

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**İMİDAZOL FONKSİYONEL GRUBUNA SAHİP  
KRİYOJELLER İLE LİZOZİM ADSORPSİYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH**

**DENİZLİ, OCAK - 2024**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**



**İMİDAZOL FONKSİYONEL GRUBUNA SAHİP  
KRİYOJELLER İLE LİZOZİM ADSORPSİYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH**

**DENİZLİ, OCAK - 2024**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH** tarafından hazırlanan “**İMİDAZOL FONKSİYONEL GRUBUNA SAHİP KRİYOJELLER İLE LİZOZİM ADSORPSİYONU**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24.01.2024 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Koray ŞARKAYA

.....

Üye

Doç. Dr. Berna KAVAKÇIOĞLU  
YARDIMCI

.....

Üye

Doç Dr. Kemal ÇETİN

.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Yusuf ÖNER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH**

## ÖZET

**İMİDAZOL FONKSİYONEL GRUBUNA SAHİP KRİYOJELLER İLE  
LİZOZİM ADSORPSİYONU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ KORAY ŞARKAYA)  
DENİZLİ, OCAK - 2024**

Sunulan bu tez çalışmasında, süpermakrogözenekli kriyojeller sentezlendi ve sulu çözeltiden lizozim uzaklaştırılması için kullanıldı. İmidazol fonksiyonel grupları, komonomer olarak n-vinilimidazol kullanılarak kriyojellere pseudo-spesifiklik (sahte özgülük) kazandırmak amacıyla temel bir polimerik iskelete dahil edildi. Kriyojeller, plastik bir şırınga kolonu içinde kısmen dondurulmuş monomerlerin sulu bir çözeltisinde kriyojelasyon yoluyla hazırlandı. poliakrilamit-N-vinil imidazol [poli(AAm-VIM)] kriyojeller, suda çözünür ve afinite ligandı olarak fonksiyonel monomer olan N-vinil imidazolün, hidrofilik ve jelleştirici amacıyla Akrilamit monomeri ile çapraz bağlayıcı olarak N-N Metilenbisakrilamit varlığında polimerizasyonu yoluyla hazırlandı. Sentezlenen kriyojellerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değerlendirmek için yapılan karakterizasyon çalışmaları kapsamında şişme testi, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), elementel analiz, Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) ve Termo Gravimetrik Analiz (TGA-DTA) yöntemiyle yapıldı.

poli(AAm-VIM) kriyojelleriyle sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonu çalışmaları pH 9.0 tamponunda gerçekleştirildi. Adsorpsiyon sürecindeki optimum koşulların belirlenebilmesi için başlanıç derişimi taraması, iyonik şiddet etkisi, sıcaklık etkisi, kolonun akış hızı gibi parametreler ışığında lizozim adsorpsiyonu için en uygun koşullar belirlenmiş oldu. Adsorpsiyon parametrelerinin matematiksel olarak değerlendirilebilmesinde izoterm modeli olarak Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri çalışıldı. Elde edilen regresyon katsayısı sonuçlarına göre, lizozim adsorpsiyonunun Langmuir izoterm modeliyle daha uyumlu olduğu saptandı. SDS-PAGE analizi neticesinde, pol(AAm-VIM) kriyojel kolonunun sulu çözeltiden lizozim ayırımı için saflık kontrolü gerçekleştirildi. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü içeriğinde gerçekleştirilen tekrar kullanılabilirlik deneyleri ile poli(AAm-VIM) kriyojel afinite kolonların inertliği ve rejenerasyon kabiliyeti ölçümlendi.

**ANAHTAR KLİMELER:** Hidrojeller, Kriyojeller, Lizozim, Adsorpsiyon, Afinite Kromatografisi

## ABSTRACT

### CRYOGELS CONTAINING IMIDAZOLE FUNCTIONAL GROUP FOR LYSOZYME ADSORPTION

MSC THESIS

**RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH**  
**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**  
**CHEMISTRY**

(SUPERVISOR:ASST. PROF. KORAY ŞARKAYA)

DENİZLİ, JANUARY 2024

In this thesis, super macroporous cryogels were synthesized and used to purify lysozyme from an aqueous solution. Imidazole functional groups were incorporated into a basic polymeric skeleton to impart pseudo-specificity to the cryogels using n-vinylimidazole as the comonomer. Cryogels were prepared by cryogelation in an aqueous solution of partially frozen monomers in a plastic syringe column. polyacrylamide-N-vinyl imidazole) [poly(AAm-VIM)] cryogels were prepared by polymerization of N-vinyl imidazole, a water-soluble and functional monomer as affinity ligand, with Acrylamide monomer for hydrophilic and gelling purposes in the presence of N-N Methylenebisacrylamide as cross-linker. Within the scope of characterization studies to evaluate the physical and chemical properties of the synthesized cryogels, swelling test, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), elemental analysis, Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM), and Thermo Gravimetric Analysis (TGA-DTA) methods were performed.

Lysozyme adsorption studies from aqueous solution with poly(AAm-VIM) cryogels were carried out in pH 9 (TRIS buffer). In order to determine the optimum conditions in the adsorption process, the most suitable conditions for lysozyme adsorption were determined in the light of parameters such as initial concentration screening, ionic strength effect, temperature effect, and flow rate of the column. Langmuir and Freundlich's isotherm models were studied as isotherm models to evaluate the adsorption parameters mathematically. According to the regression coefficient results obtained, it was determined that lysozyme adsorption was more compatible with the Langmuir isotherm model. As a result of SDS-PAGE analysis, purity control of the pol(AAm-VIM) cryogel column was carried out to separate lysozyme from the aqueous solution. The inertness and regeneration ability of poly(AAm-VIM) cryogel affinity columns were measured with reusability experiments performed within the adsorption-desorption cycle.

**KEYWORDS:** Hydrogels, Cryogels, Lysozyme, Adsorption, Affinity Chromatography

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ÖZET</b> .....  | <b>i</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>ii</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | <b>iii</b>  |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....   | <b>v</b>    |
| <b>TABLO LİSTESİ</b> .....   | <b>vi</b>   |
| <b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....  | <b>vii</b>  |
| <b>ÖNSÖZ</b> .....   | <b>viii</b> |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>2. BİYOAFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ</b> .....                                   | <b>6</b>    |
| 2.1 Afinite Saflaştırmasının Uygulanması .....                               | 6           |
| 2.2 Afinite Kromatografisi Yöntemleri .....                                  | 7           |
| 2.2.1 İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) .....                   | 8           |
| 2.2.2 Metal Oksit Afinite Kromatografisi (MOAC) .....                        | 8           |
| 2.2.3 Boya-Ligand Afinite Kromatografisi .....                               | 10          |
| 2.2.4 Protein A Afinite Kromatografisi (PAAC).....                           | 10          |
| 2.2.5 Hücre Afinite Yakalama Kromatografisi (CACC).....                      | 11          |
| 2.2.6 Pseudospesifik Ligand Afinite Kromatografisi (PLAC) .....              | 11          |
| <b>3. KRİYOJELLER</b> .....  | <b>13</b>   |
| 3.1 Kriyojel Üretimi .....   | 15          |
| 3.1.1 Kriyojel Sentezi Yöntemleri .....                                      | 15          |
| 3.1.2 Çapraz Bağ Sınıflandırması .....                                       | 17          |
| 3.2 Kriyojellerin Mikroyapısı.....   | 18          |
| <b>4. LİZOZİM</b> .....  | <b>20</b>   |
| 4.1 Lizozimin Genel Özellikleri .....  | 20          |
| 4.2 Lizozimin Bakteriyostatik Mekanizması .....                              | 22          |
| 4.2.1 Lizozimin antibakteriyel aktivitesi için litik mekanizma .....         | 22          |
| 4.2.2 Lizozimin antibakteriyel aktivitesi için litik olmayan mekanizma ..... | 23          |
| 4.3 Lizozimin Kullanım Alanları .....  | 23          |
| <b>5. DENEYSEL BÖLÜM</b> .....   | <b>26</b>   |
| 5.1 Kimyasal Maddeler.....   | 26          |
| 5.2 Kriyojellerin Hazırlanması .....   | 26          |
| 5.3 Kriyojellerin Karakterizasyonu .....                                     | 26          |
| 5.3.1 Jelleşme Verimi.....   | 26          |
| 5.3.2 Su Tutma Davranışları.....   | 27          |
| 5.3.3 FTIR Analizi .....   | 28          |
| 5.3.4 Yüzey ve Gözenek Morfolojisi .....                                     | 28          |
| 5.3.5 Elementel Analiz .....   | 28          |
| 5.3.6 Termogravimetrik Analiz .....  | 28          |
| 5.4 Adsorpsiyon Çalışmaları.....   | 29          |
| 5.5 Desorpsiyon- Tekrar Kullanılabilir Çalışmaları.....                      | 30          |
| <b>6. BULGULAR</b> .....   | <b>31</b>   |
| 6.1 Kriyojellerin Hazırlanması.....  | 31          |
| 6.2 Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları .....                          | 32          |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 6.3       | Adsorpsiyon Sonuçları.....                       | 39        |
| 6.3.1     | Lizozim Kalibrasyon Eğrileri .....               | 39        |
| 6.3.2     | pH Etkisi .....                                  | 41        |
| 6.3.3     | Başlangıç Derişimi Etkisi .....                  | 42        |
| 6.3.4     | Polimerik Kriyojel Kolonun Akış Hızı Etkisi..... | 43        |
| 6.3.5     | İyonik Şiddet Etkisi .....                       | 44        |
| 6.3.6     | Sıcaklık Etkisi .....                            | 45        |
| 6.3.7     | SDS-PAGE Analizi .....                           | 49        |
| <b>7.</b> | <b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                   | <b>52</b> |
| <b>8.</b> | <b>KAYNAKLAR .....</b>                           | <b>54</b> |
| <b>9.</b> | <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                             | <b>70</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Şekil 2.1: Afinite saflaştırmasının şematik gösterimi .....   | 7                                   |
| Şekil 2.2: Afinite kromatografi sistemlerinin kullanılan immobilize liganda göre sınıflandırılması .....  | 12                                  |
| Şekil 3.1: Makrogözenekli hidrojellerin hazırlanışının şematik gösterimi:<br>A) Gözenek bazlı yöntemler, B) Kriyojelasyon yöntemi ile gözenek oluşumu .....   | 14                                  |
| Şekil 4.1: Lizozimin yapısı.....  | 20                                  |
| Şekil 6.1: Bu çalışmada sentezlenen kriyojellerin optik görüntüleri: a: şişmiş haldeki poli(Aam) kriyojeli, b: şişmiş halde poli(Aam-VIM) kriyojeli, c: kurutulmuş haldeki poli(Aam-VIM.) kriyojeli, d: kurutulmuş haldeki poli(Aam-VIM) kriyojeli..... | 31                                  |
| Şekil 6.2: poli(AAm) kriyojel ve poli(AAm-VIM) kriyojelin FTIR spektrumları.....  | 34                                  |
| Şekil 6.3: poli(AAm) (a-c-e) ve poli(AAm-VIM) (b-d-f) kriyojellerin FESEM görüntüleri.....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| Şekil 6.4: poli(Aam) kriyojellerinin elementel dizilimi .....   | 37                                  |
| Şekil 6.5: poli(Aam-VIM) kriyojellerinin elementel dizilimi .....   | 37                                  |
| Şekil 6.6: Kriyojellere ilişkin TGA diagramları.....  | 38                                  |
| Şekil 6.7: Kriyojellere ilişkin DTA diagramları.....  | 39                                  |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|  |    |
|--|----|
| Tablo 3.1: Ayarlanabilir parametrelerin kriyojellerin yapısal özelliklerine etkisi.....  | 19 |
| Tablo 6.1: Poli(AAm-VIM) kriyojelinin jelleşme verimleri (G), şişme derecesi (S.D.), şişme oranları (S.R.), makrogözeneklilik (MP), gözeneklilik (P.) ve gözenek hacmi (P.V.) sonuçları..... | 32 |

## SEMBOL LİSTESİ

|             |   |  |
|-------------|---|--|
| <b>Aam</b>  | : | Akrilamit                                    |
| <b>VIM</b>  | : | N vinil imidazol                             |
| <b>LYZ</b>  | : | Lizozim                                      |
| <b>IEC</b>  | : | İyon Değişirme Kromatografisi                |
| <b>HEK</b>  | : | Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi          |
| <b>SEC</b>  | : | Boyut Dışlama Kromatografisi                 |
| <b>IMAC</b> | : | İmmobilize metal afinite kromatografisi      |
| <b>MOAC</b> | : | Metal oksit afinite kromatografisi           |
| <b>BAC</b>  | : | Boronat afinite kromatografisi               |
| <b>PAAC</b> | : | Protein A afinite kromatografisi             |
| <b>DLAC</b> | : | Boya-ligand afinite kromatografisi           |
| <b>CAC</b>  | : | Hücre afinite yakalama kromatografisi        |
| <b>PLAC</b> | : | Pesudospesifik ligand afinite kromatografisi |

## ÖNSÖZ

Tezim süresince bana tüm desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü bilgi ve birikimini benimle paylaşan sevgili Danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Koray ŞARKAYA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tezim süresince bana desteklerini esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi'nin değerli Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Rafet KILINÇARSLAN, Doç. Dr. Berna KAVAKÇIOĞLU YARDIMCI, Doç. Dr. Ahmet KAYA, Dr. Öğr. Üyesi Sevil SÖYLEYİCİ, Dr. Öğr. Üyesi Nurettin İlder SEVER'e ve laboratuvar arkadaşlarım Mesbah MESBAHULDIN, Halime GÜNAYDIN ve Mert KORKUT'a teşekkür ederim.

Bu tezimi, başta rahmetli annem ve babama, sevgili aileme ithaf etmekten mutluluk duyarım.

RADWAN AHMED TARİSH ABDULLAH

# 1. GİRİŞ

Proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasına yönelik teknik ve yöntemlerin geliştirilmesi, biyoteknoloji araştırmalarındaki son gelişmelerin çoğu için büyük öneme sahiptir. Günümüzde çeşitli protein saflaştırma teknikleri mevcuttur. Ancak çözünürlük problemleri nedeniyle farklı kromatografi türleri daha yaygın olarak kullanılabilir (Liu ve diğ. 2020). Birçok farklı kromatografi prensibi temelli yöntemlerde, örneğin jel filtrasyon kromatografisi, boya afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisinde ve hidrofobik etkileşim kromatografisi gibi uygulamaların tercih edildiği çalışmalarda proteinlerin ayrımı ve saflaştırılması için ayrılacak olan moleköl ile seçilecek olan kromatografik taşıyıcıların biyolojik ve fizikokimyasal etkileşimlerinin yansıra, ayrılması hedeflenen proteinin moleköl boyut, net yük, biyospesifik ve hidrofobiklik gibi özellikleri de dikkate alınmaktadır (Coskun 2016).

Afinite kromatografisi, seçici duyarlıkta moleköl tanıma dayalı olarak biyomoleküllerin tayini, izole edilmesi, ayrılması ve saflaştırılması için sıklıkla uygulanan bir yöntemdir (Lee ve Lee 2004). Bu yöntemde, spesifik tanıma kabiliyetine sahip bir moleköl, genellikle kolon veya membran formundaki polimerik bir malzeme olan uygun bir çözünmeyen destek üzerinde immobilize edilir. İzole edilecek moleköl, hedefi içeren çözeltinin uygun koşullar altında kromatografik kolondan veya bir parti sisteminden basit bir şekilde geçirilmesiyle matris üzerinde hareketsiz hale getirilen tamamlayıcı ligand tarafından seçici olarak yakalanır. Hedef moleköl daha sonra desorpsiyonu destekleyen koşullar altında uygun elüsyon maddeleri kullanılarak, pH'nın, iyon kuvvetinin veya sıcaklığın ayarlanmasıyla, spesifik çözücüler veya rekabetçi serbest ligandlar kullanılarak elüe edilir, böylece ligand ile hedef arasındaki etkileşim bozulur ve hedef moleköl aynı şekilde saflaştırılmış bir form olarak elde edilir (Urh ve diğ. 2009). Boyalar çeşitli taşıyıcı sistemlerle birleştirilmiş ve biyomolekülleri farklı moleküllerden ayırmak için kullanılmıştır (Uygun ve diğ. 2012). İyon değiştirme kromatografisi (IEC) büyük ölçekli ayırmalar için en yaygın kullanılan kromatografik yöntemlerden biridir.

Psödo-biyospesifik ligand afinite kromatografisi, biyospesifik ligand afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik ligandlar için sağlam ve ucuz ikame maddeleri kullanır. Proteinler ile hareketsizleştirilmiş metaller, boyaların yanı sıra imidazol grubu içerikli amino asitler, proteinler arasındaki etkileşimler, biyolojik karışımlardan tek aşamalı saflaştırmaları mümkün kılacak kadar spesifik olabilir (Mojarrad Moghanloo ve diğ. 2018).

Buna karşılık, Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) de yaygın olarak kullanılmaktadır. HEK'in prensibine göre proteinlerin yüzeyindeki hidrofobik bölgelerin (aminoasit, peptit bağları vs. gibi) karakteristiklerindeki farklılıklara göre ayırdığı varsayılır (Roettger ve Ladisch 1989).

HEK, proteinlerin hidrofobikliğinden yararlanarak, immobilize edilmiş (katı destek fazına harekesiz tutturulmuş) hidrofobik ligandlar ile proteinlerin yüzeyindeki polar olmayan bölgeler arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayalı olarak ayrılmasını destekler. Adsorpsiyon, hareketli fazdaki yüksek tuz konsantrasyonuyla artar ve elüentin tuz konsantrasyonunun azaltılmasıyla elüsyon sağlanır. Diğer kromatografik teknikler kullanılarak ayrılması zor olan protein karışımlarını saflaştırmak için farklı elüsyon koşulları kullanılabilir (Queiroz ve diğ. 2001). HEK, diğer protein kromatografi tekniklerini tamamlayıcı bağlanma özellikleri gösterdiğinden ayırma için başarıyla uygulanabilmektedir (Şarkaya ve diğ. 2020, Ağlamaz ve diğ. 2023). Son yıllarda, HEK, hem laboratuvar ölçeğinde hem de proteinlerin endüstriyel ölçekte saflaştırılmasında sıklıkla çalışılan güçlü bir biyoayırma tekniğidir. HEK için birçok sabit fazın geliştirilmesi, serum proteinleri, nükleer proteinler, hormonlar, rekombinant proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında çok çeşitli HEK uygulamaları literatürde yer almaktadır (Tomaz 2017).

Yüzeylerinde polar olmayan hidrofobik karakterli triptofan veya fenilalanin gibi amino asitlerin yan zincirlerine sahip birçok farklı türde hidrofobik molekül, HEK'de ligand olarak kullanılabilir (Aşır ve diğ. 2017). Bu psödospesifik ligandlar düşük bağlanma sabitlerine ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$  M<sup>-1</sup>) sahiptir ve düşük afiniteli ligandlar olarak değerlendirilir. Bununla birlikte, hızlı kinetik ile elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri gibi çoklu zayıf bağlanma olaylarının kümülatif etkilerinden seçicilik davranışı gösterebilirler. Son zamanlarda, psödospesifik ligandlar olarak küçük amino asit molekülleri, ürüne sızıntı durumunda bir bağışıklık

tepkisine neden olma olasılıkları düşük olduğundan, endüstriyel biyoafiniteli ayırmalar için özel avantajlara sahip olabilir (Gaberc-Porekar ve Menart 2001). Bu ligandlar ayrıca protein ligandlarından çok daha stabildir; çünkü biyolojik aktiviteyi sürdürmek için üçüncül bir yapıya ihtiyaç duymazlar (Feng ve diğ. 2010). Ekonomiklik, immobilizasyon kolaylığı ve yüksek adsorpsiyon kapasitesi açısından biyolojik ligandlara göre avantajlar sunarlar (Riguero ve diğ. 2020).

Lizozim (LYZ), doğada bazı maddelerin hidrolizinde katalitik aktivite sunan bakteriyel hücre duvarı bileşenleri olarak yaygın bulunan antimikrobiyal bir enzimdir. Ticari lizozim, tavuk yumurtasının beyazından ekstrakte edilir ve yumurta beyazı proteinlerinin yaklaşık %3,4'ünü temsil eder (Veríssimo ve diğ. 2017). 129 amino asitten oluşan tek bir polipeptit zincirinden oluşan küçük bir proteindir. Disülfür köprüleri oluşturan dört sistein çifti içerir. Molar kütlesi 14,3 kDa'dır ve izoelektrik noktası 11'e yakındır. Lizozim uygulamalarının teknolojik potansiyeli, saflaştırılması için yeni malzeme ve yöntemlerin geliştirilmesine olan ilgiyi artırmıştır (Shi ve diğ. 2008).

Afinitite kromatografisi, yüksek saflıkta ürünler üreten, hedef bileşiğin spesifik olarak tutulması nedeniyle biyomolekül saflaştırması için etkili bir yöntemdir. Bazı spesifik bağlama malzemeleri çok pahalı olduğundan bu tekniği kullanışsız hale getirir. Bu nedenle basit, etkili ve ucuz yeni ilgi desteklerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Lowe ve diğ. 2001). Quan ve diğ. (2008), lizozim ile tris hidroksimetil aminometan bileşiği arasındaki etkileşimi inceledi. Lizozimin, Tris hareketsizleştirilmiş desteği tarafından seçici olarak yakalandığı ve daha sonra hafif koşullar altında ayrıştırılarak iyileşmesine izin verildiği, zayıf fakat spesifik bir etkileşimin varlığını gösterdiler. Etkileşim, lizozimin Aps52, Glu35 ve Ala107 amino asitleri ile Tris yapısında bulunan hidroksil üçlüsü (OH) arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır.

Tavuk yumurtası akı, biraz viskoz olan ve uygulamadan önce seyreltilmesi gereken biyoayırmada kullanılan, bir hammadde türüdür. Viskozite, kolon işlemlerinde sorunlara neden olabilecek ve dolayısıyla kolondaki basınç düşüşünü artırabilecek önemli bir özelliktir. Geleneksel kromatografik destek malzemeleri çok verimli olmalarına rağmen mobil faz akışına karşı bir miktar direnç oluşturur ve tıkanma gibi bazı sorunlara yol açabilir.

Jeller genel olarak makromoleküler zincirlerin birbirleriyle fiziksel veya kimyasal etkileşimleri nedeniyle çapraz bağlanan şişmiş haldeki üç boyutlu polimerik malzemeler olarak tanımlanır (Kopeček 2002). Üç boyutlu polimerik jeller, sentezlenen jelin boyutuna ve polimer zincirinin çapraz bağlanmasına, polimerizasyon öncüllerinin doğal veya sentetik olmasına veya çözücünün türüne bağlı olarak farklı parametrelerde değişiklik gösterebilir. Bunları çapraz bağlayıcının tipine veya polimere immobilize edilen solvente göre sınıflandırmak en yaygın olanıdır. Jellerdeki öncüllerin çapraz bağlanması, kimyasal maddeler veya fiziksel veya iyonik etkileşimler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Öte yandan, eğer su molekülleri polimer içinde immobilize edilmiş çözücü ise hidrojeller olarak sınıflandırılırlar (Buwalda ve diğ. 2014). Hidrojeller, yapılarındaki su ve biyolojik sıvı kütlelerinin en az %20'sini koruyabilen, şişme davranışı göstermeden, fiziksel ve mekanik özelliklerinin katkısı sonucu yapay kıkırdak gibi canlı dokulara benzeyen, üç boyutlu çapraz bağlı hidrofilik polimerlerdir (Kumar ve Kumar 2001). Hidrojeller, adsorpsiyon, oksijen geçirgenliği, biyoyumluluk ve esneklik gibi değerli özelliklerinden dolayı başta çevresel ve biyomedikal olmak üzere geniş bir uygulama alanına sahip, halen güncelliğini koruyan polimerik malzemelerden biridir (Wang ve Urban 2020).

Diğer bir jel türü olan kriyojeller ise kriyojelasyon yöntemiyle hazırlanan mikro ve makro gözenekli hidrojeller olarak bilinmektedir (Plieva ve diğ. 2007). Kriyojelasyon (kriyotropik jelasyon), uyarıcılara hızla yanıt veren mekanik mukavemetli makro gözenekli jellerin hazırlanması için uygun bir yöntemdir. Hidrojellerin hazırlanmasına yönelik kriyojelasyon yönteminin bir diğer avantajı, buz kristallerinin inert şablonlar gibi davranmasıdır, dolayısıyla herhangi bir organik çözücüye ihtiyaç duyulmaz (Baudron ve diğ. 2019). Kriyojellerin kriyojelasyon yöntemiyle sentezlenmesi koşullarında, polimer öncüleri önce dondurulur ve daha sonra su gibi uygun bir çözücü içinde çözülür. Bu aşamada suyun donmasıyla oluşan buz kristallerinin etrafında donmamış sıvı içindeki polimer öncüllerinin polimerize edilmesiyle bir ağ yapısı oluşturulur. Reaksiyon sonrasında buz parçacıklarının oda sıcaklığı koşullarında eritilmesiyle kriyojel adı verilen gözenekli üç boyutlu polimerik ağlar elde edilir. Hidrojeller kriyojellere göre daha az esnekliğe sahiptir. Bununla birlikte, hidrojeller, daha az sayıda birbirine bağlı gözenek dahil olmak üzere daha küçük gözenek boyutundan dolayı kriyojellere göre daha düşük bir şişme hızına ve daha az mekanik stabiliteye sahiptir (Plieva ve diğ. 2007). Kriyojellerin hidrojellere



karşı yüzey morfolojisi, mekanik stabilitesi ve hızlı kütle transfer performansına dayanan bu üstün özelliklerinden dolayı son yıllarda çoğu çalışma kriyojellere yönelmiştir (Lozinsky ve Okay 2014). Kriyojellerin sağlık, biyomedikal, çevre ve teknolojik bilimlerde doku mühendisliği, ilaç dağıtımı, protein kromatografisi, ağır metal giderimi, sensörler ve katalizörler gibi çeşitli uygulamaları vardır (Mattiasson 2014).

Kriyojeller, yüksek gözenekli yapıları ve düşük akış dirençleri nedeniyle yeni nesil kromatografik matrisler olarak tanıtıldı (Yao ve diğ. 2007). Bu özellikler, ayırma işlemlerinin performansında ve hızında önemli bir rol oynar ve ham ekstraktların önceden arılmadan ve seyreltilmeden doğrudan işlenmesine olanak tanır. Kriyojeller ayrıca bağlanma bölgelerine yüksek erişim ve ihmal edilebilir iç kütle transfer sınırlamaları ile de karakterize edilir. Bu nedenle zaman sürecinin ve su ve diğer malzemelerin tüketiminin optimize edilmesine katkıda bulunur. Ayrıca kromatografik prosesler yüksek akış hızlarında ve dolayısıyla kısa sürede geliştirilebilmektedir (Saylan ve Denizli 2019).

## 2. BİYOAFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ

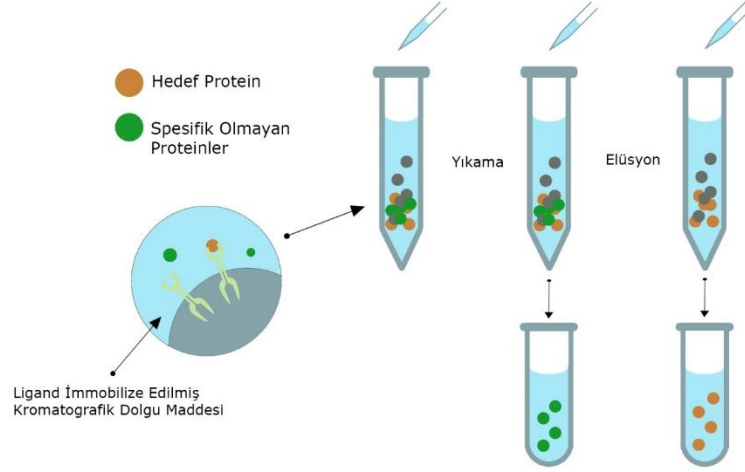
İlgili proteinler ve diğer makromoleküller, ham ekstraktlardan veya diğer karışımlardan çeşitli yöntemlerle saflaştırılabilir. En basit yöntemlerden bir tanesi seçici çöktürmedir. Ancak çoğu saflaştırma yöntemi, çözeltideki (mobil faz) moleküllerin, sabit bir malzeme (katı faz) ile kimyasal veya fiziksel etkileşimlerindeki farklılıklara dayalı olarak ayrıldığı bir tür kromatografiyi içerir. Jel filtrasyonu (aynı zamanda boyut dışlama kromatografisi veya SEC olarak da bilinir), molekülleri boyuta (fiziksel dışlama) göre ayırmak için gözenekli bir reçine malzemesi kullanır. İyon değiştirme kromatografisinde moleküller, katı fazlı bir malzemeyle genel iyonik etkileşimlerinin gücüne (yani spesifik olmayan etkileşimlere) göre ayrılır.

Afinite kromatografisi (aynı zamanda afinite saflaştırması olarak da adlandırılır), moleküller arasındaki spesifik bağlanma etkileşimlerinden yararlanır. Belirli bir ligand, kimyasal olarak immobilize edilir veya katı bir desteğe bağlanır. Böylece kompleks bir karışım, kolon üzerinden geçirildiğinde liganda spesifik bağlanma afinitesine sahip olan moleküller bağlanır. Diğer numune bileşenleri yıkandıktan sonra bağlı molekül destekten sıyrılır ve bunun sonucunda orijinal numunedeki saflaştırılır (Li ve diğ. 2017).

### 2.1 Afinite Saflaştırmasının Uygulanması

Afinite saflaştırması genellikle aşağıdaki adımları içerir;

1. Numunedeki hedef molekülün hareketsizleştirilmiş liganda bağlanmasını sağlamak için ham numuneyi (örn. hücre lizatı, hücre kültürü süpernatanı veya serum) afinite desteğiyle inkübe edilmesi,
2. Hedef molekül ve ligand arasındaki bağlanma etkileşimini koruyan uygun tamponları kullanarak bağlanmamış numune bileşenlerin yıkanması,
3. Bağlanma etkileşiminin artık oluşmaması için tampon koşullarını değiştirerek hedef molekülü hareketsizleştirilmiş ligandan ayrıştırılması.



**Şekil 2.1:** Afinité saflaştırmasının şematik gösterimi

## 2.2 Afinité Kromatografisi Yöntemleri

Bilinen en önemli afinité kromatografî yöntemleri arasında İmmobilize metal afinité kromatografisi (IMAC), metal oksit afinité kromatografisi (MOAC), boronat afinité kromatografisi (BAC), protein A afinité kromatografisi (PAAC), boya-ligand afinité kromatografisi (DLAC), hücre afinité yakalama kromatografisi (CAC) ve pseudospesifik ligand afinité kromatografisi (PLAC) yer almaktadır. Toplu uygulamalarda kullanılan sorbentler ve kolonlarda kullanılan sabit fazlar, yakın zamanda analitik amaçlarla numunelerin hazırlanması veya karmaşık numunelerden biyomoleküllerin saflaştırılabilmesi için spesifik olarak geliştirilmektedir (Kip ve diğ. 2021).

Genel afinité prensibine göre, hedef molekülün karmaşık biyolojik karışımından bir afinité sorbenti ile seçici olarak yakalanması adımlarının ardından, numunede kalan safsızlıkların giderilmesi için uygun bir tampon kullanılarak sorbent üzerine adsorbe edilen hedef molekülün desorpsiyonu için bir yıkama işlemini ve bunu amaçlayan bir elüsyon aşamasını içerir (Kip ve diğ. 2021).

Fosfopeptitlerin zenginleştirilmesinde IMAC ve MOAC sıklıkla kullanılırken, glikopeptitlerin zenginleştirilmesinde BAC yaygın olarak tercih edilmektedir. Öte

yandan PAAC çoğunlukla monoklonal antikorların izolasyonu veya saflaştırılmasında kullanılır. CAC, dolaşımdaki tümör hücrelerini, bakterileri ve virüs benzeri parçacıkları yakalamak için kullanılan başka bir kromatografik yaklaşımdır (Kip ve diğ. 2021).

### **2.2.1 İmmobilize Metal Afinit Kromatografisi (IMAC)**

İMAK, fosfo-peptitlerin fosfat grupları ile sorbent yüzeyinde hareketsizleştirilmiş Fe (III), Al (III), Ga (III) ve Ti (IV) gibi metal iyonları arasındaki şelasyon, fosfopeptitlerin zenginleştirilmesinde tipik bir etkileşimdir (Wang ve diğ. 2020). Metal iyonlarının immobilizasyonu için en yaygın kullanılan ligandlar iminodiasetik asit (IDA) veya nitrilotriasetik asittir (NTA) (Vançan ve diğ. 2002; Wegner ve diğ. 2016). Bununla birlikte, her ligand molekülü yalnızca bir metal iyonu ile koordine olabildiği için, ligand ve metal iyonu arasında nispeten zayıf bir etkileşime neden olabilir ve yıkama sırasında hareketsizleştirilmiş metal katyonlarının kaybı meydana gelebilir. Bu nedenle, IDA ve NTA'nın yerine bağlanma yeteneği daha yüksek olan ligandlar (adenozin trifosfat (ATP) ve dopamin) de kullanılabilir (Wang ve diğ. 2015). Ayrıca, yüksek değerlikli metal katyonları (Ti(IV) ve Zr(IV)) fosfat grubu taşıyan ligandlara daha yüksek bağlanma afinitesi gösterdikleri için IMAC sorbentlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Salimi ve diğ. 2017, Qiu ve diğ. 2020). Benzer şekilde Cu (II), Ni (II), Co (II) ve Zn (II) katyonları da histidin kalıntıları içeren proteinleri saflaştırmak için kullanılarak yüksek seçicilik, immobilize edilmiş katyonun, peptidler ve proteinlerdeki histidin kalıntılarının imidazol halkası ile etkileşimi ile elde edilir (Sarada ve diğ. 2008; Zhang ve diğ. 2010; Liu ve diğ. 2020).

### **2.2.2 Metal Oksit Afinit Kromatografisi (MOAC)**

IMAC gibi MOAC da afinit bölgeleri olarak metal katyonların kullanıldığı fosfoproteomik uygulamalarda yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. MOAC mekanizması, fosforillenmiş protein/peptitlerin fosfat grupları ile MOAC malzemesinin doğal metal oksidi arasındaki tersinir Lewis asit-baz etkileşimlerine dayanmaktadır (Leitner 2010).

Asidik çözeltilerde (düşük pH'da) pozitif yüklü yüzeylere sahip Lewis asitleri gibi davranan MOAC sorbentleri, fosforile proteinleri/peptitleri yakalarken, bazik çözeltilerde (yüksek pH'ta) negatif yüklü yüzeylere sahip Lewis bazları gibi davranarak proteinlerin elüsyonunu sağlar (Zhou ve diğ. 2017). Metal katyonlarının kaybı önemli bir sorundur. MOAC sorbentlerinde IMAC gözlenmez çünkü metal katyonları ve komşu oksijen anyonları arasında güçlü kimyasal bağlar vardır (Leitner 2010). Öte yandan iyonların oksit formundaki MOAC sorbentleri, metal iyon yapısına sahip IMAC malzemelerine göre daha kararlı, seçici ve hassastır (Pinkse ve diğ. 2004). Kullanılan metal oksit sorbentler arasında en yaygın olanları  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$ ,  $Fe_3O_4$ ,  $SnO_2$  ve  $CrO_2$ 'dir (Jia ve diğ. 2018, Wang ve diğ. 2018, Sun ve diğ. 2020, Yıldırım ve diğ. 2021).

### **2.2.3 Boronat Afinite Kromatografisi (BAC)**

Boronat afinite sorbentleri, nükleozidler, sakkaritler, glikanlar ve glikoproteinler gibi organik bileşiklerin seçici olarak ayrılması ve moleküler tanınması için önemli bir yöntem olarak uygulanmaktadır (Chen ve diğ. 2019). Boronat afinite kromatografisinin mekanizması, bazik sulu çözeltide fenil boronat ligandları ve cis-diol bileşikleri arasında beş veya altı üyeli siklik esterlerin oluşumuna dayanır. Fenilboronik asit (PBA) ile  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid ( $\beta$ -NAD) ve ribonükleik asit (RNA) gibi küçük ve büyük biyomolekülleri taşıyan diol arasındaki siklik boronat ester oluşumu, bu reaksiyonların bir parçasıdır (Shen ve diğ. 2020). Boronat/cis-diol ortamın pH'ı asidik bir bölgeye değiştirildiğinde ve adsorbe edilmiş diol taşıyan madde desorpsiyon ortamına salındığında kompleks ayrışır. Dolayısıyla cis-diol bileşiğinin zenginleştirilmesi bu tersinir reaksiyonla sağlanabilir. BAC, tersinir kovalent bağlanma, pH kontrollü ayırma, hızlı adsorpsiyon/desorpsiyon kinetiği ve düşük spesifik olmayan adsorpsiyon dahil olmak üzere çeşitli avantajları mevcuttur (Kip ve diğ. 2019).

### 2.2.3 Boya-Ligand Afinite Kromatografisi

Ligandlar olarak sentetik boyalar, afinite sorbentleri oluşturmak için farklı destekler üzerine immobilize edilebilir (Vergara-Barberán ve diğ. 2019). Boya ile immobilize edilmiş afinite sorbentleri, biyolojik moleküllerin aktif bölgeleri ile hidrojen bağı, hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri gibi sahte afinite etkileşimlerine sahiptir. Biyomimetik afinite kromatografisinin bir parçası olan boya-ligand afinite kromatografisi, boyaların farklı destekler üzerinde ligandlar olarak immobilizasyonunu içerir (Denizli ve Pişkin 2001). İlk kez, Staal ve diğ. 1971'de piruvat kinazın izolasyonu için ligand olarak Blue Dextran'ı kullandı (Staal ve diğ. 1971). Triazin boyaları veya ilgili bileşikler bağlayıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır (Liang-Schenkelberg ve diğ. 2017). Bu boya ligandları, kovalent bağlar yoluyla destek üzerine immobilizasyon için bir kromofor ve reaktif gruptan oluşur. Ek olarak, bir triazin halkasının varlığı, bunların bir nükleofilik ikame reaksiyonu yoluyla matrise (örn. Sefaroz veya selüloz) doğrudan immobilizasyonuna olanak tanır (Clonis ve diğ. 2000). Farklı yapılara sahip diğer bazı boya ligandları da yıllar içinde HSA, lizozim ve peroksidaz gibi biyolojik moleküllerin izolasyonunda kullanılmıştır (Katsos ve diğ. 2004, Perçin ve diğ. 2015, Kılıç ve diğ. 2021). Boya ligandlarının düşük maliyeti, destek üzerine immobilizasyon kolaylığı ve stabilitesi bu bağlayıcı ajanları afinite ayırmalarında popüler hale getirmiştir. Cibacron Blue (CBF3G-A), bilinen en yaygın boya-ligand türüdür (Odabaşı ve Denizli 2004, Kumar ve diğ. 2009; Tüzmen ve diğ. 2012).

### 2.2.4 Protein A Afinite Kromatografisi (PAAC)

Antikorların saflaştırılmasında en çok uygulanan afinite sistemi Stafilokokal protein A (SPA) ve bundan türetilen daha küçük ligandlardır (Duhamel ve diğ. 1979). Protein A ve IgG arasındaki afinite, protein saflaştırması için bir afinite sisteminin geliştirilmesi amacıyla araştırılan ilk doğal etkileşimlerden bir tanesidir (Hober ve diğ. 2007). IgG saflaştırması için de kullanılan ve bir bakteri türünden köken alan başka bir afinite ligandı, streptokok proteini G'dir (SPG) (Akerstrom ve Bjorck 1986). Antikor saflaştırmasında protein A ve protein G'nin

yaygın kullanımına rağmen ligand stabilitesi bunların kullanımını sınırlayan bir konudur (Gülich ve diğ. 2002). Afinite kromatografisinde kullanılan ligandların toleransını arttırmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. CIP tedavisine yönelik SPA ve SPG stabilitesini geliştirmek için bir protein mühendisliği stratejisi kullanılmıştır (Linhult ve diğ. 2004). Protein A'nın protein G'ye göre üstün stabilitesi nedeniyle protein G'nin endüstriyel saflaştırmalarda kullanımı oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, protein A'nın bu alt sınıfa karşı düşük afinitesi nedeniyle, protein G kullanılarak afinite saflaştırması normal serum ve insan IgG alt sınıf III'ün saflaştırılması için ilk tercihtir (Li ve diğ. 1998).

### **2.2.5 Hücre Afinite Yakalama Kromatografisi (CACC)**

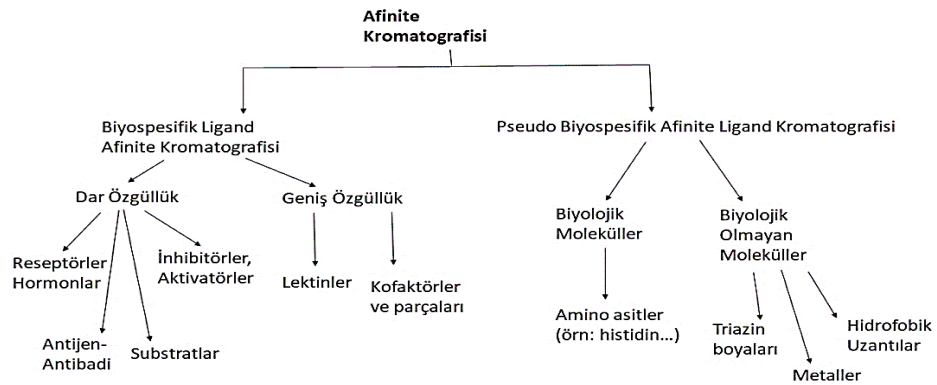
Hedef hücrelere özgü ligandlarla işlevselleştirilmiş çeşitli sorbentler, membranlar veya manyetik nanopartiküller formunda sentezlenebilmektedir. Anti-trombosit yapışması ve dolaşımdaki endotel progenitör hücrelerin poli(2-metakriloiloksietil fosforilkolin) ve hemouyumlu peptit 1 (HCP-1) ile modifiye edilmiş politetrafloroetilen (PTFE) yüzeyi üzerinde yerinde yakalanması literatürde yer almaktadır (Liu ve diğ. 2020). Anizotropik mikropartiküller, partikül bazlı ferrosivılar (örneğin, süperparamanyetik demir oksit/silikat/karbon çekirdek/kabuk/kabuk nanopartiküllerini içeren ferrosivılar) ve ikili tepki veren kopolimer fırçalara ve fenilboronik asit ligandlarına sahip makrogözenekli malzemeler, yakın zamanda farklı hücre türlerinin yakalanması için geliştirilen sorbentlerdir (Zhang ve diğ. 2018, Zhou ve diğ. 2019, Qin ve diğ. 2020).

### **2.2.6 Pseudospesifik Ligand Afinite Kromatografisi (PLAC)**

Afinite kromatografisinin prensibi basittir. Bununla birlikte, biyolojik ligandların (monoklonal antikorlar gibi) biyospesifik ligand afinite kromatografisini mükemmel bir özgüllikle kullandığı kabul edilir. Ancak birçok biyolojik ligand

makromoleküler ve kırılındır; genellikle pahalıdır ve destekler üzerinde hareketsiz hale getirilmeleri sıklıkla zordur. Bunlar, özellikle büyük ölçekli araştırmalar göz önüne alındığında, bazı pratik ticari uygulamalarda biyolojik ligandların kullanılmasındaki dezavantajlardır. Bununla beraber, ayırmak istenen biyolojik moleküller sıklıkla daha basit ligandlarla yakınlık gösterir. Dolayısıyla afinite kromatografisi biyolojik moleküllerin hidrofobik ligandlar, boyalar, metaller veya kükürt ile etkileşimlerine dayanabilir. İmmünoadsorban yöntemler biyospesifik ligand afinite kromatografisinin en iyi örnekleridir (Vijayalakshmi 1989).

Biyospesifik ligand afinite kromatografisinde amino asit temelli en yaygın kullanılan ligandlardan bir tanesi histidindir. Proteinlerdeki histidin kalıntıları, immobilize metal afinite kromatografisi sistemlerinde ve zaman zaman boya-ligand sistemindeki etkileşimlerde rol oynar. Bununla birlikte histidin aynı zamanda immobilize edilebilir ve proteinleri adsorbe etmek için bir ligand görevi görebilir (Vijayalakshmi 1996). Histidini, diğer amino asitler arasında benzersiz kılan birçok özelliğe sahiptir; Bunlar arasında hafif hidrofobikliği, imidazol halkası nedeniyle zayıf yük transfer olasılıkları, geniş pKa değerleri aralığı ve asimetric karbon atomu yer alır (Riguero ve diğ. 2020). Histidin kalıntıları ayrıca asit-baz katalizinde yük rölesi rolü oynar. Bu özellikler, pH'a, sıcaklığa ve iyon gücüne bağlı olarak proteinlerle birçok şekilde etkileşime girebileceği anlamına gelir (Hemdan ve diğ. 1989). Ayrıca, uygun gruplar yoluyla Sepharose, silika gibi bir polihidroksi matrise ya da son dönemlerde polimerik dolgu malzemelerine immobilize edildiğinde proteinlerle spesifik dipol kaynaklı etkileşimler meydana gelebilir (Çimen ve diğ. 2016).



Şekil 2.2: Afinite kromatografi sistemlerinin kullanılan immobilize liganda göre sınıflandırılması



### 3. KRİYOJELLER

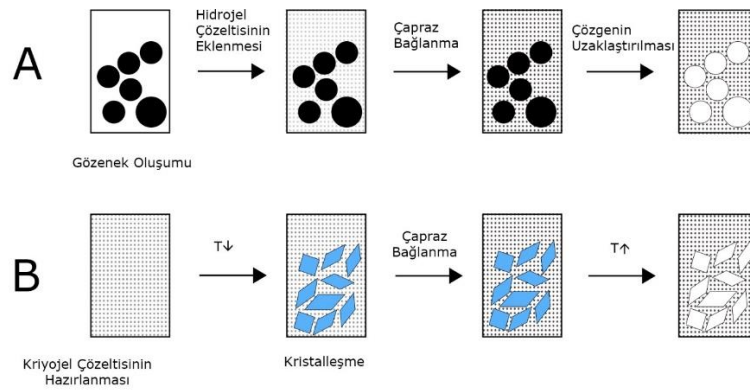
Yeni nesil biyoteknolojik gelişmeler, benzersiz özelliklere sahip malzemeler gerektirmektedir. Jellerin kullanışlılığı ve çok yönlülüğü onları biyoteknolojik araştırmaların ön saflarına yerleştirmiştir. Bu malzemeler biyoayırma, doku mühendisliği ve ilaçların salınımı dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için uygundur. Jeller bir ağ bileşeni ve bir şişme maddesinden oluşan malzemelerdir (Memic ve diğ. 2019). Hidrojeller, ağları içerisinde su alabilen, genellikle üç boyutlu, çözünmeyen, çapraz bağlı polimer ağlarından oluşan yumuşak malzemelerdir (Gong 2006). Bununla beraber, "Süper makro gözenekli"nin resmi bir Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) terimi olmamasına rağmen, hidrojel terimi literatürde onlarca ile yüzlerce mikrometre arasında değişen gözenek çaplarını tanımlamak için gayri resmi olarak kullanılabilir (Jones 2009).

Hidrojeller, gözeneklilik ve parçacık ağ tipi dahil olmak üzere çeşitli parametrelere göre sınıflandırılabilir. İçerdikleri içerdikleri çapraz bağlayıcının türüne göre kimyasal ya da fiziksel olarak sınıflandırılabilirler. Hidrojellerin içerdikleri polimer kompozisyonuna göre ise homopolimerik, kopolimerik ve multipolimerik olarak sınıflandırılır. Bununla beraber, içerdiği monomerlerin yük çeşitliliğine göre ise sırasıyla; iyonik olmayan, katyonik, anyonik ve zwitter iyonik olarak çeşitlendirilebilmektedir. Polimerlerin moleküler diziliş-düzenlenmesine göre ise kristal, yarı kristal ve amorf olarak da tanımlanabilmektedir. En önemli parametrelerden bir tanesi ise gözenek boyutlarıdır. İçerdikleri gözeneklerin boyutuna göre mikrogözenekli makrogözenekli, hem mikro hem makrogözenek içerenler ve süpermakrogözenekli olarak da sınıflandırılabilirler. Bu gözenek boyutları mükemmel ölçüde kütle akışına izin verir ve önemli biyomolekül etkileşimini mümkün kılar (Ahmed 2015; Razavi ve diğ. 2019).

Kriyojeller, sıfırın altındaki sıcaklıklarda kontrollü polimerizasyonun meydana geldiği ve birbirine bağlı elastik bir ağ ile çevrelenmiş makro gözenekler oluşturan bir hidrojel sınıfıdır (Jones ve diğ. 2009). Kriyojellerin tarihçesi 1940'lara kadar uzanabilmektedir. Ancak 1980'li yıllara kadar kriyojellere ciddi bir ilgi görülmemektedir (Lozinsky ve Okay 2014). Kriyojel araştırmalarında bu incelemeyle son derece alakalı olan paradigma değişiklikleri şunları içerir: 1) kriyojel sentezi ve

karakterizasyonunun benzersiz yönlerine artan ilgi; örneğin, poliakrilamit (pAAm) kriyojellerin donma davranışına ilişkin 1980'lerden elde edilen temel bulgular, bu sistemler üzerindeki modern araştırmaları hâlâ etkilemektedir. 2) Yine 1980'lerde, kriyojellerde (özellikle mikropalarda) tüm hücrenin hapsedilmesinin o zamanki yeni başarısı olarak kabul edilmektedir (Plieva ve diğ. 2006). Bu özel başarı, kriyojenlerin en popüler uygulamaları olmaya devam eden kromatografi monolitleri son dönem itibariyle en hızlı büyüyen uygulamaları olan doku mühendisliği iskeleleri olarak kullanılmasını içermektedir. Günümüzde polimer kimyasındaki gelişmeler kriyojel sentezinde önemli ilerlemelere yol açmaya devam etmektedir.

Kriyojelasyon (Yunanca'da [kryos] don veya buz anlamına gelir), kriyojeller adı verilen belirli bir hidrojel alt kümesi popülasyonunun üretilmesi için nispeten yeni bir biyosentetik işlemdir. Bunlar 3D hidrofilik, hidrofobik veya amfipatik olarak karakterize edilir. Yüksek derecede birbirine bağlı makro gözenekli ağlara sahip yapılardır (Lozinsky ve diğ. 2003). Kriyojelasyon süreci bir donma (toplu çözücünün donma noktasının altında) döngüsünü, belirli bir süre donmuş durumda depolamayı ve düşük veya yüksek moleküler ağırlıklı öncüllerin jelleşmesi için buzunun çözülmesini içerir. Hemen hemen her türlü sulu veya susuz, organik veya inorganik bileşik, toksik organik çözücülere kesin ihtiyaç olmaksızın kullanılabilir. Bu teknikte, buz kristalleri gözenek oluşturucu (gözenek oluşumu için nidus) görevi görür ve döngünün erime aşaması sırasında makro gözenekler oluşturur, böylece gözeneklerin boyutunun kontrol edilmesine olanak tanır (Lozinsky 2002; Lozinsky ve diğ. 2008).



**Şekil 3.1:** Makrogözenekli hidrojellerin hazırlanışının şematik gösterimi: A) Gözenek bazlı yöntemler, B) Kriyojelasyon yöntemi ile gözenek oluşumu

Kriyojeller, makromoleküler çözünen maddelerin etkili kütle aktarımına, hücresel tohumlama, esnek mekanik özelliklere, yüksek mikro-çevresel biyouyumluluğa izin veren makro gözenekli yapısal ağları nedeniyle geleneksel hidrojellerle karşılaştırıldığında daha kapsamlı bir potansiyel uygulama yelpazesine sahiptir (Tripathi ve Kumar 2011). Kriyojellerin mekanik özellikleri, polimerlerin veya çapraz bağlayıcıların derişimi, donma süresi, sıcaklık ve soğutma hızı değiştirilerek farklı kriyojenik uygulamaların gereksinimlerine göre uyarlanabilir (Dainiak ve diğ. 2010). Sünger benzeri makro gözenekli sistem, daha hızlı bir şişme kinetik profiline ve önemli ölçüde geliştirilmiş visko-elastik özelliklere izin vererek fiziksel deformasyonu önler. Ek olarak, makro gözenekli kriyojeller, geleneksel homofaz nano gözenekli hidrojellerin daha sınırlı difüzyon kapasitesi karakteristiğinin aksine, hücresel geçişler dahil olmak üzere, çözünen maddelerin engelsiz konveksiyonel kütle taşınmasına izin verir (Eggermont ve diğ. 2020). Bu özellikler, özellikle makro gözenekli yapı, kriyojelleri doku mühendisliğinde uygulama için uygun bir biyoiskele platformu haline getirmektedir (Raina ve diğ. 2016).

Ayrıca, kriyojellerde bulunan makro gözeneklerin boyutu birkaç mikrometreden yüzlerce mikrometreye kadar değişebilir. Hidrojellere göre bu kritik faydalar göz önüne alındığında, kriyojellerin, biyoayırma, doku mühendisliği ve hücresel tedavi uygulamaları için teknolojik gelişmeleri vardır. Bu nedenle, yeni kriyojellerin tasarımı ve oluşumu artık biyoteknolojik faaliyetler için önemli ve umut verici biyomühendislik yaklaşımları olarak ortaya çıkmaktadır (Kumar ve diğ. 2010).

### **3.1 Kriyojel Üretimi**

#### **3.1.1 Kriyojel Sentezi Yöntemleri**

Kriyojelasyon prosesi için (sıfırın altındaki sıcaklıklarda jelleşme), gözenek oluşturucu olarak solvent kristalleri (örn. sulu ortam) kullanılır. Çözücü kristallerinin buzunun çözülmesinin ardından büyük ve birbirine bağlı gözenekler meydana gelir (Plieva ve diğ. 2011). Makro gözenekli jeller üretmek için kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında kriyojelasyon, zaman ve kaynak açısından verimli bir yöntem olma eğilimindedir (Henderson ve diğ. 2013). Kriyojellerin diğer avantajları arasında hazırlama esnekliği ve solvent olarak esas olarak su ile çalışabilme yeteneği yer alır,

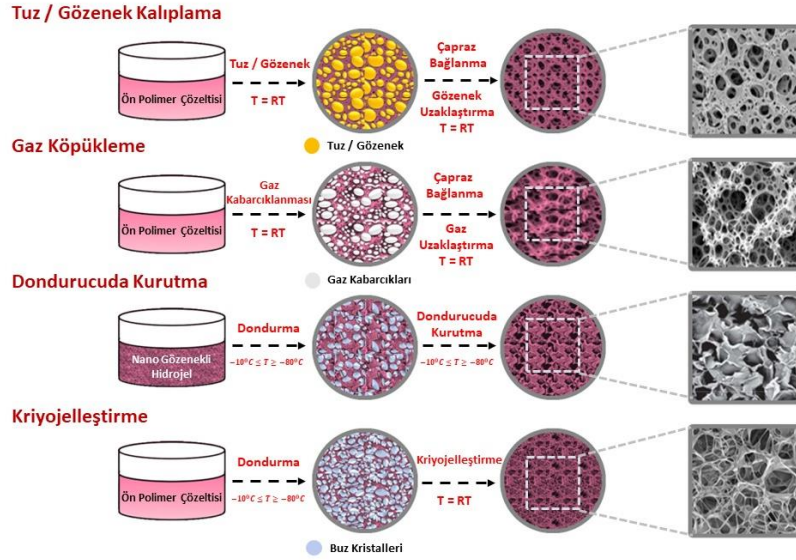
biyomateryaller böylece daha ekonomik ve çevre dostu malzemelere dönüştürülmüş olur (Van Rie ve diğ. 2015). Bu özelliklerinden dolayı, birçok uygulamada kriyoajelasyon yöntemi ile hazırlanan jeller diğer hidrojel üretim yöntemlerine göre sıklıkla tercih edilmektedir.

Tuz/porojen şablonlaması, düşük maliyeti ve basitliği nedeniyle makro gözenekli 3 boyutlu polimerik türlerin hazırlanmasında en yaygın yöntemlerden biri olmuştur (De France ve diğ. 2018). Bu teknikte, tuz parçacıkları veya polimerik mikro boncuklar, hidrojjeller içerisinde mikro ve makro boyutlu gözenekler oluşturmak için şablon olarak kullanılabilir. Tuz parçacıkları veya polimerik mikro tanecikler daha sonra uygun bir çözücüye batırılarak gözenekli bir ağ oluşturularak çözülebilir. Tarihsel olarak tuz parçacıkları, bulunabilirliği, kullanım kolaylığı, düşük maliyeti ve zorlu koşullar altında işleme sırasında iyi stabilitesi nedeniyle kullanılmıştır (Annabi ve diğ. 2010). Biyo-inertliklerinden dolayı, sodyum klorür kristalleri en sık tuz parçacıkları olarak kullanılmıştır (Draghi ve diğ. 2005).

Gaz köpüğü, makro gözenekli hidrojjellerin üretimi için başka bir standart yöntemdir. Polimer ağı, matris boyunca yakalanan gaz kabarcıklarının etrafında oluşur. Örneğin, aktif kabarcıklanma öncül çözelti içinde gaz kabarcıkları oluşturabilir (Nam ve diğ. 2000). Asidik ortamda CO<sub>2</sub> gazı ürettiği için en yaygın kullanılan gaz oluşturucu madde sodyum bikarbonattır (Behravesht ve diğ. 2002). Ancak amonyum/potasyum karbonatlar ve sodyum nitrit gibi karbonatlar ve nitratlar da kullanılmıştır. Köpük maddeleri öncelikle maliyet, güvenlik ve üretim/imalat sonrası kalan yan ürünlere göre seçilir. Gaz köpürtme, şişirici olmayan maddelerin yüksek basınçta çözüldürülmesi ve kontrolsüz, heterojen ve birbirine zayıf şekilde bağlanmış gözenekli yapı dahil olmak üzere, yaygın uygulamasını sınırlayan çeşitli dezavantajlar sunar (Dehghani ve Annabi 2011).

Dondurularak kurutulmuş kriyojeller için, önceden oluşturulmuş bir hidrojel, birkaç kez dondurularak kurutma döngüsüne tabi tutulur, bu da daha sonra süblimleşme yoluyla uzaklaştırılan buz kristallerinin büyümesine neden olur. Bu strateji, doğal ve sentetik polimerlerden yapılan geleneksel hidrojjellere birbirine bağlı makro gözenekli bir yapı kazandırır (Plieva ve diğ. 2011). Bazı durumlarda dondurularak kurutma, düzenli makro gözenekli malzemeler üretmek için buz kalıplama tekniği olarak kullanılır. Bu, hidrojjellerin, matrislerin içinde mikrometre boyutunda

buz kristallerinin olduğu soğuk bir banyoya hızlı bir şekilde daldırılmasıyla gerçekleştirilir. Buz kristalleri daha sonra birbirine bağlı makro gözenekli bir yapı oluşturmak için bir şablon görevi görür (Liu ve diğ. 2014). Donma sıcaklığının, dondurularak kurutulmuş kriyojellerin gözenek boyutunun ve şeklinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Nishihara ve diğ. 2005).



Şekil 3.2: Makro gözenekli hidrojellerin üretimi için çeşitli teknikler ve bunların ardışık adımları (Kip ve diğ. 2019)'dan düzenlenmiştir.

### 3.1.2 Çapraz Bağ Sınıflandırması

Tipik olarak, kriyojelasyon süreci, 1) buz kristali oluşumuyla faz ayrılması, 2) buz kristalleri arasında donmamış bir sıvı fazda konsantre edilmiş reaktif varlıkların çapraz bağlanması/polimerizasyonu ve ardından 3) buz kristallerinin buz kristallerinin çözülmesini ve açık ve birbirine bağlı makro gözenekli bir polimer ağı oluşturan basamaklardan meydana gelir. Çapraz bağlanma/polimerizasyon aşaması iki ana mekanizma yoluyla gerçekleşir: kimyasal ve fiziksel (Memic ve diğ. 2019).

Kimyasal çapraz bağlanma, kovalent reaksiyonlar ve monomerlerin veya prepolimerlerin çapraz bağlanması yoluyla gerçekleşir. Kimyasal olarak çapraz bağlı

kriyojeller, reaktif türlerin (monomerler, ön polimerler) buz kristalleri arasında polimerize olduğu sıfırın altındaki sıcaklıklarda oluşturulur (Bencherif ve diğ. 2012, Wang ve Yang 2018).

Fiziksel çapraz bağlanma ise kimyasal çapraz bağlanmanın aksine polimer zincirleri arasındaki iyonik veya hidrofobik etkileşimler yoluyla gerçekleşir (Ahmed 2015). Fiziksel olarak çapraz bağlı kriyojeller için, polimerler ya polimerizasyon kinetiği yavaş/gecikmeli olduğunda buz kristalleri etrafında yoğunlaştıktan sonra ya da hızlı polimerizasyon kinetiği sergileyen polimerler için kriyo işleminden (donma-çözülme döngülerine tabi tutulan fiziksel hidrojel) önce çapraz bağlanır (Bencherif ve diğ. 2015, Ciolacu ve diğ. 2016).

### **3.2 Kriyojellerin Mikroyapısı**

Kriyojellerin yapısal mimarisi sistemdeki su miktarına ve donma hızına bağlıdır. Suyun hızlı donması, daha küçük (yani daha az düzenli) buz kristallerinin oluşumuna yol açar. Buna karşılık, daha yavaş dondurma, kriyojelasyon sırasında daha kapsamlı (yani daha düzenli) buz kristallerinin oluşumuna yol açar. Genel olarak, daha yavaş bir donma hızı, çözünen öncül ile ilişkili su damlacıkları, nanoalanlar ve kümelerle göre nispeten daha büyük buz kristalitlerinin oluşmasına yol açarak gözenek duvarlarının, hücresel zarların vb. daha önemli tahribatına neden olur (Gun'ko ve diğ. 2013). Monomerik veya polimerik maddenin doğasına bağlı olarak kriyojel öncülleri, bunların başlangıç derişimleri ve kriyotropik jelleşmeyi çevreleyen çevresel koşullar göz önüne alındığında, makro gözenekli kriyojeller (yani gözenek boyutları 0,1 ila 10 µm arasında değişen) veya süper makro gözenekli kriyojeller (devasa gözenekli kriyojeller olarak da bilinir, yani onlarca ila yüzlerce mikrometre arasında değişen gözenek boyutları) yapmak için özel protokol uyarlanabilir (Lozinsky ve diğ. 2008).

**Tablo 3.1:** Ayarlanabilir parametrelerin kriyojellerin yapısal özelliklerine etkisi

| <b>Parametreler</b>     | <b>Etkileri</b>  |
|-------------------------|--|
| Çapraz bağlayıcı        | <ul style="list-style-type: none"><li>• Fiziksel bağlanma: Yeterince büyük olmayan gözeneklere sahip, gücü çözülme hızıyla ters orantılı olan jeller verir</li><li>• Kimyasal bağlanma: Potansiyel sitotoksitelerine rağmen yeterince geniş gözeneklere sahip jeller verir</li></ul> |
| Kriyojelasyon sıcaklığı | <ul style="list-style-type: none"><li>• Sıcaklık artarsa; artan gözenek boyutu, gözenek duvarı kalınlığı ve yoğunluklu kriyojel oluşur.</li></ul>  |
| Polimer molekül kütlesi | <ul style="list-style-type: none"><li>• Artarsa; jelin sertliği artar,</li><li>• Azalırsa; Gözenek boyutu artar.</li></ul>   |
| Kriyo-konsantrasyon     | <ul style="list-style-type: none"><li>• Artarsa; elastikiyet artar</li><li>• Azalırsa; jelleşme süresi artar.</li></ul>  |
| Soğutma hızı            | <ul style="list-style-type: none"><li>• Azalırsa; gözenek boyutları azalır.</li></ul>  |





omurgasız tipi (tip) (Callewaert ve Michiels 2010). Ek olarak faj tipi, bakteri tipi ve bitki tipi lizozimler dahil olmak üzere diğer birçok lizozim türü de tanımlanmıştır (Cao ve diğ. 2015). Genel olarak hem c hem de g tipi lizozimler, yüksek izoelektrik nokta (pI) değerlerinden dolayı temel proteinlerdir (Xue ve diğ. 2004). Buna karşılık, i-tipi lizozimlerin pI'leri farklıdır ve çeşitli protein fonksiyonlarına (örn. konak savunması ve sindirim) atfedilir. Cand i tipi lizozimler (~11–15 kDa), tipik g tipi lizozimlerden (~20–22 kDa) çok daha küçüktür (Callewaert ve Michiels 2010). C tipi lizozimlerin birincil yapısı, dört adet sağlam disülfid bağı (6 Cys-127Cys, 30Cys-115Cys, 64Cys-80Cys ve 76Cys-94Cys) ve altı triptofan içeren, molekül ağırlığı 14,3 kDa olan 129 amino asit kalıntısından oluşur. (Trp), üç tirozin (Tyr) ve üç fenilalanin (Phe) kalıntısıdır (Cao ve diğ. 2015). Altı Trp kalıntısı arasında Trp-62 ve Trp-108, lizozimdeki ana floroforlardır (Shanmugaraj ve diğ. 2015).

C-tipi kategorisine ait olan tavuk yumurtası beyazı lizozimi (HEWL), son zamanlarda bol miktardaki kaynakları ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Wu ve diğ. 2015, Jiang ve diğ. 2017). 17 pozitif yüklü (6 Lys, 11 Arg) ve dokuz negatif yüklü kalıntının (7 Asp, 2 Glu) varlığı nedeniyle pKa'nın (~11) altında pozitif yüklüdür, bu da HEWL'yi bileşiklerle etkileşimleri incelemek için ideal bir aday yapar (örneğin ilaçlar, metaller vb.) (Bijelic ve diğ. 2015). Bakteriyel hücre duvarı peptidoglikanlarının N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin arasındaki  $\beta$ -(1,4)-glikosidik bağı parçalama yeteneği nedeniyle, HEWL'nin gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği çok yüksektir (Huopalahti ve diğ. 2007). Şimdiye kadar gıda endüstrisinde kullanılmasına izin verilen tek lizozim HEWL'dir (Silvetti ve diğ. 2017). Bakterileri öldürmenin yanı sıra, diğer kaynaklardan elde edilen lizozimler mantarları da yok edebilir. Manila deniz tarağı *Venerupis philippinarum* *Pichia'dan* tanımlanan ve sırasıyla 156 ve 153 amino asit kalıntısından oluşan bir polipeptidi kodlayan iki c-tipi lizozim, HEWL ile karşılaştırıldığında papazlar GS115 ve *Pichia pastoris* KM71 üzerinde daha yüksek inhibitör etkiler gösterdi. Maş fasulyesi tohumlarından izole edilen bir lizozim, *F. oxysporum*, *F. solani*, *S. rolfsii*, *P. aphanidermatum* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı güçlü antifungal aktivite göstermiştir (Yang ve diğ. 2017). Bununla birlikte, tek başına kullanıldığında lizozim, et bazlı ürünlerde nispeten yaygın kirletici maddeler olan *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonadaceae* gibi gram-negatif bakterilere karşı zayıf inhibitör etkiler sergiler, çünkü bakteriyel hücre duvarı üzerinde koruyucu bir lipopolisakkaritin (LPS) varlığı,

serbest lizozimin pratik uygulamasını oldukça sınırlandırır (Barbiroli ve diğ. 2012, Wu ve diğ. 2015).

Lizozimin uygulamasını genişletmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Örnekler arasında lizozimin yararlı biyolojik özelliklerini geliştirmek için ısı, kimyasallar ve hidroliz ile modifikasyonu, kapsülleme, mikro/nano jeller, lizozim ve pektin bazlı yenilebilir filmler, sodyum aljinat, nişasta, sodyum karboksimetil veya selüloz içeren komplekslerin oluşumu yer alır (Carrillo ve diğ. 2016).

Gram-negatif bakterilerin lizozime duyarlılığını arttırmak için antimikrobiyal malzemeler ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve laktoferrinin lizozim ile kombinasyonu ile üretilmektedir. Bu yöntemlerle, gıdanın kalitesini artırmak ve raf ömrünü uzatmak için lizozim çeşitli gıda substratlarına başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Branen ve Davidson 2004).

## **4.2 Lizozimin Bakteriyostatik Mekanizması**

Lizozimin antibakteriyel mekanizması için iki farklı yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar; litik ve litik olmayan mekanizmalardır.

### **4.2.1 Lizozimin antibakteriyel aktivitesi için litik mekanizma**

Genel olarak lizozimin, peptidoglikanların  $\beta$ -1,4-glikosidik bağlantısını hidrolize edebildiğine ve muramidaz aktivitesinin, murein tabakasının parçalanmasına ve bakteriyel hücre duvarının mekanik mukavemetinin azalmasına yol açarak sonuçta ölümüyle sonuçlandığına inanılmaktadır. Bakteriler (Wang ve diğ. 2005). Bu enzimatik özellik, disülfid bağlarından en az ikisi sağlam kaldığında belirgindir; bu, lizozimin bakteriyel patojenlerin istilasına karşı spesifik olmayan bir doğuştan gelen bağışıklık molekülü olarak hizmet etmesini sağlar (Jollès and Jollès 1984). Kristal yapısından, N-asetil muramik asit ve N-asetilglukozaminin  $\beta$ -1,4 glikosidik (C—O) bağının, parçalanmaya katkıda bulunan lizozimin iki potansiyel katalitik kalıntısı olan Glu35 ve Asp52'ye yakın olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, lizozim enzim mekanizmasının atomistik ayrıntılarını incelenmesi kapsamlı hale gelmektedir, şöyle

ki; parçalanmaya SN<sup>1</sup> veya/veya SN<sup>2</sup> yolunun aracılık edip etmediği (Kirby 2001). Bununla birlikte, gram negatif bakterilerin dış yüzeyindeki ana bileşen, proteinler ve fosfolipidlerle birlikte koruyucu bir lipopolisakkarit (LPS) tabakası olduğundan, lizozimin bakterisidal etkisi bazı gram pozitif bakterilerle sınırlıdır. Hücre duvarının peptidoglikan tabakası, dış LPS tabakası tarafından geciktirilir (Ibrahim ve diğ. 1994). Lizozim güçlendirici kimyasallarla (örneğin EDTA, DL-laktik asit) kombinasyon halinde kullanılırken, bu kimyasallar en dıştaki bazı hücre duvarı bileşenlerinin kısmen çıkarılmasına izin verebileceğinden, birçok patojenik ve bozulmaya neden olan bakterinin lizizi teşvik edilebilir ve sürekli hale getirilebilir. Böylece lizozimin etki alanına (peptidoglikan) nüfuzu iyileştirilir (Hughey ve Johnson 1987).

#### **4.2.2 Lizozimin antibakteriyel aktivitesi için litik olmayan mekanizma**

Lizozim için benimsenen başka bir bakterisidal etki mekanizması, muramidaz aktivitesinden bağımsızdır ancak temel olarak yapısal faktörlere ve katyonik ve hidrofobik özelliklerine atfedilir. Bu teori, enzimatik aktiviteye sahip olmayan tamamen veya kısmen denatüre lizozimlerin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı hala çalışabileceği gerçeğiyle desteklenmektedir (Ibrahim ve diğ. 2005). Lizozimin antibakteriyel etkisinin, muramidaz aktivitelerinden ziyade lizozimin mikropla ilişkili hedeflerini içeren yapısal faktörlerden kaynaklandığı ortaya çıktığı rapor edilmektedir (Masschalck ve diğ. 2001).

#### **4.3 Lizozimin Kullanım Alanları**

Lizozim, ilaç endüstrisinde bakteriyel, viral ve inflamatuvar hastalıklara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır. Eşsiz özellikleri (daha yüksek doğal bolluk, stabilite, küçük boyut ve ilaç bağlama yeteneği) sayesinde lizozim, metal iyonları, boyalar ve çeşitli farmasötik ilaçlar dahil olmak üzere farklı küçük moleküller ile etkileşimi, örnek olarak gösterilebilecek protein katlanması ve dinamikleri, yapı-işlev ilişkisi ve hücre-hücre etkileşimi arasındaki ilişkinin incelenmesinde olduğu gibi araştırmak için bir model protein olarak kullanılmıştır (Wang ve diğ. 2009, Peng ve diğ. 2013).

Lizozimin gıda katkı maddelerine (örneğin, gıda boyaları, gıda antioksidanları) bağlanma özelliklerinin, toksisite değerlendirmesinin özüne ilişkin daha kapsamlı bir profil sunması ve gıda katkı maddelerinin metabolik mekanizması hakkında önemli bilgiler sağlaması dikkat çekicidir. Daha da önemlisi, karmaşık protein sistemlerini içeren proteomik çalışmalarda lizozim yararlı bir araç olarak görev yapabilir. Birincisi, proteomik çalışmalar ve ilaç endüstrisi için gerekli olan adsorpsiyon modellerinin oluşturulmasında ihmal edilebilir bir etkiye sahiptir. Bu durumda, farklı yok olma katsayılarına sahip lizozim ve diğer proteinler, sütündeki karmaşık protein ayrımını değerlendirmek için adsorpsiyon izotermelerini kromatografik süreçlerin matematiksel açıklamalarına dahil edebilen düzenli mezogözenekli malzemeler üzerinde rekabetçi adsorpsiyon sunar (Darwish ve diğ. 2015).

İlgili proteinleri serbest bırakmak için hücre duvarının peptidoglikanlarını parçalama yeteneğinden dolayı, lizozim, hücre duvarı dışındaki proteinleri metodik bir şekilde sindirebilir ve daha sonra iki boyutlu elektroforez (2-DE) ile analiz edilebilir. proteomun bir kısmının tam bir resmini veriyor. Ek olarak lizozim, proteomik prosesin kütle spektrometrisine kadar sindirimin izlenmesinde hayati öneme sahip, müdahaleci olmayan bir iç standart veya model protein görevi görebilir (Wright ve diğ. 2005).

Lizozimlerin endüstriyel açıdan en önemli uygulamaları, balık, et, süt ürünleri, meyveler, sebzeler ve şaraplarda antimikrobiyal madde veya indikatör görevi görmesi veya gıda ambalajına entegre aktif bileşen olarak görev yapması nedeniyle paketleme malzemelerinde kullanılabilmesidir. Örneğin lizozim, pıhtı asitlenmesinde ve peynirin olgunlaşmasında rol oynayan laktik asit bakterilerinin (LAB) büyümesine karşı önleyici bir etki göstermiştir (Wu ve diğ. 2019). Tavuk yumurtası lizoziminden türetilen lizozim peptitleri (LP), lizozim litik aktivitesinin yalnızca %11'ini sunarken, 100 µg/ml konsantrasyonundaki LP, *B. subtilis*, *B. Licheniformis* dahil olmak üzere gıda kontaminasyonuna neden olan Bacillus türlerini (*megaterium*, *B. mycooides*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B.*) tamamen inhibe etti (Abdou ve diğ. 2007). %60 lizozim ( $w_{\text{lizozim}}/w_{\text{kitosan}}$ ) ile birleştirilmiş kitosan filmleri, bakterilere karşı gelişmiş inhibisyon etkinliği sergilemiştir; burada *S. faecalis*'te 3,8 log döngü azalma ve *E. coli*'de 2,7 log döngü azalma gözlemlenmiş olup, gıda kalitesinin sağlanmasında ve güvenlik koşullarında büyük potansiyel göstermektedir (Park ve diğ. 2004). Lizozim ve nisin, yüksek tuz koşullarında bile gıdada bozulmaya neden olan

laktobasillere karşı sinerjistik bir inhibisyon etkisi göstermiştir (Chung ve Hancock 2000). Malolaktik fermantasyonun kontrolü şarabın kalitesi açısından çok önemlidir. Buna karşılık, geleneksel yöntem, sülfite duyarlı astımlı tüketiciler için sağlık açısından endişe yaratan kükürt dioksite dayanmaktadır. Tavuk yumurtası beyazı lizozimi (HEWL), çoğunlukla bozulmaya veya fermentasyonun takılıp kalmasına neden olan spontan gram-pozitif bakteri gelişimini kontrol etme kabiliyeti nedeniyle uygun bir alternatif olabileceği literatürde rapor edilmiştir. Campanella ve diğ. (2016), beyaz ve kırmızı şaraptaki laktik bakterilerin (*Oenococcus oeni*) sürekli, verimli ve gıda kalitesinde enzimatik lizisini elde etmek için lizozimin mikrobiyal kitosan boncuklarına immobilizasyonuna dayanan bir sistem geliştirmiştir.

## 5. DENEYSEL BÖLÜM

### 5.1 Kimyasal Maddeler

Lizozim enzimi ve kriyojellerin hazırlanması için kullanılan kimyasallar; lizozim (w: 12 kDa, tavuk yumurtası beyazından), monomer olarak Akrilamit (AAm, %99, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD), ve N-Vinilimidazol (VIM), (%99, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD), çapraz bağlayıcı olarak N, N'-metilen bisakrilamid (MBA, %99,5, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD), polimerizasyon başlatıcısı olarak Amonyum persülfat (APS, %98, Merck, Almanya) ve hızlandırıcı olarak ise N, N, N', N' tetrametiletilediamin (TEMED, %99, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) olarak kullanıldı. Tüm kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Kriyojel sentezi ve adsorpsiyon çalışmalarında deiyonize (DI) su kullanılmıştır.

### 5.2 Kriyojellerin Hazırlanması

Öncelikle MBA (1,8 mmol) 13,2 mL deiyonize (DI) su içerisinde çözüldü ve daha sonra bu çözeltiliye eşdeğer oranda (1/1) AAm ve VIM (toplam 12.8 mmol) ilave edildi. Çözeltiler bir saat buz banyosunda tutulduktan sonra APS (20 mg) ve TEMED (25 µL) ilave edildikten sonra çözeltili, 5 mL'lik plastik şırıngalara (1,2 cm çapında) dağıtılarak -18 °C'de 24 saat bekletildi. Sentezlenen poli(AAm-VIM) kriyojelinin bazı fiziksel özelliklerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla VIM eklenmeden, aynı koşullarda yalnızca AAm monomeri kullanılarak poli(Akrilamit) (poli(AAm) kriyojeli sentezlendi. Polimerizasyondan sonra tüm kriyojeller, yabancı maddeleri uzaklaştırmak için DI su ile yıkandı.

### 5.3 Kriyojellerin Karakterizasyonu

#### 5.3.1 Jelleşme Verimi

Kriyojellerin jelleşme verimliliği (G) Eşitlik 5.1'deki bağıntıya göre hesaplanmıştır. Buna göre, kriyojeller ilk olarak kurutulmuş ve tartımı alınmıştır ( $W_D$ ). Ardından ise polimerizasyona dahil olan monomerlerin toplam kütesine ( $W_t$ ) oranlanarak G değeri hesaplanmıştır.

$$G = \frac{W_d}{W_t} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 5.1})$$

### 5.3.2 Su Tutma Davranışları

Kriyojellerin su tutma davranışları aynı zamanda su içerisinde bekletilerek yapılan şişme testi sonucunda hesaplanmıştır. Şişme derecesi (S.D.), şişme oranı (S.R.), makrogözeneklilik (M), gözeneklilik (P), gözeneklilik hacmi (P.V.) aşağıdaki eşitlikler aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$S. D. = \frac{W_1}{W_D} \quad (\text{Eşitlik 5.2})$$

$$S. R. = \frac{W_1 - W_D}{W_D} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 5.3})$$

$$M(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 5.4})$$

$$P(\%) = \frac{W_1 - W_D}{W_1 - W_2} \quad (\text{Eşitlik 5.5})$$

$$P. V. (\%) = \frac{W_3 - W_D}{W_D} \quad (\text{Eşitlik 5.6})$$

İki saat süre boyunca su içerisinde bekletilen kriyojelin kütlesi ( $W_1$ ), suda bekletildikten sonra mekanik sıkıştırma yöntemi ile gözeneklerindeki su uzaklaştırılmış kriyojelin kütlesi ( $W_2$ ), kurutulmuş kriyojelin N-Hekzan içerisinde bekletildikten sonraki kütlesi ise ( $W_3$ ) olarak sembolize edilmiştir.

### **5.3.3 FTIR Analizi**

Fonksiyonel grup analizi amacıyla kriyojeller FTIR analizine tabi tutulmuştur. Kurutulmuş kriyojeller ATR (Nicolet iS10 ATR-FTIR, Thermo Scientific, Madison, WI, ABD) probu üzerine yerleştirilerek 500-4500 cm<sup>-1</sup> frekans aralığında FTIR spektrumları elde edildi.

### **5.3.4 Yüzey ve Gözenek Morfolojisi**

Kriyojellerin yüzey ve gözenek morfolojisi Alan Taramalı- Elektron Mikroskopisi (FE-SEM) (ZEISS GeminiSEM 500) ile analiz edildi. Kurutulan kriyojeller, FESEM numune tutucusu üzerinde moleküler altın-paladyum karışımı ile 15 dakika süreyle kaplandı ve ardından kriyojellerin çeşitli büyütmelemlerde FESEM görüntüleri elde edildi.

### **5.3.5 Elementel Analiz**

Kriyojellerin element içeriklerinin belirlenmesi amacıyla EDX analizi yapılmış olup, hem poli(AAm-VIM) hem de poli(AAm) kriyojellerin yapısında yer alan komonomerlerin yüzdece karbon (C), oksijen (O) ve (N) içerikleri belirlemiştir. Bu amaçla kriyojellerin EDX analizleri vice (Quorum, Q150R) cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

### **5.3.6 Termogravimetrik Analiz**

Artan sıcaklık ve zamana bağlı olarak kriyojellerin kütle değişimleri termogravimetrik analiz (TGA) yöntemiyle araştırıldı. Yaklaşık 10 mg kurutulmuş toz haline gelen kriyojel numunelerinin artan sıcaklık derecelerine karşı stabilitesi Termogravimetrik Analizör cihazı (DTG 60 H – DSC 60, Shimadzu, Japonya) ile azot gazı atmosferinde 25–800°C sıcaklık aralığında, 100 mL/dak akış hızında, ısıtma hızı 10°C/dk olarak tayin edildi.



#### 5.4 Adsorpsiyon Çalışmaları

Lizozimin tanınması için tüm adsorpsiyon çalışmaları peristaltik pompa (Pumpdrive 5201, Heidolph) aracılığıyla sürekli sistemde (Şekil 5.1) polimerik kriyojel kolonlarla gerçekleştirilmiştir. Lizozimin en uygun ve maksimum adsorpsiyon göstereceği çalışma koşulları pH, başlangıç derişimi taraması, sıcaklık, akış hızı, iyonik şiddet etkisi ve sıcaklık çalışmaları poli(Aam-VIM) kriyojel kolonu kullanılarak belirlendi. UV spektrofotometre ekipmanı kullanılarak, UV-VIS Spektrometresinde (UV-mini 1240, Shimadzu, Tokyo, Japonya) 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek lizozim konsantrasyonu belirlendi. (Denklem 5.7) adsorbe edilmiş lizozim konsantrasyonunun hesaplanması için kullanıldı.

$$Q = \frac{c_i - c_f}{m} \quad (\text{Eşitlik 5.7})$$

Q, kriyojelin birim kütlesi (mg/g) üzerinde adsorbe edilen lizozim miktarıdır;  $c_i$  ve  $c_f$ , sırasıyla başlangıç çözeltisindeki ve belirli bir süre sonraki sulu fazdaki lizozim konsantrasyonlarıdır (mg/mL). Ayrıca V, sulu fazın hacmidir (mL); ve m, kullanılan kriyojelin kütlesidir (g).



Şekil 5.1: Adsorpsiyon çalışmalarının yürütüldüğü peristaltik pompalı sürekli sistem

## 5.5 Desorpsiyon- Tekrar Kullanılabilir Çalışmaları

Oda sıcaklığında 1,0 mL/dakika akış hızında lizozim adsorbe edilmiş kriyojellerden sodyum klorür çözeltisi (0,5 M) geçirilerek 280 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler ile liozim desorpsiyonu gerçekleştirildi. Eşitlik 5.8 kullanılarak desorbe edilmiş lizozim miktarını hesaplamak için kullanıldı.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{Q_r}{Q_a} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 5.8})$$

Eşitliğe göre,  $Q_r$ , salınan lizozim miktarını,  $Q_a$  ise adsorbe edilmiş lizozim miktarını sembolleştirmektedir.

Kriyojellerin yeniden kullanılabilirliğini değerlendirmek için aynı koşullar altında ardışık adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü için aynı kriyojel beş kez kullanıldı.

## 5.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE) Görüntüleme

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) % 20 akrilamid jeli (1.5 M Tris-HCl pH 8.8 içinde) ile hazırlandı. İlk, son ve desorbe edilen numuneler (15 µL) alındı ve 15 µL bromofenol (%1 sulu metaminoetanol içeren %50 sulu gliserol içinde %0.002 bromofenol mavisi) ile karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 15'ar µL hazırlanan çözeltilerden yüklendi. Protein standardı olarak, geniş spektrumlu Ladders protein marker (işaretleyici referans) (10- 70 kDa) kullanıldı. Elektroforez jeli % 0.1 SDS içeren yürütme tamponu (Tris-glisin, pH 6.8) varlığında yaklaşık 3.5 saat boyunca 120 V güç uygulanarak yürütüldü.

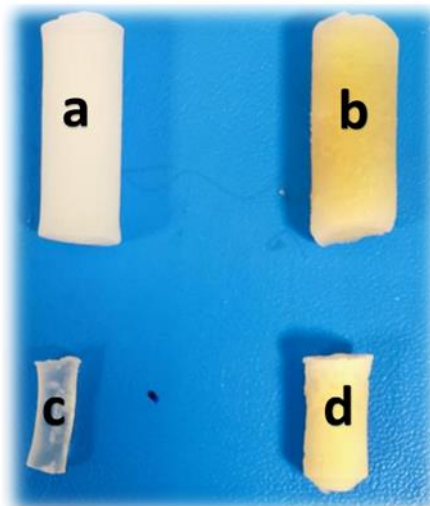
Yürütme işleminin ardından Coomassie Blue G-250 içeren çözeltiliye sırasıyla hacimce (%0.2 Coomassie Blue G-250, %40 metanol, %10 asetik asit ve %50 su) alınarak bu çözelti içerisinde 1 gün boyunca bekletildi. Ardından ise, Coomassie Blue G içermeyen sırasıyla 10-40 ve 50'lik hacimlerce asetik asit, metanol ve su içeren yıkama çözeltisi ile her 30 dakikada bir çözelti değiştirilerek, reaktif boyanın ortmanda uzaklaştırılması sağlandı.

## 6. BULGULAR

### 6.1 Kriyojellerin Hazırlanması

Kriyojeller sıfırın altındaki sıcaklıklarda (yani kullanılan çözücünün kristalizasyon sıcaklığının altında) sentezlenen çözünmeyen üç boyutlu polimer ağlarıdır. Reaksiyon, gözenek oluşturma görevi gören ve buzun çözünmesi sonrasında oldukça gözenekli bir jel oluşumunu sağlayan buz kristallerini çevreleyen derişik donmayan mikrofazda ilerlemektedir. Bu çalışmada hidrofobik etkileşim prensipli afinite kromatografisi aracılığıyla ile lizozim adsorpsiyonu için psödo-spesifik ligand olarak VIM içeren akrilamit temelli polimerik kriyojel kolonlar hazırlandı.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen kriyojellerin suda bekletilmiş ve kurutulmuş olarak ayrı ayrı optik fotoğrafları Şekil 6.1’de gösterilmektedir. Buna göre, poli(AAm) kriyojeli, açık beyaz renkli olmakla birlikte, bu çalışmanın temelinde yer almak üzere sentezlenmiş poli(AAm-VIM) kriyojelleri ise açık sarı renkli olarak (Şekil 6.1a ve Şekil 6.1b’DE) dikkat çekmektedir. Bu farklılık, N-Vinil imidazol (VIM) monomerinin kriyojel oluşumuna katkısının nitel bir yaklaşım olarak kabul öngörülebilmektedir. poli(AAm-VIM) kriyojeli silindirik şekle sahip, esnek, süngerimsi yapısı ile kriyojellerin beklenen doğal yapısı ile uyum halindedir.



**Şekil 6.1:** Bu çalışmada sentezlenen kriyojellerin optik görüntüleri: a: şişmiş haldeki poli(AAm) kriyojeli, b: şişmiş halde poli(AAm-VIM) kriyojeli, c: kurutulmuş haldeki poli(AAm-VIM.) kriyojeli, d: kurutulmuş haldeki poli(AAm-VIM) kriyojeli

## 6.2 Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları

Kriyojellerin şişme özelliklerinin ölçülebilmesi, aynı zamanda fiziksel karakterizasyonlarının belirlenmesinde önemli bir parametredir. Denge şişme derecesi, adsorbent olarak kriyojellerin geçirgenliğini ve mekanik özelliklerini etkileyen temel bir özelliğidir. Kriyojeller, su veya biyolojik sıvıları emebilen çapraz bağlı hidrofilik polimerlerdir. Biyomedikal ve farmasötik uygulamaları, çeşitli moleküler tasarım özelliklerini kullanan çeşitli sistem ve süreçleri içerir.

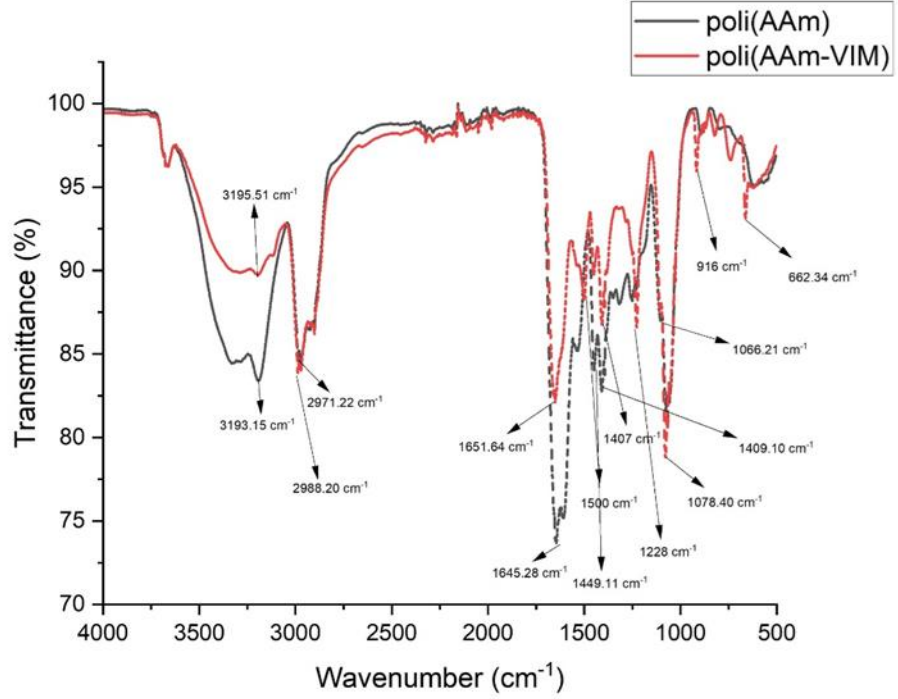
Kriyojellerin şişme özelliklerine bağlı hesaplamaların gerçekleştirilebilmesi için yapılan deneyler DI su içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bunun öncesinde ise jelleşme verimi hesaplanmıştır. Jelleşme verimi sayesinde sentezlenen kriyojelin, çapraz bağlanma kalitesinin ve dolayısıyla monomerlerin etkin bir şekilde polimerlere dönüşüp dönüşmediği anlaşılabilir. Hazırlanan kriyojellerin jelleşme verimleri Bu amaç doğrultusunda, kuru haldeki poli(AAm-VIM) kriyojeli, iki saat süresince distillenmiş su içerisinde tutulmuş, ardından bulunduğu ortamdan çıkarılıp, nemli bir havlu kağıt ile yüzeyi hafifçe silinerek tartımı gerçekleştirilmiştir. Poli(AAm) kriyojellerinin şişme kinetiği ise poli(AAm-VIM) kriyojellerine nazaran her iki kriyojelin gözenek morfolojisinin farklı olmasından ötürü farklı gelişmiştir. Şöyle ki, kriyojellerin doğası gereği, kriyojeller su içerisine bırakıldıktan çok kısa süre sonra eski şeklini alarak su içerisinde çok kısa sürede şişme dengesine gelebilmektedir. Poli(AAm-VIM) kriyojeli benzer bir şekilde bu kinetiği sağlamıştır. Ancak, poli(AAm) kriyojeli için ise aynı durum söz konusu olamamaktadır. Giriş kısmında açıklandığı gibi, akrilamit temelli kriyojeller, jelleşme karakteri olarak hidrojel özellikli morfolojiye (gözenek çapı ve duvar kalınlığı gibi vs.) sahip olduğundan, hidrojellerin gözenek boyutları, kriyojellere nazaran mikro boyutlarda kaldığından su alıp-şişme karakteri benzer sürelerde cereyan edememektedir. Bu yüzden, benzer testler bu çalışmada poli(AAm) kriyojeli için yürütülmemiştir. Kriyojellerin şişme dengesine ulaştıktan sonra gözeneklerindeki suyun mekanik olarak sıkıştırma yolu ile uzaklaştırılması sonrası makrogözeneklilikleri hesaplanabilmiştir. Bu yaklaşım sayesinde, suyun sistemlerin makrogözenekleri içinde bulunduğu ve sıkıştırma ile uzaklaştırılabileceği varsayılarak, örneklerin iç gözenekliliğini yaklaşık olarak tahmin etmek için diğer makrogözeneklilik olarak literatürde uygulanabilmektedir. Ancak hidrojel morfolojisi karakterine sahip polimerler ise geri döndürülemez şekilde hasar

görmeden mekanik olarak sıkıştırılmadığı için bu yöntem hidrojenlerin gözenekliliğini tahmini olarak hesaplamak için elverişli değildir. Makrogözeneklilik aynı zamanda, kriyojellerin su alarak şişmiş ve kurutulmuş halleri arasında gözle görülebilir önemli bir farklılık bulunmasının açıklanmasında önemli bir parametredir. Kriyojellerin, gözenek hacminin spesifik olarak tahmini hesaplanmasında kullanılan yöntemde ise kriyojellerin hidrofilik yapısının tam tersi olarak polar-hidrofilik olmayan organik çözücüler kullanılmaktadır. Tüm bu bilgiler neticesinde poli(AAm-VIM) kriyojelinin şişme özelliklerine bağlı yapılan hesaplamalar karşılığında çeşitli parametrelerin sahip olduğu değerler Tablo 1’de topluca gösterilmektedir.

**Tablo 6.1:** poli(AAm-VIM) kriyojelinin jelleşme verimleri (G), şişme derecesi (S.D.), şişme oranları (S.R.), makrogözeneklilik (MP), gözeneklilik (P.) ve gözenek hacmi (P.V.) sonuçları

| G     | S.D.  | S.R. (%) | MP.    | P      | P.V.   |
|-------|-------|----------|--------|--------|--------|
| 93.12 | 10.14 | 90.14    | 231.09 | 129.14 | 270.37 |

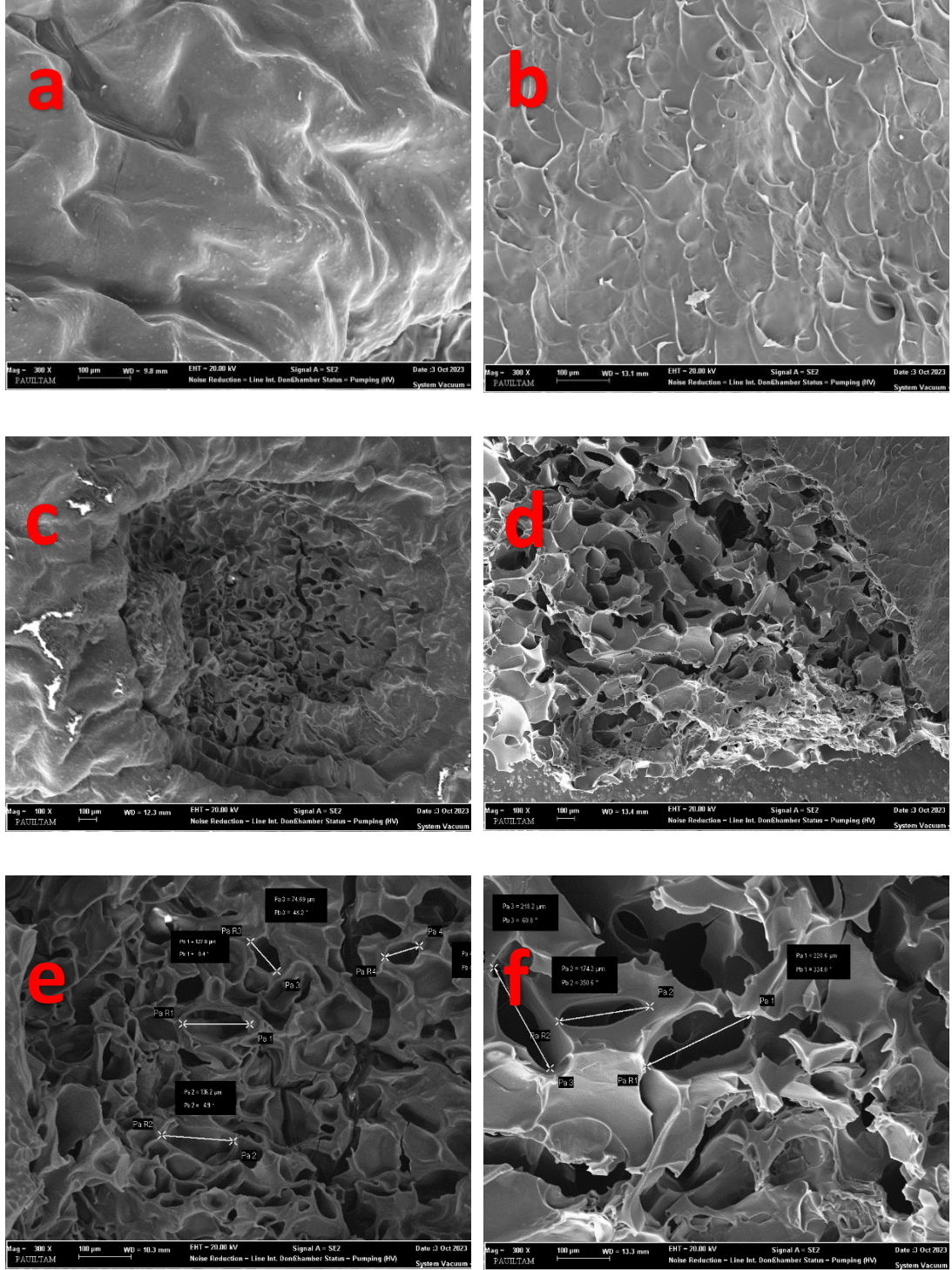
Her iki kriyojel, poli(AAm) hem de poli(AAm-VIM)'in kimyasal yapısını karakterize etmek için Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) yöntemini kullandık. Böylece, kriyojellerin karakteristik fonksiyonel grupları, Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre kullanılarak analiz edildi. poli(AAm-VIM) kriyojel için 3430 ve 3195,51  $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları  $\text{NH}_2$ 'nin gerilme titreşimi olarak tanımlanır. 2988.20  $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları, kopolimerin ana zincirindeki -CH ve -CH<sup>2</sup>'nin C-H gerilmesine yorumlanmış ve 1645  $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bandı AAm zincirinin C=O grubuna karşılık gelir. 1449 ve 1500  $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları, VIM zincirindeki C-C ve N-C gerilme titreşimi olarak yorumlanmıştır. 762 ve 662  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar sırasıyla azol halkasının C-H halkası bükülme titreşimine ve C-N titreşimine yorumlanmıştır. Bu karakteristik AAm ve VIM absorpsiyon bantları, poli(AAm-VIM) kriyojelinin başarıyla sentezlendiğini teyit etmektedir.



Şekil 6.2: poli(AAm) kriyojel ve poli(AAm-VIM) kriyojelin FTIR spektrumları

Kriyojellerin yüzey morfolojisini ve gözenekliliğini incelemek için, kriyojel yüzeyleri kurutulup iletken temaslılığını arttırmak için yapılan ön hazırlık işlemlerinden sonra alan taramalı taramalı elektron mikroskobu (FESEM) kullanıldı (Resim 3). Şekilde görüldüğü gibi kriyojeller birbirine bağlı makro gözeneklere sahip pürüzlü yüzeylere sahiptir. Bu çalışmada sentezlenen kriyojellerin FESEM görüntüleri yüzey morfolojisi ile gözenek çaplarının farklılık gösterdiği net olarak gözlemlenmektedir. poli(AAm) kriyojellerin yüzey morfolojisi daha küçük gözenek (mikrogözeneklere) sahip olmakla birlikte, kriyojellerin ise hem makro hem de mikrogözeneklere sahip olması sebebi ile farklılık göstermektedir. AAm kriyojelleri, giriş kısmında belirtildiği üzere hidrojel oluşumuna sebebiyet veren polimerizasyon sürecidir (Carvalho ve diğ. 2014). Bu noktada, hidrojellerin ağ yapısı doğrudan polimer ile donatılmaktadır. Buna karşılık, kriyojellerin birbiri ile iç içe geçmiş ağları ise buz kristalleri sayesinde oluşan makrogözeneklilik sayesinde (Lozinski ve diğ. 2008). Kriyojelasyondan sonra freeze-thawing işlemi ile buz kristalleri erir ve makro gözenekler oluşur. Hidrojel oluşumunda ise buz kristalleri oluşmadığı için polimer ve buz fazı olmak üzere iki faz yoktur ve tüm alanda polimerizasyon meydana gelir

(Lozinski 2002). Dolayısıyla FESEM görüntülerinden de görüldüğü gibi hidrojelde makro gözenek bulunmamaktadır. Ayrıca hidrojelerde polimerizasyon geniş bir alanda meydana gelirken, kriyojelerde monomerlerin buz kristalleri nedeniyle daha yoğun olması nedeniyle kriyojelerin polimer duvarları daha belirgindir (Lozinski ve Okay 2014). Bu şekilde, kriyojelerin süpermakrogözenekli yapısı ve birbirine bağlı akış kanalları korunurken, kriyojelerin spesifik yüzey alanı arttırılmıştır.

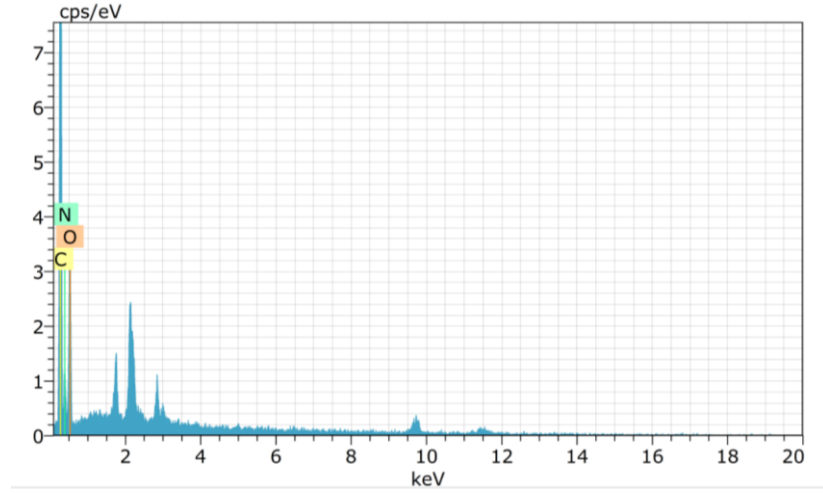


**Şekil 6.3:** poli(AAm) (a-c-e) ve poli(AAm-VIM) (b-d-f) kriyojellerin FESEM görüntüleri

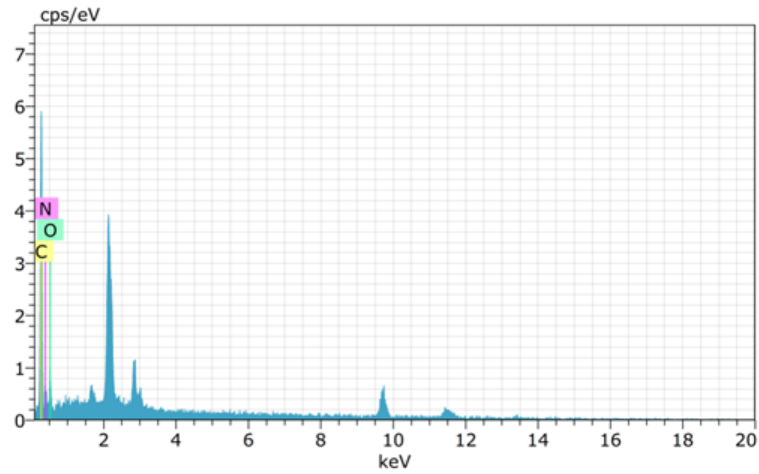
Sentezlenen kriyojellerin elementel içeriğinin belirlenebilmesi için EDS yöntemi ile karakterize edildi. Her iki kriyojel de, karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O) ve azot (N) elementlerini içermektedir. VIM monomerinin kopolimer olarak kriyojele katkısı sonucunda pli(AAm-VIM) kriyojelinde azot atomunun içeriğinin



artış göstermesi bu sonucu destekler niteliktedir. Bu elementlerin bileşimi her bir kriyojel için farklı olduğundan yüzde elementel analiz sonuçları da şu şekilde elde edilmiştir: poli(AAm) kriyojeli için; C: 52.20, O: 28.66 ve N: 19.14 iken, poli(AAm-VIM) kriyojeli için ise C: 54.74, O: 20.43 ve N: 24.83.



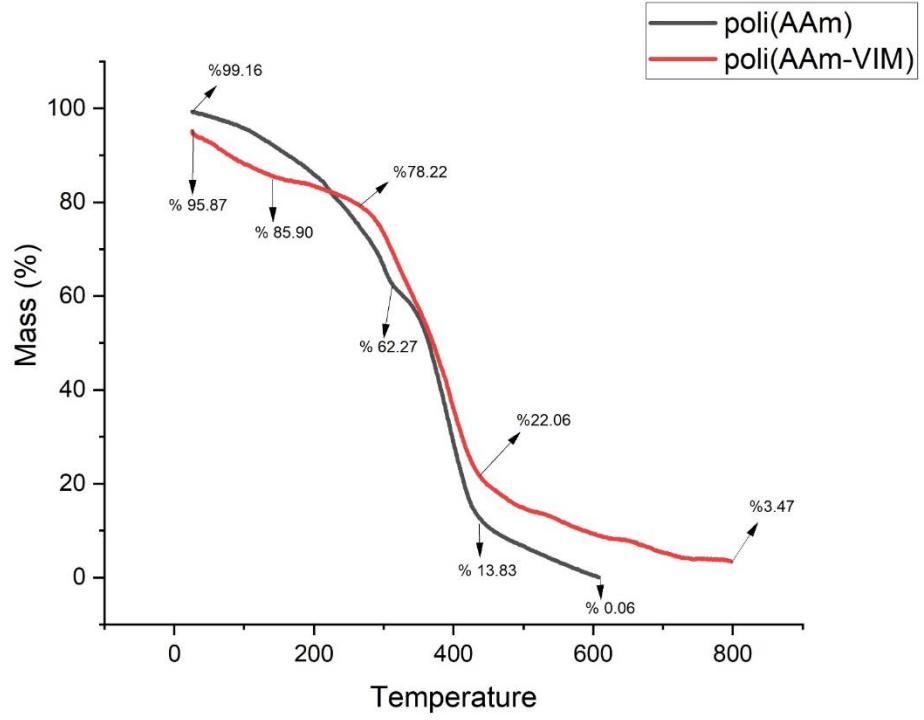
Şekil 6.4: poli(Aam) kriyojellerinin elementel dizilimi



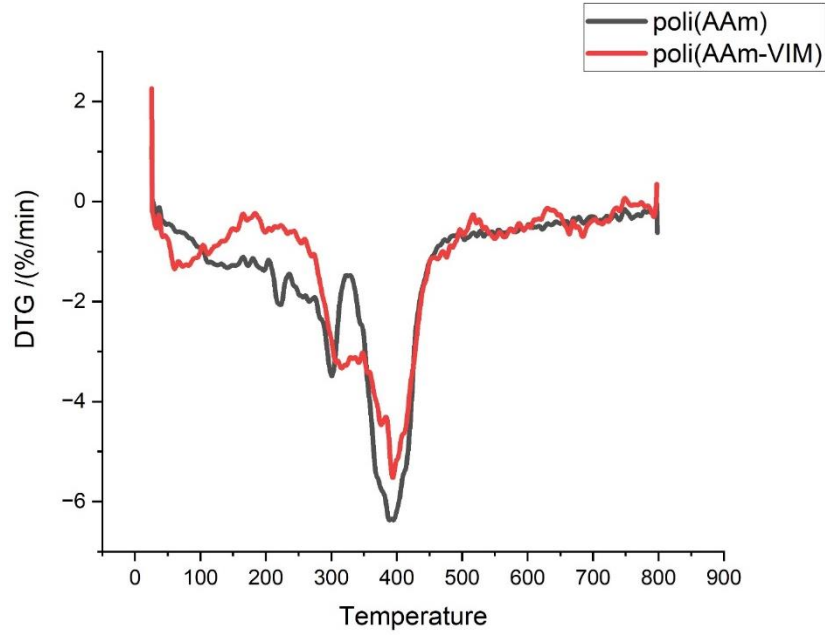
Şekil 6.5: poli(Aam-VIM) kriyojellerinin elementel dizilimi

poli(AAm) ve poli(AAm-VIM) kriyojellerin kütle kaybına ilişkin termal analiz çalışmaları, 25 °C ila 800 °C arasındaki sıcaklıklarda ve 10 °C/dk ısıtma hızında gerçekleştirildi. Buna ilişkin sonuçlar Resim 5’de gösterilmektedir. Buna göre, genel olarak poli(AAm) ve poli(AAm-VIM) kriyojellerin benzer sıcaklık ve oranlarda kütle kaybı profili çizdiği görülmektedir. Öte yandan yaklaşık 300 °C'den başlayan kütle

kaybının büyük bir kısmı hem poli(AAm) hem de poli(AAm-VIM) kriyojel için geçerlidir. Poli(AAm) kriyojelin içeriğinin 600 °C'ye ulaştığında tamamlandığı gözlenmiştir. Ancak, VIM'in poli(AAm-VIM) kriyojeline katkısının etkisiyle poli(AAm-VIM) kriyojelinin 800°C'ye gelindiğinde halen bir miktar daha termal ömrünü uzatacak kadar numune içeriğine sahip olduğu gözükmektedir. Bu durum, VIM'den kaynaklı poli(AAm-VIM) kriyojellerin içerdikleri organik kalıntı nedeniyle poli(AAm) kriyojeline göre daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, tüm kriyojellerin DTA grafiklerine bakıldığında kriyojellerin sıcaklık etkisiyle bozulma tepkimelerinin endotermik olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 6.6: Kriyojellere ilişkin TGA diagramları



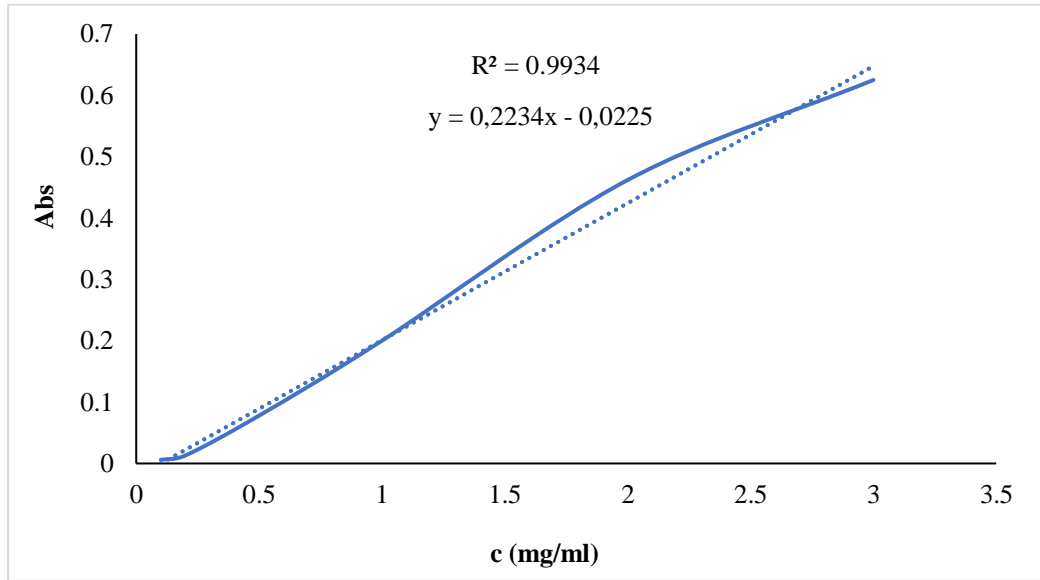
Şekil 6.7: Kriyojellere ilişkin DTA diagramları

### 6.3 Adsorpsiyon Sonuçları

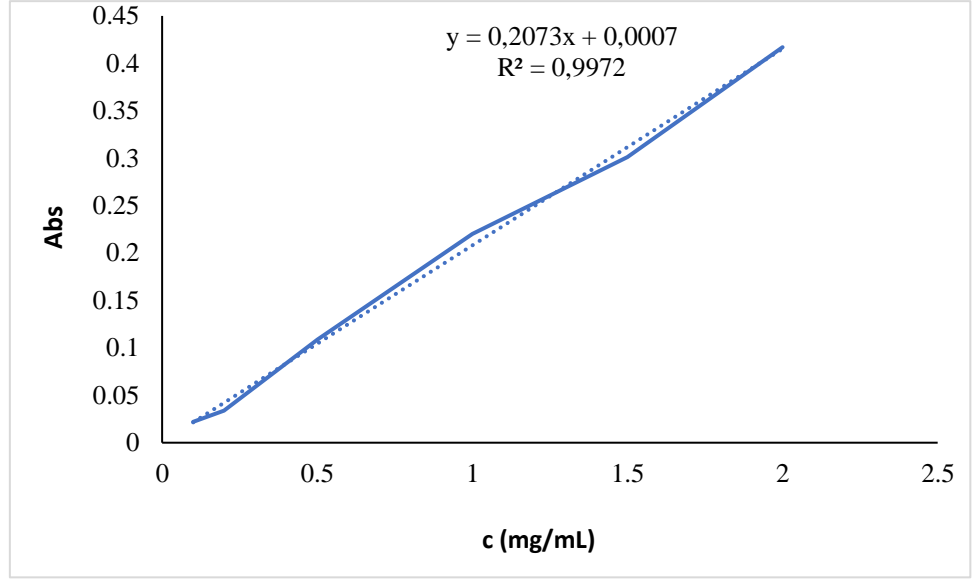
#### 6.3.1 Lizozim Kalibrasyon Eğrileri

Absorbans değerleri ile saf lizozimin farklı derişimlerdeki çözeltileri arasında bir kuramsal bağıntı elde edebilmek için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Bu çizelgeler daha sonraki deneylerde lizozim derişiminin doğru bir şekilde belirlenmesi için bir referans görevi görmektedir. Lizozim kalibrasyon eğrileri, iki farklı kalibrasyon şartlarında oluşturuldu. Sonuçların doğruluğunu ve karşılaştırılabilirliğini sağlamak amacıyla hem Kalibrasyon I hem de Kalibrasyon II için aynı dalga boyu (280 nm) ve spektrofotometre ayarları dahil olmak üzere tutarlı ölçüm koşullarının kullanılmasına dikkat edildi. Her kalibrasyon oturumunun ayrıntıları aşağıdaki gibidir. Kalibrasyon I için (Şekil 6.8), 0,1 ila 3.0 mg/ml arasında değişen altı farklı saf lizozim derişimli sulu bir çözelti titizlikle hazırlandı. Bir UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak her bir lizozim çözeltisinin absorbansı, 280 nm'lik spesifik bir dalga boyunda ölçüldü. Absorbans değerlerinin hemoglobin çözeltilerinin karşılık gelen derişimlerine (mg/ml) karşı grafiğinin çizilmesiyle bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon II için (Şekil 8), doğru hemoglobin ölçümleri için en uygun pH koşullarını belirlemek üzere

pH taraması deneyi gerçekleştirildi. pH taramasının ardından, bu sefer pH 9 tampon çözeltisi içinde yeni bir lizozim çözeltisi seti hazırlandı. pH 9 tamponundaki her bir lizozim çözeltisinin absorbanı, 280 nm'lik belirlenmiş dalga boyunda UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. İkinci bir kalibrasyon eğrisi, pH 9 tamponundaki lizozim çözeltilerinin karşılık gelen derişimlerine (mg/ml) karşı absorban değerlerinin grafiğinin çizilmesiyle oluşturuldu (Şekil 6.9). Bu kalibrasyon eğrileri, absorban değerleri ile lizozim çözeltilerinin konsantrasyonu arasında niceliksel bir ilişki kuran referans araçları olarak değerlendirilmektedir. Bu aşamadan itibaren doğru lizozim konsantrasyonu ölçümleri için büyük önem taşırlar ve spektrofotometrik analiz için güvenilir bir referanstır.



Şekil 6.8: Lizozim kalibrasyon eğrisi (I)

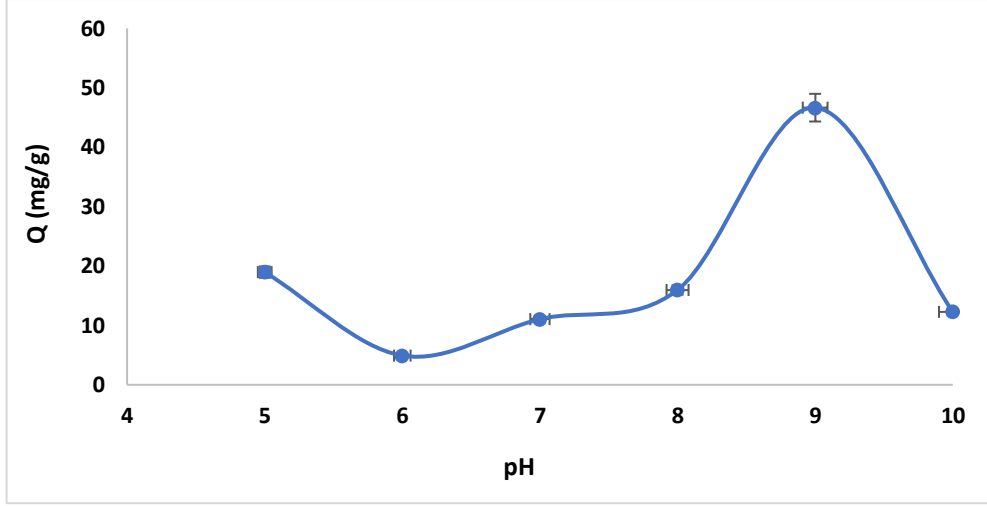


Şekil 6.9: Lizozim kalibrasyon eğrisi (II)

### 6.3.2 pH Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında, pseudospesifik ligand temelli kriyojeller tarafından lizozim adsorpsiyonu için uygun pH'ı belirlemek amacıyla saf lizozim ile deneyler gerçekleştirildi. Deneyler için pH 5.0 ile pH 10.0 aralığında tampon çözeltiler kullanıldı (pH 5: Asetat tamponu, pH 6-8 aralığındaki tamponlar için fosfat tamponu ve pH 9 ile 10 noktasındaki çalışmalara yönelik için ise TRIS tamponları hazırlandı). Bu pH değerleri arasında, kriyojel tarafından lizozim için adsorpsiyon performansı (Q), Şekil 6.8'de gösterildiği gibi en yüksek pH 9.0 için hesaplanmıştır. Lizozimin pI'si yaklaşık pH 11'dir. Buna göre, adsorpsiyon pH'ının, pH 11'e ayarlandığında lizozimin yüzey yükünün nötüre yakın olduğunu gösterir (Nepal ve Geckeler 2006). Bu koşullar altında, lizozim ile adsorban arasındaki elektrostatik etkileşim en aza indirilecek ve adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde azalacağı öngörülebilir. Buna karşılık, adsorpsiyon koşullarında pH'ı < pI'de, lizozim net bir pozitif yüklü haldedir ve negatif yüklü adsorban tarafından adsorbe edilebilir. Adsorpsiyon pH'ındaki azalmayla birlikte, lizozimin daha pozitif yüklü olduğu ve adsorbanla daha güçlü bir elektrostatik çekime sahip olacağı ve bunun da daha iyi adsorpsiyon verimliliğine yol açacağı varsayılmaktadır (Kubiak-Ossowska ve diğ. 2015). Ancak daha önce bildirilen verilerin aksine, lizozimin adsorpsiyon kapasitesinin pH 9'da daha yüksek olduğu bulunmuştur Bu nedenle, lizozimin adsorpsiyon davranışının, yük dağılımı, lizozimin

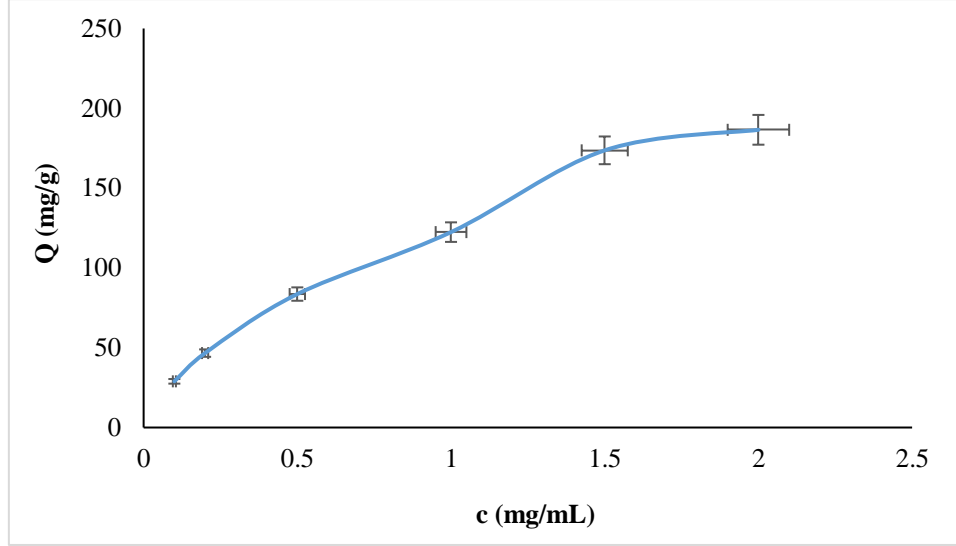
konformasyonel yapısındaki değişiklikler ve adsorpsiyon sırasındaki çevresel koşullar gibi diğer faktörler tarafından yönetilebileceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, imidazol halkasının sahip olduğu hidrofobik karakterinin de bu sonuçta etkili olabileceği düşünölmektedir.



Şekil 6.10: Lizozim adsorpsiyonuna pH etkisi: c: 0.5 mg/ml, v: 20.0 ml, t: 2 saat, 25°C, akış hızı: 0.5 ml/dk

### 6.3.3 Başlangıç Derişimi Etkisi

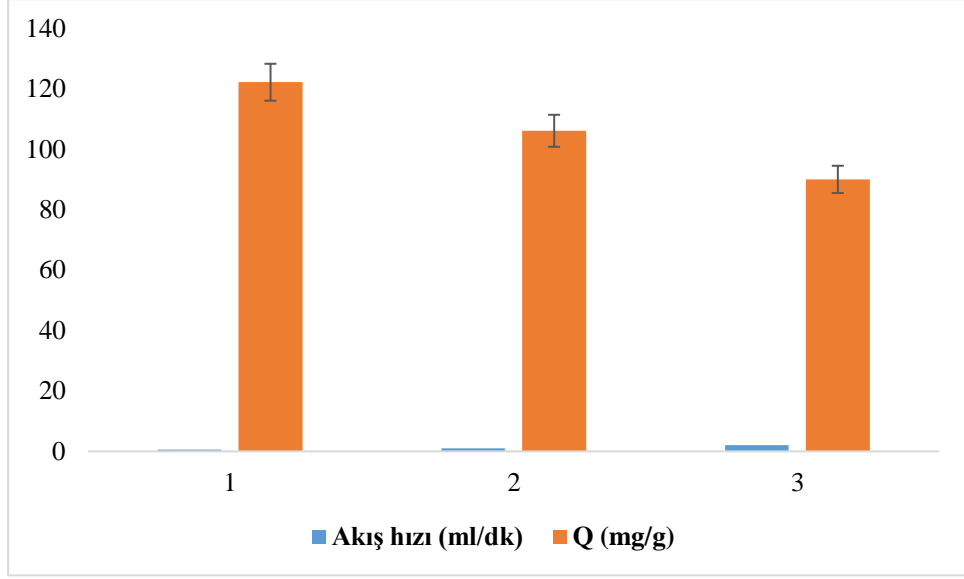
Lizozimin başlangıç derişiminin, poli(AAm-VIM) kriyojelleri tarafından adsorpsiyonuna etkisi aşamasında derişimi 0.1-2.0 mg/ml aralığında değişen lizozim çözeltileri pH 9 tamponu içerisinde hazırlanarak adsorpsiyon kapasitesindeki değişiklik araştırıldı (Şekil 5). Adsorpsiyon performansı incelendiğinde 0.1 mg/ml'den 1.0 mg/ml düzenli bir artış gözlenirken, 1.0-1.5 mg/ml aralığında ise artış hızının azaldığı ve 2.0 mg/ml'ye ulaşıldığında ise adsorpsiyon koşullarının dengeye ulaştığı gözlenmiştir. poli(AAm-VIM) kriyojellerinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 186.52 mg/ olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 6.11:** Lizozimin başlangıç derişiminin adsorpsiyon performansına etkisi: pH: 9.0, v: 10 ml, t: 2 saat, 25°C

#### 6.3.4 Polimerik Kriyojel Kolonun Akış Hızı Etkisi

poli(AAm-VIM) kriyojel kolonların farklı akış hızlarındaki adsorpsiyon miktarı Şekil 2'de verilmiştir. Sonuçlar, kolondaki akış hızı arttığında poli(AAm-VIM) kriyojeli üzerindeki lizozim adsorpsiyon kapasitesinin azaldığını göstermektedir. Akış hızının 1 ml/dakikadan 3,0 ml/dak'ya artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi 122,2 mg/g polimerden 90,04 mg/g polimere önemli ölçüde azaldı. Bunun nedeni, daha yüksek akış hızlarında analit molekülleri ile kriyojel adsorban arasındaki etkileşim süresinin azalmasıdır. Buna karşılık, kolonda akış hızının azalmasıyla afinite kolon ile analit arasındaki etkileşim, artan temas süresi ile uzar. Böylece lizozim moleküllerinin kriyojelin gözenek duvarlarına difüzyonu ve moleküler boşluklara bağlanması daha geniş ve ayrıntılı bir şekilde gerçekleşerek, dolayısıyla daha iyi bir adsorpsiyon kapasitesi elde edilir.

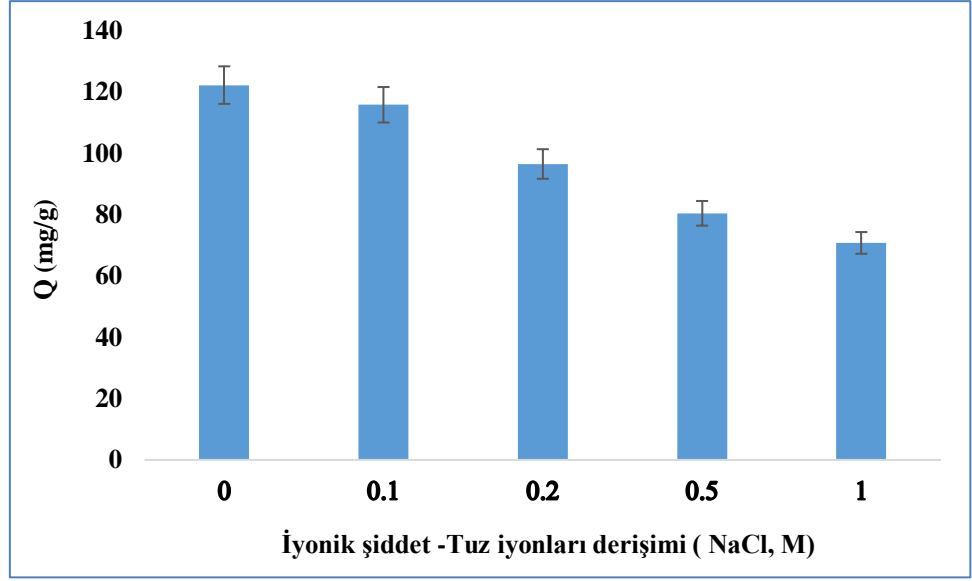


**Şekil 6.12:** Farklı akış hızlarının lizozim adsorpsiyonuna etkisi: pH:9.0, v: 10 ml, t: 2 saat, T: 25°C

### 6.3.5 İyonik Şiddet Etkisi

İyonik şiddet etkisinin poli(AAm-VIM) kriyojel kolonunda lizozim adsorpsiyonuna lizozim adsorpsiyon miktarı üzerindeki etkisi de araştırıldı. Bu kapsamda 1.0 mg/ml lizozim konsantrasyonuna sahip pH 9.0 çözeltileri içerdikleri derişimleri 0.1 -ile 1.0 M NaCl aralığındaki dört farklı konsantrasyonda tuz iyonları ile yüklü halde poli(AAm-VIM) kriyojel kolonlarından iki saat süresince geçirildi. NaCl derişiminin artması, diğer bir deyişle iyonik şiddeti arttırmı ve iyonik kuvvetin artması ise lizozim moleküllerinin kolona tutunma-bağlanma eğilimini azaltmıştır. Bu durum, adsorpsiyon kapasitesine etki ederek NaCl konsantrasyonunun artmasıyla lizozim adsorpsiyon miktarı 122.20 mg/g'dan 70.75 mg/g'a düşmüştür. Böylece iyonik etkileşimler tanıma ve bağlanma sürecine önemli ölçüde etki etmiştir. Buna sebep olarak, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin aynı anda meydana gelmesi durumunda, çözeltilerin iyonik kuvvetinin artması önceki türdeki etkileşimi azaltması ile açıklanabilir. Netice itibari ile tuz çözeltileri derişiminin artması ile protein çözünürlüğünün azaldığı bilinen bir gerçektir.

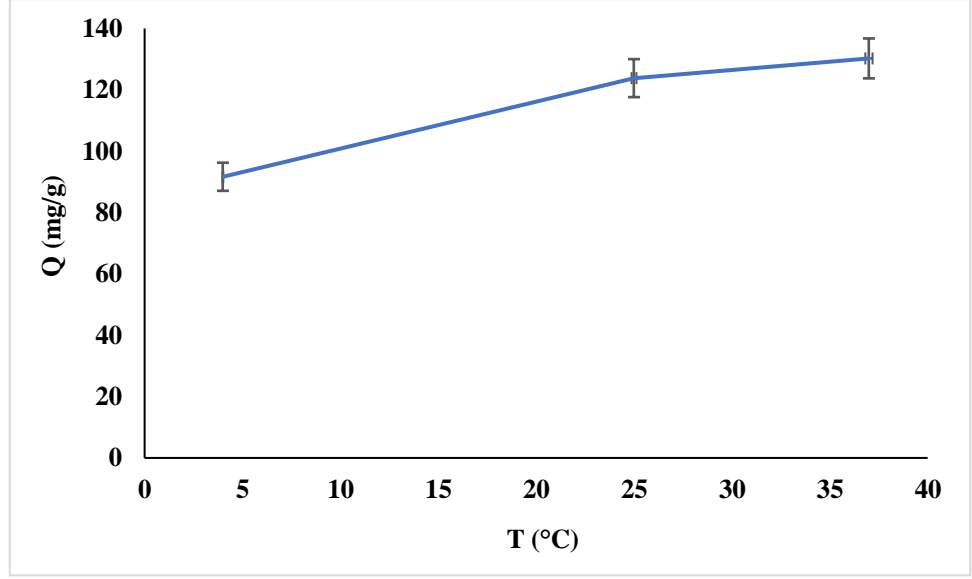




Şekil 6.13: İyonik şiddet etkisinin lizozim adsorpsiyonuna etkisi: pH 9.0, v: 10.0 ml, t: 2 saat, T: 25°C, akış hızı: 0.5 ml/ dk

### 6.3.6 Sıcaklık Etkisi

poli(AAm-VIM) kriyojel afinite kolon vasıtasıyla gerçekleştirilen lizozim adsorpsiyonu deneylerinin bu aşamasında ise adsorpsiyon performansına ortamın değişen sıcaklık koşullarının etkisi incelenmiştir. Polimerik kriyojel kolonda lizozim adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen deneyler 4 ile 37 derece sıcaklık aralığında ve üç farklı koşulda ( 4.0, 25.0 ve 37.0 derecede) incelendi. Sıcaklığın artış göstermesiyle birlikte kriyojel kolonda lizozim adsorpsiyon kapasitesi önemli oranlarda artış göstermektedir. Bu performansların karşılığı ise sırasıyla; 4 derece için 91.65 mg/g, 25 derece için 123.81 ve 37 derece için ise 130.25 mg/g olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık ile lizozim adsorpsiyonu arasındaki ilişki, bu sonuçların ardından hidrofobik etkileşimin artması şeklinde yorumlanmıştır. Eğer, hidrojen bağları ya da elektrostatik etkileşimler etkili olmuş olsaydı, artan sıcaklığın etkisiyle bu parametreler ışığında adsorpsiyon performansının düşmesi beklenebilirdi. Buna karşılık, Van der Waals ve hidrofobik etkileşimlerinin etkin olduğu reaksiyon koşullarında ise adsorpsiyon kapasitesi sıcaklıkla doğru orantılı olarak değişim göstermektedir.



Şekil 6.14: Sıcaklığın lizozim adsorpsiyonuna etkisi: pH 9.0, v: 10.0 ml, t: 2 saat, akış hızı: 0.5 ml/ dk

#### 6.4 Adsorpsiyon İzotermeleri

"Adsorpsiyon izotermi" terimi tipik olarak adsorpsiyon verilerini tanımlamak için kullanılır. "Adsorpsiyon izotermi", sabit sıcaklıkta bir birim adsorban miktarı tarafından adsorbe edilen adsorban miktarı ile denge çözeltisi derişimi (veya basıncı) arasında var olan ilişkidir. Uygulamalar açısından Langmuir ve Freundlich izotermeleri, adsorpsiyon izotermelerinin hesaplanabilmesi açısından en yaygın olarak kullanılan başlıca iki matematiksel modelledir.

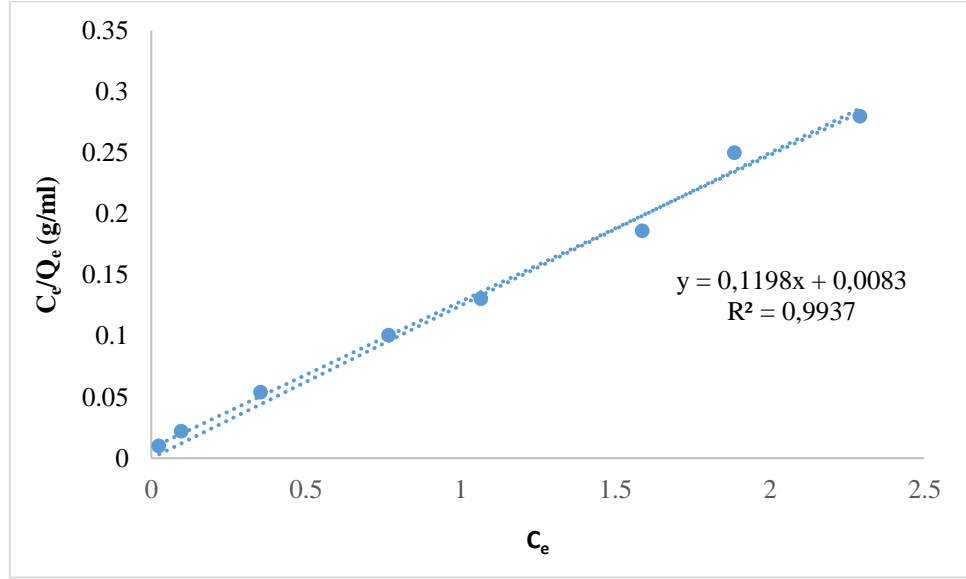
Langmuir izotermine göre, yüzeyde adsorplanan moleküllerin tek tabaka halinde adsorplandığı, yani yüzeyi homojen olduğu ve adsorplanan komşu moleküllerle olan etkileşimin ihmal edildiği için enerji dağılımının her noktada aynı olduğu kabul edilir. Langmuir izotermi aşağıdaki denklemlerle (Eşitlik 6.1) ifade edilir;

$$Q_e = \frac{q_m \times K_L \times c_e}{1 + K_L \times c_e} \quad (\text{Eşitlik 6.1})$$

Eşitlik 6.1'deki denkleme göre " $q_m$ ", adsorbentin maksimum adsorplama kapasitesi, Langmuir adsorpsiyon sabiti " $K_L$ " olarak tanımlanır. Eşitlik 6.1'in lineerleştirilmesi sonrasında aşağıdaki bağıntı (Eşitlik 6.2) elde edilmiştir.

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{1}{q_m \times K_L} + \frac{1}{q_m} \times c_e \quad (\text{Eşitlik 6.2})$$

Eşitlik 6.2'deki bağıntıya göre  $c_e'$ 'ye karşı  $\frac{c_e}{q_e}$  grafiğe geçirilmesi ile doğrunun eğiminden  $1/(q_m \times K_L)$  değerini, y ekseninin kesim noktası ise  $\frac{1}{q_m}$  değerini verir.



Şekil 6.15: poli(AAm-VIM) kriyojeli için lizozim adsorpsiyonu Langmuir izoterm modeli

Langmuir izoterm modelinde ayırma faktörü olarak bilinen denge parametresi  $R_L$  cinsinden Eşitlik 6.3'deki bağıntıyla hesaplanır.

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \times c_0} \quad (\text{Eşitlik 6.3})$$

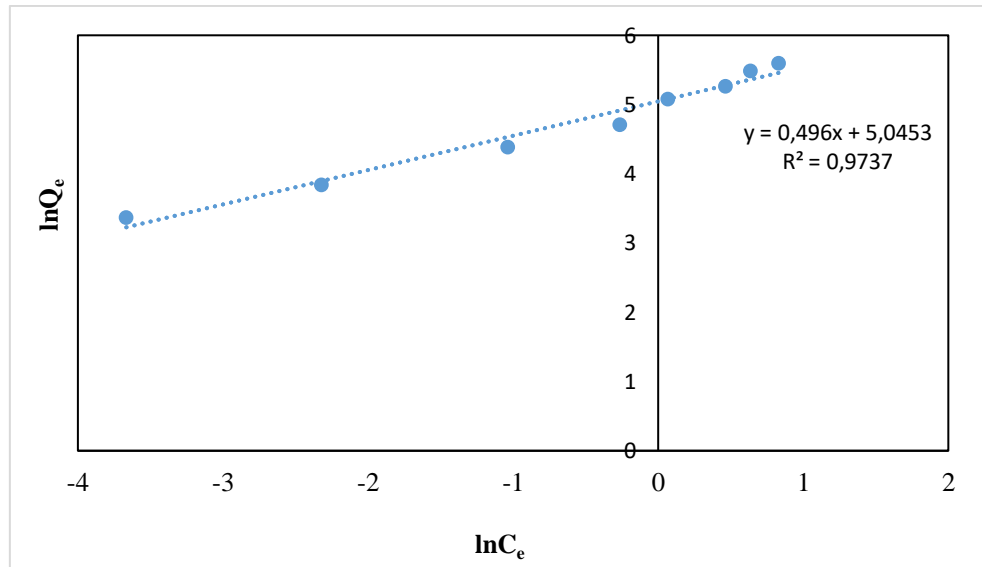
Eşitlik 6.3'e göre  $c_0$ , başlangıç lizozim derişimini (mg/mL) ve  $K_L$ , Langmuir adsorpsiyon denge sabitini (mL/mg) sembollendirir.  $R_L$  değerleri elverişsiz olarak kabul edilirse ( $R_L > 1$ ), eğer doğrusal ise ( $R_L = 1$ ), elverişli olarak kabul edilebileceği değer aralığı ( $0 < R_L < 1$ ) ve tersinmez ise ( $R_L = 0$ ) durumlara göre izoterm şeklini gösterir.

Freundlich izoterm modeli (Eşitlik 6.4), adsorpsiyonun çok tabakalı olduğunu kabul ederken. Langmuir modelinin aksine adsorbent yüzeyinin, adsorpsiyon alanları ve enerjisi bakımından aynı olmadığını, diğer bir deyişle heterojen olduğunu kabul eder.

$$Q_e = K_F \times C_e^{\left(\frac{1}{n}\right)} \quad (\text{Eşitlik 6.4})$$

Eşitlik 6.4'te “  $K_F$  ” adsorpsiyon kapasitesini ifade ederken,  $(1/n)$  ise Freundlich üssü olarak kabul edilir ve sistemin homojen olmayışının bir temsil eder.  $K_F$  değerinin artması, adsorpsiyon kapasitesinin artışı olarak tanımlanabilirken,  $(1/n)$  değerinin azalıyor olması ise adsorpsiyona karşı olan direncin azalması olarak değerlendirilir. Eşitlik 6.4'te bağıntıdaki eşitliğin her iki tarafının logaritmasının alınması ile Eşitlik 6.5'deki bağıntı elde edilir. Buradan,  $\ln C_e$ 'ye karşı  $\ln Q_e$  grafiğinin çizilmesiyle doğrunun eğiminden  $(1/n)$  değerini, doğrunun y eksenini kesim noktası ise  $\ln K_F$  değerini verir.

$$\ln Q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (\text{Eşitlik 6.5})$$



Şekil 6.16: poli(AAm-VIM) kriyojeli için lizozim adsorpsiyonu Freundlich izoterm modeli

Langmuir ve Freundlich izotermeleri sonuçlarını veren grafikler sırasıyla Şekil 6.15 ve Şekil 6.16'da gösterilmektedir. Regresyon değerleri karşılaştırıldığında adsorpsiyon modelinin Langmuir'e daha uygun olduğu anlaşılmaktadır ( $R^2; 0.9937 > 0.9737$ ).

**Tablo 6.2:** poli(AAm-VIM) kriyojeli için Langmuir ve Freundlich izotermi

| Deneysel |           | Langmuir |       |        | Freundlich |      |        |
|----------|-----------|----------|-------|--------|------------|------|--------|
| $Q_e$    | $Q_{max}$ | $K_L$    | $R_L$ | $R^2$  | $K_F$      | n    | $R^2$  |
| (mg/g)   | (mg/g)    | (ml/mg)  |       |        |            |      |        |
| 106.13   | 120.48    | 0.069    | 0.935 | 0.9937 | 154.47     | 2.02 | 0.9737 |

- $C_0 = 1$  mg/ ml değeri için

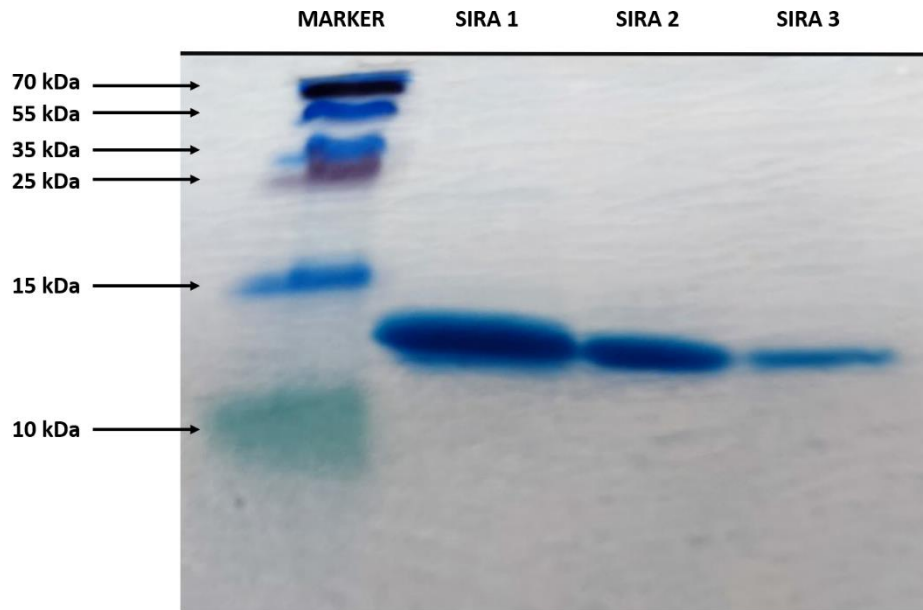
Tablo 6.2’de poli(AAm-VIM) kriyojeli için sulu çözeltiden lizozim adsorpsiyonundan elde edilen Langmuir ve Freundlich izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerlerini, deneysel olarak bulunan maksimum adsorpsiyon değeri ile karşılaştırdığımızda Langmuir izoterminden elde edilen değerin daha yakın bir değer olduğunu görmekteyiz. Bununla birlikte,  $R_L$  değeri, poli(AAm-VIM) kriyojeli vasıtasıyla lizozim adsorpsiyonunun "elverişli" gerçekleştiğini göstermektedir. Buradan çıkaracağımız sonuç, poli(AAm-VIM) kriyojeli lizozim adsorpsiyonu için elverişli bir adsorplayıcıdır.

#### 6.4.1 SDS-PAGE Analizi

Gözenekli jeller, ayrılmayı hızlandıran moleküler elek işlevi görmesi sebebi ile elektroforetik ayırmalarda kullanılmaktadır. Poliakrilamid temelli jeller, kimyasal açıdan kararlılıkları ve işleme başlanmadan çok kısa bir süre içerisinde çapraz bağlayıcı N’N-metilenbisakrilamid (MBA) varlığında hızlı şekilde jelleşme formuna girebildiği için elektroforez ile ayırma işlemlerinde taşıyıcı ortam olarak tercih edilmektedir. Proteinlerin denaturasyona uğradığı ortamda poliakrilamid jelde yürütülerek kütle farkı temeline dayandırılarak ayrılır. Bu amaç için sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi kullanılarak proteinler hem debantürasyona uğrar, hem de protein üzerinde biriken (-) yük vasıtasıyla elektroforetik ortamda yürütülmeye hazır hale gelir. Jelin gözenek büyüklüğüne bağlı olarak küçük molekül ağırlıklı moleküller daha hızlı hareket ederler. Molekülerin büyüklük ve boyut ilişkisine bağlı olarak ise SDS-PAGE görüntülemesi sayesinde proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlebildiği gibi, proteinlerin ve alt birimlerinin alt birimlerini jel üzerinde tek bant

oluşturacak şekilde ayırt edilebilmeleri de mümkündür. Böylece, saflaştırılmış proteinlerin saflık analizi hususunda fikir vermiş olur.

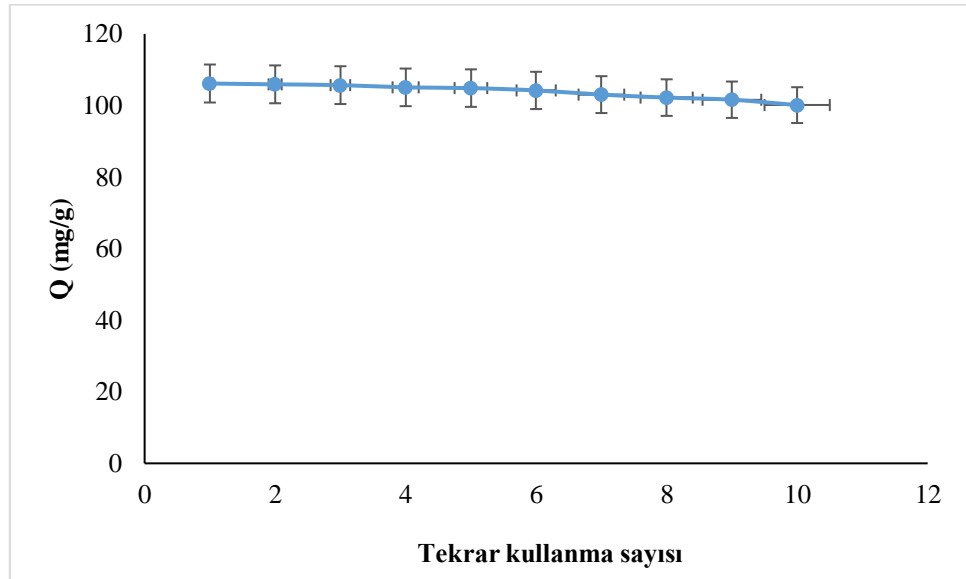
Bu çalışmada sulu çözeltilerden ayrılması adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilebilecek lizozim çözeltisini molekül ağırlığı yaklaşık 12 kDa olduğu için %20'lik akrilamid çözeltisi kullanılmıştır. Buna karşılık, lizozimin molekül kütlesi ile ilişkili olarak marker olarak tercih edilen işaretleyici referans molekül aralığı 10 ile 70 kDa aralığında olması uygun görüldü. Şekil: 6.15'den anlaşılacağı üzere Lizozim molekülüne ait bantların (Sıra 1), 10-15 kDa aralığında gözlenmiş olması bunu destekler niteliktedir. SDS-PAGE görüntüsündeki bantlar molekül büyüklüklerine göre bariz ve belirgin bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Sıra 1'de adsorpsiyon öncesi hazırlanmış lizozim çözeltisi (1 mg/ml), Sıra 2'de Adsorpsiyon sonrası denge halindeki lizozim çözeltisi ve Sıra 3'te ise desorbe edilmiş lizozim çözeltisi yer almaktadır. Bu sıra doğrultusunda lizozim molekülüne ait bantların büyüklüğünde belirgin ölçülerde azalma söz konusudur. Bu sonuç, poli(AAm-VIM) kolonunun sulu ortamdan lizozim çözeltisini başarıyla ayırt edebildiğini işaret etmektedir.



**Şekil 6.15:** Lizozim çözeltisinin poli(AAm-VIM) kriyojelleri ile adsorpsiyonunun öncesi ve sonrasında SDS-PAGE analizi: Marker (İşaretleyici referans): Ladders, Sıra 2. Adsorpsiyon öncesi lizozim çözeltisi (1 mg/ml), Sıra 3. Adsorpsiyon sonrası kalan lizozim çözeltisi, Sıra 3. Kolonda adsorbe edilen lizozim çözeltisinin desorbe edilmiş hali

#### 6.4.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Adsorbanların tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi, bunların farklı ölçeklerde ve farklı alanlarda kullanılmalarında fikir vermesi açısından önemli bir adımdır. Poli(AAm-VIM) kriyojellerinin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı polimer kullanılarak en az 10 kez tekrar edilmiştir. poli(AAm-VIM) kriyojellerinin tekrar kullanılabilirliğini gösteren adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü Şekil 6.16’da verilmiştir. poli(AAm-VIM) kriyojellerinin en az 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon çalışmasında, desorpsiyon oranı her defasında %90’ın üzerinde hesaplanmıştır. Öte yandan, poli(AAm-VIM) kriyojellerinin adsorplama kapasitelerinin hesaplanmasında kaydadeğer bir azalma gözlenmemiştir. Kriyojellerin birbiri ile iç içe geçmiş geniş yüzey alanına sahip ağ örgülü gözenekli yapıda olmaları adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün çok hızla gerçekleşmesine olanak sağlamıştır. Buna bağlı olarak adsorpsiyon süreci bir saatten daha kısa bir sürede dengeye ulaşmıştır.



Şekil 6.16: poli(AAm-VIM) kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği: c: 1.0 mg/ml, pH: 9.0, t: 2 saat, T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 0.5 M NaCl çözeltisi

## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu çalışma kapsamında N-Vinil imidazol ligandının afinite ligand olarak etkili olacağı hidrofobik etkileşim kromatografisi prensibiyle sulu çözeltilerden lizozim adsorpsiyonuna yönelik poli(AAm-VIM) kriyojeli sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.

Sentezlenme koşulu, çözücü olarak kullanılan suyun donma noktası altında kriyojelasyon yöntemi ile  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen kriyojeller, 24 saat süresince belirtilen sıcaklıkta bekletildikten sonra, oda sıcaklığına getirilerek gerçekleştirilen freze-thawing işlemi ardından buz kristallerinin erimesi sonrası makrogözenekli yapıya ulaşması hedeflenmiştir.

N-Vinil imidazol monomerinin tek başına kullanılması durumunda karşılaşılabilecek rijit bir polimerik yapıya karşılık, jelleşmenin daha etkili olabilmesi için akrilamit ve N-Vinil imidazol monomerleri birlikte kopolimerleştirilerek poli(AAm-VIM) kriyojeli elde edilmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında şişme testleri, FTIR, FESEM, elementel analiz, TGA ve DTA analizleri gerçekleştirildi. Sonuçların fiziksel karakteristiklerinin karşılaştırılabilir olması açısından VIM olmaksızın poli(AAm) kriyojelleri sentezlenmiştir.

Şişme testleri sonucunda sentezlenen poli(AAm-VIM) kriyojellerinin jelleşme verimleri, şişme derecesi-oranları, makrogözeneklilik, porozite ve gözenek hacmi gibi parametreler hesaplanabilmiştir.

FTIR analizi neticesinde kriyojellere ait fonksiyonel gruplar teyit edilmiştir.

FESEM analizleri neticesinde kriyojellerin yüzey morfolojisi ve gözenek yapısı hakkında karşılaştırma yapılabilme imkânı değerlendirilmiştir.

Kriyojellere ait sıcaklık arttıkça termal davranışlarının incelenmesi sonucunda elde edilen TGA diagramından poli(AAm-VIM) kriyojelinin, poli(AAm) kriyojelinden termal açıdan daha kararlı olduğu saptanmıştır. Son olarak ise DTA



diagramından, gerçekleştirilen analizlerin endotermik eğilimli olduğu gözlemlenmiştir.

Lizozim adsorpsiyonu sürekli sistemde incelenmiştir. Optimum koşulların belirlenmesinde ilk adım olarak çalışılacak en uygun pH'ı bulabilmek için gerçekleştirilen çalışmalarda pH 5.0-10.0 aralığında farklı tampon çözeltiler kullanılarak adsorpsiyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Buna göre, pH 9.0'da maksimum adsorpsiyon kapasitesi 46.65 mg/g ( $c_0$ : 0.5 mg/ml) olarak hesaplanmış ve adsorpsiyon çalışmaları pH 9.0'da devam etmiştir.

Optimum koşulların belirlenmesinde diğer parametreler olan başlangıç derişimi etkisi, iyonik şiddet, sıcaklık ve kolonun akış hızı gibi etkenlerde ayrı ayrı incelenmiştir. Bu sonuçların ardından adsorpsiyon izotermi incelendiğinde Langmuir izoterm modelinin, Freundlich izoterm modeline göre bu çalışmaya daha uyumlu olduğu hesaplanmıştır.

poli(AAm-VIM) kriyojellerinin lizozim saflaştırmasına yönelik uygulamasında en önemli aşamalardan bir tanesi SDS-PAGE analizi olmuştur. SDS-PAGE ile gerçekleştirilen elektroforetik ayrımlarda poli(AAm-VIM) kolonunun lizozimin sulu çözeltiden ayrılmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceği teyit edilmiştir.

Bu sonuçlar neticesinde poli(AAm-VIM) kriyojelinin başarıyla sentezlendiği ve optimizasyon koşullarının farklı parametreler ışığında belirlenmiştir. Elde edilen poli(AAm-VIM) kriyojellerinin kolon formunda kullanılarak Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE) şeklinde biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabileceği öngörülmüştür. Bununla beraber, tekrar kullanılabilirlik sonuçlarına dayanarak poli(AAm-VIM) kriyojel kolonların kromatografi cihazlarında uygulanabilirliği gelecek çalışmalar için bir motivasyon oluşturabilecektir.

## 8. KAYNAKLAR

- Abdou, A.M., Higashiguchi, S., Aboueleinin, A.M., Kim, M., Ibrahim, H.R., Antimicrobial Peptides Derived from Hen Egg Lysozyme with Inhibitory Effect against Bacillus Species, *Food Control*, 18, 173–178, 2007.
- Ahmed, E.M., Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review. *J. Adv. Res.*, 6, 105–121, 2015.
- Akerstrom, B., Bjorck, L. A Physicochemical Study of Protein G, a Molecule with Unique Immunoglobulin G-Binding Properties. *J. Biol. Chem.*, 261, 10240–10247, 1986.
- Annabi, N., Nichol, J.W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., Dehghani, F., Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. <https://home.liebertpub.com/teb>, 16, 371–383, 2010
- Aşır, S., Sarı, D., Derazshamshir, A., Yılmaz, F., Şarkaya, K., Denizli, A., Dopamine-Imprinted Monolithic Column for Capillary Electrochromatography. *Electrophoresis*, 38, 3003-3012, 2017.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L., Rollini, M., Antimicrobial Activity of Lysozyme and Lactoferrin Incorporated in Cellulose-Based Food Packaging., *Food Control*, 26, 387–392, 2012.
- Baudron, V., Gurikov, P., Smirnova, I., Whitehouse, S., Porous Starch Materials via Supercritical- and Freeze-Drying, *Gels* 5, 12, 2019.
- Behravesh, E., Timmer, M.D., Lemoine, J.J., Liebschner, M.A.K., Mikos, A.G., Evaluation of the in Vitro Degradation of Macroporous Hydrogels Using Gravimetry, Confined Compression Testing, and Microcomputed Tomography, doi:10.1021/BM020067, 2002.
- Bencherif SA, Sands RW, Ali OA, et al (2015) Injectable cryogel-based whole-cell cancer vaccines. *Nat Commun* 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms8556>
- Bencherif, S.A., Sands, R.W., Bhatta, D., Arany, P., Verbeke, C.S., Edwards, D.A., Mooney, D.J., Injectable Preformed Scaffolds with Shape-Memory Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, doi:10.1073/PNAS.1211516109/SUPPL\_FILE/SM04.MOV., 109, 19590–

19595, 2012.

- Bijelic, A., Molitor, C., Mauracher, S.G., Al-Oweini, R., Kortz, U., Rompel, A., Hen Egg-White Lysozyme Crystallisation: Protein Stacking and Structure Stability Enhanced by a Tellurium(VI)-Centred Polyoxotungstate, *ChemBioChem*, doi:10.1002/CBIC.201402597, 16, 233–241, 2015.
- Branen, J.K. and Davidson, P.M., Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin, *Int J Food Microbiol*, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00172-7), 90:63–74, 2004.
- Buwalda, S.J., Boere, K.W.M., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Vermonden, T., Hennink, W.E., Hydrogels in a Historical Perspective: From Simple Networks to Smart Materials. *J. Control. Release*, 190, 254–273, 2014.
- Callewaert, L. and Michiels C.W., Lysozymes in the animal kingdom, *J Biosci*, <https://doi.org/10.1007/S12038-010-0015-5>, 35, 127–160, 2010.
- Carvalho, B.M.A., Da Silva, S.L., Da Silva, L.H.M., Minim, V.P.R., Da Silva, M.C.H., Carvalho, L.M., Minim, L.A., Cryogel Poly(Acrylamide): Synthesis, Structure and Applications, *Sep. Purif. Rev.*, doi:10.1080/15422119.2013.795902, 43, 241–262, 2014.
- Cao, D., Wu, H., Li, Q., Sun, Y., Liu, T., Fei, J., Zhao, Y., Wu, S., Hu, X., Li, N., Expression of Recombinant Human Lysozyme in Egg Whites of Transgenic Hens. *PLoS One*, e0118626, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0118626, 10, 2015.
- Cappannella, E., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., Bavaro, T., Esti, M., Immobilized Lysozyme for the Continuous Lysis of Lactic Bacteria in Wine: Bench-Scale Fluidized-Bed Reactor Study, *Food Chem.*, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.089, 210, 49–55, 2016.
- Carrillo, W., Spindola, H., Ramos, M., Recio, I., Carvalho, J.E., Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Activities of Native and Modified Hen Egg White Lysozyme, doi:10.1089/JMF.2015.0141, 19, 978–982, 2016.
- Chen, Y., Huang, A., Zhang, Y., Bie, Z., Recent advances of boronate affinity materials in sample preparation, <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.04.050>, *Anal Chim Acta* 1076, 1–17, 2019.

- Chung, W. and Hancock, R.E.W., Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria, *Int J Food Microbiol*, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00330-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00330-5), 60, 25–32, 2000.
- Ciolacu, D., Rudaz, C., Vasilescu, M., Budtova, T., Physically and chemically cross-linked cellulose cryogels: Structure, properties and application for controlled release, *Carbohydr Polym.*, <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.084>, 151, 392–400, 2016.
- Clonis, Y.D., Labrou, N.E., Kotsira, V.P., Mazitsos, C., Melissis, S., Gogolas, G., Biomimetic Dyes as Affinity Chromatography Tools in Enzyme Purification. *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/S0021-9673(00)00577-X, 891, 33–44, 2000.
- Coskun, O., Separation techniques: Chromatography, North Clin Istanbul, <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>, 3, 156–60, 2016.
- Dainiak, M.B., Allan, I.U., Savina, I.N., Cornelio, L., James, E.S., James, S.L., Mikhailovsky, S. V., Jungvid, H., Galaev, I.Y., Gelatin–Fibrinogen Cryogel Dermal Matrices for Wound Repair: Preparation, Optimisation and in Vitro Study, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.09.029, *Biomaterials*, 31, 67–76, 2010.
- Darwish, A., Robie, T., Desch, R.J., Thiel, S.W., Competitive adsorption of lysozyme and myoglobin on mesostructured cellular foam silica, *Microporous Mesoporous Mater.*, <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2015.02.010>, 210, 101–109, 2015.
- De France K.J., Xu, F., Hoare, T., Structured Macroporous Hydrogels: Progress, Challenges, and Opportunities, *Adv Healthc Mater.*, <https://doi.org/10.1002/ADHM.201700927>, 7, 1700927, 2018.
- Dehghani, F. and Annabi, N., Engineering porous scaffolds using gas-based techniques, *Curr Opin Biotechnol.*, <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.04.005>, 22, 661–666, 2011.
- Ağlamaz, M. D., Şarkaya, K., Türkmen, D., Uçar, M., Denizli, A., Removal of amoxicillin via chromatographic monolithic columns: comparison between batch and continuous fixed bed, *Turkish J Chem.*, <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3520>, 47, 88–100, 2023.

- Çimen, D., Türkmen, D., Denizli, A., Poly-(L)-histidine immobilized cryogels for lysozyme purification, *Adsorpt Sci Technol.*, <https://doi.org/10.1177/0263617416664453>, 34, 469–487, 2016.
- Denizli, A. and Pişkin, E., Dye-ligand affinity systems. *J Biochem Biophys Methods*, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00209-3), 49, 391–416, 2001.
- Draghi, L., Resta, S., Pirozzolo, M.G., Tanzi, M.C., Microspheres leaching for scaffold porosity control. *J Mater Sci Mater Med.*, <https://doi.org/10.1007/S10856-005-4711-X/METRICS>, 16, 1093–1097, 2005.
- Duhamel, R.C., Schur, P.H., Brendel, K., Meezan, E., pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-Sepharose, *J Immunol Methods*, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(79\)90133-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(79)90133-9), 31, 211–217, 1979.
- Eggermont, L.J., Rogers, Z.J., Colombani, T., Memic, A., Bencherif, S.A., Injectable Cryogels for Biomedical Applications, *Trends Biotechnol.*, [doi:10.1016/J.TIBTECH.2019.09.008](https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2019.09.008), 38, 418–431, 2020.
- Feng, G., Hu, D., Yang, L., Cui, Y., Cui, X.A., Li, H., Immobilized-metal affinity chromatography adsorbent with paramagnetism and its application in purification of histidine-tagged proteins, *Sep Purif Technol.*, <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2010.06.013>, 74, 253–260, 2010.
- Fleming A, Alexander, F., On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character.*, <https://doi.org/10.1098/RSPB.1922.0023>, 93, 306–317, 1922.
- Gaberc-Porekar, V. and Menart, V., Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *J Biochem Biophys Methods*, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00207-X), 49, 335–360, 2001.
- Gong, J.P., Friction and lubrication of hydrogels—its richness and complexity, *Soft Matter*, <https://doi.org/10.1039/B603209P>, 2, 544–552, 2006.
- Gülich, S., Linhult, M., Ståhl, S., Hober, S., Engineering streptococcal protein G for increased alkaline stability, *Protein Eng Des Sel.*, <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/15.10.835>, 15, 835–842, 2002.
- Gun'ko, V.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S. V, Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation, *Adv Colloid Interface Sci.*,

- <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2012.11.001>, 187–188, 1–46, 2013.
- Hamdani, A.M., Wani, I.A., Bhat, N.A., Siddiqi, R.A., Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme, *Food Chem.*, <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.060>, 240, 1201–1209, 2018.
- Hemdan, E.S., Zhao, Y., Sulkowski, E., Porath, J., Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography, *Proc Natl Acad Sci.*, <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.6.1811>, 86, 1811–1815, 1989.
- Henderson TMA, Ladewig K, Haylock, D.N., McLean, K.M., O'Connor, A.J., Cryogels for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B.*, 1, 2682–2695, 2013.
- Hober, S. and Nord, K., and Linhult, M., Protein A chromatography for antibody purification, *J Chromatogr B.*, 848, 40–47, 2007. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2006.09.030>,
- Hughey, V.L. and Johnson, E.A., Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease, *Appl Environ Microbiol.*, <https://doi.org/10.1128/AEM.53.9.2165-2170.1987>, 53, 2165–2170, 1987.
- Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R., Recio, I., Ramos, M., Bioactive Egg Compounds, *Bioact. Egg Compd.*, doi:10.1007/978-3-540-37885-3/COVER, 1–298, 2007.
- Ibrahim, H. and Aoki, T., Pellegrini, A., Strategies for New Antimicrobial Proteins and Peptides: Lysozyme and Aprotinin as Model Molecules, *Curr Pharm Des.*, <https://doi.org/10.2174/1381612023395349>, 8, 671–693, 2005.
- Ibrahim, H.R., Yamada, M., Matsushita, K., Kobayashi, K., Kato, A., Enhanced Bactericidal Action of Lysozyme to Escherichia Coli by Inserting a Hydrophobic Pentapeptide into Its C Terminus, *J. Biol. Chem.*, doi:10.1016/S0021-9258(17)37654-8, 269, 5059–5063, 1994.
- Jia, Q., Ma, Y., Peng, Y., Liu, Y., Zhang, W., Selective Recognition and Separation of Luteolin Based on the Molecular Imprinted Hollow SnO<sub>2</sub> and Boronate Affinity, *Chem. Eng. J.*, doi:10.1016/J.CEJ.2018.02.103, 342, 293–303, 2018.
- Jiang, S., Qin, Y., Yang, J., Li, M., Xiong, L., Sun, Q., Enhanced Antibacterial Activity of Lysozyme Immobilized on Chitin Nanowhiskers, *Food Chem.*,

doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.10.143, 221, 1507–1513, 2017.

Jollès P. and Jollès, J., What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday, <https://doi.org/10.1007/BF00285225>/METRICS, Mol Cell Biochem 63, 165–189, 1984.

Jones, R.G., Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature, IUPAC Recommendations 2008, <https://doi.org/10.1515/CI.2009.31.4.32>, Chem Int -- Newsmag IUPAC 31, 32–33, 2009.

Jones, R.G., Wilks, E.S., Val, Metanowski, W., Kahovec, J., Hess, M., Stepto, R., Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature (IUPAC Recommendations 2008) “The Purple Book”, 2 Nd., 464, 2009.

Katsos, N.E., Labrou, N.E., Clonis, Y.D., Interaction of l-glutamate oxidase with triazine dyes: selection of ligands for affinity chromatography, J Chromatogr B., <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2004.04.032>, 807, 277–285, 2004.

Kip Ç, Gülüşür H., Çelik, E., Usta, D.D., Tuncel, A., Isolation of RNA and beta-NAD by phenylboronic acid functionalized, monodisperse-porous silica microspheres as sorbent in batch and microfluidic boronate affinity systems, Colloids Surfaces B Biointerfaces, <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.11.012>, 174, 333–342, 2019.

Kip C., Hamaloğlu, K.Ö., Demir, C., Tuncel, A., Recent trends in sorbents for bioaffinity chromatography, J Sep Sci., <https://doi.org/10.1002/JSSC.202001117>, 44, 1273–1291, 2021.

Kirby, A.J., The lysozyme mechanism sorted — after 50 years, Nat Struct Biol., <https://doi.org/10.1038/nsb0901-737>, 89, 737–739, 2001.

Kılıç, S., Andaç, M., Denizli, A., Binding modes of cibacron blue with albumin in affinity chromatography using docking tools, Int J Biol Macromol., <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.04.142>, 183, 110–118, 2021.

Kopeček, J., Polymer chemistry: Swell gels, Nature, 417, 388–391, 2002.

Kubiak-Ossowska, K., Cwieka, M., Kaczynska, A., Jachimska, B., Mulheran, P.A., Lysozyme Adsorption at a Silica Surface Using Simulation and Experiment: Effects of PH on Protein Layer Structure, Phys. Chem. Chem. Phys., doi:10.1039/C5CP03910J, 17, 24070–24077, 2015.

- Kumar, A., Mishra, R., Reinwald, Y., Bhat, S., Cryogels: Freezing unveiled by thawing, *Mater Today.*, [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70202-9](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70202-9), 13, 42–44, 2010.
- Kumar, M.N.V.R. and Kumar, N., Polymeric Controlled Drug-Delivery Systems: Perspective Issues and Opportunities, <http://dx.doi.org/101081/DDC-100000124>, 27, 1–30, 2001.
- Kumar, S., Dalvi, D.B., Moorthy, M., Korde, S.S., Fondekar, K.P., Sahasrabudhe, S.D., Schacht, H.T., Ekkundi, V.S., Halik, C., Choudhury, R., Discriminatory Protein Binding by a Library of 96 New Affinity Resins: A Novel Dye-Affinity Chromatography Tool-Kit, *J. Chromatogr. B*, 877, 3610–3618, doi:10.1016/J.JCHROMB.2009.08.045, 2009.
- Lee, W.C. and Lee, K.H., Applications of affinity chromatography in proteomics. *Anal Biochem.*, <https://doi.org/10.1016/J.AB.2003.08.031>, 324, 1–10, 2004.
- Leitner, A., Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography, *TrAC Trends Anal Chem.*, <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2009.08.007>, 29, 177–18, 2010.
- Li, R., Dowd, V., Stewart, D.J., Burton, S.J., Lowe, C.R., Design, Synthesis, and Application of a Protein A Mimetic, *Nat. Biotechnol.*, doi:10.1038/nbt0298-190, 16, 190–195, 1998.
- Li, Z., Rodriguez, E., Azaria, S., Pekarek, A., Hage, D.S., Affinity Monolith Chromatography: A Review of General Principles and Applications, *Electrophoresis*, doi:10.1002/ELPS.201700101, 38, 2837–2850, 2017.
- Liang-Schenkelberg, J., Fieg, G., Waluga, T., Molecular Insight into Affinity Interaction between Cibacron Blue and Proteins, *Ind Eng Chem Res.*, 56, 9691–9697, 2017. [https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.7B01556/ASSET/IMAGES/LARGE/IE-2017-01556Q\\_0004.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.7B01556/ASSET/IMAGES/LARGE/IE-2017-01556Q_0004.JPEG)
- Linhult, M., Gülich, S., Gräslund, T., Simon, A., Karlsson, M., Sjöberg, A., Nord, K., Hober, S., Improving the Tolerance of a Protein a Analogue to Repeated Alkaline Exposures Using a Bypass Mutagenesis Approach. *Proteins Struct. Funct., Bioinforma.*, doi:10.1002/PROT.10616, 55, 407–416, 2004.



- Liu, C., Yang, Y., Gao, H., Bai, X., Li, Z.J., Preparation and Enzymatic Activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-IDA-Ni/NAD Kinase Magnetic Catalyst. *Korean J. Chem. Eng.*, doi:10.1007/S11814-019-0472-Y/METRICS, 37, 475–481, 2020.
- Liu, S., Li, Z., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., Cong, H., Historical Perspective Recent Advances on Protein Separation and Purification Methods, doi:10.1016/j.cis.2020, 102254, 2020.
- Liu, W., Li, Y., Zeng, Y., Zhang, X., Wang, J., Xie, L., Li, X., Du, Y., Microcryogels as Injectable 3-D Cellular Microniches for Site-Directed and Augmented Cell Delivery, *Acta Biomater.*, doi:10.1016/J.ACTBIO.2013.12.008, 10, 1864–1875, 2014.
- Liu, Y., Munisso, M.C., Mahara, A., Kambe, Y., Yamaoka, T., Anti-Platelet Adhesion and in Situ Capture of Circulating Endothelial Progenitor Cells on EPTFE Surface Modified with Poly(2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine) (PMPC) and Hemocompatible Peptide 1 (HCP-1). *Colloids Surfaces B, Biointerfaces*, doi:10.1016/J.COLSURFB.2020.111113, 193, 111113, 2020.
- Lowe, C.R., Lowe, A.R., Gupta, G., New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals, *J Biochem Biophys Methods*, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00220-2](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00220-2) 49, 561–574, 2001.
- Lozinsky, V.I, Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, *Russ Chem Rev.*, 71, 489–511, 2002. <https://doi.org/10.1070/RC2002V071N06ABEH000720>
- Lozinsky, V.I., Damshkaln, L.G., Bloch, K.O., Vardi, P., Grinberg, N. V., Burova, T. V., Grinberg, V.Y., Cryostructuring of Polymer Systems. XXIX. Preparation and Characterization of Supermacroporous (Spongy) Agarose-Based Cryogels Used as Three-Dimensional Scaffolds for Culturing Insulin-Producing Cell Aggregates. *J. Appl. Polym. Sci.*, doi:10.1002/APP.27908, 108, 3046–3062, 2008.
- Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric Cryogels as Promising Materials of Biotechnological Interest, *Trends Biotechnol*, doi:10.1016/j.tibtech.2003.08.002, 21, 445–451, 2003.
- Lozinsky, V.I and Okay, O., Basic Principles of Cryotropic Gelation, *Adv Polym Sci.*,

- [https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_2), 263, 49–101, 2014.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E.G.R., Michiels, W.C., Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure, *Appl Environ Microbiol.*, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.339-344.2001>, 67, 339–344, 2001.
- Mattiasson, B., Cryogels for biotechnological applications, *Adv Polym Sci.*, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7\\_7/FIGURES/17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_7/FIGURES/17), 263, 245–281, 2014.
- Memic, A., Colombani, T., Eggermont, L.J., Rezaeeyazdi, M., Steingold, J., Rogers, Z.J., Navare, K.J., Mohammed, H.S., Bencherif, S.A., Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications, *Adv. Ther.*, [doi:10.1002/ADTP.201800114](https://doi.org/10.1002/ADTP.201800114), 2, 1800114, 2019.
- Mojarrad Moghanloo, G.M., Khatami, M., Javidanbardan, A., Hosseini, S.N., Enhancing recovery of recombinant hepatitis B surface antigen in lab-scale and large-scale anion-exchange chromatography by optimizing the conductivity of buffers, *Protein Expr Purif*, <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2017.08.011>, 141, 25–31, 2018.
- Nam, Y.S., Yoon, J., Park, G.A., Novel Fabrication Method of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds Using Gas Foaming Salt as a Porogen Additive, *https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(2000)*, 53, 1, 2000.
- Nepal, D. and Geckeler, K.E., pH-Sensitive Dispersion and Debundling of Single-Walled Carbon Nanotubes: Lysozyme as a Tool. *Small*, <https://doi.org/10.1002/SMLL.200500351>, 2, 406–412, 2006.
- Nishihara, H., Mukai, S.R., Yamashita, D., Tamon, H., Ordered macroporous silica by ice templating, *Chem Mater.*, 17, 683–689, 2005. <https://doi.org/10.1021/CM048725F/ASSET/IMAGES/LARGE/CM048725FF00008.JPEG>
- Odabaşı, M. and Denizli, A., Cibacron Blue F3GA-attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption, *Polym Int.*, <https://doi.org/10.1002/PI.1305>, 53, 332–338, 2004.
- Ogawa, H., Miyazaki, H., Kimura, M., Isolation and Characterization of Human Skin

- Lysozyme. *J Invest Dermatol.*, <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12349624>, 57, 111–116, 1971.
- Park, S.I., Daeschel, M.A., Zhao, Y., Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Composite Films, *J Food Sci.*, <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2004.TB09890.X>, 69, 215–221, 2004.
- Peng, W., Ding, F., Peng, Y.K., Jiang, Y.T., Zhang, L., Binding Patterns and Structure-Affinity Relationships of Food Azo Dyes with Lysozyme: A Multitechnique Approach, *J. Agric. Food Chem.*, doi:10.1021/JF4039327/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2013-039327\_0014.GIF, 61, 12415–12428, 2013.
- Perçin, I., Sener, G., Demirçelik, A.H., Bereli, N., Denizli, A., Comparison of Two Different Reactive Dye Immobilized Poly(Hydroxyethyl Methacrylate) Cryogel Discs for Purification of Lysozyme, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, doi:10.1007/S12010-014-1454-5/FIGURES/6, 175, 2795–2805, 2015.
- Pinkse, M.W.H., Uitto, P.M., Hilhorst, M.J., Ooms, B., Heck, A.J.R., Selective Isolation at the Femtomole Level of Phosphopeptides from Proteolytic Digests Using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and Titanium Oxide Precolumns, *Anal. Chem.*, doi:10.1021/AC0498617/ASSET/IMAGES/LARGE/AC0498617F00006.JPEG, 76, 3935–3943, 2004.
- Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergenståhl, B., Mattiasson, B., Macroporous Elastic Polyacrylamide Gels Prepared at Subzero Temperatures: Control of Porous Structure, *J. Mater. Chem.*, doi:10.1039/B606734D, 16, 4065–4073, 2006.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *J Sep Sci.*, <https://doi.org/10.1002/jssc.200700127>, 30, 1657–1671, 2007.
- Plieva, F.M., Kirsebom, H., Mattiasson, B., Preparation of macroporous cryostructured gel monoliths, their characterization and main applications, *J Sep Sci.*, <https://doi.org/10.1002/JSSC.201100199>, 34, 2164–2172, 2011.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing

- fluids and cell culture applications, *J. Sep. Sci.*, 30, 1657–1671, 2007.
- Qin, W., Chen, L., Wang, Z., Li, Q., Fan, C., Wu, M., Zhang, Y., Qin, W., Chen, L., Wang, Z., Bioinspired DNA Nanointerface with Anisotropic Aptamers for Accurate Capture of Circulating Tumor Cells, *Adv. Sci.*, doi:10.1002/ADVS.202000647, 7, 2000647, 2020.
- Qiu, W., Evans, C.A., Landels, A., Pham, T.K., Wright, P.C., Phosphopeptide Enrichment for Phosphoproteomic Analysis - A Tutorial and Review of Novel Materials, *Anal. Chim. Acta*, 1129, 158–180, 2020.
- Quan, L., Wei, D., Jiang, X., Liu, Y., Li, Z., Li, N., Li, K., Liu, F., Lai, L., Resurveying the Tris Buffer Solution: The Specific Interaction between Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane and Lysozyme, *Anal. Biochem.*, doi:10.1016/J.AB.2008.04.006, 378, 144–150, 2008.
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T., Cabral, J.M.S., Hydrophobic interaction chromatography of proteins, *J Biotechnol.*, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00237-1), 87, 143–159, 2001.
- Raina, D.B., Isaksson, H., Teotia, A.K., Lidgren, L., Tägil, M., Kumar, A., Biocomposite Macroporous Cryogels as Potential Carrier Scaffolds for Bone Active Agents Augmenting Bone Regeneration, *J. Control. Release*, doi:10.1016/J.JCONREL.2016.05.061, 235, 365–378, 2016.
- Razavi, M., Qiao, Y., Thakor, A.S., Three-dimensional cryogels for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 107, 2736–2755, 2019.
- Riguero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C., Wang, S.C., O'Connor, E., Immobilized Metal Affinity Chromatography Optimization for Poly-Histidine Tagged Proteins, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2020.461505, 1629, 461505, 2020.
- Roettger, B.F., Ladisch, M.R., Hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnol Adv.*, [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(89\)90901-4](https://doi.org/10.1016/0734-9750(89)90901-4), 7, 15–29, 1989.
- Salimi, K., Usta, D.D., Çelikbıçak, Ö., Pinar, A., Salih, B., Tuncel, A., Ti(IV) Carrying Polydopamine-Coated, Monodisperse-Porous SiO<sub>2</sub> Microspheres with Stable Magnetic Properties for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, doi:10.1016/J.COLSURFB.2017.02.028,

153, 280–290, 2017.

Sarada, N.C., Thamaraiselvi, K., Vijayalakshmi, M.A., Anti Zn antibodies: Cross reactivity and competitive binding with heavy metals, *J Chromatogr B*, 861, <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2007.08.035>, 236–239, 2008.

Şarkaya K, Aşir S, Göktürk I, et al (2020) Electrochromatographic separation of hydrophobic amino acid enantiomers by molecularly imprinted capillary columns. *Process Biochem* 92:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.033>

Saylan, Y. and Denizli, A., Supermacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications, <https://doi.org/10.3390/gels5020020>, *Gels*, 5, 20, 2019.

Shanmugaraj, K., Anandakumar, S., Ilanchelian, M., Probing the binding interaction of thionine with lysozyme: A spectroscopic and molecular docking investigation, *Dye Pigment*, <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2014.07.003>, 112, 210–219, 2015.

Shen, D., Yu, H., Wang, L., Khan, A., Haq, F., Chen, X., Huang, Q., Teng, L., Recent progress in design and preparation of glucose-responsive insulin delivery systems, *J Control Release*, <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.02.014>, 321, 236–258, 2020.

Shi, L., Khondee, S., Linz, T.H., Berkland, C., Poly(N-vinylformamide) Nanogels Capable of pH-Sensitive Protein Release, *Macromolecules*, 41, <https://doi.org/10.1021/MA800812Z>, 6546–6554, 2008.

Silveti, T., Morandi, S., Hintersteiner, M., Brasca, M., Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry, *Egg Innov Strateg Improv.*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00022-6>, 233–242, 2017.

Staal, G.E.J., Koster, J.F., Kamp, H., Van Milligen-Boersma, L., Veeger, C., Human Erythrocyte Pyruvate Kinase. Its Purification and Some Properties, *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol*, doi:10.1016/0005-2744(71)90170-7, 227, 86–96, 1971.

Sun, N., Wu, H., Shen, X., Magnetic titanium dioxide nanomaterial modified with hydrophilic dicarboxylic ligand for effective enrichment and separation of phosphopeptides and glycopeptides, *Microchim Acta*,

- <https://doi.org/10.1007/S00604-020-4161-7/FIGURES/4>, 187, 1–8.8, 2020.
- Tomaz, C.T., Hydrophobic interaction chromatography. *Liq Chromatogr Fundam Instrum Second Ed.*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00007-5>, 1, 171–190, 2017.
- Tripathi, A. and Kumar, A., Multi-Featured Macroporous Agarose–Alginate Cryogel: Synthesis and Characterization for Bioengineering Applications. *Macromol Biosci.*, <https://doi.org/10.1002/MABI.201000286>, 11, 22–35, 2011.
- Tüzmen, N., Kalburcu, T., Denizli, A.,  $\alpha$ -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization, *J Mol Catal B Enzym*, <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2012.01.017>, 78, 16–23, 2012.
- Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods. *Methods Enzymol*, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3), 463, 417–438, 2009.
- Uygun, D.A., Akduman, B., Uygun, M., Akgöl, S., Denizli, A., Purification of Papain Using Reactive Green 5 Attached Supermacroporous Monolithic Cryogel. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, doi:10.1007/S12010-012-9707-7/TABLES/2., 167, 552–563, 2012.
- Van Rie, J., Declercq, H., Van Hoorick, J., Dierick, M., Van Hoorebeke, L., Cornelissen, R., Thienpont, H., Dubruel, P., Van Vlierberghe, S., Cryogel-PCL Combination Scaffolds for Bone Tissue Repair, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, doi:10.1007/S10856-015-5465-8/FIGURES/6., 26, 1–7, 2015.
- Vançan, S., Miranda, E.A., Bueno, S.M.A., IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochem.*, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00242-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00242-4), 37, 573–579, 2002.
- Vergara-Barberán, M., Carrasco-Correa, E.J., Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Herrero-Martínez, J.M., Current Trends in Affinity-Based Monoliths in Microextraction Approaches: A Review., *Anal. Chim. Acta*, doi:10.1016/J.ACA.2019.07.020, 1084, 1–20, 2019.
- Veríssimo, L.A.A., Paganoto, F.S., Mol, P.C.G., Ilhéu Fontan, R. d. C., Minim, V.P.R., Minim, L.A., Preparation of an Affinity Cryogel Column for Lysozyme

- Purification. *Sep. Sci. Technol.*, doi:10.1080/01496395.2017.1318921, 52, 1973–1982, 2017.
- Vijayalakshmi, M.A., Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends Biotechnol.*, [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(89\)90067-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(89)90067-X), 7, 71–76, 1989.
- Vijayalakshmi, M.A., Histidine Ligand Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol.*, 6, 347–357, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF02761713/METRICS>
- Wang, C., Qian, L., Ji, L., Liu, S., Wahid, A., Jiang, X., Sohail, A., Ji, Y., Zhang, Y., Wang, P., Affinity Chromatography Assisted Comprehensive Phosphoproteomics Analysis of Human Saliva for Lung Cancer, *Anal. Chim. Acta*, doi:10.1016/J.ACA.2020.03.043, 1111, 103–113, 2020.
- Wang, J. and Yang, H., Superelastic and pH-Responsive Degradable Dendrimer Cryogels Prepared by Cryo-aza-Michael Addition Reaction, *Sci Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25456-y>, 81, 1–10. 2018.
- Wang, S., Ng, T.B., Chen, T., Lin, D., Wu, J., Rao, P., Ye, X., First Report of a Novel Plant Lysozyme with Both Antifungal and Antibacterial Activities, *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, doi:10.1016/J.BBRC.2004.12.077, 327, 820–827, 2005.
- Wang S, Urban MW (2020) Self-healing polymers. *Nat Rev Mater* 2020 58 5:562–583. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0202-4>
- Wang, X.M., Guo, Z.Y., Zhang, Y., Chen, M.L., Wang, J.H., ZrO<sub>2</sub> Doped Magnetic Mesoporous Polyimide for the Efficient Enrichment of Phosphopeptides. *Talanta*, doi:10.1016/J.TALANTA.2018.05.069, 188, 385–392, 2018.
- Wang, Z., Tan, X., Chen, D., Yue, Q., Song, Z., Study on the Binding Behavior of Lysozyme with Cephalosporin Analogues by Fluorescence Spectroscopy. *J. Fluoresc.*, doi:10.1007/S10895-009-0477-8/TABLES/5, 19, 801–808, 2009.
- Wang, Z.G., Lv, N., Bi, W.Z., Zhang, J.L., Ni, J.Z., Development of the Affinity Materials for Phosphorylated Proteins/Peptides Enrichment in Phosphoproteomics Analysis, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, doi:10.1021/ACSAMI.5B01254/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2015-, 7, 8377–8392, 2015. 012542\_0015.JPEG.

- Wegner, S., V., Schenk, F.C., Spatz, J.P., Cobalt(III)-Mediated Permanent and Stable Immobilization of Histidine-Tagged Proteins on NTA-Functionalized Surfaces, *Chem – A Eur. J.*, <https://doi.org/10.1002/CHEM.201504465>, 22, 3156–3162, 2016.
- Wright, A., Wait, R., Begum, S., Crossett, B., Nagy, J., Brown, K., Fairweather, N., Proteomic Analysis of Cell Surface Proteins from *Clostridium Difficile*, *Proteomics*, doi:10.1002/PMIC.200401179, 5, 2443–2452, 2005.
- Wu, D., Yan, J., Tang, P., Li, S., Xu, K., Li, H., Binding Properties and Structure–Affinity Relationships of Food Antioxidant Butylated Hydroxyanisole and Its Metabolites with Lysozyme, *Food Chem.*, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2015.05.013, 188, 370–376, 2015.
- Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Ye, X., Liu, D., Chen, J., What Is New in Lysozyme Research and Its Application in Food Industry? A Review, *Food Chem.*, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.017, 274, 698–709, 2019.
- Xue, Q.G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., Purification and Characterization of Lysozyme from Plasma of the Eastern Oyster (*Crassostrea Virginica*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, doi:10.1016/J.CBPC.2004.05.011, 139, 11–25, 2004.
- Yang, D., Wang, Q., Cao, R., Chen, L., Liu, Y., Cong, M., Wu, H., Li, F., Ji, C., Zhao, J., Molecular Characterization, Expression and Antimicrobial Activities of Two c-Type Lysozymes from Manila Clam *Venerupis Philippinarum*. *Dev. Comp. Immunol.*, doi:10.1016/J.DCI.2017.03.018, 73, 109–118, 2017.
- Yao, K., Shen, S., Yun, J., Wang, L., Chen, F., Yu, X., Protein Adsorption in Supermacroporous Cryogels with Embedded Nanoparticles, *Biochem. Eng. J.*, doi:10.1016/j.bej.2007.02.009, 36, 139–146, 2007.
- Yıldırım, D., Gökçal, B., Büber, E., Kip, Ç., Demir, M.C., Tuncel, A. A., New Nanozyme with Peroxidase-like Activity for Simultaneous Phosphoprotein Isolation and Detection Based on Metal Oxide Affinity Chromatography: Monodisperse-Porous Cerium Oxide Microspheres, *Chem. Eng. J.*, doi:10.1016/J.CEJ.2020.126357, 403, 126357, 2021.
- Zhang, M., He, X., Chen, L., Zhang, Y., Preparation of IDA-Cu functionalized core–satellite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polydopamine/Au magnetic nanocomposites and their



application for depletion of abundant protein in bovine blood, *J Mater Chem.*, <https://doi.org/10.1039/C0JM01336F>, 20, 10696–10704, 2010.

Zhang, Y., Zhou, Y., Li, W., Lyons, V., Johnson, A., Venable, A., Griswold, J., Pappas, D., Multiparameter Affinity Microchip for Early Sepsis Diagnosis Based on CD64 and CD69 Expression and Cell Capture, *Anal. Chem.*, [doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.7B05305](https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B05305)/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-05305X\_0007.JPEG, 90, 7204–7211, 2018.

Zhou, J., Liang, Y., He, X., Chen, L., Zhang, Y., Dual-Functionalized Magnetic Metal-Organic Framework for Highly Specific Enrichment of Phosphopeptides. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, [doi:10.1021/ACSSUSCHEMENG.7B02521](https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.7B02521)/ASSET/IMAGES/LARGE/SC-2017-02521R\_0008.JPEG, 5, 11413–11421, 2017.

Zhou, Y., Zhang, Y., Johnson, A., Venable, A., Griswold, J., Pappas, D., Detection of Culture-Negative Sepsis in Clinical Blood Samples Using a Microfluidic Assay for Combined CD64 and CD69 Cell Capture, *Anal. Chim. Acta*, [doi:10.1016/J.ACA.2019.02.039](https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.02.039), 1062, 110–117, 2019.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : RADWAN AHMED TARISH ABDULLAH

Doğum Yeri ve Tarihi : TAİZ / YEMEN – 18.06.1973

Lisans Üniversite : Taiz Üniversitesi

Elektronik posta : rabdullah21@posta.pau.edu.tr

İletişim Adresi : Aktepe mah. 2421 sok. C/8 Blok Kat 7/30

Pamukkale / DENİZLİ

**Yayın Listesi** :

**Konferans listesi** :