

METAKRİLİK ASİT AŞILANMIŞ KİTOSAN KÜRELERİN
KARAKTERİZASYONU VE LİZOZİM ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILMASI

Gülsüm EKİCİ

ÖZET

Bu çalışmada, yumurta beyazından doğrudan lizozim enziminin saflaştırılması için yeni bir kromatografik matriks geliştirildi. Destek materyali olarak, kitosan-g-pMAA küreleri kullanıldı. Kesikli sistemde bu afinite adsorbentleri üzerine farklı pH'larda farklı miktarda lizozim içeren sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu davranışı incelendi. Lizozimim iyon değiştirici kürelere adsorpsiyonu için optimal pH değeri 4.0- 8.0 değerleri arasında araştırıldı. Sıcaklık ve iyonik şiddetin, adsorbentlerin, adsorpsiyon kapasiteleri üzerindeki etkisi belirlendi. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerin lizozim adsorpsiyon kapasitesi, sırasıyla 65.7 mg/g olarak belirlendi. İmmobilize lizozim enziminin başlangıçtaki aktifliğini koruyarak 7 kez tekrar kullanılabildiği belirlendi. Yumurta beyazından doğrudan lizozim enzimi saflaştırması sonuçları YBSK ile tayin edildi. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerin, lizozim enziminin yumurta akından saflaştırılmasında kullanılmasından sonra, lizozim enziminin 1.0 M KSCN ile elsyonları yapıldı. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerden elüe edilen lizozimin saflık derecesi ve geri kazanımları sırasıyla %94.16 ve %87.30 olarak belirlendi. Kitosan-g-pMAA küreler ile saflaştırılan lizozimin spesifik aktivitesi 40486 U mg⁻¹ olarak belirlendi. Ayırıtırma ve saflaştırma işlemlerinde lizozim aktivitesi, substrat olarak *Micrococcus lysodeikticus* bakterisi kullanılarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Kitosan küre, lizozim, immobilizasyon, iyon değişim, yumurta beyazı, Aşı Kopolimer, metakrilik asit

CHARACTERIZATION OF METACRYLIC ACID GRAFTED CHITOSAN
BEADS AND THE USE OF THEM IN THE PURIFICATION OF THE
LYSOZYME ENZYME

GülsümEKİCİ

ABSTRACT

In this study, for direct purification of lysozyme enzyme from egg white, a new chromatography matrix was developed. Chitosan-g-pMAA ion-exchange beads were used as support material. Behaviour of lysozyme adsorption onto these ion-exchange beads, from Aqueous solutions containing different amounts of lysozyme at different pH, investigated in a batch system. The optimal pH values for adsorption of lysozyme on the affinity adsorbents, were investigated in the pH range of 4.0-8.0. The effects of temperature and ionic strength, on the adsorption capacities of the adsorbents, were determined. The lysozyme adsorption capacity of the chitosan-g-pMAA ion-exchange beads was found as 65.7 mg/g, respectively. It was determined that the original activity was preserved when immobilized lysozyme was used repeatedly 7 times. The results of direct lysozyme enzyme purification from egg white were determined by HPLC. After usage of chitosan-g-pMAA ion-exchange beads the lysozyme enzyme from the egg white, lysozyme enzyme was eluted by 1.0 M KSCN solution. The purity and the recovery of the eluted lysozyme, were 94.16% and 87.30 % for chitosan-g-pMAA ion-exchange beads, respectively. The specific activity of the lysozyme purified with Chitosan-g-pMAA beads 40486 U_{mg}⁻¹. Separation and purification was monitored by determination of lysozyme activity using *Micrococcus lysodeikticus* as substrate.

Key Words: Chitosan bead, lysozyme, Immobilization, Ion-exchange, metacrylic acid, Graft copolymer, Egg white

GİRİŞ

Doğal polimerler, biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevsel özelliklere sahip olan polimerler olarak adlandırılır. Proteinler (örneğin kollajen, jelatin, elastin, aktin, vb), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin, vb) ve Polinükleotidler (DNA ve RNA) başlıca doğal polimerler sınıfındadır. Yaşayan organizmaların karmaşık yapılarından dolayı üretim maliyetlerinin yüksek olması ve yeterince büyük ölçeklerde üretilmemeleri karşılaşılan başlıca sorunlardır. Ancak, doğal polimerler nanoteknoloji ve biyomimetik (doğayı taklit eden) malzemelerin sentezlenmesinde anahtar rolü oynası ve lipid tübüller (yağ borucukları) ve protein lateksler gibi biyopolimerik yapıların geliştirilmesine olanak tanınması doğal polimerlerin kullanımını önemli oranda yükseltmektedir. Kitin, kitosan ve selüloz biyopolimerleri doku ile uyumludur ve bu nedenle zamanla bozunur ve vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilen zararsız bileşenlere dönüşür.

Doğal biyobozunur polimer sınıfına giren kitosan, (1→4)-amino-2-deoksi-β-D-glukan, kitinin amino gruplarının deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Kitosan polimerinin biyolojik uyumluluğu, degrade edilebilmesi, fizyolojik olarak inert olması, toksik olmaması, antimikrobiyal özellik sergilemesi, metal iyonları ile şelat oluşturması, jel oluşturma özellikleri, kimyasal modifikasyonunun kolay olması ve proteinlere karşı yüksek afiniteye sahip olması gibi sunduğu önemli avantajlar nedeni ile, özellikle hedef moleküllerin biyolojik ortamlardan ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması işlemlerinde ve enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak yaygın bir kullanım alanı bulmuşlardır. Ayrıca, biyolojik çevre sistemleri başta olmak üzere biyoteknoloji alanında çevresel iyileştirme uygulamalarında da kullanım alanı bulunmaktadır. Kitosanın sıralanan bu olumlu özelliklerinin yanında destek materyali olarak hazırlanmaları aşamasında mekanik olarak zayıf olmalarından dolayı bazı işlemsel zorlukları vardır. Bu nedenle bu doğal kökenli polimerin istenilen geometrik formda hazırlanabilmesi için yüzey özellikleri fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal işlemlerle kolaylıkla ve istenilen özellikte modifiye edilmektedir.

Biyolojik sıvı veya fermantasyon ortamlarından hedeflenen molekülün tek basamakta ayrıştırılması ve saflaştırılması temeline dayanan afinite kromatografi teknikleri; moleküler biyoloji, biyoteknoloji, analitik biyokimya, klinik biyokimya ve

farmasotik kimya alanlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmış bulunmaktadır. Yumurta beyazı gibi biyolojik sıvılardan hedeflenen molekülün yüksek saflıkta ve tek basamakta ayrıştırılması işleminde kullanılan afinite kromatografisi tekniğinin diğer klasik kromatografik yöntemlere göre sağladığı avantajlar oldukça dikkat çekicidir.

Çalışmamızda, lizozim enzimine spesifik bir afinite destek materyali hazırlanması için; mekanik gücü yüksek, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli, küre geometrisine sahip metakrilik asit aşılınmış kitosan polimeri sentezlenerek kromatografik uygulamalarda kullanılmak üzere yeni kitosan-g-pMAA iyon değiştirici destek materyali hazırlandı. Metakrilik asit aşılınmış kitosan kürelerin karakterizasyon çalışmaları için farklı pH ortamlarında şişme özelliği, denge su içeriği, yoğunluğu, aşılama verimi, grup analizi, spesifik yüzey alanı, yüzey özelliği, gözenekliliği analiz edildi ve FTIR spektrumu alındı. Sentezlenen iyon değiştirici kitosan kürelerine sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu çalışıldı ve sistem parametrelerinin etkisi (pH, denge zamanı, iyonik şiddet, sıcaklık, adsorbent dozu, başlangıç enzim miktarı) araştırılarak kesikli sistemde lizozim adsorpsiyon çalışması optimizasyonu tamamlandı. Bunların yanında, adsorpsiyon ve desorpsiyon kinetiği, deneysel adsorpsiyon izoterm modeli ve afinite kürelerin yeniden kullanılabilirliği gibi parametreler de belirlendi. Lizozim enziminin sulu ortamdan adsorpsiyonu çalışmalarında belirlenen optimum sistem parametreleri biyolojik bir sıvı karışımı olan yumurta akından enzim saflaştırılması çalışmalarında kullanıldı. Geliştirilen metakrilik asit aşılınmış iyon değiştirici kitosan kürelerin farklı proteinler içeren yumurta beyazından lizozime karşı gösterdiği seçicilik ve adsorpsiyon kapasitesi, denge adsorpsiyon sonucunda ortamda kalan protein çözeltilerinin miktarı, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi, HPLC sistemi ile analizi sonucunda belirlendi. Ayrıştırılan lizozim enziminin saflığı ve elüe edilen enzimin saflık derecesi bir protein kolonunun kullanıldığı HPLC kullanılarak belirlendi. Ayrıştırma ve saflaştırma işlemlerinde lizozim aktivitesi, substrat olarak *Micrococcus lysodeikticus* bakterisi kullanılarak belirlendi.

1. Kuramsal Temeller

1.1. Polimer

Polimerler; çok sayıda molekülün kimyasal bağlarla düzenli bir şekilde bağlanarak oluşturdukları yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Tekrarlanan birimler, “mer” olarak adlandırılır. Polimerler “monomer” denilen birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Polimerler yapılarına göre sınıflandırılabilirler. Bir polimer tek bir monomer biriminin tekrarlanmasından oluşuyorsa buna “homopolimer” denir. Eğer polimer molekülü iki farklı monomerin birleşmesinden oluşuyorsa buna “kopolimer” denir. İster mono ister kopolimer olsun polimerler doğrusal, dallanmış yada çapraz bağlı olabilirler. Polimerler fiziksel durumlarına göre sınıflandırıldıklarında ‘amorf’, ‘kristalin’ ya da ‘yarı kristalin’ olarak adlandırılır. Polimerler, polimerizasyon yöntemlerine göre ise basamaklı ve katılma polimerizasyonunu içeren iki temel yöntem olmak üzere sınıflandırılabilirler (Cowie 1991). Polimerlerin özellikleri, yapı taşları olan monomerlerden büyük farklılık gösterir. Bu nedenle, biyoteknoloji, biyotıp uygulama alanına yönelik olarak kullanılacak biyomateryalin seçimi oldukça önemlidir.

Polimerler genel olarak sentetik ve doğal olarak başlıca iki grupta incelenebilirler. Nişasta, selüloz, doğal kauçuk ve DNA (genetik materyal), doğal polimerler grubuna girerler. Fermentasyon ve saflaştırma teknolojilerinde geliştirilen yeni tekniklerin varlığı ve ucuz doğal hammaddelerin sağlanması sonucu, sentetik polimerlerin yerine doğal polimerlerin kullanımı mümkün olmaktadır. Doğal polimerler özellikle spesifik uygulamalarda ihtiyaç duyulan boşlukları doldurmakta, ancak bazı sentetik polimerlerin çok ucuza üretilme şansı doğal polimerlerin kullanımını olumsuz yönde etkilemektedir. Sentetik polimerlerin üretiminde kullanılan endüstriyel teknikler, polimerizasyon ortamının özelliklerine bağlı olarak yığın, çözelti, süspansiyon, emülsiyon ve ara yüzey polimerizasyon prosesleri olarak sınıflandırılabilirler.

Günümüzde farklı polimerizasyon yöntemleri kullanılarak uygulama alanlarına yönelik çeşitli boy ve boyut dağılımlarına sahip farklı yoğunlukta ve yüzey yapısında polimerlerin hazırlanmasının yanında mekanik dayanımı yüksek olan biyoyumlu materyaller sentezlenmesi de önem kazanmıştır. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan materyaller endüstriyel ve biyolojik ayırma işlemlerinde, hücre izolasyonu ve enzim

immobilizasyonunda, enzim saflaştırılmasında, çeşitli kromatografi yöntemlerinde, ilaç hedefleme ve kontrollü salım sistemlerinde, immunolojik test ve tanı kitlerinde ve moleküler biyoloji alanındaki araştırmalarda kullanılmaktadır (Arıca ve ark. 2000, Bayramoğlu ve ark. 2006, Öktem ve ark. 2007, Arıca ve ark. 2004).

1.1.1. Biyobozunur polimerler

Biyobozunur polimerin canlı sistemde ilgili bölgeye yerleştirildikten sonra belirli bir zaman sürecinde polimerik materyalin biyolojik olarak parçalanarak sistemden kolaylıkla atılabilecek zararsız bileşenlere dönüşebilir olması, biyomedikal ve biyotıp alanındaki uygulamalarda sunduğu önemli bir avantajdır. Biyobozunur polimerden oluşan implantlar fizyolojik ortamla etkileştirildiklerinde, su molekülleri matriks içine difüzyonlanır ve polimer zincirlerini hidrolizleyerek parçalar.

Doğal veya sentetik kökenli polimerler ve bunların hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat ile hazırlanan kompozitleri biyopolimer olarak sert doku onarımında dolgu maddesi olarak başarı ile kullanılabilir. Polimerik biyomateryallerin kullanım yerlerine göre yapısal ve fonksiyonel özelliklerini uzun süre korumaları ya da belli bir süre fonksiyonlarını yerine getirmeleri istenebilir. Biyomateryal fonksiyonunu yerine getirdikten sonra vücuttan uzaklaştırılmalıdır ki bu da ikinci bir cerrahi operasyon gerektirdiğinden avantajlı değildir. Bu nedenle biyobozunur polimerler önemli bir alternatif oluşturmaktadır (Ayhan 2002).

1.1.1.1. Sentetik biyobozunur polimerler

Poliortoesterler, polianhidritler, poliesteramidler, poliiminokarbonatlar, polifosfenezler, alifatik poliesterler ve poli(alkil-2-siyanoakrilat)'lar sentetik biyobozunur polimerlere örnek olarak verilebilir. Sentetik biyobozunur polimer sınıfında yer alan poliesteramidlerin yapılarındaki ester grupları kolaylıkla hidroliz olabilmelerini sağlarken amid bağlarının varlığı da materyalin mekanik olarak kararlılığını artmasına neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı ameliyat ipliği olarak kullanılmaktadır. Poliesterlerin en önemli kullanım alanı ise kontrollü ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı implant olarak kullanılmasıdır (Lin ve ark.1999).

1.1.1.2. Doğal Biyobozunur Polimerler

Doğal polimerler, biyomalzeme alanının vazgeçilmez kaynakları arasında yer almaktadır. Doğal polimerler nanoteknoloji ve biyomimetik (doğayı taklit eden) malzemelerin sentezlenmesinde anahtar rolü oynadığından lipid tübüller (yağ borucukları) ve protein lateksler gibi biyopolimerik yapıların geliştirilmesine yönelik araştırmalar hız kazanmış ve dolayısı ile doğal polimerlerin kullanımını önemli oranda yükseltmiştir. Doğal polimerler sınıfında yer alan proteinler (örneğin kollajen, jelatin, elastin, aktin, vb), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin, vb) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevsel özelliklere sahip olan polimerlerdir. Biyolojik ortamdaki makromoleküllerin benzeri veya aynısı olduklarından, canlı sistemle temas ettiklerinde zehir etkisi, iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar vermezler. Enzim varlığında yapılarının bozunması, yani biyobozunur olmaları geçici uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler açısından avantajdır. Ancak, elde edildikleri kaynağa bağlı olarak bileşimlerinin değişmesi, yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve bu nedenle şekillendirilmelerindeki güçlük ve tüm bunların ötesinde immünojenik olmaları (bağışıklık tepkisine yol açmaları) önemli dezavantajları arasındadır. Yaşayan organizmaların karmaşık yapılarından dolayı yeterince büyük ölçeklerde üretilmemeleri ve yüksek maliyetli olmaları karşılaşılan diğer önemli sorunlar arasında yer almaktadır.(Ayhan 2002)

Doğal polimerler, sahip oldukları işlevsel özellikler nedeniyle, kalınlaştırıcı, jel yapıcı, bağlayıcı, dağıtma ajanı, kayganlaştırıcı, yapıştırıcı ve biyomalzeme gibi değişik kullanım alanlarına sahipler. Bu grupta yer alan biyobozunur polimerlerin ilk uygulaması; hayvan bağırsağı, ipek ve patates nişastasının yara iyileşmesinde kullanılmasıyla gerçekleşmiştir. Protein bazlı polimerlerin (albümin, kollajen, jelatin proteinleri) elastomerik davranışları, mükemmel biyoyumlulukları ve oksijen geçirgenlikleri gibi olumlu özellikleri nedeniyle doku yenilenmesi, biyosensör ve ilaç salım sistemlerinde kullanılan pek çok biyomateryalin sentezlenmesinde kullanılmaktadır.

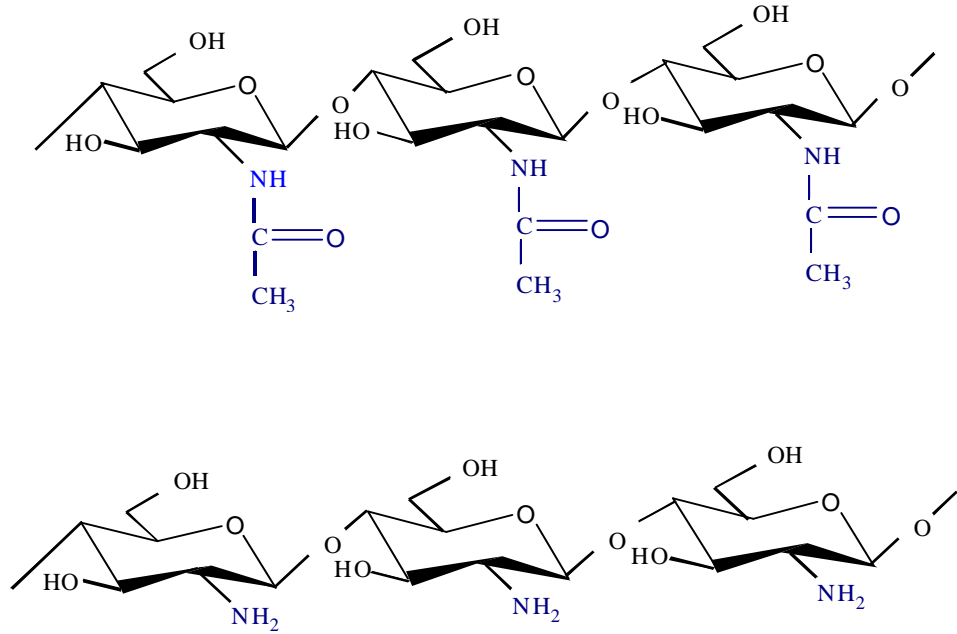
Kitin, kitosan ve selüloz polimerleri doku ile uyumludur. Nişasta, amiloz ve amilopektinden oluşan polisakkarit bazlı polimerlerin biyotıp alanındaki uygulamalarda kullanılmak üzere yüzey özelliklerinin değiştirilmesi mümkün olmaktadır. Bitki hücre duvarlarının temel yapı taşı olan selüloz yanık ve yara örtü materyali olarak kullanılmaktadır. Günümüzde diyaliz için kullanılan membranların çok büyük bir kısmı selüloz bazlıdır. Selülozdan sonra doğada en çok bulunan kitin yara iyileştirmede kullanılan etkili bir materyaldir ve ameliyat ipliklerinde kullanılır. Farklı geometriye sahip olarak üretilen doğal biyopolimerlerin kullanım alanları Tablo 1.1’de özetlenmiştir (Ayhan 2002).

Çizelge 1.1. Doğal Polimerlerin Kullanım Alanları(Ayhan 2002).

<i>Kullanım Şekli</i>	<i>Kullanım Yeri</i>
Çözelti/Jel	Kozmetik İlaç Salım Sistemi Biyoprotezlerin kaplanması Üç boyutlu hücre kültürü
Sünger	Hemostatik Ajan Üç Boyutlu Hücre Kültürü İlaç Salım Sistemi Yara ve Deri Örtü Materyali
Küre/Mikroküre	Enzim İmmobilizasyonu İlaç Salım Sistemi Hücre Kültürü İçin Ajan
Membran	İlaç Salım Sistemi Yara Örtü Materyali Diyaliz Membran Kornea Koruyucusu Doku Rehberli Rejenerasyon Bel kemiği Cerrahisi
Toz Rijit Form	İlaç Salım Sistemi Kemik Onarımı Kemik Dolgu ve Onarımı

1.1.1.2.1. Kitosan Hakkında Genel Bilgi

Yengeç, karides, istakoz gibi eklembacaklıların dekalsifikasyonu ile elde edilen kitin, poli[(1→4)-2 asetamido-2-deoksi β-D glikoz] polisakkarit yapısında olup, selülozdan sonra üretimi en fazla olan bir biyopolimerdir. Kitin suda ve birçok organik çözücüde çözünmeyen hidrofobik bir madde olduğundan, çözünebilir bir polimer elde etmek için alkali ortamda N-deasetilasyonu ile kitosana çevrilir. Kitosan, poli(β-1-4)-2 amino-deoksi-D glukopiranoz] yapısına sahiptir. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 : Kitin ve Kitosanın Molekül Yapısı

Kitosanın deasetilasyon derecesi glikozaminin mol fraksiyonu olarak tanımlanır ve genellikle %70-90 arasındadır. Kitosan asetik asit, laktik asit ve propiyonik asit gibi organik asitlerde çözünür, hidroklorik, nitrik ve perklorik asit gibi mineral asitlerde kısmen çözünür, fosforik ve sülfürik asitlerde ise çözünmez. Kitosan, organik bileşiklerde olduğu gibi birçok katyonik ve noniyonik polimerle uyumludur. Buna karşılık, çok değerli anyonlarla, kolaylıkla çapraz bağlanarak jel ve çökelti meydana getirdiği bilinmektedir. Ayrıca kitosan zincirleri üzerindeki amin ve hidroksil gruplarının uygun koordinasyon ve reaksiyon veren uç gruplar olması nedeniyle geçiş metal iyonları ile kararlı koordinasyon kompleksleri oluşturabilmektedirler. Biyolojik olarak parçalanabildiği için kitosan hem katı halde, hem de sulu çözeltilerde sınırlı bir kararlılığa sahiptir.

Kitosan, türevleri ve tuzları farmasötik teknoloji alanında güç çözünen ilaçların çözünürlüğünün artırılmasında, mide ortamında yüzebilen sürekli etkili olan preparatların hazırlanmasında, kontrollü ilaç salım sistemleri için taşıyıcı implant sistemlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Sarıbek 2006). Katyonik bir polimer olan kitosan biyouyumluluğu, degrade edilebilmesi, fizyolojik olarak inert olması, toksit olmaması, antimikrobiyal özellik sunması, metal iyonları ile şelat oluşturması, jel oluşturma özellikleri, kimyasal modifikasyonunun kolay olması ve proteinlere karşı yüksek afiniteye sahip gibi özellikleri nedeni ile özellikle hedef moleküllerin biyolojik ortamlardan ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması işlemlerinde ve enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılmaktadır (Öktem ve ark.2007, Bayramoğlu ve ark 2002, Bayramoğlu ve ark 2006, Sarıbek 2006). Ayrıca, biyolojik çevre sistemleri başta olmak üzere ağır metal iyonu uzaklaştırılması işlemini kapsayan çevresel iyileştirme uygulamalarında da kullanım alanı bulmaktadır (Bayramoğlu ve ark 2003, Genç ve ark. 2002).

Ancak destek materyali olarak hazırlanmaları aşamasında mekanik olarak zayıf olmalarından dolayı bazı işlemsel zorlukları vardır. Bu nedenle bu doğal kökenli polimerin istenilen geometrik formda hazırlanabilmesi veya mekanik dayanımının artırılabilmesi için yüzey özellikleri fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal işlemlerle kolaylıkla ve istenilen özellikte modifiye edilmektedir. Örneğin, saflaştırılan biyomoleküllerin elüsyonunun asidik koşullarda gerçekleştirileceği durumlarda ayırım

işleminde destek materyali olarak kullanılan kitosanın çözünmesini engellemek için çapraz bağlı kitosan yapıları kullanılmaktadır (Zeng ve ark.1996).

Polimer yapılarının modifikasyonu için sıkça başvurulan yöntemlerden birisi aşılı kopolimerizasyon yöntemidir. Kitosanın çözünürlüğünü ve uygulama alanlarını arttırmak amacıyla kimyasal yolla modifikasyonu üzerine yapılan çalışmalar özellikle önem kazanmıştır. Modifikasyon yöntemleri arasında yer alan aşılı kopolimerizasyonu, doğal polimerlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmesi işleminde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Kitosanın yapısında deasetillenmiş birimler üzerindeki serbest amino ve asetillenmiş veya deasetillenmiş birimlerinde bulunan C₃ ve C₆ karbonları üzerindeki hidroksil reaktif gruplarının varlığı nedeni ile yüzey modifikasyona izin veren bir biyopolimerdir. Son yıllarda araştırmacılar, kitosan ve/veya türevlerinin yüzey modifikasyonunu, farklı komonomerlerin aşılı kopolimerizasyon yöntemi ile yapmışlar ve çeşitli uygulamalarda başarı ile kullanabilmişlerdir. Modifiye edilen kitosanın sudaki çözünürlüğünün, antibakteriyel ve antioksidan özelliklerinin iyileştirildiği rapor edilmiştir (Xie ve ark. 2002, Kotze ve ark. 1997, Thanou ve ark. 2001). Aşılı kopolimerizasyonu ile modifiye edilen kitosanın bir çok özelliğinin olumlu yönde değişmesinin yanı sıra mukoadhezivlik (Hoffmann ve ark. 1997), biyouyumluluk (Tasker ve ark. 1998, Ono ve ark. 2000) ve biyobozunurluk (Singh ve ark.1998) gibi özelliklerini koruduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda, kromatografi alanında lizozim enzimi saflaştırılması işleminde kullanılmak üzere kitosan-g-metakrilikasit, kitosan-g-pMAA, materyalinin küre geometrisinde sentezlenmesi planlandı. Hazırlanan kitosan küreleri alkali ortamda epiklorhidrin ile çapraz olarak bağlandı ve modifiye edildi. Kitosanın modifikasyonu için uygulanan yöntemlerden birisi aşılı kopolimerizasyon yöntemidir. Bu amaç doğrultusunda kitosan amonyum persülfat başlatıcısı varlığında metakrilik asit (MAA) monomeri aşılı kopolimerizasyon yöntemi ile aşılı olarak modifiye edilmiş iyon değiştirici kitosan-g-pMAA kopolimeri sentezlendi. Akriyat kökenli monomerlerden sentezlenen polimerlerin genellikle biyolojik olarak uyumlu materyaller olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir .

1.1.2. Aşı Kopolimer

Genel olarak, kimyasal bileşimi farklı iki monomerin birlikte polimerleşmesine kopolimerleşme; elde edilen polimere ise kopolimer denir. Aşı kopolimerlerde, kimyasal yapıları farklı iki polimer zinciri, zincir dışından bir yerden birbirine bağlanmıştır. Bağlanma noktalarının (aşılma noktaları) sayısı az ya da çok olabilmektedir. Aşı kopolimeri *i*) çapraz bağ vermeye yatkın polimerlerin bir monomer yanında iyonlaştırıcı ışınlarla (UV, γ -ışınları) etkinleştirilmesi, *ii*) radikalik katılma polimerizasyon (herhangi bir monomerin radikalik katılma polimerizasyonu ortamda bulunan başka tür bir polimer varlığında yapılırsa, polimere zincir transferi sonucu, diğer polimer zincirleri üzerinde aktif merkezler oluşabilecektir) ve *iii*) katyonik polimerizasyon yöntemleri ile sentezlenebilmektedir.

Aşı kopolimerizasyonu işleminde amonyum persülfat (APS), potasyum persülfat (PPS), seryum amonyum nitrat (CAN), tiyokarbonatlı potasyum bromat (TCPB), 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) ve demir amonyum sülfat (FAS) gibi maddeler başlatıcı olarak kullanılmaktadır (Caner ve ark. 1998, Don ve ark. 2002, Kim ve ark. 2000, Pedram & Retuert 1996, Pedram ve ark. 2000).

Bir polimerin bir monomer ile aşılması; polimerizasyon sıcaklığı ve süresi, monomer ve başlatıcı derişimleri, çözücü/su oranı ve farklı çözücülerin şişirme etkisi gibi polimerizasyon şartlarına bağlı olacaktır. Bu nedenle oluşan aşı kopolimerin özellikleri, moleküler yapı, molekül uzunluğu ve sayısı gibi yan zincirlerin özellikleri ile kontrol edilebilmektedir. Kitosanın aşı kopolimerlerinin oluşturulmasında sistem parametrelerinin etkisini araştırmaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Sun ve ark. 2003, Xie ve ark. 2002, Don ve ark. 2002, Kim ve ark. 2000, Pedram & Retuert 1996, Pedram ve ark. 2000).

1.1.2.1. Radikalik Başlatıcı ile Aşılama ve İlgili Çalışmalar

Son yirmi yıldır vinil monomerlerinin kitosan polimeri üzerine radikalik aşılı kopolimerizasyonu ilgi çeken araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu modifikasyon yöntemi, istenilen özellikli yeni polimerik materyallerin oluşumuna olanak sağlamaktadır. Sun ve çalışma arkadaşları sulu ortamda başlatıcı olarak APS kullanarak metakrilik asidin karboksimetil selüloz ile aşılı kopolimerini hazırlamışlardır. Monomer ve başlatıcı konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı ve süresi gibi parametrelerin polimerizasyon üzerinde önemli etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Sun ve ark. 2003). Xie ve arkadaşları hidroksipropil kitosanın metakrilik asit (MAA) ile aşılama işlemini amonyum persülfat başlatıcısı varlığında gerçekleştirmişlerdir (Xie 2002). Sun ve Xu ise amonyum persülfat başlatıcısı kullanarak karboksimetil kitosan-hidroksipropil kitosan polimerinin üzerine maleik asitin aşılmasını ve polimerizasyon sistem parametrelerinin etkisini araştırmışlardır (Sun ve ark. 2004). Yılmaz ve çalışma arkadaşları, kitosan üzerine poli(4-vinil piridin)'i aşılıyarak, monomer miktarının ve sıcaklığın artması ile aşılama yüzdesinin belli bir noktaya kadar arttığını ve bu değerden sonra ise azalma eğilimi gösterdiğini belirlemişlerdir (Yılmaz 1998).

Kitosan üzerine vinil monomerlerinin aşılı kopolimerizasyonu, CAN (seryum amonyum nitrat) ve PPS (Potasyum persülfat) gibi redoks başlatıcı sistemleri kullanarak da gerçekleştirilebilmektedir. Bu sistemler, çeşitli polimerler üzerinde serbest radikalik uçlar oluşturmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Poli(vinil asetat) (PVAc) suya dayanıklı bir polimerdir ve kitosan polimerinin özelliklerini geliştirmek amacı ile kullanılır (Don, ve ark. 2002). Zhang ve arkadaşları, zwitter iyonik N,N-dimetil -N-metakrilooksietil-N-(3-sulfopropil) amonyum, monomerini kitosan polimeri üzerine aşılı kopolimerizasyonu CAN başlatıcısı kullanarak, asetik asit çözeltisinde ve azot atmosferi altında incelemişlerdir (Zhang ve ark., 2003). Kim ve arkadaşları, poli(N-izopropilakrilamid)'in kitosan polimeri üzerine aşılıyarak sıcaklık ve pH'a karşı duyarlı aşılı kopolimerlerin hazırlayarak karakterize etmişlerdir (Kim ve ark. 2000).

1.2. Kromatografi

Kromatografi, bir örnek içindeki maddelerin bir hareketli ve sabit faz arasındaki dağılımlarına bağlı olarak ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini esas alarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da mobil faz adı verilir. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış olarak sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

1.2.1. Sabit Fazı Oluşturan Destek Materyalleri

Kromatografik yöntemlerde kullanılacak destek materyalleri durgun fazın katı substratıdır. Kromatografik ayırımlarda kullanılan ve adsorbent olarak adlandırılan katı destek materyali spesifik olmayan etkileşimleri (elektrostatik, hidrofobik, vb.) minimuma indirilmiş, başka bir ifadeyle inert bir materyalden üretilmiş (genellikle doğal ve/veya sentetik polimerik bazlı) küresel partiküller, membranlar veya fiberler şeklindedir (Yılmaz 2002).

Biyolojik sıvılardan hedeflenen proteinin saflaştırılması ve ayrıştırılmasında, doğal veya sentetik kökenli polimerler (polisakkaritler, poliakrilamidler, polivinil polimerler ve poliakrilatlar) destek materyalleri olarak kullanılmaktadır. Bu materyaller kontrol edilebilir boyut dağılımına ve gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir. Küre yapıda kullanılan destek materyallerin boyutu 50-400 µm aralığındadır (Şenel 2004).

Destek materyali, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Bunun yanı sıra hidrofilik ve nötral davranış, sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla aktivasyona veya ligand bağlanması için türevlendirilmeye izin vermelidir ve rejenerasyon esnasında da fiziksel ve kimyasal olarak kararlılığını korumalıdır (Arıca ve ark. 2004, Bayramoğlu ve ark. 2002).

Kromatografik ayırımlarda destek materyali olarak kullanılan akrilat ve akrilik asit kökenli polimerler uzun ömürlü sentetik polimerlerdir. Bu grupta yer alan poli(metilmetakrilat), p(MMA), biyouyumlu sentetik bir polimer olmasından dolayı biyomedikal ve biyoteknolojik alanda çok sayıda uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca, akrilik ve metakrilik kökenli polimerler yapay damar, kontak lens, ilaç salınım sistemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu tür materyallerin uzun süreli biyolojik uyumluluğu ve fonksiyonelliği canlı dokulardaki in vivo etkileşimleri ile kontrol edilmektedir. Bu materyal mekanik olarak güçlü olmasından dolayı, enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Metakrilik asit iyonize olabilen bir monomer olarak bilinir ve bu nedenden dolayı polimeri pH'a karşı duyarlıdır.

1.3. Protein Saflaştırma Teknikleri

Hedef molekülün biyolojik sıvı karışımlarından ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde kullanılan yöntemler kromatografik, elektroforetik ve santrifügasyon olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir.

1.3.1. Kromatografik Yöntemlerle Protein Saflaştırma Teknikleri

Kromatografi kompleks karışımlarda bulunun birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan çok sayıda farklı yöntemi içerir. Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması, hareketli ve durağan fazların yapısı ve ayırma prensipleri dikkate alınarak çeşitli şekillerde yapılır (Çizelge 1.2).

Çizelge1.2. Kromatografik teknikler

Kromatografik Yöntem	Kısaltma	Ayırma Tekniği
Jel Geçirgenlik Kromatografisi	SEC	Molekül büyüklüğü
Slalom Kromatografisi (DNA)	-	Molekül uzunluğu ve esnekliği
İyon Değişirme Kromatografisi	IEC	Elektrostatik Etkileşim
Normal-faz Kromatografisi	NPC	Polar Etkileşim
Ters-faz Kromatografisi	RPC	Dispersiv Etkileşim
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	HIC	Dispersiv Etkileşim
Afinite Kromatografisi	AC	Biospesifik Etkileşim
Metal Şelat Kromatografisi	MIC	İmmobilize metalle kompleks

1.3.1.1 İyon Değişim Kromatografisi

Net bir yüzey yüküne sahip maddenin (proteinin) ters yükle yüklenmiş katı bir sabit faz tarafından tutulması prensibine dayanır. Bütün proteinler yüzeylerinde iyonlaşabilen gruplara sahiptir (Glu, Asp, His ve Arg amino asitlerinin yan zincirlerindeki amino ve karboksil grupları). Bu grupların iyonize halde bulunması ortamın nötr olmasına veya pH'sına bağlıdır.

Protein yüzeyindeki net yük değişimi ortam pH'sının değişmesine ile değişmektedir. Her bir protein yüzeyindeki yük dağılımının eşit olduğu ve bu nedenle yüksüz olarak davrandığı bir pH değeri vardır. Bu pH değerine izoelektrik noktası (pI) adı verilir. Ortam pH'sı proteinin pI değerinden küçük olduğu durumlarda pozitif yüzey yüküne ve pH'ın proteinin pI değerinden büyük olduğu durumlarda ise net negatif yüzey yüküne sahiptir (Arıca ve ark. 2004).

İyon değiştirici reğinenin protein saflaştırılmasında etkin olarak kullanılabilmesi için durgun fazın tek türde iyonize olabilen gruplara sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle negatif yüklü iyon değiştirici reğineler pozitif yüklü iyonlara bağlanacağı için kation değiştirici reçine, pozitif yüklü iyon değiştirici reğinelerde negatif yüklü iyonlarla elektrostatik etkileşime gireceğinden anyonik reçine adını alır.

1.3.1.2. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, halen makromoleküllerin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrımı için oluşturulmuş en iyi metottur ve yüksek özgün moleküler tanımaya dayanır. Özgün tanıma yeteneğine sahip bir molekül (ligand ya da bağlayıcı) uygun, çözünmeyen, genellikle polimerik malzemeden, küresel ya da membran formunda olan bir destek (matriks ya da taşıyıcı üzerinde tutuklanır. İzole edilecek olan molekül, analit ya da hedef olarak isimlendirilir. Hedef molekülü içeren çözeltinin, kromatografik kolondan uygun şartlar altında geçirilmesi ile hedef moleküller, matriks üzerine tutuklanmış olan ligand tarafından, seçici olarak yakalanır ve adsorbe edilir (Arıca ve ark. 2004).

Afinite kromatografisi, kullanılan ligandların hedef moleküle girdiği etkileşime göre, hidrofobik kromatografi, kovalent kromatografi, tutuklanmış metal şelat kromatografisi gibi gruplara ayrılır. 1975’de Porath ve arkadaşları tarafından protein saflaştırılmasında immobilize metal iyon afinite kromatografisi (IMAK) olarak adlandırılan yeni bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir. İmmobilize metal iyonu ile biyomoleküller yüzeyinde yer alan histidin, sistein ve triptofan gibi aminoasitler arasındaki seçici etkileşimden dolayı, hedef moleküllerin ayrımında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Arıca 2000, Bayramoğlu ve ark. 2003, Sun ve ark. 2003, Suen ve Etzel 1992, Bayramoğlu ve ark. 2006, Bayramoğlu 2003, Suen 2003 , Kracalikova 2006).

1.4. Adsorpsiyon

Atom, iyon veya moleküllerin katı yüzeylerde tutunmasına “adsorpsiyon”, tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına “desorpsiyon”, üzerinde ayrılacak bileşen ile dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı, hidrojen bağı ve/veya Van der Waals etkileşimleri nedeni ile adsorpsiyonun gerçekleştiği gözenekli katıya “adsorplayıcı” ya da adsorbent” ve katı yüzeyinde tutunan maddeye ise “adsorplanan” adı verilir.

Adsorbent ile temas ettirilen moleküller, adsorbentin bazı kimyasal gruplarıyla etkileşime girerler. Durağan fazda meydana gelen bu reaksiyonlar, dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı ve Van der Waals etkileşimleri gibi çeşitli çekim kuvvetleridir. Durağan faz ile yıkandığında, adsorbe edilmeyen moleküller uzaklaşır ve böylece adsorbe edilen hedef moleküllerden ayrılırlar. Bir kez elüsyon yapıldıktan sonra, hareketli faz değiştirildiğinde bu kez moleküller yeni hareketli faza geçme eğilimini gösterirler. Tercihteki bu değişim, yeni hareketli fazın, değişmeden kalan durağan faza göre, daha çok çekim kuvvetinden kaynaklanır (Sarıkaya 2000). Adsorpsiyon olayı daima ekzotermiktir. Adsorpsiyon, moleküllerin adsorpladıkları etkileşim biçimine bağlı olarak, fiziksel, kimyasal ve değişim (exchange) adsorpsiyon şeklinde üçe ayrılır.

1.4.1. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Günümüzde adsorpsiyon, çok sayıda fiziksel, kimyasal ve biyolojik ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır. Tersinir veya tersinmez olarak yürüyebilen adsorpsiyon işlemi, çok tabakalı yani multimoleküler veya tek tabakalı yani monomoleküler olarak gerçekleşebilir. Adsorpsiyon işlemi daha etkin ve az maliyetli bir hale getirmek için bir çok araştırmacı ucuz ve rejenere edilebilir adsorbentler bulmaya çalışmaktadırlar.

Adsorpsiyon, adsorban yüzeyinde biriken madde konsantrasyonu ve çözeltilde kalan madde konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder. Gazlar için konsantrasyon genellikle mol yüzdesi veya kısmi basınç olarak verilir. Çözeltiler içinse konsantrasyon kütle birimleri olarak verilir (mg/l, ppm v.s.).

Adsorplayıcı ve adsorplanan yanında, sıcaklık da sabit tutulduğunda; gaz fazından adsorpsiyon, yalnızca basınca; çözültiden adsorpsiyon ise, yalnızca derişime bağıdır. Bu durumda yüzeye adsorplanan madde miktarının, basınçla ya da derişimle değişimini veren çizgilere “adsorpsiyon izotermi” denir. Zaman içerisinde Jaeger ve Erdös tarafından oluşturulan genel bir formülden yola çıkarak bir çok araştırmacı, farklı izoterm denklemleri ortaya koymuşlardır. En genel kullanım gören izotermier Freundlich ve Langmuir denklemleridir (Sarıkaya 2000, Saçak 2002).

1.4.1.1. Langmuir Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Yüzey kimyası alanındaki çalışmalarından dolayı 1932 yılı Nobel Kimya Ödülü sahibi Amerikalı bilim adamı Irving Langmuir (1881-1957) tarafından 1916 yılında kimyasal adsorpsiyon için çok basit bir izoterm denklemi türetilmiştir (Cebe 1998, Saçak 2002). Tek tabakalı fiziksel adsorpsiyon ve çözültiden adsorpsiyon için de geçerli olan bu eşitliğe “Langmuir denklemi” denir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları birbirine eşitlenerek Langmuir denkleminde kolaylıkla geçilebilmektedir.

$$q_{den} = q_m C_{den} / (K_d + C_{den}) \quad (1.1)$$

Yukarıdaki eşitlik ile verilen Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde; q_m adsorplayıcının maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g katı); C_{den} , sulu ortamdaki solut konsantrasyonunu (mg/ml); q_{den} , adsorplayıcıya dengede adsorplanan solut miktarını (mg/g katı); ve K_d ise ayrılma sabitini (mg/ml) göstermektedir.

Langmuir adsorpsiyon kuramında, katı yüzeyinin her noktasının aynı özellikte olduğu, adsorbe olan moleküllerin katı yüzeyini monomoleküller (tek molekül kalınlığında) örttüğü, katı yüzeyinde kapatılmamış bulunabileceği varsayılır. Langmuir modeli, eşit olarak ulaşılabilir adsorpsiyon yerleri, tek tabakalı yüzey kaplaması ve adsorbe edilen türle etkileşim olmaması gibi, homojen yüzey adsorpsiyonuna dayanır (Ruckenstein ve Guo 2001, Arıca ve ark. 2004).

1.4.1.2. Freundlich Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich (1880-1941) tarafından, heterojen adsorpsiyonlar için, Langmuir denkleminde türetilen, Freundlich adsorpsiyon izotermi kullanılır .

$$q_{den} = K_F(C_{den})^{1/n} \quad (1.2)$$

Yukarıdaki eşitlik ile verilen Freundlich adsorpsiyon izoterm modelinde; q_{den} , dengedeki adsorbe edilen solut derişimini (mg/g katı); C_{den} , dengedeki sulu ortamdaki solut derişimini (mg/ml); K_F ve n , sistemin karakteristiği olan Freundlich sabitleridir. K_F , Freundlich izoterm modelindeki kapasite parametresi (mg/g katı); n , Freundlich izoterm modelindeki adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren üssel parametredir. Freundlich eşitliği, bir proteinin, bir adsorbent üzerindeki bir yere bağlanmasının adsorpsiyon enerjisinin, komşu yerlerin zaten işgal edilip edilmemesine bağlı oluşunu belirten deneysel bir bağıntıdır (Li ve ark. 2004, Bayramoğlu ve ark. 2007).

1.4.1.3. Çok Tabakalı Adsorpsiyona İlişkin BET Denklemi

Katı yüzeyinin adsorpsiyon olayıyla mutlak anlamda örtülmesi sıvılaşıma ve çok tabakalı moleküler adsorpsiyonu birlikte getirmektedir. Brunauer, Emet ve Teller (BET) izotermi, Langmuir izoterminin çok tabakalı adsorpsiyona uyarlanması olarak düşünülebilir. BET izoterm eşitliği, adsorplanan moleküler tabakaların kondenzasyon ve buharlaşma hızlarının dengeye ulaşması temelinden hareket edilerek türetilmiştir. ΔH_1 adsorpsiyon ısısı sadece birinci monomoleküler tabaka için fakat ΔH_L kondenzasyon (sıvılaşıma) ısısı ise tüm moleküller tabakaları için göz önüne alınmıştır .

Bu açıklamaların ışığında BET çok tabakalı adsorpsiyon izotermi aşağıdaki bağıntıyla bilinmektedir.

$$q_{den} = BQ^0 C_{den} / (C_s - C_{den}) [1 + (B-1)(C_{den}/C_s)] \quad (1.3)$$

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

1.5. Enzim

Enzimler, canlı hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olduğundan çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Enzimler; ekmek, süt ve mamülleri, bira, alkol, nişasta, deri, tekstil, petrol, deterjan üretiminde, atık maddelerin arıtılmasında ve sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide kullanılırlar. Doğadaki bazı reaksiyonlar olması istenen ortamdaki koşullara bağlı olarak (sıcaklık v.b.) ya çok uzun sürede gerçekleşir yada hiç gerçekleşmezler. Enzimler bu tür reaksiyonları katalizleyerek bu reaksiyonların doğadaki koşullarda meydana gelmesini sağlar. Enzimler bu katalizleme işlemini, reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek gerçekleştirirler (Trevan 1980).

Enzimlerin kimyasal olarak protein yapısındadırlar ve proteinlerin gösterdiği tüm kimyasal özellikleri (isoelektrik nokta v.b.) gösterirler. Enzimlerin protein kısmı diğer doğal proteinlerde olduğu gibi peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış 20 amino asitten oluşur. Ancak çoğu enzimde posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirinde yer alan amino asitlerin R-gruplarında bazı kimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bunun yanı sıra yine posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirine karbonhidrat, lipid, çeşitli organik moleküller veya metal iyonlarının bağlanması söz konusu olabilmektedir .

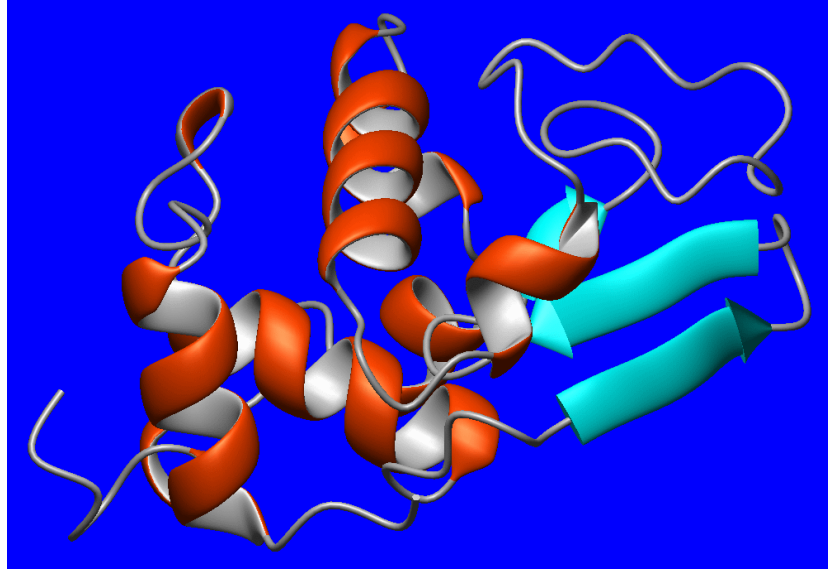
1.5.1 Enzim Aktivitesi

Enzimlerin aktivitesi reaksiyonun hızı ile eşdeğerdir ve bir çok şekilde tanımlanabilir. Spesifik aktivite, 1 mg enzim tarafından birim zamanda dönüşüne uğratılan substratın μmol miktarıdır.

1.5.2. Lizozim

Lizozim, ilk olarak Londra'da Bakteriyolog Alexander Fleming tarafından 1922'de keşfedilen bir hidroliz enzimidir. Fleming soğuk algıngında, mukus salgısından birkaç damlayı bakteriyel kültüre yerleştirmiş ve bakterilerin bir süre sonunda parçalandığını keşfetmiştir. Bakterileri parçalayan, mukustaki bu antibakteriyel madde lizozimdi (Freeman ve Stryer 1995). Daha sonraki çalışmalarda, lizozim vücut salgılarında, gözyaşında, tükürkte, rahim boynunda, bitkilerde ve yumurta beyazında bulunduğu tespit edilmiştir. Gözyaşındaki lizozim, gözdeki enfeksiyonlara karşı savunma görevi yapar. Mide salgılarındaki lizozim, eritme yeteneği sayesinde koruma görevi yapar. Yumurta beyazındaki lizozim ise, embriyoyu ve besin maddelerini, bakteriyel etkilere karşı korur. Tavuk ile hindi, ve orangutan ile keseli sıçanlarda var olan lizozim, amino asit dizisinde benzerlikler gösterir (Matsushima ve ark. 1969).

Enzimin yapısı, 1965 yılında David Phillips tarafından, X ışınları kullanılarak açıklanmıştır. Tavuk yumurtası lizozimi, elipsoidal şeklindedir. Boyutları yaklaşık olarak $45 \times 30 \times 30$ Angstrom olan, 129 aminoasit kalıntısından oluşmuş küçük bir proteindir. Lizozimin bir birim ağırlığı yaklaşık 14600 daltondur. Üç kısa zinciri mevcuttur ve 4 disülfid bağı içermektedir (Blake ve ark. 1965). Proteinin haritasındaki, alfa heliks yapısı 129 aminoasit kalıntısından 52' si tarafından (%42) oluşturulmuştur. 41 ve 45 ile 50 ve 54 amino asitleri, β tabakasını oluşturur ve 46 ile 49 amino asitleri saç tokası meydana getirirler (Diamond ve ark. 1965).



Şekil 1.3. Lizozimin üç boyutlu yapısı

1.5.2.1. Lizozimin Kullanım Alanları

Ticari değeri olan lizozimin kullanım alanları, gıda pazarında olduğu kadar, eczacılıkta da fazladır. Lizozimin güçlü bir antibakteriyel aktiviteye sahip olması eczacılıktaki ticari değerini artıran önemli bir özelliğidir. Bu enzim, klinik uygulamalarda ülserlerin, enfeksiyonların, yanıkların tedavisinde ve bazı antibiyotiklerin bir destekleyicisi olarak muazzam bir potansiyele sahiptir (Alderton ve ark. 1964, Arıca ve ark. 2004).

Gıda endüstrisinde ise, paketlenme filmlerinin antiseptik duruma getirilmesi için kullanılır. Sosis,sucuk,diğer etler ve süt tozu gibi yiyeceklere, koruyucu olarak eklenebilir (Reid 1987). Lizozim, gıdaların konserve yapılması sırasındaki sterilizasyon için gerekli olan sıcaklığa düşürmekte ve immobilize edilerek otosterilizasyonunda da kullanılmaktadır (Procton ve Cunningham 1988). Lizozim, peynir olgunlaştırılması, mayalanması sırasında bütirik asit fermantasyonuna sebep olan bakteriyel türlerin, bir inhibitörü olarak mandıra teknolojisinde kullanılmaktadır. Lizozimin pıhtılaşma zamanını kısaltmak ve ürünü artırmak için kullanılması da mümkündür (Giangiacomo ve ark. 1992).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda, lizozim enzimine spesifik bir iyon değiştirici destek materyali hazırlanması için; mekanik gücü yüksek, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli, küre geometrisine sahip metakrilik asit aşılınmış kitosan polimeri hazırlandı.

2.1. Kimyasal Malzemeler

Lizozim (tavuk yumurtası beyazından EC 3.2.1.7) ve insan serum albumin Sigma Chem. Co. (St. Louis. MO, ABD) firmasından alındı. Metakrilik asit (MAA) Merck AG'den (Darmstadt, Almanya) temin edildi ve 4°C'de saklandı. Amonyum persülfat, kitosan ve Epiklorohidrin Sigma Chem Co. Firmasından alındı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. HPLC saflık derecesinde kullanılan asetonitril, trifloroasetikasit, ultra saf su kimyasalları Merck firmasından ve HPLC çalışmalarında kullanılan protein kolonu ve ön kolon, 0.45 mm gözenek çapına sahip kartuş filtreler ve şırıngaları, milipor filtre sistemleri Supelco firmasından alındı.

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

2.2. Yöntem

2.2.1. İyon değiştirici kürelerin hazırlanması

2.2.1.1. Çapraz bağlı Kitosan Kürelerin sentezi

Hazırlanan kitosan çözeltisi (%4 asetik asit içerisinde) sodyum hidroksit (2.5 M) çözeltisine damlalar halinde ilave edilerek kitosan küreler hazırlandı. Oluşan kitosan kürelerin mekanik dayanımlarını arttırmak amacıyla pH'sı 10.0 olan epiklorhidrin

(ECH) çözeltisi ile 6 saat 50 °C'deki su banyosunda inkübe edilerek çapraz bağlı kitosan küreleri elde edildi. Bu işlem basamağının ardından küreler distile su ile pH'sı değişmeyene kadar yıkandı.

2.2.1.2. Çapraz bağlı Kitosan Kürelerin Modifikasyonu

Çapraz bağlı kitosan kürelerin modifikasyonu; amonyum persülfat başlatıcısı varlığında metakrilik asit (MAA) komonomerinin radikalik polimerizasyon yöntemi ile aşılansarak kitosan-g-pMAA iyon değıştirici küreleri sentezlenerek gerçekleştirilmiştir. Kitosan-g-pMAA kopolimerinin sentezi; yaklaşık olarak 1.0 g çapraz bağlı kitosan kürelerin bulunduğu iki boyunlu balon içerisinde, amonyum persülfat başlatıcısı (6.58 mM, 9.0 ml) ve metakrilik asit (0.2 ml) monomeri varlığında azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Aşı kopolimerizasyonu, polimerizasyon ortam sıcaklığının 60 °C'de sabit tutulduğu ve 3 saat süreyle 200 rpm karıştırma hızında sürekli karıştırıldığı işlem koşullarında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen kitosan-g-pMAA iyon değıştirici küreleri distile su yıkandı. Ortamda kalan reaksiyona girmemiş olan homopolimerleri uzaklaştırmak için sıcak su ile ekstrakte edildi. Monomer oranının aşılama yüzdesi (% G) ve verimine (% E) etkisi araştırılarak optimize edildi.

Aşılama yüzdesi ve verimi gravimetrik yöntem kullanılarak aşılama öncesi ve sonra kuru kütlelerin belirlenmesi ile ve aşağıdaki eşitliklerin kullanılması ile hesaplanmıştır.

$$\% G = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (2.1)$$

$$\% E = \frac{W_2}{W_3} \times 100 \quad (2.2)$$

Burada W_1 , W_2 ve W_3 değerleri sırasıyla; kitosanın başlangıç, aşılansmış kitosanın ekstrakte edildikten sonraki ve ekstrasyonundan önceki toplam ürün (kopolimer ve homopolimer) kütlelerini ifade etmektedir.

2.2.2. Kürelerin Karakterizasyonu

2.2.2.1. Denge Su İçeriği

Kitosan-g-pMAA kürelerinin denge su içerikleri farklı ortam pH'larında (pH 4.0-8.0) ve distile su içerisinde oda sıcaklığında gravimetrik yöntemle tayin edildi. İyon değiştirici kürelerin denge su içerikleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Denge su içeriği (\%)} = \{(W_s - W_d) / W_d\} \times 100 \quad (2.3)$$

Burada, W_s ve W_d sırasıyla, denge su içeriğine ulaşmış kürelerin ve kuru kürelerin kütesini ifade etmektedir.

2.2.2.2. Gay-Lussac Piknometresi ile Yoğunluk Tayini

İyon değiştirici kürelerin yoğunluğu Gay Lussac piknometresi ile, 25°C sıcaklıkta membran diskleri için çözücü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

2.2.2.3. Spesifik Yüzey Alanı

Kitosan-g-pMAA kürelerinin spesifik yüzey alanı BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü.

2.2.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu

35 °C sıcaklıkta vakum etüvünde kurutulan iyon değiştirici kitosan-g-pMAA küreleri azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve elektron mikroskop fotoğrafları JEOL (JMS 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

2.2.2.5. FTIR Spektrumları

Kitosan, çapraz bağlı kitosan ve kitosan-g-pMAA kürelerin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Tabletler 0.01 g kuru küre parçası ve 0.1 g KBr karıştırılarak elde edildikten sonra spektrumları alındı.

2.2.2.6. Amin Grubu Tayini

Hazırlanan kürelerin erişilebilir amin grupları miktarının titrasyon ile belirlenebilmesi için, çapraz bağlı ve/veya MAA aşılınmış kitosan küreleri (0.2 g), distile su içerisinde 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda süzülen küreler 1 saat süresince HCl çözeltisi (2.0 M, 10 ml) ile muamele edilerek ayarlı NaOH çözeltisine (2.0 M) karşı titre edildi.

2.2.2.7. Karboksil Grubu Tayini

Kitosan-g-pMAA kürelerin yüzeyde erişilebilir karboksil grubunun titrasyon ile belirlenebilmesi için, küreler (0.2 g) distile su içerisinde 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda süzülen mikroküreler 1 saat süresince NaOH çözeltisi (2.0 M, 10 ml) ile muamele edilerek ayarlı HCl çözeltisine (2.0 M) karşı titre edildi.

2.2.3. Lizozim Adsorpsiyon Çalışmaları

2.2.3.1. Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi

Metakrilik asit bağlanmış iyon değiştirici kitosan kürelerin sulu ortamdan lizozimin adsorpsiyon davranışı kesikli sistemde incelendi. İyon değiştirici kitosan kürelerine sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonuna; pH, sıcaklık, başlangıç lizozim konsantrasyonu ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Bu yol ile yeni sentezlenen lizozime spesifik kürelerin sulu ortamdan lizozim moleküllerine gösterdikleri afinite araştırılarak adsorpsiyon sistemi karakterize edildi. Küreler üzerine lizozim adsorpsiyonu, asetat (50 mM pH 4.0-

5.0) ya da fosfat tamponu (50 mM, pH 6.0-8.0) gibi farklı pH'larda çalışıldı. Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi çalışması, dört farklı sıcaklıkta (4, 15, 25 ve 37 °C), fosfat tamponu (50 mM, pH 6.0 ve pH 7.0) içerisinde gerçekleştirildi. İyonik şiddetin etkisi ise çözelti ortamındaki 0.0-1.0 M aralığında değişen NaCl konsantrasyonunda araştırıldı. İyon değiştirici ve/veya metal iyonu immobilize edilmiş afinite kürelerin adsorpsiyon kapasitesini tayin etmek için çözeltideki lizozim başlangıç konsantrasyonu, 0.125-3.00 mg/ml arasında değiştirildi.

Her set koşullarında küreler, 5 ml tampon çözeltisi (50 mM) ile dengeye getirildi. Bütün adsorpsiyon deneyleri 25 °C sıcaklıkta, 0.5 mg/ml başlangıç lizozim konsantrasyonuna sahip sulu çözeltinin küreler ile 3 saat, 100 rpm karıştırma hızında yürütüldü. Bu periyodun sonunda küreler, adsorpsiyon ortamdan uzaklaştırıldı ve kürelere adsorplanan lizozim miktarı, adsorpsiyon ortamındaki başlangıç ve 3 saat sonundaki adsorpsiyon ortamında kalan bakiye protein konsantrasyonun çift ışık demetli UV/VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japan, Model 1601) kullanılarak, 280 nm dalga boyunda adsorbanslarının ölçülmesiyle tayin edildi. Kürelere adsorplanan lizozim enziminin miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$q = [(C_o - C) V_s] / m \quad (2.4)$$

Yukarıdaki eşitlikte q; küreler üzerine adsoplanan lizozim miktarını (mg/g), C_o; başlangıç protein konsantrasyonu (mg/ml), C; adsorpsiyon işleminden sonra ortamda kalan bakiye protein konsantrasyonu (mg/ml), V_s; adsorpsiyon çözeltisinin hacmini (ml) ve m; adsorpsiyon ortamındaki kürelerinin kütlesini (mg) göstermektedir.

2.2.3.2. Adsorpsiyon Kinetikleri

Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerin lizozim adsorpsiyonunda elde edilen deney sonuçları, birinci ve ikinci dereceden kinetik modellerle uygulanarak, adsorpsiyon sisteminin kinetiği araştırılmıştır. Lagergren birinci derece hız eşitliği, sıvı bir çözeltiden, katının adsorpsiyonu için, en yaygın kullanılanlardan biridir (Lagergren 1898) ve aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (2.5)$$

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

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log q_{eq} - (k_1 t) / 2,303 \quad (2.6)$$

İkinci derece kinetik model ile elde edilen adsorpsiyon denge kapasitesi aşağıda verilen eşitlikten elde edilir (Ho ve ark. 1999).

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_{eq} - q_t)^2 \quad (2.7)$$

Yukarıdaki eşitlik, sınır koşullarda integre edilerek, ikinci dereceden doğru denklemi elde edilir.

$$\left(\frac{t}{q_t} \right) = \left(\frac{1}{k_2 q_{eq}^2} \right) + \left(\frac{1}{q_{eq}} \right) t \quad (2.8)$$

Bu eşitliklerde k_1 ve k_2 , birinci ve ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (dak^{-1} ve $\text{g mg}^{-1} \text{dak}^{-1}$), q_{eq} ve q_t sırası ile denge ve t anında adsorplanan lizozim miktarıdır (mg g^{-1}).

2.2.3.3. Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi

Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin uygulamasından elde edilen izoterm parameterleri arasında yer alan K_d değeri kullanılarak farklı sıcaklıklarda birleşme sabiti ($K_a=1/K_d$) hesaplandı ve aşağıdaki eşitliğe göre van't Hoff eğrisi çizilerek termodinamik parametreler (ΔH , ΔS ve ΔG) hesaplandı (Öktem ve ark. 2007, Bayramoğlu ve ark. 2006).

$$\ln K_a = \Delta S/R - \Delta H/RT \quad (2.9)$$

$$\Delta G_{assoc} = -RT \ln K_a \quad (2.10)$$

burada R gaz sabitidir (8.314 J/mol K).

2.2.3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Uygun koşullar altında, destek materyaline adsorplanan hedef biyolojik molekül farklı pH, iyonik şiddet veya uygun spesifik elüentler kullanılarak, desorbe edilebilmektedir. Kitosan-g-pMAA kürelere adsorplanan lizozimin desorpsiyon deneyleri, pH'sı 8.0 olan 1.0 M KSCN içeren tampon çözeltisi içerisinde yapıldı. Lizozim adsorplanmış küreler, 25 °C'de 100 rpm karıştırma hızında 2 saat süreyle karıştırılan desorpsiyon ortamında tutuldu. Destek materyalinden ayrılan ve desorpsiyon ortamına geçen lizozim miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Yeniden kullanımı belirlemek için, adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı afinite destek materyali kullanılarak 7 kez tekrar edilerek kürelerin tekrar kullanım özellikleri test edildi.

2.2. Yumurta Akından Lizozim Ayırıştırılması ve Saflaştırılması

Yumurta beyazından lizozimin adsorpsiyonu için; kabuğu alkolle silinen günlük yumurtalardan, 100 ml yumurta beyazı ayrılarak, 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. Yumurta beyazı, buz banyosunda, mikserle karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra ultrasantrifüj ile 4 °C’de, 12000 rpm’de, 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve süpernatant alındı.

Yumurta akı örneğindeki toplam protein konsantrasyonu Bradford Yöntemi ve HPLC ile tayin edildi. Ayrıca, iyon değişim kromatografisi alanında kullanılmak üzere biyolojik bir sıvı karışım olan yumurta akındaki lizozimin saflaştırılması amacıyla yönelik hazırlanan kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerin adsorpsiyon eğilimi, ayırıştırılan lizozim enziminin saflığı ve saflık derecesi HPLC ile araştırıldı (Sarıbek 2006).

Adsorpsiyon deneyleri, yumurta beyazı içinde, kitosan-g-pMAA iyon değiştirici küreleri ile toplam 5.0 ml hacimde, kesikli sistemde 25°C’de, 4 saat süreyle 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak yapıldı. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelere adsorbe edilen lizozimin elüsyonu pH’sı 8.0, 1.0 M NaCl ile yapıldı. 2 saat süreyle, 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak elüe edilen lizozimin saflığı, HPLC ile tespit edildi.

2.3.1. HPLC İşletim Koşulları

Çalışmamız da kullandığımız HPLC sistemi (Dionex Co., Germering, Germany); vakum gaz gidericisi sistem içinde bulunan dörtlü pompa (Model P580A), enjeksiyon kapasitesi 1’den 250 µl’ye değişebilen bir otosampler (Model ASI-100), bir kolon fırını (Model STH 585) ve bir UV-Vis dizi diyod dedektör (Model 340S) ünitelerini içermektedir. Proteinlerin kromatografik ayrımı, ön kolon (20 mm, iç çapı 4.6 mm) ile korunan, protein kolonu (150 mm x iç çapı 4.6 mm) ile gerçekleştirildi. Kromatografik çalışmalarda kullanılan bütün protein çözeltileri, partikül ve büyük agregatları uzaklaştırmak için, membran filtresi (0.2 µm, millipor) ile önceden filtre edildi. Proteinlerin ayırıştırılmasında taşıyıcı faz olarak A hattında; MiliQ saf su içerisinde % 0,1 Trifluoroasetik asit (TFA) ve B hattında ise % 95 asetonitril (AcN) ve % 5 ultra saf su içerisinde % 0,1 oranında TFA kullanıldı. B hattı taşıyıcı fazı, A fazına oranla 20

dakika içerisinde % 25'ten % 60'a çıkarıldı. 4.5 dakika sonunda ise % 60'tan % 25'e indirildi. Hareketli fazın akış hızı 1 ml/dakika olarak seçildi. Kolon fırın sıcaklığı 25 °C'ye ayarlandı. Kromatografik ayırım, 1.0 ml/dak akış hızında, bir gradiyent program kullanılarak ve otosamplerin örnek enjeksiyon hacmi 10µl olarak gerçekleştirildi. UV-Vis dedektör 220 nm'ye ayarlandı ve sıcaklık 25°C'de sabit tutuldu. Dionex CHROMELLEON® yazılımı kullanıldı ve bilgi elde edilmesi ve entegrasyonu için, Windows 98 işletim sistemi altında çalıştırıldı. Bu veri programı ile pik integrasyonları yapılarak her bir proteinin pik alanı elde edildi.

2.3.2. Saflaştırılan Lizozim Enziminin Aktivitesi

Saflaştırma deneylerinde, lizozimin aktivitesi, 620 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi, fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7.0) süspanse edilen *Micrococcus lysodeikticus* hücrelerinin kültürünün turbiditesindeki azalma, lizozimin ve/veya elüsyon sonucunun eklenmesinden sonra 6 dakika boyunca izlendi. Bir ünite lizozimin aktivitesi, 25°C'de ve pH 7.0'de bir dakikada O.D. değerini 0.001 azaltan enzim miktarı olarak tanımlandı (Sarıbek 2006 , Arıca ve ark. 2004, Arıca ve ark. 2004).

3.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

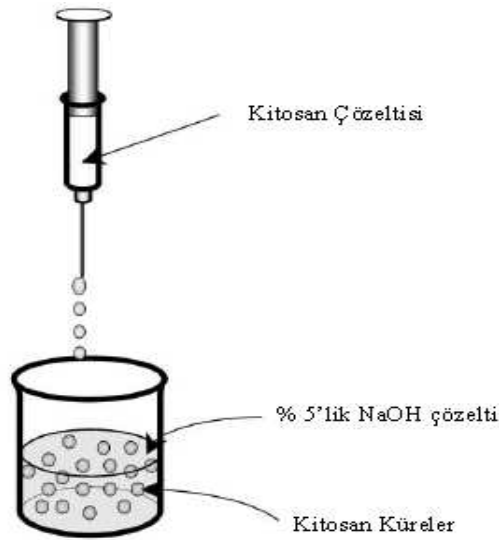
Polimerik destek malzemeleri adsorpsiyon, tutuklama, kovalent bağlama yöntemleri ile organik (Buchanan ve Nicel 1999), inorganik ve biyolojik moleküllerin, sulu ortamlardan ayrıştırılması ve saflaştırılmasına yatkındırlar ve fiziksel/kimyasal biçim açısından metal şelat reçineleri, hidrojeller (Bayramoğlu ve ark. 2002, Bayramoğlu ve ark. 2007, Bayramoğlu 2003), membranlar (Bayramoğlu ve ark. 2006, Arıca ve ark. 2004) ve mikroküreler (Bayramoğlu ve ark. 2006, Feiyan ve ark. 2006) gibi yapılarda hazırlanabilirler.

Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin gelişimi ile birlikte proteinlerin endüstriyel ölçekte üretilmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Son yıllarda sentetik polimerlerden hazırlanan destek malzemelerle biyolojik moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması ilgi çeken bir araştırma alanı olmuş ve polimerik destek malzemeleri inorganik destek malzemeler yerine kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle, destek malzemelerinin, farklı yüzey modifikasyon yöntemleri kullanılarak çeşitli biyomoleküller ile etkileşebilecek afinite özelliklere sahip olacak şekilde tasarlandıktan sonra ve afinite kromatografisi alanındaki kullanımları dikkat çekicidir.

Sentetik polimerlerin doğal bir polimer olan kitosan üzerine aşırı kopolimerizasyonu istenilen özellikleri kazandırmak ve çeşitli tipte yan zincirlerin seçilmesi ile uygulama alanlarını genişletmek açısından oldukça önemlidir. Aşılama işlemi sonrası aşılınmış polimer ile ana polimer malzeme karşılaştırıldığında yüzey özelliklerinin bir bütün olarak değiştiği konu ile ilgili yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Achmatowicz ve ark. 1965, Hegazy ve Abd El-Rehim 1997).

Sunulan çalışma kapsamında, çapraz bağlı kitosanın hedef biyomolekül için (lizozim enzimi) spesifik bir yüzey özelliği sunması amacı ile aşırı kopolimerizasyonu yöntemi kullanılarak modifikasyonu sonucunda iyon değiştirici destek materyalinin hazırlanması hedeflenmiştir. İlk basamakta, kitosan polimeri çözeltisinin NaOH çözeltisi içerisine damlatılarak hazırlanan kürelerin (Şekil 3.1) alkali ortamda epiklorohidrin (ECH) ile inkübe edilerek çapraz bağlanması sağlandı. ECH ile çapraz bağlanarak hem asidik koşullara dayanıklı olması sağlandı, hem de metakrilik asit monomerinin bağlanabilmesi için kitosanda fonksiyonel gruplar oluşturuldu. İkinci basamakta ise lizozim enzimine spesifik bir afinite destek materyali hazırlanması için;

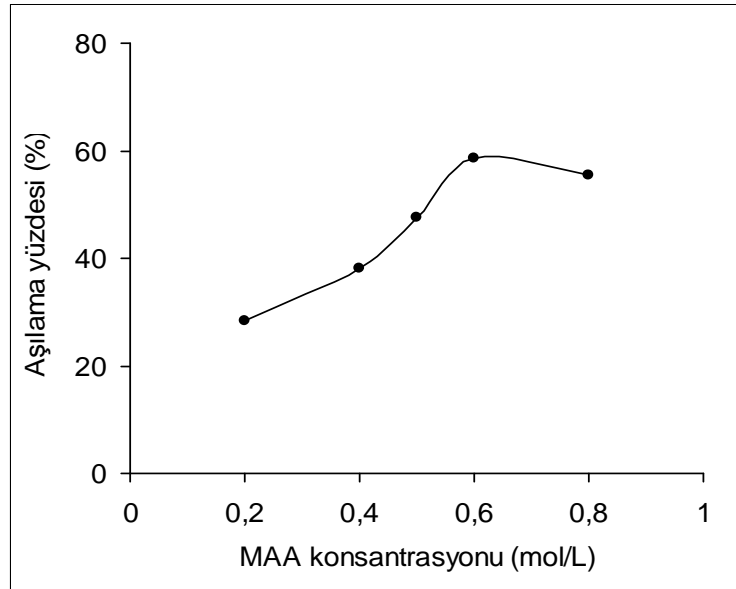
çapraz bağlı kitosan kürelerinin yüzeyine metakrilik asit kimyasal yolla aşılansarak modifiye edildi ve bu yolla mekanik gücü yüksek, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli, küre geometrisine sahip metakrilik asit aşılansmış kitosan, *kitosan-g-metakrilik asit*, iyon değiştirici destek materyali oluşturuldu. Hazırlanan iyon değiştirici destek materyalinin sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu işleminde kullanılması ve adsorpsiyon sistemine etki eden parametrelerin araştırılarak sistemin optimizasyonu sağlandı. Çalışmamızın son aşamasında ise, belirlenen optimum çalışma koşullarında iyon değiştirici kitosan-g-MAA küreler, yumurta beyazından lizozim enzimi saflaştırması çalışmasında kullanılmıştır.



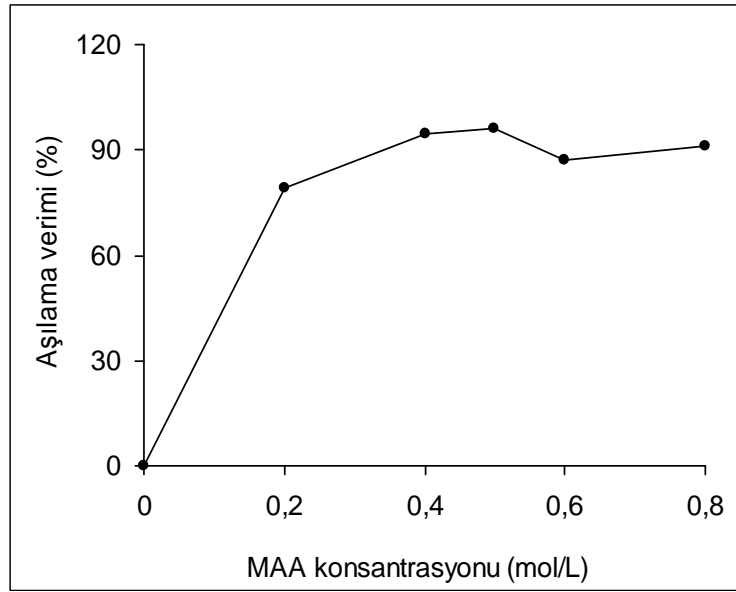
şekil 3.1. Kitosan kürelerin hazırlanması

3.1. Kürelerin Karakterizasyonu

Çapraz bağlı kitosana MAA aşılama işlemi monomer konsantrasyonunun kopolimerizasyona etkisi araştırıldı ve sonuçlar Şekil 3.2’de verildi. Reaksiyon ortamında MAA oranının artması ile aşılama yüzdesi ve veriminin belirli bir değere kadar arttığı belirlendi. Aşılama yüzdesi ve verimini artırmasının; *i*) polimerizasyon ortam pH’sının azalması ve dolayısı ile başlatıcının daha hızlı ayrışması, *ii*) redoks işleminin hızlanması, *iii*) homopolimerizasyon ve aşılama işleminin başlangıcında ortamda serbest radikal türlerin daha çok olması, *iv*) reaksiyon ortamındaki maddelerle kitosanın daha uyumlu hale gelmesi ve yüksek çözünürlük ve *v*) yüksek konsantrasyonda MAA’ın bulunması MAA moleküllerinin devinimsiz kitosan makroradikallerine daha kolay erişilebilir hale gelmiş olmasına sebep olması gibi mekanizmalar ile açıklanabileceği belirtilmektedir (Lagos ve Reyes 1988).

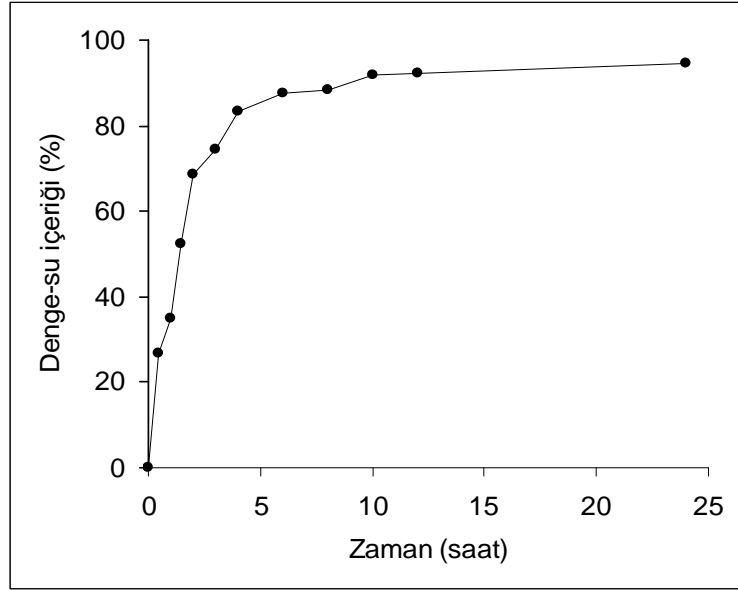


Şekil 3.2. Aşılama yüzdesine MAA konsantrasyonunun etkisi (reaksiyon sıcaklığı, 60°C; reaksiyon süresi, 3 saat; APS, 6.58 mol/L)



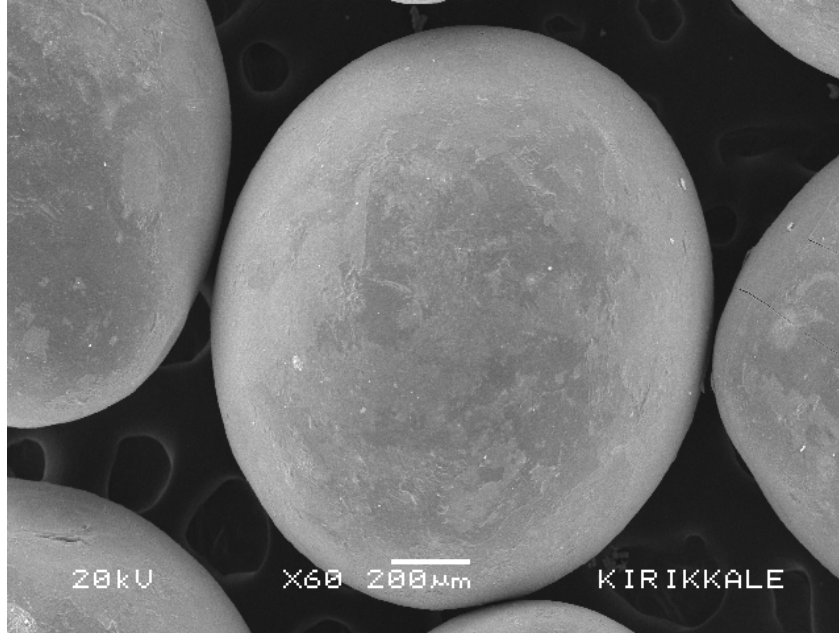
Şekil 3.3. Aşılama verimine MAA konsantrasyonunun etkisi (reaksiyon sıcaklığı, 60°C; reaksiyon süresi, 3 saat; APS, 6.58 mol/L)

Protein ve enzim ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması çalışmalarında, afinite materyalin dolgulu kolon sistemlerinde kullanımı düşünüldüğünde denge su içeriği oldukça önemlidir. Kitosan-g-pMAA kürelerinin denge-su içeriği %94.6 (Şekil 3.4), yoğunluğu ise 1.67 g/cm^3 olarak belirlendi. Küre yapıda hazırlanan kitosan-g-pMAA yapısındaki COOH gruplarının varlığından dolayı, hidrofilitite derecesi yüksektir ve bu nedenle çapraz bağlı kitosana göre denge-su içeriğinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Destek materyalinin denge su içeriği farklı ortam pH'larında incelenmiş ve artan pH ile arttığı belirlenmiştir. Su absorplama miktarları yani denge-su içeriği, destek materyalinin gözenekliliğine ve gözenek boyutuna bağlıdır. Çalışmamızda hazırladığımız destek materyali gözeneksiz bir yüzey yapısına sahip olduğundan, iyon değiştirici kürelerin pH'a bağımlılığı yapısındaki iyonize olabilen gruplara bağlı olarak açıklanabilir. Kürelerin spesifik yüzey alanı, BET yöntemi ile ölçüldü ve $4.36 \text{ cm}^2/\text{g}$ olarak belirlendi.



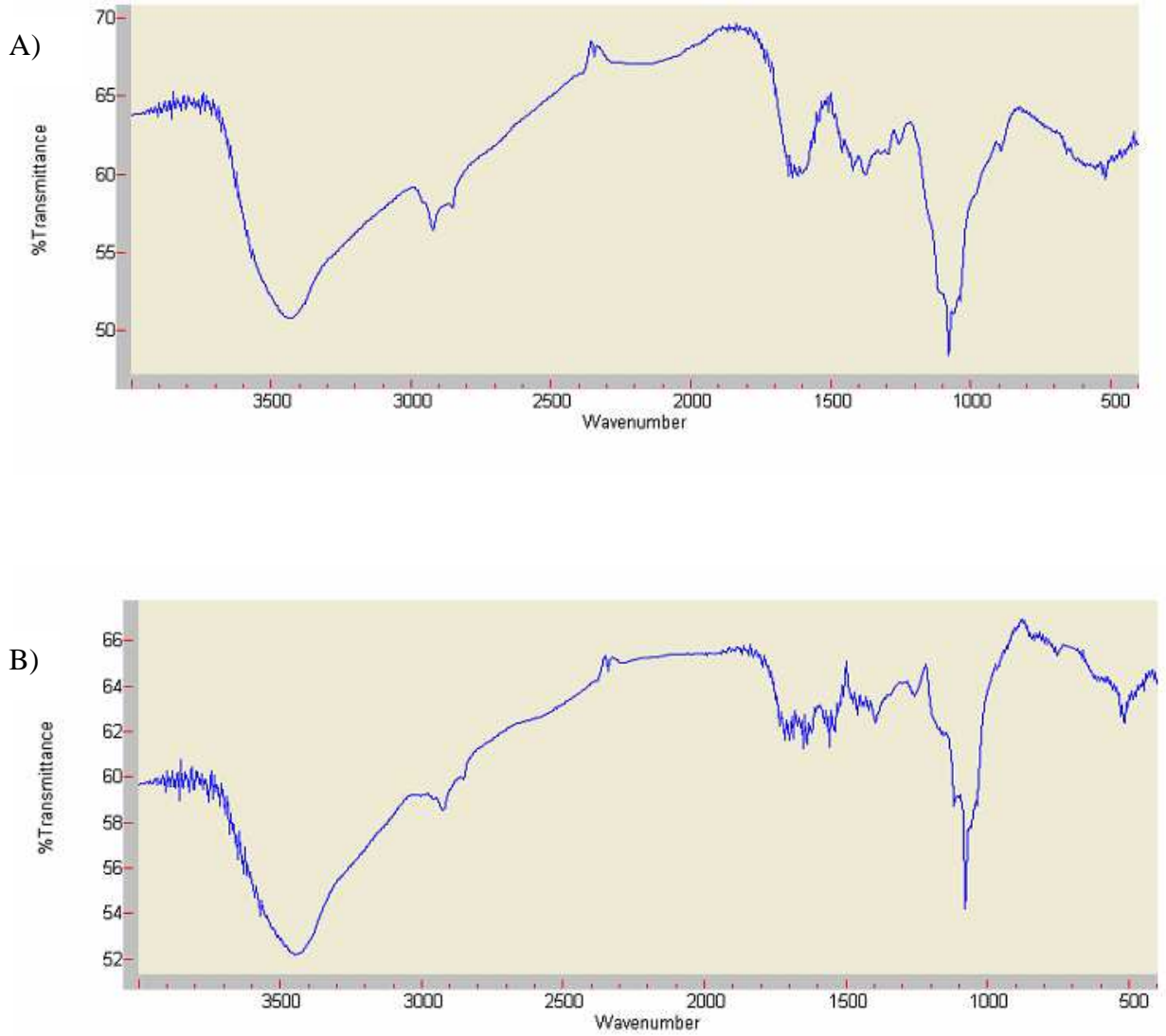
Şekil 3.4. Kitosan-g-pMAA kürelerin distile su içerisinde denge-su içeriği

Kitosan-g-pMAA kürelerinin yüzey yapısı Şekil 3.5’de taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlendi. Kürelerin oldukça düzgün küresel ve gözeneksiz bir yüzey yapısına sahip oldukları gözlemlendi. İyon değişim kromatografisi alanında iyon değiştirici olarak sentezlenen matriks için elde edilen gözeneksiz yapı difüzyonel kısıtlamaları ortadan kaldırdığı için önemli bir avantaj oluşturmaktadır.



Şekil 3.5. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerin SEM mikrografı

Kitosan polimeri ve kitosan-g-pMAA kürelerinin FTIR spektrası, Şekil 3.6'te sunuldu. FTIR spektrumunda, 3436 ve 1584 cm^{-1} 'de gözlenen pikler kitosanın karakteristik hidroksil ve amino gruplarına aittir. ~ 1626 da cm^{-1} de gözlenen pik ise kitosanın arta kalan asetamid gruplarının karbonil titreşimine karşılık gelmektedir. Metakrilik asit aşılannış kürelerde kitosan polimerinde olmayan 1560 cm^{-1} 'deki pik ve metakrilikasitin karbonil gruplarından ileri gelen ve MMA'nın ester konfigürasyonunu ifade eden absorpsiyon piki ise 1672 cm^{-1} de gözlenmesi kitosan kürelere metakrilik asitin aşılannışının bir göstergesidir.



Şekil 3.6. A) Kitosan polimeri B) kitosan-g-pMAA kürelerin FTIR spektrumu

Çapraz bağlı kitosan kürelerin yüzeyinde erişilebilir amin grubu miktarı titrasyon yöntemi kullanılarak 2.14 $\mu\text{mol/g}$ küre olarak belirlendi. Metakrilikasit monomeri karboksilik grubu taşıması nedeni ile, destek materyalinin yüzeyinde, kimyasal yolla aşılama ile kitosan polimeri modifiye edilerek yüzeyinde lizozim molekülleri ile spesifik etkileşimin gerçekleşebileceği serbest karboksil grupları oluşturulmuş oldu. Kitosan-g-pMAA kürelerinin erişilebilir karboksil grubu miktarı, potansiyometrik titrasyon yöntemi kullanılarak 11.21 mmol/g küre olarak belirlendi.

3.2. Sulu Çözeltiden Lizozim Adsorpsiyonu Çalışmaları

İyon değiştirici *kitosan-g-pMAA* kürelerin hazırlanması için optimize edilen deney protokolün oluşturulmasını takiben, yeni geliştirilen destek materyallerinin sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirilerek lizozim moleküllerine karşı gösterdikleri afinite araştırıldı.

3.2.1. pH Etkisi

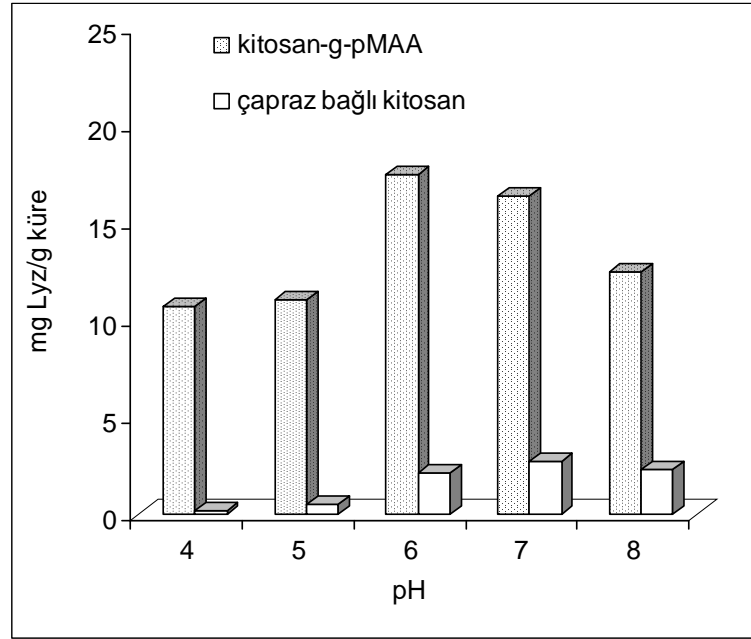
pH ve iyonik şiddet, arayüzeyde bulunan kovalent olmayan etkileşimlerle yönetilen afinite kromatografi sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Hedef molekül yüzeyindeki iyonize olabilen gruplar dolayısı ile oluşan yüzey yük dağılımı, iyon değiştirici kürelerin yüzeyindeki anyonik bağlanma bölgeleri ile spesifik afinite etkileşimlerinde pH oldukça önemli bir faktör olacaktır.

Destek materyali ile lizozim adsorpsiyonu işleminde pH'ın etkisi, 4.0-8.0 aralığında araştırıldı ve optimum lizozim adsorpsiyonu ve adsorpladığı lizozim miktarı kitosan-g-pMAA küreleri için pH 6.0'da 17.5 mg/g olarak belirlendi (Şekil 3.7).

Kitosan-g-pMAA küreler ile pH' daki spesifik etkileşim lizozimin bu pH değerinde konformasyonel ve yüzey yük dağılımı durumundan ve destek materyali yüzeyindeki negatif yük yoğunluğuna sahip bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklandığı düşünüldü. İzoelektronik noktası (pI) 11.0 olan lizozim pH 11.2'nin altında katyonik özellik taşımaktadır (Bayramoğlu 2003). Destek materyaline aşıl原因an metakrilik asitin pKa değeri 4.3 olan karbonil grubu iyonizasyondan dolayı (-COO⁻ grupları) yüzey negatif yük yoğunluğuna sahiptir. Bu nedenle metakrilik asit aşıl原因arak oluşturulan destek materyalinin katyon değiştirici olarak davrandığı söylenebilir.

Proteinlerin üç boyutlu yapılarının yüzeyinde açığa çıkan amino asitlerin türü, yükü ve yük dağılımı, ligand bağlı matriks ile protein arasındaki iyon değişimi etkileşimlerinde önemli bir faktördür. Sulu ortamda, protein moleküllerinin polar ya da iyonize amino asit kalıntıları yüzeyde olma eğilimindedir. Bununla birlikte, amino asit kalıntıları proteinin birincil yapısından dolayı birbirinden bağımsız olarak dağılamaz çünkü dağılım, bir proteinden diğerine farklılık gösterir (Bayramoğlu ve ark 2007, Arıca ve ark. 2004).

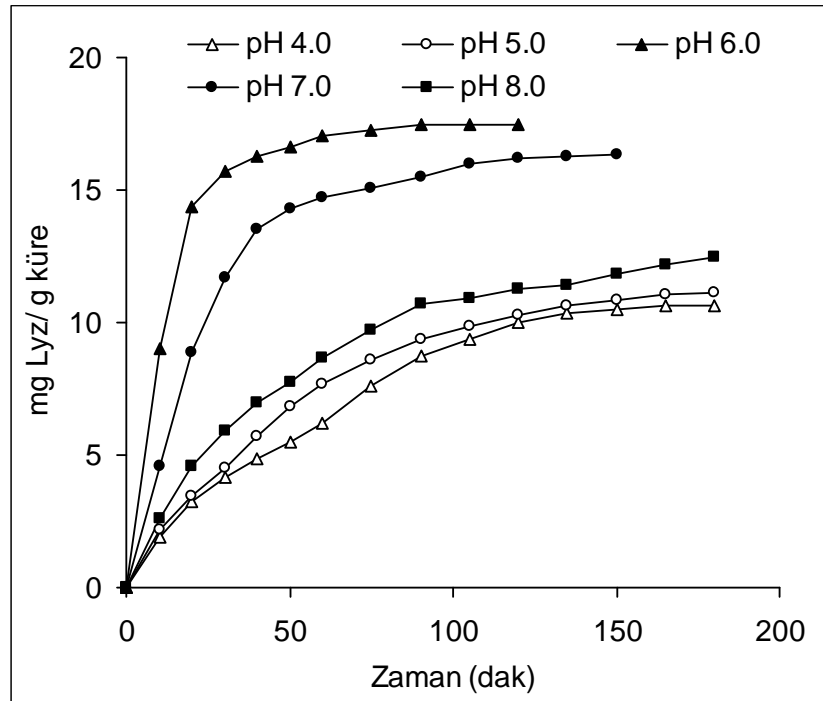
Lizozim proteininde açığa çıkan histidin, sistein ve triptofan aminoasit kalıntıları düşük pH değerlerinde bu amino asit kalıntılarının protonasyon derecesi artacağından iyon değiştirici kitosan-g-MAA küreler ile etkileşim bölgelerinin oluşacağı bildirilmektedir (Kubota ve ark. 1996).



Şekil 3.7. Kitosan-g-pMAA kürelere sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonunda pH'ın etkisi (sıcaklık, 25°C; lizozim konsantrasyonu, 0.5 mg/ml)

Çalışmamızda kullandığımız hedef enzim lizozim çalışılan pH aralığında katyonik özellik sergilemektedir. Kitosan kürelerin sahip olduğu pozitif yüklü amin grupları ile lizozim molekülünün birbirini itmesi sonucunda çapraz bağlı kitosan kürelere non-spesifik adsorpsiyonun oldukça düşük olduğu belirlendi (Şekil 3.6). Zeng ve Ruckenstein çapraz bağlı kitosanın pH 7.0'ın altındaki değerlerde yapısında bulunan amin grubunun protonasyonu sonucunda pozitif yüklü olduğunu ve bu nedenle zayıf anyon değiştirici gibi davranarak negatif yüklü proteinleri adsorplayabileceğini rapor etmişlerdir (Zeng ve Ruckenstein 1996).

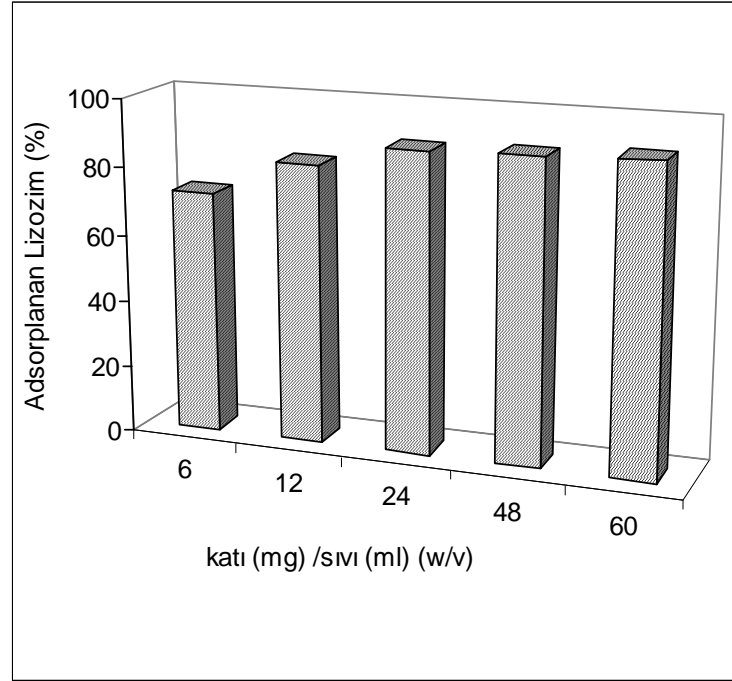
İyon değiştirici kürelere lizozim adsorpsiyonu işleminde dengeye ulaşma zamanı farklı ortam pH değerlerinde araştırıldı (şekil 3.8). Adsorpsiyon işleminin başlangıçta yüksek hızla ilerlediği, dengeye ulaşma sürelerinin ortam pH'sına bağlı olarak değiştiği görüldü. Bu nedenle çeşitli koşullar altındaki (farklı adsorpsiyon parametreleri) adsorpsiyon verileri, dengeye ulaşılan 3 saatlik adsorpsiyon işlemi süreci uygulanarak elde edildi.



şekil 3.8. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelere ile sulu ortamdaki lizozim adsorpsiyonu işleminde farklı denge-adsorpsiyon zamanı (sıcaklık, 25°C; lizozim konsantrasyonu, 0.5 mg/ml)

3.2.2. Afinite Sorbent Dozunun Etkisi

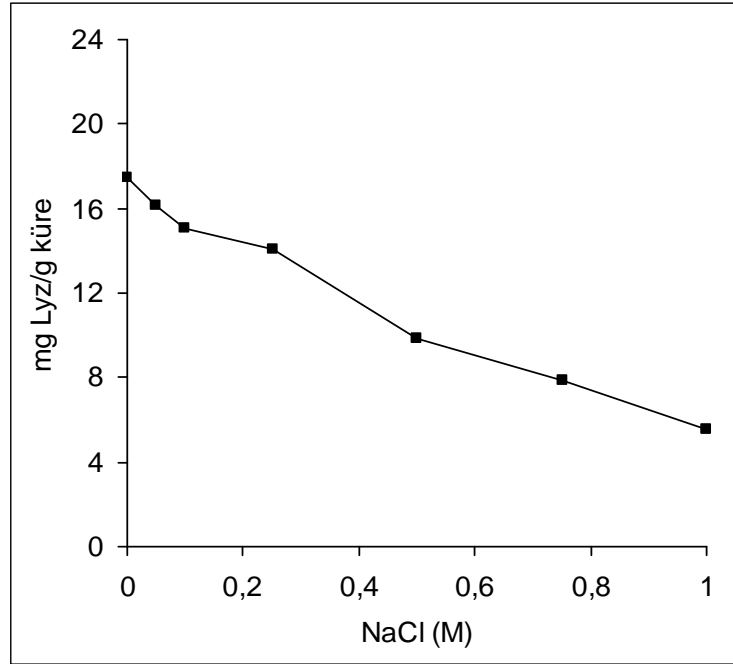
0.5 mg/ml lizozim başlangıç konsantrasyonunda, 5.0 ml toplam deney hacminde farklı küre bileşiminde katı/sıvı (v/v) oranının adsorpsiyon kapasitesine etkisi araştırıldı ve sulu ortamdan uzaklaştırılan lizozim yüzdesi Şekil 3.9’da verildi. Sulu ortamdan lizozim uzaklaştırılması işleminde, etkileşimde bulunan iyon değıştirici küre miktarının artması ile uzaklaştırılan protein miktarlarında yüzde olarak bir artış gözlemlendi ve belirli bir sorbent dozunda da doygunluğa ulaştığı belirlendi.



Şekil 3.9. Kitosan-g-pMAA iyon değıştirici kürelere sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonunda sorbent dozunun etkisi (sıcaklık, 25°C; lizozim konsantrasyonu, 0.5 mg/ml)

3.2.3. İyonik Şiddet Etkisi

İyonik şiddetin etkisi fosfat tamponunun NaCl içeriği 0.0-1.0 M arasında değiştirilerek incelendi. İyonik şiddetin artmasıyla, adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.10). İyonik şiddet arttıkça, Debye-Hückel uzunluğu tarafından verilen, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift tabaka azalacaktır. Rustemier ve Killmann, ortamdaki artan elektrolit konsantrasyonu ile, yüzey yüklerini görüntülemiştir. (Rustemier ve Killmann 1997). Bu etkilerin, moleküller arasındaki itme kuvvetinin azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, adsorpsiyon ortamında iyonik şiddet artırılması ile katı-sıvı ara yüzeyi çevresindeki elektriksel çift tabakanın elektriksel yük yoğunluğu değişebileceği ve bunun sonucunda adsorpsiyon eğiliminde azalma gözlemlenebileceği, adsorpsiyon ortamında elektrolit konsantrasyonu artması ile protein yüzey yükünün perdeleneyeceği düşünülmektedir (Belew ve ark. 1987).

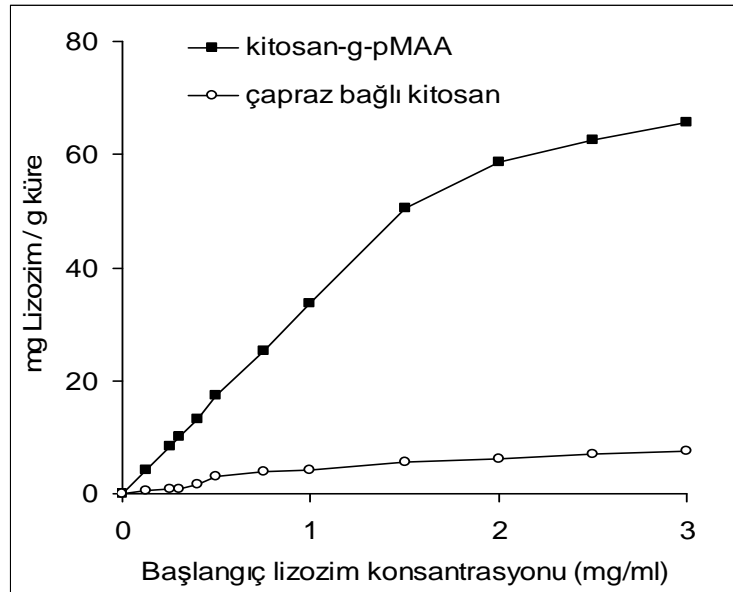


Şekil 3.10. Kitosan kürelere lizozim adsorpsiyonu işleminde iyonik şiddet etkisi

3.2.4. Başlangıç Lizozim Konsantrasyonunun Etkisi

İyon değiştirici kitosan küreler ile sulu çözeltilerden lizozim uzaklaştırılması için elde edilen deneysel adsorpsiyon eğrisi Şekil 3.11’de sunuldu. Adsorpsiyon ortamındaki lizozim konsantrasyonundaki artış, kürelere adsorplanan protein miktarında bir artışa neden olmaktadır. Başlangıç lizozim konsantrasyonu ve kürelerin protein adsorpsiyon kapasitesi arasındaki ilişkinin, başlangıç konsantrasyonu 1.5 mg/ml’den fazla olmadığı derişimler de doğrusal olduğu gözlendi. Belirli bir konsantrasyondan sonra iyon değiştirici kürelerin spesifik etkileşim gruplarının, lizozim molekülleri ile doygun hale gelmesi ile adsorpsiyon hızında yavaşlama olduğu düşünöldü.

Kitosan-g-pMAA küreleri ile deneysel olarak belirlenen adsorpsiyon izoterminden maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi 65.7 mg/g olarak belirlendi (Şekil 3.11). Çapraz bağlı kitosan kürelere metakrilik asit aşılanarak oluşturulan destek materyalinin, beklenildiği gibi, lizozim molekülüne karşı afinite gösterdiği ve yüksek adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldığı belirlendi. Adsorpsiyon ortamının sıcaklığı destek materyali ve proteinlerin etkileşiminde önemli bir rol alabilir. Adsorpsiyon sisteminde ortam sıcaklığının 4° C’den 37 °C’a kadar çıkarılması ile adsorplanan lizozim miktarının arttığı belirlendi.



Şekil 3.11. Kitosan küreler için belirlenen deneysel adsorpsiyon izotermi

Ruckenstein ve Zeng , lizozimin, bir lizozim ve ovalbumin karışımından ayrılması için makrogözenekli kitin afinite membranı kullanmışlar ve 50 mgml^{-1} 'lık bir adsorpsiyon kapasitesine sağlamayı başarmışlardır (Ruckenstein ve Zeng 1998). Arıca ve Bayramoğlu, Reactive Blue-4 ve Reactive Red-120 boya ligandı tutuklanmış PHEMA/kitosan membranlarının lizozim adsorpsiyon kapasitesi, sırasıyla 17, 9 ve $35,7 \text{ mg/ml}$ olduğunu rapor etmişlerdir (Arıca ve Bayramoğlu.2004).Şenel ve arkadaşları, lizozimin ayrılması için poly(HEMA-MAH) afinite küreleri kullanmışlar ve 8.7 mg/g 'lik bir adsorpsiyon kapasitesini sağlamayı başarmışlar. Belew ve arkadaşları, şelatlayıcı Sepharose Fast Flow ya da 5PW şelatlı TSK gel üzerine immobilize Cu(II) ile, lizozim, ovalbumin, sığır ve domuz serum albuminlerinin adsorpsiyonunu çalışmışlar ve lizozim için, $3.8-6.8 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır (Belew ve ark. 1987). Tennikova ve arkadaşları, sülfon ile modifiye poli(glisidin metakrilat- co-etilen dimetakrilat) makro gözenekli polimerik membran ile $260 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lık lizozimin adsorbe edildiğini rapor etmişler (Tennikova ve ark.1991). Bayramoğlu ve Arıca, Procion Green H-4G tutuklanmış PHEMA/Kitosan membran üzerine lizozim adsorpsiyon kapasitesini, 20.28 mg/ml 'lik olarak bildirdiler. Denizli ve arkadaşları, Cibacron Blue F3GA tutuklanmış PHEMA membran ile $135 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ 'lik lizozim adsorbe edildiği belirlenmiştir (Denizli ve ark.1998). Yılmaz ve arkadaşları, Reactive 19 tutuklanmış PHEMA/kitosan membranlar ile $60,8 \text{ mg/ml}$ 'lik lizozimin adsorbe edildiği belirtilmiştir.

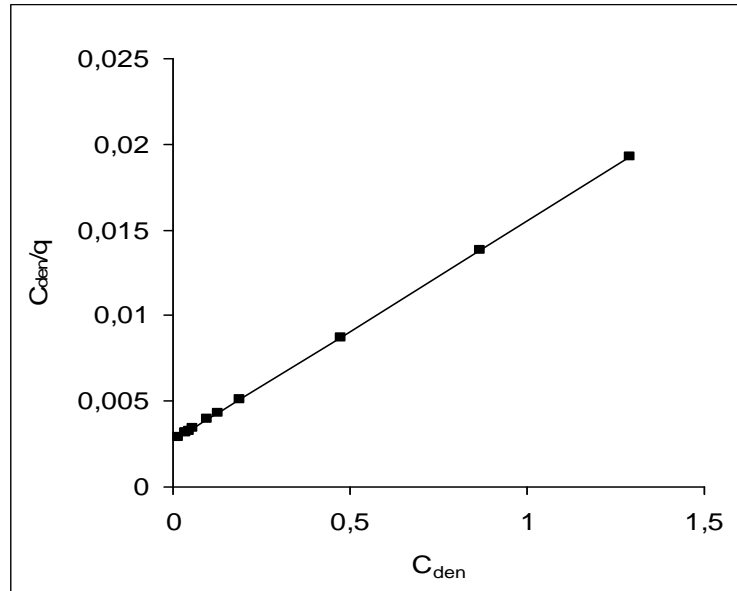
3.2.5. Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün matriksle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonu çalışmalarında, bu proteinin hazırlanan destek materyali ile ilişkisini açıklamak amacıyla kesikli sistem deneyleri sırasında elde edilen deneysel verilerin, teorik olarak türetilen izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı.

Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinden elde edilen doğrusal grafik (Şekil 3.12), yüksek korelasyon katsayısı (r^2) ve teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin, q_m , deneysel adsorpsiyon kapasitelerine, $q_{m(\text{deneysel})}$, eşit olması, iyon değiştirici kitosan-g-pMAA kürelere sulu çözülden lizozim adsorpsiyonunun Langmuir İzoterm modeli ile açıklanabileceğini gösterdi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici küreleri ile sulu çözülden farklı sıcaklıklarda lizozim adsorpsiyonu için belirlenen Langmuir ve Freundlich sabitleri

Sıcaklık (K)	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri			
	q_{deney} (mg/g)	q_m (mg/g)	$K_d \times 10^6$ (M)	r^2	n	K_F	r^2
277	56.64	62.5	20.98	0.987	1.75	52.52	0.964
288	58.23	66.7	15.60	0.991	1.69	68.33	0.906
298	65.67	78.13	14.44	0.991	1.59	85.40	0.945
310	72.18	80.56	9.45	0.995	1.78	99.06	0.932



Şekil 3.12. Kitosan-g-pMAA kürelere lizozim adsorpsiyonunda belirlenen deneysel verilerin Langmuir izoterm modeline uygulanması

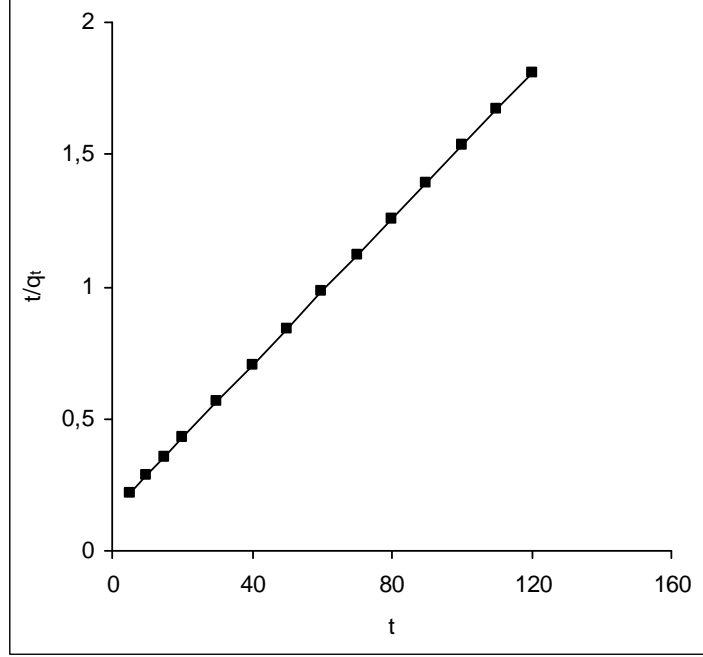
Sulu çözümlerden kitosan kürelere lizozim adsorpsiyonundan elde edilen deneysel veriler Freundlich izoterm modeline uygulandı ve belirlenen karakteristikler Çizelge 3.1’de verildi. K_F ve n değerlerinin yüksek olması kürelerin yüksek adsorpsiyon kapasitesi ile sulu ortamdan lizozim uzaklaştırmanın kolay olduğunu göstermesini yanında düşük korrelasyon katsayıları elde edilmiştir.

3.2.6. Adsorpsiyon Kinetiği

Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici küreler ile lizozim ayrıştırılması işleminde adsorpsiyon kinetiği, deneysel verilerin birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanması ile belirlendi. Deney sonuçları, Şekil 3.13’de sunulduğu gibi, ikinci dereceden kinetik modeline uygulandığında elde edilen yüksek korelasyon katsayısı ve adsorpsiyon kapasitesini ifade eden teorik q değerlerinin deneysel olarak belirlenen değere yakın olması adsorpsiyon işleminin bu ikinci dereceden kinetik modeli ile uyumlu olduğunu gösterdi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kitosan-g-pMAA küreleri ile sulu çözümlerden farklı sıcaklıklarda lizozim adsorpsiyonu sistemi için belirlenen birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri

Sıcaklık (K)	Birinci Derece Kinetik				İkinci Derece Kinetik		
	q_{deney} (mg/g)	$k_1 \times 10^2$ (min^{-1})	q_{eq} (mg/g)	r^2	$k_2 \times 10^3$ (g/mg/min)	q_{eq} (mg/g)	r^2
277	56.64	4.37	43.32	0.940	1.95	58.82	0.996
288	58.23	6.65	88.19	0.955	1.69	62.50	0.998
298	65.67	6.28	86.10	0.942	1.29	71.42	0.999
310	72.18	5.73	92.46	0.931	0.98	80.14	0.989



Şekil 3.13. Kitosan-g-pMAA kürelere sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonunun ikinci derece kinetik modeline uygulanması

3.2.7. Adsorpsiyon Sisteminin Termodinamik Parametri

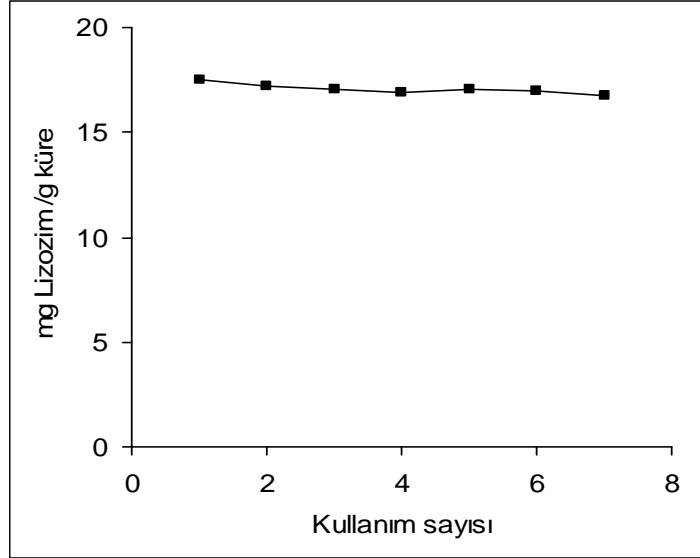
İyon değişim kromatografisi uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanan kitosan-g-pMAA destek materyali için de elde edilen pozitif ΔH (16.27 kJ/mol) değeri adsorpsiyon işleminin endotermik olduğunu belirtirken, pozitif ΔS (148.21 J/mol K) değeri de adsorpsiyon sırasında sistemdeki toplam düzensizliği ifade etmektedir. Kitosan-g-pMAA küreleri için farklı sıcaklıklarda ΔG değeri hesaplandı ve Çizelge 3.3'de sunuldu. Her bir çalışma sıcaklığında elde edilen negatif ΔG değerleri adsorpsiyon işleminin kendiliğinden olduğunu gösterdi. İkinci derece kinetik model ile açıklanabileceği belirlene bu adsorpsiyon işleminde Bölüm 3.2.6'da belirlenen ikinci derece hız sabitleri kullanılarak Arrhenius eşitliğinden destek materyali için de E_a -14.21 kJ/mol belirlendi ve Çizelge 3.3'de verildi.

Çizelge 3.3. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici küreleri ile sulu çözeltiden farklı sıcaklıklarda lizozim adsorpsiyonu sistemi için belirlenen termodinamik parametreler

Sıcaklık	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol K)	E_a (kJ/mol)
277	-24.81	16.27	148.21	-14.21
288	-26.50			
298	-27.64			
310	-29.82			

3.2.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Lizozim yüklü kürelerin, 1.0 M KSCN içeren, pH 8.0'deki desorpsiyon ortamına yerleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M KSCN kullanıldığı zaman, destek materyaline adsorbe edilen lizozimin % 98'undan fazlası elüe edildi. Elüsyon sonuçları, KSCN'nin, lizozim için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu gösterdi. Kitosan-g-pMAA kürelerinin yeniden kullanılabilirliğini göstermek için, lizozimin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, aynı küreler kullanılarak yedi kez tekrarlandı. İyon değiştirici kürelerin adsorpsiyon kapasitelerindeki minumum kayıpla (~%4) yüksek derecede yeniden kullanılabilirlik gösterdi (Şekil 3.13). İyon değiştirici kürelerin rejenerasyonları sırasıyla, 0.1 M NaOH ve 1.0 M NaCl ile 4 ve 2 saat yıkanarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.13. Kitosan-g-pMAA iyon değiştirici kürelerin adsorpsiyon kapasitelerine tekrar kullanım sayısının etkisi

3.3. Yumurta Beyazından Lizozimin Saflaştırılması

Tavuk yumurtası beyazındaki lizozim içeriği, yaklaşık %3.4'tür. Klasik lizozim saflaştırma yöntemleri, presipitasyon, santrifugasyon ve adsorpsiyon gibi, çeşitli adımlar gerektirmektedir. Çalışma kapsamında lizozim enzimine spesifik kitosan-g-pMAA iyon değiştirici küreleri ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonu çalışmalarında belirlenen optimize koşullar, yumurta akından lizozim saflaştırılması işleminde kesikli sisteme uygulayarak çalışıldı. Bu doğrultuda, 1:5 oranında tampon sistemi (50 mM, pH 7.0) ile seyreltilen yumurta akı çözeltilisindeki proteinlerin ve toplam protein miktarının analizi ile afinite kürelerden elüe edilen lizozimin saflığı HPLC kullanılarak yapıldı. Metakrilikasit aşılanmış kürelere bir diğer yumurta akı proteini olan albumine karşı adsorpsiyon eğiliminin olmadığı ve lizozime karşı spesifik olduğu belirlendi. Yumurta akından hedef protein lizozimin saflaştırılması işlemi pH 6.0 da gerçekleştirilmiştir. Bu pH değerinde, sahip olduğu karboksil gruplarının iyonizasyonu nedeni ile negatif yüklü

destek materyali ile negatif yüzey yük dağılımına sahip olan albumin molekülü arasındaki itme kuvvetlerinin baskın olmasından dolayı adsorpsiyon gözlenmemiştir. Afinite kürelerden elüe edilen lizozimin saflık derecesi %94.16 ve geri kazanımları %87.30 olarak belirlendi. Metakrilik asit aşılınmış kitosan küreler ile saflaştırılan lizozimin spesifik aktivitesi 40486 U mg^{-1} olarak belirlendi. Bu araştırmanın sonuçları, biyolojik sıvılardan hedef bir proteinin ayrımı için, kromatografik alanlarda kullanılabilir yeni bir iyon değiştirici sistemi hakkında yapılacak çalışmalara ışık tutacak bir öneme ve yeteri kadar bilgiye sahip olduğu düşünceindedir.

SONUÇ

Kitosan polimerinin biyolojik uyumluluğu, degrade edilebilmesi, fizyolojik olarak inert olması, toksik olmaması, antimikrobiyal özellik sergilemesi, metal iyonları ile şelat oluşturması, jel oluşturma özellikleri, kimyasal modifikasyonunun kolay olması ve proteinlere karşı yüksek afiniteye sahip olması gibi sunduğu önemli avantajlar nedeni ile, özellikle hedef moleküllerin biyolojik ortamlardan ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması işlemlerinde ve enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Kitosanın sıralanan bu olumlu özelliklerinin yanında destek materyali olarak hazırlanmaları aşamasında mekanik olarak zayıf olmalarından dolayı bazı işlemsel zorlukları vardır. Bu nedenle bu doğal kökenli polimerin istenilen geometrik yapıda hazırlanabilmesi için yüzey özellikleri fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal işlemlerle kolaylıkla ve istenilen özellikte modifiye edilmektedir.

Çalışmamızda, epiklorhidrin ile çapraz bağlanan kitosan kürelere amonyum persülfat başlatıcısı varlığında metakrilik asit (MAA) monomeri aşı kopolimerizasyon yöntemi ile aşılansak modifiye edilmiş ve iyon değıştirici kitosan-g-MAA kopolimeri sentezlenmiştir. İyon değıştirici küreler ile lizozim adsorpsiyonu işleminde pH'ın etkisi, 4.0-8.0 aralığında araştırıldı ve optimum lizozim adsorpsiyonu pH 6.0'da gözlemlendi. Kitosan-g-pMAA iyon değıştirici kürelerin maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesi 65.7 mg/g olarak belirlendi. İyon değıştirici kürelere adsorplanan lizozim pH 8'de, 1.0 M KSCN desorpsiyon ajanı olarak kullanılarak % 98 oranında geri kazanılabildi. Kürelerin, hedef molekül olarak seçilen lizozim proteinini biyolojik sıvı karışımlarından, yüksek bir kapasite ile ayırma gücüne sahip olduğunu gösterdi.

Sulu ortamdan lizozim adsorpsiyon çalışmalarından sonra, yumurta beyazından, doğrudan lizozim adsorpsiyon davranışı incelendi. Yumurta beyazının viskozitesi yüksektir. Bundan dolayı, kütle transfer direnci yüksektir ve dolayısıyla etkili lizozim adsorpsiyonu için uzun temas süreleri gerekmektedir (Grasselline ve Cascone 1996). Bu nedenle, adsorpsiyon deneyinde, yumurta beyazı %25 oranında fosfat tamponu ile seyreltilerek kullanılmıştır. Yumurta beyazından adsorbe edilen lizozim miktarı ve

sorbentlerden elüe edilen lizozim miktarları, HPLC analizi ile tespit edilerek yumurta beyazından ayrıştırılan lizozimin saflığı ve saflık derecesi belirlendi.

Yumurta beyazı proteinleri arasında lizozim, % 3.5'luk bir oranı teşkil etmektedir. Yumurta beyazındaki protein kompozisyonunda avidin, ovalbumin ve konalbumin yer almaktadır (Alderton ve ark. 1964). Klasik lizozim hazırlanması, yumurta beyazından, pH 9.5'ta %5'lik NaCl çözeltisinin eklenmesiyle doğrudan kristallendirme yöntemini içerir. Bu şekilde lizozim kazanımı % 60-80 civarında olmaktadır. Bununla birlikte, işlem gören yumurta beyazının işlevselliği de hasara uğramaktadır. Bu sakıncayı ortadan kaldırmak için, yumurta akından lizozim ayrımı, ultrafiltrasyonla, iyon değiştiricilerle ya da afinite kromatografisi ile yapılmaktadır.

Lizozim, ovalbumin ve konalbumin, kolon iyon değiştirme kromatografisi kullanılarak, tek basamaklı işlemle saflaştırılmıştır. Yüksek derişimlerde ve geleneksel olarak kullanılan teknik ve materyaller yerine alternatif olarak; daha yüksek akış hızlarında kullanılabilir yeni bir reçine kullanılmış ve distile suyla % 25'e kadar seyreltilmiş yumurta beyazına başarılı şekilde uygulanmıştır (Ming ve Howell 1992).

Lizozimin güçlü bir antibakteriyel aktiviteye sahip olması eczacılıktaki ticari değerini artıran önemli bir özelliğidir. Lizozimle ilgili devam eden araştırmalar, bu enzimin geniş ölçeklerde izolasyonu için ticari metotların gelişimini teşvik edecektir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde, sentezlenen yeni kitosan-g-MAA iyon değiştirici küreleri ile sulu ortamdan lizozim adsorpsiyonun yüksek bir kapasite ile gerçekleştirilebildiği belirlenmiştir. İyon değiştirici kromatografisi, lizozimin elüsyon kolaylığı, elüe edilen lizozim miktarı, lizozimin saflığı gibi özellikler bakımından, olumlu sonuçlar sağlamıştır.

Ayrıca bu yöntem üzerine adsorbe olan lizozim enziminin kolayca desorbe edilmesiyle destek materyalinin enzimin tekrar kullanımını mümkün kılmaktadır. Yumurta beyazı gibi viskozitesi yüksek besin maddelerinden proteinlerin doğrudan ayrımı için, kromatografik alanlarda kullanılabilir yeni bir iyon değiştirici sistemi hakkında yapılacak çalışmalara ışık tutacak bir öneme ve yeteri kadar bilgiye sahip olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- ACHMATOWICZ, T. 1965. Robalewski A. Zielinski W., Pol.Pat., 59, 401; 1966.Chem. Abstr., 6, 5274 .
- ARICA, M.Y. 2000. Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization. Journal of Apply Polymer. Science, 77: 2000-2008,.
- ARICA, M.Y., E. YALÇIN, G. BAYRAMOĞLU. 2004. Preparation and characterisation of surface properties of poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacryloylamidohistidine): application for purification of HIgG. Journal of Chromatography B. 807: 315-325.
- ARICA, M.Y., G. BAYRAMOĞLU, N. BIÇAK. 2004. Characterization of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. Process biochemistry, 39: 2007-2017.
- ARICA, M.Y., G. BAYRAMOĞLU. 2005. Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. Process Biochemistry, 40:1433-1442
- ARICA, M.Y., M. YILMAZ, E. YALÇIN, G. BAYRAMOĞLU. 2004. Surface properties of Reactive Yellow 2 immobilised pHEMA and HEMA/chitosan membranes: characterisation of their selectivity to different proteins. Journal of Membrane Sciences, 240: 167-178.
- ARICA, M.Y., M. YILMAZ, G. BAYRAMOĞLU. 2004. Affinity membrane chromatography: Relationship of dye-ligand type to surface polarity and their effect on lysozyme separation and purification. Journal of Chromatography B, 805: 315-323.
- AYHAN, H.2002. Biyomalzemeler .Bilim ve teknik dergisi Yeni ufuklar , Temmuz sayısı.s.10.
- BAYRAMOĞLU, G., B. KAYA, M.Y. ARICA. 2002. Procion Brown MX-5BR attached and Lewis metal ion immobilized Poly(hydroxyethyl-methacrylate)/chitosan IPNs membranes: their lysozyme adsorption equilibria and kinetics characterisation. Chemical Engineering Science, 57: 2323-2334.
- BAYRAMOĞLU, G. ve M.Y. ARICA. 2003. A novel pH sensitive porous membrane carrier for various biomedical applications based on pHEMA/chitosan: preparation and its drug release characteristics. Macromoleculer Symposia, 203: 213-218.

- BAYRAMOĞLU, G., E. YALÇIN, Ö. GENÇ, M.Y. ARICA. 2003. Dye-ligand immobilized IPNs membrane for removal heavy metal ions. *Macromoleculer Symposia*, 203: 219-224.
- BAYRAMOĞLU, G. 2003. poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/chitosan Dye and Different Metals Ion Immobilized Interpenetrating Network Membranes: Preparation and its Application in Metal-Affinity Chromatography. *Journal of Applied Polymer Science*, 88:1843-1853.
- BAYRAMOĞLU, G., G. ÇELİK, M.Y. ARICA. 2006. Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3): 1689-1697.
- BAYRAMOĞLU, G., A.Ü. ŞENEL, M.Y. ARICA. 2006. Effect of spacer arm and Cu(II) ions on performance of L-histidine immobilized on the poly(GMA/MMA) beads as a affinity ligand for separation and purification of IgG. *Separation and Purification Technology*, 50: 229-239.
- BAYRAMOĞLU, G., G. ÇELİK, M.Y. ARICA. 2006. Immunoglobulin G adsorption behavior of L-histidine ligand attached and Lewis metal ions chelated affinity membranes. *Colloid and Surfaces A.: Physicochem. Eng. Aspects*, 287,:75-85.
- BAYRAMOĞLU, G., M. YILMAZ, M.Y. ARICA. 2007. Chitosan-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible enzyme immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 103: 3084-3093.
- BAYRAMOĞLU, G., Y. TUNALI, M. Y. ARICA. Immobilization of β - galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catal. Commun.*, Article in press.
- BAYRAMOĞLU, G., H.A. ÖKTEM, M.Y. ARICA., *Biochemical Engineering Journal*, In Press.
- BELEW, M., T. T. YIP, L. ANDERSSON, J. PORATH. 1987. Quantitation of adsorption capacity, adsorption isotherms and equilibrium constants by frontal analysis. *J.Chromatogr.*, 403:197.
- BUCHANAN, I.D. 1999. Nicell J.A., *J.Chem.Technol. Biotechnol.* 74: 669.
- BLAKE, C.C.F., D.F. KOENIG, G.A. MAIR, A.C.T. NORTH, D.C. PHILLIPS, V.R. SARMA.1965. *Nature*.Structure of Hen Egg White Lysozyme,May.
- BUCHANAN, I.D. 1999. Nicell J.A., *J.Chem.Technol. Biotechnol.* 74: 669.

- CEBE, M. 1987. Fizikokimya. Uludağ Üniversitesi Basımevi
- COWIE, J. M. G. 1991. Polymers: Chemistry & Physics of modern materials, second edition, Stanley Thornes Ltd., United Kingdom, (ISBN: 0-7487-4073-2).
- DENİZLİ, A., S. ŞENEL, M.Y. ARICA. 1998. Colloids Surf. B 11:113.
- DIAMOND, R., D.C. PHILLIPS, C.C.F. BLAKE, A.C. NORTH. 1975. Protein Data Structure Explorer-6LYZ, Real-Space Refinement of the Structure of Hen Egg White Lysozyme. February.
- DON, T. M., C. F. KING, W. Y. CHIU. 2002. Journal of Applied Polymer Science, 86 (12): 3057–3063.
- FEIYAN, W., Y. ZHU, J. ZHISHEN. 2006. Preparation of dye–ligand affinity chromatographic packings based on monodisperse poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads and their chromatographic properties. Journal of Chromatography A, 1134: 45–50.
- FREMAN, W.H. ve L. STRYER. 1995. L. Biochemistry. Co. New York.
- GENÇ, Ö., Ç. ARPA, G. BAYRAMOĞLU, M.Y. ARICA, S. BEKTAŞ. 2002. Selective recovery of mercury by Procion Brown MX-5BR immobilized poly(2-hydroxyethylmethacrylate/chitosan) composite membranes. Hydrometallurgy, 67: 53-62.
- GIANGIACOMO, R., F. NIGRO, G. MESSINA, T.M.P. CATTANEO. 1992. Food Additives and Contaminants, 9:427.
- GRASSELLINE, M., O. CASCONI. 1996. Neth Milk Dairy J. 50: 551.
- HEGAZY, E.A., H.A. ABD EL-REHİM. 1997. J. Polym. Int., 43, 321.
- HO, Y. S., G. MCKAY. 1999. Pseudo-second order model for sorption processes. Process Biochem., 34:451-465.
- HOFFMAN, A. S., G. CHEN, X. WU, Z. DING, B. KABRA, K. RANDERİ. 1997. Polymer Preparations, 38(2):524–525.
- ÖKTEM H.A., G. BAYRAMOĞLU, V.C. ÖZALP, M.Y. ARICA. 2007. Single-step purification of recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase using DNA-Aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. Biotechnol. Prog., 23:146-154.
- KİM, S. Y., S. M. CHO, Y. M. LEE, S. J. KİM. 2000. Journal of Applied Polymer Science, 78(7): 1381–1391.

- KOTZE, A. R., H. L. LUEBEN, B. J. DE LEEUW, A. G. DE BOER, J.C. VERHOEF, H. E. JUNGINGER, 1997. *Pharmaceutical Research*, 14(9):1197–1202.
- KRACALIKOVA, K., G. TISHCHENKO, M. BLEHA. 2006. Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni^{+2} –iminodiacetic acid complexes on retention of IgG_1 . *J Biochem Biophys Methods* 67:7-25.
- KUBOTA, N., Y. NAKAGAWA, Y. EGUCHI. 1996. Recovery of serum proteins using cellulozic affinity membrane modified by immobilization of Cu^{+2} ion. *J. App. Poly. Sci.*, 62: 1153.
- LAGERGREN, S. 1898. About the theory of so-called adsorption of soluble substance. *Kung Sven Vetem Hand* 24: 1-39
- LAGOS, A. and J. REYES.1988. Grafting onto chitosan. I. Graft copolymerization of methyl methacrylate onto chitosan with Fenton's reagent (Fe^{2+} – H_2O_2) as a redox initiator. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 26(4),: 985–991.
- LI, W., S. ZHANG, Y. SUN. 2004. *Biochemical Engineering Journal*, 22: 63.
- LIN, S.S., S.W.N. UENG, S.C. LIU, E.C. CHAN, E.K. CHAO, C.H. TSAI, K. T.CHEN, F.C. WEI, H. SHIH, 1999, *Clin. Orthop. Rel. Res.*,240-362
- MATSUSHIMA, Y., T. MIYAZAKI, S.KASAI. 1969. Chemical Evidence for the Phillips Model of the Action of Hen Egg White Lysozyme, July.
- MING, F., J.A. HOWELL. 1992. *Bioseparation* 2:289
- ONO, K., Y. SAITO, H. YURA, K. ISHIKAWA. 2000 . *Journal of Biomedical Material Research*, 49(2): 289–295.
- PEDRAM, M. Y., A.LAGOS, J. RETUERT, R. GUERRERO, P. RIQUELME. 1995. *Journal of Macromolecular Science, Part. A: Pure & Applied Chemistry*, A32(5): 1037–1047.
- PEDRAM, M. Y., J. RETUERT, R. QUIJADA. 2000. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201(4): 923–930.
- PROCTON, V., F.E. CUNNINGHAM. 1988. *CRC Critical Rew in Food Sci. And Nutr.* 26:359
- RUCKENSTEIN, E., X. ZENG. 1998. *J. Membr. Sci.*142:13
- RUCKENSTEIN, E and W .GU. 2001 .*Journal of Membrane Science*, 193 : 131.

- RUSTEMIER, O. and E. KILLMANN.1997. Electrostatic Interactions and Stability of Poly-l-lysine Covered Polystyrene Latex Particles Investigated by Dynamic Light Scattering. *Journal of Colloid Interface Science*, 290:360
- SAÇAK.M. 2002. Kimyasal Kinetik , Gazi Kitabevi,Ankara.
- SARIBEK, H. 2006. “Lizozim saflaştırılması işleminde kullanılmak üzere yeni affinite destek materyalinin hazırlanması: destek materyalinin yüzey özelliklerinin, adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması” Tez aşamasında, Kırıkkale Üniversitesi, Fen. Bil. Enstitüsü
- SARIKAYA.Y.2000.Fizikokimya, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- SİNGH, D. K. and A. R RAY. 1998. *Carbohydrate Polymers*, 36(2–3):251–255.
- SUEN. S.Y, M.R .ETZEL.1992. *Chemical Engineering Science*, 47 :1355.
- SUEN, S.Y., Y.C. LIU, C.S. CHANG. 2003. Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species. *Journal of Chromatography B*, 797: 305-319.
- SUN.S., Y. YUE, X. HUANG, D. MENG. 2003. *Journal of Membrane Science*, 222: 3.
- ŞENEL. A.Ü. 2004 . “Uzatma kolu takılı L-Histidin bağlı poli(GMA-MMA) affinite mikrokürelerle HIgG saflaştırılması”, Kırıkkale Üniversitesi, Fen. Bil. Enstitüsü.
- TASKER, R. A., B. J. CONNELL, S. J. ROSS, C. M. ELSON. 1998. *Laboratory Animals*, 32(2): 270–275.
- TENNİKOVA, T.B., M. BLEHA, F. SVEC, T.V. ALMAZOVA. 1991. *J. Chromatogr.A*, 555:97.
- THANOU, M., J. C. VERHOEF, H. E JUNGİNGER. 2001. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52(2):117–126.
- TREVAN, M.D. 1980. *Techniques of immobilization*, In *immobilized enzyme* .John Wiley and sons, New York
- YILMAZ, M. 2002. *Boya ligand kromatografisi uygulamaları*. Kırıkkale Üniversitesi, Fen. Bil. Enstitüsü .
- YILMAZ, Y., H. CANER, H. HASİPOĞLU, O. YİLMAZ. (1998). *European Polymer Journal*, 34(3–4), 493–497.
- ZHANG, J., Y. YUAN, J. SHEN, S. LİN. 2003. *European Polymer Journal*, 39(4): 847–850.
- ZENG ,X. 1996. *E.Ruckenstein, Ind. Eng. Chem. Res.* 35: 4169-4175.

ZHAO, Y. J., E. SULKOWSKI, J. PORATH. 1991. Surface topography of histidine residues in lysozymes. *Eur. J. Biochem.*, 202: 1115.

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Necati BEŐİRLİ'ye en içten teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmanın gerçekleőtirilmesinde, her türlü araştırma destekleri sağlayan, tez konusu yönlendiren ve değerlendiren, büyük bir özveri ile daima bana destek olan ve araştırma konum hakkında bilimsel bakıő açısı edinmemi sağlayan değerli Hocam, Sayın Doç. Dr. Gülay BAYRAMOğLU'na iten saygı ve teőekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca, Kırıkkale Üniversitesi Biyokimyasal İőlemler ve Biyomateryal laboratuvarında tez çalıőmamın tamamlanmasında araştırma desteklerini sağlayan Prof. Dr. M. Yakup ARICA'ya ayrıca teőekkürlerimi sunarım.

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde katkısı olan aileme teőekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

21.09.1979 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1998 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2002 yılında Kimya bölümünden mezun oldu. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Bilim Dalında yüksek lisansa öğrenimine başladı.