

**LİZOZİM ADSORPSİYONUNA YÖNELİK YENİ BİR
KRİYOJELİN HAZIRLANMASI VE ENZİM İÇİN
BAZI OPTİMİZASYON PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ**

EYYÜP AKSOY

ŞUBAT-2023

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİZOZİM ADSORPSİYONUNA YÖNELİK YENİ BİR
KRİYOJELİN HAZIRLANMASI VE ENZİM İÇİN
BAZI OPTİMİZASYON PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ**

EYYÜP AKSOY

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV
YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
KİMYA ANABİLİM DALINDA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

ŞUBAT-2023

DİYARBAKIR

**LİZOZİM ADSORPSİYONUNA YÖNELİK YENİ BİR
KRİYOJELİN HAZIRLANMASI VE ENZİM İÇİN
BAZI OPTİMİZASYON PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Eyyüp AKSOY tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma, aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Kimya Anabilim Dalı**'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL
Danışman, **Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi**

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL (*, **)
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Murat YAVUZ
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Nurullah AKCAN
Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Siirt Üniversitesi

ONAY

Savunma Tarihi: 03/ 02 /2023

(*) Sınav Jürisi kısmının birinci satırına Jüri Başkanının bilgilerini yazınız.

(**) Sınav Jürisi kısmının ikinci satırına Tez Danışmanının bilgilerini yazınız.

Eşime ve Kızlarıma...



Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılıyıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımınla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Ad, Soyad: Eyyüp AKSOY

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleştirilmesi ve tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimleri ile desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana yol gösteren, tez çalışmamın bitmesi için gerekli tüm laboratuvar olanaklarını bana sağlayan, sabır ve nezaketi ile tez danışmanlığımı yaparak beni onure eden Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezin deneysel aşamalarında yardım ve destekleri ile yanımda olan, bilgi, birikimlerinden yararlandığım Dicle Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. İbrahim DOLAK, laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini gördüğüm D.Ü. Eczacılık Fakültesi doktora öğrencisi sayın Veysi ÇAĞLAYAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu zorlu süreçte daima yanımda olan, desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Ümran'a, yaşamdaki değerli varlıklarımız ve güzel kızlarımız Elif Rana ve Alin Şifa'ya teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Kriyojeller.....	5
1.2 İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi.....	7
1.3 Lizozim	9
1.4 Antipirin.....	12
1.5 Seryum.....	13
1.6 Adsorpsiyon.....	14
1.6.1 Adsorpsiyona Etki Eden Parametreler	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	16
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1 Kullanılan Kimyasallar	22
3.2 Kullanılan Cihazlar	23
3.3 Tampon Çözeltiler	24
3.3.1 pH: 5,0; 20 mM asetat tamponu:	24
3.3.2 pH: 6,0; 20 mM fosfat tamponu	24
3.3.3 pH: 7,0; 20 mM fosfat tamponu	24
3.3.4 pH: 8,0; 20 mM fosfat tamponu:	24
3.4 Metakriloil Antipirin-Ce ³⁺ Hazırlanması.....	24

3.5 P(HEMA-MAAP-Ce ³⁺) Kriyojelinin Hazırlanması	25
3.6 P(HEMA-MAAP-Ce ³⁺) Kriyojelinin Karakterizasyon Çalışmaları	25
3.6.1 Şişme testi	25
3.6.2 UV-NIR, EDX çalışmaları ve yüzey morfolojisi çalışmaları	26
3.6.3 FT-IR çalışması	26
3.7 Sulu Çözeltilerden Lizozim Adsorpsiyonu	26
3.8 Standart Lizozim Eğrisi	27
3.9 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1 Karakterizasyon Çalışması	29
4.1.1 Şişme testi	29
4.1.2 Yüzey morfolojisi	30
4.1.3 UV-NIR ve EDX çalışmaları	30
4.1.4 FT-IR çalışmaları	32
4.2 Standart Lizozim Eğrisinin Belirlenmesi	32
4.3 Adsorpsiyon Çalışmaları	33
4.3.1 Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi	33
4.3.2 Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi	34
4.3.3 Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	35
4.3.4 Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	36
4.3.5 Lizozim başlangıç konsantrasyonunun adsorpsiyon üzerine etkisi	37
4.4 Adsorpsiyon İzotermi	37
4.5 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Kriyojelleşme olayı	2
Şekil 1.2 Kriyojelasyon işlemi.....	6
Şekil 1.3 Kriyojellerin kullanım şekilleri: (a) silindirik yapı, (b) silindirik disk şeklinde	7
Şekil 1.4 İMAK uygulamalarındaki protein adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi için şematik gösterim.....	8
Şekil 1.5 Bakteri hücre duvarına ait NAG-NAM polisakkarit yapıları	10
Şekil 1.6 Tavuk yumurta akı lizoziminin birincil yapısı.....	11
Şekil 1.7 Lizozimin üç boyutlu yapısı	12
Şekil 1.8 Antipirinin yapısı	13
Şekil 4.1 Şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA-MAAP-Ce ³⁺) kriyojel.....	29
Şekil 4.2 P (HEMA-MAAP-Ce ³⁺) kriyojelinin SEM görüntüsü	30
Şekil 4.3 MAAP ve MAAP-Ce ³⁺ kompleksinin UV-NIR spektrumu	31
Şekil 4.4 MAAP-Ce ³⁺ kompleksinin EDX spektrumu	31
Şekil 4.5 HEMA ve P(HEMA-MAAP-Ce ³⁺) kriyojellerinin FT-IR spektrumu	32
Şekil 4.6 Standart lizozim grafiği (3 tekrarlı deneyler)	33
Şekil 4.7 Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi.	34
Şekil 4.8 Lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi.	35
Şekil 4.9 Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.	36
Şekil 4.10 Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.	36
Şekil 4.11 Lizozim başlangıç konsantrasyonunun adsorpsiyon üzerine etkisi.	37
Şekil 4.12 Desorpsiyon işlemi ve tekrar kullanılabilirlik.	40

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1 Yumurta akı protein bileşimi	9
Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar	23
Tablo 4.1 Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri adsorpsiyon katsayıları	39



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
g	Gram
mg	Miligram
pH	Asitlik veya bazlık derecesi
°C	Santigrat Derece
M	Molarite
mM	Milimolar
nm	nanometre
cm	Santimetre
cm ⁻¹	Santimetre ⁻¹
T	Sıcaklık
β	Beta
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
L	Litre
V	Hacim
Ce	Seryum
Ce ³⁺	Seryum (+3) iyonu

Kısaltma**Açıklama**

HEMA	2-Hidroksietil metakrilik asit
MAAP	Metakriloilantipirin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
EDX	Enerji dağıtıcı X-ray
NaCl	Sodyum klorür
İMAK	İmmobilize metal afinite kromatografi
PHEMA	Polihidroksietilmetakrilat
PEG	Polietilen glikol
PVA	Polivinil alkol
Lyz	Lizin
Asp	Aspartik asit
Glu	Glutamik asit
His	Histidin
Cys	Sistein
GRAS	Generally Recognised as Safe
NAM	N- Asetilmuramik asit
NAG	N-Asetil glukozamin
HEWL	Tavuk yumurta akı lizozimi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KSCN	Potasyum tiyosiyonat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FTIR	FourierDönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
AGE	Alil glisidileter
MBAAm	N, N'-Metilen-Bisakrilamid
AAm	Akrlamid
BET	Brauner-Emmett-Teller
BSA	Bovine serum albumin

MAH	N-metakriloil-(L)-histidin metil ester
Lys	Lizozim
MIP	Moleküler baskılı polimer
APS	Amonyum persülfat
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametil etilendiamin
MATrp	N-metakriloil (L)- triptofan
P(GMATrp)	Poli glisidil metakrilat-N-metakriloil-L-triptofan
P(HEMAPA)	Poli hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-L-fenilalanin
P(HEMA-MAAP-Ce ⁺³)	2-Hidroksietil metakrilik asit metakriloil antipirin Seryum (III) kompleksi
MAAP	Metakriloil antipirin
UV-NIR	Ultraviole Yakın İnfrared

ÖZET

LİZOZİM ADSORPSİYONUNA YÖNELİK YENİ BİR KRİYOJELİN HAZIRLANMASI VE ENZİM İÇİN BAZI OPTİMİZASYON PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ

Aksoy, Eyyüp

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Zübeyde Baysal

Şubat 2023, 66 sayfa

Bu çalışmada, 2-hidroksietil metakrilik asit (HEMA) ve metakriloil antipirin-Ce³⁺ (MAAP- Ce³⁺) kompleksinden yola çıkarak serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile 2-hidroksietil metakrilik asit-metakriloil antipirin-Ce³⁺ [P(HEMA-MAAP-Ce³⁺)] kriyojeli hazırlandı. MAAP-Ce³⁺ kompleksinin UV-yakın infrared (UV-NIR) ve enerji dağıtıcı X-ray (EDX) teknikleri, p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin ise taramalı elektron mikroskobu (SEM), FT-IR ve şişme testleri ile karakterizasyon işlemi yapıldı. UV-NIR spektrumunda MAAP-Ce³⁺ kompleksi için 916, 1037, 1081, 1109 ve 1141 nm’de beş farklı pik görüldü. EDX spektrumunda ise MAAP-Ce³⁺ kompleksinde %15,12 N ve %2,89 Ce³⁺ varlığı yapıda azot ve Ce³⁺ olduğunu gösterdi. FT-IR spektrumu çalışmalarında kriyojelin 3412 cm⁻¹’de –OH ve 3104 cm⁻¹’de –NH titreşimlerine, 1768-1712 cm⁻¹’de ise ester, amid ve siklik karbonil gruplarının C=O bağlarına sahip olduğu görüldü. Daha sonra kriyojel sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonu için kullanıldı. P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelin denge şişme oranı 7,39 g H₂O/g kriyojel, kriyojelde oluşan makrogözenek miktarı ise % 80,8 olarak hesaplandı. Kriyojel gözenek boyutu ise 30-50 µm olarak bulundu. Lizozim adsorpsiyonu üzerine akış hızı, pH, sıcaklık, başlangıç enzim derişimi ve iyonik şiddetin etkisi incelendi. Maksimum adsorpsiyon kapasitesine (57,84 mg/g kriyojel) 0,5 mL/dak. akış hızında, pH: 6,0 ve 25 °C’de ulaşıldı. İyonik şiddetin etkisi sonucu, tuz derişiminin 0,05 M’ den 1,0 M’ye artmasıyla lizozim adsorpsiyon kapasitesinin 41,31 mg/g’den 2,01 mg/g’ ye kadar azaldığı tespit edildi. Langmuir ve Freundlich izoterm analizleri sonucu hesaplanan korelasyon katsayısı (R²: 0,9939) Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olabileceğini gösterdi. Adsorplanan enzim, 20 mM, pH: 6,0 fosfat tamponu içeren 1 M NaCl çözeltisi ile 120 dak.’da %95,7 oranında desorbe edildi. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, kriyojelin 7 kez ard arda kullanılmasına rağmen adsorpsiyon kapasitesinde fazla bir düşüş olmadığı görüldü.

Anahtar Sözcükler: Kriyojel, İMAK, Seryum⁺³, Adsorpsiyon, Lizozim

ABSTRACT

PREPARATION OF NOVEL CRYOGEL FOR LYSOZYME ADSORPTION AND DETERMINATION OF SOME OPTIMIZATION PARAMETERS FOR ENZYME

Aksoy, Eyyüp

Master of Science in Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Zübeyde Baysal

February 2023, 66 pages

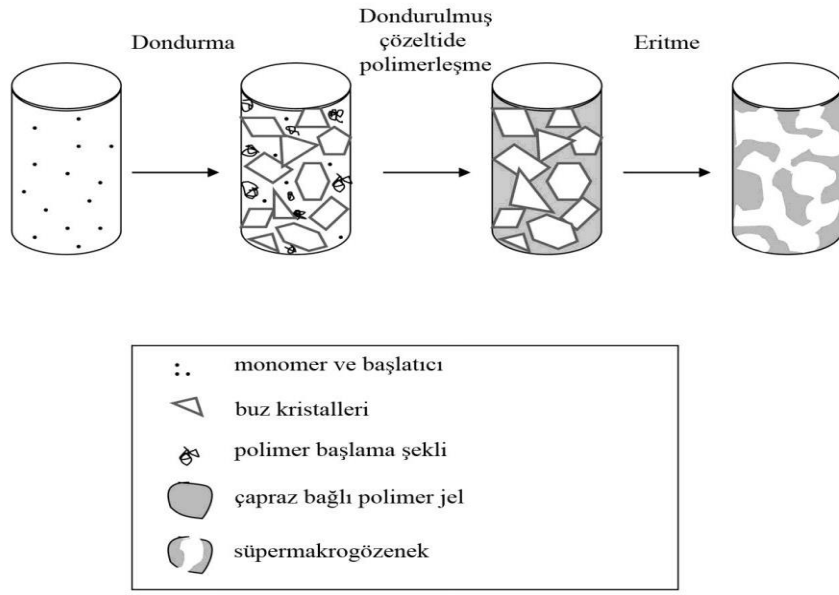
In this study, 2-hydroxyethyl methacrylic acid-methacryloyl antipyrin- Ce^{3+} [P(HEMA-MAAP- Ce^{3+})] cryogel was prepared by free radical polymerization method based on 2-hydroxyethyl methacrylic acid (HEMA) and methacryloyl antipyrin- Ce^{3+} (MAAP- Ce^{3+}) complex. The MAAP- Ce^{3+} complex was characterized by UV-near infrared (UV-NIR) and energy dispersive X-ray (EDX) techniques, and the p(HEMA-MAAP- Ce^{3+}) cryogel was characterized by scanning electron microscopy (SEM), FT-IR and swelling tests. Five different peaks were seen at 916, 1037, 1081, 1109 and 1141 nm for the MAAP- Ce^{3+} complex in the UV-NIR spectrum. In the EDX spectrum, the presence of 15.12% N and 2.89% Ce^{3+} in the MAAP- Ce^{3+} complex showed nitrogen and Ce^{3+} in the structure. In FT-IR spectrum studies, cryogel showed –OH vibrations at 3412 cm^{-1} and characteristic –NH vibrations at 3104 cm^{-1} , and also at $1768\text{--}1712\text{ cm}^{-1}$, ester, amide and cyclic carbonyl groups appears to have C=O bonds. The cryogel was used for lysozyme adsorption from the aqueous solution. Equilibrium swelling ratio of P(HEMA-MAAP- Ce^{3+}) cryogel was calculated as $7.39\text{ g H}_2\text{O/g cryogel}$, and the macropore amount was calculated as 80.8%. The cryogel pore size was found to be $30\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$. The effects of the flow rate, pH, temperature, initial enzyme concentration and ionic strength on lysozyme adsorption were studied. Maximum adsorption capacity reached with 57.84 mg/g of prepared cryogel under 0,5 flow rate (mL/min), at pH 6.0 and at $25\text{ }^\circ\text{C}$. The result of the effect of ionic strength, it was determined that the lysozyme adsorption capacity decreased from 41.31 mg/g to 2.01 mg/g as the salt concentration increased from 0.05 M to 1.0 M. The correlation coefficient (R^2 : 0.9939) obtained as a result of the values calculated for the Langmuir and Freundlich isotherms showed that the Langmuir adsorption model, could be suitable for this system. The adsorbed enzyme was desorbed 95.7% with 1.0 M NaCl solution containing 20 mM, pH 6.0 phosphate buffer in 120 minutes. In the prepared cryogel reusability studies, no significant decrease was observed in the adsorption capacity of the cryogel used 7 times in succession.

Keywords: Cryogel, IMAC, Cerium $^{3+}$, Adsorption, Lysozyme

1. GİRİŞ

Kriyojeller, donma sıcaklığının altında, supermakro gözeneklere sahip üç uzantılı geometrik yapıya sahip, jel kıvamında oluşan kristallerdir (Alkan vd., 2000). Kriyojellerin oluşum aşaması esnasında çözücünün hemen hemen hepsi donarak birbirine bağlı, şeffaf, parlak, kırılğan ve billur yapıda buz parçacıklarını oluşturur. Parlak buz parçacıkları etrafındaki donma noktasına ulaşmamış sıvıda bulunan polimerik yapıdaki öncüler de birleşerek oluşan buz kristallerinin çevresinde bir ağ örgüsü görüntüsü gösterirler. Reaksiyon gerçekleşince, donma noktasına ulaşmış polimer yapı oda sıcaklığına getirilerek kristal haldeki buz eritilir ve gözenekli yapıya sahip polimerik ağ örgü yapısına sahip kriyojel oluşur. Kriyojelde bulunan boşluklu yapıların etrafında, çözücünün temas yüzeyinde gerilmiş esnek bir zar bulunmaktadır. Bu esnek zar sayesinde yüzey gerilimi etkisi altında bulunan tabaka buz kristallerinin erimesini ve kriyojellerdeki boşluklu yapıların dairesel şekle sahip olmasını sağlar.

Elastik ve süngerimsi yapıya sahip kriyojeller yüksek ve düşük molekül kütlesine sahip öncüler ile hazırlanıp sulu ortamda serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile sıfır santigrat derece altında üretilirler (Plieva vd., 2005). Kriyojellerin süngerimsi yapıda bulunan birçok çeşitleri bulunmaktadır. Bu süngerimsi yapıdaki polihidroksimetakrilat (PHEMA), poliakrilamid (PAAM), polivinil alkol (PVA) polietilen glikol (PEG), kriyojellerin temellerini oluşturmaktadırlar (Arvidsson vd., 2003). Bir kriyojelin oluşum aşaması Şekil 1.1’de gösterilmektedir (Plieva vd., 2006).



Şekil 1.1 Kriyojelleşme olayı

İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK), biyomoleküllerin saflaştırılması için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ilk olarak 1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Porath ve arkadaşları proteinlerin metallere olan ilgilerinden dolayı bu saflaştırma tekniğini önermişlerdir. (Porath vd., 1975) Yöntem, peptidlerin, proteinlerin ve nükleotitlerin metallere olan ilgisine dayanmaktadır (Hage vd., 2012). Yöntem katı bir destek üzerinde hareketsizleştirilmiş bir metal iyonu ile protein yüzeyinden bir elektron veren grup arasındaki koordinasyona dayanmaktadır. Kromatografinin bu çeşidinde bazı metal şelat gruplarının kovalent olarak bağlanması için bir sorbent yada bir matriks kullanılmaktadır. Kullanılan bu sorbent ya da matriksler metal iyonları ile kompleks bir bileşik oluştururlar. Kompleks yapının içindeki metal iyonlarının protein ile etkileşimini sağlamak için serbest koordinasyon bölgeleri bulunur. Metal iyonları ile proteinler arasında oluşan bu etkileşim ya hidrofobik ya da elektron alma-verme şeklindedir (Sharma ve Aganwal., 2001).

İMAK, metal iyonları ile etkileşime giren proteinlerin özgünlüğünü koruyarak karmaşık yapılı biyolojik polimerlerin kolay ve hızlı bir şekilde saflaştırılmasını sağlar. Proteinleri saflaştırmak için immobilize metal afinite kromatografisi için en çok kullanılan metaller; Ni (II), Fe (III), Co (II), Zn (II) ve Cu (II)'dir (Hage vd., 2012).

Lizozim (N-asetil muramid glikanhidrolaz, (EC 3. 2. 1. 17) bakteri hücre çeperindeki peptidoglikan tabakasının N-asetilmuramik asit ve N-asetil glukozamin arasındaki β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizleyen bir enzimdir (Ghosh vd., 2000). Hidrolaz grubu enzim sınıfı içinde yer alan lizozim, en iyi karakterize edilen enzimlerden biri olup, molekül ağırlığı 14,400 Da, izoelektrik pH'ı ise 11,2'dir. Lizozim, solunum, idrar, gözyaşı ve tükürük gibi sekresyonlarda ayrıca virus, bakteri, bitkiler, böcekler ve kuşlarda bulunur (Ghosh vd., 2000). Birçok uygulama alanı olan lizozim enzimi besinlerde koruyucu olarak, iltihabik hastalıklarda, ülser tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca oftalmolojik preparasyonlarda antibakteriyel ajan olarak, süt ürünlerinde gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Das vd., 1992; Türkmen ve Denizli., 2014).

Fenazon olarak da bilinen antipirin ateş düşürücü alerjik bir ilaçtır. 1883 yılında Ludwig Knoor tarafından ilk defa sentezlenmiştir. Karaciğer mikrozomal enzimi tarafından yoğun bir şekilde sentezlenen antipirin ürenin idrar içine karışmasından önce yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 13-20 saat aralığındadır. İnsan kan plazmasındaki normal bulunan konsantrasyonu 1-25 mg/L iken 50-100 mg/L aralığında olması halinde toksik olduğu için ölümcül olabilmektedir. Fenazon diğer alerjik ilaçlar ile kıyaslandığında daha güvenli bir ilaç olarak kabul edilmektedir (Yao vd., 2006). Asetoasetat ester i ile fenilhidrazinin kondensasyonu ile elde edilen fenilmetil pirazolonun metillendirilmesiyle oluşur.

Seryum (Ce) atom numarası 58, atom kütlesi 140,1 g/mol; özkütlesi 6,7g/cm³; 798 °C'de eriyen, bazı bileşiklerde +3 bazılarında ise +4 değeri alan, renk olarak gümüş gri rengine, lambaların yapımında kullanılan akkor malzemesinin temelini oluşturan bir elementtir. Kristal yapısı yüzey merkezli kübik şeklinde olup Pauling ölçeğine göre elektronegatifliği 1,12'dir.

Nadir toprak elementlerinden doğada en fazla bulunan seryum ilk kez, 1803'te J. Berzelius ve Wilhelm tarafından bulunmuştur. Birçok mineral seryum içerse de, monazite kumu, bestansit ve serit ticari önemi en çok olan seryum mineralleridir. Bunun dışında, minerallerinde diğer nadir toprak elementleri de bulunur.

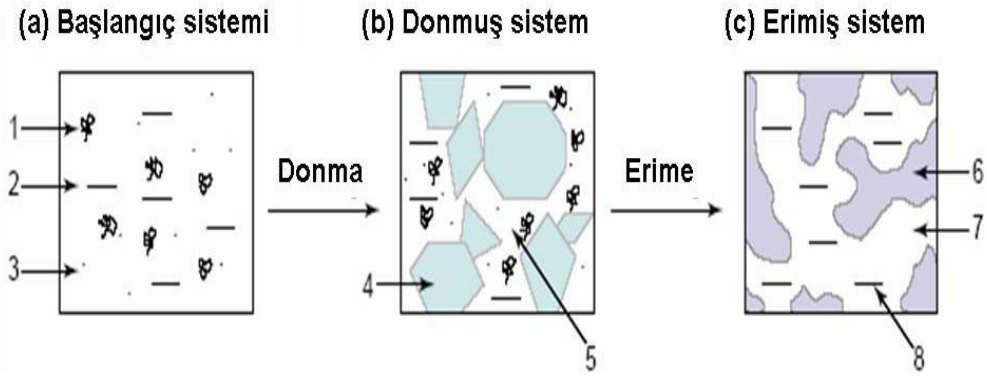
Çakmaktaşı, çeşitli alaşımlarda yükseltgenmeyi önleyici ve vakum tüplerinde oksijeni gidermek amacıyla kullanılmasının yanında, %3 oranında seryum yüksek sıcaklığa dayanıklı alaşımlara ilave edilerek jet motorlarında da kullanılmaktadır. Sinema, televizyonlarda ark lambalarında ise metal olarak kullanılmaktadır. Ayrıca optik sanayiinde camın inceltirilmesi ve cam üretiminde renk giderici olarak seryum dioksitten faydalanılır (Arora vd., 2009, Dahle vd., 2015).

Atom, iyon veya moleküllerin katı bir destek üzerinde bağlanmasına adsorpsiyon, bağlanmış taneciklerin katı destek yüzeyinden kopmasına desorpsiyon, katı desteğe adsorplayıcı madde, katı yüzeyinde bağlanan maddeye ise adsorplanan madde adı verilir (Mildan, 2015). Adsorbe edilen maddenin yüzeyde tutunması için bir kuvvet gerekmektedir ve gerekli olan bu kuvvet etkileşimi zayıf olan van der Waals kuvveti ile meydana gelirse fiziksel adsorpsiyon gerçekleşir. Eğer adsorbe edilen madde ve adsorplayıcı madde arasında kimyasal bir tepkime gerçekleşirse veya elektron alma ya da elektron verme durumu gerçekleşirse kimyasal bir adsorpsiyon gerçekleşir. Gerçekleşen van der Waals etkileşimlerinde oluşan bağlar moleküller arasında olmasına rağmen kimyasal adsorpsiyonda bu bağlar atomlar arasında gerçekleşmektedir. Fiziksel etkileşimler ile meydana gelen adsorpsiyonda reaksiyonlar tersinirdir. Bu nedenle adsorbent rejenere edilip tekrar kullanılabilir. Fiziksel adsorpsiyonda meydana gelen etkileşim çok hızlı gerçekleşirken kimyasal adsorpsiyonda meydana gelen etkileşimler sıcaklığın etkisi ile değişebilmektedir. Moleküller arasında gerçekleşen zayıf etkileşimler ile oluşan adsorpsiyon teknikleri endüstride birçok yerde kullanılmaktadır. Su molekülleri içinde sıcaklığın arttırılması ile oluşan buharın havadan ya da diğer gazlardan ayırt edilmesi ve ayrıştırılması, karbondioksit gazının endüstride kullanılan gaz karışımlarından analiz edilmesi, saf maddelerin elde edilmesi, gaz ve sıvı karışımlarından kötü kokuların giderilmesi şeker çözeltisinde oluşan farklı renklerin yok edilmesi gibi birçok adsorpsiyon uygulama alanı bulunmaktadır. Katı katalizör uygulamalarında ise kimyasal adsorpsiyon kullanılmaktadır (Mildan, 2015).

1.1 Kriyojeller

Kriyojel teriminin kökü Yunancaya dayanmaktadır. Kriyo terimi Yunancada don ya da buz anlamına gelen “*kryos*” kelimesinden gelmektedir. Bu polimerik yapı jelimsi bir yapıya sahip olduğu için jel ile birleşerek kriyojel adını almıştır. Kriyojeller farklı koşullarda ve sıcaklıklarda dondurulabilme özelliklerine sahip oldukları için kriyokoaservat, kriyokoagulat, kriyosantre yapılı olanlar, anormal yapılı ve donma çözünme işleminde kullanılan jeller gibi farklı isimler ile de tanımlanmışlardır (Schulze vd., 1964; Çoban, 2015). Kriyojellerin dondurulduğu sıcaklık, kriyojellerin sahip olduğu gözenek boyutunun büyüklüğünü belirler. Kriyojellerin dondurulma sıcaklığı düşük olursa yapıda daha küçük gözenek oluşur (Lozinsky vd., 1986). Düşük sıcaklıkta üretilen kriyojellerin donmamış sıvı mikrofaz hacminin az olması kriyojelde daha ince ve daha yoğun gözenek duvarları oluşturur. Eğer kriyojelin dondurulma sıcaklığı büyük olursa buz kristal yapı büyüklükleri de o kadar büyük olur ve böylece sıcaklığın etkisi ile genişlikleri arttırılmış boşluklu yapıya sahip kriyojeller hazırlanır. Yüksek donma sıcaklığına sahip kriyojeller oluşturulurken çözeltinin donmama riski olduğundan kriyojeller oluşturulurken sıcaklık öyle bir ayarlanmalı ki polimerleşen karışımı dondurabilsin (Plieva vd., 2004). Kriyojeller hazırlanırken suda şişme oranının fazla olması için yapısındaki çapraz bağ oranının az olması gerekmektedir. Başlangıç konsantrasyonu yüksek tutulan kriyojellerde çok yoğun ve kırılğan yapıya sahip gözenekler oluşur fakat başlangıç konsantrasyonu azaldıkça oluşan gözenekler matrisler daha esnek ve boşluklu bir yapı alırlar (Ardivissson vd., 2003). Serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile üretilen kriyojellerin esnek ve süngerimsi bir yapıda olabilmesi için belirli bir sıcaklığa kadar kriyojel dondurulmalıdır (Plieva vd., 2006).

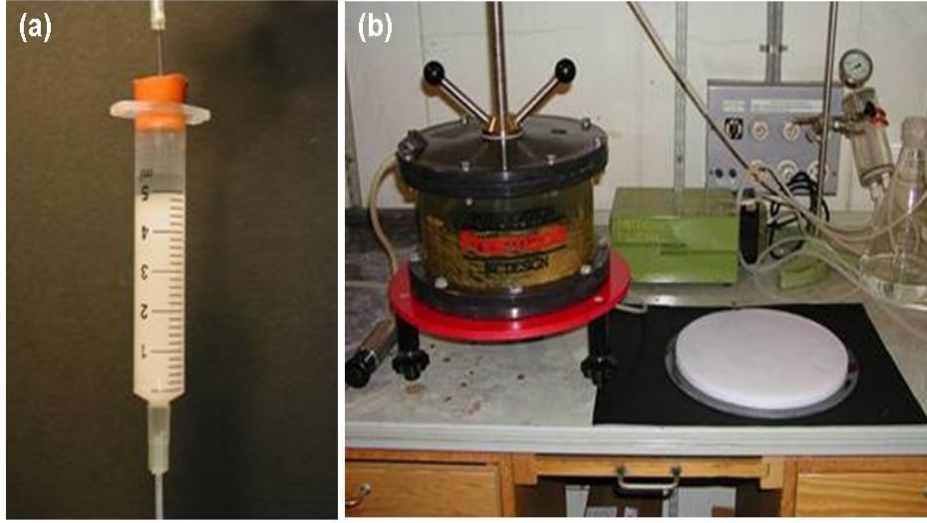
Kriyojellerde polimer fazında oluşmuş mikro gözenekler mevcuttur. Bu mikro gözenekler kriyojelde heterofaz ve heterogözenek yapıyı oluştururlar (Şekil 1.2) (Bölgen, 2008).



Şekil 1.2 Kriyojelasyon işlemi. (1: çözeltideki büyük moleküller, 2: çözücü 3: küçük-moleküler maddeler, 4: donma noktasındaki çözücü; 5: donma noktasına ulaşmamış sıvı mikrofaz; 6: kriyojelin polimer yapıdaki çerçevesi; 7: büyük boşluklu yapılar; 8: çözücü)

Kriyojeller kromatografik tekniklerle biyolojik moleküllerin, mikroorganizmaların ayırma işlemlerinde kullanılmakla beraber bunların immobilizasyonunda da kullanılmaktadırlar (Bölgen, 2008).

Kriyojeller, farklı şekillerde elde edilebilirler. Bazıları fiziksel etkileşim kuvvetleri ile oluşan zayıf etkileşimler ile bağlanmış heterojen polimerik yapıların oluşumu sonucu elde edilirken bazıları ise kovalent bağlarla bağlanmış heterojen görünümlü polimerik yapıların oluşumu ile elde edilebilirler. Kriyojellerin en tipik özelliği birbiri ile bağlantılı makro gözenekli ve süngerimsi morfolojik yapıda olmalarıdır. Kriyojeller, bu süngerimsi özelliklerinden dolayı yapılarında su barındırırlar. Ortamdaki su mekanik olarak sıkıştırma ile yapıdan çıkartılabilir. Bir kriyojelin özelliği kriyojelleşme sıcaklığı, donmuş bir şekilde kalma süresi, çözücünün türü, içerdiği çözünen veya çözünmeyen madde ile değişebilir (Çavuş, 2011). Cam boncuk, süngerimsi elastik yapı, silindir yapılı, disk veya monolitik kolonlar şeklinde kullanılabilirler (Şekil 1.3) (Bölgen, 2008).



Şekil 1.3 Kriyojellerin kullanım şekilleri: (a) silindirik yapı, (b) silindirik disk şeklinde üretilmiş kriyojel (Bölgen, 2008).

1.2 İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi

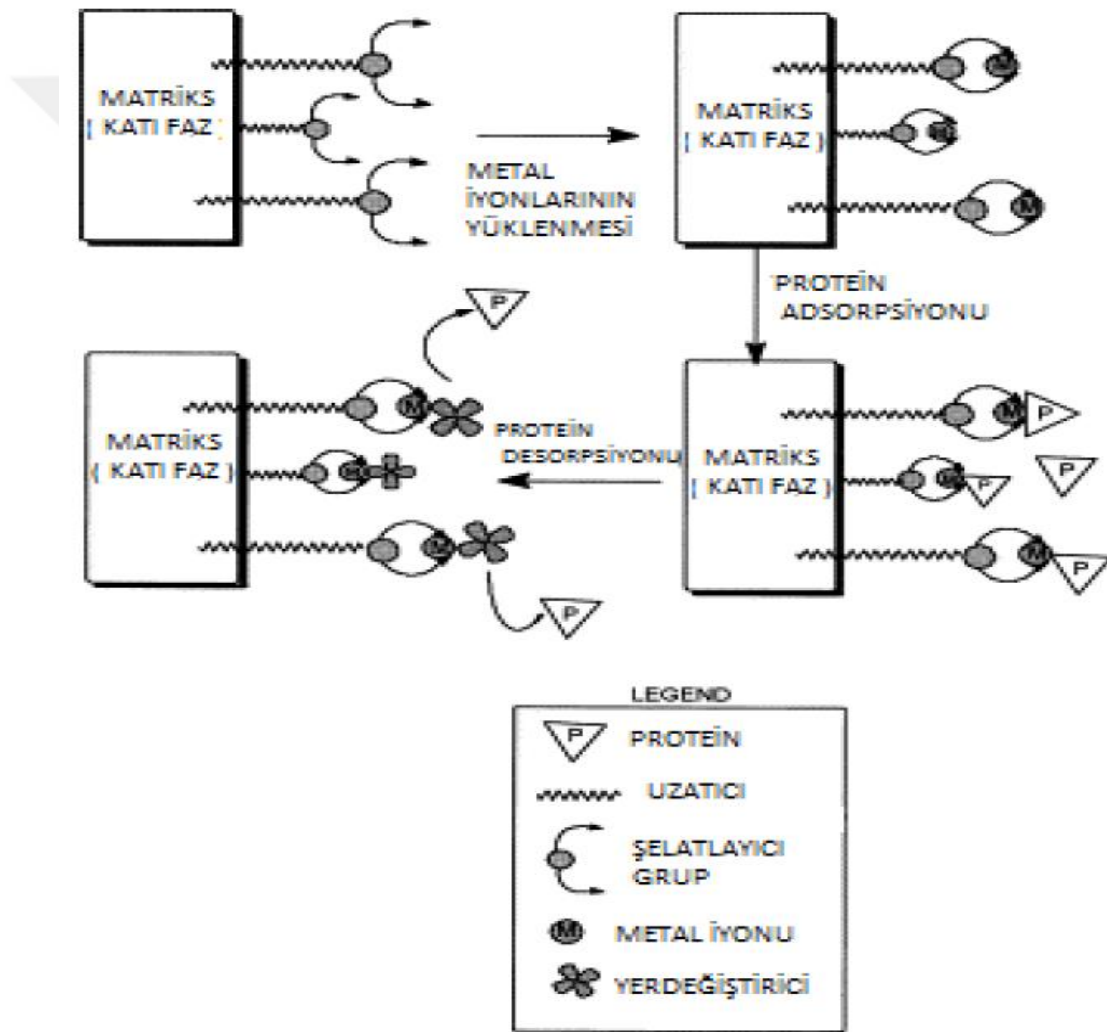
1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından immobilize metal şelat kromatografisi adı altında yeni bir kromatografik yöntem geliştirildi (Porath vd., 1975). Çalışmacılar buldukları bu basit yöntem ile insan serumundan proteinleri ayırtmak için bakır ve çinko metal iyonlarını immobilize ederek gerçekleştirdiler ancak bu yöntem 1961 yılında Halfferich tarafından tanımlanmıştı (Halfferich, 1961).

İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK), katı destek materyaline immobilize edilen metal iyonları ile elektron donor grupları aracılığıyla protein yüzeyindeki amino asit artıkları arasındaki etkileşimlere dayanan seçici bir ayırma tekniğidir (Porath vd., 1975; Fioravante ve Bueno, 2022).

İmmobilize metal afinite kromatografisinde biyolojik moleküllerin Asp, Glu, His, Cys veya Lys gibi aminoasit artıkları ile bağ yapmamış elektron çifti bulunduran farklı metal iyonları arasında etkileşim gerçekleşir (Lia vd., 2004).

Kromatografinin bu çeşidinde bazı metal şelat gruplarının kovalent olarak bağlanması için bir sorbent yada bir matriks kullanılmaktadır. Kullanılan bu sorbent ya da matriksler şelat grubu metal iyonları ile kompleks bir bileşik oluştururlar. Kompleks

yapının içindeki metal iyonlarının protein ile etkileşimini sağlamak için serbest koordinasyon bölgeleri bulundurulmalıdır. Metal iyonları ile proteinler arasında oluşan bu etkileşim ya hidrofobik ya da elektron alma-verme şeklindedir (Sharma ve Agarwal., 2001). İMAK uygulamaları için bir çok geçiş metali kullanılmaktadır. Bakır, nikel, kobalt ve demir İMAK uygulamaları için kullanılan en yaygın geçiş metallere aittir. Bu metal iyonlar elektron çifti alan iyonlar olarak düşünülebilir (Ueda vd., 2003). İMAK uygulamalarında protein ayrılması ve saflaştırılması için gerçekleşen mekanizma Şekil 1.4'te gösterilmektedir (Kazak, 2010).



Şekil 1.4 İMAK uygulamalarındaki protein adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi için şematik gösterim (Kazak, 2010)

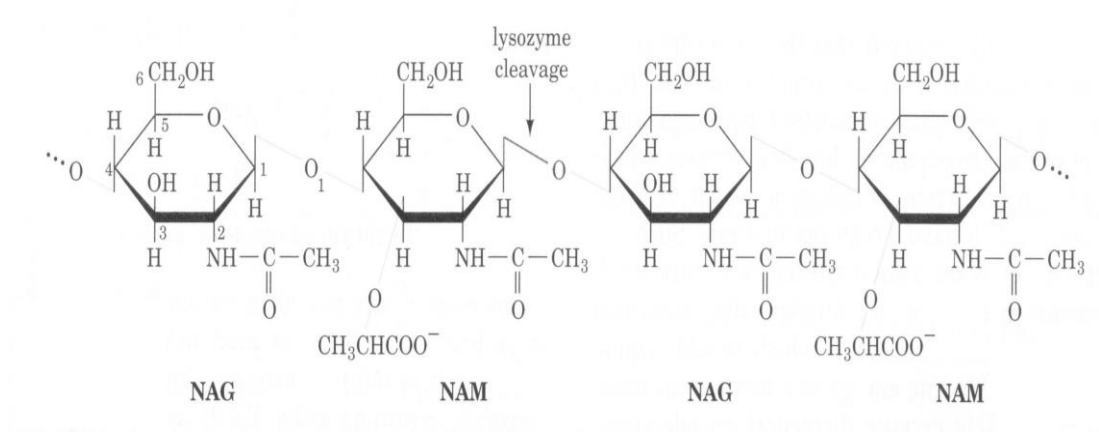
1.3 Lizozim

Alexander Fleming tarafından 1922’de yumurta akındaki albuminden elde edilen lizozim bakterilere karşı koruyucu etkisi olan, çeşitli organizmalar tatarfindan üretilen bir enzimdir. Yumurta akında ovalbumin, ovomukoid, G2 ve G3 globulinler gibi proteinler ve lizozim gibi farklı birçok enzim bulunmaktadır (Tablo 1.1). (Ghosh vd., 2000). Fakat bu enzimler arasında lizozim önemli bir yere sahiptir (Yılmaz vd., 2005).

Tablo 1.1 Yumurta akı protein bileşimi

Protein	Molekül ağırlığı (Da)	İzoelektrik pH	Protein yüzdesi
Ovalbumin	45,000	4,5	%54-57
Konalbumin	80,000	6,1	%12-15
Ovamucin	$5,5-8,3 \times 10^{10}$	4,7	%3-4
Lizozim	14,300	11,0	%3,4

Lizozimin toksik bir enzim olmadığı ile ilgili 1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Organizasyonu (GTO) bir bildiri yayınlamışlardır. Almanya, İngiltere, Fransa, İtalya, Japonya ve Avusturya gibi bir çok ülkede lizozimin gıdalarda kullanılmasına izin verilmektedir. Ayrıca Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri’nde lizozimin genel olarak güvenli kabul edilebilir (Generally Recognised as Safe) GRAS bir enzim olduğu görülmüştür (Üstümkol, 2006). Muramidaz ve N-Asetil Muramik hidrolaz olarak bilinen lizozimin (EC 3. 2. 1. 1. 7) molekül kütlesi 14,3 kDa olup, doğada yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Lizozim bakterilerin hücre çeperinde yer alan mukopolisakkaritlerin N- asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetil glukozamin arasındaki (NAG) β (1→4) glikozidik bağları hidrolizler (Şekil 1.5) (Voet ve Voet., 1990).

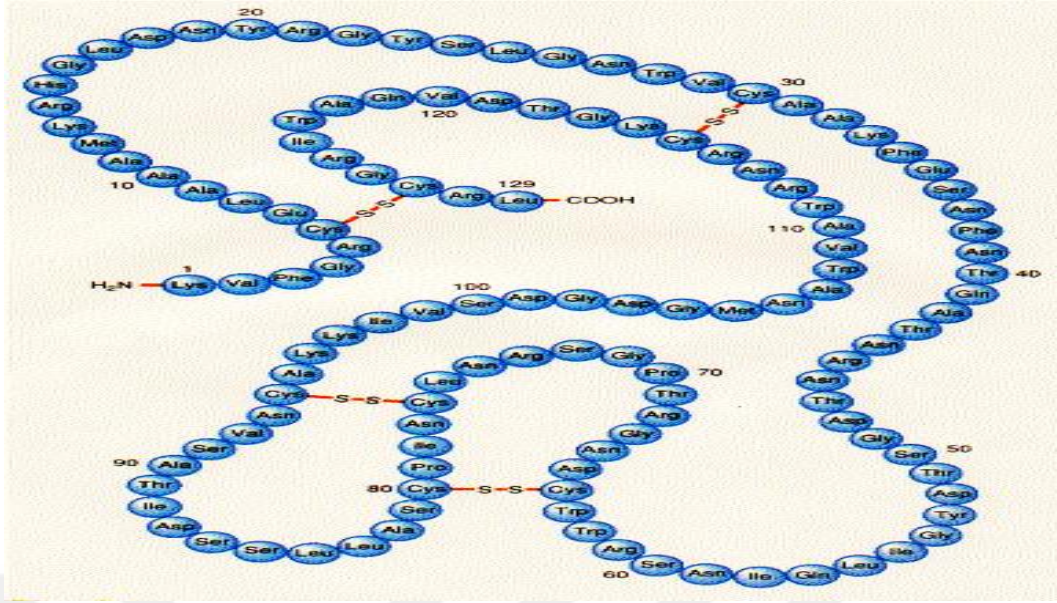


Şekil 1.5 Bakteri hücre duvarına ait NAG-NAM polisakkarit yapıları

Omurgalı canlıların hücre ve salgılarında oldukça fazla bulunan bu enzim, bakterileri öldürebilme özelliğine sahip olmasından dolayı antibiyotik olma özelliğine de sahiptir. Biyolojik sıvılarda ve kas dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. Yumurta akı, gözyaşı, ter, geviş getiren hayvanların sindirim sistemi lizozimin temel kaynaklarından. Tavuk yumurta akında bulunan lizozim, lizozim içeren maddeler içinde en iyi karakterize edilenidir. Bol miktarda bulunması, ucuz olması, kolayca kristalize olması ve yüksek kararlılıkta olması gibi bazı eşsiz özellikleri onu kapsamlı protein ve enzim çalışmaları için çok iyi bir model yapmaktadır (Aktaş, 2008).

Lizozim, peptidoglikan tabakaya ulaşabilme özelliğine sahip olmasından dolayı Gram-pozitif bakterilere karşı çok etkili bir antibakteriyel özellik taşımanın yanında, bazı Gram-negatif bakterilere karşı da antibakteriyel özelliğinin olduğu tespit edilmiştir (Aktaş 2008).

Tavuk yumurta akı (HEW) lizozimi, lizozimin çok yaygın çalışılmış bir enzim türü olmanın yanında mekanistik olarak en iyi anlaşılmış enzimlerden biri olma özelliğine de sahiptir. Lizozimin yapısına bakıldığında iç kısımda 4 disülfid bağı çapraz olarak bulunmaktadır. Ayrıca tek polipeptid zinciri içeren ve 129 amino asit birimi bulunduran bir enzimdir. Yumurta akı lizoziminin, hidrolizleme yeteneği oldukça hızlıdır. Bu özelliğe sahip olmasından dolayı hidrolizleme özelliği oldukça yüksek olup, substratını katalizör yer almayan tepkimelere göre 10^{10} kat daha yüksek bir hızda hidrolizleyebilmektedir (Şekil 1.6) (Voet ve Voet., 1990).

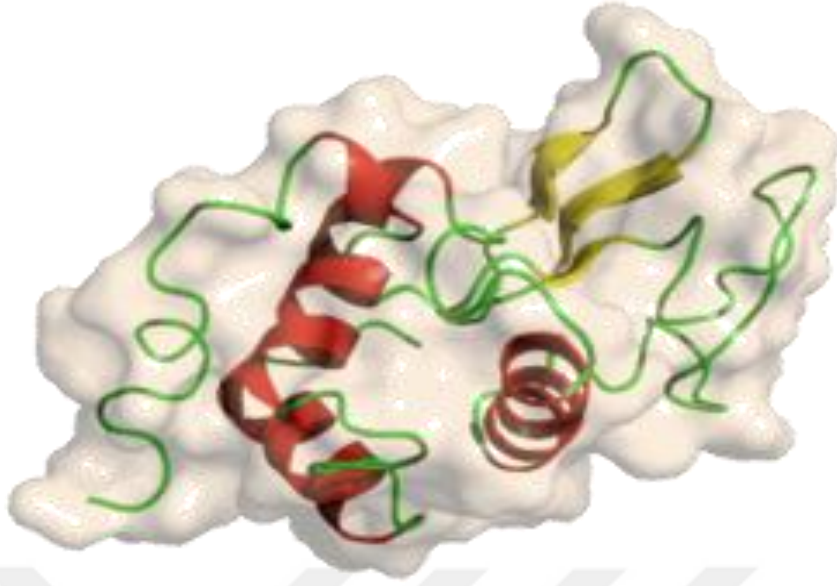


Şekil 1.6 Tavuk yumurta akı lizoziminin birincil yapısı

Göz tedavisinde antibakteriyel bir madde olması, gıda ürünlerinde koruyucu özelliğe sahip olması, hücre içindeki bakterileri yok etmesi, enfeksiyon ve ülser tedavisinde ilaç olarak kullanılabilme özelliklerine sahip olmasından dolayı kullanımı yaygın olan bir enzimdir (Baydemir vd., 2015). Koruyucu özelliğinden dolayı et, balık, sebze ve süt gibi birçok gıdanın uzun süre bozulmadan depo edilmesini sağlar. Yara iyileştirici kremler ve antikanser ilaç yapımında kullanılan lizozim farmakolojikal teknolojide önemli bir enzimdir (Perçin vd., 2015).

Lizozim mantarların üremesini durduran, antitumor aktiviteler içeren, HIV virüsünün üremesini engelleyen ve nükleik asit ile ilgili fonksiyonlara sahiptir (Zhu vd., 2016).

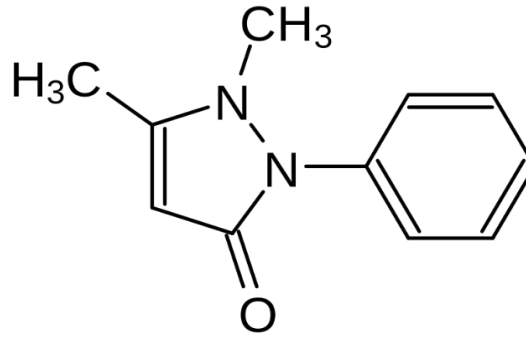
Lizozim, omurgalı canlıların birçok organlarında, mukus ve serumda bulunan öz savunma enzimlerinden biridir (Uygun vd., 2015). Diğer enzimlere nazaran molekül ağırlığı küçük bir enzimdir fakat antibakteriyel olması, gıda takviyelerinde kullanılması ve bakterilerin hücre duvarını yıkma özelliğine sahip olmasından dolayı endüstriyel uygulamalarda çok önemli bir değere sahiptir (Keçili vd., 2007). Lizozimin üç boyutlu yapısı Şekil 1.7’de gösterilmektedir.



Şekil 1.7 Lizozimin üç boyutlu yapısı

1.4 Antipirin

1883 yılında Ludwing Knorr tarafından ilk defa sentezlenen antipirin (1,2-dihidro-1, 5-dimetil-2-fenil-3 H pirazol-3-on) aynı zamanda analjezik ve ateş düşürücü bir ilaçtır. Karaciğer mikrozomal enzim sistemi tarafından yoğun bir şekilde metabolize edilen bir maddedir. Antipirinin insan kanındaki normal bulunması gereken aralık 1-25 mg/L'dir. Ancak 50-100 mg/L aralığında bulunursa ölümcüldür. Antipirin toksik etkisi daha az olduğu için diğer ilaçlara göre daha güvenli bir ilaçtır ancak vücutta birçok olumlu etkilerinin yanında olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Vücutta böbrek yetmezliği ve akut alerjik reaksiyonlar gibi olumsuz durumlara sebebiyet verebilmektedir (Karinen vd., 2015). Antipirinin kimyasal formülü $C_{11}H_{12}N_2O$ ve molekül ağırlığı 188,226 g/mol'dür. Şekil 1.8'de antipirinin genel formülü gösterilmektedir.



Şekil 1.8 Antipirinin yapısı

1.5 Seryum

Lantanitler geçiş metallerinde bulunan atom numaraları 57 ile 71 aralığında değişen elementleri kapsamaktadır. Lantanit grubunda 17 tane nadir toprak elementinin 15 tanesi yer almasından dolayı lantanitlere nadir toprak etlemenleri de denilmektedir. Lantanitlerin en önemli ortak özellikleri elektron değişiminin sadece 4f orbitaline elektron eklenmesi ile gerçekleşmesidir. +3 değerlikli lantanitler birbirlerine çok benzeyen özellikler gösterirler. Elektropozitiflik değerleri yüksek olduğu için üretilmeleri zordur. +3 yüklü lantanitler atom çapı ve yüklerinden dolayı yüksek koordinasyon numaralarına sahiptirler. +3 yüklü lantanit bileşiklerinin 6 ile 10 aralığında koordinasyon sayıları bulunmaktadır (Arora vd., 2009).

1803 yılında seryum oksit bileşiğinden keşfedilen seryum elementi periyodik tablonun lantanitler grubundadır. Seryum proton sayısı 58, atom kütlesi 140,1 g/mol olan bir elementtir. Seryum yer kabuğundaki nadir toprak elementleri içerisinde en fazla bulunan geçiş metalidir. Farmakoloji ve endüstri uygulama alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Seryum doğada saf bulunmadığı için seryum fosfat, seryum silikat, seryum dioksit ve hidroksil minarelleri işlenerek seryum elde edilmektedir. Yakıt ve yakıt katkıları için nanoteknolojide yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Dahle ve Arai., 2015).

1.6 Adsorpsiyon

Bir atomun, bir iyonun ya da bir molekülün katı bir yüzeyde tutunmasına adsorpsiyon denir. Tutunan bu taneciklerin bağlı olduğu katı yüzeyden ayrılmasına desorpsiyon denir. Katı maddeye absorplayıcı madde, katı yüzeyinde tutulan maddeye ise absorblanan madde denir (Mildan, 2015). Adsorbe edilen maddenin yüzeyde tutunması için bir kuvvet gerekmektedir ve gerekli olan bu kuvvet etkileşimi zayıf olan van der Waals kuvveti ile meydana gelirse fiziksel adsorpsiyon gerçekleşir. Adsorbant ile absorban arasında kimyasal bir reaksiyon oluşması ya da iyonik bir bağ gerçekleşmesi durumunda kimyasal adsorpsiyon gerçekleşir.

Moleküller arasında gerçekleşen adsorpsiyon fiziksel adsorpsiyon iken atomlar arasında gerçekleşen adsorpsiyon kimyasal adsorpsiyondur. Fiziksel adsorpsiyonda reaksiyonlar geri dönüşümlü iken kimyasal adsorpsiyonda geri dönüşüm mümkün değildir. Bu nedenle fiziksel adsorpsiyonda adsorbent yeniden kullanılabilir iken kimyasal adsorpsiyonda ise bu durum mümkün değildir. Fiziksel adsorpsiyonda moleküller arası etkileşim hızlı olmasına rağmen, kimyasal adsorpsiyonda sıcaklığa bağlı olarak bu etkileşimler değişebilmektedir. Fiziksel adsorpsiyondan endüstride birçok alanda yararlanılmaktadır. Örneğin su buharının havadan ya da diğer gazlardan analiz edilmesi, karbondioksit gazının endüstride kullanılan gaz karışımlarından ayrıştırılması, maddelerin daha saf hale getirilmesi, gaz ve sıvı karışımlarında koku giderici olarak yararlanılması, şeker çözeltisindeki rengin giderilmesi gibi birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Katı katalizör uygulamalarında ise kimyasal adsorpsiyon kullanılmaktadır (Mildan, 2015).

1.6.1 Adsorpsiyona Etki Eden Parametreler

Sıcaklık: Adsorpsiyonda oldukça önemli bir kriter olan sıcaklık, adsorpsiyonun tipini belirtmektedir.

Ortamin pH Değeri: İyonların adsorplanma kapasitesi farklı pH değerlerinde yüksektir.

Katyonik metal iyonlarının adsorplanması spesifik pH değerlerinde önemli olurken, anyonik iyonların adsorpsiyonu ise düşük pH değerlerinde gerçekleşir.

Adsorbanın Yüzey Alanı: Adsorbanın yüzey alanının tayini zor olduğu için adsorbanın birim ağırlığı başına adsorplanan madde miktarı dikkate alınarak değerlendirme yapılmaktadır. Adsorbanın yüzey alanı arttıkça adsorplanan madde miktarı da artar.

Başlangıç Adsorbant Konsantrasyonu: Çözünmüş adsorbant derişimi arttıkça adsorpsiyon hızı artar.

Denge Süresi: Adsorplama işleminin maksimum düzeyde olduğu zaman aralığı olarak bilinmektedir.

Adsorbanın Parçacık Boyutu: Parçacık büyüklüğü küçüldükçe adsorplama kapasitesini de artmaktadır (Weber ve Morris, 1964; Ardalı, 1990).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bayramoğlu ve Arıca (2002) poli (HEMA), çitosan, procion green H-4G'den oluşan gözenekli polimerik membran hazırlamışlardır. Hazırladıkları bu membranlar üzerinde lizozimin adsorpsiyon kapasitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada boya bağlı membranın lizozim adsorpsiyon kapasitesi 14,06 mg/mL bulunmuştur. Enzimi 1 M KSCN kullanarak (pH: 8,0) desorbe ederek tekrarlanan adsorpsiyon/desorpsiyon çalışmaları boya bağlı bu membranın lizozim adsorpsiyonu için uygun olduğunu ve hedef protein içeren büyük hacimli biyolojik sıvılarda etkili olacağını belirtmişlerdir (Bayramoğlu ve Arıca, 2002).

Xue ve arkadaşları (2004) istiridye plazmasından lizozimi, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) kullanılarak lizozimin mol kütlesi yaklaşık olarak 18,4 kDa hesaplanarak izoelektronik pH'ı 10'dan daha büyük bulundu. Lizozim için iyonik şiddet, pH, enzim başlangıç konsantrasyonu ve sıcaklık gibi optimizasyon çalışmaları yapıldı. İstiridye plazmasından saflaştırılan lizozimin Gram-pozitif (*Lactococcus garvieae*, *Enterococcus* sp.) ve Gram-negatif bakterilerin (*Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*) gelişimini engellediği saptandı. Bu çalışma bir istiridye ve çift kabuklu bir yumuşakçadan saflaştırılan lizozim ile ilgili ilk çalışmadır (Xue vd., 2004).

Keçili ve arkadaşları (2006) kimyasal aktivasyon ve ligand immobilizasyonu aşamalarına ihtiyaç duymadan penisilin açılaz enzimi için yalancı-spesifik ligand hazırlamışlardır. Bu amaçla metakriloil antipirin (MAAP) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) içeren polimerik mikro küreler hazırlamışlardır. Hazırlanan bu mikro küreler fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile karakterize edildi. Hazırlanan bu adsorbent penisilin açılaz enziminin saflaştırılması için kullanılarak bazı adsorpsiyon parametrelerinin (pH, enzim konsantrasyonu etkisi gibi) protein adsorpsiyonu üzerine etkisi incelenmiştir (Keçili vd., 2006).

Yao ve arkadaşları (2006) kopolimerizasyon yöntemini kullanarak nanometre boyutunda parçacıklar ve süpermakrogözeneklere sahip monolit kriyojeller olan alil glisidileter (AGE), N, N'-metilen-bisakrilamid (MBAAm) ve akrilamid (AAM) içeren kriyojelleri sentezlemişlerdir. Hazırladıkları kriyojel süpermakrogözenek boyutunu 10-50 µm çapında bulup bovin serum albüminin (BSA) adsorpsiyon ve desorpsiyon özellikleri incelenerek bu yeni kriyojelin protein kromatografisinde kullanılabileceği gözlemlenmiştir. Kriyojel ve kriyojeldeki matriks yapısı SEM ve TEM ile analiz edilmiştir (Yao vd., 2006).

Odabaşı ve arkadaşları (2007) lizozim enzimini yumurta akından ve sıvı çözeltiden saf olarak elde etmek için polimerler hazırlamışlardır. Öncelikle p(HEMA-MAH)-Cu²⁺ polimer yapıdaki destek maddesini, lizozim içeren poli (HEMA-MAH)-Cu²⁺-(Lys-MIP) tanecikleri oluşturmuşlardır. Kalıp molekül 0,1 M NaCl ile uzaklaştırılarak çalışmalara devam edilmiştir. Çalışmada lizozim baskılı polimerin spesifik yüzey alanı 22,9 m²/g, parçacık büyüklüğü 20-30 µm, şişme oranı ise %57 olarak hesaplandı. Analiz sonuçları ile parçacıkların 42 µg MAH/g polimer ihtiva ettiği ve en yüksek enzim adsorpsiyonunun 12,1 mg/g olduğu ifade edildi (Odabaşı vd., 2007).

Lu ve arkadaşları (2007) kolojen fiber matriks üzerine Fe (III) immobilizasyonu ile yeni bir metal bağlı affinite adsorbent hazırlamışlardır. Yaptıkları çalışmada bu adsorbentin sulu çözeltiden lizozimin adsorsiyonu için uygun olduğunu, adsorsiyon-desorsiyon davranışlarının pratik uygulamalarda yararlı olacağını belirtmişlerdir. Enzim için adsorsiyon kapasitesini 303 K'de, 2,5 mg/mL enzim derişiminde 395 mg/g olarak bulmuşlardır. Optimum pH: 8,0 olarak bulunmuş ve adsorsiyon kapasitesinin sıcaklığa bağlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca tavuk yumurta akı tozundan hazırladıkları bu matriks ile lizozim enzimini saflaştırmışlardır (Lu vd., 2007).

Yılmaz ve arkadaşları (2009) tavuk yumurta akındaki lizozimi saf olarak elde etmek için N-metakriloil (L)-triptofan (MATrp) içeren poli (2-hidroksietil metakrilat) p(HEMATrp) kriyojeli hazırladılar. P(HEMATrp) kriyojeli FT-IR, SEM ve şişme testi ile karakterize edildi. P(HEMATrp) kriyojelinin parçacık boyutu 60-100 µm,

yüzey alanı ise 50 m²/g olarak bulundu. Kriyojelin denge şişme oranı p(HEMA) ve p(HEMATrp) için sırasıyla, 7,18 g H₂O/g ve 6,99 g H₂O/g olarak bulundu. Lizozim adsorpsiyonu üzerine pH, akış hızı, sıcaklık, protein konsantrasyonu ve tuz çözeltisinin etkisi incelendi. Sulu çözeltiden p(HEMA) ve p(HEMATrp) ile hazırlanan kriyojelin lizozim adsorpsiyon kapasitesi 2,9 ve 46,8 mg/g olarak bulundu. Ayrıca lizozimin saflığı SDS-PAGE ile belirlendi (Yılmaz vd., 2009).

Ünlü ve arkadaşları (2011) monolitik kriyojel içine gömülmüş Ni²⁺-çok atomlu partiküllerin protein adsorpsiyon kapasitesini araştırmak için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada p(HEMA) monolitik kompozit-Ni²⁺-(da) hazırlanarak insan serumundan ve sulu çözeltiden albümini saf elde etmişlerdir. Kompozit kriyojelin karakterizasyonu SEM ile analiz edilmiştir. Farklı pH, gömülü partikül miktarı, başlangıç protein derişimi, sıcaklık ve akış hızı gibi etkenlere bağlı olarak, kompozit kriyojelin adsorplama kapasitesini araştırmışlardır. En yüksek adsorpsiyon pH: 8,0 fosfat tamponu ile 485,15 mg/g olarak bulunmuştur. Hazırlanan bu kriyojelin albumin adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir düşüş göstermediği gözlemlenmiştir (Ünlü vd., 2011).

Tyagi ve arkadaşları (2011) serbest radikal polimerizasyon tekniğiyle monomer olarak farklı konsantrasyonlarda metakrilik asit (MAA) ve 2-hidroksietil metakrilattan yola çıkarak APS/TEMED ve etilen glikol varlığında p(HEMA-MAA) hidrojelleri sentezlemişlerdir. Sentezlenen bu hidrojel için %30 oranında MAA kullanılmıştır. Sentezlenen p(HEMA-MAA) için denge şişme oranı %587 olarak bulunmuştur. %10 MAA kullanılarak hazırlanan hidrojel için şişme oranı ise %413 olarak bulunmuştur. Hazırlanan hidrojeller SEM ile karakterize edilmiş düzensiz ve kümeli bir yapıda olduğu tespit edilmiştir. Hidrojellere insulin yükleme kapasitesi farklı MAA konsantrasyonlarında çalışılmış ve insulin yükleme kapasitesinin en yoğun olduğu konsantrasyon %60 MAA derişiminde hazırlanan konsantrasyon olmuştur. Bu jellerin şeker hastalığına yakalanan fareler için tedavi amaçlı kullanılabilir olacağı öngörülmüştür (Tyagi vd., 2011).

Çimen ve Denizli (2012) İMAK ile bir kriyojel hazırlayarak sitokrom c enzimini saflaştırmışlardır. Bu amaçla poli (hidroksietilmetakrilat - N- metakriloil- (L) - (His)

monolitik kriyojeli TEMED ve APS kullanarak hazırlamışlardır. Hazırlanan kriyojelin spesifik yüzey alanı 38,6 m²/g olarak belirlenmiştir. 113,7 µm MAH/g içerdiği görülen p(HEMAH) kriyojel Cu²⁺ iyonları ile kompleksleştirilmiş, ardından tavşan karaciğer homojenatı ve sulu çözeltiden sitokrom c enziminin adsorpsiyonu incelenmiştir. Cu²⁺- bağlı P(HEMAH) kriyojelin sitokrom c adsorpsiyon kapasitesi pH:8,0 fosfat tamponu içinde 20,8 mg/g olarak bulunmuştur. Homojenatta sitokrom c enziminin adsorpsiyon kapasitesi ise %93,8 saflıkta 37,7 mg/g olarak bulunmuştur. Hazırlanan kriyojelin tekrarlanabilirlik çalışmalarında enzimin adsorsiyon kapasitesini kaybetmeden kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Çimen ve Denizli, 2012).

Akduman ve arkadaşları (2013) Zn (II) iyonu bağlı poli (HEMA-GMA) kriyojel kolon hazırlayarak bira mayasından alkol dehidrojenaz enzimini saflaştırmışlardır. Kriyojelin karakterizasyon çalışmalarını FTIR, SEM, EDX ve şişme testleri ile yapmışlardır. Enzim adsorpsiyonu üzerine pH, sıcaklık, enzim derişimi ve akış hızının etkisini incelemişlerdir (Akduman vd., 2013).

Baydemir ve arkadaşları (2015) tavuk yumurta akından lizozim enzimini saflaştırmak için mikroküre gömülü yeni bir kompozit kriyojel sentezlemişlerdir. 5 µm den küçük olan poli (hidroksietilmetakrilat-N-metakakriloil-L-fenilalanin, p(HEMAPA) mikroküreleri poli[hidroksietil metakrilat p(HEMA)] kriyojel kolon içine gömmüşlerdir. P(HEMAPA) mikroküre gömülü kriyojel kolon şişme testleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey analizi Brauner-Emmett-Teller (BET) ölçümleri, element analizi ve akış dinamiği çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Kompozit kriyojelin yüzey alanı 41,2 m²/g olarak hesaplanmıştır. Sulu çözeltide lizozim bağlanma çalışmaları ile ilgili olarak enzim konsantrasyonu, pH, akış hızı, sıcaklık ve NaCl konsantrasyonunun etkisi gibi farklı parametrelerde çalışmalar yapılmıştır. 10 defa tekrar kullanılabiliirlikte bile lizozim adsorpsiyon kapasitesinde azalma olmadığı görülmüştür. Bu kolon ile yumurta akından lizozim enzimi saflaştırılarak enzimin saflığı jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Baydemir vd., 2014).

Türkmen ve Denizli (2014) yumurta akındandan lizozim saflaştırmak için hidrofobik ligand olarak N-metakriloil-(L)- triptofan metilester (MATrp) kullanarak,

dispersiyon polimerizasyonu ile poli(glisidil metakrilat-N-metakriloil-L-triptofan), P(GMATrp) kriyojelini hazırlamışlardır. Hazırladıkları bu kriyojele poli (hidroksietil metakrilat (PHEMA) yüklemişlerdir. Çalışmalarında P(HEMA)/P(GMATrp) kompozit kriyojeli için adsorpsiyon kapasitesini 332,7 mg/g olarak bulunarak, enzim adsorpsiyonu için tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve p(HEMA/p(GMATrp) kompozit kriyojelin lizozim adsorpsiyon kapasitesini artırdığını gözlemlemişlerdir (Türkmen ve Denizli, 2014).

Perçin ve arkadaşları (2014) lizozim saflaştırılması için poli (hidroksietil metakrilat)' a P(HEMA) ile Cibacron Blue F3GA ve Alkali Blue 6B' yi immobilize ederek kriyojel diskleri hazırlamışlardır. Hazırladıkları bu kriyojel diskleri taramalı elektron mikroskobu, şişme testleri, elementel analiz ile karakterize ederek çalışmalarını tamamlamışlardır. Sulu çözeltilerden lizozim adsorpsiyonu için her bir kriyojel ayrı ayrı kullanılmış ve maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesini Cibacron Blue F3GA için 103,3 mg/g Alkali Blue 6B için ise 106,7 mg/g olarak bulmuşlardır. pH, iyonik şiddet, ve sıcaklığın lizozim adsorpsiyonuna etkisini hesaplamışlardır. Yaptıkları bu çalışmanın sonucunda hazırladıkları P(HEMA) ile desteklenmiş Cibacron blue F3GA ve Alkali blue 6B kriyojelinin lizozim saflaştırılması için ekonomik ve hızlı saflaştırma yaptığını gözlemlemişlerdir (Perçin vd., 2014).

Uygun ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışma incelendiğinde poli(metil metakrilat-glisidil metakrilat; p(MMA-GMA) kriyojeli metakrilat ve glisidil metakrilatın radikal kriyo polimerizasyon ile hazırlamışlardır. Daha sonra Reactive Green 19 boyası ile fonksiyonelleştirerek hazırladıkları bu kriyojeli lizozim adsorpsiyon çalışmalarında kullanmışlardır. Kriyojelin FTIR, SEM, EDX gibi karakterisasyon çalışmalarını yapmışlardır. Lizozim adsorpsiyon koşullarını belirlemek için yaptıkları çalışmada maksimum enzim adsorpsiyonunu pH:6,0 fosfat tamponu ile 32 mg/g olarak bulmuşlardır. Desorpsiyon aşamasında pH: 4,5 asetat tamponu içeren 1,5 M NaCl kullanılarak desorbe olan lizozimin enzim aktivitesini incelemişlerdir. Enzimin hazırlanan bu yeni boya bağlı kriyojelde bağlanma kapasitesinin azalmadığını 10 kez yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları ile gözlemlemişlerdir (Uygun vd., 2015).

Hazarkhani ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada sulu çözeltilerden metil oranjinin uzaklaştırılması için pullulan/poli(N-vinilimidazol) kriyojeli sentezlenmiştir. Kriyojelin bazı karakterizasyon çalışmaları (element analizi, FTIR-ATR, termal gravimetrik analizi, SEM analizi gibi) yapıldıktan sonra metil oranjinin adsorpsiyon kapasitesi incelendi. 200 ppm olarak hazırlanan metil oranjinin çözeltisinde maksimum adsorpsiyon kapasitesi 54,2 mg/g olarak bulundu (Hazarkhani vd., 2021). Denizli ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan çalışmada kompozit kriyojel hazırlanarak, tirozin aminoasidinin adsorpsiyonu için bazı parametreler belirlenmiştir. Bu amaçla moleküller baskılı manyetik silika mikrosfer gömülü bir kriyojel hazırlandı. Karakterizasyon çalışmalarının ardından optimum tirozin adsorpsiyon koşulları belirlendi. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH: 8,0'da fosfat tamponu ile 62,27 mg/g olarak hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, hazırlanan kompozit kriyojelin performansını kaybetmeden sekiz kez kullanılabileceği rapor edildi (Denizli vd., 2021).

Şarkaya ve Allı'nın (2021) çalışmalarında, sırasıyla 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N-vinil piroolidon (VP) ve N-vinil formamid kullanılarak poli(HEMA-VP) ve poli(HEMA-VF) kriyojel kolonlar hazırlandı. Bu kriyojellerin şişme derecesi üzerine farklı solventlerin etkisi incelenerek, karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra model ilaç olarak metil kırmızısı (MR), metilen mavisi (MB) ve metilen yeşili (MG) hazırlanan kriyojellere yüklenerek, kriyojel kolonun kontrollü salım özellikleri incelendi. 2 saat içinde kriyojelden yaklaşık %90 ilaç salımının gerçekleştiği görüldü. (Şarkaya ve Allı, 2021).

Zenger ve Baydemir- Peşint (2022) yaptıkları çalışmada, insan kan serumundan serum albümin proteinini saflaştırmak için iki tabakalı, moleküler baskılı kriyojel sentezlemişlerdir. Sentezlenen kriyojelin karakterizasyonu şişme testi, taramalı elektron mikroskopu, BET analizi ve mikro bilgisayarlı tomografi ile yapıldıktan sonra serum albümin için optimum parametreler çalışıldı. Hazırlanan iki tabakalı, moleküler baskılı kriyojelin en yüksek adsorpsiyon kapasitesi kullanılan protein için 106,8 mg/g olarak hesaplandı. Adsorpsiyon kapasitesinde ise 10 kez kullanımda bile anlamlı bir azalma olmadığı gözlemlendi (Zenger ve Baydemir-Peşint, 2022).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu bilimsel çalışma aşamasında kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler analitik saflıkta olup, ticari olarak temin edilmiştir.

Lizozim (yumurta akı lizozimi, katalog numarası: Sigma 62970)

N, N'-metilen bisakrilamid (MBAAm)

N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)

Amonyum persülfat (APS)

Sodyum klorür (NaCl)

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)

Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)

Seryumnitrat hegzahidrat ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Kloroform (CHCl_3)

Hidroklorik asit (HCl)

Asetik asit (CH_3COOH)

Sodyum asetat (CH_3COONa)

3.2 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmanın tamamı Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1' de gösterilmektedir.

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar

Hassas terazi (Gec Avery)
pH metre (Mettler-Toledo)
Manyetik karıştırıcı (Heidolph)
UV-Vis Spektrofotometre (UV mini 1240 –Vis spectrophotometer Shimadzu)
Peristaltik pompa (Watson-Marlow)
Etüv (Binder)
Manyetik Karıştırıcı, ısıtmalı (IKA)
Mikropipet (Eppendorf)
Hassas Terazi (Hettich)
FT-IR (Mattson 1000 FT-IR Spectrometer)
SEM (JOEL, JSM 5600)
EDX (FEI Quanta FE6-250)
Derin dondurucu (Sanyo)

3.3 Tampon Çözeltiler

3.3.1 pH: 5,0; 20 mM asetat tamponu:

14,8 mL 20 mM asetik asit üzerine 35,2 mL 20 mM sodyum asetat ilave edildikten sonra üzerine distile su ilave edilerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.2 pH: 6,0; 20 mM fosfat tamponu

6,15 mL 20 mM Na_2HPO_4 üzerine 43,85 mL NaH_2PO_4 ilave edildikten sonra üzerine distile su ilave edilerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.3 pH: 7,0; 20 mM fosfat tamponu

30,5 mL 20 mM Na_2HPO_4 üzerine 19,5 mL NaH_2PO_4 ilave edildikten sonra üzerine distile su ilave edilerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.4 pH: 8,0; 20 mM fosfat tamponu:

47,35 mL 20 mM Na_2HPO_4 üzerine 2,65 mL NaH_2PO_4 ilave edildikten sonra üzerine distile su ilave edilerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.4 Metakriloil Antipirin- Ce^{3+} Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan Metakriloil antipirin (MAAP), Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Keçili ve arkadaşları tarafından aşağıdaki prosedüre göre sentezlenmiştir (Keçili vd., 2006).

5,0 g 4-aminoantipirin ve 0,2 mL piridin 100 mL kuru CHCl_3 içinde çözüldü. Daha sonra hazırlanan çözelti 0 °C de soğutuldu. Soğutulan çözeltiye 0,26 mL metakriloil klorür ilave edilerek 2 saat oda sıcaklığına getirildi. Oluşan tepkime sonucunda, çözeltide tepkimeye girmeyen metakriloil klorür 50 mL HCl ve 50 mL NaOH ile yıkandı. Organik faz bir karıştırıcı evaporator içinde evapore edilip, geriye kalan madde petroleum benzene- etil asetat çözeltisi içinde kristalize edildi. MAAP- Ce^{3+} şelat kompleksini hazırlamak için 100 mg/50 mL $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ üzerine 130 mg MAAP ilave edildi. Hazırlanan bu çözelti oda sıcaklığında ve 100 rpm de 24 saat karıştırıldı.

Atomik adsorpsiyon spektrofotometresi ile çözeltideki Ce^{3+} iyonları konsantrasyonu bulundu. Bağlanmış olan Ce^{3+} iyonları Ce^{3+} 'ün denge ve başlangıç konsantrasyonları kullanılarak hesaplandı.

3.5 P(HEMA-MAAP- Ce^{3+}) Kriyojelinin Hazırlanması

Bir beher içinde 1,3 mL HEMA ve 100 μ L MAAP- Ce^{3+} karıştırılarak üzerine 5 mL deiyonize su ilave edildi. Aynı bir yerde 0,283 g MBAAm 10 mL deiyonize su içinde çözüldükten sonra bu iki çözelti karıştırıldı. Buz banyosu içine oturtulan tüplere 20 mg APS ve 50 μ L TEMED ilave edilerek 2-3 dakika hafifçe çalkalandı. Daha sonra hazırlanmış polimerik materyal 5 mL'lik plastik şırıngalara ilave edilerek, $-18^{\circ}C$ 'de 24 saat kriyojelasyon için bekletildi. Ertesi gün şırıngalar alınarak yapıdaki suyun çözülmesi için bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Ardından reaksiyona girmemiş monomerler, kriyojel 50 mL deiyonize su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Hazırlanan kriyojel kullanılıncaya kadar $+4^{\circ}C$ 'de bekletildi.

3.6 P(HEMA-MAAP- Ce^{3+}) Kriyojelinin Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1 Şişme testi

Hazırlanan kriyojel, 50 mL distile su içeren bir beher içinde şişmesi için tutulduktan sonra, alınarak hassas terazide tartıldı. Daha sonra kurutularak tekrar tartımı alındı. Kurutulmuş ve büyük oranda şişmiş kriyojellerin ağırlıklarından yararlanarak polimer yapılı kriyojellerin su bağlama kapasitesi 3.1 eşitliği kullanılarak hesaplandı.

$$S = (W_s - W_o) / W_o \quad (3.1)$$

Eşitlikte W_o , su bağlanmadan önceki kriyojel ağırlığı W_s ise su bağlandıktan sonraki kriyojel ağırlığını gram (g) olarak göstermektedir. Kriyojellerin maksimum gözenek kapasitesi yüzdesini (%M) hesaplanmak için eşitlik 3.2 kullanıldı.

Bu eşitlik kullanılırken önce denge şişme oranına sahip kriyojel örneği ($W_{ıslak}$) tartıldı. Şişmiş kriyojel bir enjektör içine alınarak kriyojelin makrogözeneklerinde

bulunan suyu uzaklaştırmak için kriyojel enjektör ile sıkılarak tekrar tartıldı ($W_{sıkıştırılan}$). Kriyojelin sahip olduğu makrogözeneklerin yüzdesi hesaplandı:

$$\%M = [(W_{ıslak} - W_{sıkıştırılan}) / W_{ıslak}] \times 100 \quad (3.2)$$

3.6.2 UV-NIR, EDX çalışmaları ve yüzey morfolojisi çalışmaları

Metakriloil antipirin- Ce^{3+} (MAAP- Ce^{3+}) UV-NIR ve EDX spektroskopik teknikleriyle analiz edildi. P(HEMA-MAAP- Ce^{3+}) kriyojeli Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak bu kriyojelin yüzey morfolojisi görüntüleri elde edildi.

3.6.3 FT-IR çalışması

P(HEMA-MAAP- Ce^{3+}) kriyojelinin yapı analizi FT-IR spektrofotometresi ile yapıldı. FT-IR'da karakterizasyon amacı ile kriyojel örnekleri oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan kriyojel toz haline getirildikten sonra potasyum bromür ile (KBr, 0,1 mg, IR Grade) karıştırıldı. Daha sonra örnek pelet haline getirilip, FT-IR 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında spektrumu çekildi.

3.7 Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyonu

Hazırlanmış olan kriyojel, öncelikle 50 mL saf su ile yıkandıktan sonra 10 mL 20 mM fosfat tamponu (pH:6.0) ile 30 dak. dengeye getirilerek, 10 mL (0,5 mg/mL) lizozim çözeltisi 2 saat boyunca peristaltik pompa ile kriyojel kolonundan geçirildi. Adsorplanan lizozim miktarı Bradford yöntemine göre tayin edildi (Bradford, 1976). Bunun için örneklerden 100 μ L alınarak üzerlerine 4,95 mL Bradford reaktifi bırakıldı. 5 dak. bekletildikten sonra, örneklerin 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bütün adsorpsiyon çalışmaları 25 °C'de gerçekleştirildi.

Adsorbe edilen lizozim miktarı eşitlik 3.3'e göre hesaplandı:

$$Q = (C_o - C) V / m \quad (3.3)$$

Q: Adsorplanan lizozim miktarı (mg/g)

C_o: Lizozim çözeltisinin kolondan geçmeden önceki konsantrasyonu (mg/mL)

C: Lizozim çözeltisinin kolondan geçtikten sonraki konsantrasyonu (mg/mL)

V: Hacim (mL)

m: Adsorpsiyon için kullanılan kriyojelin kütlesi (g)

Adsorpsiyon çalışmalarında enzim adsorpsiyonu üzerine pH, akış hızı, sıcaklık, başlangıç lizozim derişimi ve iyonik şiddetin etkisi incelendi. pH etkisini incelemek için sırasıyla 20 mM'lık pH: 5,0 asetat ve 20 mM'lık pH: 6,0; 7,0 ve 8,0 fosfat tampon çözeltileri kullanıldı. Adsorpsiyon üzerine akış hızının etkisini hesaplamak için 0,5; 1,0; 2,0, 3,0 ve 4,0 mL/dak., sıcaklık ve başlangıç enzim derişiminin etkisini incelemek için ise sırasıyla, 4; 25; 35 ve 45 °C ve 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 ve 1,50 mg/mL aralıklarında çalışıldı. 0,05; 0,1; 0,5 ve 1,0 M NaCl çözeltisi ile lizozim adsorpsiyonu üzerine iyonik şiddetin etkisi araştırıldı.

Deneysel aşamalar sonucunda adsorplanan lizozim 2 saat boyunca 1,0 M NaCl içeren 20 mM fosfat tamponu (pH: 6,0) ile desorbe edilip desorpsiyondan sonra ise 1 saat distile su ile temizlenerek tekrar kullanılması sağlandı. Bu Çalışmada deneyler, aynı koşullarda üç kez tekrarlanıp standart sapma değerleri baz alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.8 Standart Lizozim Eğrisi

1,5 mg/mL'lik stok lizozim çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin Bradford yöntemine göre 595 nm'de protein miktar tayinleri yapıldı (Bradford, 1976).

3.9 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojeline adsorplanan lizozimin desorpsiyon çalışmalarında 20 mM fosfat tamponu (pH:6.0) içeren 1 M NaCl çözeltisi kullanıldı. 30 mL desorpsiyon çözeltisi 0,5 mL/dak. akış hızında 120 dak. boyunca kriyojelin

kolondan geçirilmesi saglandı. Belirli araliklarda (10; 20; 40; 60; 80 ve 120 dak.) alınan örneklerin 595 nm' de ölçümleri alındı.

Desorpsiyon yüzdesi (%) aşağıdaki denkleme (3.4) göre hesaplandı:

$$\text{Desorpsiyon yüzdesi \%} = \frac{\text{Serbest kalan lizozim miktarı} \times 100}{\text{Adsorbe edilen lizozim miktarı}} \quad (3.4)$$

Desorpsiyon işleminden sonra p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojel 50 mL saf su ile yıkanarak, bir sonraki aşamaya geçmek için 20 mM fosfat tamponu (pH: 6,0) ile dengeye getirildi.

P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği çalışmaları için lizozim adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi 7 kez tekrarlandı. Her aşamada kolonda, 20 mM fosfat tamponu (pH: 6,0) içeren 1 M NaCl çözeltisi ile desorpsiyon işlemi gerçekleştirilerek, ardından kolon 50 mL saf su ile yıkandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Karakterizasyon Çalışması

4.1.1 Şişme testi

P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojeli (HEMA) ve (MAAP-Ce³⁺) komplekslerinin kriyopolimerleşmesi ile hazırlandı. Bu kriyopolimerleşme için çapraz bağlayıcı olarak MBAAm kullanıldı. Reaksiyon başlatıcı olarak APS aktivatör olarak ise TEMED kullanıldı.

Kriyojeller hem matriksin yapısı hem de çapraz bağ derecelerine göre yapılarına su alarak şişerler. Yapılan çalışmalar sonucu, hazırlanan p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) için denge şişme oranı 7,39 g H₂O/g, makrogözenek miktarı ise % 80,8 olarak hesaplandı.

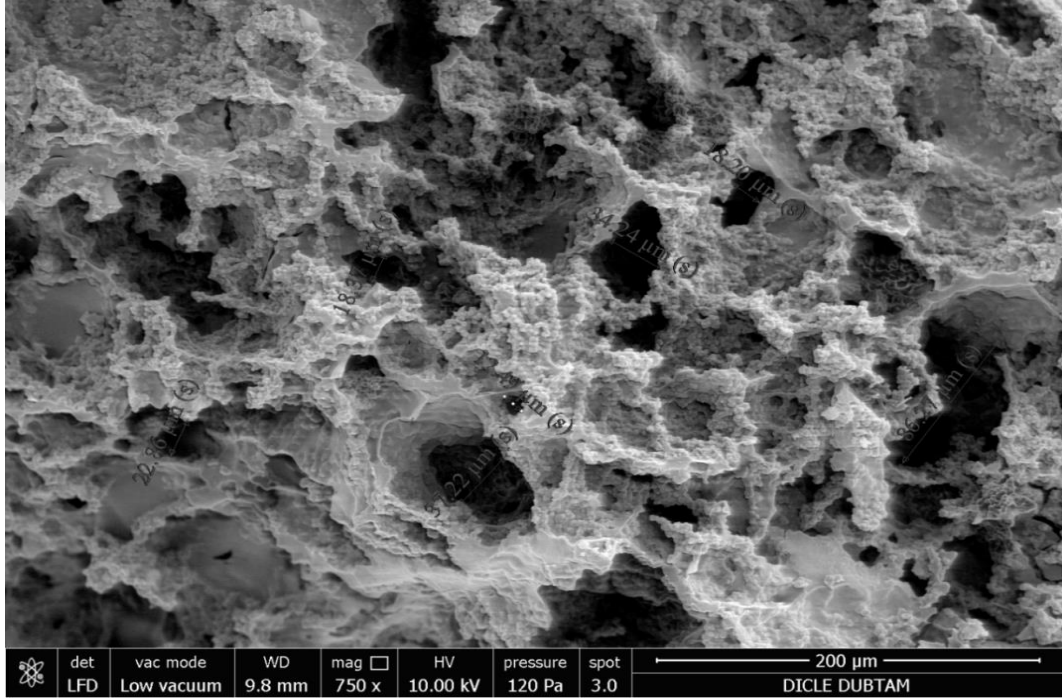
P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojel süngerimsi ve esnek bir yapı görünümünde olup, gözeneklerde bulunan su, kriyojelin el ile sıkıştırılması sonucu uzaklaştırılabilir. Suyu hemen yapı içine alarak birkaç saniye içinde tekrar eski yapısına dönüşür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojel

4.1.2 Yüzey morfolojisi

Kriyojelin SEM analizi görüntüsü Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi kriyojel birbirine bağlı ve porlu bir yapıya sahiptir. P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin gözenek boyutu taramalı elektron mikroskopunda 30-50 µm olarak ölçüldü.

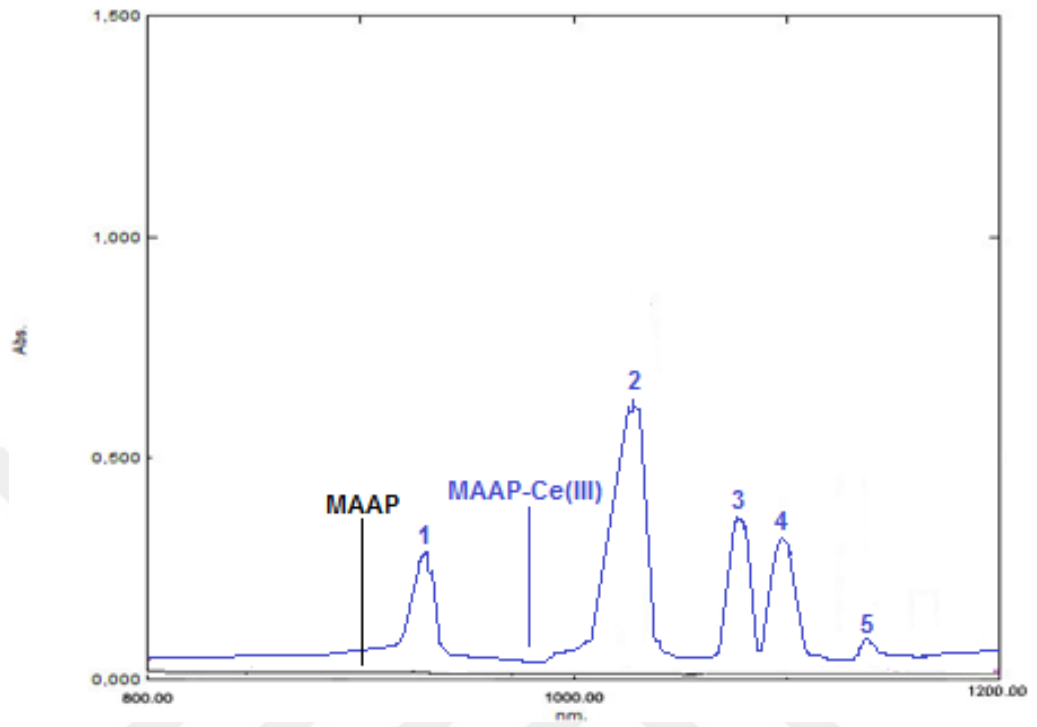


Şekil 4.2 P (HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin SEM görüntüsü

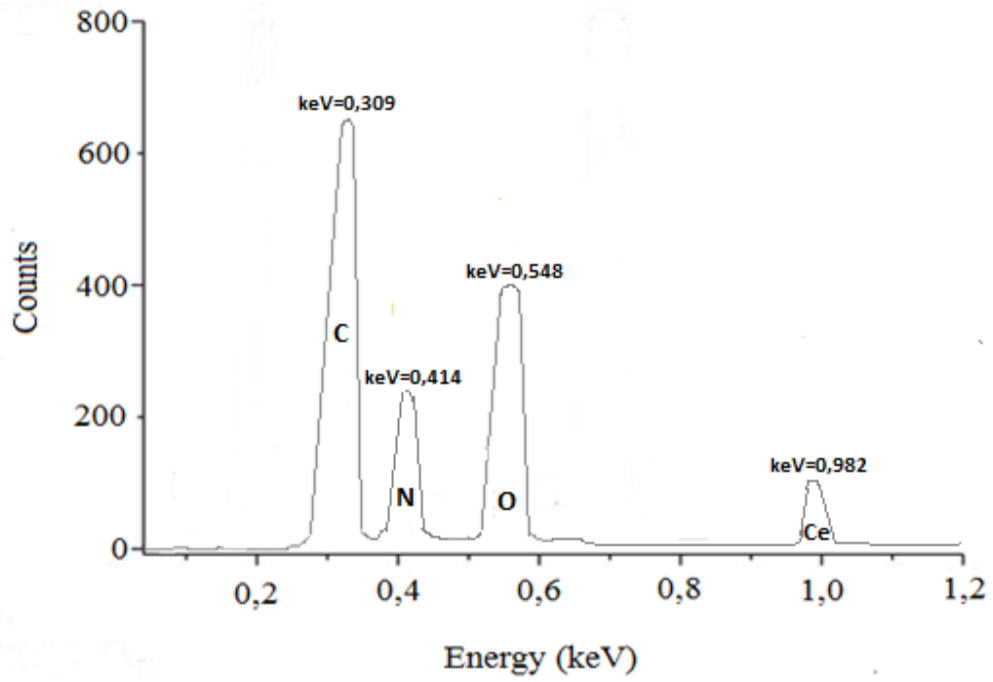
4.1.3 UV-NIR ve EDX çalışmaları

Fonksiyonel metal-şelat monomer MAAP-Ce³⁺ lizozime seçici bağlanmak için hazırlandı. Hazırlanan kompleks UV-NIR ile karakterize edildi. Şekil 4.3’te görüldüğü gibi, MAAP herhangi bir pik göstermezken, MAAP-Ce³⁺ kompleksi için 916, 1037, 1081, 1109 ve 1141 nm’de beş farklı pik gözlemlendi. UV-NIR bölgesinde oluşan bu pikler MAAP ve Ce³⁺ iyonunun kompleksleştiğini göstermektedir.

Şekil 4.4’te MAAP-Ce³⁺ kompleksinin EDX spektrumu görülmektedir. MAAP-Ce³⁺ kompleksinde %15,12 N ve %2,89 Ce³⁺ varlığı yapıda azot ve Ce³⁺ olduğunu göstermektedir.



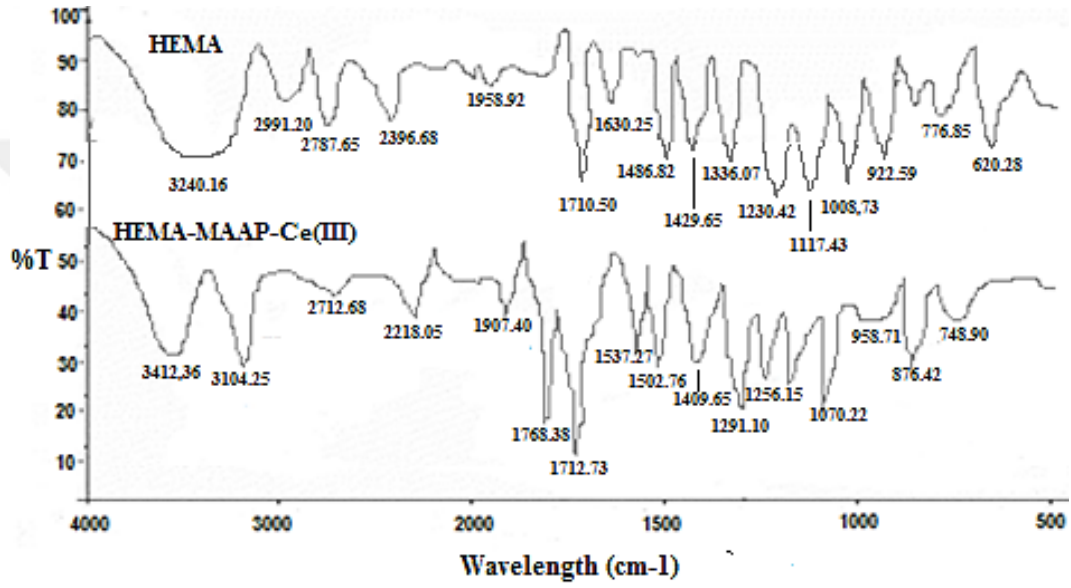
Şekil 4.3 MAAP ve MAAP-Ce³⁺ kompleksinin UV-NIR spektrumu



Şekil 4.4 MAAP-Ce³⁺ kompleksinin EDX spektrumu

4.1.4 FT-IR çalışmaları

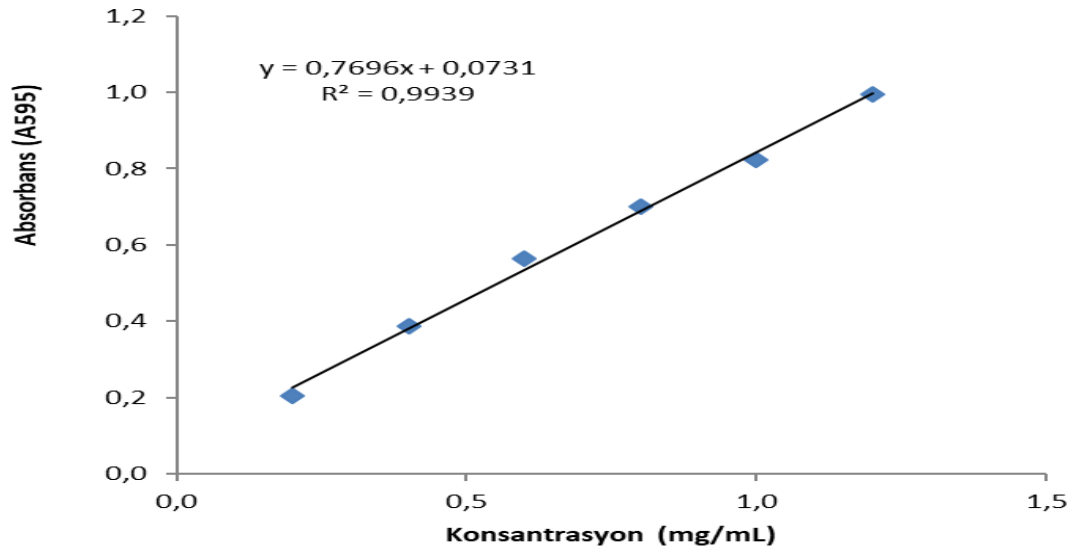
Lizozim adsorpsiyonu için hazırlanan p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin FT-IR spektrumu Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojel 3412 ve 3104 cm⁻¹'de sırasıyla karakteristik –OH ve –NH titreşimlerine sahiptir. 1768-1712 cm⁻¹'de ise ester, amid ve siklik karbonil gruplarının C=O bağlarının bandı görülmektedir.



Şekil 4.5 HEMA ve P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojellerinin FT-IR spektrumu

4.2 Standart Lizozim Eğrisinin Belirlenmesi

DeneySEL aşamalarda kriyojel kolona adsorplanan lizozim miktarını bulmak için belirli derişimlerde lizozim çözeltileri hazırlanarak, enzim için standart lizozim grafiğı oluşturuldu. Çalışmada R² değeri 0,9939 olarak bulundu. Standart lizozim grafiğı Şekil 4.6'da verilmektedir.

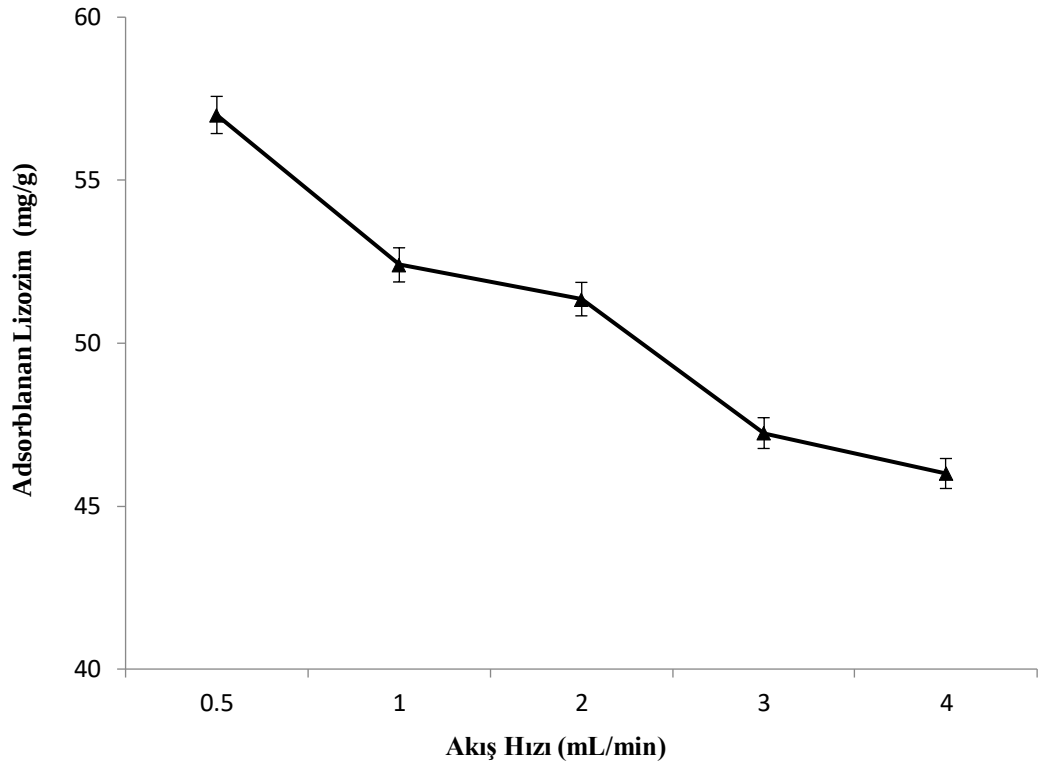


Şekil 4.6 Standart lizozim grafiği (3 tekrarlı deneyler)

4.3 Adsorpsiyon Çalışmaları

4.3.1 Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi

Farklı akış hızlarında adsorplanan lizozim miktarı ile ilgili elde edilen veriler Şekil 4.7’de görülmektedir. Akış hızının 0,5 mL/dak.’dan 4 mL/dak.’a değişmesiyle lizozim adsorplama kapasitesinin 57,84 mg/g’den 47,35 mg/g’ye kadar azaldığı görüldü. Bu sonuca göre lizozim adsorpsiyon kapasitesinin akış hızından bağımsız olduğu söylenebilir. Adsorpsiyonun akış hızından bağımsız olması p(HEMA-MAAP-Ce³⁺)’ün bağlayıcı kütle transfer özelliğinden kaynaklanabilmektedir (Perçin vd., 2013).



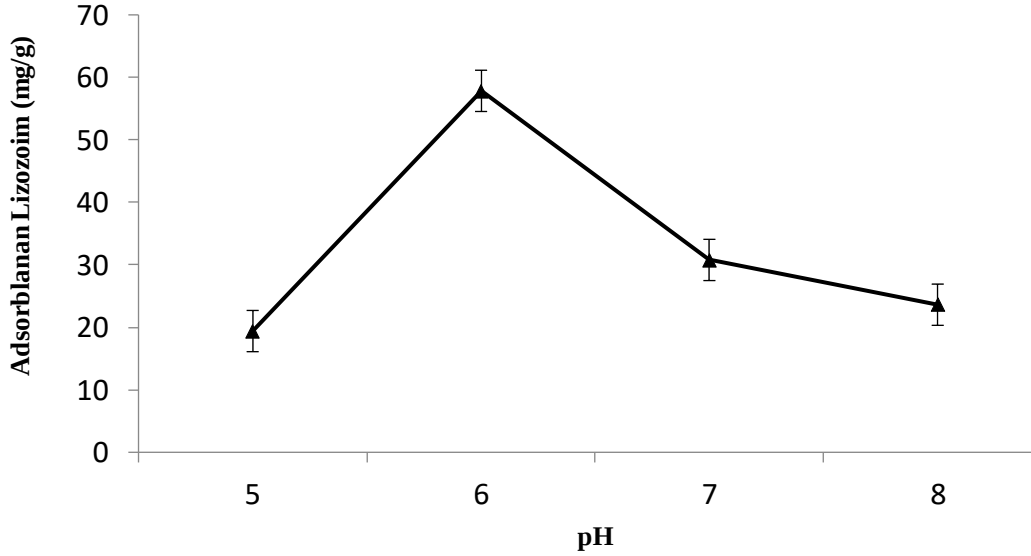
Şekil 4.7 Lizozim adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Deneysel koşulları: pH: 6,0; T:25 °C; Lizozim derişimi: 0,5 mg/mL

4.3.2 Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi

Adsorpsiyon kapasitesine etki eden parametrelerden biri pH'tır. Çalışmada 20 mM asetat (pH: 5,0) ve 20 mM fosfat (pH: 6,0,7,0, 8,0) tampon çözeltileri ile 0,5 mg/mL lizozim çözeltisi kullanılarak farklı pH'lardaki çözeltilerin lizozim adsorpsiyonu üzerindeki etkileri incelendi. Lizozim için en yüksek adsorpsiyon kapasitesi pH: 6,0' da 57,84 mg/g kriyojel olarak bulundu. Lizozim adsorpsiyon kapasitesinin pH: 6,0' dan sonra ise azaldığı tespit edildi. Şekil 4.8'de gösterildiği gibi, pH: 6,0'ın altındaki ve üstündeki pH'larda adsorpsiyon kapasitesi düşmektedir. Bu durum yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimler sonucu olabilmektedir.

İMAK'ta protein adsorpsiyonu bazı metal iyonları ve histidin (His), sistein (Cys) gibi amino asitler arasındaki etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Lizozimin yüzeyinde bir His artığı bulunmakta ve çoğu proteinde His amino asidinin pKa değeri 5,5-8,5 değerleri aralığındadır (Lu vd., 2007). Bu değerlerin üstünde His'in imidazol grubu

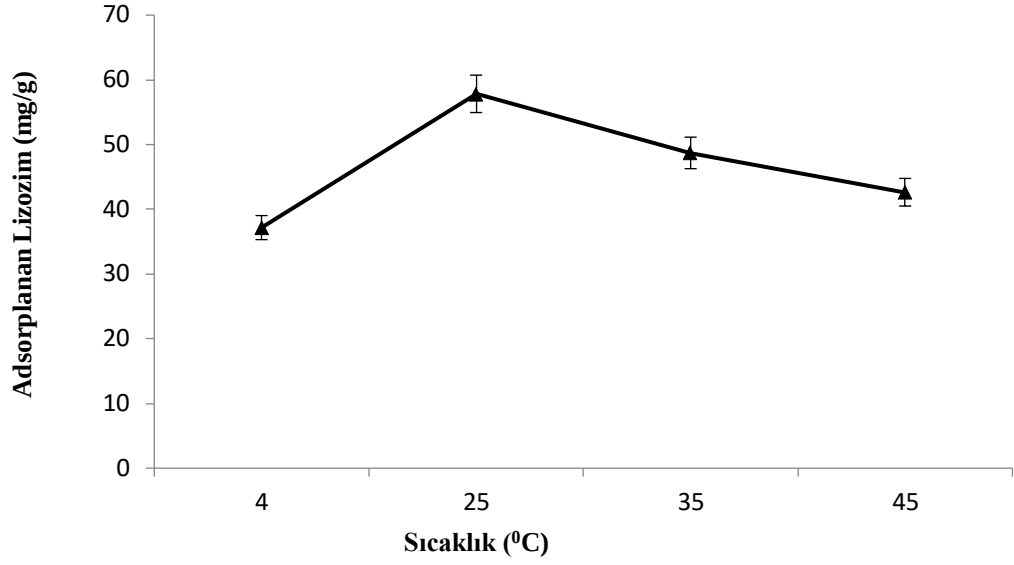
protonsuzdur ve pozitif yüklü metal iyonlarıyla etkileşime girebilmektedir (Tüzmen vd., 2012).



Şekil 4.8 Lizozim adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Deneysel koşullar: Lizozim derişimi: 0,5 mg/mL; T: 25 °C; Akış Hızı: 0,5 mL/dak.

4.3.3 Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

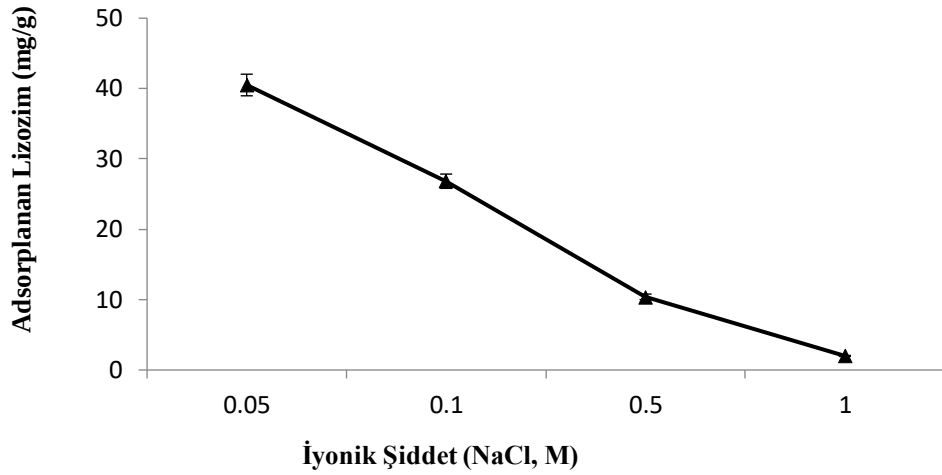
Hidrofobik, iyonik, elektriksel, Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları gibi farklı kuvvetler proteinlerin adsorpsiyon kapasitesine etki etmektedir. İlave olarak, sıcaklık adsorpsiyon tipine bağlı olarak proteinin polimer üzerindeki adsorpsiyonunna etki eder. Lizozim adsorpsiyon çalışmaları 4, 25, 35 ve 45°C sıcaklık aralıklarında gerçekleştirildi. Sonuçlar Şekil 4.9'da verilmektedir. Çalışılan sıcaklıklarda maksimum adsorsiyon 25°C' de 57,84 mg/g olarak belirlendi. Lizozim adsorpsiyonu için sıcaklığın 4 °C den 25 °C' ye artırılması ile belirgin bir şekilde artış (%31) görüldü. Bu durum van der Waals etkileşimlerinin artışı ile açıklanabilir (Baysal vd., 2014; Yavuz vd., 2016). Sıcaklık 25 °C den 45 °C' ye çıkarıldığında ise adsorpsiyon kapasitesinde yaklaşık %12 bir azalma kaydedildi. Bu hafif azalmanın nedeni MAAP'ın hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşim yapma kapasitesine sahip olması şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.9 Lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. DeneySEL koşullar: Lizozim derişimi :0,5 mg/mL; pH: 6,0; Akış hızı: 0,5 ml/dak.

4.3.4 Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

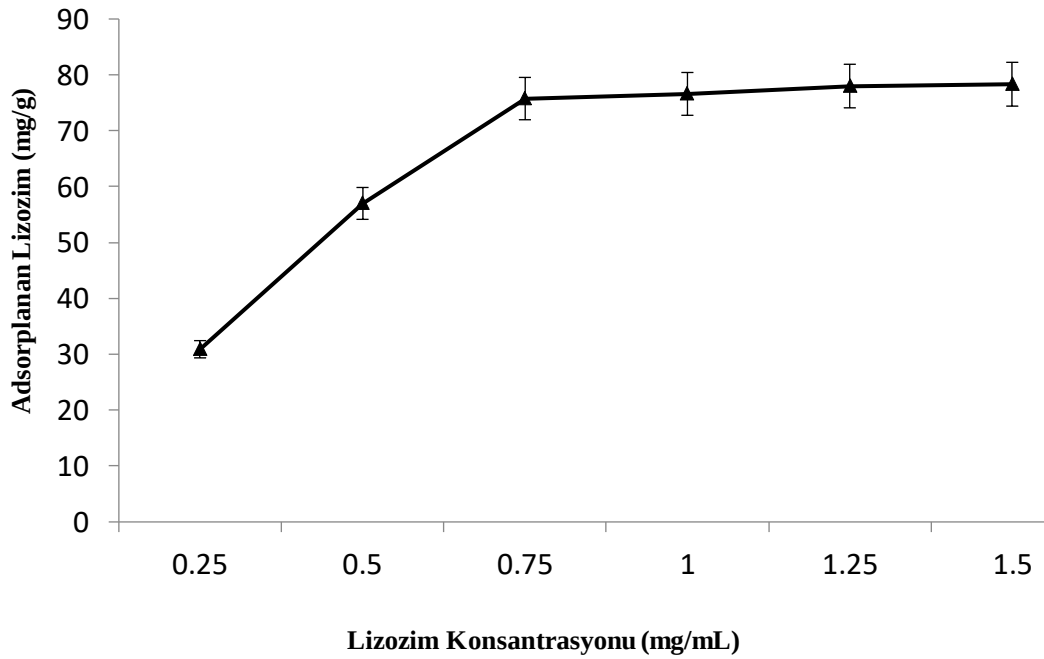
Lizozim adsorpsiyon kapasitesine iyonik şiddetin etkisi Şekil 4.10’da verilmektedir. Düşük tuz derişiminde (0,05 M) adsorpsiyon kapasitesi 41,31 mg/g iken yüksek tuz derişiminde (1 M) bu değEr 2,01 mg/g bulundu.



Şekil 4.10 Lizozim adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. DeneySEL koşullar pH :6.0; Lizozim derişimi :0,5 mg/mL; Akış hızı: 0,5mL/dak.; T: 25 °C

4.3.5 Lizozim başlangıç konsantrasyonunun adsorpsiyon üzerine etkisi

Başlangıç lizozim derişiminin enzim adsorpsiyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla 0,25 – 1,5 mg/mL’lik lizozim çözeltileri hazırlanarak çalışmaları yapıldı. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi lizozim adsorpsiyonu üzerine başlangıç enzim konsantrasyonunun etkisi olduğu tespit edildi. Artan lizozim derişimi ile lizozim adsorpsiyon kapasitesi artmakta, 1 mg/mL lizozim konsantrasyonunda ise enzimin doygunluğa (78,6 mg/mL) ulaştığı görüldü.



Şekil 4.11 Lizozim başlangıç konsantrasyonunun adsorpsiyon üzerine etkisi. DeneySEL koşullar pH: 6,0; T :25 °C; Akış hızı :0,5 mL/dak.

4.4 Adsorpsiyon İzotermLeri

Adsorpsiyon işleminde biyomoleküller adsorban ile etkileşim haline geçmektedirler. Dolayısıyla adsorpsiyon prosesinde biyomolekül ve adsorbent etkileşimleri için

adsorpsiyon izotermi önemli bir fizikokimyasal yaklaşımdır. Adsorpsiyon izotermi katı bir faz üzerine adsorplanan iyonların miktarı ile denge halindeki çözeltide bulunan iyonlar arasındaki bağlantıyı tanımlamaktadır (Labrou ve Cloin (1995). Adsorban biyomoleküller ile etkileşimini incelemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri kullanılan en genel modellerdir (Akduman vd., 2013).

Langmuir adsorpsiyon modeline göre moleküller belirli sayıda ve herbiri yalnızca tek molekül bağlayabilen bölgelere bağlanır. Freundlich adsorpsiyon modeli ise adsorbente, tanecik adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsaymaktadır. Langmuir adsorpsiyon izoterm eşitliği eşitlik 4.1’de Freundlich adsorpsiyon izoterm eşitliği ise eşitlik 4.2’de gösterilmektedir.

$$Q_e = Q_{max} \times b \times C_e / (1 + b \times C_e) \quad (4.1)$$

Burada; Q_e , adsorban bağlanan lizozim miktarı (mg/g); C_e , denge anındaki çözeltideki lizozim derişimi (mg/ml); b , Langmuir sabiti (ml/mg) ve Q_{max} , lizozim adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir.

$$\ln Q_e = \ln K_F + (1/n \times \ln C_e) \quad (4.2)$$

Burada; Q_e , adsorpsiyon miktarı (mg/g), C_e çözeltideki adsorbent derişimi (mg/mL)’dir. K_F adsorpsiyon kapasitesini, $1/n$ ise Freundlich sabitidir.

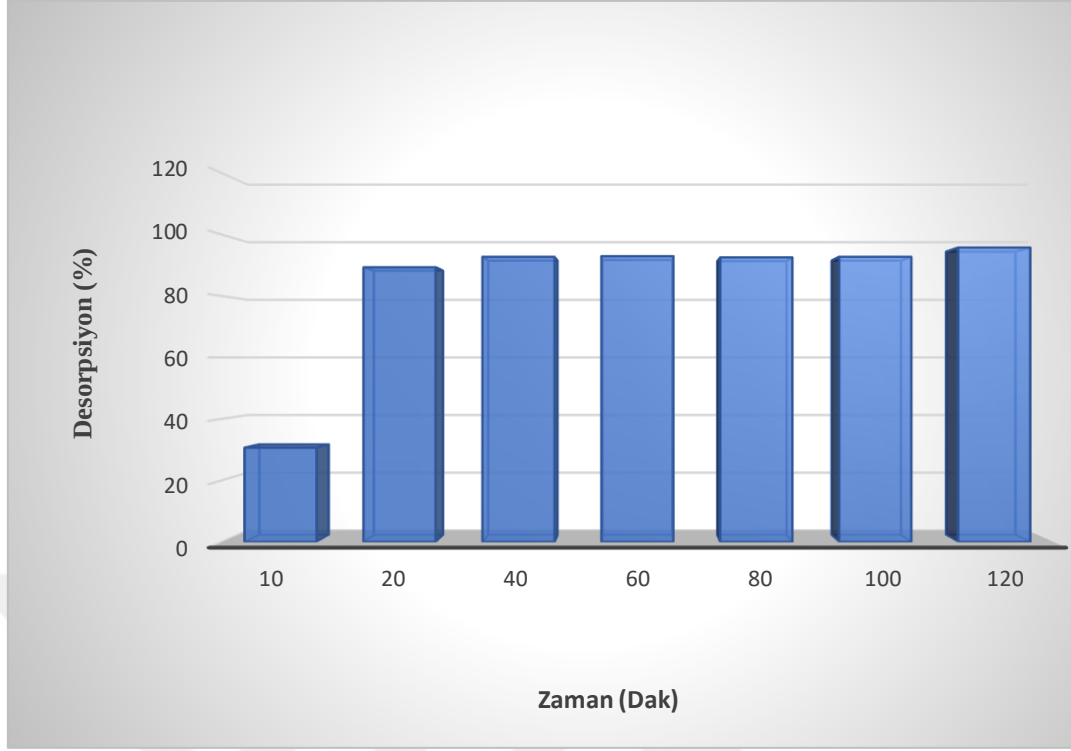
Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, hesaplamalar sonucu korelasyon katsayısı olan R^2 değerinin 0,9939 olarak bulunması bu sistemin Langmuir adsorpsiyon modeline uygun olabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.1 Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri adsorpsiyon katsayıları

Langmuir adsorpsiyon izotermi	Freundlich adsorpsiyon izotermi
$q_{\max} = 81,97 \text{ mg/g}$	$K_f = 180,34 \text{ mg/g}$
$b = 406,66 \text{ mL/mg}$	$1/n = 0,243$
$R^2 = 0,9939$	$R^2 = 0,5172$

4.5 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelde kolon dengesinin sağlanması için desorpsiyon işlemi 20 mM fosfat tamponu (pH: 6,0) içeren 1 M NaCl ile 10-120 dak. aralıklarında yapıldı. Şekil 4.12’ görüldüğü gibi p(HEMA-MAAP-Ce³⁺)’e adsorplanan lizozim 40. dak. aralığında yaklaşık %95,7 desorbe edildi. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında aynı kriyojel kullanılarak 7 kez çalışılan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemlerinde lizozim adsorpsiyon kapasitesinde yaklaşık %12 bir azalma görüldü. Elde edilen sonuçlarla, p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelin lizozim adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir kayıp olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirliği ve lizozim adsorpsiyonunda iyi bir kullanılabilirlik gösterdiği söylenebilir.



Şekil 4.12 Desorpsiyon işlemi ve tekrar kullanılabilirlik. DeneySEL koşullar pH: 6,0; T:25 °C; Akış hızı: 0,5 mL/dak.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yumurta akı proteini olarak bilinen lizozim yan etkisi olmayan bir protein yapısında bir enzim olup, mikroorganizmalarda polisakkaritleri hidrolizleyerek hücre duvarlarını yıkıma uğrattır. Günümüzde antibakteriyel, antienflamatuar ve antiviral özelliklerinden dolayı önemli uygulama alanlarına sahiptir. Bu nedenle, lizozimin saflaştırılması, ayrılması ve adsorpsiyonuna yönelik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bunlar arasında polimerik materyaller sahip oldukları esneklik ve yüzeylerinin işlevselliği nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bu önemli polimerlerden olan kriyojeller donma sıcaklığının altında üretilen makrogözenekli polimerlerdir. Kriyojeller farklı ligandlar ile birlikte kolayca hazırlanabilmektedirler.

Yapılan bu çalışmada HEMA ve MAAP-Ce³⁺’ün polimerizasyonu sonucu hazırlanan p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojeli lizozim adsorpsiyonunu araştırmak için hazırlandı. Hazırlanan MAAP-Ce³⁺ kompleksi UV-NIR ve EDX ile p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojeli ise şişme testi, yüzey morfolojisi ve FTIR ile karakterize edildi.

UV-NIR analizinde MAAP için herhangi bir pik görülmezken MAAP-Ce³⁺ için 9,16; 1037; 1081; 1109 ve 1141 nm’de beş farklı pik gözlemlendi.

EDX çalışmalarında yapıda %15,12 N ve %2,89 Ce³⁺ olduğu görüldü. Elde edilen bu sonuçlar MAAP-Ce³⁺ sentezinin gerçekleştiğini gösterdi.

P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin FTIR spektrumu alındığında 3412 ve 3104 cm⁻¹’de –OH ve –NH titreşim bantlarına ait frekanslar ile, 1768 ve 1712 cm⁻¹’de ester, amid ve siklik karbonil gruplarının C=O bağlarının bandı görüldü.

Yapılan şişme testi ve makrogözeneklilik çalışmalarında kriyojelin yüksek bir su tutma kapasitesine sahip olduğu, kriyojel için denge şişme oranı 7,39 g H₂O/g kriyojel, makrogözenek oranı ise %80,8 olarak hesaplandı.

SEM görüntüleri hazırlanan p(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojelinin makrogözenekli, birbirine bağlı bir yapıya sahip olduğunu gösterdi. Gözenek boyutu 30-50 µm aralığında bulundu.

P(HEMA-MAAP-Ce³⁺) kriyojeline lizozim adsorpsiyonu için bazı parametreler optimize edildi. Bu amaçla, akış hızı, pH, sıcaklık, başlangıç enzim derişimi ve iyonik şiddetin lizozim adsorpsiyonu üzerine etkisi incelendi.

0,5 mL/dak. akış hızında lizozim adsorpsiyon kapasitesi 57,84 mg/g iken, akış hızının 4 mL/dak. yükselmesiyle enzim adsorpsiyon kapasitesinin 47,35 mg/g'ye kadar düştüğü görüldü.

pH çalışmalarında (pH: 5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0) maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH: 6,0, 20 mM fosfat tamponu içinde 57,84 mg/g olarak bulundu.

Sıcaklığın lizozim adsorpsiyonu üzerine etkisini incelemek için çalışmalar 4; 25; 35 ve 45 °C'de gerçekleşti. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi 25 °C'de görüldü.

İyonik şiddetin lizozim adsorpsiyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla 20 mM fosfat tampon (pH: 6,0) içeren 0,05; 0,1, 0,5 ve 1 M NaCl çözeltileri ile çalışmalar gerçekleşti. Tuz derişiminin 0,05 M'den 1 M'ye artmasıyla enzim adsorpsiyon kapasitesinin 41,31 mg/g'den 2,01 mg/g'ye kadar düştüğü gözlemlendi.

Başlangıç enzim derişiminin artmasıyla adsorplanan lizozim miktarının da arttığı görüldü. 1 mg/mL lizozim derişiminde doygunluğa (78,6 mg/mL) ulaşıldığı gözlemlendi. Daha yüksek enzim derişimlerinde ise etkileşime giren bölgeler dolduğu için anlamlı bir artış görülmedi.

Adsorpsiyon izoterm çalışmalarında Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin uygun (R^2 : 0,9939) olduğu görüldü.

Tekrarlanabilirlik çalışmalarında adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi, aynı kriyojel 7 kez kullanıldığında, adsorpsiyon kapasitesinde %12 bir azalma görüldü. Bu veri ile aynı kriyojelin tekrar tekrar kullanılabilceğı sonucuna varıldı.

Elde edilen sonuçlara göre lantanit grubu bir element olan Seryum'dan yola çıkarak hazırlanan polimerin lizozim için biyoteknolojik alanlarda kullanılabilirliğinin olacağı söylenebilir. Bunun yanında, çok fazla çalışılmamış lantanit grubu diğer elementlerden yola çıkılarak yeni polimerik materyaller de hazırlanabilir.



KAYNAKLAR

- Akduman, B., Uygun, M., Uygun Aktaş, D., Akgöl, S., Denizli, A. (2013). Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. *Materials Science and Engineering C*, 33(8), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.009>
- Aktaş Uygun, D. (2008). Protein saflaştırılması için magnetik nano yapıların hazırlanması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A. (2009). Antibody purification with protein A attached supermacro porous poly (hydroxyethylmethacrylate) cryogel. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 45-272. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.03.013>
- Ardali, Y. (1990). Endüstriyel atık sulardan ağır metallerin adsorbsiyonla uzaklaştırılması. 19 Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 118
- Arora, K., Sharma, M. Sharma, K. P. (2009). Studies of some lanthanides (III) nitrate complexes of Schiff base ligand. *Engineering Journal of Chemistry*, 6(1), 201-210. <http://doi:10.1155/2009/149837>
- Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (2003). Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 986(2), 275-278. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01871-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01871-X)
- Baydemir, G., Türkoğlu, E. A., Andaç, M., Perçin, I., Denizli, A. (2015). Composite cryogels for lysozyme purification. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(2), 252-259. <https://doi.org/10.1002/.1259>
- Bayramoğlu, G., Arıca, M. Y. (2002). Procion Green H-4G immobilized on a new hydrogel membrane composed of poly (2hydroxyethylmethacrylate)/chitosan: preparation and its application to the adsorption of lysozyme. *Colloids and SurfacesA: Physicochemical and Engineering Aspects*, 202(1), 41-52. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01055-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01055-X)
- Baysal, Z., Bulut, Y., Yavuz, M., Aytekin, Ç. (2014). Bentonit/kitosan kompozitine adsorpsiyon yoluyla α -amilazın immobilizasyonu: Denge, kinetik ve termodinamik parametrelerin belirlenmesi. *Nışasta-Stärke*, 66(5-6), 484-490. <https://doi.org/10.1002/star.201300133>
- Bölgen, N. (2008). HEMA-LAKTAT-DEKSTRAN kriyojellerin üretimi ve doku mühendisliğinde uygulamaları Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Çavuş, A. (2011). İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojellerinin hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

- Çimen, D., Denizli, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.058>
- Çoban, S.A. (2015). Protein A imprinted supermacroporous poly(hydroxyethyl-metacrylate) based cryogels. Doktora Tezi, Hacatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dahle, J. T., Arai, Y. (2015). Environmental geochemistry of cerium: applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), 4600-4601. <https://www.mdpi.com/1660-4601/12/2/1253>
- Das, S., Bannerjee, S., Dasgupta, J. (1992). Experimental evaluation of preventive and therapeutic potentials of lysozyme. *Chemotherapy*, 38, 350-357. <https://doi.org/10.1159/000239025>
- Fioravante, I. F., Bueno, S. M. A. (2022). Performance of polyacrylamide-alginate-based cryogel for IgG purification from bovine serum by IMAC. *Process Biochemistry*, 118, 413-424. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.034>
- Galaev, I. Y., Dainiak, M. B., Plieva, F., & Mattiasson, B. (2007). Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel. *Langmuir*, 23(1), 35-40. <https://doi.org/10.1021/la061462e>
- Ghosh, R., Cui, Z.F. (2000). Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. *Journal of Membrane Science*, 167(1), 47-53. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00275-6)
- Ghosh, R., Silva, S. S., Cui, Z. (2000). Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), 19-24. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00069-3)
- Hage D. S. Anguizola J.A., Bi, C., Li, R, Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>
- Hazarkhani, M. Ustürk S. Özbilenler C. Yılmaz E. (2021). Pullulan/poly(N-vinylimidazole) cryogel: an efficient adsorbent for methyl orange. *Journal of Applied Polymer Science*, 138, e50958. <https://doi.org/10.1002/app.50958>
- Helfferich, F. (1961). 'Ligand exchange': a novel separation technique. *Nature*, 189(4769), 1001-1002. <https://doi.org/10.1038/1891001a0>
- Kalburcu, T., Tabak, A., Ozturk, N., Tuzmen, N., Akgol, S., Caglar, B., Denizli, A. (2015). Adsorption of lysozyme from aqueous solutions by a novel bentonite–tryptophane (Bent–Trp) microcomposite affinity sorbent. *Journal of Molecular Structure*, 1083, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.11.055>
- Karinen, R., Høiseth, G., Svendsen, K. O., Rogde, S., Vindenes, V. (2015). A fatal intoxication with phenazone (antipyrine). *Forensic Science International*, 248, e13-e15. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.01.001>

- Kazak, N. O. (2010). İmmobilize metal iyon afinite kromatografi (IMAK) uygulamalarında kullanılmak üzere nanotaşıyıcıların hazırlanması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisan Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.
- Keçili, R., Say, R., Yavuz, H. (2006). Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 39(4-5), 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.04.001>
- Keçili, R., Say, R., Ersöz, A., Yavuz, H., Denizli, A. (2007). Purification of penicillin acylase through a monolith column containing methacryloyl antipyrine. *Separation and Purification Technology*, 55(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.10.016>
- Şarkaya, K., Allı, A. (2021). Synthesis and characterization of cryogels of p(HEMA-N-Vinylformamide) and p(HEMA-N-Vinylpyrrolidone) for chemical release behavior. *Journal of Porous Materials*. 28, 853-865. <https://doi.org/10.1007/s10934-021-01037-9>
- Labrou, N. E., Clonis, Y. D. (1995). The interaction of *Candida boidinii* formate dehydrogenase with a new family of chimeric biomimetic dye-ligands. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316(1), 169-178. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1025>
- Liao, Y. C., Syu, M. J. (2005). Novel immobilized metal ion affinity adsorbent based on cross-linked β -cyclodextrin matrix for repeated adsorption of α -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.10004>
- Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S., Domotenko, L. V., Mamtsis, A. M., Titova, E. F., Belavtseva, E. M., Rogozhin, S. V. (1986). Study of cryostructurization of polymer systems VII. Structure formation under freezing of poly (vinyl alcohol) aqueous solutions. *Colloids and Polymer Science*, 264(1), 19-24. <https://doi.org/10.1007/BF01410304>
- Lu, A. X., Liao, X. P., Zhou, R. Q., Shi, B. (2007). Preparation of Fe (III)-immobilized collagen fiber for lysozyme adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1-3), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.12.027>
- Mildan, E. (2015). Poli(m-aminobenzoik asit) polimeri ile Pd (II) iyonlarının adsorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A. (2007). Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1), 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.03.002>
- Ortiz-Martin, L., Benavente, F., Medina-Casanellas, S., Giménez, E., Sanz-Nebot, V. (2015). Study of immobilized metal affinity chromatography sorbents for the analysis of peptides by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 36(6), 962-970. <https://doi.org/10.1002/elps.201400374>

- Öztürk, G., Saylan, Y., Denizli, A. (2021). Designing composite cryogel carriers for tyrosine adsorption. *Separation and Purification Technology*, 254, 117622. <https://doi.org/10.1016/J.Seppur.2020.117622>
- Perçin, I., Aksöz, E., Denizli, A. (2013). Gelatin-immobilised poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel for affinity purification of fibronectin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 352-365. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0352>
- Perçin, I., Sener, G., Demirçelik, A. H., Bereli, N., Denizli, A. (2015). Comparison of two different reactive dye immobilized poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel discs for purification of lysozyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 2795-2805. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1454-5>
- Plieva, F. M., Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (2004). Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. *Journal of Separation Science*, 27(10-11), 828-836. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401836>
- Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M. R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y. (2005). Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*, 1(4), 303-309. <https://doi.org/10.1039/B510010K>
- Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergenståhl, B., Mattiasson, B. (2006). Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. *Journal of Materials Chemistry*, 16(41), 4065-4073. <https://doi.org/10.1039/B606734D>
- Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *Journal of Separation Science*, 30(11), 1657-1671. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700127>
- Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (2004). Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *Journal of Chromatography B*, 807(1), 129-137: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.01.050>
- Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536), 598-599. <https://doi.org/10.1038/258598a0>
- Schulze, W. E., Yu, D. T., Macmasters, M. M. (1964). Coacervation of starch I. By freezing. *Starch-Stärke*, 16(2), 41-44. <https://doi.org/10.1002/star.19640160202>
- Sharma, S., Agarwal, G. P. (2001). Interactions of proteins with immobilized metal ions: a comparative analysis using various isotherm models. *Analytical Biochemistry*, 288(2), 126-140. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4894>
- Şengül, F. Küçükgül, E. Y. (1990). Çevre mühendisliğinde fiziksel, kimyasal temel işlemler ve süreçler. Dokuz Eylül Üniversitesi Basım Ünitesi, İzmir
- Türkmen, D., Denizli, A. (2014). PHEMA based composite cryogels with loaded hydrophobic beads for lysozyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 859-865. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.034>

- Tüzmen, N., Kalburcu, T., Denizli, A. (2012). Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, 47(1), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.021>
- Tyagi, P., Kumar, A., Kumar, Y., Lahiri, S. S. (2011). Synthesis and characterization of poly (HEMA-MAA) hydrogel carrier for oral delivery of insulin. *Journal of Applied Polymer Science*, 122(3), 2004-2012. <https://doi.org/10.1002/app.34075>
- Ueda, E. K. M., Gout, P. W., Morganti, L. (2003). Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A*, 988(1), 1-23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02057-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02057-5)
- Uygun, M., Akduman, B., Uygun, D. A., Akgöl, S., Denizli, A. (2015). Dye functionalized cryogel columns for reversible lysozyme adsorption. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(5), 277-289. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.997560>
- Ünlü, N., Ceylan, Ş., Erzen, M., Odabaşı, M. (2011). Investigation of protein adsorption performance of Ni²⁺-attached diatomite particles embedded in composite monolithic cryogels. *Journal of Separation Science*, 34(16-17), 2173-2180. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100269>
- Üstükoğlu, N. (2006). Farklı ortam koşullarında nisin, lizozim ve bazı bitkisel kaynakların küf gelişiminin kontrol altına alınması üzerine etkileri. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Voet, D. Voet, J.G. (1990). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 1223 p. USA.
- Weber, W.J. Morris, J.C., (1964). Kinetics of adsorption on carbon from solution. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 89: 31-39
- Xue, Q. G., Schey, K. L., Volety, A. K., Chu, F. L. E., La Peyre, J. F. (2004). Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.05.011>
- Yao, K., Yun, J., Shen, S., Wang, L., He, X., Yu, X. (2006). Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1109(1), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.014>
- Yavuz, M., Çakır, O., Baysal, Z. (2016). Adsorption of cellulase on poly (2-hydroxyethyl methacrylate) cryogels containing phenylalanine. *Turkish Journal of Chemistry*, 40(5), 720-728. <https://doi.org/10.3906/kim-1601-43>
- Yılmaz, M., Bayramoğlu, G., Arıca, M. Y. (2005). Separation and purification of lysozyme by Reactive Green 19 immobilised membrane affinity chromatography. *Food Chemistry*, 89(1), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.072>
- Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. (2009). Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.009>

- Zenger, O., Baydemir Peşint, G. (2022). Preparation of molecularly imprinted bilayer cryogel columns for selective protein depletion. *Process Biochemistry*, 117, 90-100. <https://doi.org/10.1016/J.procbic.2022.03.018>
- Zhu, X., Zhang, L., Fu, A., Yuan, H. (2016). Efficient purification of lysozyme from egg white by 2-mercapto-5-benzimidazolesulfonic acid modified Fe₃O₄/Au nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 59, 213-217. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.009>



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyad, Ad Aksoy, Eyyüp
Web sayfası
(Research Gate, Academia, vs.)

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi	2023
Lisans	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2010
Lise	Türkan Ömer Okan Lisesi	2003

İş Deneyimi

Dönem (Yıl)	Şirket, Kurum	Görev
2014-2021	Yükseliş Koleji	Öğretmen, Yönetici
2021-2022	Maya Okulları	Yönetici

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Baysal, Z., Aksoy, E., Dolak, İ., Ersöz, A., Say, R. “Adsorption Behaviours of Lysozyme onto Poly-Hydroxyethyl Methacrylate Cryogels Containing Methacryloyl Antipyrine-Ce(III)” International Journal of Polymeric Materials Polymeric Biomaterials. 67 (4), 199-204, 2018.
2. Baysal, Z., Aksoy, E., Dolak, İ., Çağlayan, V., Ersöz, A., Say, “New lanthanide-chelate cross-linked affinity cryogel for protein separation” 10. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, P17, 26-28 Mayıs 2016, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Öğrencinin Adı, Soyadı	Eyyüp Aksoy
Öğrenci No	14803007
Ana Bilim Dalı	Kimya
Program Türü	Proje ☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof. Dr. Zübeyde Baysal
Tez Başlığı	Lizozim Adsorpsiyonuna Yönelik Yeni Bir Kriyojelin Hazırlanması ve Bazı Optimizasyon Parametrelerinin Belirlenmesi
RAPOR BİLGİLERİ	
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası
Sayfa Sayısı	66
Raporlama Tarihi	17.02.2023
Benzerlik Oranı (%)	15

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 66 sayfalık kısmına ilişkin, 17/02/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %15 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☐ Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç
☒ Kaynaklar hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer (Açıklayınız)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Benzerlik oranım üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir, gereğini arz ederim.

Öğrencinin Eyyüp Aksoy

Tarih: 17.02.2023

İmza:

Danışman Prof. Dr. Zübeyde Baysal

İmza:

Tarih: 17.02.2023

Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Berrin Ziyadanoğulları

İmza:

Tarih: 17.02.2023