can Matbaacılık, Mersin, **2008**.
- [4] Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M., Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Safılaştırılması (Antalya, Türkiye), *Akademik Gıda*, 12 (2), 79-87, **2014**.
- [5] Chaga, G.S., Twenty-Five Years of Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: Past, Present and Future (Palo Alto, USA), *Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 313-334, **2001**.
- [6] Odabaşı, M., İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi. *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 243-267, **2014**.
- [7] GE Healthcare, *Strategies for Protein Purification Handbook*, Sweden, **2010**.
- [8] Hedhammar, M., Karlström, A.E., Hober, S., *Chromatographic Methods for Protein Purification*, Stockholm, **2006**.
- [9] Milli Eğitim Bakanlığı, *Kromatografik Analizler*, Ankara, **2013**.
- [10] Balcı, O., *Affinity Chromatographic Purification of Recombinant Human Growth Hormone*, Thesis to the Graduate School, Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara, **2008**.
- [11] Erol, K., *Yüzey Baskılama Yöntemiyle Seçici Adsorbentlerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Kromatografik Uygulamaları*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [12] Andaç, M., Andaç, C., Denizli, A., Afinite kromatografisinde ligand seçimi ve tasarımı. *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 27-39, **2014**.
- [13] Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Ng, T. B., Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: a Review on Its Applications (Heidelberg, Germany), *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, 1411-1420, **2012**.

- [14] Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., Metal Chelate Affinity Chromatography, A New Approach to Protein Fractionation, *Nature*, 258, 598-599, **1975**.
- [15] Kagedal, L., Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Third Edition, (ed: Jonson, J.C.), John Wiley & Sons Inc, Sweden, 183-201, **2011**.
- [16] Wang, Z. G., Lv, N., Bi, W. Z., Zhang, J. L., Ni, J. Z., Development of the Affinity Materials for Phosphorylated Proteins/Peptides Enrichment in Phosphoproteomics Analysis (Changchun, China), *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 8377-8392, **2015**.
- [17] Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schafer, F., Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review (Jülich, Germany), *Methods in Enzymology*, 463, 439-473, **2009**.
- [18] Zhang, Y., Li, D., Yu, M., Ma, W., Guo, J., Wang, C., Fe₃O₄/PVIM-Ni²⁺ Magnetic Composite Microspheres for Highly Specific Separation of Histidine-Rich Proteins (Shanghai, China), *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 8836-8844, **2014**.
- [19] Zhang, R., Pan, B., Wang, H., Dan, J., Hong, C., Li, H., Polydopamine and Graphene Oxide Synergistically Modified Prussian Blue Electrochemical Immunosensor for the Detection of Alpha-Fetoprotein with Enhanced Stability and Sensibility (Xinjiang Uygur Autonomous Region, China), *The Royal Society of Chemistry*, 5, 38176-38182, **2015**.
- [20] Jiang, C., *Immobilized Cobalt Affinity Purification for HSV-1 Based Gene Therapy Vectors*, Degree of Doctor of Philosophy, University of Pittsburgh, Pittsburgh, **2006**.
- [21] Porekar, V. G., Menart, V., Perspectives of Immobilized-Metal Affinity Chromatography (Ljubljana, Slovenia), *Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 335-360, **2001**.
- [22] Kikot, P., Polat, A., Achilli, E., Lahore, M. F., Grasselli, M., Immobilized Palladium (II) Ion Affinity Chromatography for Recovery of Recombinant Proteins with Peptide Tags Containing Histidine and Cysteine (Bernal, Argentina), *Journal of Molecular Recognition*, 27, 659-668, **2014**.
- [23] Tuncel, A., Eş-boyutlu partikül üretimi için polimerizasyon yöntemleri, *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 91-102, **2014**.

- [24] Usta, D. D., *Afinite Kromatografisiyle Desteklenmiş Sers Tabanlı Biyosensörler Aracılığıyla Diol Gruplu Biyomolekül Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2016**.
- [25] Cunningham, M. F., *Microsuspension Polymerization of Methyl Methacrylate (Ontario, Canada)*, *Taylor & Francis*, 7 (2), 231-257, **1999**.
- [26] Ayar, A., *Fonksiyonel Gruplar Bağlanmış Sporopolleninin Ligand Adsorpsiyonunun İncelenmesi*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, **1997**.
- [27] Kyzas, G. Z., Matis, K. A., *Nanoadsorbents for Pollutants Removal: A Review (Thessaloniki, Greece)*, *Journal of Molecular Liquids*, 203, 159-168, **2015**.
- [28] Rahimi, M., Vadi, M., *Langmuir, Freundlich and Temkin Adsorption Isotherms of Propranolol on Multi-Wall Carbon Nanotube (Sarvestan, Iran)*, *Journal of Modern Drug Discovery and Drug Delivery Research*, **2014**.
- [29] Dada, A.O., Olalekan, A.P., Olatunya, A. M., Dada, O., *Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn²⁺ Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk (Kwara State, Nigeria)*, *Journal of Applied Chemistry*, 3, 38-45, **2012**.
- [30] Elmas. B., Tuncel. M., Yalçın, G., Şenel, S., Tuncel, A., *Synthesis of Uniform, Fluorescent Poly(Glycidyl Methacrylate) Based Particles and Their Characterization by Confocal Laser Scannig Microscopy (Ankara, Turkey)*, *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 269, 125-134, **2005**.
- [31] Kip, Ç., Maraş, B., Evirgen, O., Tuncel, A., *A New Type of Monodisperse Porous, Hydrophilic Microspheres with Reactive Chloroalkyl Functionality: Synthesis and Derivatization Properties (Ankara, Turkey)*, *Colloid and Polymer Science*, 292, 219-228, **2014**.
- [32] Tuncel A., *Electron Microscopic Observation of Uniform Macroporous Particles. II. Effect of DVB Concentration (Ankara, Turkey)*, *Journal of Applied Polymer Science*, 71, 2291-2302, **1999**.
- [33] Usta, D.D., Salimi, K., Pınar, A., Coban, İ., Tekinay, T., Tuncel, A., *A Boronate Affinity-Assisted SERS Tag Equipped with a Sandwich System for Detection of Glycated Hemoglobin in the Hemolysate of Human Erythrocytes (Ankara, Turkey)*, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 11934-11944, **2016**.

- [34] Salimi, K., Usta, D.D., Çelikbıçak, Ö., Pınar, A., Salih, B., Tuncel, A., Ti (IV) Carrying Polydopamine-Coated, Monodisperse-Porous SiO₂ Microspheres with Stable Magnetic Properties for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides (Ankara, Turkey), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2017** (Submitted).
- [35] Cheng, S. H., Kao, K. C., Liao, W. N., Chen, L. M., Mou, C. Y., Lee, C. H., Site-Specific Immobilization of Cytochrome C on Mesoporous Silica Through Metal Affinity Adsorption to Enhance Activity and Stability (Montpellier, France), *New J. Chem*, **35**, 1809-1816, **2011**.
- [36] Günal, G., *Silika ve Polimer Bazlı Mikrokürelerin DNA İzolasyon Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, **2016**.
- [37] Ma, Z., Guan, Y., Liu, H., Synthesis and Characterization of Micron-Sized Monodisperse Superparamagnetic Polymer Particles with Amino Groups (Beijing, China), *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **43**, 3433-3439, **2005**.
- [38] Perçin, I., Karakoç, V., Ergün, B., Denizli, A., Metal-Immobilized Magnetic Nanoparticles for Cytochrome C Purification from Rat Liver (Ankara, Turkey), *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, **63** (1), 31-40, **2016**.
- [39] Ma, Z. Y., Liu, X. Q., Guan, Y. P., Liu, H. Z., Synthesis of Magnetic Silica Nanospheres with Metal Ligands and Application in Affinity Separation of Proteins (Beijing, China), *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **275**, 87-91, **2006**.
- [40] Sharma, S., Agarwal, G. P., Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: A Comparative Analysis Using Various Isotherm Models (New Delhi, India), *Analytical Biochemistry*, **288**, 126-140, **2001**.
- [41] Cassels, R., Dobson, C. M., Poulsen, F. M., Williams, R. J. P., Study of the Tryptophan Residues of Lysozyme Using ¹H Nuclear Magnetic Resonance (Oxford, England), *European Journal of Biochemistry*, **92**, 81-87, **1978**.
- [42] Hamzah, A., Hamzah, S., Nasir, F. M., Ariffin, M. M., Isolation and Purification of Lysozyme from Albumin: Effect of Albumin Concentration, pH and Ionic Strength of Buffer Solution (Terengganu, Malaysia), *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **20**, 799-805, **2016**.
- [43] Xie, Y., Yan, B., Xu, H., Chen, J., Liu, Q., Deng, Y., Zeng, H., Highly Regenerable Mussel-Inspired Fe₃O₄@Polydopamine-Ag Core-Shell Microspheres as Catalyst and Adsorbent for Methylene Blue Removal (Alberta, Canada), *ACS Applied Materials & Interfaces*, **6**, 8845-8852, **2014**.

- [44] Ma, Z., Guan, Y., Liu, H., Superparamagnetic Silica Nanoparticles with Immobilized Metal Affinity Ligands for Protein Adsorption (Beijing, China), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 301, 469-477, **2006**.
- [45] Cao, J., Zhang, X., He, X., Chen, L., Zhang, Y., Facile Synthesis of a Ni(II)-Immobilized Core-Shell Magnetic Nanocomposites as an Efficient Affinity Adsorbent for the Depletion of Abundant Proteins from Bovine Blood (Dalian, China), *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 3625-3632, **2013**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Buket Çelikkaya
Doğum Yeri : Burhaniye / Balıkesir
Medeni Hali : Bekar
E-posta : bcelikkaya@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Kimya Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarı 12 Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lise : TEV İnanç Türkeş Özel Lisesi, Tam Burslu, % 100 İngilizce Eğitim, Kocaeli
Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, % 30 İngilizce Eğitim
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Ankara
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, İş Sağlığı ve Güvenliği

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İleri Düzey
Almanca : Başlangıç Düzeyi

İş Deneyimi

2016 Ocak – Nisan : Proje Asistanı, Hedef Artı Mühendislik
2013 Sonbahar : Stajyer, Yudum Gıda, Balıkesir
2010 Yaz : Stajyer, Agrolab Gıda Su Çevre Analiz Laboratuvarı ve Hijyen Destek Hizmetleri, İstanbul

Deneyim Alanları

Mikropartikül Sentezi
İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi

Kompostlařtırma

Gıda Analizi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Usta, D. D., Salimi, K., Kip, Ç., **Çelikkaya, B.**, Tuncel, A. Polydopamine Coated, Magnetic Monodisperse-Porous Silica Microspheres as A Stationary Phase for Protein Separation by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). 44th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, San Francisco, ABD, 19-24.06.2016.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 03 / 02 / 2017

Tez Başlığı / Konusu: Protein İzolasyonu İçin İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Bazlı Kesikli Sistemlerin Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 68 sayfalık kısmına ilişkin, 02/02/2017 tarihinde şahsım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

03/02/2017

B. Çelikkaya

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Buket Çelikkaya
Öğrenci No: N14126987
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği
Programı: Kimya Mühendisliği
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel

(Unvan, Ad Soyad, İmza)