

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**YENİ AKRİLAT KÖKENLİ AFİNİTE KÜRELERİN TASARLANMASI:**  
**PROTEİN ADSORPSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASINDA**  
**KULLANILMASI**

**AYŞEGÜL ÜLKÜ METİN**

**ARALIK 2008**

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

01/12/2008

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

\_\_\_\_\_  
Müdür

Bu tezin Doktora tezi olarak Kimya Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM

\_\_\_\_\_  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Doktora tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

\_\_\_\_\_  
Ortak Danışman

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

\_\_\_\_\_  
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa ÖZCİMDER

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Muzaffer TALU

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Abbas AKSÜT

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Meral KARAKIŞLA ŞAHİN

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

\_\_\_\_\_

## ÖZET

YENİ AKRİLAT KÖKENLİ AFİNİTE KÜRELERİN TASARLANMASI:  
PROTEİN ADSORPSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASINDA  
KULLANILMASI

METİN, Ayşegül Ülkü  
Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Ortak Danışman: Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Aralık 2008, 150 sayfa

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde, afinite kromatografisi uygulamalarında dolgu maddesi olarak kullanılabilen farklı özelliklere sahip, monodispers p(glisidil metakrilat-etilenglikoldimetakrilat), p(GMA-EGDMA), partikülleri dispersiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlandı. Farklı özellikteki ligandların IgG'ye karşı afinitesini belirlemek üzere glutarikdialdehit kullanılarak modifiye edilen p(GMA-EGDMA) partiküllerine L-histidin amino asidi (L-his), Kongo Kırmızısı (CR) boya ligandı ve Cu(II) iyonlarının şelatlanması amacı ile üç dişli iminodiasetik asit (IDA) ligandı yüzeye kovalent olarak bağlandı ve modifiye partiküllerin sulu çözeltiden

IgG adsorpsiyonu araştırıldı. Hazırlanan üç farklı özellikteki monodispers afinite partiküllerin karakterizasyon çalışmaları (spesifik yüzey alanı, yoğunluğu, şişme oranı, mikroskop görüntüsü, FT-IR spektrumu, DSC ve TGA analizi ve yüzey aktif grupların tayini) tamamlanarak sulu çözeltilerden IgG proteininin adsorpsiyon davranışı araştırıldı. Adsorpsiyon koşullarının (pH, adsorpsiyon denge süresi, iyonik şiddet, sıcaklık, başlangıç protein derişimi gibi) monodispers partiküllerin IgG adsorpsiyon performansına etkileri incelendi. Bununla birlikte, adsorpsiyon kinetiği ve izoterm modeli ile monodispers afinite partiküllerin yeniden kullanılabilirliği gibi parametreler de belirlendi. Monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) partikülleri için maksimum adsorpsiyon kapasitesi sırası ile pH 7.0, 6.0 ve 7.5’de gözlemlendi. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi, p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) partiküllerinin kullanıldığı sistemde 32.87 mg/g olarak belirlendi. Afinite partiküllerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadan adsorpsiyon-desorpsiyon işlem döngülerinde yeniden kullanılabilirliği belirlendi.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, biyolojik molekül ile etkileşimini incelemek üzere yeni manyetik özellik kazandırılmış akrilat kökenli afinite polimerik partikülleri hazırlandı. Bu doğrultuda, afinite kürelere farklı bir monomerin kopolimerizasyonu ve/veya monomerin yüzeyde aşılması ve manyetik özellik kazandırılması gibi işlemlerle farklı özellikler kazandırılarak adsorpsiyon tekniği ile tripsin enzimi immobilizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Manyetik p(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat), *mp(GMA-MMA)*, polimerik destek materyali süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlandı. p(GMA-MMA) mikrokürelerinin epoksi grupları, magnetizasyon reaksiyonu sırasında amin gruplarına dönüştürüldü. p(GMA-MMA) mikrokürelerinin yüzeyine metakrilik asit (MAA) monomeri aşı

kopolimerizasyon reaksiyonu ile aşılandı ve manyetik p(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat)-g-(metakrilik asit), *mp(GMA-MMA)-g-MAA*, mikrokürelere elde edildi. Yüzeyine metakrilik asit aşılansmış manyetik kürelere tripsin enzimi adsorpsiyon yoluyla immobilize edildi. Manyetik kürelere tripsin adsorpsiyonuna sistem parametrelerinin (başlangıç tripsin konsantrasyonu, ortam pH ve sıcaklığı) etkisi ve immobilize enzimin aktivitesindeki değişim belirlendi.

Maksimum adsorpsiyon pH 7.0'de elde edildi. Maksimum immobilizasyon kapasitesinin 2.0 mg/ml enzim konsantrasyonunda 123.2 mg/g olduğu ve başlangıç aktivitesinin yaklaşık %84.2'sini koruduğu belirlendi. Immobilize tripsinin desorpsiyonu, 1.0 M NaCl çözeltisi içeren 1.0 M formik asit çözeltisiyle gerçekleştirildi. Sonuçlar, manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA kürelere üzerine adsorplanan tripsinin aktivitesinde kayıp olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilceğini gösterdi. Belirlenen optimum adsorpsiyon koşullarında manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelere immobilize edilen tripsin enziminin sitokrom *c* ve insan serum albümini (HSA) proteinlerini parçalama etkisi HPLC yardımıyla belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Monodispers partikül, Manyetik mikroküre, Aşı kopolimer, Afinite ligand, L-Histidin, Kongo kırmızısı, Cu(II) metal iyonu, Immunoglobulin G, Adsorpsiyon, tripsin.

## ABSTRACT

### DESIGN OF THE NEW ACRYLATE BASED AFFINITY BEADS AND THE USE OF ADSORPTION AND PURIFICATION OF PROTEIN

METİN, Ayşegül Ülkü  
Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry, Ph.D.Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU  
Co-Supervisor: Prof. Dr. M. Yakup ARICA

December 2008, 150 pages

At first chapter in this thesis, monodisperse poly(glycidylmethacrylate-ethyleneglycoldimethacrylate), p(GMA-EGDMA), particles will be used as packing materials in affinity chromatography applications were prepared by dispersion polymerisation. In order to determine specificity of the different properties of affinity ligand to IgG, L-histidine (L-his) amino acid, Congo Red (CR) dye ligand and Cu(II) metal ions subsequently derivatized iminodiacetic acid (IDA) chelating were then covalently immobilised on monodispers p(GMA-EGDMA) particles using glutaricdialdehyde as a coupling agent. The performance of modified particles on IgG adsorption from solution was investigated. Furthermore, characterizations of

monodispers affinity particles (specific surface area, density, swelling ratio, microscopic picture, FTIR spectrum, DSC and TGA analysis and determination of surface active groups) were determined and adsorption behavior of IgG was investigated from solutions. Adsorption conditions (such as pH, equilibrium adsorption time, ionic strength, temperature, initial protein concentration) were search on performance of IgG adsorption. However, parameters such as adsorption kinetics, isotherm models and reuse of affinity particles were determined.

The monodisperse p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR, p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) affinity particles maximum adsorption capacity of IgG was found at pH 7.0, 6.0 and 7.5 respectively. The highest adsorption capacity was obtained with p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) particles and maximum adsorption capacity was found 32.87 mg/g. The IgG molecules could be repeatedly adsorbed and desorbed with monodisperse affinity particles without noticeable loss in their IgG adsorption capacity.

At the second chapter in this study, in order to investigate of interaction with biological molecule, a new acrylate based polymeric affinity beads were synthesized. For this purpose, magnetic poly(glycidylmethacrylate-methylmethacrylate), *mp(GMA-MMA)* beads were prepared via suspension polymerization in the presence of ferric ions. The epoxy groups of the poly(GMA-MMA) beads were converted into amino groups during magnetization reaction, and then were grafted with methacrylic acid (MAA) via graft copolymerization. Magnetic *mp(GMA-MMA)-g-MAA* microbeads were found. The enzyme trypsin was immobilized on the magnetic beads via adsorption. The effect of system parameters (initial trypsin concentration, pH and

temperature of media) of trypsin adsorption on magnetic beads and change of immobilized enzyme activity were determined.

The maximum adsorption was obtained at pH 7.0. At 2.0 mg/mL initial trypsin concentration, the maximum immobilization capacity was 123.2 mg trypsin/g beads and retained about 84.2% of its initial activity. The immobilized trypsin could be desorbed by 1.0M formic acid solution containing 1M NaCl. The usability and efficiency of the immobilized trypsin for protein digestion were tested with two different model proteins (i.e.,HSA and cytochrom *c*) with HPLC.

**Keywords:** Monodisperse particles, Magnetic microbead, Graft copolymer, Affinity Ligand, L-Histidine, Congo Red, Cu(II) metal ion, Immunoglobulin G, Adsorption, Trypsin.



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında beni yönlendiren, destekleyen, değerli bilgileri ile yanımda olan ve en önemlisi bana bu fırsatı sunan danışmanım, değerli Hocam, Sayın *Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU*'na,

Ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesi esnasında karşılaştığım bütün zorluklar karşısında değerli önerileriyle yardımını esirgemeyen ve desteğini her zaman hissettiğim değerli Hocam, Sayın *Prof. Dr. Yakup ARICA*'ya saygı ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmalarım esnasında benden yardım ve desteklerini esirgemeyen, bugünümü borçlu olduğum sevgili *Aileme* sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

*Ayşegül Ülkü METİN*

*Kırıkkale, 2008*

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

1.1. Dispersiyon Polimerizasyonun şematik gösterimi.....	13
1.2. Dispersiyon polimerizasyonunda parçacık oluşumu ve sterik olarak stabilize olan parçacıkların büyümesinin şematik gösterimi.....	14
1.3. Afinite sisteminin şematik gösterimi.....	27
1.4. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	47
3.1. Dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanan p(GMA-EGDMA) partiküllerinin şematik gösterimi.....	78
3.2. p(GMA-EGDMA) partiküllerinin TGA analizi.....	79
3.3. p(GMA-EGDMA) partiküllerinin DSC analizi.....	79
3.4. p(GMA-EGDMA) partiküllerinin SEM görüntüleri.....	81
3.5. p(GMA-EGDMA) partiküllerin boyut dağılım grafiği.....	82
3.6. Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin FT-IR spektrumu.....	82
3.7. Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin aktivasyonu ve (i) L-histidin (ii) Kongo Kırmızısı ve (iii) IDA-Cu(II) ligandı bağlı afinite kürelerin şematik olarak gösterimi.....	84
3.8. IgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi.....	86
3.9. IgG ve Cu(II) afinite partiküllerinin etkileşiminin şematik gösterimi.....	90
3.10. HSA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi.....	92
3.11. IgG adsorpsiyonuna Zamanın etkisi.....	93
3.12. IgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	95
3.13. Başlangıç Protein konsantrasyonunun etkisi.....	96

3.14. Sıcaklığın etkisi.....	98
3.15. IgG adsorpsiyonunda deneysel verilerin Langmiur İzoterm modeline uygulanması.....	100
3.16. IgG adsorpsiyonun ikinci derece kinetik modeline uygulanması.....	102
3.17. mp(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin şematik gösterimi.....	108
3.18. mp(GMA-MMA) mikro kürelerine ait boyut dağılımı.....	109
3.19. Monomer konsantrasyonunun aşılama yüzdesine etkisi.....	110
3.20. Manyetik kürelerin FT-IR spektrumu.....	111
3.21. mp(GMA-MMA)-g-MMA kürelerinin SEM fotoğrafları: (A) Manyetik kürelerin genel görünümü, (B) Aşılamadan önceki yüzey morfolojisi, (C) Aşılamadan sonra yüzey morfolojisi.....	113
3.22. mp(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin ESR spektrumu.....	115
3.23. Enzim yükleme kapasitesi üzerine MAA aşılama yüzdesinin etkisi.....	117
3.24. mp(GMA-MMA)-g-MAA küreleri ile tripsin adsorpsiyonuna pH'ın etkisi...118	
3.25. Başlangıç tripsin konsantrasyonunun immobilizasyon kapasitesine etkisi...119	
3.26. Serbest ve immobilize enzimin pH profili.....	120
3.27. Serbest ve immobilize enzimin sıcaklık profilleri.....	121
3.28. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı.....	122
3.29. Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığı.....	124
3.30. HPLC kromatogramları:(A) immobilize tripsin ile HSA parçalanması (B)İmmobilize tripsin ile Sitokrom c parçalanması.....	127

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### ÇİZELGE

2.1. Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin elde edildiği polimerizasyon koşulları.....	55
3.1. Afinite partiküller ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırılmasında elde edilen Freundlich ve Langmiur adsorpsiyon modeline ait sabitler ve korelasyon katsayıları.....	99
3.2. Dubinin-Redushkevich (D-R) izoterm modeli sabitleri.....	100
3.3. Afinite sorbentlerin sulu ortamdan IgG adsorpsiyonuna ait kinetik sabitler....	101
3.4. Serbest ve immobilize enzimin kinetik sabitleri.....	125

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kolon Uygulamalarında Kullanılan Polimerik Partiküller.....	7
1.1.1. Süspansiyon Polimerizasyonu.....	8
1.1.2. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	9
1.1.3. Dispersiyon Polimerizasyonu.....	11
1.1.3.1. Proses Değişkenlerinin Dispersiyon Polimerizasyonu Üzerine Etkisi.....	16
1.2. Biyomoleküllerin Saflaştırılması İşleminde Kullanılan Teknikler.....	23
1.2.1. Afinite Kromatografisi.....	26
1.2.1.1. Ligand.....	27
1.2.2. Boya Ligand Afinite Kromatografisi.....	29
1.2.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC).....	31
1.2.4. Polimerik Partikül Yüzeylerinin Aşılama Yöntemi Kullanılarak Modifikasyonu ve Afinite Kromatografi Alanındaki Uygulamaları.....	34

1.2.5. Afinite Kromatografisi Uygulamalarında Kullanılan Destek Materyalleri.....	36
1.2.5.1. Manyetik Temelli Afinite Destek Materyalleri.....	39
1.3. Biyomoleküller ve Özellikleri.....	42
1.3.1. İmmnoglobulinler.....	42
1.3.2. Tripsin.....	45
1.3.2.1. Enzim İmmobilizasyonu ve Teknikleri.....	46
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
2.1. Materyaller.....	50
2.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	50
2.1.2. Cihazlar.....	50
2.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre.....	50
2.1.2.2. FTIR Spektrofotometre.....	51
2.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	51
2.1.2.4. Elemental Analiz.....	51
2.1.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC).....	52
2.1.2.6. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	52
2.1.2.7. Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (ESR).....	52
2.1.2.8. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	52
2.1.2.9. Boyut Dağılımı Analiz Cihazı.....	53
2.1.2.10. Kullanılan Diğer Cihazlar.....	53
2.2. Yöntem.....	53
2.2.1. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerin Sentezlenmesi..	53
2.2.2. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerin Aktivasyonu....	55

2.2.2.1. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Aminlenmesi.....	55
2.2.2.2. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerin Glutarikdialdehit İle Aktivasyonu.....	56
2.2.2.3. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerine L-Histidin Ligandının Bağlanması.....	56
2.2.2.4. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerine Boya Ligandının Bağlanması.....	57
2.2.2.5. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerine İminodiasetik Asit (İDA) Bağlanması.....	57
2.2.2.5.1. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerine Metal İyonu Bağlanması.....	57
2.2.3. Monodispers Partiküllerin Karakterizasyonu.....	58
2.2.3.1. Ortalama Partikül Boyu ve Boy Dağılımın Tayini.....	58
2.2.3.2. Monomer Dönüşüm Tayini (Polimerizasyon Verimi).....	59
2.2.3.3. Monodispers Partiküllerin Şişme Oranı.....	59
2.2.3.4. Monodispers Partiküllerin Yoğunluğu.....	60
2.2.3.5. p(GMA-EGDMA) Partiküllerin Yüzey Alanı.....	60
2.2.3.6. p(GMA-EGDMA) Partiküllerin FTIR Spektrumu.....	61
2.2.3.7. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin DSC Analizi.....	61
2.2.3.8. Partiküllerin Termal Analizi (TGA).....	61
2.2.3.9. Epoksi Grubu Tayini.....	61
2.2.3.10. Amin Grubu Tayini.....	62
2.2.4. Protein Adsorpsiyon Çalışmaları.....	62

2.2.4.1. pH Etkisi.....	63
2.2.4.2. Adsorpsiyon Zamanının Etkisi.....	64
2.2.4.3. İyonik Şiddet Etkisi.....	64
2.2.4.4. Başlangıç protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	64
2.2.4.5. Sıcaklığın Etkisi.....	65
2.2.4.6. Adsorpsiyon İzotermi.....	65
2.2.4.7. Adsorpsiyon Kinetikleri.....	66
2.2.4.8. Protein Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	67
2.2.5. Manyetik Partiküllerin Hazırlanması.....	68
2.2.5.1. Manyetik p(GMA-MMA) Kürelerin Hazırlanması... ..	68
2.2.5.2. Metakrilik Asit Aşılı Kürelerin Hazırlanması.....	69
2.2.6. Manyetik Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	70
2.2.6.1. Manyetik Kürelerinin Yüzey Alanı.....	70
2.2.6.2. Manyetik Kürelerin Yüzey Morfolojileri.....	70
2.2.6.3. Manyetik Kürelerin FTIR Spektrumu.....	71
2.2.6.4. Manyetik Kürelerin ESR Spektrumu.....	71
2.2.6.5. Karboksil Grup Tayini.....	71
2.2.7. Tersinir Tripsin İmmobilizasyonu.....	72
2.2.7.1. Tripsin İmmobilizasyonuna pH Etkisi.....	72
2.2.7.2. Tripsin İmmobilizasyona Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi.....	72
2.2.7.3. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Aktivite Tayini.....	73
2.2.7.3.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine pH Etkisi.....	74



2.2.7.3.2.Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	74
2.2.7.4. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Kararlılık Çalışmaları.....	74
2.2.7.5. Enzim Kinetiğinin Belirlenmesi.....	74
2.2.7.6. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	75
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	76
3.1. p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Karakterizasyonu.....	77
3.2. p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Aktivasyonu.....	83
3.3. Protein Adsorpsiyon Çalışmaları.....	84
3.3.1. pH'ın Etkisi.....	84
3.3.2. Adsorpsiyon Zamanının Etkisi.....	92
3.3.3. İyonik Şiddetin Etkisi.....	93
3.3.4. Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	95
3.3.5. Sıcaklığın Etkisi.....	96
3.3.6.Adsorpsiyon İzotermi.....	98
3.3.7.Adsorpsiyon Kinetiği.....	101
3.3.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	102
3.4. Literatür Değerlendirilmesi.....	103
3.5. Poli(GMA-MMA)-g-MAA Kürelerinin Karakterizasyonu.....	107
3.6. Tripsinin İmmobilizasyonu.....	116
3.6.1.Tripsin İmmobilizasyonuna pH'ın Etkisi.....	117
3.6.2. İmmobilizasyona Başlangıç Tripsin Konsantrasyon Etkisi...118	
3.6.3. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Aktivite Tayini....119	

3.6.3.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine pH Etkisi.....	120
3.6.3.2.Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	121
3.6.4. Serbest ve immobilize tripsinin kararlılık çalışmaları.....	122
3.6.4.1.Serbest ve İmmobilize enzimin termal kararlılığı.....	122
3.6.4.2.Serbest ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı.....	123
3.6.5. Enzim Kinetiği.....	124
3.6.6. İmmobilize Tripsinin Protein Parçalama Verimliliği.....	126
3.6.7.Destek Materyali ve İmmobilize Tripsinin Tekrar Kullanılabilirliği.....	128
3.7. Literatür Değerlendirilmesi.....	128
4.SONUÇ.....	131
KAYNAKLAR.....	138
ÖZGEÇMİŞ.....	150

## 1. GİRİŞ

Nano ve mikron boyutlu, monodispers partiküllerin üretimi ve karakterizasyonu, son çeyrek yüzyılda önemli bir araştırma konusu olarak araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Monodispers partiküllerin tek boyut dağılımına sahip olması, çaplarının duyarlılıkla tayin edilebilmesi, yüzey özelliklerinin karakterize edilebilmesi, farklı boyut ve kimyasal özelliğe sahip olarak sentezlenebilmesi nedeni ile geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tek boyut dağılımına sahip bu partiküller; enzim, hücre ve ilaçların immobilizasyonunda<sup>(1)</sup>, diagnostik test kitlerinde ve organ görüntülenmesinde taşıyıcı olarak, elektron mikroskopları, optik mikroskoplar, partikül ve hücre sayıcıların kalibrasyonu, standardizasyonu ve kontrolünde kullanılmaktadır<sup>(2,3)</sup>. Ayrıca, bu tür partiküllerin yüzeyine tutuklanan biyolojik moleküller, partikül içi difüzyon sınırlaması olmaksızın, sulu ortamda bulunan moleküllerle kolaylıkla etkileşebilmektedir. Bu nedenle, araştırmacılar son yıllarda çok çeşitli monomerlerden mikron veya nanometre boyutlu monodispers küre sentez prosesleri geliştirerek ürettikleri destek materyallerini, kromatografik uygulamalarda, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kolon dolgu materyali ve afinite kromatografisinde biyolojik moleküllerin ayrımı ve saflaştırılması işleminde başarı ile kullanabilmişlerdir<sup>(4-6)</sup>.

Monodispers polimerik partiküllerin sentezlenmesi amacıyla kullanılan en uygun yöntem olarak önerilen dispersiyon polimerizasyonu, organik karakterdeki dağıtma ortamında yürütülen dar boy dağılımıyla mikron yada nano boyutunda polimerik partikül sentezi temeline dayanan alternatif bir tekniktir<sup>(7-9)</sup>. Diğer polimerizasyon yöntemlerine kıyasla, dispersiyon polimerizasyonu sisteminde

başlangıçta tek faz bulunmaktadır. Reaksiyonun ilerlemesiyle büyüyen polimerik partiküller katı faza geçerek dağıtma ortamından ayrılmakta ve sonuçta iki fazlı yapıya ulaşmaktadır. 1980'lerin başında, çekirdeklenme polimerizasyon tekniklerinin yeterince gelişmesiyle istenilen boy aralığında polistiren lateksler sentezlenebilmiştir<sup>(10,11)</sup>. Bu gelişmeyle birlikte, dispersiyon polimerizasyonu, monodispers polistiren (PS) ve polimetilmetakrilat (PMMA) latekslerin tek basamakta üretimi için alternatif bir metot olarak kullanılmaya başlanmıştır<sup>(12)</sup>.

Başlangıçta dispersiyon polimerizasyon tekniği, çoğunlukla inert formda partiküllerin elde edilebildiği, stiren, metilmetakrilat, bütilmetakrilat gibi monomerler için uygulanmıştır. Bu tür partiküllerin biyoteknolojik uygulamalarda doğrudan kullanımının zorluğu, genellikle biyolojik molekül ile etkileşim öncesinde polimer yapısının fonksiyonlandırılması için ilave işlemler gerektirmektedir. Bu nedenle, son yıllarda biyolojik moleküller ile kimyasal etkileşim yeteneğine sahip fonksiyonel grupları taşıyan, monodispers partiküllerin dispersiyon polimerizasyonu ile doğrudan sentezi önem kazanmıştır. Bu amaçla, 2-hidroksietilmetakrilat, p-klorometilstiren ve glisidilmetakrilat gibi reaktif gruplar içeren fonksiyonel monomerler için farklı dispersiyon polimerizasyonu yöntemleri geliştirilmiştir<sup>(13-15)</sup>.

Proteinler, tüm yaşamsal organizmalar ve yapısal fonksiyonlarda önemli role sahip olan doğal polimerlerdir. Son yıllarda, biyolojik sıvı karışımlarından ayrıştırılan ve saflaştırılan çok sayıda proteinin, ilaç ve besin endüstrisinde kullanılması ekonomik açıdan önem kazanmasına neden olmuştur<sup>(16)</sup>. Bu nedenle, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisindeki artan talepler doğrultusundaki hızlı gelişim, enzim veya proteinlerin geri kazanım ve saflaştırılması işleminde, yeterli ve etkin ayırım hedefi, yeni ayırma tekniklerinin gelişimini zorunlu kılmıştır. Geliştirilen bu

yöntemler arasında yer alan afinite kromatografisi, proteinlerin buldukları ortamdan yüksek saflıkta tek basamakta saflaştırılması için oldukça etkin ve çok yönlü bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır<sup>(17)</sup>.

Afinite kromatografisi, destek materyali üzerine tutuklanmış ve yüksek tanıma kapasitesine sahip bir ligand molekülü ile biyolojik molekül arasında ortaya çıkan ve kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanır. Afinite kromatografisinde yalancı spesifik ligand olarak tekstil boyaları, amino asitler ve metal şelat oluşturabilen moleküller çok sayıdaki avantajlarından dolayı, biyospesifik ligandların yerine kullanılmaktadır<sup>(18)</sup>. Bu teknikte, en önemli parametre kullanılacak destek materyalinin seçimidir. Metakrilat kökenli polimerler, tasarlanan uygulamalar için fonksiyonel grup çeşitliliği sağlaması ve kolaylıkla fonksiyonlandırılabilir olması nedeniyle kromatografik destek materyallerinin hazırlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır<sup>(19-23)</sup>. Metakrilat kökenli bir polimer olan olan p(glisidil metakrilat), p(GMA), taşıdığı reaktif epoksi halkasından dolayı kimyasal modifikasyon kolaylığı ve biyolojik moleküller ile doğrudan kimyasal etkileşim özelliği sayesinde afinite kromatografi sistemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidroksil, aril grupları yada sekonder, tersiyer ve kuarterner amin grupları taşıyan geniş polariteye sahip polimerik partiküller, farklı aktivasyon prosedürleri kullanılarak p(GMA) içeren polimerik yapılardan kolaylıkla elde edilebilmektedir<sup>(24)</sup>.

Afinite kromatografisi teknolojisi, yeni sabit fazların tasarımı ve geliştirilmesine paralel olarak ilerlemektedir<sup>(25)</sup>. Son dönemde manyetik özellik kazandırılmış partiküller, biyoteknolojik uygulamalarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur<sup>(26)</sup>. Biyolojik moleküllerin ayrıştırılması veya saflaştırılması işleminde manyetik özellikteki partiküllerin kullanıldığı ayırma teknikleri, biyomoleküllerin

saflaştırılmasında yüksek kütle transfer hızı, kolay ayırım ve yüksek verimlilik sağlamaktadır<sup>(27)</sup>. Manyetik partiküller, kullanıldığı proseslerde mıknatıs gibi dışarıdan uygulanan basit bir manyetik aygıtla reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilir ve tekrar kullanılabilir<sup>(28)</sup>. Manyetik destek materyalleri inorganik materyaller yada sentetik veya doğal polimerlerden hazırlanabilmektedir. Ancak, yüzey fonksiyonel gruplarının çeşitliliği nedeniyle manyetik destek materyalleri genellikle polimerlerden üretilmektedir<sup>(29-31)</sup>.

Son yıllarda protein adsorpsiyonu ve enzim immobilizasyonu gibi bir çok uygulama alanında polimer ana zincirine aşılınmış nanoiplikçiklerden oluşan yan zincirlerin bulunduğu destek materyalleri kullanılmaya başlanmıştır. Adsorpsiyon kapasitesi geliştirilmiş bu modifiye destek materyallerinin polimer yüzeyi, proteinlerin polimer tabakasına kolaylıkla girmesine ve çok tabakalı adsorpsiyonuna olanak sağlayacak şekilde uygun bir mesafeye taşımaktadır. Ayrıca, protein ve polimer yüzeyi arasındaki bu yan zincirler sayesinde protein ve destek materyali yüzeyi arasında meydana gelebilecek istenmeyen nonspesifik etkileşimler minimum düzeyde azaltılmış olmaktadır<sup>(32)</sup>.

Monoklonal antikorlar, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldıklarından önemli terapötik ajan grubunu oluştururlar. Endüstriyel öneme sahip farklı antikorların %30'unu biyoteknolojik kökenli antikorlar oluşturmaktadır. Bunlar arasında insan immüoglobulin G (IgG) önemli bir yere sahiptir. İnsan plazmasından IgG elde edilmesi, alloimmünizasyon, SLE, immunolojik tayin kitleri ve immün bozukluklarda ve kanser gibi önemli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmasının yanı sıra alternatif bir tedavi sistemi oluşturduğu için IgG saflaştırılması biyoteknoloji ve eczacılık alanında önemlidir<sup>(33)</sup>.

İki bölümü kapsayan tez çalışmasının ilk bölümünde, afinite kromatografisi uygulamalarında dolgu maddesi olarak kullanılacak farklı özelliklere sahip, monodispers yeni afinite partikülleri hazırlandı ve biyoteknojik açıdan büyük öneme sahip olan IgG moleküllerine karşı gösterdiği afinite araştırıldı. Bu doğrultuda, yapısında reaktif epoksi grubu bulunduran monodispers p(glisidilmetakrilat-etilenglikoldimetakrilat), p(GMA-EGDMA), partikülleri dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlandı. Glisidil metakrilat (GMA)/etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) komonomer oranı, başlatıcı ve stabilizatör konsantrasyonu, monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı gibi polimerizasyon sistemi parametreleri değiştirilerek optimize polimerizasyon koşullarında monodispers p(GMA-EGDMA) partikülleri hazırlandı. Farklı özellikteki ligandların IgG'ye karşı afinitesini belirlemek üzere glutarikdialdehit kullanılarak modifiye edilen p(GMA-EGDMA) partiküllerine L-histidin amino asidi (L-his), Kongo Kırmızısı (CR) boya ligandı ve Cu(II) iyonlarının şelatlanması amacı ile üç dişli iminodiasetik asit (IDA) ligandı yüzeye kovalent olarak bağlandı ve sırası ile *p(GMA-EGDMA)-L-his*, *p(GMA-EGDMA)-CR* ve *p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II)* monodispers partikülleri elde edildi. Ayrıca, sentezlenen monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin epoksi grupları hidroliz edilerek yüzeylerinde hidroksil grupları oluşturuldu ve ligand bağlı karıştırlarına karşı adsorpsiyon işleminde protein ile sorbent arasındaki non-spesifik etkileşimlerin incelenmesinde kontrol amaçlı kullanıldı.

Hazırlanan üç farklı özellikteki monodispers afinite partiküllerin karakterizasyon çalışmaları (spesifik yüzey alanı, yoğunluğu, şişme oranı, mikroskop görüntüsü, FTIR spektrumu, DSC ve TGA analizi ve yüzey aktif grupların tayini) tamamlanarak sulu çözeltilerden ticari açıdan büyük bir öneme sahip olan IgG

proteininin adsorpsiyon davranışı araştırıldı. Adsorpsiyon koşullarının (pH, adsorpsiyon denge süresi, iyonik şiddet, sıcaklık, başlangıç protein derişimi gibi) monodispers partiküllerin IgG adsorpsiyon performansına etkileri incelendi. Adsorpsiyon kinetiği ve izoterm modeli ile monodispers afinite partiküllerin yeniden kullanılabilirliği gibi parametreler de belirlendi.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde biyolojik molekül ile etkileşimini incelemek üzere yeni manyetik özellik kazandırılmış akrilat kökenli afinite polimerik partikülleri hazırlandı. Bu doğrultuda, afinite kürelere farklı bir monomerin kopolimerizasyonu ve/veya monomerin yüzeyde aşılması ve manyetik özellik kazandırılması gibi işlemlerle farklı özellikler kazandırılarak adsorpsiyon tekniği ile tripsin enzimi immobilizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Birinci aşamada, manyetik p(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat), *mp(GMA-MMA)*, polimerik destek materyali süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlandı. p(GMA-MMA) mikro kürelerinin epoksi grupları, magnetizasyon reaksiyonu sırasında amin gruplarına dönüştürüldü. p(GMA-MMA) mikro kürelerinin yüzeyine metakrilik asit (MAA) monomeri aşı kopolimerizasyon reaksiyonu ile aşılandı ve manyetik p(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat)-g-(metakrilik asit), *mp(GMA-MMA)-g-MAA*, mikrokürelere elde edildi. Yüzeyine metakrilik asit aşılanmış manyetik kürelere tripsin enzimi adsorpsiyon yoluyla immobilize edildi.

Sentezlenen manyetik özellikteki afinite kürelerin yüzey alanı ölçümü, şişme testi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elektron spin rezonans (ESR) gibi analizleri yapılarak karakterizasyon çalışmaları tamamlandı. Sentezlenen ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanan manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikro kürelerine model protein olarak proteolitik bir enzim olan tripsin adsorpsiyon yoluyla



immobilize edildi. Manyetik kürelere tripsin adsorpsiyonuna sistem parametrelerinin (başlangıç tripsin konsantrasyonu, ortam pH ve sıcaklığı) etkisi ve immobilize enzimin aktivitesindeki değişim serbest enzime göre değerlendirildi. Belirlenen optimum adsorpsiyon koşullarında manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikro kürelerine immobilize edilen tripsin enziminin sitokrom *c* ve insan serum albümini (HSA) parçalama etkisi HPLC yardımıyla belirlendi.

### **1.1. Kolon Uygulamalarında Kullanılan Polimerik Partiküller**

Çeşitli boyut ve özelliklere sahip partiküller, farklı heterojen polimerizasyonu sistemleri ile sentezlenebilmektedir. Heterojen yada parçacık oluşum polimerizasyon prosesleri genellikle iki faz içeren sistemlerdir. Burada, başlangıçtaki monomer(ler) yada sonuçta oluşan polimerler, kendilerinin çözünmediği bir çözücü içerisinde iyi bir dispersiyon oluşturmaktadırlar.

Yaklaşık 1  $\mu\text{m}$ 'den daha küçük damlacıklar halindeki parçacıkları içeren sıvılar, emülsiyon (lateks veya kolloid) olarak bilinmektedir<sup>(34)</sup>. Hazırlama teknikleri göz önüne alındığında, polimer kolloidleri emülsiyon, süspansiyon ve dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilebilmektedir<sup>(35)</sup>. Bu yöntemler şu dört kriterle birbirinden ayrılmaktadır: *i*) Polimerizasyon karışımının başlangıç basamağı, *ii*) polimerizasyon kinetiği, *iii*) parçacık oluşum mekanizması ve *iv*) elde edilen polimer parçacıklarının şekil ve büyüklüğü<sup>(34)</sup>.

### 1.1.1. Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu (“tane” polimerizasyonu), günümüzde birçok önemli polimerin yüksek kapasitelerle üretiminde kullanılmaktadır. 1940’lı yıllarda geliştirilen ve 1950’li yıllarda hızla ilerleme gösteren süspansiyon prosesi, basit teknolojisi, düşük viskozitesi sayesinde karıştırma ve ısı transfer kolaylıklarına sahiptir. Bu polimerizasyon yönteminde, yığılma ve bloklaşmayı önlemek ve bir ölçüye kadar ürün tanecik boyutunu ayarlamak, dolayısıyla polimerizasyon derecesini kontrol etmek için ortama stabilizörler ve benzeri katkı maddeleri ilave edilir. İlk yıllarda süspansiyon stabilizörleri olarak suda çözünen yüksek molekül ağırlıklı polimerler (polivinilalkol, v.b.) kullanılmıştır. Günümüzde, jelatin, stiren-maleik asit anhidrit sodyum tuzu, talk, kaolin, bentonit, baryum, kalsiyum ve magnezyum karbonatlar, silikatlar, fosfat ve sülfatlar, alüminyum hidroksit gibi birçok madde değişik ortamlarda dağıtıcı ve stabilizör olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel boyutlarda süspansiyon polimerizasyonu ile üretilen ilk polimer polivinilkloroasetatdır. Bugün, akrilik ve metakrilik asitler, stiren ve kopolimerleri, vinil asetat, vinil klorür, vinilidin klorür, tetrafloroetilen, klorotrifloroetilen ve daha birçok doymamış monomer bu prosesle polimerleştirilmektedir. Bu süreçte monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir. Dağıtma ortamı olarak genellikle su kullanılır. Başlatıcı suda dağılmış halde bulunan monomer damlacıklarının içinde çözülmüştür.

Ortam sürekli karıştırılarak monomer süspansiyonun devamlılığı sağlanır. Dağıtma ortamında çözünen süspansiyon stabilizörleri ve emülsifiye edicilerle süspansiyonun kararlılığı desteklenir. Sisteme uygun bir ısıtma programı uygulanarak monomer damlacıklarının küresel polimer tanecikleri haline dönüşmesi

sağlanır. Bu yöntem kullanılarak, sistem parametrelerinin ayarlanması ile, 10 µm'den 10 mm'ye kadar istenilen boyda polimer taneciklerinin sentezi gerçekleştirilebilmektedir.

Süspansiyon polimerizasyonu tekniğinin uygulandığı sistemlerde reaktör tasarımı, ulaşılabilecek son ürün kalitesi için oldukça önemlidir. Süspansiyon ortamındaki monomer damlacıklarının ortalama çapı, karıştırma hızı monomer/süspansiyon ortamı oranı, stabilizör derişimi, monomer fazının ve dağıtma ortamının viskozitesi gibi değişkenlerin ayarlanması ile kontrol edilebilir.

Süspansiyon proseslerinin, önemli avantajlarından biri, bu yöntemde ürün tanecik boyunun çok daha kolay ayarlanabilmesi ve istenilen boyda ürün elde edilebilmesidir. Ayrıca, bu yöntemde katkı maddelerinin neden olduğu kirlenme emülsiyon polimerizasyonuna göre daha azdır. Ürün bağıl olarak daha ucuz ve basit ayırma ve saflaştırma işlemlerinden sonra piyasa sunulabilmektedir<sup>(36)</sup>.

### **1.1.2. Emülsiyon Polimerizasyonu**

Emülsiyon polimerizasyonu genellikle sulu ortamda yürütülen bir işlemdir. Bu yöntem ile ilgili ilk patent 1909 yılında Bayer firması tarafından alınmıştır. Endüstriyel boyuttaki üretim 1940'lı yıllarda stiren-bütadien kauçuğu (SBR) üretimi ile önem kazanmıştır. Günümüzde SBR kauçuğunun yanı sıra, poliakrilat ve metakrilatlar, polivinilasetat, polivinil klorür gibi çeşitli radikal polimerizasyon ürünleri bu prosesle üretilen polimerlere örneklerdir.

Süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile elde edilen ürün partikül boyutu 10 µm ile 10 mm arasında olmasına karşın, emülsiyon polimerizasyonunda 0.05 ile 5.0

µm boyutlarındadır. Ayrıca, emülsiyon polimerizasyonunda sonuç ürün bir sentetik lateks, başka bir ifadeyle, polimer partiküllerinin sulu ortamdaki kararlı bir emülsiyonu şeklindedir. Emülsiyon polimerizasyonunun bir çok uygulamasında ürün lateks doğrudan kullanılır. Boya, yüzey kaplama, yapıştırıcılar, lateks köpük kauçuk bu uygulamalara örnek olarak verilebilir.

Emülsiyon polimerizasyonunun mekanizmasını aydınlatmak üzere pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında en çok ilgi gören Harkins modelidir. Bu modele göre, monomer yaklaşık 1µm boyutunda damlacıklar halinde su içinde dağıtılır. Monomerin su içindeki çözünürlüğü ihmal edilebilecek kadar azdır (yaklaşık %0.04). Başlatıcı suda çözünür ve uygun sıcaklıkta polimerizasyonu başlatacak radikalleri oluşturur. Monomer ve daha sonra oluşacak polimerik partiküllerin kararlı emülsiyonunu sağlamak üzere emülsifiye edici ajanlar kullanılır. Bu moleküller sulu ortamda, hidrofobik monomer damlacıkların çevresinde toplanarak, hidrofobik uçları monomer tarafına, hidrofilik uçları dış tarafa (su tarafına) olmak üzere yönlendirilir. Böylece, monomer-su arasındaki ara yüzeylere yerleşen bu ajanlar damlacıkların birbiriyle birleşmesini engeller ve kararlı emülsiyon oluştururlar. Emülsiyon yapıcı maddelerin polimerizasyondaki diğer önemli görevi ise, emülsiyon polimerizasyonunun yürüyeceği miselleri oluşturmalarıdır.

Monomerlerin varlığında miseller hacimlerini iki kat kadar arttırarak monomerle şişerler ve böylece polimerizasyonun yürümesi için ortam oluştururlar. Ortamın ısıtılması ile sulu fazda oluşan radikaller, monomer taşıyan miseller içine difüze olur ve polimerizasyonu başlatırlar. Büyüyen misellere sürekli monomer transferi olur ve polimerizasyon, ortamdaki sayıları yaklaşık  $10^{15}$  partikül/ml aktif miseller içinde, dönüşüm %100 olana kadar devam eder. Emülsiyon

polimerizasyonunda kullanılan emülsifiye edici ajanlar, iyonlaşmayan, anyonik, katyonik veya amfoterik olabilir.

Emülsiyon polimerizasyonunda suda çözünen başlatıcılar kullanılır. Bunlar, organik yada inorganik peroksitler, diazo bileşikleri ve çeşitli redoks başlatıcılarıdır. İyi ısı ve kütle transferi sağlayabilmek için ortam viskozitesinin düşük olması istenir. Buna ulaşabilmek için monomer/su oranı genellikle 1/2 -1/3 aralığında tutulur<sup>(36)</sup>.

Bu yöntem ile yüksek polimerizasyon hızı ile diğer yöntemlere göre çok daha yüksek molekül kütesine çıkılabilmektedir. Ayrıca, diğer yöntemlere göre ortam viskozitesi düşük olup, karıştırma, ısı transferi, ürünün transferi (pompalanması) ve sürekli üretimi kolaydır. Diğer proseslere kıyasla daha fazla katkı malzemesi kullanılması, kirlenmenin daha fazla olması, emülsiyondan ürünün elde edilmesinde, saflaştırma ve kurutma işlemlerinin daha fazla olması prosesin maliyetini arttırmakta ve bunlarda polimerizasyon tekniğinin önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır.

### **1.1.3. Dispersiyon Polimerizasyonu**

Dispersiyon polimerizasyonu uzun yıllardır bilinen bir teknik olmakla beraber, tek basamakta mikron veya nano büyüklükte monodispers polimer parçacıklarının hazırlanması için çekici bir yöntem sunmaktadır<sup>(37)</sup>. Dispersiyon polimerizasyonu tek basamakta 0.1-15.0 µm büyüklükte, bazen de oldukça dar veya monodispers moleküler ağırlık dağılımına sahip parçacık oluşumunu sağlayan eşsiz bir polimerizasyon yöntemidir<sup>(38)</sup>.

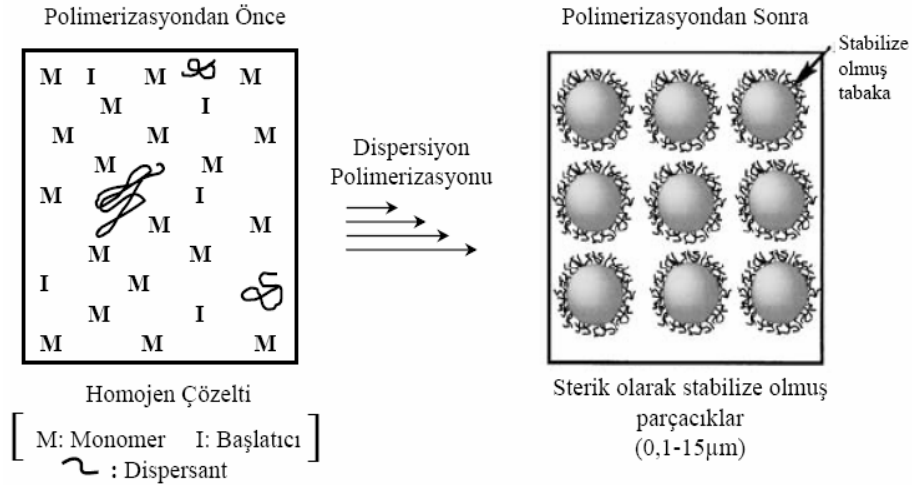
Eş boyutlu partiküllerin sentezlenmesi için seçilen dispersiyon polimerizasyonu, bu özelliğinden dolayı süspansiyon ve emülsiyon

polimerizasyonları arasındaki boşluğu doldurmaktadır. Bu yöntem, Barret ve arkadaşları<sup>(38)</sup> tarafından rapor edildiğinden beri birçok polimerin sentezlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Stiren<sup>(39)</sup>, metil metakrilat<sup>(40)</sup>, divinil benzen<sup>(41)</sup>, hidroksi etil metakrilat<sup>(42)</sup> ve kloro metil stiren<sup>(43)</sup>, dispersiyon polimerizasyonunda yaygın biçimde kullanılan monomerler arasındadır.

Dispersiyon polimerizasyonu, reaksiyon ortamında polimerik bir stabilizör varlığında monomerin polimerizasyonunun gerçekleştiği bir çökme polimerizasyonu olarak da tanımlanabilmektedir<sup>(44)</sup>. Reaksiyon ortamı olarak seçilen çözücü, hem monomer hem de başlatıcı madde için iyi bir çözücü olmalı iken, ortamda oluşan polimer için iyi bir çözücü niteliği taşımamalıdır<sup>(45)</sup>. Bunun yanında en önemlisi ise, kararlı polimer dispersiyonlarının elde edilmesi için kullanılan sterik stabilizör olarak, bir kısmı, oluşan ve çökme eğiliminde olan polimere tutunan, diğer kısmıysa stabilizasyonu sağlayan bloklara sahip ve önceden hazırlanmış blok yada aş (graft) kopolimerlerinin kullanılma zorunluluğudur. Stabilizörler polimerik topakların yüzeyini kaplayarak ve/veya ortamdaki monomerle aş kopolimer oluşturarak partiküllerin kararlılığını sağlar<sup>(46)</sup>(Şekil 1.1.). Bu koşullar sağlandığında, çözücünün, stabilizörün kararlılığı sağlayan kısmının molekül kütlesinin, monomerin ve reaksiyon sıcaklığının doğru olarak seçimi başarılı bir dispersiyon polimerizasyonunun gerçekleştirilmesi için önemli faktörler olarak göz önüne alınmaktadır<sup>(47)</sup>.

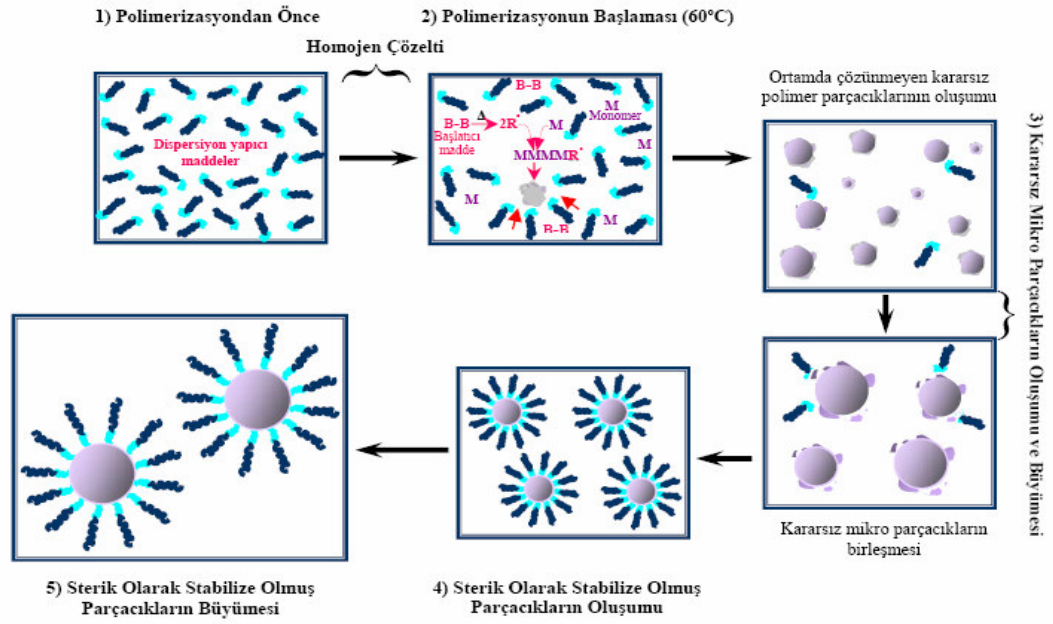
Sonuç olarak dispersiyon polimerizasyonu, başlatıcı madde, monomer(ler) ve elde edilen polimerlerin çökmesiyle sterik olarak stabilize olmuş polimer parçacıklarının oluşturduğu dağıtıcı fazın homojen bir karışımını içermektedir<sup>(48)</sup>. Oluşan polimerin molekül kütlesi kritik bir sınıra ulaştığında polimer fazı ayrılır ve

çöker. Bu durum, Şekil 1.2’de gösterilen ilk parçacıkların oluşumu ve çekirdekleşmesine yol açmaktadır. Polimer parçacıklarının sterik olarak stabilizasyonu, genellikle blok kopolimerler olan dispersiyon ajanları ortama ilave edildiğinde gerçekleşmektedir. Parçacıklar oluştuktan sonra, şişen monomer parçacıklarının bütününde ileri bir polimerizasyon ortaya çıkmaktadır. Yeni bir parçacık çekirdekleşmesi söz konusu olmadıkça, dar parçacık büyüklük dağılımı elde etmek mümkündür.



**Şekil 1.1** Dispersiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi<sup>(46)</sup>

Oluşan parçacıkların boyutları, genellikle ortamda oluşturulan polimerin çözünürlüğüne bağlıdır. Oluşturulan polimer, iyi bir çözünürlüğe sahipse, polimer zincirlerinin agregasyonu gecikmekte, bu da daha büyük çapa sahip parçacıkların oluşmasına yol açmaktadır. Eğer daha düşük bir çözünürlük söz konusu ise, polimer daha çabuk pıhtılaşır ve daha küçük çapta parçacıklar elde edilir<sup>(49)</sup>.



**Şekil 1.2** Dispersiyon polimerizasyonunda parçacık oluşumu ve sterik olarak stabilize olan parçacıkların büyümesinin şematik gösterimi<sup>(46)</sup>

Dispersiyon polimerizasyonu sulu veya susuz ortamların her ikisi içerisinde de serbest radikalik yada iyonik mekanizmayla gerçekleşmektedir. Dispersiyon polimerizasyonu tekniğinin iki temel basamaktan oluştuğu düşünülmektedir. Bu temel basamaklar; i) çekirdek oluşumu ve ii) çekirdek büyümesidir<sup>(50)</sup>.

Polimerizasyonun başlangıcında homojen olan polimerizasyon ortamına belirli bir sıcaklıkta başlatıcı maddenin ilavesiyle ilk polimer çekirdekleri oluşur ve çökme eğilimi gösterir. Daha sonra bu çekirdekler ortamda çözünmüş halde bulunan sterik stabilizörler tarafından sınırlanarak sterik olarak stabilize edilmiş polimer parçacıkları elde edilmiş olur<sup>(51)</sup>. Reaksiyon boyunca oluşturulan çekirdek, ortamda yeteri kadar bulunan sterik stabilizörün çekirdek yüzeyinde kararlı bir stabilizasyon sağlamasını gerçekleştirene kadar reaksiyon ortamında pıhtı halinde kalmaktadır.



Böylece parçacıkların büyümesi iki yolla sağlanmaktadır: i) Ortamdan sönmüş polimer zincirlerinin yakalanması ve ii) yakalanmış oligomerik radikaller ve çözülmüş haldeki başlatıcı madde aracılığıyla, monomerin şişmiş polimer parçacıklarının içerisinde gerçekleşen polimerizasyonu söz konusudur<sup>(52)</sup>. Dispersiyon polimerizasyonunda, ortamda bulunan sterik stabilizörler, oluşan parçacıkların yüzeylerinde adsorplanmaktadır. Parçacık büyümesi, ortamdaki tüm monomerlerin tükenmesi ve/veya stabilizörün tamamının adsorbe edilmesi ve parçacık yüzeylerinin tamamının sarılması gerçekleşinceye kadar devam etmektedir<sup>(49)</sup>.

Son 20-30 yıllık süre içerisinde literatürde yer alan önemli sayıda çalışmada parçacık saldırı mekanizması ve parçacık büyüklük ve büyüklük dağılımının kontrolünün nasıl sağlanacağına ağırlık verilmiştir<sup>(53)</sup>. Yasuda ve çalışma arkadaşları<sup>(54)</sup>, dispersiyon polimerizasyonunda parçacık oluşum basamağındaki davranış üzerine bir model geliştirmiş ve teorik olarak tahmin edilen parçacık konsantrasyonu ile deneysel verileri kıyaslayarak bir sonuca ulaşmışlardır.

Günümüze kadar dispersiyon polimerizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda monodispers partikül üretimine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir. Levy ve arkadaşları<sup>(55)</sup> tarafından yürütülen çalışmada 1-6 µm aralığında monodispers polistiren partiküller üretilmiştir. Stiren ve GMA içeren monodispers kopolimer mikro küreler, dispersiyon polimerizasyonu ile Yang ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada sentezlenmiş ve partikül boy ve boyut dağılımına çeşitli polimerizasyon parametrelerinin etkileri sistematik olarak saptanmıştır<sup>(56)</sup>. Stiren-glisidilmetakrilat kopolimer bazlı lateksler, emülsiyon yapıcı ajanlardan bağımsız dispersiyon kopolimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiş, lateks partiküllerin

boyutunu ve morfolojisini etkileyen temel faktörlerin başlatıcı ( $K_2S_2O_8$ ) konsantrasyonu, sulu fazın toplam iyonik şiddeti ve toplam monomer konsantrasyonu olduğu belirtilmiştir. Bu değişkenler için kritik değerlerin varlığı gösterilmiştir<sup>(57)</sup>. Sulu ortamda uygulanan tek basamaklı bir polimerizasyon tekniği ile monodispers polistiren partiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada, başlatıcı olarak potasyum persülfat, setiltrimetil amonyum bromür ve sodyum dodesil sülfat ise stabilizör olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada ortalama 3.3 µm boyutlu monodispers polistiren partikülleri elde edilmiştir<sup>(58)</sup>.

Cao ve arkadaşları<sup>(59)</sup>, eş boyutlu poli(metilmetakrilat) mikro kürelerini dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlamışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmada, dispersiyon ortamı olarak metanol-su karışımı, azo türü bir başlatıcı ve stabilizatör olarak ise poliakriliasit yada polivinilprolidon kullanılmıştır. Polimerizasyon sıcaklığı ve zamanı, başlatıcı türü ve konsantrasyonu, stabilizatörün molekül kütlesi, türü ve konsantrasyonu gibi sistem parametrelerinin ürün üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak 1-5 µm boyutlu polimerik küreler elde edildiği rapor edilmiştir. Poli(vinilasetat) Okaya ve arkadaşları tarafından etanol-su ortamında polivinil alkolün sterik stabilizatör olarak kullanıldığı dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Uygun proses şartlarının ayarlanması ile 450 nm büyüklüğünde monodispers nano küreler sentezlenmiştir<sup>(50)</sup>.

### **1.1.3.1. Proses Değişkenlerinin Dispersiyon Polimerizasyonu Üzerine Etkisi**

Dispersiyon polimerizasyon sistemlerinde farklı başlatıcılar, monomer ve dağıtma sistemleri kullanılarak yapılan çalışmaların sonucunda, sentezlenen ürünlerin molekül ağırlığı, boy ve boy dağılımının; polimerizasyon sıcaklığı,

kariştırma hızı ve şekli, dağıtma ortamının türü ve bileşimi, stabilizörün türü ve konsantrasyonu, başlatıcı türü ve konsantrasyonu ve monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı gibi parametrelerden etkilendiği belirlenmiştir<sup>(60)</sup>.

Dispersiyon polimerizasyonu yönteminde sıcaklık, hem serbest radikal oluşum hızını, hem de polimerizasyon sisteminin termodinamik özelliklerini etkilediği için önemlidir. Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan dağıtma ortamının kaynama noktası, polimerizasyon sıcaklığını kısıtlayan en önemli faktörlerden biridir. Bununla birlikte, monomer faz içindeki başlatıcının serbest radikal oluşturabileceği sıcaklık aralığının 70-75°C olarak tutulması da polimerizasyonda önem taşımaktadır.

Shen ve arkadaşları<sup>(61)</sup>, metil metakrilatın (MMA) metanol içindeki dispersiyon polimerizasyonunda sıcaklığın etkisini araştırmışlar ve sıcaklığının 50 ile 60 °C arasında değiştirilmesiyle partikül boyunda net bir büyüme gözlendiğini rapor etmişlerdir. Ober ve Hair<sup>(62)</sup> sıcaklığın partikül büyüklüğüne ve molekül kütesine etkisini stirenin etanol-metoksietanol ortamındaki dispersiyon polimerizasyonunda incelemişlerdir. Araştırmacılar, sıcaklığın artışı ile polimerizasyon hızının arttığını ve oluşan partiküllerin molekül kütesinin azaldığını gözlemişlerdir. Bu çalışmalara dayanarak, polimerizasyon sıcaklığının dispersiyon polimerizasyonuna etkisi şu şekilde açıklanmıştır.

Polimerizasyon sıcaklığının artması ile sürekli fazda oluşan serbest radikal sayısı artar, bu durum ortamdaki oligomerik radikal sayısının artmasına neden olur. Oligomerik radikallerin ortamdaki sayısının artması ile polimerizasyon hızı artar ve daha düşük molekül kütesine sahip partiküller oluşur. Bununla birlikte, polimerizasyon sıcaklığının artışı ile oligomerik radikallerin dispersiyon ortamındaki

çözünürlüğü artar ve çekirdeklenme daha yüksek molekül kütlelerinde gerçekleşir. Sonuç olarak daha az sayıda polimer çekirdekleri oluşur ve bu durum büyük partikül oluşumuna neden olur<sup>(63)</sup>.

Monodispers yapıda partiküllerin sentezlenmesi için, dispersiyon polimerizasyonu süresince karıştırma hızı düzenli ısı transferi sağlayabilecek bir düzeyde tutulmalıdır. Bu amaçla genellikle düşük karıştırma hızlarında çalışılır. Çünkü, yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi partiküllerde monodispers özelliğın bozulmasına ve boy dağılımı oluşmasına neden olur. Polimerizasyon sisteminde karıştırma, bıçak tipi bir karıştırıcı veya çalkalama yolu ile yapılabilir.

Dispersiyon polimerizasyonunda dağıtma ortamının türü ve bileşimi oldukça önemlidir. Dağıtma ortamının polaritesi ve bu ortamdaki monomer çözünürlüğü, sonuç partikül boyutu ve boy dağılımını önemli ölçüde etkilemektedir. Dispersiyon polimerizasyonunda seçilen dağıtma ortamında monomer çözünürlüğünün yüksek, polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenir<sup>(64)</sup>. Polimerizasyonun başlangıcı ile birlikte dağıtma ortamında çözülmüş bulunan monomerin polimerleşerek, katı partiküller olarak ayrılması yani “faz inversiyonu” nun meydana gelebilmesi için bu koşulun sağlanması gereklidir. Seçilen dağıtma ortamı monomeri en iyi şekilde çözebilmelidir ancak aynı zamanda oluşan polimerin mümkün olan en dar boy dağılımı ile çözelti fazından ayrılmasına imkan vermesi de gereklidir.

2000 yılında Horak ve Shapoval<sup>(65)</sup> tarafından yürütölen bir çalışmada, dispersiyon polimerizasyonunda dağıtma ortamının çözünürlük parametresi değiştirilerek 0.5-4.0 µm aralığında poli(GMA) mikro küreler sentezlenmiştir. Hidroksi propil selüloz (HPC) veya selüloz asetat bütirat (CAB) sterik stabilizörleri

varlığında N,N'-dimetilformamid(DMF)/metanol ortamında çözünürlük parametresinin azalması ile boyut dağılımının genişlediği ve partikül boyutunun arttığı gösterilmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonunda ilk kullanılan dağıtma ortamı sudur. Among ve Levy<sup>(63)</sup>, dağıtıcı ortam olarak su, stabilizör olarak ise polivinil alkol (PVA) veya sodyumdodesil sülfatın (SDS) kullanıldığı bir polimerizasyon prosesi ile monodispers poli(stiren) partiküllerini sentezlemişlerdir. Başlatıcı olarak ise benzoil peroksit (BPO), AIBN ve lauril peroksit (LP) gibi stirende çözünebilen yapıları seçmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda partikül boy dağılımının 1-10 µm aralığında olduğu gözlenmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonunda alkol/su ve alkol/eter çözeltileri de dağıtma ortamı olarak kullanılmaktadır. Lok ve Ober<sup>(66)</sup> tarafından yapılan çalışmada saf alkoller, eter/alkol ve alkol/su çözeltileri dağıtma ortamı, BPO başlatıcı, HPC ise stabilizör olarak seçilerek dağıtıcı ortam polaritesinin etkisi araştırılmıştır. Etanol/su dağıtma ortamında su içeriğinin %0-%35 aralığında değiştirilmesi ile ortalama partikül boyutu 1.4-0.91 µm aralığında değişmiştir. Elde edilen sonuçlar, dağıtma ortamının polaritesinin artışı ile ortalama partikül boyutunun azaldığını göstermiştir.

Dispersiyon polimerizasyon sistemlerinde stabilizör türü ve derişimi önemli rol oynamaktadır. Stabilizör hem partikül oluşumu sürecinde partikül kararlılığını sağlar hem de sürekli fazın viskozitesini etkiler<sup>(61)</sup>. Dispersiyon polimerizasyonu ile monodispers partiküllerin sentezlenmesi için kullanılan stabilizörler, polivinilpirolidon (PVP), poliakrilik asit (PAA) ve hidroksi propil selüloz'dur (HPC)<sup>(67)</sup>. Bu yöntemde kullanılan stabilizörler polimerik yapıya sahiptir ve diğer dispersiyon polimerizasyonu parametreleri gibi dağıtma ortamında çözünebilir

yapıdadır. Paine<sup>(64)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, hidroksi propil selüloz stabilizasyonu ve polar yapıdaki çözücü ortamında, stabilizör derişiminin karekökü ile ortalama partikül boyutunun ters orantılı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada bulunan diğer bir sonuç ise, HPC'un molekül kütesinin partikül boy dağılımını etkilemesidir.

Polimerizasyon ortamında stabilizör derişiminin artması ile, ortamda oluşan ilk çekirdekler daha çabuk ve iyi şekilde stabilize olarak birbirlerine yapışmaları önlenerek daha fazla fakat küçük partiküller elde edilir. Böylece stabilizör derişiminin artışı ile polimerizasyon hızı artar. Çünkü, polimerizasyon hızı ortamda oluşan çekirdek sayısı ile orantılıdır<sup>(68)</sup>. Okubo ve arkadaşları<sup>(69)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, poliakrilik asit derişiminin 0.1 g/dl ile 2g/dl aralığında arttırılması ile partikül boyutunun 4.0 µm ile 2.0 µm aralığında azaldığı bununla birlikte monodispersitenin korunduğu gözlenmiştir.

Paine ve arkadaşları<sup>(64)</sup> tarafından yapılan çalışmada ise etanol dağıtma ortamında değişik molekül kütesine sahip PVP stabilizör olarak kullanılmış ve stabilizör konsantrasyonu 4-40 g/l aralığında değiştirilmiştir. Stabilizör konsantrasyonunun artırılmasıyla, bütün stabilizör türleri için ortalama partikül boyutunda lineer bir azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir. Polivinil alkolün stabilizör olarak kullanıldığı bir başka çalışmada dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile 2.6 µm boyutlu monodispers poli(metil metakrilat), p(MMA), partikülleri sentezlenmiştir<sup>(70)</sup>.

Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcıların türü ve derişiminin polimerizasyon hızı ve partikül boyunu etkileyen önemli parametrelerden biri olduğu rapor edilmiştir. Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcılar monomer

fazında çözünebilmektedir. Benzoil peroksit (BPO) ve 2,2'- azobisisobutironitril (AIBN) bu polimerizasyon yönteminde yaygın olarak kullanılan başlatıcılar arasındadır. Bununla birlikte, 4,4'-azobis(4-siyanovalerik asit) (ACVA) ve 2,2'-azobis(2-amino propan) dihidroklorid (AMPA) da araştırmacılar tarafından kullanılmıştır<sup>(71)</sup>. Polimerizasyon sisteminde başlatıcı miktarının artırılması ile elde edilen partiküllerin boy dağılımında bir genişleme ve reaksiyon hızında artış olduğu saptanmıştır. Başlatıcı derişiminin artırılması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalinin oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısılması ile açıklanmaktadır<sup>(72)</sup>.

Monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı, dispersiyon polimerizasyonu ile monodispers partikül sentezinde önemli parametrelerden bir değeridir. Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan oran diğer polimerizasyon tekniklerine göre daha düşüktür. Dispersiyon polimerizasyonunda uygun değerden daha düşük monomer/dağıtma ortamı oranı kullanılırsa, faz ayrımı oluşması ve buna bağlı olarak küresel partiküllerin meydana gelmesi zorlaşır ve şekilsiz partiküller elde edilir. Genellikle, belirli bir monomer/dağıtma oranı aralığında ortalama partikül boyutu artan monomer/dağıtma ortamı oranıyla artış gösterir. Ancak bu oranın çok artırılması polidispers dağılıma sahip partiküllerin oluşmasına yol açar. Çok yüksek monomer/dağıtma ortamı oranlarında ortalama partikül boyutu sonsuza gider, diğer bir ifadeyle bloklama meydana gelir. Lok ve Ober<sup>(60)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, etanol/2-metoksietanol dağıtma sisteminde stiren/dağıtma ortamı hacimsel oranı 1/9 ile 1/2 aralığında değiştirilerek monomer/dağıtma ortamı oranının ortalama partikül boyuna etkisini incelenmiş, bu oranın artması ile partikül boy ve boy dağılımında önemli bir artış olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Dispersiyon polimerizasyonu ile yapılan çalışmalar genellikle stiren, metil metakrilat gibi inert formda partiküllerin üretilmesi üzerinde durulmuştur. Uniform polimerik partiküllerin yüzeyinde fonksiyonel grupların varlığı, partiküllerin türevlendirilmesi gereken uygulamalarda, örneğin ligand bağlanması veya biyolojik moleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması için gereklidir. Genel olarak inert polimerik yüzeyleri türevlendirmek zordur. Bu nedenle, türevlendirilebilen fonksiyonel özelliğe sahip uniform partiküllerin üretilmesi gündeme gelmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak stiren monomerinin çeşitli fonksiyonel monomerler ile kopolimeri hazırlanmıştır. Bu monomerlere örnek olarak; hidroksietil akrilat, metakrilik asit, akrilamid, polidimetilsiloksan ve dimetilaminoetilmetakrilat verilebilir<sup>(73)</sup>.

Fonksiyonel grup taşıyan monodispers yapıda polimerik partiküller çok basamaklı polimerizasyon teknikleri ile de hazırlanabilmektedir<sup>(74)</sup>. Bu yöntemlerden biri emülsiyon yapıcı madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu tekniğine dayalı olarak geliştirilen yöntemdir<sup>(75)</sup>. Burada, devam eden kopolimerizasyon sırasında ortamdaki partikül sayısı sabit tutularak, mevcut partiküllerin monomer-komonomer karışımı ile şişirilmesi sağlanmaktadır. Bu yolla polistiren-polimetakrilik asit, polistiren-polimetilmetakrilat, polistiren polihidroksietilmetakrilat ve polistiren–poliakrilik asit monodispers partikülleri sentezlenmiştir.

Monodispers p(GMA) partikülleri farklı kromatografik uygulamalarda kullanılmaya müsait destek materyalleridir. Kolaylıkla türevlendirilebilen reaktif epoksi grupları taşıyan monodispers p(GMA) partiküllerinin dispersiyon polimerizasyonu ile sentezine yönelik araştırmalar yapılmıştır<sup>(76)</sup>. Jiang ve arkadaşları<sup>(77)</sup> tarafından, manyetik özellikte 4.92 µm çapına sahip monodispers



poli(glisidilmetakrilat-trimetilpropantrimetakrilat), p(GMA-TRI), mikrokürelere dispersiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Epoksi grubu taşıyan başka bir kopolimer Hou ve arkadaşları<sup>(6)</sup> tarafından hazırlanmıştır. Bu çalışmada, 5.1 µm boyutlu monodispers p(stiren-glisidil metakrilat) küreleri dispersiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak sentezlenmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanan 3.0 µm boyutlu gözenekli p(GMA) partikülleri, kapiler elektrokromatografi için iyi bir ayırma performansı sergilediği belirtilmiştir<sup>(78)</sup>. Nükleotit immobilize edilen monodispers poli(glisidil metakrilat-stiren), p(GMA-St) kopolimeri dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanarak DNA afinite-HPLC sistemlerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır<sup>(79)</sup>. Çok basamaklı polimerizasyon yöntemleri ile hazırlanan gözenekli p(GMA) küreleri jel geçirgenlik kromatografisi için uygun destek materyalleri olduğu bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir<sup>(71)</sup>.

## **1.2. Biyomoleküllerin Saflaştırılması İşleminde Kullanılan Teknikler**

Bir hücre veya dokudan istenilen protein yada enzim gibi biyolojik moleküllerin saf halde izole edilmesi oldukça güç bir işlemdir. Saflaştırılmak istenilen proteinin konsantrasyonu düşük ise binlerce farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine uygun olan saflaştırma tekniklerinin seçilmesi gerekir. Proteinlerin saflaştırılmasında bugün kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırmada kullanılan yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılarak hedef protein saf halde veya safa yakın bir şekilde elde edilmektedir. Günümüzde uygun saflaştırma tekniklerinin kullanılmasıyla pek çok enzim ve protein saf ve kristal halde başarılı bir şekilde izole edilmektedir. Biyomoleküllerin

saflaştırılması amacıyla kullanılan teknikler genellikle *Kromatografik, Elektroforetik ve Santrifügasyon* yöntemleri olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır.

Santrifügasyon yöntemlerinde proteinler, yoğunluk veya büyüklüklerinin farklı olmasından yararlanılarak ayrılmaktadır. Elektroforez ve İzoelektrik Odaklama ise yaygın olarak kullanılan Elektroforetik teknikler arasındadır. Elektroforez, yüklü taneciklerin elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanan bir ayırma işlemidir. Proteinler, elektroforez ortamının pH'ına bağlı olarak pozitif veya negatif yüklü olabilir veya yük taşımayabilir. Ortamın pH'ı proteinin izoelektrik pH'ına eşit ise protein net bir yük taşımaz. Bu durumda protein elektriksel alan içinde hareketsizdir. Ortam pH'ı proteinin izoelektrik pH'ından düşük ise protein net bir pozitif yük taşır ve elektrik alanı yönünde hareket eder. Ortam pH'ı proteinin izoelektrik pH'ından yüksek olduğu durumda ise protein net bir negatif yük taşır ve elektrik alanına zıt yönde hareket eder. Böylece, belli bir pH değerinde artı ve eksi yükler taşıyan proteinler elektrik alanındaki hareket yönlerine göre birbirlerinden ayrılabilirler. Diğer taraftan, aynı yönde hareket eden proteinlerin büyüklükleri ve şekilleri genellikle farklı olacağından, elektrik alanı içinde belli bir süre sonunda aldıkları yollar da farklı olacaktır. Böylelikle aynı işaretli yükler taşıyan proteinler de ortamda karşılaşacakları farklı dirençlere bağlı olarak birbirlerinden ayrılırlar.

İzoelektrik odaklama ise, proteinlerin bir pH gradyentinde izoelektrik noktalarının farklı olmasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, yüksek hareketliliğe sahip sentetik poliamino-polikarboksilik asitlerin karışımından oluşan amfoter bileşikler içeren jel polimerleştirilir. pH gradyenti oluşturmak için ise sisteme akım verilir ve amfolitler izoelektrik noktalarına göre jelde düzenlenirler. En asidik olan anoda, en bazik olan katoda doğru ilerler. Daha sonra örnek proteinler

jele uygulanır ve yüklerine göre anoda ve katoda doğru hareket ederler. Proteinler jel üzerinde net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederek ve bu noktada hareketsiz kalarak dururlar. Bu şekilde ayırım sağlanmış olur.

Jel Filtrasyon, İyon Değişim ve Afinite kromatografisi, proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan kromatografik tekniklerdir.

Jel filtrasyon Kromatografisi, proteinlerin molekül ağırlıklarının farklı olması prensibine dayanarak ayrılmalarını sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemde, proteinlerin birbirinden ayrılması, sabit fazı oluşturan jelin gözenek büyüklüğüne göre moleküllerin alıkonması esasına dayanmaktadır. Gözenekli bir jelin bulunduğu bir kolondan yerçekimi etkisiyle hareket eden protein çözeltisi içerisinde bulunan küçük molekül ağırlığındaki proteinler jeldeki gözeneklere girerken, büyük molekül ağırlıklı proteinler gözeneklere girmeden kolonu ilk olarak terk ederler.

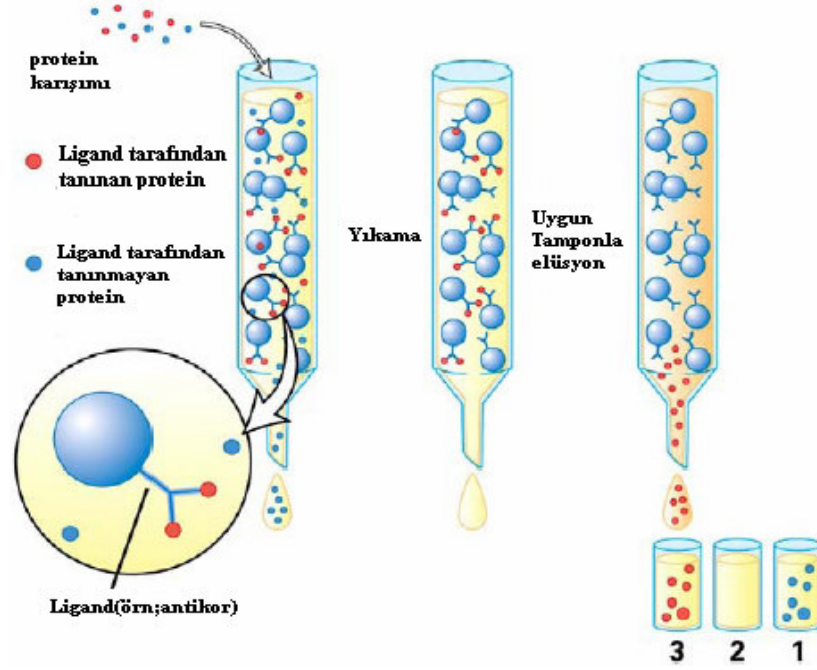
Proteinlerin saflaştırılması amacıyla kullanılan bir diğer kromatografik teknik olan iyon değişim kromatografisi, üzerinde yüklü gruplar bulunan katı ve poröz bir destek materyalinden iyonize analit karışımının elüe edilmesi prensibine dayanan bir sıvı kromatografisi olarak sınıflandırılabilir. İyon değişim kromatografisinde kullanılan sabit fazlar, genellikle sentetik organik polimerlerin türevlendirilmesiyle üretilen polimerik materyallerdir. İlk sentezlenen polimer bazlı iyon değiştiriciler stiren divinilbenzen (S-DVB) kopolimerizasyonu veya akrilik veya metakrilik asitin divinil benzenle kopolimerizasyonu ile üretilmiştir<sup>(80)</sup>.

### 1.2.1. Afinite Kromatografisi

Proteinlerin saflaştırılması amacıyla kullanılan kromatografik teknikler arasında yer alan afinite kromatografisi 70 yılı aşkın bir süredir biyokimya ve biyoteknoloji alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır<sup>(81)</sup>. Son 20 yıldır yayınlanan 27.000'in üzerindeki makalede afinite kromatografi teknikleri tanımlanmakta veya tartışılmaktadır<sup>(82)</sup>.

Afinite kromatografi, biyomoleküllerin tayini, izolasyonu, ayrımı ve saflaştırılması için iyi tasarlanmış ve oldukça yüksek spesifik moleküler tanıma üzerine kurulmuş eşsiz bir ayırma yöntemidir<sup>(83)</sup>. Afinite kromatografi yöntemi, 1968 yılında Cuetracasas ve arkadaşları tarafından ilk kez kullanıldığından beri, binlerce farklı molekülün (enzimlerin, antikorların, hormonların, vitaminlerin, nükleik asitlerin) hatta bakteri, virüs ve hücrelerin ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmıştır<sup>(84)</sup>.

Bu yöntemde, ligand olarak isimlendirilen moleküler tanıma kapasitesine sahip bir molekül, uygun çözünmeyen genellikle polimerik bir küre yada membran yapıda olan bir destek materyali üzerine immobilize edilir<sup>(85)</sup>. İzole edilmek istenen molekül, matriks üzerine immobilize edilmiş ligand tarafından kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile ayrıştırılır. Daha sonra, pH, iyonik şiddet veya sıcaklık ayarlanarak, uygun eluentlerin kullanıldığı desorpsiyon koşulları altında ligand ile hedef molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimin bozulması sonucu hedef molekül saf olarak elde edilir<sup>(84)</sup> (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3** Afinite Sistemin Şematik Gösterimi<sup>(80)</sup>

### 1.2.1.1. Ligand

Başarılı bir afinite sisteminin hazırlanması için önemli faktörlerden biri uygun ligandın seçimidir. Ligand, hedef moleküle spesifik ve tersinir olarak bağlanmalı ve destek materyaline bağlanmaya izin verecek fonksiyonel gruplar (örneğin,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CHO$ ,  $-SH$  ve  $-OH$  gibi) içermelidir.

Proteinler, enzimler, hormonlar, antikorlar, nükleik asitler (DNA, RNA), oligopeptitler ve oligonükleotitleri içeren bifonksiyonel moleküllerin büyük bir bölümü afinite sistemlerin hazırlanmasında ligand olarak kullanılmaktadır<sup>(86)</sup>. Bu ligandların son derece spesifik olmalarının yanında, üretim ve kapsamlı saflaştırma basamaklarının maliyetleri oldukça yüksektir. Bununla birlikte, afinite sistemlerin hazırlanması sırasında uygun yönlendirmede destek materyaline immobilize

edilmelerinin güç olması bu ligandların önemli dezavantajlarından<sup>(83)</sup>. Üstelik, bu ligandların bağlanma sabitleri ( $10^6$ - $10^8$   $M^{-1}$ ) çok yüksektir ve elüsyon basamağı hedef biyomolekülün aktivitesinde kayıplara yol açan zor koşulları gerektirir<sup>(87)</sup>. Afinite sistemlerindeki bu problemleri gidermek için Vijayalakshmi<sup>(88)</sup> tarafından “*pseudobiyospesifik*” olarak isimlendirilen düşük molekül kütleli ligandlar geliştirilmiştir. Boyalar<sup>(89)</sup>, metal şelatlar<sup>(90)</sup> ve aminoasitler<sup>(91)</sup> afinite kromatografi yönteminde *pseudobiyospesifik* ligand olarak kullanılmaktadır. Pseudobiyospesifik ligandlar, güçlü kimyasal şartlara ve yüksek sıcaklıklara karşı kararlıdır. Bu ligandlar, düşük maliyete ve bağlanma sabitlerine ( $10^4$ - $10^6$   $M^{-1}$ ) sahip olmalarına rağmen elektrostatik, hidrojen bağı ve Van der Waals etkileşimlerinin toplam etkisi sonucu olarak yüksek seçicilik gösterirler<sup>(92,93)</sup>.

Afinite Kromatografi sistemlerinde zaman zaman afinite adsorbent, ligandın düşük sterik ulaşılabilirliği nedeniyle zayıf seçicilik ve düşük bağlanma kapasitesi gösterir. Ayrıca liganda bağlanan biyolojik molekül ve taşıyıcı arasındaki sterik girişim yüzünden biyolojik molekülün inaktivasyonuna neden olabilir. Bu durum ile genellikle küçük ligandların (örneğin; enzim kofaktörleri gibi) kullanıldığı afinite sistemlerinde karşılaşılır. Bu olumsuzluklar taşıyıcı ve ligand arasına saflaştırılmak istenen moleküle ligandın kolaylıkla ulaşmasını sağlamak amacıyla “uzatma kolu” adı verilen moleküllerin yerleştirilmesi ile giderilebilir. Yaygın olarak kullanılan uzatma kolları, her bir zincirin sonuna iki fonksiyonel grup yerleşmiş olan alifatik lineer hidrokarbon zincirleridir. Gruplardan biri (sıklıkla primer amin,  $-NH_2$ ) matrikse bağlanır, diğer ucu ise liganda bağlanır. Liganda bağlanan kısım terminal grup adını alır ve genellikle karboksil ( $-COOH$ ) yada amino( $-NH_2$ ) grubudur. Hekzametilendiamin, 6-amino hekzanoik asit, gibi bileşikler afinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılan uzatma kollarıdır<sup>(94)</sup>.

Afinite kromatografisinde, aktivasyon işlemi destek materyaline ligand bağlanması için gerekli olan reaktif grupların elde edilmesi, dolayısıyla hedef biyomoleküle yüksek seçiciliğin sergilendiği iyi bir ayırımın sağlanması için uygulanan çeşitli yöntemleri içerir. Bu doğrultuda siyanojen bromür, epoksit, peroksit, triazin aktivasyonu gibi destek materyalindeki fonksiyonel grupların varlığına göre farklı aktivasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Diğer önemli aktivasyon yöntemleri, glutarikdialdehit, karbonilasyon, sülfonik asit klorid ve Wood K yöntemi sayılabilir.

### **1.2.2. Boya Ligand Afinite Kromatografi**

Afinite tekniklerinden biri olan boya ligand afinite kromatografisi<sup>(93)</sup>, biyomoleküllerin laboratuvar ve büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde araştırmacılar tarafından yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu yöntem, tek basamakta yüksek seçicilik, saflık ve geri kazanım sağlamaktadır<sup>(95)</sup>.

Boya ligandlar ticari olarak elde edilebilir, reaktif fonksiyonel grupları sayesinde destek materyaline kolaylıkla bağlanabilir, kimyasal ve biyolojik degradasyona karşı dayanıklıdır. Bu tür ligandlar bir çok proteinin aktif bölgeleri ile proteinlerin kofaktör yada bağlanma ajanlarının yapılarını taklit etmek suretiyle etkileşir<sup>(96)</sup>. Reaktif boya olarak bilinen çok sayıda tekstil boyası, çeşitli biyomoleküller ile iyonik, polar ve hidrofobik etkileşimlerde bulunmaktadır. Boya ligand afinite sistemlerinde kullanılan reaktif boyalarının çoğu, reaktif gruba bağlı bir kromofor grup içerir. Ayrıca, sulu ortamda molekülün çözünürlüğünü sağlayan sülfonil grupları da içerirler. Bununla birlikte bazı boyalar, karboksil, amino, klorür yada metal kompleks gruplarına (aromatik halka içinde yada dışarıda azot içerir)

sahiptir. Bugün, triazin bazlı reaktif boyalar, proteinlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(97)</sup>.

Blue dextran ile bazı kinazlar arasında beklenmeyen bir etkileşimin keşfedilmesiyle birlikte<sup>(82)</sup> boya ligand afinite kromatografisi, ilk kez Roschlan ve Hess<sup>(98)</sup> tarafından Cibacron Blue tekstil boyasının Sephadex G-200 üzerine kovalent olarak bağlanması ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Daha sonra bu boya ligandı bir çok araştırmacı tarafından farklı destek materyallerine bağlanarak biyomoleküllerin saflaştırma işlemlerinde yaygın biçimde kullanılmıştır<sup>(99)</sup>. Günümüzde ise tekstil boyalarının ligand olarak kullanıldığı protein saflaştırma çalışmaları hala devam etmektedir<sup>(100)</sup>.

Nie ve arkadaşları<sup>(101)</sup>, Cibacron Blue F3GA tekstil boyasının ligand olarak kullanıldığı kitosan kaplı naylon membran temelli afinite membranların papain adsorpsiyon performansını araştırmışlardır.

Wu ve arkadaşları<sup>(72)</sup>, Procion Blue MX-R boya ligandının kovalent olarak bağlandığı monodispers poli(glisidilmetakrilat-etilendimetakrilat), p(GMA-EDMA), kürelerini lizozim, ve insan serum albumin proteinlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografi ayrımları için kolon dolgu materyali olarak kullanmıştır. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(97)</sup> Reactive Green 5 bağlı pHEMA, membranlarının IgG adsorpsiyonu ve saflaştırılması üzerine performansını araştırmış ve yüksek saflıkta IgG elde etmeyi başarmışlardır. IgG adsorpsiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan bir başka boya ligand afinite sisteminde, Procion Red HE-3B ve Red-120 boya ligandları bağlı pHEMA membranları kullanılmıştır<sup>(96)</sup>.



### 1.2.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)

İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi, IMAC, ilk olarak Porath ve çalışma arkadaşları tarafından Metal Şelat Afinite Kromatografisi adı altında bilim dünyasına sunuldu<sup>(90)</sup>. Bu kromatografi yöntemi, Helferrich'in küçük moleküller için geliştirdiği Ligand Değişim Kromatografisinin özel bir durumu olarak kabul edildi<sup>(102)</sup>.

Tekniğin temeli, bir kromatografik destek materyaline immobilize edilen metal şelat ligandlara bağlı metal iyonlarına proteinlerin afinitesi üzerine dayanmaktadır<sup>(103)</sup>. Bu "biyoafinite" özellik kısa zaman içinde afinite kromatografi yöntemini kullanan araştırmacıların büyük ilgisini kazanmıştır. En iyi bilinen ilerleme, rekombinant polipeptitlerin ayrımı için histidin parçalarının kullanılmasıdır<sup>(104)</sup>.

İmmobilize metal afinite kromatografisinde proteinlerin adsorpsiyonu, immobilize metal iyonu ve protein yüzeyindeki elektron verici gruplar arasındaki koordinasyona dayanmaktadır. Ayrım, bir Lewis asidi (elektron çifti alıcısı, örneğin bir metal iyonu) ile protein yüzeyindeki elektron taşıyıcı atomlar (N, O ve S) arasındaki etkileşim sayesinde gerçekleşmektedir<sup>(105)</sup>. Proteinlerin, başlıca histidinin imidazol grubu, triptofanın indol grubu ve sisteinin tiyol grupları ile etkileşime katıldığı kabul edilir. Komşu aminoasit yan zincirleri arasındaki ilişki ve bölgesel konformasyonlar proteinin bağlanması önemli rol oynar. Ayrıca aromatik amino asitler ve peptitlerin amino asit uç grupları da bağlanmaya katkıda bulunur<sup>(106)</sup>.

Metal-protein bağının sağlamlığı, proteinden proteine değişir ve bir çok durumda bu farklılık spesifik proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılır<sup>(107)</sup>. Bir metal için protein ilgisindeki farklılıklar Pearson tarafından

ifade edilen sert ve yumuşak asit ve baz prensibiyle açıklanabilir. Bu teoriye göre, iki atom bir bağ oluşturduğu zaman, bir atom Lewis asidi ve bir diğeri ise Lewis bazı olarak davranır. Bağın sağlamlığı atomları içeren “sertlik” yada “yumuşaklık” sınıflamasını belirler. Ca(II), Mg(II) ve Fe(III) gibi metal iyonları sert Lewis asidi olarak sınıflandırılırken, Ag(I), Cu(I), Cd(II), Hg(II) metal iyonları yumuşak Lewis asitleri olarak ayrılır. Co(II), Zn(II), Cu(II) ve Ni(II) gibi sınır metal iyonları ise ortada olduğu düşünölür<sup>(108)</sup>.

Kromatografik destek materyaline bağlanmış olan şelat bileşikleri içindeki elektron verici atomların metal ile oluşturduğu koordinasyon sayısına göre, bidentat, tridentat, tetradentat, pentadentat metal şelatları oluşur, geriye kalan koordinasyon bölgeleri su molekülleri ile işgal edilmiştir ve proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirmesinin sonucu olarak protein bağlanır.

Kromatografik uygulamalarda metal iyonlarının immobilizasyonu için bidentat şelatlayıcı bileşikler olarak; aminohidroksamik asit ve salisilaldehit, tridentat şelatlayıcı bileşikler olarak; iminodiasetik asit (IDA), dipikoliamin, ortofosferi, 2,6-diaminometilpiridin, tetradentat ligand olarak; nitriloasetik asit (NTA) ve karboksimetilaspartik asit ve tris(karboksimetil) etilendiamin ise pentadentat olarak kullanılmaktadır<sup>(109)</sup>.

şelatlayıcı maddelerin serbest koordinasyon bölgelerinin sayısındaki farklılıklar, hedef proteine karşı farklı seçicilik ve adsorpsiyon aktiviteleri göstermelerini sağlar. Örneğin, üç dişli ligand olan iminodiasetik asit, İDA, kullanıldığında metal azot atomu ve iki karboksilli oksijen üzerinden bağlanacaktır. Bu yöntemde metal iyonlarının immobilizasyonu için en yaygın kullanıma sahip ligand iminodiasetik asittir<sup>(110)</sup>.

İmmobilize metal afinite kromatografisi ile proteinlerin ayrımı, ligand ve uygun metal iyonu seçimiyle optimum koşullar sağlandığı zaman, diğer afinite tekniklerine kıyasla daha yüksek bir seçiciliğe sahiptir. Bu yöntemde ligand kararlılığı ve yüksek seçiciliği, yüksek protein yükleme kapasitesi, ılıman elüsyon koşulları, basit rejenerasyon, metal iyonlarının düşük maliyeti ve adsorbentlerin metal şelat özelliklerinde tayin edilebilir bir kayıp olmaksızın yüzlerce kez kullanılabilmesi, IMAC uygulamalarının sunduğu avantajlar olarak sıralanabilir<sup>(111)</sup>. Ayrıca, IMAC aynı ligandın farklı proteinlerin adsorpsiyonunda ve aynı matrikse farklı metal iyonlarının şelatlanmasıyla kullanılabilmesinden dolayı çok yönlü bir yöntemdir<sup>(112)</sup>.

İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile immunoglobulin G saflaştırılmasında, etkileşimler üzerine yapılan çalışmalar doğrultusunda yaygın şelatlayıcı grupların iminodiasetik asit (IDA) ve imidazol olduğu kaydedilmiştir<sup>(113)</sup>. Farklı kaynaklardan immünoglobulinlerin IMAC matriksleri üzerine adsorpsiyonu bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Porath ve Olin, agaroz-İDA-Ni(II) destek materyali ile insan serumundan; Boden ve arkadaşları Novarose-TREN-Cu(II) destek materyali ile keçiden; Hale ve Beidler evcilleştirilmiş sıçandan İDA-Ni(II) destek materyali kullanarak IgG saflaştırmayı başarmışlardır<sup>(114)</sup>.

Başka bir çalışma ise Hari ve arkadaşları tarafından albumin,  $\gamma$ -globulin, fibrinojen karışımından,  $\gamma$ -globulinin seçici olarak uzaklaştırması amacıyla Cu(II) metal iyonları immobilize edilmiş selüloz membranlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir<sup>(115)</sup>.

#### 1.2.4. Polimerik Partikül Yüzeylerinin Aşılama Yöntemi Kullanılarak Modifikasyonu ve Afinite Kromatografi Alanındaki Uygulamaları

Yüzey modifikasyonu, son yıllarda pratik uygulamalar için bir materyale istenen özelliklerin sağlanması için kullanılan yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Yüzey modifikasyon yöntemleri arasında yer alan aşılama metodu ile polimerik fırçaların oluşturulması ilk kez Tsukahara ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir<sup>(116)</sup>.

Son on yıldır katı yüzeyler üzerine “fırça” olarak isimlendirilen polimerlerin aşılmasına olan ilgi giderek artmaktadır<sup>(117)</sup>. Polimerik fırçalar, yüzeye yoğun olarak aşılandığında, yüzeyden uzanan yan zincir polimerleri olarak tanımlanmaktadır. Çapraz bağlı polimer partikülleri üzerine lineer polimerlerin aşılması, çözünmezlik sağlamanın yanı sıra fonksiyonel grup taşıyan polimerlerin yapıya katılması ve polimer zincirlerin esnekliğine olumlu özellikler kazandırılması nedeni ile kromatografik uygulamalarda önemli bir yere sahiptir<sup>(118)</sup>. Polimer yüzeyinde oluşturulan fırça tipi bu yan zincirler, hedeflenen biyolojik molekülün destek materyaline çok tabakalı bağlanmasına izin vererek adsorpsiyon kapasitesini ve etkinliğinin arttırmasına olanak sağlamaktadır. Bu materyallerin yüksek spesifik arayüzeyler sergilemesi nedeni ile biyolojik akışkanlardan hedeflenen protein izolasyonu ve enzim immobilizasyonu işlemlerinde başarı ile kullanılabilir<sup>(119)</sup>.

Geleneksel olarak polimer zincirlerine yan zincirlerin aşılması için radikal yada atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) teknikleri kullanılmaktadır<sup>(116)</sup>. Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan polimerik yüzeylerin modifikasyonu amacıyla bu tekniklerin kullanıldığı bir çok araştırma literatürde rapor edilmiştir. M.

Goto ve arkadaşları<sup>(120)</sup>, aşı polimerizasyonu ile gözenekli hollow-fiber membranlar üzerine epoksi (GMA), hidroksil (-OH) yada dietil amino gibi çeşitli fonksiyonel grupları aşılıyarak enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanmışlardır. Yamashiro ve arkadaşları<sup>(121)</sup>, aşı polimerizasyon tekniğini kullanarak, gözenekli polietilen bir şerit üzerine epoksi grubu taşıyan vinil monomerini aşılıyarak, katı faz ekstraksiyon yönteminde kullanmışlardır. R. Yokoyama ve arkadaşları<sup>(122)</sup>, radikal aşılama polimerizasyonu ile, silika nanopartiküllerinin yüzeyine 2-metakriloksietil fosfoklorin (MPC) aşılıyarak biyoteknolojik uygulamalar için biyoyumlu bir polimer elde etmeyi başarmışlardır. Radikal aşılama polimerizasyonu kullanıldığı bir başka çalışma Savina ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, gözenekli poliakrilamid jeller üzerine N,N-dimetiaminoetil metakrilat (DMAEMA) aşılıyarak, protein bağlama kapasitesi araştırılmıştır<sup>(123)</sup>. Wang ve arkadaşları<sup>(124)</sup>, poli(dimetilsiloksan) yüzeyine [(N-Süksinimid)süksinil)-o-metil-poli(etilenglikol)] aşılıyarak, aminoasitlerin elektroforez ile ayrımında kullanmışlardır. Poli(dimetilsiloksan)ının yüzey modifikasyonu için yapılan bir başka çalışmada foto başlatıcılı aşılama polimerizasyon tekniği kullanılarak, polietilen glikol monoakrilat ve polietilen glikol diakrilat aşılıyarak, her iki aşı kopolimerinin protein adsorpsiyon kapasiteleri ve hücre adezyonları araştırılmıştır. Şenkal ve arkadaşları<sup>(118)</sup>, atom transfer radikal polimerizasyonu yöntemiyle, çapraz bağlı poli(stiren) küreleri üzerine poli(glisidilmetakrilat) aşılıyarak, atık sulardan boya giderilmesi amacıyla kullanmışlardır.

### 1.2.5. Afinite Kromatografisi Uygulamalarında Kullanılan Destek Materyalleri

Afinite Kromatografisinde kullanılacak ligandın bağlanacağı destek materyalinin seçimi, uygulamanın hedeflenen başarıya ulaşmasında en önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle destek materyali, kullanıldığı ortamda çözünmez yapıda, yüksek yüzey alanına sahip uygun ve sağlam bir partikül formunda, mekanik ve kimyasal olarak kararlı, ligandın bağlanabilmesi için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip, mikrobiyal ve enzimatik bozulmaya karşı dayanıklı ve hidrofilik karakter sergileyebilmelidir. Ayrıca, kromatografik uygulamada kullanılacak materyal, proteinlerin non spesifik adsorpsiyonuna sebep olmamalı, dejenere olmadan rejenerasyona izin vermeli ve kromatografik yürütme esnasında yapısında hiçbir büzülme veya şişme olmamalıdır<sup>(125)</sup>.

Bir kromatografik destek materyali tasarlandığı zaman, farklı gereksinimler düşünülmelidir. Kromatografik ayırım, ayırma ortamının kimyasal yapısı ile kontrol edilir, bununla birlikte gözeneklilik, sertlik gibi diğer özellikler de iyi bir kromatografik ayırımın sağlanması için büyük öneme sahiptir<sup>(126)</sup>. Özellikle protein adsorpsiyonu, afinite matriksin yüzey kompozisyonu ve morfolojisine bağlıdır<sup>(127)</sup>.

Kromatografik uygulamalarda doğal (agaroz, dekstran, selüloz ve türevleri ve kitosan gibi polisakkaritler) ve sentetik (poliakrilamid, poliakrilat gibi) polimerler ile silika gibi anorganik materyaller destek materyali olarak kullanılmaktadır<sup>(128)</sup>. Agaroz ve dekstran gibi doğal polimerlerin mekanik olarak zayıf ve yüksek basınç ve akış hızlarına dayanıksız olması nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Silikanın ise, uç pH değerlerinde kararsız ve kolonların yıkanması sırasında kullanılan alkali çözeltilere karşı dayanıksız olması kromatografik çalışmalarda kullanımını zorlaştırmaktadır<sup>(72)</sup>.

Bununla birlikte, sentetik polimerik destek materyalleri yüksek kimyasal ve mekaniksel kararlılığa sahip olmaları ve hazırlanmaları esnasında kontrol edilebilen yapısal özellikler sergilemeleri nedeniyle kromatografik çalışmaların ilgi odağı olmuştur<sup>(129)</sup>.

Sentetik polimerler arasında yer alan metakrilat temelli destek materyalleri hem asidik hem de bazik koşullar altında kararlıdır ve bir dizi basit reaksiyon ile kolaylıkla fonksiyonlandırılarak yüksek kapasitede amin ve karboksil grupları taşıyan sabit fazlar hazırlanmasına olanak sunarlar<sup>(126)</sup>. Bu materyaller, mikrobiyal degradasyona karşı dayanıklı uzun ömürlü polimerlerdir<sup>(89)</sup>.

Akrilik ve epoksi grupları içeren glisidil metakrilat (GMA) monomeri, çift fonksiyonlu bir yapı sunar ve polimer dizaynında kullanım serbestliği ve esneklik sağlar. Akrilik grup, sulu ve susuz sistemlerde diğer vinil monomerleri ile kopolimerizasyona izin verirken, epoksi grupları (i) aminler, karboksilik asitler, anhidritler ve hidroksil içeren polimerler ile çapraz bağlanma reaksiyonlarına ve (ii) polimer zincirin yapısal modifikasyonuna izin verir<sup>(130)</sup>.

Bu doğrultuda, araştırmacıların protein saflaştırılması için yeni destek materyalleri elde etme çabalarının sonucu yapılarında epoksi grubu taşıyan glisidil metakrilat temelli polimerler kullanılmaya başlanmıştır<sup>(131)</sup>. Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, enzim ve proteinlerin laboratuvar ve endüstriyel ölçekte adsorpsiyonu ve immobilizasyonu için elverişlidir. Epoksi içeren destek materyalleri 1.0-12.0 gibi geniş pH aralığında kararlı bir yapıya sahip olması ve farklı protein grupları ile kararlı O-C ve N-C kovalent bağlarını oluşturabilmesi nedeni ile biyomoleküllerin ayrıştırma ve saflaştırma işlemlerinde etkili biçimde kullanılmaktadır<sup>(105)</sup>.

Afinite Kromatografisinde kullanılan destek materyalleri küre, çubuk veya membran yapıda hazırlanabilir. Kromatografik yöntemlerle proteinlerin saflaştırılması için küre geometrisine sahip adsorbentler sıklıkla kullanılmaktadır<sup>(132,133)</sup>. Küre yapıdaki destek malzemelerinin kullanılması hedef moleküllerin karışımdan direkt olarak izole edilmesi ve saflaştırılmasını sağlamanın yanında, işlem zamanının da önemli ölçüde azalmasını sağlar. Küre yapıdaki destek malzemeleri kolon uygulamalarında minimum kanallaşma ile mükemmel akış özelliği sergiler. Afinite kromatografisinde kullanılan küre yapıdaki materyallerin boyutu genellikle 50-400 µm aralığındadır. Genellikle, kolon uygulamalarında destek materyalleri olarak kullanılan kürelerin partikül boyutunun büyük ve geniş dağılımı karışımdaki bileşenlerin ayırım gücünü sınırlamaktadır. Bu nedenle, kolonda düşük geri basınç ve iyi ayırım gücü elde edilebilmesi için partikül boyut dağılımının monodispers olması istenir. Eş boyutlu kromatografik destek materyalleri, geniş büyüklük dağılımlı materyallere göre uniform akış hızı profili, düşük geri basınç, yüksek ayırıcılık ve yüksek hızda ayırım gibi avantajlar sunar<sup>(134)</sup>.

Afinite Kromatografi ayırımlarında, hızlı bağlanma kinetikleri ile yüksek bağlanma kapasitelerine ulaşmak için adsorpsiyonda büyük spesifik yüzey alanına sahip afinite sorbentlerin kullanılması tercih edilir<sup>(32)</sup>. Bu amaçla, yüzey alanını pratik olarak kullanışlı bir seviye olan 100 m<sup>2</sup>/ g değerine ulaşmak için ya gözenekli ya da gözeneksiz nano boyutlu küreler kullanılmalıdır. Nano boyutlu partiküller, biyoanaliz ve biyoteknoloji uygulamalarında eşsiz optik özelliklere, yüksek yüzey/hacim oranı ve diğer büyüklüğe bağlı niteliklerinden dolayı ümit vermektedir. Bu özellikler yüzey modifikasyonu ve partiküllerin ayarlanabilir bileşimi ile bir araya getirildiğinde seçiciliği yüksek biyolojik analizler için uygulama alanı sağlar<sup>(76)</sup>. Gözeneksiz nano boyuttaki adsorbentlerin başlıca avantajı ise belirgin iç partikül



difüzyon direncini önemli derecede azaltmasıdır. Bu durum özellikle, proteinlerin yüksek verimlilik ve ayırıcılıkla hızlı analizi için oldukça yararlıdır. Hızlı ayırım, kalite kontrol, on-line izleme ve rekombinant ürünlerin peptit haritası gibi biyomoleküllerin saflığını kontrol edebilme imkanı sağlar<sup>(135)</sup>.

### **1.2.5.1. Manyetik Temelli Afinite Destek Materyalleri**

Protein saflaştırılması işlemi amacı ile yeni destek materyallerinin geliştirilmesi halen önemini koruyan bir araştırma alanıdır<sup>(136)</sup>. Günümüzde, araştırmacılar hücre ayırımı, enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılması gibi birçok biyoteknoloji ve medikal alanlardaki uygulamalarından dolayı  $Fe_3O_4$  partiküllerinin enkapsüle edildiği manyetik özellikteki materyallerin sentezlenmesine ilgi duymaktadır<sup>(137)</sup>.

Manyetik özellik kazandırılmış destek materyalleri, yüksek kütle transfer hızı, hızlı işlem süresi, kolay ayırım ve yüksek verimliliğe sahiptir<sup>(138)</sup>. Bunun yanı sıra, kolay geri kazanım, kararlılık ve güçlü fiziksel ve kimyasal özellikler, düşük maliyet, üstün biyolojik uyumluluk ve aktif fonksiyonel grup çeşitliliği sayesinde biyoteknolojik uygulamalarda avantajlar sunar<sup>(137)</sup>. Manyetik küreler dolgu yatak ve geleneksel akışkan yatak sistemlerinin kullanıldığı kromatografik ayırmalarda karşılaşılan birçok problemi ortadan kaldırır<sup>(133)</sup> ve işletim maliyetlerini de önemli derecede azaltır<sup>(139)</sup>.

Manyetik destek materyalleri inorganik materyaller yada sentetik yada doğal polimerlerden hazırlanabilmektedir. İnorganik malzemelerin en büyük dezavantajı metal iyonlarıyla kompleksleşme için işlevsel gruplarının kısıtlı olmasıdır. Organik kökenli doğal yada sentetik polimerik materyaller hedef uygulamalara göre

hazırlanabilmeleri, fonksiyonel grup çeşitliliği ve gözenekli yada gözeneksiz olarak hazırlanabilmeleri nedeniyle manyetik destek materyali olarak kullanımları tercih edilmektedir<sup>(138,139)</sup>. Bu nedenle, yüksek manyetik cevaba sahip, süper paramanyetik özellikteki polimerik partiküllerin üretimi, son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur<sup>(137)</sup>.

Polimerik manyetik mikro kürelerin hazırlanması için çeşitli yollar vardır. Bunlar arasında *i*) manyetik partiküllerin polimer ile kaplama yada enkapsülasyonu ve *ii*) monomer polimerizasyonu yer almaktadır. Birinci yöntem, manyetik çekirdek ( $Fe_3O_4$ ) ve manyetik çekirdeği çevreleyen polimerik kabuktan oluşmaktadır<sup>(140)</sup>. Polistiren, polivinil bütiral ve polivinil alkol gibi polimerler manyetik çekirdeği kaplamak için yaygın biçimde kullanılmaktadır. Dekstran, agaroz ve selüloz gibi doğal polimerler de ayrıca kaplayıcı materyaller olarak kullanılmaktadır.

Monomer polimerizasyonuna dayalı yöntem daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, emülsiyon, süspansiyon ve dispersiyon polimerizasyon teknikleri ile polimerik manyetik partiküller hazırlanabilmektedir<sup>(134)</sup>. Süspansiyon polimerizasyonu ile yüksek magnetit içerikli küre şeklinde partikül üretiminin daha basit<sup>(138)</sup> olması sebebiyle büyük ölçekli uygulamalarda genellikle süspansiyon polimerizasyonu yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde, monomerler ve manyetik materyal birlikte polimerizasyon ortamında karıştırılır. Diğer polimerizasyon koşullarının ayarlanması ile manyetik polimerik mikro küre oluşturmak üzere polimerleştirilir. Son zamanlarda monomer polimerizasyonu yöntemi ile manyetik özellikteki polimerik destek materyallerinin hazırlanmasında, akrilat kökenli polimerler tasarlanan uygulamalar için çeşitli fonksiyonel gruplar ile

kolaylıkla fonksiyonlandırılabilir olmaları nedeniyle biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda araştırmacılar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmıştır<sup>(137)</sup>.

Bayramoğlu ve Arıca<sup>(138)</sup>, yeni bir teknik geliştirerek süper paramanyetik özelliğe sahip poli(metakrilik asit-metil metakrilat-etilenglikoldimetakrilat), p(MAA-MMA-EGDMA) mikro kürelerini süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlayarak protein adsorpsiyonu çalışmalarında kullanmışlardır. Aynı yöntemle, Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(141)</sup> tarafından glutamik asit immobilize edilen manyetik poli(glisidil metakrilat-metil metakrilat), mp(GMA-MMA), küreleri süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanarak sitokrom c adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Chung ve arkadaşları<sup>(142)</sup> tarafından süper paramanyetik poli(glisidil metakrilat-stiren), p(GMA-St), partikülleri yeni bir polimerizasyon yöntemiyle hazırlanarak, DNA probu olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Öktem ve arkadaşları<sup>(143)</sup> tarafından manyetik poli(glisidil metakrilat-etilenglikol dimetakrilat), p(GMA-EGDMA), mikroküreleri Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano partikülleri varlığında süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmış ve manyetik özellik kazandırılmış partiküller üzerine DNA polimeraz enzimine spesifik DNA-aptamer ligandı kovalent olarak tutuklanmış ve hücre özütünden recombinant Taq polimerazın saflaştırılması işleminde kullanılmıştır. Çalışmada, saflaştırılan Taq polimeraz enziminin saflığı ve geri kazanımı sırası ile % 93 ve %89 olarak, HPLC sistemi ile belirlendiği rapor edilmiştir.

### 1.3. BİYOMOLEKÜLLER VE ÖZELLİKLERİ

Proteinler, neredeyse tüm biyolojik işlemlerde anahtar rol oynayan makro moleküllerdir. Proteinler, taşıma ve depolama, bağışıklık sisteminin korunması, uyarı, metabolizmanın bütünleşmesi ve büyüme ve farklılıkların kontrolü gibi geniş bir işlev aralığında görev alır. Proteinlerin temel yapıları amino asitlerdir. Bakteriden insana kadar tüm türlerdeki tüm proteinler aynı yirmi amino asitten oluşmuştur. Bu yapıcı blokların yan zincirleri büyüklük, şekil, yük, hidrojen bağı kapasitesi ve kimyasal reaktivite yönünden farklılık gösterir. Bir proteinin biyolojik fonksiyonunun önemli göstergesi, molekül atomlarının üç boyutlu düzenini ifade eden konformasyonudur. Polipeptit zincirlerinin düzenli olarak tekrar eden üç konformasyonu  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -platalet düzlemi ve kollojen heliks olarak bilinmektedir. Proteinler, spesifik olarak tanıma kabiliyetine sahip ve farklı moleküller ile etkileşebilen yegane makro moleküllerdir<sup>(144)</sup>.

Enzimler, yalnız canlılar tarafından sentezlenebilen aktivasyon enerjisini düşürmek suretiyle kimyasal reaksiyonların hızını arttıran biyolojik katalizörlerdir<sup>(143,145)</sup>. Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek, zor ve uzun sürede gerçekleşen tepkimelerin çok kısa sürede ve az enerji harcanarak gerçekleşmesini sağlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır.

#### 1.3.1. İmmünoglobulinler

İmmünoglobulinler , plazma hücrelerinde yabancı maddelerin varlığına cevap üreten aktif bir biyolojik protein grubudur. Tüm immünoglobulinler Ig ile ifade

edilen protein ailesine aittir. Bu protein ailesi, immün sisteminin başlıca iki bileşeninden biri olan B hücreleri tarafından sentezlenmektedir<sup>(144)</sup>. İmmüoglobulinler beş sınıfa (IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM) ayrılmaktadır. Bu sınıflar arasındaki fark beş farklı ağır zincir ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ve  $\mu$ ) ve iki tip hafif zincirden ( $\kappa$  ve  $\lambda$ ) kaynaklanmaktadır. Her bir sınıfta yer alan proteinler yapısal ve molekül ağırlığı açısından farklılıklar gösterir. Bu sınıflar arasında konsantrasyonu en yüksek olan G sınıfı immüoglobulinlerdir. Bu sınıfın plazmadaki konsantrasyonu  $10 \text{ kg m}^{-3}$ 'e kadar ulaşabilmektedir.

İmmüoglobulin G, biyoteknoloji endüstrisinde önemli bir role sahiptir. Onlar teşhis ve tedavi amaçlı olarak ve ayrıca sitokinler ve kan pıhtılaşma faktörleri gibi farmasötik öneme sahip değeri yüksek diğer proteinlerin endüstriyel ölçekte saflaştırılması için afinite ligandı olarak kullanılmaktadır. Modern teşhis ve tedavideki bu önemlerinden dolayı İmmüoglobulin G'nin yüksek saflıkta saflaştırılması önemlidir<sup>(113)</sup>.

IgG'ler teşhis ve özellikle medikal uygulamalar için fizikokimyasal metotların bileşimi kullanılarak saflaştırılmaktadır. 1940'lı yıllarda ilk immüoglobulin Cohn ve arkadaşlarının bir çok önemli proteini içeren insan kanının fraksiyonlandırılması için oldukça basit bir kimyasal yöntem geliştirmesiyle elde edildi. Daha sonraki yıllarda immüoglobulin G saflaştırılması için size-exclusion, iyon değişim, hidroksi apatit ve afinite kromatografisini içeren kromatografik teknikler kullanılmaya başlanmıştır<sup>(87)</sup>.

Protein A/G gibi biyolojik ligandların kullanıldığı afinite kromatografi sistemleri, IgG'nin saflaştırılması için iyi bilinen ve popüler bir metottur<sup>(144)</sup>. Spesifikliği çok yüksek olan protein A/G ligandları, IgG'nin klinik uygulamalar için

geniş ölçekli saflaştırma işlemlerinde protein A/G'nın büyük bir miktarının matriksten ayrılmasıyla klinik uygulamalarda istenmeyen kirliliğe sebebiyet vermesi ve maliyetlerinin çok yüksek olması gibi bazı dezavantajlara sahiptir<sup>(146)</sup>. Protein A/G gibi ligandların uygun bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, protein A/G kromatografi yüksek afinitesinin yanında, saflaştırma işlemi sırasında yönde immobilize edilmesinin zor olması, uzun süreli bekletilmelerindeki zorluk (biyolojik aktivitesini kaybetmeden), elüsyonlarının zor olması ve temizleme koşullarında aktivitelerini kolaylıkla kaybedebilmeleri karşılaşılan diğer dezavantajlar olarak sıralanabilir<sup>(147)</sup>.

Diğer taraftan, biyolojik ligandlara göre üstünlükleri bulunan pseudobiyospesifik ligandlar biyolojik sıvılardan immüoglobulinleri saflaştırmak için yaygın biçimde kullanılmaktadır<sup>(86)</sup>. Son zamanlarda immüoglobulinlerin endüstriyel ölçekli afinite ayrımlarında pseudobiyospesifik ligand olarak L-Histidin aminoasiti kullanılmaktadır. Bu ligand biyolojik aktivitenin korunduğu spesifik tersiyer yapıya ihtiyacı olmadığından protein A/G gibi biyolojik ligandlardan daha kararlıdır<sup>(148)</sup>. L-Histidin amino asit ligandı, ekonomik olmasının yanı sıra kolay immobilizasyon ve yüksek adsorpsiyon kapasiteleri nedeniyle biyolojik ligandlara göre ek avantajlara sahiptir<sup>(149)</sup>.

Özellikle hücre kültüründen yada biyolojik sıvılardan monoklonal antikörlerin saflaştırılması ve insan plazmasından IgG sınıfı moleküllerinin ayrılmasında yüksek etkiye sahip olan L-histidin aminoasiti, karboksil, amino ve imidazol grupları aracılığıyla çeşitli proteinler ile izoelektrik noktaları yakınında etkileşir<sup>(150)</sup>. Bu özelliği yüzünden, hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekte L-Histidin ligand olarak kullanıldığı immüoglobulin G saflaştırma çalışmaları

üzerine ilgi oldukça artmıştır<sup>(83)</sup>. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(105)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, L-Histidin ligandı bağlı p(GMA/MMA) afinite mikrokürelerinin sulu ortamdan ve insan serumundan IgG'nin uzaklaştırılma performansı belirlenmiştir. Ayrıca L-histidin ligandına Cu(II) iyonlarının immobilize edilmesiyle, adsorpsiyon kapasitesindeki değişim belirlenmiştir. Yine Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(145)</sup> tarafından rapor edilen başka bir çalışmada, membran formundaki L-Histidin bağlı poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat), p(HEMA-GMA) afinite destek materyalinin IgG adsorpsiyon performansı araştırılmıştır.

### 1.3.2. Tripsin

Tripsin (EC 3.4.21.4), sindirim sisteminde bulunan peptit bağlarının parçalanmasında yüksek etkinliğe sahip olan proteolitik bir enzimdir<sup>(150)</sup>. Tripsin enzimi, spesifik olarak lizin ve arjinin kalıntılarının karboksil yan zincirlerindeki peptit bağlarının hidrolizini sağlar<sup>(151)</sup>. Endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bu enzim, klinik uygulamalarda iltihaplanmaları ve sindirim güçlüklerinin tedavi edilmesinde yardımcı olarak kullanılmaktadır<sup>(152)</sup>. Son yıllarda, tripsin peptitlerin izolasyonu ve saflaştırılması amacıyla biyoteknoloji alanında<sup>(153)</sup> ve süt yada bebek besinlerindeki kazein parçalanması amacıyla da besin endüstrisindeki uygulamaları artmaktadır. Ancak tripsin, kararlılığı çok düşük olan proteaz enzimlerinden biridir. Bu enzimin çözelti ortamında hızlı bir şekilde otoliz olması nedeniyle reaksiyon parametrelerinin kontrol edilmesi zorlaşır ve enzimin katalitik aktivitesi azalır. Bunun sonucu olarak, kullanım maliyeti oldukça artar<sup>(150)</sup>. Ancak, tripsinin bir katı desteğe immobilize edilerek kullanılması, katalitik aktivitesinin uzun süre korumasının yanı sıra, tekrar kullanılabilirliği, eser seviyedeki

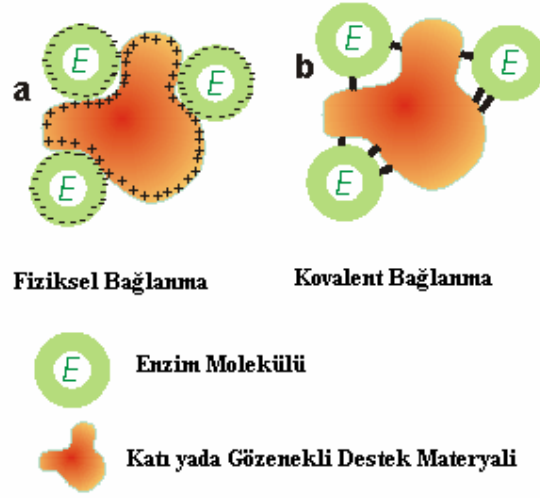
örnekler için analiz imkanı sunması, düşük maliyetli ve yüksek işlem hacmi sayesinde otomasyona uygun olması gibi pek çok avantaj sunmaktadır<sup>(154)</sup>.

### 1.3.2.1. Enzim İmmobilizasyonu ve Teknikleri

Enzimler etkili ve spesifik biyolojik katalizörler olmalarına rağmen, sulu ortamda çözünür ve işlevsel olarak aktivitelerini çabuk kaybetmeleri endüstriyel ölçekte kullanılmalarını kısıtlamaktadır<sup>(155)</sup>. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimlerin düşük geri kazanımları ve tekrar kullanım imkanlarının sınırlı olması yüzünden araştırmacıların ilgisi enzim immobilizasyonu üzerine yoğunlaşmıştır<sup>(156)</sup>. Enzim immobilizasyonu serbest enzimlere göre kesikli yada sürekli proseslerde hızlı reaksiyon, kontrollü ürün oluşumu, reaksiyon karışımından enzimin uzaklaştırılma kolaylığı gibi pek çok üstünlüğe sahiptir<sup>(155)</sup>. İmmobilizasyon gibi son dönemde ilgi odağı olan teknikler, enzimlerin kararlılık, aktivite, spesifiklik ve seçicilik gibi hemen hemen tüm özelliklerini geliştiren güçlü bir yöntem haline gelmiştir. Üstelik enzimlerin immobilizasyonu, bir enzim reaktörünün tasarımında ve reaksiyonun kontrolünde kolaylık sağlamaktadır.

Enzimlerin katı bir destek materyaline immobilizasyonu için farklı yöntemler araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Bu doğrultuda immobilize enzim sistemleri, enzim ve destek arasındaki moleküler etkileşimlere dayanan bağlanma metotlarına göre genel olarak *fiziksel bağlanma* (iyonik bağlanma, afinite, hidrofobik bağlanma v.b.) ve *kovalent bağlanma* yoluyla immobilizasyon olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.4)





**Şekil 1.4** Enzim immobilizasyon yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemlerine bağlı olarak, immobilize enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişiklikler olması beklenmektedir. Enzimlerin immobilizasyon sonucu kararlılıklarının önemli derecede arttığı çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca, immobilize enzimler çeşitli fiziksel şartlara karşı serbest enzime göre oldukça dayanıklıdır ve enzimin aktifliği uzun süre korunur. Fiziksel bağlanma ile enzim immobilizasyonu, yani adsorpsiyon metodu, zayıf çekim kuvvetleri ile enzimin inert bir taşıyıcıya bağlanması işlemini kapsamaktadır. Bu metot, destek materyali üzerine enzimin bağlanması için seçilen en basit yöntemdir. Yöntem; yüzeyi aktif, suda çözünmeyen bir taşıyıcı destek materyalinin uygun koşullarda (pH, iyonik şiddet, sıcaklık) enzim çözeltisiyle karıştırılması ve enzim fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Bu yöndeki bir immobilizasyon, van der Waals, iyonik ve hidrojen bağlarının taşıyıcı ile enzim arasında kurulmasıyla gerçekleşir.

İlk ticari immobilize enzim sistemi fiziksel bağlanma ile hazırlanmıştır ve uygulanan yöntem hala endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajları, işlemsel kolaylığı ve maliyetinin düşük olmasıdır. Dezavantajı ise, enzimin yıkama ve elüsyon şartlarında desorbe olma ihtimalidir. Bu sebeple, adsorpsiyon yoluyla tersinir immobilizasyon enzim ile destek materyali arasında güçlü hidrofobik yada iyonik etkileşimlere ihtiyaç duyar. Adsorpsiyon yönteminin en önemli avantajı, enzimin inaktivasyonundan sonra destek materyalinin rejenerasyonun mümkün olmasıdır. Böylece taşıyıcılar taze enzim çözeltisiyle tekrar muamele edilerek kullanılabilirler<sup>(157)</sup>.

Enzim ile suda çözünmeyen destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu işleminde sıkça kullanılan bir tekniktir. Farklı taşıyıcı malzemeler ve reaktif gruplar kullanılarak, kovalent bağlanma yoluyla enzim immobilizasyonu üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bu yöntemde, ilk olarak katı destek materyallerinin aktive edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, destek materyali amino, karboksil v.s. gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak glutarikdialdehit, karbodiimid, epiklorhidrin v.s. gibi çeşitli aktifleyici ajanlar kullanılarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirilir. Daha sonra enzim modifiye edilen destek materyaline kovalent olarak bağlanır. Kovalent bağlanma yoluyla enzim immobilizasyonunda, enzim ile matriks arasındaki bağın kararlılığının yüksek olması bu yöntemin en büyük avantajıdır. Bu durum enzimin taşıyıcı matriksten ayrılarak ürün içine karışmasını büyük ölçüde azaltmaktadır.

Taşıyıcı materyal ve bağlanma yöntemi seçimlerinde pek çok alternatifin bulunması bu yöntemin avantajları arasındadır. Bu durum, yük dağılımı, hidrofobik/hidrofilik grup oranı, uzatma kolu kullanımı gibi fiziksel ve kimyasal

özelliklerin ayarlanabildiği esnek bir immobilize enzim sistemi tasarımına olanak sağlamaktadır. Kovalent bağlanma yönteminin en büyük dezavantajı ise maliyetinin yüksek ve kovalent bağlanma işlemlerinin karışık olmasıdır. Bunun yanı sıra, immobilizasyon işlemi sırasında enzimin oldukça güçlü bir kimyasal ortam ve toksik reaktifler ile karşılaşması immobilize enzimin aktivitesinin düşmesine neden olabilir (158-160).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyaller

#### 2.1.1. Kimyasal Malzemeler

İnsan İmmunoglobulin G, (insan serumundan, cohn fraction II, III), başlatıcı olarak kullanılan  $\alpha, \alpha'$  azobisisobutyronitril (AIBN) ve amonyum persülfat (APS) ile trifloroasetik asit (TFA) Sigma Chem. Co.(St. Louis. MO, ABD) firmasından temin edildi. Tripsin (EC 3.4.21.4) hayvan pankreasından (Tür XI; yaklaşık ~ 6.000 unit/mg protein), dimetil sülfoksit (DMSO), yapay substrat olarak N-benzil-D-L-arjinin-p-nitroanilid (BAPNA) Sigma Chemical Co. (St. Louis. MO, ABD)'dan sağlandı. Glisidil metakrilat (GMA) ve Metil Metakrilat (MMA), Merck AG (Darmstadt, Almanya), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ise Aldrich Chemical Company (USA) firmasından alındı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

#### 2.1.2. Cihazlar

##### 2.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre

Sulu ortamdan IgG adsorpsiyon çalışmalarında deney ortamındaki başlangıç ve bakiye protein miktarları, UV-VIS spektrofotometre ile (Shimadzu, Tokyo, Japonya,

Model 1601) 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi.

#### **2.1.2.2. FT-IR Spektrofotometre**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partikülleri, mp(GMA-MMA) ve mp(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelerinin FT-IR spektrumları (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi.

#### **2.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Monodispers p(GMA-EGDMA) polimerik partikülleri ile manyetik p(GMA-MMA) ve metakrilik asit aşılınmış manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelerinin elektron mikrografları JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

#### **2.1.2.4. Elemental Analiz**

Boya (Kongo Kırmızısı) ve aminoasit (L-histidin) ligandı bağlı monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllere bağlı ligand miktarı element analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD) ile, azot miktarları dikkate alınarak tayin edildi.

#### **2.1.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin  $T_g$  sıcaklığı diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı (Pyris Sapphire DSC. Standards 115V, Japonya) kullanılarak belirlendi.

#### **2.1.2.6. Termogravimetrik Analiz (TGA)**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin termal analizi, termogravimetrik analiz cihazı TGA (Labsys Setaram TG, TU 0025) kullanılarak belirlendi.

#### **2.1.2.7. Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (ESR)**

Manyetik p(GMA-MMA) polimerik mikrokürelerin yapısındaki manyetik kürelerin varlığı Elektron Spin Rezonans (ESR) spektrofotometresi (EL 9, Varion USA) ile kullanılarak araştırıldı.

#### **2.1.2.8. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Manyetik kürelere immobilize edilen tripsinin protein parçalama aktivitesinin belirlenmesinde Dionex HPLC sistemi (Dionex Co., Germering, Germany) kullanıldı. HPLC sistemi, on-line vakumlu gaz giderici gradiyent pompa (Model P580 A), 1'den 250 µl enjeksiyon kapasitesine sahip otomatik örnek enjeksiyon ünitesi (Model ASI-100), kolon fırını (Model STH 585) ve UV-VIS diyot dizi dedektörü (Model 340 S) ünitelerinden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım için

SUPELCO Discovery BIO Wide Pore C5, 568422-U HPLC kolonu kullanıldı. Bu kolon bir ön kolon (Supelco C5, 20 mm, 4.6mm ) ile korundu. Kromatografik çalışmalarda kullanılan bütün protein çözeltileri membran filtre (0.2 µm, Millipore) ile filtre edildi.

Bütün sistem CHROMELLEON veri programı ile Windows işletim sistemi altında otomatik olarak kontrol edildi.

#### **2.1.2.9. Boyut Dağılımı Analiz Cihazı**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin boyut dağılımı laserli tane boyut analiz cihazı( Malvern, MS2000, İngiltere) kullanılarak belirlendi.

#### **2.1.2.10. Kullanılan Diğer Cihazlar**

pH metre (NEL Elektronik, Türkiye), santrifüj (Nüve, Türkiye), su banyosu (Nüve ST402, Türkiye), sirkülatörlü ısıtıcılı soğutuculu su banyosu (Labcon CPE20, Labcon LTB12140, Güney Afrika).

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Monodispers poli(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Sentezlenmesi**

Küre yapıdaki poli(glisidilmetakrilat-etilenglikoldimetakrilat), p(GMA-EGDMA), monodispers partikülleri dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlendi. Bu amaçla polimerizasyon deneylerinde, Glisidilmetakrilat, GMA,

monomeri,  $\alpha$ - $\alpha'$  azoizobütironitril, AIBN, başlatıcısı varlığında çapraz bağlayıcı olarak etilen glikoldimetakrilat, EGDMA, monomeri, stabilizatör olarak, polivinil alkol, PVA, veya Polivinilpirolidon, PVP, dağıtma ortamı olarak ise etanol ve su kullanıldı. Bütün deneyler, çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. Dispersiyon polimerizasyonunda sentez koşullarının partikül özelliklerine etkisini belirleyebilmek amacıyla, polimerizasyon ortamında başlatıcı konsantrasyonu, stabilizör türü ve konsantrasyonu, dağıtma ortamı ve monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı değiştirilerek bir dizi deney gerçekleştirildi.

Çalışmanın ilk aşamasında, monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı 0.01-0.1 (ml monomer/ml dağıtma ortamı) aralığında değiştirilirken stabilizatör (10 mg/ml dağıtma ortamı) ve başlatıcı (8 mg/ml monomer) konsantrasyonları sabit tutuldu. Dağıtma ortamı olarak farklı yüzdelerde etanol ve su karışımları kullanıldı. Polimerizasyon işleminden önce, monomer çözeltileri içindeki inhibitörleri uzaklaştırmak amacıyla NaOH-NaCl çözeltisi (20 ml, %20-%5, w/v) ile ekstrakte edildi. Ekstrakt içinde kalabilecek muhtemel çözelti  $\text{CaCl}_2$  (0.5 g) kullanılarak uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından başlatıcı monomer fazında çözülerek polimerizasyon ortamına aktarıldı. Polimerizasyon işlemleri, 100 cpm çalkalama hızındaki su banyosunda reaktör sisteminde 3 saat  $70^\circ\text{C}$  ve 2 saat  $80^\circ\text{C}$  sıcaklığa sahip işletim koşullarında gerçekleştirildi.

Çalışmalara, diğer polimerizasyon parametreleri değiştirilerek devam edildi ve monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin elde edildiği polimerizasyon koşulları aşağıdaki çizelgede verildi.



**Çizelge 2.1** Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin elde edildiği polimerizasyon koşulları (Toplam monomer hacmi:15 ml)

Monomer GMA/EGDMA ml/ml dağıtma ortamı	Dağıtma Ortamı Etanol/Su (%50%50 v/v; ml)	Başlatıcı AIBN mg/ml monomer	Stabilizatör PVP mg/ml dağıtma ortamı
0.075	200	13.3	6.25

Reaksiyon tamamlandıktan sonra, partiküller etanol ortamına aktarılarak dağıtıldı. Monodispers partiküller etanol ile (%70 v/v) bir dizi santrifügasyon-dekantasyon işlemi kullanılarak yıkandı. Yıkama işlemi tamamlanan monodispers partiküller kullanılıncaya kadar etanol (%70 v/v) içinde saklandı. Monodispers partiküllerin polimerizasyon verimi ile partikül boy ve boy dağılımı belirlendi.

## **2.2.2. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Aktivasyonu**

### **2.2.2.1. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Aminlenmesi**

Aminoasit ligandı bağlı p(GMA-EGDMA) afinite sorbenti hazırlamak için, monodispers p(GMA-EGDMA) partiküller (5 g) amonyak çözeltisi (%25 v/v) ile 50°C'de 5 saat süresince sürekli karıştırılarak inkübe edildi ve yüzeyde amin grupları taşıyan partiküller elde edildi. Reaksiyon sonunda ortamdan alınan partiküller, distile su ile yıkandı.

#### **2.2.2.2. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerin Glutarikdialdehit İle Aktivasyonu**

Aminlenen monodispers p(GMA-EGDMA) partikülleri (~ 5.0 g), fosfat tamponu içerisinde (50 mM, pH 7.4) dengeye getirildi ve reaktörde aynı tampon sisteminde hazırlanan glutarikdialdehit çözeltisi (% 0.25 v/v, 100 ml) ortamına aktararak, 12 saat boyunca manyetik karıştırıcılı ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. Aktivasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra monodispers partiküller sırası ile distile su, asetik asit çözeltisi (100 mM, 100 ml) ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7.0) ile yıkanarak glutarikdialdehitin fazlası uzaklaştırıldı.

#### **2.2.2.3. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerine L-Histidin Ligandı Bağlanması**

Glutarikdialdehit ile aktive edilen aminlenmiş monodispers p(GMA-EGDMA) partikülleri (~ 5 g), pH'sı 10.0 olan, 40 ml L-Histidin ligandı içeren çözelti (4 mg L-Histidin/ml çözelti) ortamına aktararak oda sıcaklığında manyetik karıştırmalı sistemde inkübasyonu sağlandı. Bu yolla hazırlanmış olan *p(GMA-EGDMA)-L-his* afinite partikülleri distile su ve tampon ile yıkanarak, tampon çözelti içerisinde kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta saklandı.

#### **2.2.2.4. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerine Boya Ligandının Bağlanması**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerine boya ligand olarak Kongo Kırmızısı (CR) tekstil boyası bağlanarak protein adsorpsiyonunda kapasitesi

araştırıldı. Bu amaçla yaklaşık 5 g monodispers partikül Kongo Kırmızısı boya çözeltisi (3 mg/ml, 0.1 N NaOH içeren 100ml) ile 80°C'de 4 saat süreyle inkübe edildi. Reaksiyonun tamamlanmasıyla reaksiyon ortamından alınan boya bağlı küreler sırasıyla su, NaCl çözeltisi (2 M, 100 ml) ve fosfat tamponu (0.1 M, pH 7, 100 ml) ile yıkandı. Monodispers partiküllere bağlanan boya miktarı başlangıç ve bakiye boya konsantrasyonlarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi. Boya ligand bağlı monodispers *p(GMA-EGDMA)-CR* afinite partikülleri kullanılıncaya kadar tampon çözelti içerisinde 4°C sıcaklıkta saklandı.

#### **2.2.2.5. Monodispers *p(GMA-EGDMA)* Partiküllerine İminodiasetik Asit (İDA)**

##### **Bağlanması**

Yaklaşık 5.0 g monodispers partikül, karbonat tamponu (50 mM, pH 11.0) ile ortam pH'ı 11.0 ayarlanan iminodiasetik asit çözeltisi (25 ml, 0.2 M) ile 12 saat boyunca 80°C sıcaklıktaki su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyonun tamamlanmasının ardından monodispers partiküller sırasıyla asetik asit (%5 v/v) ve distile su ile yıkanarak Cu(II) metal iyonu bağlandı.

#### **2.2.2.5.1. Monodispers *p(GMA-EGDMA)* Partiküllerine Metal İyonu**

##### **Bağlanması**

İminodiasetik asit bağlı monodispers *p(GMA-EGDMA)* partiküllerine sınır metal iyonu Cu(II)'nin bağlanması, partiküller üzerine bağlı iminodiasetik asit yapısındaki karboksil grupları ile metal iyonlarının arasındaki koordinasyon kompleksleri oluşumuna dayanır. Bu doğrultuda, pH'sı 4.1 olan 100 ppm'lik nitrat

tuzlarını içeren metal iyonu çözeltisi hazırlandı. Ortamın pH'sı deneyin başlangıcında 0.1 Molar hidroklorik asit (HCl) ile ayarlandı. İminodiasetik asit bağlı monodispers partiküller metal çözeltisi içeren ortama aktarıldı, 25 °C'de 4 saat süreyle 100 rpm'de karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) afinite partikülleri fosfat tamponu (50 mM pH 7.0) ile birkaç kez yıkandı.

p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) afinite partikülleri EDTA çözeltisi ile etkileştirilerek bağlanan bakır iyonlarının yapıdan ayrılması sağlandı. Bu işlem kürelere bağlı bakır iyonlarının tamamını uzaklaştırmak için iki kez tekrar edildi. EDTA çözeltisi içerisine geçen bakır iyon derişimi Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (AAS) (Shimadzu AA 6800, Japan) kullanılarak belirlendi. 50 mM EDTA içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakır çözeltisi hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çıkarıldı. İmmobilize olan bakır iyonu konsantrasyonu salınan bakır miktarına eşit olacağından kürelere bağlanan Cu(II) metal iyonu miktarı belirlendi.

### **2.2.3. Monodispers Partiküllerin Karakterizasyonu**

Dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin ortalama boy ve boy dağılımı Taramalı Elektron Mikroskobu görüntülerinden ve laserli boyut dağılım analiz cihazı, kütlece yüzde monomer dönüşümleri (polimerizasyon verimi) ise gravimetrik analiz ile tayin edildi.

#### **2.2.3.1. Ortalama Partikül Boyu ve Boy Dağılımın Tayini**

Poli(GMA-EGDMA) partiküllerinin ortalama boy ve boy dağılımları Elektron Mikroskobu ile belirlendi. Bu amaçla 2 ml sonuç partikül dispersiyonu

5000 rpm'de santrifüjlenerek süpertanant atıldı ve üzerine aynı hacimde etanol eklenerek, ultrasonikasyon ile partiküller dağıtıldı. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Elde edilen dispersiyon, stamp üzerine yayılarak oda sıcaklığında sıvı fazın buharlaşması sağlandı ve mikroskop görüntüleri alındı.

Elde edilen fotoğraflardan partiküller sayılarak sayıca ortalama çap ( $D_n$ ,  $\mu\text{m}$ ), ağırlıkça ortalama çap ( $D_w$ ,  $\mu\text{m}$ ) ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri aşağıda verilen eşitlikler yardımıyla hesaplandı<sup>(47,50)</sup>.

$$D_n = \sum n_i D_i / \sum n_i \quad (2.1)$$

$$D_w = \sum n_i D_i^4 / \sum n_i D_i^3 \quad (2.2)$$

$$PDI = D_w / D_n \quad (2.3)$$

Sentezlenen p(GMA-EGDMA) partiküllerin partikül boy dağılımı lazerli tane boyut ölçüm cihazı kullanılarak analiz edildi.

### 2.2.3.2. Monomer Dönüşüm Tayini (Polimerizasyon Verimi)

Polimerizasyon verimi gravimetrik olarak tayin edildi. Bu amaçla, yıkama işlemi tamamlanan 4.0 ml monodispers partikül terazi ile tartılıp  $45^\circ\text{C}$ 'de vakum etüvünde kurutuldu. Polimerizasyon verimi ( $\%C_T$ ) reaktöre konulan toplam monomer kütlelerinin polimerik partiküllere kütlece dönüşümü olarak hesaplandı<sup>(59)</sup>.

### 2.2.3.3. Monodispers Partiküllerin Şişme Oranı

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin şişme oranı, distile su içinde tayin edildi. Distile su bulunan volümetrik kap (10 ml) içerisine  $\sim 1\text{g}$  partikül

aktarılarak 24 saat sonundaki yükseklik okundu ve monodispers partiküllerin şişme oranı, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Şişme Oranı} = \text{ilk yükseklik} / \text{son yükseklik} \quad (2.4)$$

#### 2.2.3.4. Monodispers Partiküllerin Yoğunluğu

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin yoğunluğu piknometre yardımıyla, partiküller için çözücü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

#### 2.2.3.5. p(GMA-EGDMA) Partiküllerin Yüzey Alanı

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin yüzey alanı, BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü. Çok tabakalı fiziksel adsorpsiyonu ifade eden teorik BET denklemi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir (75)

$$q_{den} = BQ^0 C_{den} / (C_s - C_{den}) [1 + (B-1)(C_{den}/C_s)] \quad (2.5)$$

Burada,  $C_s$  adsorplanan bileşenin doyum konsantrasyonu, B ve  $Q^0$  ise sırasıyla adsorplayıcı yüzeyi ile çözelti arasındaki etkileşim enerjisini gösteren ve tek tabaka adsorpsiyon kapasitesini ifade eden bir sabittir.

### **2.2.3.6. p(GMA-EGDMA) Partiküllerin FT-IR Spektrumu**

Monodispers p(GMA-EGDMA), FT-IR spektrometre (Mattson 1000 FT-IR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. 0.1 g kuru küre ve 0.01 g KBr karıştırılarak tablet haline getirildikten sonra spektrumu alındı.

### **2.2.3.7. Monodispers p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin DSC Analizi**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerine ait DSC analizi, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre cihazı (Pyris Sapphire DSC Standards 115V, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, monodispers partikül (5 mg), alüminyum malzemedan yapılmış numune kaplarına konularak, referans maddeye karşı 600°C sıcaklığa kadar ısıtıldı.

### **2.2.3.8. Partiküllerin Termal Analizi (TGA)**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin termal analizi termogravimetrik analiz cihazı (Labsys Setaram TG, TU 0025,USA) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, monodispers p(GMA-EGDMA) partikülleri (10mg), platin malzemedan yapılmış numune kaplarına konularak, 1100 °C sıcaklığa kadar ısıtıldı.

### **2.2.3.9. Epoksi Grubu Tayini**

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin yüzeyde ulaşılabilir epoksi grubu içeriği literatürde verilen piridin-HCl yöntemi ile tayin edildi<sup>(161)</sup>. Bu amaçla,

0.5 g partikül piridin-HCl çözeltisi (50 ml) ile 20 dakika geri soğutucu altında etkileştirildi. Reaksiyon sonunda örnek ayarlı NaOH çözeltisi (0.1 M) ile titre edildi.

#### **2.2.3.10. Amin Grubu Tayini**

Aminlenen monodispers *p*(GMA-EGDMA) partiküllere bağlanan amin grubu miktarı, titrasyona dayanan ölçüm yöntemi ile belirlendi<sup>(162)</sup>. Hazırlanan afinite sorbentin taşıdığı amin grubu miktarının titrasyon yöntemi ile belirlenebilmesi için, aminlenen monodispers *p*(GMA-EGDMA) partikülleri (0.2 g), distile su içerisinde 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda süzülen partiküller 1 saat süresince HCl çözeltisi (2.0 M, 10 ml) ile muamele edilerek ayarlı NaOH çözeltisine (2.0 M) karşı titre edildi.

#### **2.2.4. Protein Adsorpsiyon Çalışmaları**

Karakterizasyon ve aktivasyon çalışmaları tamamlanarak, üç farklı yapıdaki ligandın bağlanmasıyla hazırlanan monodispers *p*(GMA-EGDMA)-*L*-his, *p*(GMA-EGDMA)-CR, *p*(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) afinite partiküllerinin sulu ortamdan insan serum albumin (HSA) ve immunoglobulin G (IgG) adsorpsiyon davranışları kesikli sistemde incelendi.

Afinite sorbentlerin IgG proteinine karşı sergilediği adsorpsiyon kapasitelerine pH, sıcaklık, başlangıç protein konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi parametrelerin etkisi araştırıldı. Deneyler, 0.5 mg ml<sup>-1</sup> başlangıç protein konsantrasyonu içeren, 50 mM, 3.0 ml tampon içinde, afinite sorbentin bulunduğu adsorpsiyon ortamında, 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildi.



### 2.2.4.1. pH Etkisi

Adsorpsiyon ortam pH'sının, HSA ve IgG ayrıştırılması ve saflaştırılmasına etkisi pH 4.0 - 8.0 aralığında farklı tampon sistemleri kullanılarak araştırıldı. pH 4.0-5.0 aralığında asetat tamponu (50 mM CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH) ve pH 6.0-8.0 aralığında fosfat tamponu (50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) kullanıldı. Deneyler 0.5 mg ml<sup>-1</sup> başlangıç protein konsantrasyonu içeren, 50 mM, 3.0 ml tampon içinde, afinite sorbentin aktarılması ile, 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında 4 saat süreyle gerçekleştirildi.

Monodispers afinite partiküllere adsorplanan protein miktarları, başlangıç ve 4 saat sonunda adsorpsiyon ortamında kalan protein derişiminin 280 nm dalga boyunda çift ışık demetli UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak absorbanslarının ölçülmesiyle tayin edildi. Sulu ortamdaki protein miktarının belirlenebilmesi için, başlangıç protein konsantrasyonu 0.125-2.0 mg/ml aralığında tutularak kalibrasyon grafiği elde edildi. Deney sonucunda monodispers partiküller adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve adsorplanan protein miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$q = [ ( C_o - C ) V_s ] / m \quad (2.6)$$

Yukarıdaki eşitlikte q; küreler üzerine adsorplanan protein miktarını (mg g<sup>-1</sup>), C<sub>o</sub>; proteinin başlangıç konsantrasyonunu (mg ml<sup>-1</sup>), C; adsorpsiyon sonrası çözelti ortamındaki proteinin denge konsantrasyonunu (mg ml<sup>-1</sup>), V<sub>s</sub>; çözelti hacmini (ml) ve m; adsorpsiyon ortamındaki sorbent miktarını (mg) göstermektedir.

#### **2.2.4.2. Adsorpsiyon Zamanının Etkisi**

Hazırlanan üç farklı yapıdaki monodispers afinite partiküllerle sulu ortamdan protein ayrıştırılması işleminin zamana bağlılığını belirlemek, sorbentin sürekli sistemde kullanılma aşamasında önemlidir. p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) afinite partiküllerin adsorpsiyonunun zamanla değişimi tampon çözeltisi içinde protein başlangıç konsantrasyonu  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  olduğu adsorpsiyon ortamında 4 saat süresi boyunca kesikli sistemde çalışıldı ve yukarıda verilen eşitlik kullanılarak her bir afinite destek materyalinin adsorpsiyon hız ve kapasitesi belirlendi.

#### **2.2.4.3. İyonik Şiddet Etkisi**

IgG adsorpsiyonu üzerine iyonik şiddetin etkisi, adsorpsiyon koşulları 3.0 ml, 0.5 mg IgG/ml olan fosfat tamponu içerisinde NaCl içeriği 0.0 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M ve 1.0 M olacak şekilde değiştirilerek oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

#### **2.2.4.4. Başlangıç protein Konsantrasyonunun Etkisi**

Monodispers afinite partiküllerin adsorpsiyon hız ve kapasitesine başlangıç IgG konsantrasyonunun etkisi 0.125-2.0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi.

#### 2.2.4.5. Sıcaklığın Etkisi

Protein adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi dört farklı sıcaklıkta (5, 15, 25 ve 35 °C), fosfat tamponunda (3.0 ml, 50 mM, pH 7.0) ve 0.5 mg/ml başlangıç protein konsantrasyonu koşullarında araştırıldı.

#### 2.2.4.6. Adsorpsiyon İzotermi

Monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) afinite partiküllerinin adsorpsiyon kapasiteleri, 0.125-3.0 mg ml<sup>-1</sup> IgG konsantrasyonunda araştırılarak deneysel adsorpsiyon izotermi elde edildi. Adsorpsiyon deneyleri, 50 mM fosfat tamponunda, 25 °C'de, 4 saat süreyle, 100 rpm hızla devamlı karıştırılarak yapıldı. Deney sonunda partiküller, protein çözeltisinden uzaklaştırıldı ve adsorplanan protein miktarı (2.6) eşitliği kullanılarak hesaplandı.

Hazırlanan monodispers afinite partikülleri ile sulu ortamdan IgG adsorpsiyonunda belirlenen deneysel verilerin teorik olarak türetilen Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı. Deneysel verilerden elde edilen  $C_{den}$  ve  $q_{den}$  değerleri kullanılarak Langmuir eşitliğine göre (2.7),  $C_{den} / q_{den}$ 'ye karşı  $C_{den}$  grafiği çizildi. Bu grafiğin kaymasından  $K_d$  ve eğimden de  $q_m$  değerleri belirlendi. Freundlich modelini ifade eden (2.8) eşitliği kullanılarak  $\ln q_{den} - \ln C_{den}$  grafiği elde edildi ve eğimden n ve kaymadan da  $K_F$  parametreleri belirlendi.

$$q_{den} = q_m C_{den} / (K_d + C_{den}) \quad (2.7)$$

$$q_{den} = K_F (C_{den})^n \quad (2.8)$$

Dubinin–Radushkevich (D–R) izoterm modeli, adsorpsiyonun türünü (Fiziksel yada Kimyasal) belirlemek için kullanılır. Bu model aşağıda verilen eşitlik ile ifade edilir:

$$\ln q_e = \ln q_m - K\epsilon^2 \quad (2.9)$$

ve adsorpsiyon enerjisi:

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2K}} \quad (2.10)$$

Adsorpsiyon enerjisi, 1-8 kJ/mol aralığında olduğunda adsorpsiyon türünün fiziksel, 8-16 kJ/mol olduğunda kimyasal olduğu belirtilmiştir<sup>(163)</sup>.

#### 2.2.4.7. Adsorpsiyon Kinetikleri

Yeni geliştirilen afinite partiküller ile sulu ortamdan IgG adsorpsiyonundan elde edilen deney sonuçları birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanarak adsorpsiyon sisteminin kinetiği araştırıldı. Sulu ortamdan adsorpsiyon davranışı için kullanılan birinci dereceden kinetik eşitlik modeli aşağıdaki formül ile ifade edilir<sup>(164-166)</sup>.

$$d_{q_t} / dt = k_1 (q_{den} - q_t) \quad (2.11)$$

Bu eşitlikte  $k_1$ , birinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti ( $\text{dak}^{-1}$ ),  $q_{den}$  ve  $q_t$  sırası ile denge ve  $t$  zamanında adsorplanan protein miktarını göstermektedir ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Eşitliğin entegralinin alınması ile ( $t = 0$  anında ve  $t = t$  olduğunda  $q_t = q_t$ ) aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\log(q_{den} - q_t) = \log q_{den} - (k_1 t) / 2,303 \quad (2.12)$$

Elde edilen deneysel verilerin birinci dereceden kinetik modeline uygulanması ile  $\log(q_{den} - q_t) - t$  grafiğe geçirildiğinde bir doğru elde edildi. Bu doğrunun eğiminden  $k_1$  sabiti ve kaymasından ise  $q_{den}$  değeri belirlendi.

Ritchie, katı üzerine gazların adsorpsiyonunun kinetiği için, bir ikinci derece hız eşitliği önermiştir<sup>(165)</sup>. İkinci derece eşitlik, sorbentler üzerine, solutların adsorpsiyonu için uygulanabilir<sup>(166)</sup>. İkinci derece eşitliği, adsorpsiyon kapasitesine dayanır ve şu şekilde ifade edilebilir:

$$q_m / (q_m - q_t) = k_2 t + 1 \quad (2.13)$$

Bu eşitliğin doğrusal şekli (2.14) eşitliği ile verilir.

$$1/q_t = 1/k_2 q_m t + 1/q_m \quad (2.14)$$

Afinite partiküller ile elde edilen deneysel veriler, ikinci dereceden kinetik denkleme uygulanarak, hız kinetiği belirlendi. Bu doğrultuda, eşitlik (2.14) kullanılarak  $1/q_t$  'ye karşı  $1/t$  grafiğe geçirildi, elde edilen doğrunun kayma ve eğiminden sırasıyla, adsorpsiyon kapasitesi  $q_m$  ve hız sabiti  $k_2$  hesaplandı.

#### **2.2.4.8. Protein Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik**

Kongo Kırmızısı bağlı destek materyaline adsorplanan IgG desorpsiyonu NaCl çözeltisi (2 M, pH 6.0) ve L-histidin ligandı bağlı monodispers afinite partiküllere adsorplanan IgG desorpsiyonu, 0.5 M NaCl içeren glisin-HCl (pH 2.6) çözeltisi ve Cu(II) metal iyonu bağlı afinite destek materyaline adsorplanan protein desorpsiyonu ise EDTA (% 3,7 w/v) ile gerçekleştirildi. İmmüoglobulin G adsorplanmış afinite partiküller desorpsiyon ortamına yerleştirilerek 100 rpm karıştırma hızında 25 °C'de 4 saat süre boyunca devamlı karıştırılarak

gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda partiküller çözelti ortamından uzaklaştırıldı ve 280 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometre ile absorbansı ölçüldü. Desorpsiyon ortamına geçen protein miktarı aşağıdaki eşitlik yardımıyla belirlendi.

$$\text{Desorpsiyon oranı} = \frac{[\text{Desorbe edilen protein miktarı} \times 100]}{[\text{Partikül üzerine adsorplanan protein miktarı}]} \quad (2.15)$$

Afinite partiküllerin tekrar kullanılabilirlikleri adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemi aynı sorbentin dört kez kullanılması ile test edildi.

## **2.2.5. Manyetik Partiküllerin Hazırlanması**

### **2.2.5.1. Manyetik poli(GMA-MMA) Kürelerinin Hazırlanması**

Manyetik poli(glisidil metakrilat-metil metakrilat), mp(GMA-MMA), mikroküreleri, birbirini izleyen iki basamaklı bir yöntem ile sentezlendi. İlk basamakta, demir içeriğine sahip p(GMA-MMA) küreleri süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlandı. Bu amaçla, GMA (7.5ml), MMA (7.5ml) monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (7.5 ml) ve stabilizör olarak polivinil alkol (%5.0, 20 ml) çözeltileri başlatıcı olarak toluen (20 ml) içinde çözülmüş AIBN (0.2g) ile karıştırılarak, FeCl<sub>3</sub> çözeltisinin (0.3M, 400 ml) bulunduğu sulu dispersiyon ortamına aktarıldı. Polimerizasyon reaktörü su banyosuna yerleştirildi ve 65 °C'ye ısıtıldı. Polimerizasyon reaksiyonu 2.0 saat 70 °C ve sonra 1.0 saat 80 °C de gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında, oluşan küreler su trompu ile süzüldü, distile su ve etanol ile yıkandı.

İkinci basamakta, manyetik p(GMA-MMA) küreleri, kürelerde demir oksitin birlikte çökelim reaksiyonu ile hazırlandı. Birlikte çökelim reaksiyonu için, 5.0 g FeCl<sub>2</sub> saf suda (100ml) çözüldü ve sonra NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (50 ml, %25 w/v) içindeki demirli-p(GMA-MMA) kürelerini (15 g) içeren bir reaktöre aktarıldı. Küreler, geri soğutucu altında ve azot atmosferinde üç farklı sıcaklıkta ( 40°C, 50°C ve 90°C) 2 saat süreyle muamele edildi. Sonuç olarak, sentezlenen manyetik küreler, reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve 3 saat etanol çözeltisi (%50; 250 ml) ve sonra saf su ile yıkandı. Vakum etüvünde 40°C'de kurutulan manyetik kürelerin polimerizasyon verimi, boy ve boyut dağılımı moleküler elek kullanılarak belirlendi.

#### **2.2.5.2. Metakrilik Asit Aşılı Manyetik Kürelerin Hazırlanması**

Manyetik p(GMA-MMA) küreleri üzerine metakrilik asitin (MAA) aşılı kopolimerizasyonu, başlatıcı olarak amonyum persülfatın (APS) kullanıldığı proses ile gerçekleştirildi<sup>(167)</sup>. Aşılama işleminde, manyetik p(GMA-MMA) küreleri (1.0 g) ve APS çözeltisi ( $6.58 \times 10^{-3}$  M, 9.0 ml) bir reaktör içine transfer edildi. Reaktör, 60 °C deki bir su banyosuna yerleştirildi ve 0.2- 1.0 ml aralığında değişen hacimlerdeki metakrilik asit monomeri, reaksiyon ortamına damla damla eklendi. Reaksiyon ortamı 10 dakika boyunca azot atmosferi ile doyuruldu. Bu işlemlerin ardından reaktörün kapağı kapatılarak, reaksiyon ortamı azot atmosferi altında 200 rpm de 3 saat boyunca çalkalandı. Reaksiyonun ardından, metakrilik asit aşılı manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA küreleri, reaksiyon ortamından süzülerek ayrıldı ve birkaç kez saf su ile yıkandı. Son olarak, poli(metakrilik asit) aşılı manyetik küreler yaklaşık 48 saat saf suda bırakıldı ve sonra vakum altında 60°C'de kurutuldu.

Aşılama yüzdesi, aşağıda verilen eşitlik kullanılarak, aşılama öncesi ve sonraki kuru küre kütlesi esas alınarak belirlendi.

$$\text{Aşılama yüzdesi} = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1} \times 100 \quad (2.16)$$

$W_1$  : Reaksiyon ortamına yerleştirilen manyetik kürelerin kütlesi (g)

$W_2$  : poli(MAA) aşılı manyetik kürelerin kütlesi (g)

## **2.2.6. Manyetik Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları**

### **2.2.6.1. Manyetik Kürelerin Yüzey Alanı**

mp(GMA-MMA) ve mp(GMA-MMA)-g-MAA mikro kürelerinin spesifik yüzey alanı ve gözenek hacmi bir yüzey alanı cihazı ile ölçüldü ve BET (Brunauer, Emet ve Teller) metodu kullanılarak hesaplandı.

### **2.2.6.2. Manyetik Kürelerin Yüzey Morfolojileri**

Vakum etüvünde kurutulmuş 75-150 µm boyut dağılımına sahip mp(GMA-MMA) ve mp(GMA-MMA)-g-MAA mikroküreleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve kürelerin elektron mikrografları, JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.



### **2.2.6.3. Manyetik Kürelerin FT-IR Spektrumu**

mp(GMA-MMA) ve mp(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelerine ait FT-IR spektrumu, FT-IR spektrometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. 0.1 g kuru küre ve 0.1 g KBr karıştırılarak tablet haline getirildikten sonra spektrumu alındı.

### **2.2.6.4. Manyetik Kürelerin ESR Spektrumu**

mp(GMA-MMA) polimerik partiküllerindeki manyetik kürelerin varlığı Elektron Spin Rezonans (ESR) spektrofotometresi (EL 9, Varion USA) kullanılarak araştırıldı.

### **2.2.6.5. Karboksil Grup Tayini**

Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelerinin yüzeyinde ulaşılabilir karboksil gruplarının miktarı, potansiyometrik titrasyon yoluyla belirlendi. Bu amaçla, manyetik küreler 24 saat saf su içinde bırakıldı. Sonra NaOH çözeltisi (0.2 N 10 ml) ile 1.0 saat boyunca muamele edildi. Bu işlemin ardından, manyetik küreler ortamdan uzaklaştırılarak süpernetant ayarlı HCl (0.1 N) çözeltisi ile titre edildi.

## **2.2.7. Tersinir Tripsin İmmobilizasyonu**

### **2.2.7.1. Tripsin İmmobilizasyonuna pH Etkisi**

Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerine tripsinin adsorpsiyon yolu ile tersinir immobilizasyonu, çeşitli pH değerlerinde asetat (7.5 ml, 50 mM, pH 4.0-6.0) yada fosfat tamponu (7.5 ml, 50 mM, pH 6.0-8.0) ile çalışıldı. Her bir tampon sisteminde tripsinin başlangıç konsantrasyonu 2.0 mg/ml değerinde tutuldu. İmmobilizasyon deneyleri 22°C de 3 saat süreyle çalkalamak suretiyle gerçekleştirildi.

Kürelere adsorplanan tripsinin miktarı, ortamdaki tripsinin başlangıç ve son absorbans değerlerinin UV-visible spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalga boyunda ölçülmesi ve standart kalibrasyon eğrisi yardımıyla belirlendi. Tüm deneyler üç kez tekrarlanarak standart sapmaları hesaplandı. İmmobilizasyondan sonra, manyetik küreler manyetik bir aygıt yardımı ile enzim çözeltisinden ayrıldı ve küreler üzerine immobilize olan tripsinin miktarı aşağıda verilen eşitlik 2.6 kullanılarak hesaplandı.

### **2.2.7.2. Tripsin İmmobilizasyona Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi**

Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin, adsorpsiyon kapasitesine başlangıç tripsin konsantrasyonunun etkisini araştırmak amacıyla, adsorpsiyon ortamında tripsin konsantrasyonu 0.2-2.0 mg/ml aralığında değiştirildi.

### 2.2.7.3. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Aktivite Tayini

Tripsin, çeşitli yapay substratların ester ve amid bağlarını hidrolizler. Tripsinin amidaz aktivitesi yapay substrat olarak BAPNA (N-benzil-D-L-arjinin-p-nitroanilid) çözeltisi kullanılarak ölçüldü. Serbest enzimin aktivitesinin belirlenmesinde, reaksiyon ortamı olarak CaCl<sub>2</sub> (10 mM) içeren Tris-HCl tamponu (pH 7.5; 50 mM, 2.5 ml) ve 0.1 ml BAPNA (0.5M BAPNA, DMSO içinde) kullanıldı. Hazırlanan karışımlar enzim ile reaksiyonundan önce su banyosunda 25 °C'de 5 dak ön inkübasyona tabi tutuldu ve analiz, ortama enzim çözeltisinin (0.1 ml, 2.0 mg protein) eklenmesi ile başlatıldı. Enzimatik reaksiyon, 5 dakika sonra ortama %30'luk asetik asit çözeltisinin eklenmesi ile durduruldu. Çözeltinin absorbansı 410 nm de ölçüldü ve enzim aktivitesi hesaplandı.

BAPNA birimi (U), verilen analiz şartları altında dakika başına absorbansda 0.1 birim değişmeye neden olan enzim miktarı olarak belirlendi. İmmobilize enzimin aktivitesini belirlemek amacıyla, tripsin immobilize edilmiş 10 mg manyetik küre, serbest enzim yerine enzimatik reaksiyon ortamına yerleştirildi. İmmobilize tripsinin aktivitesi, aynı miktarda serbest enzimin yüzdesi olarak hesaplandı.

Proteolitik bir enzim olan tripsinin, proteinleri parçalama aktivitesi, HSA yada sitokrom c (1.0 mg/ml Tris-HCl tamponu, 50 mM, pH 7.5) çözeltisi ve 0.1 ml enzim çözeltisinin (2 mg/ml, 10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren Tris-HCl tamponu) karıştırılmasıyla belirlendi. Örnekler, 25°C de 5 dakika enzim çözeltisi eklenmeden önce ön inkübasyona tabi tutuldu. 120 dakika sonra reaksiyon TFA (10 ml, %0.1 v/v) ve asetik asit çözeltisi (0.4 ml, %30) eklenerek durduruldu. Süspansiyon 15.000 rpm de 10 dakika santrifüjlenerek süpernanttaki parçalanmış ürünler yukarıda belirtildiği gibi HPLC yüklenerek analiz edildi.

#### **2.2.7.3.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine pH Etkisi**

BAPNA hidrolizinde serbest ve immobilize enzimin aktivitesi üzerine pH'ın etkisini belirleyebilmek amacıyla reaksiyon ortam pH'ı 4.0-9.0 aralığında değiştirildi.

#### **2.2.7.3.2. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi**

Serbest ve immobilize tripsinin, ortam sıcaklığı ile aktivitesindeki değişimi belirleyebilmek amacıyla reaksiyon ortam sıcaklığı 20-60°C aralığında değiştirildi.

#### **2.2.7.4. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Kararlılık Çalışmaları**

Serbest yada immobilize tripsinin termal kararlılığı, fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7.5) iki farklı sıcaklıkta (55°C ve 65°C) enzimatik aktivitenin ölçülmesi ile belirlendi.

Tripsin enziminin depolama kararlılığı, tripsin tampon çözelti ortamında (50 mM, pH 4) 8 hafta saklandıktan sonra, serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Serbest ve immobilize tripsin aktivitesi başlangıç aktiviteleri ile karşılaştırılarak, yüzde olarak hesaplandı.

#### **2.2.7.5. Enzim Kinetiğinin Belirlenmesi**

Enzim kinetiğinin belirlenebilmesi amacıyla, serbest ve immobilize enzimin yapay substrat (BAPNA) hidrolizinin başlangıç reaksiyon hızı farklı substrat konsantrasyonlarında ölçüldü. BAPNA'nın hidrolizden elde edilen deneysel veriler

Michaelis-Menten eşitliğine uygulandı. Lineweaver-Burk noktası  $1/v$ ,  $1/S$ , Michaelis sabiti ( $K_m$ ) ve serbest ve immobilize enzimlerin maksimum reaksiyon hızı ( $V_{mak}$ ) hesaplandı<sup>(167)</sup>.

#### **2.2.7.6. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları**

Manyetik kürelerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için, aynı manyetik kürelerin tripsin adsorpsiyon desorpsiyon döngüsünde altı kez kullanılmasıyla belirlendi. Manyetik kürelere adsorbe olan tripsinin desorpsiyonu 1.0 M NaCl içeren 1.0 M formik asit çözeltisiyle gerçekleştirildi. Desorpsiyon ortamı manyetik olarak 25°C sıcaklıkta 100 rpm de 120 dakika karıştırıldı. Denge desorpsiyon zamanı 120 dakika olarak belirlendi. Desorpsiyon ortamındaki protein miktarı Bradford metodu ile tayin edildi<sup>(168)</sup>. Desorbe olan tripsin oranı 2.15 eşitliği kullanılarak hesaplandı.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında, afinite kromatografisi ve kromatografik uygulamalarda kolon dolgu maddesi olarak kullanılabilir farklı özelliklere sahip akrilat kökenli destek materyalleri hazırlandı. Farklı fonksiyonel gruplar ile kolaylıkla kimyasal reaksiyon verebilme yeteneğine sahip olan glisidil metakrilat, GMA, reaktif polimerik yapıların sentezinde yaygın olarak tercih edilen bir monomerdur. Literatürde mikron altı veya mikron boyutlu ve monodispers formda GMA temelli partiküllerin sentezi üzerine önerilen çeşitli polimerizasyon teknikleri mevcuttur. GMA birimlerini içeren monodispers partikülleri sulu fazda gerçekleşen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmeye çalışıldığında, polimerizasyon sırasında epoksi halkası kısmen yada tamamen hidroliz olarak diol yapısına dönüşmektedir. Böylece, oluşan partikül yüzeyi üzerinde hem reaktif fonksiyonel epoksi grubunun yoğunluğunda azalma meydana gelmekte ve hem de epoksi ve diol fonksiyonel gruplarını içeren ikili bir yapı elde edilmektedir. Bu nedenle, hidroliz riskini ortadan kaldırabilmek için en uygun yöntem, polimerizasyon işleminin organik kökenli bir dağıtma ortamı içerisinde yürütülmesidir<sup>(169)</sup>.

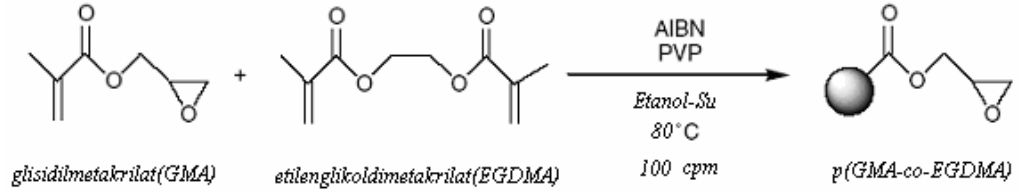
Bu doğrultuda tez çalışması kapsamında, GMA temelli polimerik partiküllerin sentezlenmesinde, organik kökenli dağıtma ortamlarında gerçekleşen dispersiyon ve süspansiyon polimerizasyon yöntemleri kullanıldı. Bu amaçla, çalışmanın ilk bölümünde monodispers özellikte p(GMA-EGDMA) polimerik partiküller dispersiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlendi (Şekil 3.1) ve biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahip olan IgG proteinin sulu ortamdan adsorpsiyonu işleminde kullanılabilme potansiyeli araştırıldı.

Sentezlenen monodispers özellikteki p(GMA-EGDMA) partiküllerin yapısındaki epoksi gruplarının varlığı istenilen ligand ve/veya protein moleküllerinin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır. Farklı özellikteki ligandların IgG'ye karşı afinitesini belirlemek üzere glutarikdialdehit kullanılarak modifiye edilen p(GMA-EGDMA) partiküllerine L-histidin amino asidi (L-his), Kongo Kırmızısı (CR) boya ligandı ve Cu(II) iyonlarının şelatlanması amacı ile üç dişli iminodiasetik asit (IDA) ligandı yüzeye kovalent olarak bağlandı ve sırası ile *p(GMA-EGDMA)-L-his*, *p(GMA-EGDMA)-CR* ve *p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II)* monodispers partikülleri elde edildi. Ayrıca, sentezlenen monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin epoksi grupları hidroliz edilerek yüzeylerinde hidroksil grupları oluşturuldu ve ligand bağlı karışıklarına karşı adsorpsiyon işleminde protein ile sorbent arasındaki non-spesifik etkileşimlerin incelenmesinde kontrol amaçlı kullanıldı.

### **3.1. p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Karakterizasyonu**

Protein adsorpsiyonu, çeşitli fizikokimyasal faktörlere bağlı olarak belirlenebilen çok karmaşık bir işlemdir. Bunlar arasında en önemli olan faktörler, yüzeyin kimyasal yapısı, pürüzlülüğü ve hidrofilité derecesi, protein moleküllerinin birbirleriyle ve yüzeye elektrostatik etkileşimleri, spesifik yüzey alanı ve yüzey yük yoğunluğu ve protein moleküllerinin yapısal kararlılığıdır.

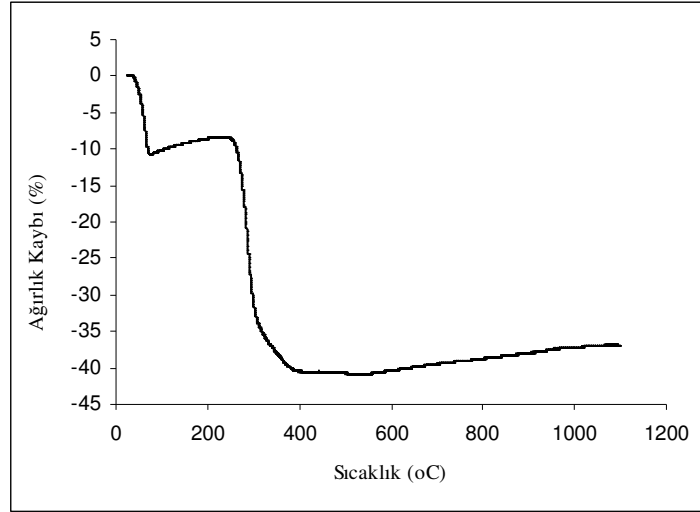
Dispersiyon polimerizasyon tekniğı ile sentezlenen p(GMA-EGDMA) partiküllerinin polimerizasyon verimi %80 olarak belirlendi. Protein adsorpsiyonu çalışmalarında önemli bir parametre olan destek materyalinin şişme oranı, metakrilat kökenli bir polimer olan p(GMA-EGDMA) küreleri için 1.3 olarak bulundu. Afinite kürelerin yoğunluğu  $1.11 \text{ g cm}^{-3}$  olarak belirlendi.



**Şekil 3.1** Dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanan p(GMA-EGDMA) partiküllerinin şematik gösterimi

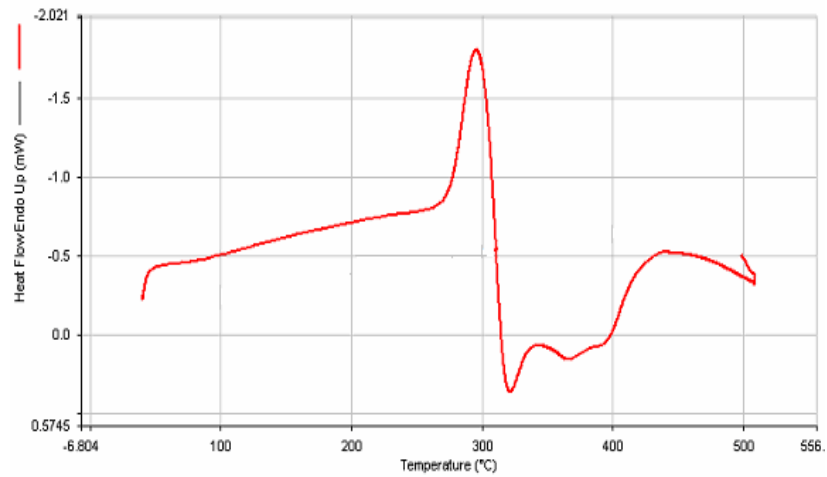
Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin 300-1100°C aralığında termogravimetrik analizi incelendiğinde, iki kütle kaybı basamağı görüldü. İlk kütle kaybı basamağının, polimere adsorplanmış fiziksel su veya nemden kaynaklanabileceği düşünüldü. Polimerin %32'lik kütle kaybının gerçekleştiği 284°C'ye kadar termal olarak kararlılığını koruduğu ve bu sıcaklıktan sonra polimerde herhangi bir kütle kaybının olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.2). Parades ve arkadaşları<sup>(126)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, makro gözenekli p(GMA-EGDMA) mikrokürelerinin TGA analizinde 200°C sıcaklık değerine kadar yapıda önemli bir değişim olmadığını, bu sıcaklıktan sonra sürekli bir kütle kaybıyla polimer kütesinin yaklaşık %50'sini kaybettiği rapor edilmiştir.





**Şekil 3.2** p(GMA-EGDMA) partiküllerinin TGA analizi

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin termal kararlılığının belirlenmesi amacı ile DSC analizi 25-500°C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika ısıtma hızında gerçekleştirildi. Polimerik partiküllere ait DSC eğrisinden, 290°C’de endotermik bir pike sahip olduğu ve bu sıcaklık değerinden sonra ise polimer yapısının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 3.3).



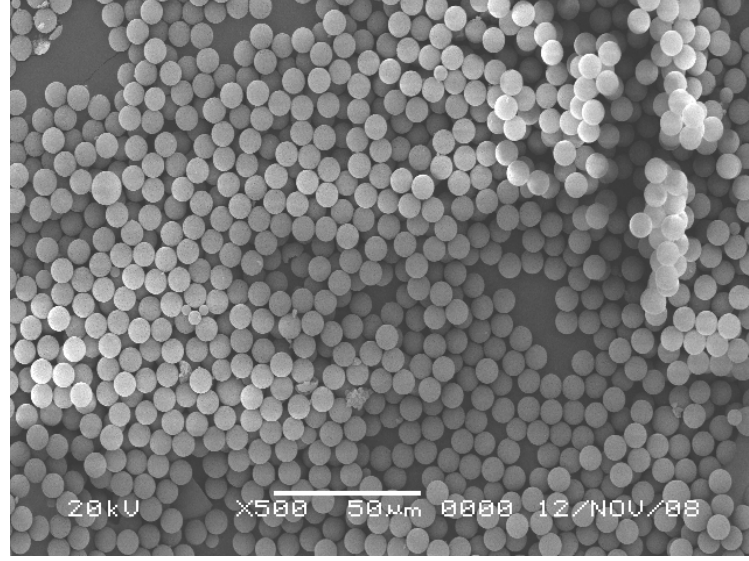
**Şekil 3.3** p(GMA-EGDMA) partiküllerinin DSC eğrisi

Afinite kromatografisi tekniği kullanılarak yapılan ayrımlarda, hızlı bağlanma kinetikleri ile yüksek bağlanma kapasitelerine ulaşmak için destek materyallerinin spesifik ve büyük yüzey alanına sahip olması tercih edilir. Bu nedenle, yüzey alanını arttırmak için ya gözenek büyüklüğü yüksek yada gözeneksiz nano boyutlu küreler kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan gözeneksiz p(GMA-EGDMA) partiküllerinin spesifik yüzey alanı 28.06 m<sup>2</sup>/g olarak bulundu.

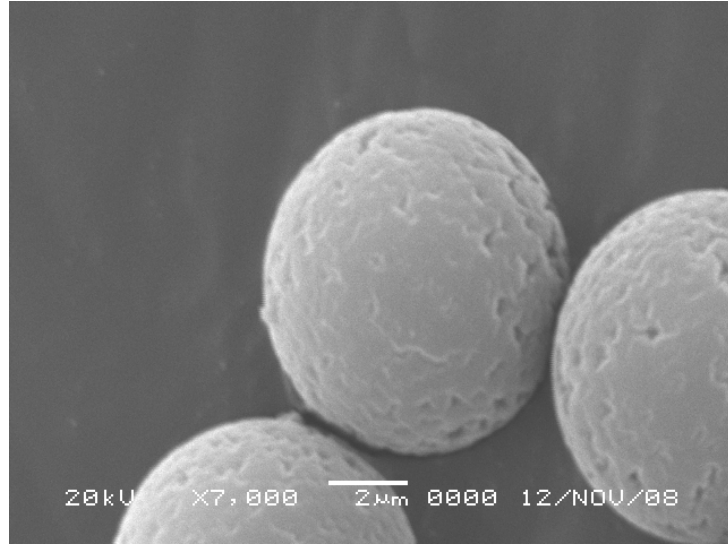
Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin görüntüleri SEM mikrografları ile elde edildi (Şekil 3.4). SEM görüntüleri ve hesaplanan polidispersite indeksi değerinin (PDI=1.001) (1.05'den daha küçük PDI değerine sahip partiküllerin genellikle monodispers olduğu düşünölmektedir<sup>(169)</sup>) polimerik partiküllerin oldukça dar bir boy dağılımına sahip, bir başka deyimle monodispers yapıda olduğunu göstermektedir. Partiküllerin pürüzlü bir yüzey görüntüsüne sahip olduğu göröldü (Şekil 3.4(B)). Lazerli tane boyut ölçüm analiz sonucunda da, sentezlenen p(GMA-EGDMA) partiküller için partikül boyut dağılımının oldukça dar bir aralığa sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.5).

Kromatografik uygulamalar için kolon dolgu materyali olarak sentezlenen partiküllerin monodispers yapıda olması kromatografik analiz boyunca kolonda düzenli bir akış rejimi sağlamaktadır. Bu sayede kolon içerisinde kanallaşma oluşma olasılığı azalmaktadır. Böylece mobil faz kolonun içerisindeki her partikülle etkileşebilmekte ve daha etkin bir kütle transferi elde edilebilmektedir.

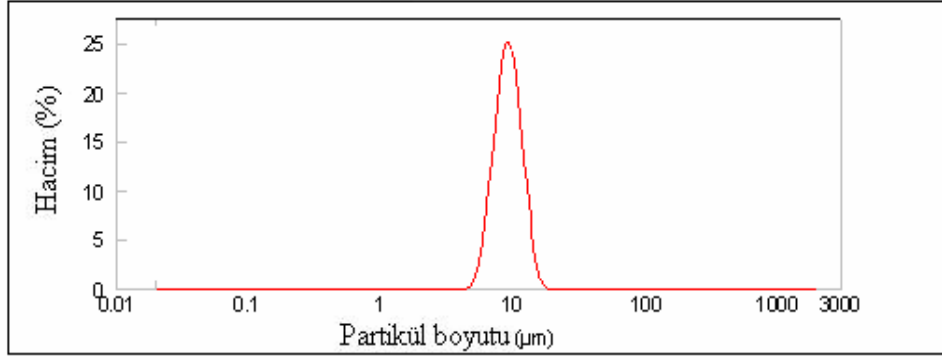
(A)



(B)

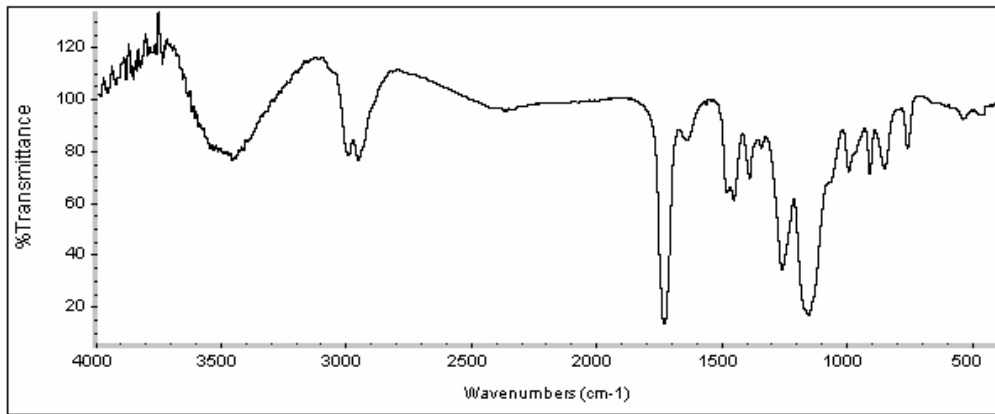


**Şekil 3.4** p(GMA-EGDMA) partiküllerinin SEM görüntüleri



**Şekil 3.5** p(GMA-EGDMA) partiküllerin boyut dağılım grafiği

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin FT-IR spektrumu Şekil 3.6 da verildi. Monodispers partiküllerin FT-IR spektrumundan,  $\sim 2951 \text{ cm}^{-1}$ 'de metilen ve  $2994 \text{ cm}^{-1}$ 'deki metil titreşimleri glisidil metakrilat'ın karakteristik titreşimleri olarak görülmüştür.  $1730 \text{ cm}^{-1}$ 'de glisidil metakrilat'ın ester konfigürasyonuna ait görülen titreşim piki gözlenmiştir.  $910 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen bandın ise epoksi grubuna ait olduğu düşünülmüştür.



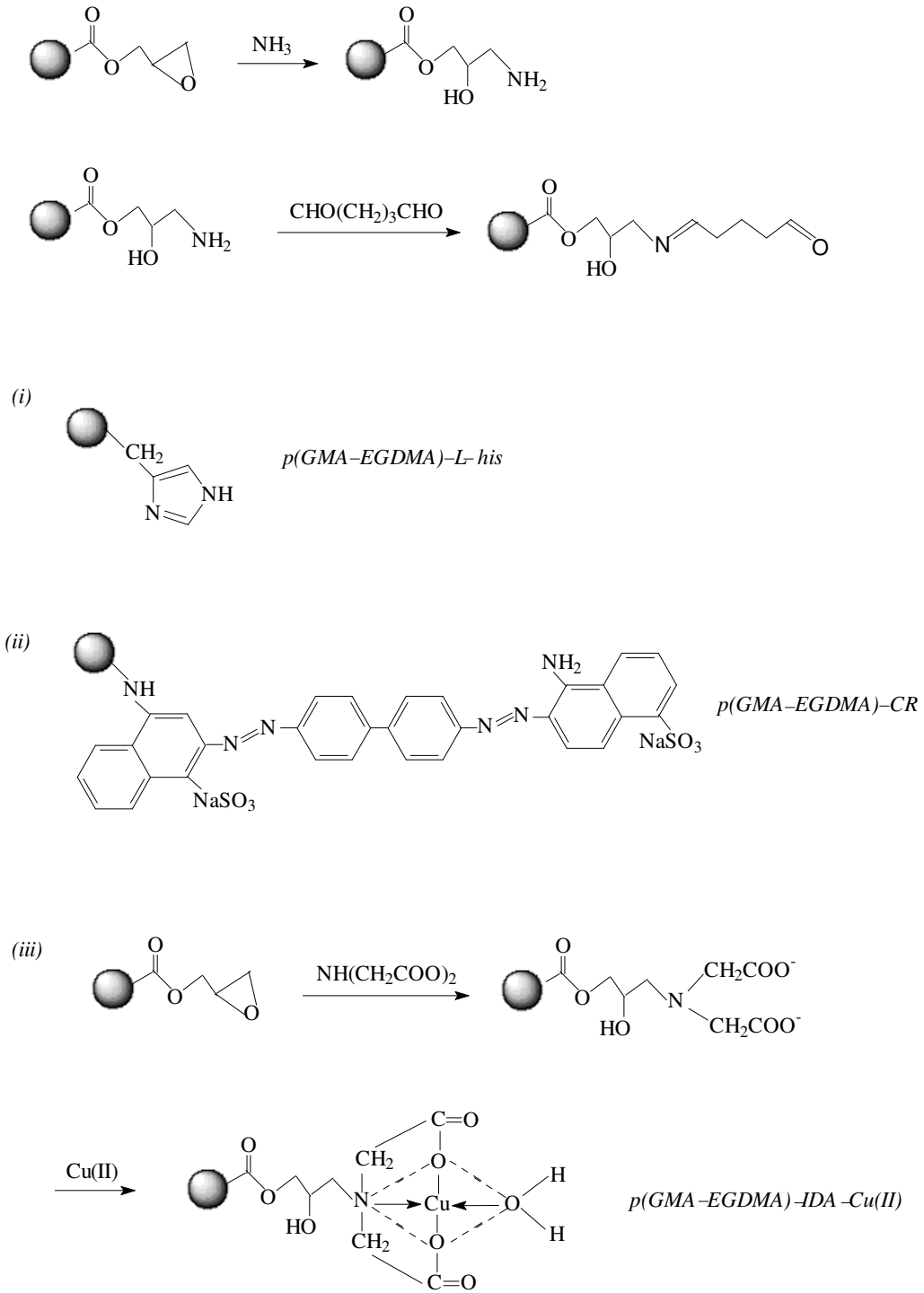
**Şekil 3.6** Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin FT-IR spektrumu

### 3.2. p(GMA-EGDMA) Partiküllerinin Aktivasyonu

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerin bir bölümü epoksi grupları hidroliz edilerek yüzeyinde hidroksil grubu bulunan *p(GMA-EGDMA)* partiküllere dönüştürüldü ve adsorpsiyon işleminde IgG proteini ile yüzeyinden ligand takılı karşılarına karşı kontrol amaçlı kullanıldı.

Çalışmalarımızda sulu ortamdan IgG adsorpsiyonu işleminde kullanılmak üzere üç farklı afinite ligand taşıyan afinite sorbentleri kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda, epoksi grubu taşıyan p(GMA-EGDMA) partikülleri amonyak varlığında aminlenerek yüzeylerinde amin grupları oluşturuldu ve glutarikdialdehit aktivasyonu işlem basamağının ardından ligand olarak *i)* L-histidin amino asidi kovalent olarak bağlanarak *p(GMA-MMA)-L-his*, *(ii)* Kongo Kırmızısı (CR) boya ligandı kovalent olarak bağlanarak *p(GMA-EGDMA)-CR* ve *(iii)* Cu(II) iyonlarının immobilize edilebilmesi için üç dişli iminodiasetik asit ligandı bağlanarak, *p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II)* monodispers afinite partikülleri elde edildi (Şekil 3.7).

Bu yolla yüzeyinde sırasıyla, aminoasit ligand, boya ligand ve immobilize metal iyonu taşıyan üç farklı özellikte afinite sorbenti hazırlandı. Geliştirilen afinite sorbentler kullanılarak sulu ortamdan IgG adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirildi.



**Şekil 3.7** Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin aktivasyonu ve (i) L-histidin, (ii) Kongo Kırmızısı ve (iii) IDA-Cu(II) ligandı bağlı afinite kürelerin şematik olarak gösterimi

Monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin yüzeyde ulaşılabilir epoksi grubu içeriği, pridin-HCl yöntemi kullanılarak 7.37 mmol/g olarak bulundu. Aminleme işleminden sonra monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerindeki amino gruplarının miktarı titrasyon yöntemi ile 2.06 mmol/g olarak hesaplandı. L-histidin aminoasit ligandı ve Cu(II) bağlı monodispers p(GMA-EGDMA) partiküllerinin aktivasyonu için kullanılan glutarikdialdehit'in %31 mertebesine kadar küreler üzerine bağlandığı belirlendi. Monodispers partiküller yüzeyine bağlanan İDA (iminodiasetik asit) miktarı titrasyon yöntemi kullanılarak 3.81 mmol/g olarak belirlendi.

p(GMA-EGDMA)-*L-his*, p(GMA-EGDMA)-*CR* afinite partiküllerinin elementel analizi yapıldı. L-histidin ve Kongo Kırmızısı içeriği, gram polimer başına sırası ile 0.35 mmol ve 0.27 mmol olarak bulundu. L-Histidin ve Kongo kırmızısı bağlı afinite partiküllerin yapılarındaki ligandın polimerik yapıdan ayrılmasının söz konusu olmadığı spektrofotometrik ölçümler ile belirlendi. Monodispers p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) afinite sorbentine bağlanan Cu(II) metal iyonu miktarı gram partikül başına 1.82 mmol olarak bulundu.

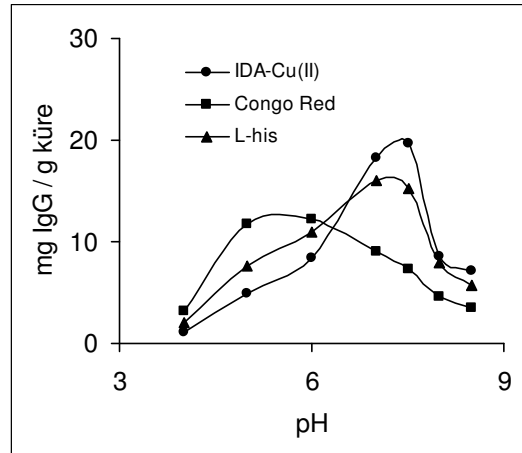
### **3.3. Protein Adsorpsiyon Çalışmaları**

#### **3.3.1. pH'ın Etkisi**

Ara yüzeyde bulunan kovalent olmayan etkileşimler üzerine kurulan afinite kromatografi sistemlerinde, adsorpsiyon ortam pH'ı önemli rol oynamaktadır. Hedef molekül yüzeyinde iyonize olabilen gruplar dolayısı ile oluşan yüzey yük dağılımı,

afinite destek materyalindeki bağlanma bölgeleri ile spesifik afinite etkileşimlerinde pH'ın oldukça önemli bir faktör olmasına yol açmaktadır. Hazırlanan tüm afinite partiküller ile IgG proteinin spesifik etkileşimine pH'ın etkisi 4.0-8.0 aralığında değiştirilerek araştırıldı (Şekil 3.8).

Farklı ligand taşıyan üç ayrı afinite sistemi için düşük pH değerlerinde önemli derecede düşük adsorpsiyon kapasitesi gözlemlendi. Ortam pH'sındaki artışın adsorpsiyon etkinliğinin de artmasına neden olduğu belirlendi (Şekil 3.3.1). Monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) afinite partikülleri ile maksimum IgG adsorpsiyonu sırasıyla pH 7.0'de 16.01 mg/g, pH 6.0'da 12.19 mg/g ve pH 7.5'de 19.74 mg/g olarak bulundu. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi metal iyonunun şelatlandığı afinite partiküller ile elde edildi. Kontrol amacı ile kullanılan p(GMA-EGDMA) partiküllere non-spesifik adsorpsiyonun ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi (2.07 mg/g). Adsorpsiyon çalışmaları sırasında yapılan spektrofotometrik ölçümler ile afinite partiküllerden protein çözeltisi ortamına bağlı ligandın sızmadığı belirlendi.



Şekil 3.8 IgG Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi



Afinite partiküller ile IgG arasındaki spesifik etkileşimin, IgG'nin maksimum adsorpsiyon etkinliği gösterdiği pH değerinde sahip olduğu konformasyonel yapısı dolayısı ile yüzey yük dağılım durumu ve destek materyali yüzeyindeki yük yoğunluğuna sahip bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklandığı düşünüldü. Bir ara yüzey olayı olan biyolojik molekül adsorpsiyonundan sorumlu başlıca etkileşimlerin hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları olduğu bilinmektedir<sup>(86,170)</sup>.

Proteinler, bir seri aminoasit birimini içeren bir yumaktan ibarettir. Bu özellikleri nedeniyle pH'a duyarlı konformasyonlara sahiptirler. Proteinler, izoelektrik noktalarında net bir yüke sahip değildir. Bu nedenle sulu çözeltilerde, izoelektrik noktalarına yakın pH değerlerinde maksimum adsorpsiyon davranışı sergilerler. IgG'nin izoelektrik noktası 6.95'tir ve pH 7.0'de yüzeydeki net elektrik yükü sıfırdır.

IgG ve L-histidin ligandı bağlı destek materyali, arasındaki spesifik etkileşimler (elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağları) pH 7.0'de afinite partiküllerin iyonize olan grupları (karboksil, imidazol, imidazolium, karbonil ve hidroksil) ve IgG molekülünün yan zincir aminoasitleri arasında gerçekleşmektedir. Ayrıca, izoelektrik noktasındaki konformasyonel değişimler de spesifik adsorpsiyona katkıda bulunabilir<sup>(148,171)</sup>.

L-histidin ligandı bağlı p(GMA-EGDMA) partiküllerin maksimum adsorpsiyon davranışı sergilediği pH değerinin literatürde yer alan çalışmalarla uyum içerisinde olduğu belirlendi. Metin ve arkadaşları<sup>(148)</sup>, L-histidin aminoasit ligandı içeren p(HEMA-MAH) membranlar ile sulu çözeltilerden IgG'nin pH 7.0 değerinde maksimum adsorpsiyon davranışı sergilediğini rapor etmişlerdir. Bayramoğlu ve

arkadaşları<sup>(145)</sup> tarafından rapor edilen bir çalışmada, L-histidin ligandı bağlı p(HEMA-GMA) membranları ile maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesine pH 7.0 değerinde ulaşıldığı belirtilmiştir.

Sun ve arkadaşları<sup>(172)</sup>, 1,6 diaminoheksan uzatma kolu takılı p(viniliden florid) hollow fiber yada membranlarına afinite ligand olarak bağlanan farklı aminoasitlerin IgG adsorpsiyonunda performansını araştırarak, L-histidin bağlı destek materyalinin maksimum IgG adsorpsiyonuna pH 6.5 değerinde ulaşıldığını rapor etmiştir. L-histidin ligandının kullanıldığı başka bir çalışmada aminoheksil-Sepharose 4B adsorbenti ile maksimum IgG adsorpsiyonuna pH 7.2 değerinde ulaşıldığı belirtilmiştir<sup>(173)</sup>.

Boya ligandlar ile protein molekülleri arasındaki güçlü etkileşimin, boya ligandın üzerindeki aromatik yapılar ve asidik gruplar ile protein yüzeyinde açığa çıkan aminoasit yan zincirlerinin neden olduğu hidrofobik yada iyon değişim mekanizmalarının ortak sonucunda oluştuğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda boya ligand olarak kullanılan Kongo Kırmızısı tekstil boyası yapısında, sülfonik asit, primer ve sekonder amin grupları ile aromatik grupları taşımaktadır. pH 6.0'da iyonize olabilen gruplar nedeni ile pozitif yüzey yüküne sahip olan IgG molekülü ile bu pH değerinde boya ligandının deprotone olarak negatif yüklü olan sülfonil grupları arasında güçlü elektrostatik etkileşimlerin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu değerden daha düşük ve yüksek pH değerlerinde adsorpsiyon kapasitesinin önemli derecede azaldığı belirlendi (Şekil 3.8).

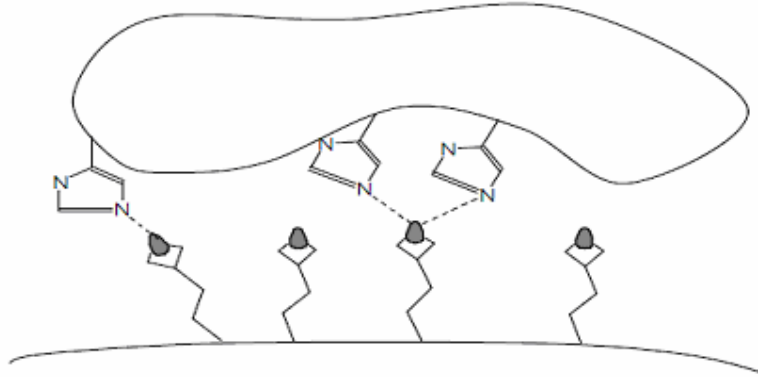
Kongo Kırmızısı boya ligandı ile maksimum adsorpsiyon kapasitesinin ulaşıldığı koşullar, literatürde yer alan farklı boya ligandların kullanıldığı çalışmalar ile benzerlikler göstermektedir. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(97)</sup>, Reaktif Green 5 boya

ligandı immobilize edilen p(HEMA) membranlar ile IgG adsorpsiyon performansını araştırarak, maksimum adsorpsiyon kapasitesine pH 6.0 da ulaşıldığını rapor etmişlerdir. Bayramoğlu ve Arıca<sup>(127)</sup> tarafından rapor edilen başka bir çalışmada ise, Procion Green HE-4BD boya ligandının kovalent olarak bağlandığı p(HEMA) membranlarının IgG ve HSA adsorpsiyon performansını araştırarak maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesinin pH 5.0 de gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Monodispers p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) afinite partiküllerinin IgG adsorpsiyon etkinliğinin adsorpsiyon ortam pH'sının artmasıyla arttığı ve pH 7.5 değerinde ise maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaştığı belirlendi. Artan pH ile adsorplanan protein miktarının artması; IgG protein yüzeyinde açığa çıkan aminoasit kalıntılarının (histidin, triptofan, sistein) yüksek pH'larda Cu(II) metal iyonları için koordinasyon bölgeleri oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Geçiş metal iyonları, proteinlerdeki His-Gly-His, His-Tyr-NH<sub>2</sub> ve His-Trp peptit dizilerine karşı yüksek afinite göstermektedir. Sınır metal iyonu olan Cu(II), histidin ve sistein aminoasitlerinde bulunan sırasıyla N ve S gibi yumuşak Lewis bazları ile etkileşmektedir. Protein yüzeyinde sistein kalıntılarının sınırlı olduğu göz önüne alındığında histidin kalıntılarının sınır metal iyonları için başlıca hedefler olduğu kabul edilmektedir<sup>(174)</sup>. Sulkowski<sup>(87)</sup>, Cu(II) metal iyonu şelatlanmış destek materyallerine proteinlerin afinitesi için, protein yüzeyinde ulaşılabilir en az bir histidin kalıntısının gerekli olduğunu bildirmiştir. IgG yüzeyinde bir histidin dizisine sahiptir, bu açığa vurulan histidinin yan imidazol halkası, immobilize Cu(II) iyonları ile IgG arasında baskın afinite bölgelerini oluşturmaktadır (Şekil 3.9).

Protein yüzeyinde açığa çıkan histidin kalıntısının pKa değerinden (yaklaşık olarak 6-7) daha yüksek bir pH değerine artırılmasıyla kısmi olarak deprotonasyonu

sonucu adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır. Bununla birlikte, izoelektrik noktası üzerinde negatif yüklü olan protein ve immobilize katyonik bakır iyonları arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimlerin baskın kuvvetler olduğu düşünülmektedir. Benzer sonuçlar Wu ve arkadaşları<sup>(125)</sup> tarafından farklı türde (İDA veya N,N,N-tris(karboksimetil)etilendiamin) şelatlayıcı ajanların kullanıldığı Cu(II) metal iyonu immobilize edilen selüloz membranlar ile IgG, HSA ve lizozim proteinlerinin adsorpsiyon davranışının araştırıldığı bir çalışmada, İDA-Cu(II) bağlı selüloz membranlar ile maksimum IgG adsorpsiyonuna pH 7.4'de ulaşıldığı rapor edilmiştir.

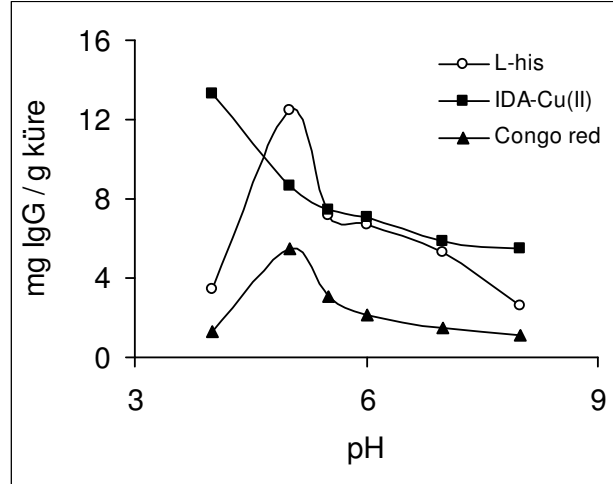


**Şekil 3.9** Cu(II) metal iyonu bağlı afinite partiküller ile IgG etkileşiminin şematik gösterimi

IgG uzaklaştırma ve saflaştırma çalışmalarında farklı metal iyonlarının immobilize edildiği bir çok afinite destek materyali araştırmacılar tarafından hazırlanarak metal iyonlarının IgG molekülüne afinitesi araştırılmıştır. Tishchenko ve arkadaşları<sup>(175)</sup> tarafından, şelatlayıcı grup olarak İDA'nın kullanıldığı, Cu(II) ve Ni(II) metal iyonları immobilize edilen p(GMA-EDMA) mikrokürelerinin

Horseradish spesifik IgG saflaştırılmasında performansını araştırılarak, IgG'nin Cu(II) metal iyonuna Ni(II) kompleksinden daha güçlü bağlandığını rapor edilmiştir. Vançan ve arkadaşları<sup>(112)</sup>, Cu(II), Ni(II), Zn(II) ve Co(II) immobilize edilen İDA bağlı Sepharose kolonunun sulu çözeltiden IgG adsorpsiyon performanslarını karşılaştırarak en yüksek etkinliği Cu(II) immobilize edilen Sepharose kolonun gösterdiğini bildirmiştir. Immobilize metal iyonlarının etkinliğinin araştırıldığı bir başka çalışmada, İDA bağlı poli(etilen-vinil alkol) hollow fiber membranları üzerine Cu(II), Co(II), Ni(II) ve Zn(II) gibi dört farklı metal iyonu bağlanarak hücre kültürü süpernantından IgG saflaştırılmasına çalışmıştır. En yüksek saflaştırma etkinliğini Cu(II) immobilize edilen membranların gösterdiği rapor edilmiştir<sup>(114)</sup>.

Hazırlanan farklı özellikteki monodispers afinite partiküllerin başka bir serum proteini olan albumine karşı adsorpsiyon davranışına pH etkisi araştırıldı. Bu amaçla adsorpsiyon ortam pH'sı 4.0-8.0 aralığında değiştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.10'da verildi. Monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his ve p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) partikülleri ile pH 5.0 ve p(GMA-EGDMA)-CR partikülleri ile pH 4.0 değerinde maksimum HSA adsorpsiyonuna ulaşıldı. Ayrıca grafikten de görülebileceği gibi, IgG için maksimum adsorpsiyonun gözlemlendiği pH değerlerinde HSA adsorpsiyonun ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi.



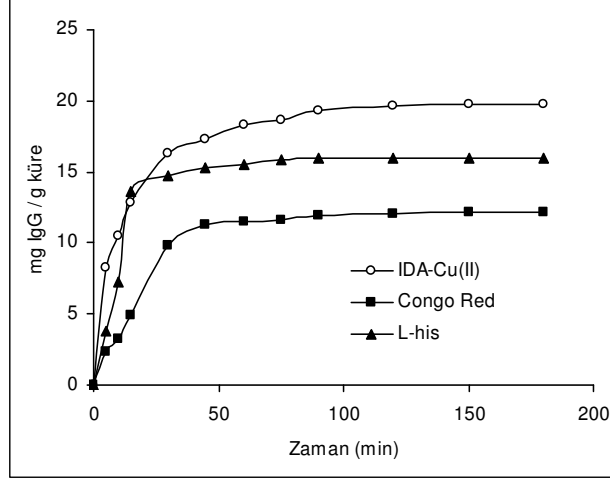
**Şekil 3.10** HSA Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi

### 3.3.2. Adsorpsiyon Zamanının Etkisi

Farklı ligand taşıyan monodispers afinite partiküllerle sulu ortamdan protein adsorpsiyonu işleminin zamana bağlılığını belirlemek, sorbentin sürekli sistemde kullanılma aşamasında önemlidir. Kromatografik proseslerin kullanılabilirliği, hedef proteinlerin adsorpsiyon dengesi ve kinetiğine doğrudan bağlıdır. Kısa proses zamanları protein molekülünde meydana gelebilecek degradasyonu azaltmaktadır<sup>(176)</sup>.

p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) afinite partiküllerin adsorpsiyonunun zamanla değişimi tampon çözeltisi içinde IgG başlangıç konsantrasyonu  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  olduğu adsorpsiyon ortamında 4 saat süresi boyunca kesikli sistemde çalışılarak belirlendi. Şekil 3.11'den görüldüğü gibi, tüm afinite sistemleri için başlangıcında hızlı bir adsorpsiyon gözlemlendi ve 120 dakika sonunda dengeye ulaştığı ve 240 dakika boyunca sabit kaldığı belirlendi. Ayrıca, L-histidin ligandı ve Cu(II) metal iyonu bağlı partiküllerin adsorpsiyon

işleminde, adsorpsiyonun başlangıcındaki bu dik eğimi IgG protein moleküllerin bu afinite destek materyallerine yüksek afiniteyle bağlandığını göstermektedir.



Şekil 3.11 IgG Adsorpsiyonuna Zamanın Etkisi

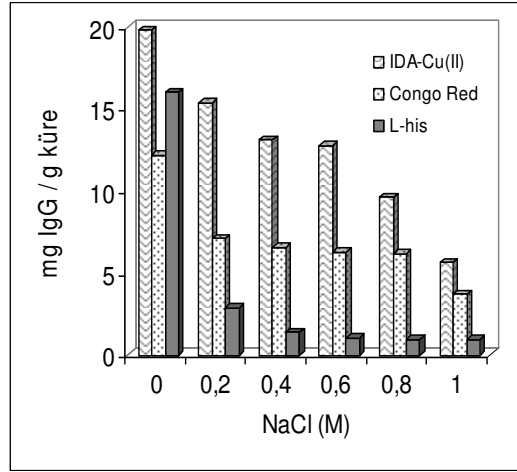
### 3.3.3. İyonik Şiddetin Etkisi

Sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi, tüm afinite partiküller için belirlenen optimum pH değerlerinde farklı tuz konsantrasyonlarında çalışılarak belirlendi. Adsorpsiyon ortamında NaCl konsantrasyonu 0.0-1.0 M aralığında değiştirildiğinde tüm afinite sistemlerin adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir azalma gözlemlendi (Şekil 3.12). İyonik şiddetin artırılmasıyla p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II) monodispers afinite partikülleri için adsorpsiyon eğilimlerinin sırasıyla %94, %69.4 ve %71.4 oranında azaldığı belirlendi.

Afinite partiküllerin IgG adsorpsiyon kapasitesindeki azalmanın, protein molekülleri ve ligandlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerin azalmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Debye-Hückel, adsorpsiyon ortamında elektrolit konsantrasyonu arttırıldığında, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift tabaka kalınlığının azaldığını rapor etmiştir. Ayrıca, Van Oss ise, adsorpsiyon ortamında elektrolit konsantrasyonu arttıkça, protein yüzey yükünün perdelendiğini belirtmiştir<sup>(148,177)</sup>. Bu etkilerin, arayüzeydeki moleküller arasındaki elektrostatik etkileşimin azalmasına neden olacağını düşündürmektedir.

L-histidin ligandı bağlı partiküllere sulu ortamdan IgG adsorpsiyonu işleminde, iyonik şiddetin arttırılmasıyla adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisinin çalışılan diğer farklı ligand taşıyan afinite destek materyallerine kıyasla daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuç, L-histidin amino asit ligandı ile IgG molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimlerin hidrofobik etkileşimlerden daha güçlü olduğunu göstermektedir. Sun ve arkadaşları<sup>(172)</sup>, L-triptofan, L-fenilalanin ve L-histidin aminoasit ligandları bağlı p(viniliden florid) ile IgG adsorpsiyon davranışının araştırıldığı bir çalışmada, adsorpsiyon ortamında iyonik şiddetin arttırılmasıyla adsorpsiyon etkinliğindeki en büyük azalmanın L-histidin ligandı bağlı afinite destek materyalinin gösterdiğini ve L-histidin ile IgG molekülleri arasında baskın kuvvetlerin elektrostatik etkileşimler olduğunu bildirmiştir.



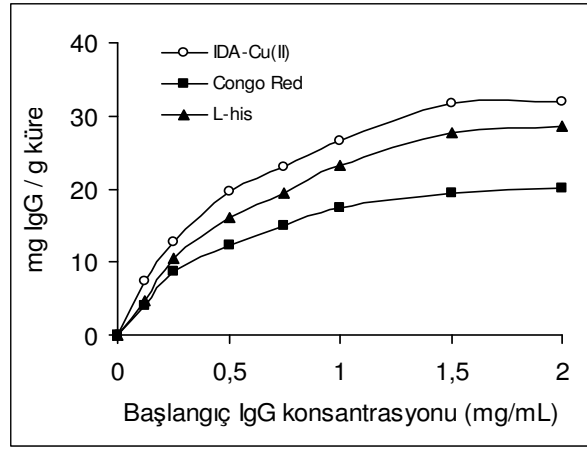


Şekil 3.12 IgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

### 3.3.4. Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Monodispers afinite partiküllerin adsorpsiyon hız ve kapasitesine başlangıç IgG konsantrasyonunun etkisi 0.125-2.0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi. Adsorpsiyon kapasitesinin, 2 mg/ml IgG konsantrasyonuna kadar arttığı, bu değerden sonra sabit kaldığı gözlemlendi. Bu sonuç, afinite partiküllerin etkileşim gruplarının, adsorbe olmuş protein molekülleri ile doymuş hale gelmiş olmasıyla açıklanabilir. p(GMA-EGDMA)-*L-his*, p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) afinite partikülleri ile elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla, 29.7, 21.17 ve 32.87 mg/g olarak bulundu (Şekil 3.13). IgG yüzeyinde bir histidin dizisine sahiptir, açığa çıkan histidin yan imidazol halkası, immobilize Cu(II) iyonları ile IgG arasında baskın afinite bölgelerini oluşturmaktadır. İmidazol halkasının hidrofobik, van der Waals kuvvetler, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi mekanizmaların toplam etkisine sahip olduğu bilinmektedir<sup>(178)</sup>.

Adsorpsiyon işlemi sırasında, IgG ve sorbentler arasında; *i*) metal iyonları ve proteinler arasındaki koordinasyon ve/veya elektrostatik etkileşim *ii*) ligand ve protein arasındaki biyomimetik etkileşim *iii*) protein ve destek materyalinin fonksiyonel grupları arasında non-spesifik bağlanma ve *iv*) protein-protein etkileşimleri gibi farklı bağlanma mekanizmaları gerçekleşebilir<sup>(110)</sup>.



Şekil 3.13 Başlangıç protein konsantrasyonunun etkisi

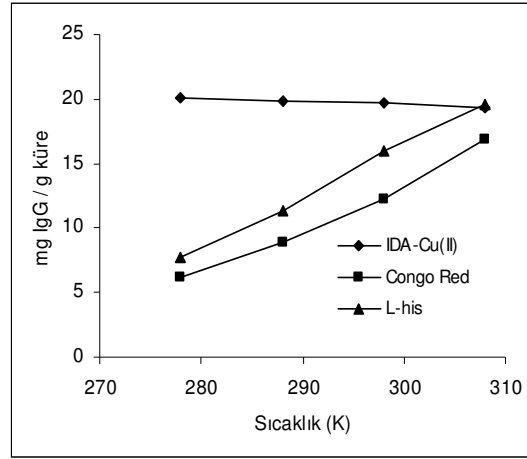
### 3.3.5. Sıcaklığın Etkisi

Adsorpsiyon ortam sıcaklığının  $4^{\circ}\text{C}$ 'den  $37^{\circ}\text{C}$ 'e kadar yükseltilmesi ile Cu(II) ligandı bağlı monodispers p(GMA-EGDMA)-IDA afinite partiküllerin adsorpsiyon kapasitelerinde çok büyük olmayan bir azalma gözlenirken, monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his ve p(GMA-MMA)-CR afinite partiküllerin adsorpsiyon kapasitelerinin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.14). Cu(II) ligandı bağlı afinite partiküllerin adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklıkla azalması, adsorpsiyon prosesinin ekzotermik olduğunu göstermektedir. Monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his ve p(GMA-MMA)-

CR afinite partiküllerin sıcaklığın arttırılmasıyla adsorpsiyon kapasitelerinde gözlenen bu artışın, histidin amino asiti ve boya ligandın aromatik grupları ile IgG arasındaki etkileşiminden kaynaklandığı düşünüldü. Afinite sorbentlerin IgG adsorpsiyon kapasitesindeki artışın sırasıyla 2.72 ve 2.52 kat olduğu belirlendi.

Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(105)</sup> uzatma kolu takılı ve L-histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) afinite mikrokürelerin IgG adsorpsiyon etkinliğinin adsorpsiyon ortam sıcaklığının 4°C'den 37°C'ye arttırması ile 1.97 kat arttığını bildirmiştir. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(177)</sup> tarafından rapor edilen başka bir çalışmada, L-arjinin aminoasit ligandı bağlı p(GMA-MMA) mikrokürelerinin IgG adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklığın arttırmasıyla 1.39 kat arttığı rapor edilmiştir.

Boya ligandın kullanıldığı bir afinite sistemiyle yapılan çalışmada ise, Reaktif Green 5 tekstil boyası bağlı p(HEMA) membranlarının IgG adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklığın 4°C'den 37°C'ye arttırması ile %59 oranında arttığı belirtilmiştir<sup>(97)</sup>.



**Şekil 3.14** Afinite partiküller ile sulu ortamdan IgG adsorpsiyonu işleminde ortam sıcaklığın etkisi

### 3.3.6. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün matrisle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Bununla birlikte, çözeltideki protein derişimi ile matris üzerine adsorplanmış protein molekülü arasındaki ilişkiyi de açıklar. Sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonu çalışmalarında, proteinin matrisle ilişkisini açıklamak amacıyla kesikli sistem deneyleri sırasında elde edilen verilerin, izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı<sup>(169)</sup>.

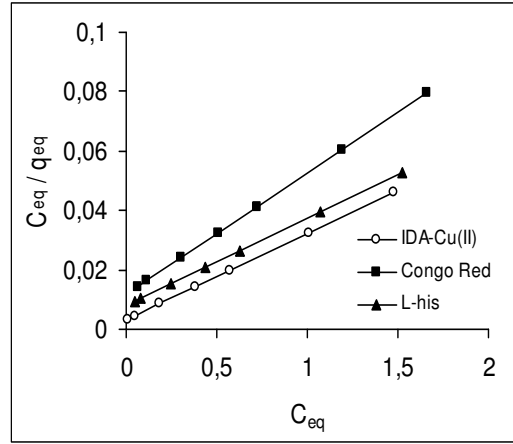
Langmiur izoterm modeli, adsorpsiyonun prosesinin, adsorbent üzerindeki spesifik homojen bölgelerde meydana geldiğini ileri sürer ve bir çok tek tabakalı adsorpsiyon proseslerinde başarılı bir şekilde kullanılır<sup>(179,180)</sup>. Langmiur izoterm modelinden elde edilen doğrusal grafik (Şekil 3.15), yüksek korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) ve teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin,  $q_m$ , deneysel adsorpsiyon kapasitelerine,  $q_{exp}$ , yakın olması, afinite partiküller ile sulu çözeltiden

IgG adsorpsiyonunun Langmiur İzoterm modeli ile açıklanabileceğini gösterdi (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1** Afinite partiküller ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırılmasında elde edilen Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline ait sabitler ve korelasyon katsayıları

Ligand Türü	$q_{exp}$ (mg/g)	Freundlich izotermi			Langmuir izotermi			$\Delta G$ (kJ/mol)
		$K_F$	n	$R^2$	$q_m$ (mg/g)	$K_d \times 10^6$ (M)	$R^2$	
IDA-Cu(II)	32.87	30.63	3.46	0.995	34.25	0.74	0.995	-34.99
Kongo Kırmızısı	21.17	19.09	2.15	0.958	24.49	1.92	0.997	-32.62
L-histidin	29.70	27.43	2.09	0.959	34.28	1.80	0.996	-32.71

Sulu çözeltilerden monodispers afinite partiküllere IgG adsorpsiyonundan elde edilen deneysel veriler Freundlich izoterm modeline uygulandı ve belirlenen karakteristikler Çizelge 3.1’de verildi.  $K_F$  ve n değerlerinin yüksek olması üç farklı ligand takılı monodispers afinite partiküllerin yüksek adsorpsiyon kapasitesi ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırmanın kolay olduğunu göstermektedir. Afinite partiküllere bağlanmanın n değerinin 1’den büyük olması adsorpsiyonun kolay ve doğasının heterojen olduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.15** IgG adsorpsiyonunda deneysel verilerin Langmiur izoterm modeline uygulanması

Monodispers afinite partiküller ile sulu çözülden IgG adsorpsiyon prosesinin türünü belirlemek için Dubinin-Redushkevich (D-R) izoterm modeli kullanıldı<sup>(163)</sup> ve sonuçlar Çizelge 3.2’de verildi. Monodispers p(GMA-EGDMA)-L-his, p(GMA-EGDMA-CR ve p(GMA-EGDMA)-İDA-Cu(II) partikülleri ile gerçekleştirilen adsorpsiyon prosesinin enerjileri sırasıyla, 4.15, 3.95 ve 7.11 kJ/mol olarak hesaplandı. Adsorpsiyon enerjinin literatürde fiziksel adsorpsiyonu tanımlayan aralıkta olduğu belirlendi ve bu sonuçlar tasarlanan afinite sistemler için sulu çözülden IgG adsorpsiyon işleminin doğasının fiziksel olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 3.2** Dubinin-Redushkevich (D-R) izoterm modeli ait sabitler

Ligand türü	D-R izotermi				
	$q_{ex}$ (mg/g)	$q_m$ (mg/g)	$K \times 10^9$ (mol <sup>2</sup> /kJ <sup>2</sup> )	$R^2$	E (kJ/mol)
IDA-Cu(II)	32.87	27.87	0.99	0.964	7.11
Kongo Kırmızısı	21.17	20.45	3.21	0.988	3.95
L-histidin	29.70	28.08	2.93	0.982	4.15

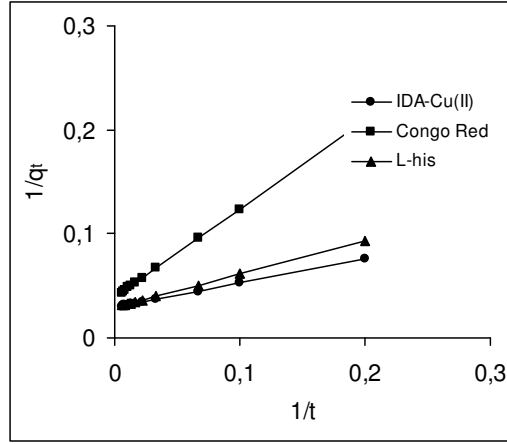
### 3.3.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Monodispers afinite partiküllerin IgG ayrıştırılması işleminde adsorpsiyon kinetiği, deneysel verilerin birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanması ile belirlendi. Deney sonuçları, birinci dereceden kinetik modeline uygulandı ve elde edilen sabitler Çizelge 3.3’de gösterildi. Deney sonuçlarından elde edilen adsorpsiyon kapasitelerinin, ikinci dereceden kinetik modeline uygulanması ile Şekil 3.16’da verilen grafik elde edildi.

Deneysel verilerden hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi,  $q_{deneysel}$ , ile birinci ve ikinci dereceden kinetik modelin uygulanması ile elde edilen teorik denge adsorpsiyon kapasiteleri,  $q_{eq}$ , karşılaştırıldığında, sonuçların ikinci derece kinetik modelinden elde edilen değerlere çok yakın olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.3). Yüksek korrelasyon katsayıları ve maksimum adsorpsiyon kapasitelerindeki uyumlu bu sonuçlar tüm afinite partiküllerin sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetik modeli ile uyumlu olduğunu gösterdi.

**Çizelge 3.3** Afinite sorbentlerin sulu ortamdan IgG adsorpsiyon kinetik sabitleri

Ligand Türü	Birinci Mertebe				İkinci Mertebe		
	$q_{exp}$ (mg/g)	$q_{eq}$ (mg/g)	$k_1 \times 10^2$ ( $min^{-1}$ )	$R^2$	$q_{eq}$ (mg/g)	$k_2 \times 10^1$ (g/mg/min)	$R^2$
IDA-Cu(II)	32.87	21.68	3.72	0.988	33.87	1.29	0.991
Kongo Kırmızısı	21.17	11.55	2.94	0.942	24.82	0.47	0.994
L-histidin	29.70	20.44	5.72	0.986	33.73	0.91	0.992



**Şekil 3.16** IgG adsorpsiyonunun ikinci derece kinetik modeline uygulanması

### 3.3.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Monodispers p(GMA-EGDMA)-CR ve p(GMA-EGDMA)-L-his afinite partiküller üzerine adsorplanan IgG moleküllerinin desorpsiyonu sırasıyla NaCl çözeltisi (2 M, pH 6.0) ve 0.5 M NaCl içeren glisin-HCl (pH 2.6) çözeltisi kullanılarak %86 ve %74 oranında gerçekleştirildi. Protein molekülü Cu(II) metal iyonu bağlı afinite destek materyali güçlü bir şelatlayıcı ajan olan EDTA (50mM) çözeltisi kullanılarak, adsorbe olan IgG moleküllerinin %91'inin desorbe edilebildiği belirlendi.

Destek materyallerinin tekrar kullanılabilirliği, sürekli sistem maliyetleri açısından önemlidir. Tasarlanan afinite destek materyallerinin tekrar kullanılabilirliği, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleriyle belirlendi ve 4 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin sonucunda, adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir kayıp olmadığı gözlemlendi. Afinite mikrokürelerin rejenerasyonu 1 M NaOH çözeltisi ile gerçekleştirildi. Sonuç olarak farklı özellikte



ligand taşıyan afinite destek materyallerinin IgG adsorpsiyon işleminde kapasitelerinde çok az bir kayıpla yeniden kullanılabilceği tespit edildi.

### 3.4. Literatür Değerlendirilmesi

Farklı afinite sistemlerin kullanıldığı IgG uzaklaştırma ve saflaştırma çalışmaları için literatürde farklı adsorpsiyon kapasiteleri rapor edilmiştir. Füglistaller<sup>(181)</sup>, Affi-Gel, Eupergit, Ultrigel, Sepharose gibi yaygın protein A afinite kromatografi matrikslerinin dinamik bağlama kapasitelerini araştırarak, adsorpsiyon kapasitelerinin 0.7-20.1 mg IgG<sub>3</sub>/g aralığında değiştiği belirlenmiştir.

Klein ve arkadaşları<sup>(182)</sup> tarafından, biyospesifik ligand olarak protein A immobilize edilen mikrogözenekli poli(kaprolaktam) hollow fiber ve düz membranlarının kullanıldığı bir çalışmada IgG adsorpsiyonun kapasitesi 12.4-28.3 mg/cm<sup>3</sup> olarak rapor edilmiştir. Dancette ve arkadaşları<sup>(183)</sup> tarafından, insan ve fareden IgG saflaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada polimetilmetakrilat ve poliakrilonitril temelli protein A/G afinite membranlarını kullanarak IgG bağlama kapasitesinin 6.6 mg/ml membran olduğunu bildirilmiştir. Ma ve Ramakrishna<sup>(184)</sup>, protein A/G ile fonksiyonlandırılmış selüloz asetat nanofiber membranlarının, IgG bağlama kapasitesinin 18µg/mg membran olduğunu bildirmiştir. Ferrance<sup>(184)</sup>, protein A immobilize edilen Gellan zıncık kürelerini IgG adsorpsiyonu amacıyla kullanarak, adsorpsiyon kapasitesini 10.7±0.2 mg immobilize protein A olduğunu belirlemiştir. Protein A ligandı bağlı mikro gözenekli polisülfon hollow fiberler ile yapılan bir çalışmada, IgG adsorpsiyon kapasitesinin 8.8 mg/g olduğu belirtilmiştir<sup>(186)</sup>. Protein A ligandının kullanıldığı başka bir çalışma Katoh ve

arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, silika üzerine bağlı protein A ligandının dinamik IgG bağlama kapasitesinin 38 mg/ml olduğu belirtilmiştir<sup>(187)</sup>.

Kim ve arkadaşları<sup>(188)</sup> ligand olarak hidrofobik özellikteki aminoasitleri (fenilalanin ve triptofan gibi) içeren polietilen membranlarının gama globulin kapasitesinin, g polimer başına 50 mg olduğunu belirlemiştir. Muller-Shulte ve arkadaşları<sup>(189)</sup> tarafından, L-histidin ligandı bağlı Biograft Sepharose 4B, Superose ve Spherosil gibi farklı polimerlerden elde edilen çeşitli polimerik taşıyıcıların maksimum IgG1 adsorpsiyon kapasitelerinin 0.05-0.23mg IgG1/ml sorbent aralığında değiştiği rapor edilmiştir.

Farklı merkaptoheterosiklik ligandların (piridin, imidazol, purin ve pirimidin halkaları) aşılandığı poli(etilenvinilalkol) hollow fiber membranların kullanıldığı bir çalışmada, en yüksek IgG adsorpsiyon kapasitesinin elde edildiği merkaptometilimidazol ligandı bağlı hollow fiber membranların adsorpsiyon kapasitesi 100 µg/cm<sup>2</sup> olarak kaydedilmiştir<sup>(190)</sup>.

Ramos-Clamont ve arkadaşları<sup>(191)</sup> domuz serumunda immunoglobulinlerin (IgA, IgG ve IgM) spesifik ayırımında kullanılan yüksek oranda asetilenmiş agaroz matriksin (HA-Sepharose) izole edilen immunoglobulin fraksiyonunun; IgA için 2.2±0.2 mg/mL, IgG için 18.8±0.5 mg/mL ve IgM için 1.4±0.1 mg/mL olduğunu belirtmiştir. Etilendiamintetrametilenfosfonik asit ile modifiye edilerek pseudobiyospesifik sorbent olarak hazırlanan zirkonyum oksit kürelerin kullanıldığı IgG adsorpsiyonunda maksimum dinamik bağlanma kapasitesi 20-12 mg IgG/ml küre olduğu rapor edilmiştir<sup>(192)</sup>. İnsan serumundan spesifik olarak IgG izole edilmesi için tiyofilik paramanyetik polimer kürelerin kullanıldığı bir yöntem Qian ve arkadaşları tarafından kaydedilmiştir. Bu çalışmada, insan serumundan IgG'nin

%72'sinin kazanıldığı ve saflığının %98.4 olduğu rapor edilmiştir<sup>(193)</sup>. Şenel ve arkadaşları<sup>(194)</sup> L-sistein ligandı bağlı p(GMA-MMA) afinite mikrokürelerin, insan serumundan immunoglobulin-G saflaştırılması işleminde başarı ile kullanılabilirdiğini rapor etmişlerdir.

Sun ve arkadaşları<sup>(172)</sup>, uzatma kolu bağlı poliviniliden florid (PVDF) hollow fiber yada membranlarının kullanıldığı afinite sistemlerinde, ligand olarak L-fenilalanin, L-triptofan ve L-histidin aminoasitleri kullanılarak IgG adsorpsiyon performansı araştırılmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesinin elde edildiği membran formda PVDF ile L-fenilalanin, L-triptofan ve L-histidin için maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin 0.23, 0.12 ve 0.20 mg/cm<sup>2</sup> olduğu belirtilmiştir. Protein A ve L-histidin bağlı iki farklı p(GMA-EDMA) monolitin IgG adsorpsiyon kapasitelerinin sırasıyla 0.064 µg/g ve 0.075 µg/g monolit olduğunu belirtmiştir<sup>(83)</sup>. Bueno ve arkadaşları<sup>(195)</sup>, L-histidin bağlı hollow fiber kartuşunun IgG adsorpsiyon kapasitesinin 77.7 mg IgG/g polimer olduğunu belirtmiştir.

L-histidin ligandının kullanıldığı bir başka çalışmada ise, L-histidin ligandı içeren p(HEMA-MAH) membranlarının maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesinin 13.06 mg/ml olduğu belirtilmiştir<sup>(148)</sup>. Bayramoğlu ve Arıca<sup>(127)</sup> tarafından, Procion Green HE-4BD immobilize edilen poli(HEMA) ve polietilen imin(PEI) ile kompleks oluşturularak hazırlanan Procion Green HE-4BD immobilize p(HEMA) afinite membranların IgG adsorpsiyon kapasitelerinin, sırasıyla 7.2 ve 11.3 mg/ml olduğu rapor edilmiştir. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(96)</sup> tarafından rapor edilen başka bir çalışmada Red 120 boya ligandı bağlı p(HEMA) membranların IgG ve HSA adsorpsiyon kapasiteleri araştırılarak, maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesinin 17.8 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Boya ligand kullanıldığı bir başka çalışmada,

Reactive Green 5 bağlı p(HEMA) mebranlarının maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesinin 33.75 mg/ml olduğunu rapor edilmiştir<sup>(97)</sup>.

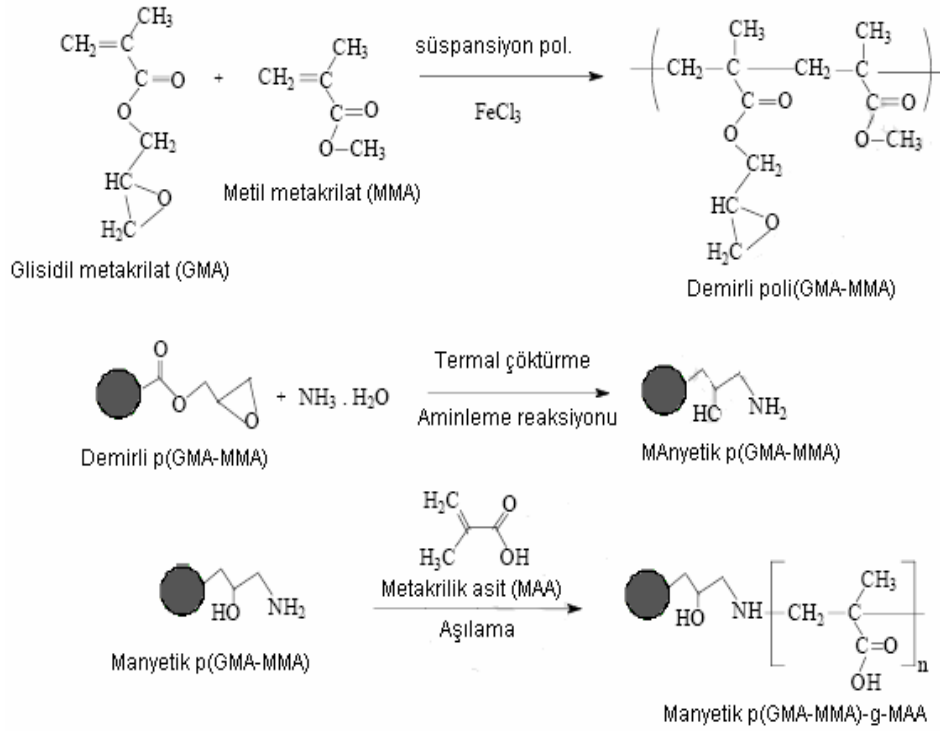
İmmobilize metal afinite kromatografisi tekniği kullanılarak yapılan çalışmalardan biri, Riberio ve arkadaşlarının insan plazmasından IgG saflaştırmak amacıyla, iki farklı şelatörün kullanıldığı (TREN ve İDA) Ni(II) immobilize poli(etilenvinil alkol), (PEVA),hollow fiber mebranlarının hazırlanmasıdır. Yapılan alışmada, Ni(II)-TREN-PEVA hollow fiber mebranının Ni(II)-İDA-PEVA ile aynı seçiciliği göstermesine rağmen daha düşük adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. IgG adsorpsiyonu için Ni(II)-İDA-PEVA ve Ni(II)-İDA-agaroz jel küreler ile karşılaştırıldığında agaroz jel küreler ile daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine (19.2 mg/g) ulaşıldığı belirtilmiştir<sup>(113)</sup>.

Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(145)</sup>, IgG uzaklaştırılması amacıyla şelatlayıcı ajan olarak L-histidin amino asidinin kullanıldığı Fe(III) ve Cu(II) bağlı p(HEMA-GMA) immobilize metal afinite mebranlarını hazırlayarak, adsorpsiyon kapasitesine uzatma kolunun(1,6-diaminoheksan) etkisini araştırmıştır. En yüksek IgG bağlanma kapasitesinin (25.6 mg/ml) uzatma kolu bağlı ve Cu(II) şelatlanmış p(HEMA-GMA) mebranları ile ulaşıldığı rapor edilmiştir. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>(105)</sup> tarafından rapor edilen başka bir çalışmada, IgG uzaklaştırılması ve saflaştırılması için L-histidin ligandı bağlı p(GMA/MMA) kullanılmıştır. Mikrokürelere uzatma kolu ve Cu(II) metal iyonları bağlanmasıyla IgG adsorpsiyon kapasitesinin sırasıyla 93.9 mg/g ve 142.1 mg/g olduğu belirtilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalardaki IgG adsorpsiyon kapasitelerindeki farklılıkların, afinite sistemlerdeki adsorbentin kimyasal yapısı ve yüzey alanı, fonksiyonel gruplar, bağlı ligand miktarı gibi spesifik etkilerin bir sonucudur.

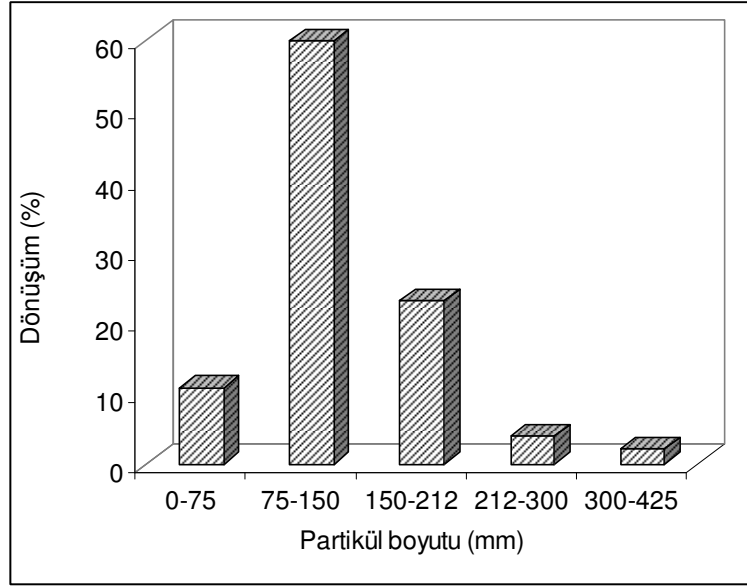
### 3.5. Poli(GMA-MMA)-g-MAA Kürelerinin Karakterizasyonu

Tez çalışmasının ikinci bölümünde biyolojik molekül ile etkileşimini incelemek üzere yeni manyetik özellik kazandırılmış akrilat kökenli afinite polimerik partikülleri hazırlandı. Bu doğrultuda, afinite kürelere farklı bir monomerin kopolimerizasyonu ve/veya monomerin yüzeyde aşılması ve manyetik özellik kazandırılması gibi işlemlerle farklı özellikler kazandırılarak adsorpsiyon tekniği ile tripsin enzimi immobilizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Birinci aşamada, manyetik *mp(GMA-MMA)*, polimerik destek materyali süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlandı. *p(GMA-MMA)* mikro kürelerinin epoksi grupları, magnetizasyon reaksiyonu sırasında amin gruplarına dönüştürüldü. *p(GMA-MMA)* mikro kürelerinin yüzeyine metakrilik asit (MAA) monomeri aşı kopolimerizasyon reaksiyonu ile aşılandı ve *mp(GMA-MMA)-g-MAA*, mikrokürelere elde edildi (Şekil 3.17). Yüzeyine metakrilik asit aşılanmış manyetik kürelere tripsin enzimi adsorpsiyon yoluyla immobilize edildi.



**Şekil 3.17** p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerin sentezinin şematik gösterimi<sup>(166)</sup>.

Sentezlenen mp(GMA-MMA) mikrokürelerinin boy ve boyut dağılımı 425-300-212-75-150  $\mu\text{m}$  gözenek çaplı moleküler elekler kullanılarak belirlendi (Şekil 3.18). Polimerizasyon verimi %65 olarak belirlenen en yüksek dönüşümün gözlemlendiği 75-150  $\mu\text{m}$  boyut dağılımına sahip olan mikroküreler bundan sonraki deneylerde kullanılmak üzere ayrıldı.

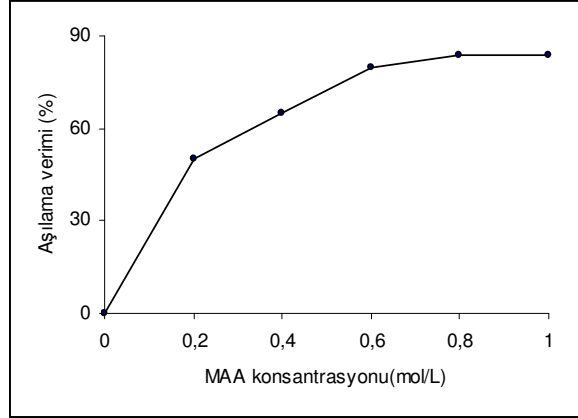


**Şekil 3.18** mp(GMA-MMA) mikrokürelerine ait boyut dağılımı

Manyetik p(GMA-MMA) ve p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin yüzey alanları, BET metodu ile belirlendi. p(GMA-MMA) manyetik kürelerin toplam yüzey alanı ve gözenek hacmi sırasıyla yaklaşık olarak  $7.45 \text{ m}^2/\text{g}$  ve  $1.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{g}$  olarak belirlendi. Metakrilik asit ile aşılama sonrası manyetik kürelerin yüzey alanı ve gözenek hacmi önemli ölçüde ve sırasıyla  $2.44 \text{ m}^2/\text{g}$  ve  $1.3 \times 10^{-8} \text{ cm}^3/\text{g}$  olarak bulundu.

Manyetik p(GMA-MMA) kürelerine MAA aşırı kopolimerizasyonu amonyum persülfat başlatıcısı varlığında, serbest radikalik polimerizasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Manyetik p(GMA-MMA) mikrokürelerin aşılama verimi, metakrilik asit konsantrasyonu 0.0 -1.0 M ile değiştirilerek belirlendi ve Şekil 3.19'da sunuldu. Grafikten görüleceği gibi, metakrilik asit konsantrasyonunun 0.8 mol/L değerine artırılmasıyla, aşılama verimliliğinin %84.7 arttığı ve bu değerden sonra değişmediği

belirlendi. Bu nedenle sonraki aşılama kopolimerizasyon reaksiyonlarında, optimum metakrilik asit konsantrasyonu 0.8 mol/L olarak kullanıldı.



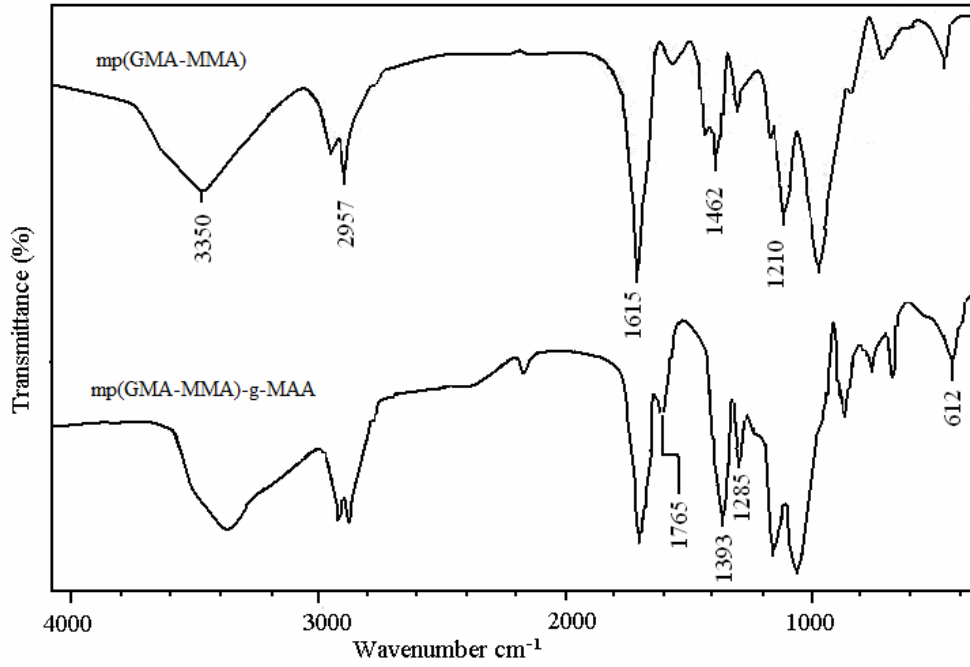
**Şekil 3.19** Monomer Konsantrasyonun Aşılama Yüzdesine Etkisi

Manyetik kürelere aşılama metakrilik asitin ulaşılabilir karboksil gruplarının miktarı potansiyometrik yöntemle 13.46 mmol/g olarak belirlendi. Manyetik destekler, iyon değiştirici kolonlarda kullanıldığı zaman su içeriği önemlidir. Aşılama manyetik kürelerin denge su içeriğinin %63.7 olduğu tespit edildi.

Manyetik p(GMA-MMA) ve p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerin FT-IR spektrumu Şekil 3.20'de sunuldu. Spektrumdan görüldüğü gibi,  $\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$ de hidrojen bağının karakteristik gerilme titreşimi bulunmaktadır. Karakteristik titreşimler arasında hem GMA hem de MMA'nın  $\sim 2957 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen metilen titreşimleri yer almaktadır. Diğer taraftan, manyetik küreler için parmak izi bölgesi olan  $1615$  ve  $1210 \text{ cm}^{-1}$  arasında çeşitli bantlar gözlemlendi. Bu pikler,  $1462 \text{ cm}^{-1}$ GMA ve MMA'nın  $-\text{CH}_2$  grubunun makaslama bandı,  $1393 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1285 \text{ cm}^{-1}$  sırasıyla GMA ve EGDMA'nın karbonil grubuna ait simetrik ve simetrik olmayan gerilme



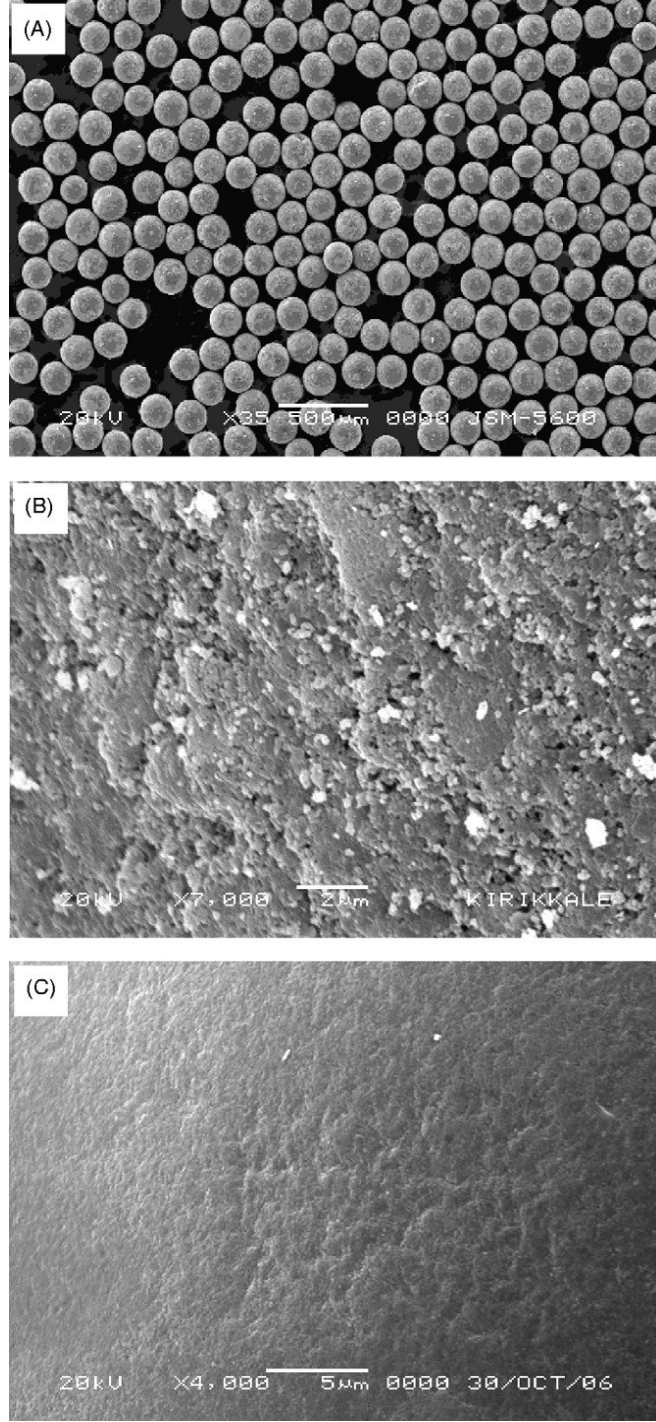
bantlarının olduğu söylenebilir. En önemli adsorpsiyon bandı ise  $1765\text{cm}^{-1}$ de görülen manyetik küreler üzerine aşılana metakrilik asitin karboksil gruplarının göstergesi olan banttır. Ayrıca,  $612\text{ cm}^{-1}$  görülen  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  molekülü karakteristik bir bandı,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  molekülünün küre yapısı içine başarılı bir şekilde yerleştirildiğini göstermektedir.



**Şekil 3.20** Manyetik Kürelerinin FT-IR Spektrumu

Manyetik p(GMA-MMA) ve p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin SEM mikrografları Şekil 3.21’de gösterildi. Taramalı elektron mikroskobundan elde edilen yüzey morfolojisi görüntülerinden, manyetik kürelerin küresel formda ve boyutlarının 75 ve 150  $\mu\text{m}$  arasında olduğu görüldü (Şekil 3.21A). Şekil 3.21C’den görülebileceği gibi, p(MAA) ile aşılama sonrası manyetik kürelerin gözeneklerinin

aşı kopolimeri ile dolduğu ve p(MAA) aşılı manyetik kürelerin yüzeyinin temel manyetik küreler ile karşılaştırıldığında daha pürüzsüz olduğu görüldü (Şekil 3.21B).



**Şekil 3.21** mp(GMA-MMA)-g-MMA kürelerinin SEM fotoğrafları: (A) Manyetik kürelerin genel görünümü, (B) Aşılardan önceki yüzey morfolojisi, (C) Aşılardan sonra yüzey morfolojisi

Sentezlenen manyetik kürelerin manyetik yoğunluğu, oda sıcaklığında Elektron Spin Rezonans spektroskopisi (ESR) ile doğrulandı ve manyetik alana (Gauss) karşı manyetik yoğunluk olarak edilen sonuçlar Şekil 3.22’de gösterildi. ESR spektrumundan, bir magnetit pikinden yaklaşık 1000 Gauss’luk manyetik alanın uygulanması ile manyetik küreleri uyarmak için yeterli olduğu gözlemlendi.

Dış bir manyetik alan uygulandığında, kürelerde etkin bir alan ( $H_{eff}$ ) oluşturmak için, dış manyetik alana ( $H_{ext}$ ) dik olarak elektronik manyetik momentin eklenmesi ile bölgesel manyetik alanın oluşturduğu dış alandan eklenen yada azalan bir iç manyetik alan oluşabilir<sup>(196)</sup>.

$$H_{eff} = H_{ext} + H_{local}$$

Şekil 3.22’de görüldüğü gibi, manyetik p(GMA-MMA) kürelerinin bağıl şiddeti  $2.8 \times 10^{-3}$ ’dir. Bu değer, termal çöktürme esnasında oluşan magnetit nano partiküllerden dolayı, polimerik yapının lokal bir manyetik alana sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 3.22’den elde edilen g faktörü, çiftleşmemiş elektronların bulunduğu yerin karakteristik bir niceliği olarak düşünülebilir ve aşağıda verilen eşitlik yardımıyla hesaplanabilir:

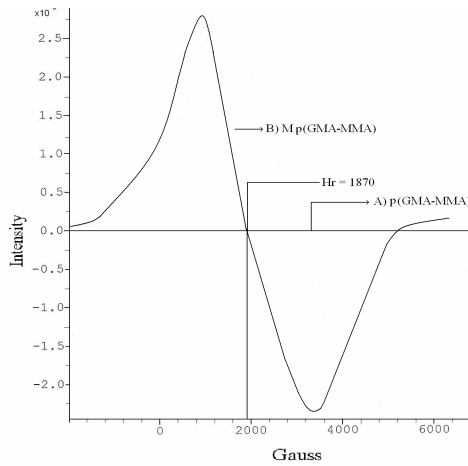
$$g = h\nu / \beta H_r$$

Burada  $h$  Planck sabiti ( $6.63 \times 10^{-27}$  erg s);  $\beta$  genel sabit ( $9.27 \times 10^{-21}$  erg/Gs);  $\nu$  frekans ( $9.80 \times 10^9$  Hz) ve  $H_r$  manyetik alan rezonansıdır (Gs).

Bilinmeyen bir sinyal için g faktörünün ölçülmesi, sinyalin belirlenmesinde önemlidir. Literatürde Fe(III) için g faktörü, düşük spin için 1.4-3.1 ve yüksek spin kompleksleri için 2.0-9.7 aralığında verilmektedir<sup>(197)</sup>.

Manyetik p(GMA-MMA) için yukarıda bahsedilen eşitlik kullanılarak hesaplanan g faktörü 3.74 olarak belirlendi. ESR spektrumundan ve  $H_r$  değerinden görüldüğü gibi, 1870 Gs'lik manyetik alanın uygulanması, p(GMA-MMA) manyetik kürelerinin 1.0 gramında tüm dipol momentinin harekete geçmesi için yeterli olduğu düşünüldü.

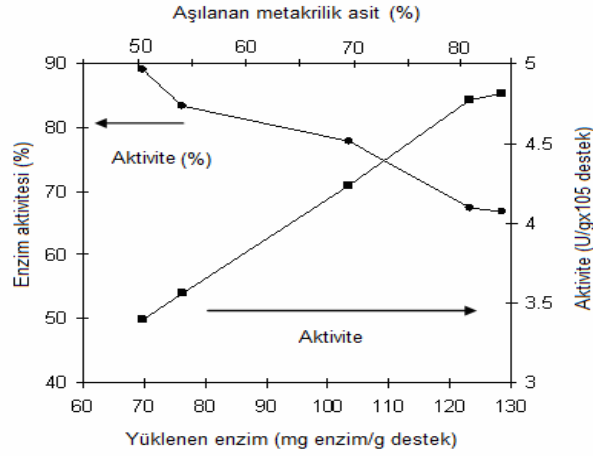
Literatürde, manyetik polimerik malzemeler için bu değer 1000 ve 20.000 Gauss arasında olduğu rapor edilmiştir<sup>(198)</sup>. Literatürdeki çalışmalarla kıyasladığımızda, 1000 ve 20.000 kGauss arasında değişen manyetik şiddetler, çalışmamızda çeşitli uygulamalar için daha az manyetik yoğunluk gerektiren manyetik kürelerin sentezlendiğini göstermiştir. Böylece, manyetik küreler geleneksel sabit bir mıknatıs yardımıyla çözelti ortamından kolaylıkla ayrılabilir. Uygulanan manyetik kuvvet uzaklaştırıldığı zaman, manyetik kürelerin basit bir şekilde çalkalanması ile kolayca dağıtılabilir.



Şekil 3.22 Manyetik p(GMA-MMA)-g- MAA kürelerinin ESR spektrumu

### 3.6. Tripsinin İmmobilizasyonu

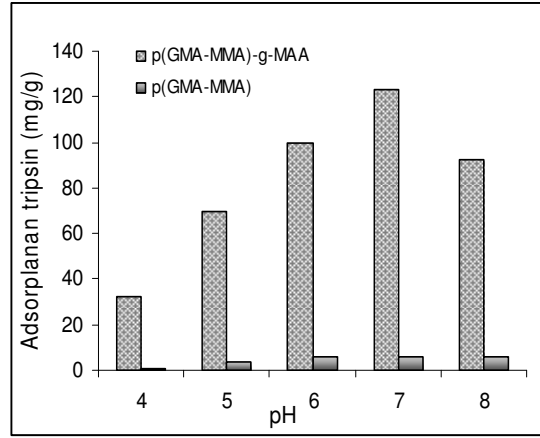
Enzim immobilizasyon proseslerinde en önemli konu enzimin destek malzemesi üzerinde aktivitesini korumasıdır. İmmobilizasyon prosedüründe herhangi bir kimyasal modifikasyon yada fiziksel adsorpsiyon, enzimlerin aktivitesini etkilemektedir. İyon-değişim etkileşimi yoluyla gerçekleşen adsorpsiyon işlemi, diğer yöntemlere göre daha ılıman şartları gerektiren bir protein immobilizasyon yöntemidir. Bu nedenle iyon değiştirici adsorbentler protein ayırımında yada immobilizasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(199)</sup>. Ayrıca, çok bölgeli bağlanmanın enzimlerin yapısal kararlılığını geliştirmeye yardım ettiği bilinmektedir. Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelere tripsin immobilizasyonu iyon değişim etkileşim yoluyla gerçekleştirildi. Enzim immobilizasyon kapasitesinin manyetik kürelere aşılana metakrilik asit yüzdesi ile değişimi Şekil 3.23’de verildi. Şekil 3.23’den görülebileceği gibi manyetik kürelere aşılana metakrilik asit yüzdesindeki artış, immobilizasyon kapasitesinin artmasına neden olmuştur. Fakat bu oranın, yaklaşık %84.7 aşılama yüzdesinden sonra bir değişmediği gözlemlendi. Şekil 3.23’den görülebileceği gibi, tripsin yüklemesi ve sonuç enzim aktivitesi, g küre başına 120 mg protein civarında lineer olarak arttı ve bu değerden sonra ise bir plato değerine ulaştığı gözlemlendi. Böylece, maksimum enzim yüklemesinin 123.2 mg/g olduğu ve adsorbe olan enzimin başlangıç aktivitesinin %84.2’sini koruduğu belirlendi. Bu sonuç, metakrilik asit aşılana zincirler üzerine adsorbe olan enzimin fazla yığılmasının sonucu olarak substrat difüzyonunda sınırlama meydana gelmesiyle açıklanabilir. Bundan sonraki deneylerde, metakrilik asit aşılama yüzdesi %84.7 olan p(GMA-MMA)-g-MMA mikrokürelere tripsin immobilizasyon deneylerinde kullanıldı.



**Şekil 3.23** Enzim Yükleme Kapasitesi Üzerine MAA Aşılama Yüzdesinin Etkisi

### 3.6.1. Tripsin İmmobilizasyonuna pH'ın Etkisi

Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA küreleri üzerine tripsinin adsorpsiyonuna pH'ın etkisi immobilizasyon ortam pH'ı 4.0-8.0 aralığında araştırıldı ve sonuçlar Şekil 3.24'de verildi. *mp(GMA-MMA)-g-MAA* küreleri ile maksimum adsorpsiyon kapasitesine pH 7.0 da ulaşıldı ve pH'ın artışı yada azalmasıyla azaldı. Manyetik küreler üzerindeki metakrilik asitin fonksiyonel karboksil gruplarının, tripsin adsorpsiyonunda aktif bölgeler olarak düşünüldü. Tripsinin pI değeri 10.0 'dır. Bu nedenle tripsin molekülleri pH'ı 10.0'dan daha düşük olan bir ortamda net pozitif yüke sahiptir. Bununla birlikte, metakrilik asitin karboksil gruplarının pI değeri 4.5 olduğundan dolayı bu değerden daha yukarı değerlerde net negatif yüke sahiptir. Bu nedenle pH 7.0 civarında olan adsorpsiyon ortamında, protein ile iyon değiştirici adsorbent arasında elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 3.24** mp(GMA-MMA)-g-MAA küreleri ile Tripsin adsorpsiyonuna pH etkisi;  
Başlangıç tripsin konsantrasyonu: 2.0 mg/mL

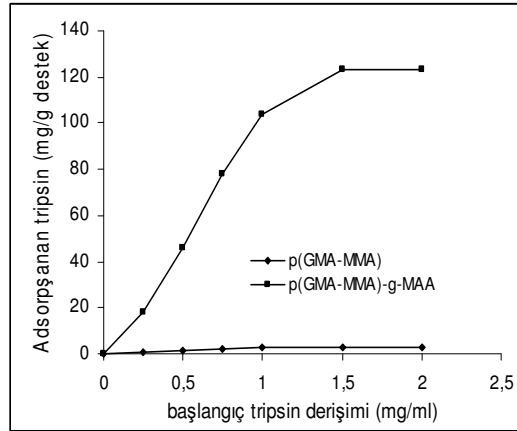
Çözeltinin pH değerine bağlı olarak tripsin moleküllerinin amin grupları protonlanır ( $\text{NH}_3^+$ ) ve protonlanmanın derecesi, çözelti ortamının pH'ına bağlı olacaktır. Tripsin enziminin yüzeyindeki protonlanmış amin grupları, tripsin molekülleri ile manyetik küreler arasındaki elektrostatik etkileşimin türünü belirlemektedir<sup>(200-202)</sup>. Daha alkali yada daha asidik bölgelerde enzimin adsorpsiyon kapasitesinde azalma, zıt yüklü bu gruplar arasındaki elektrostatik itmelerden kaynaklanabilir. Bu doğrultuda, bundan sonraki çalışmalarda, enzim immobilizasyonu için polikationik polimer aşılı manyetik küreler ile bazik bir protein olan tripsin adsorpsiyonu pH 7.0 da gerçekleştirildi.

### 3.6.2. İmmobilizasyona Başlangıç Tripsin Konsantrasyonunun Etkisi

Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin, adsorpsiyon kapasitesine başlangıç tripsin konsantrasyonunun etkisini araştırmak amacıyla, adsorpsiyon ortamında tripsin konsantrasyonu 0.2-2.0 mg/ml aralığında değiştirildi. Şekil 3.25'den görülebileceği gibi, başlangıç tripsin konsantrasyonun artması ile



adsorpsiyon kapasitesi artmıştır. Manyetik p(GMA-MMA) ve p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla, 1.97 ve 123.2 mg/g küre olarak belirlendi. Manyetik kürelere metakrilik asit aşılması ile, tripsin adsorpsiyon kapasitesinin yaklaşık olarak 62.8 kat arttığı gözlemlendi. Şekil 3.25’den görülebileceği gibi, düşük tripsin konsantrasyonunda deneysel tripsin adsorpsiyon izotermi çok yüksektir ve 2.0 mg/ml başlangıç tripsin konsantrasyonunda bir plato değerine ulaşmaktadır.



**Şekil 3.25** Başlangıç tripsin konsantrasyonunun immobilizasyon kapasitesine etkisi

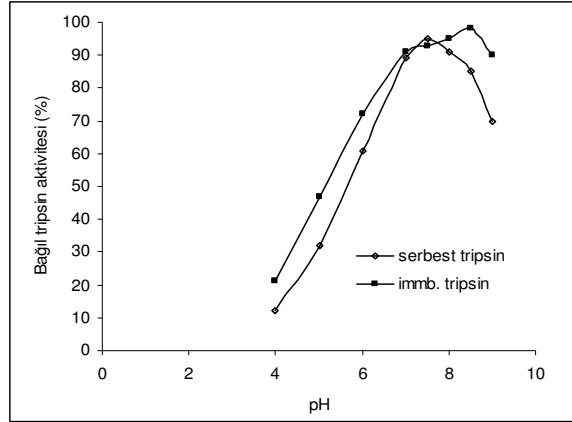
### 3.6.3. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Aktivite Tayini

Proteaz grubu enzimlerin bir üyesi olan tripsin, çeşitli yapay substratların ester ve amid bağlarını hidrolizler. Serbest halde bulunan ve manyetik p(GMA-MMA)-MAA kürelerine immobilize olan tripsinin amidaz aktivitesi, yapay substrat olarak BAPNA (N-benzil-D-L-arjinin-p-nitroanilid) çözeltisi kullanılarak belirlendi.

### 3.6.3.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine pH Etkisi

BAPNA hidrolizinde serbest ve immobilize enzimin aktivitesi üzerine pH'ın etkisini belirleyebilmek amacıyla reaksiyon ortam pH'ı 4.0-9.0 aralığında değiştirildi ve Şekil 3.26'da verildi. Serbest enzim için optimum aktivite pH 7.5'de gözlenirken, immobilize enzim için optimum pH değeri yaklaşık 8.5 olan daha alkali bölgeye kaydığı gözlemlendi. İmmobilize tripsin ayrıca, hem alkali hem de asidik bölgelerde genişleyerek farklı bir pH profili sergilediği gözlemlendi.

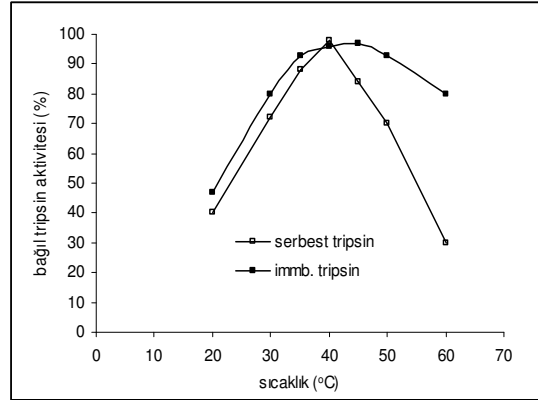
Enzimin immobilize edilmesiyle optimum pH değerinin daha alkali bölgeye kayması, enzim ve polimerik destek arasındaki ikincil etkileşimler(örneğin, iyonik ve polar etkileşimler, hidrojen bağı) yüzünden olması muhtemeldir. Tripsin yada diğer enzimlerin immobilizasyonu için benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir<sup>(203-205)</sup>.



Şekil 3.26 Serbest ve immobilize enzimin pH profili

### 3.6.3.2. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize tripsinin, ortam sıcaklığı ile aktivitesindeki değişimi belirleyebilmek amacıyla reaksiyon ortam sıcaklığı 20-60°C aralığında değiştirildi ve sonuçlar Şekil 3.27’de sunuldu. Şekil 3.27’den görülebileceği gibi, sıcaklığın değişmesi ile birlikte serbest enzim için 40°C immobilize enzim için 45°C de optimum aktivite gösterdiği ve çan eğrisine benzer bir profil sergiledikleri belirlendi. Bununla birlikte, immobilize enzim için 45-55°C sıcaklık aralığında görülen plato bölgesi serbest enzim için gözlenmedi. Enzimin immobilize edilmesiyle optimum sıcaklıkta gözlenen artış, enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişimine neden olduğu düşünüldü. Ayrıca, enzimin amino grupları ile destek materyali arasındaki kovalent olmayan etkileşimler, enzimin substratına bağlanmak için gösterdiği konformasyonel esnekliğini azaltır<sup>(203)</sup>.

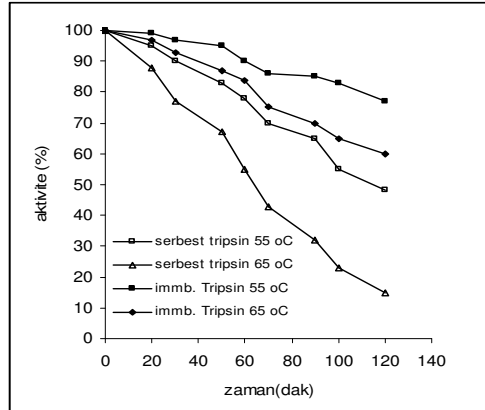


Şekil 3.27 Serbest ve İmmobilize Tripsinin Sıcaklık Profilleri

### 3.6.4. Serbest ve İmmobilize Tripsin Enziminin Kararlılık Çalışmaları

#### 3.6.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Termal Kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı, çeşitli sıcaklıklarda substrat varlığında belirlendi. Şekil 3.28, 55 ve 65°C gibi iki farklı sıcaklıkta sırasıyla serbest ve immobilize enzimin ısı inaktivasyon eğrilerini göstermektedir. Isı kararlılık modeli, manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerine immobilize olan tripsinin 55 °C' deki termal inaktivasyon hızının serbest enziminkinden daha küçük olduğunu göstermektedir. 120 dakikalık işlem süresinin ardından immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %73'ünü koruduğu buna karşın serbest enzimin başlangıç aktivitesinin ancak %49'nu koruduğu belirlendi.



Şekil 3.28 Serbest ve İmmobilize Tripsinin Termal Kararlılığı

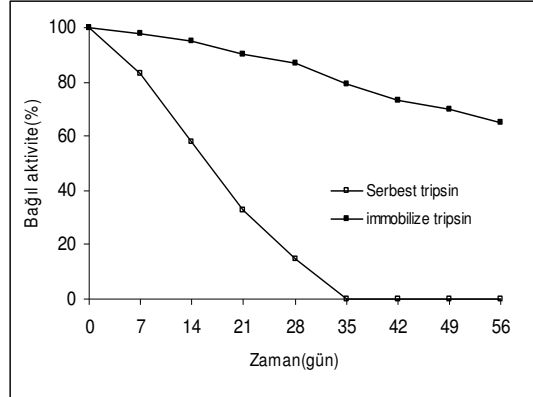
65°C sıcaklıkta gerçekleştirilen termal kararlılık deneylerinde, 120 dakikalık işlem süresinin sonunda, serbest enzim başlangıç aktivitesinin %16'sını koruduğu immobilize enzimin serbest enzimden daha yavaş hızda inaktive olarak başlangıç

aktivitesinin %59'unu koruduğu belirlendi. Bu sonuçlardan yararlanılarak immobilize enzimin yüksek sıcaklıklarda termal olarak kararlılığını arttırdığı belirlendi. Enzimlerin termal kararlılığının adsorpsiyonla artması uygulanma potansiyellerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Literatürde enzimlerin immobilizasyon sonucunda termal kararlılığın arttığı bir çok adsorbe enzim sistemi için kaydedilmiştir<sup>(157,206,207)</sup>. Bu gözlemler temel alındığında iyon değiştirici grup taşıyan hidrofilik ağ yapısına sahip manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA mikrokürelerine adsorbe olan enzimin termal kararlılığının serbest karşıtlarına göre daha yüksek olduğu belirlendi.

#### **3.6.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı**

Serbest ve immobilize tripsin enziminin depolama kararlılığı, tampon çözelti ortamında (50 mM, pH 4) 4°C'de 8 hafta saklandıktan sonra enzimin aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Bu depolama koşulunda, sekiz haftalık depolama periyodunda immobilize tripsinin aktivitesinde %39'luk bir azalma kaydedildi (Şekil 3.29). Aynı depolama şartlarında, dört haftalık depolama periyodunda serbest tripsin enziminin aktivitesinin %89'unu kaybettiğı belirlendi. Şekil 3.29'dan görüldüğü gibi immobilize tripsin, serbest formuna göre daha yüksek depolama kararlılığına sahiptir. Enzim ve manyetik kürelerin karboksil grupları arasında çok bölgeli iyonik etkileşimlerin oluşması ayrıca immobilize enzimin daha yüksek konformasyonel kararlılığa sahip olduğunu gösterir. Serbest enzimin aktivitesindeki bağıl azalma, depolama sırasında enzimin ortamda kolaylıkla otoliz olmasına bağlanabilir. Manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin üzerine tripsinin immobilizasyonu otolizin etkisini azalttığı söylenebilir. Kararlılık deneylerinin gerçekleştirildiğı 4°C

sıcaklık değerinin immobilize enzimin depolanması için uygun olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.29 Serbest ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı

### 3.6.5. Enzim Kinetiği

Enzim immobilizasyonun önemli olduğu enzim reaktörleri ve biyosensörlerin yapımında izlenebilen kinetik parametrelerde gözlenen değişiklikler çok önemlidir. Enzim kinetiğinin belirlenmesi amacıyla, serbest ve immobilize enzim için farklı konsantrasyonlardaki yapay substratın (BAPNA) hidrolizinin başlangıç reaksiyon hızı ölçüldü ve elde edilen veriler Michaelis-Menten eşitliğine uygulandı. Serbest ve immobilize enzim için maksimum reaksiyon hızı ( $V_{max}$ ), ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) değerleri hesaplandı, sonuçlar Çizelge 3.4 de verildi. Serbest tripsin enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 9.7 mM, 5890 U/mg olarak hesaplandı. İmmobilize enzim için  $K_m$  değeri 13.6 mM olarak belirlendi ve  $K_m$  değeri serbest karıştına göre 1.4 kat daha yüksek olduğu görüldü. Bu değişim,

manyetik küreler üzerine adsorpsiyon yoluyla immobilize olan enzimin substrata karşı gösterdiği afinitenin değiştiğini göstermektedir. Bununla birlikte immobilize enzimin  $V_{max}$  değeri 3946 U/mg olarak hesaplandı. Bu değer serbest enzim ile karşılaştırıldığında 1.5 kat azaldığı belirlendi.

**Çizelge 3.4** Serbest ve İmmobilize Kinetik Sabitleri

Enzim Türü	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg enzim)	Yüklenen Enzim (mg enzim /g)	Verimlilik Faktörü	Katalitik verim ( $k_{cat}/K_m$ )
Serbest Enzim	9.7	5890	-	-	607
İmmobilize Enzim	13.6	3946	124.7	0.67	290

Enzim immobilizasyonundan sonra  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerindeki değişimler çeşitli sebepler sunulabilir<sup>(208-210)</sup>. Bu değişimler, immobilize enzimin serbest karşısına göre daha az aktif konformasyona neden olan, enzimin destek materyaline aşıl原因 metakrilik asit ile iyon değişimi gibi çeşitli faktörlere bağlanabilir. Tripsin enziminin yüzeyi sırasıyla 15 ve 2 lizin ve arjinin kalıntularına sahiptir. Dolayısıyla, negatif yüklü destek materyali ve yüzeyinde pozitif aminoasit kalıntıları bulunan tripsin enzimi arasında iyon değişim etkileşimi hakimdir. Tripsinin bu çok bölgesi etkileşim yoluyla immobilize edilebileceği söylenebilir. Ancak, prosesin immobilize enzimin konformasyonel deformasyonuna da neden olabilir. Böylece, immobilize enzimin uygun olmayan yönlenmesi ile substratın bağlandığı aktif bölgeler engellenebilir.

Verimlilik faktörü, immobilize enzimin serbest karşıtına göre maksimum reaksiyon hızlarından hesaplanabilir:

$$\eta = V_{immb} / V_{serbest}$$

Burada,  $V_{immb}$ ,  $V_{serbest}$  sırasıyla immobilize ve serbest enzimin reaksiyon hızını göstermektedir. Bu hesaplamadan, manyetik kürelerin immobilize tripsin için verimlilik faktörü 0.67 olarak bulundu.  $k_{cat} / K_m$  bir enzim- substrat çiftinin katalitik veriminin bir ölçüsüdür. Çalışmamızda, serbest ve immobilize tripsinin katalitik verimlilikleri ( $k_{cat} / K_m$ ) sırasıyla 607 ve 290 olarak bulundu. Enzimin immobilizasyonla katalitik verimliliğinin 2.09 kat azaldığı belirlendi.

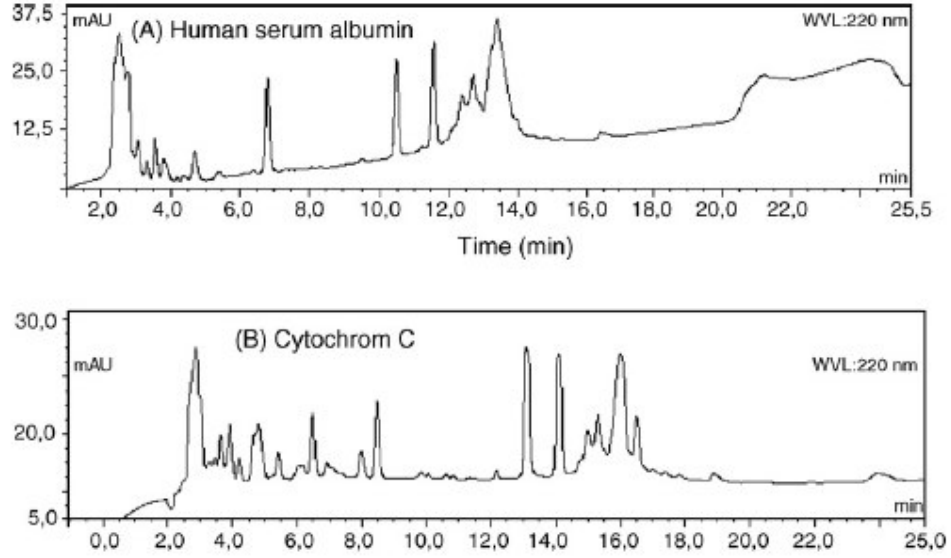
### 3.6.6. İmmobilize Tripsinin Protein Parçalama Verimliliği

Tripsin enzimi, yaygın olarak proteinleri sindirmek ve peptitleri oluşturmak için kullanılmaktadır. Tripsin çok iyi tanımlanmış spesifikliğıe sahip olduğundan dolayı, özellikle bu çalışmalar için uygundur. Tripsin spesifik olarak, lizin ve arjinin kalıntılarının karboksil yan zincirlerindeki peptit bağlarını hidrolize eder. İmmobilize tripsin enziminin protein parçalama amacıyla kullanılabilirliğı ve verimliliğı iki farklı model protein (örn; HSA ve Sitokrom *c*) kullanılarak belirlendi.

İmmobilize enzimin HSA ve Sitokrom *c* parçalama etkinliğıne ait HPLC kromatogramları Şekil 3.30A ve 3.30B'de ayrıntılı olarak gösterildi. HPLC kromatogramlarından immobilize tripsin ile her iki proteinin de etkili bir şekilde parçalandığı görüldü. Bununla birlikte, immobilize tripsin ile proteinlerin parçalanmasından sonra HPLC ile elde edilen HSA ve Sitokrom *c*'ye ait



kromatogramlar karşılaştırıldığında Sitokrom *c*'nin HSA'dan daha fazla sayıda peptit sayısı elde edildi.



**Şekil 3.30** HPLC kromatogramları:(A) immobilize tripsin ile HSA parçalanması, (B)İmmobilize tripsin ile Sitokrom *c* parçalanması

Karşılaştırma için serbest tripsin enzminin HSA ve sitokrom *c* parçalama performansı araştırıldı. Serbest tripsin enzimi ile HSA ve sitokrom *c*'ye ait peptit kromatogramları, immobilize tripsinin serbest tripsinden az farklı olduğu belirlendi. Sonuçlar, manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA küreleri üzerine iyon değişim etkileşimiyle immobilize edilen tripsinin protein parçalanmasında ve birincil yapının belirlenmesinde pratik olarak uygulanabileceğini göstermektedir. İmmobilize tripsin kartuşlara yerleştirilebilir ve sürekli bir akış sisteminde peptit haritasının otomasyonunda kullanılabileceği düşünüldü.

### 3.6.7. Destek Materyali ve İmmobilize Tripsinin Tekrar Kullanılabilirliği

p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için, aynı destek materyali kullanılarak tripsinin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü altı kez tekrarlandı. Tripsin adsorplanmış manyetik kürelerin rejenerasyonu 1.0 M NaCl içeren 1.0 M formik asit çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Altı kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonunda manyetik kürelerin adsorpsiyon kapasitesinde yalnızca %8'lik bir azalma olduğu belirlendi. Bu bulgular, p(GMA-MMA)-g-MAA kürelerinin adsorpsiyon yoluyla tersinir enzim immobilizasyonunda başlangıç yükleme kapasitesinde çok küçük bir değişim ile tekrar kullanılabilirliğini göstermiştir. Yapay substrat olarak kullanılan BAPNA'nın hidrolizi aynı tripsin immobilize küreler ile 25°C'de gerçekleştirildi. Manyetik kürelere immobilize olan enzim 20 kez tekrar kullanıldı ve ilk yedi kullanımda aktivite kaybının %23 olduğu, daha sonraki on üç kullanımda sabit kaldığı gözlemlendi. Sonuçlar, manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA küreleri üzerine adsorplanan tripsinin aktivitesinde kayıp olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirliğini gösterdi.

### 3.7. Literatür Değerlendirilmesi

Enzimlerin çeşitli destek materyallerine immobilizasyonu özellikle biyomedikal ve biyoteknolojik alanda çok sayıda pratik uygulamalarda kullanılmaktadır<sup>(211-213)</sup>. Literatürde enzimlerin yüksek aktivite ve kararlılıkla immobilizasyonu için geliştirilen çeşitli yöntemler ve destek materyalleri yer almaktadır. Proteolitik bir enzim olan tripsin immobilizasyonu için literatürde çok sayıda metot ve destek materyalinin kullanıldığı çalışma rapor edilmiştir.

Kang ve arkadaşları<sup>(150)</sup>, tripsinin kovalent olarak immobilize edildiği poli(metil metakrilat-etilakrilat-akrilikasit) lateks partiküllerinin maksimum enzim aktivitesinin 958.0 mg tripsin/g küre olduğunu bildirmiştir. Wu ve arkadaşları<sup>(214)</sup> tarafından rapor edilen bir çalışmada, makrogözenekli kitosan ile kaplı silika jel küreleri hazırlandı ve sırasıyla Cu(II), Zn(II) ve Ni(II) metal iyonları yüklenerek metal immobilize afinite kromatografik adsorbentlerine tripsin metal-protein etkileşim kuvvetleri yoluyla adsorbe edilmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesinin  $4980 \pm 125$  IU g<sup>-1</sup> değeri ile Cu(II) immobilize edilen afinite jel küreler ile gözlemlendiği, immobilize tripsinin başlangıç aktivitesinin yalnızca %24 kaybettiği belirtilmiştir. Nicoli ve arkadaşları<sup>(215)</sup>, on-line hızlı protein parçalama ve peptid haritasının belirlenmesi için tripsinin kovalent olarak immobilize edildiği üç farklı (epoksi, karbonildiimidazol ve etilendiamin) monolitik immobilize enzim reaktörü hazırlayarak, Epoksi, karbonilimidazol ve etilendiamin monolitik enzim reaktörlerine kovalent olarak bağlanan enzim miktarları sırasıyla 0.9,1.5,1.1 mg ve enzimatik aktivitelerinin ise sırasıyla 479, 157, 539 BAEEU/mg olduğunu belirtmiştir. Proteinlerin parçalanması ve peptid analizi için hazırlanan tripsin temelli monolitik bir biyoreaktörde, tripsinin monolitik kolona kovalent olarak bağlandığı ve immobilize enzim miktarının 66.07 mg olduğu belirtilmiştir<sup>(154)</sup>. Temporini ve arkadaşları<sup>(216)</sup>, peptid ve proteinler gibi biyoteknolojik ilaçların kalite kontrolunda kullanılmak üzere, farklı miktarlarda tripsin yüklenen silika temelli monolitik tripsin biyoreaktörleri hazırlayarak, proteinlerin parçalanması ve tayini için on-line LC/ESI/MS/MS sistemine bağlanmıştır. En iyi kromatografik şartların elde edildiği monolitik enzim reaktöründe bağlı enzim miktarının 7.13 mg olduğu rapor edilmiştir.

Caromori ve Fernandes<sup>(217)</sup>, glutaraldehit ile aktive edilen poli(etilen teraftalat)-poli(anilin) şeritlerine immobilize olan tripsin miktarının 4.55EU/cm<sup>2</sup> olduğunu ve immobilize enzimin 4°C'de 14 gün boyunca aktivitesini %100 koruduğunu, aynı şeritin 4 kez kullanılabileceğini belirtmiştir. Bayramoğlu,Erdoğan ve Arıca<sup>(119)</sup> tarafından iyon değıştirci poli(metakrilik asit) aşılı kitosan membranlarına adsorpsiyon yoluyla bağlanan tripsinin miktarının 92.86 mg/ml olduğunu rapor edilmiştir. Tripsinin fiziksel adsorpsiyonu üzerine yapılan başka bir çalışma Arıca,Akyol ve Bayramoğlu tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, glutamik asit aşılı manyetik p(GMA-EGDMA) mikrokürelerin maksimum tripsin adsorsiyon kapasitesinin 84.96 mg/g olduğu rapor edilmiştir<sup>(133)</sup>. Yamada ve arkadaşları<sup>(218)</sup>, poliakrilik asit aşılı poli(etilen) levhalara farklı miktarlarda kovalent olarak tripsinin aktivitelerini belirlemiştir. Sonuç olarak, 0.015 mg tripsin /cm<sup>2</sup> levhanın aktivesinde %45, 0.053 mg tripsin /cm<sup>2</sup> levhaya bağlı tripsinin aktivitesinde ise %13'lük bir azalma olduğu kaydedilmiştir. Purcena ve arkadaşları<sup>(219)</sup> tarafından, glutaraldehit ile aktive edilen poli(anilin) yüzeyine kovalent olarak bağlanan maksimum tripsin miktarının 2000U/g olduğu ve 4°C de 49 gün boyunca başlangıç aktivitesinin %58'ini koruduğu belirtilmiştir. Kovalent tripsin immobilizasyonu ile başka bir çalışma Kang ve arkadaşları tarafından kaydedilmiştir. Bu çalışmada, emüliyon polimerizasyonu ile sentezlenen p(MMA-EA-AA) lateks partiküllerinin maksimum enzim kapasitesinin 958 mg tripsin/g partikül olduğu belirtilmiştir<sup>(150)</sup>.

#### 4.SONUÇ

Tsvett ve Lederer gibi kromatografi biliminin öncüleri, kromatografik sistemlerde ayırma ortamı olarak, doğal gözenekli inorganik materyalleri kullanmıştır. 1950'lili yılların ortalarında ise, biyomoleküllerin büyüklük dışlama ve iyon değişim kromatografisi ile ayırımında modifiye polisakkarit temelli polimerik destek materyalleri kullanılmıştır. Polimerik kökenli kolon destek materyallerinin kullanılmasıyla birlikte, biyomoleküllerin etkin bir şekilde ayrılması ve saflaştırılmasında HPLC uygulamaları hız kazanmıştır<sup>(220)</sup>.

Son yıllarda, polimer kökenli sabit fazların pH değişimlerine karşı kararlı olmaları ve ulaşılabilir fonksiyonel gruplarının çeşitliliği nedeniyle biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması amacıyla kromatografik yöntemlerde kullanılmalarına duyulan giderek artmıştır. Sentetik polimerler arasında yer alan metakrilat temelli destek materyalleri, çeşitliliği, asidik ve bazik koşullar altında kararlı olması, bir dizi basit reaksiyon ile kolaylıkla fonksiyonlandırılarak yüksek kapasitede amin ve karboksil grupları taşıyan sabit fazlar hazırlanmasına uygun olması nedeniyle biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir alkil, bir akrilat ester ve bir karboksil grubu içeren metakrilat monomerleri, monomerlerin geniş bir bölümü ve esnek polimer zincirleri sağlayan fonksiyonel moleküller ile reaksiyona girebilir. Ayrıca bu materyaller, mikrobiyal degradasyona karşı dayanıklı uzun ömürlü polimerlerdir.

Kromatografinin bir çok alanında uygulaması bulunan metakrilat temelli küreler, klasik süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanabilmektedir. Ancak, son yıllarda araştırmacılar geniş boyut dağılımına sahip kürelerin elde edildiği

süspansiyon polimerizasyon tekniği yerine, daha dar boyut dağılımı yada monodispers partiküllerin elde edilebildiği dispersiyon polimerizasyonu tekniği kullanmaya başlamıştır.

Monodispers partiküller, tek boyut dağılımına sahip olması, çaplarının duyarlılıkla tayin edilebilmesi, yüzey özelliklerinin karakterize edilebilmesi, farklı boyut ve kimyasal özelliğe sahip olarak sentezlenebilmesi nedeni ile kromatografik uygulamalarda, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kolon dolgu materyali ve afinite kromatografisinde biyolojik moleküllerin ayırımı ve saflaştırılması işleminde başarı ile kullanılabilmektedir. Monodispers partiküllerin yüzeylerine tutuklanan biyolojik moleküller, partikül içi difüzyon sınırlaması olmaksızın, sulu ortamda bulunan moleküllerle kolaylıkla etkileşebilmektedir. Bu nedenle, araştırmacılar son yıllarda çok çeşitli monomerlerden mikron yada nanometre boyutlu monodispers küre sentez prosesleri geliştirerek farklı amaçlara uygun malzemeler üretmeyi başarmışlardır.

Biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişme, teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan proteinlerin yüksek saflıkta ve verimlilikte saflaştırılması için yeni yöntemlerin araştırılmasını ve geliştirilmesini sağlamıştır. Biyomedikal araştırmalarda monoklonal antikorların büyüyen rolü yaygın olarak bilinmektedir. Buna paralel olarak antikor temelli tedaviler ve in vivo teşhisler dünya çapındaki ilaç şirketlerinin vasıtasıyla daha büyük bir önem kazanmaktadır. Kanseri ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılan bir monoklonal antikor olan insan IgG'nin endüstriyel olarak üretimi özellikle önemlidir (27 ton/yıl). İnsan İmmunoglobulin G'lerin uygulamalarının en belirgin özellikleri, hastaların enfeksiyonlara karşı olan dirençlerinin artmasıdır. Ayrıca, IgG'ler sitokinler ve kan pıhtılaştırıcı faktörler gibi

farmasotik öneme sahip proteinlerin saflaştırılmasında biyoafinite ligandı olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel ölçekte insan plazmasından IgG saflaştırmak için en çok kullanılan yöntem etanol ile çöktürme işlemidir<sup>(112)</sup>. Bununla birlikte kromatografik teknikler arasında yer alan ve seçici bir saflaştırma yöntemi olan afinite kromatografisi kullanılarak yüksek saflıkta IgG saflaştırmak mümkündür.

Bu doğrultuda sunulan tez çalışmasında, yapısında akrilik ve epoksi grupları sayesinde polimer dizaynında esneklik sağlayan ve modifikasyona izin veren glisidil metakrilat (GMA) temelli, farklı özelliklerdeki afinite destek materyalleri uygun polimerizasyon yöntemleri ile sentezlendi. Bu amaçla, iki bölümü kapsayan tez çalışmasının ilk bölümünde, afinite kromatografisi uygulamalarında dolgu maddesi olarak kullanılacak farklı özelliklere sahip, monodispers yeni afinite partikülleri hazırlandı ve biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahip olan IgG moleküllerine karşı gösterdiği afinite araştırıldı. Dispersiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlanan monodispers  $p(\text{GMA-EGDMA})$  partiküllere bağlı farklı özellikteki ligandların IgG'ye karşı afinitesini belirlemek üzere glutarikdialdehit kullanılarak modifiye edilen  $p(\text{GMA-EGDMA})$  partiküllerine L-histidin amino asidi (L-his), Kongo Kırmızısı (CR) boya ligandı ve Cu(II) iyonlarının şelatlanması amacı ile üç dişli iminodiasetik asit (IDA) ligandı yüzeye kovalent olarak bağlandı ve sırası ile  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-L-his}$ ,  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-CR}$  ve  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-IDA-Cu(II)}$  monodispers partikülleri elde edildi.

Afinite destek materyallerinin IgG adsorpsiyon davranışı, farklı adsorpsiyon koşullarında araştırıldı. pH, iyonik şiddet ve sıcaklık gibi parametrelerin adsorpsiyon dengesi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu belirlendi. Adsorpsiyon ortam pH'ı IgG adsorpsiyonunda önemli bir etken olduğu ve adsorbent ile IgG arasındaki

spesifik etkileşimi belirlediği düşünüldü. Monodispers  $p(GMA-EGDMA)-L-his$ ,  $p(GMA-EGDMA)-CR$  ve  $p(GMA-EGDMA)-IDA-Cu(II)$  partikülleri için maksimum IgG adsorpsiyon kapasitelerine sırasıyla pH 7.0, 6.0 ve 7.5 de ulaşıldı ve sonuçların literatür ile uyum içerisinde olduğu belirlendi.

Afinite sorbentlerin IgG denge adsorpsiyonuna sıcaklık değişiminin etkisi araştırıldığında, Cu(II) metal iyonu şelatlanan afinite partiküller için, sıcaklığın artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde azalma, diğer afinite partiküllerin adsorpsiyon kapasitesinde ise artış gözlemlendi. Bu sonuçla, immobilize metal iyon afinite destek materyalinin, sulu çözülden gerçekleştirilen IgG adsorpsiyon işleminin entalpisinin ekzotermik, diğer afinite partiküller için endotermik olduğu belirlendi. Adsorpsiyon ortamında iyonik şiddetin artırılmasıyla, tüm afinite sistemlerin adsorpsiyon kapasitelerinde önemli derecede azalma kaydedildi. Bu sonuç ile afinite ligadlar ve IgG etkileşiminin yürütücü kuvvetinin elektrostatik etkileşimler olduğu düşünüldü.

Test edilen tüm afinite sorbent sistemleri için hesaplanan teorik  $q_{eq}$  değerlerinin, deneysel verilerin ikinci mertebe kinetik eşitliğin uygulanması ile elde edilen  $q_{eq}$  değerleri ile uyumlu olduğu belirlendi. Bununla birlikte, tasarlanan tüm afinite sistemlerinin IgG adsorpsiyon davranışının Langmiur izoterm modeliyle açıklanabileceği belirlendi.

Monodispers afinite partiküller ile sulu çözülden IgG adsorpsiyon prosesinin türünü belirlemek için Dubinin-Redushkevich (D-R) izoterm modeli kullanılarak, test edilen afinite partiküller için hesaplanan adsorpsiyon enerjilerinin literatürde fiziksel adsorpsiyonu tanımlayan aralıkta olduğu belirlendi. Bu nedenle tüm monodispers afinite partiküller için sulu çözülden IgG uzaklaştırılma işleminde adsorpsiyon işleminin doğasının fiziksel olduğu düşünüldü.



İlk bölümde, dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen metakrilat kökenli monodispers  $p(\text{GMA-EGDMA})$  partikülleri, geniş yüzey alanı ile ligand ve protein moleküllerin kolay immobilizasyonuna olanak sağlamasının yanı sıra, monodispers yapıda olmasıyla partikül içi difüzyon sınırlaması olmaksızın sulu ortamda bulunan IgG molekülleri ile kolaylıkla etkileşmek suretiyle önemli avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, monodispers  $p(\text{GMA-EGDMA})$  partiküllerinin reaktif epoksi grupları aracılığıyla polimer yüzeyine bağlanan farklı özellikteki pseudospesifik (L-histidin, Kongo Kırmızısı, immobilize Cu(II) şelat) ligandların, kromatografik sistemlerde kararlı ve maliyeti oldukça yüksek olan biyolojik ligandlara göre üstün özelliklere sahiptir. Bu ligandlar, yüksek kararlılık, kapasite ve spesifikliğin yanı sıra düşük maliyet sağlamaktadır.

Monodispers  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-L-his}$ ,  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-CR}$  ve  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-IDA-Cu(II)}$  partiküller ile elde edilen maksimum IgG adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla, 29.7, 21.17 ve 32.87 mg/g olarak elde edildi ve non spesifik IgG adsorpsiyonun ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirlendi. Monodispers  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-L-his}$ ,  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-CR}$  ve  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-IDA-Cu(II)}$  partikülleri ile IgG adsorpsiyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar, literatürde yer alan sonuçlar ile karşılaştırıldığında, afinite sistemlerin tasarlanmasında etkin protein ayrımları için, bağlı ligand kadar, destek materyalinin de çok önemli bir parametre olduğu düşünüldü.

Sonuç olarak, immunolojik hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılan IgG'nin sulu çözeltilerde monodispers  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-L-his}$ ,  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-CR}$  ve  $p(\text{GMA-EGDMA})\text{-IDA-Cu(II)}$  partikülleri ile optimum adsorpsiyon

koşullarında yüksek bağlanma kapasiteleri ile etkili bir şekilde uzaklaştırılabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde biyolojik molekül ile etkileşimini incelemek üzere yeni manyetik özellik kazandırılmış akrilat kökenli afinite polimerik partikülleri hazırlandı. Bu doğrultuda, afinite kürelere farklı bir monomerin kopolimerizasyonu ve/veya monomerin yüzeyde aşılması ve manyetik özellik kazandırılması gibi işlemlerle farklı özellikler kazandırılarak adsorpsiyon tekniği ile tripsin enzimi immobilizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Birinci aşamada, manyetik *mp(GMA-MMA)*, polimerik destek materyali süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanarak yapısındaki epoksi grupları, magnetizasyon reaksiyonu sırasında amin gruplarına dönüştürüldü. *mp(GMA-MMA)* mikrokürelerinin yüzeyine metakrilik asit (MAA) monomeri aşı kopolimerizasyon reaksiyonu ile aşılarak, manyetik *mp(GMA-MMA)-g-MAA*, mikroküreleri elde edildi. Yüzeyine metakrilik asit aşlanmış manyetik kürelere model protein olarak tripsin enzimi adsorpsiyon yoluyla immobilize edildi.

Tripsinin, *mp(GMA-MMA)-g-MAA* küreler üzerine adsorpsiyon davranışına çeşitli adsorpsiyon parametrelerinin etkisi araştırıldı. Sonuçlar, ortam pH'ı ve başlangıç enzim konsantrasyonunun adsorpsiyon dengesi üzerinde etkili olduğunu gösterdi. Ayrıca, immobilize enzimin serbest enzim ile kıyaslandığında pH ve sıcaklık profilinin önemli ölçüde değiştiği belirlendi. Bununla birlikte, tripsin enziminin manyetik destek materyaline immobilize edilmesiyle termal ve depolama kararlılığının da geliştiği gözlemlendi.

Manyetik *p(GMA-MMA)-g-MAA* kürelerinin adsorpsiyon yoluyla tersinir enzim immobilizasyonunda başlangıç yükleme kapasitesinde çok küçük bir değişim

ile tekrar kullanılabilceği belirlendi. İmmobilize enzimin yapay substrat olarak kullanılan BAPNA'nın hidrolizinde 20 kez tekrar kullanıldığında aktivite kaybının %23 olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, manyetik p(GMA-MMA)-g-MAA küreleri üzerine adsorplanan tripsinin aktivitesinde kayıp olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilceğini gösterdi. Ayrıca, manyetik kürelerin basit bir mıknatıs yardımıyla adsorpsiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi, işlem süresi önemli ölçüde kısaltmıştır.

Böylece, hazırlanan metakrilat kökenli destek materyallerine manyetik özellik kazandırılmasıyla, zor koşullu ayırma basamaklarının elimine edildiği kısa işlem süresi, ekonomik işlem maliyeti, otomasyona ve sürekli sistemlere kolaylıkla uygulanabilmesi klasik enzim immobilizasyon sistemlerine göre önemli üstünlükler getirmektedir. Ayrıca, manyetik mikrokürelere MAA aşılmasıyla polimer yüzeyinde oluşan nano iplikçikler ile enzim ve enzimatik reaksiyon için büyük yüzey alanı sayesinde enzim immobilizasyonu için yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. C. F. Nathan, Z. A. Cohn, J. Exp. Med., **154**, 1539(1981).
2. V. B. Elings, D. F. Nicoli, American Laboratory, **16**, 34(1984).
3. A. Liberman, American Laboratory, **12**, 61(1980).
4. D. Altschuh, S. Oncul, A. P. Demchenko, J. Mol. Recogn., **19**, 459(2006).
5. D. Summerer, N. Z. Rudinger, I. Detmer, A. Marx, Angew. Chem. Int. Ed., **44**, 4712(2005).
6. X. Hou, B. Liu, X. Deng, B. Zhang, H. Chen, R. Luo, Analytical Biochemistry, **368**, 100(2007).
7. D. O. Kim, J. H. Jin, S. H. Oh, J. of Applied Polymer Science, **104**, 2385 (2007).
8. C. K. Ober, K. P. Lok, Macromolecules, **20**, 268(1987).
9. C. K. Ober, K. P. Lok, M. L. Hair, J. Polym Sci Polym Lett Ed, **23**, 103(1985).
10. J. W. Vanderhoff, M. S. El-Aasser, F. J. Micale, E. D. Sudol, C. M. Tseng, A. Silwanowicz, D. M. Komfeld, F. A. Vicente, J. Disp. Sci. Tech., **5**, 231(1984).
11. J. Ugelstad, P. C. Mork, A. Berge, T. Ellingsen, A. Khan, Academic Press, New York, 1982.
12. Y. Almong, S. Reich, M. Levy, Polym. J., **14**, 131(1982).
13. D. Horak, P. Shapoval, Journal of Polymer Science, **38**, 3855(2000).
14. E. Zurkova, K. Bouchal, D. Zdenkova, J. Polym. Sci., **21**, 2949(1983).
15. W. Yang, J. Hu, Z. Tao, Colloid Polym. Sci., **277**, 446(1999).
16. T. Kawai, K. Saito, W. Lee, J Chromatogr B, **790**, 131(2003).
17. V. Kumar, Y. K. Bhardwaj, S. N. Jamdar, N. K. Goel, S. Sabharwal, J. Polym. Sci., **102**, 5512(2006).
18. S. Geoffrey, J. McCarty, Trends Biotechnol, **19**, 491(2001).

19. G. Bayramoglu, J. Appl. Polym. Sci., **88**, 1843(2003).
20. D.H. Chen, M.H. Liao, J. Mol. Catal. B, **16**, 283(2002).
21. Y-Q. Xiang, Y. Zhang, D-J. Chen, Polym. Int., **55**, 1407(2006).
22. M. Karakisla, G. Bayramoglu, M.Y. Arica, J. App. Pol. Sci., **108(5)**, 3313(2008).
23. G. Bayramoglu, M. Yılmaz ve M.Y. Arica, Biochem. Eng. J., **13**, 35(2003).
24. Deniz Safiye Altuner, “Sığır serum albuminin immobilize metal afinite membranları kullanılarak sulu ortamdan adsorpsiyonu” Kırıkkale Üniversitesi, Fen. Bil. Enstitüsü (2006).
25. G. A. Platonova, T. B. Tennikova, Journal of Chromatography A, **1065**, 19(2005).
26. A. Halbreich, J. Roger, J.-N Pons, M. F. Da Silva, J.-C Bacri, In Microspheres, Microcapsules and Liposomes; Arshady, R.; Ed.; London, **3**, 459(2001).
27. Z. Y. Ma, Y. P. Guan, H. Z. Liu, Reactive & Functional Polymers, **66**, 618 (2006).
28. G. Bayramoğlu, M. Y. Arica, Polym. Int., **57**, 70(2008).
29. C. Martin, J. Cuellar, Ind. Eng. Chem. Res., **43**, 475(2004).
30. X. D. Tong, B. Xue, Y. Sun, Biotechnol. Prog., **17**, 134(2001).
31. Z.Y. Ma, Y.P. Guan, X.Q. Liu, H.Z. Liu, J. Appl. Polym. Sci., **96**, 2174(2005).
32. Z.Y. Ma, Y.P. Guan, X.Q. Liu, H.Z. Liu, Langmuir, **21**, 6987(2005).
33. G. Fassina, A. Verdoliva, G. Palombo, M. Ruva, G. Cassani, Journal of Molecular Recognition, **11**, 128(1998).
34. R. Arshady, Methodological Survey, Colloid Polymer Science, **270**, 717(1992).
35. G. Riess, C. Labbe, Macromol. Rapid Commun., **25**, 401(2004).
36. E. Pişkin, Polimer Teknolojisine Giriş, İnkılap Kitabevi, Ankara, 1987.
37. P. Lacroix-Desmazes, J. Guillot, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, **36**, 325(1998).

38. K. E. J. Barret, Ed., Dispersiyon Polymerization in Organic Media, Wiley, London, 1975.
39. K. P. Lok, C. K. Ober, Canadian Journal of Chemistry, **63**, 209(1983).
40. S. Shen, E. D. Sudol, M. S. El-Aasser, J. Polym. Sci., **32**, 1087(1994).
41. K. Li, H. D. H. Stover, Journal of Polymer Science, **31**, 3257(1993).
42. K. Takahashi, S. Miyamora, H. Uyama, S. Kobayashi, J. Polym. Sci. **34**, 175(1996).
43. S. Margel, E. Nov, I. Fisher, Journal of Polymer Science, **29**, 347(1991).
44. D. Wang, L. V. Dimonie, E. D. Sudol, M. S. El-Aasser, Journal of Applied Polymer Science, **84**, 2692(2002).
45. B. Ray, B. M. Mandal, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, **37**, 493(1999).
46. R. B. Karabacak, Tersiyer Amin Metakrilat Bazlı Suda Çözünebilen Diblok Kopolimerlerin Stirenin Alkolik Ortam Dispersiyon Polimerizasyonunda Yeni Tip Dispersantlar Olarak Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2006.
47. I. L. Gabaston, R. A. Jackson, S. P. Armes, Macromolecules, **31**, 2883(1998).
48. S. Kawaguchi, K. Ito, Advances in Polymer Science, **175**, 299(2005).
49. J. Kim, S. Y. Jeong, K. U. Kim, Y. H. Ahn, R. P. Quirk, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, **34** (16), 3277(1996).
50. J. M. Sàenz, J. M. Asua, Journal of Polymer Science: Part A: **34**, 1977(1996).
51. P. Lacroix-Desmazes, J. Guillot, Journal of Polymer Science Part B: **36**, 325(1998).
52. K. Cao, B. G. Li, Z. R. Pan, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **153**, 179(1999).
53. J. V. Dawkins, S. A. Shakir, T. G. Croucher, European Polymer Journal, **23**, 173(1987).
54. M. Yasuda, H. Seki, H. Yokoyama, H. Ogino, K. Ishimi, H. Ishikawa, Macromolecules, **34**, 3261(2001).
55. Y. Almong, S. Reich, M. Levy, Polym. J., **14**, 131(1982).

56. W. Yang, J. Hu, Z. Tao, L. Li, C. Wang, S. Fu, *Colloid Polym Sci*, **277**, 446(1999).
57. M. Hölderle, M. Baumert, R. Mülhaupt, *Macromolecules*, **30**, 3420(1997).
58. C. Kun, Y. Jian, B.G. Li, B. F. Li, Z. R. Pan, *Chem. Eng. J.*, **78**, 211(2000).
59. K. Cao, J. Yu, B. G. Li, B. F. Li, Z. R. Pan, *Chem. Eng. J.*, **78**, 211(2000).
60. K. P. Lok, C. K. Ober, *J.Polym.Chem.*, **63**, 209(1985).
61. S. Shen, E. D. Sudol, M. S. El-Aasser, *J.Polym. Sci.*, **31**, 1393(1993).
62. J. K. Ober, M. L. Hair, *J.Polym.Sci., Chem.Ed.*, **25**, 1395(1987).
63. Y. Almong, M. Levy, *J.Polym.Chem.Ed.*, **18**, 1(1980).
64. A. J.Paine, W.Luymes, J.Mc Nulty, *Macromolecules*, **23**, 3104(1990).
65. D. Horak, P. Shapoval, *Journal of Polymer Science*, **38**, 3855(2000).
66. K. P. Lok, C.K. Ober, *J.Polym.Chem.*, **63**, 209(1985).
67. Q.Ye, X.Ge, Z. Zhang, *Radiation Physics and Chemistry*, **66**, 11(2003).
68. Y.Y.Lu, M. S. El-Aasser, J. W. Vanderhoff, *J.Polym.Sci.*, **26**, 1187(1988).
69. M. Okubo, K. Ikegami, Y. Yamamoto, *Colloid Polym.Sci.*, **267**, 193(1989).
70. O. H. Kim, K.Lee, K. Kim, B. H. Lee, S. Choe, *Polymer*, **47**, 1953(2006).
71. C. Jin, Y. G. Yang, Z. Z. Zhao, S. M. Yang, X. L. Tian, T. S. Su, *Chin.Sci.Bull.*, **45**, 220(2000).
72. F. Wu, Y. Zhu, Z. Jia, *Journal of Chromatography A*, **1134**, 45(2006).
73. B. Gong, J. Zhu, L. Li, K. Qiang, L. Ren, *Talanta*, **68**, 666(2006).
74. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, **258**, 598(1975).
75. W. Guo, Z. Shang, Y. Yu, L. Zhou, *Biomed Chromatogr*, **11**, 164(1997).
76. W. Tan, K. Wang, X. He, X. J. Zhao, T. Drake, L. Wang, R. P. Bagwe, *Medicinal Research Reviews*, **24**, 621(2004).
77. X. Y. Jiang, S. Bai, Y. Sun, *Journal of Chromatography B*, **852**, 62(2007).
78. Z. H. Zhang, J. Zhang, C. Horvath, *J.Chromatogr.A*, **965**, 83(2002).

79. B. L. Gong, C. Y. Ke, X. D. Geng, *Chinese J.Chem*, **22**, 283(2004).
80. <http://yunus.hacettepe.edu.tr>.
81. G. M. Qiu, Z. H. Sun, *Chin. J. Biomed.Eng.*, **12**, 209(1995).
82. HQ. Mao, K. Roy, VL. Troung-Le, K. A. Janes, K. Y. Lin, Y.Wang, J. T. August, K. Leong, *J Control Release*, **70**, 399(2001).
83. Q. Luo, H. Zou, Q. Zhang, X. Xiao, J. Ni, *Biotec.and Bioeng*, **80**, 5(2002).
84. Turkova, *J.Bioaffinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
85. S. Zhang, Y. Sun, *Biotechnol. Prog.* **20**, 207(2004).
86. G.Bayramoğlu, A.Ü.Şenel, E.Yalçın, M.Y.Arıca, *Polym Int.*, **55**, 40(2006).
87. D. Todorova-Balvay, O. Pitiot, M. Bourhim, T. Srikrishnan, M. Vijayalakshmi, *Journal of Chromatography B*, **808**, 57(2004).
88. M. A. Vijayalakshmi, *Trends Biotechnol.*, **7**, 71(1989).
89. M. Yılmaz, G. Bayramoğlu, M. Y. Arıca, *Food Chemistry*, **89**, 11(2005).
90. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, **258**, 598(1975).
91. W. Guo, Z. Shang, Y. Yu, L. Zhou, *Biomed Chromatogr*, **11**, 164(1997).
92. U. B. Finger, J. Thommes, D. Kinzeld, M. R. Kula, *J. Chromatogr.A*, **664**, 69(1995).
93. O. Pitiot, C. Legallais, L. Darnige, M. A. Vijayalakshmi, *J. Memb.Sci.*, **166**, 221(2000).
94. T. M. Phillips, *Anal. Tech. Immunchem.*, **50**(1992).
95. G. Bayramoğlu, M.Y. Arıca, *Colloid. Surface A*, **202**, 41(2002).
96. M. Y. Arıca, G. Bayramoğlu, *Process. Biochem.* **40**, 1433(2005).
97. G. Bayramoğlu, H. A. Öktem, M. Y. Arıca, *Biochem.Eng. J.*, **34**, 147(2007).
98. A. Ouyang, P. Bennett, A. Zhang, S. T. Yang, *Process Biochem.*, **42**, 561 (2007).
99. B. Cass, P. L. Pham, A. Kamen, Y. Durocher, *Protein Expr Purif.*, **40**, 77(2005).
100. R. Ghosh, *Biochem. Eng. J.*, **14**, 109(2003).



101. H. L. Nie, T. X. Chen, L. M. Zhu, Sep. and Purif. Technology, **57**, 121(2007).
102. F. Helfferich, Nature, **189**, 1001(1961).
103. Z. H. Wang, A. S. Viana, G. Jin, L. M. Abrantes, Bioelectrochem., **69**, 180 (2006).
104. R.C. Hockney, Trends Biotechnol.,**12**, 456(1994).
105. G. Bayramoglu, A. U. Şenel, M. Y. Arica, Sep. and Purif. Techn., **50**, 229(2006).
106. T. T. Yip, T. W. Hutchens, Mol. Biotechnol., **1**, 151(1994).
107. L. Kågedal In: J.-C. Janson and L. Rydén, Editors, Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications (2nd ed ed.), Wiley–VCH, New York 8, 311(1998).
108. R.G. Pearson J. Chem. Educ., **45**, 581(1968).
109. H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, J. Biochem. Biophys. Meth., **49**, 199(2001).
110. J.W. Wong, R.L. Albright and N.-H. Wang Sep. Purif. Methods, **20**, 49 (1991).
111. R. Gutierrez, E. M. M. DelValle, M. A. Galan, Process Biochem., **41**, 142(2006).
112. S.Vançan, E. A. Miranda, S. M. A. Bueno, Process Biochemistry, **37**, 573 (2002).
113. M. B. Ribeiro, M. Vijayalakshmi, D. Todorova-Balvay, S. M. A. Bueno, J.Chrom.B, **861**, 64(2008).
114. G. Serpa, E. F. P. Augustob, W. M. S. C. Tamashiroc, M. B. Ribeiro, E. A. Miranda, S. M. A. Buena, Journal of Chromatography B, **816**, 259(2005).
115. P. Bai, F. Cao, X. Lan, F. Zhao, Y. Ma, C. Zhao, J. Biochem. Biophys. Methods, **70**, 903(2008).
116. M. Zhang, T. Breiner, H. Mori, A. H. E. Müller, Polymer, **44**, 1449(2003).
117. P. Farquet, A. Kunze, C. Padeste, H. H. Solak, S. A. Gürsel, G. G. Scherer, A. Wokaun Polymer, **48**, 4936(2007).
118. B. F. Şenkal, F. Bildik, E. Yavuz, A. Saraç, React.&Func. Polym., **67**, 1471 (2007).

119. G. Bayramoğlu, H. Erdoğan, M. Y. Arica, *J. Appl. Polym. Sci.*, **108**, 456(2008).
120. M. Goto, T. Okuboa, H. Kawakita, K. Uezuc, S. Tsuneda, K. Saito, M. Goto, M. Tamadag, T. Sugog, *Biochem. Eng. J.* **37**, 159(2007).
121. K. Yamashiro, K. Miyoshi, R. Ishihara, D. Umenoa, K. Saito, T. Sugob, S. Yamadac, H. Fukunaga, M. Nagai, *Journal of Chromatography A*, **1176**, 37(2007).
122. R. Yokoyama, S. Suzuki, K. Shirai, T. Yamauchi, N. Tsubokawa, M. Tsuchimochi, *European Polymer Journal*, **42**, 3221(2006).
123. I. N. Savina, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, *J. Chromatography A*, **1092**, 199 (2005).
124. M. Wang, J. Xu, X. Zhou, T. Tan, *Journal of Chromatography A*, **1147**, 24(2007).
125. C-Y. Wu, S-Y. Suen, S-C. Chen, J-H. Tzeng, *J. Chromatogr. A*, **996**, 53(2003).
126. B. Paredes, S. González, M. Rendueles, M. A. Villa-García, M. Díaz, *Acta Materialia*, **51**, 6189(2003).
127. G. Bayramoğlu, M. Y. Arica, *Int. J. Bio. Macromolecules*, **37**, 249(2005).
128. C. R. Lowe, J. C. Pearson, *Methods Enzymol.*, **104**, 97(1984).
129. K. Křáčálková, G. Tishchenko, M. Bleha, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **67**, 7(2006).
130. J. P. H. Pérez, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Biomol. Eng.*, **23**, 233(2006).
131. J. Rocks, L. Rintoul, F. Vohwinkel, G. George, *Polymer*, **45**, 6799(2004).
132. G. Bayramoğlu, G. Ekici, N. Beşirli, M. Y. Arica, *Colloids and Surfaces A* **310(1-3)**, 68(2007).
133. M. Y. Arica, A. B. Akyol, G. Bayramoğlu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **107**, 2810(2008).
134. H. A. Chase, *Trends Biotechnol.*, **12**, 296(1994).
135. M. Takafuji, S. Ide, H. Ihara, Z. Xu, *Chem. Mater.* **16**, 1977(2004).

136. N. Belattar, T. Mekhalif, *Materials Science and Engineering C*, **24**, 507(2004).
137. A. Frenzel, C. Bergenmann, G. Kohl, T. Reinard, *J. Chromatogr. B*, **793**, 325(2003)
138. G. Bayramoğlu, M.Y. Arica, *Journal of Hazardous Materials*, **156**, 148(2008).
139. Z. Guo, S. Bai, Y. Sun, *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 776(2003).
140. X. Liu, H. Liu, J. Xing, Y. Guan, Z. Ma, G. Shan, C. Yang, *China Particuology*, **1**, 76(2003).
141. G. Bayramoğlu, E. Loğoğlu, M. Y. Arica, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **297**, 55(2007).
142. T. H. Chung, H.C. Pan, W. C. Lee, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **311**, 36(2007).
143. H. A. Öktem, G. Bayramoglu, V. C. Özalp, M. Y. Arica, *Biotechnol. Prog.*, **23**, 146(2007).
144. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, Harper'in *Biyokimyası, Barış Kitabevi*, 1993.
145. G. Bayramoğlu, M. Y. Arica, *Macromol. Sym.*, **203**, 207(2003).
146. A. Verdoliva, D. Marasco, A. D. Capua, A. Saporito, P. Bellofiore, V. Manfredi, R. Fattorusso, C. Pedone, M. Ruvo, *ChemBioChem*, **6**, 1242(2005).
147. M.-E. Avramescu, Z. Borneman, M. Wesling, *J. Chromatogr. A*, **1006**, 171(2003).
148. A. Ü. Metin, G. Bayramoğlu, VII. Ulusal Kromatografi Kongresi, s.47, 13-15 Haziran 2007, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale.
149. A. Ü. Şenel, Uzatma Kolu Takılı L-histidin Bağlı p(GMA-MMA) Afinitel Mikroküreler İle IgG Saflaştırılması, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2005
150. K. Kang, C. Kan, A. Yeung, D. Liu, *Materials Science and Engineering C*, **26**, 664(2006).
151. A. Idris, N. A. M. Zain, M. S. Suhaimi, *Process Biochemistry*, **43**, 331(2008).
152. F. Xi, J. Wu, Z. Jia, X. Lin, *Process Biochemistry*, **40**, 2833(2005).

153. A. B. Jarzebski, K. Szymanska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Bialon, *Catalysis Today* **124**, 2(2007).
154. E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J.-L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, *Journal of Chromatography A*, **1045**, 99(2004).
155. A. Manrich, C. M. A. Galvao, C. D. F. Jesus, R. C. Giordano, R. L. C. Giordano, *International Journal of Biological Macromolecules*, **43**, 54(2008).
156. F. Y. Li, Y. J. Xing, X. Ding, *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1692 (2007).
157. M. Y. Arica., G. Bayramoğlu, *Journal of Molec. Catal. B: Enzymatic*, **38**, 131(2006).
158. M. Boy, A. Dominik, H. Vos, *Process Biochem.*, **34**, 535(1999).
159. M.Y. Arica, *J. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 2000(2000).
160. Wiseman A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, TJ Pres Ltd., UK, 1995.
161. S. Sidney, *Quantitative Organic Analysis*, 3. Baskı, 1967.
162. N. Bıçak, D. C. Sherrindton, S. Sungur, N. Tan, *Reac.&Func.Polym.*, **54**, 141(2000).
163. H. Zheng, Y. Wang, Y. Zheng, H. Zhang, S. Liang, M. Long, *Chem.Eng. Journal*, **14**, 117(2008).
164. S.Y. Suen, M. R. Etzel, *Chem.Eng.Sci.*, **47**, 1335(1992).
165. F. Fang, I. Szleifer. *Biophys. Journal*, **80**, 2568(2001).
166. C. J. Van Oss, *J. Molecular Recognition*, **16**, 177(2003).
167. G. Bayramoğlu, M. Yılmaz, A. Ü. Şenel, M. Y. Arica, *Biochemical Engineering Journal*, **40**, 262( 2008).
168. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976).
169. Z-Y. Ma, Y-P. Guan, H-Z. Liu, *Polym Int*, **54**, 1502(2005).
170. M.Y. Arica, G. Bayramoğlu, *Biochem. Eng. J.*, **20**, 73(2004).
171. W. Li, S. Li, *Coll. And Surfaces A: Physicochem.Eng.Aspects*, 295, 159 (2007).

172. H. Sun, L. Zhang, H. Chai, J. Yu, H. Qian, H. Chen, *Separation and Purification Technology*, **48**, 215(2006).
173. O. Pitiot, E. Nedonchelle, C. Legallais, M. A. Vijayalakshmi, *J. Chromatography B*, **758**, 173(2001).
174. H. Feng, L. Jia, H. Li, X. Wang, *Biomedical Chromatography*, **20**, 1109(2006).
175. G. Tishchenko, B. Hodrova, J. Simunek, M. Bleha, *Journal of Chromatography A*, **983**, 125(2003).
176. J. Hubbuch, T. Linden, E. Knieps, J. Thömmesc, M-R. Kula, *Journal of Chromatography A*, **1021**, 105(2003).
177. G. Bayramoğlu, A. Ü. Şenel, M. Y. Arica, *J. Appl. Polym Sci.*, **104**, 672(2007).
178. S. Jain, M. N. Gupta, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **39**, 319(2004).
179. E. Oğuz, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.*, **252**, 121(2005).
180. L. Zhang, T. Huang, M. Zhang, X. Guo, Z. Yuan, *Journal of Hazardous Materials*, **157**, 352(2008).
181. P. Füglistaller, *J. Immunol. Methods*, **124**, 171(1989).
182. E. Klein, E. Eichholtz, D. H. Yeager, *J. Membr. Sci.*, **95**, 199(1994).
183. O. P. Dancette, J. L. Taboureau, E. Tournier, C. Charcosset, P. Blond, *J. Chromatogr. B*, **723**, 61(1999).
184. Z. Ma, S. Ramakrishna, *Journal of Membrane Science*, **319**, 23(2008).
185. J. P. Ferrance, *Journal of Chromatography A*, **1165**, 86(2007).
186. C. Charcosset, Z. Su, S. Karoor, G. Daun, C. K. Colton, *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 415(1995).
187. S. Katoh, M. Imada, N. Takeda, T. Katsuda, H. Miyahara, M. Inoue, S. Nakamura, *Journal of Chromatography A*, **1161**, 36(2007).
188. M. Kim, K. Saito, S. Furusaki, T. Sato, T. Sugo, I. Ishigaki, *J. Chromatogr.*, **585**, 45(1991).
189. D. Müller-Schulte, S. Manjini, M. A. Vijayalakshmi, *J. Chromatography*, **539**, 307(1991).
190. Y. Coffinier, M. A. Vijayalakshmi, *Journal of Chromatography B*, **808**, 51(2004).

191. G. R. Clamont, M. D. C. Candia-Plata, R. G. Zamudioc, L. Vazquez-Moreno, *Journal of Chromatography A*, **1122**, 28(2006).
192. A. Subramanian, S. Sarkarb, *Journal of Chromatography A*, **989**, 131(2003).
193. H. Qian, M.Q. Chen, Z. Y. Lin, *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* in press, (2008).
194. A. Ü. Şenel, G. Bayramoğlu, M. Y. Arıca, 1. Ulusal afinite teknikleri Kongresi, s.15, 22-24 Haziran 2005, Hacettepe Üniversitesi, Beytepe, Ankara.
195. S. M. A. Bueno, K. Haupt, M A. Vijayalakshmi, *J. Chromatogr. B.*, **667**, 57(1995).
196. Z. Guo, Y. Sun, *Biotechnol. Prog.*, **20**, 500(2004).
197. H. M. Swartz, J. R. Bolton, D. C. Borg, *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, Wiley, New York, 1972.
198. M. Panhorst, P-B. Kamp, G. Reiss, H. Bruckl, *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 1685(2005).
199. M. Y. Arıca, M. Yılmaz, G. Bayramoğlu, *J. Chromatogr. B*, **805**, 315(2004).
200. H. Matsuno, Y. Nagasaka, K. Kurita, T. Serizawa, *Chem. Mater.*, **19**, 2174(2007).
201. J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 698(2007).
202. J. Bryjak, B. N. Kolarz, *Process Biochem.*, **33**, 409(1998).
203. P.S. Sears, D.S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 118(1993).
204. Y. Wang, F. Caruso, *Chem Mater.*, **17**, 953(2005).
205. M.Y. Arıca, G. Bayramoglu, N. Bicak, *Process Biochem.*, **39**, 2007(2004).
206. S. A. Cetinus, H. N. Oztop, D. Saraydın, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 447(2007).
207. M. Y. Arıca, Y. Tunalı, G. Bayramoğlu, *Catal. Commun.*, **8**, 1094(2007).
208. J. Hu, S. Li, B. Liu, *Biotechnol. J.*, **1**, 75(2006).
209. S. Phadtare, V. P. Vinod, K. Mukhopadhyay, A. Kumar, M. Rao, R. V. Chaudhari, M. Sastry *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 629(2004).

210. G. Bayramoglu, B. Kaya, M.Y. Arica, Food Chem., **92**, 261(2005).
211. G. Bayramoğlu, M. Yılmaz, M.Y. Arica, Food Chem., **84**, 591(2004).
212. M.Y. Arica, G. Bayramoğlu, J. Mol. Catal. B, **27**, 255(2004).
213. H. B. Yildiz, E. Sahmetlioglu, A. E. Boyukbayram, L. Toppare, Y. Yagci, Int, J. Biol. Macromol., **41**, 332(2007).
214. J. Wu, M. Luan, J.Zhao, Int. J. Biological Macromolecules, **39**, 185(2006).
215. R. Nicoli, N. Gaud, C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, J. Pharma. Biomed. Analysis, **48**, 398(2008).
216. C. Temporini, E. Perani, F. Mancini, M. Bartolini, E. Calleri, D. Lubda, G. Felix, V. Andrisano, G. Massolini, J. Chromatography A, **1120**, 121(2006).
217. S. S. Caramori, K. F. Fernandes, Materials Sci. and Eng. C, **28**, 1159(2008).
218. K. Yamada, T. Nakasone, R. Nagano, M. Hirata, J. Appl. Polym. Sci., **89**, 3574(2003).
219. L. L. A. Purcena, S. S. Caramori, S. Mitidieri, K. F. Fernandes, Materials Science and Engineering: C, **In Press, Corrected Proof**,(2008)
220. M. J. Benes, D. Horak, F. Svec, J. Sep. Sci., **28**, 1855(2005)

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Elazığ'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Van'da lise öğrenimini Manisa'da tamamladı. 1996 yılında girdiği Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünden 2000 yılında mezun oldu. 2001 yılında Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2002-2005 yılları arasında Yüksek Lisans, 2005-2008 yılları arasında da Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Doktora öğrenimini sürdürdü. Halen Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.