

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2013-YL-030

İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
İLE MAYA ALKOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI

Begüm AKDUMAN

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Begüm AKDUMAN tarafından hazırlanan “İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile Maya Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması” başlıklı tez, 13.06.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı,	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. Sinan AKGÖL	EGE ÜNİV
Üye	: Doç. Dr. Deniz Aktaş UYGUN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

13/06/2013

İmza

Begüm AKDUMAN

ÖZET

İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE MAYA ALKOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Begüm AKDUMAN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN
2013, 76 sayfa

Bu tezde, poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) [poli(HEMA-GMA)] kriyojelleri, HEMA ve fonksiyonel komonomer GMA'nın çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen bisakrilamid (MBAAm) kullanılarak radikalik kriyokopolimerizasyon ile hazırlanmıştır. İminodiasetik asit (IDA) fonksiyonel grupları, poli(HEMA-GMA) kriyojellerindeki epoksi gruplarının halka yapılarının açılmasıyla kriyojellere bağlanmış ve daha sonra Zn^{2+} iyonları ile şelatlaştırılmıştır. Kriyojeller FTIR, SEM, EDX ve şişme çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Bu kriyojeller 30-50 μm büyüklüğünde birbirine bağlı gözeneklere sahiptir. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerinin denge şişme derecesi yaklaşık % 600'dür. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelleri sulu çözeltiden alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu için kullanılmış ve adsorpsiyon sürekli sistemde gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyona pH, alkol dehidrogenaz derişimi, sıcaklık, iyonik şiddet ve akış hızının etkisi araştırılmıştır. Maksimum alkol dehidrogenaz miktarı, 1,0 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde ve 0,5 mL/dak akış hızındaki pH 5,0 asetat tamponunda 9,94 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Adsorplanan alkol dehidrogenazın desorpsiyonu pH 8,0 fosfat tamponunda 1,0 M NaCl içerisinde gerçekleştirilmiş ve % 93,5 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu kriyojeller tek bir adımda mayadan alkol dehidrogenaz saflaştırılmasında kullanılmıştır. Desorbe edilen alkol dehidrogenazın saflığı gümüş ile boyanmış SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Bu saflaştırma işlemi ham maya homojenatından alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması için başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Alkol dehidrogenaz, maya, kriyojel, İMAK, iminodiasetik asit.

ABSTRACT

PURIFICATION OF YEAST ALCOHOL DEHYDROGENASE BY IMMOBILIZED METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Begüm AKDUMAN

M. Sc. Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

2013, 76 Pages

In this thesis, poly(2-hydroxyethyl methacrylate-glycidyl methacrylate) [poly(HEMA-GMA)] cryogels were prepared by radical cryocopolymerization of HEMA with GMA as a functional comonomer and N,N'-methylene-bisacrylamide (MBAAm) as a crosslinker. Iminodiacetic acid (IDA) functional groups were attached via ring opening of the epoxy group on the poly(HEMA-GMA) cryogels and then Zn^{2+} ions were chealed with this structures. Characterization of cryogels was performed by FTIR, SEM, EDX and swelling studies. These cryogels have interconnected pores of 30-50 μm size. The equilibrium swelling degree of Zn^{2+} chealed poly(HEMA-GMA)-IDA cryogels was approximately 600 %. Zn^{2+} chealed poly(HEMA-GMA)-IDA cryogels were used in the adsorption of alcohol dehydrogenase from aqueous solutions and adsorption was performed in continuous system. The effects of pH, alcohol dehydrogenase concentration, temperature, ionic strength and flow rate on adsorption were investigated. The maximum amount of alcohol dehydrogenase adsorption was determined to be 9,94 mg/g cryogel at 1,0 mg/mL alcohol dehydrogenase concentration and acetate buffer at pH 5,0 with flow rate of 0,5 mL/min. Desorption of adsorbed alcohol dehydrogenase was carried out by 1,0 M NaCl at pH 8,0 phosphate buffer and desorption rate was found to be 93,5 %. Additionally, these cryogels was used for purification of alcohol dehydrogenase from yeast with a single-step. The purity of desorbed alcohol dehydrogenase was shown by silver-stained SDS-PAGE. This purification process can successfully be used for the purification of alcohol dehydrogenase from unclarified yeast homogenates.

Key words: Alcohol dehydrogenase, yeast, cryogel, IMAC, iminodiacetic acid

ÖNSÖZ

Bu çalışmada immobilize metal afinite kromatografisi kullanılarak mayadan alkol dehidrogenaz enzimi saflaştırılmıştır. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Başta yüksek lisans öğrenimim boyunca bana yol gösteren, tez çalışmamın planlanması ve tamamlanmasında benden maddi, manevi hiçbir desteği esirgemeyen, her zaman moralimi yüksek tutup bana her konuda güvenen, çalışmalarım sırasında bana her türlü imkanı sağlayan, kendime her zaman örnek aldığım sevgili danışman hocam sayın Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım süresince manevi ve bilimsel katkılarından dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımım sırasında büyük bir sabırla benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Koçarlı Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Dr. Murat UYGUN'a ve FTIR ölçümlerindeki yardımlarından dolayı Kimya Bölümü Arş. Gör. Rukiye GÜMÜŞADA FIRINCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Rukiye Yavaşer, Doktora Öğrencisi Çağdaş SUNNA'ya ve Yüksek Lisans Öğrencileri Tuğba MERT, Merve TÜNEK ve Pelin ALPAY'a teşekkür ederim.

Bu çalışmayı FEF-13020 No'lu araştırma projesi olarak destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana destek olan, her konuda yardımlarını esirgemeyip, moralimi yüksek tutmamı sağlayan sevgili arkadaşım, meslektaşım Abdülkadir YURTYAPAN'a teşekkür ederim.

Son olarak bana her koşulda güvenen, maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, çalışmalarım, öğrenim hayatım boyunca beni anlayışla karşılayıp, her zaman destek olan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Begüm AKDUMAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Afinite Kromatografisi.....	1
1.1.1. Matriks Seçimi.....	3
1.1.2. Ligand Seçimi.....	5
1.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi.....	7
1.2.1. İMAK'ın Mekanizması.....	7
1.2.2. İMAK'ın Temel Unsurları.....	8
1.2.3. Destekler, Şelatlayıcı Ligandlar ve Metal İyonları.....	8
1.2.4. İMAK'da Tuz, Çözgen, pH, Tampon, Deterjan ve Katkıların Etkisi..	9
1.3. Alkol Dehidrogenaz Enziminin Yapısı ve Substrat Özgüllüğü.....	10
1.4. Biyoteknolojide Polimerler, Polimerik Materyaller ve Jel Sistemleri...	12
1.5. Kriyojeller.....	14
1.5.1. Biyoayırmada Kriyojeller.....	15
1.6. Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kimyasal ve Cihazlar.....	27
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Poli(HEMA-GMA) Kriyojelinin Hazırlanması	27
3.2.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojeline IDA'nın Bağlanması ve Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılması.....	28
3.3. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Karakterizasyonu.....	28
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri.....	28
3.3.2. ESEM (Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	29
3.3.3. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi.....	29

3.3.4. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojellerinin Şişme Analiz Ölçümleri.....	29
3.4. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojellere Alkol Dehidrogenaz Enziminin Adsorpsiyonu Ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi	29
3.4.1. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi	30
3.4.2. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	30
3.4.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi	30
3.4.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi.....	31
3.4.5. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi.....	31
3.4.6. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenazın Desorpsiyonu ve Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliğini İncelenmesi.....	31
3.5. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Tayini	32
3.5.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	33
3.5.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	33
3.5.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	34
3.5.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	34
3.5.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi	34
3.5.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi	35
3.6. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması.....	35
3.6.1. Protein Tayini.....	35
3.6.2. SDS-PAGE Elektroforezinin Uygulanması.....	36
3.6.2.1. Gümüş Boyama.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. IDA Bağlı Poli(HEMA-GMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu.....	38

4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri.....	39
4.1.2. ESEM (Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	40
4.1.3. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi.....	41
4.1.4. Şişme Analizi Ölçümleri.....	42
4.2. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojeline Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi.....	43
4.2.1 Alkol Dehidrogenaz Enzimi Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	43
4.2.2. Alkol Dehidrogenaz Enzimi Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	42
4.2.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	45
4.2.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi.....	46
4.2.5. Alkol Dehidrogenaz Enzimi Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi.....	47
4.2.6. Adsorpsiyon izotermleri.....	48
4.2.7. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Enziminin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	51
4.3. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Ölçümü.....	51
4.3.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi.....	51
4.3.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	52
4.3.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	53
4.3.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	55
4.3.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi.....	56
4.3.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi.....	57
4.4. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması	58
5. SONUÇ.....	62

KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum persülfat
Arg	Arjinin
Asp	Aspartik asit
Cys	Sistein
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Esherichia coli</i>
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını analizi elektroforezi
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskopu
FTIR	Fourier transform infrared
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
GMA	Glisidil metakrilat
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
His	Histidin
IDA	İminodiasedik asit
IgG	İmmunoglobulin G
IMAK	İmmobilize metal afinite kromatografisi
Lys	Lizin
Magnetit	Fe ₃ O ₄
MBAAm	N-N'-tetrametilenbisakrilamid
Met	Metionin
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit (redükte)
NADHP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte)

PHEMA	poli (hidroksietil metakrilat)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tyr	Tirozin
U	Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite Kromatografisinin Şematik Gösterimi.....	2
Şekil 1.2. Maya Alkol Dehidrogenaz Enziminin Aktif Bölgesinin Moleküler Grafiklenmesi	11
Şekil.1.3. <i>S. cerevisiae</i> Alkol Dehidrogenaz Katalizli NAD ⁺ 'nın NADH'a İndirgenmesi	12
Şekil 1.4. Biyoteknolojide Polimerlerin Kullanım Alanları.....	13
Şekil 1.5. Makrogözenekli Kriyojellerin Oluşumunun Şematik Gösterimi.....	15
Şekil 1.6. İmmobilize Enzimlerin Özelliklerini Belirtmek İçin Enzim ve Desteğin Özellikleri.....	18
Şekil 3.1. <i>S. cerevisiae</i> alkol dehidrogenaz katalizli fenilglioksilik asitin (R)-mandelik asite indirgenmesi (Li vd., 2008).....	32
Şekil 4.1. Şekil 4.1 Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Sentezlenme Basamakları.....	38
Şekil 4.2. A) HEMA-GMA; B) poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojellerinin FTIR Spektrumu.....	39
Şekil 4.3. IDA Bağlı poli(HEMA-GMA) Kriyojellerinin ESEM Fotoğrafları (a, b ve c).....	40
Şekil 4.4. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin EDX Spektrumu.....	41
Şekil 4.5. IDA Bağlı poli(HEMA-GMA) Kriyojelinin Şişme Oranı.....	42
Şekil 4.6. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi.....	43
Şekil 4.7. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Derişiminin Etkisi.....	44
Şekil 4.8. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi.....	45

Şekil 4.9. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi	46
Şekil 4.10. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi.....	47
Şekil 4.11. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonunun Langmuir Adsorpsiyon İzotermi.....	49
Şekil.4.12. Zn ²⁺ ile Şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonunun Freundlich Adsorpsiyon İzotermi.....	50
Şekil 4.13. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine pH'ın Etkisi.....	52
Şekil 4.14. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	53
Şekil 4.15. Serbest Alkol Dehidrogenaz Enzimi için Lineweaver-Burk Grafiği.....	53
Şekil 4.16. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimi için Lineweaver-Burk Grafiği.....	54
Şekil 4.17. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesinin 35 °C'de Zamana Bağlı Olarak Değişimi.....	55
Şekil 4.18. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığı.....	56
Şekil 4.19. İmmobilize Alkol Dehidrogenazın İşlemsel Kararlılığı.....	57
Şekil 4.20. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılmasına İlişkin Gümüşle Boyanmış SDS-PAGE Analizi.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite Kromatografisinin Dalları.....	2
Çizelge 1.2. Ticari Olarak Üretilen Afinite Taşıyıcıları.....	4
Çizelge 1.3. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Bazı Ligand Grupları...	6
Çizelge 1.4. Enzimleri İmmobilize Etmek İçin Kullanılan Yöntemler.....	17
Çizelge 4.1. EDX analizine ilişkin veriler.....	41
Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich İzotermlerinin Kinetik Sabitleri.....	50
Çizelge 4.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenazın Kinetik Sabitleri.....	57
Çizelge 4.4. Maya Alkol Dehidrogenaz Enziminin Zn^{2+} ile Şelatlaştırılmış poli (HEMA-GMA)-IDA Kriyojeli ile Saflaştırılması.....	58
Çizelge 4.5. Alkol Dehidrogenaz Saflaştırılması ile İlgili Çalışmalar.....	60

1. GİRİŞ

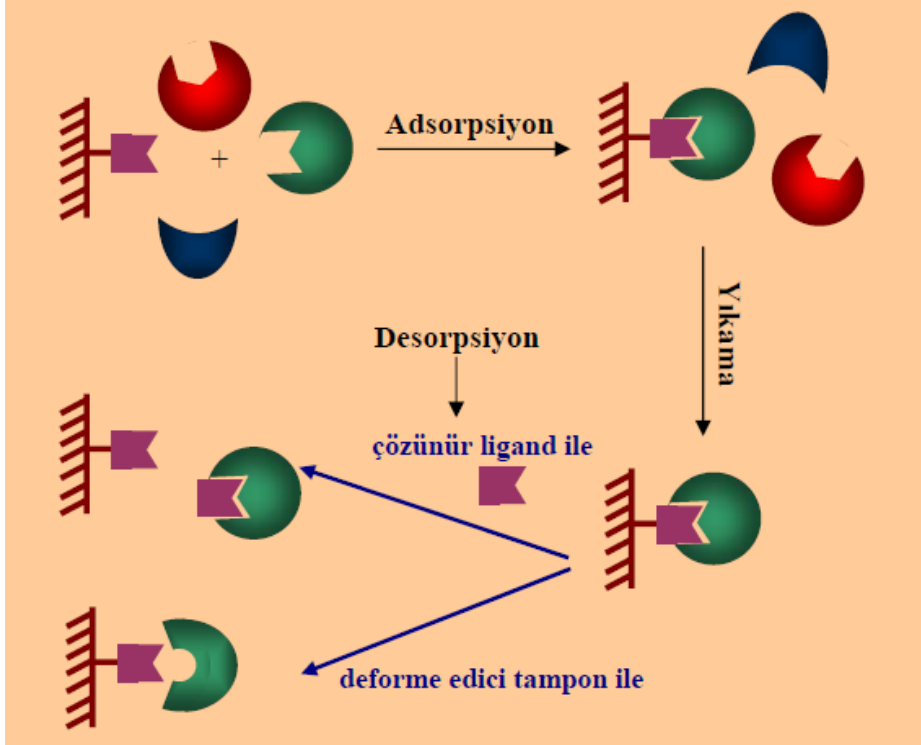
1.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir (Denizli, 2011).

Geleneksel yöntemlerden farklı olarak, bu yöntemde biyolojik moleküller çok seçici olarak biyolojik tanıma özelliğine sahip taşıyıcılar kullanılarak saflaştırılır. Enzimlerin inhibitörleri, substratları, kofaktörleri ve efektörleri ile antibadilerin antijen veya haptenlerle, lektinlerin karbonhidratlarla, nükleik asitlerin nükleotitlerle, hormon ve toksinlerin reseptörlerle, taşıyıcı proteinlerin vitaminler ve şekerlerle oluşturdukları kompleksleri afinite kromatografisine örnek olarak gösterilebilir.

Kısaca, “sorbent” olarak adlandırılan taşıyıcı seçici olmayan etkileşimleri (elektrostatik, hidrofobik, vb.) minimuma indirilmiş, başka bir ifadeyle inert bir malzemeden (genellikle polimerik temelli) üretilmiştir. Taşıyıcı matrikse ayrılması istenen biyolojik molekülleri (protein, enzim, hormon vb.) seçici olarak tanıyan (adsorplayan) “ligand” adı verilen maddeler takılır.

Ligandın kovalent olarak bağlandığı taşıyıcı, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.1’de gösterilmiştir. Ayrılacak olan biyomolekülü içeren ham karışım kolondan geçirilir, afinite ligandı ile seçici etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Daha sonra adsorplanan protein ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık veya üre, guanidin klorür gibi desorbe edici ajanların ilavesiyle) veya ligandın kendi çözeltisi kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dağılma kuvveti, dipol-dipol etkileşimi veya yük-aktarım etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi ligand-protein bağının seçiciliğini ve etkinliğini belirleyen en temel etmendir.



Şekil 1.1 Afinite kromatografisinin şematik gösterimi (Denizli, 2011).

Afinite kromatografisinin farklı yaklaşımlarla türevlendirilmesiyle değişik afinite uygulamaları ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerin çoğu kendine özgü bilimsel isimleriyle kabul edilmektedir. Bu yöntemlerin önemli bir bölümü Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin dalları (Denizli, 2011)

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
➤ Hidrofobik Kromatografi
➤ İmmünoafinite Kromatografisi
➤ Kovalent Afinite Kromatografisi
➤ Metal-Şelat Afinite Kromatografisi
➤ Moleküler Baskılama
➤ Membran Afinite Kromatografisi
➤ Afinite Kuyruk Kromatografisi
➤ Lektin Afinite Kromatografisi
➤ Boya Afinite Kromatografisi

-
- Reseptör Afinite Kromatografisi
 - Zayıf Afinite Kromatografisi
 - Perfüzyon Afinite Kromatografisi
 - Yüksek Performans Afinite Kromatografisi
 - Kütüphane Türevli Afinite Sistemleri
 - Afinite Çöktürme
 - Afinite Kapiler Elektroforez
 - Santrifüj Afinite Kromatografisi
 - Afinite İtme Kromatografisi
 - Tiyofilik Afinite Kromatografisi
-

1.1.1. Matriks Seçimi

Afinite kromatografisinin hızlı gelişmesi ve yaygın kullanımındaki en önemli etmenlerden birisi de istenilen özelliklere sahip taşıyıcıların geliştirilmesi olmuştur. Taşıyıcıların doğru seçilmesi, taşıyıcı ve afinite ligandı arasındaki etkileşim kromatografik ayırmanın belki de en önemli basamağını oluşturmaktadır. Taşıyıcı, immobilize ligand ve afinite gösterdiği biyomolekülün kararlılığı üzerinde de önemli etkiye sahiptir. Katı destek, bazı durumlarda ligand moleküllerini içeren doğal ortamın kendisi de olabilir (örneğin, lektinlerin saflaştırılması için polisakkaritlerin taşıyıcı olarak kullanılması gibi). Çok sayıda farklı türde taşıyıcı ticari olarak piyasada mevcuttur (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Ticari olarak üretilen afinite taşıyıcıları (Denizli, 2011)

Ticari İsmi	Malzeme	Partikül Çapı (µm)	Mevcut Ligandlara Örnekler	Aktive Edilmiş Formu Var mı?	Üretici
Sepharose HP	Agaroz	34	Protein A, heparin, Cibacron Blue	Evet	Amersham Biosciences
Sepharose FF	Agaroz	90	Protein A, heparin, Cibacron Blue	Evet	Amersham Biosciences
Mimetic series	Agaroz	105	Sentetik ligandlar	Hayır	Prometic Biosci/ACL
Affi-Gel	Agaroz	150-300	Protein A, heparin, Cibacron Blue	Evet	Bio-Rad Laboratories
Sepharose Big Beads	Agaroz	200	IMAC	Hayır	Amersham Biosciences
Cellthru Big Beads	Agaroz	400	Cibacron Blue, heparin, IMAC	Evet	Sterogene
TSK-Gel	Polimetakrilat	10	Boronat, IMAC, heparin	Evet	TosoHass/Supelco
Affi-Prep	Polimetakrilat	10-50	Protein A, polymyxin	Hayır	Bio-Rad Laboratories
SigmaChrom AF	Polimetakrilat	20	Protein A, IMAC, Cibacron Blue	Hayır	Supelco
Fractogel	Polimetakrilat	30-65	IMAC, heparin	Evet	Merck
ProteinPak	Silika	40	Yok	Evet	Waters
Bakerbond	Silika	40	Yok	Evet	J. T. Baker
Trisacryl	Poliakrilamid	60-200	Cibacron Blue, Basiline Blue	Hayır	BioSeptra/Pall
Affi-Gel 601	Poliakrilamid	Belirtilmemiş	Boronat	Hayır	Bio-Rad Laboratories
Cellufine	Selüloz	85-170	Heparin, IMAC, jelatin	Evet	Chisso/Amicon/Milipore

Taşıyıcı aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

- Çözünmemelidir.
- Uygun geçirgenliğe ve büyük iç yüzey alanına sahip olmalıdır.
- Yüksek sertliğe ve uygun partikül şekline sahip olmalıdır.
- Seçici olmayan adsorpsiyon miktarı düşük olmalıdır.
- Afinite ligandının yapıya takılabilmesi için fonksiyonel gruplar içermelidir.
- Ligand immobilizasyonu, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarında kimyasal olarak kararlı olmalıdır.
- Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dayanıklı olmalıdır.
- Hidrofilik karakterde olmalıdır.

1.1.2. Ligand Seçimi

Afinite kromatografisinde kullanılacak bir ligandın iki önemli özelliği taşıması gerekir.

- Saflaştırılacak protein ile seçici ve tersinir bir kompleks oluşturmalıdır.
- Taşıyıcıya bağlanmasını sağlayacak fonksiyonel gruplar içermelidir.

Bu iki koşulu sağlayan çok sayıda ligand mevcuttur. Afinite kromatografisi ilkelerinin pratiğe uygulanmasında kullanılabilen büyük çeşitlilik, yöntemin etkinliğini belirler. Bu etkinliği sağlayan faktörler şunlardır:

- İstenilen amaca göre kullanılabilen ligandların çeşitliliği,
- Grup-seçici ligandların kullanımı,
- Bir proteinin saflaştırılması için kullanılabilen ligandların çeşitliliği.

Ligandlara örnekler Çizelge 1.3'te verilmiştir. Afinite ligandları oldukça farklı türlerde maddeler olabilir. Proteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin yanı sıra daha düşük molekül ağırlıklı bileşikler de afinite ligandı olarak kullanılabilir. Ayrıca herhangi bir biyolojik işlevi olmayan basit moleküllerin de kullanımı mümkündür.

Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand grupları (Denizli, 2011)

Uygulama Alanı	Ligand
Enzimoloji (enzimler, inhibitörler, kofaktörler)	Enzimler, substratlar ve analogları, ürünleri, inhibitörleri, allostarik efektörleri, kofaktörler, antibadiler, biyolojik işlevi olmayan maddeler
Peptidler	Enzimler, antibadiler
İmmünoloji	Haptenler, antijenler, antibadiler
Protein kimyası (reseptörler, taşıma proteinleri, glikoproteinler)	Hormonlar, vitaminler, steroidler, lektinler, lipidler, antibadiler, mono-ve polisakkaritler
Nükleik asitler, nükleotidler	Nükleik asit bazları, nükleozidler, oligonükleozidler, dihidroksiboril türevleri
Hücre ve virüslerin izolasyonu	Antijenler, antibadiler, lektinler, hormonlar

Afinite ligandları seçicilik ve kapasite bakımından oldukça geniş bir dağılıma sahiptirler. Antijen-antibadi etkileşimi gibi yüksek afiniteli etkileşimler ve enzim substrat etkileşimleri gibi daha düşük afiniteli etkileşimler afinite kromatografisinde kullanılabilir.

Dar bir seçicilik aralığına sahip ligandın veya çok seçici bir ligandın kullanılması yüksek etkinlik ve saflıkta tek bileşiğin saflaştırılmasına olanak verir. Bu aynı zamanda saflaştırılacak her madde için özel bir ligand-matriks bileşimi gerektireceğinden bir dezavantajdır. Dolayısıyla grup-seçici ligandlar çok daha büyük pratik öneme sahiptir (Denizli, 2011).

1.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi

İlk olarak Porath vd. (1975) tarafından önerilen immobilize metal afinite kromatografisi (IMAK) fikri, Zn(II), Cu(II), Ni(II), ve Co(II) gibi geçiş metal iyonlarının sulu çözeltilerdeki afinitesine dayanır. Bu teknik sulu çözeltilerdeki proteinleri fraksiyonlamak ve saflaştırmak için bir desteğe immobilize edilmiş metal iyonlarının kullanılması tasarlanarak geliştirilmiştir. Porath vd. (1975) agaroz metal iyonlarını immobilize etmek için iminodiasetik asidi (IDA) kullanılmıştır. Proteinler, yüzeylerinde bulunan sistein, histidin ve triptofan gibi belli amino asit birimleri vasıtasıyla metal iyonu koordinasyon bölgelerine spesifik olarak bağlanabilir. Bunun en iyi bilinen uygulaması histidin etiketlenmiş füzyon proteinlerinin saflaştırılmasıdır. Son yıllarda IMAK, tetrasiklinler, kuinolonlar, makrolidler, β -laktamlar ve aminoglikozidler gibi ilaçların tanınması için örneklerin ön işlem görmesinde, yüzeyi arttırılmış lazer desorpsiyon/ionizasyon da kütle spektrometrisi ile birlikte çalışırken hastalıkların teşhisinde, serum, idrar ve dokulardaki biyomarkerların belirlenmesi için ön işlemlerde ve kütle spektrometrisi analizinden önce IMAK ile fosfoproteinlerin zenginleştirilmesinde birçok uygulama alanı bulmuştur (Cheung vd., 2012).

1.2.1. IMAK'in Mekanizması

IMAK'de, protein adsorpsiyonu, immobilize metal iyonu ve protein yüzeyinde bulunan elektron verici gruplar arasındaki etkileşime dayanır. Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) ve Fe(III) gibi iyonları kapsayan geçiş metal iyonları, en sıklıkla kullanılan metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlı olan şelatlayıcı bileşiklerdeki elektron verici atomlar (N, S ve O) metal iyonları ile koordinasyona girebilir ve metal şelatları üretebilirler. İki dişliden beş dişliye kadar olabilen şelatlayıcı bileşikler, oluşan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak adlandırılır. Kalan metal koordinasyon bölgeleri genellikle su veya tampon molekülleri ile doldurulur ve bunlar daha sonra protein yüzeyindeki elektron verici gruplarla yer değiştirir. Proteinlerin amino uçlarının yanısıra bazı amino asitler özellikle yan zincirlerindeki elektron verici atomlarından dolayı bağlanma için uygundur. Glu, Asp, Arg, Lys, Tyr, His, Cys ve Met'ini içeren çok sayıdaki birim bağlanma işlemine katılabilesine rağmen IMAK'de asıl protein bağlanması, histidin birimlerinin varlığı ile belirlenir (Arnold, 1991; Sulkovski, 1989).

1.2.2. İMAK'ın Temel Unsurları

Bir çok protein, metal iyonları ile kompleks oluşturabilir. İMAK bu şelatlaşmış komplekslerin birçoğunun saflaştırılması için kullanılabilir. Komplekslerin gücü birinden diğerine farklılıklar gösterir ve bu İMAK'a yüksek özgüllük sağlar. İMAK'de kullanılan kromatografik destek, bir bağlayıcı ile bağlanmış şelatlayıcı ligandı içeren bir matriksten oluşur. Metal iyonlarının eklenmesi üzerine, metal iyonları şelatlayıcı ligand ile kompleks oluşturacaktır. Metal iyonlarının bazı koordinasyon bölgeleri protein veya çözgenin bağlanması için boş kalır (Kagedal, 2011). Hedef proteinin elüsyonu şu şekilde gerçekleştirilebilir:

- 1) Düşük pH'a sahip bir tampon
- 2) Yarışmalı yer değiştirici bir ajan
- 3) Şelatlayıcı ajanlar

Düşük pH'a sahip elüsyon tamponları sıkça kullanılır. Histidin biriminin imidazol halkasının pK_a değeri yaklaşık 6,0'dır ve bu imidazol grubu pH yaklaşık olarak 4,0'e düştüğünde protonlanacaktır. Bu koşullar altında, protonlanmış imidazol halkası metal iyonlarına bağlanmayacaktır ve bu şekilde elüsyon gerçekleşecektir. Nötral pH civarında imidazol ile yer değiştirici bir ajan, proteinler düşük pH'a duyarlı olduğundan daha uygundur. EDTA gibi güçlü bir şelatlayıcı ajanın kullanılması hedef proteinin elüsyonunu kolaylaştırır. EDTA metal iyonlarını tutar ve proteinler ve şelatlayıcı ligandlar arasındaki etkileşimi bozar. Dolayısıyla sonraki saflaştırma işleminden önce metal iyonları ile kolonun yeniden yüklenmesi gereklidir (Chage, 2001).

1.2.3. Destekler, Şelatlayıcı Ligandlar ve Metal İyonları

Farklı yetenekleri ve sınırlamaları nedeniyle çok çeşitli İMAK destekleri geliştirilmiştir. Geleneksel destekler, agaroz gibi yumuşak jel matriksi temellidir. Polisakkaritler, örneğin selüloz biyolojik uygunluk avantajına sahiptir ve aktivasyona hazırdır. Bununla birlikte düşük mekanik güce sahiptir ve dolayısıyla yüksek basınçlı sistemlerde kullanılamaz. Aksine silika gibi inorganik destekler muhteşem mekanik özelliklere sahiptir fakat proteinlerin geri dönüşümsüz non-spesifik adsorpsiyon sınırlamasına sahiptir.

Dörtlü şelatlayıcı ligandlar, metal iyonları için üçlü olanlardan daha yüksek afiniteye sahiptirler fakat koordinasyon bölgelerinden birini kaybettikleri için daha düşük protein bağlanma kabiliyeti gösterirler. Bu durum beş dişli şelatlayıcı ligandlarda daha belirgindir. Bunlar, Ni(II) iyonlarının altı koordinasyon bağından birini proteinlerin bağlanması için bırakabilir ve beşini işgal edebilir.

IMAK reçinelerine bir proteinin afinitesi, büyük oranda koordinasyona katılan metal iyonlarına bağlıdır. IDA şelatlayıcı ligandlarının farklı metal iyonlarına afinitesi şu şekildedir: $Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) \geq Co(II)$ (Hovath ve Nagydiósi, 1975). Nitriloasetik asit gibi dört dişli şelatlayıcı ligandlar güçlü bir şekilde Cu(II) ve Ni(II) iyonlar ile şelatlaşır.

1.2.4. IMAK’de Tuz, Çözgen, pH, Tampon, Deterjan ve Katkıların Etkisi

Katotropikler, tuzlar, organik çözgenler, deterjanlar ve indirgeyici ajanlar gibi çeşitli kimyasallar ile IMAK matrikslerinin kullanılabilirliği, spesifik proteinlerin saflaştırılması için özel gereksinimlere olan ihtiyacı kolaylaştırır. IMAK’de tamponlar içerisinde 0,3-1,0 M aralığında NaCl kullanmak, proteinler ve reçineler arasındaki iyonik etkileşimleri minimize etmekte sıkça kullanılır. Gliserol (% 50’ye kadar) veya etanol (% 20’ye kadar) proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri önlemek için tampona eklenebilir. Ana maddelerin bulunduğu bir durumda hedef proteinin saflaştırılmasında 8,0 M’lık veya 6,0 M’lık guanidinyum klorür gibi denatüre edici ajanları içeren tamponlar, IMAK’de yararlı olabilir. Ayrıca hafif alkali bir pH’a sahip yükleme tamponu genellikle kullanılır. Bu protein yüzeyindeki elektron verici grupların bu pH’da unprotonlanmış olması ve bağlanmayı kolaylaştırması nedeniyledir.

Bu alkali pH aralığında, protein yüzeyindeki diğer amino fonksiyonel gruplarına bağlanma daha kolaydır ve bu seçiciliği azaltacaktır. Fosfat ve asetat tamponları, şelatlanmış metal iyonlarının koordinasyon bölgelerine bağlanmadığından en yaygın kullanılan tamponlardır. IMAK, çok sayıda non-iyonik deterjan ile uyumludur. Deterjan ilavesi seçiciliği arttırarak, tüm tamponların performansını ve verimini geliştirir (Cheung vd., 2012).

1.3. Alkol Dehidrogenaz Enziminin Yapısı ve Substrat Özgüllüğü

Alkol dehidrogenaz, mikroorganizmalarda ve hayvanların karaciğerinde bol miktarda bulunan bir enzimdir. Alkol metabolizmasını içeren çeşitli fizyolojik olaylarda önemli bir role sahiptir. Alkol dehidrogenaz enzimleri alkollerin yükseltgenmesini, aldehit ve ketonlar gibi bileşiklerin indirgenmesini katalizler.

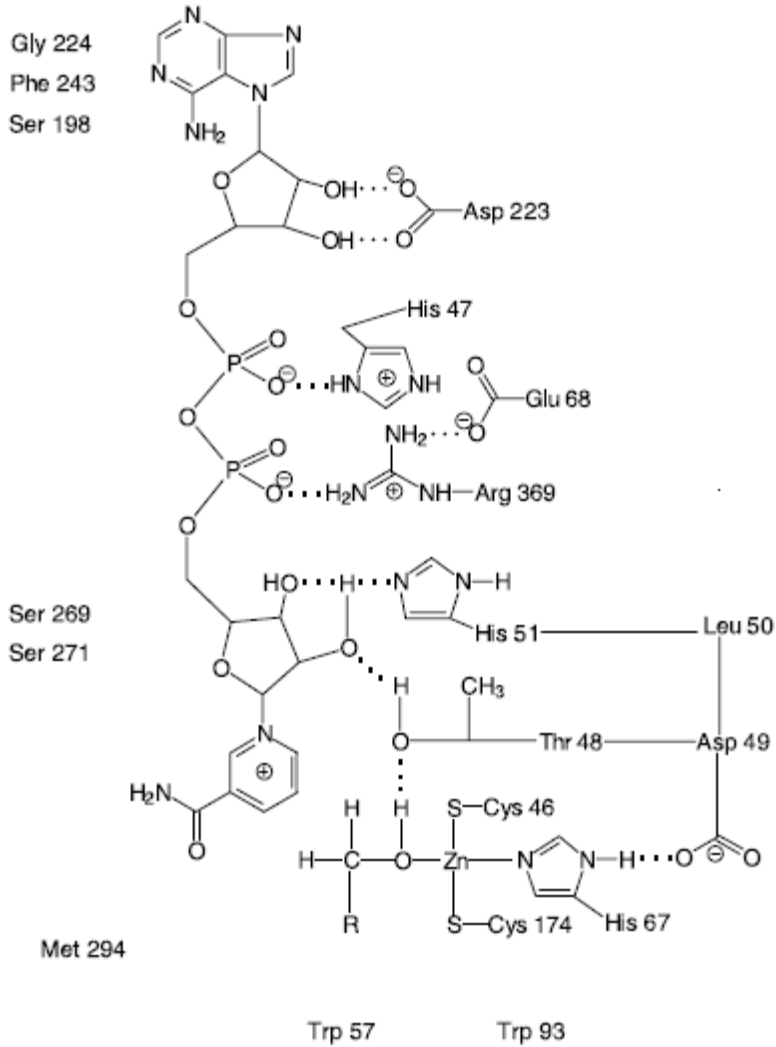
Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), alkol dehidrogenaz enzimi için iyi bir kaynaktır. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enzimi (EC 1.1.1.1) AD1, AD2 ve AD3 olarak adlandırılan 3 izoenzime sahiptir.

AD1 fermentasyon sırasında baskın olan temel form, AD2 glukoz tarafından repress edilen sitoplazmik form, AD3 mitokondride bulunan formdur. AD1, ekmek mayasının gelişiminde alkol dehidrogenaz aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludur.

Maya alkol dehidrogenaz 1 (AD1) izoenzimi, her biri 347 amino asit içeren ve 36 kDa molekül kütleli 4 özdeş alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt birim, kataliz için gerekli olan bir koenzim bağlanma bölgesine ve sıkıca bağlı bir çinko atomuna sahiptir. Katalitik bölge (Cys-46, His-67 ve Cys-174), bu çinko atomuna ligandlar sağlar. İkinci bir çinko atomu, 97, 100, 103 ve 111 numaralı sistein birimlerinin kükürt atomlarıyla tetrahedral düzende koordinasyona katılmıştır. Bu çinko atomu sadece yapısal role sahiptir.

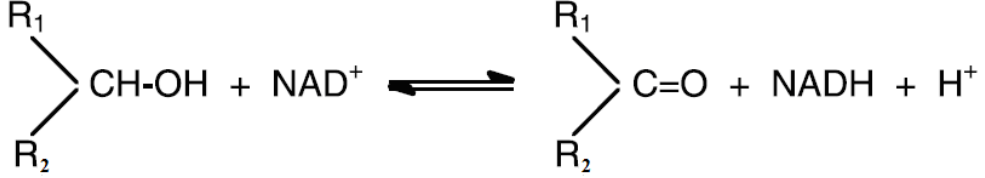
Maya alkol dehidrogenazının alt üniteleri katalitik ve koenzim bağlama bölgesi olmak üzere iki kısma sahiptir. Bu iki bölge farklı büyüklükte olup katalitik kısım tüm amino asitlerin 3/5'ini, koenzim bağlama kısmı 2/5'ini içerir. Bu kısımlar substrat ve koenzimin nikotinamid ucunu tutan derin bir cebi içeren bir yarıkla ayrılır. Bir bölgeye koenzim bağlanır ve diğer bölge substrat özgüllüğünü kontrol eden grupların çoğunu içerdiği gibi katalitik çinkoya ligandlar sağlar. Maya alkol dehidrogenazının aktif bölgesi Plapp vd. (1990), tarafından moleküler grafikleme ile şematik olarak çizilmiştir ve bu Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Katalizin gerçekleşmesi için enzimin aktif bölgesine bir substrat ve koenzim molekülünü üreten bir madde bağlanması ve bunların arasında bir hidrür transfer reaksiyonunun gerçekleşmesi gerekir. Adenozin bağlama bölgesine çözüldüden kolayca ulaşılabilirken nikotin bağlama bölgesi proteinin içine gömülü olarak merkezde bulunur. Enzimin primer yapısındaki çeşitli

amino asitler, substratın ve koenzimin bağlanmasından ve katalizinden sorumludur.



Şekil 1.2. Maya alkol dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinin moleküler grafiklenmesi (Plapp vd., 1990).

Maya alkol dehidrogenaz enzimi Şekil 1.3'deki geri dönüşümlü redoks reaksiyonunu katalizler. Alkol dehidrogenaz ile katalizlenen bu temel reaksiyon prensipte çok basittir. Bir alkol grubu, hidroksil grubundan bir protonun uzaklaştırılmasıyla oksitlenir ve hidroksil grubuna komşu karbon atomundan bir hidrür iyonu NAD^+ 'e transfer edilir (Leskovac vd., 2002).

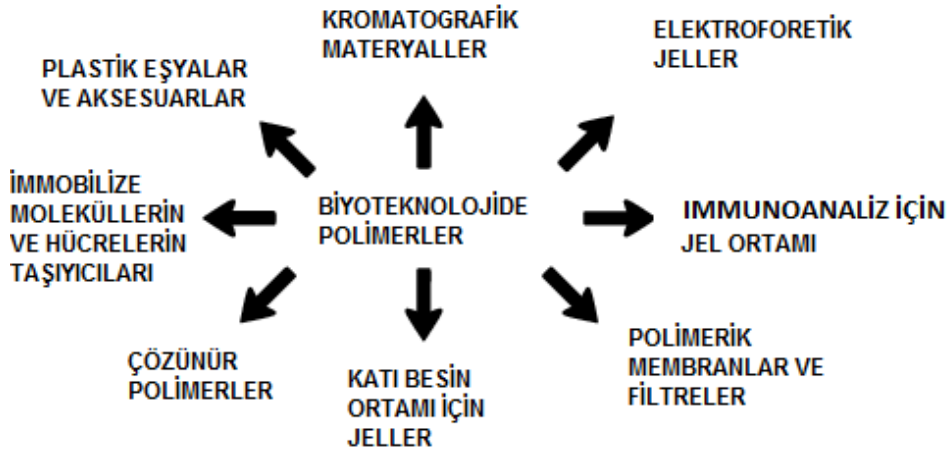


Şekil 1.3. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz katalizli NAD^+ 'nın NADH 'a indirgenmesi.

Şekil 1.3'de gösterilen reaksiyon dengesi nötral pH'da sola doğru kayar. Maya alkol dehidrogenaz enziminin substrat özgülüğü, birincil dallanmamış alifatik alkollerle sınırlıdır ve yan zincirdeki herhangi bir dallanma enzimin aktivitesini azaltır. İlaveten bu metanol aktivitesi, benzer koşullardaki etanol aktivitesinin yalnızca % 0,07'si kadardır. Bu enzim NAD^+ 'yı kullanarak metanolü formaldehit ve NADH 'a oksitleyebilir fakat bu enzimatik reaksiyon, birçok yan reaksiyonun karışması nedeniyle oldukça komplekstir (Kaya, 2012).

1.4 Biyoteknolojide Polimerler, Polimerik Materyaller ve Jel Sistemleri

Biyoteknolojide polimerik materyaller ve onun ürünleri gibi çeşitli polimerler (doğal veya sentetik) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar çeşitli plastik eşyalar (özellikle gemiler, boru sistemleri, tabaklar ve çeşitli aksesuarlar), bazı çözülebilir polimerler (örneğin, iki fazlı polimer sistemlerinin hazırlanması için), çeşitli kromatografik reçineler, immobilize biyokatalizörler (enzimler, hücreler) veya imünoaktif türler için polimerik taşıyıcılar, elektroforez, izoelektrik fokuslama veya iminodifüzyon için jel ortamı, katı besin ortamı için jeller olarak sıralanabilir (Lozinsky, 2008).



Şekil 1.4. Biyoteknolojide polimerlerin kullanım alanları (Lozinsky, 2008).

Şekil 1.4’te sunulan örneklerin çoğu, makromoleküllerin kararlı bağlar ile üç boyutlu bir ağ yapısı içinde birleştirildiği uzaysal olarak yapısallaşan “polimer+immobilize çözgen” sistemleri olan polimerik jeller (kolloid kimya açısından liyojeller) olarak adlandırılırlar. Biyoteknolojik işlemlerde (iyon-değişim matriksleri, jel geçirgenlik kromatografisi için taşıyıcılar ve biyoafinite sorbentleri gibi) kullanılan kromatografik matrikslerin çoğu jellerdir. Enzim ve hücre immobilizasyonu üzerine yazılmış çalışmaların büyük bir kısmı çözünmeyen taşıyıcı olarak çok çeşitli polimerik jellerin kullanımını tanımlamaktadır.

Poliakrilamid veya agaroz jeller kullanarak proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyopolimerlerin elektroforetik ayrımı en popüler analitik metotlardan birisidir. Katı jel besinsel ortamlar (genelde agar ve agaroz temelli) mikrobiyologlar, genetik mühendisleri, hücre biyologları, virologlar vs. için rutin çalışma araçlarıdır. Bu sebeple, jel sistemler ve ilgili polimerik materyaller üzerine olan ilgi hem uygulamalı hem de bilimsel alanda sürekli artmaktadır.

Uzaysal ağ yapısının düğümlerindeki bağların tipine bağlı olarak jeller kimyasal çapraz bağlı (veya kovalent) jeller, iyonik (koordinatif) bağlı (veya iyonotropik) jeller, fiziksel (veya kovalent olmayan) jeller ve jel sisteminin kararlılığı için sorumlu çeşitli tiplerde bağlar içeren jeller olmak üzere sınıflandırılırlar (Lozinsky, 2008).

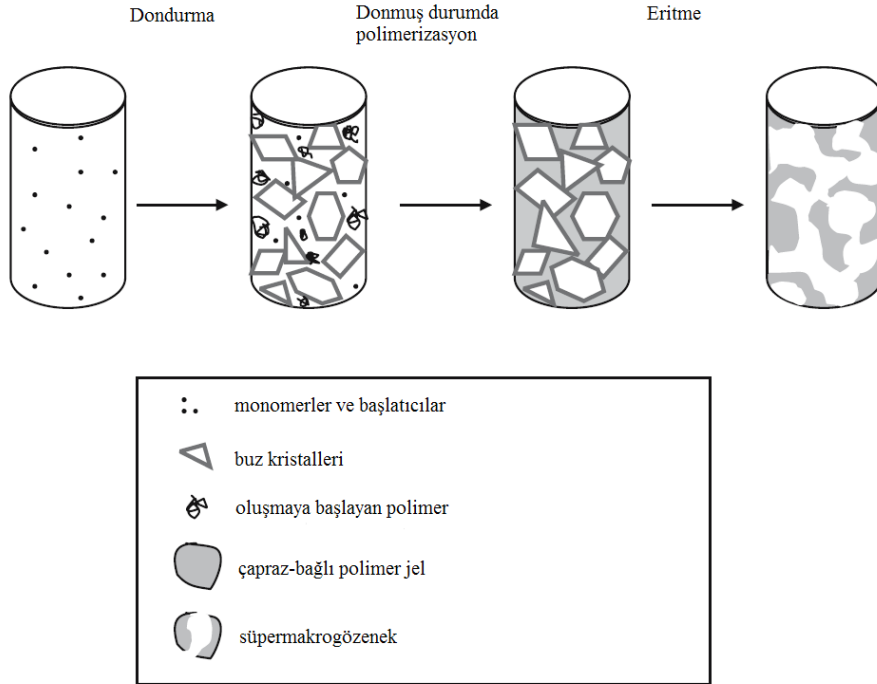
Ağ yapısı morfolojisine bağlı olarak, jel sınıflandırılması homofaz ve heterofaz sistemler olmak üzere ayrılırlar ve sırasıyla birinci ve ikinci tip jeller olarak adlandırılırlar. Burada sadece gözenek boyutu değil, aynı zamanda geniş gözenekler ile birbirinden ayrı veya içten bağlı yapıdaki gözenek morfolojisi önemli bir parametredir. Bu parametre aynı zamanda jelin spesifik uygulama problemlerinin çözümü için uygulanabilirliğini belirlemektedir. Bu açıdan bakıldığında, makro gözenekli ve süpermakro gözenekli polimerik kriyojeller çok geniş gözenekleri sebebiyle ikinci tip jel sistemleri olarak sınıflandırılırlar ve bu yüzden kriyojeller üzerindeki bu gözenek ve heterofaz karakteri birbirleri ile yakından ilişkilidir (Lozinsky, 2008).

1.5. Kriyojeller

Kriyojel Yunanca'da donma veya buz anlamındadır. Kriyotropik jelleşme kromatografik uygulamalarda makro gözenekli jelleri oluşturmak amacıyla kullanılır. Polimer bilimi bütünüyle incelendiğinde kriyojel tipindeki materyaller bir süredir bilinmektedir ancak, onların biyoteknolojik uygulamalardaki potansiyelleri son zamanlarda kullanım bulmuştur. Dolayısıyla hidrofilik kriyojeller özellikle teknolojik iddialı biyoayırma proseslerinde ve yüksek verimli analizlerin uygulamaları için spesifik olarak tasarlanmıştır (Dainiak vd., 2007).

Kriyojeller, kriyojelleşme reaksiyonunun hızı ve çözgen kristalizasyonunun hızının kontrol edilmesi ile istenilen özelliklerde hazırlanabilir.

Tipik olarak kriyojeller, büyüyen buz kristallerinin porjen olarak ve erimeden sonra içten bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandığı -10 ile -20 °C aralığındaki düşük sıcaklıklardaki sulu çözeltilerde hazırlanır. Tepkime karışımı buz kristalleri ve donmayan sıvı mikrofaz olarak adlandırılan donmamış bölgeyi içeren iki temel kısımdan oluşur. Kimyasal tepkime bu donmayan sıvı mikrofazda gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözgen kristalleri donma sırasında büyür ve sürekli iskelet sistemi oluşuncaya kadar diğer kristaller ile kaynaşır. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra erime ile sürekli makrogözenekli kanallara sahip bir sistem oluşur (Dainiak vd., 2007).



Şekil 1.5 Makrogözenekli kriyojellerin oluşumunun şematik gösterimi (Dainiak vd., 2007).

1.5.1. Biyoayırmada Kriyojeller

Kromatografi hem analitik hemde geniş skalalı işlemlerde downstream (aşağıya doğru) ayırmalarda en etkili yöntemdir. Geleneksel sabit durgun fazlı yatak kromatografisi eşsizliği ve yüksek ayırma gücüne rağmen, büyük sınırlamalara sahiptir. Örneğin hücre süspansiyonu ve tam berraklaşmamış hücre homojenatlarındaki gibi partikül içeren sıvılardaki yetersizliği. Partiküllü materyaller, kromatografik taşınma sırasında kürecikler arasına sıkışarak kolonun akış direncini arttırmaları ve akışın durmasına sebep olurlar. Bu dezavantajı yenmek için genişletilmiş yatak kromatografisi önerilir. Bununla birlikte genişletilmiş yatak kromatografisi özel tipteki kolona ve araçlara ihtiyaç duyan ve geleneksel dolgulu yatak kromatografisi sistemlerine uygun değildir. Dolgulu yatak kromatografisinin taşıyıcıları hücre kalıntılarını hatta tüm hücrelerin taşınması için yeterli genişlikteki gözeneklere sahip olması ve akışı engellememeleri nedeniyle oldukça dikkat çekicidir. Kriyojellerin gözenekleri,

süpermakro gözenekli kromatografik materyaller arasında kriyojellerin çok uygun adaylar olmalarını sağlar (Lozinsky, 2008).

1.6. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimler, ılımlı ve çevreyle dost koşullar altında çok çeşitli ürünleri elde etmek için farklı proseslerin tasarlanmasında mükemmel özelliklere (aktivite, seçicilik, özgüllük) sahiptirler. Geleneksel kimyasal yaklaşımlarla karşılaştırıldığında biyokatalizörlerin kimyasal, ekonomik ve sosyal avantajları uzun zamanlardan beri sunmalarına rağmen, endüstriyel üretim işlemlerindeki uygulamaları modern biyoteknolojideki son buluşlara kadar önemli oranda ihmal edilmiştir.

Son yıllarda biyoteknoloji antibiyotikler, rekombinant proteinler, aşılardan ve monoklonal antikorları içeren eczacılık sektöründe küçük moleküllerin sentezinde zorunlu bir araç olarak ortaya çıkmıştır (Miletic vd., 2012).

Enzim immobilizasyonu ilk olarak, maliyeti yüksek olan enzimlerin yeniden kullanılmasına olanak sağladığı için başlamıştır. Bunu gerçekleştirmek için ilk teşebbüsler geçen yüzyılın ilk kısımlarında tanımlanmıştır (Hedin, 1915), fakat bu girişimlerde kömüre adsorplanan enzimlerin çok kararsız olduğu görülmüştür. 1950'li yıllarda çeşitli araştırmacılar diğer destek materyallerine enzimleri immobilize etmeye başlamışlardır (Micheel ve Ewers, 1949; Grubhofer ve Schleith, 1954). Menecke ve Singer (1960) polimer destekler üzerinde daha kararlı immobilize enzim sistemleri hazırlamayı başaran ilk araştırmacılar olmuştur. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulamaları optikçe saf amino asitlerin üretimi (Tosa vd., 1969) ve penisilin G'nin hidrolizidir (Carleymith ve Lilly, 1979). O zamandan beri enzimlerin immobilizasyonu ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Miletic vd., 2012).

Enzimlerin immobilizasyonunun temel avantajları aşağıdaki gibidir;

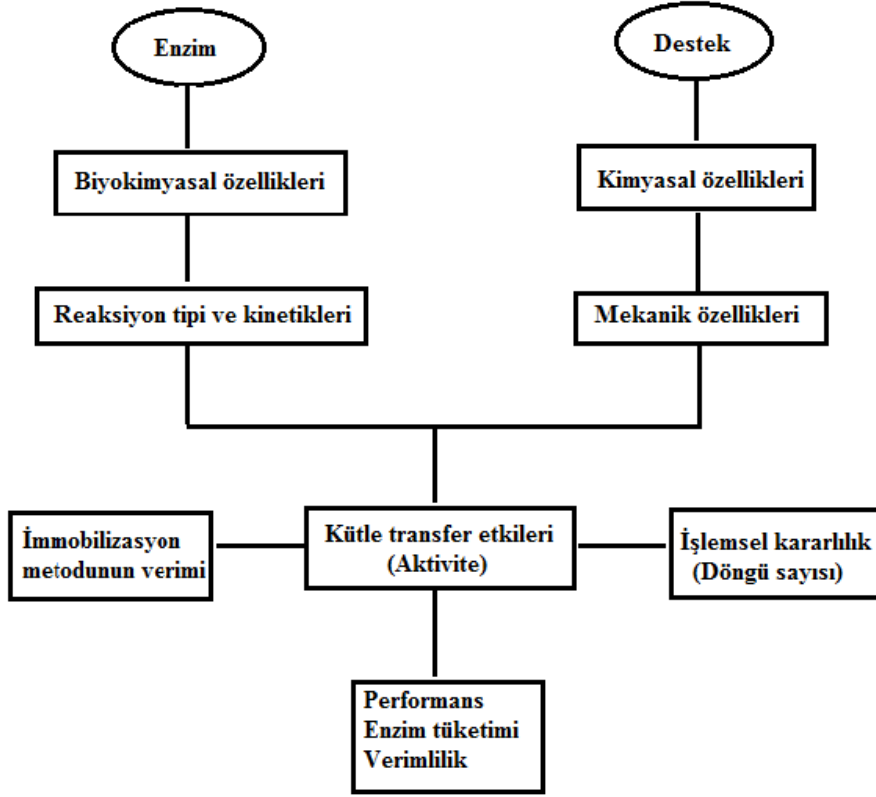
- Organik çözügenlerde enzim aktivitesinde artış görülür.
- Sıcak stabilitesi artar.
- Depo kararlılığı artar.
- Enantioseçicilik artar.
- İmmobilize enzim kullanıldıktan sonra filtrasyon veya santrifüjlenme ile kolaylıkla ayrılabilir.
- Farklı reaksiyonlarda bile enzimler defalarca kullanılabilir.

Enzimleri immobilize etmek için farklı yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler Çizelge 1.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 1.4. Enzimleri immobilize etmek için kullanılan yöntemler (Miletic vd., 2012)

Non-Kovalent Bağlanma	Destek maddelerine adsorplanan veya iyonik bağlanma Enzim kristalizasyonu Dağıtıcı enzimler (organik çözümlerde kurutulmuş enzim tozları gibi)
Kovalent Bağlanma	Ön işlem görmüş destek maddelerine bağlanma Çapraz bağlanma
Tutuklama	Polimerik ağ yapısı içinde tutuklama Membranda tutuklama

İmmobilize bir enzim hazırlamanın niteliklerini, hem enzimin hemde destek materyalinin özellikleri belirler. Bu ikisi arasındaki etkileşim spesifik kimyasal, biyokimyasal, mekaniksel ve kinetik özelliklere sahip immobilize bir enzim elde edilmesini sağlar (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. İmmobilize enzimlerin özelliklerini belirlemek için enzim ve desteğin özellikleri (Tischer ve Wedekind, 1999).

Molekül kütlesi, yüzeyindeki fonksiyonel gruplar ve saflığı gibi enzimin biyokimyasal özellikleri immobilizasyon için önemli faktörlerdir. Enzimin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, destek ve enzim arasında ne tür etkileşimler olabileceği hakkında bilgi verir. Aynı zamanda safsızlıklar substratı engelleyebileceğinden enzimin saflığı önemlidir.

İmmobilize enzimlerin davranışını belirleyen diğer enzim özellikleri, enzimlerce katalizlenen reaksiyonların tipi ve kinetikleridir. pH, sıcaklık, çözenler ve safsızlıklara karşı enzimlerin aktivite , inhibisyon ve kararlılık davranışlarını incelemekte kullanılan spesifik aktiviteler ve kinetik parametreler immobilize enzimler için de önemli parametrelerdir.

Destek materyalinin özellikleri de immobilize enzimlerin özelliklerini belirlemekte çok önemlidir. Desteğin en önemli özelliklerinden biri enzimlerle etkileşimini belirleyecek olan kimyasal yapısıdır.

Destek materyali büyük oranda gözenekli ise gözenek boyutu ve dağılımı immobilize enzimin özelliklerini belirlemede çok önemli rol oynayacaktır. Küçük gözenek boyutu, difüzyon sınırlamasına sebep olur ve enzimin inaktivasyonuna sebep olur. Bununla birlikte çok geniş gözenekler enzimlerin kümelenmesine sebep olabilir ve bu da aktivite kaybına sebep olur (Miletic vd., 2012).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Porath 1975 yılında “immobilize metal afinitesi” terimini ortaya koymuş ve bir protein molekülünün metal afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak saflaştırılabileceğini gözlemiştir. O, katı bir destek üzerine metal iyonunu immobilize etmek için şelatlayıcı bir ajanın kullanımının protein-metal etkileşimlerinin serbestlik derecesini azaltacağı ve bu kısıtlama ile hem proteinlerin saflaştırılmasının sağlanacağı hem de denatürasyonun azalabileceğini ve enzimin aktivitesini koruyabileceğini rapor etmiştir. Porath’tan bu yana IMAK ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara örnekler şöyledir;

Arevalo vd. (2000), iminodiasetik asit-Cu bağlı iyon değişim reçinelerini kullanarak sığır serum albümin ve α -laktalbumin adsorpsiyonunu araştırmışlardır. Bu amaçla bir iminodiasetik asit reçinesini (Lewatit TP-207) bakır iyonları ile doyummuşlar ve bu iki proteinin alıkonma kapasitelerini test etmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar kolonda denge analizlerini gerçekleştirmişler ve denge kinetiklerini belirlemişlerdir.

Zou vd. (2001), bir kolon içerisinde makrogözenekli poli(glisidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) monolit yapılarını serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Daha sonra monolitlerin epoksit gruplarına IDA bağlayarak Cu^{2+} iyonları ile şelatlaştırmışlar ve albümin ve lizozim proteinlerinin adsorpsiyonunda kullanmışlardır.

Vançan vd. (2002), Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ve Co^{2+} iyonları immobilize edilmiş IDA-Sepharoz kolonlarını kullanarak farklı tampon çözeltilerinde insan IgG proteininin adsorpsiyonunu araştırmışlardır. Onlar kullanılan tampon türlerine bağlı olmaksızın yüksek miktarda IgG adsorpsiyonu gözlemişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar MOPS-imidazol tampon sistemini kullanarak Sepharoz 6B IDA- Cu^{2+} kolonunu kullanarak IgG proteinini saflaştırmışlardır.

Follmer vd. (2004), kobalt yüklü IDA-Sepharoz kolonunu kullanarak jack bean’den üreazın izoenzimlerinin saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca bu izoenzimlerin üreolitik aktivitesi dışında ürektisidol özelliklerini de araştırmışlardır.

Wu vd. (2006), makrogözenekli kitosan tabakası ile silika jel küreleri kaplamışlar ve Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonları ile şelatlaştırarak tripsin immobilizasyonunda kullanmışlardır. Maksimum tripsin yüklemesini Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış küreler ile elde etmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca immobilize tripsinin kinetik özelliklerini incelemişlerdir.

Liou vd. (2008), poli(HEMA) mikrokürelerini, HEMA ve EGDMA'nın süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlamışlar ve Ni^{2+} iyonları ile şelatlaştırmışlardır. Daha sonra bu desteği poli(His) ile etiketlenmiş D-hidantoinaz adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Onlar, bu desteğin polisakkarit türevli diğer desteklere önemli bir alternatif olabileceğini rapor etmişlerdir.

Zou vd. (2011), Kitosan-GMA-IDA nanokürelerini hazırlamışlar ve nanokürelerin boyutunun 20-100 nm aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Daha sonra bu nanoküreleri Fe^{3+} iyonları ile şelatlaştırmışlar ve fosforillenmiş peptitlerin saflaştırılmasında ve zenginleştirilmesinde kullanmışlardır. Böyle elde edilen enzimlerin MALDI-MS'de doğrudan analizinin gerçekleştirilebileceğini göstermişlerdir.

Wang vd. (2012), susam protein hidrolizatını papain, alkalaz ve tripsin enzimleri ile muamele etmişler ve açığa çıkan peptitleri İMAK- Zn^{2+} ve LC-MS/MS sistemleri ile saflaştırmışlar ve tanımlamışlardır.

Alkol dehidrogenaz enzimleri alkollerin yükseltgenmesini, aldehit ve ketonlar gibi bileşiklerin indirgenmesini katalizler. Alkol dehidrogenaz steoridlerin dehidrogenasyonu, mevalonat metabolizmasının paralelindeki yolların ara ürünü olan alkollerin oksidasyonu ve yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir (Negoro ve Wakabayashi, 2004). Literatürde bahsedilen önemlerinden dolayı çeşitli kaynaklardan alkol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Cabrera vd. (1997), *Entamoeba histolytica* ve *Saccharomyces cerevisiae*'den alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmak için çinko afinite kromatografisini kullanmışlardır. Bu amaçla iminodiasetik asit bağlı Sepharoz 6B desteğini hazırlamışlar ve Zn^{2+} iyonları ile şelatlaştırmışlardır. Onlar bu iki organizmadan alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmanın basit ve tek adımlı bu yaklaşımla gerçekleştirilebileceğini rapor etmişlerdir.

Hidayat vd. (2003), emülsiyon tekniğini kullanarak agaroz ile kaplanmış alümina desteğini hazırlamışlar ve bu desteğe iminodiasetik asit ve Cibacron Blue F3GA'yı immobilize etmişlerdir. Bu araştırmacılar boya-IDA matriksini Zn^{2+} iyonları ile şelatlaştırmışlar ve mayadan alkol dehidrogenaz saflaştırılması için kullanmışlardır. Bu araştırmacılar enzimin aktivite verimini % 76,8 ve saflaştırma katsayısını 8,4 olarak bulmuşlardır.

Shibusawa vd. (2004), boya-ligand karşıt akım kromatografisini kullanarak sığır karaciğeri homojenatından alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu amaçla boya ligandı olarak Procion Red boyasını kullanmışlardır. Bu çalışmada alkol dehidrogenaz enzimi, ham sığır karaciğeri ekstraktından 6 saat içinde ve minimum enzim aktivitesi kaybı ile saflaştırmıştır.

Madhusudhan vd. (2008), çöktürme ve sulu ikili faz ekstraksiyonu ile mayadan alkol dehidrogenaz enzimi saflaştırmışlardır. Bu araştırmacılar sulu ikili faz ekstraksiyonunun ardından çöktürme işlemi gerçekleştirmişlerdir. Çöktürme işlemi için amonyum sülfat ve polietilen glikol kullanmışlardır. Bu araştırmacılar sulu ikili faz ekstraksiyonunun ardından polietilen glikol çöktürmesi ile % 90 aktivite verimi ile 6,6 katlık bir saflaştırma elde etmişlerdir.

Rocha-Martin vd. (2009), *E. coli*'de klonlanmış *Thermus thermophilus* HB27'den yüksek enantio seçicilikteki alkol dehidrogenaz enzimini IMAK kolonu ile % 80 aktivite verimi ile 9 kat saflaştırmışlar ve enzim stabilitesini arttırmak için bu enzimi farklı desteklere immobilize etmişlerdir.

Raghava ve Gupta (2010), *Thermus thermophilus*'tan gliserole karşı özgüllük gösteren bir alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Bu amaçla amonyum sülfat çöktürmesi ve butil sepharoz hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanmışlardır. Araştırmacılar bu enzimi % 68 aktivite verimi ile 25 kat saflaştırmışlardır. Ayrıca enzimin optimum sıcaklık ve kinetik sabitlerini rapor etmişlerdir.

Ying ve Ma (2011), hipertermofilik arkeon mikroorganizmasından (*Thermococcus guaymasensis*), stereo seçici ve Zn içeren bir alkol dehidrogenaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Bu amaçla hazırladıkları hücre ekstraktını sırasıyla DEAE-Sepharoz, hidroksiapatit, fenil-Sepharoz ve jel filtrasyon kolonlarına uygulamışlardır. Saflaştırılan enzimin

sekonder alkoller ve ilgili ketonlar için substrat özgülüğü gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Colnik vd. (2012), süperkritik CO₂ ekstraksiyonunu kullanarak *S. cerevisiae*'den bazı proteinleri ve alkol dehidrogenaz enzimini elde etmişlerdir. Bunun için *S.cerevisiae* süspansiyonu sabit sıcaklıkta farklı sıcaklık ve işlem sürelerinde süper kritik CO₂ ile inkübe edilmiştir. Bu araştırmacılar süperkritik CO₂ uygulaması ile elde ettikleri alkol dehidrogenaz enziminin aktif formda olduğunu belirtmişlerdir.

Geniş substrat özgülüğü sergileyen alkol dehidrogenaz enzimleri, yüksek duyarlılık gösteren ancak kararlılıkları düşük enzimlerdir. Kararlılıklarının artırılması için alkol dehidrogenaz enzimlerinin immobilizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Liao ve Chen (2001), maya alkol dehidrogenaz enzimini karbodimid aktivasyonu ile Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Sentezlenen süpermanyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin ortalama çapı 10,6 nm olarak bulunmuştur. Bu immobilizasyon işlemi manyetik partiküllerin boyut ve yapısından etkilenmemiştir. Serbest enzim ile karşılaştırıldığında immobilize enzim % 62'lik kalan aktivite göstermiştir ve kararlılığını 10 kat arttırmıştır.

Trivedi vd. (2005), çeşitli destek materyalleri kullanarak farklı alkol dehidrogenaz enzimlerinin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir ve immobilizasyona çeşitli parametrelerin etkilerini araştırmışlardır. Maya alkol dehidrogenaz enziminin immobilizasyonu için cam boncuklar, Celite 545, Celite 503 ve poliamide katı desteklerini kullanmışlar ve % 79'luk aktivite verimi elde etmişlerdir.

Xu vd. (2006), aljinat jel içine silika nanotüplerin inkorporasyonunu gerçekleştirmişler ve bu şekilde aljinat-silika nanotüp kompozitlerini hazırlamışlardır. Daha sonra bu nanotüp kompozitlerini maya alkol dehidrogenaz enziminin enkapsülasyon yoluyla immobilizasyonunda kullanmışlardır. Bu işlem enzim ve substrat arasında daha güçlü bir afinite, daha yüksek aktivite verimi, artan depo ve işlemsel kararlılığın gözlenmesine olanak sağlamıştır.

Bolivar vd. (2006), at karaciğeri alkol dehidrogenaz enzimini gliksil-agaroz üzerine immobilize etmişler ve bu immobilizasyon işleminin, enzim aktivitesini bozucu bazı faktörlere (pH, sıcaklık, organik çözügen gibi) karşı koruduğunu rapor etmişlerdir.

Liu ve Cai (2007), pozitif yüklü polielektrolit poli(dimetildiallil amonyum klorür) tabakasıyla kaplanmış tek duvarlı karbon nanotüplerin yüzeyine pH 8,2'de negatif yüklü alkol dehidrogenaz enzimini negatif-pozitif elektrostatik yük etkileşimi sağlayacak nanokompozit yapıları sağlamıştır. Daha sonra bu nanokompozit yapıları Nafyon yardımı ile camsı karbon elektrot yüzeyine immobilize edilmiş ve etanol tayini için bir biyosensör hazırlamışlardır.

Li vd. (2008), glutaraldehit kullanarak manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerine *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enziminin kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Bu amaçla öncelikle manyetik nanopartiküller, oksitleyici ajan olarak H₂O₂ kullanarak hidrotermal metodu hazırlamışlardır. Daha sonra manyetik nanopartiküller, yüzeylerine kitosan bağlanarak fonksiyonelleştirilmiş ve kitosandan gelen amin grupları ile alkol dehidrogenaz enziminin amino grupları glutaraldehit ile bağlanmıştır. İmmobilizasyon işlemi manyetik partiküllerin boyut ve yapısından etkilenmemiştir. İmmobilize alkol dehidrogenaz ile fenilgliksilik asit substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldığında % 48,77 aktivite verimi elde edilmiştir.

Li vd. (2010), kitosan ile kaplanmış manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin yüzeyini α -ketoglutarik asit ile fonksiyonelleştirmiş ve daha sonra alkol dehidrogenaz enziminin kovalent immobilizasyonunda kullanmışlardır. Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize enzim orijinal aktivitesinin % 65'ini göstermiştir ve daha yüksek sıcaklık kararlılığı ve dayanıklılığı sergilemiştir.

Gözenekli yapıları ve işlemsel kararlılıkları kriyojellerin çok çeşitli alanlarda kullanım bulmasına olanak sağlamıştır. Kriyojeller özellikle kromatografik destek materyali olarak enzim ve hücrelerin immobilizasyonunda ve hedef moleküllerin saflaştırılması için biyoayırma yaygın kullanım alanları bulmuştur (Plieva vd., 2007). Kriyojellerle ilgili yapılan çalışmalara örnekler aşağıda verilmiştir.

Kumar vd. (2006), insan böbrek hücrelerinin hücre kültürü sıvısından ürokinaz enziminin immobilize metal afinite kromatografisi ile saflaştırılması için destek materyali olarak süpermakro gözenekli kriyojel matrisini kullanmışlardır. Ayrıca bu kriyojel matrisi ile Sepharoz afinite matrisini karşılaştırmışlardır. Ürokinaz saflaştırılması için kriyojel bazlı IMAK matrisinin, Cu(II)-IDA-Sepharoz kolonu ile karşılaştırıldığında seçiciliğinin daha yüksek olduğunu görmüşlerdir.

Yao vd. (2006), nano boyutlu partiküller hazırlayarak bunları, metilen bis akrilamid temelli kriyojellerin içine gömmüşlerdir. Sonra hazırladıkları bu destek materyalini sığır serum albümin proteininin adsorpsiyonu için kullanmışlar ve bu yöntemin literatürdeki diğer benzer çalışmalara göre adsorpsiyon kapasitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Bajpai ve Saini (2006), poli(vinil alkol) ve yumurta albüminden oluşan kriyojel yapılarını sentezlemişlerdir. Ayrıca bu kriyojelin hazırlanması sırasındaki koşulları değiştirerek (pH, sıcaklık, tuz derişimi gibi) optimizasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Onlar bu çalışmada yüksek elastikiyete sahip, su absorplayabilen ve kanla uyumlu süngerimsi hidrojel yani kriyojel yapıları hazırladıklarını belirtmişlerdir.

Busto vd. (2007), meyve sularında acılığın giderilmesi için poli(vinil alkol) kriyojellerine *Aspergillus niger* CECT 2088'den izole edilen naringinaz enzimini immobilize etmişlerdir. Araştırmacılar immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik sabitlerini belirlemişlerdir. İmmobilize naringinazın 6 döngüden sonra % 36'lık naringin hidrolizi aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Yılmaz vd. (2009), yumurta akından lizozim saflaştırılması için N-metakriloil-L-triptofan içeren poli (2-hidroksietil metakrilat) temelli süpermakro gözenekli kriyojel yapılarını sentezlemişlerdir. Bu araştırmacılar hazırladıkları kriyojellerin gözenek çaplarının 60-100 µm aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Hazırladıkları kriyojellerin lizozim saflaştırılmasında kullanılabilirliğini SDS-PAGE ile göstermişler ayrıca desorbe lizozimin olası denatürasyonunu florimetrik ölçümlerle de kontrol etmişlerdir.

Bereli vd. (2010), poli(GMA) küreleri hazırlamışlar ve bu kürelerin bir kısmına Cibacron Blue F3GA, bir kısmına IDA-Cu²⁺ yapılarını bağlamışlar ve poli (HEMA) kriyojeline gömmüşlerdir. Sentezlenen yapıları şişme analizleri ve SEM çalışmaları ile karakterize etmişlerdir. Daha sonra hazırladıkları bu kompozit kriyojelleri insan serumundan albümin ve IgG uzaklaştırılması için kullanmışlar ve sırasıyla % 89,4 ve % 93,6 verim elde etmişlerdir.

Stanescu vd. (2010), lakkaz immobilizasyonu için poli(vinil alkol) kriyojellerini hazırlamışlardır. İmmobilize enzimin, serbest enzimle karşılaştırıldığında daha düşük aktiviteye ancak daha yüksek kararlılığa sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca immobilize enzimin optimum pH değeri serbest enziminkinden daha yüksek bulunmuş ve bu enzimin daha ılımlı koşullarda kullanılabileceğini göstermiştir.

Luding vd. (2011), yumurta akından lizozim saflaştırılması için poliakrilamid temelli katyon değişim kriyojelini kullanmışlardır. Kromatografik işlemi tek bir adımla ve kademeli elüsyon ile gerçekleştirmişlerdir. Enzimin saflığını % 96 oranında bulmuşlar ve SDS-PAGE ile göstermişlerdir.

Tüzmen vd. (2012), poli(akrilamid-allilglisidil eter) kriyojelini radikal polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Daha sonra bu kriyojel yapısına Cibacron Blue F3GA'yı kovalent olarak immobilize etmişler ve Fe³⁺ iyonları ile şelatlaştırmışlar ve katalaz immobilizasyonunda kullanmışlardır. İmmobilize enzimin pH ve sıcaklığına karşı aktivitesi ve kinetik sabitlerini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar immobilize katalazın geniş skalalı biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı bulabileceğini rapor etmişlerdir.

Bibi vd. (2013), terminal epoksit birimleri ile aşılınmış megaparöz kriyojelleri sentezlemişler ve IDA ile şelatlaştırmışlar ve bir IMAK desteği elde etmişlerdir. Bu desteği poli(His) etiketli rekombinant bir proteinin saflaştırılması için başarılı bir şekilde kullanmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kimyasal ve Cihazlar

Deneylerde Longer Pump BT100-1L 4 geçişli peristaltik pompa, Vestel (White FR 540) buzdolabı, Hereaus (Function Line) etüv, IKA (MS2) vorteks, Hanna (pH 211) pH metre, Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, VWR (1180S) sirkülatörlü su banyosu, GFL (2001/4) saf su cihazı, Brand (Transferpette) otomatik pipetler, Ohaus-Pioneer (PA214C) 0,0001 g duyarlılıkta terazi, IKA®C-MAG HS7 sıcaklık ayarlı karıştırıcı, milipore (Simplicity UV, 18,2 mΩ cm) ultra saf su cihazı kullanıldı.

Saccharomyces cerevisiae'den saflaştırılmış ticari alkol dehidrogenaz, N,N'-metilenbisakrilamid (MBAAm), amonyumpersülfat (APS), N,N,N',N'-tetraetilmetilendiamin (TEMED), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), glisidil metakrilat (GMA), iminodiasedik asit (IDA), sodyum karbonat, hidroklorik asit, sülfirik asit, asetik asit, NADH, Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, NaOH, sodyum asetat Riedel-de Haën (Seelze, Almanya)'dan; NaCl, potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidrojen fosfat, asetik asit Carlo Erba (Rodana, İtalya)'dan, sodyum azit, glutaraldehit, ZnSO₄.7H₂O Merck (Dramstadt, Almanya)'dan temin edildi.

Sentezlenen polimerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, ABD), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (ESEM, Philips XL-30S FEG, Almedo, Hollanda) ve İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezinde bulunan Enerji Dağılımlı X-ışını Analiz cihazı (LEO, EVO 40, Carl Zeiss NTS, Peabody, MA, ABD) kullanıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1. Poli (HEMA-GMA) Kriyojelinin Hazırlanması

Poli (HEMA-GMA) monolitik kriyojeli, N,N,N',N'-tetraetilmetilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS)'nin varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendi. Bu amaçla 0,2 mmol GMA (27,26µL) ve 1,5

mL HEMA bir beher içerisine alındı ve toplam hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı. Bu karışım 10 mL saf suda 0,250 g N,N'-metilen-bisakrilamid (MBAAm) içeren çözeltiye ilave edilerek buz banyosuna alındı. Ardından bu karışıma 20 mg APS ve 25 µL TEMED eklenerek 1 dakika karıştırıldı. Bu polimerizasyon çözeltisi plastik şırıngalara (hacim: 5mL, iç çapı: 0,8 cm) alınarak ağızları kapatıldı ve -12 °C'de 24 saat donduruldu. Daha sonra bu yapı oda sıcaklığında eritilerek 200 mL saf su ile yıkayıp % 0,02 sodyum azit içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi içinde +4 °C'de saklandı.

3.2.2. Poli (HEMA-GMA) Kriyojeline IDA'nın Bağlanması ve Zn²⁺ ile Şelatlaştırılması

Poli (HEMA-GMA) kriyojeline IDA'nın bağlanması için sentezlenen kriyojel pH 11,0'deki 50 mL IDA çözeltisi ile 75 °C'de 6 saat karıştırıldı. IDA çözeltisinin hazırlanması için 0,5 g IDA, 20 mL 2,0 M Na₂CO₃ çözeltisinde çözüldü ve bu çözeltiye 0,25 g NaCl eklenerek çözeltinin pH'ı NaOH ile 11,0'e ayarlandı. IDA'nın kriyojel matrisine bağlanmasından sonra kriyojel önce % 5'lik asetik asitle ve ardından yıkama çözeltisinin pH'ı nötral oluncaya kadar saf su ile yıkandı.

IDA bağlı (HEMA-GMA) kriyojelinin Zn²⁺ iyonları ile şelatlaştırılması için 0,1 M pH 6,0'daki sodyum asetat tamponunda hazırlanmış 50 mL 0,3 M ZnSO₄.7H₂O çözeltisi, kriyojel matrisinden 2 saat boyunca geçirildi. Daha sonra kolon 0,5 M NaCl ve ardından saf su ile yıkandı.

3.3. Zn²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Karakterizasyonu

3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Poli (HEMA-GMA) ve poli (HEMA-GMA)-IDA kriyojelerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, ABD) kullanılarak elde edildi. Örnekler (0,1 g) KBr ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirildi ve FTIR spektrumu çekildi.

3.3.2. ESEM (Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen polimerik kriyojellerin yapısı yüzey morfolojisi, çevresel taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendi. Şişmiş kriyojelin ESEM ölçümlerinde Phillips XL-30S FEG (Almelo, Hollanda) marka taramalı elektron mikroskobu kullanıldı.

3.3.3 EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

Sentezlenen kriyojellerin elementel analizi SEM’nda X-ışını analizi (EDX) cihazı (LEO, EVO 40, Carl Zeiss NTS, Peabody, Massachusetts) kullanılarak gerçekleştirildi. Kriyojellere bağlanan çinko ve IDA bu analiz sonuçları ile hesaplandı.

3.3.4. Şişme Analizi Ölçümleri

Sentezlenen Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli (HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin şişme derecesinin tayini için kriyojeller 24 saat boyunca 60 °C’de kurutuldu. Kurumuş kriyojeller tartılıp, saf su içerisinde bekletildi (25 °C’de) ve belirli zaman aralıklarında absorplanan su miktarları ölçülüp kriyojelin şişme karakteri incelendi. Kriyojelin şişme derecesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanıldı.

$$\text{Şişme derecesi} = [(m_{\text{şişmiş polimer}} - m_{\text{kuru polimer}}) / m_{\text{kuru polimer}}] * 100$$

3.4. Zn^{2+} ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojellere Alkol Dehidrogenaz Enziminin Adsorpsiyonu Ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış kriyojel matriksine maya alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyonu deneyleri sürekli sistemde gerçekleştirildi. Kriyojel yapıları uygun tampon çözelti ile yıkanıp dengelendi. Daha sonra 5,0 mL alkol dehidrogenaz çözeltisi 2 saat boyunca bir peristaltik pompa yardımıyla kolondan geçirildi ve alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 280 nm’de absorbansın azalması ile izlendi. Adsorpsiyona pH’ın, alkol dehidrogenaz derişiminin, sıcaklığın, iyonik şiddetin ve akış hızının etkileri incelendi ve maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun gerçekleştiği koşullar belirlendi.

3.4.1. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH çözeltilerinde (pH 4,0-5,0 asetat tamponu; pH 6,0-8,0 fosfat tamponu; 0,1 M) derişimi 0,5 mg/mL olan 6'şar mL alkol dehidrogenaz enzimi çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 1,0 mL alınıp 280 nm de absorbansları okundu. Geriye kalan 5,0 mL'ik çözeltiler sürekli sistemde bir peristaltik pompa yardımıyla kriyojelden 2 saat boyunca geçirildi. 2 saatin sonunda kolondan geçirilen çözeltilerin 280 nm'de absorbansları okundu. pH değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi gösterdiği pH değeri bulundu.

3.4.2. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna alkol dehidrogenaz başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi için 25 °C'de 6'şar mL'lik pH 5,0 asetat tamponu ile 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,2 mg/mL derişimlerinde alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1' de anlatıldığı gibi her bir derişim örneği için poli(HEMA-GMA)-IDA ve Zn²⁺ ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerine adsorpsiyon işlemleri gerçekleştirildi ve adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları hesaplandı. Alkol dehidrogenaz derişimine karşı, adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı grafikleri çizildi ve polimerlerin maksimum adsorpsiyon kapasiteleri bulundu. Zn²⁺ ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli için alkol dehidrogenaz derişimine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı verilerinden yararlanarak adsorpsiyon izotermeleri (Langmuir ve Freundlich) çizildi ve değerlendirildi.

3.4.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi için 4; 15; 25; 45; 55 °C'deki sıcaklıklarda enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 6'şar mL'lik pH 5,0 asetat tamponu ile alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlanarak bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi her bir sıcaklıkta adsorpsiyon gerçekleştirildi. Sıcaklık değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirilerek değerlendirildi.

3.4.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için derişimleri 0; 0.01; 0.05; 0.1 olan NaCl çözeltileri ile enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla pH 5.0 asetat tamponunda hazırlanan 0.5 mg/mL derişimindeki alkol dehidrogenaz çözeltilerine farklı miktarlarda NaCl ilave edildi ve bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi. İyonik şiddet değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirildi.

3.4.5. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi

Akış hızının alkol dehidrogenaz bağlanması üzerine etkisinin incelenmesi için pH 5.0 asetat tamponunda 0.5mg/mL derişiminde hazırlanan enzim çözeltileri kullanılarak akış hızı 0.2-4.0 mL/dak aralığında değiştirildi ve adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi. Akış hızı değerlerine karşı adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarları grafiğe geçirildi.

3.4.6. Zn²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinin Alkol Dehidrogenazın Desorpsiyonu ve Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliğini İncelenmesi

Zn²⁺ ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyonu ardından desorpsiyonu işlemleri gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak pH:8,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 1,0 M NaCl kullanıldı. Kriyojele bağlı enzimi sökmek için kriyojelden 5,0 mL sodyum klorür çözeltisi 1 saat boyunca geçirildi. 280 nm'de okunan absorbans değerlerinden alkol dehidrogenaz enzimi için % desorpsiyon oranı hesaplandı.

% desorpsiyon = [desorpsiyon ortamına salınan alkol dehidrogenaz miktarı (mg)/adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı (mg)] x 100 (Eşitlik 3.1)

Daha sonra kriyojel pH 5,0 asetat tamponuyla yarım saat yıkılarak kolonun dengeye gelmesi sağlandı.

3.5. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Tayini

Alkol dehidrogenaz aktivitesi, Vallee ve Hoch (1955) tarafından önerilen spektrofotometrik metoda göre tayin edildi. Bu metodun temeli NADH'in NAD^{+} 'ya yükseltgenmesi sonucu 340 nm'deki absorbansın azalmasına dayanmaktadır.



Şekil 3.1. *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz katalizli fenilglioksilik asitin (R)-mandelik asite indirgenmesi (Li vd., 2008)

Bu amaçla 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 0,25 mL 0,1 M fenilglioksilik asit ve 1,25 mL 1,0 M pH 5,0 asetat tamponu kör küvetine, 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH,

0,25 mL 0,1 M fenilglioksilik asit, 1,0 mL 1,0 M pH 5,0 asetat tamponu ve 0,25 mL 0,05 mg/mL alkol dehidrogenaz enzimi örnek küvetine konarak NADH'in NAD^{+} 'ya yükseltgenmesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de 3 dakika boyunca izlendi ve gerçekleşen reaksiyon Şekil 3.1'de gösterildi. Bir ünite alkol dehidrogenaz, 25 °C'de ve pH 5,0'de, dakikada 1 μmol NADH'in yükseltgenmesi için kullanılan enzim miktarı olarak tanımlandı ve ünite hesabı yapıldı.

$$U = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times d \times \Delta t} \times sf \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Protein miktarı tayini için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın aktivitesine pH'nın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelendi. İlaveten serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın ısıl ve depo kararlılıkları ve immobilize alkol dehidrogenazın işlemsel kararlılığı belirlendi.

3.5.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'nın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 4,0-5,0 asetat tamponu; pH 6,0-8,0 fosfat tamponu; 0,1 M) derişimi 0,5 mg/mL olan 6'şar mL alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi ve aktivite ölçümleri bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için Eşitlik (3.2) kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için optimum pH değerleri belirlendi.

3.5.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için farklı sıcaklık değerlerinde (4; 15; 25; 35; 45 ve 55 °C) ve 0,1 M pH 5,0 asetat tamponunda, derişimi 0,5 mg/mL olan 6'şar mL alkol dehidrogenaz çözeltileri hazırlandı. Adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi ve aktivite ölçümleri yapıldı. Enzim aktivitelerinin ölçümünde spektrofotometreye bağlanan bir sirkülatörlü su banyosundan yararlanıldı. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için Eşitlik (3.2) kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. Sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilip, serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.5.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine substrat derişiminin etkisinin incelenmesi için pH 5,0 asetat tamponunda farklı substrat (fenilglioksilik asit) derişiminde çözeltiler hazırlandı. Farklı derişimdeki bu substrat çözeltileri (0,01; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10 mol/L) kullanılarak serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimleri ile aktivite ölçümleri yapıldı. Bunun için 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 1,25 mL 1,0 M pH 5 asetat tamponu ve 0,1 mg/mL derişiminde 0,25 mL alkol dehidrogenaz enzimi kör küvetine, 0,25 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M NADH, 1,0 mL 1,0 M pH 5 asetat tamponu, 0,25 mL farklı derişimlerdeki fenilglioksilik asit ve 0,1 mg/mL derişimde 0,25 mL alkol dehidrogenaz enzimi örnek küvetine konarak enzimin hızı NADH'in yükseltgenmesine bağı olarak spektrofotometrede 340 nm'de 3 dakika boyunca izlendi. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimleri için hız değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.5.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın ısıl kararlılığının incelenmesi için 35 °C'deki sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz 35 °C'deki su banyosunda 300 dakika tutuldu ve belirli aralıklarla aktivite ölçümleri Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için bu sıcaklıkta zamana karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

3.5.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın depo kararlılığının incelenmesi için belli aralıklarla 60 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Bu süre içinde serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz buzdolabında +4 °C'de saklandı. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için yapılan aktivite ölçümlerinden zamana karşı % aktivite grafikleri çizildi.

3.5.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize alkol dehidrogenazın işlemsel kararlılığının incelenmesi için immobilize enzim ile ard arda 10 kez aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir aktivite ölçümünden sonra immobilize alkol dehidrogenaz pH 5,0 asetat tamponu ile yıkandı ve tekrar aktivite ölçümü için kullanıldı. İmmobilize alkol dehidrogenaz için döngü sayısına karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

3.6. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması için 2,0 g kuru maya (*S. cerevisiae*) 10 mL pH 5,0 asetat tamponunda 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra maya hücreleri 1000 rpm'de homojenizatör yardımı ile 5 dakika parçalandı. Ardından 10000 g'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek maya homojenatı ayrıldı. Elde edilen maya homojenatında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Homojenattan 3,5 mL alınıp üzerine 1,0 mL pH 5,0 asetat tamponu ilave edilerek kolondan 2 saat boyunca geçirildi. 2 saatin sonunda homojenatta protein tayini yapılarak bağlanan protein miktarı hesaplandı. Desorpsiyon için 5,0 mL pH 8'de hazırlanmış 1,0 M NaCl çözeltisi kriyojelden 2 saat geçirilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon sonunda örnekte protein tayini ve aktivite ölçümleri yapıldı ve örnek elektroforeze uygulandı.

3.6.1. Protein Tayini

Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması işleminde protein tayini için Bradford yöntemi (1976) kullanıldı. Commassie Brilliant Blue G-250, negatif yüklü bir boyadır ve proteindeki pozitif yüklü gruplara seçimli olarak bağlanır. Boya $A_{\max}=465$ nm'de kırmızı ve A_{\max} 595 nm'de mavi formda bulunur. Kırmızı form çözeltideki halidir ve boya proteine bağlandığında mavi renk oluşur ve bir saat kadar kararlı kalır (Robty ve White, 1987).

Bradford yöntemi ile protein tayini için Bradford boya çözeltisi hazırlandı. Bunun için 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası tartılıp 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Ardından bu çözeltiliye 100 mL % 85'lik fosforik asit ilave edildi. Çözelti filtre kağıdı ile süzüldü ve saf su ile 1,0 L'ye tamamlandı. Protein tayini için 2,5 mL Bradford çözeltisi ve 50 μ L saf su kör küvetine, 2,5

mL Bradford çözeltisi ve 50 µL protein çözeltisi örnek kuvvetine konularak 595 nm'de absorbans okundu.

3.6.2. SDS-PAGE Elektrofrezinin Uygulanması

Mayadan elde edilen alkol dehidrogenaz enziminin saflığı Laemmli (1970) yöntemine göre SDS-PAGE kullanılarak belirlendi. SDS-PAGE jel hazırlığı ve elektroforeze uygulama işlemleri Arat (2007)'ye göre uygulandı. Elektrofrez camları % 70'lik etanol ile iyice yıkandı. % 10'luk ayırma jeli için 2,55 mL saf su, 1,66 mL pH 8,8 ayırma tamponu ($2,8 \times 10^{-3}$ M SDS içeren 3,0 M Tris-baz tamponu), 2,2 mL % 30'luk akrilamid/ N,N'-metilenbis akrilamid çözeltisi, 6 µL TEMED ve 43 µL % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi karıştırıldı. Hazırlanan jel mikropipet yardımıyla elektrofrez camları arasına döküldü. Jelin hava ile temasını kesmek için üzeri % 70'lik etanol ile kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat bekletildi. Bir saatin sonunda jelin üzerindeki etanol kurutma kağıtları yardımıyla jele temas etmeden dikkatlice alındı. Daha sonra ayırma jelinin üzerine % 5'lik yoğunlaştırma jeli döküldü. Yoğunlaştırma jeli için 965 µL saf su, 416 µL yoğunlaştırma tamponu ($3,5 \times 10^{-4}$ SDS içeren 0,5 M Tris-baz tamponu), 278 µL % 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid çözeltisi, 1,7 µL TEMED ve 17 µL % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi karıştırıldı. Bu karışım polimerleşen jelin üzerine mikropipetle döküldü. Tarak, jelde hava kabarcığı olmayacak ve ayırma jeline temas etmeyecek şekilde yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için bir gece bekletildi (Kaya, 2012).

Jele uygulanacak örnekler ve standart, pH 8,5 örnek tamponuyla (12,5 mL 1,0 M pH 6,8 Tris-baz, 40 mL % 10'luk SDS, 20 mL gliserol, 2 mL % 2'lik brom fenol mavisi, 5 mL % 5'lik -merkaptoetanol) uygun oranda seyreltikten sonra kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi. Tarak jele zarar vermeden çıkartıldı. Kuyucuklara yaklaşık 15 µL pH 8,5 yürütme tamponu ($2,5 \times 10^{-2}$ M Tris-baz, 0,2 M glisin, $3,5 \times 10^{-3}$ M SDS) ve yaklaşık 15 µL örnek yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucuklar içinde kalacak şekilde pH 8,5 yürütme tamponu ($2,5 \times 10^{-2}$ M Tris-baz, 0,2 M glisin, $3,5 \times 10^{-3}$ M SDS) ile dolduruldu. Güç kaynağı ile üst jele 100 V 20 mA, alt jele 200 V 40 mA elektrik akımı uygulanarak elektrofrez işlemi 120 dakikada tamamlandı.

Elektroforetik yürütme tamamlandıktan sonra cam plakalar arasından çıkarılan jel Commasie Brilliant Blue G-250 çözeltisi içine alınarak bir gece bekletildi. Jel boya çözeltisinden alınıp ilk önce birinci yıkama çözeltisinde (400 mL metanol, 70 mL asetik asit, 530 mL saf su) ve daha sonra ikinci yıkama çözeltisinde (50 mL metanol, 70 mL asetik asit, 880 mL saf su) 3'er saat bekletilerek bantlar görünür hale getirildi (Kaya, 2012).

3.6.2.1. Gümüş boyama

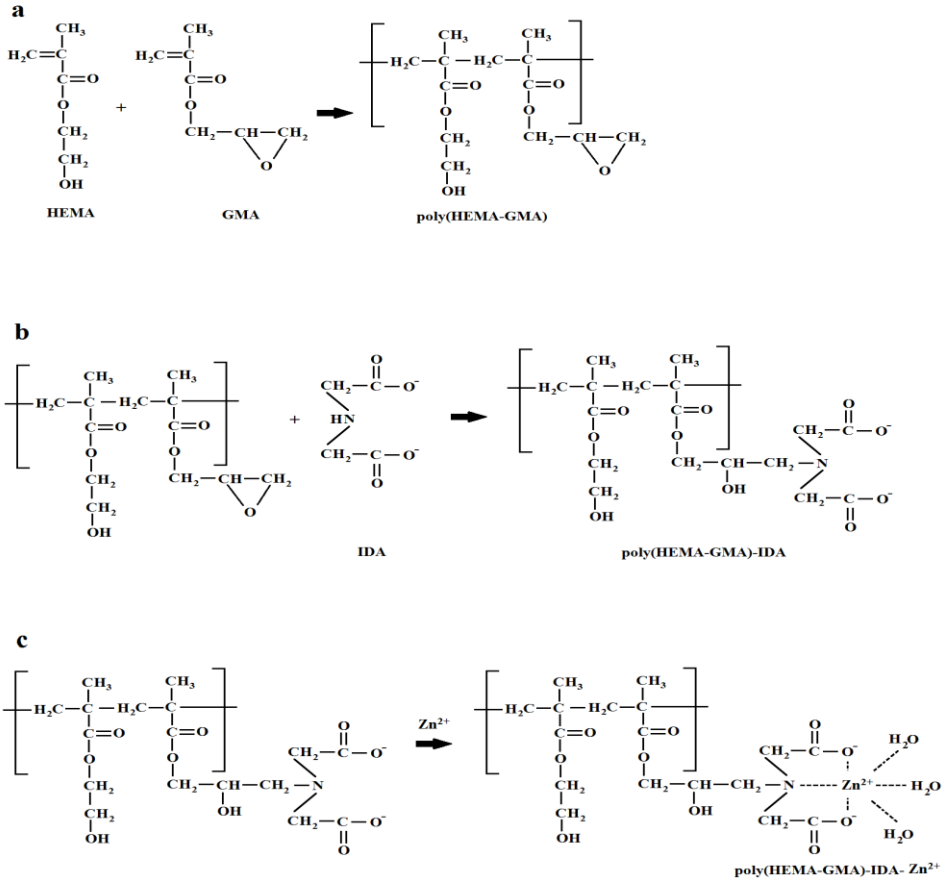
Gümüş boyama ile elektroforez sonrası belirgin olmayan protein bantları 100 kat daha belirgin hale getirilip izlenebilir. Bunun için elektroforez jeline aşağıdaki işlemler uygulandı .

Elektroforez jeli, A çözeltisinde (50 mL metanol, 10 mL asetik asit, 40 mL saf su) çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra B çözeltisinde (5 mL metanol, 7 mL asetik asit, 88 mL saf su) ve C çözeltisinde (% 10'lük glutaraldehit) 15'er dakika bekletildi. Ardından jel, cam bir kap içinde saf suda 2 saat kadar bekletilerek durulandı. Durulamadan sonra mL'sinde 5,0 g (DTT) dithiothreitol olacak şekilde saf suda hazırlanmış çözeltide 15 dakika bekletildi. Daha sonra % 1'lik AgNO₃ çözeltisinden, taze olarak % 0,1'lik AgNO₃ çözeltisi hazırlandı ve jel bu çözeltide 15 dakika çalkalandı. Ardından jel 10 mL hacmindeki saf su ile iki kez durulandı ve bir müddet geliştirme çözeltisinde (% 3'lük sodyum karbonat çözeltisine % 37'lik 25 mL formaldehit eklenmesiyle hazırlanan) bekletildi. Jel dikkatlice izlendi ve bantlar istenilen koyuluğa ulaştığında ortama durdurma çözeltisi (2,3 M sitrik asit) eklendi. Jel su içinde saklandı ve fotoğrafı çekildi (Walker, 2002; Kaya, 2012).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

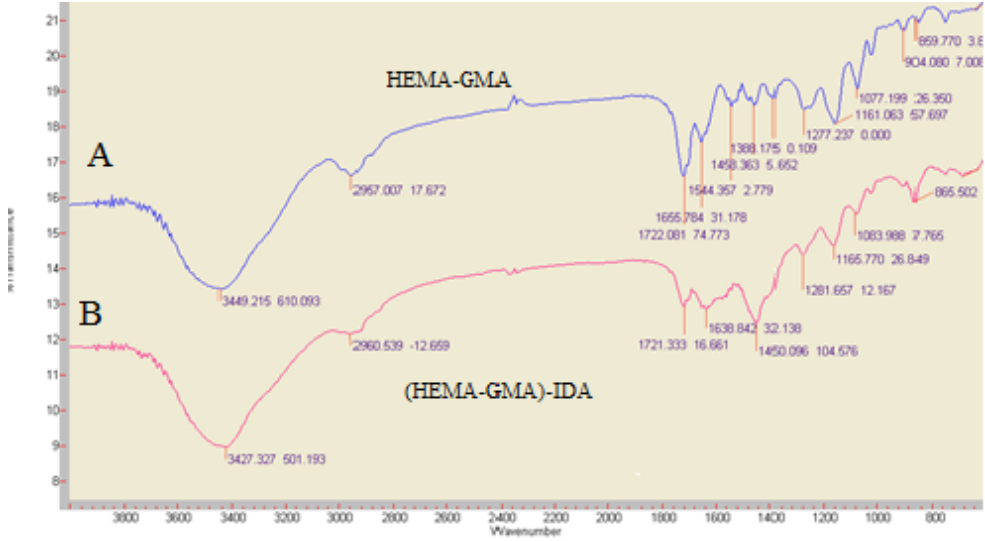
4.1. IDA Bağlı Poli(HEMA-GMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu

Bu tezde HEMA ve GMA monomerleri kullanılarak poli(HEMA-GMA) monolitik kriyojelleri sentezlenmiş ve bu kriyojellere IDA şelatlayıcı ajanı bağlanılarak Zn^{2+} iyonları ile şelatlaştırılmıştır. Şekil 4.1.a poli(HEMA-GMA) kriyojelinin yapısını, Şekil 4.1.b poli(HEMA-GMA) kriyojeline IDA'nın bağlanmasını, Şekil 4.1.c ise IDA bağlı poli(HEMA-GMA) kriyojelinin Zn^{2+} iyonları ile şelatlaştırılmasını göstermektedir.



Elde edilen kriyojeller elastik, süngerimsi ve opaktır. Bu kriyojellerin karakterizasyonu için FTIR, ESEM, EDX ve şişme analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

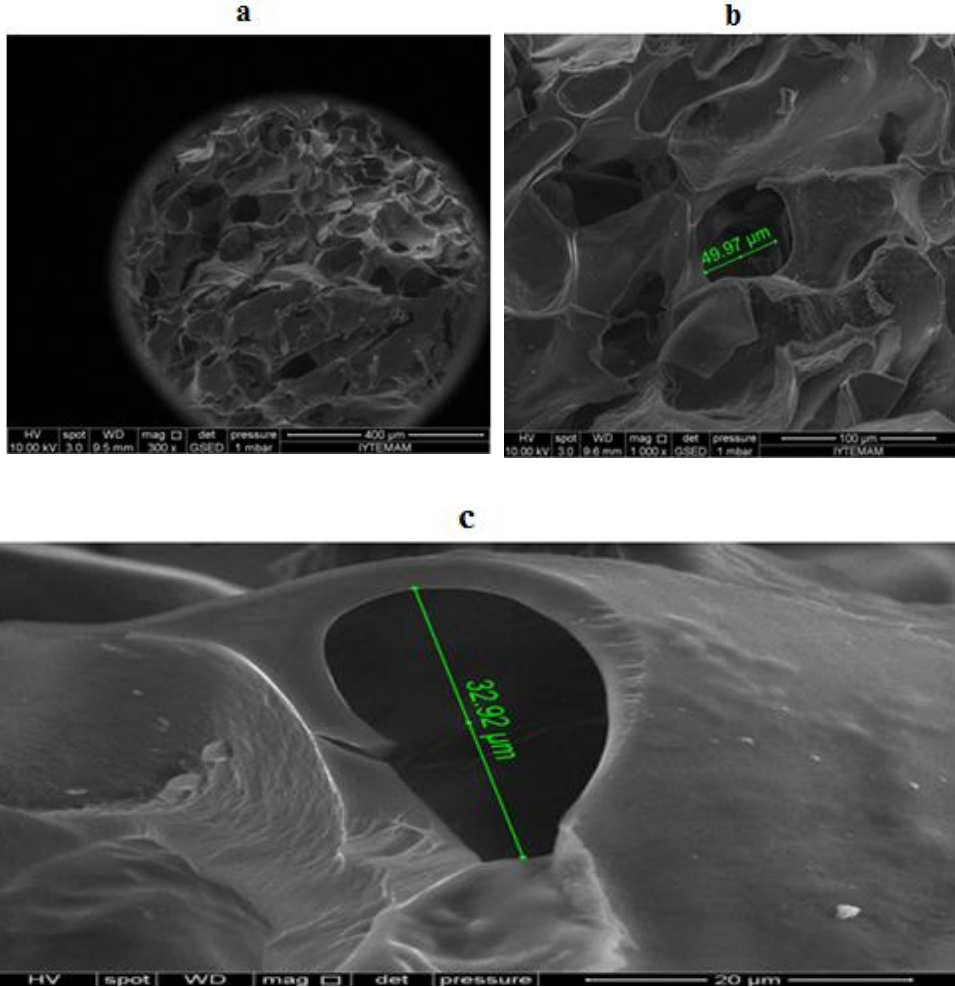


Şekil 4.2 A) HEMA-GMA; B) poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerinin FTIR spektrumu

Şekil 4.2’de poli(HEMA-GMA) ve poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerine ait FTIR spektrumları verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi $-\text{CH}_3$ ve $\text{C}=\text{O}$ gerilmelerine ilişkin bantlar sırasıyla 3400 cm^{-1} ve 1720 cm^{-1} ’de görülmektedir. $\text{C}-\text{O}$ gerilme bantlarına ait pikler 1270 cm^{-1} civarında gözlenmiştir. Yapıya IDA’nın girmesi ile GMA’dan gelen oksiran gruplarına ait halka gerilmesine ilişkin 1255 cm^{-1} ’deki ve oksiran gruplarındaki $\text{C}-\text{O}$ gerilmesine ilişkin 904 cm^{-1} ’deki pikler kaybolmuştur. Ayrıca poli(HEMA-GMA) kriyojeline ait spektrumda gözlemlenmediği halde poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeline ait spektrumda gözlenen 1450 cm^{-1} ’deki pik $\text{C}-\text{N}$ valens piki olup, IDA’nın bağlanmasıyla gelen azotu göstermektedir.

4.1.2. ESEM (Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

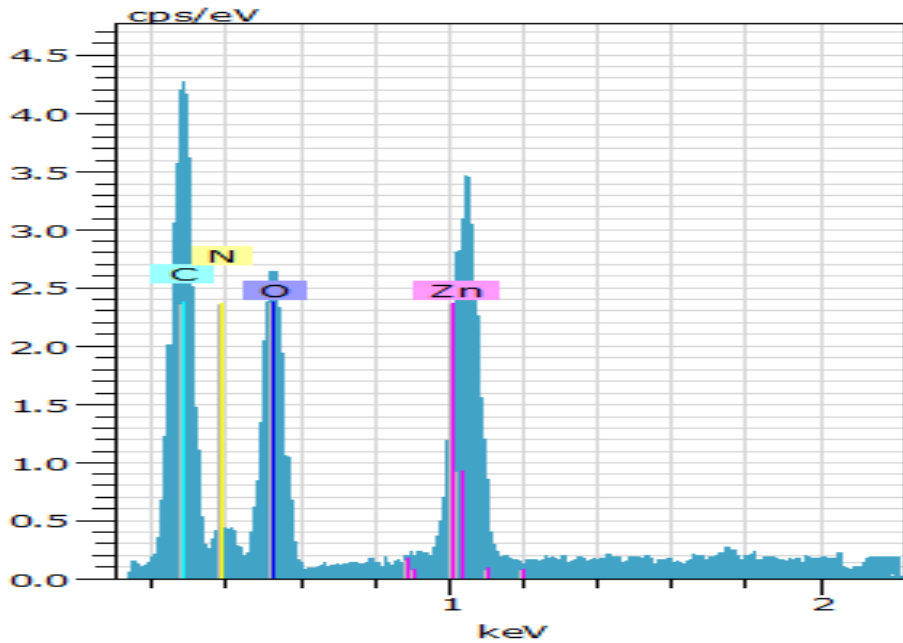
IDA bağlı poli(HEMA-GMA) kriyojelinin ESEM fotoğrafları Şekil 4.3'de görülmektedir. Sentezlenen IDA bağlı poli(HEMA-GMA) kriyojeller oldukça gözenekli olup gözenek çapları 30-50 μm arasında değişmektedir. Gözenekler birbirlerine bağlıdır ve gözenek duvarları incedir. Elde edilen ESEM fotoğrafları kriyojeller üzerinde makro gözeneklerin yoğun olarak bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. IDA bağlı poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin ESEM fotoğrafları (a, b ve c).

4.1.3. EDX Analizi

Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerine ilişkin EDX analizi grafiği Şekil 4.5'te ve elde edilen veriler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Polimerik yapıya IDA'nın katıldığı N varlığı ile görülmüş ve yapıya katılan IDA miktarı azot sitokiyometrisi kullanılarak 12,2 mmol/g polimer olarak hesaplanmıştır. Ayrıca EDX analizindeki Zn^{2+} 'ya ait verilerden poli(HEMA-GMA)-IDA ile şelatlaşan Zn^{2+} miktarı sitokiyometrik olarak hesaplanmış ve 0,24 mmol/g polimer olarak bulunmuştur.



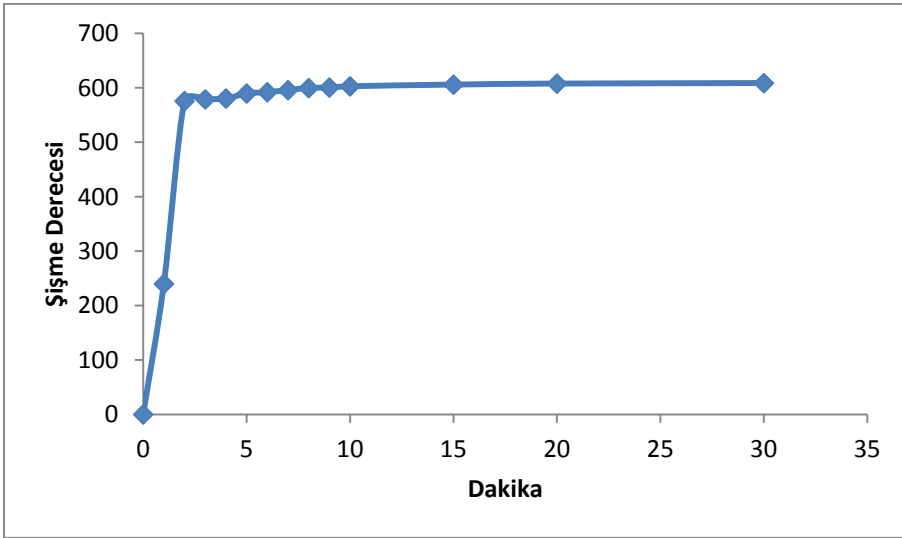
Şekil 4.4. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin EDX spektrumu.

Çizelge 4.1. EDX analizine ilişkin veriler.

Element	Kütlece %	% Hata
C	20.26	7.0
N	18.57	7.1
O	49.82	16.6
Zn	1.49	0.1

4.1.4 Şişme Analizi Ölçümleri

Kriyojellerin en önemli özelliği gözenekli yapılarıdır ve bu yapılarından dolayı sulu ortamda hızlı bir şekilde su alarak şişerler ve denge şişme derecesine ulaşırlar. Şekil 4.5 Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerinin 25 °C'de zamana bağlı % şişme derecesini göstermektedir. Kriyojel yapıları hızla su almış ve 2 dakikada % 600 şişme derecesine ulaşmıştır. Bu yüksek şişme derecesi kriyojelin hidrofilik karakterini ve makro gözenekliliğini göstermektedir.

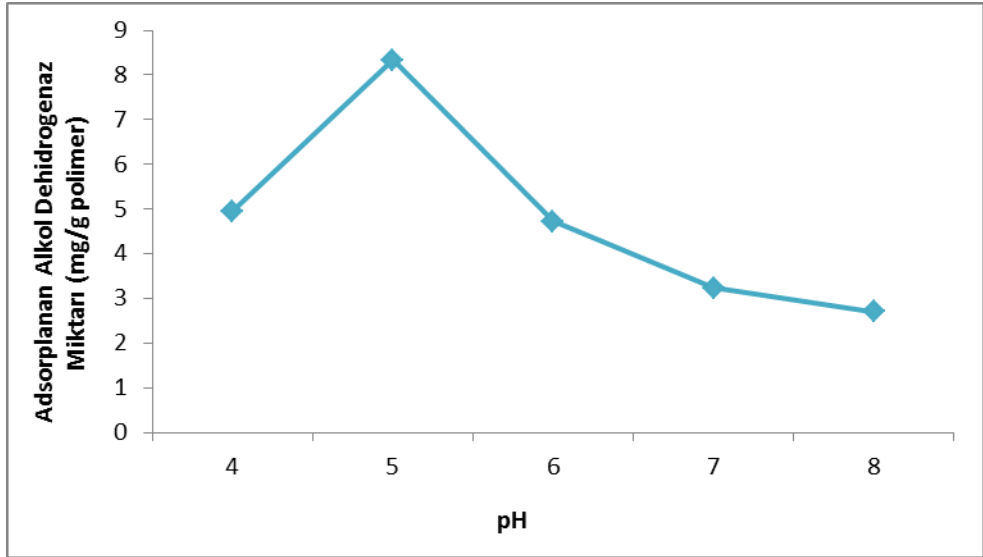


Şekil 4.5. IDA bağlı poli(HEMA-GMA) kriyojelinin şişme oranı.

4.2. Zn^{2+} ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojeline Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

4.2.1 Alkol Dehidrogenaz Enzimi Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeline alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi 25 °C'de pH 4,0-8,0 aralığında incelenmiş ve Şekil 4.6'te gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi adsorpsiyon kapasitesi pH 4,0-5,0 arasında önemli oranda artmış, pH 5,0'ten daha yüksek değerlerde adsorpsiyon kapasitesi azalmıştır. İMAK'te metal iyonları ile bağlanmaya yatkın protein kısımlarının histidin, sistein ve triptofan amino asitlerinin olduğu bilinmektedir. Maya alkol dehidrogenaz enzimi çeşitli histidin birimleri içerdiğinden özellikle bu asitlerin bağlanmaya katkıda bulunması beklenmektedir (Willoughby, 1999).

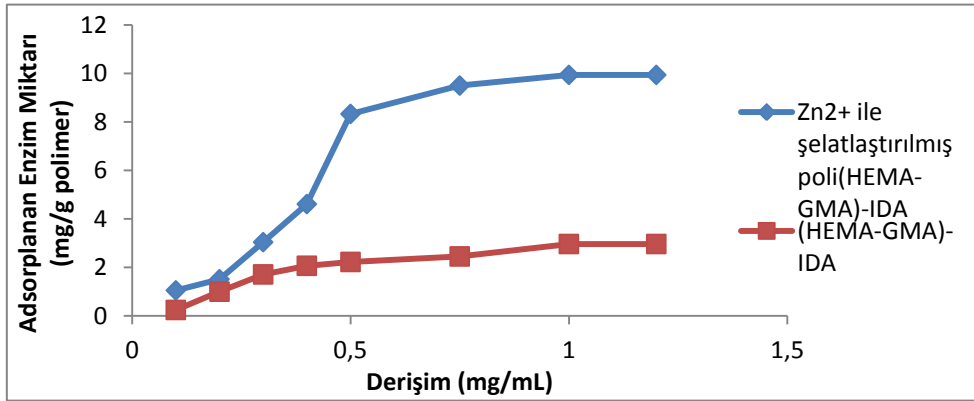


Şekil 4.6. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi. Başlangıç alkol dehidrogenaz derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

Hidayat vd. 2003, alkol dehidrogenaz ve immobilize Zn^{2+} iyonları arasındaki etkileşim bölgelerinin yüksek sayısını, alkol dehidrogenazdaki histidin birimlerinin yüksek sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Histidin amino asidinin imidazol grubunun pKa değeri 6,0'dır. pH 6,0'nın altında bu grubun protonlanması ve Zn^{2+} iyonları ile koordinasyonunun bozulması söz konusudur. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerinin pH 5,0'da sergilediği maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun histidin ve diğer amino asitlerin bu pH'da iyonlaşabilen grupları nedeni ile olması muhtemeldir.

4.2.2. Alkol Dehidrogenaz Enzimi Adsorpsiyonuna Alkol Dehidrogenaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

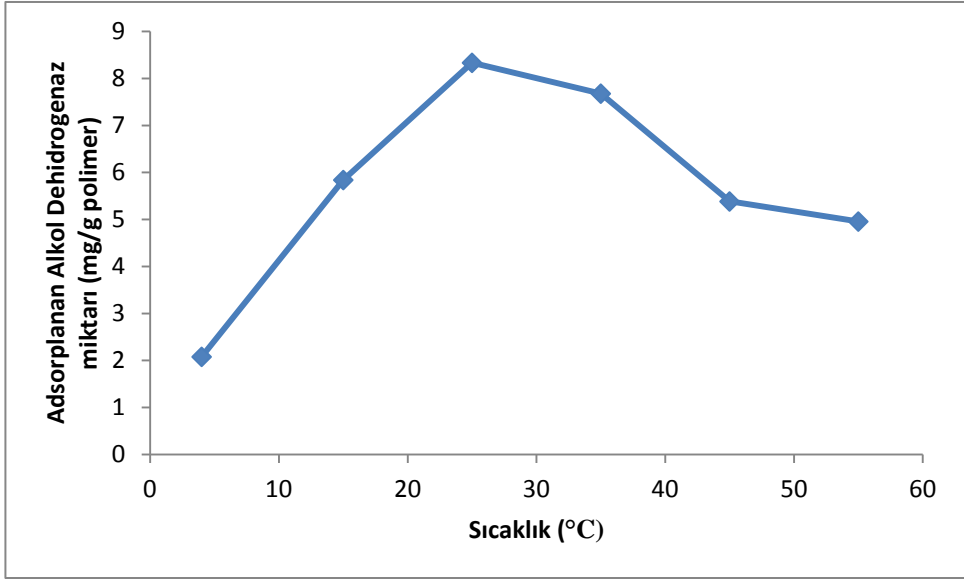
Şekil 4.7 poli(HEMA-GMA)-IDA ve Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna alkol dehidrogenaz başlangıç derişiminin etkisini göstermektedir. Alkol dehidrogenaz derişimine bağlı olarak adsorpsiyon kapasitesi artmış ve 1,0 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde bir plato değerine ulaşmıştır. Adsorpsiyon izoterminin başlangıç kısmının eğimi, alkol dehidrogenaz ve Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış gruplar arasındaki yüksek afiniteyi göstermektedir. Maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 1,0 mg/mL alkol dehidrogenaz derişiminde 9,94 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bu alkol dehidrogenaz derişimindeki non-spesifik adsorpsiyon ise 2,96 mg/g polimer olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7. poli(HEMA-GMA)-IDA ve Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna alkol dehidrogenaz derişiminin etkisi. pH: 5,0; inkübasyon süresi 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.3. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

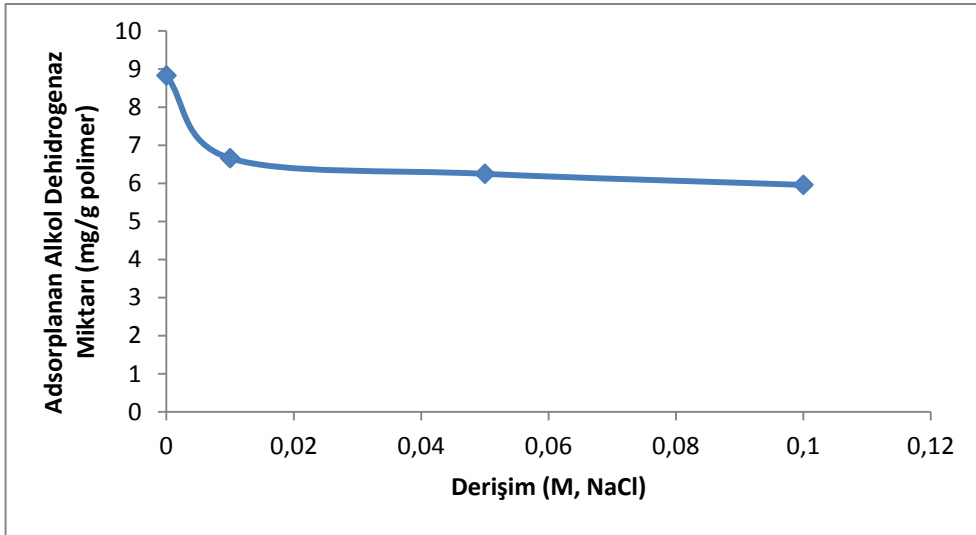
Şekil 4.8 Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini göstermektedir. Şekil 4.8'e bakıldığında sıcaklık artışına bağlı olarak adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı artmış, 25 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda alkol dehidrogenaz adsorpsiyon kapasitesi azalmıştır. Bu azalma yüksek sıcaklıklarda proteinin üç boyutlu yapısındaki değişimler ve kriyojel ve protein molekülleri arasındaki etkileşimleri bozabilecek termodinamik etkilerden kaynaklanabilir.



Şekil 4.8. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç alkol dehidrogenaz derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 5,0; inkübasyon süresi: 2 saat

4.2.4. Alkol Dehidrogenaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

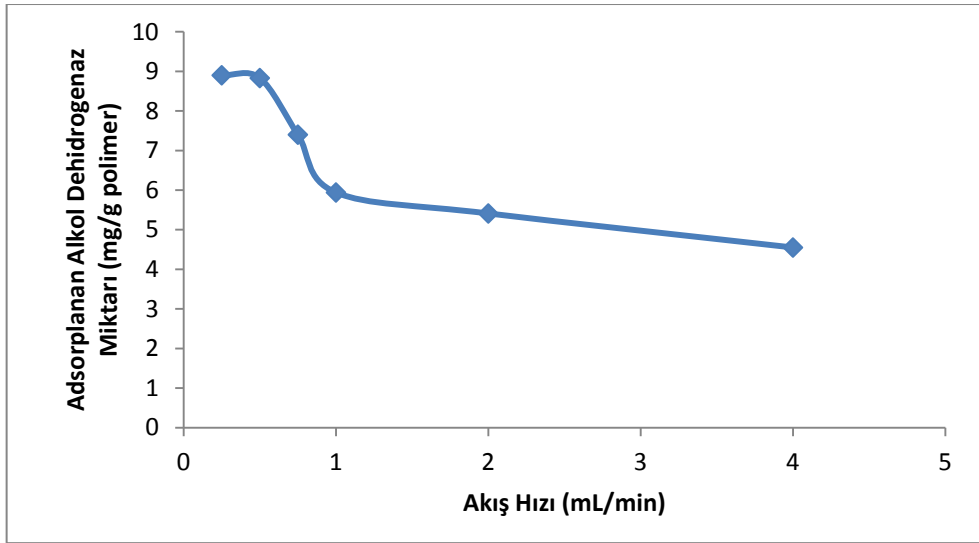
Alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi şekil 4.9’te gösterilmiştir. Şekilden iyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı görülmektedir. pH 5,0 asetat tamponunda iyonik şiddet 0,01’den 0,1’e arttırıldığında Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık % 32,50 oranında azalmıştır. Daha yüksek değerlerdeki iyonik şiddet etkileri protein çözeltisinde bulanıklaşma olması nedeniyle denenememiştir. Tuz derişiminin artışına karşılık alkol dehidrogenaz kapasitesindeki azalma, Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli ile protein molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimin azalmasından kaynaklanabilir (Bereli vd., 2006).



Şekil 4.9. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Başlangıç alkol dehidrogenaz derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 8,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.5. Alkol Dehidrogenaz Enzimi Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi

Farklı akış hızlarındaki alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu kapasitesi Şekil 4.10'da verilmiştir. Kromatografik akış hızının 0,5 mL/dak'dan 4 mL/dak'ya artırılması ile adsorpsiyon kapasitesi 8,90 mg /g polimer kriyojelden 4,55 mg/g polimer kriyojele düşmüştür. Bu, yüksek akış hızlarında alkol dehidrogenaz ve Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli arasındaki temas süresinin azalması nedeniyledir. Benzer sonuçlar daha önce yayınlanan çalışmalarda gösterilmiştir (Tüzmen vd., 2012).



Şekil 4.10. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna akış hızının etkisi.

4.2.6. Adsorpsiyon izotermi

Langmuir izoterm modeli, eşit ulaşılabilir adsorpsiyon bölgeleri, tek tabakalı yüzey kaplama ve adsorplanan türler arasında etkileşim olmaması gibi homojenite varsayımı temeline dayanmaktadır (Mohann vd., 2006; Uygun, 2008). Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$q_{eq} = q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + b \cdot C_{eq}) \quad \text{Eşitlik:4.1}$$

Burada q_{eq} , denge anında adsorbana bağlı alkol dehidrogenaz derişimi (mg/g); C_{eq} , çözeltideki denge alkol dehidrogenaz derişimi (mg/mL); b , Langmuir sabiti (mg/mL, adsorpsiyon serbest enerjisi veya net entalpi ile ilgili bir sabittir) ve q_{max} , maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g). Bu eşitlik aşağıdaki gibi linerleştirilebilir:

$$C_{eq}/q_{eq} = 1/q_{max} \cdot b + C_{eq}/q_{max} \quad \text{Eşitlik: 4.2}$$

C_{eq} 'a karşı C_{eq}/q_{eq} grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun kesimi $1/q_{max} \cdot b$ 'yi, eğimi $1/q_{max}$ 'ı verir.

Freundlich izoterm modeli, genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanır. Adsorplanan maddenin miktarı, tüm bölgelerdeki adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izotermi geri dönüşümlü adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabakanın oluşumu ile sınırlandırılmaz (Proctor ve Toro-Vazquez 1996; Uygun, 2008).

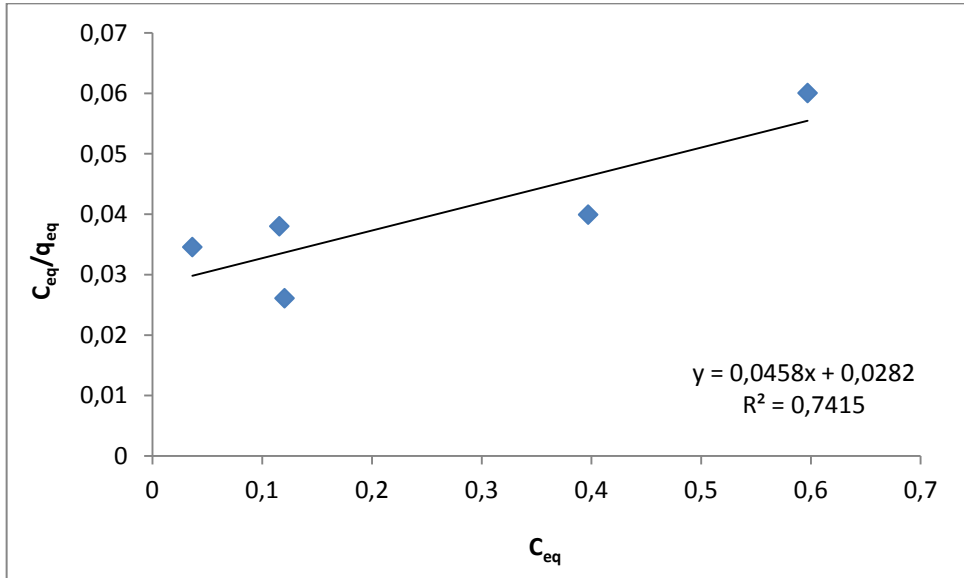
$$q_{eq} = K_f \cdot (C_{eq})^{1/n} \quad \text{Eşitlik:4.3}$$

Burada q_{eq} , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı (mg/g); C_{eq} , çözeltideki alkol dehidrogenaz denge derişimi (mg/mL); K_f , adsorbana bağlı adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g); $1/n$, adsorpsiyon şiddeti sabitidir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi linerleştirilebilir:

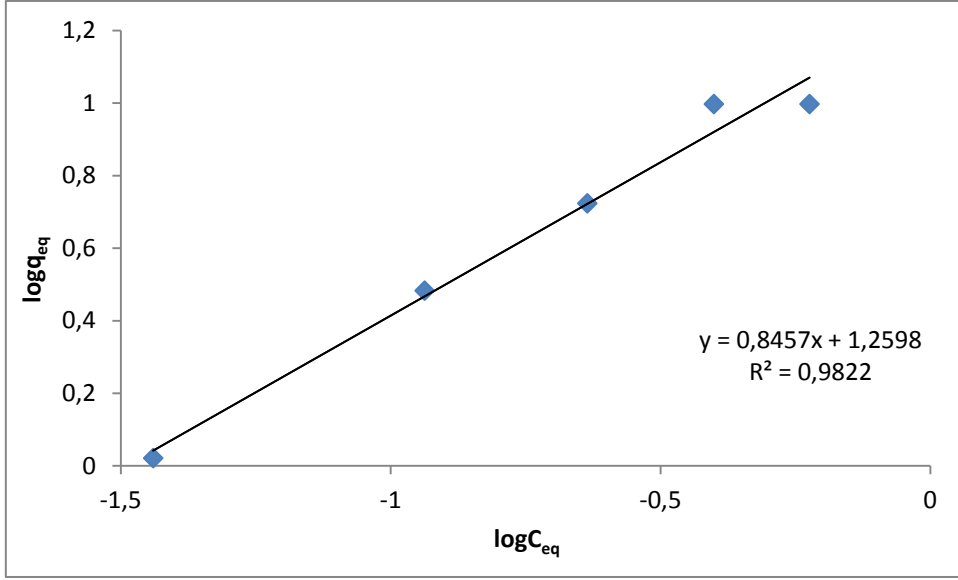
$$\log q_{eq} = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{eq} \quad \text{Eşitlik:4.4}$$

$\log C_{eq}$ 'e karşı $\log q_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun eğimi $1/n$ 'i, kesimi $\log K_f$ 'yi verir (Uygun, 2008).

Adsorpsiyon izotermi olan Langmuir ve Freundlich izotermi Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelleri üzerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun özelliklerini değerlendirmek için kullanılmış ve Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'deki izotermi elde edilmiştir. Çizelge 4.2'de bu izotermi elde edilen kinetik sabitler görülmektedir.



Şekil 4.11. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi. pH: 5,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C



Şekil 4.12. Zn^{2+} ile şelatlaştırılmı poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izoterminin. pH: 5,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25 °C

Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich izotermlerinin kinetik sabitleri

Langmuir			Freundlich		
q_{max}	b	R^2	K_f	1/n	R^2
(mg/g)	(mL/mg)		(mg/mL)		
22,2	1,61	0,7410	18,2	0,845	0,9822

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'deki adsorpsiyon izoterminin grafiklerinin korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında deneysel verilerin Freundlich izotermine uygun olduğu görülmektedir. Freundlich izoterminin genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanır ve çok tabakalı bağlanmayı ifade eder.

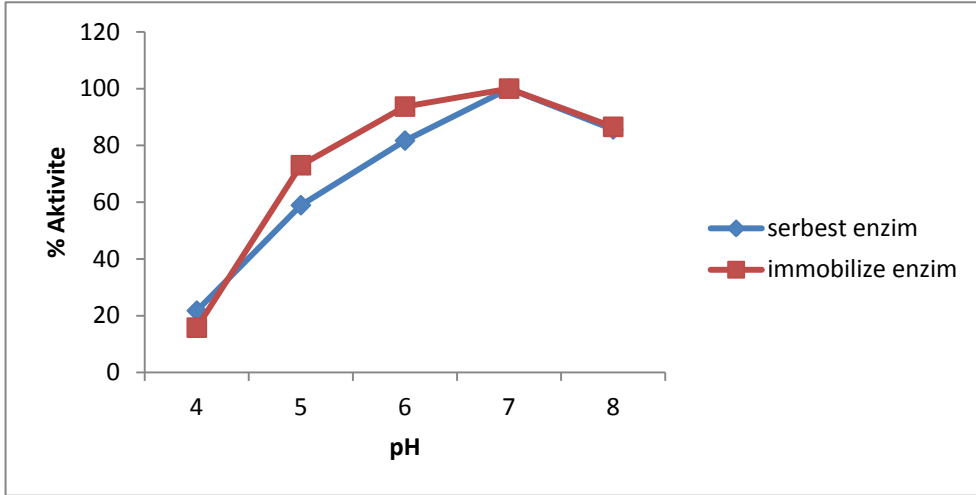
4.2.7. Zn²⁺ ile Şelatlaştırılmış Poli(HEMA-GMA)-IDA Kriyojelinden Alkol Dehidrogenaz Enziminin Desorpsiyonu ve Polimerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Afinite ayırmalarındaki en önemli adım adsorplanan proteinin mümkün olan en kısa sürede ve en yüksek miktarda desorbe edilebilmesidir. Bu çalışmada adsorplanan alkol dehidrogenaz moleküllerinin desorpsiyonu için pH 8,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 1,0 M NaCl çözeltisi kullanılmış ve 1 saatlik desorpsiyon süresi sonunda adsorplanan proteinin % 93,5 oranında desorpsiyonu sağlanmıştır. Sentezlenen Zn²⁺ ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için adsorpsiyon desorpsiyon işlemleri 50 döngü boyunca tekrarlanmış ve adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar hazırlanan kriyojelin bir afinite adsorbantı olarak kararlılığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

4.3. Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi Ölçümü

4.3.1. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi

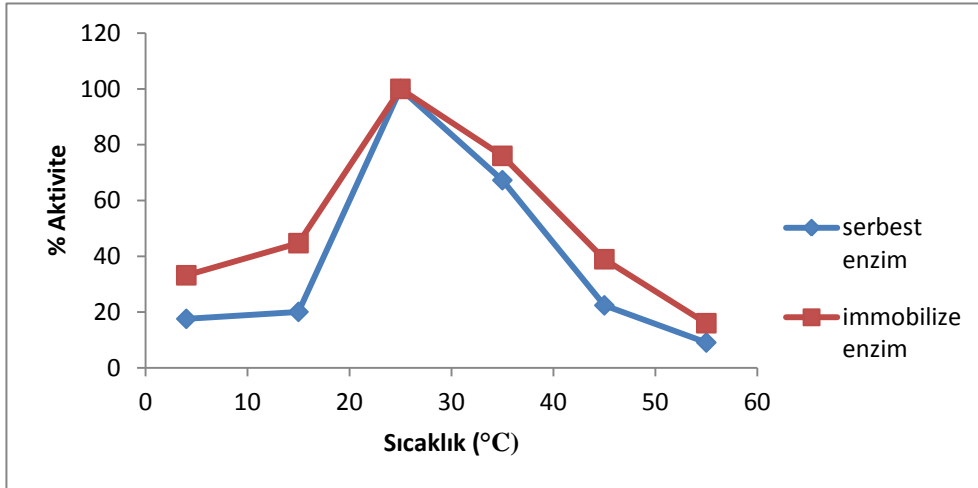
Fenilglioksilik asit substratı kullanılarak serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesi 25 °C'de pH'a bağlı olarak araştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Hem serbest hem de immobilize alkol dehidrogenazın optimum pH'ı 7,0 olarak bulunmuştur. Literatürde benzer bir sonuç Zhou vd. (2010), tarafından elde edilmiştir. Bu araştırmacılar serbest alkol dehidrogenaz enziminin farklı pH'larda fenilglioksilik asit substratı için optimum pH'ını 6,8 olarak bulmuşlardır.



Şekil 4.13. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'ın etkisi

4.3.2. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

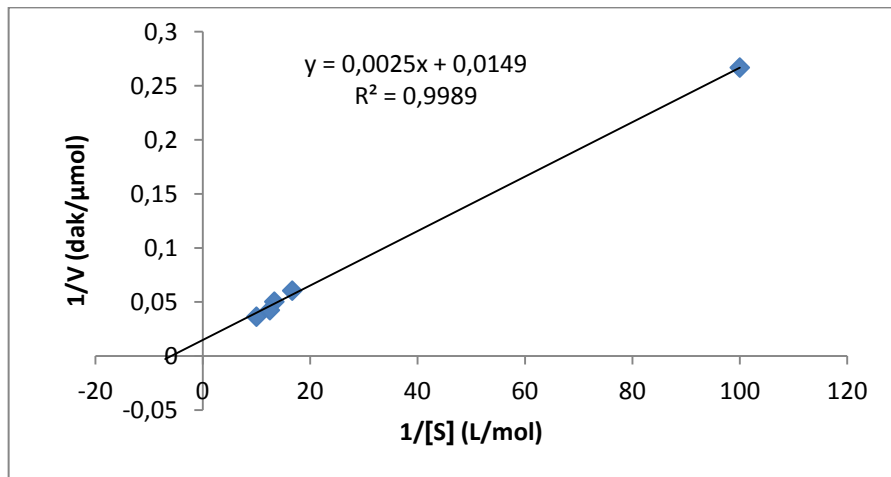
Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi 4-55 °C arasında 6 farklı sıcaklıkta incelenmiş ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Elde edilen grafiklerden serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri 25 °C olarak bulunmuştur. Ancak her sıcaklıkta immobilize enzimin daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu durum immobilize enzimin daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilceğini ve endüstriyel değerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Yakın bir sonuç Li vd. (2010), tarafından elde edilmiştir. Bu araştırmacılar serbest *S. cerevisiae* alkol dehidrogenaz enzimi için optimum sıcaklık değerini 30 °C olarak rapor etmişlerdir.



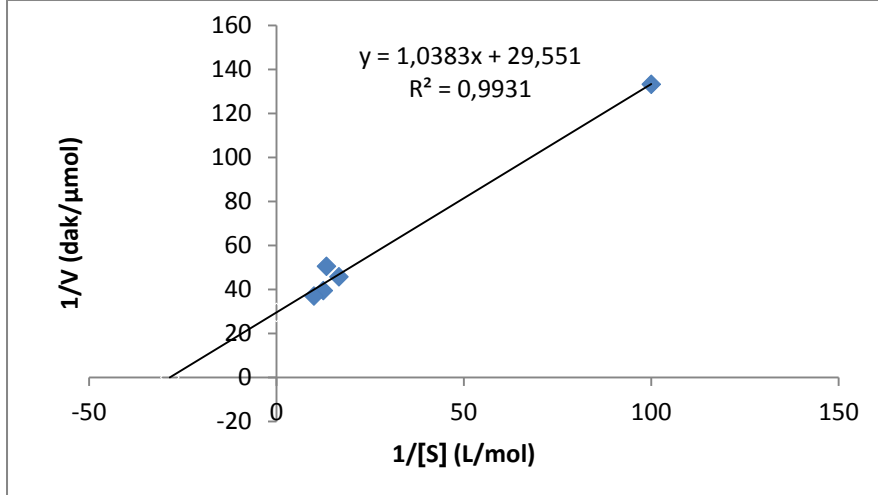
Şekil 4.14. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklık etkisi

4.3.3. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Enzim katalizinde bir enzimin kinetik parametrelerinin belirlenmesi o enzimin etkinliğinin ifade edilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enziminin kinetik sabitleri Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek değerlendirilmiş ve Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Serbest alkol dehidrogenaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.16. İmmobilize alkol dehidrogenaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

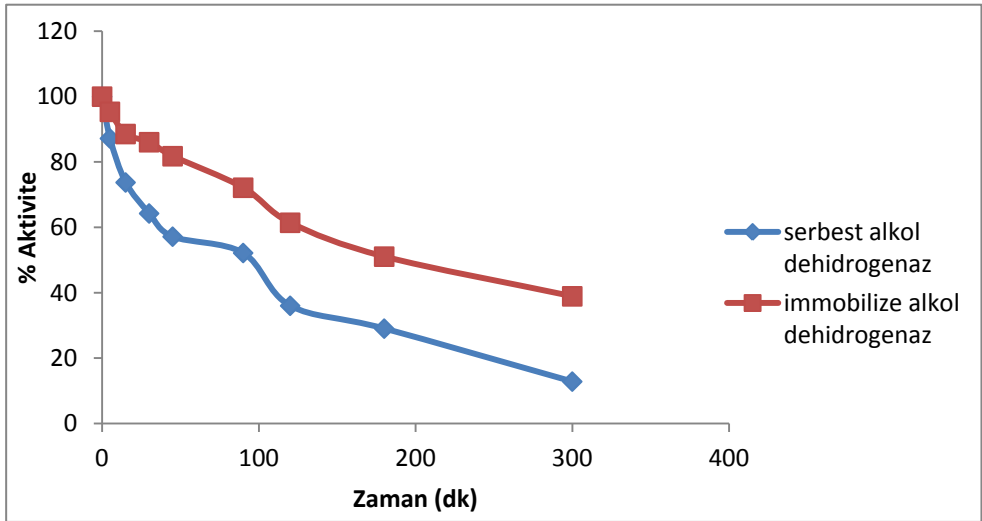
Yukarıdaki grafiklerden elde edilen kinetik sabitler Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. K_m bir enzimin substratına olan ilgisi olarak bilinir (Park vd., 2005) ve immobilizasyondan sonra genellikle K_m 'de bir artış beklenir. Bu çalışmada farklı bir durum yani K_m 'de azalma görülmektedir. V_{max} , enzimin tümü substratına doymuş olduğundaki olası en yüksek hızdır ve bu parametre immobilize enzimin gerçek özelliklerini yansıtır (Reshmi vd., 2007). Bu çalışmada immobilizasyonla V_{max} 'ın düştüğü görülmüştür. k_{cat} , turnover sayısı olarak bilinir ve bir enzimin immobilizasyonla davranışını değerlendirmede oldukça anlamlıdır. Bu çalışmada serbest alkol dehidrogenaz için k_{cat} değeri $3743,9 \text{ dak}^{-1}$ iken, immobilize alkol dehidrogenaz için $3165,74 \text{ dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur. k_{cat} değerindeki bu düşüş, enzimin birim zamanda ürüne çevirdiği molekül sayısında azalma olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın kinetik sabitleri

	K_m (mol/L)	V_{max} (μmol/dak)	k_{cat} (dak ⁻¹)
Serbest enzim	0,143	71,43	3743,9
İmmobilize enzim	0,035	0,034	3165,74

4.3.4. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

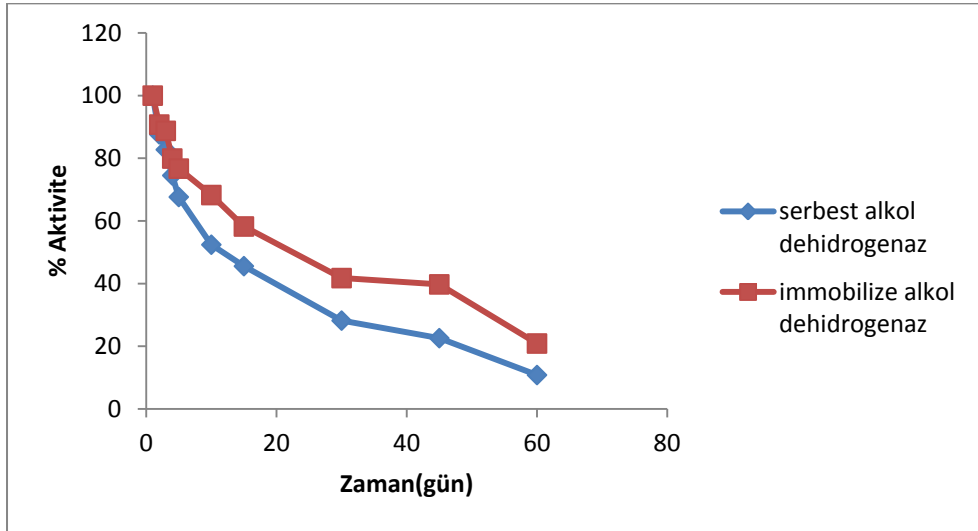
Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.17’de gösterilmiştir. 35 °C’de 300 dakika boyunca ısıyla muamele edildikten sonra serbest alkol dehidrogenaz başlangıç aktivitesinin % 12,85’ini korurken, immobilize alkol dehidrogenaz % 38,93’ünü korumuştur. İmmobilize alkol dehidrogenazın yüksek sıcaklıkta gösterdiği bu kararlılık onun endüstriyel açıdan önemini arttırmaktadır.



Şekil 4.17. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesinin 35°C’de zamana bağlı olarak değişimi

4.3.5. Serbest ve İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi

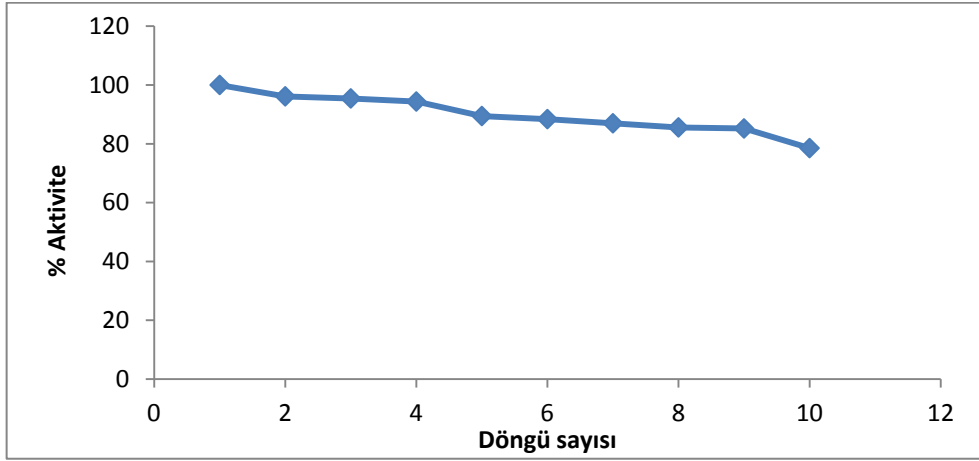
Enzimler genellikle bir destek üzerine immobilize edildiklerinde kararlılıkları artmaktadır. Bu tezde serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimleri 4 °C'de 60 gün boyunca saklanmış ve aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelenmiştir. Şekil 4.18, serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın zaman bağlı kararlılığını göstermektedir. İmmobilize enzim 60 günün sonunda bile başlangıç aktivitesinin %20'sini korumuştur.



Şekil 4.18. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enzimlerinin depo kararlılığı

4.3.6. İmmobilize Alkol Dehidrogenaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

Enzimlerin yüksek maaliyeti ve immobilize enzimlerin defalarca kullanılabilir olması immobilizasyon işlemini değerli kılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA desteğine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz enzimi on kez ard arda kullanılmış ve her kullanımda aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 4.19). On kullanımdan sonra immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesinde yaklaşık % 22'lik bir azalma görülmüştür.



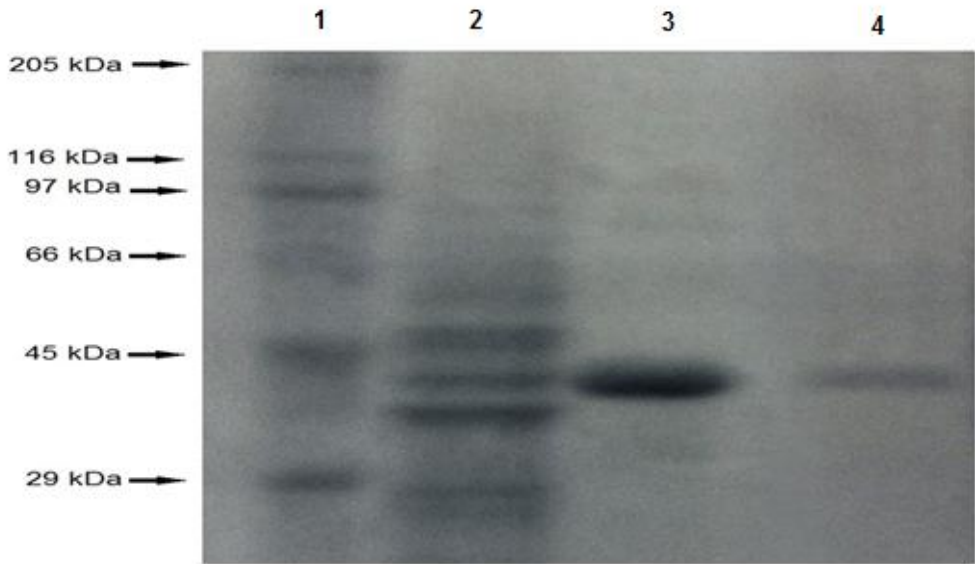
Şekil 4.19. İmmobilize alkol dehidrogenaz enziminin işlemsel kararlılığı

4.4. Mayadan Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

Bu çalışmada Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli hazırlanmış ve bu İMAK desteğine maya alkol dehidrogenaz enziminin adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşulları araştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan İMAK desteği kullanılarak mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan saflaştırma işlemleri sonunda ham maya homojenatından alkol dehidrogenaz enzimi % 62,73 aktivite verimi ile 71,05 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.4). Elde edilen enzimin saflığı gümüş ile boyanmış SDS-PAGE ile belirlenmiş ve elde edilen jel deseni Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Maya alkol dehidrogenaz enziminin Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli ile saflaştırılması

Saflaştırma Adımı	Total Protein (mg)	Aktivite (Unite)	Spesifik Aktivite (Unite/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	6,23	4,26	0,683	100	1
Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli ile saflaştırılmış alkol dehidrogenaz	0,055	2,67	48,6	62,7	71,2



şekil 4.20. Mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin gümüşle boyanmış SDS-PAGE analizi. 1: standartlar; 2: ham homojenat 3: ticari alkol dehidrogenaz; 4: mayadan saflaştırılmış alkol dehidrogenaz

Çizelge 4.5 Alkol dehidrogenaz saflaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalardaki veriler

Enzimin Adı	Enzimin Kaynağı	% Verim	Saflaştırma Katsayısı	Kullanılan Yöntem	Literatür
Alkol Dehidrogenaz	Maya	54	800	IMAK	Cabrera vd., 1997
Alkol Dehidrogenaz	Maya	78.2	8.2	IMAK	Willoughby vd., 1999
Alkol Dehidrogenaz	Maya	66	4.7	IMAK-Boya Ligand Afinite Kromatografisi	Hidayat vd., 2003
Alkol Dehidrogenaz	Maya	58	13	Boya Ligand Afinite Kromatografisi	Mondal vd., 2003
Alkol Dehidrogenaz	Maya	93.5	8.8	IMAK-Boya Ligand Afinite Kromatografisi	Hidayat vd., 2004
Alkol Dehidrogenaz	Maya	89	4.6	Boya Ligand Afinite Kromatografisi	Chang vd., 2006

Bu çizelge incelendiğinde Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojelinin, mayadan alkol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında oldukça iyi bir destek materyali olduğu görülmektedir.

Kriyojellerin düşük akış direnci ile karakterize edilmesi onların içten bağlı büyük gözenekli yapıları nedeniyle ve bu, ilginç kromatografik özellikleri olan kriyojel dolgulu kolonların tasarlanmasına izin vermiştir. Kriyojel kolonu içerisine çözünenin transportu temel olarak difüzyondan ziyade konveksiyon yoluyla gerçekleşmektedir. Süpermakrogözenekli kriyojel hazırlama işleminin teknik olarak basit ve monomer ve başlatıcılarının ucuz olması, süpermakrogözenekli kriyojellerin safsızlık içeren ham ekstraktlardan protein saflaştırılmasında için ilginç alternatifler olması olarak sağlamıştır. Proteini yakalama adımı birçok biyoteknolojik süreçte kritik adımdır. Bu sebeple, kriyojellerin kullanımı dolgulu yataklara adsorpsiyon ve berraklaştırma adımlarını içeren geleneksel metotlara ilaveten genişletilmiş dolgulu yataklarda büyük boncukların kullanılmasının getirdiği dezavantajlara önemli bir alternatif olmuştur. Bu jellerin dezavantajı, proteinler için 1 mg/mL'yi geçmeyen düşük bağlanma kapasiteleridir (Jungbauer ve Hahn, 2004). Bu çalışmada da sentezlenen kriyojellere bağlanan alkol dehidrogenaz miktarı çok fazla olmamasına (9,94 mg/g kriyojel) rağmen ölçek büyütme gidildiğinde kriyojellerin yukarıda bahsedilen avantajlarından dolayı çok ekonomik bir saflaştırma desteği olması dikkat çekicidir.

5. SONUÇ

- ❖ Bu çalışmada, Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve alkol dehidrogenaz enziminin immobilizasyonu ve saflaştırılması için kullanılabilecek yeni bir destek materyali hazırlanmıştır.
- ❖ Sentezlenen kriyojellerin elastik, opak ve süngerimsi yapıda olduğu görülmüştür. Kriyojeller kurutulup sulu ortama konulduğu zaman hızlıca su alarak şiştiği görülmüş ve dengedeki şişme yüzdesi yaklaşık % 600 olarak bulunmuştur.
- ❖ FTIR analizi ile kriyojel yapısına IDA'nın bağlandığı görülmüş ve yapıya katılan IDA ve Zn^{2+} miktarı EDX analizi ile hesaplanmıştır.
- ❖ SEM analizleri ile hazırlanan kriyojelin oldukça gözenekli yapıda olduğu görülmüş ve gözenek boyutu 30-50 μm olarak belirlenmiştir.
- ❖ Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeline maksimum alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 1,0 mg/mL derişiminde pH 5,0 asetat tamponunda 9,94 mg/g polimer olarak bulunmuştur.
- ❖ Poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeline non-spesifik alkol dehidrogenaz adsorpsiyonu 2,96 mg/g polimer olarak bulunmuştur.
- ❖ Sıcaklığın 4 °C'den 25 °C'ye kadar artması ile adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı artmış daha sonra sıcaklığın 55 °C'ye kadar arttırılması ile adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarı 4,96 mg/g polimere düşmüştür.
- ❖ İyonik şiddet etkisinin incelenmesinde, iyonik şiddetin arttırılmasıyla Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerine alkol dehidrogenaz adsorpsiyonunda azalma gözlenmiştir.
- ❖ Akış hızı etkisinin incelenmesinde, kromatografik akış hızının 0,5 mL/dak'dan 4,0 mL/dak'a arttırılmasıyla adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarında azalma meydana gelmiştir.
- ❖ Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeline alkol dehidrogenaz adsorpsiyonuna ilişkin izotermeler değerlendirildiğinde, Freundlich adsorpsiyon izotermine uygunluğu görülmüştür.
- ❖ Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojellerden alkol dehidrogenaz enziminin desorpsiyonu pH 8,0 karbonat tamponunda hazırlanan 1,0 M NaCl ile gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon oranı % 93,5 olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri 50 döngü boyunca

tekrarlanılarak adsorplanan alkol dehidrogenaz miktarında önemli bir azalma olmadığı rapor edilmiştir.

- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine pH'ın etkisi 4,0-8,0 tamponları arasında incelenmiş ve serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz enziminin optimum pH'ları pH 7,0 olarak bulunmuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 4-55 °C arasında incelenmiştir. Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın optimum sıcaklığı 25 °C olarak bulunmuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenaz için k_{cat} değerleri sırasıyla 3743,9 dak^{-1} ve 3165,74 dak^{-1} olarak bulunmuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın ısıl kararlılıkları 35 °C'de 300 dakika boyunca izlenmiştir. İmmobilize alkol dehidrogenazın ısıl kararlılığının serbest alkol dehidrogenazinkinden daha yüksek olduğu görülmüştür.
- ❖ Serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın depo kararlılığı 60 gün boyunca izlenmiştir. 30 günün sonunda immobilize alkol dehidrogenazın aktivitesini % 41,8'sini koruduğu görülürken, serbest alkol dehidrogenaz sadece % 28,2'sini koruyabildiği görülmüştür.
- ❖ İmmobilize alkol dehidrogenazın işlemsel kararlılığı incelendiği zaman aynı immobilize enzim 10 döngü boyunca art arda kullanıldığında aktivitesinde sadece % 22'lik bir azalma görülmüştür.
- ❖ Zn^{2+} ile şelatlaştırılmış poli(HEMA-GMA)-IDA kriyojeli ile ham maya homojenatından alkol dehidrogenaz enzimi tek basamakta saflaştırılmış ve sonuç elektroforetik olarak görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Alois Jungbauer, Rainer Hahn. Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *Journal of Separation Science*, 2004, 27, 767-778.
- Arat, Ö. 2007. *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Arevalo, E., Rendueles, M., Fernandez, A., Diaz, M. 2000. Equilibrium and simulation of the operation for the adsorption of albumin proteins in an iminodiacetic-Cu bounded ion exchange resin (IMAC). **Separation and Purification Technology**, 18: 217-225.
- Arnold, F. H. 1991. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. **Biotechnology (NY)**, 9: 151-156.
- Bajpai, A. K., Saini, R. 2006. Preparation and characterization of novel biocompatible cryogels of poly(vinyl alcohol) and egg-albumin and their water sorption study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 17: 49-61.
- Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E. B., Yavuz, H., Denizli, A. 2010. Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. **Materials Science and Engineering**, 30: 323-329.
- Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkek, A., Denizli, A. 2006. Antibody Purification Using Porous Metal-Chelated Monolithic Columns. **Journal of Applied Polymer Science**, 101: 395-404.
- Bibi, N. S., Singh, N. K., Dsouza, R. N., Aasim, M., Fernandez-Lahore, M. 2013. Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. **Journal of Chromatography A**, 1272: 145-149.

- Bolivar, J. M., Wilson, L., Ferrarotti, S. A., Guisan, J. M., Fernandez- Lafuente, R., Mateo, C. 2006. Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose. **Journal of Biotechnology**, 125: 85-94.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-251.
- Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N., Perez-Mateos, M. 2007. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. **Food Chemistry**, 104: 1172-1182.
- Cabrera, N., Rangel, P., Hernandez-Munoz, R., Monfort, R.P. 1997. Purification of alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica* and *S. cerevisiae* using zinc-affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, 10: 340-344.
- Carleysmith, S. W., Lilly, M. D. 1979. Deacylation of benzylpenicillin by immobilized penicillin acylase in a continuous four-stage stirred-tank reactor. **Biotechnol. Bioeng**, 21: 1057-1073.
- Chage, G. S. 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **Biochem J**, 183: 647-656.
- Chang, Y. K., Chen, J. P., Sheu, J. R., Cheng, P. J., Su, C. H., Chou, S. Y. 2006. Direct recovery of alcohol dehydrogenase from unclarified yeast cell homogenate by IDEBAC using an improved scheme for eluting. **Biochemical Engineering Journal**, 30: 1-10.
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Ng, T. B. 2012. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, 96: 1411-1420.
- Colnik, M., Primožic, M., Knez, Z., Habulin, M. 2012. Use of supercritical carbon dioxide for proteins and alcohol dehydrogenase release from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Supercritical Fluids**, 65: 11-17.

- Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Kumar, A., Plieva, F.M., Mattiasson, B. 2007. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 106: 101-127.
- Denizli, A. 2011. Biyoayırma ve Polimerik Taşıyıcılar. Hacettepe Üniversitesi, Tükiye Bilimler Akademisi, 2011. Ankara.
- Follmer, C., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. 2004. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. **Plant Science**, 167: 241-246.
- Grubhofer, N., Scheith, L. 1954. Die spaltung von racemischer mandelsäure mit einem optisch aktiven anionenaustauscher. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem**, 296: 262-266.
- Hedin, S. G. 1915. Grundzüge der Physikalischen Chemie in ihrer Beziehung zur Biologie. **J. F. Bergmann Verlag**, Weisbaden.
- Hidayat, C., Nakajima, M., Takagi, M., Yoshida, T. 2003. Development of new dye metal agarose-coated alumina matrix and elution strategy for purification of alcohol dehydrogenase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95: 133-138.
- Hidayat, C., Takagi, M., Yoshida, T. 2004. Expanded bed adsorption for purification of alcohol dehydrogenase using a dye-iminodiacetic acid matrix. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 4: 284-287.
- Hovath, Z., Nagydiosi, G. 1975. Imino-diacetic-acid-ethyl-cellulose and its chelate forming behavior-1. **J Inorg Nulc Chem** 37: 767-769.
- Kagedal, L. 2011. Immobilized metal ion affinity chromatography. In: Janson JC, Ryden L Protein purification: principles, high-resolution methods and applications, 3rd edn. Wiley, New York, pp 183-201.

- Kaya, N. 2012. Manyetik Boya-Ligand Afinitive Nanoyapılarını Kullanarak *Saccharomyces cerevisiae*'den Alkol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, K. P., Mattiasson, B. 2006. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, 1103: 35-42.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 277: 680-685.
- Leskovac, V., Trivić, S., Peričin, D. 2002. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 2: 481-494.
- Li, G. Y., Huang, K. L., Jiang, Y. R., Yang, D. L., Ding, P. 2008. Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 42: 405-412.
- Li, G., Zhou, Z., Li, Y., Huang, K., Zhong, M. 2010. Surface functionalization of chitosan-coated magnetic nanoparticles for covalent immobilization of yeast alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 322: 3862-3868.
- Liao, M. H., Chen, D. H. 2001. Immobilized of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. **Biotechnology Letters**, 23: 1723-1727.
- Liou, C. L., Chen, Y. C., Lin, S. C. 2008. A poly(2-hydroxyethyl metacrylate)-based immobilized metal affinity chromatography adsorbent for protein purification. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, 39: 329-336.

- Lozinsky, V. I. 2008. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supernacroporous materials for biotechnological purposes. **Russian Chemical Bulletin**, 57: 1015-1032.
- Luding, Y., Shaochuan, S., Junxian, Y., Kejian, Y. 2011. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 19: 876-880.
- Lui, S., Cai, C. 2007. Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 602: 103-114.
- Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K. S. M. S., Nene, S. 2008. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction. **Biochemical Engineering Journal**, 38: 414-420.
- Manecke, G., Singer, S., 1960. Über einige chemische umsetzungen am polyaminostyrol. *Makromol. Chem.* 37: 119–142.
- Michael, F., Ewers, J. 1949. Synthese von verbindungen der cellulose mit eiweißstoffen. **Makromol. Chem**, 3: 200-209.
- Miletic, N., Nastasovic, A., Loos, K. 2012. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, 115: 126-135.
- Mohann, D., Pittman, C.U. Jr. and Steele, P.H., 2006. Single, binary and multicomponent adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin-a biosorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, 297: 489- 504.
- Mondal, K., Roy, I., Gupta, M.N. 2003. Carrageenan as a carrier in affinity precipitation of yeast alcohol dehydrogenase. **Protein Expression & Purification**, 32: 151-160.
- Negoro, M., Wakabayashi, I. 2004. New simple method for purification of class I alcohol dehydrogenase. **Alcohol & Alcoholism**, 39: 178-182.

- Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I.S., Kim, W.S. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. **Process Biochemistry**, 40: 53-61.
- Plapp, B.V., Ganzhorn, A.J., Gould, R.M., Green, D.W., Jacobi, T., Warth, E., Kratzer, D.A. 1990. Catalysis by yeast alcohol dehydrogenase. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 3* (Weiner, H., Wermuth, B. and Crabb, D.V., Eds.), Plenum Pres, pp. 241-251, New York.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, 30: 1657-1671.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, 258: 598-599.
- Proctor, A. Toro-Vaquez, I.F. 1996. The Freundlich isotherm in studying adsorption in oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 73: 1627-1633.
- Raghava, S., Gupta, M. N. 2010. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase with an unusual specificity towards glycerol from *Thermus thermophilus*. **Bioresource Technology**, 101: 2554-2557.
- Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S. 2007. Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. **Catalysis Communications**, 8: 393-399.
- Robty, J.F., White, B.J. 1987. Electrophoretic techniques. In: *Biochemical techniques: theory and practice*. Waveland Pres Inc., pp 131-157.

- Rocha-Martin, J., Vega, D. E., Cabrera, Z., Bolivar, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Berenguer, J., Guisan, J. M. 2009. Purification, immobilization and stabilization of a highly enantioselective alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 cloned in *E. coli*. **Process Biochemistry**, 44: 1004-1012.
- Shibusawa, Y., Fujiwara, T., Shindo, H., Ita, Y. 2004. Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye–ligand affinity counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 799: 239-244.
- Stanescu, D. M., Fogorasi, M., Shaskolskiy, B. L., Garvilas, S., Lozinsky, V. I. 2010. New potential biocatalysts by laccase immobilization in PVA cryogel type carrier. **Appl Biochem Biotechnol**, 160: 1947-1954.
- Sulkowski, E. 1989. The saga of IMAC and MIT. **BioEssays**, 10: 170-175.
- Tischer, W., Wedekind, F. 1999. Immobilized enzymes: methods and applications. In: Fressner, W.D. (Ed.), **Biocatalysis From Discovery to Application**, Springer-Verlag, Berlin, pp. 95–126.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I. 1969. Studies on continuous enzyme reactions. Part V. Kinetics and industrial application of aminoacylase column for continuous optical resolution of acyl-DL-amino acids. **Agricultural and Biological Chemistry**, 33: 1047-1052.
- Trivedi, A., Heinemann, M., Spies, A. C., Dausmann, T., Büchs, J. 2005. Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 99: 340-347.
- Tüzmen, N., Kalburcu, T., Denizli, A. 2012. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. **Process Biochemistry**, 47: 26-33.
- Uygun, D.A. 2008. Protein Saflaştırılması İçin Magnetik Nano Yapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.

- Vallee, B.L., Hoch, F.L. 1955. Zinc: A component of yeast alcohol dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 41: 327-338.
- Vançan, S., Miranda, E. A., Bueno, S. M. A. 2002. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc and cobalt ions and different buffer systems. **Process Biochemistry**, 37: 573-579.
- Walker, J.M. 2002. Quantification of radiolabeled proteins in polyacrylamide gels. In: *The Protein Protocols Handbook* (Springer, W.R., Eds.), Humana Pres Inc., pp. 231-235, Totowa, New Jersey.
- Wang, C., Li, B., Ao, J. 2012. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, 134: 1231-1238.
- Willoughby, N.A., Kirschner, T., Smith, M.P., Hjorth, R., Titchener-Hooker, N.J. 1999. Immobilised metal ion affinity chromatography for purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast using an expanded bed adsorption system. **Journal of Chromatography A**, 840: 195-204.
- Wu, J., Luan, M., Zhao, J. 2006. Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, 39: 185-191.
- Xu, S., Lu, Y., Jiang, Z., Wu, H. 2006. Silica nanotubes-doped alginate gel for yeast alcohol dehydrogenase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B**, 43: 68-73.
- Yao, K., Yun, J., Shen, S., Wang, L., He, X., Yu, X. 2006. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1109: 103-110.
- Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, 43: 272-279.

- Ying, X., Ma, K. 2011. Characterization of a zinc-containing alcohol dehydrogenase with stereoselectivity from the hyperthermophilic archaeon *thermococcus guaymasensis*. **Journal of Bacteriology**, 193: 3009-3019.
- Zhou, Z-D., Li, G-Y., Li, Y-J. 2010. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, 47: 21-26.
- Zou, H., Luo, Q., Xiao, X., Gou, Z., Kong, L., Mao, X. 2001. Chromatographic separation of proteins on metal immobilized iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimetacrylate). **Journal of Chromatography**, 926: 255-264.
- Zou, X., Liu, D., Zhong, L., Yang, B., Lou, Y., Hu, B., Yin, Y. 2011. Highly specific capture and direct MALDI-MS analysis of phosphorylated peptides using novel multifunctional chitosan-GMA-IDA-Fe (III) nanosphere. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 401: 1251-1261.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Begüm AKDUMAN

Doğum Yeri ve Tarihi: İZMİR/1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi,

Fen Edebiyat Fakültesi,

Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi,

Fen Bilimleri Enstitüsü,

Kimya Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

1. Uygun, D.A., Akduman, B., Uygun, M., Akgöl, S. and Denizli, A. 2012. Purification of papain using reactive green 5 attached supermacroporous monolithic cryogel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 167, 552-563, 2012.
2. Akduman, B., Uygun, M., Uygun, D.A. and Antalík, M. 2013. Fe₃O₄ magnetic core coated by silver and functionalized with N-acetyl cysteine as novel nanoparticles in ferritin adsorption. **Journal of Nanoparticle Research**, 15, 1564, 2013.

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası**-Ulusal**

1.Uygun, D. A., Akduman, B., Akgöl, S., Denizli, A. Boya bağı kriyojel yapılarına papain adsorpsiyonu. Kromatografi 2011, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 7-10 Eylül 2011 (Poster).

c) Katıldığı Projeler

1. “Fe³⁺ ile şelatlaştırılmış manyetik gümüş nano partiküllere ferritin adsorpsiyonu”. ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-11009. Proje araştırmacısı.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : -

İLETİŞİM

E-posta Adresi : begumakduman1008@gmail.com

Tarih : 13.06.2013