

T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMİNOASİT BAĞLI KRIYOJELLERİN SENTEZİ VE
BİYOLOJİK UYGULAMALARI

Büşra SARICA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Kadir EROL

EYLÜL 2016
ÇORUM

T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMİNOASİT BAĞLI KRİYOJELLERİN SENTEZİ VE
BİYOLOJİK UYGULAMALARI

Büşra SARICA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Kadir EROL

EYLÜL 2016
ÇORUM

Büşra SARICA tarafından hazırlanan “AMİNOASİT BAĞLI KRİYOJELLERİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK UYGULAMALARI” adlı tez çalışması 28/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy çokluğu ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi kabul edilmiştir.

(Doç. Dr. Dursun Ali KÖSE).....(imza)

(Yrd. Doç. Dr. Kadir EROL).....(imza)

(Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE).....(imza)

Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 30/09/2016 tarih ve 2016/180 sayılı kararı ile Büşra SARICA’nın KİMYA Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.



Prof. Dr. ALİ KILIÇARSLAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

TEZ BEYANI

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

(İmza)

Büşra SARICA



AMİNOASİT BAĞLI KRİYOJELLERİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK UYGULAMALARI

Büşra SARICA

HİTİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2016

ÖZET

Kriyojeller son yıllarda oldukça fazla tercih edilen sentetik materyallerdir. Bu yapılar sürekli ve kesikli sistemde adsorban olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada poli(2-Hidroksietilmetakrilat-N-metakriloil-L-lizin), poli(HEMA-MAL), kriyojeller sentezlenmiş ve L-aspartik asidin sulu sistemlerden adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Kriyojellerin aspartik asit adsorpsiyonu değişen pH, etkileşim süresi, başlangıç aspartik asit derişimi, sıcaklık ve iyonik şiddet koşullarında test edilmiştir. Kriyojellerin karakterizasyonu için; şişme testi, Fourier Transform Infrared spektroskopisi (FT-IR) analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi, termal analiz, yüzey alanı analizi ve elementel analiz yapılmıştır. Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık olarak 236,0 mg aspartik asit/g kriyojel olarak hesaplanmıştır. Belirlenen optimum adsorpsiyon koşulları ile lizozim enziminin adsorpsiyonu çalışılmış ve adsorpsiyon kapasitesi 37,25 mg enzim/g kriyojel olarak tespit edilmiştir. Adsorpsiyon işleminin adsorpsiyon modeli Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri üzerinden analiz edilmiş ve Langmuir adsorpsiyon modelinin daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adsorpsiyon, Aspartik asit, Kriyojel, Lizozim.

SYNTHESIS OF AMINOACID IMMOBILIZED CRYOGELS AND BIOLOGICAL APPLICATIONS

Büşra SARICA

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

September 2016

ABSTRACT

Cryogel quite preferred as synthetic materials in recent years has emerged. Adsorbents are used in the batch and continuous system operation. In this study poly(2-Hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-L-lysine), poly(HEMA-MAL), cryogels synthesized and used in adsorption from aqueous systems of L-aspartic acid. The adsorption of aspartic acid with the cryogels was tested under changing conditions of pH, interaction time, initial aspartic acid concentration, temperature, and ionic strength. For the characterization of cryogels; swelling test, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis, surface area (BET), elemental analysis were performed. The adsorption capacity of cryogels was determined about 236,0 mg aspartic acid/g cryogel. Adsorption of lysozyme was studied under the optimum adsorption conditions and adsorption capacity of cryogels was found as 37,25 mg enzyme/g cryogel. The adsorption process was triad via Langmuir and Freundlich isotherm models and the Langmuir adsorption model was determined to be more appropriate for the aspartic acid adsorption onto cryogels.

Keywords: Adsorption, Aspartic Acid, Cryogel, Lysozyme.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her türlü desteğini ve zamanını esirgmeden bana yardımcı olan Danışmanım

Yrd. Doç. Dr. Kadir EROL'a

teşekkürlerimi sunarım,

Fikirlerine ve deneyimlerine güvendiğim, zorda kaldığımda sorgusuzca tam destek olup beni doğru yönlendiren, laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açıp maddi ve manevi olarak her türlü desteği veren çok sevdiğim hocam

Doç. Dr. Dursun Ali KÖSE'ye

derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım,

Tezimin yürütülmesindeki her türlü desteklerinden dolayı, fikirleri ve konu ile ilgili olarak önceden yapmış olduğu çalışmalarıyla yol gösteren sayın hocam

Dr. Kazım KÖSE'ye

teşekkürlerimi sunarım,

Yardımları ile laboratuvar çalışmalarımı kolaylaştıran değerli arkadaşlarım, Elif Bilgin ve Murat Yüce'ye yaptıkları yardımlardan dolayı teşekkür ederim,

Beni her zaman özveriyle, güvenle destekleyip, bu duruma gelmemi sağlayan sevgili ailem Nazan Yıldırım ve Recai Yıldırım'a ve bana emekleri büyük olan ikinci annem

Ayşe Sarıca'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında bana her zaman sabır gösterip moralimi yüksek tutan, maddi ve manevi olarak hiçbir desteğini esirgemeyen, gösterdiği özveriden dolayı, sevgili eşim Emre Sarıca'ya hayatımda olduğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Büşra SARICA

Çorum, 2016

Bu tez çalışmasına, ODMYO.19004.16.002 numaralı proje kapsamında vermiş oldukları destekten dolayı, Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İyonik Değişim Kromatografisi.....	2
2.2. Afinite Kromatografisi	3
2.3. Biyoanalizde Afinite Kromatografisi	4
2.4. Adsorpsiyon.....	7
2.5. Protein Analizi.....	9
2.6. Elektrostatik Etkileşimi Etkileyen Faktörler	11
2.6.1. Ana materyalin tipi	11
2.6.2. pH etkisi.....	12
2.6.3. Sıcaklığın etkisi.....	12
2.7. Kriyojelleşme	13
2.8. Aspartik Asit.....	15
3. DENEYSEL PROSEDÜR	19
3.1. Kimyasal Maddeler	19
3.2. Poli(HEMA-MAL) Kriyojellerin Hazırlanması	19
3.3. Poli(HEMA-MAL) Karakterizasyonu.....	20
3.3.1. Şişme testi	21
3.3.2. Yüzey morfolojisi	21
3.3.3. Elemental analiz.....	21
3.3.4. FTIR çalışmaları	22
3.3.5. Yüzey alanı analizi.....	22
3.3.6. Termal analiz	22
3.4. Aspartik Asit Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	22

3.4.1. Aspartik asit sulu çözeltilerden adsorpsiyonu	22
3.4.2. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	23
3.4.3. Aspartik asidin doğal ortamdan ayrımı.....	24
4. DENEYSEL UYGULAMA.....	25
4.1. Poli (HEMA-MAL) Kriyojellerin Karakterizasyonu	25
4.1.1. Şişme testi.....	25
4.1.2. Yüzey morfolojisi	25
4.1.3. Elemental analiz.....	27
4.1.4. FTIR çalışmaları	27
4.1.5. Yüzey alanı analizi.....	29
4.1.6. Termal analiz çalışmaları.....	29
4.2. Aspartik Asit Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	30
4.2.1. Aspartik asidin sulu çözeltilerden adsorpsiyonu	30
4.2.1.1. pH etkisi	31
4.2.1.2. Etkileşim süresi	32
4.2.1.3. Aspartik asit derişiminin etkisi	33
4.2.1.4. Sıcaklığın etkisi.....	34
4.2.1.5. İyonik şiddetin etkisi	35
4.2.2. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	36
4.2.3. Aspartik asidin doğal ortamdan ayrımı.....	38
4.3. Literatür Karşılaştırması.....	40
4.4. Matematiksel Modellemeler.....	41
4.4.1. Adsorpsiyon izotermi	41
4.4.2. Adsorpsiyon kinetik modelleme	44
5. SONUÇ	47
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Etkileşimler.....	5
Çizelge 2.2. Bağ türlerinin ortalama enerjileri.....	12
Çizelge 4.1. Yumurta akının temel bileşenleri.....	39
Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.....	43
Çizelge 4.3. Yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitler.	46



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. İyonik etkileşim kromatografisinin şematik gösterimi.	3
Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.	4
Şekil 2.2. Adsorpsiyon mekanizması.	9
Şekil 2.3. Kriyojel oluşumu.	14
Şekil 2.4. Farklı kriyojel formları.	15
Şekil 2.5. Aspartik asit.	18
Şekil 3.1. Poli(HEMA-MAL) kriyojelin yapısı.	20
Şekil 4.1. Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin SEM görüntüsü.	27
Şekil 4.2. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAL) kriyojellerinin FTIR spektrumları. ..	28
Şekil 4.3. Poli(HEMA-MAL) kriyojelinin termal analiz grafiği.	30
Şekil 4.4. Poli(HEMA-MAL) kriyojel ile aspartik asidin muhtemel etkileşimi.	31
Şekil 4.5. Aspartik asit adsorpsiyonuna çözelti pH'sının etkisi. Aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C.....	32
Şekil 4.6. Aspartik asit adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi. pH: 7.0; Aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; sıcaklık 25°C.	33
Şekil 4.7. Aspartik asit adsorpsiyonuna aspartik asit derişiminin etkisi. pH: 7.0; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C.....	34
Şekil 4.8. Aspartik asit adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. pH: 7.0; Aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.	35
Şekil 4.9. Aspartik asit adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. pH: 7.0; aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C.	36
Şekil 4.10. Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.	37
Şekil 4.11. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAL) kriyojellerin adsorpsiyon performanslarının karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.12. Lizozim adsorpsiyonu için UV-VIS spektrumu.	40
Şekil 4.13. Langmuir izotermi.	42
Şekil 4.14. Freundlich izotermi.	43
Şekil 4.15. Poli(HEMA-MAL) kriyojelleri için deneysel verilerin yalancı birinci derece kinetiği.	45
Şekil 4.16. Poli(HEMA-MAL) kriyojelleri için deneysel verilerin yalancı ikinci derece kinetiği.	46

SİMGE VE KISALTMALAR

q.....adsorpsiyon kapasitesi

mg.....miligram

g.....gram

nm.....nanometre

dak.....dakika

ppm.....milyonda bir

UV.....mor ötesi

VIS.....görünür

TGA....termal gravimetrik analiz

DSC....diferansiyel taramalı kalorimetre

1. GİRİŞ

Bir karışımı oluşturan bileşenlerin birbiri ile karışmayan iki faz arasında fiziksel olarak ayrılmasını sağlayan ayırma yöntemine kromatografi denir. Bu iki fazdan biri hareketsiz olan sabit faz (gözenekli, tabaka halinde veya film şeklinde) diğeri ise sabit fazın üzerinden akan hareketli fazdır. Proteinlerin ayırma-safılaştırma işlemleri için kromatografinin kullanımı 1960'lı yıllarda başlamış olup öncelikle küçük partiküllü sistemler kullanılmıştır (Konak ve ark., 2014). Ancak düşük geçirgenlik probleminden dolayı istenilen verim sağlanamamış ve 1967 yılında günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) olarak adlandırılan özel cihazlar üretilmiştir.

Spesifik bir biyomolekölü bulunduğu kompleks bir karışımdan ayırabilmek için bu moleküle alakalı fiziksel ve kimyasal özelliklerin bilinmesi ve yöntemin buna göre seçilmesi gerekmektedir. Her türlü biyomolekölü saflaştırmak için tek ve basit bir yöntem yoktur. Örneğin bir proteinin saflaştırılması için son derece başarılı olan bir yöntem başka bir protein için uygulandığında bu proteinin denatürasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Kromatografi yöntemi ile proteinlerin saflaştırılmasında proteinlerin boyut, yük, çözünürlük, spesifik bağlanma gibi özelliklerinden yararlanılmaktadır. Proteinlerin yüzeyinde bulunan polar ve hidrofobik gruplar proteinlerin çözünürlüğünü etkilerken, aspartik asit, glutamik asit, histidin, arjinin, lizin gibi aminoasitler de yük özelliklerini belirlemektedir. Proteinlerin üzerinde polar grupların olması durumunda iyon etkileşim kromatografisi, hidrofobik grupların olması durumunda hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılmaktadır. Farklı büyüklükte proteinlerin bulunduğu karışımlarda jel filtrasyon kromatografisi uygulanmakta olup, hedeflenen protein belirli bir bileşik ile spesifik bağlanma meydana getiriyorsa afinite kromatografisinden yararlanılmaktadır.

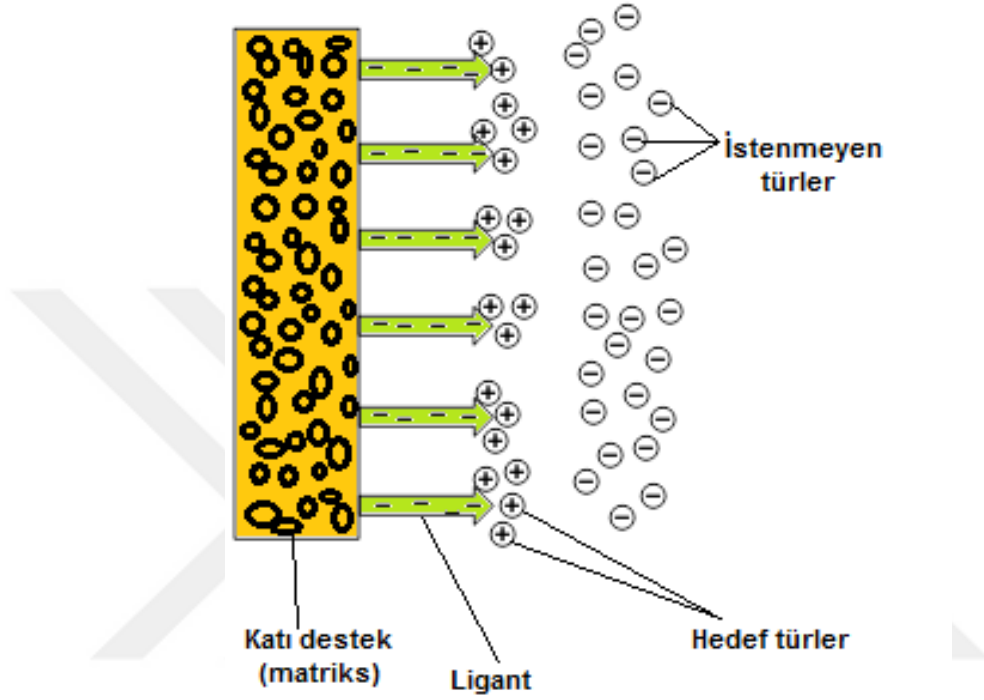
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İyonik Değişim Kromatografisi

Proteinlerin çözünürlüğünü belirleyen en önemli etmen olarak yüzeylerinde yer alan aminoasitler karşımıza çıkmaktadır. Çünkü yüzeyde ya da yüzeye yakın bölgelerde bulunan amino asitlerin yan zincirlerinde bulunan gruplar çözücü (solvent) ile etkileşime girmektedir. Aspartik asit ve glutamik asit gibi asidik aminoasitler fizyolojik pH değerinde negatif yüklü iken, lizin, arjinin, histidin gibi amino asitler ise pozitif yüklüdür. Proteinlerin net yükü incelendiğinde ise yapılarında bulunan farklı grupların (amino asitlerin) yük dengesine ve pH durumlarına bakmak gerekmektedir. Bir proteinin net yükünün sıfır olduğu pH değeri izoelektrik pH (pI) olup her protein için farklı bir izoelektrik pH değeri bulunmaktadır. Proteinlerin üzerindeki yük farklılıkları ayırma işlemlerinde kullanılmakta olup iyonik etkileşim kromatografisi bu amaçla ön plana çıkmaktadır. İyonik etkileşim kromatografisi proteinlerin ayırma-saflaştırma işlemlerinde kolon kromatografisi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

İyonik etkileşim kromatografisinde kolon üzerinde ligant görevi yapan yüklü gruplar bulunmakta ve bu gruplara zıt yüke sahip hedef moleküller ligant grupları sayesinde kolona bağlanmaktadır (Şekil 1.1). Bu etkileşim bir adsorpsiyon işlemi olup tersinir olarak gerçekleşmektedir. Bu tür bir ayırma işlemi için kromatografi kolonu öncelikle uygun tampon çözelti ile yıkanarak pH ve iyonik güç açısından dengelenmektedir. Daha sonra hedef molekülün bulunduğu karışım kolona düşük iyonik şiddet ile verilmekte ve hedef moleküllerin kolona bağlanması sağlanmaktadır. Düşük iyonik şiddet uygulanmasının nedeni hedef moleküllerin kolona maksimum miktarda adsorbe olmasını sağlamaktır. Daha sonra kolon uygun pH ve iyonik güçteki tampon çözelti ile yıkanarak kolona bağlanan istenmeyen türlerin (safsızlıkların) kolondan uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmektedir. Kolona verilen protein karışımı içerisinde, kolonda yer alan katı destek (matriks) ile farklı düzeyde etkileşim gösteren başka proteinler de bulunabilmektedir. Yıkama çözeltisinin iyonik şiddetinin kademeli olarak arttırıldığı yıkama aşaması ile kolona zayıf düzeyde bağlanan proteinler kolondan daha önce uzaklaştırılmakta ve sona doğru artan iyonik şiddetle beraber

kolona sıkı bir şekilde bağlanan proteinler de kolondan ayrılmaktadır. Belirli aralıklarla toplanan protein fraksiyonları ile bir elüsyon profili oluşturulmaktadır.



Şekil 1.1. İyonik etkileşim kromatografisinin şematik gösterimi.

2.2. Afinite Kromatografisi

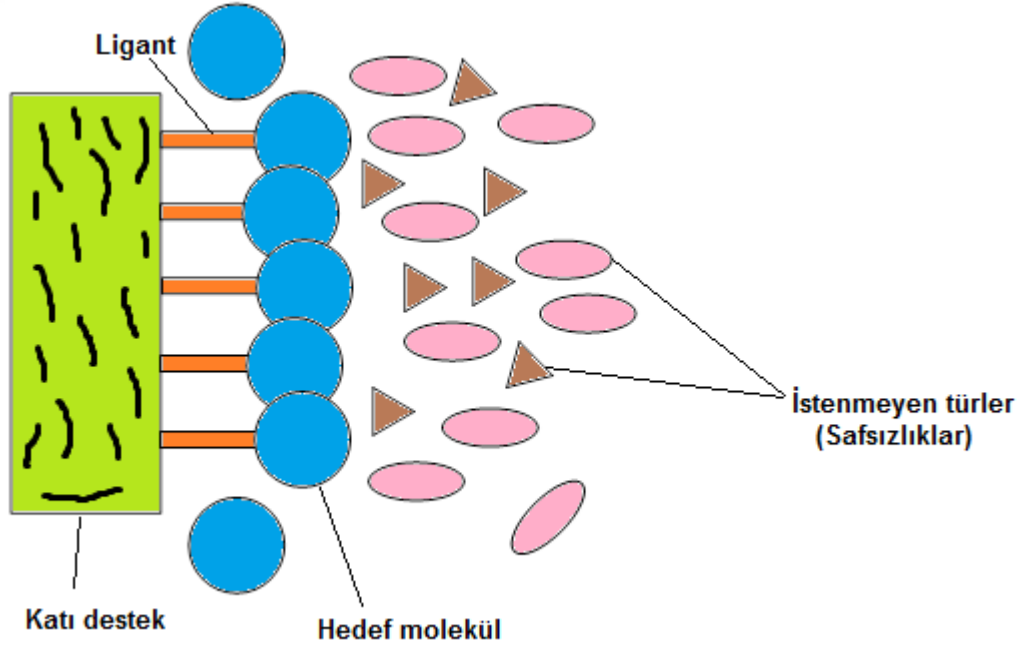
Spesifik protein, hücre ya da biyomoleküllerin buldukları kompleks ortamlardan ayrılması ve uzaklaştırılması için klinik anlamda kullanılan analitik yöntemlerin en önemli basamağıdır. Mevcut afinite teknikleri içerisinde biyomoleküllerin spesifik bağlanmaları veya bağlanmamaları önemli bir veri olarak karşımıza çıkmaktadır (Wilchek, 2004; Sarkar ve ark., 2016).

Afinite kromatografisi bir saflaştırma yöntemi olup tek bir basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılabilmektedir (Şekil 2.1). Bu teknik bir tür adsorpsiyon kromatografisidir ve matriks adı verilen katı bir destek materyaline, ligandın kovalent olarak immobilize edilmesi işlemi kapsamaktadır (Denizli, 2011). Enzim-substrat, reseptör-ligant, antibadi-antijen gibi moleküllerin saflaştırılmasında sıklıkla afinite

kromatografisinden yararlanılmaktadır (Urh ve ark., 2009; Moser ve Hage, 2010; Brgles ve ark., 2016).

Afinite kolonundan saflaştırılması istenilen molekülü (hedef molekül) içeren bir karışım geçirilirse sadece hedef molekül ligant tarafından tutulmaktadır. İstenmeyen safsızlıklar ise kolondan uygun bir tamponla ayrılmakta ve kolonda tutulan hedef molekül spesifik elüsyonla kolondan alınmaktadır.

Afinite kromatografisi ile protein saflaştırılması ilk olarak 1960'ların sonlarında başlamıştır (Cuatrecasas ve Wilchek, 1968). Daha sonra hızla popüler hale gelen bu teknik günümüzde de yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.

2.3. Biyoanalizde Afinite Kromatografisi

Tüm biyolojik işlemler moleküller arasındaki spesifik etkileşimlere bağlıdır. Bu etkileşimler bir protein ve düşük moleküler ağırlıklı maddeler (örneğin, substrat veya düzenleyici bileşikler ile enzimler arasında; biyoinformatif moleküller, hormonlar, transmitterler vb. reseptörler) arasında ancak biyospesifik etkileşimlerin daha sıklıkla iki ya da daha fazla biyo-polimer, özellikle de proteinler arasında meydana

gelmektedir. Örnekler; multimoleküler birliktelikler, efektör-reseptör etkileşimleri, DNA-protein etkileşimleri ve antijen-antikor bağlanmaları gibi yapısal ve fizyolojik biyokimyannın tüm alanlarında bulunabilmektedir. Afinite kromatografisi adını, bir katı faza adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bu çeşitli biyolojik afinitelerden yararlanılmasına borçludur (Scouten, 1981; Wilchek ve ark., 1984). Etkileşim, içerisindeki çiftlerin üyelerinden olan ligant, katı faza immobilize olur. Karşı ligant olarak adlandırılan diğeri ise (genellikle bir protein), kolon boyunca geçen ekstreden adsorbe olur. Bu tür afinite sistemlerinin örnekleri, Çizelge 2.1'de listelenmektedir.

Pek çok durumda afinite kromatografisi çok güçlü bir yöntemdir. İlgi dahilindeki protein bir karışımın küçük bir bileşeni olduğunda bu durum özellikle geçerlidir. Bir adet yumurtadan alınan yumurta akından yaklaşık 30 mg lizozimin saflaştırılması afinite kromatografisinin en iyi örneklerinden biridir (Köse ve Denizli, 2013).

Çizelge 2.1. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Etkileşimler.

Ligant	Karşı ligant
Antibadi	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, yüzey reseptörü, membran proteini,
Nükleik asit	Nükleik asit bağlayan protein (enzim veya histon)
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim, veya diğere şeker bağlayan protein

Afinite kromatografisi terimine, farklı yazarlar tarafından oldukça farklı anlamlar verilmiştir. Bazen iyon değişimi dışındaki tüm kromatografileri içeren aşırı geleneksel olmayan ligantlara dayanan adsorpsiyon kromatografilerini içine alacak kadar geniştir. Genellikle immobilize metal iyonu afinite kromatografisi (IMAC), kovalent kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve bunun gibi teknikleri kapsamaktadır. Diğere durumlarda, enzim-inhibitör kompleksleri gibi biyolojik olarak

işlevli çiftlere dayalı ligantlar anlamına gelir. Terim sadece fonksiyonel çiftleri değil, aynı zamanda bio-mimetik ligantlar olarak da adlandırılan, fonksiyonel enzimlerin aktif bölgelerine bağlanabilen, özellikle de boyaları içermektedir. Boya moleküllerinin kendileri doğal olarak hücre içerisinde fonksiyonel bağlamda mevcut değildir.

Afinite kromatografisi, uygun fonksiyonel özelliklere dayandığı için, aktif ve aktif olmayan formlar genellikle ayrılabilir. Bununla birlikte, bu durum sadece afinite yöntemlere özgü değildir. Kromatografik ayırmayı sağlayan etkileşim, proteinin fonksiyonel tiyol grubuna bağlı olduğunda kovalent kromatografi de aynı şeyi yapabilmektedir. Afinite elüsyonu ile iyonik etkileşim kromatografisi fonksiyonel özelliklerine uygun olarak ayrılabilir. Ancak bunlar, afinite yöntemleri için koyulmuş kuralların istisnalarıdır.

Afinite kromatografisinin tamamlayıcı baz sekanslarının ligantlar olarak kullanılabilirdiği nükleik asitlerin fraksiyonlanmasında ve hücre yüzey reseptörlerinin afinitenin temeli olduğu, hücrelerin ayrılmasında oldukça önem arz ettiği kanıtlanmıştır. Ana kullanımı ise protein saflaştırılması bağlamında olmuştur.

Genellikle ayrı ayrı muamele edildiğinde oldukça başarılı olan bir alan ise immunosorpsiyon olarak isimlendirilen afinite temelli antijen-antibadi etkileşimleridir. Bazı durumlarda, bu bir proteinin saflaştırılması için kullanılabilen tek uygun yol olmaktadır ve elde uygun bir monoklonal antikör olduğu zaman özellikle ilgi çekicidir.

Çoğu zaman afinite kromatografisi kullanılması araştırmacıya adsorbanı sentezlemesini gerektirmektedir. Bunu yapmak için gerekli yöntemler iyi sonuç vermektedir ve aynı zamanda sentetik organik kimyada uzman olmayanlar için kolayca öğrenilebilmektedir. İşlemi daha da fazla kolaylaştırmak için, bir ligant ile tepkimeye hazır aktif jel matrisleri ticari olarak temin edilebilmektedir. Bir ligandın immobilize edilmesi, en iyi durumlarda, çok basit bir işlem olabilir. Buna ek olarak, immobilizasyon işlemi proteinler kadar küçük moleküller için de kolay bir işlemdir.

Özellikle dikkat edilmesi gereken bir husus da ligant ve karşı ligant arasındaki ilişki gücüdür. Çok zayıf ise adsorpsiyon olmayacaktır, çok güçlü ise adsorplanmış proteini elde etmek zor olacaktır. Aynı zamanda aktif bir proteini bozmadan, kompleksten

ayrılmasını desteklemek için pH, tuz konsantrasyonu ya da deterjan vb. diğer maddeler gibi koşulları bulmak her zaman önem arz etmektedir. Afinite metotlarında genellikle burada bir aksaklık yaşanmaktadır.

Ligantlar son derece seçici olabilir ama sadece grup özgül de olabilir. İkinci tip glikoprotein-lektin etkileşimleri, bazı boya-enzim etkileşimleri ve immobilize kofaktörler ile etkileşimleri örnek olarak verilebilir. Bu etkileşimlerin birçok ayırma problemlerini çözmede son derece yararlı olduğu da kanıtlanmıştır. İyi örnekler immünoglobülinlere karşı grup seçici olan ligantlardır (Örneğin, stafilokokal protein A veya streptokokal protein G) (Jonson ve Ryden, 1998).

2.4. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, akışkan (hareketli-mobil) fazda çözülmüş haldeki belirli bileşenlerin bir katı adsorban (sabit faz) yüzeyine tutunmasına dayanan ve sabit faz yüzeyinde görülen yüze tutunma olayıdır (Şekil 2.2). Adsorplanan maddeye adsorbat, adsorplayan katı maddeye ise adsorban ya da adsorbent denir.

Katı örgüsü içinde bulunan iyonlar çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözeltideki maddeleri katı yüzeyine çeker ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözeltideki maddelerin katı yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşmektedir.

Günümüzde adsorpsiyon, fiziksel, kimyasal ve biyolojik uygulamalarda önem taşımaktadır (Srihari ve Das, 2008; Lin ve Juang, 2009; Hongxia ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2016; Zhang ve Qui, 2016). Ayrıca adsorpsiyon işlemi, atık sulardaki organik ve kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzey üzerine tutularak giderilmesi işleminde de sıklıkla kullanılmaktadır (Altmann ve ark., 2016; Frascari ve ark., 2016; Mailler ve ark., 2016).

Adsorplayan madde yüzeyi ile adsorplanan kimyasal arasındaki çekim kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen üç tür adsorpsiyon işlemi tanımlanmaktadır.

Fiziksel Adsorpsiyon: Katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorpsiyon olayıdır. Burada zayıf van der Waals kuvvetleri

etkindir ve işlem tersinirdir. Adsorpsiyon sonucu yoğunlaşma enerjisinden biraz fazla ısı açığa çıkmaktadır.

Kimyasal Adsorpsiyon: Adsorplanan madde ile katı yüzey arasındaki fonksiyonel grupların kimyasal etkileşimi ile oluşan adsorpsiyondur. Adsorpsiyon tersinmezdir ve tek tabakalıdır. Adsorpsiyon sırasında açığa çıkan ısı reaksiyon ısısından daha büyüktür.

İyonik Adsorpsiyon: Elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisi ile iyonlar yüzeydeki yüklü bölgelere tutunmaktadır. Burada adsorplayan ile adsorplananın iyonik güçleri önemlidir. İyonlar eş yüklü ise daha küçük olan tercihli olarak yüzeye tutunmaktadır. Çoğu adsorpsiyon olayında bu üçü birlikte veya art arda görülmektedir.

Adsorpsiyonu etkileyen bazı faktörler şunlardır:

pH: Hidronyum ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorbe olduklarından, diğer iyonların adsorpsiyonu çözelti pH'ından etkilenir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonizasyon derecesi de adsorpsiyonu etkilemektedir.

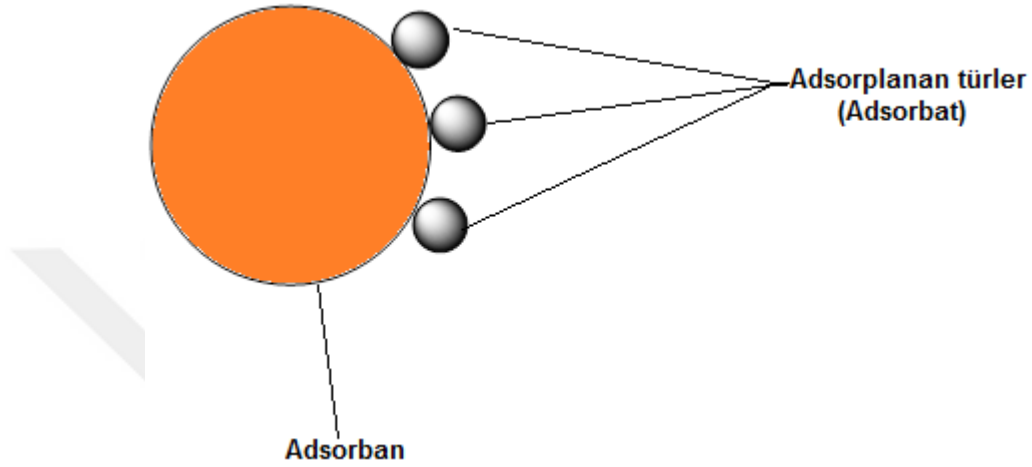
Sıcaklık: Adsorpsiyon işlemi genellikle ısı veren bir tepkime biçiminde gerçekleşmektedir. Bu nedenle azalan sıcaklık ile adsorpsiyon büyüklüğü artmaktadır. Açığa çıkan ısının genellikle fiziksel adsorpsiyonda yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları mertebesinde, kimyasal adsorpsiyonda ise kimyasal tepkime ısısı mertebesinde olduğu bilinmektedir.

Yüzey alanı: Adsorpsiyon bir yüzey işlemi olduğundan, adsorpsiyon büyüklüğü spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Adsorbanın partikül boyutunun küçük, yüzey alanının geniş ve gözenekli yapıda olması adsorpsiyonu arttırmaktadır.

Adsorbatın çözünürlüğü: Genellikle; bir maddenin adsorpsiyonu bulunduğu ortamdaki çözünürlüğü ile doğru orantılıdır. Adsorbatın çözünürlüğü ne kadar fazla ise adsorbanla çözelti arasındaki bağ o kadar güçlü ve adsorpsiyon da o kadar fazla olmaktadır. Ayrıca; adsorpsiyon olayında adsorbatın çözünürlüğü adsorpsiyon dengesini kontrol etmektedir.

Karıştırma hızı: Adsorpsiyon hızı ortamın karıştırma hızına bağlı olarak etkilenmektedir. Genellikle adsorpsiyon artan karıştırma hızıyla artış göstermektedir.

Çünkü karıştırma hızının artmasıyla adsorban ile adsorbat arasındaki etkileşim artmakta ve daha fazla adsorpsiyon söz konusu olmaktadır. Ancak belli bir karıştırma hızından sonra adsorpsiyonda azalmalar söz konusu olabilmektedir. Yani maksimum adsorpsiyon için limit bir karıştırma hızının belirlenmesi önem arz etmektedir.



Şekil 2.2. Adsorpsiyon mekanizması.

2.5. Protein Analizi

Proteinler biyolojik işlemlerde hayati rol oynamaktadırlar. Biyolojik sistemlerdeki neredeyse tüm katalizörler enzim olarak adlandırılan proteinlerdir. Dolayısıyla proteinler hücrelerdeki kimyasal dönüşüm örgüsünü belirlemektedirler. Ayrıca proteinler; taşıma, depolama, koordine hareketler, mekanik destek, bağışıklık, metabolizma olayları ve büyüme-farklılaşmanın kontrolü gibi pek çok diğer işlevlerin de yerine getirilmesinde rol oynamaktadırlar.

Proteinlerin en temel yapısal birimleri aminoasitlerdir. Bakterilerden insanlara kadar tüm türlerdeki tüm proteinler 20 aminoasidin değişik şekillerde dizilmesiyle meydana gelmektedir. Bu yapı taşlarının yan zincirleri boyut, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal reaktivite açısından değişkenlik göstermektedir. Aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

Alifatik yan zincirler: glisin, alanin, valin, lösin, izolösin ve prolin;

Hidroksil alifatik yan zincirler: serin ve treonin

Aromatik yan zincirler: fenilalanin, tirozin ve triptofan

Bazik yan zincirler: lizin, arjinin ve histidin;

Asidik yan zincirler: aspartik asit ve glutamik asit;

Amid yan zincirler: asparajin ve glutamin;

Sülfür yan zincirler: sistein ve metiyonin.

Aminoasitlerin yüzden fazlası bir araya gelerek polipeptit zincirlerini oluşturmak için peptit bağları oluşturmaktadırlar. Bir peptit bağı aminoasidin α -karboksil grubu ve diğerinin α -amino grubu arasında gerçekleşmektedir. Disülfid çapraz bağlar sistein kalıntıları vasıtasıyla oluşturulmaktadır. Bazı proteinler kovalent olarak modifiye olmuş ve sentezlerinden sonra ayrılmışlardır. Proteinler genetik olarak belirlenmiş özgün aminoasit dizilerine sahiptirler. Bir proteinin biyolojik fonksiyonunun en kritik belirleyicisi, bir molekülün atomlarının üç boyutlu düzenlenmesi anlamına gelen konformasyonlarıdır. Üç düzenli tekrar eden polipeptit konformasyonu olarak α -heliks, β -plaka ve kolojen heliks yapıları verilebilir.

α -heliks ve β -plaka yapıları genelde pek çok proteinde bulunmaktadır. Buradaki önemli nokta proteinin üç boyutlu yapısının aminoasitlerin dizilimi tarafından belirleniyor olmasıdır. Proteinler α -helikal veya β -tabaka yapılarına uyacak şekilde kısa polipeptit segmentleri tarafından bükülmektedirler. Hidrofobik kalıntıların sudan uzaklaşma konusundaki güçlü yönelimleri çözünebilen proteinlerin bükülmesine sebep olmaktadır. Proteinler, hidrofobik etkileşimlerin yanında pek çok hidrojen bağı ve van de Waals etkileşimlerinin desteğiyle kararlı hale gelmektedir.

Proteinler, son derece farklı molekülü tanıyabilen ve etkileşim kurabilen makromoleküllerin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. 20 tane aminoasidin yan zincirleri proteinleri çok farklı şekillerde katlanmasına veya tamamlayıcı yüzeyler oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Enzimlerin katalitik aktivitesi, substratları belirli oryantasyonlarda bağlama kapasitesinden ve kimyasal bağları oluşturma ve kırma sırasında geçiş ara ürünlerini kararlı hale getirmesinden kaynaklanmaktadır. Konformasyonel değişiklikler protein moleküllerinin uzak bölgeleri arasında

aktarılmakta ve bu da enerji ve bilgi aktarımı konusunda protein kapasitelerinin kalbini oluşturmaktadır.

2.6. Elektrostatik Etkileşimi Etkileyen Faktörler

2.6.1. Ana materyalin tipi

Elektrostatik etkileşimlerde kullanılan materyal tiplerinde etkileşime giren türlerden biri yoğunluklu olarak pozitif (+) yüklü iken diğeri negatif (-) yüklüdür. Elektrostatik etkileşimlerin oluşması için polar yüklü yapıların olması şarttır. Bu yük dağılımı türlerin tamamen iyonik olmasından veya molekül içi anlık değişik yük dengesinden (anlık dipol) kaynaklanabilmektedir. Türler kovalent yapılı olduğunda ise kısmi pozitif veya kısmi negatif yük dağılımını dipol belirlemektedir. Dipolun oluşturduğu kısmi pozitif veya kısmi negatif yükler arasında oluşan etkileşimler dipol-dipol etkileşimler olarak isimlendirilebilmektedir. Bu etkileşime olanak sağlayan türler polar türlerdir. Elektrostatik etkileşimin avantajları yanında çok fazla seçici olmaması gibi bazı dezavantajları da vardır. Ana matris yine de hedef molekül ile etkileşime girmektedir. Meydana gelen etkileşim doğrusal değildir yani atom tercihi yoktur. Elektrostatik etkileşimin ortalama kuvveti 15 kJ/mol'dür. İyonlar arasındaki uzaklık arttıkça bağın kuvveti azalmaktadır.

Diğer bağlarla (van der Waals, hidrofobik, hidrojen vb.) karşılaştırıldığında iyonik etkileşim biyolojik etkileşimler için neredeyse en uygundur. Bağlanma ve daha sonrasında bırakmanın gerçekleşmesi için meydana gelen etkileşimin tutacak kadar kuvvetli, bırakacak kadar da zayıf olması tercih edilmektedir. Özellikle adsorpsiyon çalışmalarında tercih edilen bir etkileşimdir.

Hidrofobik etkileşimin gerçekleşmesi için hidrofobik gruplar, hidrojen bağının gerçekleşmesi için ise O, N, S gibi elektronegatif atomların olduğu gruplar gereklidir. Eğer çalışılacak biyomolekülde bu yapılar yoksa hidrofobik etkileşim ve hidrojen bağı kuran grupları aramaktansa elektrostatik etkileşim oluşturabilecek yapılara ulaşmak daha kolaydır.

Çizelge 2.2. Bağ türlerinin ortalama enerjileri.

Bağ Türü	Enerji (kJ/mol)
Kovalent, ör. C-C	350
Elektrostatik	15
Hidrojen	1-161.5
van der Waal's	10

2.6.2. pH etkisi

Elektrostatik etkileşimlerin olduğu ortamlarda pH hayati önem taşımaktadır. Asidik ve bazik pH'larda ortamda çok fazla Hidronyum (H^+) ve Hidroksit (OH^-) iyonu olacağından hedef molekül veya ligant üzerindeki elektrostatik etkileşime açık bölgeler bu iyonlarla maskelenebilecektir. Bundan dolayı yapılan deneyler de göstermiştir ki elektrostatik etkileşim nötral (pH:7) pH' da daha etkili ve daha çok gerçekleşmektedir.

2.6.3. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık elektrostatik etkileşimi dolaylı olarak biyomoleküllerin yapılarına olan etkisinden dolayı pozitif ya da negatif yönde etkileyebilmektedir. Bunun sebebi ise, sıcaklık değiştikçe biyomoleküllerin konformasyonları değişeceğinden elektrostatik etkileşime girecek olan bölgelerin molekülün iç tarafına bükülmesi veya dış tarafına çıkmasıyla açıklanabilir. Elektrostatik etkileşimin kendisine ise çok az da olsa negatif etkisi olacağı düşünülmektedir. Sıcaklık arttıkça genel anlamda moleküllerin hareketi hızlanacağından etkileşimin gerçekleşmesi için gerekli olan head-to-head (kafa kafaya) çarpışma ya da yaklaşma sayısı azalacaktır. Buna ek olarak etkileşim kurmuş iyonlar sıcaklık artışının getirdiği enerjiyle birbirlerinden uzaklaşabilirler.

2.7. Kriyojelleşme

Günümüzde polimerik jeller; kromatografik malzeme, elektroforez ve immünodifüzyon moleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı olarak ve katı kültür ortamı için jel olarak kullanım da dahil olmak üzere biyoteknolojide birçok farklı alanda uygulamaya sahiptir. Polimerik jellerin kullanımı ve hem de karşılaşılan biyolojik nesnelere geniş aralığı ile ilişkili sorunlar, jeller için, çoğu zaman çelişkili bir şekilde yeni jellerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu şartlar biyoteknolojide önemli potansiyele sahip yeni polimerik jellerin geliştirilmesi ve ticarileştirilmesini teşvik etmektedir. Polimerik jellerin yeni tiplerinden biri olan ve biyoteknolojide ciddi potansiyele sahip kriyojeller (Yunanca buz anlamına gelen kryos kelimesinden) (Lozinsky, 2002) ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce rapor edilmiştir ve bu polimer jeller oldukça sıra dışı olan özellikleri ile oldukça dikkat çekmiştir. Bu malzemelerin biyomedikal ve biyoteknolojik potansiyelleri artık kabul edilmiştir (Nambu, 1990; Kaetsu, 1993; Suzuki ve Hirasu, 1993; Hassan ve Peppas, 1998; Lozinsky ve Plieva, 1998; Lozinsky, 1998,2002; Lozinsky ve ark., 2001).

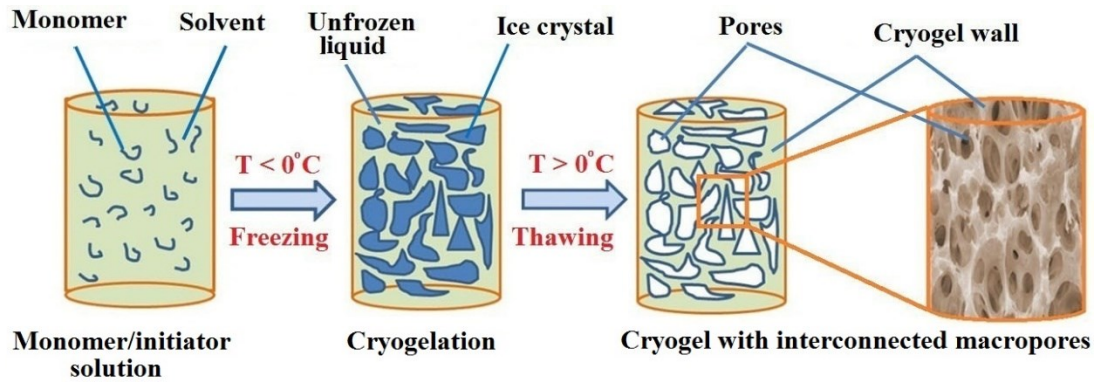
Konvansiyonel dolgulu yatak kolonlar yavaş difüzyon kütle transferi ve boncuklar arasında büyük boşluk hacmi gibi bazı içsel sınırlamalara sahiptirler (McCoy ve ark., 1996). Bu sorunları çözmek için gözenekli olmayan polimer boncuklar gibi bazı yeni sabit fazlar (Denizli ve ark., 2000) ve perfüzyon kromatografi ambalajlar tasarlanmıştır ancak söz konusu sorunların üstesinden gilememiştir (Özkara ve ark., 2003). Son zamanlarda, kriyojel malzemeler biyomoleküllerin ayrılması için geleneksel kolonlara kıyasla kolay hazırlanabilme, mükemmel akış özellikleri ve yüksek performansları nedeniyle yeni bir nesil olarak kabul edilmektedir (Lozinsky, 2002; Arvidsson ve ark., 2002,2003; Lozinsky ve ark., 2003; Babac ve ark., 2006; Dainiak, 2006; Hanora ve ark., 2006).

Gözenekli kriyojeller birçok avantaj ile protein ayırma için çok iyi bir alternatiftir. Kriyojellerin önemli potansiyel avantajları; geniş gözenekler, kısa difüzyon yolu, düşük basınç düşüşü ve adsorpsiyon-elüsyon için çok kısa kalma süresi gibi parametrelerdir.

Kriyojeller pratik olarak herhangi bir boyutta eriyiklerin engelsiz difüzyonuna ve hem de nano kütle ve hatta mikrotaneciklerin aktarımına imkan veren birbirine eklemelenen makrogözeneklere (ya da süper makrogözenekler) sahiptirler. Kriyojellerin benzersiz yapıları, ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığı ile kombinasyon halinde, biyolojik nanopartiküller (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta bütün hücrelerin kromatografisi için cazip bir matris olmasını sağlamaktadır. Polimerik kriyojeller biyomoleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için etkili taşıyıcılardır. Kriyojeller, düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı öncülerin kriyojenik (dondurma, donmuş halde belirli bir zaman için depolama ve defrost etme) muamele sonucunda jelleşme yeteneğine sahip koloitlerdeki gibi jelleşmesi ile oluşur.

Üretim buz kristallerinin gözenek oluşturucu madde (porojen) olarak görev yaptığı ve görünüm olarak dondurulmuş tepkime sisteminin dondurulmamış mikrofazında jelleşmenin ilerlediği kısmen donmuş tepkime sisteminde gerçekleştirilir. Şekil 2.3 kriyojel oluşumunu göstermektedir.

Mikrofazdaki jelleşme tamamlandığında, tepkime sisteminin erimesi ile donmamış mikrofazda oluşan yoğun bir hidrojelin duvarla çevrildiği büyük gözeneklerden (daha önce buz kristallerinin kapladığı alan) oluşan bir sistem elde edilmektedir. Kriyojeller, Şekil 2.4’de farklı şekillerde görülebilmektedir.



Şekil 2.3. Kriyojel oluşumu (Ingavle ve ark., 2016).



Şekil 2.4. Farklı kriyojel formları.

2.8. Aspartik Asit

Aktif formları magnezyum, kalsiyum veya potasyum aspartat, L-aspartat, L-aspartik asit, D-aspartik asit, D-aspartat olan ve L-aspartat olarak da bilinen aspartik asidin, iyi bir metabolizma hızlandırıcı olduğu düşünülmektedir. Bazen de kronik yorgunluk (Hicks, 1964; Wesson ve ark., 1988) ve depresyon (Iadarola ve ark, 2015) tedavisinde kullanılmaktadır. Aspartik asit, asparajin, arjinin, lizin, metiyonin, treonin ve izolösin gibi diğer amino asitler ve biyokimyasalların sentezlendiği sitrik asit veya Krebs döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.5).

Aspartik asit, minerallerin daha kolay asimile, sindirme ve kullanılması için kalsiyum, potasyum ve magnezyum aspartat içerisinde olduğu gibi şelatlama veya tutma işlemlerinde gereklidir (Hobbs ve Haas, 2016).

Aspartik asit, ününü kronik yorgunluk tedavisinde hücrel enerji üretici olarak oynadığı önemli rolden almaktadır. Aspartik asit, koenzim nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) moleküllerini, hücrenin ana gövdesinden tüm hücrel aktiviteler için gerekli bir yakıt olan adenzin trifosfat (ATP) üretiminde kullanıldığı mitokondriye taşımaktadır.

Kısacası, bir hücrede ne kadar çok NADH varsa, ürettiği kimyasal yakıt ve dolayısıyla da gün boyunca sahip olduğunuz enerji de o kadar fazladır (Bazı çalışmalar göstermektedir ki, aspartik asit aslında sporcuların hem tahammül gücünü hem de dayanıklılık seviyelerini artırmaktadır.) Aspartat bir ergojenik destekleyici olarak kabul edilmektedir (Trudeau, 2008). Bir çift-kör çapraz çalışmada, 10 g potasyum ve magnezyum aspartik asit tuzu, 5 g aspartat veya plasebo, kan amonyak seviyesini önemli ölçüde düşürmüş ve iyileştirilmiş ergojenik yararlar sağlamıştır. (Tuttle ve ark., 1995). Başka bir çift-kör, plasebo kontrollü, çapraz çalışmada, 6 g aspartik asit tuzu çalışma kapasitesini ve metabolik süreci geliştirmiştir (Maughan ve Sadler, 1983; Wesson ve ark., 1988). Egzersiz performansı için aspartik asit kullanılarak negatif çalışmalar da yapılmıştır (Maughan ve Sadler, 1983; Triplett ve ark., 1990).

Ayrıca, bu aminoasit sağlıklı RNA ve DNA üretimi için gerekli minerallerin hücrelere ulaşmasına yardımcı olmakta ve immünglobulin ve antibadilerin (bağışıklık sistemi proteinleri) üretiminde artış olmasını sağlayarak bağışıklık sistemini güçlendirmektedir.

Aspartik asit, normal zihinsel işleyiş için gerekli olan nörotransmitterlerin ve kimyasalların üretimini artırdığı düşünülen, beyindeki NADH konsantrasyonlarını artırarak zihnimizi uyanık tutmaktadır. Doktorlar epilepsi olan kişilerde daha yüksek ve depresyon olanlarda düşük miktarlarda olduğunu bulmuşlardır (Hobbs ve Haas, 2016). Ayrıca, beyin ve sinir sisteminin yanı sıra karaciğer için de çok zararlı olan hücrelerdeki aşırı toksini, özellikle de amonyağı uzaklaştırmaktadır. İyi dengelenmiş bir diyet uygulandığı takdirde esansiyel olmayan bir aminoasidin eksiklikleri meydana gelmeyecektir. Aspartik asit düzeyinin düşük olması, aşırı diyet proteininin önemli atık ürünü olan ürenin düzenli olarak sentez ve salgılanması için yetersizliğe neden olabilmektedir. Üre salgılanmasındaki yetersizlik, yorgunluk, kafa karışıklığı, baş ağrısı, depresyon, sinirlilik, ya da, aşırı durumlarda, psikoza yol açabilen nitrojen içeren toksik metabolitlerin birikimine sebebiyet verebilmektedir.

Aspartik asit, aynı zamanda hormonlar ve nörokimyasalların sentezi ve salınımında bir düzenleyici olarak nöroendokrin sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (D'Aniello, 2007). Hipofiz bezinde, aşağıdaki hormonların stimülasyonu ve salgılanmasında aspartik asit yardımcı olmaktadır:

Prolaktin - ana işlevi meme bezleri ve süt üretimini stimule etmektir.

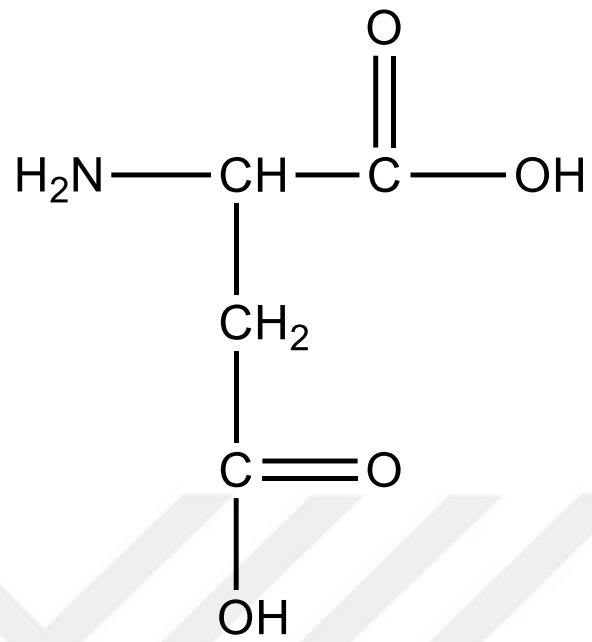
Luteinleştirici hormon (LH) - LH üreme sisteminde yer almaktadır. Erkeklerde testosteron sentezinde; buna karşın kadınlarda yumurtlama ve adet döngüsünde rol oynamaktadır.

Büyüme hormonu

D-aspartik asit laboratuar hayvanları ve insanlarda testislerdeki testosteron üretimini artırmaktadır (Topo ve ark., 2009).

Aspartik asit vücudun kendi kaynağını üretiminin mümkün olduğu anlamına gelen, yani esansiyel olmayan bir aminoasittir. Aynı zamanda süt, sığır eti, kümes hayvanları, şeker kamışı ve pekmezde (diğer bir aminoasit olan yapay tatlandırıcı aspartam aspartik asit ve fenilalaninden yapılır) bulunmaktadır. Proteince fakir beslenme programına sahip veya yeme bozuklukları ve yetersiz beslenmeye sahip kişiler aspartik asit eksikliğinin yanı sıra diğer aminoasitler açısından da yetersiz miktarda kalmakta ve aşırı yorgunluk ya da depresyon ile sonuçlanan problemler yaşamaktadırlar. Doktorlar, genellikle daha hassas sinir sistemlerine sahip çocuklar başta olmak üzere, düzenli aspartik asit takviyesini tavsiye etmemektedirler (Topo ve ark., 2009).

Serbest formdaki aspartik asit, aspartat ve glutamadin kan plazmasındaki seviyesini yükseltir. Bu fazlalık, nörotransmitterlerin yüksek düzeye gelmesine yol açabilir ve hassas nöronlara zarar verebilir.



Şekil 2.5. Aspartik asit.

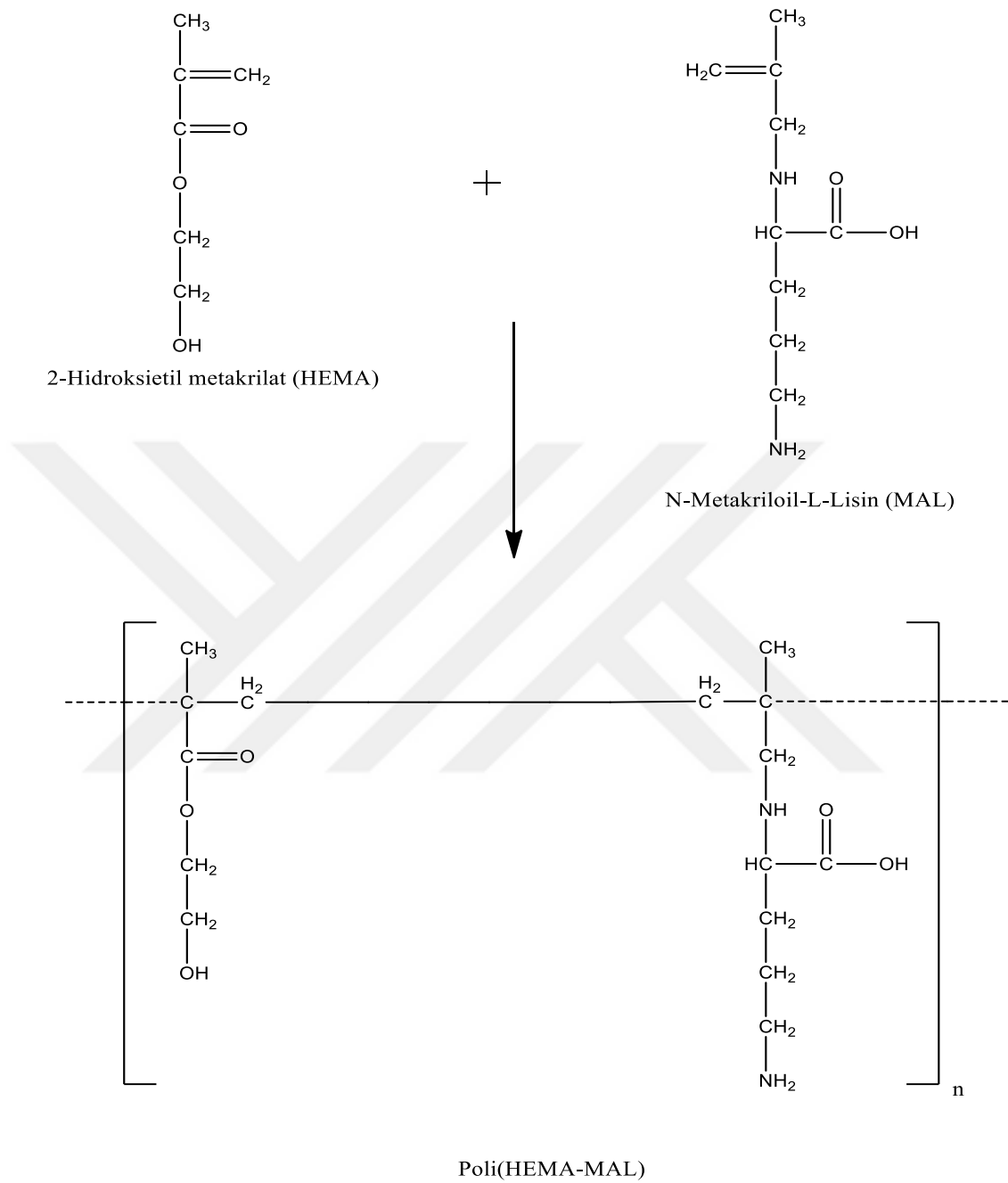
3. DENEYSEL PROSEDÜR

3.1. Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), ninhidrin, amonyum persülfat (APS), sodyum dodesil sülfat (SDS), N,N,N',N'-Tetrametiltilendiamin (TEMED), L-Aspartik asit Sigma (St. Louis, ABD) firmasından tedarik edilmiştir. N-metakriloil-L-lizin (MAL) literatüre uygun bir şekilde mâkul ölçüde değiştirilerek sentezlenmiştir (Erol ve ark.,) Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve tüm çalışmalarda ultra saf su (18 MΩ.cm) kullanılmıştır.

3.2. Poli(HEMA-MAL) Kriyojellerin Hazırlanması

200 mg MAL monomeri (foksiyonel monomer) tartıldı. Üzerine 5 mL distile su ve 5 mL HEMA (yapısal monomer) ilâve edildi. Dağıtma fazı ise 1 g SDS, 1,2 mL EGDMA ve 18,8 mL distile suyun karıştırılması ile hazırlandı. Dağıtma fazı monomer fazının üzerine ilâve edildi ve homojen bir karışım elde etmek için 5 dak. manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Homojen hale gelen karışım buz banyosunda 15 dakika bekletildi ve karışıma 30 mg APS ve 150 µL TEMED ilâve edildi. Jel iki cam plaka arasına döküldü ve 24 saat boyunca -20°C'de bekletildi (Şekil 3.1). Sentezlenen kriyojeller, membran (disk) şeklinde kesildi ve distile su ile defalarca (köpürme bitene kadar) yıkandı (Erol ve ark., 2016).



Şekil 3.1. Poli(HEMA-MAL) kriyojelin yapısı.

3.3. Poli(HEMA-MAL) Karakterizasyonu

3.3.1. Şişme testi

Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin su tutma kapasitesi distile su kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için öncelikle kuru kriyojel numuneleri, dikkatlice tartılmıştır. Daha sonra izotermal su banyosunun içerisindeki distile suyun içerisine atılmış ve 25°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kriyojel örnekleri, bir süzgeç kâğıdının üzerine alınıp yüzeye tutunan suyun uzaklaştırılması için hızlıca silinmiş, tekrar tartılmış ve su tutma kapasitesi hesaplanmıştır. Su tutma kapasitesini belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

Bu eşitlikte W_0 ve W_s sırayla kuru membranın ve su tutmuş membranın ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

3.3.2. Yüzey morfolojisi

Sentezlenen poli(HEMA-MAL) kriyojellerin morfolojik yapılarını incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM; Carl Zeiss AG - EVO® 50 Series, Almanya) kullanılmıştır. Etüv kullanılarak yaklaşık 72 saat boyunca kurutulmuş olan kriyojel numuneleri vakumlandıktan sonra SEM plakalarına yerleştirilmiş ve yüzey görüntüleri alınmıştır.

3.3.3. Elemental analiz

Tamamen kurutulmuş numune elemental analiz için özel tartım kaplarında yaklaşık 1-2 mg olarak tartılmış ve daha sonra cihazın numune kısmına yerleştirilmiştir. Analiz başlatılmış ve %N yanma kompartımanının sıcaklığı 1120°C ve indirgenme kompartımanının sıcaklığı 850°C olarak analiz gerçekleştirilmiştir.

Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin içerisine katılmış olan MAL monomerinin miktarının belirlenmesinde elemental analiz cihazı (CHNS-932, Leco, ABD) kullanılmıştır. Hesaplamalar azot miktarına göre yapılmıştır.

3.3.4. FTIR çalışmaları

Elde edilen poli(HEMA-MAL) kriyojellerin üzerindeki fonksiyonel grupları belirlemek için Fourier transform infrared spektroskopisi (Thermo Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer, ABD) cihazından yararlanılmıştır. Kriyojeller, kuru toz KBr (0,1 g, IR Grade, Merck, Almanya), ile homojen olarak karıştırılmış pelet haline getirilerek FTIR analizi yapılmıştır.

3.3.5. Yüzey alanı analizi

Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin spesifik yüzey alanı, Brunauer-Emmett-Teller (BET; Quantachrome Autosorb® iQ-Chemi, ABD) cihazı ile belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemi ile kurutulan kriyojel numuneleri gözeneklerdeki oksijen ve nemi gidermek için, 35°C'de 100 mbar vakum altında 6 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra kriyojel örneklerine oda sıcaklığında azot gazı ile muamele edilmiştir.

3.3.6. Termal analiz

Kriyojellerinin termal bozunma basamaklarını saptamak amacıyla termogravimetrik analiz cihazı (Shimadzu DTG-60H, Japonya) da kullanılmıştır. Termogravimetrik analiz işlemi, 100 cm³/dakika hava akış hızı ve 10°C/dak. ısıtma hızıyla 0°C'den 900°C'ye ısıtılarak gerçekleştirilmiş ve kütle kayıpları incelenmiştir.

3.4. Aspartik Asit Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

3.4.1. Aspartik asit sulu çözeltilerden adsorpsiyonu

Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin aspartik asit adsorplama performansları sulu çözelti içerisinde kesikli sistemde yapılmıştır. Kriyojeller 1 mL aspartik asit çözeltisi ile 15 dakika denge zamanında 10 rpm'de etkileşime girmişlerdir. Optimum aspartik asit başlangıç derişimi, sıcaklık, pH, tuz derişimi ve süre parametreleri belirlenmiştir. Aspartik asidin kriyojellere adsorpsiyonu pH 4-10 arasında incelenmiştir. Başlangıç derişimi 1-1000 ppm arasında değişen aspartik asit çözeltileri kriyojellerin adsorpsiyon performansının hangi derişimde olduğunu belirlemede kullanılmıştır. Aspartik asidin adsorpsiyonu 4 - 45 °C arasında değişen sıcaklıklarda incelenmiş ve adsorpsiyonun en yüksek olduğu sıcaklık denge sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Yine aynı şekilde optimum sürenin belirlenmesi için adsorpsiyon işlemi 5-90 dakika arasında değişen sürelerde incelenmiş ve adsorpsiyonun maksimum olduğu süre optimum süre olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon işlemi iyonik şiddetin yüksek olduğu NaCl ortamında yapılmış ve optimum koşullar altında değişen iyonik şiddet değerlerinde adsorpsiyon incelenmiş ve iyonik şiddetin adsorpsiyona etkisi belirlenmiştir. Adsorpsiyon öncesi ve sonrasındaki aspartik asit miktarı Morötesi-Görünür Bölge (UV-VIS) spektrofotometresi ile (TU-1810 UV-VIS Spectrophotometer, Pgeneral, Çin) tayin edilmiştir. Numuneler ninhidrinin etanol (%1, w/w) çözeltisi ile etkileşime sokulmuş ve meydana gelen kompleksin analizi 570 nm dalga boyunda yapılmıştır (Greiner ve ark., 2014). Aspartik asit adsorpsiyon kapasitesi aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$q = \frac{(C_0 - C)V}{m} \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

burada, q birim kriyojel kütlesine adsorplanan aspartik asit miktarı (mg/g); C₀ ve C sırasıyla, aspartik asit başlangıç ve muamele sonrası derişimleri (mg/mL); V çözelti hacmi ve m kullanılan kriyojelin kütlesidir (g). Sonuçların güvenilirliği ve istatistiksel doğruluk açısından deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Poli(HEMA-MAL) kriyojellere adsorplanmış olan aspartik asidin desorpsiyonu ve elde edilmesi de yine kesikli sistemde çalışılmıştır. Aspartik asit adsorplanmış olan

kriyojeller 10 mL 1 M NaCl çözeltisi içerisinde 15 rpm'de 30 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirlik kapasitesi için aynı kriyojel ile 5 döngü gerçekleştirilmiştir. Aspartik asit desorpsiyon oranı aşağıdaki formüle göre bulunmuştur.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorplanan aspartik asit miktarı}}{\text{Toplam adsorplanan aspartik asit miktarı}} \times 100$$

(Eşitlik 3.3)

3.4.3. Aspartik asidin doğal ortamdan ayrımı

İlk aşamada, yumurta akı taze yumurtadan ayrılmış ve fosfat tamponu (1:10) (0,1 M; pH:7,0) ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş yumurta akı, buz banyosunda homojenize edilmiş ve 4°C'de 14.500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında alınan numunelerin üzerindeki süpernatandan, (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile (3.5 M) albumin gibi daha büyük molekül kütesine sahip proteinler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha önceden belirlenen optimum koşullarda (pH:7,0; 30 dak. etkileşim süresi) adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kriyojeller üzerine adsorplanan aspartik asit 1,0 M NaCl çözeltisi ile desorplanmıştır.

4. DENEYSEL UYGULAMA

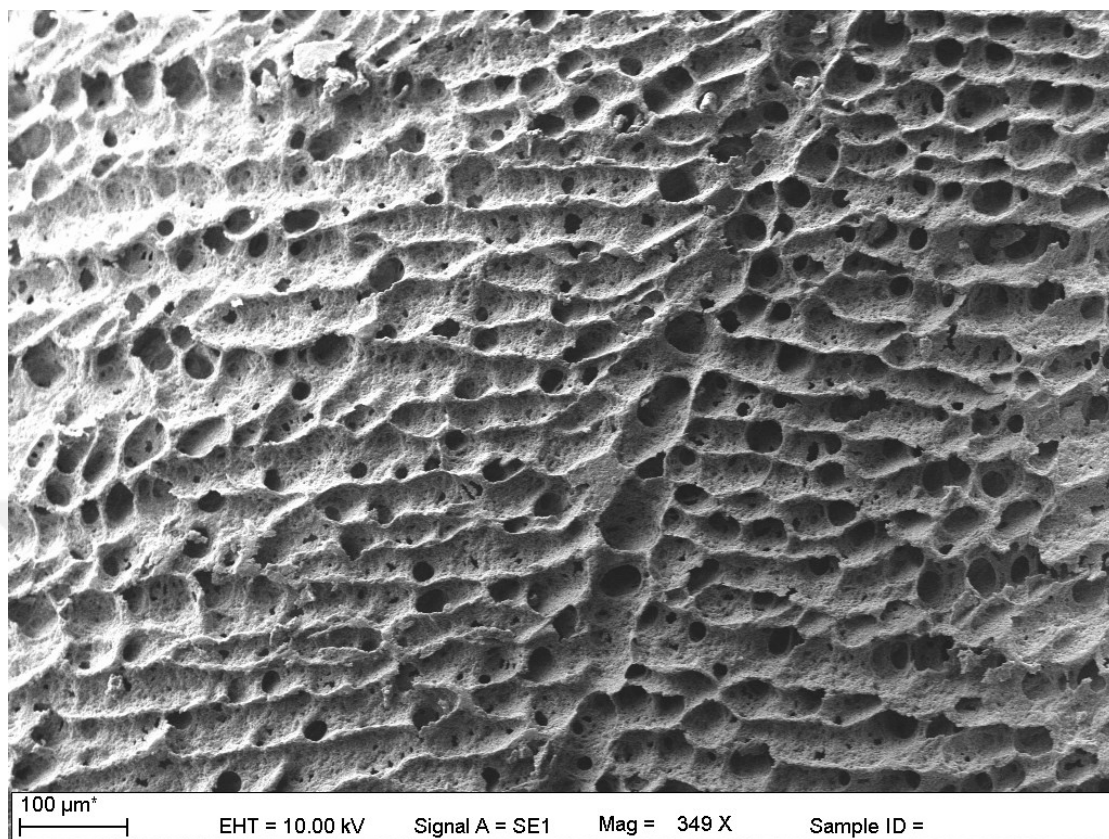
4.1. Poli (HEMA-MAL) Kriyojellerin Karakterizasyonu

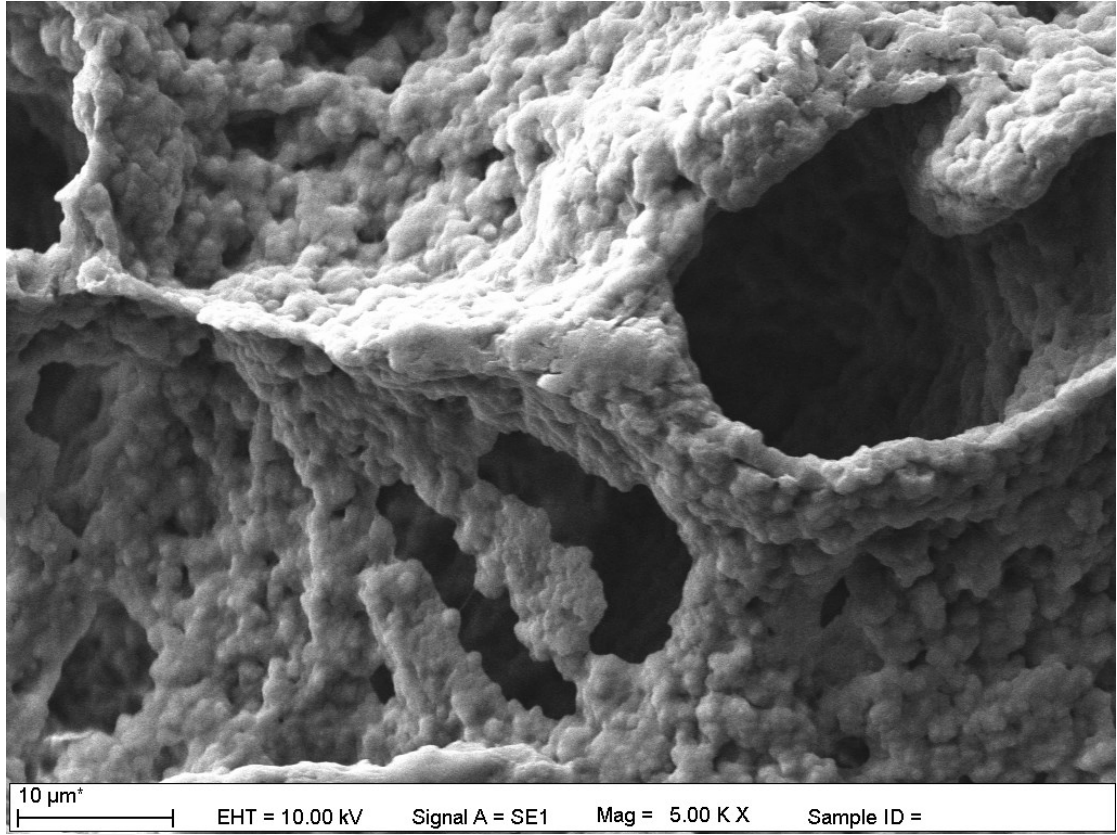
4.1.1. Şişme testi

Poli(HEMA-MAL) kriyojeller çapraz bağlıdır bundan dolayı sulu ortamlarda çözünmezler fakat çapraz bağ örgüsüne ve matrisin hidrofilisite özelliğine bağlı olarak su tutarak şişerler. Bu çalışmada kullanılan poli(HEMA-MAL) kriyojelin dengedeki şişme kapasitesi yaklaşık %314 olarak bulunmuştur. Yani 1 g kuru kriyojel 3,14 g su tutma kapasitesine sahiptir. Su çapraz bağlarla bağlanmış yapının içine nüfuz ederek içeride kalmaktadır.

4.1.2. Yüzey morfolojisi

Poli(HEMA-MAL) kriyojellere ait yüzey yapısı ve kaviteler Şekil 4.1'de açık bir şekilde görülmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere kriyojeller makro gözeneklere ve pürüzlü bir yüzeye sahiptir. Polimerin özellikleri incelendiğinde çapraz bağlayıcı sayesinde elde edilen büyük gözenekler dikkat çekmektedir.





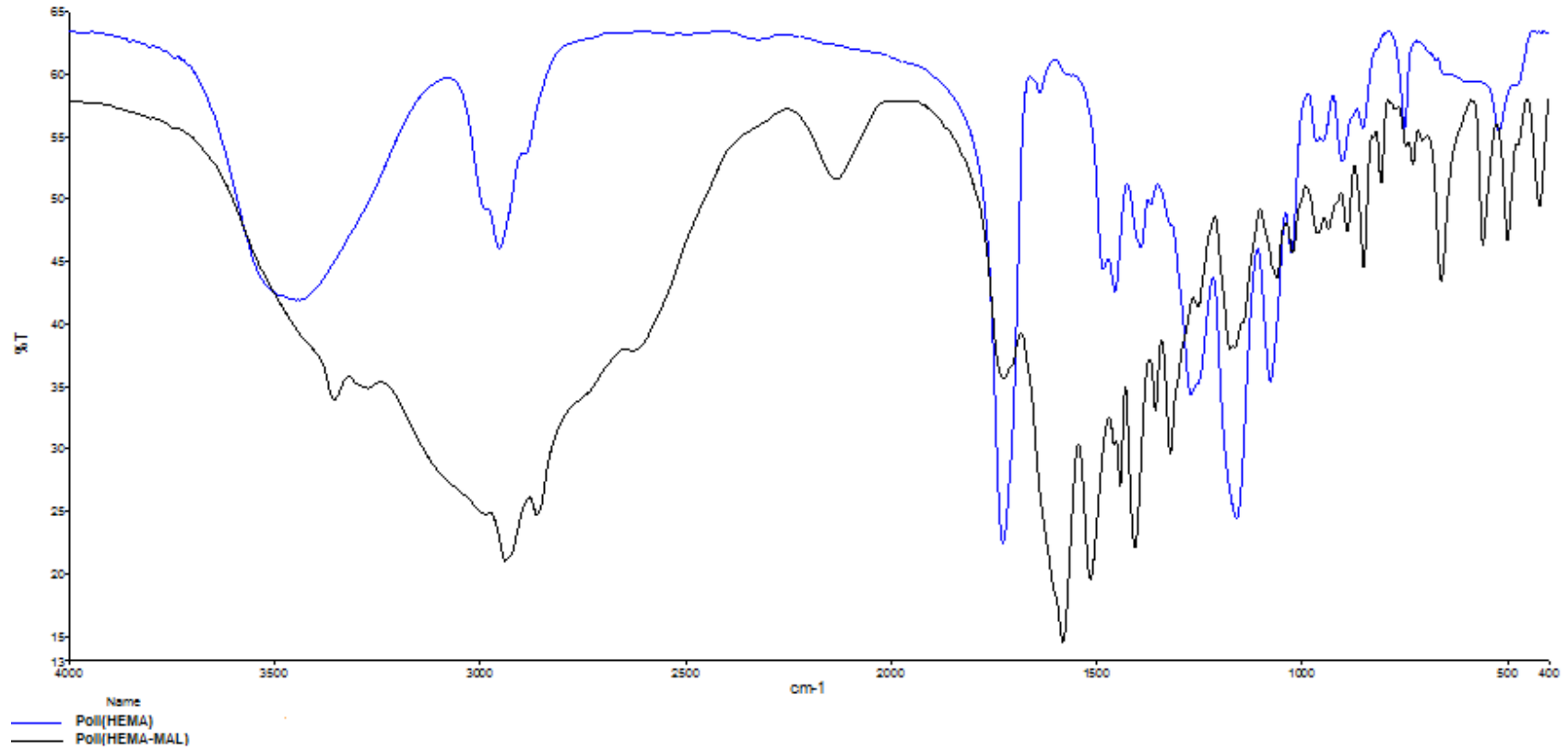
Şekil 4.1.Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin SEM görüntüsü.

4.1.3. Elemental analiz

Bu çalışma kapsamında hazırlanan poli(HEMA-MAL) kriyojellerin yapısına giren MAL miktarı, HEMA'nın yapısında azot olmadığından, azot stokiyometrisi kullanılarak 65,81 $\mu\text{mol/g}$ polymer olarak hesaplanmıştır.

4.1.4. FTIR çalışmaları

Şekil 4.2'de ise poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAL) kriyojellere ait FTIR spektrumları verilmektedir. Bu spektrumlar incelendiğinde; her iki spektrumda da alkanlardaki CH gerilmesi (2900 ve 2900 cm^{-1} civarı) ve kaboksilli asitlerdeki C=O gerilmesi (1650 - 1700 cm^{-1} civarı) pikleri dikkat çekmektedir. Poli(HEMA-MAL) kriyojelinin spektrumunda yer alan primer amin piki (1500 - 1600 cm^{-1} civarı) MAL fonksiyonel monomerinin poli(HEMA)'nın yapısına başarılı bir şekilde katıldığına göstergesidir.



Şekil 4.2. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAL) kriyojellerinin FTIR spektrumları.

4.1.5. Yüzey alanı analizi

Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin yüzey alanı 8,962 m²/g olarak bulunmuştur. Bu yüzey mikro ya da nanopartiküller ile karşılaştırıldığında düşük olmasına rağmen yapı içerisindeki kaviteler adsorpsiyonun etkili olması konusunda ciddi avantajlar sağlamıştır.

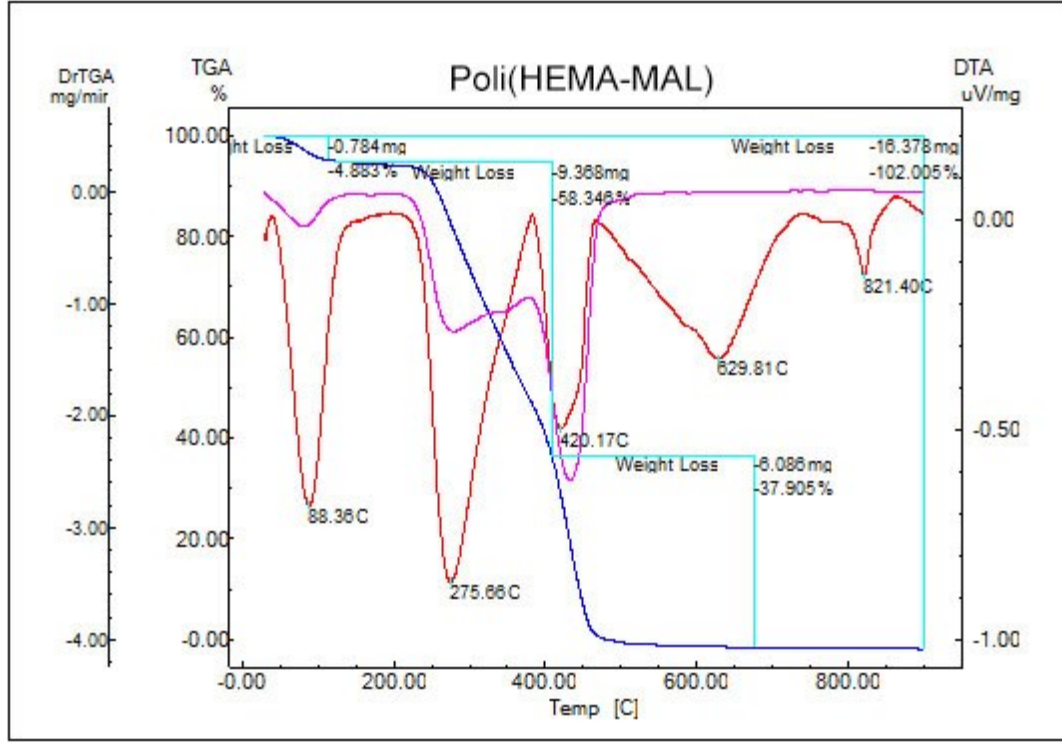
4.1.6. Termal analiz çalışmaları

0-900°C aralığında inert azot atmosferi ortamında yapılan termal bozunma analizi elde edilen TG, DTA ve DrTG eğrileri Şekil 4.3'de verilmiştir. Bu grafiklerde termogravimetrik analiz (TG) eğrileri ısıtma işlemi sonucu meydana gelen kütle kayıplarını, drTGA eğrileri kütle kayıplarının meydana geldiği sıcaklık bölgelerini ve diferansiyel termal analiz (DTA) eğrileri ise tepkimelerin ısı alan (endotermik) ve ısı veren (ekzotermik) özelliklerinin incelenmesi konusunda veriler sağlamaktadır. TG grafiği incelendiğinde örneğin yapısında bulunduğu tahmin edilen ve kurutma esnasında tam olarak yapıdan uzaklaştırılamayan nemden kaynaklı %4,88 ağırlık kaybının bulunduğu ve bu nemin 44-150°C aralığında, 88,36 maksimum DTA sıcaklığında ve endotermik bozunma ile ortamdan uzaklaştığı söylenebilir.

Dehidrate duruma gelen örnek devam eden termal bozunma neticesinde 224-460°C aralığındaki ağırlık kaybı polimer yapısının temelini oluşturan bileşenlerden olan N-Metakriloil-L-Lizin (MAL) moleküllerinin parçalanmasına ait edilebilir. Teorik ve deneysel olarak elde edilen kütle kayıpları belirtilen molekülün bozunmasını desteklemektedir. (teorik:%59,17; deneysel:%58,35). Belirtilen bozunma basamağı da endotermik olup maksimum DTA piki 275,66°C'de görünmektedir.

Polimerik yapının son bozunma basamağı olarak nitelendirilebilecek sıcaklık aralığı 408-677°C bölgesi olup 420 ve 629°C'lerde iki endotermik DTA piki vermektedir. Bu sıcaklık bölgesinde polimerik yapının ana temelini oluşturan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) molekülünün yanarak parçalandığı iddia edilebilir. İlgili bozunmaya ait hesaplanan sonuç olan %38,46 ile deneysel elde edilen %37,91 sonuçlarının da uyum içerisinde olması iddia edilen bozunma sonuçlarını desteklemektedir. Tamamen

organik türevlerden oluşan polimerik yapının yanarak bozunması sonucu reaksiyon kabında hiçbir artıkalın ürün kalmaması da sonuçları desteklemektedir.

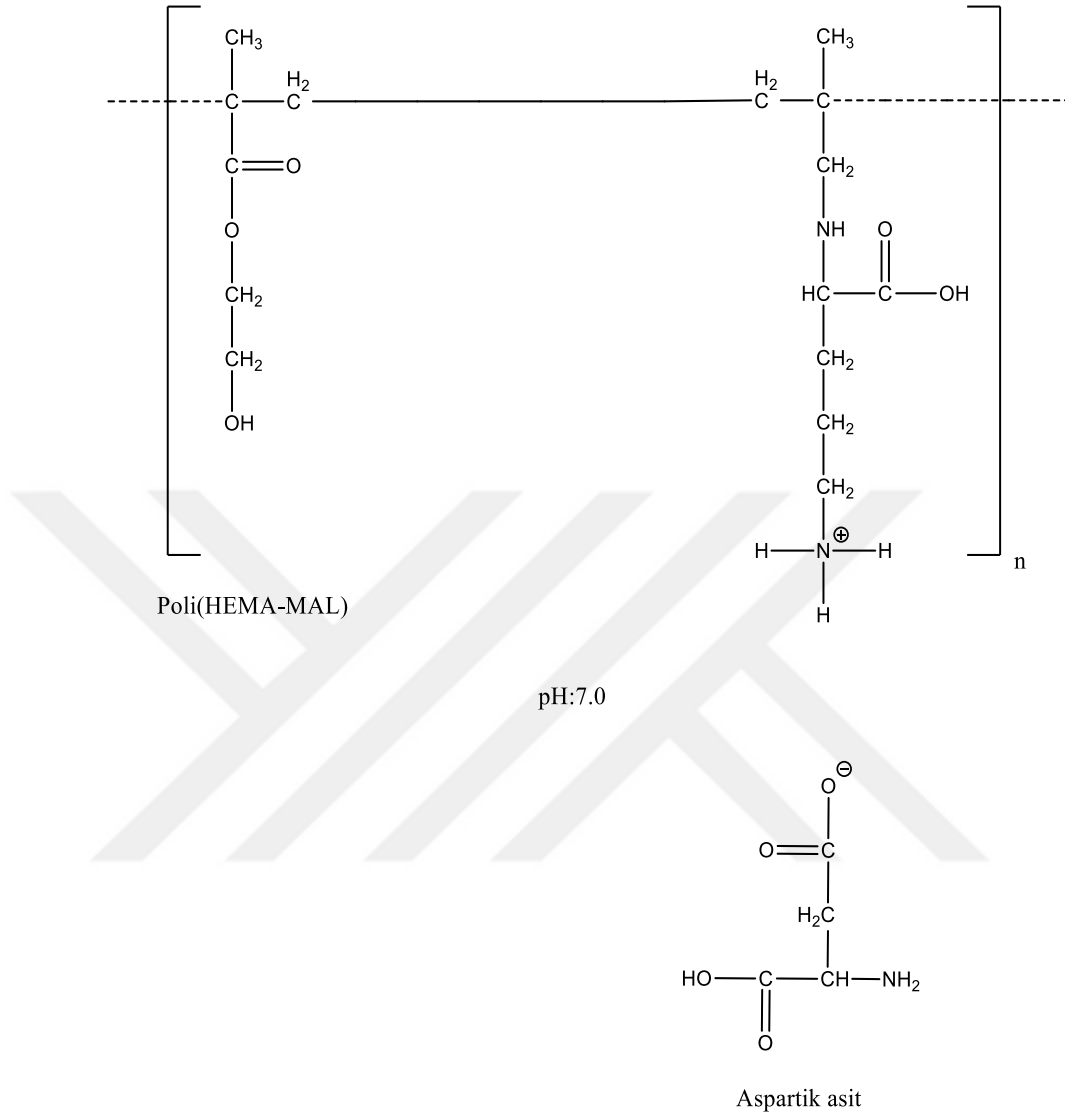


Şekil 4.3. Poli(HEMA-MAL) kriyojelinin termal analiz grafiği.

4.2. Aspartik Asit Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

4.2.1. Aspartik asidin sulu çözeltilerden adsorpsiyonu

Poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonu Şekil 4.4’de sembolize edilmiştir. Optimum adsorpsiyon koşulları değişen pH, etkileşim süresi, aspartik asit başlangıç derişimi, sıcaklık, tuz derişimi parametrelerinde belirlenmiştir.

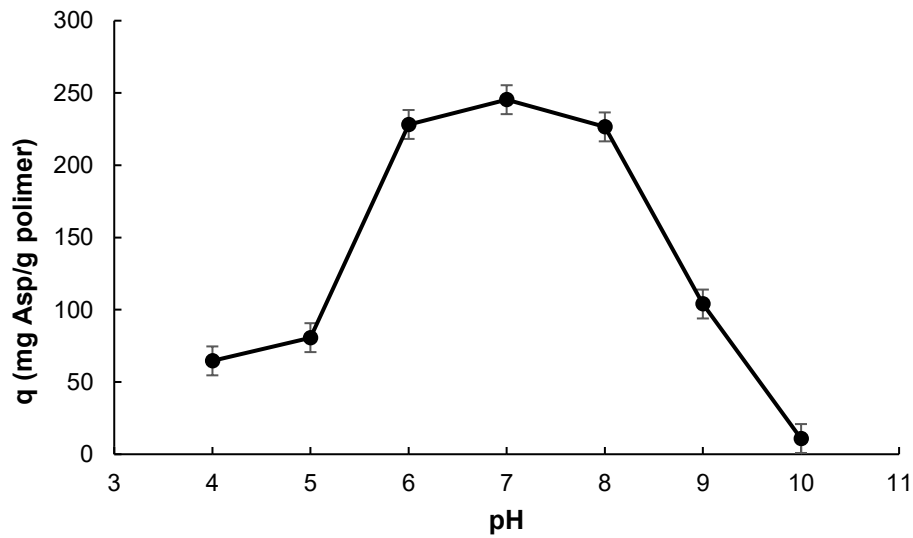


Şekil 4.4. Poli(HEMA-MAL) kriyojel ile aspartik asidin muhtemel etkileşimi.

4.2.1.1. pH etkisi

Poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonunun pH değeriyle değişimi Şekil 4.5’de verilmektedir. Aspartik asit pI:2,77 izoelektrik pH değerine ve 133,10 g/mol moleküler kütle değerlerine sahiptir. Poli(HEMA-MAL) kriyojeller üzerine maksimum aspartik asit adsorpsiyonu ise pH:7,0 değerinde elde edilmiştir (Şekil 4.5). Kriyojellerin aspartik asite gösterdiği afinite daha yüksek ve daha düşük pH değerlerinde önemli derecede düşüktür. Aspartik asit, asidik bir aminoasit olduğundan

fizyolojik pH değerinde (pH:7,0) negatif yüklüdür. Poli(HEMA-MAL) kriyojeller ile aspartik asit arasındaki etkileşim, MAL monomerinde bulunan bazik lizin aminoasidi fizyolojik pH değerinde pozitif yüklü olduğundan, elektrostatik bir etkileşimdir. En yüksek adsorpsiyonun nötral pH'da (pH:7,0) elde edilmesi de elektrostatik etkileşim gerçekleştiğinin bir kanıtıdır.

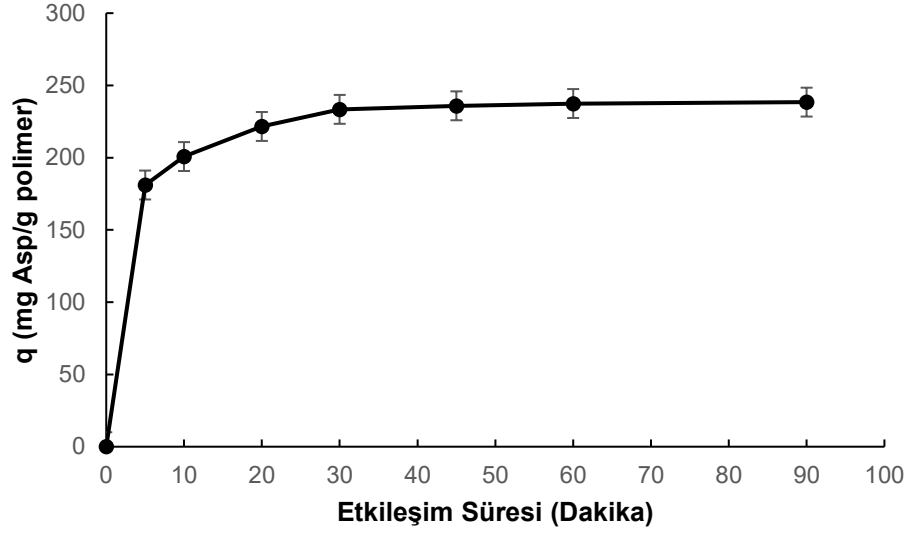


Şekil 4.5. Aspartik asit adsorpsiyonuna çözelti pH'sının etkisi. Aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C.

4.2.1.2. Etkileşim süresi

Şekil 4.6 incelendiğinde poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonu ilk 30 dakikada maksimum seviyeye ulaşmış ve bu süreden sonra adsorpsiyon miktarında ciddi bir değişim gözlenmemiştir. Bunun sebebi ilk 30 dakikada aspartik asit molekülleri oldukça hızlı bir şekilde poli(HEMA-MAL) kriyojellerin aktif bölgelerine tutunmuş ve tüm bölgeler tutabileceği kadar aspartik asit tutarak dolmuştur. Etkileşimin bu kadar hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, kriyojellerin aktif bölgelerinde bulunan MAL fonksiyonel grupları ve aspartik asit molekülleri arasında hem geometri hem de elektrostatik etkileşim açısından kayda değer bir uyum olduğunun göstergesidir. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında elde edilen

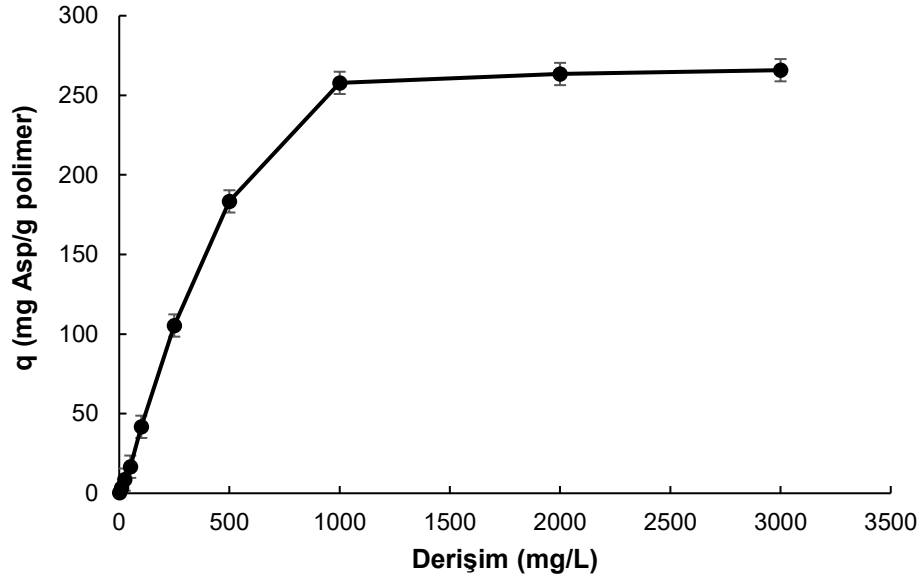
adsorpsiyon hızı poli(HEMA-MAL) kriyojellerin adsorpsiyon performansı hakkında oldukça umut vericidir.



Şekil 4.6. Aspartik asit adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi. pH: 7,0; Aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; sıcaklık 25°C.

4.2.1.3. Aspartik asit derişiminin etkisi

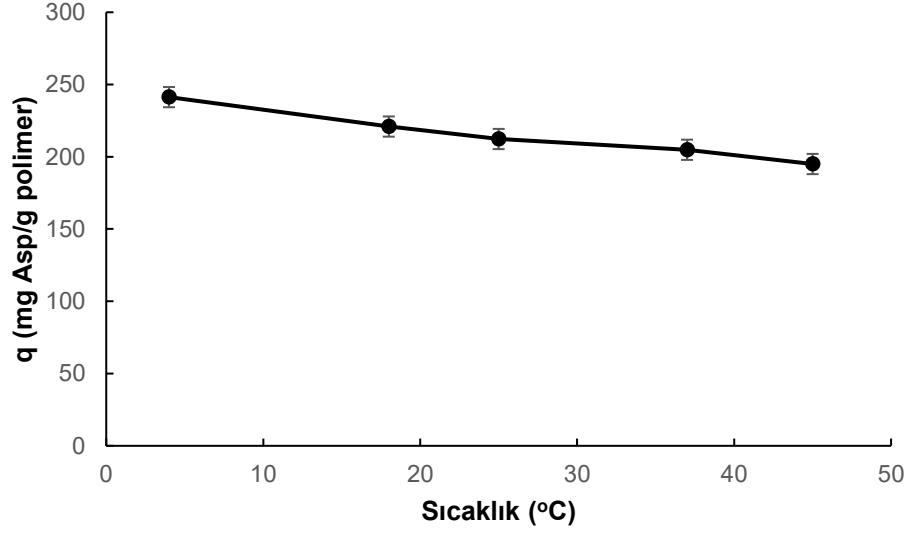
Aspartik asidin poli(HEMA-MAL) kriyojellere adsorpsiyonuna etki eden diğeri bir faktör ise aspartik asit başlangıç derişimidir. 1-3000 ppm arasında değışen aspartik asit başlangıç derişimine sahip çözeltiler maksimum adsorpsiyonun gerçekleştiğı pH değeriinde poli(HEMA-MAL) kriyojeller ile etkileşime sokulmuş ve Şekil 4.7’de gösterildiğı gibi adsorpsiyon 1000 ppm ‘e kadar artmakta ve bu değerdan sonra plato değeriine ulaşmaktadır. Bu da poli(HEMA-MAL) kriyojellerin etkileşime giren bölgelerinin aspartik asit ile tamamen doyduğunu ve aspartik asit bağlayacak boş bölgenin kalmadığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Aspartik asit adsorpsiyonuna aspartik asit derişiminin etkisi. pH:7,0; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C.

4.2.1.4. Sıcaklığın etkisi

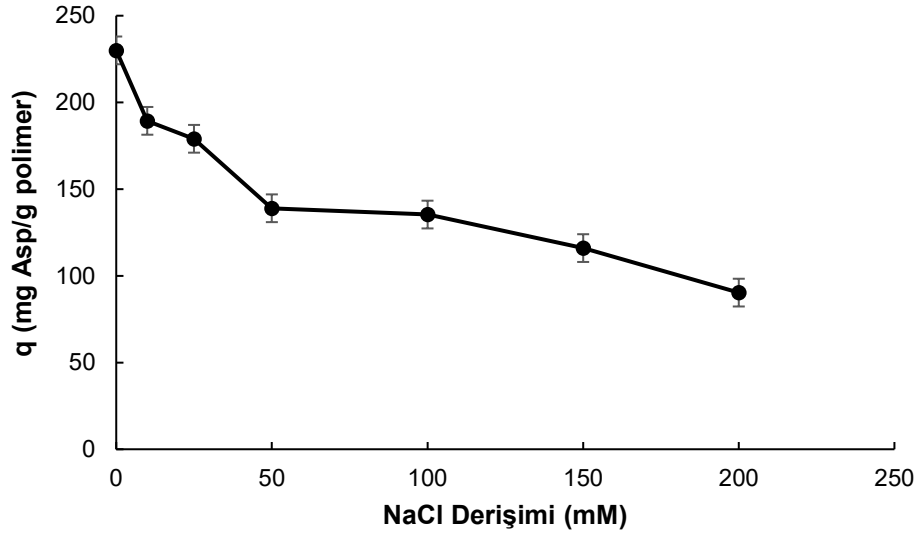
Poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini ve optimum adsorpsiyon sıcaklığını belirlemek amacıyla 4, 18, 25, 37 ve 45°C sıcaklıklarda adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve en yüksek adsorpsiyon değerinin elde edildiği sıcaklık 4°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonu artan sıcaklıkla ters orantılı olarak azalmaktadır. Adsorpsiyonun sıcaklıkla azalmasının nedeni olarak adsorpsiyon işleminin doğası gereği ekzotermik bir işlem olması ve düşük sıcaklığa sahip ortamlarda ısıl seyreltilik etkisi gösterilebilir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda moleküller nispeten daha fazla enerjiye ve buna bağlı olarak hareketliliğe sahip olacağından elektrostatik etkileşimin oluşması için gerekli olan özellikle moleküller arasındaki mesafe de artacaktır. Bu da etkileşimin oluşması için bir engeldir. Spesifik adsorpsiyon sürecini kontrol eden termodinamik faktör, bağlanma ile ilgili toplam serbest enerji değişimi (ΔG), hem entalpi hem de entropi değişimlerini içerdiğinden adsorpsiyon muhtemelen kompleks bir şekilde sıcaklığa bağımlıdır (Leatherbarrow ve Dean, 1980; Arnold ve Blanch, 1986).



Şekil 4.8. Aspartik asit adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. pH: 7,0; Aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.

4.2.1.5. İyonik şiddetin etkisi

İyonik şiddetin aspartik asit adsorpsiyonuna etkisini belirlemek amacıyla derişimi 10-200 ppm arasında değişen NaCl çözeltileri kullanılmıştır. Şekil 4.9'dan da görüldüğü üzere poli(HEMA-MAL) kriyojeller üzerine aspartik asit adsorpsiyonu artan tuz derişimiyle azalmaktadır. Bu sonucun bir sebebi olarak artan iyonik şiddetin meydana getirdiğı elektrostatik itme kuvveti ve polimerik materyal ile hedef molekülün aktif bölgelerinde oluşan tuzdan kaynaklı maskelenme gösterilebilir. İyonik şiddet arttıkça MAL fonksiyonel grubu üzerindeki amino grupları tuzun anyonları ile deprotone olmaktadır ve bu da daha az aspartik asit adsorpsiyonuna neden olmaktadır. Ayrıca tuz varlığında oluşan tuz köprülerindeki bozulma yüksek iyonik şiddete sahip ortamlarda adsorpsiyonun düşmesine sebep olmaktadır (Kassab ve ark., 2000).



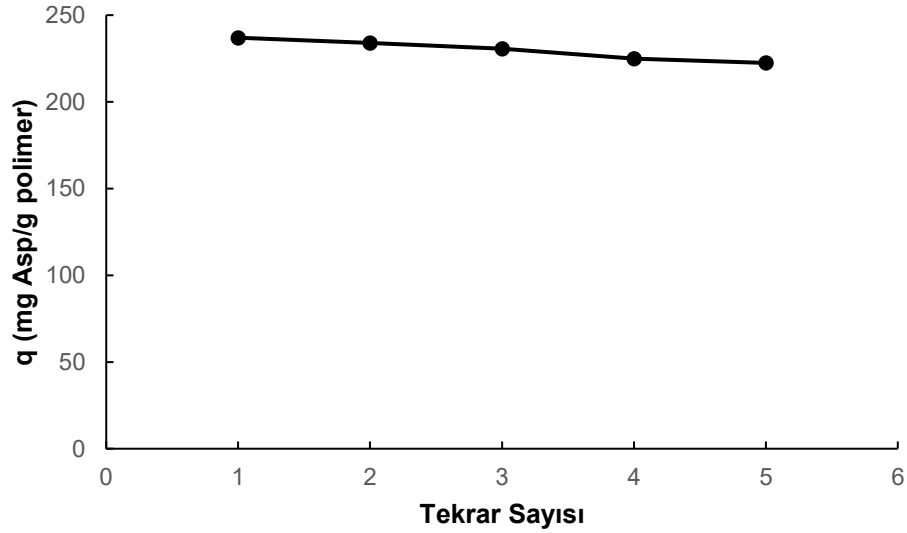
Şekil 4.9. Aspartik asit adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. pH:7,0; aspartik asit derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C.

4.2.2. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Poli(HEMA-MAL) kriyojellere adsorbe olan aspartik asit moleküllerinin desorpsiyonu için 1 M NaCl kullanılarak hazırlanmış desorpsiyon çözeltisiyle aspartik asit adsorplamış kriyojeller kesikli sistemde 10 rpm hızda oda sıcaklığında etkileşime sokulmuş ve 1 saat etkileşim süresinin sonunda desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tuz, hedef molekül ve polimerik materyal arasındaki etkileşimi kırmakta Bölüm 4.2.1.5’de ifade edildiği üzere adsorpsiyonu engelleyen bir performans sergilemektedir.

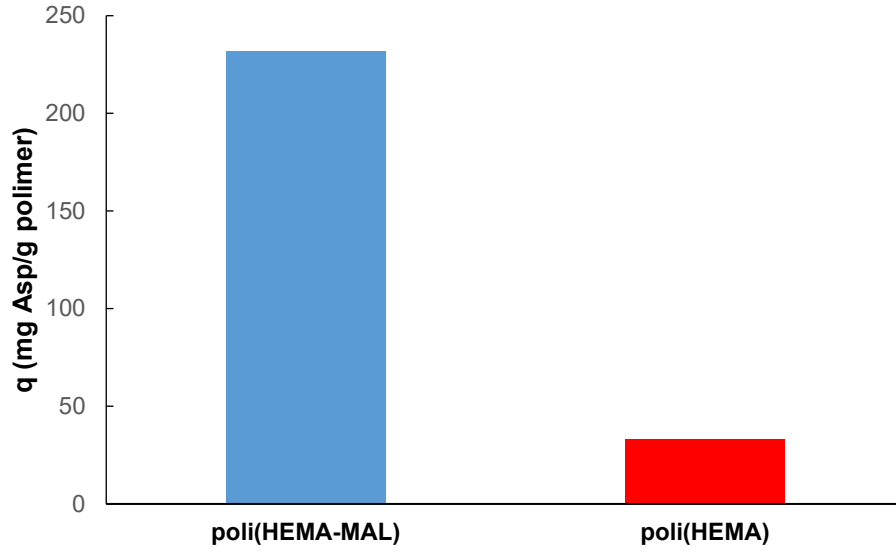
Aspartik asit adsorplamış aynı poli(HEMA-MAL) kriyojel kullanılarak adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmış ve 5 döngü sonucunda polimerik kriyojellerin aspartik asit adsorplama performanslarında kayda değer bir azalma görülmemiştir (Şekil 4.10). İlk döngü sonunda 236,99 mg/g olan adsorplama kapasitesi 5. döngü sonunda 222,45 mg/g değerine düşmüş ve sadece %6 oranında azalmıştır. Kriyojellerin rejenarasyonu için kriyojeller iki döngü arasında 2 mM NaOH içerisinde 30 dakika bekletilmiş ardından önce distile su ve sonrasında adsorpsiyonun gerçekleştiği pH:7,0 tampon çözeltisi ile yıkanarak yeniden kullanıma hazır hale

getirilmiştir. 5 döngü sonucunda geri kazanım sağlanan aspartik asit miktarı ortalama %97,59'dur.



Şekil 4.10. Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

Poli(HEMA-MAL) kriyojeller üzerine takılan MAL fonksiyonel monomerinin adsorpsiyona sağladığı katkıyı görebilmek amacıyla poli(HEMA) kriyojeller sentezlenmiş ve adsorpsiyonun gerçekleştiği optimum koşullarda hem poli(HEMA) kriyojel ($q=33,17$ mg/g) hem de poli(HEMA-MAL) kriyojel ($q=231,63$ mg/g) ile aspartik asit adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. İki kriyojelin adsorpsiyon performansının karşılaştırması Şekil 4.11'de verilmiştir. Grafikten de görüldüğü üzere MAL fonksiyonel monomeri adsorpsiyona ciddi anlamda katkı sağlamıştır. Aspartik asit veya aspartik asit içeren proteinlerin veya biyomoleküllerin saflaştırılmasında MAL fonksiyonel monomeri oldukça umut vaat edici bir performans sergilemiştir.



Şekil 4.11. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAL) kriyojellerin adsorpsiyon performanslarının karşılaştırılması.

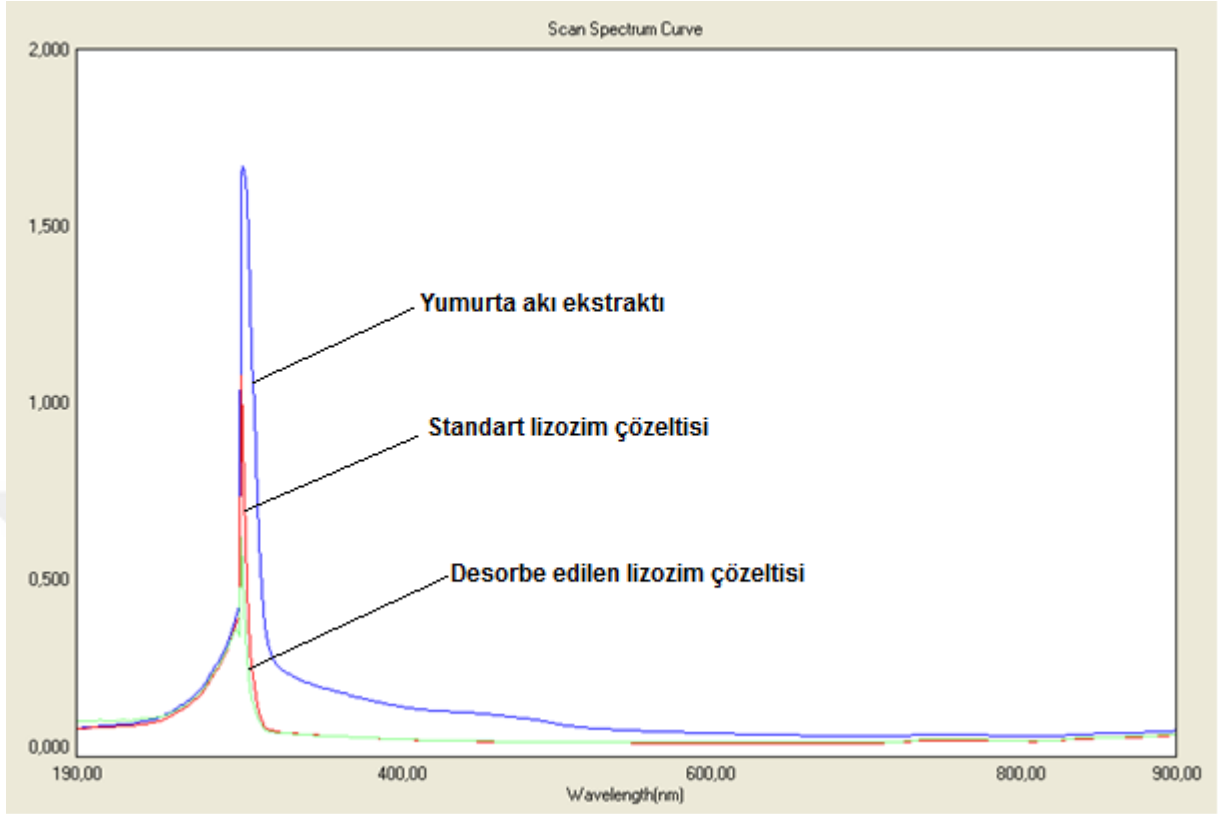
4.2.3. Aspartik asidin doğal ortamdan ayrımı

Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin doğal ortamdaki aspartik asit izolasyon performanslarını incelemek amacıyla aspartik asit içeren bir protein olan lizozimin izolasyonu çalışılmıştır. Lizozimin yapısında, özellikle yüzeyde ulaşılabilen bölgelerde, bir histidin, dört aspartik asit, iki glutamik asit ve iki tirozin kalıntısı vardır (Yılmaz ve ark, 2009). Lizozim üzerindeki negatif yükten dolayı özellikle de aspartik asit yapısı poli(HEMA-MAL) üzerinden etkileşime girmektedir.

Çizelge 4.1. Yumurta akının temel bileşenleri (Köse, 2011).

Protein	Miktar (%)	M Kütle (KDa)	pI	Özellik
Ovalbumin	54	45	4,5	
Ovatransferrin	12-13	77,7	6,0	Demiri ve diğer metal iyonlarını bağlar
Ovamucoïd	11	28	4,1	Serin proteazı inhibe eder
Lizozim	3,4-3,5	14,3	10,7	Bakteri hücre duvarını yıkar
Ovamucin	1,5-3,5	220-270000	4,5-5,0	Lizozim ile etkileşir
Avidin	0,05	68.,3	10,0	Biotini bağlar

Tavuk yumurtası akında bulunan lizozim miktarı neredeyse yok denecek kadar az olmasına rağmen lizozim kaynakları düşünüldüğünde oldukça etkin bir lizozim miktarına sahiptir (%3,4) (Çizelge 4.1) (Huopalahti ve ark, 2007). Bölüm 3.4.3'de anlatılan prosedür uygulanarak yumurta akından lizozim proteini adsorpsiyon ile ayrılmıştır. Daha sonra 1 M NaCl çözeltisi ile desorpsiyon işlemi uygulanmıştır. Desorbe edilen lizozim proteininin saflık derecesini kontrol etmek amacıyla UV-VIS spektrotometresi ile 280 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Şekil 4.12). Spektrum incelendiğinde standart lizozim çözeltisinin spektrumu ile desorbe edilen lizozimin spektrumunun hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Aynı zamanda poli(HEMA-MAL) kriyojelin lizozim proteinini adsorplama kapasitesi 37,25 mg/g olarak hesaplanmıştır. Adsorbe edilen lizozim proteini için desorpsiyon oranı %95,83 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar poli(HEMA-MAL) kriyojeller ile lizozim proteininin adsorpsiyonunun ve desorpsiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.



Şekil 4.12. Lizozim adsorpsiyonu için UV-VIS spektrumu.

4.3. Literatür Karşılaştırması

Aspartik asit adsorpsiyonu bilim adamlarının son yıllarda dikkatini çekmekle beraber literatürde rapor edilen birtakım çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; Zhu ve arkadaşları, vinil-SiO₂ temelli mikroküreler üzerine 18 çeşit aminoasidi baskılamışlar ve herbir aminoasit için seçici polimerler sentezlemişlerdir. Bu çalışmada aspartik asit için adsorpsiyon kapasitesi 89,1 mg/g olarak hesaplanmıştır (Zhu ve ark., 2016).

He ve arkadaşları ise kalsiyum okzalat kullanarak glutamik asit ve aspartik asit adsorbe etmişler ve aspartik asit için adsorpsiyon kapasitesini 8,78 mg/g olarak tespit etmişlerdir (He ve ark., 2015).

Pusnik ve arkadaşları ise demir oksit nanopartiküller üzerine lizin ve aspartik asit adsorpsiyonu çalışmışlardır. Demir oksit nanopartiküllerin geniş yüzey alanları

sayesinde ($89,9 \text{ m}^2/\text{g}$) $717,9 \text{ mg/g}$ aspartik asit adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır (Pusnik ve ark., 2016).

Sonuçlar değerlendirildiğinde poli(HEMA-MAL) kriyojeller ile elde edilen $265,7 \text{ mg/g}$ aspartik asit adsorpsiyon kapasitesi literatür değerlerine uygun ve iyi bir konumdadır.

4.4. Matematiksel Modellemeler

4.4.1. Adsorpsiyon izotermeleri

Aspartik asidin poli(HEMA-MAL) kriyojelleri üzerine adsorpsiyonunun karakterizasyonu için Langmuir (Şekil 4.13) ve Freundlich (Şekil 4.14) adsorpsiyon izotermelerinden faydalanılmıştır. Bu iki izoterm sayesinde hedef molekül ile katı destek arasındaki etkileşimin teorik olarak nasıl gerçekleşmesi gerektiği ve deneysel sonuçların teoriğe ne kadar yakın olduğunun değerlendirilmesi yapılmıştır.

Langmuir adsorpsiyon modelinde etkileşim tek tabakada ve homojen olarak gerçekleşmektedir. Bu adsorpsiyon modeline göre bir molekülün adsorplandığı bölge ile diğer bölgeler arasında ve diğer hedef moleküller arasında etkileşim yoktur.

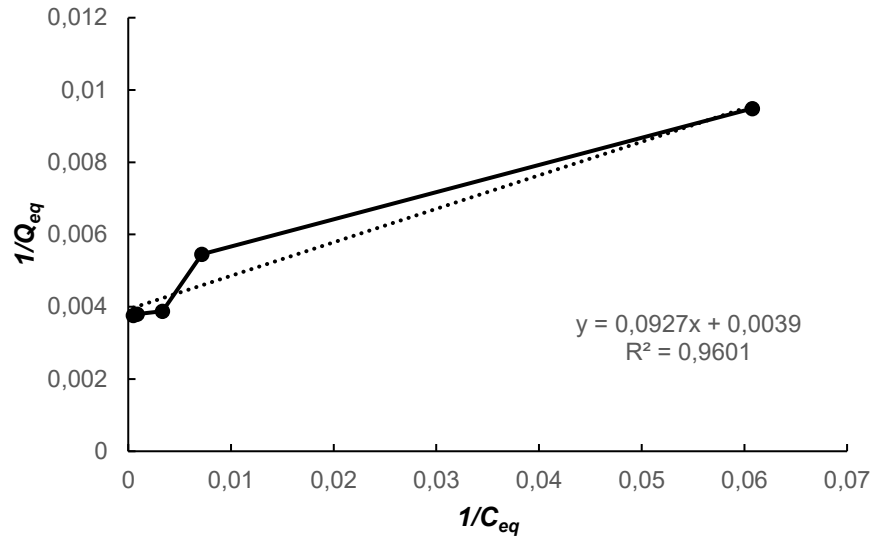
Aşağıdaki eşitlik Langmuir adsorpsiyon modeline göre maksimum adsorplanan miktarın hesaplanmasında kullanılmaktadır.

$$Q_{eq} = \frac{Q_{max} \cdot b \cdot C_{eq}}{1 + bC_{eq}} \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

Burada Q_{eq} adsorplanan aspartik asit miktarını (mg/g), C_{eq} ise dengedeki aspartik asit derişimini (mg/mL) vermektedir. b Langmuir sabiti (mL/mg)'dir ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin deneysel değer ile ilişkisini göstermektedir. Q_{max} ile ifade edilen birim ise maksimum adsorpsiyon kapasitesidir. Linearizasyon yapıldığında;

$$\frac{1}{Q_{eq}} = \left[\frac{1}{Q_{max}} \cdot b \right] \left[\frac{1}{C_{eq}} \right] + \left[\frac{1}{Q_{max}} \right] \quad (\text{Eşitlik 4.2})$$

eşitliği elde edilir. $1/C_{eq}$ 'a karşı $1/Q_{eq}$ grafiğinin y eksenini kestiği nokta $1/Q_{max}$ değerini ve eğimi de $1/Q_{max} \cdot b$ değerini vermektedir.



Şekil 4.13. Langmuir izoterminin.

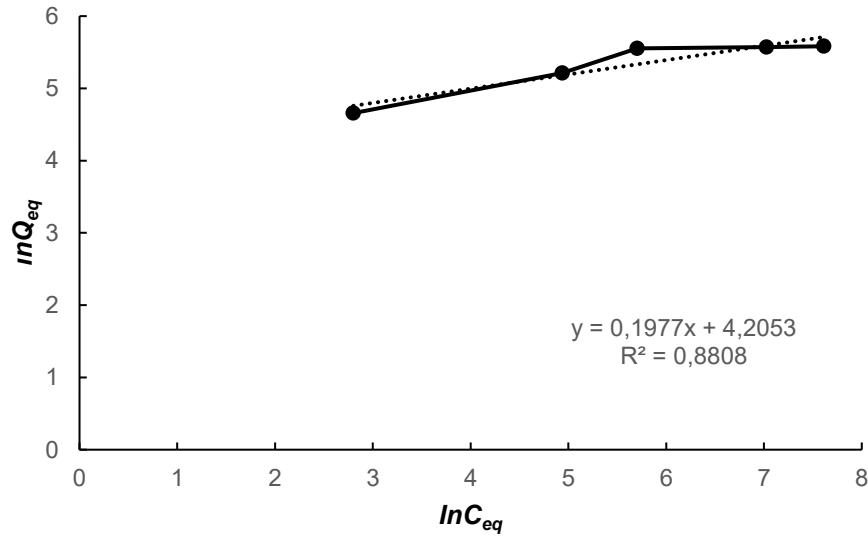
Poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonunun teorik hesaplamaları Langmuir adsorpsiyon modeline göre yapılmış ve Langmuir korelasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur ($R^2=0,9601$). Ayrıca Q_{max} değeri de deneysel olarak elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi ile oldukça yakın değere sahiptir. Sonuç olarak bu aspartik asidin poli(HEMA-MAL) kriyojellere adsorpsiyonu Langmuir adsorpsiyon modeli ile açıklanabilir.

Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir adsorpsiyon modeli ise adsorpsiyonun heterojen ve çoklu tabakada gerçekleştiği esasına dayanan Freundlich adsorpsiyon modelidir. Bu modele göre adsorplanan hedef molekülün miktarı tüm bağlanma bölgelerine adsorplanmış moleküllerin toplamına eşittir ve tersinir adsorpsiyon gerçekleşmektedir. Freundlich adsorpsiyon modeli aşağıdaki denklem ile ifade edilir;

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + (n \times \ln C_{eq}) \quad (\text{Eşitlik 4.3})$$

Burada K_F ve n Freundlich adsorpsiyon sabitlerini göstermektedir. $\ln Q_{eq}$ 'a karşı $\ln C_{eq}$ grafiğinde $\ln K_F$, y eksenini kesen nokta ve eğim de n değerini vermektedir. Burada $1/n$ değeri yüzey heterojenite indeksini vermektedir. Bu değer ne kadar büyükse adsorpsiyonun daha elverişli, 0,0'a yakın olması ise düşük olduğunu bildirmektedir.

K_F ise adsorpsiyon kapasitesini göstermektedir. Bu değer ne kadar büyükse adsorpsiyon kapasitesi o kadar büyüktür. Bu değerler, poli(HEMA-MAL) ve aspartik asit arasındaki etkileşim için sırasıyla 5,058 ve 67,04 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı da göz önüne alındığında Freundlich adsorpsiyon modelinin bu etkileşime uygun olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.14. Freundlich izotermi.

Her ikisi izoterm için hesaplanan değerler karşılaştırıldığında önceden de bahsedildiği gibi Langmuir adsorpsiyon modeli bu adsorpsiyon sistemini açıklamak için kullanılabilir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

Langmuir Sabitleri				Freundlich Sabitleri			
$Q_{deneyisel}$	Q_{max}	b	R^2	K_F	n	$1/n$	R^2
(mg/g)	(mg/g)	(L/mg)					
265,7	256,4	0,042	0,9601	67,04	0,1977	5,058	0,8808

4.4.2. Adsorpsiyon kinetik modelleme

Gerçekleşen etkileşim üzerindeki hakim kuvveti belirlemek amacıyla elde edilen deneysel veriler kullanılarak reaksiyon kinetiği hesaplamaları yapılmıştır. Yalancı-birinci ve yalancı-ikinci derece kinetik hesapları yapabilmek için deneysel derişimlerin adsorban yüzeyindeki derişimlere eşit olması gerekmektedir. Bu işlemi yapabilmek için genellikle başvurulmuş denklem Lagergren birinci-derece hız denklemdir:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (\text{Eşitlik 4.4})$$

Burada q_{eq} (mg/g) dengedeki, q_t (mg/g) t anındaki adsorplanan aspartik asit miktarını, k_1 (1/dak.) ise yalancı- birinci derece adsorpsiyon hız sabitini belirtmektedir.

Sınır değerler, $t=0$ için $q_t=0$ ve $t=t$ için $q_t=q_t$, uygulandıktan sonra integrasyon uygulandıgında;

$$\log \frac{q_{eq}}{q_{eq}-q_t} = \frac{k_1 t}{2.303} \quad (\text{Eşitlik 4.5})$$

Linearize edildiğinde ise;

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (\text{Eşitlik 4.6})$$

denklemini elde edilir.

$\log(q_{eq})$ 'e karşı t grafiği çizildiğinde eğer doğrusal bir veri dizisi elde edilirse bu adsorpsiyon modeli yalancı-birinci kinetik model ile açıklanabilir ve fiziksel adsorpsiyon dinamiklerin kontrolü hakimdir.

Yalancı-ikinci derece denklem ise aşağıdaki denklem ile ifade edilebilir;

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (\text{Eşitlik 4.7})$$

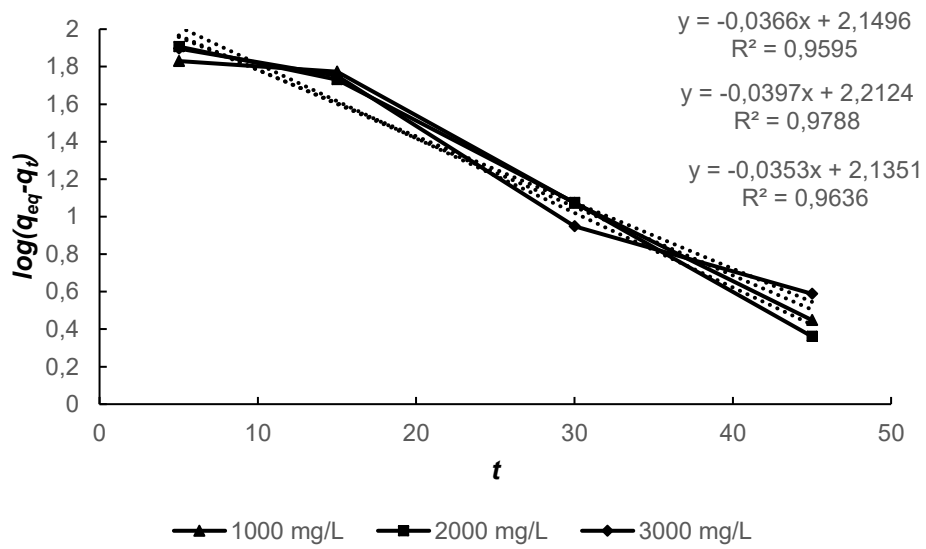
Burada k_2 (g/mg.dak.) yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabitidir. Sınırlar, $t=0$ için $q_t=0$ ve $t=t$ için $q_t=q_t$ olduğunda yapılan integrasyon sonucu;

$$\frac{1}{q_{eq}-q_t} = \frac{1}{q_{eq}} + k_2 t \quad (\text{Eşitlik 4.8})$$

denklemini elde edilir. Doğrusal olarak ise;

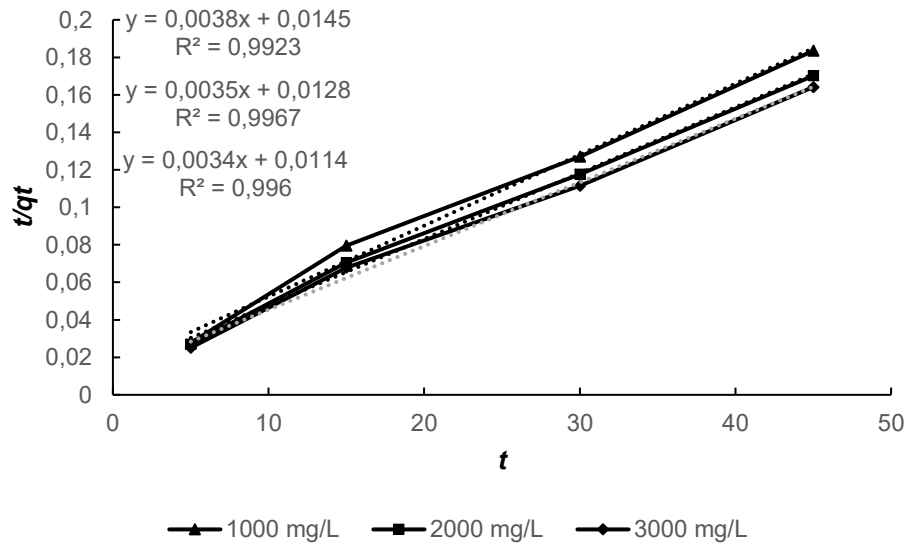
$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_{eq}^2} + \frac{1}{q_{eq}} t \quad (\text{Eşitlik 4.9})$$

denklemini elde edilir.



Şekil 4.15. Poli(HEMA-MAL) kriyojelleri için deneysel verilerin yalancı birinci derece kinetiği.

Yine burada da yalancı ikinci derece kinetiğin uygulanabilmesi için t/q_t ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gerekmektedir. Şekil 4.15 yalancı birinci derece kinetik, Şekil 4.16 ise yalancı ikinci derece kinetik modellemenin deneysel verilere uygulanmış grafikleridir. Bu grafiklerden elde edilen sabitlerin özeti Çizelge 4.3’de verilmektedir. Çizelgeden de görüldüğü üzere deneysel verilerle en çok örtüşen ve en yakın değerler yalancı-ikinci derece kinetik modelleme hesaplamalarından elde edilmiştir. Sonuçlara göre korelasyon sabiti R^2 değerleri yalancı ikinci derece kinetik modelleme için genelde 1,00’ e yakındır. Yani poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit adsorpsiyonu kimyasal dinamiklerin kontrolünde yürümüştür.



Şekil 4.16. Poli(HEMA-MAL) kriyojelleri için deneysel verilerin yalancı ikinci derece kinetiği.

Çizelge 4.3. Yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitler.

Başlangıç Derişimi (mg/L)	Yalancı-Birinci Derece				Yalancı-İkinci Derece		
	$q_{deneyse}$ (mg/g)	q_{eq} (mg/g)	k_1 (1/dak.)	R^2	q_{eq} (mg/g)	k_2 (g/mg.dak.)	R^2
1000	248,06	141,12	0,0843	0,9595	263,16	0,000996	0,9923
2000	266,79	163,08	0,0914	0,9788	285,71	0,000957	0,9967
3000	278,07	136,49	0,0813	0,9636	294,12	0,001014	0,996

5. SONUÇ

Aspartik asit adsorpsiyon deneyleri kesikli sistemde yapılmıştır.

- Poli(HEMA-MAL) kriyojeller serbest radikal polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin spesifik yüzey alanı 8,962 m²/g bulunmuştur.
- Taramalı elektron mikroskop görüntülerinden anlaşıldığı üzere Poli(HEMA-MAL) kriyojeller makro gözeneklere sahiptir ve yüzeyler adsorpsiyon için elverişli olacak şekilde pürüzlüdür.
- MAL fonksiyonel monomerinin katılım miktarı hesaplanmış ve MAL miktarı azot stokiyometrisi göz önünde bulundurularak 65,81 µmol MAL/g polimer olarak bulunmuştur.
- Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin termogravimetrik analizleri yapılmış ve termal kararlılıkları belirlenmiştir. Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin termal kararlılığını MAL komonomerlerinin HEMA monomerine eklenmesiyle artmıştır. Bozunma sıcaklık aralığı Poli(HEMA-MAL) için 224-460°C sıcaklıklarında ulaşılmaktadır.
- Poli(HEMA-MAL) kriyojeller üzerine aspartik asit adsorpsiyonu elektrostatik nitelik taşıdığından çözeltinin pH'ına bağlıdır. En yüksek adsorpsiyon değerinin hesaplanması için asidik ve bazik pH'larda adsorpsiyon işlemi yapılmış ve en uygun pH değerinin 7,0 olduğu bulunmuştur. Bu pH değerindeki maksimum adsorpsiyon kapasitesi 319,51 mg/g olarak hesaplanmıştır. Başlangıç aspartik asit derişimi 1,0 mg/mL olarak alınmıştır.
- Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin aspartik asit içeren bir protein olan lizozim adsorpsiyon kapasitesi tavuk yumurtasından 37,25 mg/g olarak tespit edilmiştir.
- Poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik adsorpsiyonu sıcaklık arttıkça azalmaktadır.

- Poli(HEMA-MAL) kriyojellere adsorbe olan aspartik asidin desorpsiyonu yine kesikli sistemde yürütülmüştür. Kriyojellere, desorpsiyon ajanı olarak 1 M 10 mL NaCl çözeltisi uygulanmış ve tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü uygulanmıştır. Aspartik asit geri kazanım oranı ise ortalama 97,59 ve aspartik asit içeren bir protein olan lizozim için yumurta akında 95,83 olarak elde edilmiştir.
- Poli(HEMA-MAL) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojeller kullanılarak 5 kez tekrarlanmıştır. Bu beş döngünün sonunda kayda değer bir azalma gözlenmemiştir (236,99 mg/g'dan 222,45 mg/g'a).
- Lizozimin saflığını görebilmek için, yumurta akından alınan lizozimin spektrofotometrik incelemesi yapılmıştır. UV-VIS spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümlere göre desorplanan lizozimin spektrumu standart lizozim (1 mg/mL) çözeltisinin spektrumu ile hemen hemen aynıdır. Bu da lizozim proteininin poli(HEMA-MAL) kriyojeller tarafından başarı ile adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulduğunun önemli bir kanıtıdır.
- Aspartik asit adsorpsiyonu için deneysel maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) ve Langmuir (Q_{max}) değeri birbiriyle uyumludur. Korelasyon katsayısı (R^2) Langmuir izotermi için 0,9601 Freundlich izotermi için 0,8808'dir. Langmuir adsorpsiyon modeli bu afinite adsorbent sistemine uygulanabilir. Yani poli(HEMA-MAL) kriyojellere aspartik asit molekülleri tek tabaka (homojen) halinde adsorplanmıştır ve polimerin yüzeyindeki tüm noktalar eş enerjilidir.
- Aspartik adsorpsiyonu üzerinde hakim olan kinetik modellemenin ve sürücü kuvvetin belirlenmesi için yapılan matematiksel hesaplamalar sonucunda teorik ve deneysel q_{eq} değerlerinin yalancı ikinci-derece kinetik modelleme için birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak difüzyon sorunu yoktur ve sürücü kuvvet kimyasal kontrollü olarak gerçekleşmiştir.

- Bütün bu veriler ışığında bakıldığında poli(HEMA-MAL) kriyojeller hafif bazik karakterleri ile asidik biyomoleküllerin izolasyonunda kullanılabilmesi açısından gelecek vadetmektedir. MAL monmerinin içerisindeki lizin aminoasidinin fizyolojik pH değerinde negatif yüklü olması aynı zamanda poli(HEMA-MAL) polimerinin iyonik etkileşim kromatografisinde de tercih edilebileceği düşüncesini akla getirmektedir. Polimerin fonksiyonel özelliğinin fazla olması biyokromatografi ve biyoteknoloji alanlarında yeni çalışmaların tasarlanması adına önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Altmann, J., Rehfeld, D., Träder, K., Sperlich, A., Jekel, M., 2016. Combination of granular activated carbon adsorption and deep-bed filtration as a single advanced wastewater treatment step for organic micropollutant and phosphorus removal. *Water Research*, 92, 131-139.
- Arnold, F., Blanch, H., 1986. Analytical affinity chromatography: II. Rate theory and the measurement of biological binding kinetics. *Journal of Chromatography A*, 355, 13-27.
- Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 986(2), 275-290.
- Arvidsson, P., Plieva, F.M., Savina, I.N., Lozinsky, V.I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2002. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 27-38.
- Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A., 2006. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *Reactive and Functional Polymers*, 66(11), 1263-1271.
- Brgles, M., Sviben, D., Forčić, D., Halassy, B., 2016. Nonspecific native elution of proteins and mumps virus in immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1447, 107-114.
- Cheng, W.P., Gao., W., Cui, X., Ma, J.H., Li, R.F., 2016. Phenol adsorption equilibrium and kinetics on zeolite X/activated carbon composite. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 62, 192-198.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., 1968. Single-step purification of avidin from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 33(2), 235-239.
- D'Aniello, A., 2007. D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain research reviews*, 53(2), 215-234.
- Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2006. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *Journal of Chromatography A*, 1123(2), 145-150.
- Denizli, A., 2011. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 39(1), 1-18.

- Denizli, A., Yavuz, H., Garipcan, B., Arica, M.Y., 2000. Nonporous monosize polymeric sorbents: Dye and metal chelate affinity separation of lysozyme. *Journal of Applied Polymer Science*, 76(2), 115-124.
- Erol, K., Köse, K., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., 2016. Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 567-576.
- Frasconi, D., Bacca, A.E.M., Zama, F., Bertin, L., Fava, F., Pinelli, D., 2016. Olive mill wastewater valorisation through phenolic compounds adsorption in a continuous flow column. *Chemical Engineering Journal*, 283, 293-303.
- Greiner, E., Kumar, K., Sumit, M., Giuffre, A., Zhao, W., Pedersen, J., Sahai, N., 2014. Adsorption of l-glutamic acid and l-aspartic acid to γ -Al₂O₃. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 133, 142-155.
- Hanora, A., Savina, I., Plieva, F.M., Izumrudov, V.A., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., 2006. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. *Journal of Biotechnology*, 123(3), 343-355.
- Hassan, C. and Peppas, N., 1998. Pure PVA hydrogels using freezing/thawing techniques as carriers for drug delivery. in *Proceedings International Symposium Controlled Release Bioactive Materials*, 25, 50-51.
- He, J., Lin, R., Long, H., Liang, Y., Chen, Y., 2015. Adsorption characteristics of amino acids on to calcium oxalate. *J. Colloid Interface Science*, 454, 144-51.
- Hicks, J.T., 1964. Treatment of Fatigue in General Practice: A Double Blind Study. *Clinic Medical (Northfield)*, 71, 85-90.
- Hongxia, Z., Xiaoyun, W., Honghong, L., Tianshe, T., Wangsuo, W., 2016. Adsorption behavior of Th (IV) onto illite: Effect of contact time, pH value, ionic strength, humic acid and temperature. *Applied Clay Science*, 127, 35-43.
- Huopalahti, R., Anton, M., López-Fandiño, R. and Schade, R., 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Berlin, Almany, 298 p.
- Iadarola, N.D., Niciu, M.J., Richards, E.M., Vande Voort, J.L., Ballard, E.D., Lundin, N.B., Nugent, A.C., Machado-Vieira, R., Zarate, C.A., Jr., 2015. Ketamine and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the treatment of depression: a perspective review. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 6(3), 97-114.

- Ingavle, G., Baillie, L., Zheng, Y., Savina, I., Howell, C., Mikhalovsky, S. Sandeman, S., 2016. Disposable polymeric cryogels for the removal of biologically active anthrax toxin. 10th World Biomaterials Congress, 17-22 Mayıs, Montreal, Canada.
- Janson, J.C., Ryden, L., 1998. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, 2nd ed. John Wiley-VCH, New York, USA, 695 p.
- Kaetsu, I., 1993. Radiation synthesis of polymeric materials for biomedical and biochemical applications, in Recent Trends in Radiation Polymer Chemistry. Springer, 81-97.
- Kassab, E., Langlet, J., Evleth, E., Akacem, Y., 2000. Theoretical study of solvent effect on intramolecular proton transfer of glycine. Journal of Molecular Structure-Theochem, 531(1), 267-282.
- Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M., 2014. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. Academic Food Journal/Akademik GIDA, 12(2), 79-87.
- Köse, K., 2011. Lizozim Saflaştırılmasına Yönelik Hidrofobik Manyetik Nanopartiküller. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Köse, K. Denizli, A., 2013. Poly (hydroxyethyl methacrylate) based magnetic nanoparticles for lysozyme purification from chicken egg white. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 41(1), 13-20.
- Leatherbarrow, R.J. Dean, P.D., 1980. Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. Biochemical Journal, 189(1), 27-34.
- Lin, S.H. Juang, R.S., 2009. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review. Journal of Environmental Management, 90(3), 1336-1349.
- Lozinsky, V.I., 1998. Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions. Uspekhi Khimii, 67(7), 641-655.
- Lozinsky, V.I., 2002. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application. Uspekhi Khimii, 71(6), 559-585.
- Lozinsky, V.I. Plieva, F.M., 1998. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. Enzyme and Microbial Technology, 23(3-4), 227-242.

- Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2001. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10(4-5), 163-88.
- Mailler, R., Gasperi, J., Coquet, Y., Derome, C., Buleté, A., Vulliet, E., Bressy, A., Varrault, G., Chebbo, G., Rocher, V., 2016. Removal of emerging micropollutants from wastewater by activated carbon adsorption: Experimental study of different activated carbons and factors influencing the adsorption of micropollutants in wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 1102-1109.
- Maughan, R., Sadler, D., 1983. The effects of oral administration of salts of aspartic acid on the metabolic response to prolonged exhausting exercise in man. *International Journal of Sports Medicine*, 4(02), 119-123.
- McCoy, M., Kalghatgi, K., Regnier, F.E., Afeyan, N., 1996. Perfusion chromatography - Characterization of column packings for chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*, 743(1), 221-229.
- Moser, A.C., Hage, D.S., 2010. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*, 2(4), 769-90.
- Nambu, M., 1990. Rubber-Like Poly(Vinyl Alcohol) Gel. *Kobunshi Ronbunshu*, 47(9), 695-703.
- Ozkara, S., Garipcan, B., Piskin, E., Denizli, A., 2003. N-methacryloyl-(L)-histidinemethylester carrying a pseudospecific affinity sorbent for immunoglobulin-G isolation from human plasma in a column system. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 14(8), 761-776.
- Pusnik, K., Peterlin, M., Cigic, I.K., Marolt, G., Kogej, K., Mertelj, A., Gyergyek, S., Makovec, D., 2016. Adsorption of Amino Acids, Aspartic Acid, and Lysine onto Iron-Oxide Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(26), 14372-14381.
- Sarkar, A., Hou, H.W., Mahan, A.E., Han, J., Alter, G., 2016. Multiplexed Affinity-Based Separation of Proteins and Cells Using Inertial Microfluidics, *Scientific reports* 6, doi:10.1038/srep23589.
- Scouten, W.H., 1981. *Affinity chromatography; bioselective adsorption on inert matrices*. John Wiley & Sons, New York, USA, 348 p.
- Srihari, V., Das, A., 2008. Comparative studies on adsorptive removal of phenol by three agro-based carbons: equilibrium and isotherm studies. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71(1), 274-83.

- Suzuki, M., Hirasa, O., 1993. An approach to artificial muscle using polymer gels formed by micro-phase separation, in responsive gels: volume transitions II. *Advances in Polymer Science*, 241-261.
- Topo, E., Soricelli, A., D'Aniello, A., Ronsini, S., D'Aniello, G., 2009. The role and molecular mechanism of D-aspartic acid in the release and synthesis of LH and testosterone in humans and rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 1-11.
- Triplett, N.T., Stone, M.H., Adams, C., Allran, K.D., Smith, T.W., 1990. Effects of Aspartic Acid Salts on Fatigue Parameters during Weight Training Exercise and Recovery. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 4(4), 141-147.
- Trudeau, F., 2008. Aspartate as an ergogenic supplement. *Sports Med*, 38(1), 9-16.
- Tuttle, J.L., Potteiger, J.A., Evans, B.W., Ozmun, J.C., 1995. Effect of acute potassium-magnesium aspartate supplementation on ammonia concentrations during and after resistance training. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 5(2), 102-9.
- Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., 2009. Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol*, 463, 417-38.
- VI, L., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savinal, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10), 445-451.
- Wesson, M., Mcnaughton, L., Davies, P., Tristram, S., 1988. Effects of Oral-Administration of Aspartic-Acid Salts on the Endurance Capacity of Trained Athletes. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 59(3), 234-239.
- Wilchek, M., 2004. My life with affinity. *Protein Science*, 13(11), 3066-70.
- Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., 1984. Affinity chromatography. *Methods Enzymol*, 104, 3-55.
- Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 272-279.
- Zhang, S.F., Sheng, J.J., Qiu, Z.S., 2016. Water adsorption on kaolinite and illite after polyamine adsorption. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 142, 13-20.

Zhu, F., Wang, J., Zhu, L., Tan, L., Feng, G., Liu, S., Dai, Y., Wang, H., 2016. Preparation of molecularly imprinted polymers using theanine as dummy template and its application as SPE sorbent for the determination of eighteen amino acids in tobacco. *Talanta*, 150, 388-98.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : SARICA, Büşra

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 22.04.1990 – Sakarya

Medeni Hali : Evli

Telefon : 0 534 214 13 13

e-mail : busrasarica_@hotmail.com

Eğitim	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Hitit Üniversitesi Kimya Bölümü	2013
Lise	Şehit Üsteğmen Selçuk Esedođlu Lisesi	2006

Yabancı Dil

İngilizce