

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİZOZİMİN SAFLAŞTIRILMASI İŞLEMİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ
AFİNİTE DESTEK MATERYALİNİN HAZIRLANMASI: DESTEK
MATERYALİNİN YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN, ADSORPSİYON
MEKANİZMASININ AYDINLATILMASI

HÜLYA SARİBEK ÇİMEN

MART 2006

Fen Bilimleri Enstitüsü müdürünün onayı.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Kimya Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Doç. Dr. Meral KARAKIŞLA

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

ÖZET

LİZOZİM SAFLAŞTIRILMASI İŞLEMİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ AFFİNİTE DESTEK MATERYALİNİN HAZIRLANMASI: DESTEK MATERYALİNİN YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN, ADSORPSİYON MEKANİZMASININ AYDINLATILMASI

ÇİMEN, Hülya Sarıbek

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Mart 2006, 58 SAYFA

Afinite kromatografisinde, biyospesifik ligandlar yerine, boyalar, amino asitler ve şelatlanmış metal iyonları gibi pseudo-spesifik ligandlar kullanılmaktadır. Boya ligandların ekonomik ve kararlı olmasının, kolaylıkla immobilize edilebilmelerinin ve proteinleri adsorplama kapasitelerinin yüksek olmasının, biyolojik ligandlara göre önemli avantajlar sağladığı bilinmektedir. Protein adsorpsiyonu yüzeyde bulunan fonksiyonel grup kompozisyonuna ve morfolojisine bağlı olduğundan, yüzey özelliklerindeki değişimin, yüzey ile çözülmüş madde arasındaki etkileşimin de değişmesine neden olduğu bilinmektedir. Protein adsorpsiyon mekanizmasının, sorbentin yüzey kimyasal yapısı, hidrofilitesi ve protein molekülünün sorbent yüzeyi ve birbiri ile elektrostatik etkileşimi, ayrıca

protein molekülünün yapısal kararlılığı gibi çok sayıda faktöre bağlı olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda membran yapıda poli(hidroksietil metakrilat/kitosan) kompozit afinite materyali UV fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlendi ve membran yüzeyine Cibacron Blue F3GA boya ligandı kovalent olarak bağlandı. Boya-ligand bağlı afinite membranların karakterizasyonu elemental analiz, FTIR spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu gibi teknikler kullanılarak yapıldı ve lizozim adsorpsiyonu çalışmalarında kullanıldı. Lizozim adsorpsiyonu çalışmasında farklı adsorpsiyon koşullarında termodinamik parametreler belirlendi ve adsorpsiyon ve desorpsiyon davranışları araştırıldı.

Sulu ortamdan boya-ligand bağlı afinite membrana lizozim adsorpsiyonu değişen pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve farklı başlangıç derişiminde çalışıldı. Boya-ligand bağlı afinite membranların maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi, kinetiği ve adsorpsiyon izoterm modeli yapılan bu adsorpsiyon çalışmaları ile belirlendi. Ayırıştırma ve saflaştırma işlemlerinde lizozim enziminin aktivitesi, substrat olarak *Micrococcus lysodeikticus* bakterisi kullanılarak belirlendi. Yumurta akından lizozimin ayırıştırılması ve saflaştırılması işlemi YBSK ile takip edildi.

Anahtar Kelimeler: Membran, kinetik, termodinamik parametre, boya ligand, kromatografi, adsorpsiyon, lizozim

ABSTRACT

PREPARATION OF AFFINITY SUPPORT FOR SEPARATION OF LYSOZYME: CHARACTERIZATION OF SURFACE PROPERTIES AND ADSORPTION MECHANISM

ÇİMEN, Hülya Saribek

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, M. Sc. Thesis

Supervisor : Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Mart 2006, 58 pages

In the affinity chromatography, pseudo-specific ligands, e.g., dyes, amino acids and chelated metal ions have been used instead of biospecific ligands. Dyes is to some advantages according to biological ligands in terms of economy, ease of immobilization, ligand stability and adsorbent capacity. The change in surface properties was found to affect the interaction of surface with the surroundings. In particular, protein adsorption depends on the surface composition and morphology of the membrane. There are many reports that adsorption of proteins on the polymer membrane surface are quantitatively changed, depending on the type of ligands immobilised. The adsorption of protein is a very complex process, which can be determined by several factors. Among these, the chemical structure, surface

roughness, the degree of hydrophilicity of surface, electrostatic interactions of the protein molecules with each other and with surface, and the structural stability of protein molecules are the most important.

In this research, poly(hydroxyethyl methacrylate/chitosan) composite affinity membrane was synthesized by UV initiated photopolymerization and a dye ligand (i.e., Cibacron Blue F3GA) was covalently immobilized onto membrane. Dye-ligand attached affinity membranes were characterized by FTIR, elemental analysis, contact angle and scanning electron microscopy.

Lysozyme adsorption onto dye-ligand attached affinity membrane from aqueous solutions containing different amounts of lysozyme at various pH, temperature and ionic strength was investigated by continuous monitoring of the adsorption system. The maximum lysozyme adsorption capacities of the affinity membrane, kinetic and adsorption isotherm model were determined from these adsorption studies. Separation and purification were monitored by determining the lysozyme activity using *Micrococcus lysodeikticus* as substrate. Purification and separation of lysozyme from egg white were followed by YBSK.

Key Words: Membrane, kinetic, thermodynamic parameters, dye ligand, chromatography, adsorption, lysozyme

TEŐEKKÖR

Bu alıőmada bana değerli bilgileri ile yol gösteren ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Gülay BAYRAMOğLU'na teőekkr ederim.

Hülya SARİBEK ÇİMEN

Kırkkale, 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Kromatografi.....	3
1.1.1.Membran Kromatografisi.....	4
1.1.2. Afinite Kromatografisi.....	4
1.1.2.1. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Destek Materyalleri.....	5
1.1.2.1.1. Kitosan ve Polihidroksietil metakrilat (pHEMA).....	7
1.1.2.2. Ligand.....	9
1.1.3. Boya Ligand Afinite Kromatografisi.....	10
1.1.4. Sıvı Kromatografi.....	12
1.2. Model Protein Lizozim.....	13
1.3. Adsorpsiyon.....	14
1.4. Çalışmanın Amacı.....	15
2.MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
2.1.Kimyasal Malzemeler.....	16
2.2.Yöntem.....	17

2.2.1. Afinite IPNs Membranlarının Sentezi.....	17
2.2.2. IPNs Membranlarına Boya Ligand Bağlanması.....	17
2.2.3. Afinite Membranların Karakterizasyonu.....	18
2.2.3.1. Elementel Analiz.....	18
2.2.3.2. FTIR Spektrumları.....	18
2.2.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu.....	19
2.2.3.4. pHEMA/Kitosan Membranlarının Denge Su İçeriği.....	19
2.2.3.5. IPN Membranın Ortam pH'sına Karşı Davranışı.....	19
2.2.3.6. Membran Kalınlığı ve Yoğunluğu.....	20
2.2.4. Afinite Membranlar ile Sulu Ortamdan Lizozim Adsorpsiyonu Çalışmaları.....	20
2.2.5. Adsorpsiyon Parametrelerinin Etkisi.....	21
2.2.6. Lizozimin Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik....	22
2.2.7. Temas Açısı Ölçümleri ve Yüzey Enerjisinin Belirlenmesi.....	23
2.2.8. Yumurta Akından Lizozim Ayrıştırılması ve Saflaştırılması	24
2.2.8.1. Yumurta Akından Lizozim Adsorpsiyonu.....	24
2.2.8.2. YBSK İşletim Koşulları.....	25
2.2.8.3. Yumurta Akından Saflaştırılan Lizozimin Aktivitesi.....	26
2.2.9. Birinci ve İkinci Derece Kinetik Eşitlikleri.....	27
2.2.10. Adsorpsiyon İzoterm Modelinin Belirlenmesi.....	28

3.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	30
3.1. Boya Ligand Bağlı Membranların Özellikleri.....	31
3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskopu ile Yüzey Analizleri....	31
3.1.2. p(HEMA/Kitosan) Membranlarının Denge Su İçeriği..	33
3.1.3. Elementel Analiz.....	34
3.1.4. FTIR Spektrası.....	35
3.2.Afinite Membrana Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyonu.....	37
3.2.1. pH Etkisi.....	37
3.2.2. Afinite Sorbent Dozunun Etkisi.....	39
3.2.3 Adsorpsiyon Hızı ve Adsorpsiyon Kinetiği.....	40
3.2.4 İyonik Şiddetin Etkisi.....	42
3.2.5. Başlangıç Lizozim Konsantrasyonunun Etkisi.....	43
3.2.6. Adsorpsiyon İzoterm Modeli.....	46
3.2.7.IPN membranların Temas Açıkları ve Yüzey Serbest Enerjisi Parametreleri.....	47
3.2.8. Yumurta Beyazından Lizozimin Saflaştırılması.....	50
3.2.9 Lizozim Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	50
4. SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi	5
2.2. Lizozim enziminin aktif merkezi	14
3.1. IPN membranının yüzey SEM görüntüleri.....	32
3.2. IPN membranın farklı ortam pH'larındaki denge su içeriği.....	33
3.3. Cibaron Blue F3GA boya ligandının kimyasal yapısı.....	35
3.4. FTIR Spektrumları.....	36
3.5. Boya-ligand bağlı IPN membranlara sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonunda pH'ın etkisi.....	38
3.6. Boya-ligand bağlı IPN membranlar ile sulu ortamdan lizozim uzaklaştırılmasında sorbent dozunun etkisi.....	39
3.7. Boya ligand bağlı IPN membranlara lizozim adsorpsiyonunda adsorpsiyon süresinin etkisi.....	40
3.8. Boya-ligand bağlı IPN membranlara lizozim adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi.....	42
3.9. İyonik şiddet ile başlangıç lizozim konsantrasyonunun Adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	44
3.10. Sıcaklık ile başlangıç lizozim konsantrasyonunun Adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	44
3.11. pH ile başlangıç lizozim konsantrasyonunun Adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

- 3.1. Farklı ortam pH'sında boya ligand bağlı IPN membran ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu işleminde belirlenen ikinci derece kinetik sabitleri.....41
- 3.2. Boya-ligand bağlı IPN membrana lizozim adsorpsiyonunda farklı sıcaklıklarda belirlenen Langmuir and Freundlich izoterm modeli sabitleri.....47
- 3.3. Boya-ligand bağlı IPN membranı ve protein kaplı afinite membranlarının deneme sıvılarıyla temas açıları48
- 3.4. Wu (harmonik ifade), Fowkes (Geometrik ifade) ve Zisman kritik yüzey gerilimine göre membranlarının yüzey serbest enerjileri.....49

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji başta olmak üzere, tüm bilim dallarında, geniş bir uygulama alanı bulan kromatografi teknikleri, araştırmacılara, etkin ve hızlı analiz imkanı tanımaktadır. Kromatografik tekniklerin, basit ve geliştirilmeye açık oluşu, çeşitli biyolojik sıvılardan, hedef molekülleri ayırmak için, gereksinime özgün sistemler kurulmasına olanak vermektedir. Kromatografik alandaki çalışmalar, özellikle, proteinler, enzimler, peptitler, nükleik asitler ve hormonlar gibi biyomoleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında, mevcut tekniklere göre, daha yüksek verimle, daha güvenilir sonuçlar sağlamaktadır.

Gelişen sanayi toplumlarında, hızla artan ihtiyaçlar, uygulanan tüm tekniklerin, hızlı, basit ve düşük maliyetli olmasını gerektirmektedir. Bu doğrultuda, çeşitli sanayi kollarında uygulanan, ayırma ve saflaştırma işlemleri için, yeni geliştirilen kromatografik yöntemlerle, endüstriyel ölçekte ayırım gerçekleştirilebilmektedir.

Kromatografik yöntemler arasında, bahsedilen üstünlüklere sahip olan afinite kromatografisi, yüksek saflık derecelerinde ayırım yapılabilen, önemli bir tekniktir. Afinite kromatografisinin, saflık derecesinin yüksek olması, hedef molekülün, adsorbent sistemi tarafından özgül olarak tanınmasına dayanmaktadır. Adsorbent sistemi, bir destek materyali ile destek üzerine bağlanan, hedef molekülle non-kovalent olarak etkileşebilen bir ligand molekülünden oluşur.

Afinite kromatografisinin prensibi, destek materyali ile hedef protein arasındaki özgül etkileşime dayandığından, yeni materyallerin dizaynı oldukça

önemli bir parametredir. Bu bakımdan, çalışmalar afinite destek materyallerinin seçimi ve hazırlanma yöntemleri üzerine yoğunlaşmıştır⁽¹⁻⁴⁾.

Kullanılan destek materyalleri, doğal ve/veya sentetik polimerlerden üretilmektedir ve küresel, çubuk veya membran formunda hazırlanabilir. Doğal polimerlerden, agaroz, dekstran, selüloz ve kitosan gibi makromoleküller, yüksek afinite gösterir fakat, mekanik olarak zayıf materyallerdir. Bu nedenle, bu materyalleri kromatografi alanında kullanmak üzere membran yapıda hazırlama zorlukları bulunmaktadır. Poliakrilatlar, polistiren, polietilen türevleri gibi sentetik polimerler ise, mekanik dayanıklılıkları yüksek, kimyasal ve biyolojik degradasyona dirençli malzemelerdir. Farklı formlarda destek malzemesi hazırlanmasında, doğal ve sentetik polimerler, birlikte kullanılarak, olumlu özellikleri birleştirilebilmektedir.

Hidrojeller, hidrofilitesi yüksek, suda çözünmeden önemli ölçüde şişebilen, esnek ve mekanik kararlılığı yüksek hidrofilik polimerlerdir. Hidrojeller, genellikle üç boyutlu, ağ yapılı ve çapraz bağlı polimerlerdir. Hidrojellerin yapısına önemli ölçüde su molekülü olarak şişmesini etkileyen bütün faktörler, polimerizasyon koşulları ve monomerlerin seçimi ile kontrol edilebilmektedir. Bu şekilde değişik gözenek çapına sahip afinite hidrojelleri hazırlamak mümkündür. Bunlardan en önemlisi yapıya hidrofilik ya da hidrofobik karakterde ikinci bir polimerin katılması ile IPN olarak isimlendirilen materyallerin hazırlanmasıdır.

Farklı hedef moleküllere, özgün bağlanma özelliğindeki ligand molekülleri, enzimler, koenzimler, antikolar, aminoasitler gibi biyolojik moleküllerden hazırlanabilir. Biyolojik ligandlar, genellikle kimyasal ve biyolojik degradasyona uğrarlar ve yüksek maliyetlidirler. Bu nedenle, biyolojik ligandlar yerine boya ligandların kullanımı tercih edilmektedir. Boya-ligand afinite kromatografisi, tek

basamakta yüksek saflık derecesine ulaşımı sağladığından, araştırma laboratuvarlarında, çeşitli uygulamalarda ve ayrıca geniş ölçekli protein saflaştırılması çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Reaktif boyalar, polar ve apolar gruplar içeren ve proteinler ile hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlere giren kompleks moleküllerdir. Triazin grubu boyaların, ekonomik olması, immobilizasyon kolaylığı, yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılık ve yüksek adsorpsiyon kapasitesi gibi özelliklerinden dolayı önemli avantajlar sağladığı, çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir ⁽⁵⁻⁷⁾.

1.1. Kromatografi

Kromatografi, bir karışım içinde bulunan farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip maddelerin, bir hareketli faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinden yürütülmesi esnasında, maddelerin bu iki fazdaki dağılıma katsayılarına bağlı olarak ayrılması yöntemidir. Bu yöntem, yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve isimlendirilmiştir. Bir X bileşenin sabit faz (s) ile hareketli faz (h) arasındaki dağılımı, $X_h = X_s$ dengesine göre oluşur ve X bileşenin iki fazdaki derişimlerinin oranına dağılıma katsayısı adı verilir. Bu oranın değerinin büyük olması, bileşenlerin sabit fazda iyi tutunduğunu; küçük olması ise bileşenin hareketli faza olan ilgisinin fazla olduğunu göstergesidir.

Kromatografik tekniklerin kullanılarak yapıldığı tüm ayrımlar, maddelerin yük, büyüklük yada şekil ve yüzey karakteristiği gibi moleküler özelliklerine dayanır. Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması, hareketli ve durağan fazların yapısı ve ayırma prensipleri dikkate alınarak çeşitli şekillerde yapılır.

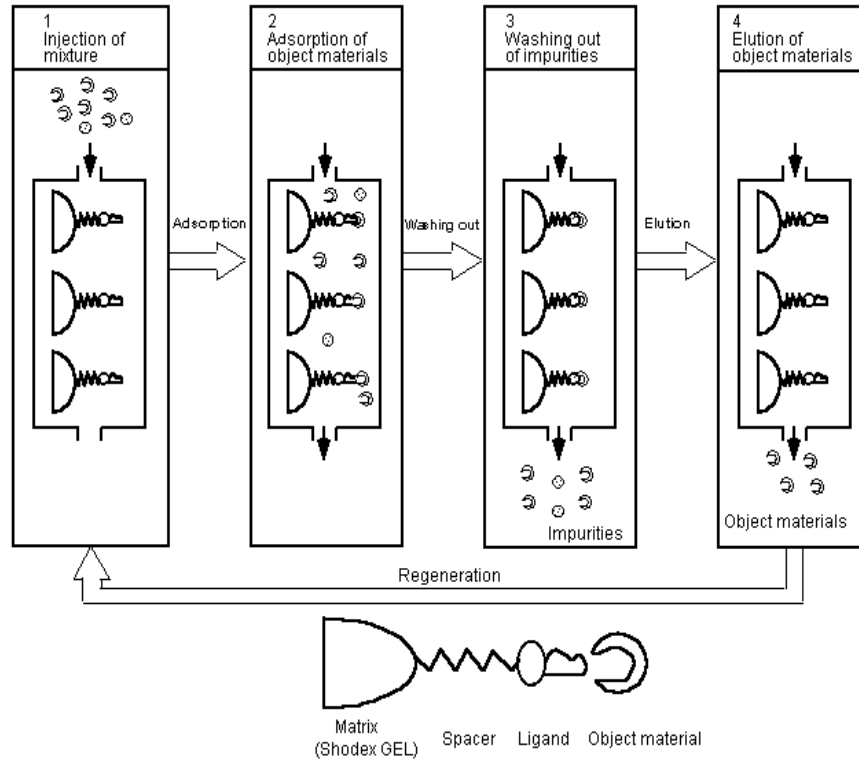
1.1.1. Membran Kromatografisi

Membran kromatografisinde kullanılan mikro veya makro gözenekli membranlar, gözenek yüzeylerinin iç kısımlarında fonksiyonel ligandlar içeren adsorbentlerdir. Matriksin sahip olduğu gözenekler, boya-ligand veya protein arasındaki ilişkinin sağlanması için yeterince geniş olmalıdır. İyi bir ayırma işleminin gerçekleştirilebilmesi için, ideal bir membranın *i)* hızlı akış için mikro veya makro gözenekli yapıya, *ii)* fonksiyonel ligandların bağlanması için erişilebilir reaktif gruplara, *iii)* fiziksel ve kimyasal kararlılığa, *iv)* spesifik olmayan bağlanmanın engellenmesi için hidrofilik bir yüzeye sahip olması, *v)* spesifik olmayan adsorpsiyona yol açmaması ve *vi)* sistemdeki maddelerle kimyasal reaksiyona girmemesi, yani inert olması gerekir.

1.1.2. Afinite Kromatografisi

Kromatografik teknikler arasında en önemli yeri afinite kromatografisi almaktadır. Afinite kromatografi yöntemi; 1968'de Cuetracasas ve arkadaşları tarafından ilk kez kullanıldığından beri, binlerce farklı molekülün (enzimlerin, antikorların, hormonların, vitaminlerin, reseptörlerin çok sayıda farklı glikoproteinlerin, RNA'nın, DNA'nın) hatta bakterilerin, virüslerin ve hücrelerin, ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılır ^(8,9).

Makromoleküllerin teşhisi ve saflaştırılması için önemli bir metot olan ve uzatma kolu takılı afinite ligand bağlı destek materyalinin kullanıldığı afinite kromatografisinin temel prensibini, Şekil 2.1'de gösterilen, özgün tanıma yeteneğine sahip olan bir molekülün (ligand ya da bağlayıcı) uygun, çözünmeyen, genellikle polimerik bir destek materyali üzerine tutuklanması oluşturmaktadır.



Şekil 2.1 Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

1.1.2.1 Afinite Kromatografisi Uygulamalarında Kullanılan Destek Materyalleri

Afinite kromatografisi uygulamalarında performansı belirleyen en önemli parametrelerden birisi destek materyalinin seçimidir. Destek materyali, yüzeyinde ligandların tutuklanması için; *i*) hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalı, *ii*) hidrofilik ve nötral davranışa sahip olmalı, *iii*) kimyasal, mekanik ve biyolojik kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve *iv*) kimyasal reaksiyonlarla türevlendirmeye izin vermelidir. Ayrıca, matriks yüzeyindeki yüklü ya da hidrofobik gruplar ile proteinler arasında meydana gelebilecek non-spesifik adsorpsiyon mümkün olduğunca düşük olmalı, enzim ve protein immobilizasyonu için geniş uygun bir yüzey alanı sağlamalı, toksik olmamalı ve minimum difüzyon direncine sahip olmalıdır. Ayrıca bu materyaller kontrol edilebilir büyüklüğe ve

gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir. Çoğu ayırma ortamlarında, membran yapıdaki destek materyalleri, sağladığı önemli avantajlardan dolayı tercih edilir.

Naylon, polisülfon, polietilen ve sentetik kopolimerler, polistiren ve/veya kopolimerleri kromatografik alanda kullanılan sentetik kökenli polimerlere örnek olarak verilebilir. Selüloz asetat, selüloz nitrat ve rejenere selüloz membranları filtrasyon ve diyaliz amaçları için kullanılan selüloz türevleridir⁽¹⁰⁾. Zou ve arkadaşları⁽³⁾, selüloz asetat ve selüloz kompozit membranlarını afinite kromatografisi alanında başarı ile kullandıklarını belirtmişlerdir.

Farklı polimer karışımlarında hazırlanan IPN hidrojel, çevrelerinde bulunan suyu, ağırlıklarının birkaç katına kadar absorplama kapasitesine sahip çapraz bağlı polimer ağlarından oluşmaktadır. Hidrojeller, ilaç salınım sistemlerinde^(11,12), yapay doku ve organlarda⁽¹³⁾ ve kontak lenslerin üretiminde⁽¹⁴⁾ yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok ticari yumuşak kontak lensler, poli-2-hidroksietil metakrilat, pHEMA, kökenlidir. Biyotıp uygulamalarında organik ve/veya inorganik yüzeyleri içeren implant yüzeyi ile biyolojik çevreyi oluşturan proteinlerin yüzey adsorpsiyonu biyouyumlulukta oldukça önemlidir. Bu nedenle hidrojel yüzeylerine protein adsorpsiyonu, bir protein filminin, bazı durumlarda, hidrojel yüzeylerinin biyouyumluluğunu modifiye edebileceğinden dolayı, önemli bir araştırma konusudur⁽¹⁴⁾. Çalışmalar, lizozimin, düşük moleküler ağırlıklı olması ve fizyolojik pH'ta pozitif yüklü olması nedeniyle, hidrojel kontak lensler üzerine adsorplanan en yaygın protein olduğunu göstermiştir⁽¹⁵⁾. Ayrıca, lizozim, insan göz yaşında en bol bulunan, proteindir.

1.1.2.1.1. Kitosan ve Polihidroksietil metakrilat (pHEMA)

Kitin ve kitosan: Deniz kabukluları ve deniz ürünleri endüstrisi atıkları gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyopolimerlerdir. Biyolojik uyumluluğu, biyolojik yolla parçalanması, toksik olmaması, antimikrobiyal özelliğe sahip olması, ağır metal iyonları ile şelat oluşturması, jel oluşturma özellikleri, kimyasal modifikasyonunun kolay olması ve proteinlere karşı yüksek afiniteye sahip olması gibi çok sayıda avantajlara sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı kitin ve türevi olan kitosanın, özellikle biyolojik çevre sistemleri başta olmak üzere yakın gelecekte çevresel iyileştirme uygulamalarında yaygın olarak kullanılacağı öngörülmektedir (16,17,18,19).

Kitin, kimyasal olarak $\beta(1\rightarrow4)$ bağıyla bağlı 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glikoz birimlerinin (ya da N-asetilglikozamin) uzun zincirinden oluşan düz zincir bir polimerdir. Suda ve birçok çözücüde çözünmeyen kitin, hidrofilik, dayanıklı ve inert bir katıdır.

Kitinin ilk türevi olan kitosan, N-deasetilasyon ile elde edilir ve deasetilasyonun derecesiyle karakterize edilir. Asetilasyonun derecesi, %80-85 ya da daha yüksek çözünebilir bir ürün elde etmek için önemlidir. N-asetilglikozamin ve glikozaminin bir kopolimeridir. Suda çözünmeyen kitosan, moleküldeki amino gruplarının varlığından dolayı asidik çözeltilerde kolayca çözünür.

Kitosan, *Mucorales strains* gibi bazı fungusların hücre duvarlarında bulunan asetillenmiş glukozamin ünitelerinden oluşan, biyolojik olarak uyumlu bir biyopolimerdir ve yüksek hidrofiliteye ve anti bakteriyel özelliklere sahiptir. Bu biyopolimer ayrıca, kitosan zincirleri üzerindeki amino ($-\text{NH}_2$) ve hidroksil ($-\text{OH}$) gruplarının varlığından dolayı sırasıyla elektrostatik ve koordinatif bağlanma

bölgelerine sahip olması nedeni ile iyi bir adsorbent olarak bilinmektedir. Bu nedenle, önemli çevre sorunlarından birini oluşturan ağır metal iyonlarının uzaklaştırılması ve çeşitli moleküllerin adsorpsiyonunda etkili bir şekilde kullanılmaktadır⁽²⁰⁾.

Polianyonlarla agregasyonu ve asidik çözeltide çözünebilirliği, kitosanın iyi bir jel oluşturma kapasitesine sahip olduğunun göstergesidir. Kitosanın çok sayıda hidroksil grubu sayesinde gösterdiği yüksek hidrofilitte, taşıdığı çok sayıda amin grubu ile sunduğu yüksek aktivite ve polimer zincirinin esnek yapısı sayesinde metal iyonları ile uygun konformasyon oluşturabilmesi gibi özellikleri, bu polimerin kullanılabilirliğini artıran başlıca özelliklerindedir. Kitosan zincirleri üzerindeki bu amin (-NH₂) ve hidroksil (-OH) grupları, sırasıyla elektrostatik ve/veya koordinatif bağlanma bölgeleri sunar. Bu iki fonksiyonel grup ayrıca destek materyaline istenilen özellikleri kazandırmak için aktivasyon ve/veya modifikasyon işlemlerine olanak sağlamaktadır. Biyoyumluluğu, biyolojik olarak degrade edilebilmesi, toksik olmaması, fizyolojik olarak inert olması, proteinlere karşı yüksek afiniteye sahip olması, antibakteriyel, haemostatik, fungistatik, antitumoral ve antikolesteremik özellikleri nedeni ile kitin ve kitosan, kontrollü salım sistemleri, doku mühendisliği, gıda mühendisliği, biyosensör uygulamalarında ve çevresel sorunların giderilmesi işlemlerinde geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir^(21,22).

Polihidroksietil metakrilat (pHEMA): 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinin polimerizasyonu ile sentezlenen sentetik bir polimerdir. Membran yapıda hazırlanabilen bu materyalin, mekanik dayanımının yüksek olması, kimyasal ve mikrobiyal degradasyona karşı dayanıklı olması, bu destek materyalinin afinite kromatografisi alanındaki kullanım amacı doğrultusunda vazgeçilmez unsurları oluşturmaktadır. pHEMA'nın yüzey yapısı, gözenekli hazırlanmaya uygun

olduğundan, geniş bir yüzey alanı elde etmek ve yüksek oranda ligand bağlamak mümkündür. Yüzeyinde hidroksil gruplarının bulunması, ligandların bağlanmasına olanak tanımaktadır. pHEMA, hidrofilik bir polimerdir. Çok fazla miktarda su içerme kapasitesine sahiptir. Geometrik yapı olarak membran yapıda hazırlanan destek materyalleri proteinlerin hızlı ve büyük miktarda saflaştırılması için difüzyon sınırlamalarına sahip olmadıklarından ve kolon uygulamalarında düşük basınç, yüksek akış hızı ve yüksek verimliliğe sahip olmalarından dolayı özellikle tercih edilmektedir.

1.1.2.2. Ligand

Hedef moleküle özgün bağlanma yeteneği gösteren molekül ligand olarak isimlendirilir. Hedef molekül, uygun şartlar altında matriks üzerine tutuklanmış seçici ligand ile kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile yüzeyde tutulur. Daha sonra adsorplanan molekül farklı pH, iyonik şiddet ve uygun spesifik elüentler kullanılarak biyolojik molekül ile matriks arasındaki non-kovalent ilişkinin bozulması ile desorbe edilir ^(17,18,23). Kromatografik ayırmada kullanılacak destek materyaline bağlanacak ligandın, hedef moleküle spesifik ve tersinir olarak bağlanması ve destek materyaline de bağlanmaya olanak verecek gruplar içermesi gerekir. Ligandın matris yüzeyine bağlanmasının herhangi bir aktivasyon işlemi gerektirdiği durumlarda, aktivasyon veya modifikasyon işlemi ligandın spesifik bağlanma aktivitesini zayıflatmamalı ve zarar vermemelidir ⁽²⁴⁾. Bu özelliklere sahip afinite ligandı olarak kullanılan materyaller mono-spesifik ya da grup-spesifik ligandlar olarak iki gruba ayrılabilirler.

Mono-spesifik ligandlar, genel olarak proteinlere grup spesifik ligandlara göre daha güçlü bir şekilde bağlanır. Bu tür ligandların ayrışma sabitleri genel olarak 10^6 - 10^8 M⁻¹ aralığındadır. Bu grupta yer alan biyolojik ligandlar arasında reseptör, antikor, protein A, lektin, nükleik asitler yaygın olarak kullanılanlardır ^(25,26). Ancak bu ligandların yüksek maliyetli olmaları, yıkama ve elüsyon koşullarındaki kararsızlıkları, yapıdan sızması gibi dezavantajlarından dolayı uygulanmaları güçtür.

Biyomoleküllerin ayrımı için kullanılan biyospesifik ligandların yerine daha ekonomik ve küçük molekül olmalarının yanında yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılık sunmaları gibi avantajlardan dolayı boyalar, amino asitler ve metal şelat gibi pseudo spesifik ligandlar kullanılmaktadır ^(22,27-30).

1.1.3. Boya-ligand Afinite Kromatografisi

Biyoafiniteye göre önemli üstünlükleri olan boya ligand afinite kromatografisi çok sayıda proteinin saflaştırılması için etkin bir teknik olarak kullanılmaktadır. Boya ligandlar düşük maliyet, kolay immobilizasyon şartları, yüksek oranda fiziksel ve kimyasal kararlılık, yüksek protein adsorplama kapasitesi, metal ile şelat oluşturma kapasitesi ile hedef proteine karşı daha seçicilik göstermesi gibi özelliklerinden dolayı diğer ligandlara göre daha yaygın bir kullanım alanına sahiptir.

Boya ligand afinite sistemlerinde kullanılan boya ligandlar reaktif bir gruba bağlanan bir kromofor içerirler. Kromofor grubunda bulunan sulfonik asit grupları pKa değerlerinin üzerinde negatif yüklüdürler. Boya ligandlar karboksil, amin, klorit veya metaller ile kompleks oluşturabilen gruplar içerirler. Bu ligandlar proteine spesifik veya non-spesifik olarak bağlanırlar. Bağlanma tipine göre farklı yöntemler

kullanılarak elüsyonları yapılır. Boya ligand ve proteinler arasındaki etkileşim, elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağlarının ortak bir kombinasyonu olarak gerçekleşebilir. Boyalar çok sayıda proteinle önemli derecede yüksek seçicilikle etkileşmekte ve taşıyıcı matrikslere kolaylıkla tutuklanabilmektedir. Ayrıca, biyoligandlara göre daha ekonomik ve kararlıdır.

Boya ligand kromatografisi, laboratuvar ölçekli ve geniş ölçekli protein saflaştırma çalışmalarında önemli bir yer almaktadır. Reaktif boyalar, içerdikleri polar ve apolar gruplarla, proteinler ile hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlere girerler. Bu nedenle, boya molekülleri ligand olarak kullanılarak biyolojik karışımlardan belirli bir proteini spesifik olarak, yüksek saflıkta ayrıştırma işlemi tek basamakta gerçekleştirilmesine olanak sağlarlar.

Tez çalışmamızda, boya ligand olarak kullandığımız Cibacron Blue F3GA triazin grubu bir boyadır, farklı proteinlerin saflaştırılması işleminde, araştırmacılar tarafından kullanılan bir tekstil boyasıdır ⁽³¹⁻³³⁾. Bu çalışmadan sonra, çok sayıda farklı destek materyali üzerine boya ligandı olarak bağlanarak çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır ^(12,14). Bu boya ligandının üzerinde taşıdığı sülfonat grupları ve antrokinon halkası, bazı enzimler için önemli bir bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Cibacron Blue F3G-A ve NAD⁺ molekülüne benzerlik gösterdiği için, bu molekülün yapısını taklit ederek, proteine spesifik afinite gösterebilmektedir. Bu nedenle Cibacron Blue F3G-A özellikle nükleotit bağlanma bölgeleri olan proteinlerin ayrıştırılma ve saflaştırılmasında kullanılan ideal bir boya ligandıdır. Cibacron Blue F3GA boya ligandı bağlı destek materyalinin ayırım kapasitesi ve etkinliğine farklı uzatma kollarının (polietilenimin, glutaraldehit, polivinilalkol gibi) etkisi de araştırmacılar tarafından çalışılmış ve rapor edilmiştir ^(34,35,36).

1.1.4. Sıvı Kromatografisi

Kromatografik yöntem kullanılarak, örnek madde bileşenlerinin analizinin yapılmasında, kullanılan hareketli fazın seçiminde kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri gibi birçok parametreye dikkat edilmelidir. Kullanılacak kromatografi tekniğinin türüne göre tasarlanmış, çok sayıda farklı materyalden imal edilmiş ve “kolon” olarak adlandırılmış sabit fazlar mevcuttur. Yüksek basınç sıvı kromatografisi (YBSK) uygulamalarında, daha çok, içerisi farklı yüzey özelliklerine sahip destek materyalleri ile doldurulabilen, 30-300 mm uzunluğunda, yaklaşık 5 µm iç çapında, paslanmaz çelikten kolonlar kullanılmaktadır. Kromatografik işlemlerde hareketli faz, sabit fazdan basınç altında geçirilir. Burada moleküllerin hareketi, hareketli fazın itici gücü ve durağan fazın alıkoyucu gücü arasındaki dengeye bağlıdır. Bileşenler ortamda farklı hızlarda ilerlediklerinden kromatografik işlemin sonunda farklı zamanlarda sistemi terk ederler. Belirli koşullar altında, her molekül için parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retention time- t_R) tanımı türetilmiştir. Durağan fazın alıkoyma gücü, adsorpsiyon, çözünürlük, bağlanma, iyonik etkileşim gibi etkilere dayanmaktadır. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana veya hareketli fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi temel olarak pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör bileşenlerinden oluşan bir donanıma sahiptir. Basınç üretimi, 0.1-10 ml/dakika aralığındaki akış hızları yüksek basınç pompa sistemiyle sağlanmaktadır. Pompa sistemleri; akış hızına, pompanın yapımında

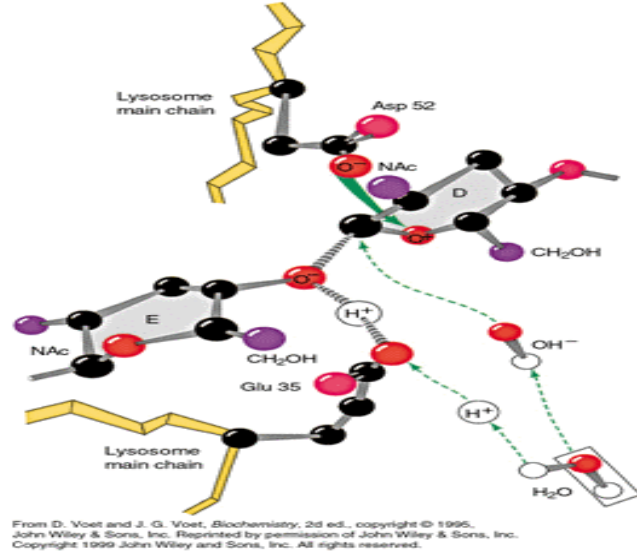
kullanılan malzemeye ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre farklı şekilde sınıflandırılabilir. Analitin mobil faza enjekte edilmesi için kullanılan enjektör, elle veya bilgisayar ile kumanda edilebilir. Karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit faz kolondur. Seçilecek kolonun YBSK uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Kolonda dolgu maddesi olarak kullanılan polimerik partiküllerin çapları, 3-10 µm arasındadır. Partiküller silis, alumina, polistiren-divinil benzen, sentetik reçine veya bir iyon değiştirici reçineden oluşur. Sistemin dördüncü bileşenini oluşturan dedektör, kolonda ayırımı yapılan maddeye ait bileşenlerin alkonma zamanlarına göre sırayla içerisinde geçerken kantitatif tayinlerinin yapıldığı donanımdır⁽³⁷⁾.

1.2. Model Protein Lizozim

Lizozim (EC 3.2.1.17) ticari öneme sahip bir enzimdir. Soğuk pastörizasyonda, dondurulmuş gıdaların saklanması, ambalaj sanayinde (pastörize edilmiş gıdaları paketleme işleminde), süt ürünleri elde edilmesi ve şarap üretim işlemlerinde, antibakteriyel protein olarak gıda endüstrisinde, kontak lens solüsyonlarında, ülser ve enfeksiyonların tedavisinde ilaç olarak yüksek bir kullanım potansiyeline sahiptir. Lizozimin bir antikanser ilacı olarak da kullanım potansiyeline ayrıca HIV enfeksiyonlarında da önemli bir işleve sahip olduğu tartışılmaktadır^(16,38). Son zamanlarda, lizozimin boya ligand kromatografisi kullanılarak yumurta beyazından doğrudan saflaştırılması için yeni birkaç metot rapor edilmiştir⁽¹⁷⁾.

Lizozim 129 amino asitten oluşmuş bir enzimdir (Şekil 2.2). Zincirin üç kısa zinciri 5 ve 15, 24 ve 34, 88 ve 96, amino asitler arasında bir α -heliks

oluşturmaktadır. Zincirin 41 ve 45 ile 50 ve 54 amino asitleri β tabakasını oluşturur ve 46 ile 49 amino asitleri saç tokası meydana getirirler. Lizozimin substratı, bakteri hücre duvarıdır. Yalnızca N-asetilglukozamin birimlerinden yapılmış olan bir oligosakkarit üzerine lizozimin etkisi oldukça yavaştır^(39,40).



Şekil 2.2 Lizozim enziminin aktif merkezi

1.3. Adsorpsiyon

Gaz ya da sıvı çözültide çözünen molekül ya da iyonların katı bir madde yüzeyine tutularak birikmesi olayına “adsorpsiyon”, tutunan taneciklerin yüzeyden geri alınmasına “desorpsiyon” denir. Üzerinde ayrılacak bileşen ile dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı ve/veya van der Waals etkileşimleri nedeni ile adsorpsiyonun gerçekleştiği gözenekli katıya “adsorbent” ve katı yüzeyine tutunan maddeye ise “adsorplanan” adı verilir⁽⁴¹⁾. Adsorplanan molekül; farklı pH, iyonik

şiddet ve uygun elüentler kullanılarak, ligand ile arasındaki kovalent olmayan ilişkinin bozulması ile desorbe edilir.

1.4. Çalışmanın Amacı

Sunulan tez kapsamında, yumurta akından lizozim ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde kullanılması amacı ile, afinite kromatografisi alanında, herhangi bir aktivasyon ve/veya modifikasyon işlemi gerektirmeden boya ligandı bağlı afinite membran sorbentleri geliştirildi. pHEMA ve kitosanın olumlu özellikleri bir araya getirilerek iki polimer karışımından oluşan (IPN) yeni bir destek materyalinin hazırlanması planlandı. Hazırlanan IPN'nin yapısında bulunan, hidroksil ve amino gruplarının, Cibacron Blue F3GA boya ligandı için fonksiyonel bağlanma bölgeleri oluşturduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda, sentetik 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomeri ve doğal kitosan polimer çözeltisi kullanılarak membran geometrisine sahip, pHEMA/kitosan IPN membranları UV fotopolimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. Reaktif bir tekstil boyası olan Cibacron Blue F3GA, IPN membran yüzeyine kovalent olarak bağlandı. Boya ligandının afinite membrana ayrıca iyon değiştirici bir özellik kazandırdığı da düşünüldü. pHEMA/kitosan ve boya ligand bağlı pHEMA/kitosan IPN membranları ile ticari açıdan büyük öneme sahip olan lizozim enziminin sulu ortamlardan adsorpsiyon yolu ile uzaklaştırılma çalışmaları yapıldı. Yeni geliştirilen afinite membranın lizozimi adsorplama eğilimi farklı etkin değişkenler altında test edildi. Adsorpsiyon ortam koşullarının afinite membranın performansı üzerine etkisi araştırıldı ve belirlenen optimum koşullarda biyolojik bir sıvı karışımı olan yumurta akından lizozimin boya ligand bağlı IPN membranları ile ayrıştırılması ve saflaştırılması çalışıldı.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada 2-hidroksietil metakrilat monomeri ve kitosan polimerinin olumlu özelliklerini bir araya getirerek kromatografik alanda kullanılabilir membran yapıda IPN kompozit matriksi hazırlandı. Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaları; *i*) afinite IPN membranların hazırlanması, boya ligandının kovalent olarak bağlanması ve karakterizasyonu, *ii*) boya ligand bağlı membranların sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonunda sorbent olarak kullanılarak adsorpsiyon hızı, izotermi ve kapasitesinin belirlenmesi ve *iii*) belirlenen optimum deney koşullarında boya ligand bağlı afinite membran ile yumurta akından lizozim ayrıştırılması, saflaştırılması ve saflık derecesinin belirlenmesi olarak üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

2.1. Kimyasal Malzemeler

Lizozim (tavuk yumurtası beyazından EC 3.2.1.7) ve human serum albumin Sigma Chem. Co. (St. Louis. MO, ABD) firmasından alındı. 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) Fluka AG'den (İsviçre) temin edildi ve 4⁰C'de saklandı. α,α' -azobisisobutirilonitril (AIBN), kitosan ve Cibacron Blue F3GA Sigma Chem Co. Firmasından alındı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. YBSK saflık derecesinde kullanılan asetonitril, trifloroasetikasit, ultra saf su kimyasalları Merck firmasından ve YBSK çalışmalarında kullanılan protein kolonu ve ön kolon, 0.45 mm gözenek çapına sahip kartuş filtreler ve şırıngaları, milipor filtre sistemleri SUPELCO firmasından alındı.

Çalışmamızın her aşamasında kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, USA) ROPure LP marka ters ozmoz, Barnstead D3804 NANOpure organik/colloidal uzaklaştırıcı yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) üniteleri ve iyon-değişim kolonundan oluşan ultra-saf su sisteminden elde edildi. Bu sistem kullanılarak elde ettiğimiz suyun iletkenliği 18 mS/cm dir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Afinite IPN Membranlarının Sentezi

Membran yapıdaki p(HEMA-kitosan) afinite destek materyalleri, UV fotopolimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. AIBN (20 mg) başlatıcısı içeren 2-HEMA monomeri (2.5 ml) ile %1.0'lık kitosan çözeltisi (%10 asetik asit içinde) (2.0 ml) 6.0 ml'ye tamamlanarak karıştırıldı. Bu çözelti yuvarlak cam reaktör içerisinde (çapı: 9.0 cm) 1 saat süresince, azot atmosferi altında, oda sıcaklığında, UV ışığında polarizasyona tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda sentezlenen membran yapıdaki hidrojeller NaOH (%1.0'lık) ile nötralize edildi ve daha sonra damıtık su ile yıkandı. Bu yolla hazırlanan membranlar perforator ile disk halinde (çapı: 1.0 cm) kesildi ve fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içinde 4 °C'de saklandı.

2.2.2. IPN Membranlara Boya Ligand Bağlanması

Alkali ortamda p(HEMA-kitosan) membranın yapısında bulunan fonksiyonel hidroksil veya amino grubu ile Cibacron Blue F3GA'nin triazin halkasındaki klor arasında nükleofilik reaksiyon ile boya kovalent olarak membran yüzeyine tutuklandı. Bu yöntem için, Cibacron Blue F3GA (300 mg) damıtık su (10 ml) içerisinde çözüldü ve 80 ml damıtık su içerisinde dengeye getirilmiş olan

membran disklerinin (yaklaşık 15 g) bulunduğu ortama aktarıldı. Bu çözeltiye, sodyum hidroksit (1.0 M, pH~13, 10 ml) eklendi ve kapalı reaktör içerisinde 4 saat 80 °C'de manyetik olarak karıştırılarak inkübe edildi. Bu reaksiyon sonunda, reaktör oda sıcaklığında soğutuldu. Komposit membran diskleri birkaç kez damıtık su, %10'luk metanol ve son olarak da tekrar damıtık su ile yıkandı.

Boyanın kovalent olarak yüzeye tutuklanmasından sonra boya-ligand bağlı IPN afinite membran olarak tanımlandı. Boya ligand bağlı afinite membran diskleri tekrar ultra saf su ve fosfat tamponu ile yıkandı ve kullanılabildiği kadar sodyum azid içeren (mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için) fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisinde +4°C'da saklandı.

2.2.3 Afinite Membranlarının Karakterizasyonu

2.2.3.1 Elementel Analiz

Afinite pHEMA/kitosan membranlara bağlı boya ligand miktarı elementel analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD) kullanılarak, azot ve kükürt miktarları dikkate alınarak tayin edildi.

2.2.3.2 FTIR Spektrumları

pHEMA, pHEMA/kitosan, Cibacron Blue F3GA bağlı pHEMA/kitosan membranlarının FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Tabletler 0.01 g kuru membran parçası ve 0.1 g KBr karıştırılarak elde edildikten sonra spektrumları alındı.

2.2.3.3 Taramalı Elektron Mikroskopi

Kurutulmuş afinite pHEMA/kitosan membranları azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve elektron mikroskop fotoğrafları JEOL (JMS 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

2.2.3.4. pHEMA/kitosan Membranlarının Denge Su İçeriği

pHEMA/kitosan membranlarının denge su içerikleri tuz çözeltisi (%0,85 NaCl) içerisinde oda sıcaklığında gravimetrik yöntemle tayin edildi. Membranların denge su içerikleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Denge su içeriği(\%)} = \{(W_s - W_d) / W_d\} \times 100 \quad (1)$$

W_s ve W_d sırasıyla, denge su içeriğine ulaşmış ıslak gözenekli hidrojel yapının ve kuru membranların ağırlıklarını ifade etmektedir.

2.2.3.5. IPN Membranın Ortam pH'sına Karşı Davranışı

Hidrojel yapıdaki p(HEMA-kitosan) afinite membranının denge su içeriğine ortam pH'sının etkisi pH 4.0-8.0 aralığında tampon sistemi içerisinde gravimetrik yöntem kullanılarak (3.1) eşitliğine göre araştırıldı.

2.2.3.6. Membran Kalınlığı ve Yoğunluğu

IPN membranların ıslak durumdaki kalınlığı dijital kumpas yardımı ile belirlendi. Afinite IPN membranının yoğunluğu piknometre yardımıyla membranlar için çözücü olmayan bir sıvı (n-dekan) kullanılarak yapıldı.

2.2.4. Afinite Membranlar ile Sulu Ortamdan Lizozim Adsorpsiyonu Çalışmaları

2-hidroksietil metakrilat monomeri ve kitosan polimerinin polimerizasyonu ile elde edilen p(HEMA-kitosan) IPN membranına, Cibacron Blue F3GA boya ligandı kovalent olarak bağlanarak oluşturulan afinite membran ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu kesikli sistemde araştırıldı. Boya-ligand bağlı p(HEMA-kitosan) afinite membranına, sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu, 0.5 mg/ml başlangıç protein konsantrasyonu içeren, 50 mM, 5.0 ml fosfat tamponu ortamında, 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildi. Destek materyaline adsorplanan protein miktarı, adsorpsiyon ortamındaki lizozimin başlangıç ve adsorpsiyon sonundaki bakiye protein konsantrasyonunun spektrofotometrik yöntem kullanılarak takip edilmesi ile belirlendi. Bu doğrultuda, kalibrasyon eğrisi hazırlamak için standart lizozim çözeltisi (0.05-3.00 mg ml⁻¹) kullanıldı. Sulu çözeltideki başlangıç ve bakiye protein konsantrasyonu çift ışık demetli UV/Vis spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japan, Model 1601) kullanılarak 280 nm dalga boyunda ölçüldü. Her bir deneysel veri en az iki ölçümün ortalaması alınarak belirlendi. Deney sonucunda afinite hidrojel adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve adsorpsiyon dengesi kurulan afinite membranlarının adsorpsiyon kapasitelerini ifade eden, adsorplanan protein miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$q = [(C_o - C)V_s] / m \quad (2)$$

Burada q; afinite hidrojel üzerine adsorplanan lizozim miktarlarını (mg/ml), C_o ve C sırası ile başlangıç ve adsorpsiyon işleminden sonra ortamda kalan bakiye protein konsantrasyonlarını (mg/ml), V_s; adsorpsiyon çözeltisinin hacmini (ml) ve v; adsorpsiyon ortamındaki afinite membranın hacmini (ml) göstermektedir.

2.2.5. Adsorpsiyon Parametrelerinin Etkisi

Boya-ligand bağlı p(HEMA-kitosan) afinite membranının sulu ortamdan lizozime karşı adsorpsiyon davranışı ve etkinliği farklı ortam pH ve sıcaklığı, adsorbent dozu, başlangıç protein konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi parametrelerin etkisi altında araştırılarak belirlendi.

Adsorpsiyon ortam pH'sının, sulu çözeltideki protein adsorpsiyonuna etkisi, pH 4.0 ile 9.0 aralığında farklı tampon sistemleri kullanılarak araştırıldı. pH 4.0-5.0 aralığında asetat tamponu (0.1M CH₃COONa/CH₃COOH), pH 6.0-7.0 aralığında fosfat tamponu (0.1 M K₂HPO₄/KH₂PO₄) ve pH 8.0-9.0 aralığında ise Tris-HCl tamponu kullanıldı. Her pH'da, lizozim başlangıç konsantrasyonu 0.5 mg ml⁻¹ olarak seçildi. Adsorpsiyon deneyleri 25°C'de 4 saat süre ile 100 dev/dak karıştırma hızında karıştırılarak yapıldı. Bu sürenin sonunda afinite membranlar lizozim çözeltisinden uzaklaştırıldı ve adsorplanan lizozim miktarı Eşitlik (2) kullanılarak hesaplandı.

Afinite hidrojin adsorpsiyon hızı ve kapasitesine, başlangıç lizozim miktarlarının etkisi, başlangıç lizozim konsantrasyonu 0.05-2.0 mg/ml aralığında tutularak araştırıldı.

Destek materyali miktarının protein adsorpsiyonuna etkisi, sorbent miktarı 25-150 mg aralığında değiştirilerek incelendi. Bu şekilde katı/sıvı oranının adsorpsiyon kapasitesine etkisi belirlendi.

Sıcaklığın lizozim adsorpsiyonlarına etkisi, 0.5 mg protein/ml içeren tampon sisteminde dört farklı sıcaklıkta (5, 15, 25 ve 35 °C) çalışıldı.

Boya-ligand bağlı p(HEMA-kitosan) afinite membranına lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi, 0.0-1.0 M konsantrasyon aralığında NaCl içeren ortamda araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda, 0.5 mg/ml başlangıç lizozim konsantrasyonu sahip olan çözelti ortamında 0. 0.1, 0.5 ve 1.0 M NaCl içeren 5.0 ml fosfat tamponu içerisinde iyonik şiddet etkisi araştırıldı.

2.2.6. Lizozimin Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik

Uygun koşullar altında, matrikse tutuklanmış ligand tarafından adsorplanan hedef biyolojik molekül farklı pH, iyonik şiddet veya uygun spesifik elüentler kullanılarak, desorbe edilir. Afinite membranlara adsorplanan lizozimin desorpsiyon deneyleri, pH'sı 8.0 olan 1.0 M KSCN içeren tampon çözeltisi içerisinde yapıldı. Lizozim adsorplanmış afinite membran diskleri, 25 °C'de 100 dev/dak karıştırma hızında 4 saat süreyle karıştırılan desorpsiyon ortamında tutuldu. Afinite membran disklerinden ayrılan ve desorpsiyon ortamına geçen lizozim miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Desorpsiyon oranı (3) eşitliği kullanılarak hesaplandı.

$$DO. (\%) = (\text{desorbe edilen}) \times 100 / (\text{afinite membrana adsorplanan}) \quad (3)$$

Sürekli sistem uygulamalarında önemli bir parametre olan yeniden kullanımı belirlemek için, adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı afinite destek materyali kullanılarak 8 kez tekrar edilerek afinite membranların tekrar kullanım özellikleri test edildi.

2.2.7. Temas Açısı Ölçümleri ve Yüzey Enerjisinin Belirlenmesi

Membran örnekleri kurutulduktan sonra, farklı test sıvıları (su, gliserol ve diiyodometan) için, temas açısı değerleri 25°C’de tek damla düşürme yöntemiyle, dijital optik temas açısı ölçer cihazı CAM200 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlandiya) kullanılarak ölçüldü. Membran yüzeyinde, manuel bir mikro şırınga kullanılarak yukarıdan sıvının doldurulmasıyla bir damla oluşturuldu. Sağ ve sol temas açıları ve damla boyut parametreleri dijital görüntüden, Windows 98’de işletilen CAM 200 yazılımı kullanılarak otomatik olarak hesaplandı. Her damlanın, iki kenarı, substrat ve sıvı arasında yapılan ilk temas anından başlayarak, 5 saniye aralıklarla zamanın bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Ölçümler, üç membran örneği üzerinde alınan, en az 5 temas açısının ortalamasıdır.

Düz ve plazma proteini kaplı membranların serbest yüzey enerjisi parametreleri, araştırılan sıvıların temas açıları kullanarak hesaplandı. Temas açısı verilerinden yüzey enerjisinin (bazen katı yüzey gerilimi olarak tanımlanır) belirlenmesi için kararlaştırılmış tek bir yaklaşım yoktur. Bu sonuçlar, en yaygın olarak *i*) Zisman’ın kritik yüzey gerilimi *ii*) Fowkes’s geometrik ifade , *iii*) Wu’nun harmonik ifade ve *iv*) Van Oss’un asit-bazı olmak üzere dört yöntemle göre analiz edilirler⁽⁴²⁻⁴⁵⁾.

Katı bir yüzeyin bir sıvıyla ıslatılması ve temas açısı (θ) kavramı, ilk olarak aşağıda verilen Young eşitliği ile formüle edilmiştir ⁽⁴⁶⁾.

$$\gamma_1 \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{sl} \quad (4)$$

burada γ_1 sıvının yüzey enerjisi, γ_{sl} katı/sıvı arayüzeyinin arayüzey enerjisi ve γ_s katının yüzey enerjisidir.

Araştırılan test sıvılarının temas açısı verileri kullanılarak, yüzey serbest enerjisi parametreleri hesaplandı. Sonuçlar, van Oss, Good ve Chaudbury'nin asit baz metoduna göre analiz edildi ⁽⁴⁵⁾. İlgili eşitlikler, aşağıda özetlendi. Toplam yüzey serbest enerjisi, γ^{TOT} , iki bileşene ayrılmıştır,

$$\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (5)$$

Burada, γ^{LW} ve γ^{AB} sırasıyla, serbest yüzey enerjisinin, dispersif ve asit-baz bileşenleridir. Uygun ifadeler yerine konarak, Eşitlik (6) elde edildi,

$$(1 + \cos \theta) \gamma_1 = 2 [(\gamma_s^{LW} \gamma_1^{LW})^{1/2} + (\gamma_s^+ \gamma_1^-)^{1/2} + (\gamma_s^- \gamma_1^+)^{1/2}] \quad (6)$$

Burada, γ^+ ve γ^- , sırasıyla, asit-baz bileşenin, proton ve elektron veren karakterlerini ifade etmektedir.

2.2.8. Yumurta Akından Lizozim Ayrıştırılması ve Saflaştırılması

2.2.8.1. Yumurta Akından Lizozim Adsorpsiyonu

Yumurta beyazından lizozimin adsorpsiyonu için; kabuğu alkolle silinen günlük yumurtalardan, 100 ml yumurta beyazı ayrılarak, 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. Yumurta beyazı, buz banyosunda, mikserle

karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra ultrasantrifüj ile 4 °C’de, 12000 rpm’de, 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve süpernatant alındı.

Yumurta beyazının başlangıçta içerdiği lizozimin miktarı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YBSK) ile tayin edildi. Adsorpsiyon deneyleri ise, yumurta beyazı içinde, boya-ligand bağlı p(HEMA-kiosan) membranları ile toplam 5.0 ml hacimde, kesikli sistemde 25°C’de, 4 saat süreyle 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak yapıldı. Adsorpsiyondan sonra yumurta akında kalan lizozim miktarı yine YBSK analizi ile belirlendi. Boya-ligand bağlı afinite IPN membranları üzerine adsorbe edilen lizozimin elüsyonu pH’sı 8.0, 2.0 M NaCl ile yapıldı. 2 saat süreyle, 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak elüe edilen lizozimin saflığı, YBSK ile tespit edildi. Yumurta akı örneğindeki toplam protein konsantrasyonu YBSK ve Bradford Yöntemi ile tayin edildi ve Coomassie Brilliant Blue boyası kullanıldı. Ayrıca, biyolojik bir sıvı karışım olan yumurta akındaki albumine karşı hazırlanan afinite membranın adsorpsiyon eğilimi spektrofotometrik olarak ve/veya YBSK ile de araştırıldı.

2.2.8.2. YBSK İşletim Koşulları

Çalışmamız da kullandığımız YBSK sistemi (Dionex Co., Germering, Germany); vakum gaz gidericisi sistem içinde bulunan dörtlü pompa (Model P580A), enjeksiyon kapasitesi 1’den 250 µl’ye değişebilen bir otosampler (Model ASI-100), bir kolon fırını (Model STH 585) ve bir UV-Vis dizi diyod dedektör (Model 340S) ünitelerini içermektedir. Proteinlerin kromatografik ayrımı, ön kolon (20 mm, iç çapı 4.6 mm) ile korunan, SUPELCO C8 protein kolonu (150 mm x iç çapı 4.6 mm) ile başarıldı. Kromatografik çalışmalarda kullanılan bütün protein

çözeltileri, partikül ve büyük agregatları uzaklaştırmak için, membran filtresi (0.2 µm, millipor) ile önceden filtre edildi. Proteinlerin ayrıştırılmasında taşıyıcı faz olarak A hattında; MiliQ saf su içerisinde % 0,1 Trifluoroasetik asit (TFA) ve B hattında ise % 95 asetonitril (AcN) ve % 5 ultra saf su içerisinde % 0,1 oranında TFA kullanıldı. B hattı taşıyıcı fazı, A fazına oranla 20 dakika içerisinde % 25'ten % 60'a çıkarıldı. 4,5 dakika sonunda ise % 60'tan % 25'e indirildi. Hareketli fazın akış hızı 1 ml dakika⁻¹ olarak seçildi. Kolon fırın sıcaklığı 25 °C'ye ayarlandı. Kromatografik ayırım, 1.0 ml dak⁻¹ akış hızında, bir gradiyent program kullanılarak ve otosamplerin örnek enjeksiyon hacmi 20µl olarak gerçekleştirildi. UV-Vis dedektör 220 nm'ye ayarlandı ve sıcaklık 25°C'de sabit tutuldu. Dionex CHROMELLEON® yazılımı kullanıldı ve bilgi elde edilmesi ve entegrasyonu için, Windows 98 işletim sistemi altında çalıştırıldı. Bu veri programı ile pik integrasyonları yapılarak her bir proteinin pik alanı elde edildi.

2.2.8.3. Yumurta Akından Saflaştırılan Lizozimin Aktivitesi

Saflaştırma deneylerinde, lizozimin aktivitesi, 620 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi, fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7.0) süspanse edilen *M. lysodeikticus* hücrelerinin kültürünün turbiditesindeki azalma, lizozimin ve/veya elüsyon sonucunun eklenmesinden sonra 6 dakika boyunca izlendi. Bir ünite lizozimin aktivitesi, 25°C'de ve pH 7.0'de bir dakikada O.D. değerini 0.001 azaltan enzim miktarı olarak tanımlandı. Saflaştırılan örneklerdeki lizozimin saflığı, YBSK kullanarak analiz edildi.

2.2.9. Birinci ve İkinci Derece Kinetik Eşitlikleri

Boya ligand tutuklu pHEMA membranlarının hazırlanması sırasında, çok sayıda ve farklı kimyasal gruplar (ör., -NH₂, -NH, -SO₃H, -OH, -COOH ve hidrofobik gruplar) adsorbentlerin yüzeyinde oluşturuldu, bu durum, lizozim boyamatriks etkileşimlerinin çok fazla tipi olduğunu işaret etmektedir. Kinetik modelleri (birinci derece ve ikinci derece eşitlikleri), ölçülen konsantrasyonların, adsorbentlerin yüzey konsantrasyonlarına eşit olduğu varsayılan durumlarda kullanılabilir. Lagergren birinci derece hız eşitliği, sıvı bir çözülden, katının adsorpsiyonu için, en yaygın kullanılanlardan biridir. ⁽²⁵⁾. Aşağıdaki gibi sunulabilir:

$$dq_t / dt = k_1 (q_{eq} - q_t) \quad (7)$$

Burada k₁, birinci derece biyosorpsiyonun hız sabiti (dak⁻¹) ve q_{eq} ve q_t, denge ve t zamanında adsorbe edilen lizozim miktarlarını gösterir. Sınır şartların uygulanmasıyla, integrasyondan sonra, t=0'da q_t = 0 ve t = t'de q_t =q_t aşağıdaki eşitliği verir:

$$\log (q_{eq} / (q_{eq} - q_t)) = k_1 t / 2.303 \quad (8)$$

$$\log (q_{eq} - q_t) = \log q_{eq} - (k_1 t / 2.303) \quad (9)$$

Eşitlik (9), doğrusal bir form elde etmek için yeniden düzenlenebilir. log (q_{eq} - q_t)'ye karşı t'nin grafiği, kinetik modelin uygulanabilirliğinin teyit edilmesi için, düz bir çizgi vermelidir. Gerçek bir birinci derece işleminde log q_{eq}, log (q_{eq} - q_t)'ye karşı t grafiğinin kaymasına eşit olmalıdır.

Ritchie, katı üzerine gazların adsorpsiyonunun kinetiği için, bir ikinci derece hız eşitliği önermiştir ⁽²⁶⁾. İkinci derece eşitlik, adsorbentler üzerine, solutların

adsorpsiyonu için uygulanabilir ⁽⁴⁷⁾. İkinci derece eşitliği, adsorpsiyon kapasitesine dayanır, şu şekilde ifade edilebilir:

$$q_m / (q_m - q_t) = k_2 t + 1 \quad (10)$$

Bu eşitliğin doğrusal şekli:

$$1/q_t = 1/k_2 q_m t + 1/q_m \quad (11)$$

Eşitlik 11'den, $1/q_t$ 'ye karşı $1/t$ grafiği, düz bir çizgi vermelidir ve sorpsiyon kapasitesi q_m ve hız sabiti k_2 , sırasıyla, doğrusal ikinci derece eşitliğin kayma ve eğiminden hesaplanabilir.

2.2.10. Adsorpsiyon İzoterm Modelinin Belirlenmesi

Genellikle, iki farklı teorik izoterm modeli, deneysel verilere uygunluğu için kullanılır: Langmuir ve Freundlich modelleri. Langmuir modeli, eşit erişilebilir adsorpsiyon yerleri, tek tabakalı yüzey kaplaması ve adsorplanan türler arasında etkileşimin olmadığı gibi homojenite varsayımına dayanır. Langmuir modeli, homojen adsorpsiyonlar için formüle edildiğinden, Freundlich izoterm modeli, genellikle heterojen adsorpsiyon için uygulanır. Freundlich izotermi, sıklıkla adsorpsiyonu tanımlamak için kullanılır. Adsorbe edilen konsantrasyonu, solut konsantrasyonunun bir fonksiyon kuvveti olarak ilişkilendirilir. Freundlich modelinin bir sınırlaması, adsorplanan solutun miktarının, çözeltideki solutun konsantrasyonu ile tanımlanamaz şekilde artmasıdır. Bu ampirik eşitlik şu şekildedir:

$$q_{eq} = K_F (C_{eq})^{1/n} \quad (12)$$

Burada K_F ve n , sistemin karakteristik Freundlich sabitleridir. K_F ve n sırasıyla, adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon yoğunluğunu belirtir. Doğrusal Freundlich eşitliğinin eğim ve kayması sırasıyla, $1/n$ ve $\ln K_F$ 'ye eşittir.

3.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Son yıllarda, membran yapıda polimerik destek materyallerinin kullanıldığı boya-ligand afinite kromatografisi, kolon tekniklerinin kullanıldığı kromatografik ayırımlardaki difüzyon sınırlamalarını azalttığından, alternatif olarak geliştirilmiş yeni bir tekniktir ^(10,13). Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması amacı ile, modifiye edilen kompozit membranlara, çeşitli boya ligandları immobilize edilmiştir ^(24,48). Boya-ligandlar, substrat veya kofaktör yüzeylerini taklit ederler. Bu şekilde çok sayıda enzimin aktif bölgelerine uyum gösterirler. Boya-ligandların bağlanmaları, geri dönüşümlü ve seçici olduğundan; proteinlerin adsorpsiyon ve desorpsiyonlarında başarı ile kullanılmaktadır. Boya-ligand afinite kromatografisi, fosfofrüktokinazlar ile Blue Dekstran (Cibacron Blue F3-GA) arasındaki beklenilmeyen bir etkileşimin görülmesi ile başlamış ve boya ligand afinite kromatografisi protein saflaştırmasında çok güçlü bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Cibacron Blue F3-GA ve onun benzerleri olan Procion Blue H-B, Blue MX-R ve MX-3G, NAD ve diğer pürin nükleotitlere benzerlik gösterirler ve proteinlere özel nükleotit bağlanma yerlerinden bağlanırlar.

Bu çalışmada, p(HEMA-kitosan) membranları, UV foto-polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı. Bir triazin boyası olan Cibacron Blue F3GA boya ligandı; proteinlerle etkileşimler için afinite yüzeylerini sağlamak, membranların tekrarlanan kullanımlarında adsorpsiyon/elüsyon çalışmaları sırasında kararlı bir afinite boya-ligand sistemi kurmak, yeterli mekanik, kimyasal ve biyolojik kararlılığa sahip afinite membran sistemleri geliştirmek ve geniş bir yüzey alanı sağlamak amacı ile IPN membrana immobilize edildi.

3.1. Boya Ligand Bağlı Membranların Özellikleri

Boya ligand bağlı afinite IPN p(HEMA-kitosan) membranlarının, sulu ortamdan ve biyolojik sıvılardan protein ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde kullanılabilmesi için, bir arayüzey olayı olan adsorpsiyon işleminin optimizasyonu gereklidir. Protein ile membran yüzeyindeki spesifik etkileşimlerin destek materyalinin yüzey topografyası ve bazı fiziksel parametreler ile değiştiği bilinmektedir.

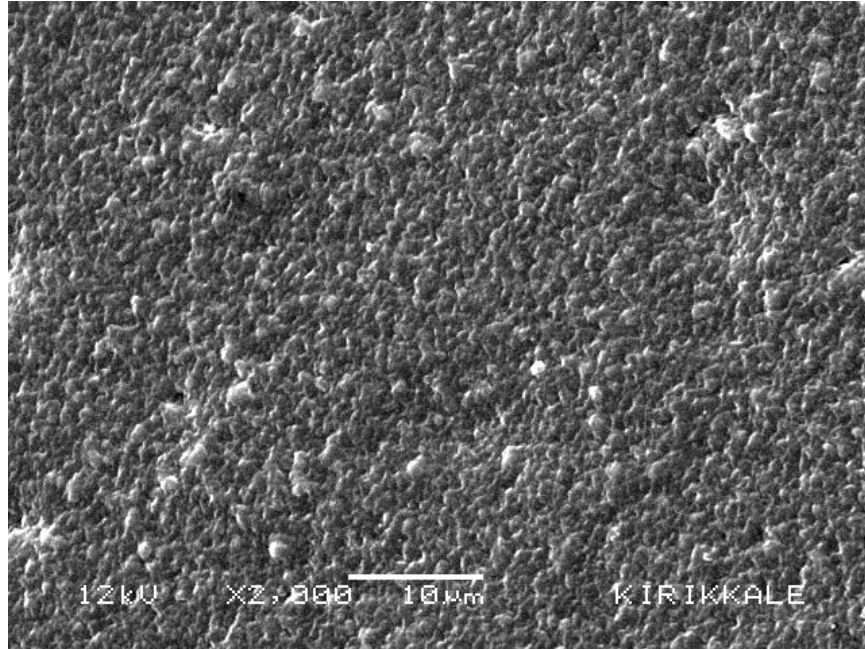
3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Yüzey Analizleri

Afinite kromatografisinde kullanılan matrikslerin ideal bir destek materyali olarak kullanılabilmesi için çalışmamızda kullanılan p(HEMA-kitosan) IPN membranında olduğu gibi gözenekli ve hidrofilik bir yapıya, yüksek kimyasal ve mekanik dirence, uygun fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir. Membranlarının kalınlığı ve yoğunluğu sırasıyla 600 μm ve 1,26 g/cm^3 , 1 ml ıslak membranının düz yüzey alanı ise 38.5 cm^2 olarak belirlenmiştir.

Membran yapıda hazırlanan IPN materyalinin yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlendi. Afinite membranının elde edilen yüzey ve yan kesit mikrograflarından düzgün bir yüzeye ve gözenekli yapıya sahip olduğu gözlemlendi ve yüzey mikrografı Şekil 3.1'de verildi. Kromatografik destek materyalinin gözenekli yapıda olması, hedef molekül için yüksek oranda erişim bölgeleri sağlayacağından, daha fazla afinite göstermesi yolu ile adsorpsiyon eğilimi ve kapasitesini arttırarak önemli bir avantaj sağladığı bilinmektedir. Ayrıca geniş yüzey alanı, matrikste düşük difüzyon direnci sağlarken, membranlara bağlanan

ligand yoğunluğunun da daha fazla olmasını ve dolayısıyla protein adsorpsiyon kapasitesinin artmasını mümkün kılacaktır.

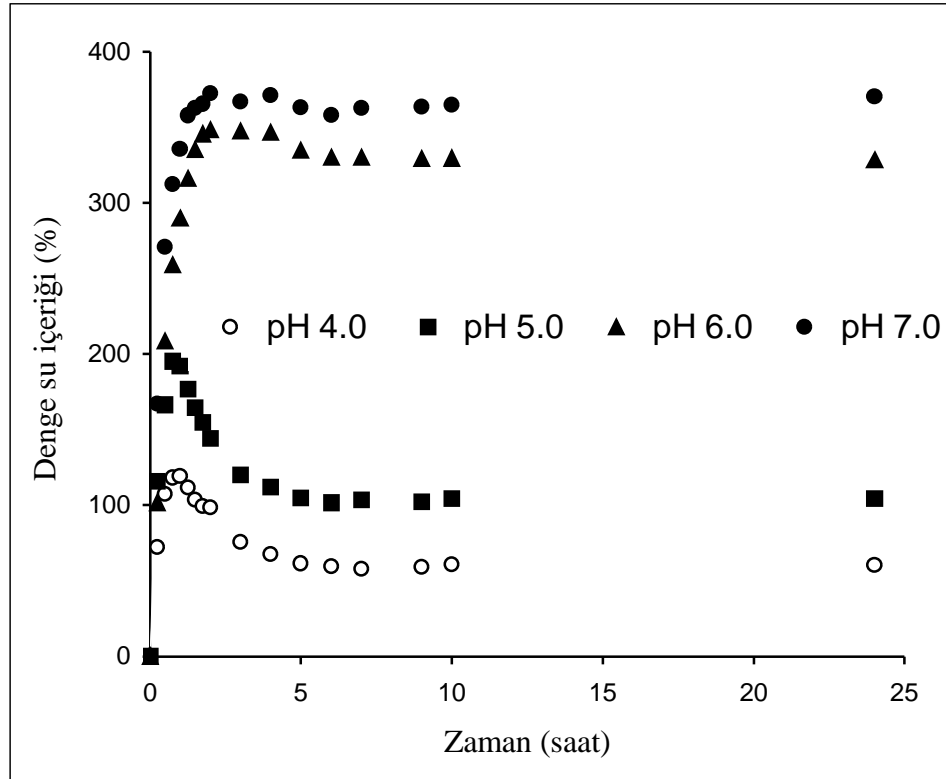
Karışımdan hedeflenen biyolojik molekülün yüzeye bağlanan madde miktarı taşıyıcı materyalin kimyasal bileşimi ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle afinite kromatografi alanında kullanılacak materyallerin seçiminde destek materyalinin gözenekliliği ve/veya toplam yüzey alanı yanında yapıdaki hidrofilik ve hidrofobik grupların yani polar grupların varlığı da önemlidir. Destek materyalinin yapısına hidrofilik ya da hidrofobik karakterde ikinci bir polimerin katılması ile IPN olarak isimlendirilen materyallerin hazırlanması, kromatografik alanda kullanılacak matriksin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin daha olumlu hale getirilmesi açısından oldukça önem taşır.



Şekil 3.1. IPN membranının yüzey SEM görüntüleri

3.1.2. p(HEMA/Kitosan) Membranlarının Denge Su İçeriği

p(HEMA-kitosan) IPN membranlarının denge su içeriği ve değişen ortam pH'sına göre şişme davranışı incelendi. Membranların denge su içeriğine 5 saatte ulaştığı belirlendi. pHEMA ağ yapısının içerisine kitosan eklenmesi ile daha fazla hidrofilik fonksiyonel grupların (-NH₂ ve -OH) membran yapıda bulunması sağlandı ve bu doğrultuda denge su içeriğinde artış gözlemlendi. Hidrojellerin gözenek boyutu, ortamın pH'sına göre değiştiğinden, IPN membranın denge su içeriğinin pH değerinin artması ile arttığı belirlendi (Şekil 3.2). Düşük pH ortamlarında gözenek boyutu veya çapı küçülmekte ve hidrojelin üç boyutlu ağı yapısına alabildiği su molekülü miktarı azalmaktadır. Afinite membranların pH'a karşı duyarlılığının, kopolimerin yapısında bulunan iyonize olabilen gruplara bağlı olduğu düşünülmektedir.

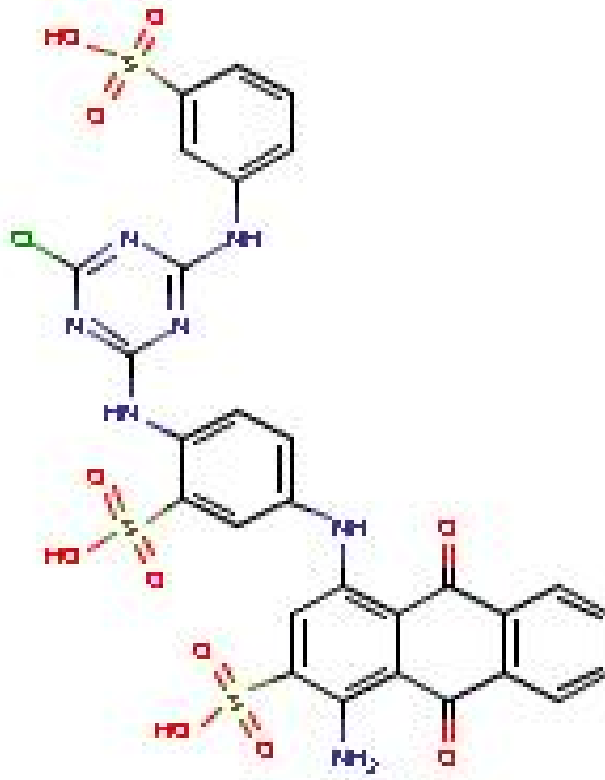


Şekil 3.2. IPN membranın farklı ortam pH'larındaki denge su içeriği

3.1.3. Elemental Analiz

Şekil 3.3.'de kimyasal yapısı verilen Cibacron Blue F3GA boya ligandı, alkali ortamda, IPN membrandaki HEMA'nın hidroksil grupları ve kitosanın hidroksil ve/veya amin grupları ile boya ligandın triazin halkasındaki klor grubu arasındaki nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu ile IPN membranı üzerine immobilize edilerek afinite membran hazırlandı. Cibacron Blue F3GA boya ligandı bağı p(HEMA-kitosan) membranlarının elemental analizi yapıldı. Azot ve kükürt oranları dikkate alınarak yapılan elemental analiz sonuç değerlendirilmesinde 1.0 ml membrana 197.6 µmol boya bağlandığı bulundu. Bu çalışmada kullanılan, boya-ligand bağı membranlarından adsorpsiyon ortamlarına boyanın sızıntısı gözlenmedi.

Reaktif boyalar çözelti içerisinde çeşitli proteinler için inhibitör, koenzim veya proteinin aktivitesini arttıran özelliklere sahip olabilir ve genellikle etkileştikleri proteinlere substatlarından daha fazla ilgi gösterebilirler. Örnek olarak tek bir reaktif boyanın polimerik destek materyali üzerine bağlanması bir afinite sistemi oluşturur ve çok sayıda proteinin saflaştırılmasında kullanılabilir. Cibacron Blue F3GA boya ligandın aromatik yapısında bir tane primer amin, üç tane sekonder amin, üç tane sülfonil grubuna sahip bir tekstil boyasıdır (Şekil 3.3).

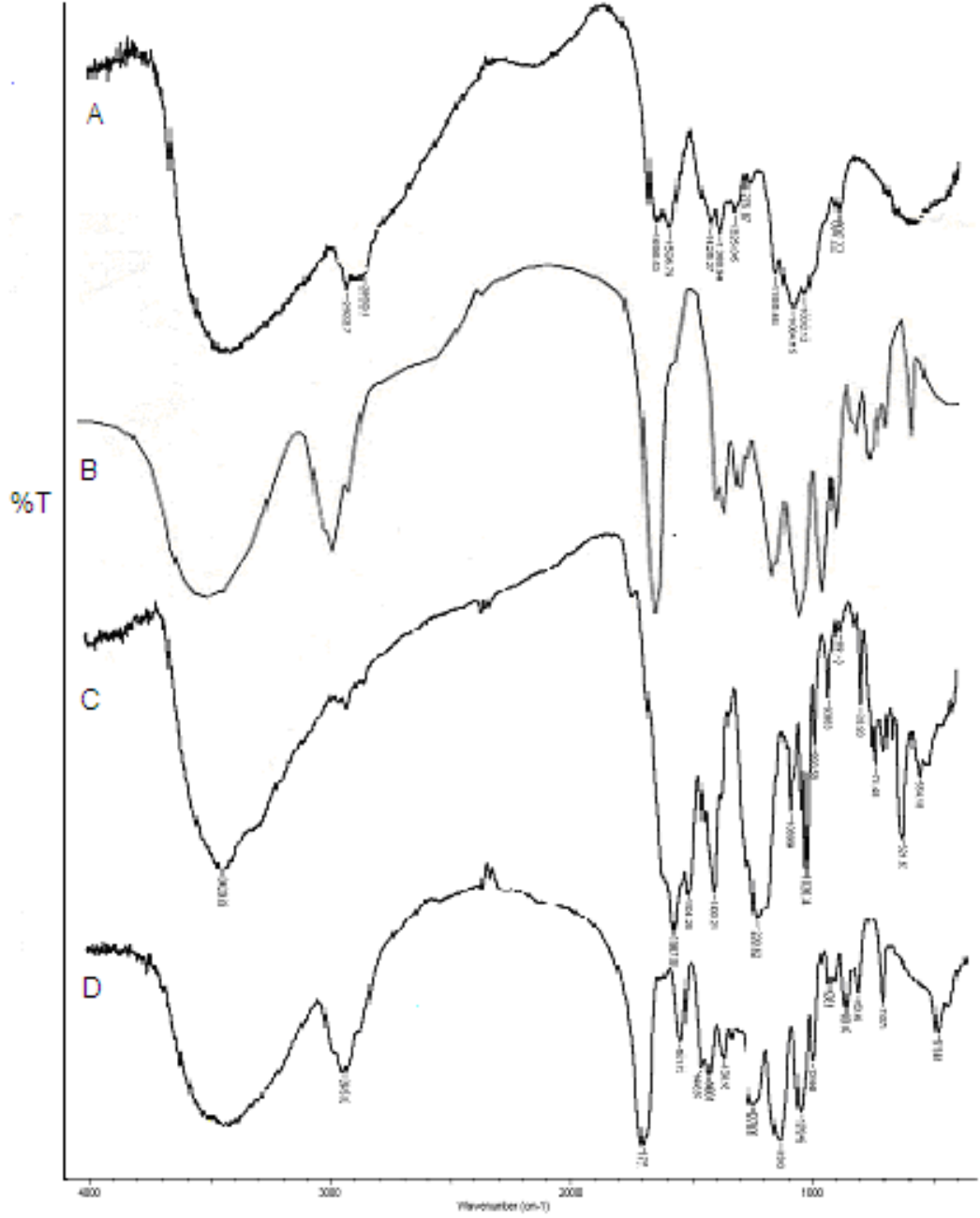


Şekil 3.3. Cibaron Blue F3GA boya ligandının kimyasal yapısı

3.1.4. FTIR Spektrasi

Kitosan, pHEMA, Cibaron Blue F3GA boya ligandı ve boya ligand bağı p(HEMA-kitosan) IPN membranlarının FTIR spektrumları Şekil 3.4'de sunulmuştur. Boya ligandları bağı pHEMA membranlarının FT-IR spektrasi, 1575 cm^{-1} 'de, pHEMA'dan farklı adsorpsiyon bandına sahiptir. Bu, pHEMA üzerine tutuklu boya moleküllerinden kaynaklanan, aromatik halkaların karakteristik (C....C) gerilmesi titreşim bandıdır. 3300, 1580, 1090, 1160 ve 1260 cm^{-1} 'deki bandlar, pHEMA'ya bağı Cibaron Blue F3GA boyasından gelen, sırasıyla, N-H gerilmesi, N-H bağı (makaslama), simetrik S=O gerilimi, asimetrik S=O gerilimi ve aromatik C-N titreşiminden dolayıdır. Bu bandlar, bununla birlikte, pHEMA, aynı bölgede bazı absorpsiyon bantlarına sahip olduğundan dolayı, görünmezler. Aromatik

halkanın bu karakteristik absorpsiyon bandının gözlenmesi boyanın membran yüzeyine kovalent olarak bağlandığını gösterir.



Şekil 3.4. FTIR spektrumları A) Kitosan, B) pHEMA, C) Cibacron Blue F3GA, D) Cibacron Blue F3GA bağlı p(HEMA-kitosan) membranı

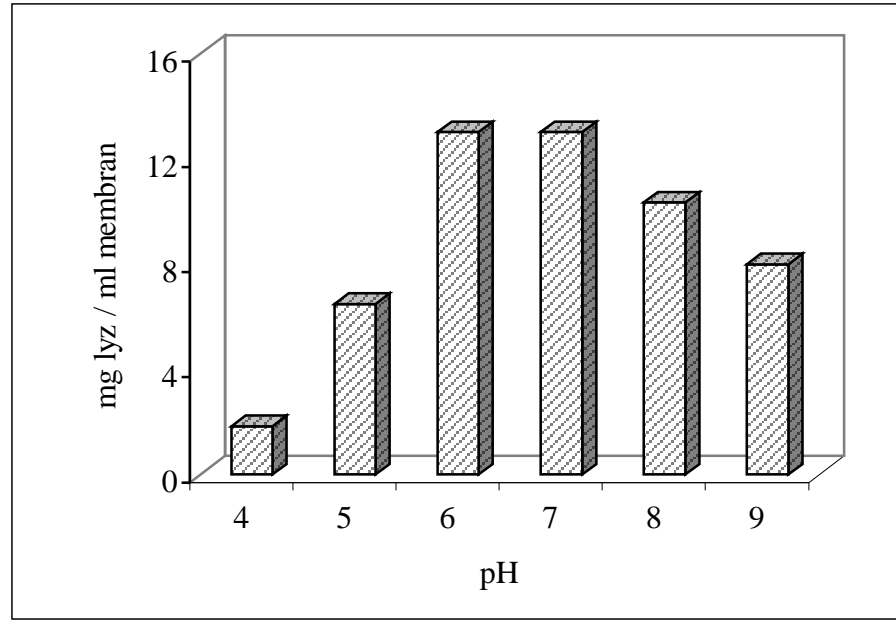
3.2.Afinite Membrana Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyonu

3.2.1. pH Etkisi

Boya ligand bağı p(HEMA-kitosan) afinite membranları ile sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonu ve yumurta akından lizozim ayırıştırma ve saflaştırma çalışmaları gerçekleştirildi. Boya-ligand ile protein molekülleri arasındaki etkileşimler üzerinde etkisi olan önemli faktörler arasında protein yüzeyindeki elektron verici grupların türü ve sayısı, ortamın pH'sı, polimerik sorbentteki ligand yüzey yoğunluğu, ortamdaki tuzlar ve sıcaklık sayılabilir^(49,50).

Proteinlerin üç boyutlu yapılarının yüzeyinde açığa çıkan amino asitlerin türü, yükü ve yük dağılımı, ligand bağı matriks ile protein arasındaki iyon değişimi etkileşimlerinde önemli bir faktördür. Sulu ortamda, protein moleküllerinin polar ya da iyonize amino asit kalıntıları yüzeyde olma eğilimindedir. Bununla birlikte, amino asit kalıntıları proteinin birincil yapısından dolayı birbirinden bağımsız olarak dağılamaz çünkü dağılım, bir proteinden diğerine farklılık gösterir⁽⁵¹⁾.

Boya ligand bağı IPN membranlarının adsorpsiyon kapasitesine pH'ın etkisi, 4.0-8.0 aralığında araştırıldı ve maksimum lizozim adsorpsiyonuna pH 6.0 ile 7.0'da ulaşıldı (Şekil 3.5). Membranların adsorpladığı lizozim miktarı 13.02 mg/ml olarak bulundu ve sonuçlar Şekil 3.5'de verildi.



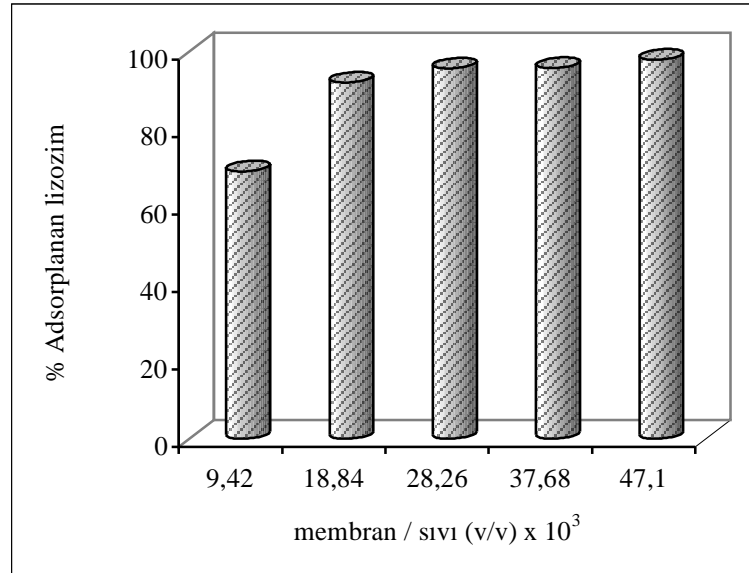
Şekil 3.5. Boya-ligand bağlı IPN membranlara sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonunda pH'ın etkisi

Asidik ve alkali pH değerlerinde boya bağlı membranlara lizozim adsorpsiyonunun belirgin bir şekilde daha az olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar ortam pH'sının lizozim adsorpsiyon dengesi için önemli olduğunu ve pH 6.0 ve 7.0 civarında lizozim ve boya ligandı arasında tercihli bir ilişki olduğunu gösterdi. İzoelektronik noktası (pI) 11.0 olan lizozim pH 11.0'ın altında katyonik özellik taşımaktadır ⁽⁵⁰⁾. Proteinler amfoterik moleküllerdir ve bu nedenle proteinlerin yük dağılım özellikleri ortamın pH'sı ile değişmektedir. Tutuklanan boya yüzeyinde taşıdığı asidik özellikteki sülfon ve hidroksil grubundan dolayı nötr veya bazik ortamlarda negatif yük taşımaktadır. Bunun yanında kompozit matriksin bir üyesi olan kitosan, pH 5.8 ve 7.0 aralığında pozitif yük taşımaktadır. pH 4.0 değerinde lizozim adsorpsiyonunun gözlenmemesinin nedeninin asidik sülfon gruplarının protone ve $-NH_3^+$ gruplarının deprotone olmasından dolayı olduğu düşünüldü. Yukarıdaki değerlendirmeler sonucunda pH 6.0 ve 7.0 civarında lizozim molekülü

ile boya molekülü arasındaki ilginin iyon değiştirici etkileşim sonucu meydana geldiği dūřünüldü. Bunun yanında lizozim ile boya arasında ikincil ilişkilerde önemlidir ve bunlar farklı mekanizmalar sonucu ortaya çıkabilir, boya ve amino asit moleküllerinin yapısında bulunan aromatik gruplar arasında hidrofobik ilişkiler buna örnek olarak verilebilir.

3.2.2. Afinite Sorbent Dozunun Etkisi

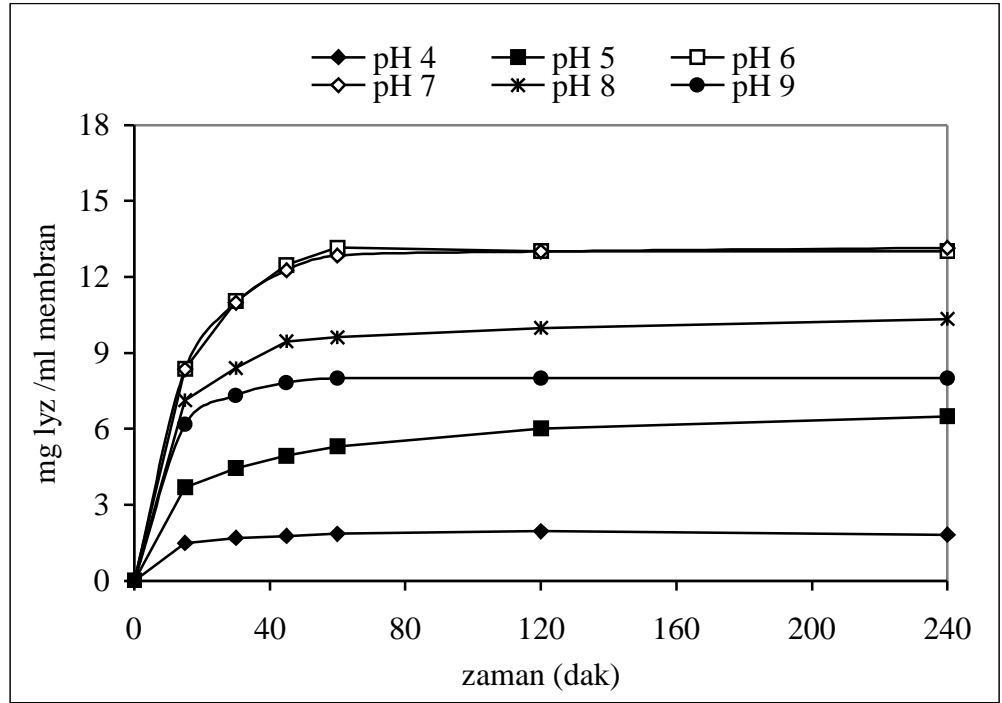
0.5 mg/ml lizozim başlangıç konsantrasyonunda, 5.0 ml toplam deney hacminde farklı afinite membran bileşiminde katı/sıvı (v/v) oranının adsorpsiyon kapasitesine etkisi araştırıldı ve sulu ortamdan uzaklaştırılan lizozim yüzdesi Şekil 3.6'da verildi. Adsorbent olarak kullanılan boya-ligand bağlı IPN membran miktarının artması ile lizozim uzaklaştırma etkinliğinin önemli Şekilde arttığı belirlendi.



Şekil 3.6. Boya-ligand bağlı IPN membranlar ile sulu ortamdan lizozim uzaklaştırılmasında sorbent dozunun etkisi

3.2.3 Adsorpsiyon Hızı ve Adsorpsiyon Kinetiği

Boya ligand bağı IPN membranlarla sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu işleminde bir arayüzey olayı olan adsorpsiyonun dengeye ulaşması süresi farklı ortam pH'larında araştırıldı ve sonuçlar Şekil 3.7'de gösterildi. Adsorpsiyon süresinin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı gözlemlendi ve adsorpsiyon dengesine 90 dakikada ulaşılırken adsorpsiyon ortamındaki lizozim konsantrasyonunun artırılması ile adsorpsiyon hızının da arttığı belirlendi. Bu davranışın sıvı ve katı fazdaki konsantrasyon farklılığından kaynaklandığı düşünüldü. Sıvı fazdaki lizozim konsantrasyonundaki artış lizozim moleküllerinin katı faza yönelmesi doğrultusunda itici bir kuvvet oluşturduğu düşünüldü.



Şekil 3.7. Boya ligand bağı IPN membranlara lizozim adsorpsiyonunda adsorpsiyon süresinin etkisi

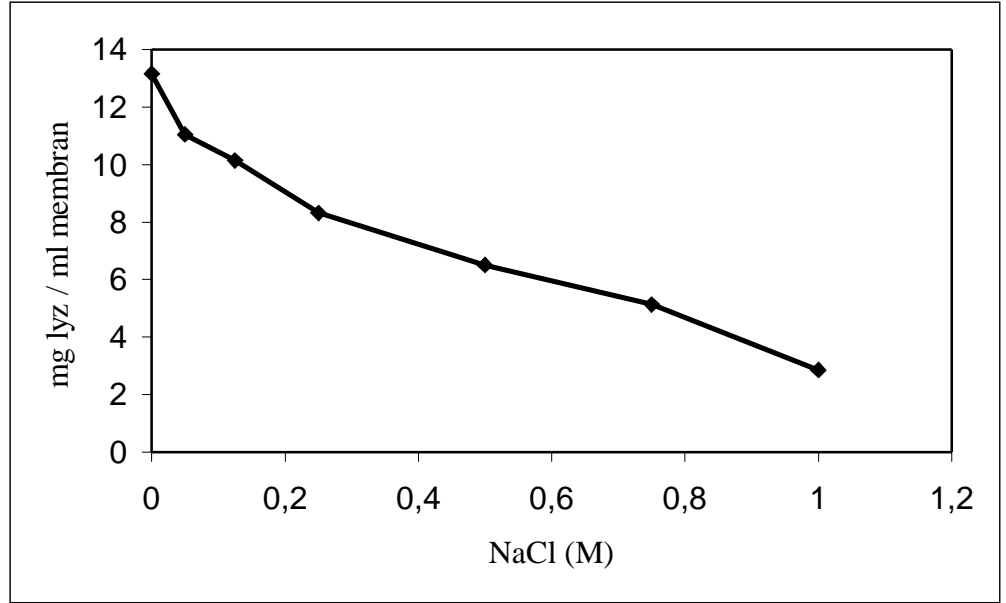
Afinite membranın sentezinde ve/veya modifikasyonunda yüzeyde çeşitli gruplar (amin, karboksil, karbonil, hidroksil ve hidrofobik gruplar) oluşmaktadır. Bu gruplar ligand molekülleri ve lizozim ile önemli derecede etkileşim bölgeleri oluşturmaktadır. Boya ligand bağlı IPN membranı ile lizozim ayrıştırılması işleminde adsorpsiyon kinetiği, deneysel verilerin birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanması ile belirlendi. Deney sonuçları, birinci dereceden kinetik modeline uygulandı ve birinci dereceden modeldeki düşük korelasyon katsayısı ve adsorpsiyon kapasitesini ifade eden teorik q değerlerinin düşük oluşu adsorpsiyon işleminin bu model ile açıklanamayacağını gösterdi. Değişen ortam pH'larında adsorpsiyonun zamana bağlılığının incelenmesinden elde edilen deneysel verilerin ikinci dereceden kinetik modeli ile ifade edilebileceği ilgili kinetik eşitlik kullanılarak hesaplandı ve kinetik parametreler Çizelge 3.1'de gösterildi. Yüksek korelasyon katsayıları ve maksimum adsorpsiyon kapasitelerindeki uyumlu sonuçlar, afinite membranın lizozim adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetik modeli ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge. 3.1. Farklı ortam pH'sında boya ligand bağlı IPN membran ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu işleminde belirlenen ikinci derece kinetik sabitleri

pH	q_{eqex} (mg/ml)	$k_2 \times 10^1$ (ml/mg/min)	q_{eq} (mg/ml)	R^2
4.0	1.83	2.21	1.96	0.979
5.0	6.49	0.84	6.46	0.996
6.0	13.02	0.95	14.02	0.989
7.0	13.15	1.40	13.69	0.982
8.0	10.34	1.30	10.65	0.994
9.0	8.01	1.88	8.49	0.991

3.2.4 İyonik Şiddetin Etkisi

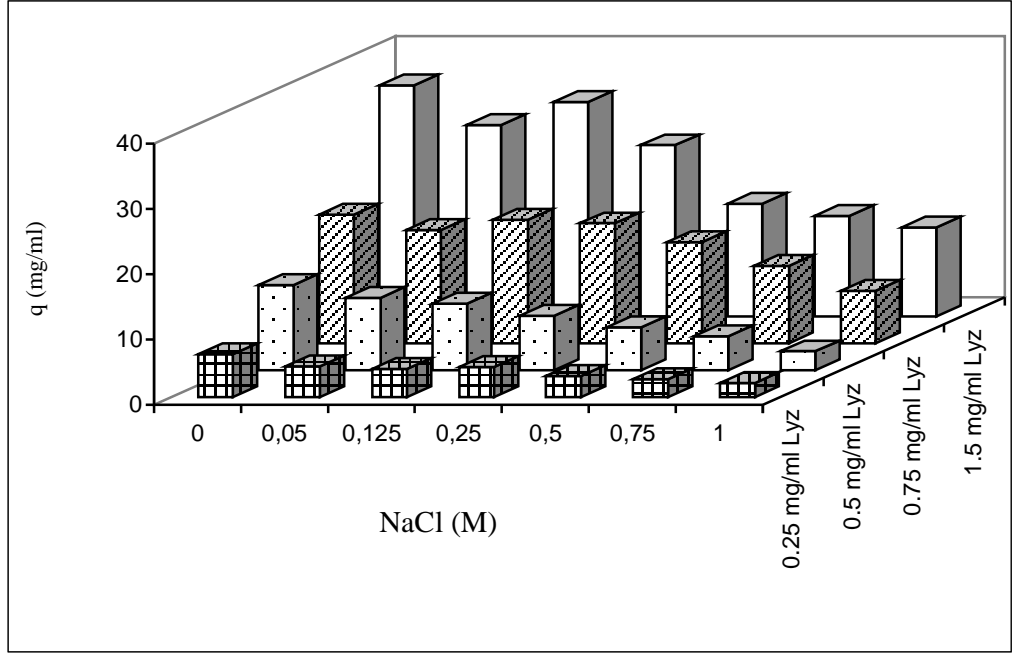
İyonik şiddetin etkisi fosfat tamponunun NaCl içeriği 0.0-1.0 M arasında değiştirilerek incelendi. İyonik şiddetin artmasıyla, adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.8.). Debye-Hückel'e göre, adsorpsiyon ortamındaki elektrolitin konsantrasyonu arttırıldığında, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift tabaka kalınlığı azalır. Van Oss ise, adsorpsiyon ortamında elektrolit konsantrasyonu arttıkça, protein yüzey yükünün perdelendiğini belirtmiştir. Bu etkiler, moleküller arasındaki elektrostatik etkileşimin azalmasına sebep olur ⁽⁵²⁾. Sonuç olarak, moleküller arasındaki toplam elektrostatik enerji azalır ve sistem agraşe olmaya başlar ve bu nedenle adsorpsiyon kapasitesinde önemli oranda azalma görülmüştür.



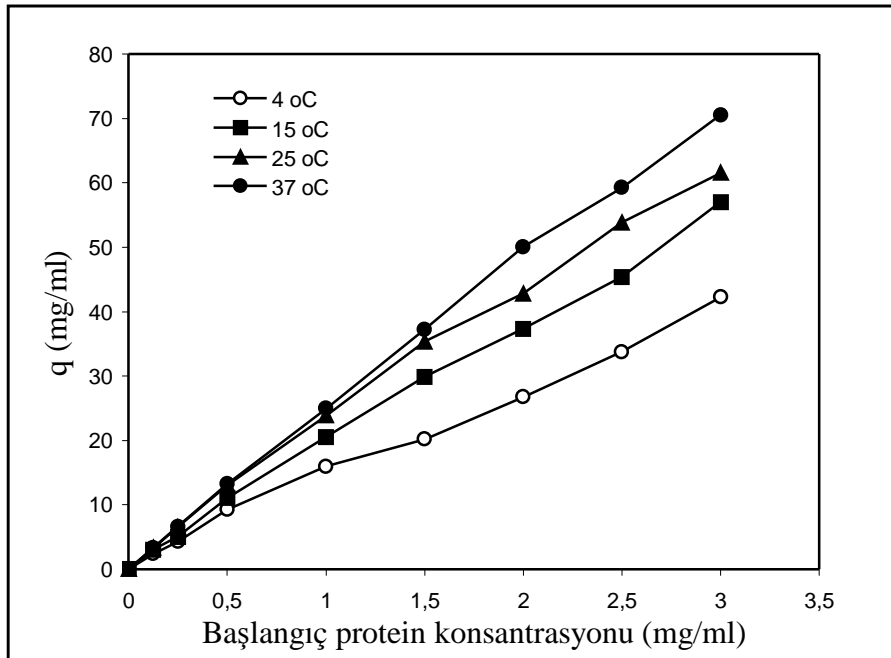
Şekil 3.8. Boya-ligand bağı IPN membranlara lizozim adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi

3.2.5. Başlangıç Lizozim Konsantrasyonunun Etkisi

Boya ligand bağı IPN membranların adsorpsiyon hız ve kapasitesine başlangıç lizozim konsantrasyonunun etkisi 0.125-3.0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi. Adsorpsiyon kapasitesinin, artan lizozim konsantrasyonu ile arttığı gözlemlendi (Şekil 3.9.). Bu sonuçlar muhtemelen, lizozim ve kompozit membranın kitosanı arasındaki, ilave etkileşimlerden (ör, asit-baz ve elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları) dolayı olabilir. Bu sonuç, iki olası mekanizma ile açıklanabilir: (a) kitosanın protonlanmış amin grupları ($-NH_3^+$) ve lizozim arasında ilave elektrostatik etkileşimler kurulabilir. Çünkü kitosan polikationik doğal bir polimerdir ve polikationik bir uzatıcı kol olarak davranır. Lizozim molekülü, kitosana etkileşime girdiğinde, lizozimin üçüncül konfigürasyonu değişebilir ve lizozimin bu yeni konformasyonel konfigürasyonu, diğer protein tabakalarının adsorpsiyonu için enerjetik olarak uygun başka bir tabaka oluşturabilir. Genelde, sulu ortamdaki benzer moleküller birbirlerini iterler, bundan sonra, çok tabakalı adsorpsiyon işlemi, protein moleküllerinin orijinal konformasyonel yapısını değiştirebilir, (b) kitosan lizozimin bir substrat analogudur, ve bu fenomen, kitosanın lizozime karşı seçiciliğini ve bağlanma afinitesinin artmasına sebep olur. Bütün bu fenomenler, boya ligand bağı IPN membranın, lizozim ve artan lizozim konsantrasyonu için adsorpsiyon kapasitesinde bir artışla sonuçlanabilir. 3.0 mg/ml başlangıç lizozim konsantrasyonuna 25 °C sıcaklığa sahip adsorpsiyon ortamında boya ligand bağı IPN membranın maksimum adsorpsiyon kapasitesi 61.53 mg/ml olarak belirlendi. Değişen başlangıç lizozim konsantrasyonunda deneysel olarak belirlenen adsorpsiyon izotermi farklı ortam iyonik şiddet, sıcaklık ve pH değerlerinde araştırıldı ve belirlenen sonuçlar sırası ile Şekil 3.9.-3.11.'da verildi.

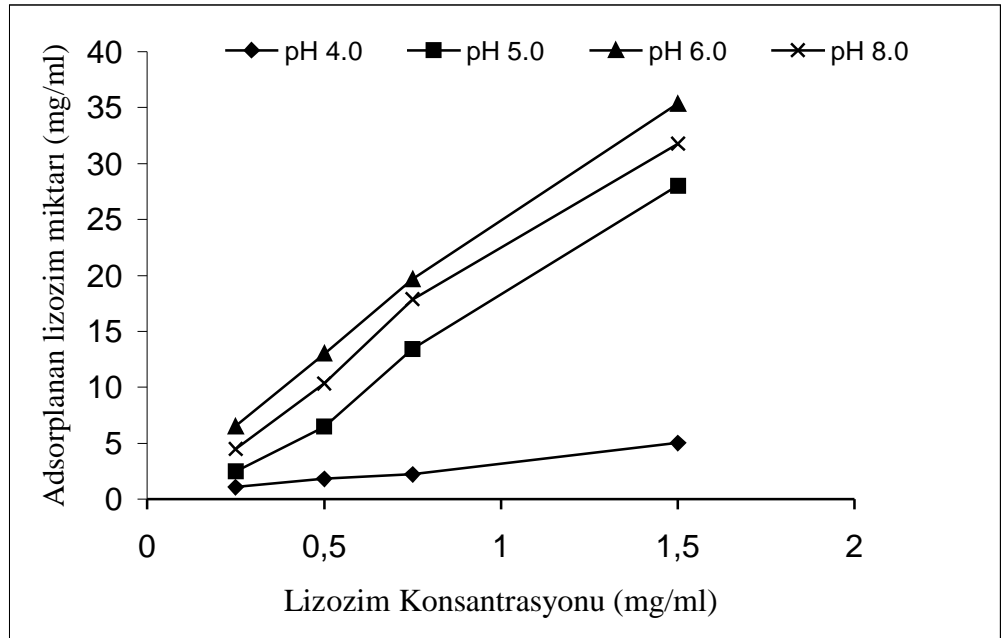


Şekil 3.9. İyonik şiddet ile başlangıç lizozim konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine tekisi



Şekil 3.10. Sıcaklık ile başlangıç lizozim konsantrasyonunun Adsorpsiyon kapasitesine tekisi

Adsorpsiyon ortamının sıcaklığı ligand ve proteinlerin etkileşiminde önemli bir rol alabilir. Sıcaklıkla, protein ve ligandın fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim alanı arttı ve dolayısıyla adsorpsiyon kapasitesinin de arttığı gözlemlendi (Şekil 3.10). Sıcaklığın 5 °C'den 35 °C'ye çıkarılması ile birlikte boya bağlı membranların adsorpsiyon kapasitesindeki bu artışın lizozim molekülünün üç boyutlu yapısı ile ilgili olduğu düşünüldü. Yüksek sıcaklıklarda proteinin üç boyutlu yapısında değişiklikler meydana gelmesiyle proteinlerin içe dönük yapısında bulunan amino asitlerin yan hidrofobik grupları dış yüzeye doğru çıkar. Böylece protein ile matriksin yapısında bulunan hidrofobik gruplar arasındaki temas alanı artar ve sorbent ile proteinlerin bağlanma bölgelerinde sıcaklığın artmasıyla artış sağlanır.



Şekil 3.11. pH ile başlangıç lizozim konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi

3.2.6. Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün matris ile etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Bununla birlikte çözeltideki protein derişimi ile matrise adsorplanmış protein arasındaki ilişkiyi de açıklar, sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonu çalışmalarında bu proteinin matris ile olan ilişkilerini açıklamak amacıyla kesikli sistem deneyleri yapıldı.

Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli, deneysel verilerin teorik olarak türetilen matematik modellemelere uygunluğu için sıklıkla kullanılan modellerdir. Langmuir modeli, eşit erişilebilir adsorpsiyon yerleri, tek tabakalı yüzey kaplaması ve adsorplanan türler arasında etkileşimin olmadığı gibi homojenite varsayımına dayanır. Langmuir modeli, homojen adsorpsiyonlar için formüle edildiğinden, Freundlich izoterm modelleri, genellikle heterojen adsorpsiyon için uygulanır. Boya ligand bağlı IPN membranlar için elde edilen deneysel verilerle semi resiprokal eğriler ve Scatchard eğrileri çizildiğinde korelasyon katsayısı çok yüksek olmayan bir eğri elde edildi. Özellikle düşük sıcaklıklarda doğrusal olmayan eğri ve teorik olarak belirlenen adsorpsiyon kapasitelerin deneysel olarak belirlenenden düşük olması adsorpsiyon heterojenitesine işaret etmektedir ^(53,54). Bundan dolayı, afinite membranları üzerine lizozimin adsorpsiyonu, Langmuir modeliyle açıklanamaz. Freundlich modelinin K_F ve n değerlerinin büyüklüğü, boya ligandı tutuklu IPN membranının yüksek bir adsorpsiyon kapasitesi ile sulu ortamdan lizozim alımının kolay olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Boya-ligand bağı IPN membrana lizozim adsorpsiyonunda farklı sıcaklıklarda belirlenen Langmuir and Freundlich izoterm modeli sabitleri

Ortam sıcaklığı	Langmuir sabitleri				Freundlich sabitleri		
	q_{ex} (mg/ml)	q_{max} (mg/ml)	$K_d \times 10^7$ (M)	R^2	N	K_F	R^2
4 °C	42.26	64.79	0.77	0.882	1.35	29.43	0.994
15 °C	57.04	88.09	0.45	0.842	1.44	55.77	0.988
25 °C	61.53	62.44	5.47	0.969	2.48	73.23	0.989
37 °C	70.57	70.99	2.67	0.951	2.67	97.42	0.979

3.2.7. IPN membranların Temas Açıları ve Yüzey Serbest Enerjisi Parametreleri

Ligand molekülü (sentetik veya doğal) kromatografik destek materyallerinin yüzey modifikasyonunda kullanılmak üzere destek materyaline immobilize edilebilir. Yapılan çalışmalarda yüzey özelliklerindeki değişimin, yüzey ile çevresinin etkileşimini etkilediği bulunmuştur. Destek materyali üzerine adsorbe edilmiş hedef makromoleküllerin miktarını, birincil olarak, immobilize ligandın türü belirler^(55,56). Destek materyalinin hidrofobisitesi, yüzeye bağlanan ligandın polaritesine bağlı olarak değiştirilebilir. Bu nedenle adsorplayıcı membranın yüzey özellikleri proteinler ile etkileşimini açıklamak için karakterize edilmelidir. Kompozit membranların hidrofobik ve polar karakterleri yüzey gerilimi bilinen farklı test sıvılarının kullanıldığı kontak açı ölçümleri ile belirlenir⁽⁵⁷⁾. Bu doğrultuda, sorbentlerin çevreleri ile etkileşimi hakkındaki önemli sonuçlar yüzey enerjileri ve

ıslanabilirlik özellikleri araştırılarak belirlenebildiğinden, çalışmamızda, afinite membranının yüzey polaritesinin belirlenmesi için düz yüzey ve/veya plazma proteinleri ile etkileşimden sonra temas açısı ölçümleri gerçekleştirildi. Islatma gücünün değişimi, yüzey tabakası kalınlığındaki (en az 10Å) ve sıvı fazla doğrudan temasındaki, fonksiyonel grupların etkisini yansıttığından yüzey karakteristiklerine, oldukça fazla hassastır ^(58,59). Su, gliserol ve diiyodometan (DIM) için, p(HEMA-kitosan), p(HEMA-kitosan)-boya-ligand afinite membranı ve onların lizozim ve albumin kaplı eşlenik IPN membranlarının temas açısı değerleri, Çizelge 3.3'te sunuldu. Young eşitliğine göre, daha küçük yüzey gerilimli deneme sıvıları ile ölçülen temas açısı, daha küçük olmalıdır. p(HEMA-kitosan) ve yumurta akı proteinleri olan, lizozim ve albumin kaplı eşleniği membran örnekleri, fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak, çok farklı yüzey karakteristikleri vermektedir. Polar bir sıvı ile ölçülen temas açısının, ıslatılmayan hidrofobik yüzeyler için, daha yüksek olması beklenir ve bunun tersi de geçerlidir. Protein moleküllerinin adsorpsiyonu ile yüzeyin kaplanmasıyla, temas açısının değişimi, kontrol amacı ile kullanılan IPN ve boya-ligand bağlı IPN membranına göre, yüzeyin hidrofilitésinin azaldığını gösterir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Boya-ligand bağlı IPN membranı ve protein kaplı afinite

membranlarının deneme sıvılarıyla temas açıları (γ_{erg} : Test sıvılarının yüzey gerilimi)

Afinite membran	Su ($\gamma_{erg}=71.3$)	Gliserol ($\gamma_{erg}=64.0$)	DIM ($\gamma_{erg}=50.8$)
p(HEMA-kitosan)	46.9	56.4	41.3
p(HEMA-kitosan)-boya-ligand	53.2	60.9	38.1
p(HEMA-kitosan)-lizozim	51.2	62.3	41.9
p(HEMA-kitosan)-albumin	74.1	64.8	39.1

Membran örneklerinin, Zisman'a göre, kritik yüzey enerjisi değerleri belirlendi ve Çizelge 3.4'de verildi. Zisman yöntemiyle elde edilen kritik yüzey enerjisi değerleri, Wu ve Fowkes yöntemleriyle elde edilen serbest yüzey enerjisinden daha az olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.4). Sadece bir empirik bir parametre olan kritik yüzey enerjisi, serbest yüzey enerjisi değildir, fakat bu değerle yakından ilgilidir.

Çizelge 3.4. Wu (harmonik ifade), Fowkes (Geometrik ifade) ve Zisman kritik yüzey gerilimine göre membranlarının yüzey serbest enerjileri

Membran	Yaklaşım	γ (mN/m ²)	γ^p (mN/m ²)	γ^d (mN/m ²)	X ^p
P(HEMA-kitosan)	Wu	53.85	18.95	34.90	0.352
	Fowkes	51.05	17.51	33.54	0.343
	Zisman γ_c (mN/m ²)			-8.93	
p(HEMA- kitosan)-boya- ligand	Wu	53.82	17.07	36.75	0.317
	Fowkes	50.08	14.34	35.74	0.286
	Zisman γ_c (mN/m ²)			25.99	
p(HEMA- kitosan)-lizozim	Wu	51.55	17.61	33.93	0.342
	Fowkes	48.32	16.01	32.30	0.331
	Zisman γ_c (mN/m ²)			5.79	
p(HEMA- kitosan)-albumin	Wu	46.41	8.38	38.04	46.41
	Fowkes	42.45	4.82	37.63	0.113
	Zisman γ_c (mN/m ²)			41.18	

3.2.8. Yumurta Beyazından Lizozimin Saflaştırılması

Tavuk yumurtası beyazındaki lizozim içeriği, yaklaşık %3.4'tür. Klasik lizozim saflaştırma yöntemleri, presipitasyon, santrifugasyon ve adsorpsiyon gibi, çeşitli adımlar gerektirmektedir. Çalışma kapsamında boya-ligand bağlı IPN membranları ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu çalışmalarında belirlenen optimize koşullar, yumurta akından lizozim saflaştırılması işleminde kesikli sisteme uygulayarak çalışıldı. Bu doğrultuda, 1:5 oranında tampon sistemi ile seyreltilen yumurta akı çözeltisindeki proteinlerin ve toplam protein miktarının analizi YBSK kullanılarak yapıldı. Boya-ligand bağlı IPN membranların bir diğer yumurta akı proteini olan albumine karşı adsorpsiyon eğilimi araştırıldığında ihmal edilebilir düzeyde olduğu ve lizozime karşı spesifik olduğu belirlendi. Boya ligand tutuklu afinite membranlarından elüe edilen lizozimin saflığı, YBSK ile belirlendi. Boya-ligand bağlı IPN membranlardan elüe edilen lizozimin saflık derecesi %94.76 ve geri kazanımları %81 olarak belirlendi. Boya-ligand bağlı IPN membranı lizozim için yüksek bağlanma kapasitesi ve yüksek seçicilik gösteren, seyreltik yumurta beyazından lizozim saflaştırılması için etkili bir tek adım yöntemi sağlamıştır. Boya ligand bağlı p(HEMA-kitosan) membranı ile saflaştırılan lizozimin spesifik aktivitesi 40300 U mg⁻¹ olarak belirlendi.

3.2.9 Lizozim Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik

Lizozim yüklü afinite membranları, 1.0 M NaCl içeren, pH 8.0'deki elüsyon ortamına yerleştirildi. NaCl adsorbentler için sıklıkla kullanılan iyi bir desorpsiyon ajanıdır ve tekrar kullanıma izin verir. Elüsyon ajanı olarak 1.0 M NaCl kullanıldığı zaman, afinite membranlarında, adsorbe edilen lizozimin % 89'undan fazlası elüe edildi. Elüsyon sonuçları, NaCl'nin, afinite membranlarından, lizozim için uygun bir

desorpsiyon ajanı olduğunu gösterir. Afinite membranın yeniden kullanılabilirliğini göstermek için, lizozimin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, aynı afinite membranları kullanılarak on kez tekrarlandı ve boya-ligand bağlı IPN membranların adsorpsiyon kapasitesinin, tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri süresince değişmediği belirlendi. Afinite membranların rejenerasyonları sırasıyla, 0.1 M NaOH ve 1.0 M NaCl ile 4 ve 2 saat yıkanarak gerçekleştirildi.

4. SONUÇ

p(HEMA-kitosan) afinite destek materyalleri, UV fotopolimerizasyon yöntemi ile, membran formunda hazırlandı. Başlatıcı olarak AIBN kullanıldı, 2-HEMA monomeri ile kitosan çözeltisi karıştırıldı. Azot atmosferi altında, oda sıcaklığında, UV ışığında polarizasyona tabi tutuldu. Sentezlenen membran yapıdaki hidrojeller NaOH (%1.0'lık) ile nötralize edildi.

Hazırlanan p(HEMA/kitosan) IPN hidrojeli, mekanik dayanıklılığı yüksek, kimyasal ve mikrobiyal degradasyona karşı dayanıklı ve hidrofilik bir yapıdadır. Taramalı elektron mikroskobu çalışmalarıyla, gözenekli bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, geniş bir yüzey alanına sahiptir ve yüksek oranda ligand bağlamak mümkündür. Ligand olarak triazin grububir tekstil boyası olan Cibacron Blue F3GA kullanılmıştır. Elemental analiz sonuçlarından, 1.0 ml membrana 197.6 µmol boya bağlandığı bulunmuştur.

Bu boya ligand afinite membranıyla, sulu ortamdan ve yumurta beyazından lizozim enziminin adsorpsiyonu çalışılmıştır. Boya ligand bağlı IPN membranlarının lizozim adsorpsiyon kapasitesi, pH 7.0'de, 13.15 mg/ml olarak bulundu.

Adsorpsiyon hızı ve kinetikleri araştırıldı. Adsorpsiyon süresinin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı gözlemlendi ve adsorpsiyon dengesine 90 dakikada ulaşılırken, adsorpsiyon ortamındaki lizozim konsantrasyonunun arttırılması ile adsorpsiyon hızının da arttığı belirlendi. Adsorpsiyon kinetiği, deneysel verilerin birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanması ile belirlendi. Yüksek korelasyon katsayıları ve maksimum adsorpsiyon kapasitelerindeki

uyumlu sonuçlar, afinite membranın lizozim adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetik modeli ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Literatürde yer alan boya ligand afinite kromatografisi çalışmalarından bazıları, şu şekildedir. Ratnayake ve Regnier ⁽⁶¹⁾, akrilat aşılınmış silika adsorbentlere, 12,2-21,6 $\mu\text{g cm}^{-2}$ lizozim adsorbe etmişlerdir. Finette ve arkadaşları ⁽⁶²⁾, Cibacron Blue F3GA tutuklanmış gözenekli silika üzerine, 30 $\mu\text{g cm}^{-2}$ lizozim adsorbe etmişlerdir. Buijs ve Hlady ⁽⁶³⁾, kuaterner aminopropil dimetilsilil metillendirilmiş silika üzerine 4-25 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır. Champluvier ve Kula ⁽⁶⁴⁾, Cibacron Blue F3GA, Procion Blue MX 5B ve Procion Red HE3B tutuklanmış ultipor membranlarla, 78-122 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik bir adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır. Arıca ve arkadaşları ⁽⁶⁵⁾, pHEMA üzerine, Procion Green H-4EBD bağlayarak, 13,33 mg ml^{-1} 'lık bir lizozim adsorpsiyonuna ulaşmışlardır. Li-Chan ve arkadaşları ⁽⁶⁶⁾, Duolite C-464 adsorbentini kullanarak, 8,3 g l^{-1} lizozim adsorpsiyon kapasitesine ve 1,5 g l^{-1} lizozim elüsyonunu sağlamışlardır. Ming ve arkadaşları ⁽⁶⁷⁾, ProductivTM CM kolonunu kullanmışlar ve 45 g l^{-1} adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir. Grasselli ve arkadaşları⁽⁶⁸⁾ Red HE-3B-bağlanmış hollow fiber kullanarak, 7,5 g l^{-1} adsorpsiyon kapasitesine ve 1 g l^{-1} lizozim elüsyonuna ulaşmışlardır.

Cibacron Blue F3GA, boya ligandı, aromatik yapısında bir tane primer amin, üç tane sekonder amin, üç tane sülfonil grubuna sahip bir tekstil boyasıdır. Lizozimin hidrofobik yan grupları ile boyanın aromatik grupları arasında, hidrofobik etkileşim gerçekleşir. Kitosanın protonlanmış amin grupları ($-\text{NH}_3^+$) ile lizozim arasında ilave elektrostatik etkileşimler kurulabilir. Lizozimin izoelektronik noktası (pI) 11.0'dir, bu değer altındaki pH değerlerinde, katyonik özellik taşımaktadır. Tutuklanan boya

yüzeyinde taşıdığı asidik özellikteki sülfon ve hidroksil grubundan dolayı nötr veya bazik ortamlarda negatif yük taşımaktadır ve bu nedenle, boyanın anyonik grupları ile elektrostatik etkileşim meydana gelir.

Adsorplanan lizozimin desorpsiyonu, pH 8.0'deki, 1.0 M NaCl çözeltisi ile gerçekleştirildi. NaCl adsorbentler için sıklıkla kullanılan iyi bir desorpsiyon ajanıdır ve tekrar kullanıma izin verir. Afinite membranlarından, adsorbe edilen lizozimin % 89'undan fazlası elüe edildi. Yeniden kullanılabilirliğini göstermek için, lizozimin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, aynı afinite membranları kullanılarak on kez tekrarlandı ve boya-ligand bağlı IPN membranların adsorpsiyon kapasitesinin, tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri süresince değişmediği belirlendi.

Doğrudan yumurta beyazından, lizozim adsorpsiyonu, kesikli sisteme uygulayarak çalışıldı. Bu doğrultuda, 1:5 oranında tampon sistemi ile seyreltilen yumurta akı çözeltisindeki proteinlerin ve toplam protein miktarının analizi YBSK kullanılarak yapıldı. Boya-ligand bağlı IPN membranlarının, albumine karşı adsorpsiyon eğilimi araştırıldığında ihmal edilebilir düzeydedir ve lizozime karşı spesifik olduğu belirlendi. Boya-ligand bağlı IPN membranlardan elüe edilen lizozimin saflık derecesi %94.76 ve geri kazanımları %81 olarak belirlendi.

Lizozim, en bol bulunduğu kaynak olan, yumurta beyazından, iyon değiştirme kolon kromatografisi kullanılarak tek basamaklı işlemlerle saflaştırılmıştır. Fakat geleneksel olarak kullanılan yöntemlerin çoğunun, pH 9,5'te, %5'lik NaCl çözeltisiyle kristallendirme gibi, yumurta beyazını yıkıcı, parçalayıcı bir ön muameleyi gerektirmesinden dolayı, uyguladığımız boya ligand afinite kromatografisi tekniği, lizozimin tek basamakta yüksek saflıkta, enzim aktivitesinin korunarak saflaştırılmasıyla, daha üstündür.

KAYNAKLAR

1. P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen, Proc. Natl. Acad. Sci., **61**, 636 (1968).
2. J. Carlsson, J.-C. Janson, M. Sparrman, Protein Purification VCH Publishers, Inc., New York, Weinheim, Cambridge, (1989).
3. H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, J. Biochemical Biophysical Methods, **49**, 199-240, (2001).
4. L. Miribel, E. Giannazza, P. Arnaud, Journal of Biochem Biophys Met, **16**, 1 (1988).
5. N.E. Labrou, Molecular Biotechnology, **20**, 77 (2002).
6. J. Kaminska, J. Dzieciol, J. Koscielak, Glycoconjugate Journal, **16**, 719 (1999).
7. C. R. Lowe, S. J. Burton, N. P. Burton, W. K. Alderton, J. M. Pitts, J. A. Thomas, Tibtech December, **10**, 442, (1992).
8. Turkova, J. Bioaffinity Chromatography, Amsterdam, (1993)
9. M.B. Deutscher. Academic Pres, **182**, (1990).
10. E. Castillo, J. Koenig, J. Anderson, Biomaterials **5**, 319, (1984).
11. A. Baszkin, W. Norde, Physical Chemistry of Biological Interfaces, Dekker, New York, 2000.
12. C. Brazel, N. Peppas, Polymer, **40**, 3383–3398, (1999).
13. D. Williams, Concise Encyclopedia of Medical and Dental Materials, Pergamon, Oxford, 1990.
14. A. Denizli, S. Şenel, M. Y. Arıca, Colloids Surf. B **11**, 113, (1998).

15. A. Tomlinson, Complications of Contact Lens Wear, Mosby–Year Book, St. Louis, (1992).
16. R. K. Scopes, Protein Purification Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, (1982).
17. X.Zeng, E.Ruckustein, Biotechnology Progress, **15**, 1003-1019,(1999)
18. F. Ming, J. A. Howell, Bioseparation, **2**, 289, (1992).
19. M. Leonard, Journal of Chromatography B, **699**, 3-27, (1997).
20. P.M. Boyer, J. T. Tsu, Adv. Biochem. Eng. Biotechn., **49**, 1, (1993).
21. M.Y. Arıca, H. Yavuz, S.Patır, A.Denizli, Journal of Molecular catalysis B : Enzymatic **11**, 127-138, (2000).
22. Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **49**, 335–360, (2001).
23. A.Denizli, E.Pişkin, J.Biochem. Biophys. Methods, **49**,391-416,(2001).
24. E. Klein, Affinity Membr., Newyork Wiley, (1991)
25. W. Guo, Z.Shang, Y.Yu, L. Zhou, Biomed. Chromotog., **8**, 142, (1994).
26. A. Serres, E. Legendre, J.Jozefonwicz, D.Muller, J.Chromatogr. B, **681**, 219, (1996).
27. Lan, Q., Bassi, A. S., Zhu, J. X., & Margaritis, A. Chemical Engineering Journal, **81**, 179–186, (2001).
28. Ruckenstein, E., & Guo, W. Journal of Membrane Science, **187**, 277–286, (2001).
29. Zachariou, M., & Hearn, M. T. W. Journal of Chromatography A, 890, 95–116, (2000).
30. J. Thömmes, M.R. Kula, Biotechnol. Prog. **11**, 357, (1995).

31. Suen S-Y, Liu Y-C, Chang C-S. *J Chromatogr B*; 797, 305–309, (2003).
32. M. Y. Arica, H. N. Testereci, A. Denizli, *J Chromatogr A*;799: 83–91 (1998).
33. R. K. Scopes, *Analytical Biochemistry*, 165, 235, (1987).
34. M.Y Arica, A. Denizli, *Seperation Science and Thecnology.*,**35**, 2243,(2000).
35. *Affinity Chromatography, Principles and Methods . Handbooks from Amersham Pharmacia Biotech AB* (2001).
36. H. A. Chase, *Journal of Chromatography*, 297, 179 (1984).
37. R. O. Owen, H. A. Chase, *Joural of Chromatography A*, **757**, 41, (1997).
38. G.Alderton, W.H. Ward, H.L. Fevold. *J. Biol chem* **164**, 1, (1964)
39. E.I. Elagamy, R. Ruppanner, A.Ismail, C.P Champagne, R.Assaf, *Intl Dairy J.***6**, 129 (1987).
40. V.M. Lakhtin, E.A. Kostanova, N.P. Arbatskii, *Appl Biochem Microbiol.*, **31**, 214, (1995)
41. Tong X-D, Dong X-Y, Sun Y. *Biochem Eng*, **12**, 117–204.(2002)
42. Zisman, W.A., *Ind. Eng. Chem.* **55**, 19(1963).
43. Fowkes, F.M., J.. *Adhes Sc. Technol.* **1**, 7(1987)
44. Wu, S.J., *Colloid Surface Sci.* **71**, 605(1979)
45. C.J. Van Oss, *J.Molecular Recognition*, **16**, 117-190,(1990)
46. I. West, O. Goldrind, *Mol. Biotechnol.* , **2**, 147, (1994)
47. F.Fang, I. Szleifer. *Biophy. Journal*, **80**, 2568-2589, (2001)
48. C. Charcosset, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **71**, 95-110, (1998).
49. M.Y.Arica, A. Denizli, *Seperation Science and Technology.*, **35**,2243,(2000).

50. G.Bayramoglu, B.Kaya, M.Y. Arica, Chemical Engineering Science., **57**, 2323, (2002).
51. M.Y.Arica, E. Yalçın, G. Bayramoğlu, Journal of Chromatography B, **807**, 315-325, (2004)
52. Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ. Monopolar surfaces. Adv Colloid Interface Sci , **28**, 35–65, (1987).
53. M. Leonard, Journal of Chromatography B, **699**, 3-27, (1997)
54. Zhou, W. and Zimmermann, W., FEMS Microbiol. Lett. **107**, 157(1993).
55. Zhou, J.L. and Banks, C.J., Environ. Technol. **12**, 859(1991).
56. Archibald, F. and Roy, B., Appl. Environ. Microbiol. **58**, 1496(1992).
57. Blanco, R., Arai A., Grinberg, N., Yarmush, B.D., Karger, M..L., J. Chromatogr. **482**, 1(1989).
58. Chagas, E.P. and Durrant, L.R., Enzyme Microb. Technol. **29**, 473(2001).
59. Ciardelli, G., Corsi, L., Marucci, M., Resour. Conserv. Recycl. **31**, 189(2000).
60. Brahim-Horn, M.C., Lim, K.K., Liany, S.L. and Mou, D.G., J. Ind. Microbiol. **10**, 245(1992).
61. C. K. Ratnayake, F. E. Regnier, J. Chromatography A, 743, 25, (1996).
62. G. M. S. Finnette, Q. M. Mao, M.T. W. Hearn, J. Chromatogr. A 763, 71, (1997).
63. J. Buijs, V. Hlady, J. Colloid Interface, Sci. 190, 171, (1997)
64. B. Champluvier, M.R. Kula J. Chromatogr A 539, 315, (1991)
65. M. Y. Arica, A. Denizli, Separation Science Technology 35,2243, (2000)
66. E. Li-Chan, S. Nakai, J. Sim, D.B. Bragg, K.V. Lo, Journal of Food Science, 51, 4, 1032, (1986)

67. F. Ming, J. Howell, F. Acosta, J. Hubble, *Biotechnology and bioengineering*, 42, 1086, (1993)
68. M. Grasselli, S. A. Champery, A.A. Navarro Canizo, . Cascone, *J.Sci. Food Agric.* 79, 333, (1999).