

**ÇAPRAZ BAĞLI KİTOSAN YÜZEYİNDE AKRİLİK ASİT İPLİKÇİKLERİNİN
OLUŞTURULMASI: SİTOKROM C ADSORPSİYONUNDA
KULLANILMASI, TERMODİNAMİK VE KİNETİK PARAMETRELERİN
BELİRLENMESİ**

HANDE SOYDOĞAN DAĞLI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2010

ANKARA

Hande SOYDOĞAN DAĞLI tarafından ÇAPRAZ BAĞLI KİTOSAN YÜZEYİNDE AKRİLİK ASİT İPLİKÇİKLERİNİN OLUŞTURULMASI: SİTOKROM C ADSORPSİYONUNDA KULLANILMASI, TERMODİNAMİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap ŞENEL

(Kimya, Hacettepe Üniversitesi)

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

(Kimya, Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Selma ATEŞ

(Kimya, Gazi Üniveristesi)

Tarih: 23/06/2010

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hande SOYDOĞAN DAĞLI

**ÇAPRAZ BAĞLI KİTOSAN YÜZEYİNDE AKRİLİK ASİT İPLİKÇİKLERİNİN
OLUŞTURULMASI: SİTOKROM C ADSORPSİYONUNDA
KULLANILMASI, TERMODİNAMİK VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

HANDE SOYDOĞAN DAĞLI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2010**

ÖZET

Bu çalışmada, kitosan membranlara akrilik asit monomeri aşıl原因arak membranlara katyon değıştirici özelliğı kazandırıldı. Elde edilen kitosan-g-pAA bazık bir protein olan sitokrom c proteinin sulu ortamdan adsorpsiyonunda kullanılmak üzere iki basamakta hazırlandı. İlk aşamada, kitosan membranları epiklorohidrin ile çapraz bağlandı. İkinci aşamada, çapraz bağlı kitosan membran üzerine zayıf anyon değıştirici gruplar taşıyan akrilik asit monomerinin aşı kopolimerizasyonu sağlandı. Kitosan-g-pAA membranların yüzeyinde poliakrilik asit iplikçikleri oluşturuldu. Böylece mekanik dayanımı iyi, biyolojik ve kimyasal parçalanmaya karşı dirençli destek materyali hazırlanmış oldu. Modifiye edilerek hazırlanmış membranların optimizasyon ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Kitosan membranların yapısı FT-IR spektroskopisiyle doğrulandı ve termal kararlılığı DSC ile belirlendi.

Kitosan-g-pAA membranları ile adsorpsiyon işleminde pH, sıcaklık, iyonik şiddet gibi parametrelerin adsorsiyon kapasitesi üzerine etkisi araştırıldı. Membranlarının maksimum deneysel ve teorik adsorpsiyon

kapasitesi sırasıyla 76,21 ve 80,39 mg/ml olarak belirlendi. Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinden hesaplanan K_d değeri sonucunda proteinin sorbente karşı yüksek bağlanma afinitesi olduğu görüldü. Freundlich model parametre değerlerinin büyüklüğü, iyon değiştirici membranının yüksek bir adsorpsiyon kapasitesiyle sitokrom c alımının kolay olduğunu gösterdi. Yüksek korelasyon katsayıları ve maksimum adsorpsiyon kapasitelerindeki uyumlu sonuçlar, adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetik modeliyle uyumlu olduğunu gösterdi. İyon değişim kromatografisi alanında kullanılmak üzere hazırlanan kitosan-g-pAA membranı için belirlenen pozitif ΔH ve negatif ΔG değerleri sırasıyla adsorpsiyonun endotermik ve kendiliğinden olduğunu gösterdi.

Bilim Kodu : 201. 1. 118
Anahtar Kelimeler : Kitosan, modifikasyon, akrilik asit, adsorpsiyon, kinetik ve termodinamik parametreler
Sayfa adedi : 78
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU
Prof. Dr. M. Yakup ARICA

**GRAFTING OF ACRYLIC ACID FIBROUS BRUSHES ON CROSSLINKED
CHITOSAN SURFACES: APPLICATION IN CYTOCHROM C
ADSORPTION AND DETERMINATION OF THERMODYNAMIC AND
KINETIC PARAMETERS
(M. Sc. Thesis)**

Hande SOYDOĞAN DAĞLI

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
June 2010**

ABSTRACT

In this study, chitosan membranes gained cation exchanger property with grafting acrylic acid monomer to chitosan membranes. Obtained chitosan-g-pAA was prepared in two phases to be used on adsorption of alkaline cythcrome c from aqueous solution. Firstly, the chitosan membranes was crosslinked with epichlorohydrin. Secondly, the graft copolymerization of acrylic acid monomer which carries anion exchanger groups provided on crosslinked chitosan, by formation of polyacrylic acid fibrils on the surface of chitosan-g-p(AA) membranes, a supporting material with a good mechanic tolerance to biologic and chemical decomposition had been prepared. Optimization and characterization processes of membranes, prepared by modifying, were carried out. Chitosan membranes had been confirmed with FT-IR spectroscopy and thermal determination identified with DSC.

Effects of parameters like pH, temperature, ionic intensity on adsorption quality have been investigated during the process of adsorption with chitosan-g-pAA membranes. Maximum experimental

and theoretical adsorption capacities of membranes were identified as 76,21 and 80,39 mg/ml respectively. As a result of K_d value, obtained from Langmuir adsorption isotherm model, it had been observed that protein had high affinity against sorbent. Greatness of Freundlich model parameters showed that ion exchanging membrane's taking of cythchrome c with a high adsorption capacity was easy. High correlation coefficients and compatible results of maximum adsorption capacities showed that adsorption is compatible with quadratic kinetic model. Positive ΔH and negative ΔG values identified for the chitosan-g-pAA membrane, in ion exchanging chromatography area showed that the adsorption is endothermic and spontaneous respectively.

Science Code	: 201. 1. 118
Key Words	: Chitosan, modification, acrylic acid, adsorption, kinetic and thermodynamic parameter
Page Number	: 78
Adviser	: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU Prof. Dr. M. Yakup ARICA

TEŞEKKÜR

Bütün yüksek lisans çalışmam boyunca ilgi, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her türlü desteği esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr.Gülay Bayramoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, çalışmalarımda büyük katkısı bulunan sayın hocam Prof.Dr. M.Yakup Arıca'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman beni destekleyen, maddi-manevi her konuda bana yardımcı olan sevgili annem Hale Soydoğan ve sevgili babam T.Celal Soydoğan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sabri,anlayışı ve sevgisi ile beni yalnız bırakmayan, her türlü konuda bana destek olan sevgili eşim Kenan Dağlı' ya teşekkür bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISATMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Polimerler.....	4
2.2. Polimerlerin Sınıflandırılması.....	4
2.3. Polimerlerin Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması.....	5
2.3.1. Yapay polimerler.....	6
2.3.2. Doğal polimerler.....	7
2.4. Kitosan.....	10
2.4.1. Kitosanın kullanım alanları.....	13
2.5. Modifikasyon.....	14
2.5.1. Kitin ve kitosanın kimyasal modifikasyonu.....	14
2.5.2. Aşı kopolimerizasyonu.....	16
2.5.3. Kitosan üzerine akrilat ve vinil kökenli monomerler aşılması.....	18
2.6. Proteinler.....	21

Sayfa

2.7. Protein Saflaştırma Teknikleri.....	22
2.7.1. Afinite kromatografisi.....	24
2.7.2. İyon değişim kromatografisi.....	24
2.7.3. Proteinlerin iyon değişim kromatografisi ile ilgili uygulamaları.....	28
2.8. Adsorpsiyon.....	29
2.9 Adsorpsiyon İzoterm Modelleri.....	30
2.9.1. Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	30
2.9.2. Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	31
2.10. Sitokrom c.....	32
2.10.1. Literatürde sitokrom c adsorpsiyonu üzerine yapılan çalışmalar.....	33
3. DENEYSEL KISIM.....	37
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	37
3.2. İyon Değiştirici Membranların Hazırlanması.....	37
3.2.1. Kitosan membranların hazırlanması.....	37
3.2.2. Kitosan membranların çapraz bağlanması.....	37
3.2.3. Çapraz bağlı kitosan membranların modifikasyonu.....	38
3.3. Membranların Karakterizasyonu.....	39
3.3.1. Denge su içeriği.....	39
3.3.2. Gay- Lussac piknometresi ile yoğunluk tayini.....	39
3.3.3. FT-IR spektrumları.....	39
3.3.4. Amin grubu tayini.....	39
3.3.5. Karboksil grubu tayini.....	40

Sayfa

3.3.6. Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	40
3.4. Sulu Çözeltilerden Sitokrom c Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi.....	40
3.4.1. Adsorpsiyon parametrelerinin etkisi.....	41
3.5. Adsorpsiyon Kinetiği.....	42
3.6. Adsorpsiyon İzoterm Modellerinin Belirlenmesi.....	43
3.7. Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi.....	44
3.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	44
4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMA.....	46
4.1. Çapraz Bağlı Kitosanın Aşı Kopolimerizasyonu ile Modifikasyonu.....	46
4.2. Aşılama Verimi.....	49
4.3. Kitosan-g-p(AA) Membranların Karakterizasyonu.....	51
4.3.1. Kitosan ve modifiye kitosanın denge su içeriği.....	51
4.3.2. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi.....	52
4.3.3. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri.....	54
4.3.4. Differansiyel tarama kalorimetresi (DSC).....	56
4.4. Kitosan-g-p(AA) Membranlarının Sitokrom-c Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	58
4.3.1. Adsorpsiyon kapasitesinde pH etkisi.....	58
4.3.2. Adsorpsiyon hızı ve adsorpsiyon kinetiği.....	60
4.3.3. Adsorpsiyon kapasitesinde derişim etkisi.....	61
4.3.4. İyonik şiddet etkisi.....	62
4.3.5. Sıcaklığın etkisi.....	63

Sayfa

4.4. Adsorpsiyon İzoterm Modeli.....	63
4.5. Adsorpsiyon Kinetiği.....	65
4.6. Adsorpsiyon Sisteminin Termodinamik Parametresi.....	65
4.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	66
5. SONUÇLAR.....	67
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Polimerlerin genel olarak kaynaklarına göre sınıflandırılması...	6
Çizelge 2.2. Farklı geometriye sahip doğal polimerlerin kullanım alanları....	9
Çizelge 2.3. Kopolimer aşıllı kitosan çeşitleri.....	17
Çizelge 2.4. Hareketli ve sabit fazın yapısı ayırma prensipleri dikkate alınarak kromatografik tekniklerin sınıflandırılması.....	23
Çizelge 2.5. Yaygın olarak kullanılan iyon değiştiriciler.....	27
Çizelge 4.1. Yüzeyinde poli(akrilik asit) taşıyan kitosan-g-pAA Membranların sitokrom c adsorpsiyonunda belirlenen izoterm modeli sabitleri.....	64
Çizelge 4.2. İyon değiştirici membranların sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu İşleminde belirlenen kinetik sabitler.....	65
Çizelge 4.3. Kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranların kullanıldığı sulu çözeltiden farklı sıcaklıklarda protein adsorpsiyonu sistemi için belirtilen termodinamik parametreler.....	66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. (a) Kitin ve (b) Kitosanın kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.2. Kitinin izolasyonu ve kitinden kitosan sentezi.....	11
Şekil 2.3. Kitosanın olası türevlendirme işlemleri.....	15
Şekil 2.4. Poli (A) –g – poli (B) kopolimer.....	19
Şekil 2.5. Proteinlerdeki polipeptid zincirinin yapısı.....	21
Şekil 2.6. Proteinlerin pH'a bağlı olarak farklı iyonlaşma durumları.....	22
Şekil 2.7. İyon değıştiriciler (a)Katyon değıştirici (b)Anyon değıştirici.....	25
Şekil 2.8. Sitokrom–c yapısı.....	33
Şekil 4.1. Kitosan ve çapraz bağı kitosan yapılarının şematik gösterimi...47	
Şekil 4.2. Kitosanın epiklorohidrin ile çapraz bağlanmasının şematik gösterimi.....47	
Şekil 4.3. Çapraz bağı kitosan üzerine akrilik asit monomerinin aşılmasının şematik gösterimi.....48	
Şekil 4.4. Proteinin kitosan-g-p(AA) yapısına bağlanmasının gösterimi....48	
Şekil 4.5. Monomer konsantrasyonun aşılama yüzdesine etkisi.....50	
Şekil 4.6. Polimerizasyon sıcaklığının aşılama yüzdesine etkisi.....51	
Şekil 4.7. Kitosan, çapraz bağı kitosan ve poli(akrilik asit) aşılansak modifiye edilen kitosan membranların denge su içeriğı.....52	
Şekil 4.8. Çapraz bağı kitosanın FTIR spektrumu.....53	
Şekil 4.9. AA monomeri aşılı çapraz bağı kitosanın FT-IR spektrumu.....54	
Şekil 4.10. Çapraz bağı kitosan membranın SEM mikrografı.....55	
Şekil 4.11. AA aşılansak Kitosan membranın SEM mikrografı.....55	
Şekil 4.12. Çapraz bağı kitosanın DSC eğrisi.....57	

Şekil	Sayfa
Şekil 4.13. AA aşılانmış çapraz bağılı kitosanın DSC eğrisi.....	57
Şekil 4.14. Sulu ortamdan iyon değıştirici membranlara sitokrom c adsorpsiyonun pH etkisi.....	59
Şekil 4.15. İyon değıştirici membranlara sitokrom c adsorpsiyonunda adsorpsiyon süresinin etkisi.....	60
Şekil 4.16. Sulu çözeltideki sitokrom c 'nin denge derişiminin adsorsiyon kapasitesine etkisi.....	61
Şekil 4.17. İyon değıştirici membranlarla sitokrom c adsorpsiyonunda İyonik şiddetin etkisi.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
AAc	Akrilik asit
AIBN	2,2-Azobisisobütironitril
APS	Amonyum persülfat
BET	Brunauner-Emmett-Teller
CAN	Seryum amonyum nitrat
¹³C NMR	Karbon nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
CHT	Kitosan
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECH	Epiklorohidrin
EGDMA	Etilen gilisidil metakrilat
FAS	Demir amonyum sülfat
FT-IR	Fourier-transform infrared spektroskopisi
HCl	Hidroklorik asit
¹H NMR	Proton nükleer manyetik rezonans spektrometresi
IMAC	İmmobilize metel iyon afinite kromatografisi
IEC	İyon değiştirme kromatografisi

KBr	Potasyum bromür
KSCN	Potasyum tiyosiyanat
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAA	Metakrilik asit
MMA	Metil metakrilat
MAH	Maleik anhidrit
NAOH	Sodyum hidroksit
PDC	Potasyum diperyodatokuprat
PPS	Potasyum persülfat
PI	İzoelektrik nokta
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV	Ultra viyole
UV-VİS	UV-görünür bölge spektroskopisi

Simgeler	Açıklama
B	Beta ışınları
Γ	Gama ışınları
pKa	Asitlik sabiti
K_d	Ayrılma sabiti
K_F	Freundlich sabiti
Mg	Miligram
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mL	Mililitre
%G	Aşılama yüzdesi
%E	Aşılama verimi
ΔH	Entalpi değişimi
ΔS	Entropi değişimi
ΔG	Gibbs serbest enerji değişimi

1. GİRİŞ

Polimer membranlar klinik uygulamalar için, tıp ve biyoteknoloji alanında kullanılmakla birlikte biyolojik sıvılardan hedeflenen proteinin ayrıştırılmasında, enzim reaktörünün ve enzim elektrotlarının hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [1,2].

Polimerler genel olarak sentetik ve doğal olarak başlıca iki grupta incelenebilirler. Doğal polimerler, bir çok işlevsel özelliğe sahip olduklarından dolayı, biyomalzeme, kayganlaştırıcı, bağlayıcı, jel yapıcı gibi birçok kullanım alanları vardır fakat istenilen büyük miktarlarda üretimleri maliyet açısından yüksek olması önemli bir dezavantajdır. Bu grupta yer alan biyobozunur bir polimer olan kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir.

Biyobozunur polimerlerin ilk uygulaması hayvan bağırsağı, ipek ve patates nişastasının yara iyileştirilmesinde kullanılmasıdır. Protein temelli polimerler (albümin, kollajen gibi) elastomerik yapıda, iyi derecede oksijen geçiren, biyoyumlu polimerlerdir. Bu sayede doku mühendisliği, biyosensör ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Polisakkarit sınıfındaki kitosan mekanik olarak dayanıksız olması nedeniyle kullanımı zordur fakat çeşitli alanlarda kullanılmak üzere yüzey özelliklerinin değiştirilerek zenginleştirilmesi daha dayanıklı bir forma kavuşturulması mümkündür [3,4].

Genel olarak, kimyasal bileşimi farklı iki monomerin polimerizasyonuna kopolimerizasyon, oluşan polimere ise kopolimer adı verilir. Polimerlerin yüzey özelliklerinin değiştirilerek istenilen özellikler kazandırmak amacıyla modifiye edilmesinde ise yaygın olarak aşı kopolimerizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Aşı kopolimerlerde, kimyasal yapıları farklı iki polimer zinciri, zincir dışından bir yerden birbirlerine bağlanmış ve bu zincirdeki bağlanma noktalarının sayısı oluşan aşı kopolimerin yapısına bağlı olarak değişmektedir.

Polimer yapılarının modifikasyonu için kullanılan aşı kopolimerizasyonu kitosanın çözünürlüğünü ve daha çok alanda kullanımını arttırmaya yöneliktir. Bu sayede kitosanın modifikasyonuna yönelik çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Polimerler üzerine bir monomerin aşılması; polimerizasyon sıcaklığı, ortamdaki monomer ve başlatıcının derişiminin değıştirilmesi, çözücü/su oranı ve farklı çözücülerin varlığında polimerin şişme özellikleri gibi parametreler polimerizasyonun şartlarına bağılı olarak değışiklik göstermektedir. Bu parametreler dikkate alınarak gerçekleştirilen aşı kopolimerin moleküler yapısı, molekül uzunluğu ve sayısı gibi yan zincirlerin özellikleri kontrol edilebilmektedir [5,6].

Biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişme, protein saflaştırılmasında verimliliği yüksek yeni yöntemlerin araştırılmasını ve geliştirilmesini sağlamıştır. İyon değışim kromatografisi seçici bir saflaştırma yöntemidir. Bu alanda kullanılacak olan polimerik destek materyallerinin bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Kullanılan afinite desteklerinin çözünmezliği önemli bir parametredir. Bu doğrultuda, çapraz bağılı polimerik destek materyallerinin kullanımı dikkat çekmektedir. Biyolojik olarak uyumlu olan akrilik ve metakrilik polimerler kontakt lens, ilaç salınım sistemleri ve yapay damar olarak çeşitli tıbbi uygulamalarda geniş ölçekli olarak kullanılmaktadır. Özellikle, destek malzemelerinin, farklı yüzey modifikasyon yöntemleri kullanılarak çeşitli biyomoleküller ile etkileşebilecek ve yüksek seçicilik sergileyecek özelliklere sahip olacak şekilde tasarlandıktan sonra ve kromatografi alanındaki kullanımları dikkat çekicidir.

Doğal bir polimer olan ve yaygın bir kullanım alanına sahip olan kitosanın aşı kopolimerizasyonu ile modifikasyonu sonucunda olumlu özellikler sergileyen yapıların elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bu çalışmada, kitosan membranlara akrilik asit monomerinin aşılması ile modifikasyonu ile membrana katyon değıştirici özelliği kazandırılan iyon değıştirici kitosan-g-pAA destek materyali, bazik bir protein olan sitokrom c proteininin sulu ortamdan adsorpsiyonunda kullanılmak üzere iki basamakta hazırlandı. İlk

aşamada, faz dönüşüm tekniği ile hazırlanan kitosan membranları epiklorohidrin ile çapraz bağlandı. İkinci aşamada ise çapraz bağlı kitosan membran üzerine zayıf anyon değiştirici gruplar taşıyan akrilik asit monomerinin aşırı kopolimerizasyonu amonyum persülfat varlığında gerçekleştirilerek membran yüzeyinde poliakrilik asit iplikçiklerin oluşumu sağlandı. Bu yolla kromatografik alanda kullanılabilecek membran yapıda mekanik dayanımı iyi, biyolojik ve kimyasal parçalanmaya karşı dirençli iyon değiştirici kitosan-g-pAA destek materyali hazırlandı. Modifiye edilerek hazırlanmış membranların optimizasyon ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi.

Serbest radikalik polimerizasyon yöntemi ile çapraz bağlı kitosan membrana akrilik asit aşılama verimi, akrilik asit derişimi, ortam sıcaklığı, başlatıcı derişimi değiştirilerek belirlendi ve sistemin optimizasyonu gerçekleştirildi.

Modifiye edilen kitosan membranların yapısı FT-IR spektroskopisi kullanılarak doğrulandı ve termal kararlılığı ise DSC ile belirlendi. Ayrıca iyon değiştirici membranların fonksiyonel grup analizi, denge su içeriği, yoğunluk tayini yapılarak karakterizasyonu çalışmaları tamamlandı. Yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan iyon değiştirici kitosan-g-pAA membranlarının sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonunda pH, sıcaklık, iyonik şiddet gibi parametrelerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi araştırıldı. Kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranları kullanılarak sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonunda elde edilen deneysel verilerin teorik olarak türetilen Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine ve birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanması ile adsorpsiyon sistemini tanımlayan adsorpsiyon izoterm ve kinetik modeli araştırıldı. İyon değişim kromatografisi alanında sitokrom c adsorpsiyonu uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanan kitosan-g-pAA membranı için termodinamik parametreler belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimerler

Polimerler, çok sayıda aynı veya farklı moleküllerin kimyasal bağlarla, az veya çok düzenli bir biçimde bağlanması sonucu oluşturduğu uzun zincirli ve yüksek molekül kütleli bileşiklerdir. Polimerler *monomer* birimlerinden meydana gelmiştir ve her bir tekrarlanan birim *mer* olarak isimlendirilir. Bu karmaşık yapıdaki yüksek molekül kütleli bileşikler çoğu zaman daha uygun bir sözcük olan *makromoleküller* olarak da isimlendirilir [7].

Monomer adı verilen küçük moleküller uygun koşullarda polimerizasyon tepkimesi sonucu birbirleriyle kimyasal bağ yaparlar ve polimerleri oluştururlar. Tek bir monomer zincirinde binlerce ya da milyonlarca monomer bulunur. Polimer zincirini oluşturan monomerlerin özellikleri ve zincirlerin birbirleriyle olan etkileşimleri polimer malzeme özelliklerinde belirleyici olduğundan yeterli mekanik dayanıma belli bir zincir büyüklüğü üzerine çıkıldığında ulaşılabilmektedir [8].

Polimerler günlük yaşamda yaygın olarak kullanılan plastik, sentetik lif, bazı boyalar ve yapıştırıcılar gibi ürünlerin temel maddesini teşkil etmektedir.

2.2. Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerler yapılarına göre sınıflandırılırsa, polimer zinciri tek bir monomer biriminin tekrarlanmasından oluşuyorsa *homopolimer* eğer iki farklı monomerin birleşmesinden oluşuyorsa *kopolimer* olarak isimlendirilir.

Polimer zincirleri doğrusal olabildiği gibi dallanmış yapıda da olabilir, bu durumda ana zincirden yan dallar ayrılmaktadır. Yan dallar başka bir ana zincire bağlanıyorsa oluşan polimerlere çapraz bağlı polimerler denir ki, günümüzde kullanılan polimerlerin yarıya yakını çapraz bağlı yapıdadır.

Çapraz bağılı polimerler hiçbir çözücünde çözünmezler fakat sıvıları yapılarına alarak şişme özelliği gösterirler. Böylece jel yapısını oluşturular [9].

Polimerler fiziksel durumlarına göre sınıflandırıldığında *amorf*, *kristal*, ya da *yarı kristal* yapıdadırlar. Genelde polimerlerde kristal ve amorf bölgeler bir arada bulunur.

Kristal bölgeler malzemeye sertlik ve kırılganlık verirken amorf bölgeler ise tokluk verir. Dolayısıyla malzemenin kristanilite derecesi mekanik özelliklerinde çok önemlidir. Düzenli yapılar kristal oluşumunu kolaylaştırır. Moleküller arası çekim kuvvetleri de kristaniliteyi arttırmaktadır.

Polimerlerin termal özellikleri onların erime ve camsı geçiş sıcaklıklarıyla tanımlanır. Polimer zincirleri camsı geçiş sıcaklığı T_g 'nin altında donmuş bir yapıda T_g 'nin üzerinde ise kauçuksu durumdadır. Bu sıcaklıkları yan gruplar ya da zincirin sertliği belirlemektedir [9].

2.3. Polimerlerin Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması

Yüksek moleküllü birleşmeler elde edildiği yere göre doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal polimerler, doğada var olan polimerlerdir (Çizelge 2.1). Doğal polimerlerin modifikasyonu ile elde edilen polimerlere ise yarı-sentetik polimerler denir. Sentetik polimerler ise, monomerlerden çeşitli yöntemlerle sentezlenirler.

Doğal polimerin bazıları farklı yapıda değişik birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Biyopolimer olarak isimlendirilen ve yaşamla ilgili birçok önemli faaliyetin yürütülmesinde rol alan proteinler, nükleik asitler ve enzimler doğal polimerlere örnek olarak verilebilir.

Çizelge 2.1. Polimerlerin genel olarak kaynaklarına göre sınıflandırılması

Doğal polimerler	Sentetik polimerler	Yarı-sentetik polimerler
DNA, RNA, Proteinler	Polietilen	Rejenere selüloz ve türevleri
Selüloz ve türevleri	Polipropilen	Modifiye nişasta
Nişasta	Polietilen teraftalat	
Yün, ipek, pamuk	Polistiren	
Doğal kauçuk	Polivinil klorür	

2.3.1. Yapay polimerler

Polianhidritler, poli(α -hidroksiasitler), polikaprolakton, alifatik poliesterler, poli(ortoesterler), polifosfozanlar, poli(hidroksialkanoatlar), poli(iminokarbonatlar) yapay yapıda polimerlere örnek olarak verilebilir.

Yapay polimerlerin bozunma hızı, geçirgenlik ve çözünürlük, morfoloji (kristanilite/amorf yapı), molekül kütlesi gibi yapısal özelliklerinin istenilen şekilde düzenlenebilmesi bu malzemelerin kullanımlarını yaygınlaştırmıştır. Kimyasal bileşim, konfügürasyon, işlenme şekli, molar kütle, polidisperseite, morfoloji (örneğin gözeneklilik), oryantasyon, ilave katkıları ve monomer varlığı polimerin bozunma hızının kinetiğini etkileyen bazı parametreler olarak sıralanabilir. Poliesterlerin biyobozunumu, ester bağlarının hidrolizi sonucunda bir molekül su açığa çıkarak gerçekleşmektedir. Ayrıca alifatik yapıdaki poliesterlerin bir çok kullanım alanı vardır. Eriyik halde işlenebilir özellikte olmaları nedeni ile doku mühendisliği alanında biyomalzeme üretiminde ve medikal cihazların kaplanması, ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanılırlar.

2.3.2. Doğal polimerler

Doğal polimerler farklı yapıdaki değişik birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Polisakkaritler (nişasta, selüloz, kitin/kitosan, pultulan, dekstran, vb.), proteinler (kollajen/jelatin, kazein, ipek, elastin, albumin, fibrinojen, vb.), poliesterler (polihidroksialkonatlar) ve lignin, doğal kauçuk, poliglutamik asit doğal polimerler olup doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Bu polimerler bir döngü içinde doğada yaşamın gereği olarak sürekli üretilmekte ve parçalanmaktadır. Biyolojik kökenli olan doğal polimerler biyo-polimer olarak isimlendirilirler ve yaşamla ilgili birçok faaliyetin yürütülmesinde rol alırlar.

Doğal polimerler ilk olarak hayvan bağırsağı, ipek ve patates nişastasının yara iyileştirilmesinde kullanılmıştır. Doğal polimerlerin enzim varlığında yapılarının bozunması yani biyo-bozunur olması geçici uygulamalarda kullanılan biyo-malzemeler açısından avantaj sağlamaktadır. Bu malzemeler mükemmel biyo-uyumlulukları ve oksijen geçirgenlikleri nedeniyle doku yenilenmesi, biyo-sensörler, ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır [3,4].

Ayrıca doğal polimerlerin biyolojik olarak uyumlu olması, alerjik, toksik veya kanserojenik etki yaratmaması gibi özellikleri bu materyallerin biyo-malzeme alanında kullanımını sağlamaktadır. Ancak elde edildikleri kaynağa bağlı olarak bileşimlerinin değişmesi, yüksek sıcaklıklarda bozunmaları nedeniyle şekillendirilmelerindeki güçlük, çoğu uygulama için fiziksel, mekanik ve kimyasal dayanıklılıklarının yetersiz veya sınırlı olması bu malzemelerin kullanımları sırasında karşılaşılan zorluklar arasındadır.

Bu dezavantajların giderilmesi ve bu tür alanlarda kullanabilmesi için polimer yüzeyinde fiziksel ve kimyasal teknikler ile moleküler seviyede modifikasyonlar yapmak, örneğin yüzeye biyolojik ajanlar bağlamak, protein veya enzim tutturmak veya nano-desenler oluşturarak biyolojik yapının taklidi mümkündür. Bazı biyomalzeme uygulamalarında, kütle özellikleri çok iyi ve istenilen kalitede olmasına rağmen yüzeyin modifiye edilmesi gerekebilir [10].

Yüzey modifikasyonları kimyasal (kaplama, adsorplama, oksitleme, asitleme, vb.), fiziksel (Langmuir-Blodgett film kaplama, kimyasal adsorplama, vb.), radyasyon (plasma-elektriksel boşaltım, corona boşaltım, UV, gamma, lazer veya iyon demeti ile işleme tabii tutma vb.), biyolojik moleküller ile (heparin ile kaplama, lipid bağlama, hyalunarik asit kaplama, protein veya enzim bağlama, vb) reaksiyon tekniklerinden biri veya ikisi kullanılarak yapılabilir. Genellikle *in vivo* uygulamalarda malzeme-biyolojik ortam etkileşimleri birkaç Angstron ile nanometre düzeyinde oluşur [11].

Doğal polimerler sınıfında olan kitin ve kitosan, selüloz ve türevleri, nişasta, amiloz ve amilopektinden oluşan polisakkarit bazlı polimerler çeşitli uygulamalarda kullanılmakta ve yüzey özellikleri değiştirilebilmektedir. Bitki hücre duvarlarının temel yapıtaşı olan selüloz yanık ve yara tedavisinde, selülozdan sonra doğada en çok bulunan kitin ise yara iyileştirilmesinde ve ameliyat ipliklerinin yapımında kullanılmaktadır. Bu polimerlerin kullanım alanları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

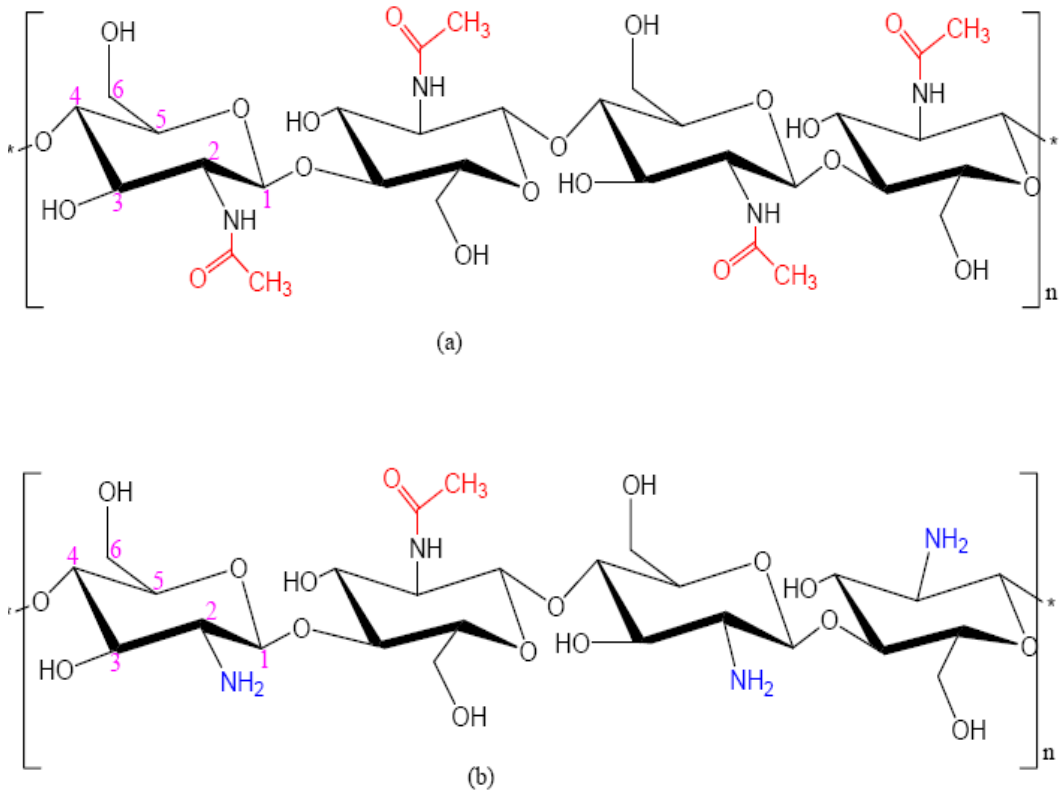
Çizelge 2.2. Farklı geometriye sahip doğal polimerlerin kullanım alanları [12]

Kullanım şekli	Kullanım yeri
Çözelti/ Jel	Kozmetik Kozmetik deri defektlerinde enjekte edilebilir İlaç salım sistemi Biyo-protezlerin kaplanması Üç boyutlu hücre kültürü
Sünger	Hemostatik ajan Üç boyutlu hücre kültürü Yara ve deri örtü materyali İlaç salım sistemi
Küre/ mikroküre	Hücre kültürü içi taşıyıcı İlaç Salı sistemi
İnce içi boş tüp	Hücre kültür matrisi Tübüler doku malzemesi Hücre sinir rejenerasyonu
Membran	Yara örtü materyali Diyaliz membranı Yamalar Kornea koruyucusu Doku rehberli rejenerasyon Bel kemiği cerrahisi
Toz	Kemik dolgu ve onarımı İlaç salım sistemi
Sert yapı	Kemik onarımı

2.4. Kitosan

Doğal bir polimer olan kitin (β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin) yengeç, karides, istakoz gibi eklembacaklıların iskeletlerinin esas maddesi olup bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında da bulunmaktadır. Glikozdaki C-2 karbonundaki hidroksil grubu yerine kitinde asetilamin grubu bulunmaktadır [13].

Kitosan ise kitinin alkali ortamda deasetilasyonu sonucu elde edilen (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunabilen lineer bir polisakkarittir. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları Şekil 2.1’de verilmiştir.

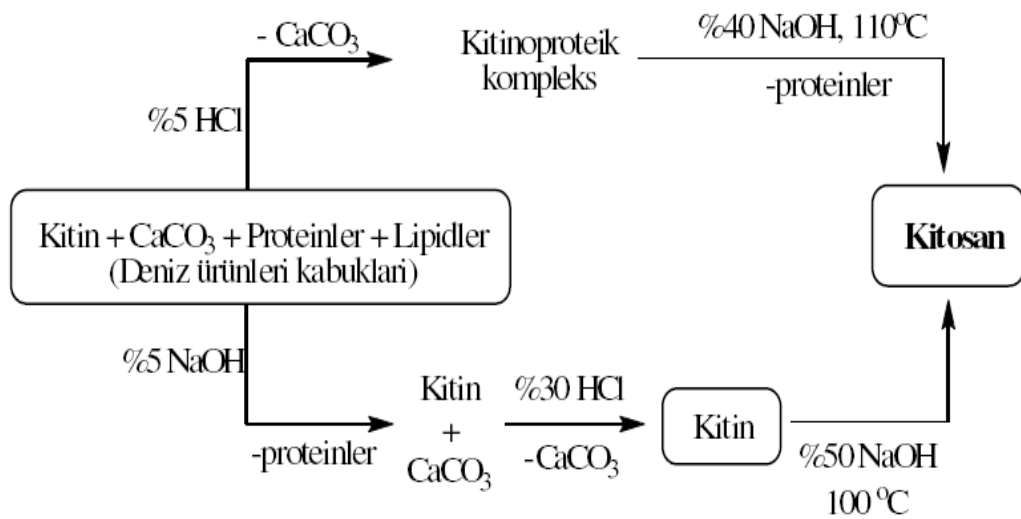


Şekil 2.1. (a) Kitin ve (b) Kitosanın kimyasal yapısı [14]

Kitosanın ortalama molekül kütlesi 3 200 – 2 000 000 g/mol arasındadır. Kitinin aksine kitosan sulu asidik ortamlarda çözünebilir. Kitin ve kitosan türevleri hem tek hücreli canlılarda hem de yüksek organizasyonlu ökaryotik organizmalarda enzimatik olarak yıkıma uğrayabilmektedirler.

Mikroorganizmalardaki kitinaz ve kitozinaz enzimleri ile yüksek organizasyonlu canlılarda lizozomal enzimler kitin ve kitosanı parçalarlar. Bu enzimler kitin ve kitosanı oluşturan birimler arasındaki N-asetil- β -(1-4) glukozamin bağlarını koparır. Kitosanın lizozomal enzimlerin varlığında parçalanabilmesi, biyo-parçalanabilir ve biyoadeziv bir polimer olması toksik ve alerjik özellik göstermemesi, bu polimerlerin farmasötik ve biyo-medikal kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır.

Kitosan C-2 pozisyonunda bulunan $-NH_2$ gruplarının protonlanması sonucu çözünür ve böylece asidik ortamlarda polielektrolit şeklinde bulunur. Kitinin izolasyonu ve kitinden kitosan eldesinin şematik gösterimi Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kitinin izolasyonu ve kitinden kitosan sentezi [14]

Deasetilasyon derecesi, deasetilasyona uğramış N-asetil-D-glukozamin ünitelerinin sayısının toplam ünite sayısına göre miktarını ifade etmektedir. Kitosanın fizikokimyasal özellikleri deasetilasyon derecesi ve molekül kütlesi ile değişmektedir (15). Kitosan örneklerinin karakterize edilebilmesi için kitosanın sahip olduğu asetil gruplarının tayininde potansiyometrik titrasyon, IR, elementel analiz, UV-vis, sıvı faz, ^1H NMR ve katı faz ^{13}C NMR (CP/MAS) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır [16].

Kitosanın molekül kütlesi ve deasetilasyon derecesi, kitinin kaynağına, izolasyon yöntemine, sodyum hidroksit ile işlem görme süresine, derişimine ve işlem sırasındaki sıcaklığa bağlıdır. Kitosan nötral ve alkali pH'da çözünmez, fakat glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi inorganik ve organik asitlerle sulu ortamlarda çözünebilen yapılara dönüşür.

Asidik ortamda ise, çözünmeden sonra polimerin amino grupları protone olarak ve molekül pozitif yüklere sahip olur. Her glukozamin ünitesinde bir yük olduğundan kitosan yüksek yüzey yük yoğunluğuna sahiptir ve negatif yüzeylerle güçlü bir şekilde etkileşebilmektedir. Genel olarak, kitin ve kitosanın çözünürlüğü molekül kütlesinin artmasıyla azalmaktadır. Kitosanın pH 7.0'nin üzerindeki sulu çözeltilerde çözünmemesinin sebebi kararlı kristal yapıda olmasındandır. Bütün bu parametrelerin etkisi altında nötral ortamlarda çözülebilecek olan kitosanın minimum %50 deasetile edilmiş kitinden elde edilmiş olması gerekir. %40 deasetile edilmiş kitinden elde edilen kitosanın ise ancak asidik ortamlarda çözüldüğü bildirilmiştir [16,17,18].

Yüksek molekül kütlesi ve dallanmamış düz yapısı kitosanı asidik ortamlarda mükemmel bir viskozite artırıcı madde olarak kullanımını sağlamaktadır. Kitosan çözeltisinin, derişimi ve asetilasyon derecesi arttıkça veya ortam sıcaklığı azaltıldıkça viskozitesi artmaktadır. Ayrıca kitosan çözeltisinin hazırlandığı asitin çeşidine bağlı olarak da viskozitesi değişiklik göstermektedir [19].

Doğal bir polimer olan kitosandan farklı sistemlerde kullanılmak üzere jel, film sünger, tablet, mikropartiküler sistem (mikroküre, mikroboncuk vb.) ve nano boyutta küreler hazırlanabilmektedir.

2.4.1. Kitosanın kullanım alanları

Kitosan ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında, kozmetik alanda saç, deri ve diş bakım ürünlerinde, tıp ve dişçilik alanında yapay deri, cerrahi iplik, kontak lens, diş dolgu maddesi olarak; biyoteknoloji alanında, enzim, canlı hücre tutuklanması gibi alanlarda kullanılmaktadır. Gıda ve tarım sanayinde bakteri ve küf gelişimi önleyici antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca kitosan katkı maddesi olarak, içeceklerin ve meyvelerin asitlendirilmesi, doğal tatlandırıcıların arıtılması, renk sabitleştiricisi, emülsiyeye edici, kalınlaştırıcı ve stabilize edici madde olarak da kullanılmaktadır. Kitosan, sulu ortamdan metal iyonlarının, pestisitlerin, fenollerin ve PCB'lerin geri alınması ve/veya renklendiricilerin uzaklaştırılması işlemleri ile suyun saflaştırılması işleminde kullanılmasının yanında enzim tutuklanmasında, enzim veya proteinlerin saflaştırılması işlemlerinde adsorbent olarak kullanılmıştır [20].

Kitosanın işlemsel zorlukları nedeni ile uygulamada karşılaşılan zorluklar araştırmacıları mekanik olarak daha dayanımlı olan kitosanın kompozit yapılarının sentezlenmesine doğru yönlendirmiştir. Kitosan zincirleri üzerindeki amino ($-NH_2$) ve hidroksil ($-OH$) grupları, sırasıyla elektrostatik veya nükleofilik bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu iki fonksiyonel grup ayrıca destek materyaline istenilen özellikleri kazandırmak için aktivasyon ve/veya modifikasyon işlemlerine olanak sağlamaktadır. Kitosanın farklı monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak modifikasyonu pratik kullanımlarda fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi için uygun ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır [21].

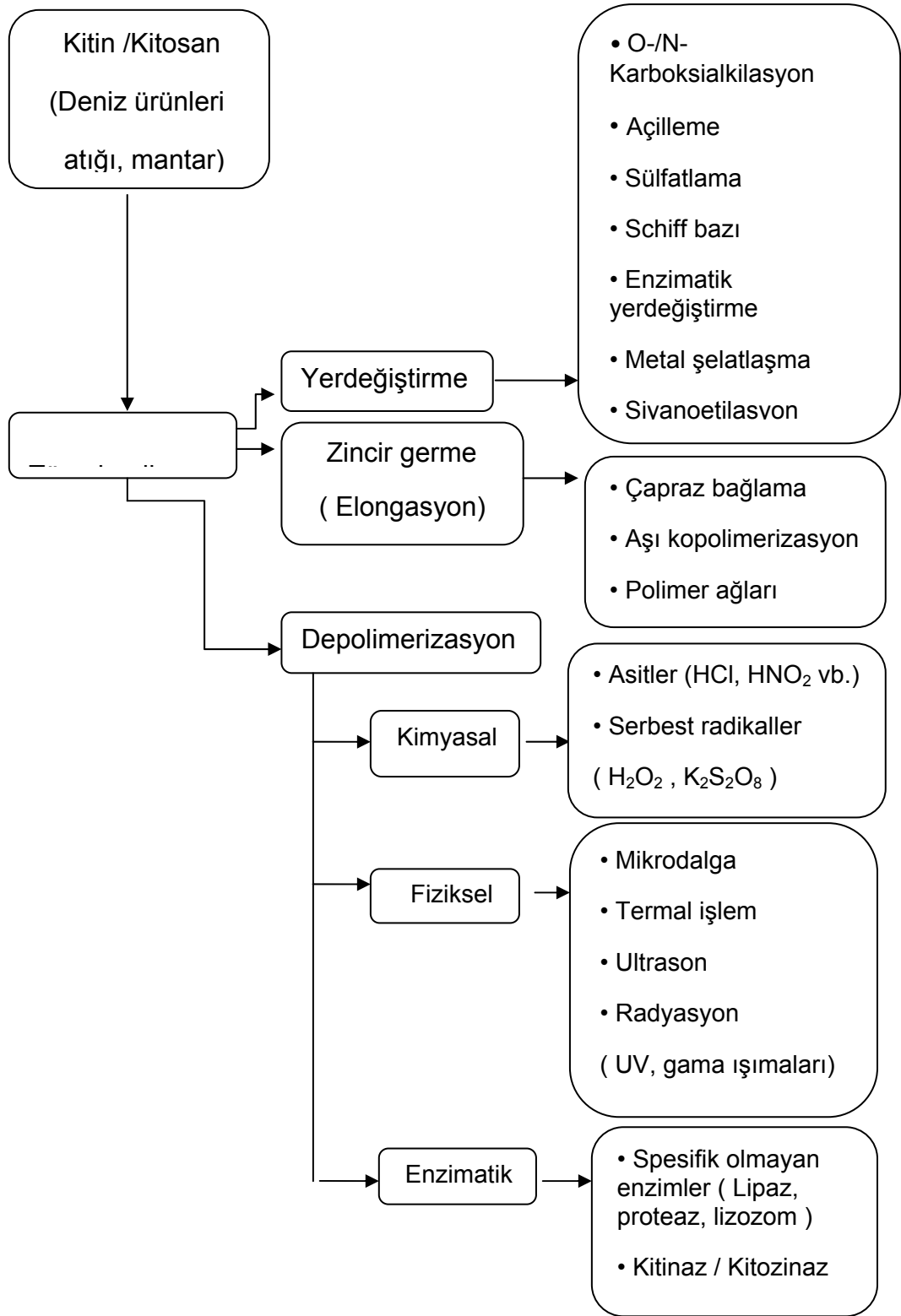
2.5. Modifikasyon

Modifikasyon, herhangi bir materyalde meydana gelen değişiklik olarak tanımlanır. Yüzey modifikasyonu, materyallerin temel özelliklerini değiştirmeden, çevre ile yüzey etkileşimini optimize etmek amacıyla yüzeylerinde kimyasal ya da fiziksel değişimlerin meydana gelmesini sağlamaktadır. Kimyasal, fizikokimyasal ve biyokimyasal olarak sınıflandırılan modifikasyon yöntemleri sayesinde, materyallerin direnci artırılarak istenilen özellikler kazandırılabilir.

2.5.1. Kitin ve kitosanın kimyasal modifikasyonu

Kitin ve kitosanı tasarlanan uygulamalara karşı uygun modifikasyon yöntemini belirlemek gereklidir. Çünkü modifikasyon yolu ile bu biyo-makromoleküllerin yeni kullanım alanlarının yolları açılmaktadır. Kitinin çözünür olmaması nedeniyle kimyasal modifikasyonu çeşitli problemleri de beraberinde getirmektedir. Örneğin; seçici yer değiştirme zorluğu, reaksiyonun zayıflık derecesi, ürünlerin elastik yapısı ve kısmi bozunma şeklinde sıralandırılabilir. Bu nedenle ileri fonksiyonlarının gelişimi dikkate alınarak kitosanın modifikasyonu kitinden daha çok dikkat çekmiştir [22].

Kitin ve kitosanın çeşitli yöntemlerle türevlendirme işlemleri şekilde ayrıntılı olarak verilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kitosanın olası türevlendirme işlemleri [23].

Mümkün olan modifikasyonlar içinde aşı kopolimerizasyon yöntemi doğal ve sentetik kökenli polimerlerin ileri fonksiyonlarının gelişmesi açısından oldukça önemli bir konuma sahiptir ve uygulama alanları için ümit verici görülmektedir [23].

2.5.2. Aşı kopolimerizasyonu

Aşı kopolimerizasyonunda, kimyasal yapıları farklı iki polimer zinciri, ana zincir dışında başka bir reaktif bölgeden bağlanarak elde edilirler. Aşı kopolimerleri, çapraz bağ vermeye yatkın polimerlerin bir monomer yanında iyonlaştırıcı ışınlarla polimerizasyonu, radikal katılma polimerizasyonu veya katyonik polimerizasyon yöntemleri ile sentezlemek olasıdır. Aşı kopolimerin sentezinde en çok kullanılan başlatıcı sistemleri amonyum persülfat (APS), potasyum persülfat (PPS), seryum amonyum nitrat (CAN), tiyokarbonasyon potasyum bromat (TCPB), potasyum diperyodatokuprat (PDC), 2,2-azobisisobütiro nitril (AIBN) ve demir amonyum sülfat (FAS) olarak sıralanabilir [24].

Aşı kopolimerizasyon, sentetik polimerlerin çok çeşitli moleküler tasarımlarına olanak sağlamakla birlikte doğal ve sentetik polisakkaritleri uygun hale getirerek melez materyallerin elde edilmesi mümkündür.

Aşılama ile yüzey modifikasyonu sonucunda istenilen özelliklere sahip olması aşılama yüzdesi ve aşılama verimini belirleyen aşılama süresi, reaksiyon sıcaklığı, monomer derişimi, başlatıcı derişimi gibi parametrelere fazlasıyla bağlıdır. Meydana gelen aşı kopolimerin özellikleri yan zincirlerin karakteristiklikleri ile geniş ölçüde kontrol edilebilir. Bugüne kadar araştırmacılar tarafından aşılansmış kitosan polimerlerinin özellikleri, aşılama parametreleri ve bu değişkenlerin etkileri üzerine bir çok çalışma yapılmıştır [23].

Yaygın bir kullanım alanına sahip olan kitosanın aşı kopolimerizasyonu ile modifikasyonu sonucunda olumlu özellikler sergileyen yapıların elde edilmesi mümkün olmuştur [25].

Kitosan üzerine aşılama yapılmış kopolimerlerin çeşitleri Çizelge 2.3'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kopolimer aşıllı kitosan çeşitleri [23]

Çeşit	Başlatıcı	Aşılanan monomer
Radikalik indükleme	Ce^{4+} , $K_2S_2O_8$, Fentom raektifi, Tributil boran	Akrilonitril, N-izopropil akrilamit, metilmetakrilat, vinil monomerler
Radyasyon indükleme	γ -ray, ^{60}C	Stiren, 2-hidroksi etilmetakrilat,
Mikrodalga ışınlama		Poliakrilamit
Üzerine aşılama metodu	Çeşitli hızlandırıcılar	Polietilen glikol, telechelic polimerler

2.5.3. Kitosan polimeri üzerine akrilat ve vinil kökenli monomerlerinin aşılınması

Polisakkaritler üzerine akrilik ve vinil kökenli sentetik monomerlerin aşılınması çok sayıda araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Örneğin Prashanth aşılı kopolimerler sentezi için önce polimer zincirleri üzerinde serbest radikaller oluşturmuş ve sonrasında da bu radikalleri bir diğer vinil monomerlerinin polimer zincirlerine aşılınması için makroradikaller olarak çalıştığını belirtmiştir (Şekil 2.4).

Dos Santos ve arkadaşları aşı kopolimerizasyon ile kitosan membranlar üzerine 2- hidroksietil metakrilat ve akrilik asit aşılamışlardır. Bu çalışmada, kitosan kullanılmasının başlıca nedeni, bakteriyal enfeksiyonların önlenmesinde ve iyileşme sürecinin hızlandırılmasında etkili bir rol oynamasıdır. Kitosana akrilik asit aşılama ile biyouyumlu ve antibakteriyal özellik kazandırılmış, karboksil gruplarından dolayı yüksek kapasiteli bir absorbent haline getirildiği rapor edilmiştir. Böylece akrilik asit monomerinin aşılama ile ilaç salım sistemleri için önemli bir matriks ve su içeriğinin yüksek olmasından dolayı da yara pansumanı için kullanılma potansiyeli yüksek hidrofillik özellik gösteren yeni bir materyal sentezlenmiştir [25].

Yapılan bir başka çalışmada, kitosan aşı kopolimerizasyonu ile modifiye edilerek yüzeyinde poli(akrilik asit) zincirleri oluşturulmuştur. Kitosan polimer zincirlerinin üzerine akrilik asit monomeri homojen fazda aşılanmış ve hidrofilik yapıda nanopartiküller elde edilmiştir. Bu nano-partiküller küçük boyutta olup elde edilmeleri sırasında yüksek sıcaklık, organik çözücü, yüzey aktif madde kullanılmamıştır [27].

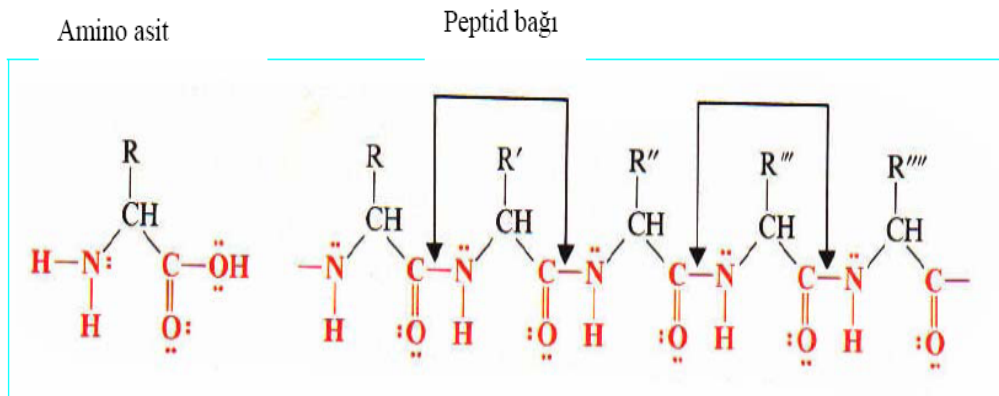
Kitosan üzerine vinil monomerlerinin aşı kopolimerizasyonunun başlatılması için seryum amonyum nitrat (CAN) ve Fentom başlatıcısının en önemli başlatıcı sistemleri olduğu rapor edilmiştir. Seryum dört değerlikli halde bulunan çok amaçlı oksitleyici bir reaktiftir ve çoğunlukla vinil monomerlerinin aşı kopolimerizasyonunda kullanılır. Ayrıca kitosan üzerine vinil monomerleri AIBN başlatıcı varlığında da çalışılmış ve akrilonitril ve vinil asetat monomerlerinin kitosan polimer zincirlerinin üzerine aşılama yüzdesinin düşük bulunduğu rapor edilmiştir [28].

Guogi Fu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma ise kitosan boncukları poli(akrilik asit) ile aşılama ile modifiye edilmiş ve reaksiyon koşullarının etkileri (aşılama derecesi, verimi vb.) incelenmiştir. Poli(akrilik asit) ile aşılama kitosan boncuklar, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) taşıması işleminde destek materyali olarak kullanılmış ve in vitro adsorpsiyon testleri

ile modifiye kitosan boncuklarının lipoprotein adsorpsiyon performansı incelenerek gerçekleştirilmiştir [29].

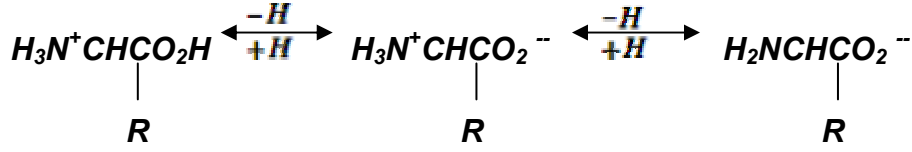
2.6. Proteinler

Protein molekülleri kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak peptid bağı oluşturan amino asit grupları içeren uzun zincirlerden oluşurlar (Şekil 2.5). Bir protein, polipeptid zincirindeki peptid bağları ve yan grupları arasındaki kovalent olmayan etkileşimler ile dengede tutulur. Bu kovalent olmayan etkileşimler hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve elektrostatik etkileşimlerdir [30].



Şekil 2.5. Proteinlerdeki polipeptid zincirinin yapısı

Proteinler monomerleri olan amino asitler gibi izoelektrik noktaya (pI) sahiptirler. bu noktada çift tuz özelliğine sahiptirler ve net yükleri sıfırdır. İzoelektrik noktanın üzerindeki pH değerlerinde negatif (anyon formu), altındaki pH değerlerinde ise pozitif (katyon formu) yük değerlerine sahiptirler (Şekil 2.6). Proteinlerin polipeptit zinciri, protein konformasyonu olarak adlandırılan, spesifik üç boyutlu yapıdadır.



pH < pI (katyon formu) pH = pI (dipolar iyon) pH > pI (anyon formu)

Şekil 2.6. Proteinlerin pH'a bağlı olarak farklı iyonlaşma durumları

Günümüzde ilaç, gıda ve tekstil sanayisi ve bunlara bağlı diğer kollarda protein saflaştırılması son yıllardaki en popüler çalışma alanlarından biridir. Protein saflaştırılması beraberinde birçok spesifik problem getirmektedir (otoliz, denatürasyon, aktivite kaybı gibi). Çalışmalardaki temel hedef saflaştırılacak moleküle en uygun metotları seçerek ideal bir yöntem geliştirmektir [31,32].

2.7. Protein Saflaştırma Teknikleri

Hedef bir molekülün biyolojik sıvı karışımlardan ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde i) afinite, hidrofobik etkileşim, iyon değişim, jel filtrasyon ve kapiler elektrokromatografisi gibi kromatografik yöntemler, ii) elektroforez ve izoelektrik odaklama gibi elektroforetik yöntemler ve iii) Densiti gradient (zonal), diferansiyel santrifügasyon ve diyaliz ve ultrafiltrasyon tekniklerini içeren santrifügasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede nitel ve nicel analizlerin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz adı verilir. Hareketli fazın içerisinde bulunan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için birbirinden ayrılmış durumda sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun biçimde

ölçülür. Kromatografi günümüzde son derece duyarlı ve etkili bir ayırma yöntemi olarak kabul edilmektedir.

Kromatografik ayırım işlemlerinde temel olarak proteinin fiziksel özelliklerine bağlı olarak ortamdaki diğer proteinlerden ve yabancı maddelerden ayırt edilmesi amaçlanır [33]. Çoklu bir karışımdan hedef molekülün ayrıştırılmasında, kullanılan destek materyali (sabit faz) ile karışımdaki bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir (Çizelge 2.4). Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir.

Çizelge 2.4. Hareketli ve sabit fazın yapısı ayırma prensipleri dikkate alınarak kromatografik tekniklerin sınıflandırılması [34]

Teknik	Dayandığı özellik	Kapasite	Verim	Maliyet
İyon-değişim kromatografisi	Yük	Orta	Orta	Orta
Hidrofobik etkileşim kromatografisi	Hidrofobisite	Orta	Orta	Orta
Jel-geçirgenlik kromatografisi	Molekül boyutu	Çok düşük	Yüksek	Orta
Ligand-afinite kromatografisi	Biyoaktivite	Orta-düşük	Düşük	Yüksek
Biyoafinite kromatografisi	Biyoafinite	Yüksek	Değişebilir	Yüksek
Kromatofokuslama (odaklama)	Yük/pl	Düşük	Orta	Yüksek

2.7.1. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisinin temel prensibini, özgün tanıma yeteneğine sahip olan bir molekülün (ligand yada bağlayıcı) uygun, çözünmeyen, genellikle polimerik bir destek materyalinin (matriks) üzerine tutuklanması oluşturmaktadır. Hedef molekülün ayrılması uygun şartlar altında seçici olarak matriks üzerine tutuklanmış ligand ile kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile ayrıştırılır.

Afinite kromatografisi, kullanılan ligandların hedef moleküle girdiği etkileşime göre, hidrofobik kromatografi, kovalent kromatografi, tutuklanmış metal şelat kromatografisi gibi gruplara ayrılır. 1975' de Porath ve arkadaşları tarafından protein saflaştırılmasında immobilize metal iyon afinite kromatografisi (IMAK) olarak adlandırılan yeni bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Immobilize metal iyonu ile biyomoleküller yüzeyinde yer alan histidin, sistein ve triptofan gibi amino asitler arasındaki seçici etkileşimlerden dolayı, hedef moleküllerin ayrımında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [35,36].

2.7.2. İyon değişim kromatografisi

Biyolojik molekülleri birbirinden ayırmanın kesin yöntemlerinden biri olan iyon değişim kromatografisi biyomolekülleri, onların anyonik ve katyonik yük karakteristiklerindeki farka dayanarak ayırır.

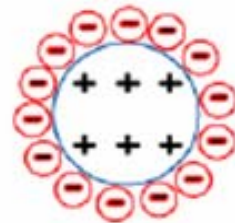
İyon değişim kromatografisi, bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, içinde bulunduğu çözelti içindeki aynı yük karakteristiğinde yüklü diğer iyonlarla bir dengeye göre değiştirilmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddelere iyon değiştiriciler denir. İyon değiştiriciler içinde ve yüzeyde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan doğal ve/veya sentetik polimerik materyal (matriks) ve hareketli karşı iyonlar olmak üzere temel olarak iki bileşenden oluşur. Karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki

başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirilebilirler [37].

İyon değiştirici destek materyalinin pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlandığında karşı iyonlar negatif yüke sahip iyonlardır ve bu tür iyon değiştiriciler *anyon değiştiriciler* olarak isimlendirilir. Destek materyalinin negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanması durumunda ise karşı iyonlar pozitif yüke sahip iyonlardır ve bu tür iyon değiştiriciler *kasyon değiştiriciler* adını alırlar (Şekil 2.7).



(a)



(b)

Şekil 2.7. İyon değiştiriciler (a) Kasyon değiştirici (b) Anyon değiştirici

İyon değiştirici olarak kullanılan destek materyali polisakkaritler, alüminyum silikatlar gibi doğal materyaller veya sentetik reçineler olabilir. İlk kullanılan iyon değiştiriciler sentetik reçineler olup suyun demineralizasyonunu ve su kalitesini düzeltmede ve atıklardan iyonların kazanılmasında kullanılmıştır. Bu tür iyon değiştiriciler yüksek derece yüklü gruplarla kovalent olarak bağlanmış hidrofobik polimer maddeleri olup biyolojik maddelerin saflaştırılmasında uygun değildir. Çünkü yüksek yük yoğunluğu ve polimerlerin hidrofobik oluşu biyolojik maddelerin denatüre olmalarına sebep olur.

Biyolojik maddelerin ayrımında ilk kullanılan iyon değiştiriciler Petersen ve Sober (1956), tarafından geliştirilen selüloz iyon değiştiricilerdir. Hidrofobik

yapısı sebebiyle selülozun proteinleri denatüre etme eğilimi düşüktür. Pharmacia Fine Chemicals firması tarafından geliştirilen modifiye dekstran olan 'Sephadex', çapraz bağlı agaroz olan 'Sepharose' ve epiklorohidrin ile çapraz bağlanarak kuvvetlendirilmiş selüloz olan 'Sephacel' iyon değiştiricileri, küresel tanecikli ve gözenekli ilk iyon değiştiricileridir.

Günümüzde kullanılmakta olan çok farklı destek maddeleri vardır ancak proteinlerin fraksiyonlarına ayrılması için yaygın olarak kullanılan destek maddesi selüloz ve türevleridir [38]. Yaygın olarak kullanılan iyon değiştiricilerin pH kullanım aralıkları ve zayıf veya kuvvetli iyon değiştirici türleri Çizelge 2.5 'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Yaygın olarak kullanılan iyon değıştirciler [34]

İyonik grup	pH Kullanım Aralığı	Destek materyali
Anyon değıştircileri		
Zayıf Anyon Değıştircisi Dietilamin (DEAE) Fonksiyonel grup; $-O-CH_2CH_2N^+-(C_2H_5)_2 Cl^-$ Karşı iyon; Cl^-	2-9	Dekstran Agaroza Bilyeleştirilmiş selüloz Lifli selüloz Mikrogranüler selüloz
Kuvvetli Anyon Değıştircisi Kuaterner aminoetil (QEA) Fonksiyonel grup; $-O-CH_2CH_2N^+-$ $(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3Cl^-$ Karşı iyon; Cl^-	2-10	Dekstran Lifli selüloz
Kasyon Değıştircileri		
Zayıf Kasyon Değıştircisi Karboksimetil (CM) Fonksiyonel grup; $-O-CH_2COO^- Na^+$ Karşı iyon; Na^+		Dekstran Agaroza Lifli selüloz Mikrogranüler selüloz
Kuvvetli Kasyon Değıştircisi Sülfopropil (SP) Fonksiyonel grup; $-O-CH_2CH_2CH_2SO_3^- Na^+$		Dekstran Mikrogranüler selüloz

2.7.3. Proteinlerin iyon değişim kromatografisi ile ilgili uygulamaları

İyon değişim kromatografisi ile ayırma işlemi temel olarak sulu ortamdan hedef molekülün iyon değiştirici üzerine adsorpsiyonu ve adsorbe edilen örnek bileşenlerinin iyon değiştirici destek materyalinden elüsyonu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır [38].

Amfoterik maddeler olan proteinlerin net yüzey yükleri değişkendir. Düşük pH'larda pozitif, yüksek pH'larda negatif yüklü ve izoelektrik noktada (pI) ise net yükü sıfırdır. Proteinlerde etkileşime giren yük grupları başlıca karboksil, amino veya tersiyer amino gruplarıdır. Proteinler iyon değiştiricilere zıt yüklü gruplar arasındaki iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanırlar. Baęlanan proteinler ya tampon çözeltisinin iyonik gücü kademeli artırılarak yada tampon çözeltisinin pH'ı değiştirilerek protein yüzeyindeki etkileşen grupların yükü yok edilerek kolondan ayrı ayrı elüe edilirler. Bütün bu işlemler esnasında iyonik değiştiricilerin yükü sabit kalacak şekilde bir pH sečilmelidir çünkü tersi durumda bütün proteinler kolondan ayrılmadan birlikte elüe olurlar. Baęlanma gücü hem proteinin izoelektrik noktasıyla (pI) hem de toplam yüzey yükü ile bağlantılıdır. Dolayısıyla aynı izoelektrik noktasına sahip iki protein denge izoelektrik odaklama ile ayrılamazken iyon-değişim kromatografisiyle ayrılabilirler [38].

Kromatografik ayırımlarda iyon değiştirici olarak kullanılan ve destek materyali veya adsorbent olarak da adlandırılan katı destek materyalleri elektrostatik, hidrofobik etkileşimler gibi spesifik olmayan etkileşimleri minimuma indirir ve genellikle doğal veya sentetik polimerik temelli olan bu materyaller küresel partiküller, membranlar veya fiberler şeklinde hazırlanabilmektedir.

İyon değiştirici materyallerle ilgili literatürde yer alan bir çalışmada, glisidilmetakrilat (GMA) ve metilmetakrilat (MMA) monomeri kullanılarak süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile süper manyetik özelliğe sahip

p(GMA-MMA) küreleri hazırlanmış ve yüzeyi aşılama yöntemi ile modifiye edilmiştir. Böylece yüzeyde protein saflaştırılması işleminde kullanılmak üzere nanoiplikçikler oluşturulmuştur. Bu nano-iplikçikler sayesinde de tripsinin immobilizasyonu sağlanmıştır [39].

Yapılan bir başka çalışmada ise yine nano iplikçikler oluşturulmuş membran yüzeyine poliakrilik asit aşılanmış ve membrana katyon değiştirici özelliği kazandırılarak bazik bir protein olan tripsinin etkin bir şekilde ayrıştırıldığı rapor edilmiştir [40].

2.8. Adsorpsiyon

Maddenin iç kısmına geçen molekülleri belirten absorpsiyon teriminden farklı olarak adsorpsiyon terimi, yüzeye tutunan molekülü belirtmek için kullanılır. Gaz, buhar ya da sıvı fazında veya herhangi bir çözeltide bulunan çözünmüş maddelere ait molekül, atom ya da iyonların katı bir maddenin yüzeyinde tutunması olayına *adsorpsiyon*, tutulan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına *desorpsiyon*, gözenekli katı yapıya *adsorplayıcı* adı verilmektedir [41].

Adsorplayıcı ile etkileşen moleküller adsorbent yüzeyine zayıf veya kuvvetli bir şekilde tutunabilir. Bu durumda fiziksel ve kimyasal adsorpsiyondan söz edilebilir. Fiziksel adsorpsiyonda atom, molekül ya da iyon şeklinde olan adsorplanan tanecikler ile katı yüzey arasında uzun mesafeli fakat zayıf olan van der Waals türü çekim kuvvetleri etkindir. Kimyasal adsorpsiyonda ise tanecikler ve yüzey arasında bir kimyasal bağ ve genellikle kovalent bağ oluşmaktadır. Kimyasal adsorpsiyon tek tabakalı yani monomoleküler olabildiği halde, fiziksel adsorpsiyon tek tabakalı ya da çok tabakalı olabilmektedir. Ayrıca çoğu fiziksel adsorpsiyonlar tersinir olarak yürütülebildiği halde kimyasal adsorpsiyonlar yürütülemez [41,42].

Fiziksel adsorpsiyon düşük sıcaklıklarda herhangi bir adsorplayıcı - adsorplanan ikilisine bağlı olarak meydana gelebilir. Kimyasal adsorpsiyon

ikili sistemin türüne ve ikili arasındaki özel bir kimyasal ilgiye bağlıdır. Fiziksel adsorpsiyon oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşirken, kimyasal adsorpsiyonun hızı, aktiflenme enerjisine bağlıdır [41,42].

2.9. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Bir arayüzey olayı olan ve bir çok parametreye bağlı olan adsorpsiyon olaylarındaki davranışlar adsorpsiyon izotermi olarak adlandırılan eşitliklerle ifade edilmektedir. Sabit sıcaklıkta adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı ile denge basıncı veya konsantrasyonla yüzey örtülmesi değişimi *adsorpsiyon izotermi* olarak adlandırılır [41,42].

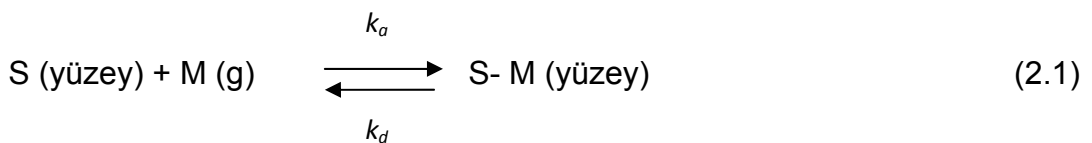
Denel yoldan belirlenen adsorpsiyon izotermi ve diğer adsorpsiyon verilerini değerlendirebilmek için çok sayıda denklem türetilmiştir. Adsorplanan ve adsorplayıcı maddelerin özelliklerine göre bir adsorpsiyon bu eşitliklerden biri ya da birkaçına uygun olmaktadır.

Çözeltiden adsorpsiyonla elde edilen deneysel verileri yorumlamak için sıklıkla kullanılan izotermi Freundlich ve Langmuir izoterm modelleridir.

2.9.1. Langmuir adsorpsiyon izotermi

Yüzey kimyasındaki çalışmalarından dolayı 1932 yılında Nobel Ödülünü alan Amerikalı bilim adamı Irving Langmuir (1881-1951) tarafından 1916 yılında kimyasal adsorpsiyon için çok basit bir izoterm denklemi türetilmiştir.

Çözeltideki moleküllerin dinamik dengede olduğu farz edilirse aşağıdaki reaksiyon yazılabilir:



Burada k_a ve k_d , sırasıyla adsorpsiyon ve desorpsiyon için hız sabitleridir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları birbirine eşitlenerek Langmuir denkleminde geçilebilmektedir.

Langmuir izoterm teorisi, homojen bir adsorplayıcı üzerinde tek tabakalı bir kaplanma gerçekleştiğini, varsaymaktadır. Langmuir modeli, eşit erişilebilir adsorpsiyon yerleri, tek tabakalı yüzey kaplaması ve adsorplanan türler arasında etkileşimin olmadığı gibi homojenite varsayımına dayanır.

$$q_{den} = q_m C_{den} / (K_d + C_{den}) \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte, q_m , sorbentin maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g); C_{den} , sulu çözeltideki proteinin denge derişimini (mg/ml); q_{den} , sorbentin dengedeki adsorpsiyon kapasitesini (mg/ml); ve K_d ($K_d = k_2 / k_1$) ise sistemin ayrışma sabitini (mg/ml) göstermektedir [43].

2.9.2. Freundlich adsorpsiyon izotermi

Heterojen adsorpsiyonlar için, Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich (1880-1941) tarafından Langmuir İzoterm modelinden türetilen Freundlich adsorpsiyon modeli kullanılır.

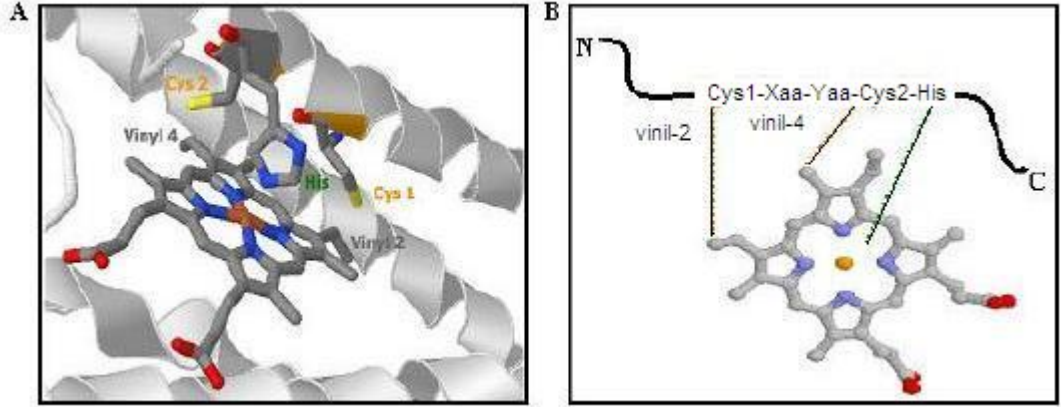
$$q_{den} = K_F (C_{den})^n \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte, K_F ve n , sistem karakteristiği olan Freundlich sabitleridir. K_F , adsorpsiyon kapasite parametresi; n , adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren üssel parametrelerdir.

2.10. Sitokrom C

Mitokondri solunum zinciri birçok sitokrom içerir. Sitokromlar elektron taşıyan proteinler olup, hemoglobinin heme halkasına benzer şekilde porfirin halkasına bağlı demir atomu içerir. Sitokromlardaki demir atomları Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye geri dönüşümlü olarak değiştirebilen tek elektron taşıyıcılarıdır. Sitokrom c, mitokondriden kolayca ayrılabilen küçük bir proteindir. Diğer sitokromlar a, a_3 , c_1 ve b ise mitokondrinin iç zarına yerleşmiştir.

Sitokrom c mitokondri iç zarından kolaylıkla izole edilebilen tek elektron taşıyıcı proteindir ve suda çözünbilmesi saflaştırılması ile kristalizasyonu kolaylaştırır. Bu sebeple sitokrom c yapısı diğer elektron taşıyıcı proteinlerden çok daha iyi bilinmektedir. Sitokrom c yarıçapı yaklaşık olarak 34 Å olan kabaca küresel bir proteindir. C-tipi sitokromlar, apoproteinin korunmuş (-Cys-Xaa-Yaa-Cys-His-) modifinde yer alan sistein (Cys) amino asidine kovalent olarak bağlı bir veya daha fazla hem grubu (protohem IX) içeren proteinlerdir (Şekil 2.8). Sitokrom c yapısı içindeki hem grubu hidrofobik yan zincirler tarafından sıkıca sarılmıştır. Hem grubunun çevresindeki bu hidrofobik karakter sitokrom c'nin indirgenme potansiyelini aynı heme grubunun sulu çözelti içindeki indirgenme potansiyelinden daha pozitif yapar.



Şekil 2.8. Sitokrom c yapısı [Hem kofaktörünün (demir protoporfirin IX) apositokromdaki korunmuş hem bağlanma modifitine (-Cys-Xaa-Yaa-Cys-His-) kovalent olarak bağlanması]. Hem molekülünün vinil yan zincirleri ile apositokromdaki sistein (Cys) amino asitleri arasındaki tiyoester bağları kovalent ve stereo-özgündür. Histidin (His) amino asiti, hem molekülüne bağlanır (A) ve (B). Hem molekülünde demir, kavuniçi; pirol nitrojen halkası ise mavi renkte gösterilmiştir [44]

Sitokrom c molekülü çok az α –sarmal yapıya sahiptir ve β –tabakalı yapı içermez. Esas olarak polipeptit zincir heme grubu etrafında katlanmıştır.

Sitokrom c daha öncede değinildiği üzere elektron transferinde rol alan bir proteindir ve sitokrom redüktaz kompleksinden sitokrom oksidaz’a elektron taşır. Sitokrom c bu elektron transferini üzerindeki yüklü kalıntılar sayesinde gerçekleştirir. Sitokrom c yüzeyi pozitif yüklü gruplara sahiptir ve sitokrom redüktaz ve oksidazın ise negatif yüklü gruplara sahiptir. Böylece elektrostatik etkileşim sayesinde sitokrom c elektron transferini gerçekleştirir.

2.10.1. Literatürde sitokrom c adsorpsiyonu üzerine yapılan çalışmalar

Farklı polimerik destek materyallerinin sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu ile ilgili literatürde çalışmalar rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, poli(etilenglikoldimetakrilat-metakrilamindohistisin) bazlı manyetik özellikte polimerik bir malzeme sentezlenmiş ve bakır şelat

üzerinden sitokrom c'nin saflaştırılması amaçlanmıştır. Manyetik özellikteki poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin sitokrom c adsorpsiyonu pH 8,0'da 51 mg/g olarak bulunmuş ve sitokrom c'nin adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla azaldığı gözlemlenmiştir [45].

Yapılan diğer bir çalışmada, sitokrom c saflaştırılması için metal şelat oluşturuca ligand olarak poli(etilen imin) içeren manyetik poli(hidroksietil metakrilat) küreler hazırlanmıştır. Poli(hidroksietil metakrilat) yapısındaki ester grupları NaH varlığında poli(etilen imin) ile reaksiyona sokularak imin gruplarına dönüştürülmüş ve sulu çözeltiden immobilize metal affinite sorbentine sitokrom c adsorpsiyonu farklı koşullarda incelenmiştir [46].

Bayramoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, glisidil metakrilat (GMA) ve metil metakrilat (MMA) monomerleri ile çapraz bağlayıcı varlığında süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile manyetik özellikte polimerik bir malzeme sentezlenmiş, pH, iyonik şiddet ve sıcaklık koşulları değiştirilerek sitokrom c'nin adsorpsiyonuna değiştirilen bu koşulların etkileri incelenmiştir [47].

Deere ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, mezogözenekli silika (MPS) materyalleri (MCM-41, CNS) kullanılmış ve sitokrom c' nin bu MPS materyalleri üzerine adsorpsiyonu sağlanmıştır. CNS (siyano modifiyeli silikat) yapısının en büyük gözenek yapısına sahip olduğundan sitokrom c 'nin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 10,2 $\mu\text{mol/g}$ silikat olarak bulunmuştur. MCM-41 materyalinin ise daha küçük bir gözenek yapısı olduğundan dolayı maksimum sitokrom c adsorpsiyonu 1,7 $\mu\text{mol/g}$ silikat olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak bir protein - gözenekli silikat sisteminde sitokrom c kolayca adsorbe olabilmekte ve gözenek boyutunun büyüklüğü adsorbe olan protein miktarında önemli bir rol oynamaktadır [48].

Xiaogin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, sitokrom c adsorpsiyonu, modifiye edilmiş altın elektrot - altın nanotanecek üzerinde

dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve kronopotansimetri kullanılarak çalışılmıştır. Adsorbe olan ortamdaki sitokrom c miktarının yük transfer direnci ile direk olarak orantılı olduğu ve sitokrom c 'nin modifiye edilmiş elektrot yüzeyi ile yüksek bir afinite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Sitokrom c adsorpsiyonunun Gibbs enerjisi -626,63 kJ/mol olarak bulunmuş ve bulunan bu değerin yüksek bir negatif değer sonucu adsorpsiyonun kendiğinden gerçekleştiğini ve adsorpsiyonu büyük bir pozitif entropinin yürüttüğünü rapor etmişlerdir [49].

Yapılan diğer bir çalışmada, kitosan, altın nanotanecek, L-sistein, sitokrom c ve ssDNA yapılarının çok tabakalı modifiyesi ile yeni bir DNA biosensörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu biosensörün davranışlarını voltametri, impedans spektrum, AFM ile araştırmışlar ve DNA biosensörün her bir tabakası arasındaki morfolojik farklılıkları incelemişlerdir. Adsorbe olan DNA miktarı $1,672 \times 10^{-10}$ mol/cm² olarak bulunmuştur. Yeni geliştirilen bu biosensörün DNA' nın tanınmasında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır [50].

Vinu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, sitokrom c adsorpsiyonu, çeşitli mezogözenekli moleküller üzerinde farklı pH 'a sahip çözeltilerde çalışılmıştır. Adsorpsiyonunun çözelti pH 'ına bağlı olarak sitokrom c proteinin izoelektrik noktası (pI: 9,8) yakınında maksimum adsorplama gösterdiği görülmüştür. Mezogözenekli molekül üzerinde sitokrom c 'nin pozitif yüklü amino asit kısımları ve alüminyum bölgeleri üzerinde negatif olarak yüklenmiştir ve aralarında güçlü bir elektrostatik etkileşim vardır. Sonuç olarak sitokrom c ile adsorbent arasındaki güçlü elektrostatik çekim ortam pH 'nın 10,6 olduğu koşulda en fazla rapor edilmiştir [51].

Yapılan bir başka çalışmada ise, sitokrom c, bovine serum albumin (BSA) ve fibrinojen sorpsiyonları, bir seri karboksilik katyon değiştiriciler üzerinde iyonojenik grupların çeşitli derişimlerde araştırılmıştır. Katyon değiştirici olarak MAA/HPMA kopolimeri başarı göstermiş ve iyonojenik grupların

derişiminin değiştirilmesi proteinlerin sorpsiyonlarında seçici olmuştur. Buçeşit sorbentlerin büyük proteinlerin kompleks karışımlardan seçici olarak ayrılmasında başarı ile kullanıldığı rapor edilmiştir [52].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kimyasal Malzemeler

Sitokrom c, kitosan ve epiklorohidrin Sigma (St. Louis. MO, ABD) firmasından, amonyum persülfat (APS), akrilik asit monomeri (AA) Fluka şirketinden (Buchs, İsviçre) temin edildi. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edildi.

3.2. İyon Değişirici Membranların Hazırlanması

3.2.1. Kitosan membranlarının hazırlanması

Kitosan membranlar faz dönüşüm tekniği kullanılarak hazırlandı. 5,0 g kitosan asetik asit çözeltisi içerisinde (%4,0, 100 mL) çözüldü. Kitosan çözeltisi (10 mL) petri kabına döküldü ve petrilere NaOH (%10'luk) çözeltisi ilave edildi ve kitosan membranları hazırlandı. Bu yolla hazırlanan membranlar distile su ile yıkandı ve perforator ile disk halinde (çapı: 0,75 cm) kesildi.

3.2.2. Kitosan membranlarının çapraz bağlanması

Hazırlanan kitosan membranlarının mekanik dayanımını arttırmak amacıyla pH'ı 10 olan epiklorhidrin (ECH) çözeltisi (20 mL) ile 3 saat boyunca 50 °C'deki su banyosunda inkübe edilerek çapraz bağlı kitosan membranları elde edildi. Bu işlem basamağının ardından membranlar distile su ile pH'sı değişmeyene kadar yıkandı.

3.2.3. Çapraz bağlı kitosan membranlarının modifikasyonu

Çapraz bağlı kitosan membranlarının modifikasyonu, radikalik polimerizasyon yöntemi ile, amonyum persülfat (APS) başlatıcısı varlığında kitosan membranına akrilik asit (AA) monomerinin aşılama ile gerçekleştirildi ve kitosan-g-p(AA) iyon değiştirici membranlar sentezlendi. Bu amaç doğrultusunda, yaklaşık 2,0 g çapraz bağlı kitosan membranlarının bulunduğu iki boyunlu balon içerisinde, farklı derişimde başlatıcı (3,3-12 mM, 18 ml) ve akrilik asit (0,1-0,7 M) monomeri varlığında azot atmosferinde gerçekleştirildi. Aşı kopolimerizasyonu, ortamın 60 °C'de sabit tutulduğu ve 3 saat süreyle 200 rpm karıştırma hızında sürekli karıştırıldığı işlem koşullarında gerçekleştirildi. Sentezlenen kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranları distile su ile yıkandı ve ortamda kalan reaksiyona girmemiş olan homopolimerleri uzaklaştırmak için sıcak su ile ekstrakte edildi. Monomer oranının aşılama yüzdesi ve verimine etkisi etkisi araştırılarak sistem optimize edildi.

Aşılama yüzdesi gravimetrik yöntem kullanılarak aşılama öncesi ve sonrası kuru kütlelerinin belirlenmesi aşağıdaki eşitliklerin kullanılması ile hesaplanmıştır.

$$\% G = [(w_2 - w_1) / w_1] \times 100 \quad (3.1)$$

$$\% E = (w_2 / w_3) \times 100 \quad (3.2)$$

Burada w_1 , w_2 ve w_3 değerleri sırasıyla; kitosanın başlangıç, aşılama sonrası kitosanın ekstrakte edildikten sonraki ve ekstraksiyonundan önceki toplam ürün (kopolimer ve homopolimer) kütlelerini ifade etmektedir.

3.3. Membranların Karakterizasyonu

3.3.1. Denge su içeriği

Kitosan-g-pAA membranlarının denge su içerikleri farklı ortam pH'larında (pH 4,0- 8,0) ve distile su içerisinde oda sıcaklığında gravimetrik yöntemle tayin edildi. İyon değiştirici membranların denge su içerikleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Denge su içeriği (\%)} = [(w_s - w_d) / w_d] \times 100 \quad (3.3)$$

Burada w_s , w_d sırasıyla, denge su içeriğine ulaşmış membranların ve kuru membranların kütlesini ifade etmektedir.

3.3.2. Gay- Lussac piknometresi ile yoğunluk tayini

İyon değiştirici membranların yoğunluğu Gay- Lussac piknometresi ile, 25 °C sıcaklıkta membranlar için çözücü olmayan n- Dekan sıvısı kullanılarak belirlendi.

3.3.3. FT-IR spektrumları

Kitosan, çapraz bağlı kitosan ve kitosan-g-pAA membranlarının FT-IR spektrumları, FT-IR spektrometresi kullanılarak elde edildi. Tabletler 0,01 g kuru kütle parçası ve 0,1 g KBr karıştırılarak elde edildikten sonra spektrumları alındı.

3.3.4. Amin grubu tayini

Hazırlanan membranların erişilebilir amin grupları miktarının titrasyon ile belirlenebilmesi için 0,2 g çapraz bağlı kitosan membranları 24 saat

süresince 2,0 M 10 ml HCl çözeltisi içinde bekletildi ve 2,0 M ayarlı NaOH çözeltisine karşı titre edilerek serbest amin gruplarının miktarı hesaplandı.

3.3.5. Karboksil grubu tayini

Kitosan-g-pAA membranlarının yüzeyde erişilebilir karboksil grubunun titrasyon ile belirlenebilmesi için, 0,2 gram membran 2,0 M 10 ml NaOH çözeltisi içinde 24 saat süresince bekletildi. Sonrasında ayarlı HCl çözeltisine (2,0 M) karşı titre edilerek erişilebilir karboksil gruplarının miktarı hesaplandı.

3.3.6. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)

Çapraz bağlı kitosan ve kitosan-g-pAA membranların morfolojileri taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak incelendi.

3.4. Sulu Çözeltiden Sitokrom C Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi

Akrilik asit aşılınmış iyon değiştirici kitosan membranların sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyon davranışı kesikli sistemde incelendi. İyon değiştirici membrana sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu, 0,5 mg/ml başlangıç protein derişimi içeren, 50 mM, 5,0 ml fosfat tamponu (pH 6,5) ortamında, 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildi. Destek materyaline adsorplanan protein miktarı, adsorpsiyon ortamındaki sitokrom c başlangıç ve adsorpsiyon sonundaki bakiye protein derişimi spektrofotometrik yöntem kullanılarak takip edilmesi ile belirlendi. Bu doğrultuda, kalibrasyon eğrisi hazırlamak için standart sitokrom c çözeltisi (0,05-3,00 mg/ml) kullanıldı. Sulu çözeltideki başlangıç ve bakiye protein derişimi UV/Vis spektrofotometresi kullanılarak 530 nm dalga boyunda ölçüldü. Her bir deneysel veri en az iki ölçümün ortalaması alınarak belirlendi. Deney sonucunda iyon değiştirici

membran adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve adsorpsiyon dengesi kurulan membranların adsorpsiyon kapasitelerini ifade eden, adsorplanan protein miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$q_{den} = [(C_o - C_{den}) V_s] / v \quad (3.4)$$

Burada q_{den} ; iyon değiştirici membran üzerine adsorplanan sitokrom c miktarlarını (mg/ml), C_o ve C_{den} sırası ile başlangıç ve adsorpsiyon işleminden sonra ortamda kalan bakiye denge protein derişimleri (mg/ml), V_s ; adsorpsiyon çözeltisinin hacmini (ml) ve v ; adsorpsiyon ortamındaki iyon değiştirici membranın hacmini (ml) göstermektedir.

3.4.1. Adsorpsiyon parametrelerinin etkisi

Kitosan-g-pAA membranlarının sulu çözeltiden sitokrom c adsorpsiyonuna; pH, denge zamanı, sıcaklık, başlangıç sitokrom c derişimi ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Bu yol ile sentezlenen sitokrom c'ye afinite gösteren membranların sulu ortamdan sitokrom c moleküllerine gösterdikleri afinite araştırılarak adsorpsiyon sistemi karakterize edildi.

Adsorpsiyon çalışmalarında ortam pH'sının, sulu çözeltideki protein adsorpsiyonuna etkisi, pH 4,0 ile 9,0 aralığında asetat (50 mM, pH 4,0 – 5,0), fosfat (50 mM, pH 6,0 – 8,0) ve Tris-HCl tampon sistemleri kullanılarak araştırıldı. Her pH'da, protein başlangıç derişimi 0,4 mg/ml olarak seçildi.

Adsorpsiyon deneyleri 25°C'de 3 saat süre ile 100 dev/dak karıştırma hızında karıştırılarak yapıldı. Bu sürenin sonunda afinite membranlardan sitokrom c çözeltisinden uzaklaştırıldı ve adsorplanan sitokrom c miktarı Eşitlik (3.4) kullanılarak hesaplandı.

İyon değiştirici membranın adsorpsiyon denge süresi pH 6,5 de, protein başlangıç derişimi 0,4 mg/ml olarak seçilerek 25°C'de 3 saat süre ile 100

dev/dak karıştırma hızında karıştırılarak belirlendi. İyon değiştirici membranların sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu işleminde başlangıç protein miktarlarının etkisi, başlangıç sitokrom c derişimi 0,1-3,0 mg/ml aralığında tutularak araştırıldı. Sıcaklığın sitokrom c adsorpsiyonuna etkisi, 0,4 mg protein/ml içeren tampon sisteminde dört farklı sıcaklıkta (4, 15, 25 ve 34 °C) çalışıldı. İyonik şiddetin etkisi ise sulu ortamda 0,0 – 1,0 M aralığında değişen NaCl varlığında araştırıldı. İyon değiştirici membranların sitokrom c ile etkileşimi, 0,4 mg/ml başlangıç protein derişimine sahip olan çözelti ortamında 0,0, 0,1, 0,3, 0,6 ve 1,0 M NaCl içeren 5,0 ml fosfat tamponu içerisinde iyonik şiddet etkisi araştırıldı.

3.5. Adsorpsiyon Kinetiği

Kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranlarının sitokrom c adsorpsiyonunda elde edilen deney sonuçları, birinci ve ikinci dereceden kinetik modellerine uygulanarak adsorpsiyon sisteminin kinetiği araştırıldı. Aşağıdaki eşitlikte verilen Lagergren birinci dereceden kinetik modeli, sıvı bir çözeltiden, katının adsorpsiyonu için, en yaygın kullanılan hız eşitliğidir.

$$dq_t / dt = k_1 (q_{den} - q_t) \quad (3.6)$$

Burada k_1 , birinci derece adsorpsiyonun hız sabiti (dak^{-1}) ve q_{den} ve q_t , denge ve t zamanında adsorbe edilen protein miktarlarını gösterir. Sınır şartların uygulanmasıyla, integrasyondan sonra, $t=0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t'$ 'de $q_t=q_t$ aşağıdaki eşitliği verir.

$$\log [(q_{den} / q_{den}) - q_t] = k_1 t / 2,303 \quad (3.7)$$

$$\log (q_{den} - q_t) = \log q_{den} - (k_1 t / 2,303) \quad (3.8)$$

Eşitlik (3.8), doğrusal hale getirmek için yeniden düzenlenebilir. $\log (q_{den} - q_t)$ 'ye karşı t'nin grafiği, kinetik modelin uygulanabilirliğinin teyit edilmesi için,

düz bir çizgi vermelidir. Gerçek bir birinci derece işleminde $\log q_{den}$, $\log (q_{den} - q_t)$ 'ye karşı t grafiğinin kaymasına eşit olmalıdır.

Ritchie, katı üzerine gazların adsorpsiyonunun kinetiği için, bir ikinci derece hız eşitliği önermiştir. İkinci derece eşitlik, adsorbentler üzerine, çözünenlerin adsorpsiyonu için uygulanabilir. İkinci derece eşitliği, adsorpsiyon kapasitesine dayanır, şu şekilde ifade edilebilir:

$$q_m / (q_m - q_t) = k_2 t + 1 \quad (3.9)$$

Bu eşitliğin doğrusal şekli:

$$1 / q_t = 1 / k_2 q_m t + 1 / q_m \quad (3.10)$$

Eşitlik 10'dan, $1/q_t$ 'ye karşı $1/t$ grafiği, düz bir çizgi vermelidir ve sorpsiyon kapasitesi q_m ve hız sabiti k_2 , sırasıyla, doğrusal ikinci derece eşitliğin kayma ve eğiminden hesaplanabilir.

3.6. Adsorpsiyon İzoterm Modelinin Belirlenmesi

Genellikle, iki farklı teorik izoterm modeli, deneysel verilere uygunluğu için kullanılır: Langmuir ve Freundlich modelleri. Kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranları kullanılarak sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonunda belirlenen deneysel verilerin teorik olarak türetilen ve bölüm 2.9.1. ve 2.9.2.'de verilen Langmuir ve Freundlich izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı.

Deneysel verilerden elde edilen C_{den} ve q_{den} değerleri kullanılarak Langmuir eşitliğine (Eşitlik 2.2) göre, C_{den}/q_{den} 'ye karşı C_{den} grafiği çizildi. Bu grafiğin kaymasından K_d ve eğimden de q_m değerleri belirlendi. Freundlich modelini ifade eden (2.3) eşitliği kullanılarak $\log q_{den} - \log C_{den}$ grafiği elde edildi ve eğimden n ve kaymadan da K_F parametreleri belirlendi.

3.7. Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi

İyon değıştirici membranların sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu çalışmalarından elde edilen deneyel sonuçlar kullanılarak farklı sıcaklıklarda denge sabiti ($K_c = q_{den}/C_{den}$) hesaplandı. Aşığıdaki eşitliğe göre van't Hoff eğrisi çizilerek termodinamik parametreler (ΔH , ΔS ve ΔG) hesaplandı [53].

$$\ln K_c = \Delta S / R - \Delta H / RT \quad (3.11)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.12)$$

Burada, R gaz sabitidir (8,314 J/ molK).

3.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Uygun koşullar altında, aş kopolimerizasyonu yöntemi ile modifiye edilerek hazırlanan iyon değıştirici membran tarafından adsorplanan hedef biyolojik molekül farklı pH, iyonik şiddet veya uygun spesifik elüentler kullanılarak, desorbe edilebilmektedir. İyon değıştirici membranlara adsorplanan sitokrom c glutamik asit içeren tampon çözeltisi ile desorbe edildi. Bu amaç doğrultusunda kitosan-g-pAA iyon değıştirici membranların sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu işleminin dengeye ulaşmasının ardından membran diskleri sulu ortamdan uzaklaştırılarak fosfat tamponu ile yıkandı. Sitokrom c adsorplanmış iyon değıştirici kitosan-g-pAA membran diskleri, 25 °C'de 100 dev/dak karıştırma hızında 2 saat süreyle karıştırılan desorpsiyon ortamında (pH'sı 8,0 olan ve 2,0 M KSCN çözeltisi içeren tampon sistemi) tutuldu. İyon değıştirici membran disklerinden ayrılan ve desorpsiyon ortamına geçen sitokrom c miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Desorpsiyon oranı (DO) (3.13) eşitliği kullanılarak hesaplandı.

$$DO (\%) = \left[\frac{\text{desorbe edilen protein miktarı}}{\text{membrana adsorplanan protein miktarı}} \right] \times 100 \quad (3.13)$$

Sürekli sistem uygulamalarında önemli bir parametre olan yeniden kullanımı belirlemek için, adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı iyon değiştirici membran diskleri kullanılarak ve 6 kez tekrar edilerek iyon değiştirici membranların tekrar kullanım özellikleri test edildi.

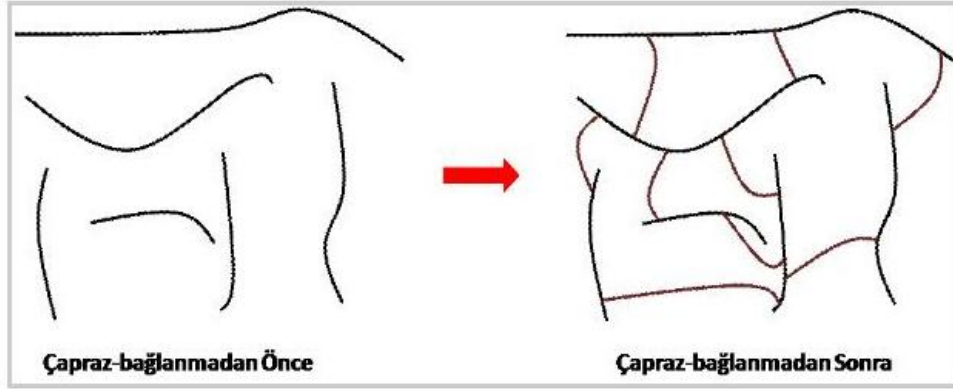
4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMA

Yüzey modifikasyonu, son yıllarda pratik uygulamalar için bir materyale istenen özelliklerin sağlanması için kullanılan yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Son on yıldır katı yüzeyler üzerine “fırça” olarak isimlendirilen polimerlerin aşılmasına olan ilgi giderek artmaktadır. Polimerik fırçalar, yüzeye yoğun olarak aşılandığında, yüzeyden uzanan yan zincir polimerleri olarak tanımlanmaktadır.

Çapraz bağlı polimer partikülleri üzerine lineer polimerlerin aşılması, çözünmezlik sağlamasının yanı sıra fonksiyonel grup taşıyan polimerlerin yapıya katılması ve polimer zincirlerin esnekliğine olumlu özellikler kazandırılması nedeni ile kromatografik uygulamalarda önemli bir yere sahiptir [54,40]. Polimer yüzeyinde oluşturulan fırça tipi bu yan zincirler, hedeflenen biyolojik molekülün destek materyaline çok tabakalı bağlanmasına izin vererek adsorpsiyon kapasitesini ve etkinliğinin arttırmasına olanak sağlamaktadır. Bu materyallerin yüksek spesifik arayüzeyler sergilemesi nedeni ile biyolojik akışkanlardan hedeflenen protein izolasyonu ve enzim tutuklanmasında işlemlerinde başarı ile kullanılabilmektedir [39,55].

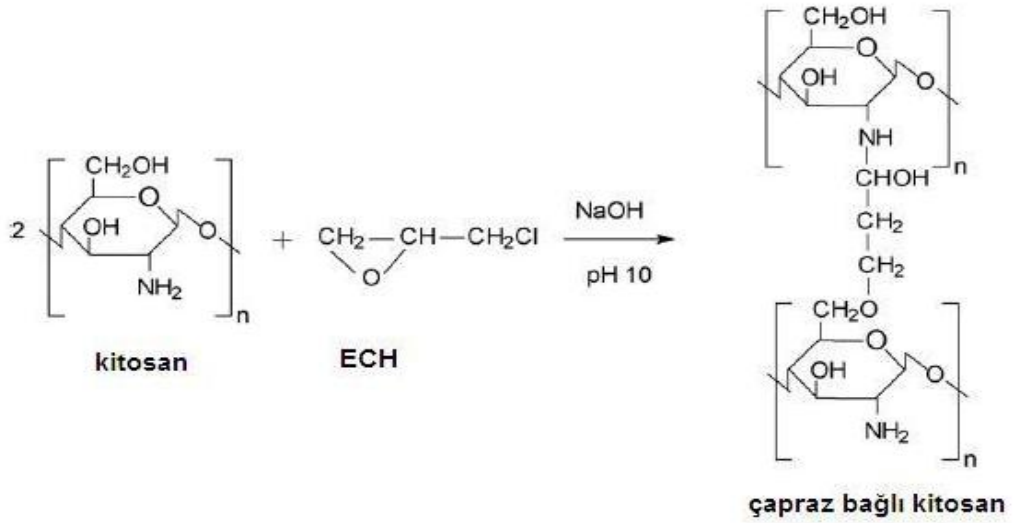
4.1. Çapraz Bağlı Kitosanın Aşı Kopolimerizasyonu ile Modifikasyonu

İyon değiştirici kitosan-g-pAA membranları iki basamakta hazırlandı. Kitosan membranlarının çapraz bağlanması sonucu oluşan polimer zincirlerinin şematik gösterimi Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Böylece kitosan membranlarının mekanik dayanımı arttırılmıştır.



Şekil 4.1. Kitosan ve çapraz bağlı kitosan yapılarının şematik gösterimi

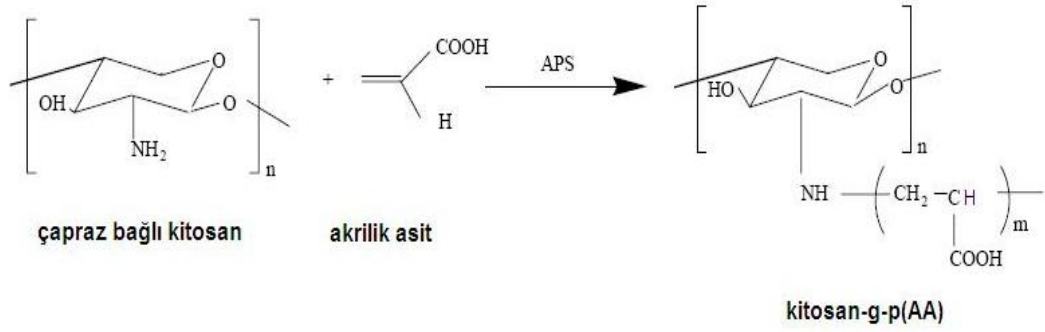
İlk aşamada, faz dönüşüm tekniği ile hazırlanan kitosan membranlarının yapısında bulunan amin grupları epiklorohidrin ile çapraz bağlandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kitosanın epiklorohidrin ile çapraz bağlanmasının şematik gösterimi [40]

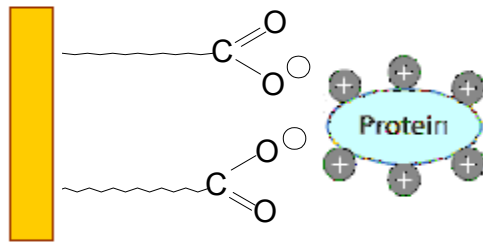
İkinci aşamada ise çapraz bağlı kitosan membran üzerine akrilik asitin aşırı kopolimerizasyonu amonyum persülfat varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile gerçekleştirilerek yüzeyde poliakrilik asit iplikçiklerin oluşumu sağlanmıştır (Şekil 4.3). Kitosanın sahip olduğu $-NH_2$ grupları akrilik

asit monomeri için polimerik zincirler üzerine aşılama bölgelerini oluşturmaktadır.



Şekil 4.3. Çapraz bağlı kitosan üzerine akrilik asit monomerinin aşılmasının şematik gösterimi

Kitosan-g-p(AA) membranlarında oluşturulmuş olan fırçalaşmış yapılar proteinlerin immobilizasyonu ve saflaştırılması için oldukça elverişlidir çünkü sulu çözelti ortamında bu yapılar şişme davranışı gösterirler ve büyük biomoleküllerin bağlanmasını kolaylaştırırlar [56]. Fırçalaşmış poli(akrilik asit) yapısının bir proteine nasıl bağlandığı Şekil 4.4’de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Kitosan g pAA membrane

Şekil 4.4. Proteinin kitosan-g-p(AA) yapısına bağlanmasının gösterimi

Sonuç olarak, zayıf anyon değiştirici gruplar taşıyan akrilik asit monomeri, çapraz bağlı kitosan membranlar üzerine serbest radikalik aşı polimerizasyon yöntemi ile aşılansmıştır. Böylece elde edilen bu iyon değiştirici destek

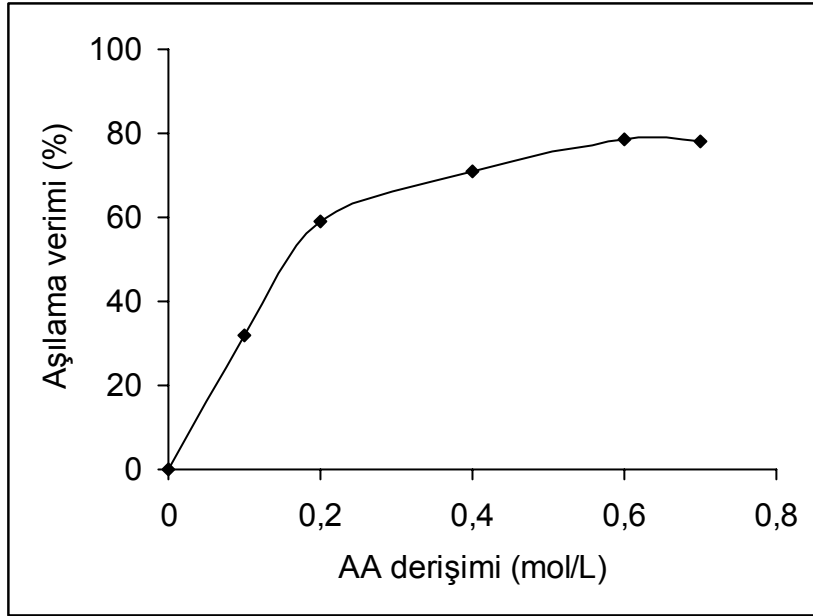
materyali mekanik gücü yüksek, biyolojik ve kimyasal parçalanmaya karşı dirençli membranlardır.

Kitosan-g-pAA membranlarının kalınlıkları 0,15 cm ve yoğunluğu ise 1,58 g/mL olarak belirlendi. Çapraz bağlı kitosan membranların yüzeyinde erişilebilir amin grubu miktarı titrasyon yöntemi kullanılarak 1,98 $\mu\text{mol/g}$ membran olarak belirlendi. Akrilik asit monomeri karboksilik grubu taşıması nedeni ile, destek materyalinin yüzeyinde, kimyasal yolla aşılama ile kitosan polimeri modifiye edilerek yüzeyinde sitokrom c molekülleri ile spesifik etkileşimin gerçekleşebileceği serbest karboksil grupları oluşturulmuş oldu.

4.2. Aşılama Verimi

Reaksiyon ortamında AA oranının artması ile aşılama yüzdesi ve veriminin belirli bir değere kadar arttığı belirlendi. Serbest radikalik polimerizasyon yöntemi ile çapraz bağlı kitosan membrana AA aşılama verimi, akrilik asit derişimi 0,1 – 0,7 M aralığında değiştirilerek belirlendi ve Şekil 4.5’de sunuldu. Grafikte görüleceği gibi, akrilik asit derişiminin 0,6 mol/L değerine arttırılmasıyla, aşılama veriminin arttığı (%78,42) ve bu değerden sonra değişmediği belirlendi. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında aşılama reaksiyonlarında, optimum akrilik asit derişimi 0,6 mol/L olarak seçildi.

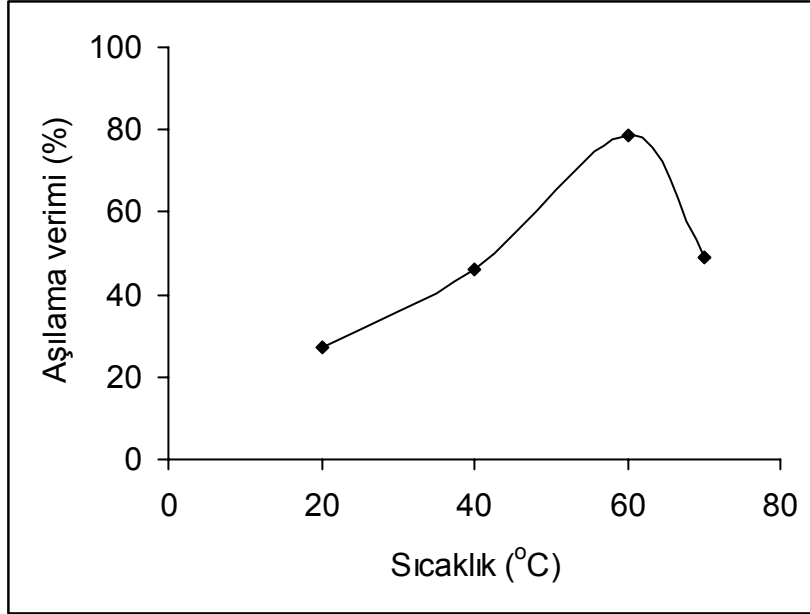
Çapraz bağlı kitosan membran üzerine aşılama polimerinin erişilebilir karboksil gruplarının miktarı titrimetrik yöntem ile belirlendi. Akrilik asit monomerinin polimerizasyon ortamındaki derişiminin arttırılması ile aşılama yüzdesinin arttığı ve buna paralel olarak da 0,1-0,7 M aralığında değiştirilen akrilik asit derişimi ile yüzeyde erişilebilir karboksil grubu miktarının 3,95 – 8,62 mmol/g olarak değiştiği belirlendi.



şekil 4.5. Monomer derişiminin aşılama yşzdesine etkisi

Aşılama verimine başlatıcı derişim etkisi üç ayrı APS derişimde (3,3, 6,6 ve 12,0 mM) alışılarak araştırılmıştır. Başlatıcı derişimi 3,3 mM'dan 6,6 mM'a çıkarılması ile aşılama veriminin arttığı ancak bu derişimin 12,0 mM'a çıkarılması ile aşılama yşzdesinde önemli bir değişime neden olmadığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında aşılama reaksiyonlarında, optimum başlatıcı derişimi 6,6 mM olarak seçildi.

Aşılama verimine kopolimerizasyon sıcaklığının etkisi araştırılmış ve polimerizasyon sisteminin sıcaklığının 60 °C'ye çıkarılması ile aşılama veriminin arttığı bu sıcaklık değerinden üstünde ise azaldığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında aşılama reaksiyonlarında, polimerizasyon sisteminin optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi.

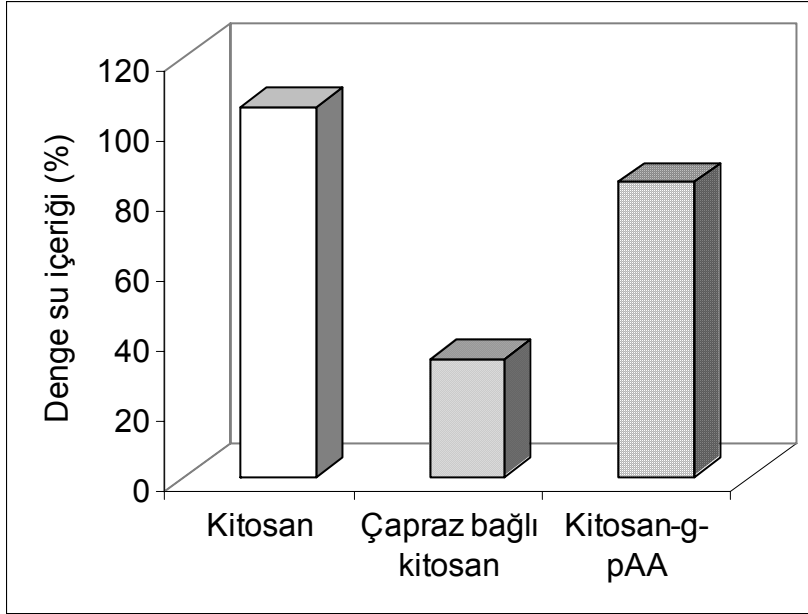


Şekil 4.6. Polimerizasyon sıcaklığının aşılama yüzdesine etkisi

4.3. Kitosan-g-p(AA) Membranların Karakterizasyonu

4.3.1. Kitosan ve modifiye kitosanın denge su içeriği

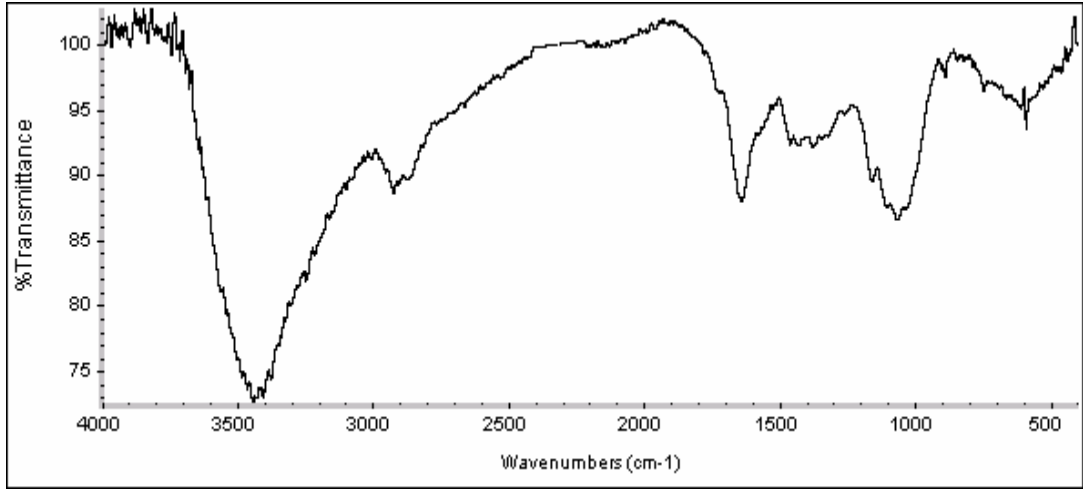
Destek materyallerinin, iyon değiştirici kolonlarda kullanıldığı durumlarda su içeriği önemlidir. Akrilik asit aşılansız membranların denge su içeriğinin %84,3 olduğu belirlendi (Şekil 4.7). Poli(akrilik asit) aşılı membranın çapraz bağlı kitosan membrana kıyasla daha fazla su içeriğine sahip olması yüzeye aşılansız zincirlerdeki serbest uçlu grupların çapraz bağlı ağ yapısına oranla yüksek hareketlilik göstermiş olması ile açıklanabilir. Ayrıca bu değişim kitosan membranının modifiye edildiğinin bir diğer göstergesidir.



Şekil 4.7. Kitosan, çapraz bağlı kitosan ve poli(akrilik asit) aşılansak modifiye edilen kitosan membranların denge su içeriği

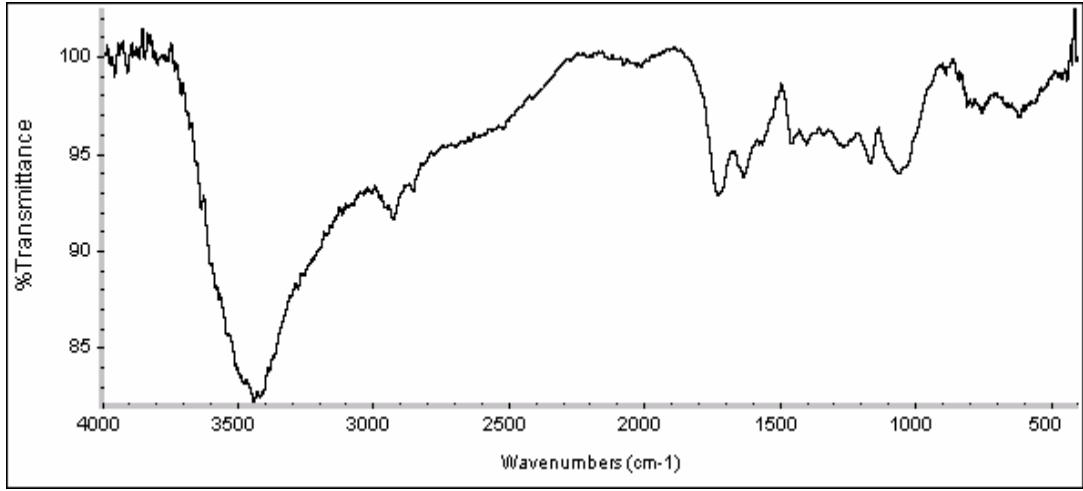
4.3.2. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi

Sentezlenen membranların yapısal karakterizasyonu için FT-IR spektroskopisinden yararlanıldı. Çapraz bağlı kitosan ve AA monomeri aşılansmış kitosan membranlarının spektrumları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'de verildi.



Şekil 4.8. Çapraz bağlı kitosanın FTIR spektrumu

Yapıdaki -NH_2 bandı ikiye ayrılmış gibi çatallı bir şekilde görülmektedir. Yapıda -OH gruplarının bulunması bandın genişlemesine hatta -NH_2 gruplarının tamamen görünmemesine neden olabilir. -OH bandındaki simetrisinin bozulması, yapıda -NH_2 varlığını göstermektedir. Kitosana ait FT-IR spektroskopisinde 3450 ile 3300 cm^{-1} aralığında gözlenen yayvan pik -OH grubunu ve bu grubun kapattığı N-H bağları ve polisakkarit zincirine ait molekül içi hidrojen bağlarını göstermektedir. 2879 cm^{-1} 'de C-H bağı gerilme, 1654 cm^{-1} 'de asetil (C=O) grubu gerilme titreşim bandları gözlenmiştir. 1584 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik kitosanın karakteristik amino grubuna aittir.

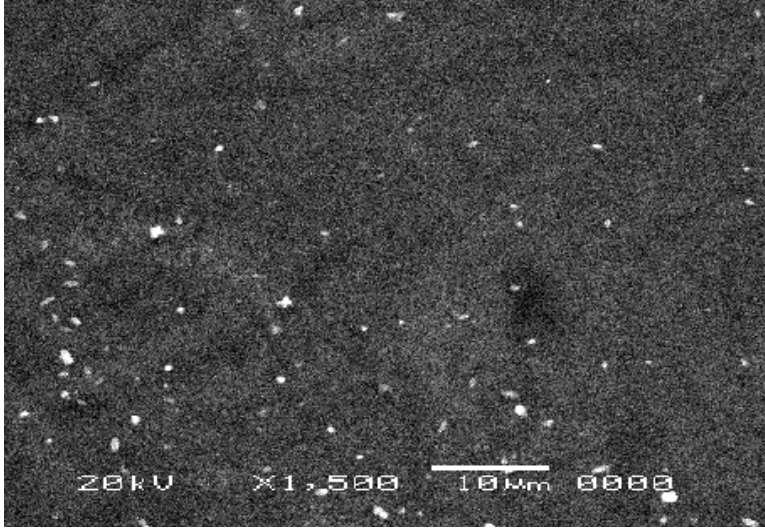


Şekil 4.9. AA monomeri aşılı çapraz bağlı kitosanın FTIR spektrumu

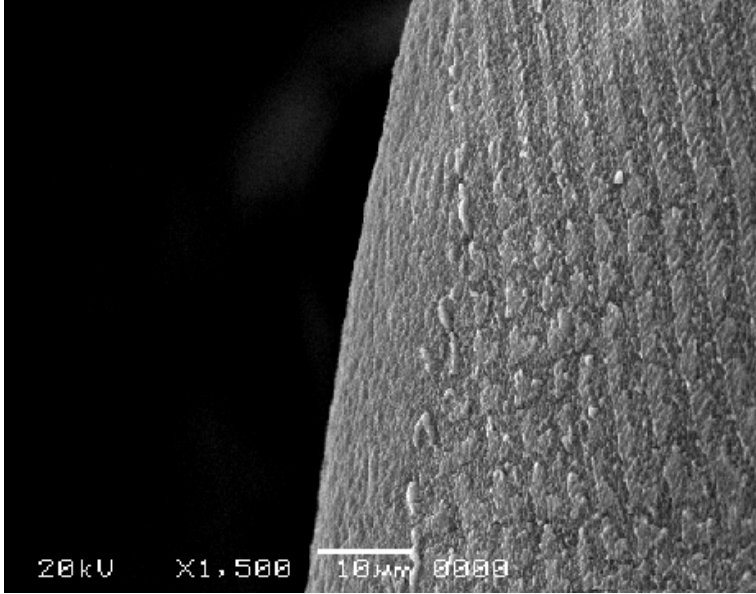
Akrilik asit aşılanmış membranın FT-IR spektrumuna bakıldığında, 1654 cm^{-1} 'de asetil grubuna ait titreşim bandının yanında 1560 cm^{-1} 'deki band akrilik asitin karbonil grubundan ileri gelmektedir. Akrilik asitin ester bağlarından meydana gelen band 1672 cm^{-1} 'de ve ayrıca parmak izi bölgesindeki değişiklikler kitosana akrilik asitin başarılı bir şekilde aşılandığı düşüncesini desteklemektedir.

4.3.3. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri

Çapraz bağlanmış saf kitosanın yüzeyinin oldukça düz bir yüzey yapısına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9). Çapraz bağlı kitosan filmlere AA monomeri aşılama ile membranların yapılarında pürüzlerin oluştuğu ve yüzeyde pürüzlülükte bir artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, aşılama öncesi kitosan filmlerin yüzeyi oldukça homojen bir yapıda iken aşılama ile yüzeyin heterojen bir hale geldiği gözlenmiştir. Bu değişimler, hazırlanan membranlarda aşılamanın gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. Çapraz bağlı kitosan membranının SEM mikrosrafı



Şekil 4.11. AA aşılanmış kitosan membranının SEM mikrosrafı

4.3.4. Differansiyel tarama kalorimetresi (DSC)

Kitin, kitosan gibi polisakkarit yapıda olan makromoleküller su için güçlü bir afiniteye sahiptirler ve sıvı halde kolayca hidrasyona uğrayabilen bu makromoleküller, düzensiz yapıdadırlar [57].

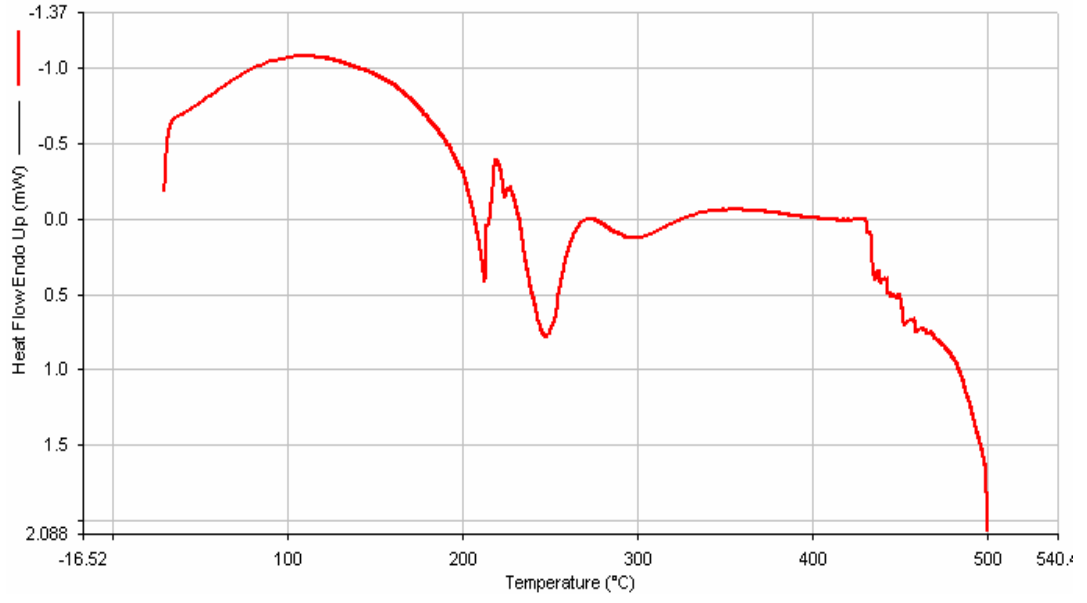
DSC eğrileri polimerlerin termal özellikleri ve davranışları hakkında bilgi vermektedir. Çapraz bağlı kitosan ve poli(akrilik asit) aşılınmış kitosan membranlarının termal kararlılığının belirlenmesi amacı ile DSC analizi 25-500 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika ısıtma hızında gerçekleştirildi.

Polimerik membranlara ait DSC eğrisinden, çapraz bağlı kitosanın termal kararlılığının zayıf olduğu, 215 °C'de endotermik bir pike sahip olduğu, 425 °C sıcaklık değerinden sonra ise polimer yapısının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 4.12).

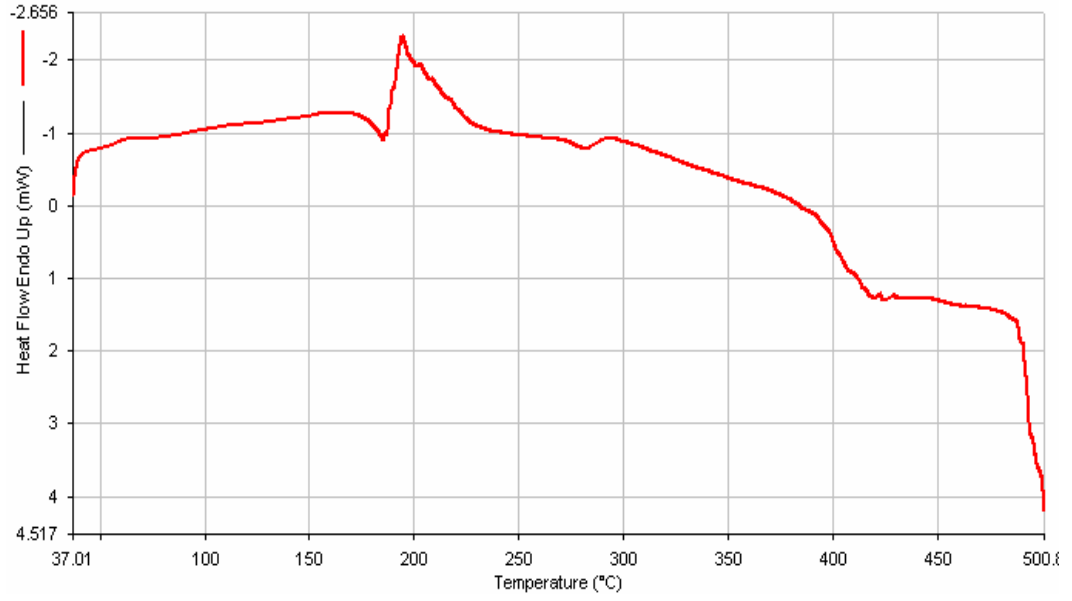
Akrilik asit aşıl原因 kitosan membranının ise termal kararlılığının daha kuvvetli olduğu çapraz bağlı kitosana oranla daha yüksek sıcaklıklara kadar bozunmaya uğramadığını yapısını koruduğu gözlenmiş fakat 480 °C sıcaklık değerinden sonra polimer yapısının bozulduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Yüksek bir aşılama yüzdesinde aşıl原因 kopolimerin termal kararlılığının artması kitosan zincirleri ile hidrojen bağları arasında güçlü bir kovalent etkileşimin olduğunun göstergesidir [58,59].

Kitosanın kristallliği, hidrofobik yan zincirlerin aşılması sonucu hidrojen bağlarını kaybederek azalır fakat serbest hidrofilik hidroksil gruplarının ve kitosanın amino gruplarının sayıları artar. Buna bağlı olarak su molekülleri yapıya daha kuvvetli tutunur ve buharlaşma daha az miktarlarda gerçekleşir [60,61]. Böylece aşılınmış kitosan polimerinin termal olarak daha kararlı olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.12. Çapraz bağlı kitosanın DSC eğrisi



Şekil 4.13. AA aşılannmış çapraz bağlı kitosan membranının DSC eğrisi

4.4. Kitosan-g-p(AA) Membranlarının Sitokrom c Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Proteinlerin üç boyutlu yapılarının yüzeyinde açığa çıkan amino asitlerin türü, yükü ve yük dağılımı, adsorbe edecek yüzey ile protein arasındaki iyon değişimi etkilerinde önemli bir faktördür. Sulu ortamda, protein moleküllerinin polar ya da iyonize amino asit kalıntıları yüzeyde olma eğiliminde olduğu için amino asit kalıntıları proteinin birincil yapısından dolayı birbirinden bağımsız olarak dağılmaz. Dağılım, her proteinde farklılık göstermektedir [55,44].

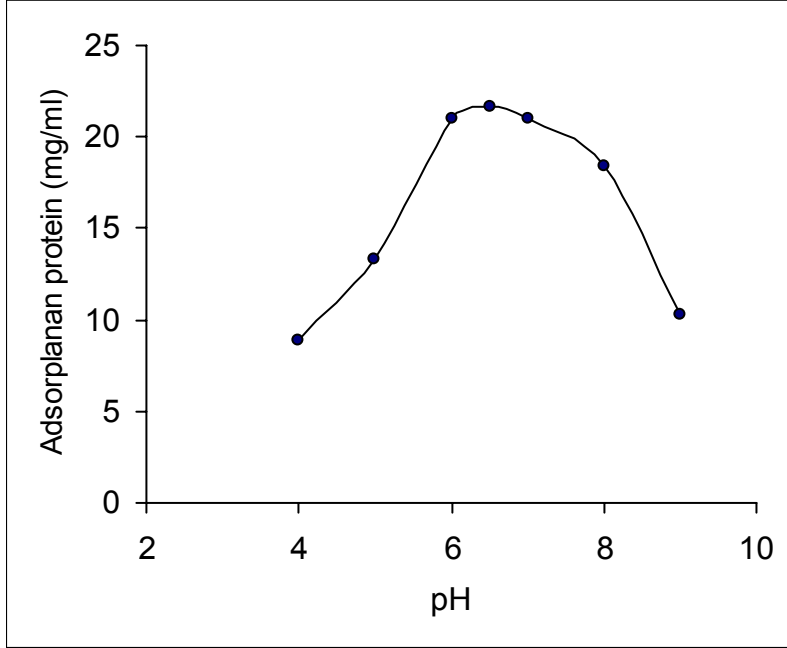
Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan sitokrom-c bazik bir proteindir ve izoelektrik noktası 10,6 'dır. Proteinin bu değerinin altındaki pH 'larda pozitif yüzey yüküne sahip olduğu bilinmektedir. Sitokrom-c 'nin yüzeyinde açığa çıkan iyonlaşmış amino asit grupları ile membranlarda aşılama sonrası oluşturulan iplikçiklerin fonksiyonel karboksil grupları arasında elektrostatik etkileşim yolu ile adsorpsiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır.

4.3.1. Adsorpsiyon kapasitesinde pH etkisi

Destek materyali ile protein molekülleri arasındaki etkileşimler üzerinde etkisi olan önemli faktörler arasında protein yüzeyindeki elektron verici grupların türü ve sayısı, ortamın pH'sı, ortamdaki tuzlar (iyonik şiddet) ve sıcaklık sayılabilir. Sulu ortamda, polar ya da yüklü amino asit kalıntıları yüzeyde olma eğilimindedir. Bununla birlikte, amino asit kalıntıları proteinin birincil yapısından dolayı birbirinden bağımsız olarak dağılamaz çünkü dağılım, bir proteinden diğerine farklılık gösterir.

Bu nedenle iyon değiştirici membranların yüzeyindeki anyonik olan bağlanma bölgeleri ile hedef protein etkileşmesinde ortam pH'sının etkisi oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Şekil 4.14'de yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan kitosan-g-p(AA) iyon değiştirici membranlara sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonuna ortam pH'sı etkisi gösterildi. Kitosan-g

p(AA) membranlara maksimum sitokrom-c adsorpsiyonun pH 6,0-7,0 aralığında olduğu gözlemlendi.



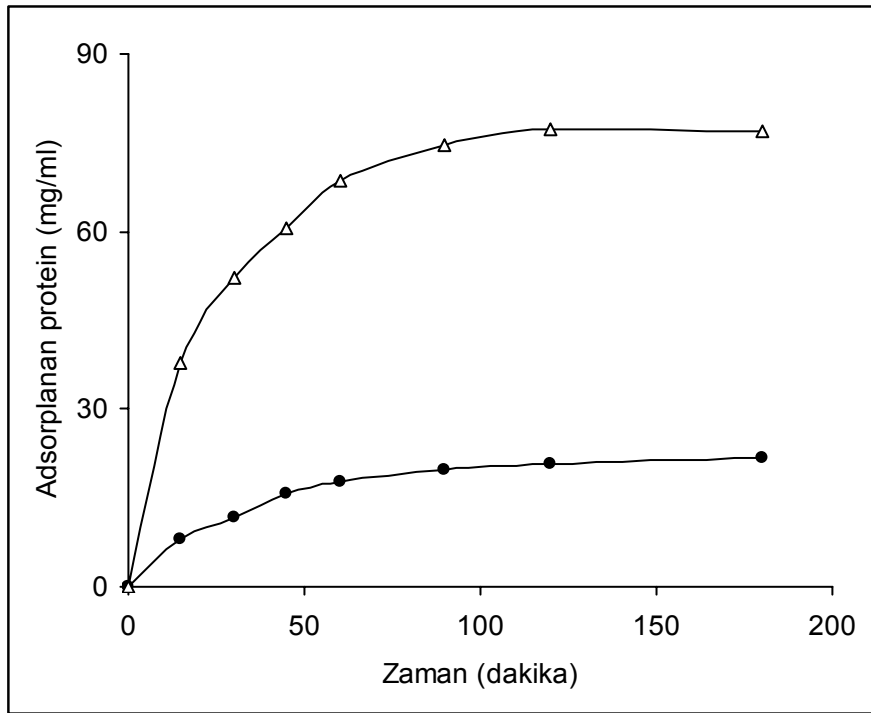
Şekil 4.14. Sulu ortamdan iyon değışirici membranlara sitokrom c adsorpsiyonun etkisi

pH 6,0 ve 7,0 civarında sitokrom c ve kitosan-g-pAA ve iyon değıştirici membran arasında tercihli bir ilişki olduğunu gösterdi. Sitokrom c pH 11,0'ın altında katyonik özellik taşımaktadır. Proteinler amfoterik moleküllerdir ve bu nedenle proteinlerin yük dağılım özellikleri ortamın pH'sı ile değışmektedir.

Yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan kitosan-g-pAA membranları karboksil grubundan dolayı ortam pH'sına bağlı olarak negatif yük taşımaktadır. Bu nedenle, pH 6,0 ve 7,0 civarında sitokrom c molekülü ile kitosan-g-pAA membranları arasındaki ilginin iyon değıştirici etkileşim sonucu meydana geldiği düşünöldü.

4.3.2. Adsorpsiyon hızı ve adsorpsiyon kinetiğı

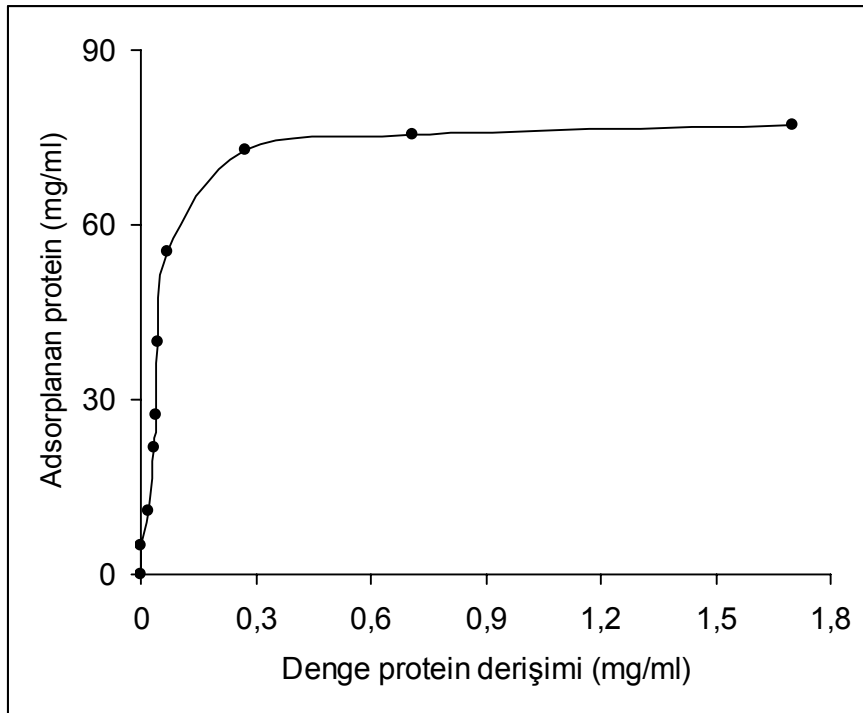
İyon değiştirici membranlara sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu işleminde bir ara yzey olayı olan adsorpsiyonun dengeye ulaşması suresi pH 6,5 de, başlangıç sitokrom c derişimi 0,4 ve 2,5 mg/ml olduğu derişimde araştırıldı ve sonuçlar şekil 4.15’de gösterildi. Adsorpsiyon suresinin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı gözlendi ve adsorpsiyon dengesine 120 dakikada ulaştığı belirlendi. Adsorpsiyon ortamındaki sitokrom c derişiminin arttırılması ile adsorpsiyon hızının da arttığı belirlendi. Bu davranışın sıvı ve katı fazdaki derişim farklılığından kaynaklandığı dşnld.



şekil 4.15. İyon değiştirici membranlara sitokrom c adsorpsiyonunda adsorpsiyon suresinin etkisi (•, 0,4 mg/ml; Δ, 2,5 mg/ml)

4.3.3. Adsorpsiyon kapasitesinde derişim etkisi

İyon değiştirici membranların adsorpsiyon kapasitesine başlangıç sitokrom c derişiminin etkisi 0,1-3,0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi. Adsorpsiyon kapasitesinin, 2,5 mg/ml başlangıç protein derişimine kadar arttığı, bu değerden sonra sabit kaldığı gözlendi. Bu, iyon değiştirici membran yüzeyindeki etkileşim gruplarının, adsorbe olmuş sitokrom c molekülleri ile doygun hale gelmiş olmasıyla açıklanabilir. Kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranlarının sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyon kapasitesinin proteinin denge derişimine bağlı olarak değişimi şekil 4.16'de verildi. Poli(akrilik asit) aşılanmış kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranlar ile elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi 76,21 mg/ml olarak bulundu (şekil 4.15). Bu sonuçların literatür ile uyum içerisinde olduğu görüldü.

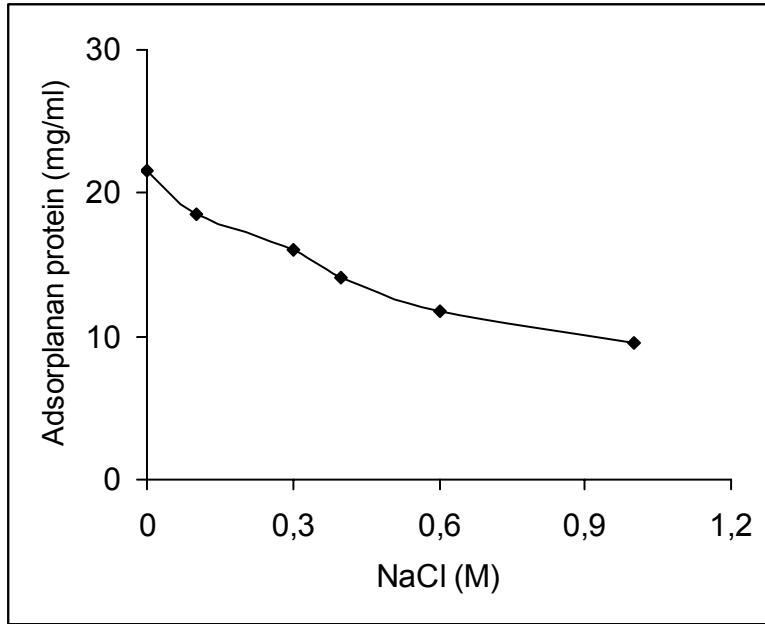


şekil 4.16. Sulu çözeltideki sitokrom c' nin denge derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi

4.3.4. İyonik şiddet etkisi

İyonik şiddetin etkisi fosfat tamponunun NaCl içeriği 0,0-1,0 M arasında değiştirilerek incelendi. İyonik şiddetin artmasıyla, adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.17). Debye-Hückel'e göre, adsorpsiyon ortamındaki elektrolitin derişimi arttırıldığında, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift tabaka kalınlığı azalır. Van Oss ise, adsorpsiyon ortamında elektrolit derişimi arttıkça, protein yüzey yükünün perdelendiğini belirtmiştir. Bu etkiler, moleküller arasındaki elektrostatik etkileşimin azalmasına sebep olur [62].

Sonuç olarak, moleküller arasındaki toplam elektrostatik enerjinin azalması sonucu sistem agra olmaya başlar, ve bu nedenle de adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma gözlemlendiği düşünöldü.



Şekil 4.17. İyon değıştirici membranlarla sitokrom c adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi

4.3.5. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın artması ile protein ve destek materyalinin fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim alanı artacağı için, iyon değiştirici kitosan-g-pAA membranlarına sitokrom c adsorpsiyonu işleminde adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlemlendi. Poliakrilik asit iplikçikleri taşıyan membranlarla sitokrom c adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklıkla artması, sitokrom c molekülünün üç boyutlu konformasyonu ile ilgili olduğu düşünüldü. Sıcaklığın artması ile, proteinin hidrofobik amino asitlerinin molekül yüzeyine çıktığı ve poliakrilik asit iplikçikleri ile sitokrom c arasındaki etkileşim alanının arttığı düşünüldü.

Sıcaklığın 4 °C'den 34 °C'ye çıkarılması ile birlikte kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranların adsorpsiyon kapasitesinin 69,07 mg/ml den 80,43 mg/ml değerine artışı sitokrom c molekülünün üç boyutlu yapısı ile ilgili olduğu düşünüldü.

4.4. Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün destek materyali ile etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Bununla birlikte, çözeltideki protein derişimi ile destek materyaline adsorplanmış protein arasındaki ilişkiyi de açıklar. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli, deneysel verilerin teorik olarak türetilen matematik modellemelere uygunluğu için sıklıkla kullanılan modellerdir. Adsorpsiyon sisteminde farklı başlangıç derişimine sahip sitokrom c sulu çözeltileri kullanılarak yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan kitosan-g-pAA membranları için elde edilen deneysel adsorpsiyon izoterm eğrisi (Şekil 4.15) ve ilgili deneysel verilerin Bölüm 3.6 da verilen Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı ve Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. Yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan kitosan-g-p(AA) membranlarının sitokrom c adsorpsiyonunda belirlenen izoterm modeli sabitleri

Langmuir sabitleri				Freundlich sabitleri		
$q_{m(deneysel)}$	q_m	$K_d \times 10^6$	R^2	n	K_F	R^2
(mg/ml)	(mg/ml)	(M)				
76,21	80,39	4,71	0,998	2,86	85,70	0,919

Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinden elde edilen doğrusal grafik, yüksek korelasyon katsayısı (R^2) ve teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin, q_m , deneysel adsorpsiyon kapasitelerine, $q_{m(deneysel)}$, eşit olması, iyon değiştirici membranlar ile sulu çözeltiden sitokrom c adsorpsiyonunun Langmuir İzoterm modeli ile açıklanabileceğini gösterdi (Çizelge 4.1). Langmuir modelinde K_d değeri protein ve sorbentten oluşan kompleksin kararlılığının göstergesidir. K_d sabitinin $4,71 \times 10^{-6}$ büyüklüğünde olması, proteinin sorbente karşı yüksek bağlanma afinitesi olduğunu göstermektedir. Freundlich modelinin K_F ve n değerlerinin büyüklüğü, iyon değiştirici membranının yüksek bir adsorpsiyon kapasitesi ile sulu ortamdan sitokrom c alımının kolay olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.1).

4.5. Adsorpsiyon Kinetiği

Deney sonuçları, Bölüm 3.5 'de verilen birinci ve ikinci dereceden kinetik modeline uygulandı ve elde edilen model sabitleri Çizelge 4.2'de gösterildi.

DeneySEL verilerden hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi, $q_{m(deneySEL)}$, ile birinci ve ikinci dereceden kinetik modelin uygulanması ile elde edilen teorik denge adsorpsiyon kapasiteleri, q_{den} , karşılaştırıldığında sonuçların ikinci derece kinetik modelinden elde edilen değerlere çok yakın olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.2). Yüksek korelasyon katsayıları ve maksimum adsorpsiyon kapasitelerindeki uyumlu sonuçlar, iyon değiştirici membranın sitokrom c adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetik modeli ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.2. İyon değiştirici membranların sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonu işleminde belirlenen kinetik sabitler

Birinci derece				İkinci derece		
$q_{m(deneySEL)}$	q_{den}	$k_1 \times 10^2$	R^2	q_{den}	$k_2 \times 10^1$	R^2
(mg/ml)	(mg/ml)	(1/dk)		(mg/ml)	(ml/mg/dk)	
76,21	192,75	6,22	0,943	83,03	5,19	0,997

4.6. Adsorpsiyon Sisteminin Termodinamik Parametresi

İyon değişim kromatografisi alanında sitokrom c adsorpsiyonu uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanan kitosan-g-pAA membranı için elde edilen pozitif ΔH (62,75 kJ/mol) değeri adsorpsiyon işleminin endotermik

olduğunu belirtirken, pozitif ΔS (52,74 J/mol K) değeri de adsorpsiyon sırasında sistemdeki toplam düzensizliği ifade etmektedir. Kitosan-g-pAA membranlar için farklı sıcaklıklarda ΔG değeri hesaplandı ve Çizelge 4.3’de verildi. Her bir çalışma sıcaklığında elde edilen negatif ΔG değerleri adsorpsiyon işleminin kendiliğinden olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.3. Kitosan-g-p(AA) iyon değiştirici membranların kullanıldığı sulu çözeltiden farklı sıcaklıklarda protein adsorpsiyonu sistemi için belirlenen termodinamik parametreler

Sıcaklık	ΔG	ΔH	ΔS
(K)	(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol K)
277	-8,35		
288	-8,88		
298	-9,45	62,75	52,74
307	-9,92		

4.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

İyon değiştirici membran üzerine adsorplanan sitokrom c KSCN (pH 8,0) çözeltisi kullanılarak %92 oranında desorbe edildi. Desorpsiyon işleminde, kullanılan desorpsiyon ajanının sitokrom c molekülleri ile membran üzerindeki iyon değiştirici gruplar arasındaki etkileşimleri zayıflatarak protein moleküllerinin membranlardan ayrılmasını sağladığı düşünüldü. İyon değiştirici membranların tekrar kullanılabilirliği, aynı sorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları tekrarlandığında, adsorpsiyon kapasitesinin tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri süresince değişmediği belirlendi.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Doğal bir polimer olan kitosan epiklorohidrin ile çapraz bağlandı ve çapraz bağlı kitosan polimeri üzerine serbest radikalik aşırı kopolimerizasyon yöntemi ile akrilik asit monomeri aşılandı.
2. Kitosan membranlara akrilik asit monomerinin aşıl原因 olarak modifikasyonu ile membran yüzeyinde poliakrilik asit iplikçiklerin oluşumu sağlanarak membrana katyon değiştirici özelliği kazandırıldı ve iyon değiştirici kitosan-g-pAA destek materyali elde edildi.
3. Polimerizasyon sistemin optimizasyonu, akrilik asit aşıl原因 verimine akrilik asit derişimi, ortam sıcaklığı, başlatıcı derişimi değiştirilerek belirlendi. Polimerizasyon sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi.
4. Aşıl原因 verimine başlatıcı derişimi etkisi amonyum persülfatın üç ayrı derişiminde (3,3, 6,6 ve 12,0 mM) çalışılarak araştırıldı. Başlatıcı derişiminin 3,3 mM'dan 6,6 mM'a çıkarılması ile aşıl原因 veriminin arttığı ancak bu derişimin 12,0 mM'a çıkarılması ile aşıl原因 yüzdesinde önemli bir değişime neden olmadığı görüldü.
5. Çapraz bağlı kitosan membranlara akrilik asit monomerinin aşıl原因ması işleminde ortamdaki akrilik asit derişiminin 0,6 mol/L değerine arttırılmasıyla, aşıl原因 veriminin arttığı (%78,42) ve bu değerden sonra değişmediği belirlendi.
6. FT-IR spektroskopisi ve SEM mikroskobu kullanılarak sentezlenen membranların yapıları ve morfolojileri tespit edildi. Elde edilen FTIR spektrumundan akrilik asit monomerinin çapraz bağlı kitosanın yapısına

katıldığı görüldü. Çapraz bağlı kitosan ve akrilik asit aşılınmış kitosanın morfolojilerinin birbirinden farklı olduğu bulundu.

7. Fonsiyonel grup analiz sonuçlarından çapraz bağlı kitosan membranların yüzeyinde erişilebilir amin grubu miktarı 1,98 $\mu\text{mol/g}$ olarak bulunurken yüzeyinde fonksiyonel karboksil grupları taşıyan kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranların erişilebilir karboksil grubu miktarının ise 3,95 – 8,62 mmol/g aralığında değiştiği belirlendi.

8. Kitosan-g-pAA membranlarının denge su içeriği ve yoğunluğu sırası ile %84,3, 1,58 g/mL olarak belirlendi.

9. Kitosan-g-p(AA) membranlarının termal davranışı DSC ile belirlendi. Yüzeyinde poliakrilik asit aşılınan kitosan membranının termal kararlılığının daha yüksek olduğu, çapraz bağlı kitosana kıyasla daha yüksek sıcaklıklara kadar bozunmaya uğramadığını yapısını koruduğu gözlemlendi.

10. Kitosan-g-p(AA) membranları ile sulu ortamdan adsorpsiyon çalışmalarında bazik bir protein olan ve izoelektrik noktası (pI) 10,6 olan sitokrom c kullanıldı ve pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve sitokrom c başlangıç derişimi gibi parametrelerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi kesikli sistemde araştırıldı. Destek materyaline adsorplanan protein miktarı, adsorpsiyon ortamındaki sitokrom c başlangıç ve adsorpsiyon sonundaki bakiye protein derişimi spektrofotometrik yöntem kullanılarak takip edilmesi ile belirlendi.

11. Yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan kitosan-g-p(AA) iyon değiştirici membranlara sulu ortamdan sitokrom c adsorpsiyonunda ortam pH'sının etkili olduğu görüldü. Maksimum sitokrom c adsorpsiyonun pH 6,0-7,0 aralığında olduğu ve sitokrom c ve kitosan-g-pAA ve iyon değiştirici membran arasında tercihli bir ilişki olduğunu gösterdi. Bu nedenle, pH 6,0 ve

7,0 civarında sitokrom c molekülü ile kitosan-g-pAA membranları arasındaki ilginin iyon değiştirici etkileşim sonucu meydana geldiği düşünüldü.

12. Adsorpsiyon süresinin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı gözlemlendi ve adsorpsiyon dengesine 120 dakikada ulaştığı belirlendi. Adsorpsiyon ortamındaki sitokrom c derişiminin artırılması ile adsorpsiyon hızının da arttığı belirlendi. Bu davranışın sıvı ve katı fazdaki derişim farklılığından kaynaklandığı düşünüldü.

13. İyon değiştirici membranların adsorpsiyon kapasitesine başlangıç sitokrom c derişiminin etkisi 0,1-3,0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi. Adsorpsiyon kapasitesinin, 2,5 mg/ml başlangıç protein derişimine kadar arttığı, bu değerden sonra sabit kaldığı gözlemlendi. Poli(akrilik asit) aşlanmış kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranlar ile elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi 76,21 mg/ml olarak bulundu.

14. İyonik şiddet etkisi fosfat tamponunun NaCl içeriği 0,0-1,0 M arasında değiştirilerek incelendi. İyonik şiddetin artmasıyla, adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı gözlemlendi.

15. Sıcaklığın 4 °C'den 34 °C'ye çıkarılması ile birlikte kitosan-g-pAA iyon değiştirici membranların adsorpsiyon kapasitesinin 69,07 mg/ml den 80,43 mg/ml değerine artışın sitokrom c molekülünün üç boyutlu yapısı ile ilgili olduğu düşünüldü.

16. Adsorpsiyon sisteminde farklı başlangıç derişimine sahip sitokrom c sulu çözeltileri kullanılarak yüzeyinde poli(akrilik asit) iplikçikleri taşıyan kitosan-g-pAA membranları için elde edilen deneysel adsorpsiyon izoterm eğrisi ve ilgili deneysel verilerinin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı. Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinden elde edilen doğrusal grafik, yüksek korelasyon katsayısı (R^2) ve teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin, q_m , deneysel adsorpsiyon

kapasitelerine, $q_{m(deneyse)}$, eşit olması, iyon değıştirici membranlar ile sulu çözültiden sitokrom c adsorpsiyonunun Langmuir İzoterm modeli ile açıklanabileceğini gösterdi.

17. Deneyssel verilerden hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi, $q_{m(deneyse)}$, ile birinci ve ikinci dereceden kinetik modelin uygulanması ile elde edilen teorik denge adsorpsiyon kapasiteleri, q_{den} , karşılaştırıldığında sonuçların ikinci derece kinetik modelinden elde edilen değerlere çok yakın olduğu ve uyumlu olduğu gözlemlendi.

18. Sitokrom c adsorpsiyonu uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanan kitosan-g-pAA membranı için de elde edilen pozitif ΔH (62,75 kJ/mol) değeri adsorpsiyon işleminin endotermik olduğunu belirtirken, pozitif ΔS (52,74 J/mol K) değeri de adsorpsiyon sırasında sistemdeki toplam düzensizliği ifade etmektedir. Kitosan-g-pAA membranlar için farklı sıcaklıklarda ΔG değeri hesaplandı ve her bir çalışma sıcaklığında elde edilen negatif ΔG değeri adsorpsiyon işleminin kendiliğinden olduğunu gösterdi.

19. İyon değıştirici membran üzerine adsorplanan sitokrom c KSCN (pH 8,0) çözültisi kullanılarak %92 oranında desorbe edildi. İyon değıştirici membranların tekrar kullanılabilirliği, aynı sorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları tekrarlandığında, adsorpsiyon kapasitesinin tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri süresince değışmediği belirlendi.

20. Sonuç olarak, zayıf özellikler gösteren kitosanın modifiye edilerek aşılması ile kromatografik alanda kullanılabilecek membran yapıda mekanik dayanımı iyi, biyolojik ve kimyasal parçalanmaya karşı dirençli iyon değıştirici kitosan-g-pAA destek materyali hazırlandı. Bu materyal iyon değıştirici fonksiyonel gruplara sahip olduğundan dolayı biyolojik sıvılardan sitokrom c 'nin saflaştırılması ve ayrıştırılmasında yüksek bir afinite gösterdi

ve böylece çeşitli kromatografik ayırmalarda başarı ile kullanılabileceği ispatlandı.

KAYNAKLAR

1. Bayramoğlu, G., Şenel, A.Ü., Arica, M.Y., 'Effect of spacer-arm and Cu(II) ions on performance of L-histidine immobilized on poly(GMA/MMA) beads as an affinity ligand for separation and purification of IgG', **Separation and Purification Technology**, 50: 229-239 (2006).
2. Kiralp S., Topçu A., Bayramoğlu, B., Arica, M.Y., Toppare, L., 'Alcohol determination via covalent enzyme immobilization on magnetic beads', **Sensors and Actuators B: Chemical**, 128(1): 521 (2008).
3. Cowie, J.M.G., *Polymers: Chemistry & Physics of modern materials*, second section, **Stanley Thoners Ltd.**, U.K., (ISBN: 0-7487-4073-2), (1991).
4. Ruckenstein, E., Gu, W., 'Crosslinked mercerized cellulose membranes and their application to membrane affinity chromatography', **Journal of Membrane Science**, 193: 131-140 (2001).
5. Lagos, A., Reyes, J., 'Grafting onto chitosan.I. Graft copolymerization of MMA onto chitosan with fenton's reagent as redox initiator', **Journal of Polymer Science**, Part A: Polymer Chemistry, 24(4): 985 (1998).
6. Zeng, X., Ruckenstein E., 'Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes', **Ind. Eng. Chem. Res.**, 35:11, 4169-4175 (1996).
7. Sperling, L.H., 'Introduction to physical polymer science', **A. John Wiley & Sons, Inc. Publication**, Lehigh Uni. Bethlehem, Pennsylvania (2006).
8. Oğuz, O., 'Polimerik malzemelerin bugünü ve yarını', **İstanbul Teknik Üni.**, İstanbul, 1-9 (2009).
9. Saçak, M., 'Polimer Kimyası', **Gazi Kitabevi**, Ankara, 1-468, (2003).
10. Mohanty, A.K, Misra, M., Hinrichsen, G., 'Biofibres Biodegradable polymers and biocomposites: an overview', **Macromol Mater Eng.**, 1-24: 276-277 (2000).
11. Hasırcı, N., 'Mikro ve nano polimerik sistemlerin medikal uygulamaları', **Orta Doğu Teknik Üni.**, Ankara (2009).
12. Ayhan, H., 'Biyomalzemeler', **Bilim Teknik Dergisi.**, Temmuz sayısı, 10 (2002).

13. Kurita, K., 'Controlled functionalization of polysaccharide chitin', ***Progress in Polymer Science***, 26: 1921-1971 (2001).
14. Olteanu, E. Camelia, 'Applications of functionalized chitosan', ***Scientific Study & Research***. VIII (3): ISSN 1582-540X (2007).
15. Burkhanova, N.D., Yugal, S.M., Pulatova, K.P., Voropaeva, G.V., Rashidova, S.S., ' Structural investigations of chitin and its deacetylation products', ***Chemistry of Natural Compounds***, 36: 352-355 (2000).
16. Demetgül, C., 'Katı desteğe tutturulmuş oksim bileşiklerinin ve metal komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu', Doktora Tezi, ***Çukurova Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü***, Adana, 1-141 (2008).
17. Kweon, D.K., Kang, D.W., 'Drug-release behavior of chitosan-g-poly(vinyl alcohol) copolymer matrix', ***J. Applied Polymer Science***, 74: 458-464 (1999).
18. Thanou, M., Verhoe, J.C., Junginger, H.E., ' Chitosan and Its derivatives as internal absorption enhancers', ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 50: 91-101 (2001).
19. Singa, A.K., Chawla, M., ' Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspect-an update', ***J. Pharm. Pharmacol.***, 53: 1047-1067 (2001).
20. Demir, A., Seventekin, N., 'Kitin ve kitosan genel kullanım alanları', ***Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi***, 3:2, E.Ü., Bornova, İzmir, 103-192 (2009).
21. Kweom, D.K., ' Preparation and Characterization of Chitosan-g-PDMS copolymers', ***Polymer Bull.***, 41: 645-652 (1998).
22. Zohuriaan - Mehr, J.M., ' Advances in chitin and chitosan modification', ***Iranian Polymer Journal***, 14(3): 235-265 (2005).
23. Prashanth, H., K.V., Tharanathan, R.N., ' Chitin/Chitosan: modification and their unlimited application potential-an overview', ***Food Science & Technology***, 117-131 (2007).
24. Kweom, D.K., ' Preparation and characterization of chitosan-g-PDMS copolymers', ***Polymer Bull.***, 41: 645-652 (1998).
25. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R.L., Mano J.F., 'Graft copolymerized chitosan – present status and application', ***Carbohydrate Polymers***, 62: 142-158 (2005).

26. Dos Santos, K.S.C.R., Coelho, J.F.J., Ferreira, P., Pinto, I., Lorangetti, S.G., Ferreira, E.I., Higa, O.Z., Gil, M.H., ' Synthesis and characterization of membrans obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan', **Inter. J. Pharma.**, 35-47 (2006).
27. Yong Hu, Xiqun Jiang, Yin Ding, Haixiong Ge, Yuyan Yuan, Changzheng Yang, 'Synthesis and characterizaiton of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles' , **Biomaterials**, 23: 3193-3201 (2002).
28. Blair, H.S., Guthrie, J., Law, T., Turkington, P., ' Chitosan and modified chitosan membrans.I.preparation and characterization', **J. Appl. Polym. Sci.**, 33: 641-656 (1987).
29. Guoqi F., Haiyan L., Haofeng Y., Li L., Zhi Y., Binglin H., ' Synthesis and lipoprotein sorption Properties of porous chitosan beads grafted with poly(acrylic acid)' , **R& Func. Polym.**, 66: 239-246 (2006).
30. Nelson David L., Cox Michael M., ' Lehninger biyokimyanın ilkeleri' **Palme Yayıncılık**, Ankara, 356, (2007).
31. Arpagaus, M., Fedon, Y., Cousin, X., Chatonnet, A., Berge, J.B., Fournier, D., and Toutant, J.B., ' CDNA sequence, gene structure, in vitro expression of ace-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode caenorhabditis elegans' **J. Biol. Chem.**, 269:13, 9957-9965 (1994).
32. Beynon, R.J., Bond J.S., ' Proteolytic enzymes.pp.' **Oxford University Press.**, Oxford, 15-25 (1998).
33. Porcelli, M., Cacciapuoti, G., Fusco, S., Iacomino, G., Gambacorta, A., De Rosa, Mario Zappia, V., ' S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon sulfobulos solfataricus: purification, physico-chemical and immunological properties' **Biochem. Biop. Acta.**, 1164:179-188 (1993).
34. Telefoncu A., ' Protein saflaştırılması ve karakterizasyonu', **Ege Üni.**, İzmir, 272 (1996).
35. Arıca, M.Y., 'Epoxy-derived pHEMA membran for use bioactive macromolecules immobilization', **J. Appl. Polym. Sci.**, 77: 2000-2008 (2000).
36. Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Genç, Ö., Arıca, M.Y., ' Dye-ligand immobilized IPNs membran for removal heavy metal ions', **Makromolecular Symposia**, 203: 219-224 (2003).

37. Boyer, R.F., 'Modern experimental biochemistry' , 2nd Ed, **The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc.**, California, 75-80 (1993).
38. Johnstone A., Thorpe, R., Immunochemistry in practise, **Beckwell Scientific Publications**, Oxford, 9-16 (1982).
39. Bayramoğlu, G., Şenel, A.U., Yilmaz, M., Arica, M.Y., ' Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption', **Biochemical Engineering Journal**, 40(2): 262-274 (2008).
40. Bayramoğlu, G., Erdoğan H., Arica M.Y., 'Studies of adsorption of alkaline trypsin by poly(methacrylic acid) brushes on chitosan membranes', **J. Appl. Polym. Sci.**, 108: 456 (2008).
41. Sarıkaya, Y., 'Fizikokimya', **Gazi Kitabevi**, Ankara, 633-650 (2005).
42. Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R., 'Principles of colloid and surface chemistry', **Marcel Dekker**, USA., Newyork, 405-456 (1997).
43. Bayramoğlu G., Yılmaz, M., Arica, M.Y., 'Chitosan-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible enzyme immobilization', **J. Appl. Polym. Sci.**, 103: 3084-3093 (2007).
44. Türkarslan, S., Sanders, C., Daldal, F., 'Extracytoplasmic prosthetic group ligation to apoproteins: Maturation of c-type cytochromes', **Mol. Microbiol.**, 60(3): 537-541 (2006).
45. Emir, S., Say, R., Yavuz, H., Denizli, A., 'A New metal chelate affinity absorbent for cytochrome c', **Anadolu Üni., Eskişehir, Hacettepe Üni.**, Ankara, 20: 223-228 (2004).
46. Türkmen, D., 'İmmobilize metal affinite kromotografisi (İMAK) ile sitokrom c saflaştırılması' Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üni. Fen bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-100 (2005).
47. Bayramoğlu, G., Loğoglu, E., Arica, M.Y., ' Cytochrome c adsorption on glutamic acid ligand immobilized magnetic poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) beads', **Colloids and Surface**, 297: 55-62 (2007).
48. Deere J., Magner, E., Wall J.G., Hodnett, B.K., 'Adsorption and activity of cytochrome c on mesoporous silicates', **Chem. Commun.**, 45: 465-466 (2001).
49. Ding, X., Yang, M., Hu, J., Qilong, L., McDougall, A., 'Study of the adsorption of cytochrome c on a gold nanoparticle-modified gold

- electrode by using cyclic voltametry, electrochemical impedance spectroscopy and chronopotentiometry', ***Microchimica Acta***, 158: 65-71 (2007).
50. Mengyao, L., Huang, S., Zhu, P., Kong, L., Peng, B., Gao, H., 'A novel DNA biosensör based on ssDNA/ Cyt c/ L-Cys/ GNPs/ Chits/ GCE', ***Electrochimica Acta***, 54: 2284-2289 (2009).
 51. Vinu, A., Hartmann, M., 'Adsorption of cytochrome c on MCM-41 and SBA-15: influence of pH', ***Studies in Surface Science and Catalysis***, 154: 2987-2994 (2004).
 52. Ochkur, O.V., Demin, A.A., ' Cation exchangers for selective sorption of large proteins', ***J.Chromatog. B.***, 849 (2007).
 53. Öktem, H.A., Bayramoğlu, G., Özalp, V.C., Arica M.Y., 'Single step purification of recombinant *Thermus Aquaticus* DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads', ***Biotechnol. Prog.***, 23: 146-154 (2007).
 54. Farquet, P., Kunze, A., Padeste, C., Solak, H.H., Gürsel, S.A., Scherer, G.G., ***A. Wokaun Polymer***, 48: 4936 (2007).
 55. Yavuz, E., Bayramoğlu, G., Şenkal, B.F., 'Poly(glycidylmethacrylate) brushes generated on poly(VBC) beads by SI-ATRP technique: Hydrazine and amino groups functionalized for invertase adsorption and purification', ***Journal of Chromatography B***, 887: 1479-1486 (2009).
 56. Jain, P., Gregory, L., Baker, Merlin, L.B., ' Application of polymer brushes in protein analysis and purification', ***Annu. Rev. Anal. Chem.***, 2: 387-408 (2009).
 57. Kacurakova, M., Belton, P.S., Hirsch, J., Ebringenova A., 'Hydration properties of xylan-type structures: an FTIR study of xylooligosaccharides', ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 77: 38-44 (1998).
 58. Kittur, F.S., Acharya, V.K., Tharanathan, R.N., ' Low molecular weight chitosan-preparation by depolymerization with *Arpergillus niger* pectinase and characterization', ***Carbohydrate Research***, 338: 1283-1290 (2003).
 59. Wu, Y., Yang, W.Z., Wang, C., Hu, J., Fu, S., ' Synthesis and characterization of an amphiphilic chitosan-polyactide graft copolymer', ***Carbohydrate Polym.***, 59: 165-171 (2005).
 60. Kittur, F.S., Prashanth, K.V.H., Sankar, K.D., Tharanathan, R.N., ' Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives

by differential scanning calorimetry', **Carbohydrate Polymers**, 49: 185-193 (2002).

61. Prashanth, K.V.H., Kittur, F.S., Tharanathan, R.N., 'Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions', **Carbohydrate Polymers**, 50: 27-33 (2002).
62. Bayramoğlu, G., 'Poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/chitosan dye and different metals ion immobilized Interpenetrating network membranes: Preparation and its application in metal-affinity chromatography', **J. Appl. Poly. Sci.**, 88: 1843-1853 (2003).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı adı : DAĞLI SOYDOĞAN, Hande
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 11.01.1984 – İSTANBUL
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0506 343 27 24
 E-mail : handesoydogan@hotmail.com

Eğitim derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Kimya Bölümü	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi Kimya Bölümü	2007
Lise	Adile Mermerci Anadolu Lisesi	2002

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Arica, M.Y., Soydoğan, H., Bayramoğlu, G., 'Reversible immobilization of *Candida rugosa* lipase on fibrous polymer grafted and sulfonated p(HEMA/EGDMA) beads' ***Bioprocess and Biosystems Engineering***, 33(2): 227-236 (2009).