

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**İMMOBİLİZE METAL İYON AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İÇİN POLİ(AKRİLAMİT-GLİSİDİL
METAKRİLAT-IDA) KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Şule DAŞTAN**

**Danışman
Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**İMMOBİLİZE METAL İYON AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İÇİN POLİ(AKRİLAMİT-GLİSİDİL
METAKRİLAT-IDA) KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI
VE KARAKTERİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Şule DAŞTAN**

**Danışman
Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU**

**Haziran 2023
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Şule DAŞTAN

İmza

“İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi için Poli(Akrilamit-Glisidil Metakrilat-IDA) Kriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Şule DAŞTAN

İmza

Danışman

Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

İmza

Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Zülâl KESMEN

İmza

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında engin bilgisiyle her daim yardımlarını esirgemeyen, pandemi zamanında, pes etme anlarımda, asrın felaketi depremlerde dahi desteğini eksik etmeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmasında güler yüzü ve tecrübesiyle her daim yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Seda ÖZGEN'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Azmi ve bilgisiyle tez çalışmasında yol göstericiliği ve yardımları için değerli hocam Prof. Dr. Nalân ÖZDEMİR'e çok saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmaları sırasında engin bilgisiyle analizlerde yardımlarını esirgemeyen öncelikle değerli hocam Prof. Dr. Zülâl KESMEN'e çok saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca analizlerde bıkmadan usanmadan güler yüzleri, çabaları ve sabırları ile yardımcı olan Saime Gülsüm BATMAN, Şeyma AYDIN ve Melike CANPOLAT'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvarında biriktirdiğimiz güzel anılar, hoş sohbetler, pandemi de bile verdikleri destekler için ve her daim varlıklarını yanımda hissettiğim değerli insanlar Mükerrrem Sacide AKBULUT, Tuğçe KORUCU ve Fatma ZENNECİOĞLU'na sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Bu zorlu tez yolculukta yorulma bıkmama anlarımda dahi maddi ve manevi olarak verdikleri güç ve destek için değerli annem Aysel DAŞTAN, babam Mürteze DAŞTAN ve kardeşim Mustafa DAŞTAN'a çok teşekkürlerimi sunarım.

Şule DAŞTAN

Haziran 2023, KAYSERİ

İMMOBİLİZE METAL İYON AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN POLİ(AKRİLAMİT-GLİSİDİL METAKRİLAT-IDA) KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Şule DAŞTAN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2023
Danışman: Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

ÖZET

Proteinlerin saflaştırılması, biyoteknoloji uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK) His₆-etiketli rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında yaygın bir teknik olarak uygulanmaktadır. İMAK yönteminde destek materyalleri çeşitli jel ve reçine formunda ticari olarak üretilmekte ve kullanıma sunulmaktadır. Sunulan çalışmada kriyojel formunda İMAK destek materyalleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada akrilamit (AAM), metilen bisakrilamid (MBA) ve glisidil metakrilat-iminodiasetik asit (GMA-IDA) konsantrasyonları bağımlı değişkenler olarak belirlenmiş ve deney tasarımı Design Expert 12.0.0 yazılımı ile hazırlanmıştır. Poli(akrilamit-glisidil metakrilat)-iminodiasetik asit (PAGMA-IDA) kriyojelleri serbest radikal kopolimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Ardından sentezlenen PAGMA-IDA kriyojellerine Ni²⁺ adsorplanmıştır (PAGMA-IDA-Ni²⁺). Hazırlanan kriyojeller, Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntüleme, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), şişme oranı, makro gözenek miktarı, Ni²⁺ adsorpsiyon miktarı analizleri yapılarak karakterize edilmiştir. Protein adsorpsiyon deneyleri model sistemlerde bovine serum albumin (BSA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre en yüksek şişme oranı 66,39 g H₂O/g kuru kriyojel olarak belirlenirken, maksimum makro gözenek ve adsorplanan BSA miktarı sırasıyla 41,3 g H₂O/g kuru kriyojel ve 12,3 mg BSA/g kriyojel olarak belirlenmiştir. Ayrıca maksimum adsorplanan nikel miktarı da 83,1 mg/g kuru kriyojel olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, protein saflaştırma için hazırlanan PAGMA-IDA kriyojellerinin İMAK çalışmaları için uygun ve düşük maliyetli bir alternatif olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Protein saflaştırma, İMAK, His₆-etiketli proteinler, kriyojeller, destek materyali

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(ACRYLAMIDE-
GLYCIDYL METHACRYLATE-IDA) CRYOGELS FOR IMMOBILIZED
METAL ION AFFINITY CHROMATOGRAPHY**

Şule DAŞTAN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, June 2023

Supervisor: Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

ABSTRACT

Purification of proteins has an important place in their biotechnology applications. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAK) has been applied as a common technique for purification of His₆-tagged recombinant proteins. In the IMAK method, support materials are commercially produced and offered for use in various gel and resin forms. In the presented study, IMAK support materials in cryogel form were developed. In this study, acrylamide (AAm), methylene bisacrylamide (MBA), and glycidyl methacrylate-iminodiacetic acid (GMA-IDA) concentrations were determined as dependent variables and the experimental design was prepared with Design Expert 12.0.0 software. Poly (acrylamide-glycidyl methacrylate)-iminodiacetic acid (PAGMA-IDA) cryogels were synthesized by free radical copolymerization. Then, Ni²⁺ was adsorbed onto the synthesized PAGMA-IDA cryogels (PAGMA-IDA-Ni²⁺). Prepared cryogels were characterized by Scanning Electron Microscope (SEM) imaging, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), swelling ratio, macropore amount, Ni²⁺ adsorption amount analysis. Protein adsorption experiments were performed using bovine serum albumin (BSA) in model systems. According to the results of the analysis, the highest swelling rate was determined as 66.39 g H₂O/g dry cryogel, while the maximum macropore and adsorbed BSA amount were determined as 41.3 g H₂O/g dry cryogel and 12.3 mg BSA /g cryogel, respectively. In addition, the maximum adsorbed nickel amount was determined as 83.1 mg/g dry cryogel. In this study, it has been shown that PAGMA-IDA cryogels prepared for protein purification can be a suitable and low-cost alternative for IMAK studies.

Keywords: Protein purification, IMAC, His₆-tagged proteins, cryogels, support material

İÇİNDEKİLER

İMMOBİLİZE METAL İYON AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN POLİ(AKRİLAMİT-GLİSİDİL METAKRİLAT-İDA) KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLERve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Proteinler	3
1.1.1. Amino Asitler	4
1.1.2. Rekombinant Proteinler.....	6
1.2. Proteinleri Saflaştırma Yöntemleri	9
1.2.1. Kromatografi.....	10
1.2.2. İyon Değişim Kromatografisi (IEC).....	11

1.2.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)	13
1.2.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC)	14
1.2.5. Afinite Kromatografisi	15
1.2.6. İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK)	17
1.2.6.1. İMAK Destek Materyalleri	19
1.2.6.2 İMAK'ta Kullanılan Metal İyonları.....	21
1.2.6.3 İMAK'ın Avantajları ve Dezavantajları.....	21
1.2.6.4 His ₆ -etiketli Proteinlerin Saflaştırılması için İMAK Uygulamaları ..	23
1.3. Kriyojeller	23
1.3.1. Kriyojellerin Oluşumu	25
1.3.2. Kriyojel Oluşumunda Etkili Faktörler	26
1.3.2.1. Donma Hızı ve Donma Sıcaklığı	26
1.3.2.2. Monomer Öncüllerin Konsantrasyonu	27
1.3.2.3. Çapraz Bağlama	28
1.3.3. Kriyojellerle İlgili Yapılan İMAK Çalışmaları.....	28

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal	32
2.2. Yöntem	34
2.2.1. PAGMA-IDA Kriyojellerin Sentezi	34
2.2.2. PAGMA-IDA Kriyojellerin Yıkanması	35
2.2.3. Karakterizasyon Çalışmaları.....	36
2.2.3.1. SEM ve FTIR Analizlerinin Yapılması	36
2.2.3.2. Şişme Oranı	37
2.2.3.3. Makro Gözenek Miktarı.....	38
2.2.4. PAGMA-IDA Kriyojellerine Ni ²⁺ İyonu Adsorpsiyonu	38

2.2.5. PAGMA-IDA-Ni ²⁺ Kriyojellerine BSA Adsorpsiyonunda pH Taraması	39
2.2.6. PAGMA-IDA-Ni ²⁺ Kriyojellerine BSA Adsorplanması.....	41
2.2.7. PAGMA-IDA Kriyojellerin Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi	42

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon Sonuçları.....	43
3.1.1. Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri.....	43
3.1.2. FTIR Analizi.....	48
3.1.3. Şişme Oranı	50
3.1.3.1. Şişme Oranına AAm ve MBA Etkisi	51
3.1.3.2. Şişme Oranına AAm ve GMA-IDA Etkisi	52
3.1.3.3. Şişme Oranına GMA-IDA ve MBA Etkisi.....	53
3.1.4. Makro Gözenek Miktarı	53
3.1.4.1. Makro Gözenek Miktarına AAm ve MBA Etkisi	55
3.1.4.2. Makro Gözenek Miktarına AAm ve GMA-IDA Etkisi	56
3.1.4.3. Makro Gözenek Miktarına GMA-IDA ve MBA Etkisi.....	57
3.2. Ni ²⁺ Adsorpsiyonu.....	58
3.2.1. Ni ²⁺ Adsorpsiyonun Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi	59
3.2.2. Ni ²⁺ İyonu Adsorpsiyonuna AAm ve MBA Etkisi	60
3.2.3. Ni ²⁺ İyonu Adsorpsiyonuna AAm ve GMA-IDA Etkisi	61
3.2.4. Ni ²⁺ İyonu Adsorpsiyonuna MBA ve GMA-IDA Etkisi.....	62
3.3. BSA Adsorpsiyonuna pH Etkisi.....	63
3.4. BSA Adsorpsiyonu	64
3.4.1. BSA Adsorpsiyonuna AAm ve MBA Etkisi	66

3.4.2. BSA Adsorpsiyonuna AAm ve GMA-IDA Etkisi	67
---	----

3.4.3. BSA Adsorpsiyonuna GMA-IDA ve MBA Etkisi	68
---	----

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA	73
----------------	----

EKLER.....	86
------------	----

EK 1.....	86
-----------	----

ÖZGEÇMİŞ.....	88
---------------	----

KISALTMALAR

İMAK	: İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi
AAm	: Akrilamit
GMA	: Glisidil metakrilat
IDA	: İminodiasetik asit
GMA-IDA	: Glisidil metakrilat – iminodiasetik asit
MBA	: <i>N, N'</i> - metilen bisakrilamid
APS	: Amonyum persülfat
Ni ²⁺	: Nikel +2 iyonu
Zn ²⁺	: Çinko +2 iyonu
Cu ²⁺	: Bakır +2 iyonu
Co ²⁺	: Kobalt +2 iyonu
Hg ²⁺	: Civa +2 iyonu
Ag ²⁺	: Gümüş +2 iyonu
Fe ³⁺	: Demir +3 iyonu
TEMED	: <i>N,N,N,N'</i> -Tetrametiletilendiamin
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
µm	: Mikrometre
g	: gram
M	: Molar
mM	: Milimolar
°C	: Santigrat derece
R ²	: Belirleme katsayısı
RSM	: Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)
ANOVA	: Varyans Analizi (Analysis of Variance)
EDX	: Enerji Dağılımlı X-ışınları Spektroskopisi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Amino asitlerin R gruplarına göre sınıflandırılması	5
Tablo 1.2. Yaygın olarak kullanılan bazı afinite etiketlerinin avantajları ve dezavantajları	7
Tablo 1.3. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	10
Tablo 1.4. Kriyojellerle ilgili literatür taraması.	29
Tablo 2.1. PAGMA-IDA kriyojel hazırlama deney tasarımı.	32
Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.	33
Tablo 2.3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar	33
Tablo 3.1. Şişme testi istatistiksel analiz modeli.	50
Tablo 3.2. Quadratic modele ait ANOVA tablosu.	50
Tablo 3.3. Makro gözeneklilik istatistiksel analiz modeli.	54
Tablo 3.4. Quadratic modele ait ANOVA tablosu.	54
Tablo 3.5. Ni ²⁺ adsorpsiyonu istatistiksel analiz modeli.	59
Tablo 3.6. Linear modele ait ANOVA tablosu.	60
Tablo 3.7. BSA adsorpsiyonunun istatistiksel analiz modeli.	65
Tablo 3.8. Quadratic modele ait ANOVA analizi.	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Bir amino asidin temel yapısı	4
Şekil 1.2. Bir proteinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının şematik diyagramı.....	6
Şekil 1.3. Rekombinant proteinlerin saflaştırılması için afinite etiketlerinin oluşturulmasında kullanılan temel prensibin açıklayıcı gösterimi	8
Şekil 1.4. Artan iyonik güç elüsyon adımlarıyla IEC ilkesi.....	13
Şekil 1.5. Sulu bir çözeltideki proteinler arasındaki (A) ve proteinler ile bir HIC adsorbanındaki hidrofobik bir ligand arasındaki (B) hidrofobik etkileşimi gösteren şematik diyagram.....	14
Şekil 1.6. GFC'nin ayırma süreci; (a) Tampon ve numune şişeleri ve GFC desteği ile yüklenmiş bir kolon ile yerçekimi akışının yardımıyla ayrıştırılan deney düzeneği, (b) Üç bileşenli bir karışımın numune enjeksiyonu.....	15
Şekil 1.7. Afinite kromatografisinin prensibi.....	16
Şekil 1.8. İMAK reçinesi ile His-etiketli rekombinant protein saflaştırılmasının gösterimi.....	17
Şekil 1.9. İMAK için metal iyonları ile şelat halindeki üç- (IDA), dört- (NTA) ve beş uçlu (TED) ligandların yapısı.....	18
Şekil 1.10. Akrilamidin polimerizasyonunun kimyasal gösterimi	20
Şekil 1.11. Bir polimer jelin şematik gösterimi	24
Şekil 1.12. Kriyojel oluşumunun basamakları	26
Şekil 1.13. Çapraz bağlı pAAm-kriyojelin SEM görüntüsü	27
Şekil 2.1. PAGMA-IDA kriyojelleri hazırlama akış şeması.....	35
Şekil 2.2. PAGMA-IDA kriyojelleri yıkama akış şeması.....	36
Şekil 2.3. PAGMA-IDA-Ni ²⁺ kriyojellerine BSA adsorpsiyonunda pH taraması için akış şeması.....	40
Şekil 3.1. GMA-IDA içermeyen 6 numaralı kriyojelin ıslak ve kuru haldeki mikroskop görüntüsü.....	44
Şekil 3.2. GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin ıslak ve kuru haldeki mikroskop görüntüsü.....	44

Şekil 3.3. Nikel adsorplanmış GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin ıslak ve kuru haldeki mikroskop görüntüsü.	44
Şekil 3.4. GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojele ait SEM görüntüsü.	45
Şekil 3.5. Ni^{2+} adsorpsiyonu sonrası GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojele ait SEM görüntüsü.	46
Şekil 3.6. Ni^{2+} adsorpsiyonu sonrası 7 numaralı PAGMA-IDA kriyojeline ait EDX analizi sonucu.	47
Şekil 3.7. GMA-IDA içermeyen 6 numaralı kriyojelin spektrumu.	48
Şekil 3.8. GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin spektrumu.	49
Şekil 3.9. Ni^{2+} adsorplanmış GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin spektrumu.	49
Şekil 3.10. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; şişme oranına AAm (g/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.	51
Şekil 3.11. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; şişme oranına GMA-IDA (mL/mL) ve AAm (g/mL) etkisi.	52
Şekil 3.12. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; şişme oranına GMA-IDA (mL/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.	53
Şekil 3.13. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; makro gözenek miktarına AAm (g/mL) ve MBA(g/mL) etkisi.	56
Şekil 3.14. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; makro gözenek miktarına AAm (g/mL) ve GMA-IDA (mL/mL) etkisi.	57
Şekil 3.15. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; makro gözenek miktarına GMA-IDA (mL/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.	58
Şekil 3.16. Ni^{2+} standart çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu.	59
Şekil 3.17. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kuru kriyojel başına adsorplanan mg Ni^{2+} iyonları ile AAm ve MBA arasındaki ilişki.	61
Şekil 3.18. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kuru kriyojel başına adsorplanan mg Ni^{2+} iyonları ile AAm ve GMA-IDA arasındaki ilişki.	62
Şekil 3.19. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kuru kriyojel başına adsorplanan mg Ni^{2+} iyonları ile MBA ve GMA-IDA arasındaki ilişki.	63
Şekil 3.20. pH 4-8 arasında g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarını gösteren grafik.	64
Şekil 3.21. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarına AAm (g/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.	66

- Şekil 3.22. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarına AAm (g/mL) ve GMA-IDA(mL/mL) etkisi.67
- Şekil 3.23. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarına GMA-IDA(mL/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.68



GİRİŞ

Proteinler, canlı organizmada sayısız roller üstlenir ve biyolojik organizmalardaki neredeyse tüm yaşam süreçlerinde yer almaktadır. Hücrenin yapısında ve hücreye ait bazı işlevlerde önemli role sahip değişik sayı ve çeşitte aminoasit birimleri içeren ve bu aminoasitlerin polipeptit zincirleriyle bir araya gelmesiyle oluşan biyopolimerlerdir. Belirli bir aminoasit sayısına, dizisine, belirli bir molekül ağırlığına, kimyasal içeriğe ve kendine özgü üç boyutlu bir yapıya sahiptir [1,2].

Proteinlerin, ayrılması ve saflaştırılması için birçok teknik geliştirilmiştir. Bu gelişmelere bağlı olarak son elli yılda biyoteknolojide önemli gelişmelere sağlanmıştır [3]. Bir proteinin saflığı, yapı ve fonksiyon çalışmaları veya potansiyel uygulaması için bir ön koşuldur. Günümüzde kromatografi, elektroforez, tuz fraksiyonu, filtreleme gibi birçok protein saflaştırma tekniği mevcuttur. Proteinlerin saflaştırılmasında iyon değişim kromatografisi (IEC), hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), jel filtrasyon kromatografisi (GFC), afinite kromatografisi (AC) yüksek verimlilikleri nedeniyle tercih edilen kromatografik yöntemlerdendir [4]. İlk kez 1975'te Porath ve arkadaşları tarafından tanıtılan immobilize metal iyon afinite kromatografisi (İMAK) tekniğini geliştirmiştir. Günümüzde İMAK; rekombinant proteinlerin analizi, serum proteinlerinin saflaştırılması, protein ve peptidlerin karakterizasyonu, fosfopeptidlerin izolasyonu, oligonükleotid, RNA, DNA gibi makromoleküllerin izolasyon işlemleriyle birçok biyokimyasal sürecin açıklanmasında kullanılmıştır [5,6]. İMAK yönteminde protein saflaştırılmasında destek materyali olarak kriyojeller kullanılmaktadır. Kriyojeller, çapraz bağlarla sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyonla sentezlenen üç boyutlu ve makro gözenekli hidrojellerdir. Kriyojeller biyoteknoloji ve biyotıp başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Literatürde, sentetik ve doğal polimerlerin kriyopolimerizasyonu ile üretilen kriyojeller ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, protein saflaştırılmasında kullanılmak üzere akrilamit (AAM)-metilen bisakrilamid (MBA) çapraz bağlı ve glisidil metakrilat (GMA) katkılı kriyojeller serbest radikal kopolimerizasyonu tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle iminodiasetik asitin bazik ortamda GMA ile verdiği tepkimiyle şelat yapma özelliği olan katkı monomeri sentezlenmiştir. Daha sonra tek basamakta poli(akrilamit-glisidil metakrilat-iminodiasetik asit) (PAGMA-IDA) kriyojelleri hazırlanmıştır. Farklı sentez parametrelerinde hazırlanan kriyojellerin karakterizasyonunda optik mikroskopi görüntüleme, SEM görüntüleme, FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Ayrıca hazırlanan jellerde, şişme oranı ve makro gözenek miktarı analizleri yapılmıştır. Bu kapsamda sentez parametrelerinin PAGMA-IDA kriyojellerin Ni^{2+} iyonu bağlama kapasiteleri ve model sistemlerde BSA adsorpsiyon kapasiteleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında; İMAK yönteminde His₆-etiketli rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında ticari destek materyallerine alternatif olabilecek, kolay ve düşük maliyetle hazırlanan, tek basmakta ve kısa sürede adsorpsiyon ve elüsyonu sağlayan PAGMA-IDA destek materyallerinin sentezlenmesi amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLERve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Proteinler

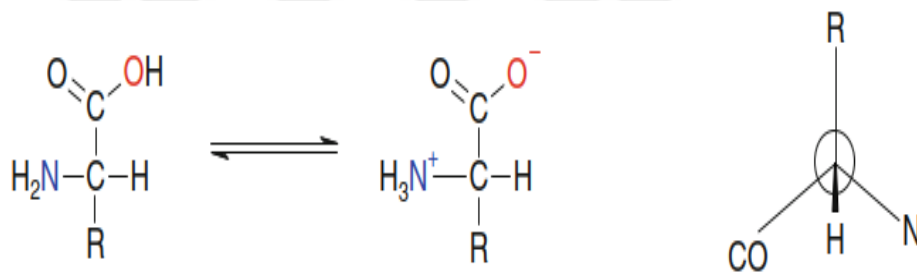
Proteinler aminoasit birimlerinden oluşan makromoleküllerdir. Amino asit birimleri birbirine peptit bağlarıyla bağlanmıştır. Proteinler yaşamın sürdürülmesi için hücre içinde yalnızca ribozomlarda sentezlenir. Hücrenin toplam kuru kütleinin yaklaşık %50'sini oluşturan bu makromoleküller birçok biyokimyasal reaksiyonda fonksiyonel role sahiptir. Proteinler, temelde karbon, hidrojen, oksijen, azot, kükürt elementlerinin yanında fosfor, demir ve çinko gibi gibi elementler de içermektedir. Değişik sayı ve çeşitte aminoasit içeren proteinler birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak polipeptitleri meydana getiririr. Proteinler belli bir aminoasit sayı ve dizisine, belli bir molekül ağırlığına, kimyasal içeriğe ve üç boyutlu yapıya sahiptir. Proteinler biyolojik organizmalardaki neredeyse tüm yaşam proselerinde yer almaktadır. Organizmalarda sahip olduğu işlevler aşağıda maddeler halinde verilmektedir [1, 2]:

- Vücudun yapıtaşdırlar.
- Organizmada taşıma ve depolamada görev almaktadırlar.
- Vücuda mekanik destek sağlarlar.
- Vücut dokularının oluşum ve onarımında kullanılırlar.
- Enzimlerin tümü, hormonların birçoğu ve virüsler protein yapısındadır.
- Vücudun elzem aminoasitlere olan ihtiyacını karşılarlar.
- Sinir impulslarının ortaya çıkması ve iletimini sağlarlar.
- Kasların uyumlu hareket etmesinde görev alırlar.
- Vücudun immün savunma sistemlerinde görevlidir.

- Çoğu kez gıdaların duysal özellikleri ve besleyici değerini belirlerler.
- Canlıda başkalaşım ve büyüme denetimini sağlarlar.

1.1.1. Amino Asitler

Aminoasitler , α karbon adı verilen merkezi bir karbon atomuna bağlı amino (NH^3^+) ve karboksil (COO^-) gruplarını içeren organik bileşiklerdir. α karbonuna bağlı kalan atomlar, tek bir hidrojen atomu ve R grubu veya yan zincirdir (Şekil 1.1). Yan zinciri bir hidrojen atomundan oluşan en basit amino asit glisindir (Gly). Genellikle canlı organizmalarda L-formundadır [7- 9].



Şekil 1.1. Bir amino asidin temel yapısı [7].

Aminoasitler, yan zincirlerine göre sınıflandırılabilir. Tablo 1.1.'de yaygın olarak bulunan 20 amino asit, kısaltmaları ve "ortalama" proteindeki oluşum yüzdeleri görülmektedir [9].

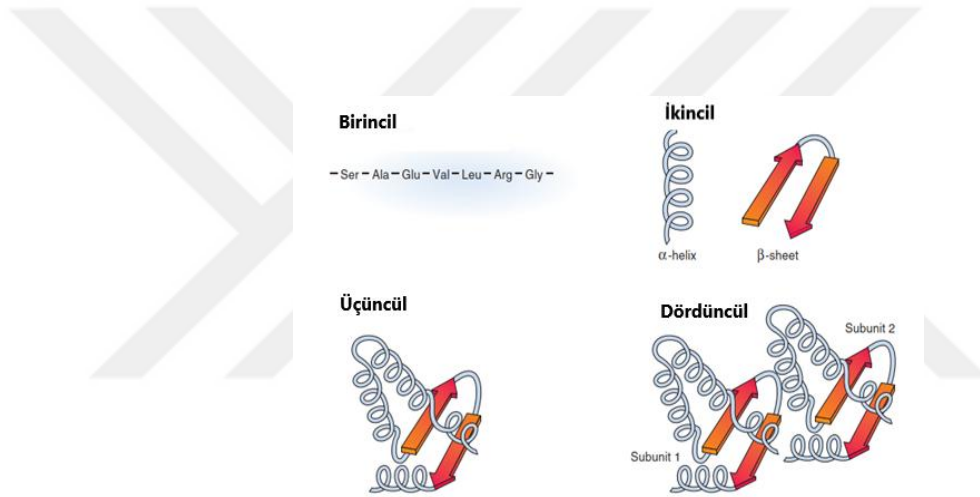
Tablo 1.1. Amino asitlerin R gruplarına göre sınıflandırılması [9].

R Grubu Sınıflandırması	Amino Asit	Kısaltılmış İsmi	Moleküler Kütle (Da)	'Ortalama' proteinde yüzde oluşum
Polar olmayan, alifatik	Glisin	Gly (G)	75	7.2
	Alanin	Ala (A)	89	8.3
	Valin	Val (V)	117	6.6
	Lösin	Leu (L)	131	9.0
	İzolösin	Ile (I)	131	5.2
	Prolin	Pro (P)	115	5.1
Aromatik	Tirozin	Tyr (Y)	181	3.2
	Fenilalanin	Phe (F)	165	3.9
	Triptofan	Trp (W)	204	1.3
Polar ama yüksüz	Sistein	Cys (C)	121	1.7
	Serin	Ser (S)	105	6
	Metionin	Met (M)	149	2.4
	Treonin	Thr (T)	119	5.8
	Asparajin	Asn (N)	132	4.4
	Glutamin	Gln (Q)	146	4.0
Pozitif Yüklü	Arjinin	Arg (R)	174	5.7
	Lizin	Lys (K)	146	5.7
	Histinin	His (H)	155	2.2
Negatif Yüklü	Aspartik Asit	Asp (D)	133	5.3
	Glutamik Asit	Glu (E)	147	6.2

Yan zincirlerdeki amino, karboksil, imidazolil, guanidino, fenolik ve sülfidril grupları iyonlaşabilir. Proteinlerdeki, bu iyonlaşabilir grupların çoğu kendilerini çevreleyen sulu ortam ile etkileşime girebilecekleri molekülün dışında olacak şekilde kıvrılır. Bu grupların bazıları yapı içinde yer alır ve protein molekülünün üç boyutlu yapısını stabilize etmeye yardımcı olan elektrostatik çekimlerde yer alabilir. Bir protein molekülündeki pozitif ve negatif grupların nispi sayıları, çözünürlük ve elektroforetik hareketlilik gibi fiziksel davranışını etkiler [10].

Proteinlerin sahip olduğu dört farklı yapı Şekil 1.2'deki diyagramda görülmektedir. Bir proteindeki amino asit dizisine onun birincil yapısı denir. Hücrede protein sentezi sırasında amino asitlerin eklenme sırası N-terminalinden başlayıp C-terminalinde bitmektedir. İkincil yapı, yan zincirlerin atomlarının dahil olmadığı çeşitli yerel

konformasyon tiplerini içerir ve merkez atomları arasında düzenli bir tekrar eden hidrojen bağı oluşumu modeliyle oluşturulur. α -helix ve β -tabakası yapıları ikincil yapıda meydana gelen konfigrasyonlardır. Proteinin üçüncül yapısı onun üç boyutlu yapısını ifade eder. Polipeptit zincirinin birincil yapısında birbirinden önemli ölçüde uzakta bulunabilen amino asit kalıntıları arasındaki etkileşimler tarafından üretilir. Kuaterner yani dördüncül yapı, birden fazla polipeptit zincirinden oluşan bir proteindeki alt birimlerin uzaysal düzenini ifade eder. Alt birimler, disülfid bağlarının yanı sıra üçüncül yapısını oluşturmak için tek bir zincirin çeşitli bölümlerini birleştiren aynı tip kovalent olmayan etkileşimlerle birleştirilir [8, 11].



Şekil 1.2. Bir proteinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının şematik diyagramı [11].

1.1.2. Rekombinant Proteinler

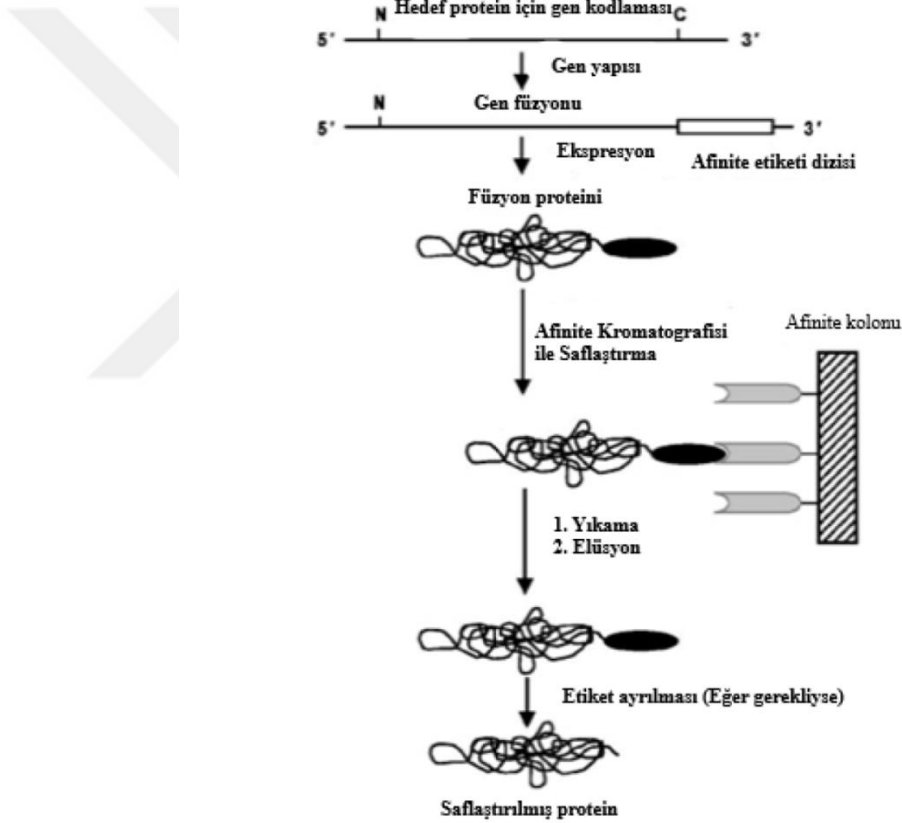
Rekombinant DNA teknolojisi; biyoteknolojik aşılar, antibiyotikler, hormonlar, monoklonal antikorlar, diagnostik maddeler gibi birçok üründe kullanılmaktadır. Rekombinant proteinler de bu ürünlerden biridir. Üretilen protein geni, prokaryotik ya da ökaryotik bir konakçı organizmaya aktararak istenen proteinin üretimi gerçekleştirilebilir. En kolay gerçekleştirilebilen prokaryotik protein ekspresyonlarından biri *Escherichia coli* (*E.coli*)'dir. *E.coli*, tanımlanmış bir organizmadır, üretim ortamı ucuzdur ve elde edilecek proteinin saflaştırılması kolaydır [12, 13]. Protein

saflaştırılmasında rekombinant teknolojilerinden faydalanılmaktadır. Bu süreçte belirli gruplara afinitesi olan amino asit veya peptit kalıntısı proteine eklenmektedir. Yaygın olarak kullanılan afinite etiketlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Yaygın olarak kullanılan bazı afinite etiketlerinin avantajları ve dezavantajları [14].

Tag (etiket)	Avantajlar	Dezavantajlar
GST (14, 20, 22)	Etkili translayon başlatma Ucuz afinite reçinesi Hafif elüsyon koşulları	Yüksek metabolik yük Homodimerik protein Çözünürlüğü artırmaz
MBP (14, 23)	Etkili translayon başlatma Ucuz afinite reçinesi Çözünürlüğü artırma Hafif elüsyon koşulları	Yüksek metabolik yük
FLAG (16)	Düşük metabolik yük Yüksek özgüllük	Pahalı afinite reçinesi Sert elüsyon koşulları
BAP (17, 18)	Düşük metabolik yük Hafif elüsyon koşulları Yönlendirilmiş bir oryantasyonda proteinleri immobilize etmek için uygun araçlar sağlar	Pahalı afinite reçinesi Enzimatik biyotinyasyonun değişken etkinliği Afinite reçinesi üzerinde <i>E. coli</i> biotin karboksil taşıyıcı proteinin birlikte saflaştırılması Çözünürlüğü artırmaz
His₆ (14, 24)	Düşük metabolik yük Ucuz afinite reçinesi Hafif elüsyon koşulları Etiket hem doğal hem de denatüre edici koşullar altında çalışır	İMAK'ın özgüllüğü diğer afinite yöntemleri kadar yüksek değildir. Çözünürlüğü artırmaz
STREP (19, 20)	Düşük metabolik yük Yüksek özgüllük Hafif elüsyon koşulları	Pahalı afinite reçinesi Çözünürlüğü artırmaz
CBP (14, 21)	Düşük metabolik yük Yüksek özgüllük Hafif elüsyon koşulları	Pahalı afinite reçinesi Çözünürlüğü artırmaz

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması için bu tür afinite etiketleri ile kullanılan temel yöntem Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Bu yöntem, bir hedef genin seçilmesini, bir afinite etiketi sekansının eklenmesini, sekansın bir ekspresyon vektörüne eklenmesini, ekspresyonun indüklenmesini, bir afinite kromatografi sorbenti kullanılarak hedef proteinin saflaştırılmasını, ekstra proteinlerin ve hücresel bileşenlerin çıkarılmasını ve gerekirse enzimatik bölünme ve proteini yeniden saflaştırma yoluyla afinite etiketinin çıkarılmasını içermektedir [15].



Şekil 1.3. Rekombinant proteinlerin saflaştırılması için afinite etiketlerinin oluşturulmasında kullanılan temel prensibin açıklayıcı gösterimi [15].

Yüksek verimli protein saflaştırması için literatürde en yaygın olarak kullanılan afinite etiketi polihistidin-etiketidir (His₆-etiketi). Küçük boyutlu ve nispeten ucuz olan His₆-etiketi, zorlu sterilizasyon koşulları altında çoklu rejenerasyon döngülerine dayanabilir. Yüksek bir bağlama kapasitesi sergileyen bir kromatografik matris ile etkileşime

girebilir. Görece ılımlı şartlarda elüsyon koşullarına sahiptir, böylece hedef protein denetürasyona uğramadan geri kazanılabilir [14]. Histidin imidazol halkası üzerindeki elektron donör grupları, immobilize geçiş metali ile kolayca koordinasyon bağları oluşturduğundan, histidin, immobilize metal iyon matrisleri ile en güçlü etkileşimi sergileyen amino asittir. Ardışık histidin kalıntılarının dizilerini içeren peptitler, İMAK üzerinde verimli bir şekilde tutulur [16]. Histidin kalıntıları içeren peptit ve proteinleri saflaştırmak için ilk çalışma Hochuli ve ark. tarafından 1987'de yapılmıştır. İMAK için destek materyali üretilirken, adsorban yüzeyinde metal şelat oluşturabilen fonksiyonel gruplara ihtiyaç vardır. Bu amaçla literatürde iminodiasetik asit (IDA) ve nitrilotriasetik asit (NTA) en sık kullanılan ligantlardır. Bu konuda yapılan bir çalışmada, NTA'nın Cu^{2+} ve Ni^{2+} iyonunu güçlü bir şekilde şelatladığı bilinen iminodiasetik asitten (IDA) üstün olduğu bulunmuştur [17]. Ni^{2+} -NTA kullanılarak hazırlanan İMAK malzemesi ile yapılan bir uygulamada, polihistidin etiketli fare dihidrofolat redüktaz enzim başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır [18].

1.2. Proteinleri Saflaştırma Yöntemleri

Son elli yılda biyobilim ve biyoteknolojide yapılan ilerlemelerle proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için birçok teknik ve yöntem geliştirilmiştir. Gelişen teknolojiyle birlikte protein ayrımları daha öngörülebilir ve kontrol edilebilir hale gelmiştir. Protein saflaştırılması zaman, maliyet, çaba ve uygun ekipman gerektirmektedir. Protein saflaştırma işlemleri, proteinin işlevini tanımlamak, proteinin yapısını belirlemek, istenen bir ürünü üretmek ve teşhis veya tedavi için uygulanır [3, 19].

Proteinin yapısı, işlevi ve özelliklerinin bilinmesi, saflaştırma yönteminin belirlenmesinde önemlidir. Saflaştırma sürecinin temel adımlarını belirlemek için moleküler ağırlık, izoelektrik nokta, hidrofobiklik, karbohidrat varlığı, substratlara olan afinite ve metal iyonlara duyarlılık gibi bilgiler yardımcı olabilir [19]. Proteinler, peptit zincirlerinin üç boyutlu yapılarında bulunur ve bu yapılar lipitler ve karbonhidratlar gibi protein dışı bileşenlerde bağlanabilir. Proteinin özellikleri, amino asitlerin sayısı, türü ve proteinin yapısındaki protein dışı bileşenler tarafından belirlenir. Üç boyutlu yapı, kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlerle stabilize edilir. Bu yapısal bütünlüğün

bozulması, denatürasyona ve proteinle ilişkili herhangi bir aktivitenin kaybedilmesine neden olur [20].

1.2.1. Kromatografi

Protein saflaştırma yöntemlerinden biri olan kromatografi, “renk” ve yazmak” anlamına gelen yunanca “chroma” ve “graphein” kelimelerinden türetilen, ilk olarak 1903 yılında Mikhail Tswett tarafından tanımlanan ve ayrılacak bileşenlerin bir sabit faz ve hareketli faz arasında dağıtıldığı en önemli enstrümental analiz yöntemlerinden biridir [21, 22]. Dağılma, hidrojen bağı, dipol dipol kuvvetleri, elektrostatik etkiler gibi temel moleküller arası etkileşimlere bağlı olarak gerçekleşir [23]. Ayrılma sonrası çözünen maddeler tanımlanabilir ve ölçülebilir. Kromatografik yöntemler; ayrılma mekanizmaları, uygulama biçimi ve faz tiplerine göre gruplandırılabilir (Tablo 1. 3).

Tablo 1.3. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması [23].

Ayrılma Mekanizmalarına Göre	Adsorpsiyon kromatografisi
	Partisyon kromatografisi
	İyon değiştirme kromatografisi
	Jel filtrasyon kromatografisi
Uygulama Biçimine Göre	Düzlemsel Kromatografi
	- Kâğıt kromatografisi
	- İnce tabaka kromatografisi (TLC)
	Kolon kromatografisi
Faz Tiplerine Göre	-Gaz kromatografisi
	-Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)
	Sıvı kromatografisi (LC)
	Sıvı-Katı kromatografisi
	Sıvı-Sıvı kromatografisi
	Gaz kromatografisi (GC)

Protein saflaştırmada kromatografik yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kromatografi 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett'e akredite edilmesine rağmen 1930'ların başında potansiyeli fark edilmiştir. Günümüzde inorganik bileşikler, enzimler

ve proteinler gibi biyolojik maddelerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Proteinlerin saflaştırılması için ilk kromatografi uygulaması 1960'larda başlamış olup proteinlerin saflaştırılmasında temel olarak iyon değişim, hidrofobik etkileşim, jel filtrasyon ve afinite kromatografisi teknikleri kullanılmaktadır [24].

1.2.2. İyon Değişim Kromatografisi (IEC)

İyon değişim kromatografisi (IEC) ilk 1938'de Taylor ve Urey tarafından rapor edilmiştir ve 1939'da Samuelson tarafından zeolit reçine kullanılarak lityum ve potasyum izotoplarını ayırmada kullanılmıştır. IEC, iyonların veya polar moleküllerin, çözünmeyen bir destek üzerinde immobilize edilmiş zıt yüklü iyon değişim gruplarının etkileşimleriyle (çoğunlukla tersinir adsorpsiyon yoluyla) ayrılabilirdiği bir tür kromatografidir. IEC sulu bir mobil faza sahiptir çünkü bu tür çözeltilerde iyon oluşumu tercih edilir ve tamponlar genellikle belirli bir pH'a ayarlanır. Bu teknik, protein saflaştırmasında ve peptit ayrımı için proteomik/peptidomikte eşit başarı ile uygulanmaktadır [25, 34].

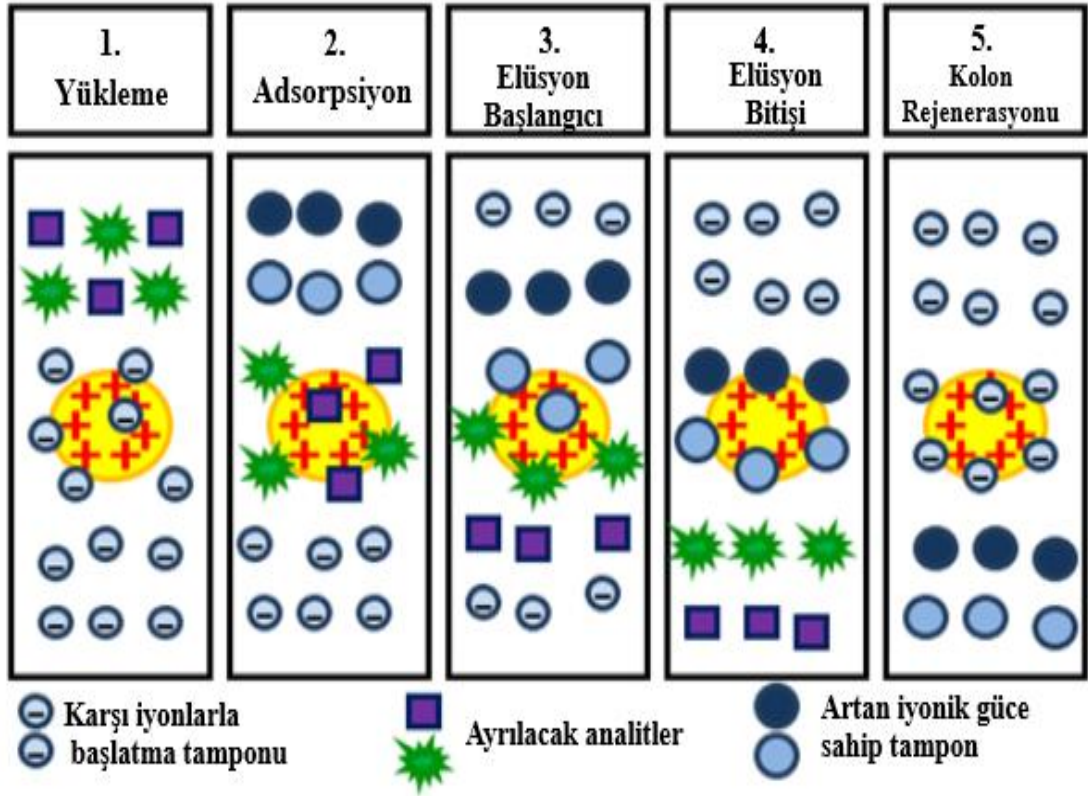
Protein, ortamın pI ve pH'ına bağlı olarak yüzey yükleri taşır. İyon değişim sürecinde adsorpsiyonda yeterli yüzey alanı sağlamak için genellikle gözenekli partiküller kullanılır. Bu matris üzerinde, pozitif veya negatif yüklü yüklü bir ligand immobilize edilir. Kapasiteyi arttırmak için, küçük yüklü bir ligand yerine, matris üzerine yüklü bir polimer de aşılanabilir [20, 26].

Katyon ve anyon değiştiricileri olarak iki farklı iyon değiştirici vardır. Katyon değiştiriciler negatif yüklü iken anyon değiştiriciler pozitif yüklüdür. Protein, pI'sının üstünde negatif yüklüdür ve bir anyon değiştiriciye bağlanır, pI'sının altında pozitif yüklüdür ve katyon değiştiricilere bağlanır. İyon değiştiricinin kendisi bir asit veya baz gibi davranır ve yüklerin orantısızlığı pH'a bağlıdır. Güçlü iyon değiştiriciler, güçlü bir asit veya baz gibi davranır ve geniş bir pH aralığında yükü değiştirmez, ancak zayıf iyon değiştiricilerin yüzey yükleri pH değerine bağlı olarak değişir. Bu özellik, seçicilik kazanmak veya elüsyon için pH gradyanları uygulanarak da kullanılabilir [27]. Bu kapsamda yürütülen bir çalışmada, model protein olarak seçilen sığır serum albumininin

(BSA) saflaştırılması için *N,N*-dimetilaminopropil akrilamit (DMPAA) ticari reçine olan Sepharose FF üzerine atom transfer radikal polimerizasyonu ile aşılıyarak yeni bir anyon değiştirici geliştirilmiştir (FF-pDMPAA). Çalışma sonuçlarına göre uygun iyonik kapasitelere sahip FF-pDMPAA reçinelerin, yüksek performanslı protein kromatografisi için uygun olduğu belirlenmiştir [28].

IEC'ye dayalı çoğu ayırma Şekil 1.4'te sunulan prosedürü tamamlamak için aşağıdaki beş adımı içerir [26]:

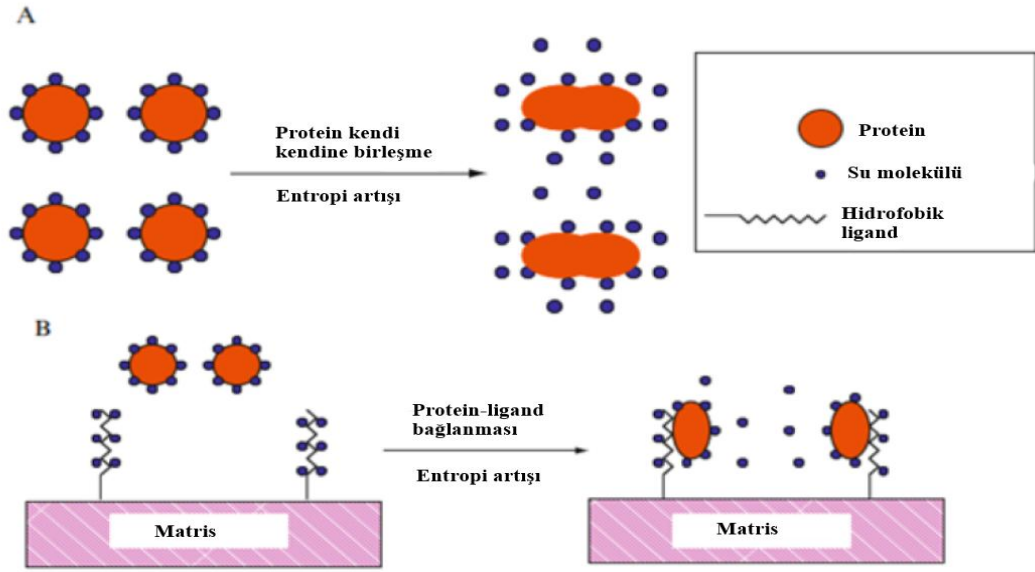
1. Başlangıç koşulları (kolon dengeleme): Analiz için kolonun hazırlanması.
2. Numune maddelerin kolondaki sabit fazda adsorpsiyonu.
3. Desorpsiyon başlangıcı: Genellikle mobil fazın pH'ını veya iyonik gücünü değiştirerek.
4. Desorpsiyonun sonu: Daha önce uygulanan koşullar altında ayrıştırılmamış tüm maddeleri kolondan çıkarmak için.
5. Rejenerasyon: Başlangıç koşulları ile kolonun yeniden dengelenmesi ve kolonun sonraki deneyler için hazırlanması.



Şekil 1.4. Artan iyonik güç elüsyon adımlarıyla IEC ilkesi [26].

1.2.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)

HIC, proteinlerin hidrofobikliğinden yararlanılarak proteinlerin yüzeyindeki immobilize hidrofobik ligandlar ve polar olmayan bölgeler arasındaki hidrofobik etkileşimler ile saflaştırmayı sağlayan kromatografi çeşitlerinden biridir. Mobil fazda yüksek tuz konsantrasyonu ile adsorpsiyon artırılarak ve elüentin tuz konsantrasyonu azaltılarak elüsyon sağlanır. Bu nedenle, bu tip kromatografi için 'tuz destekli adsorpsiyon' terimi kullanılabilir [29]. İlk hidrofobik adsorbanlar Yon (1972) tarafından sentezlenmiştir. Destek materyali olan ticari Sepharose 6B reçinesini siyanojen bromür ile aktive ettikten sonra jele 1,10-diaminodekan bağlanmıştır. İmmobilize ligandların konsantrasyonu çok yüksek olup ortaya çıkan adsorban hem iyonik hem de hidrofobik karakter göstermiştir [30]. Bu uygulamanın temel aşamaları Şekil 1.5'te gösterilmektedir.



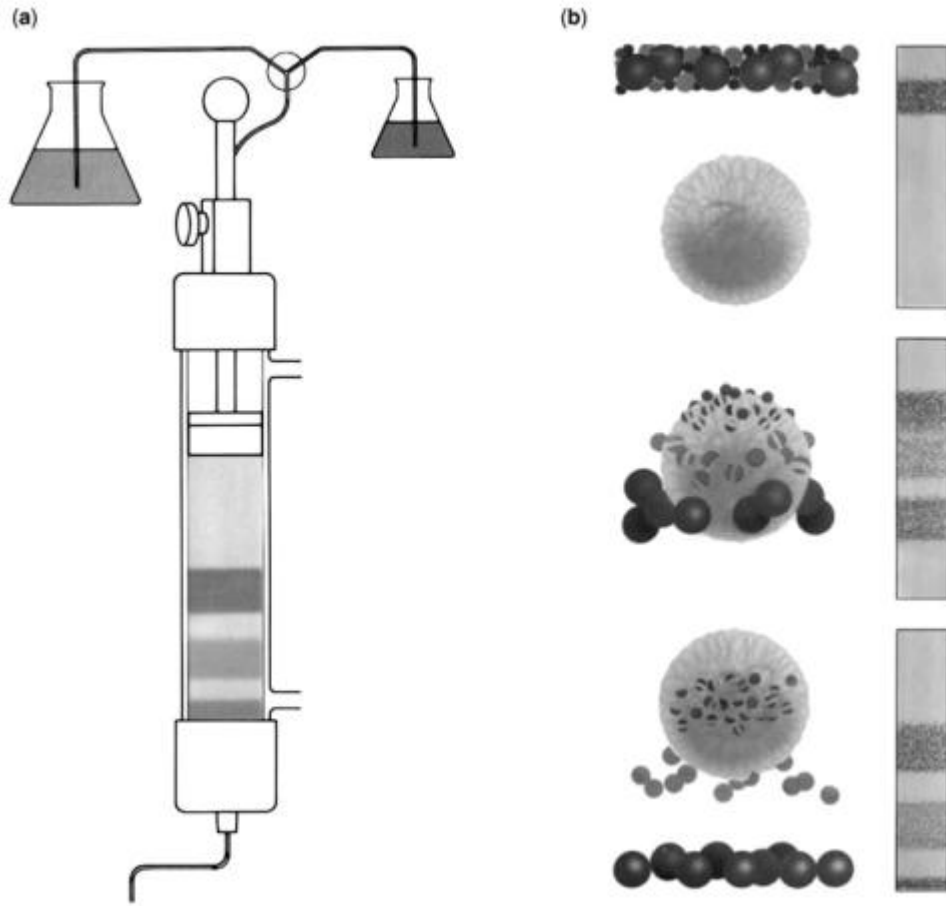
Şekil 1.5. Sulu bir çözeltideki proteinler arasındaki (A) ve proteinler ile bir HIC adsorbanındaki hidrofobik bir ligand arasındaki (B) hidrofobik etkileşimi gösteren şematik diyagram [31].

1.2.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC)

Jel filtrasyonu kromatografisi (GFC), protein moleküllerinin nispi boyutuna göre yapılan fraksiyonlamaya dayanan protein saflaştırması için kullanılan kromatografi tekniğidir. Bu teknik ayrıca jel geçirgenliği (gel-permeation), jel-dışlama (gel-exclusion), boyut-dışlama (size-exclusion) ve moleküler elek (molecular-sieve) kromatografisi gibi isimlerle adlandırılmaktadır. Geleneksel filtrasyonun aksine, proteinlerin hiçbirisi bir jel filtrasyon kolonu tarafından tutulmaz. Bu özellik, jel filtrasyonunun hem güçlü hem de zayıf yönüdür. Güçlü yönü, kırılgan proteinlerin işlevinin bir kromatografik desteğe bağlanma yoluyla zarar görmemesi iken zayıf yönü ise desteğe bağlanırlı olmamasının kromatografinin çözünürlüğünü sınırlamasıdır [32, 33].

Jel filtrasyonu (GF), proteinleri yalnızca moleküler boyuttaki farklılıklara göre ayırır. Ayırma, sterik nedenlerle moleküllerin farklı erişim derecelerine sahip olduğu gözenekli bir matris kullanılarak gerçekleştirilir (daha küçük moleküller daha fazla erişime ve daha büyük moleküller daha az erişime sahiptir). Matris gözenekleri dışındaki hacimde sınırlandırılan protein molekülleri, mobil faz tarafından kolon boyunca yürütülür ve

böylece numune azalan molekül büyüklüğüne göre ayrıştırılır (Şekil 1.6). Elue edilen protein bölgeleri, UV-Vis dedektörde takip edilerek fraksiyonlar toplanabilir [34].



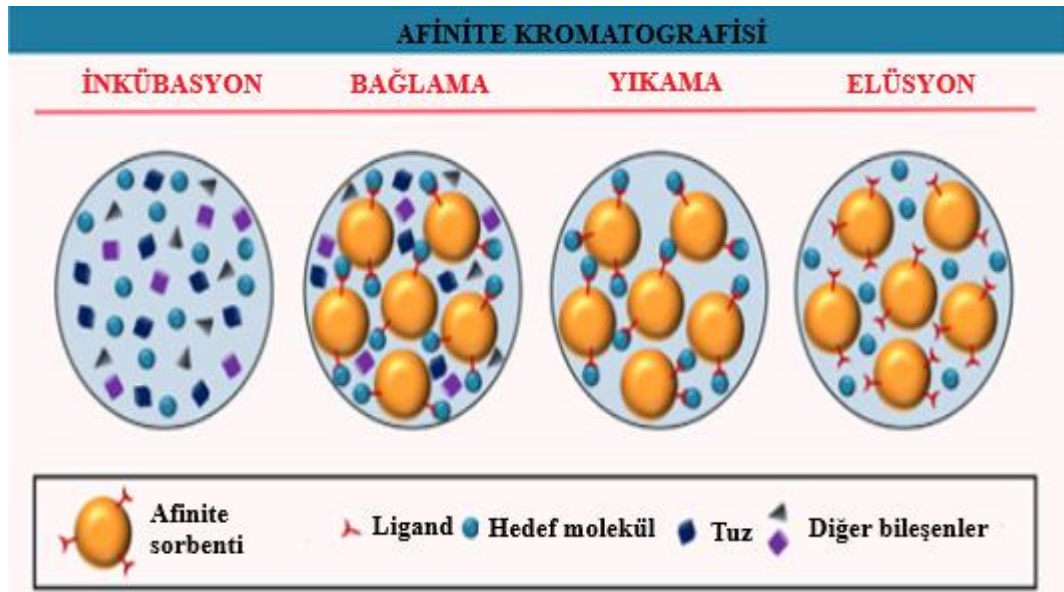
Şekil 1.6. GFC'nin ayırma süreci; (a) Tampon ve numune şişeleri ve GFC desteği ile yüklenmiş bir kolon ile yerçekimi akışının yardımıyla ayrıştırılan deney düzeneği, (b) Üç bileşenli bir karışımın numune enjeksiyonu [35].

1.2.5. Afinite Kromatografisi

Kimyasalların karmaşık karışımlardan ayrılması veya analizi için en seçici ve çok yönlü sıvı kromatografi yöntemlerinden biri, afinite kromatografisidir. Bu kromatografi metodu ilk olarak 1968'de Pedro Cuatrecasas, Chris Anfinsen ve Meir Wilchek tarafından tanıtılmıştır. Bir antikorun antijeni ile bağlanması, bir hormonun reseptörü ile

bağlanması ve bir enzimin substratı ile etkileşimi biyolojik etkileşim örnekleri arasında yer almaktadır [36, 37]. Bu etkileşimler, afinite kromatografisinde, etkileşen bir çift molekülden birinin katı bir destek üzerinde hareketsiz hale getirilmesi ve bir kolona yerleştirilmesiyle uygulanır. İmmobilize edilmiş molekül, afinite kolonunun sabit fazını oluşturur ve “afinite ligandı” olarak adlandırılır [38]. Bu afinite ligandı analitin saflaştırılmasında veya miktar tayininde kullanılabilmektedir [39]. Afinite ligandları kovalent olarak hareketsiz hale getirilebilir, spesifik olmayan veya biyospesifik etkileşimler yoluyla bir yüzeye adsorbe edilebilir, bir gözenek içinde tutulabilir veya immobilize metal iyon afinite kromatografisinde (İMAK) olduğu gibi bir metal iyonu ile koordine edilebilir [40].

Saflaştırılmak istenilen herhangi bir biyomolekül, genellikle doğal veya yapay bir molekülü tanıyabileceği doğal bir tanıma alanına sahiptir. Bu tanıma ortaklarından biri polimerik sabit faz içeren bir kolonda immobilize edilirse ikinci ortağı içeren hücre özütü mobil faz olarak kolondan geçirilerek biyomolekül seçici olarak yakalanabilir. İstenen biyomolekül daha sonra pH, iyonik güç, çözücüler ve sıcaklık gibi dış koşullar değiştirilerek ayrıştırılabilir (Şekil 1.7) [37].

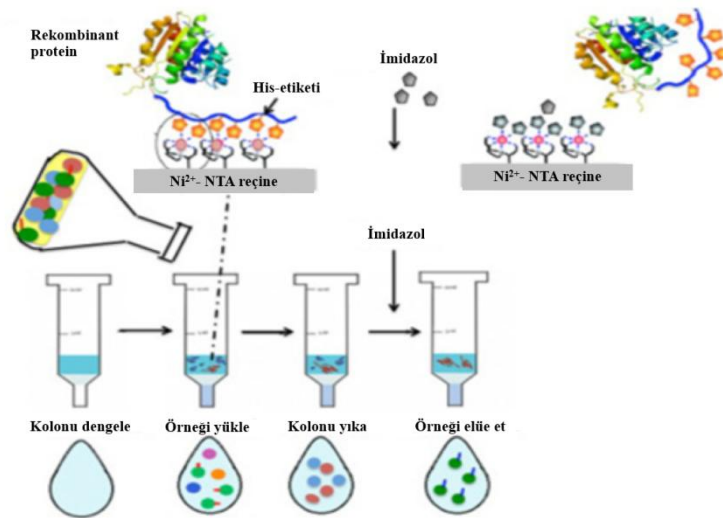


Şekil 1.7. Afinite kromatografisinin prensibi [41].

1.2.6. İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK)

İMAK, bir kolon üzerinde immobilize edilmiş metal iyonları ile proteinlerdeki temel gruplar, özellikle histidin kalıntıları arasında zayıf koordinat bağlarının oluşumuna dayanan bir protein saflaştırma yöntemidir [42]. Bir kromatografik yöntem olarak Porath ve arkadaşları tarafından 1975'te tanıtılmıştır. Küçük moleküllerin ayrılması için bu metodun temelleri gerçekte Hellferich tarafından 1961'de tarafından atılmıştır [5, 43, 44]. Everson ve Parker bu konuda, şelatlama bileşiklerinin immobilizasyonunu metallo-proteinlerin ayrılmasına uyarlayan ilk araştırmacılarıdır [45].

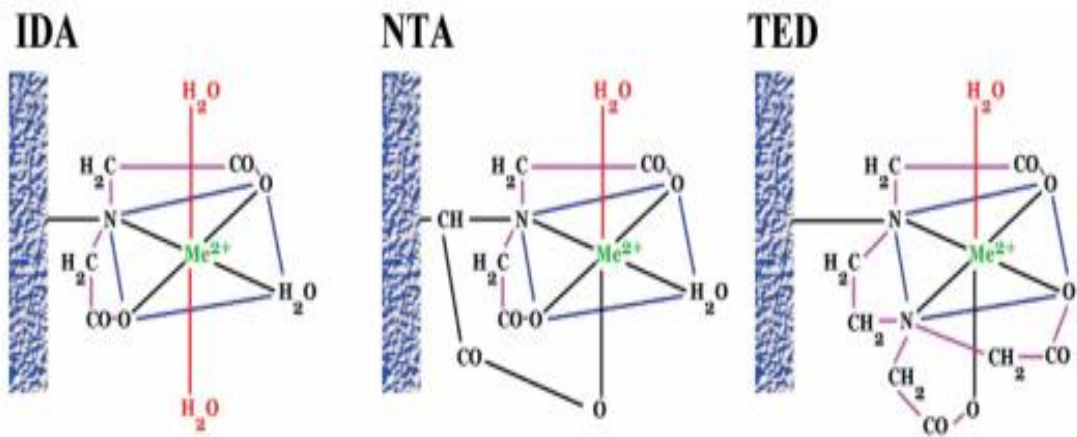
İMAK'ta metal şelatlayıcı grupların kovalent olarak yüklendiği bir sorbent veya matris kullanılır. Metal iyonları yüklendiğinde, çok uçlu şelatlayıcılar ve metal iyonları, metal iyonlarının sabitlendiği kompleksler oluşturur. Bu amaçla, çözücü veya çözünen moleküllerin onlara bağlanabilmesi için komplekslerdeki metal iyonlarının serbest koordinasyon bölgelerine sahip olması gerekir. Proteinler ve metal iyonlarının etkileşimini takiben, bağlı proteinler bir yer değiştirici (örneğin imidazol) kullanılarak serbest bırakılabilir (Şekil 1.8). Metal-protein bağının gücü proteinden proteine değişir ve birçok durumda bu farklılıktan spesifik proteinlerin etkin bir şekilde ayrılmasını ve izolasyonunu sağlamak için yararlanılabilir [46].



Şekil 1.8. İMAK reçinesi ile His-etiketli rekombinant protein saflaştırılmasının gösterimi [46].

Sulu çözeltilerde Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} iyonları gibi geçiş metal iyonları sistein histidin ve triptofan afinitesine sahiptir. Proteinler, protein yüzeyinde açığa çıkan sistein, histidin ve triptofan gibi belirli amino asit kalıntıları yoluyla metal iyon koordinasyon bölgelerine spesifik olarak bağlanabilmektedir [47].

Çok uçlu şelatlama maddeleri yani ligandlar yaygın olarak araştırma çalışmalarında ve ticari kromatografik ürünlerde kullanılmaktadır. İki uçlu olan aminohidroksamik asit, salisilaldehid, 8-hidroksikinolin (8-HQ), üç uçlu olan iminodiasetik asit (IDA), dipiklilamin (DPA), orto-fosfoserin (OPS), N- (2-piridilmetil) aminoasetat, 2,6-diamino metilpiridin, dört uçlu olan nitrilotriasetik asit (NTA), karboksimetillenmiş aspartik asit (CM-Asp), beş uçlu olan *N,N,N'*-tris-karboksimetil etilen diamin (TED) literatürde sık karşılaşılan şelatlayıcı ligandlardır. İMAK yönteminde, N- veya C- terminalinde His₆- işaretli rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında nikel iyonlarını (Ni^{2+}) immobilize etmek için iminodiasetik asit (IDA) veya nitrilotriasetik asit (NTA) ligandları düşük fiyatları ve uygun bulunabilirliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Histidin etiketli bir proteinin immobilize bir metal iyonu ile etkileşiminin temel mekanizması Şekil 1.9'da sunulmaktadır [44, 46, 48]. His-etiketinin küçük boyutlu olması saflaştırma işlevine müdahale etmeksizin hedef protein ile bağlı kalmasını sağlar ve karışık etiket uzaklaştırma adımlarını gerektirmez [49-51].



Şekil 1.9. İMAK için metal iyonları ile şelat halindeki üç- (IDA), dört- (NTA) ve beş uçlu (TED) ligandların yapısı [44].

1.2.6.1. İMAK Destek Materyalleri

Afinite kromatografisinde matris seçimi öncelikli rol oynamakta olup, genelde polisakkarit, polimer ve silika esaslı afinite matrisleri kullanılmaktadır. Bu tür matrislerin İMAK uygulamalarında kullanılması için sahip olması gereken özellikler bulunmaktadır [52-54]:

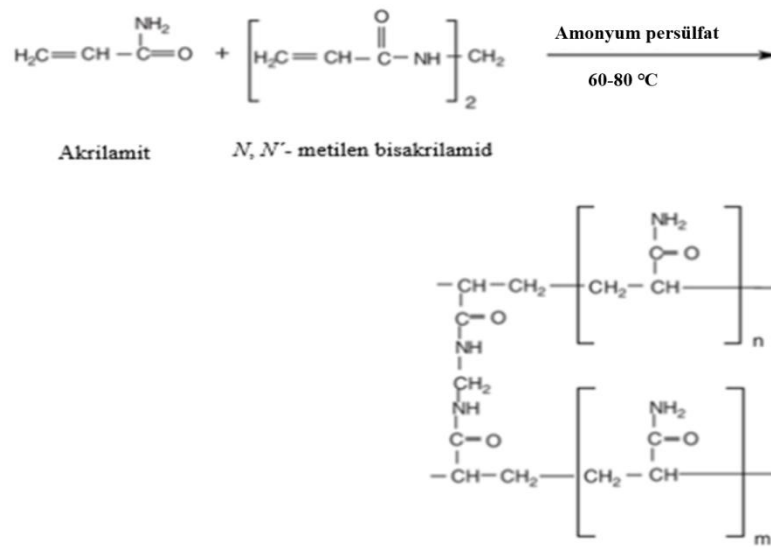
- Hidrofilitesi yüksek olmalı ve oldukça düşük spesifik olmayan adsorpsiyon sağlamalıdır.
- Fiziksel, kimyasal, termal ve mekanik stabilitesi yüksek olmalıdır.
- Hedef biyomoleküllerin geçişine izin verecek kadar gözenek boyutunun büyük ve dar bir gözenek boy dağılımına sahip olması gerekmektedir.
- Yüksek akış hızlarında kullanıma ve matris dejenerasyonu olmaksızın kolonun rejenerasyonuna izin vermelidir.
- Büyük miktarlarda ligand immobilizasyonu ve yüksek adsorpsiyon kapasitesine izin verecek yüksek spesifik yüzey alanına sahip olmalıdır.
- Ligandların türetilmesi ve immobilizasyonu için yeterli düzeyde fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır.
- Kromatografik ayırım işlemi sırasında stabil bir sabit faz sağlamalıdır.

Agaroz, dekstroz ve selüloz esaslı matrisler yüksek yüzey alanı-hacim oranına sahip olduklarından uzun süredir kromatografi desteği olarak kullanılmaktadır. Polisakkarit esaslı matrisler yüksek hidrofilik karakteristiğe sahiptir. Ancak kimyasal ve mekanik stabilitesinin zayıf olması sebebiyle sadece düşük basınç ve akış hızlarında kullanılması uygundur. Bu olgu karbonhidrat esaslı adsorbanların en önemli dezavantajıdır [54]. Ancak agaroz esaslı birçok ticari İMAK malzemesi mevcut olup bireysel veya diğer ayırma teknikleriyle birlikte protein saflaştırılmasında başarılı bir biçimde kullanılmaktadır [55].

Silika üzerine agaroz, dekstran, kitosan gibi organik polimerlerin adsorpsiyonu ile afinite matrisi yapılması yaygındır [44]. Polimer esaslı afinite matrisleri ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Sakamoto ve arkadaşları (2009), çeşitli ilaç ve biyomoleküllerin immobilizasyonu için stiren ve glisidil metakrilat polimerlerinin

kopolimerizasyonu ile lateks ve manyetik olmak üzere iki farklı partikül sentezlemişlerdir. Bu hazırlanan partiküllerin yüzeylerinde orta derecede hidrofiliteye ve yeterli fonksiyonel gruplara sahip oldukları için proteine spesifik olmayan bağlanmayı önleme ve kolay yüzey modifikasyonuna izin vererek verimli sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır [56].

Metilen bisakrilamid ile çapraz bağlı poliakrilamid, genellikle jel filtrasyonu için kullanılan ve iyi bilinen bir materyaldir (Şekil 1.10). Ancak, düşük ekskölüzyon limitine sahip olması nedeniyle sadece polimer konsantrasyonunu azaltarak iyon değişimi ve diğer uygulamalara genişletilmesine izin vermez. Ayrıca, jelin mekanik özellikleri kolon kullanımıyla uyumlu olmadığı için kullanımında sınırlamalar mevcuttur [57, 58].



Şekil 1.10. Akrlamidin polimerizasyonunun kimyasal gösterimi [58].

E.coli hücrelerinin bağlanmasına ve yüksek geri kazanımla bağlı hücrelerin elüsyonuna izin veren anyon değişim ligandları ve İMAK ligandları (Cu^{2+} yüklü iminodiasetik asit) içeren poli (akrilamid) esaslı süper gözenekli kromatografik matrisler geliştirilmiştir. Bu matrisler monomerlerin bir kolon içinde donmuş sulu çözelti içinde radikal kopolimerizasyonu (kriyopolimerizasyon) ile üretilmiştir. Hücreler, bağlanma/elüsyon

aşamalarından sonra bile canlılıklarını kaybetmemişlerdir. Bu matrisler tek seferlik kullanıma uygun olup ucuz ve temin edilmeleri kolaydır [59].

1.2.6.2 İMAK'ta Kullanılan Metal İyonları

İMAK'da proteinlerin adsorpsiyonu, immobilize bir metal iyonu ile protein yüzeyindeki elektron donör grupları arasındaki koordinasyona dayanır [60]. Pearson'ın sistemine göre metal iyonlarının nükleofillere karşı tercihi reaktivitelerine bağlı olarak güçlü, orta ve zayıf olmak üzere üç kategoriye ayrılabilceği öne sürülmektedir. Oksijen tercihi gösteren Fe^{3+} , Ca^{2+} ve Al^{3+} iyonları güçlü metal iyonları grubuna aittir. Hg^{2+} ve Ag^{2+} zayıf metal iyonları kükürdü koordine ederken, geçiş metal iyonları Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} azot, oksijen ve sülfürü koordine eder. En yaygın olarak kullanılanlar, elektron çifti alıcıları olan ve Lewis asitleri olarak kabul edilebilecek Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} geçiş metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlı şelatlama bileşiklerinde bulunan elektron verici atomlar (N, S, O) metal iyonlarını koordine etme ve alıkonulan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak iki uçlu ve üç uçlu olabilen metal şelatlar oluşturma yeteneğine sahiptir [61].

Belirli tampon koşulları altında ardışık histidin kalıntıları dizisi nikel (Ni^{2+}), kobalt (Co^{2+}) ve bakır (Cu^{2+}) gibi çeşitli immobilize metal iyonlarına bağlanabilir. Bu nedenle His₆-etiketinin varlığı, hedef proteinin saflaştırmasını büyük ölçüde basitleştirmektedir [62]. Nikel, proteinlerle güçlü bir şekilde etkileşime girer. Nikelin etkileşim gücü, mevcut amino asitlerin kimliğine bağlıdır ve en büyük afiniteyi histidin kalıntısına karşı gösterir. Nikelin bu özelliği ile agaroz reçinesine immobilize edilen nikel iyonları (Ni^{2+}) kullanılarak His₆-etiketi içeren rekombinant proteinlerin saflaştırılması genel bir yöntemdir [63].

1.2.6.3 İMAK'ın Avantajları ve Dezavantajları

İmmobilize metal afinite kromatografisi kullanılarak protein saflaştırma süreçleri ile ilgili literatürde belirtilen avantajlar aşağıda maddeler halinde verilmektedir [64-66]:

- İMAK sürecinde elüsyon kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilir, matrisin kendisi adsorpsiyona katkıda bulunmuyorsa protein büyük oranda geri kazanılabilir.
- Her kullanımdan sonra metal iyonları kolondan uzaklaştırıldığında, kolona temizleme işlemi sonrası farklı metal iyonları immobilize edilebilir.
- Genel olarak İMAK süreçlerinde protein geri kazanım oranı yüksektir.
- İMAK, örneğin His-etiketli rekombinant proteinler için en uygun yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca fosfoproteomikler için fosfopeptitleri zenginleştirmek ve izole etmek için güçlü bir araçtır.
- Hafif elüsyon koşullarına sahiptir ve kromatografi tamponlarına düşük konsantrasyonlarda imidazol dahil edilerek seçiciliği kontrol edebilir.

İMAK yönteminin yukarıda belirtilen avantajlarının yanında uygulamada birtakım olumsuz yönleri de mevcuttur. Aşağıda İMAK sürecinin olumsuz yönleri maddeler halinde verilmiştir [44, 47]:

- Protein saflaştırması, proteinlerin metal iyonları ile afinitesine dayandığından, bu yöntem metal afinitesi olmayan proteinlerde kullanılamaz.
- Metal iyonlarını reçineden ayıran EDTA gibi şelatlayıcı maddelerden kaçınılmalıdır.
- İMAK'da yüksek konsantrasyonda tuz kullanılması, sonraki adımlarda uygulanacak iyon değiştirme kromatografisi gibi diğer kromatografik yöntemleri olumsuz etkileyebilir.
- Tüm hücre lizatının kolona yüklenmesi, İMAK reçinesi üzerindeki immobilize metal iyonlarını bloke edebilir. Metal iyonu bağlama bölgelerindeki olası kümelenme de İMAK reçinesine bağlanmayı ve seçiciliğini etkileyecektir. Bu da saflaştırma adımlarını arttıracaktır.
- Metal iyon transferi (MIT), esas olarak protein kaybına ve düşük protein verimine neden olur. Ayrıca saflaştırılmış protein çözeltisini kontamine eden metal iyonlarının varlığı bu izolatin sağlık için kullanımını sınırlar.
- İMAK'da yaygın olarak kullanılan metal iyonları Co^{2+} veya Ni^{2+} , arsenik veya altı değerlikli krom ile karşılaştırıldığında zayıf mutajenler olarak kabul edilmelerine rağmen kanserojendir. Hedef protein tarafından yakalanan bu metal iyonları, tedavi amaçlıysa tehlikeli olabilir.

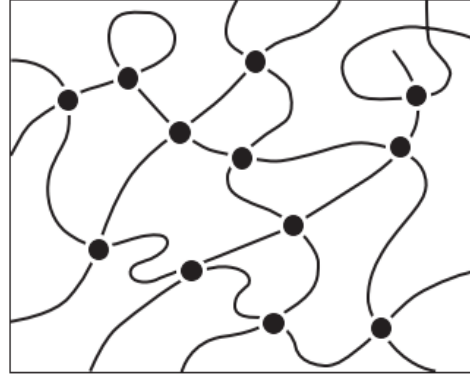
1.2.6.4 His₆-etiketli Proteinlerin Saflaştırılması için İMAK Uygulamaları

Yapılan literatür incelemesinde, His₆-etiketli proteinlerin saflaştırılmasında İMAK yönteminin kullanımı ile ilgili birçok çalışma bulunmuştur. Bu çalışmalardan seçilen bazı uygulamalar aşağıda özetlenmektedir.

Dabrowski ve Kur tarafından (1998) yapılan bir çalışmada N-terminalinde polihistidin-etiket içeren ve *E. coli*'den eksprese edilen rekombinant DNA polimeraz, Ni²⁺ affinite kromatografisi ile tek seferde saflaştırılmıştır [67]. Velkov ve arkadaşları (2008), *E. coli* hücrelerinden doğal laktoz baskılayıcı proteinin saflaştırılması için basit, Ni²⁺ esaslı İMAK protokolünün, yapısal ve biyokimyasal çalışmalar için yüksek oranda saflaştırılmış protein üretimi için faydalı olduğunu göstermiştir [68]. Sporeno ve arkadaşları (1994), histidin etiketli onkostatin M'i (Onc M), bir metal şelatlayıcı kolonu üzerinde tek adımda homojen olana kadar saflaştırmıştır [47]. Smith ve Johnson tarafından (1988), NH₂ terminali üzerindeki spesifik bir metal şelatlayıcı peptit (CP) içeren bir protein, İMAK kullanılarak saflaştırılmıştır [69]. Xu ve arkadaşları (2001), His₆-etiketli insan triptofanil-tRNA sentetazının (TrpRS) metal (Ni²⁺) şelat affinite kromatografisi saflaştırması ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, insan TrpRS'sinin aşırı üretimi için yeni, basit ve etkili bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur [70].

1.3. Kriyojeller

Polimerler, aynı veya farklı monomer birimlerinin çeşitli yöntemlerle birleştirilerek oluşturulan büyük molar kütleyle sahip makromoleküllerdir. Monomer birimleri çeşitli kimyasal tepkimelerle birleşerek kovalent bağlı yapıları oluştururlar. Bu tip tepkimeler polimerleşme reaksiyonu olarak tanımlanır. Polimerin bir solvent yardımıyla şişerek polimer ağı oluşturmaya polimerik jel adı verilmektedir. Polimer ağları, çapraz bağlarla 3 boyutlu bir yapı haline gelerek bir matris gibi çözücüyü kendisine bağlayıp jeli sağlamlaştırmaktadır. Çapraz bağlar, jel yapısının korunmasını sağlamaktadır. Polimerik jeller, hem sentetik hem de doğal polimer esaslı olabilmektedir. Polimerik bir jelin şematik gösterimi Şekil 1.11'de görülmektedir. Şekilde yer alan siyah noktalar polimer zincirleri arasındaki çapraz bağları temsil etmektedir [71, 72].



Şekil 1.11. Bir polimer jelin şematik gösterimi [72].

Polimer zincirlerini bağlayan çapraz bağlar, fiziksel (kovalent olmayan bağlar veya miseller, multipletler, kristalitler, vb) veya kimyasal (kovalent bağlar) bağlar olabilmektedir. Polimerik jeller, çapraz bağın çeşidine göre fiziksel jeller ve kimyasal jeller olarak ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel jeller zayıf bağlarla bağlandığı için kararsızdır ama kimyasal jeller kovalent bağlarla bağlandığından güçlü ve geri dönüşümsüz bir yapıya sahiptir [72, 73].

Hidrojeller, solventi su olan kimyasal veya fiziksel bağlarla çapraz bağlanarak suda şişerek üç boyutlu bir yapı oluşturan hidrofilik polimer jellerdir. Hidrojellerin ilk olarak 1960 yılında Wichterle ve Lím (1960) tarafından duyurulmuştur [74]. Hidrojeller; hazırlama (homopolimerik, kopolimerik, iç içe geçmiş ağ), iyonik yük (katyonik, anyonik, iyonik olmayan), kaynak (doğal, sentetik, hibrid), çapraz bağ (fiziksel veya kimyasal), tepki (kimyasal, biyokimyasal, fiziksel) ve fiziksel özelliklerine (akıllı veya geleneksel) göre sınıflandırılabilirler [75].

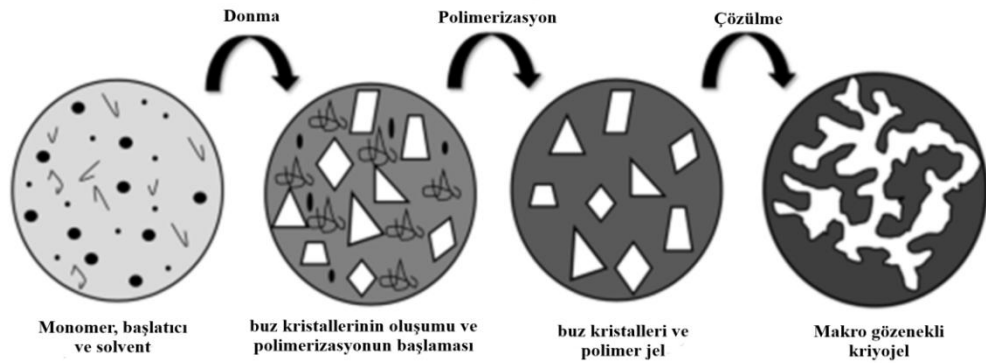
Homojen olarak şişmiş polimer jellerinkinden daha büyük ve polimer köpüklerin boyutunun altında gözenek boyutlarına sahip jeller olan makrogözenekli polimer jeller yani krijojeler 1950'lerde keşfedilmiştir [76]. Bu polimerler biyoteknoloji ve biyotıpta büyük bir ilgiyi üzerine çekmektedir. Makro gözenekli polimerlerin hazırlanmasında dondurarak kurutma, porojenasyon, mikroemülsiyon oluşumu, gaz üfleme tekniği ve faz ayrımı gibi farklı yöntemler bulunmaktadır. Açık gözenekli yapılara ve kontrollü

gözeneklere sahip büyük gözenekli polimerik malzemeler, kriyojelasyon teknolojisi ile üretilir.

Vladimir I. Lozinsky tarafından 1980'lerin başında, polimerik jellerin dondurulmuş bir ortamda oluştuğunu tanımlamak için kullanılan "kriyojel" terimi ortaya çıkmıştır [77]. Kriyojel, terim olarak Yunanca'da don veya buz anlamına gelen "krios (*kryos*) ve jel kelimelerinden türetilmiştir [78]. Çözücünün polimer ağına bağlı olduğu homofaz sistemleri olan geleneksel jellerin aksine, kriyojeller çözücünün hem birbirine bağlı makro gözenekler içinde hem de polimer ağına bağlı olan heterofaz sistemlerdir [79]. Kriyojeller; ozmotik, kimyasal ve mekanik stabilite, makro gözenekli yapıda, yüksek yüzey alanı ve su tutma kapasitesinde olup süngerimsi ve elastik bir yapıya sahiptir. Kriyojelasyon sıcaklığı, numunenin donmuş halde tutulduğu süre ve donma/çözülme oranları modifiye edilerek, çözücünün doğasına uygun çözünür ve çözünmeyen malzemelerin kullanımıyla istenilen özelliğe sahip kriyojeller üretilebilmektedir. Kriyojeller bu özelliklerinden dolayı biyoseperasyon ve saflaştırma uygulamalarında kromatografi teknikleri için kullanımının yanı sıra çevre, biyomedikal mühendisliği, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmıştır [80, 81].

1.3.1. Kriyojellerin Oluşumu

Protein saflaştırılmasında ticari reçinelere alternatif olabilecek kriyojeller, bir çözücü içinde polimer veya monomer öncüllerin uygun bir başlatıcı/aktivatör çifti kullanılarak sıfırın altındaki sıcaklıklarda kriyopolimerizasyonuyla oluşturulmaktadır. Şekil 1.12'de de görüleceği gibi kriyopolimerizasyon işlemi, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı içeren bir polimerik çözeltinin çözücünün donma noktasının altındaki bir sıcaklıkta dondurulması, gözenek oluşumu için donmuş halde bekletilmesi, makro gözenekler oluşturan bileşiklerin çapraz bağlanması ve reaksiyon sonucu oluşan kriyojelin oda sıcaklığında çözülmesi aşamalarını içerir [80]. Bu işlemde sulu faz dondurularak ve polimerizasyon işleminin donmamış bir sıvı mikrofazda gerçekleşmesi sağlanır. Daha sonra buz kristalleri oda sıcaklığında eritilerek büyük ve sürekli olarak birbirine bağlı gözenekler oluşturulur [82]. Su, polimerizasyon işleminde bir çözücü, dağıtıcı ve porojen olarak kullanılır ve kriyojelin makro gözenekli yapısının oluşmasında yardımcı rol oynar.



Şekil 1.12. Kriyojel oluşumunun basamakları [83].

1.3.2. Kriyojel Oluşumunda Etkili Faktörler

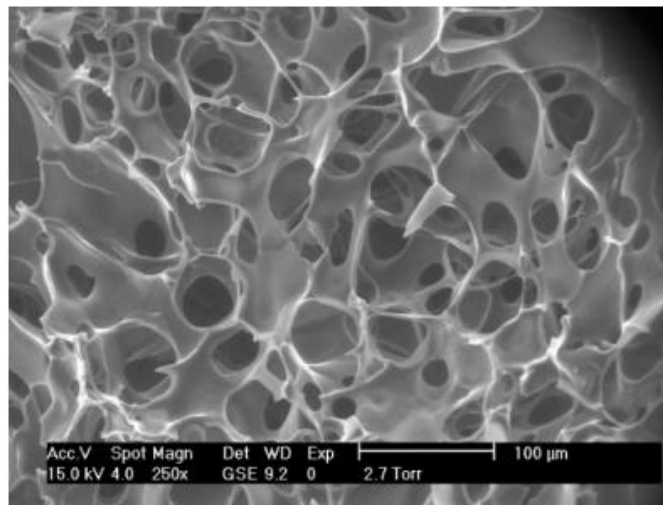
Kriyojellerin oluşumunda çapraz bağlanma derecesi ve tipi, jel çözeltisinin bileşimi, jelleşme sıcaklığı, sıcaklıkta tutulduğu süre ve donma hızı gibi birçok değişken etkili olmaktadır [84].

1.3.2.1. Donma Hızı ve Donma Sıcaklığı

Kriyojel oluşumunda donma hızı ve donma sıcaklığı etkili olan faktörlerdendir. Donma hızı ve donma sıcaklığındaki değişimler buz kristallerinin boyutunu etkilemekte ve dolayısıyla makro gözenek oluşumu meydana gelmektedir [85]. Donma hızı ne kadar yüksek ise çekirdeklenme o kadar yükselecektir ve oluşan küçük buz kristallerinin sayısını arttıracaktır [86]. Donma hızı ne kadar düşükse (veya sabit donma sıcaklığı ne kadar yüksekse), büyüyen buz kristallerinin boyutu o kadar büyük olur ve sonuç olarak daha büyük gözenek boyutlarına sahip kriyojeller hazırlanır. Bununla beraber aşırı soğutma (aşırı donma) sorunu ile başa çıkmak için donma sıcaklığı yeteri kadar düşük olmalıdır [79]. Genel olarak donma sıcaklığının düşük olması makro gözenek boyutuna olumsuz yönde etki etmektedir. [87].

1.3.2.2. Monomer Öncüllerin Konsantrasyonu

Kriyojeller hazırlanırken diğer değişkenler sabit tutulduğunda jel/monomer öncüllerinin konsantrasyonundaki artış gözenek duvarlarının kalınlaşmasına ve polimerleşen jelin dayanıklılığının artmasına neden olsa da genellikle makro gözeneklerin birbirine bağlanabilirliğinin ve gözenek boyutlarının azalmasına yol açmaktadır [79]. Farklı polimerizasyon koşullarında hazırlanan poli (2-hidroksietil metakrilat-ko-allil glisidil eter) (HEMA-AGE) hidrojellerin morfolojileri incelendiğinde monomer konsantrasyonu ve reaksiyon koşulları gözenek oluşumunda etkili olmuştur. Daha yüksek bir monomer konsantrasyonuna sahip HEMA-AGE hidrojel örneklerinde, daha küçük gözenekler meydana gelmiştir [88]. Süper makro gözenekli poliakrilamit kriyojellerin (pAAm-kriyojeller) gözenek boyutu ve gözenek duvarlarının kalınlığı, başlangıç reaksiyon karışımındaki monomerlerin konsantrasyonu (%6-22) ve kullanılan çapraz bağlayıcı değiştirilerek kontrol edildiğinde pAAm-kriyojellerindeki gözenek duvarlarının kalınlığı, başlangıç reaksiyon karışımındaki artan monomer konsantrasyonu ile artmıştır. Ayrıca pAAm kriyojellerindeki gözenek hacmi %70-93 aralığında bulunmuştur ve reaksiyon beslemesindeki artan monomer konsantrasyonu ile azalmıştır (Şekil 1.13) [89].



Şekil 1.13. Çapraz bağlı pAAm-kriyojelin SEM görüntüsü [89].

1.3.2.3. Çapraz Bağlama

Kriyojeller, çok çeşitli doğal veya sentetik polimerler veya monomerler kullanılarak kimyasal çapraz bağlama, polimerizasyon veya fiziksel jel oluşumu yoluyla oluşturulabilir [84]. Çapraz bağlama işlemi hidrojel sentezi sırasında veya sentez sonrasında yapılabilir. Bu konuda yapılan bir çalışmada akrilamit esaslı hidrojeller donmuş ortamda glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Kriyojellerin makro gözenek yapısını çapraz bağlayıcının konsantrasyonu ve jelin oluşum sıcaklığının etkilediği çalışma bulgularında belirtilmiştir. Ayrıca bu şekilde sentezlenen jel malzemelerinin süngerimsi, süper makro gözenekli bir morfolojisi akrilamit (AAm) ve *N,N'*- metilen bisakrilamidin (MBAAm) kriyojenik kopolimerizasyonu yoluyla üretildiği bilinen PAAm kriyojellerine benzerlik gösterdiği bu çalışmada ortaya konulmuştur [90]. Bir diğer çalışmada poli (vinil alkol) (PVA), sıfırın altındaki sıcaklıklarda asidik koşullar altında glutaraldehit ile kimyasal olarak çapraz bağlanarak makro gözenekli monolitik kriyojeller (cryoPVA) hazırlanmıştır. CryoPVA'nın şişme derecesi, ilk reaksiyon karışımındaki polimer konsantrasyonuna ve çapraz bağlanma derecesine göre değişiklik göstermiştir [86]. Kriyojellerin kimyasal olarak çapraz bağlanması sıfırın altındaki sıcaklıkta dondurulma sırasında gerçekleşirken fiziksel olarak çapraz bağlanma çözülme aşamasında meydana gelmektedir [81]. Çapraz bağlayıcıların hidrofilik veya hidrofobik olması kriyojellerin yapısına etki etmektedir. Poliakrilamit (pAAm) monomerinin orta düzeyde hidrofobik bir çapraz bağlayıcı *N,N'*- metilen bisakrilamid (MBAAm) ve daha hidrofilik dialiltartaramid (DATAm) ile çapraz bağlanarak serbest radikal polimerizasyonu ile üretilen kriyojellerin fiziksel özellikleri karşılaştırıldığında belirgin farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir [89].

1.3.3. Kriyojellerle İlgili Yapılan İMAK Çalışmaları

Histidin-etiketli proteinlerin, farklı protein kalıntıları içeren rekombinant proteinlerin ve çeşitli kaynaklardan elde edilen enzimlerin İMAK uygulamalarıyla saflaştırması ile ilgili çalışmaların listesi Tablo 1.4'te verilmektedir. İlgili tabloda geliştirilen İMAK materyali ve kullanıldığı uygulamalar verilmektedir.

Tablo1.4. Kriyojellerle ilgili literatür taraması.

Sentezlenen Kriyojel	Sentezleme Yöntemi	Uygulama	Referans
PHEMA/PGMA-CB	serbest radikal polimerizasyonu	insan serumundan albümin ve IgG'nin aynı anda izolasyonu	91
PHEMA/PGMA-IDA-Cu ²⁺	dispersiyon polimerizasyonu		
Poli(HEMA-GMA)-IDA-Zn ²⁺	radikal kriyokopolimerizasyonu	mayadan alkol dehidrojenaz enziminin saflaştırılması	92
Poli(AAm-GMA)-IDA-Fe ³⁺	kriyopolimerizasyon	katalaz enzimini adsorpsiyonu	93
Poli(EGDMA)- Con A	radikal kriyokopolimerizasyonu	invertaz enzimi immobilizasyonu	94
Poli(HEMA-GMA)-IDA-Ni ²⁺	serbest radikal kriyopolimerizasyonu	üreaz enzimi adsorpsiyonu	95
DEAE-GMA	kimyasal ışınlama,gama ışınlaması, aşı kopolimerizasyonu	etkili zayıf anyon değişim adsorbanları geliştirme	96
Poli(EGDMA-GMA)-Con A	kriyopolimerizasyon	amiloglikozidaz enzimi adsorpsiyonu	97
Tris-kriyojel	kriyopolimerizasyon	yumurta beyazından lizozimin saflaştırılması	98
Cu ²⁺ -IDA-MPAAG	serbest radikal kopolimerizasyonu	lizozim bağlanma kapasitesini belirleme	99
AAM-AGE-D-GlcNAc	kopolimerizasyon (epoksi, Schiff bazı, glutaraldehit ve etilendiamin yöntemleri	Lektin saflaştırılması	100
Poli(HEMA-GMA)-p-BA-Cu ²⁺ , Ag ⁺ ve Zn ²⁺	serbest radikal polimerizasyonu	insülin adsorpsiyonu	101
Poli(HEMA-GMA)-p-AP-Cu ²⁺ , Ag ⁺ ve Zn ²⁺			
Poli(AAm-MAH)	serbest radikal polimerizasyonu	insan plazmasından IgG saflaştırılması	102
PHEMA-IDA- Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺	serbest radikal polimerizasyonu	insan kanından hemoglobin uzaklaştırılması	103
P(HEMA-GMA)-IDA-Cu ²⁺ , Ca ²⁺ ve Fe ³⁺	serbest radikal kopolimerizasyonu	domuz pankreas lipazı (PPL) ve sığır serum albumin (BSA) adsorpsiyonu	104

*kısaltmaların açılımı EK 1'de yer almaktadır.

Sunulan çalışmanın mevcut literatürden iki temel farkı bulunmuştur. Mevcut çalışmalarda İMAK materyalinin hazırlanma yöntemi, öncelikle GMA içeren kriyojel hazırlanması ve bu işlemi takiben IDA'nın glisidil gruplarına bağlanması şeklindedir. Yapılan ön denemelerde bu uygulamada iki temel problem tespit edilmiştir. Bunlar sırasıyla; GMA'nın su fazında çözünürlüğü zayıf olup kriyojel hazırlama esnasında yüksek GMA derişimlerinde faz ayrımı görülmektedir. Çalışma kapsamında öncelikle

hazırlanan GMA-IDA monomeri suda çözünür yapıdadır. Böylece GMA-IDA monomerinin önce hazırlanmış olması, faz ayrımı problemini çözmüştür. İkinci problem hidrojel yapısında bulunan GMA'nın tamamının IDA ile tepkimeye girememesidir.

Sunulan çalışmanın mevcut literatürden diğer farkı, hazırlanan kriyojelerin belirli gözenek çapına sahip eleklerden geçirilerek kolon uygulamalarına uygun partikül formunda elde edilmesidir.

Sonuç olarak sunulan çalışmada öncelikle GMA-IDA bazık ortamda tepkimeye girdirilerek suda çözünebilir katkı monomeri hazırlanmıştır. Daha sonra bu monomer akrilamit-metilen bisakrilamid karışımı ile tek basamakta polimerleştirilerek kriyojel yapıda İMAK malzemesi hazırlanmıştır. Böylece tez kapsamında yukarıda bahsedilen problemler ortadan kaldırılarak tek basamakta hızlı ve etkin İMAK malzemeleri hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında hazırlanan malzemeler Ni^{2+} ile yüklenecek model sistemlerde test edilmiştir.

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

Bu tez çalışması kapsamında poli (akrilamit-glisidil metakrilat-iminodiasetik asit) (PAGMA-IDA) kriyojelleri sıfırın altındaki sıcaklıkta serbest radikal kopolimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Bu kriyojellerin sentezlenmesi, akrilamit (AAm) monomeri ile glisidil metakrilat-iminodiasetik asit (GMA-IDA) monomer şurubunun sabit APS-TEMED (başlatıcı-hızlandırıcı) sistemi altında *N,N'*-metilen bisakrilamid (MBA) çapraz bağlayıcısı ile kopolimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Kriyojellerin kopolimerizasyonu, Chen ve Chen [105] tarafından tarif edilen yöntemin modifikasyonu ile uygulanmıştır. Yapılan ön denemeler sonucu AAm, MBA ve GMA-IDA çözelti konsantrasyonları bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir. Çalışma kapsamında başlatıcı ve monomer şuruplarının hassas bir biçimde karıştırılabilmesi için AAm 0,6 g/mL ve MBA 0,02 g/mL, %10 APS (w/v) konsantrasyonlarında stok çözeltileri hazırlanmıştır. Kopolimerizasyonda kullanılacak diğer monomer şurubu GMA-IDA derişimi monomer-çapraz bağlayıcı karışımının 1, 1,5 ve 2 kat konsantrasyonlarda olacak şekilde alınmıştır. Bu değişkenlere göre her bir kriyojelinin toplam polimerizasyon hacmi 8,5 mL olacak şekilde ayarlanmış deney planı Design-expert 12 istatistik programı ile hazırlanmıştır. Hazırlanan deney planında 15 deneylik bir tasarımı oluşturulmuştur (Tablo 2.1). Deney tasarımına göre hazırlanan karışımlar -22°C'de 24 saat süreyle polimerizasyon işlemi uygulanarak makro gözenekli kriyojellerin sentezlenmesi sağlanmıştır. Ardından sentezlenen PAGMA kriyojellerine yıkama ve nötralizasyon işlemleri yapılmıştır. PAGMA kriyojellerinin karakterizasyonu için; Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FTIR) analizi, şişme oranı, makro gözenek miktarı analizi, nikel (Ni^{2+}) adsorpsiyonu ve model sistemlerde sığır serum albumin (BSA) adsorpsiyon analizleri

gerçekleştirilmiştir. Bu karakterizasyon çalışmalarının sonuçları literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

Tablo 2.1. PAGMA-IDA kriyojel hazırlama deney tasarımı.

Std	Run	Factor 1 A: AAm g/ml	Factor 2 B:MBA g/ml	Factor 3 C:GMA-IDA ml/ml
6	1	0,15	0,006	1,5
1	2	0,1	0,006	1,5
3	3	0,05	0,009	2
9	4	0,1	0,006	1
8	5	0,1	0,009	1,5
15	6	0,1	0,006	1,5
2	7	0,15	0,003	2
13	8	0,1	0,006	1,5
5	9	0,05	0,006	1,5
7	10	0,1	0,003	1,5
1	11	0,15	0,009	1
4	12	0,05	0,003	1
14	13	0,1	0,006	1,5
10	14	0,1	0,006	2
12	15	0,1	0,006	1,5

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 2.1’de, cihaz ve ekipmanlar ise Tablo 2.2’de verilmektedir.

Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Marka
GMA (Glisidil metakrilat)	Aldrich Chem. Co., for R&D, ABD
AAm (Akrilamit)	Merk, Almanya
MBA (<i>N, N'</i> -metilen bisakrilamid)	Merk, Almanya
TEMED (<i>N, N, N, N'</i> -tetrametiletilendiamin)	Sigma-Aldrich, ABD
APS (Amonyum persülfat) $\geq 98\%$ ACS	Sigma, ABD
IDA (İminodiasetik asit)	Sigma-Aldrich, ABD
NaOH	J.T. BAKER, Hollanda
NiSO ₄ ·6H ₂ O (Ni(II) Sülfat Hegzahidrat)	TEKKİM, Türkiye
HCl	Merck, A. G., Almanya
Sitrik asit	Merck, A. G., Almanya
NaH ₂ PO ₄	J. T. BAKER, Hollanda
K ₂ HPO ₄	CARLO ERBA, İtalya

Tablo 2.3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

Cihaz ve Ekipmanlar	Marka
Hassas Terazı	Sartorius BP 221 S, Almanya
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonore RK100H, Almanya
Vorteks Karıştırıcı	IKA® VORTEX genius 3, ABD
Manyetik karıştırıcı	Stuart CC 162, İngiltere
pHmetre	Mettler Toledo, İsveç
Etüv	Memmert, Almanya
Santrifüj	Hettich-320, Almanya
Atomik absorpsiyon spektrofotometresi	Perkin Elmer HGA 700, Almanya
Çalkalamalı su banyosu	Memmert, WNB14, Almanya
Spektrofotometre	Agilent Cary60 UV/Vis, ABD
Filtre 5,0 μ m	Minisart, sartorius stedim, Biotech
Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi-ATR	FTIR-BrukerTensor II, ABD
Taramalı elektron mikroskobu/enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi	SEM/EDX-Carl ZeissSigma 300 VP, Almanya
Işık mikroskobu	NIKON DS-Fi2, Japonya

2.2. Yöntem

Çalışma kapsamında akrilamit, metilen bisakrilamid ve glisidil metakrilat esaslı kriyojellerin üretimi, karakterizasyonu ve İMAK materyali olarak kullanımı test edilmiştir. Tez kapsamında yürütülen çalışmalar ve uygulamalar aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmaktadır.

2.2.1. PAGMA-IDA Kriyojellerin Sentezi

Bu çalışmada kullanılmak üzere akrilamit (AAM) 0,6 g/ml, metilen bisakrilamid (MBA) 0,02 g/mL ve %10 (w/v) konsantrasyonlarında amonyum persülfat (APS) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çalışmada APS-TEMED (başlatıcı-hızlandırıcı) sisteminin konsantrasyonları sabit tutularak AAM 0,05, 0,1 ve 0,15 g/mL, çapraz bağlayıcı MBA 0,003, 0,006 ve 0,009 g/mL ve GMA-IDA monomer şurubu ise 1, 1,5 ve 2 kat olacak şekilde herbir değişken üçer farklı değişik konsantrasyon bağımlı değişkenler seçilerek deney tasarımı oluşturulmuştur.

PAGMA kriyojellerin sentezlenmesi için gerekli stok çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Stok AAM çözeltisinin hazırlanması: Konsantrasyonu 0,6 g/mL olan stok çözeltiyi hazırlamak için hassas terazide 15 g AAM tartılarak balon jojeye konulmuş ve saf su ile hacmi 25 mL'ye tamamlanarak ultrasonik su banyosunda çözündürülmüştür.

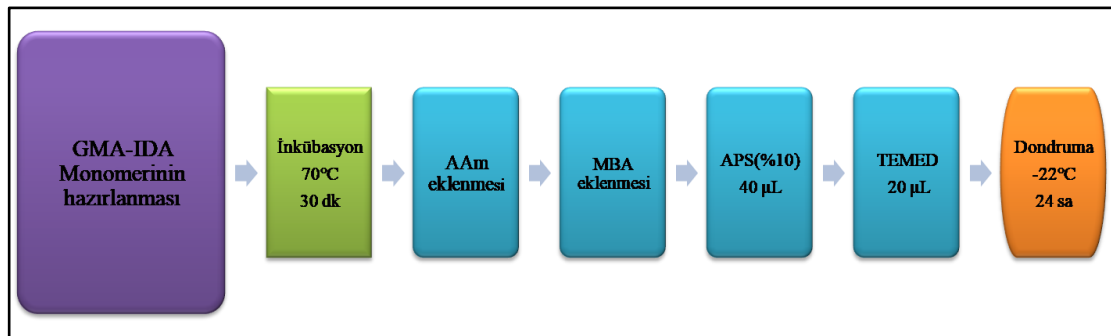
Stok MBA çözeltisinin hazırlanması: Konsantrasyonu 0,02 g/mL olan stok çözeltiyi hazırlamak için hassas terazide 1 g MBA tartılarak balon jojeye alınmış saf su ile hacmi 50 ml'ye tamamlanarak ultrasonik su banyosunda çözündürülmüştür.

Stok %10 (w/v)'luk APS çözeltisinin hazırlanması: Polimer başlatıcı stok APS çözeltisi hazırlamak için 0,3 g APS hassas terazide tartılarak cam tüpe alınmış ve 3 mL safsu içinde ultrasonik su banyosunda çözündürülmüştür.

Hazırlanan bütün stok çözeltiler, kriyojeller sentezleninceye kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

PAGMA kriyojellerini sentezlenmek için deney tasarımında belirlenen oranlar kullanılmıştır. Kriyojel sentezinde öncelikle GMA-IDA monomeri hazırlanmıştır. Bu

amaçla belirlenen miktarda sodyum hidroksit (NaOH) hassas terazide tartılarak deney tüpüne alınmıştır. Daha sonra belirlenen oranda saf su içinde çözündürülerek hazırlanan NaOH çözeltisi içine iminodiasetik asit (IDA) eklenmiştir. Son olarak deney tasarımı belirlenen miktarda GMA eklenerek fonksiyonel monomer ortamı hazırlanmıştır. GMA'da bulunan oksiran grubu (C_2H_4O) ile IDA'nın amin grubunun tepkimeye girmesi için karışım $70^{\circ}C$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon ortamı sürekli karıştırılmış ve amin grubu ile oksiran grubu arasında tepkime gerçekleştirilerek fonksiyonel monomer şurubu hazırlanmıştır [105]. Çözünen GMA-IDA monomer şurubu buzda hızlıca soğutularak üzerine deney tasarımı göre belirlenen konsantrasyonlarda sırasıyla önceden hazırlanan AAm ve MBA stok çözeltilerinden eklenmiştir. Polimerizasyon başlatıcı önce %10 (w/v)'luk APS stok çözeltisinden 40 μL sonra polimerizasyon hızlandırıcı olarak 20 μL TEMED eklenerek vortekslenmiştir. Polimerizasyonun oda sıcaklığında gerçekleşmesini engellemek için buzlu suda çalışılmıştır. Homojenize edilen karışım $-22^{\circ}C$ 'de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu grup çalışmanın akım şeması Şekil 2.1'de verilmektedir.

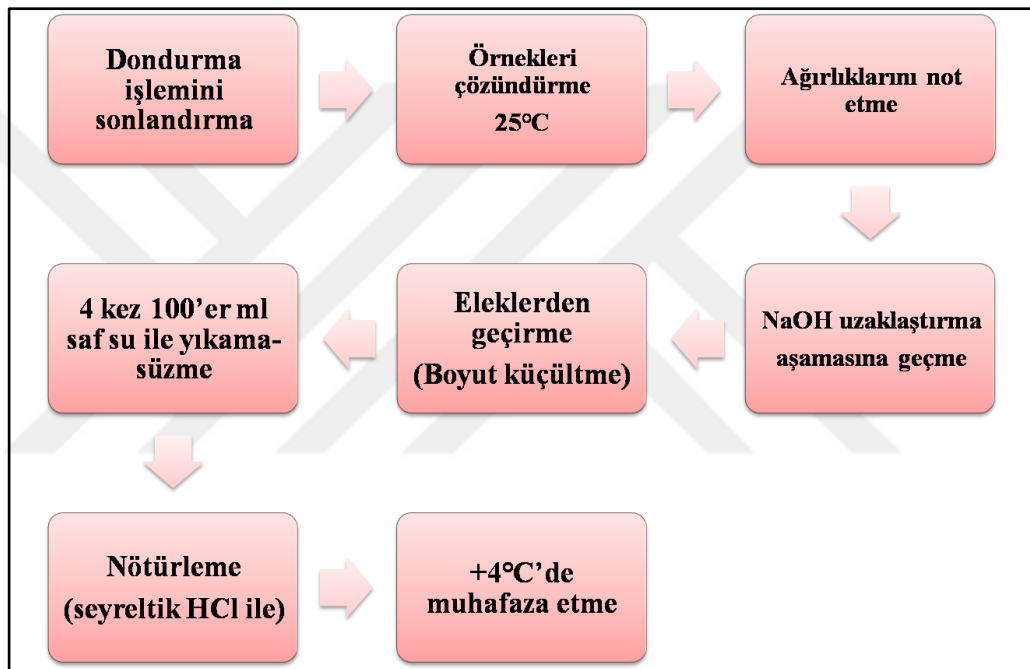


Şekil 2.1. PAGMA-IDA kriyojelleri hazırlama akış şeması.

2.2.2. PAGMA-IDA Kriyojellerin Yıkınması

Hazırlanan PAGMA-IDA kriyojel örnekleri derin dondurucudan çıkarılarak makro gözeneklerinin oluşması için oda sıcaklığında bekletilerek buzunun çözünmesi sağlanmıştır. Kriyojeller hassas terazide tartılarak kütleleri not edilmiştir. Örnekler içerisindeki NaOH'un uzaklaşması için kriyojeller belirli gözenek çapına sahip

eleklerden geçirilerek partikül formuna getirilmiştir ve 250 mL'lik behere konulmuştur. Ardından 1 saat aralıklarla her seferinde 100 mL saf su eklenerek 4 kez yıkama-süzme işlemi uygulanarak yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra seyreltik HCl çözeltisi ile pH'ları nötrlenerek Ni^{+2} adsorbsiyonu işlemine hazır hale getirilmiştir. Daha sonra karakterizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere santrifüj tüplerine alınan kriyojeller, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. PAGMA-IDA kriyojelleri yıkama akış şeması

2.2.3. Karakterizasyon Çalışmaları

Literatürde yayınlanmış önceki çalışmalar dikkate alınarak hazırlanan kriyojellerin çeşitli kimyasal ve fiziksel özellikleri karakterize edilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar ilgili referanslarıyla birlikte aşağıda açıklanmaktadır.

2.2.3.1. SEM ve FTIR Analizlerinin Yapılması

Sunulan tez çalışmasında sentezlenen PAGMA-IDA kriyojellerinin karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi-ATR (FTIR-BrukerTensor II) ve Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi (SEM/EDX-Carl

ZeissSigma 300 VP) ile analizler yapılmıştır. PAGMA kriyojellerinin ıslak ve kuru haldeki genel morfolojik yapıları ise NIKON DS-Fi2 ışık mikroskobu vasıtası ile görüntülenmiştir. Böylece sentezlenen kriyojellerin fiziksel ve kimyasal yapıları hakkında bilgi edinilmiştir.

2.2.3.2. Şişme Oranı

PAGMA-IDA kriyojellerinin karakterizasyonunda önemli analizlerden biri şişme oranının belirlenmesidir. Şişme oranı (ŞO), birim kütledeki kriyojelin absorpladığı su miktarı olarak tanımlanır. Çalışmanın ilgili bölümünde sentez parametrelerinin, jelin su tutma kapasitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla denge şişme şartlarına ulaştırılmış jellerde kuru madde analizi yapılarak deney tasarımında sentezlenen bütün kriyojellerin su tutma kapasiteleri belirlenmiştir. PAGMA-IDA kriyojellerinin şişme oranını belirlemek için öncelikle 15 mL'lik santrifüj tüplerine yaklaşık 1-2 g kriyojel konulmuştur. Üzerlerine 5 mL saf su konularak vortekslenmiştir. Hazırlanan örnekler 24 saat boyunca oda sıcaklığında (25°C) bekletilerek denge şişme şartlarına ulaştırılmıştır. Daha sonra kriyojellerden fazla suyunun uzaklaştırılması için 500 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Alüminyum tartım kapları, 95°C'de etüvde sabit tartıma getirilmiştir. Daha sonra kaplar desikatörde soğutulmuş hassas terazide tartılarak kapların darası not edilmiştir. Kaplara, santrifüjlenen ıslak kriyojel örneklerinden (M_{islak}) 0,5 g tartılarak kriyojeller 95°C'de 2 saat etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda kaplar desikatörde soğutulduktan sonra tartılmış ve tartım not edilmiştir (M_{kuru}). ŞO, aşağıdaki eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır [106].

$$\text{Şişme Oranı (g su/g kurujel)} = \frac{(M_{islak} - M_{kuru})}{M_{kuru}} \quad (1)$$

M_{islak} : Islak kriyojelin kütlesi (g)

M_{kuru} : Kuru kriyojelin kütlesi (g)

2.2.3.3. Makro Gözenek Miktarı

Kriyojellerde makro gözenek miktarının belirlenmesinde Denizli ve ark. tarafından yapılan çalışmada kullanılan yöntem izlenmiştir [107]. Bu yöntem, basınç altında sıkıştırılan kriyojelin yapısından sızan su miktarının belirlenmesi temeline göre uygulanmaktadır. Bu amaçla çıkışına filtre takılmış enjektör içine 1 g saf su içinde denge doygunluk değerine ulaşmış ıslak jel tartılmıştır. Enjektörün pistonu takıldıktan sonra sabit basınç altında (40 kPa) 15 dakika süresince piston sıkıştırılarak, makro gözeneklerde bulunan serbest suyun dışarı çıkması sağlanmıştır. Presleme işlemi öncesi ve sonrası jel kütlesi ölçülerek belirlenen kütle kaybından makro gözenek miktarı Eşitlik 2'den hesaplanmıştır.

$$\text{Makro gözenek (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

W_1 : Şişen kriyojelin ağırlığı (g)

W_2 : Kalan kriyojelin ağırlığı (g)

2.2.4. PAGMA-IDA Kriyojellerine Ni^{2+} İyonu Adsorpsiyonu

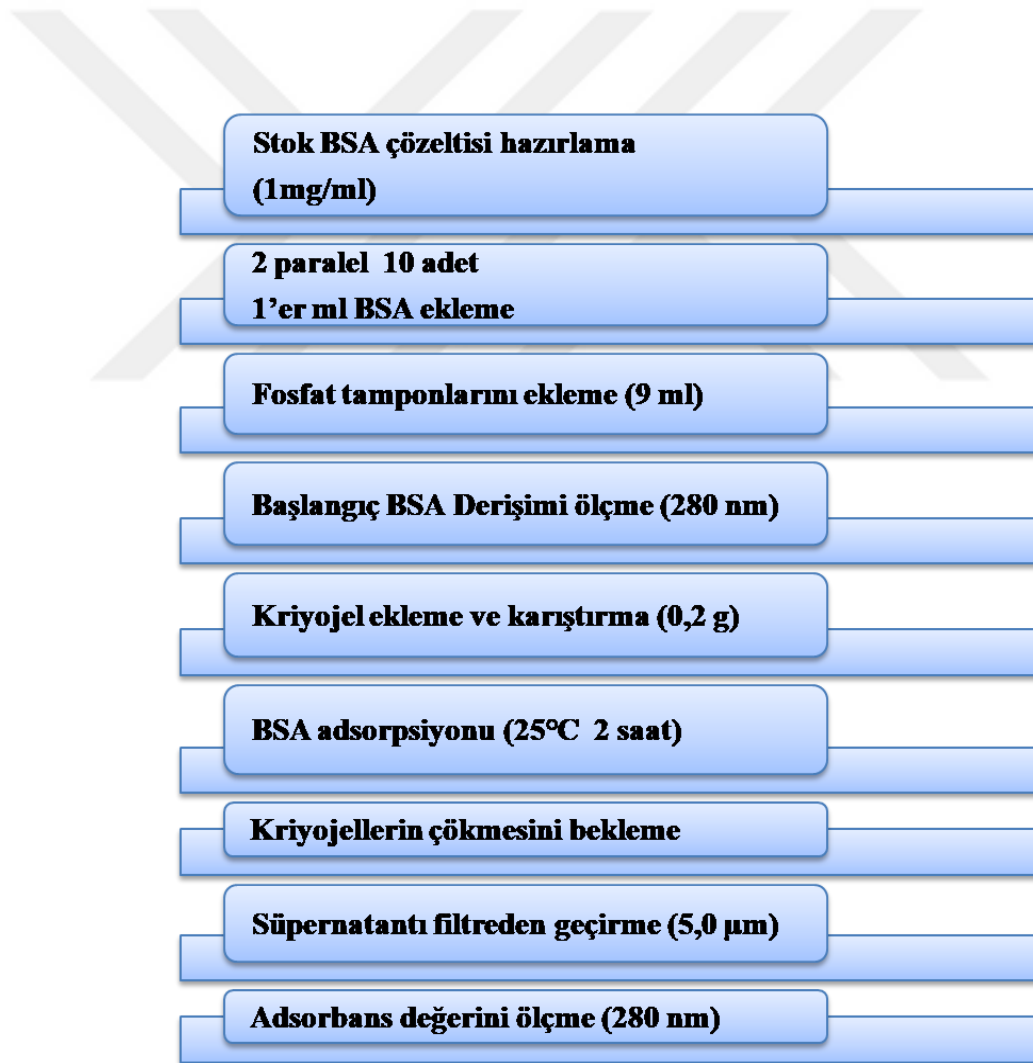
İMAK seperasyon malzemelerinin üretiminde kritik aşamalardan biri, kriyojelin metal iyonu ile kompleks oluşturmaktır. Metal adsorpsiyon işlemi iyonik bir süreç olduğu için işlemin yürütüleceği pH değerinin belirlenmesi son derece önemlidir. Bu amaçla yapılan literatür incelemesinden yola çıkılarak pH 5 fosfat tamponunda nikel çözeltisi hazırlanmıştır ve buna göre adsorpsiyon çalışmaları yürütülmüştür [108]. Bu amaçla buzdolabında muhafaza edilen PAGMA-IDA kriyojellerinden tartım kaplarına dörder g tartılmıştır. Kriyojeller laboratuvar ortamında desikatör içinde 5 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kriyojeller ependorflara konularak oda sıcaklığında saklanmıştır. Metal adsorpsiyon deneyleri için 50 mL'lik falkon tüplere 0,01 g kurutulmuş kriyojel tartılmıştır. Çalışmada önceki bölümde belirtildiği üzere adsorpsiyon işlemiyle metal iyonu yükleme sürecinde pH 5 fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. pH 5 fosfat tomponu ile 1000 ppm 100 mL stok Ni^{2+} çözeltisi hazırlanmıştır. 100 ppm Ni^{2+} çözeltisi

hazırlamak için 1000 ppm stok çözeltiden 500 ml'lik balon jöjeye 40 mL konulmuş ve pH 5 tamponu ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. 100 ppm Ni^{2+} çözeltisinden 20 mL cam pipetle alınıp tartılmış ve 50 ml'lik falkon tüplere alınan kriyojellerin üzerine konulmuştur. Tüplerin ağızları kapakla sıkıca kapatılarak vorteks ile karıştırılmıştır. Kuruyan kriyojellerin çözelti içinde dağılması beklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatılarak 25°C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 6 saat boyunca çalkalanmıştır. Bu süre sonunda tüp içindeki örnekler 5,0 µm şırınga filtreden geçirilmiştir ve analiz edilene kadar sızdırmaz kaplarda 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Kesikli sistemlerde uygulanan adsorpsiyon işleminin performansını belirlemek için 6 saat sonunda ortamdan alınan örnekler atomik adsorpsiyon sisteminde analiz edilmiştir. Bu amaçla 100 ppm Ni^{2+} çözeltisinden 1,25, 2,50, 5,00, 10,00 ve 20,00 ppm standartlar hazırlanmış ve bu çözeltilerden kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Hazırlanan Kalibrasyon doğrusu Şekil 3.16'da verilmektedir. Kesikli adsorpsiyon deneylerinde ortamdan alınan örneklerdeki Ni^{2+} iyonlarının azalışından İMAK malzemesine bağlanan iyon miktarı hesaplanmıştır.

2.2.5. PAGMA-IDA- Ni^{2+} Kriyojellerine BSA Adsorpsiyonunda pH Taraması

İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi'nde önemli parametrelerden biri de protein adsorpsiyonunun gerçekleştirileceği pH değeridir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında hazırlanan deney tasarımı ortam pH değerinin protein adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için model sistemlerde bir dizi deney yürütülmüştür. Öncelikle en iyi protein adsorpsiyonunun görüldüğü pH değeri belirlemiştir. Model sistemlerde uygulanan adsorpsiyon testlerinden Bovine Serum Albumin (BSA) model protein olarak kullanılmıştır. PAGMA-IDA- Ni^{2+} kriyojellerin BSA adsorpsiyonuna pH etkisi araştırılmak üzere pH 4, 5, 6, 7 ve 8 fosfat tamponları hazırlanmıştır. BSA stok çözeltisi 1 mg/mL derişiminde saf su ile hazırlanmıştır. Belirlenen 5 farklı pH değeri için 2 paralel olacak şekilde toplam 10 tane 15 mL'lik falkon tüplere stok BSA çözeltisinden birer mL konulmuştur. Üzerlerine ortam pH değerini ayarlamak için hazırlanan fosfat tamponlardan 9 mL konulmuş daha sonra vorteksle karıştırılmıştır. Ardından adsorpsiyon ortamının başlangıç BSA derişimleri 280 nm'de kuvars küvet kullanılarak (Agilent Cary 60 UV/Vis) spektrofotometrede belirlenmiştir. Ni^{2+} iyonu yüklenip temizlenen kriyojellerden 0,2 g tartılmıştır. Tartılan kriyojeller farklı pH değerlerinde hazırlanan BSA çözeltilerine eklenmiş ve tüpler

vorteksle karıştırılarak kriyojelin adsorpsiyon ortamında dağılması sağlanmıştır. Daha sonra adsorpsiyon ortamları çalkalamalı su banyosuna konularak 25°C’de 2 saat boyunca en yüksek hızda karıştırmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda kriyojeller tezgâha konularak çökmesi beklenmiştir. Kriyojeller çöktükten sonra ayrılan süpernatantlar 5,0 µm şırınga filtreden geçirilmiş ve ardından spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 2.3). Bu verilerden adsorplanan BSA miktarı adsorbanstaki azalmadan hesaplanmıştır. Bu grup çalışmada pH 4 tamponu içinde yapılan deneylerde maksimum BSA adsorpsiyonu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4’te ayrıntılı olarak tartışılmıştır.



Şekil 2.3. PAGMA-IDA-Ni²⁺ kriyojellerine BSA adsorpsiyonunda pH taraması için akış şeması

2.2.6. PAGMA-IDA-Ni²⁺ Kriyojellerine BSA Adsorplanması

Sentezlenen PAGMA-IDA kriyojelleri üzerinde bulunan iminodiasetik asit guruplarının kuvvetli metal şelat ajanı olduğu ve bu fonksiyonel grubun immobilize metal afinite kromatografisinde, akademik çalışmalarda ve ticari protein saflaştırma sistemlerinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Çalışmanın bu bölümünde hazırlanan deney tasarımına göre farklı parametrelerde hazırlanan kriyojellerin protein bağlama kapasiteleri model sistemlerde kesikli reaktörler içinde gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla öncelikle deney tasarımına göre hazırlanan bütün kriyojellere 10 mL, 200 mM Ni⁺² çözeltisi içinde 24 saat bekletilerek nikel iyonu yüklenmiştir. Daha sonra falkon tüplerindeki Ni²⁺ adsorplanan kriyojeller filtre kağıdı ile süzölmüştür. Süzölerek temizlenen jeller üç defa, üzerlerine 10 mL pH 4 fosfat tamponu konularak 15 dk boyunca çalkalamalı su banyosunda jeller yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra hazırlanan jeller filtre kâğıdı ile süzölerek adsorpsiyon işlemine hazırlanmıştır. BSA stok çözeltisi pH 4 fosfat tamponunda (160 ml tampon 0,16 g BSA) 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Bütün adsorpsiyon deneylerinde yapılan ölçümlerde spektrofotometre 280 nm'de pH 4 fosfat tamponuna göre sıfırlanmıştır. Deney başlangıcında stok çözeltinin seyreltilmesiyle hazırlanan bir dizi standart çözeltinin absorbansı ölçülerek kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Ön denemelerden elde edilen sonuçlara göre deney tasarımında falkon tüplerine 10 mL 1 mg/mL BSA çözeltisinden konulmuştur. Üzerine, pH 4 fosfat tamponunda yıkanıp süzölen örnekten 0,2 g jel tartılarak BSA çözeltisine eklenip ve karıştırılmıştır. Adsorpsiyon deneyleri çalkalamalı su banyosunda 25°C sıcaklıkta 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon işlemi sonunda sıvı faz 5,0 µm şırınga filtreden süzöldükten sonra spektrofotometrede belirlenen dalga boyunda (280 nm) örneklerin absorbans değerleri belirlenmiştir. Daha önce hazırlanan kalibrasyon doğrusu kullanılarak çözeltide kalan BSA konsantrasyonu belirlenmiş, başlangıç absorbans değerindeki azalıştan adsorplanan BSA miktarı belirlenerek g kuru kriyojel için mg adsorplanan BSA miktarı hesaplanmıştır.

Bu grup verilerden, hazırlanmış olan deney tasarımında belirlenen parametrelerin (AAM, MBA ve GMA-IDA) protein adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.7. PAGMA-IDA Kriyojellerin Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Kriyojellerin analizleri elde edilen sonuçların uygun modeller kullanılarak değerlendirilmesi için Design-Expert 12.0.0 istatistik programı kullanılmıştır. AAm, MBA ve GMA-IDA değişkenlerinin Ni^{+2} adsorpsiyonu, şişme oranı, makro gözenek miktarı, BSA adsorpsiyonu üzerine istatistiksel değerlendirme yapılmıştır.



3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon Sonuçları

Bu bölümde, sentezlenen kriyojellere uygulanan fiziksel ve kimyasal analizlerin sonuçları verilmektedir. Hazırlanan kriyojellerin fiziksel karakterizasyonunda kuru ve ıslak formda ışık mikroskopisi ve SEM görüntüleme kullanılmıştır. Kimyasal karakterizasyonunda ağırlıklı olarak EDX elementel analiz ve FTIR analizleri kullanılmıştır. Ayrıca tez kapsamında belirlenen deney tasarımında hazırlanan malzemelerin; su tutma kapasitesi, makro gözeneklilik, metal iyon bağlama kapasitesi ve model sistemlerde protein bağlama kapasitesi gibi fonksiyonel özellikleri belirlenerek elde edilen sonuçlar bu bölümde sunulmaktadır.

3.1.1. Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri

NIKON DS-Fi2 ışık mikroskobu ile görüntülenen ıslak olan ve liyofilizatörde dondurularak kurutulan 6 ve 7 numaralı kriyojellerin genel morfolojik yapıları sırasıyla Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.1. GMA-IDA içermeyen 6 numaralı kriyojelin ıslak ve kuru haldeki mikroskop görüntüsü.

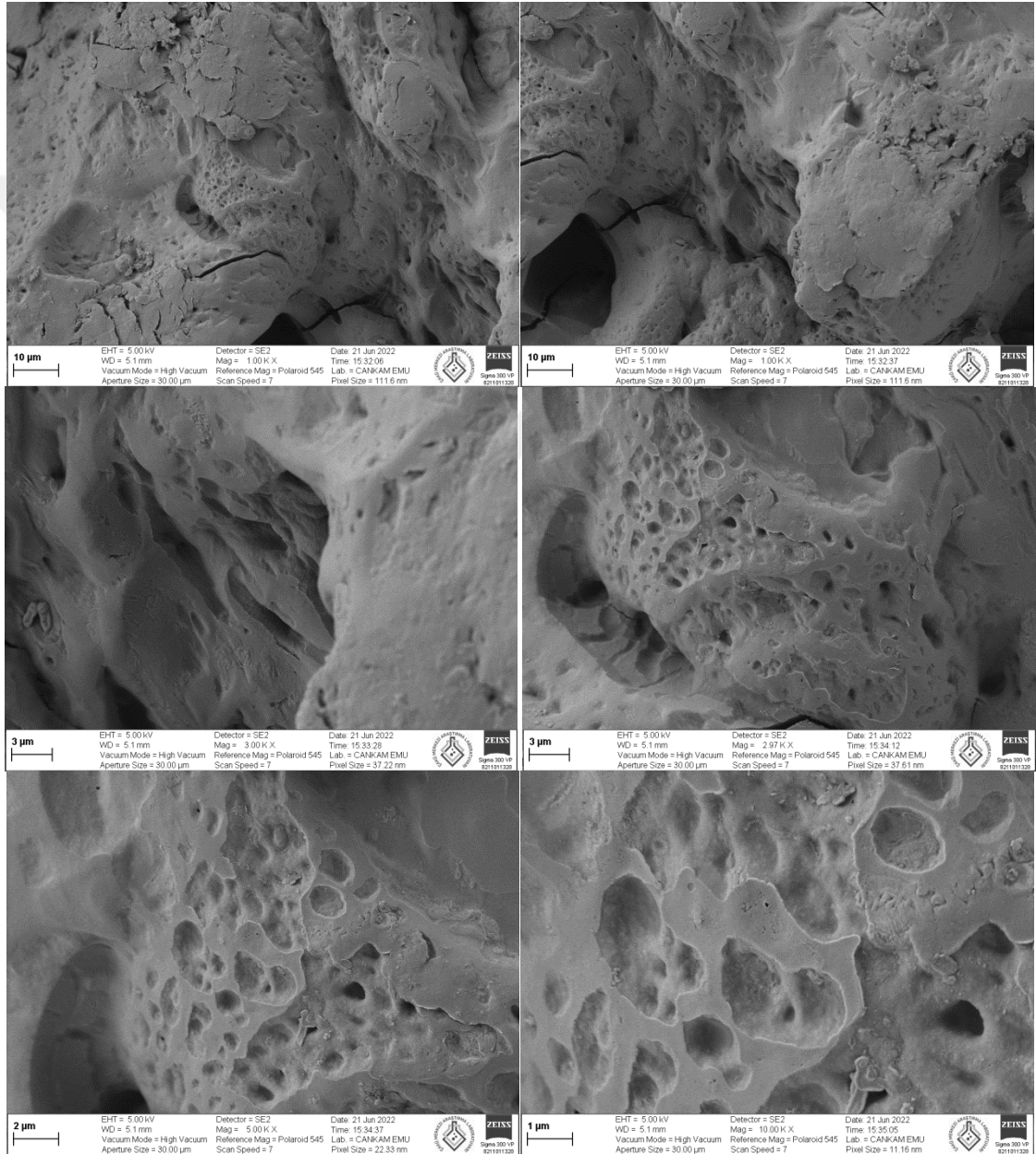


Şekil 3.2. GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin ıslak ve kuru haldeki mikroskop görüntüsü.

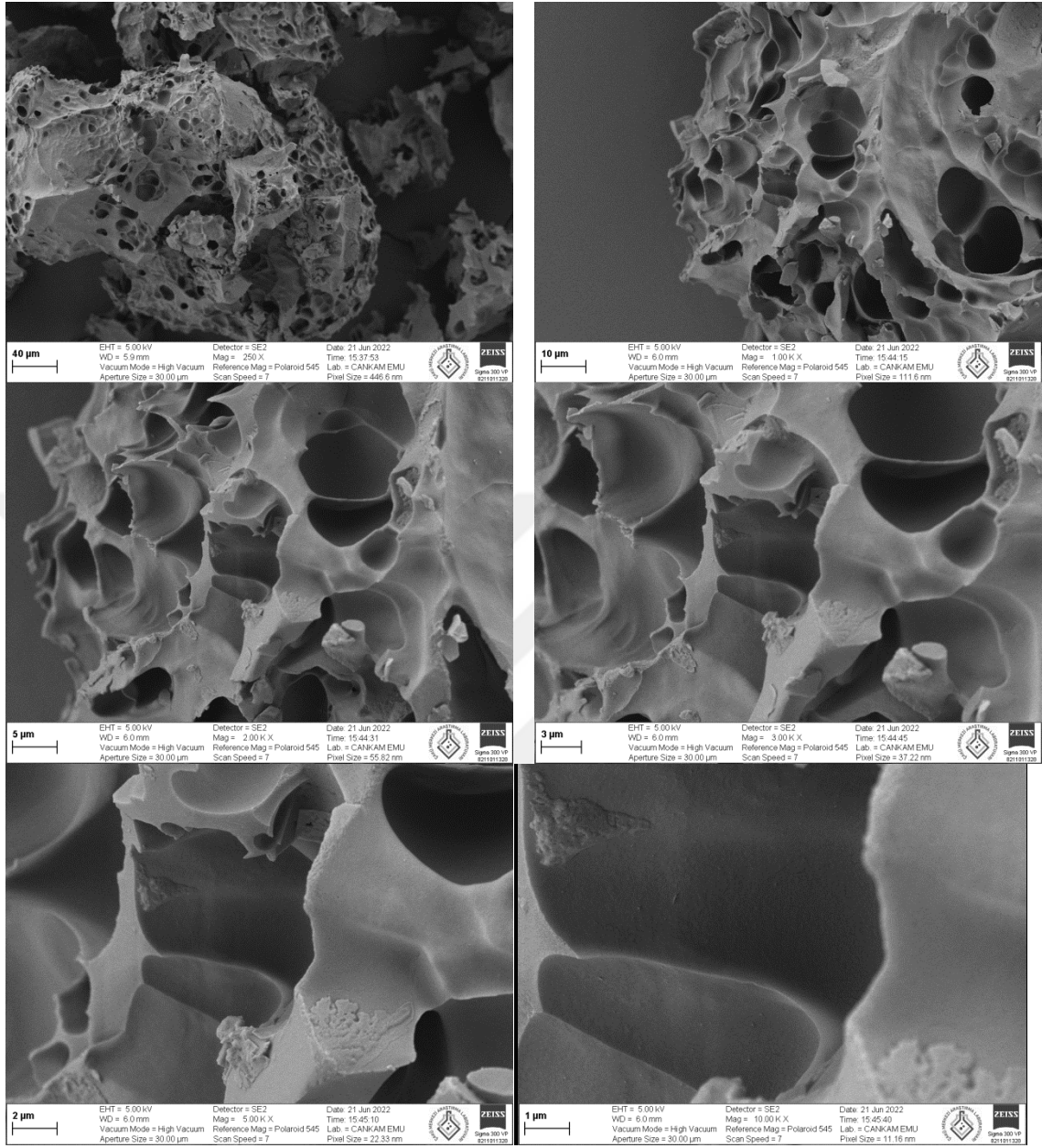


Şekil 3.3. Nikel adsorplanmış GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin ıslak ve kuru haldeki mikroskop görüntüsü.

Elde edilen GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin morfolojik yapısını aydınlatmak için Ni^{2+} adsorpsiyonu öncesi ve sonrası alınan SEM görüntüleri Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde Ni^{2+} adsorplamış kriyojel morfolojik olarak farklılıklar göstermiştir.

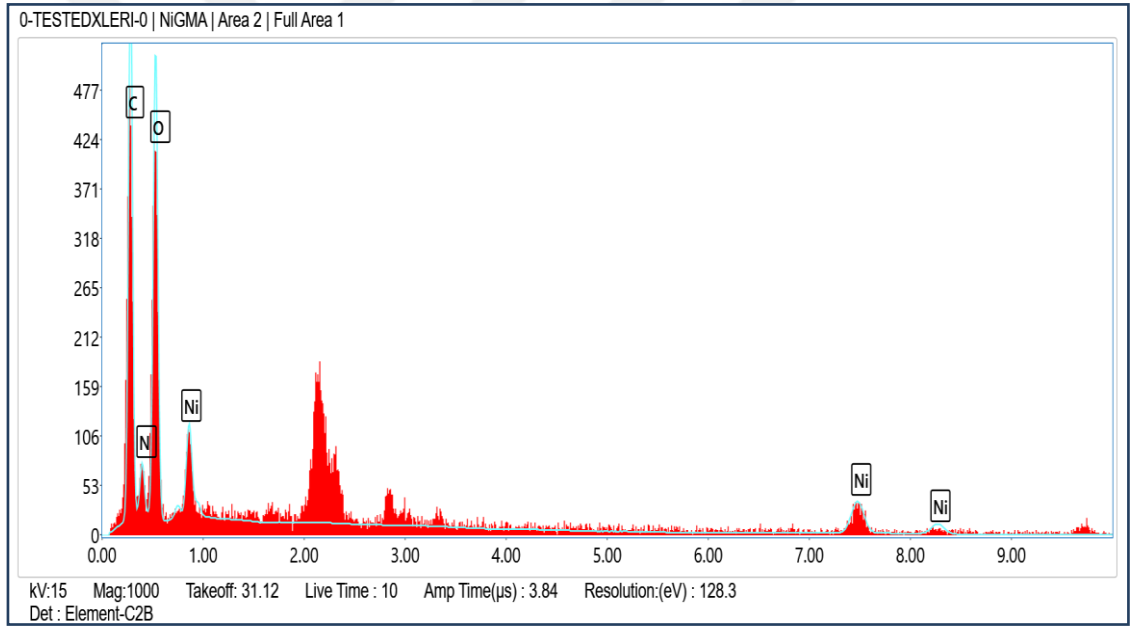
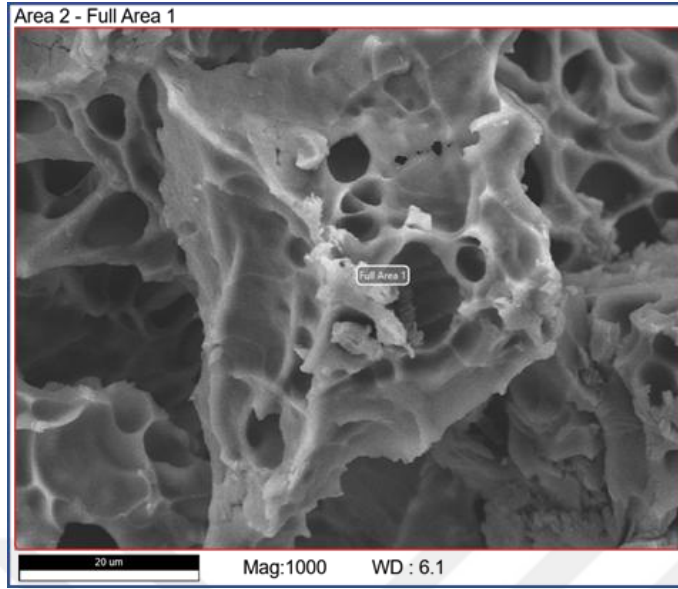


Şekil 3.4. GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojele ait SEM görüntüsü.



Şekil 3.5. Ni^{2+} adsorpsiyonu sonrası GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojele ait SEM görüntüsü.

Şekil 3.6'da görüldüğü üzere 7 numaralı PAGMA-IDA kriyojeline Ni^{2+} adsorpsiyonu sonrası yapılan EDX analizi nikelin varlığını kanıtlamaktadır.

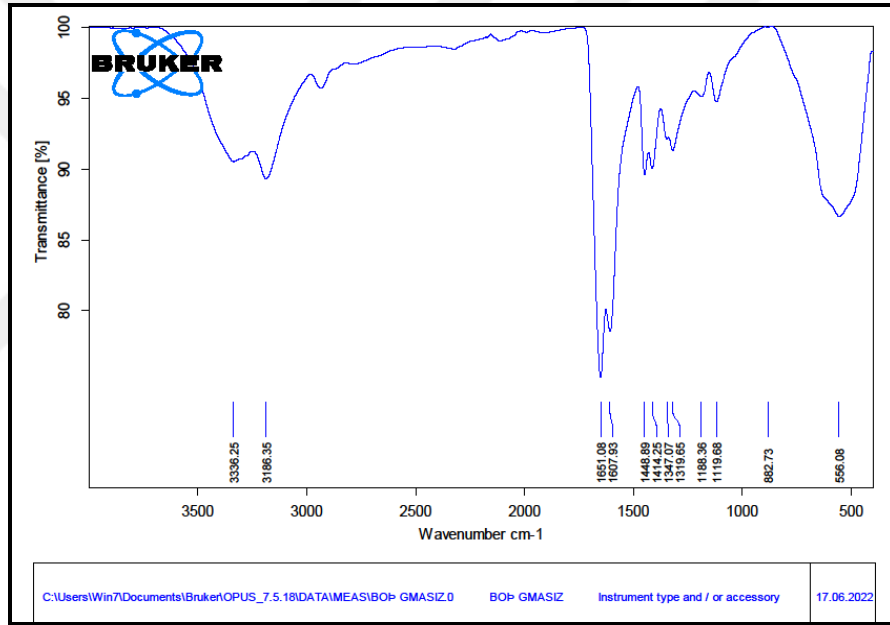


Şekil 3.6. Ni^{2+} adsorpsiyonu sonrası 7 numaralı PAGMA-IDA kriyojeline ait EDX analizi sonucu.

Şekil 3.6'dan görüleceği üzere polimer yapısında bulunan karbon, azot ve oksijen pikleri belirgin bir biçimde görülmektedir. Ayrıca nikel adsorpsiyonu sonunda analiz edilen kriyojel olması nedeniyle nikel atomuna ait pikler de görülmektedir. Bu sonuçlara göre yapıya nikelin başarılı bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir.

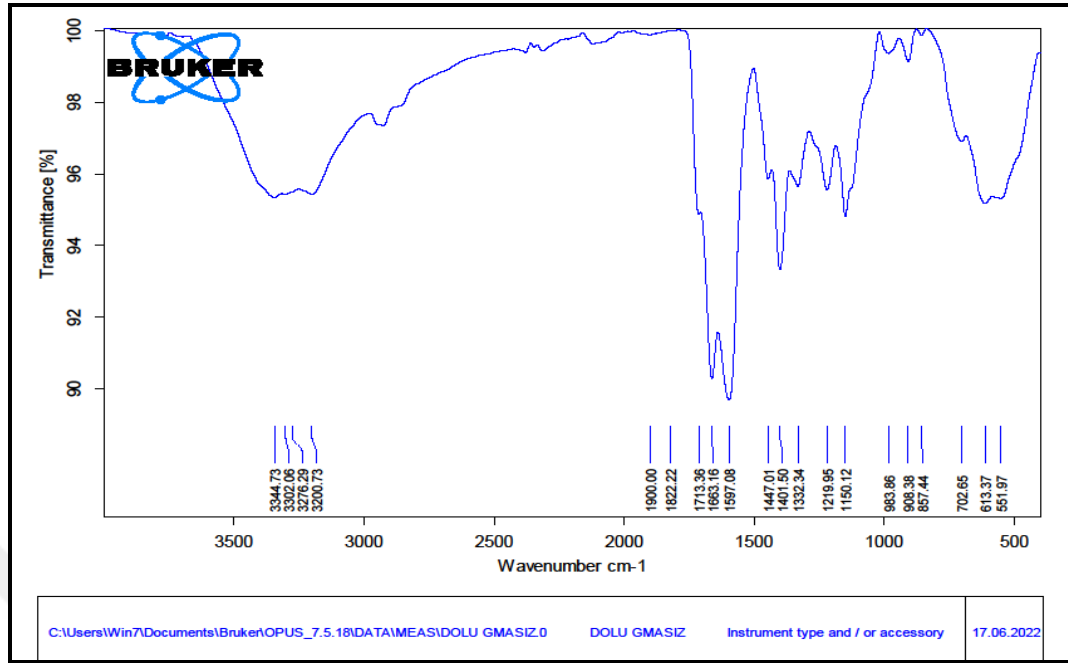
3.1.2. FTIR Analizi

FTIR analizi öncesinde kriyojel örnekleri liyofilizatörde kurutulmuştur. Şekil 3.7’de GMA-IDA içermeyen 6 numaralı kriyojelin spektrumunda, 1651 cm^{-1} (amidin $\text{C}=\text{O}$ grubu (amid I), 1608 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$ gruplarının deformasyon titreşimi (amid II)), 1449 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$), $1449\text{--}1414\text{ cm}^{-1}$ ve 1188 cm^{-1} ($-\text{NH}$ gruplarının deformasyon titreşimi), 1320 cm^{-1} ($-\text{NH}$ gruplarının gerilme titreşimi) ve 1120 cm^{-1} (C-N ve N-H bağları (amid III))’de adsorpsiyon bantları görülmektedir [109].



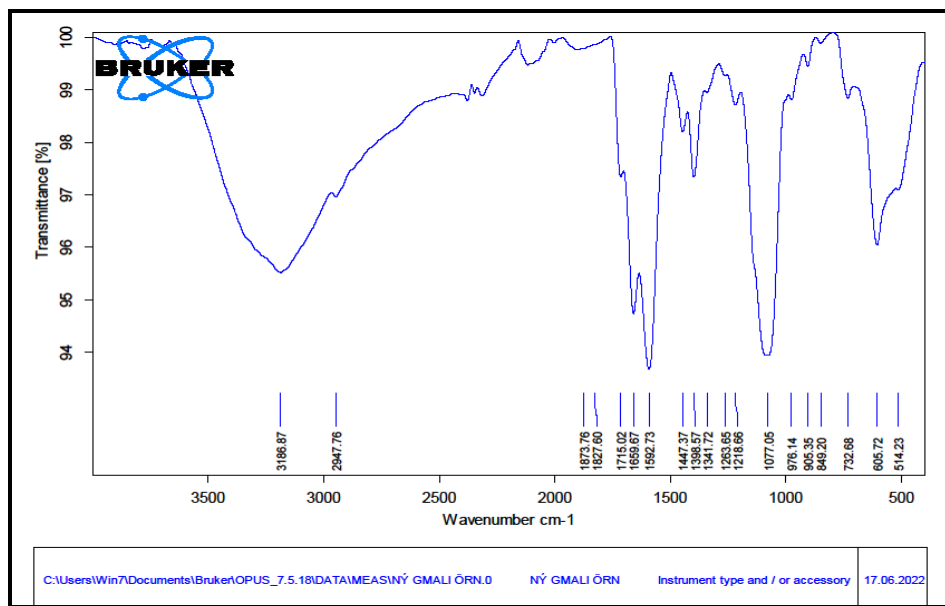
Şekil 3.7. GMA-IDA içermeyen 6 numaralı kriyojelin spektrumu.

Şekil 3.8’de GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin spektrumunda 1713 cm^{-1} (karbonil grubuna ait band) ve 3340 cm^{-1} ($-\text{OH}$ gruplarına ait germe titreşim bandları) civarında bantlar görülmektedir. Ayrıca GMA’nın yapısındaki epoksi gruplarına atfedilen 857 ve 908 cm^{-1} ’deki bantların varlığı epoksi gruplarının tamamlanmayan dönüşümünü ifade etmektedir [110]. Ayrıca 1713 cm^{-1} ve 1660 cm^{-1} civarında; GMA-IDA birimlerinin ester, karboksilik asit ve karboksilat tuzlarındaki $\text{C}=\text{O}$ ’nun germe titreşimlerine atfedilen iki tepe gözlemlenmiştir [111].



Şekil 3.8. GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin spektrumu.

Şekil 3.9'daki Ni^{2+} adsorplanmış 7 numaralı kriyojel örneğine ait FTIR spektrumunda ise adsorpsiyon öncesinde görülen bantlarda ufak kaymalar gözlenmiştir. Bu kaymalar metal iyonu ile adsorban arasında etkileşim olduğunu göstermektedir [112].



Şekil 3.9. Ni^{2+} adsorplanmış GMA-IDA içeren 7 numaralı kriyojelin spektrumu.

3.1.3. Şişme Oranı

Şişme Oranı verileri Design Expert istatistik yazılım programında Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology=RSM) ile uygun modeller kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analiz ile ilgili sonuçlar sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmektedir.

Tablo 3.1. Şişme testi istatistiksel analiz modeli.

Kaynak	p-değeri	Lack of Fit p-değeri	Düzeltilmiş R ²	Öngörülen R ²	
Linear	0,0173	0,0004	0,4759	-0,3744	
2FI	0,2374	0,0004	0,5632	-3,5063	
Quadratic	< 0.0001	0,3586	0,9897	0,8216	Önerilen
Cubic	0,3586		0,9899		Aliased

Tablo 3.1’de şişme oranı istatistiksel analizinde uygun modelin “Quadratic” model olarak önerildiği görülmektedir. Modelin “Düzeltilmiş R²” değeri 0,9897 belirlenmiştir.

Tablo 3.2. Quadratic modele ait ANOVA tablosu.

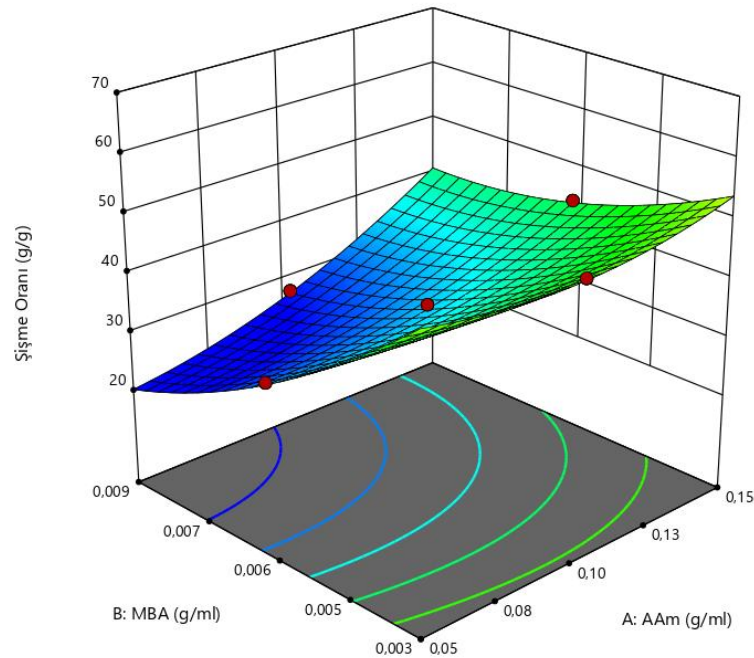
Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalamanın Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	1644,90	9	182,77	150,98	< 0.0001	önemli
A-AAm	63,84	1	63,84	52,74	0,0008	
B-MBA	253,58	1	253,58	209,47	< 0.0001	
C-GMA-IDA	72,00	1	72,00	59,48	0,0006	
AB	30,94	1	30,94	25,56	0,0039	
AC	1,61	1	1,61	1,33	0,3015	
BC	235,23	1	235,23	194,32	< 0.0001	
A ²	32,08	1	32,08	26,50	0,0036	
B ²	38,01	1	38,01	31,40	0,0025	
C ²	92,66	1	92,66	76,54	0,0003	
Residual	6,05	5	1,21			
Lack of Fit	1,28	1	1,28	1,07	0,3586	önemsiz
Pure Error	4,77	4	1,19			
Cor Total	1650,95	14				

Tablo 3.2’de önerilen “Quadratic” modelin önemli olduğu görülmektedir (p<0,0001). p değerlerinin 0,05’ten küçük olması model terimlerinin önemli olduğunu göstermektedir. Bu durumda A, B, C, AB, BC, A², B², C² önemli model terimleridir. AAm, MBA ve

GMA-IDA konsantrasyonları modeli önemli kılan parametrelerdir. “p” değeri 0,1'den büyük değerler, model terimlerinin önemli olmadığını göstermektedir. Buna göre AC terimi modele göre önemsiz bir değerdir. “Model Uygunsuzluğu (Lack of Fit) F-değeri” 1,07 olarak bulunmuş olup saf hataya göre önemsiz olduğu anlamına gelmektedir (Lack of Fit F-değeri<0,05). Elde edilen modele göre şişme oranı üzerine etki eden sentez parametrelerine ait yüzey grafikleri aşağıda karşılaştırmalı olarak sunulmaktadır.

3.1.3.1. Şişme Oranına AAm ve MBA Etkisi

Farklı AAm ve MBA oranlarının şişme oranı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Şekil 3.10'daki grafiğe göre AAm konsantrasyonu arttıkça şişme oranı artarken, MBA konsantrasyonu arttıkça şişme oranının azaldığı görülmüştür.

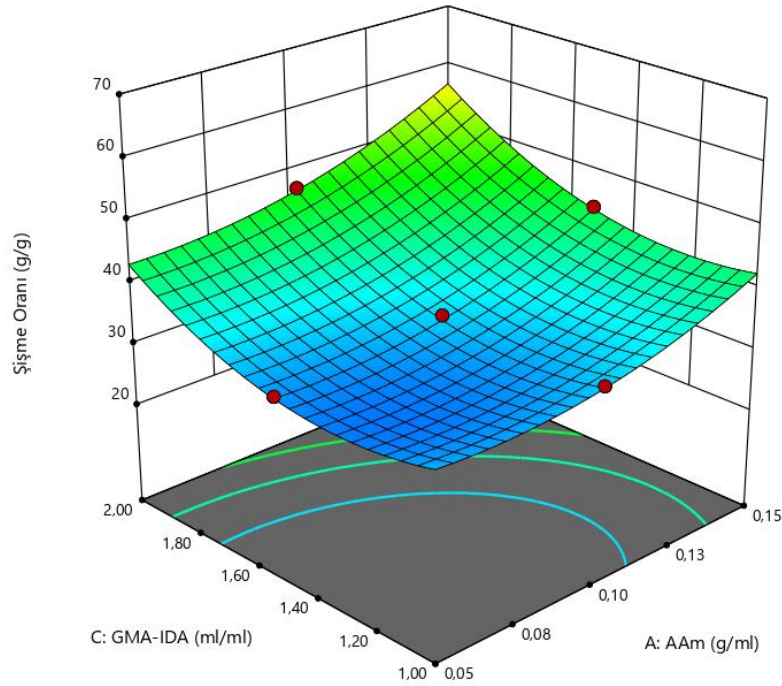


Şekil 3.10. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; şişme oranına AAm (g/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.

Beklendiği üzere polimerik yapılarda doğrusal kısmın artması, polimerin çözücüler içindeki şişme oranını arttırmaktadır. Bu grup analizlerden elde edilen sonuçlara göre kriyojelin lineer kısmını oluşturan AAm miktarının artması jelin su tutma kapasitesini arttırmaktadır. Literatürde birçok çalışma göstermektedir ki polimerik yapılarda bulunan çapraz bağlayıcı solvent içinde polimerin şişme oranını kontrol etmektedir. Şekil 3.10 incelendiğinde reçetede MBA oranının artışı şişme oranını hızlı bir biçimde düşürmektedir.

3.1.3.2. Şişme Oranına AAm ve GMA-IDA Etkisi

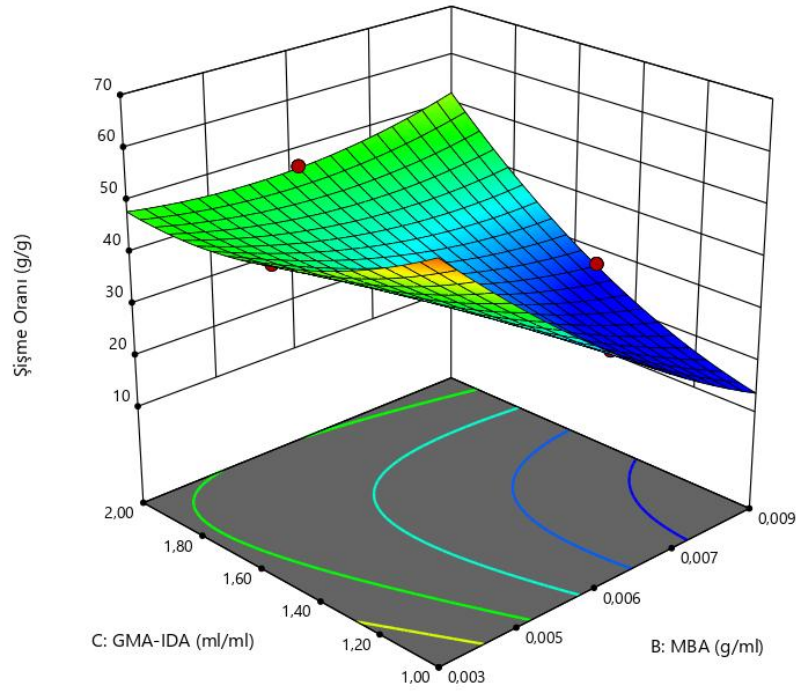
Kriyojelin şişme oranı üzerine GMA-IDA miktarı incelendiğinde, GMA-IDA ile şişme oranı arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). AAm ile GMA-IDA arasında istatistiksel ilişki görülmemiş olup reçetede bulunan GMA'nın değişiminin şişme oranına etkisi belirlenmemiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; şişme oranına GMA-IDA (mL/mL) ve AAm (g/mL) etkisi.

3.1.3.3. Şişme Oranına GMA-IDA ve MBA Etkisi

Son değişken kombinasyonu olan GMA-IDA-MBA konsantrasyonlarının şişme oranı üzerinde yüzey grafiği olarak Şekil 3.12’de gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü üzere GMA-IDA konsantrasyonu şişme oranı üzerine etkili değilken MBA konsantrasyonuna bağlı olarak şişme oranı azalmaktadır. Önceki bölümde tartışıldığı üzere, çapraz bağlayıcı oranı arttıkça şişme oranı azalmaktadır.



Şekil 3.12. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; şişme oranına GMA-IDA (mL/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.

3.1.4. Makro Gözenek Miktarı

Makro gözenek miktarı verileri Design Expert istatistik yazılım programında Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology=RSM) ile uygun modeller

kullanılarak analiz edilmiştir. Design Expert yazılımının önerdiği model ve parametreleri Tablo 3.3'te verilmektedir.

Tablo 3.3. Makro gözeneklilik istatistiksel analiz modeli.

Kaynak	p-değeri	Lack of Fit p-değeri	Düzeltilmiş R ²	Öngörülen R ²	
Linear	0,0442	0,0032	0,3718	-0,7875	
2FI	0,667	0,0018	0,2822	-6,8432	
Quadratic	0,0005	0,2644	0,96	0,0346	önerilen
Cubic	0,2644		0,9648		Aliased

Tablo 3.3'ten makro gözenek miktarının istatistiksel analizinde uygun modelin “Quadratic” model olarak önerildiği görülmektedir. Modelin “Düzeltilmiş R²” değeri 0,96'dır. Design Expert yazılımının önerdiği “Quadratic” modelin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 3.4'te sunulmaktadır.

Tablo 3.4. Quadratic modele ait ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalamanın Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	541,34	9	60,15	38,30	0,0004	önemli
A-AAm	29,65	1	29,65	18,87	0,0074	
B-MBA	2,21	1	2,21	1,40	0,2893	
C-GMA-IDA	0,1250	1	0,1250	0,0796	0,7892	
AB	34,34	1	34,34	21,86	0,0055	
AC	0,8008	1	0,8008	0,5099	0,5071	
BC	10,64	1	10,64	6,77	0,0481	
A ²	2,77	1	2,77	1,76	0,2415	
B ²	25,61	1	25,61	16,31	0,0099	
C ²	71,52	1	71,52	45,54	0,0011	
Residual	7,85	5	1,57			
Lack of Fit	2,33	1	2,33	1,68	0,2644	önemsiz
Pure Error	5,53	4	1,38			
Cor Total	549,20	14				

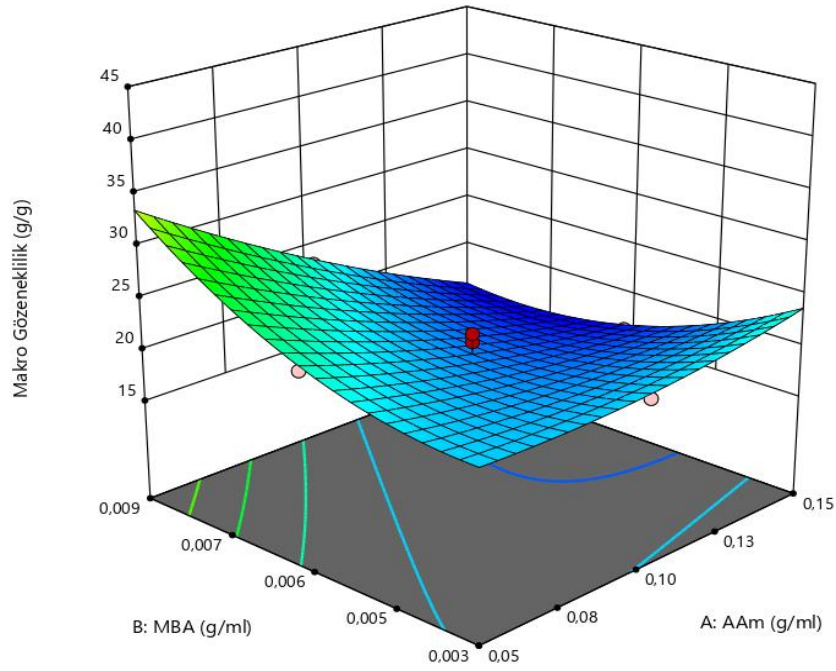
Tablo 3.4'te önerilen “Quadratic” modelin önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bu durumda A, AB, BC, B², C² terimleri modele göre önemlidir. AAm terimi modele göre önemlidir. Model terimlerinin “p” değerlerinin 0,1'den büyük değerler olması modelin

önemli olmadığını göstermektedir. Buna göre AC ve A^2 terimleri önemsiz değerler olup aynı zamanda B ve C terimleri modele göre önemsizdir. Modelin F değeri 38,30 olarak bulunmuş bu da modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Modelin “Lack of Fit değeri” 1,68 olup, “Lack of Fit” değerinin saf hataya göre önemsiz olduğunu göstermektedir. “Lack of Fit” değeri önemsiz olması modelin uygun olduğunu göstermektedir.

3.1.4.1. Makro Gözenek Miktarına AAm ve MBA Etkisi

AAm konsantrasyonunun makro gözenek miktarı üzerinde istatistiksel olarak etkisi olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ama MBA miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Şekil 3.13'teki üç boyutlu grafikte AAm ve MBA ikilisinin konsantrasyonlarındaki artışın makro gözenek miktarı üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

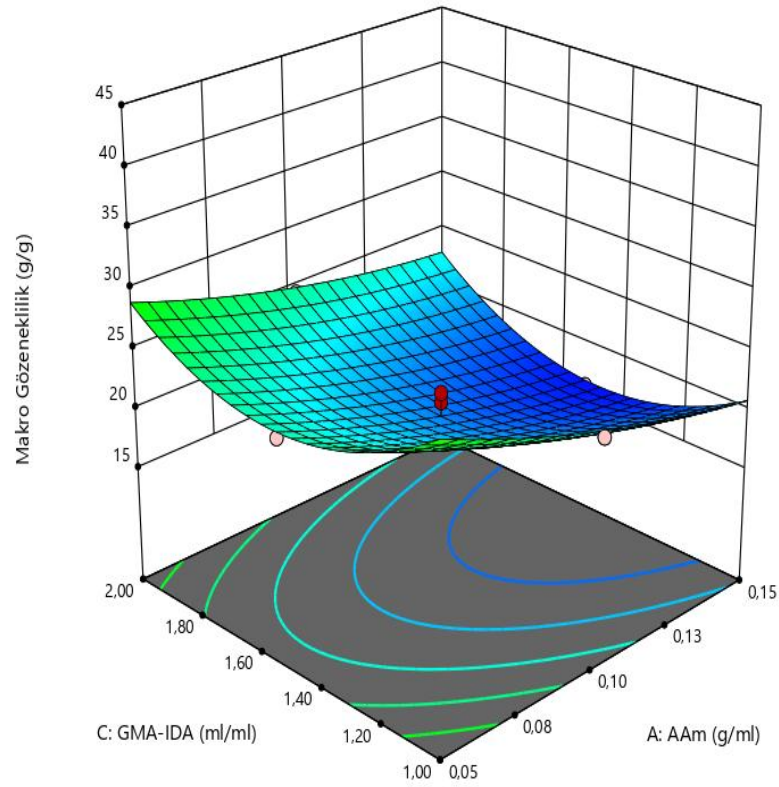
Makro gözenek miktarı su tutma kapasitesi ile alakalı olduğu için yüksek su tutma kapasitesine sahip kriyojellerin makro gözenek miktarlarının da yüksek olması beklenmektedir. Bu kapsamda AAm miktarındaki artışa bağlı olarak makro gözenekliliğin de artması beklenmektedir. Şekil 3.13'te makro gözenek yapısı üzerine AAm ve MBA konsantrasyonlarının etkisini gösteren yüzey grafiği verilmektedir. İstatistiksel olarak MBA miktarının makro gözenek üzerine etkisi önemsiz bulunmuş olmasına rağmen, grafikten görüleceği üzere su tutma kapasitesinin aksine çapraz bağlayıcı oranın makro gözenek miktarını belirli oranda arttırdığı belirlenmiştir. Bu literatürde sıklıkla görülen bir durumdur. Genelde polimerik yapılarda, reçetede yer alan yüksek çapraz bağlayıcı bileşen makro gözenek yapısını desteklemektedir.



Şekil 3.13. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; makro gözenek miktarına AAm (g/mL) ve MBA(g/mL) etkisi.

3.1.4.2. Makro Gözenek Miktarına AAm ve GMA-IDA Etkisi

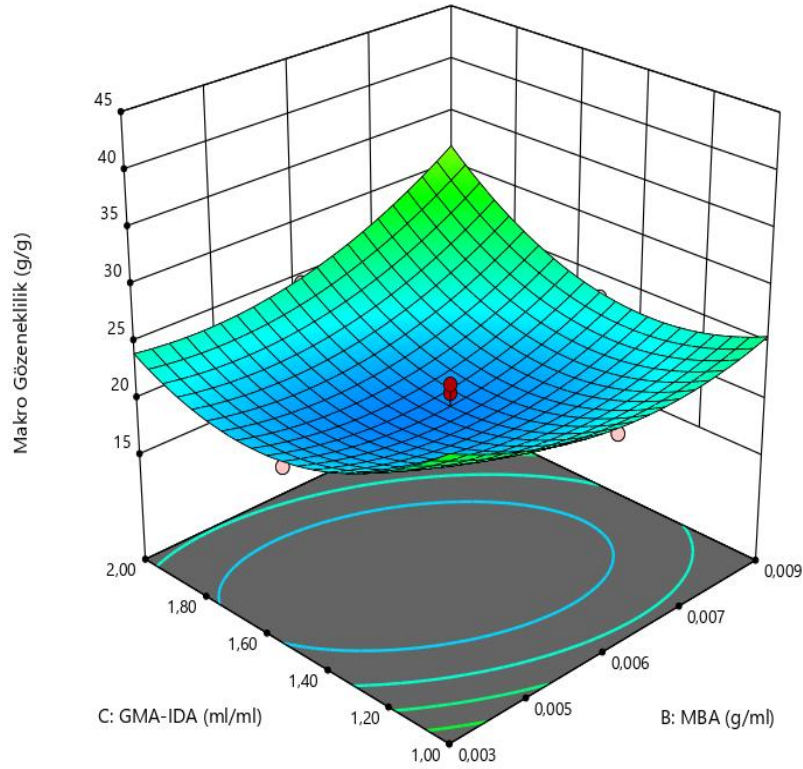
AAm konsantrasyonu makro gözenek miktarı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) iken GMA-IDA miktarı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Şekil 3.14'deki üç boyutlu grafikte görüldüğü üzere AAm ve GMA-IDA konsantrasyonlarındaki değişimin makro gözenek miktarına üzerine etkisinin sınırlı kaldığı görülmektedir.



Şekil 3.14. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; makro gözenek miktarına AAm (g/mL) ve GMA-IDA (mL/mL) etkisi.

3.1.4.3. Makro Gözenek Miktarına GMA-IDA ve MBA Etkisi

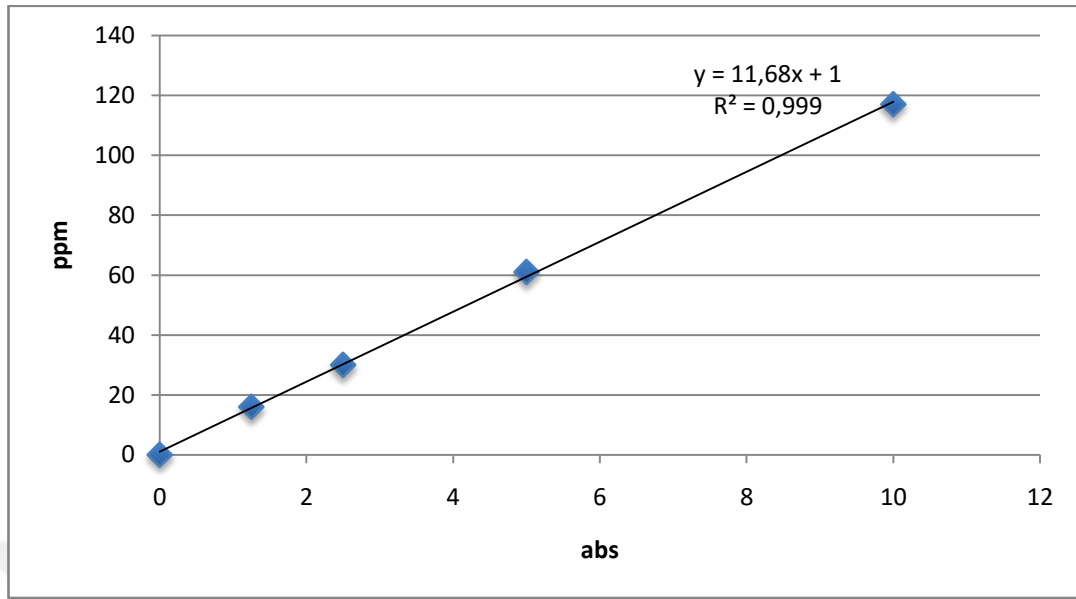
GMA-IDA ve MBA konsantrasyonlarının makro gözenek miktarı üzerinde istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Şekil 3.15'teki üç boyutlu grafikte GMA-IDA ve MBA konsantrasyonlarındaki değişimin makro gözenek miktarına etkisinin sınırlı kaldığı görülmektedir.



Şekil 3.15. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; makro gözenek miktarına GMA-IDA (mL/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.

3.2. Ni^{2+} Adsorpsiyonu

Deney tasarımında belirlenen parametrelerde hazırlanan kriyojellere Ni^{2+} adsorpsiyon deneyleri kesikli sistemlerde yürütülmüştür. Jel yapısında tutulan iyon miktarı adsorpsiyon ortamındaki Ni^{2+} derişimindeki azalışın takip edilmesiyle belirlenmiştir. Öncelikle stok çözeltiden hazırlanan belirli derişimlerdeki bir dizi Ni^{2+} standart çözeltilerin adsorbans değerleri Atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Perkin Elmer HGA 700) cihazında ölçülmüş ve kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.16’da verilmekte olup doğrunun denklemi “ $y=11,68x+1$ ”ve “ $R^2=0,999$ ” olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.16. Ni^{2+} standart çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu.

3.2.1. Ni^{2+} Adsorpsiyonun Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesikli sistemlerde yürütülen Ni^{2+} adsorpsiyonu deneylerinden elde edilen veriler Design-Expert 12.0.0 istatistik yazılım programında Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology=RSM) ile uygun modeller kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 3,5'te verilmektedir.

Tablo 3.5. Ni^{2+} adsorpsiyonu istatistiksel analiz modeli.

Kaynak	p-değeri	Lack of Fit p-değeri	Düzeltilmiş R^2	Öngörülen R^2	
Linear	< 0.0001	0,859	0,8135	0,7735	önerilen
2FI	0,6104	0,8142	0,7932	0,8019	
Quadratic	0,9668	0,3243	0,6846	-5,1846	
Cubic	0,3243		0,7003		Aliased

Tablo 3.5'te Ni^{2+} adsorpsiyonunun istatistiksel analizinde uygun modelin "Linear" model olarak önerildiği görülmektedir. Modelin "Düzeltilmiş R^2 " değeri 0,8135 ile

“Öngörülen R^2 ” değeri 0,7735 olup makul uyum içindedir. Lineer modele ait ANOVA tablosu Tablo 3.6’da verilmektedir.

Tablo 3.6. Linear modele ait ANOVA tablosu.

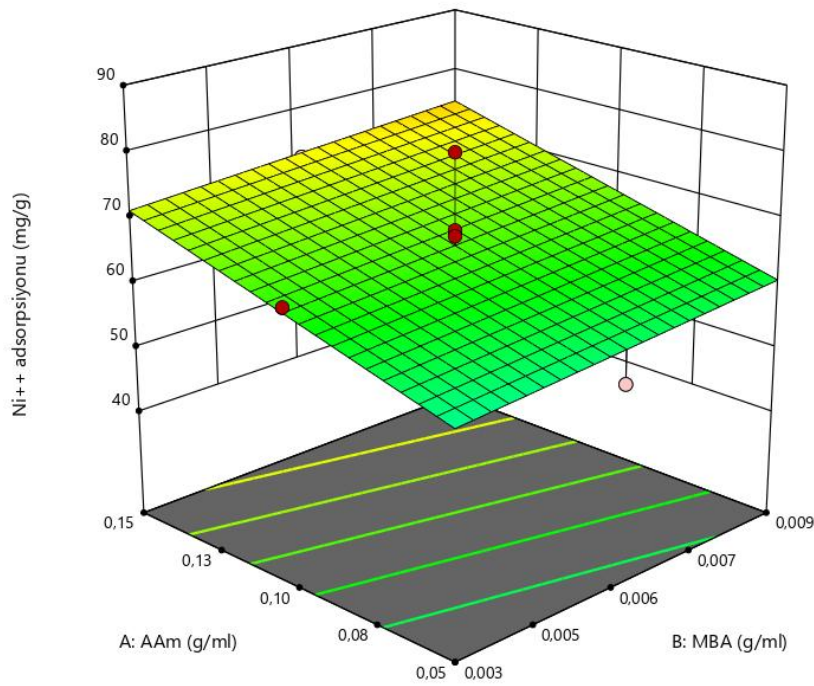
Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalamanın Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	1812,06	3	604,02	21,35	< 0.0001	önemli
A-AAm	303,88	1	303,88	10,74	0,0074	
B-MBA	19,80	1	19,80	0,7001	0,4206	
C-GMA-IDA	1488,37	1	1488,37	52,62	< 0.0001	
Residual	311,15	11	28,29			
Lack of Fit	129,34	7	18,48	0,4065	0,8590	önemsiz
Pure Error	181,81	4	45,45			
Cor Total	2123,20	14				

Tablo 3.6’da önerilen “Linear” modelin önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,0001$). “p” değerlerinin 0,05’den küçük olması model terimlerinin önemli olduğunu gösterir. Bu durumda A, C önemli model terimleri iken B önemsiz bir terimdir. B terimi yani MBA miktarı modele göre önemsiz bir değişkendir. Modelin “Lack of Fit F-değeri” 0,41 olup, Önemsiz “Lack of Fit” modelin uygun olduğunu göstermektedir. Modelin “F” değeri 21,35 olarak bulunmuş bu da modelin anlamlı olduğunu göstermektedir.

3.2.2. Ni^{2+} İyonu Adsorpsiyonuna AAm ve MBA Etkisi

Ni^{2+} adsorpsiyonuna yapılan analize göre değişken parametrelerden olan AAm konsantrasyonu ile Ni^{2+} adsorpsiyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu istatistiksel olarak görülmüştür ($p < 0,05$). Ancak MBA konsantrasyonunun Ni^{2+} adsorpsiyonunda istatistiksel olarak etkisi olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Şekil 3.17’deki üç boyutlu grafikte AAm (g/mL) konsantrasyonu arttıkça Ni^{2+} adsorpsiyonunu arttırdığı görülürken ve MBA (g/mL) konsantrasyonunun Ni^{2+} adsorpsiyonuna etki etmediği görülmektedir. Bu durum AAm miktarındaki artışın malzemenin şişme oranına bağlanmaktadır. Polimer jel yapıda doğrusal polimer zincir uzunluğunun artışı su tutma kapasitesini arttırmakta böylece aynı polimer kütlesinden daha hacimli bir matris elde edilmektedir.

Artan hacim içinde görünür difüzyon katsayısının artacağı literatürde çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir. Özellikle jel yapılarda difüzyon katsayısı jelin fiziksel yapısından etkilenmektedir.

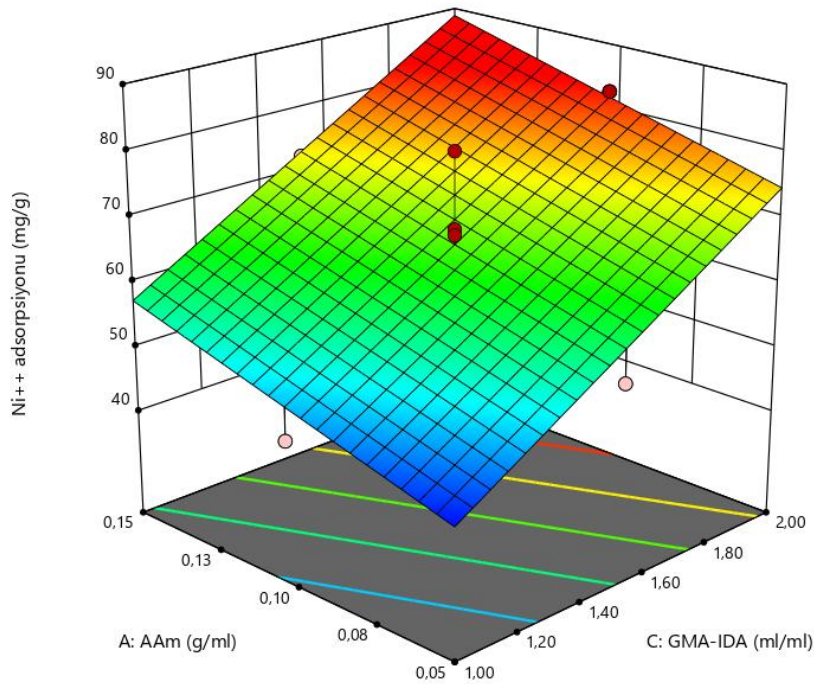


Şekil 3.17. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kuru kriyojel başına adsorplanan mg Ni^{2+} iyonları ile AAm ve MBA arasındaki ilişki.

3.2.3. Ni^{2+} İyonu Adsorpsiyonuna AAm ve GMA-IDA Etkisi

Adsorpsiyon çalışmasında kullanılan bağımlı değişkenler olan AAm ve GMA-IDA konsantasyonlarının Ni^{2+} iyonu adsorpsiyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Şekil 3.18'deki üç boyutlu yüzey grafiğinde AAm ve GMA-IDA miktarları arttıkça gram kuru kriyojel başına adsorplanan Ni^{2+} iyonu miktarının arttığı görülmektedir. GMA-IDA miktarının polimer yapısında artması yüzeyde Ni^{2+} iyonlarının bağlanabileceği ligand sayısını arttıracak için bu beklenen bir durumdur. Normal şartlarda hidrojel yapısında AAm'nin iyon bağlama yeteneği

bulunmamaktadır. Ancak önceki bölümde açıklandığı üzere reçetede artan AAm daha gevşek bir jel yapısı oluşturmakta bu da görünür difüzyon katsayısının artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle kriyojel yapısında AAm miktarının artması kütle aktarımını kolaylaştıracağı için adsorplanan Ni^{2+} miktarında bir artışın olduğu düşünülmektedir.

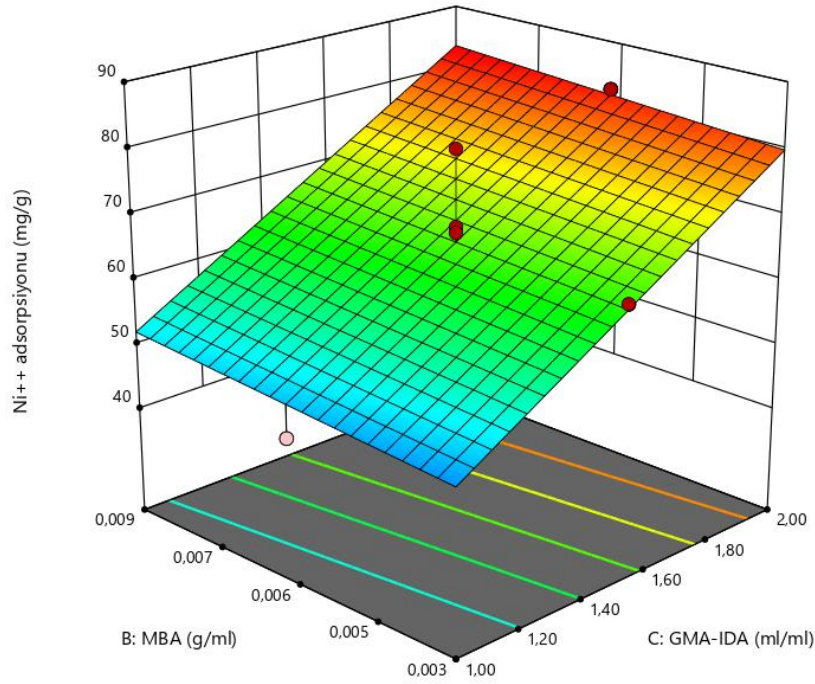


Şekil 3.18. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kuru kriyojel başına adsorplanan mg Ni^{2+} iyonları ile AAm ve GMA-IDA arasındaki ilişki.

3.2.4. Ni^{2+} İyonu Adsorpsiyonuna MBA ve GMA-IDA Etkisi

Adsorpsiyon çalışmasında diğer bir değişken olan GMA-IDA (ml/ml) konsantrasyonu ile g kuru madde kriyojel başına adsorplanan Ni^{2+} miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Şekil 3.19'daki grafikte MBA (g/mL) ve GMA-IDA (mL/ml) değişkenlerinin adsorplanan Ni^{2+} iyonu miktarına ikili etkisi gösterilmektedir. Bu grafiğe göre GMA-IDA konsantrasyonu arttıkça Bölüm 3.2.3'te

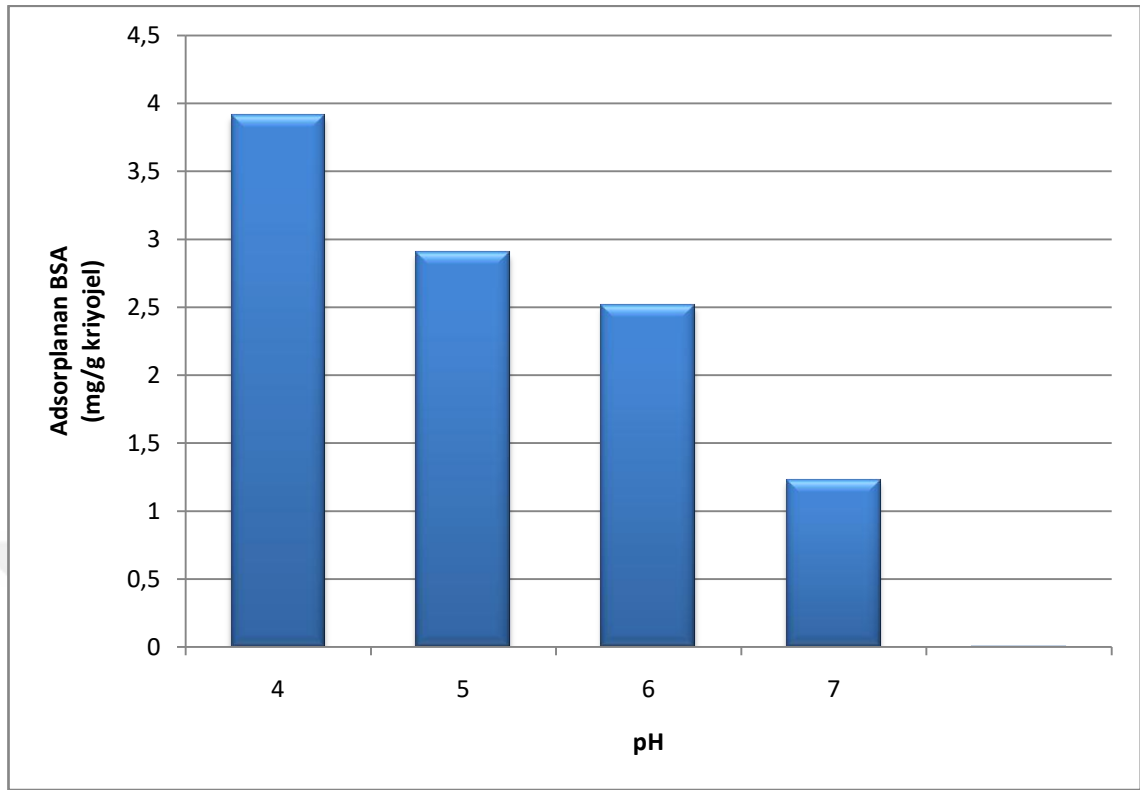
açıklandığı gibi adsorplanan Ni^{2+} iyonu artmasına rağmen artan MBA konsantrasyonu Ni^{2+} adsorpsiyonunu etkilememiştir.



Şekil 3.19. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kuru kriyojel başına adsorplanan mg Ni^{2+} iyonları ile MBA ve GMA-IDA arasındaki ilişki.

3.3. BSA Adsorpsiyonuna pH Etkisi

Design-expert deney tasarımına göre hazırlanan kriyojel örneklerinden orta değerlere sahip olan örnek 12 seçilerek pH 4-8 arasında fosfat tamponunda adsorplanan g kuru kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarı araştırılmıştır. Önceki bölümlerde açıklandığı üzere kesikli sistemlerde yürütülen bu grup deneyler çalkalamalı su banyosunda, sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Şekil 3.20’de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere ortamın pH değeri arttıkça birim kütlede kuru kriyojel için adsorplanan protein miktarı azalmaktadır.



Şekil 3.20. pH 4-8 arasında g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarını gösteren grafik.

Şekil 3.20’de görüldüğü üzere pH 4’te g kriyojel başına 3,9 mg olarak en yüksek BSA adsorplanmıştır.

3.4. BSA Adsorpsiyonu

Tez çalışmasının bu bölümünde, deney tasarımı verilen parametrelerde üretilen Ni^{2+} bağlı İMAK kriyojellerin protein adsorplama kapasiteleri, kesikli sistemlerde ön denemelerde belirlenen sabit pH ve sıcaklık değerinde belirlenmiştir. Literatürde biyokimyasal çalışmalarda yer alan protein adsorpsiyon deneylerinde, model protein olarak Bovine Serum Albumin (BSA) sıklıkla kullanılmaktadır. Deney tasarımı elde edilen protein adsorpsiyon verileri Design Expert istatistik yazılım programı ile analiz edilmiş ve uygun modeller kullanılarak belirlenen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.7. BSA adsorpsiyonunun istatistiksel analiz modeli.

Kaynak	p-değeri	Lack of Fit p-değeri	Düzeltilmiş R ²	Öngörülen R ²	
Linear	0,0029	0,0046	0,6267	0,1771	önerilen
2FI	0,0551	0,0107	0,7914	-0,3752	
Quadratic	0,0117	0,1011	0,9568	-0,8454	önerilen
Cubic	0,1011		0,9746		Aliased

Tablo 3.7’de BSA adsorpsiyonunun istatistiksel analizinde “Quadratic” ve “Linear” modelin uygun modeller olarak önerildiği görülmektedir. BSA adsorpsiyonunda $p < 0,05$ ve “Düzeltilmiş R²” değerleri yüksek olduğu için Linear model değil “Quadratic” model tercih edilmiştir. “Quadratic” modele ait anova verileri Tablo 3.8’de verilmektedir.

Tablo 3.8. Quadratic modele ait ANOVA analizi.

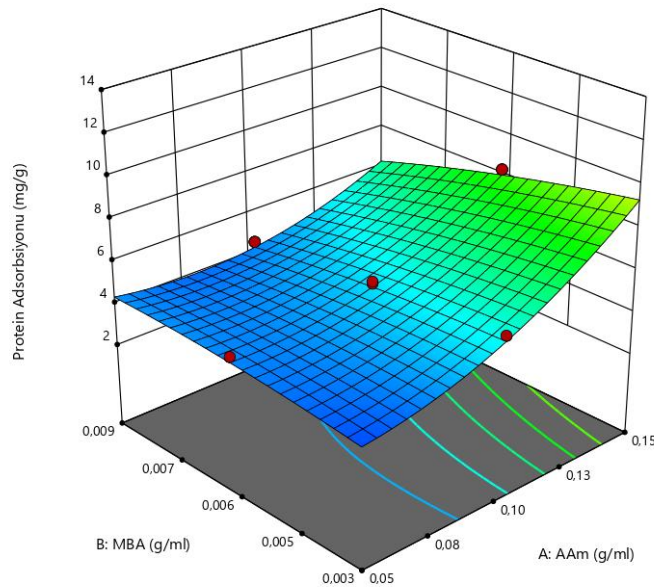
Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalamanın Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	90,71	9	10,08	35,48	0,0005	önemli
A-AAm	7,22	1	7,22	25,42	0,0040	
B-MBA	0,7200	1	0,7200	2,53	0,1722	
C-GMA-IDA	14,05	1	14,05	49,45	0,0009	
AB	1,14	1	1,14	4,02	0,1014	
AC	3,10	1	3,10	10,92	0,0214	
BC	11,80	1	11,80	41,55	0,0013	
A ²	3,11	1	3,11	10,96	0,0212	
B ²	0,1140	1	0,1140	0,4015	0,5542	
C ²	2,32	1	2,32	8,16	0,0356	
Residual	1,42	5	0,2840			
Lack of Fit	0,7522	1	0,7522	4,50	0,1011	önemsiz
Pure Error	0,6680	4	0,1670			
Cor Total	92,13	14				

Tablo 3.8.’de önerilen “Quadratic” modelin önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). “p” değerlerinin 0,05’ten küçük olması model terimlerinin önemli olduğunu göstermektedir. Bu durumda A, C, AC, BC, A², C² önemli model terimleridir. AAm ve GMA-IDA miktarları modeli önemli kılan parametrelerdir. Ayrıca ilgili değerledirmeye göre AB, B ve B² terimleri önemsiz parametrelerdir. “Lack of Fit F-değeri” 4,5 olarak bulunmuş olup saf hataya göre önemsiz olduğu anlamına gelmektedir (Lack of Fit F-değeri $< 0,05$).

Modelin F değeri 35,48 olarak bulunmuş bu da modelin önemli olduğunu göstermektedir.

3.4.1. BSA Adsorpsiyonuna AAm ve MBA Etkisi

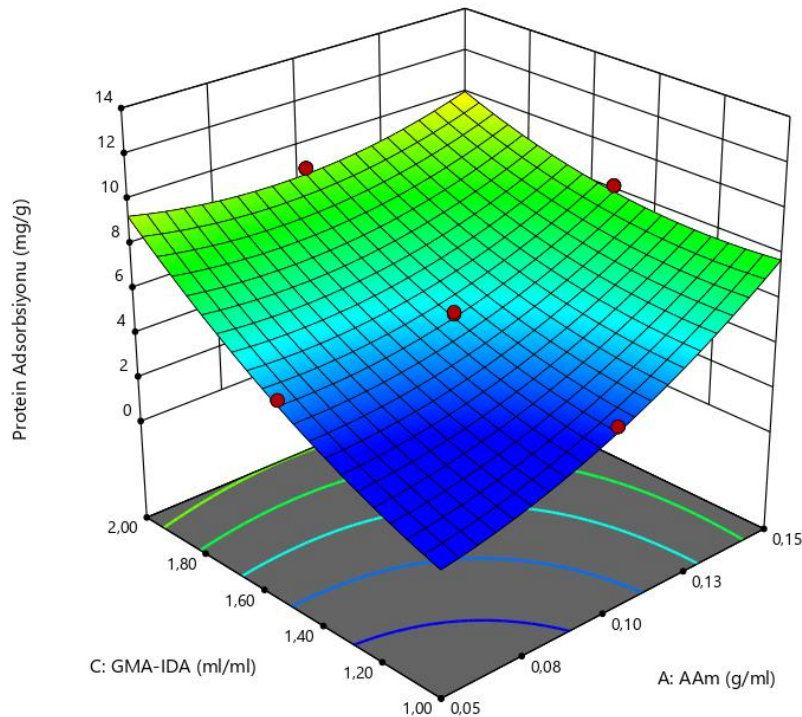
Design-expert deney tasarımına göre hazırlanan kriyojellerde BSA adsorpsiyon çalışmalarında, AAm konsantrasyonunun gram kuru kriyojel başına adsorplanan mg BSA üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). MBA konsantrasyonu, BSA adsorpsiyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Deney tasarımına göre farklı parametrelerde hazırlanan kriyojellerde BSA adsorpsiyon verileri Şekil 3.21’de üç boyutlu yüzey grafiğinde verilmektedir. Grafikten görüleceği üzere kriyojel reçetesinde bulunan MBA derişiminin adsorplanan protein miktarı üzerine etkisinin olmadığı görülmektedir. Ancak kriyojel yapısındaki AAm miktarındaki artış jel yapısında adsorplanan protein miktarını arttırdığı açıkça görülmektedir.



Şekil 3.21. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarına AAm (g/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.

3.4.2. BSA Adsorpsiyonuna AAm ve GMA-IDA Etkisi

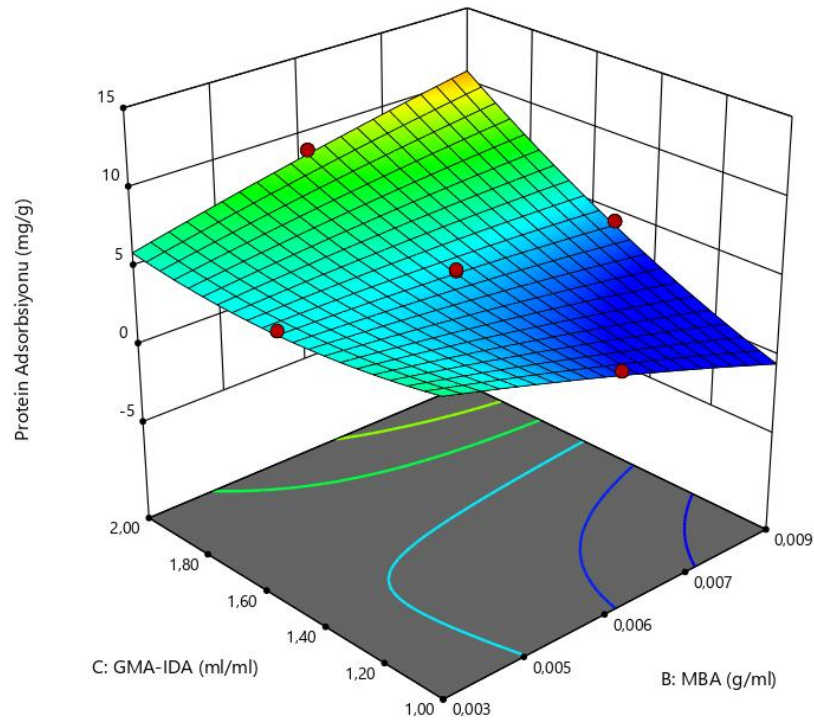
AAm ve GMA-IDA konsantrasyonlarının g kuru kriyojel başına adsorplanan mg BSA üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu görülmektedir ($p<0,05$). GMA-IDA ve AAm'nin konsantrasyonlarındaki artışın BSA adsorpsiyonunda artış gösterdiği Şekil 3.22'deki üç boyutlu yüzey grafikte görülmektedir. Önceki bölümlerde açıklandığı üzere AAm polimer yapısındanki doğrusal bölümleri oluşturmaktadır. Bu polimer yapısındaki doğrusal bölümlerin artması jel yapısını etkilemekte ve şişme oranını arttırmaktadır. Polimer yapısında hacmin artması etkin difüzyon katsayısını arttırdığı için kriyojel yapısında adsorplanan BSA miktarını arttırmaktadır. Kriyojel reçetesindeki GMA-IDA konsantrasyonundaki artış proteinin bağlanabileceği ligand miktarını arttırmaktadır. Bu nedenle GMA-IDA derişimindeki artışa bağlı olarak adsorplanan protein miktarının da artması beklenen bir durumdur.



Şekil 3.22. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarına AAm (g/mL) ve GMA-IDA(mL/mL) etkisi.

3.4.3. BSA Adsorpsiyonuna GMA-IDA ve MBA Etkisi

GMA-IDA konsantrasyonunun, g kuru kriyojel başına adsorplanan mg BSA üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu ($p<0,05$) önceki bölümde belirtilmişti. Ancak MBA konsantrasyonunun adsorpsiyonda anlamlı bir etkisi olmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Şekil 3.23'teki üç boyutlu yüzey grafikte GMA-IDA ve MBA konsantrasyonlarının birlikte arttığında adsorplanan BSA miktarında artış gösterdiği görülmemektedir. Şekilden görüleceği üzere düşük MBA konsantrasyonlarda, reçetede bulunan GMA-IDA miktarı protein adsorpsiyonu üzerine etkisi sınırlıyken MBA derişimi arttığında protein adsorpsiyonu GMA-IDA derişiminden çok daha fazla etkilenmektedir.



Şekil 3.23. Üç boyutlu yüzey yanıt grafiği; g kriyojel başına adsorplanan mg BSA miktarına GMA-IDA(mL/mL) ve MBA (g/mL) etkisi.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan tez kapsamında, tek basamakta proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmak üzere İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK) destek materyalleri sıfırın altındaki sıcaklıkta (-22°C) serbest radikal kopolimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır. Çalışmada farklı sentez parametrelerinin kriyojel özellikleri üzerine çeşitli etkileri belirlenmiştir. Makro gözenekli kriyojeller hazırlanmasında, akrilamit (AAm), metilen bisakrilamid (MBA) ve GMA-IDA konsantrasyonları bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir. Bu amaçla Design-Expert 12.0.0 istatistik programı kullanılarak ön denemelerle belirlenen seviyelerde deney tasarımı hazırlanarak poli(akrilamit-glisidil metakrilat)-iminodiasetik asit (PAGMA-IDA) kriyojelleri sentezlenmiştir. GMA üzerindeki glisidil grupları IDA ile aktive edilerek kriyojele metal bağlama özelliği kazandırılmıştır. Başlatıcı/hızlandırıcı (APS-TEMED) miktarı bütün deneylerde sabit tutulmuştur. Sentezlenen PAGMA-IDA kriyojellere, Ni^{2+} iyonu adsorplanarak (PAGMA-IDA- Ni^{2+}) kriyojellerin genel morfolojik yapı analizleri, FTIR analizi, şişme oranı, makro gözenek miktarı, Ni^{2+} adsorpsiyon ve BSA adsorpsiyon analizleri yapılarak karakterize edilmiştir.

PAGMA-IDA ve PAGMA-IDA- Ni^{2+} içeren 7 numaralı kriyojellerin SEM görüntüleri incelendiğinde kriyojellerin süngerimsi ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Monomer içeriği (AAm ve GMA-IDA), çapraz bağlayıcı (MBA) ve donma noktası (-22°C) kriyojelin bu yapıda olmasında etkili olduğu söylenebilir [98]. Ni^{2+} adsorplamış PAGMA-IDA kriyojeli morfolojik olarak farklılıklar göstermiştir. Ayrıca GMA-IDA içeren 7 numaralı PAGMA-IDA- Ni^{2+} kriyojeline yapılan EDX analizi Ni^{2+} 'in varlığını kanıtlamaktadır.

FTIR analizleri yapılan GMA-IDA içeren 7 numaralı PAGMA-IDA kriyojelin spektrumunda 1713 cm^{-1} (karbonil grubuna ait band) ve 3340 cm^{-1} (-OH gruplarına ait germe titreşim bandları) civarında bantlar görülmektedir. Ni^{2+} adsorpsiyonu öncesinde görülen IR bantlarında ufak kaymalar gözlenmiştir ve bu kaymalar Ni^{2+} ile kriyojel arasında etkileşim olduğunu göstermektedir [112].

PAGMA-IDA kriyojellerinin şişme oranı sonuçlarına göre en yüksek şişme oranı 66,39 g H_2O /g kriyojel olarak 12 numaralı örnekte, en düşük şişme oranı da 26,41 g H_2O /g kriyojel olarak 11 numaralı örnekte görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre kriyojel sentezindeki monomer konsantrasyonlarındaki artışın şişme oranında artmaya neden olduğu belirlenmiştir. Uygun ve arkadaşlarının (2013) yaptığı üreaz adsorpsiyonu için sentezledikleri IDA içeren poli (2-hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat)-iminodiasetik asit [poly (HEMA-GMA)-IDA] kriyojelin şişme derecesi 3,83 g H_2O /g kriyojel olarak bulunmuştur. Poli(HEMA) ve poli (HEMA-GMA) kriyojellerin şişme derecesi poly(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinden daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla, 8,44 g H_2O /g kriyojel, 5,54 g H_2O /g kriyojel) [95].

PAGMA-IDA kriyojellerinin makro gözenek miktarı sonuçlarına göre en yüksek %41,3 olarak 3 numaralı örnekte görülürken en düşük makro gözenek miktarı ise %16,1 olarak 1 numaralı kriyojel örneğinde bulunmuştur. AAm ve GMA-IDA konsantrasyonları gözenek miktarının azalmasında etkili olmuştur. Plieva ve diğerleri tarafından (2005) yapılan bir çalışma sonuçlarına göre poliakrilamit(pAAm) kriyojellerin gözenek hacmi artan monomer konsantrasyonu ile azalmıştır [89]. Wan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da (2019), poli(2-hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat)-iminodiasetik asit [p (HEMA-GMA)-IDA] kriyojellerinin gözenekliliği %69,5 olarak bulunmuştur [104].

PAGMA-IDA kriyojellerine Ni^{2+} adsorpsiyonu sonuçlarına göre en yüksek adsorplanan Ni^{2+} miktarı 83,1 mg/g kuru kriyojel olarak 7 numaralı örnekte elde edilmiştir. En düşük miktar ise 42,6 mg/g kuru kriyojel olarak 12 numaralı örnekte görülmüştür. AAm ve GMA-IDA'nın ikili etkisine bakıldığında AAm ve GMA-IDA konsantrasyonlarının en yüksek değerinde olduğu kriyojelde g kuru madde başına adsorplanan Ni^{2+} iyonu miktarının en yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeni GMA-IDA miktarının yüksek olması açılan epoksi halkası sayısının artmasıyla daha fazla Ni^{2+} iyonunun adsorplanması olarak yorumlanmıştır. Derazshamshir (2013) tarafından yapılan bir

çalışmada PHEMA-IDA-Ni²⁺ kriyojelinin adsorpsiyon kapasitesi pH 7,4'te 4,25 mg/g olarak bulunmuştur [103].

PAGMA-IDA-Ni²⁺ kriyojellerine BSA adsorpsiyonu analizi yapmak amacıyla öncelikle orta değerlere sahip 12 numaralı kriyojel örneği seçilerek pH 4-8 arasında tarama yapılmıştır. En yüksek adsorplanan BSA miktarı pH 4'te bulunduğu için bu tampon değerinde bütün kriyojel örneklerine 1 mg/ml konsantrasyonunda BSA adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. BSA miktarı ölçümleri 280 nm'de pH 4 fosfat tamponunda yapılmıştır. Adsorplanan BSA miktarı en yüksek 12,3 mg BSA/g kriyojel olarak 3 numaralı örnekte, en düşük miktar ise 3 mg BSA/g kriyojel olarak 11 numaralı örnekte bulunmuştur. GMA-IDA ve AAm konsantrasyonları, BSA adsorpsiyonunda artışa neden olmuştur. Bunun nedeni Ni²⁺ iyonları ile reaksiyona giren IDA miktarının yüksek olması ve dolayısıyla BSA'nın Ni²⁺ iyonu ile güçlü etkileşim oluşturan N-terminal dizisi X-Y-His sahip olması adsorpsiyonun arttırmasında etkili olduğu söylenebilir [113]. Ayrıca pH da BSA adsorpsiyonunda etkili olmuştur. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2008), maksimum adsorplanan BSA pH 4,6'da 3,9 mg/g olarak bulunmuştur. Bu da BSA'nın izoelektrik noktasına yakındır (pH 4,5-4,8). BSA ve Ni²⁺ arasındaki koordinatif etkileşim, BSA moleküllerindeki histidil kalıntılarındaki imidazol nitrojenlerin protonlanmamış formda olduğu BSA'nın izoelektrik noktasında maksimuma ulaşır. Adsorbe edilmiş protein molekülleri arasındaki itme kuvveti, BSA'nın izoelektrik noktasında minimuma ulaştığında maksimum bağlanma kapasitesi göstermektedir [114, 115]. Bu tez kapsamında protein adsorpsiyon çalışmalarında yapılan pH taramasında literatürdeki bu verilere uygun olarak optimum bağlanmanın pH 4'te olduğu belirlenmiştir. Bu durum literatürde de belirtildiği üzere BSA'nın izoelektrik noktası yakınında ve protein metal arasındaki etkileşimlerin artması ve bu sayede BSA adsorpsiyonunun yüksek bulunmasına neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Wan ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada Cu²⁺ iyonu şelatlanan poli (hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat [p (HEMA-GMA)]) kriyojel kolonlarının maksimum BSA adsorpsiyon kapasitesi 154,11 mg/g olarak bulunmuştur [104].

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre proteinlerin saflaştırılmasında sentezlenen PAGMA kriyojellerinin düşük maliyetle ve tek basamakta hazırlanarak adsorpsiyon ve elüsyon basamaklarının kısa sürede gerçekleştirilmesine olanak sağlaması yönünden ticari destek materyallerine alternatif olabilecektir. Ayrıca hazırlanan kriyojel

malzemeler partikül formunda olduğu kesikli sistemlere ve kolon uygulamalarına uygundur. Bu çalışmadan yola çıkılarak PAGMA kriyojellerinin, diğ er metal ve ligandlarla modifiye edilerek enzim saflaştırma ve atık sulardan antibiyotik gibi maddelerin uzaklaştırılması çalışmalarında da kullanılabileceğ i ön gör÷lmektedir.



KAYNAKÇA

1. Saldamlı, İ., Temiz, A., 2007. Aminoasitler, peptitler ve proteinler, 227-230. *In: Gıda Kimyası* (Eds: İ. Saldamlı, A. Temiz). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
2. Kessel, A., Ben-Tal, N., 2018. Introduction to proteins: structure, function, and motion. Chapman and Hall/CRC. New York.
3. Ersson, B., Rydén, L., Janson, J. C., 2011. Introduction to protein purification, 1-22. *In: Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications* (Eds: J. C. Janson). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
4. Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., ve Cabral, J. M. S., 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, **87**(2), 143–159.
5. Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, **258**(5536), 598-599.
6. Gutiérrez, R., Martín Del Valle, E. M., Galán, M. A., 2007. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. **Separation & Purification Reviews**, **36**(1): 71–111.
7. Whitford, D., 2005. Proteins: Structure and Function. John Wiley & Sons, İngiltere, pp. 544.
8. Buxbaum, E., 2015. Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer Cham, İsviçre, pp. 521.
9. Walsh, G., 2014. Proteins: Biochemistry and Biotechnology. John Wiley & Sons, İngiltere, pp. 448.
10. Wilson, K., Walker, J., 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University Press, ABD, pp. 759.
11. Lieberman, M. A., Ricer, R., 2019. Brs Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics. Lippincott Williams & Wilkins, ABD, pp. 449.

12. Aytekin, Ö. Ü., 2015. Transfection of *Spodoptera frugiperda* insect cell and production of recombinant protein. **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, **21**(7), 325-336.
13. Scopes, R. K., 1993. Protein Purification: Principles and Practice. Springer Science & Business Media, New York, pp. 380.
14. Waugh, D. S., 2005. Making the most of affinity tags. **Trends in Biotechnology**, **23**(6), 316-320.
15. Hearn, M. T., Acosta, D., 2001. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. **Journal of Molecular Recognition**, **14**(6), 323-369.
16. Terpe, K., 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **60**(5), 523-533.
17. Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A., 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. **Journal of Chromatography A**, **411** (1987), 177-184.
18. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., Stüber, D., 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. **Nature Biotechnology**, **6**(11), 1321-1325.
19. Roe, S., 2001. Protein Purification Techniques: A Practical Approach. Oxford University Press, New York, pp. 262.
20. Linn, S., 2009. Strategies and considerations for protein purifications, 9-19. *In: Guide to Protein Purification*, 2nd Edition Methods in Enzymology Vol. 463 (Eds: R. R. Burgess, M. P. Deutscher). Elsevier Inc., İngiltere.
21. Hage, D. S., 2018. Chromatography, 1–32. *In: Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens* (Eds: N. Rifai, A. R. Horvath, C. T. Wittwer, A. Hoofnagle). Elsevier Inc, Hollanda, pp. 205.

22. Patel, M., 2018. Review article: chromatography principle and applications. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, **13** (4), 288-293.
23. Eser, B., S.Dinçel, A., 2018. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. **Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi**, **2**(2), 51-57.
24. Kumpalume, P., Ghose, S., 2003. Chromatography: the high-resolution technique for protein separation. In Isolation and Purification of Proteins, 44-69. *In: Isolation and Purification of Proteins* (Eds. R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 676.
25. Braithwaite, A., Smith, J. F., 1999. Chromatographic Methods. Kluwer Academic Publishes, Hollanda, pp. 580.
26. Bayramoğlu, G., Ekici, G., Beşirli, N., Arica, M. Y., 2007. Preparation of ion-exchange beads based on poly (methacrylic acid) brush grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, **310**(1-3), 68-77.
27. Smoluch, M., Mielczarek, P., Drabik, A., Silberring, J., 2016. online and offline sample fractionation, 63–99. *In: Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads* (Eds: P.Ciborowski, J. Silberring). Elsevier Science, Hollanda.
28. Wang, S., Li, X., Sun, Y., 2019. Poly (N, N-dimethylaminopropyl acrylamide)-grafted Sepharose FF: A new anion exchanger of very high capacity and uptake rate for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, **1597**, 187-195.
29. Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., Cabral, J. M. S., 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, **87**(2), 143-159.
30. Eriksson, K.O., Belew M., 2011. Hydrophobic interaction chromatography, 165-181. *In: Protein Purification Principles, High Resolution Methods, and Applications* (Eds: J. C.Janson). John Wiley & Sons, New Jersey.

31. McCue, J. T., 2009. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications, 405-414. *In: Methods in Enzymology* Vol. 463 (Eds: R. R. Burgess, M. P. Deutscher) Elsevier Inc, ABD.
32. Stellwagen, E., 2009. Gel filtration, 373-385. *In: Methods in Enzymology* Vol. 463). Elsevier Inc., ABD.
33. Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., O'Connor, B. F., 2011. Gel-filtration chromatography, 25-33. *In: Protein Chromatography: Methods and Protocols* (Eds: D. Walls, S. T. Loughran, A. Madadlou, S. O'Sullivan, D. Sheehan). Humana Totowa, New Jersey.
34. Hagel, L., 2001. Gel-filtration chromatography, 10.9.1-10.9.2. *In: Current Protocols in Molecular Biology* (Eds: F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D. D. . Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl). John Wiley & Sons Inc, New Jersey.
35. Hagel L., 2011. Gel filtration: size exclusion chromatography, 51–91. *In: Protein Purification Principles, High Resolution Methods, and Applications* (Eds: J. C. Janson). John Wiley & Sons, New Jersey.
36. Hage, D. S., Matsuda, R., 2015. Affinity chromatography: a historical perspective, 1-19. *In: Affinity Chromatography* (Eds: S. Reichelt). Humana Press, New York.
37. Wilchek, M., Chaiken, I., 2000. An overview of affinity chromatography, 1-6. *In: Affinity Chromatography Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, Vol. 147 (Eds: P. Bailon, G. K. Ehrlich, W. J. Fung, W. Berthold). Humana Press, New York.
38. Hage, D. S., Ruhn, P. F., 2005. An introduction to affinity chromatography, 3-13. *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd Edition (Eds: D. S. Hage, J. Cazes). CRC Press, Boca Raton.
39. Hage, D. S., 1999. Affinity chromatography: A review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, 45(5), 593–615.

40. Magdeldin, S., Moser, A., 2012. Affinity chromatography: principles and applications, 3-28. In: Affinity Chromatography (Eds: S. Magdeldin). InTech, Hırvatistan.
41. Kip, C., Hamaloğlu, K. Ö., Demir, C., Tuncel, A., 2021. Recent trends in sorbents for bioaffinity chromatography. **Journal of Separation Science**, **44**(6), 1273-1291.
42. Scopes, R. K., 1993. Protein Purification: Principles And Practice. Springer Science & Business Media, New York.
43. Helfferich, F., 1961. 'Ligand exchange': a novel separation technique. **Nature**, **189**(4769), 1001-1002.
44. Gutierrez, R., Martín del Valle, E. M., Galan, M. A., 2007. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. **Separation and Purification Reviews**, **36**(1), 71-111.
45. Everson, R. J., Parker, H. E., 1974. Zinc binding and synthesis of eight-hydroxy-quinoline-agarose. *Bioinorganic Chemistry*, **4**(1), 15-20.
46. Velarde-Salcedo, A. J., Vázquez-Rodríguez, G., De León-Rodríguez, A., de la Rosa, A. P. B., 2021. Novel technologies in bioactive peptides production and stability, 47-74. In: *Biologically Active Peptides* (Eds: F. Toldrá, J. Wu). Elsevier Inc, ABD.
47. Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Ng, T. B., 2012. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **96**(6), 1411-1420.
48. Zhang, Y., Yang, Y., Ma, W., Guo, J., Lin, Y., Wang, C., 2013. Uniform magnetic core/shell microspheres functionalized with Ni²⁺-iminodiacetic acid for one step purification and immobilization of his-tagged enzymes. **ACS Applied Materials & Interfaces**, **5**(7), 2626-2633.
49. Karakuş, C., Uslu, M., Yazıcı, D., Salih, B. A., 2016. Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein. **Journal of Chromatography B**, **1021**, 182-187.

50. Charlton, A., Zachariou, M., 2008. Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins, 137-150. *In: Affinity Chromatography Methods and Protocols* (Eds: M. Zachariou). Humana Press, New Jersey.
51. Hale, J. E., Beidler, D. E., 1994. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**, **222**(1), 29-33.
52. Suen, S. Y., Liu, Y. C., Chang, C. S., 2003. Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species. **Journal of Chromatography B**, **797**(1-2), 305-319.
53. Ueda, E. K. M., Gout, P. W., Morganti, L., 2003. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of Chromatography A**, **988**(1), 1-23.
54. Kobayashi, S., Müllen, K., 2015. Encyclopedia Of Polymeric Nanomaterials. Springer Berlin, Heidelberg.
55. Lehr, R. V., Elefante, L. C., Kikly, K. K., O'Brien, S. P., Kirkpatrick, R. B., 2000. A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in Drosophila S2 cells. **Protein Expression and Purification**, **19**(3), 362-368.
56. Sakamoto, S., Kabe, Y., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y., Handa, H., 2009. Development and application of high-performance affinity beads: Toward chemical biology and drug discovery. **The Chemical Record**, **9**(1), 66-85.
57. Boschetti, E., 1994. Advanced sorbents for preparative protein separation purposes. **Journal of Chromatography A**, **658**(2), 207-236.
58. El-Karsani, K. S., Al-Muntasheri, G. A., ve Hussein, I. A., 2014. Polymer systems for water shutoff and profile modification: A review over the last decade. **Society of Petroleum Engineers**, **19**(01), 135-149.
59. Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bülow, L., Mattiasson, B., 2002. Chromatography of microbial cells using continuous

- supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, **977**(1), 27-38.
60. Gaberc-Porekar, V., Menart, V., 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, **49**(1-3), 335-360.
 61. Chaga, G. S., 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, **49**(1-3), 313-334.
 62. Kutysenko, V. P., Mikoulinskaia, G. V., Chernyshov, S. V., Yegorov, A. Y., Prokhorov, D. A., Uversky, V. N., 2019. Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, l-alanyl-d-glutamate peptidase of the bacteriophage T5. **International Journal of Biological Macromolecules**, **124**, 810-818.
 63. Denkhaus, E., Salnikow, K., 2002. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, **42**(1), 35-56.
 64. Porath, J., 1988. IMAC - immobilized metal ion affinity based chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, **7**(7), 254-259.
 65. Chang, Y. Y., Li, H., Sun, H., 2017. Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for metalloproteomics and phosphoproteomics, 329-353. *In: Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells* (Eds: K. K. W. Lo). Academic Press, İngiltere.
 66. Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Arrowsmith, C., 2008. Protein production and purification. **Nature Methods**, **5**(2), 135-146.
 67. Dąbrowski, S., Kur, J., 1998. Recombinant His-tagged DNA polymerase. I. Cloning, purification and partial characterization of *Thermus thermophilus* recombinant DNA polymerase. **Acta Biochimica Polonica**, **45**(3), 653-660.
 68. Velkov, T., Jones, A., Lim, M. L., 2008. Ni²⁺-based immobilized metal ion affinity chromatography of lactose operon repressor protein from *Escherichia coli*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, **38**(4), 422-441.

69. Smith, M. C., Furman, T. C., Ingolia, T. T., Pidgeon, C., 1988. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. **Journal of Biological Chemistry**, **263**(15), 7211-7215.
70. Selvaganapathy, P. R., 2008. Polymers, 75–105. *In: Comprehensive Microsystems* (Eds: Y.B. Gianchandani, O. Tabata, H. Zappe). Elsevier B.V., İngiltere.
71. Philippova, O. E., Khokhlov, A. R., 2012. Polymer gels, 339–366. *In: Polymer Science: A Comprehensive Reference* (Eds: K. Matyjaszewski, M. Möller). Elsevier B.V., İngiltere.
72. Xu, F., Jia, J., Jin, Y., Wang, D. T., 2001. High-level expression and single-step purification of human tryptophanyl-tRNA synthetase. **Protein Expression and Purification**, **23**(2), 296-300.
73. Philippova, O. E., 2000. Responsive polymer gels. **Polymer Science Series C**, **42**(2), 208-228.
74. Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, **185**(4706), 117-118.
75. Bahram, M., Mohseni, N., Moghtader, M., 2016. An introduction to hydrogels and some recent applications. *In: Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels* (Eds: S. B. Majee). IntechOpen.
76. Hentze, H. P., Antonietti, M., 2002. Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications. **Reviews in Molecular Biotechnology**, **90**(1), 27-53.
77. Şarkaya, K., 2020. P (NIPAM) kriyojelinin hazırlanışı, karakterizasyonu ve termal özelliklerinin p (NIPAM) hidrojeli ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi. **Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, **8**(2), 1383-1393.
78. Lozinsky, V. I., 2014. A brief history of polymeric cryogels, 1-48. *In: Polymeric Cryogels: Macroporous Gels With Remarkable Properties Vol. 263* (Eds: O. Okay). Springer Cham, İsviçre.

79. Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2009. Production and properties of cryogels by radical polymerization, 35-60. In: Macroporous Polymers: Macroporous Polymers (Eds: B. Mattiasson, A. Kumar, I. Y. Galeaev). CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, ABD.
80. Shiekh, P. A., Andrabi, S. M., Singh, A., Majumder, S., Kumar, A., 2021. Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. **European Polymer Journal**, **144**, 110234.
81. Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2001. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, **10**(4), 163-188.
82. Saylan, Y., Denizli, A., 2019. Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications. **Gels**, **5**(2), 20.
83. Çimen, D., Özbek, M. A., Bereli, N., Mattiasson, B., Denizli, A., 2021. Injectable cryogels in biomedicine. **Gels**, **7**(2), 38.
84. Henderson, T. M., Ladewig, K., Haylock, D. N., McLean, K. M., O'Connor, A. J., 2013. Cryogels for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, **1**(21), 2682-2695.
85. Chen, S. L., Lee, T. S., 1998. A study of supercooling phenomenon and freezing probability of water inside horizontal cylinders. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, **41**(4-5), 769-783.
86. Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergenståhl, B., Mattiasson, B., 2006. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. **Journal of Materials Chemistry**, **16**(41), 4065-4073.
87. He, X., Yao, K., Shen, S., Yun, J., 2007. Freezing characteristics of acrylamide-based aqueous solution used for the preparation of supermacroporous cryogels via cryo-copolymerization. **Chemical Engineering Science**, **62**(5), 1334-1342.
88. Savina, I. N., Gun'ko, V. M., Turov, V. V., Dainiak, M., Phillips, G. J., Galaev, I. Y., Mikhalevsky, S. V., 2011. Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels. **Soft Matter**, **7**(9), 4276-4283.

89. Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M. R., Gomez, D., Mikhlovsky, S., Galaev, I. Y., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. **Soft Matter**, **1**(4), 303-309.
90. Ivanov, R. V., Lozinsky, V. I., Noh, S. K., Han, S. S., Lyoo, W. S., 2007. Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular-weight precursor. I. Influence of the reaction temperature and concentration of the crosslinking agent. **Journal of Applied Polymer Science**, **106**(3), 1470-1475.
91. Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E. B., Yavuz, H., Denizli, A., 2010. Poly (glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. **Materials Science and Engineering: C**, **30**(2), 323-329.
92. Akduman, B., Uygun, M., Uygun, D. A., Akgöl, S., Denizli, A., 2013. Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. **Materials Science and Engineering: C**, **33**(8), 4842-4848.
93. Uygun, D. A., Uygun, M., Akgöl, S., Denizli, A., 2015. Reversible adsorption of catalase onto Fe^{3+} chelated poly (AAM-GMA)-IDA cryogels. **Materials Science and Engineering: C**, **50**, 379-385.
94. Uygun, M., Uygun, D. A., Özçalışkan, E., Akgöl, S., Denizli, A., 2012. Concanavalin A immobilized poly (ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, **887**, 73-78.
95. Uygun, M., Akduman, B., Akgöl, S., Denizli, A., 2013. A new metal-chelated cryogel for reversible immobilization of urease. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **170**(8), 1815-1826.
96. Singh, N. K., Dsouza, R. N., Grasselli, M., Fernández-Lahore, M., 2014. High capacity cryogel-type adsorbents for protein purification. **Journal of Chromatography A**, **1355**, 143-148.

97. Bayraktaroğlu, M., Orhan, H., Evli, S., Akgöl, S., Aktaş Uygun, D., Uygun, M., 2018. Lectin attached affinity cryogels for amyloglucosidase adsorption. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, **37**(5), 302-317.
98. Mól, P. C. G., Veríssimo, L. A. A., Eller, M. R., Minim, V. P. R., Minim, L. A., 2017. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, **1044**, 17-23.
99. Plieva, F., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2006. Macroporous polyacrylamide monolithic gels with immobilized metal affinity ligands: the effect of porous structure and ligand coupling chemistry on protein binding. **Journal of Molecular Recognition: an Interdisciplinary Journal**, **19**(4), 305-312.
100. Gonçalves, G. R. F., Gandolfi, O. R. R., Santos, C. M. S., Bonomo, R. C. F., Veloso, C. M., Fontan, R. D. C. I., 2016. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B**, **1033**, 406-412.
101. Erol., B., 2018, İmmobilize Metal Afinite Kromatografisinde Şelatlayıcı Karakterinin Adsorpsiyona Etkisi. Hitit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çorum. 72 s.
102. Koç, İlker., 2007. Makrogözenekli Poli (Akrilamit-Metakrilamidohistidin) Kriyojellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antibadi Saflaştırılması için Kullanılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 68 s.
103. Derazshamshir, A., 2013. Preparation of Cryogel Columns for Depletion of Hemoglobin from Human Blood. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 95 s.
104. Wan, B., Li, J., Ma, F., Yu, N., Zhang, W., Jiang, L., Wei, H., 2019. Preparation and properties of cryogel based on poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate). **Langmuir**, **35**(9), 3284-3294.

105. Chen, C. Y., Chen, C. Y., 2002. Stability constants of polymer-bound iminodiacetate-type chelating agents with some transition-metal ions. **Journal of Applied Polymer Science**, **86**(8), 1986-1994.
106. Singh, N. K., Dsouza, R. N., Grasselli, M., Fernández-Lahore, M., 2014. High capacity cryogel-type adsorbents for protein purification. **Journal of Chromatography A**, **1355**, 143-148.
107. Çimen, D., 2005. Sitokrom C Saflaştırılması için Süpermakrogözenekli İmmobilize Metal Afinite Kromatografi Adsorbentler. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 84 s.
108. Fu, Y., Wu, J., Zhou, H., Jin, G., 2015. Removal of nickel (II) from aqueous solutions using iminodiacetic acid functionalized polyglycidyl methacrylate grafted-carbon fibers. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, **23**(6), 919-923.
109. Kaşgöz, H., Özgümüş, S., Orbay, M., 2003. Modified polyacrylamide hydrogels and their application in removal of heavy metal ions. **Polymer**, **44**(6), 1785-1793.
110. Ma, Z. Y., Guan, Y. P., Liu, H. Z., 2005. Synthesis of monodisperse nonporous crosslinked poly (glycidyl methacrylate) particles with metal affinity ligands for protein adsorption. **Polymer International**, **54**(11), 1502-1507.
111. Chen, C. Y., Chiang, C. L., 2008. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. **Materials Letters**, **62**(21-22), 3607-3609.
112. Zhao, F., Tang, W. Z., Zhao, D., Meng, Y., Yin, D., Sillanpää, M., 2014. Adsorption kinetics, isotherms and mechanisms of Cd (II), Pb (II), Co (II) and Ni (II) by a modified magnetic polyacrylamide microcomposite adsorbent. **Journal of Water Process Engineering**, **4**, 47-57.
113. Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P. J., Tucker, A., 1998. Multi-metal binding site of serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **70**(1), 33-39.
114. Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., Yao, S. J., 2008. Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. **Biochemical Engineering Journal**, **42**(3), 237-242.

115. Raghuwanshi, V. S., Yu, B., Browne, C., Garnier, G., 2020. Reversible pH responsive bovine serum albumin hydrogel sponge nanolayer. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 8, 573.



EKLER

EK 1.

Tablo 1.4'teki kısaltmaların açılımı

Poli (HEMA-GMA): Poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidilmetakrilat)

PHEMA/PGMA-CB: Poli(hidroksietil metakrilat) - glisidil metakrilat - Cibacron Blue F3GA

PHEMA/PGMA-IDA-Cu²⁺: Poli(hidroksietil metakrilat) / glisidil metakrilat-iminodiasetik- bakır +2 iyonu

Poli (HEMA-GMA)-IDA-Zn²⁺: Poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidilmetakrilat)- çinko +2 iyonu

Poli (AAm-GMA)-IDA-Fe³⁺: Poli(akrilamid-glisidil metakrilat)-iminodiasetik asit-demir +3 iyonu

Poli (EGDMA)- Con A: Poli(etilen glikol dimetakrilat) - concanavalin A

Poli (HEMA-GMA)-IDA-Ni²⁺: Poli(2-hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat)-iminodiasetik asit- nikel +2 iyonu

DEAE-GMA: Dietilaminoetanol- glisidil metakrilat

Poli (EGDMA-GMA)-Con A: Poli (etilen glikol dimetakrilat-glisidil metakrilat)-concanavalin A

Tris-kriyojel: Poliakrilamit- tris(hidroksimetil) aminometan kriyojel

Cu²⁺-IDA-MPAAG: Bakır +2 iyonu-iminodiasetik asit - poli(akrilamit-allil glisidil eter)

AAm-AGE-D-GlcNAc : Akrilamit-alilglisidileter-N-asetil-D-glukozamin

Poli (HEMA-GMA)-p-BA-Cu²⁺, Ag⁺ ve Zn²⁺: Poli(2-hidroksietilmetakrilat-glisidil metakrilat-p-amino benzoik asit- bakır 2+ iyonu, gümüş +1 iyonu, çinko +2 iyonu

Poli (HEMA-GMA)-*p*-AP-Cu²⁺, Ag⁺ ve Zn²⁺: poli(2-hidroksietilmetakrilat-glisidil metakrilat-*p*-amino piridin-bakır 2+ iyonu, gümüş +1 iyonu, çinko +2 iyonu

Poli (AAm-MAH): poli(akrilamid-metakrilamido histidin)

PHEMA-IDA- Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺: poli(hidroksietil metakrilat)-iminodiasetik asit- bakır +2 iyonu, çinko +2 iyonu, nikel +2 iyonu, kobalt +2 iyonu

P (HEMA-GMA)-IDA- Cu²⁺, Ca²⁺ ve Fe³⁺: poli(hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat-iminodiasetik asit- bakır +2 iyonu, kalsiyum +2 iyonu, demir +3 iyonu



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Şule Daştan
Uyruğu: Türkiye (T.C)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	2017
Lisans	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Uluslararası İlişkiler Bölümü	2015- devam ediyor
Lise	Kayseri İstikbal Lisesi, Kayseri	2011

YABANCI DİL

İngilizce (B2 seviye), Korece (A1 seviye)

YAYINLAR

1. Akbulut, M. S., Daştan, Ş., Can, E., Sipahioğlu, O., 2020. Genç tüketicilerin helâl sertifikası konusunda farkındalığı ve bunun gıda tercihi üzerine etkileri: Kayseri ili örneği. **Helâl ve etik araştırmalar dergisi**, 1 (2): 110-121.

2. Daştan, ř., Sarioęlu, K., zgen, S., 2022. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi için poli (akrilamit-glisidil metakrilat-IDA) kriyojellerin hazırlanması ve karakterizasyonu, 484-485. *Iconfood'22 İnternational Congress On Food Researches*, 14-16 October 2022, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, İKSAD Publishing House, 758 s. (Online Sunum).

