

# Cibacron Blue F3GA ile modifiye polimerik mikroküreler ile RuBisCO adsorpsiyonu

Bilgen OSMAN<sup>1,\*</sup>, Asuman CANSEV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bursa

<sup>2</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bursa

Geliş Tarihi (Received Date): 18.01.2021

Kabul Tarihi (Accepted Date): 09.03.2021

## Öz

Bu çalışmada, Cibacron Blue F3GA (CB) ile modifiye edilmiş poli(hidroketil metakrilat) [PHEMA] mikroküreler hazırlandı ve ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) adsorpsiyonunda kullanıldı. PHEMA mikroküreler süspanسیون polimerizasyonu tekniği ile sentezlendi ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edildi. CB ile kovalent olarak modifiye edilen CB-PHEMA mikroküreler RuBisCO adsorpsiyonunda kullanıldı. Adsorpsiyona CB içeriği, başlangıç RuBisCO derişimi (0,2-1.0 mg/mL), pH (5,5-9.0), sıcaklık (4°C, 22 °C ve 35°C) ve temas süresinin etkisi araştırıldı. CB-PHEMA mikrokürelerin CB içeriği elementel analiz ile belirlenen %N miktarı kullanılarak hesaplandı. CB-PHEMA mikrokürelere adsorplanan maksimum RuBisCO miktarı 33,59 mg/g olarak belirlendi (22 °C, pH 6,0). Üç farklı sıcaklıkta (4°C, 22 °C ve 35°C) elde edilen RuBisCO adsorpsiyon verilerinin izoterm ve kinetik modellere uygunluğu araştırıldı. RuBisCO adsorpsiyon verilerinin Freundlich izoterm modeli ve yalancı-ikinci derece kinetik modele uygun olduğu belirlendi. RuBisCO adsorpsiyonuna ilişkin Gibbs serbest enerji değişimi ( $\Delta G^\circ$ ) değerleri; 4 °C, 22 °C ve 35 °C sıcaklık için sırasıyla -9,22 kJ/mol, -10,44 kJ/mol ve -11,33 kJ/mol olarak hesaplandı. Entalpi değişimi ( $\Delta H^\circ$ ) +9,661 kJ/mol ve entropi değişimi ( $\Delta S^\circ$ ) +68,14 J/mol.K olarak belirlendi. Termodinamik parametreler, CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonunun endotermik ve kendiliğinden gerçekleşen bir proses olduğunu kanıtladı. CB-PHEMA mikrokürelerin ispanak protein ekstraktından RuBisCO adsorpsiyon performansı SDS-PAGE analizi ile değerlendirildi.

**Anahtar kelimeler:** RuBisCO, adsorpsiyon, Cibacron blue F3GA, bitki proteom analizi.

\* Bilgen OSMAN, bilgeno@uludag.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0001-8406-149X>

Asuman CANSEV, auslu@uludag.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0002-3353-846X>

## RuBisCO adsorption via polymeric microbeads modified with Cibacron Blue F3GA

### Abstract

*In this study, poly(hydroxyethyl methacrylate) [PHEMA] microbeads modified with Cibacron Blue F3GA (CB) were prepared and used for the adsorption of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO). PHEMA microbeads were synthesized by suspension polymerization and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Then, CB modified CB-PHEMA microbeads were used for RuBisCO adsorption. Effects of CB content, initial RuBisCO concentration (0.2-1.0 mg/mL), pH (5.5-9.0), temperature (4 °C, 22 °C and 35°C) and contact time were investigated. The CB amount of the CB-PHEMA microbeads was calculated via N% determined by elemental analysis. The maximum RuBisCO amount adsorbed onto the CB-PHEMA microbeads was determined as 33.59 mg/g (22 °C, pH 6.0). The RuBisCO adsorption data obtained at three different temperatures (4°C, 22 °C and 35°C) were applied to isotherm and kinetic models. Freundlich isotherm model and pseudo-second order kinetic model were well fitted to adsorption data with high correlation coefficients. Gibbs free energy changes ( $\Delta G^\circ$ ) of RuBisCO adsorption for 4 °C, 22 °C and 35 °C were calculated as -9.22 kJ/mol, -10.44 kJ/mol and -11.33 kJ/mol, respectively. Enthalpy change ( $\Delta H^\circ$ ) was +9.661 kJ/mol and entropy change ( $\Delta S^\circ$ ) was +68.14 J/mol.K. The calculated thermodynamic parameters showed that RuBisCO adsorption onto CB-PHEMA microbeads was endothermic and spontaneous. The RuBisCO adsorption performance of CB-PHEMA microbeads from spinach protein extract was evaluated by SDS-PAGE analysis.*

**Keywords:** RuBisCO, adsorption, Cibacron blue F3GA, plant proteomics.

### 1. Giriş

Proteom analizi; bitkilerdeki gelişimsel değişmelerin, biyotik ve abiyotik stresin etkilerinin, hormonların rolünün belirlenmesi gibi araştırmalarda farklılaşan proteinlerin tespitinde kullanılır. Günümüzde iki boyutlu (2D) jel elektroforezi bitkilerin kompleks proteomlarının analizinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir [1]. Bitkilerde proteom analizi; model bitki türleri, organeller ve stress fizyolojisi, üreme ve sinyal gibi bitki yaşam döngüsü ile ilgili spesifik olaylara ışık tutmaktadır. Ancak, 2D jel elektroforezi ile bitki proteinlerinin ayrılmasında ve protein spotlarının belirlenmesinde biyolojik örneklerde bulunan yüksek bolluklu proteinlerin interferans etki yaptığı rapor edilmektedir [2]. Proteom analizinde bitki dokuları ile insan dokuları karşılaştırıldığında bitki dokuları ile ilgili ilave problemlerin olduğu görülmektedir. İlk olarak, farklılaşmış bitki hücrelerinde büyük vakuoller ve rijid hücre duvarları nedeniyle çözünür protein miktarı düşüktür [3]. Ayrıca bitki hücreleri proteaz enzimlerince zengindir ve bu nedenle ekstraksiyon prosedürleri özel önlemler gerektirebilmektedir [4]. Polisakkaritler, lipidler, polifenoller ve ikincil metabolitler gibi bitkilere özgü hücresel bileşenler de proteinlerin ayrılmasında ve analizinde girişim etkisi yapmaktadır [5]. Bu alandaki temel zorluklar proteinlerin fizikokimyasal özelliklerindeki heterojenite ve protein derişimindeki farklılıklardır [6]. Kaynağa bağlı olarak, bitki proteomundaki dinamik aralık  $10^7$ - $10^{12}$  kadardır ve günümüzdeki proteomik platformlar ile sadece küçük

bir dinamik aralıktaki proteinler aynı anda analiz edilebilmektedir [7]. Bitki türüne bağlı olarak, toplam yaprak proteinlerinin yaklaşık % 30-60'ını oluşturan ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO), bitki proteom çalışmalarında tüm 2D jellerde en sık tanımlanan proteindir ve düşük bolluklu proteinlerin görüntülenmesini engellemektedir [8]. Yüksek bolluklu RuBisCO proteininin varlığı, 2D jelde yalnızca düşük bolluktaki proteinlerin dinamik çözünürlüğünü ve verimini sınırlamakla kalmayıp aynı zamanda komşu protein türlerinin elektroforetik göçünü de etkilemektedir. Bu nedenle proteom analizi öncesi RuBisCO'nun uzaklaştırılması, proteom analizinde düşük derişimli proteinlerin belirlenmesi açısından son derece önemlidir. RuBisCO proteininin varlığından kaynaklanan girişim etkisi ile ilgili problem bugüne kadar çok az sayıda araştırmacı tarafından ele alınmıştır. RuBisCO proteininin proteomdan uzaklaştırılması için birçok çalışmada sıklıkla PEG (polietilen glikol) ile çöktürme [9,10] ve RuBisCO proteinine özgü IgY anti-RuBisCO içeren afinite kolonların kullanılması gibi yaklaşımlardan yararlanılmaktadır [11]. IgY anti-RuBisCO içeren afinite kolonların avantajı kolonun RuBisCO proteini için seçiciliğinin yüksek olmasıdır. Fakat afinite kolonları maliyetlidir ve aynı zamanda IgY anti-RuBisCO biyolojik bir ligand olduğundan raf ömrü kısa, üretilmesi oldukça zor ve kararsızdır.

Boya ligandları farklı türdeki proteinlere, özellikle enzimlere bazı durumlarda oldukça spesifik bir şekilde bağlanabilmektedir. Ayrıca boya ligandları ticari olarak üretilmektedir, ucuzdur ve özellikle hidroksil grubu içeren adsorbanlara kolayca immobilize edilebilmektedir. Boya ligandları sentetik olmalarına karşın, birçok proteinin aktif bölgesi ile proteinin substratlarını, kofaktörlerini ya da bağlanma ajanlarını taklit ederek etkileştikleri için afinite ligandı olarak adlandırılırlar. Reaktif boyalar olarak adlandırılan çok sayıda tekstil boyası, boya ligand afinite sistemlerinde proteinlerin ayrılması için kullanılır. Reaktif boyaların büyük bir çoğunluğu genellikle mono- yada diklorotriazin halkasına bağlı bir kromofor (azo boyaları, antrakınon ya da fitalosiyanın) içerir [12]. Boya ligand afinite, reaktif boyaların proteinlere seçici ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanabilme özelliğine dayanır [12,13]. Cibacron Blue F3GA (CB) boya ligandı ilk kez Sefadex G-200 üzerine immobilize edilerek mayadan piruvat kinazın saflaştırılmasında kullanılmıştır [14]. Daha sonra bu yaklaşım, CB immobilize edilmiş farklı adsorbanların kullanılması ile çok sayıda proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır [15,16,17]. Birçok boya ligandının, özellikle de CB ve analoglarının bazı oksidoredüktazlar, fosfokinazlar ve ATPazlar ile etkileşimleri araştırılmıştır [18,19]. Elde edilen sonuçlar, boya yapısındaki antrakınon ve benzen sülfonat halkalarının enzimlere bağlanmada önemli olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar boyaların kinazlar ve dehidrojenazlar gibi nükleotid kofaktörleri kullanan enzim ve proteinlere daha seçici bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Ancak CB, insan serum albumin [20,21], lizozim [22] ve interferon [23] gibi dinükleotid bağlama bölgeleri olmayan proteinlere de yüksek bir afinite ile bağlanmaktadır. Boyaların proteinlere bağlanması elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ile ya da daha spesifik bir şekilde ligand bağlanma bölgeleri ile "psedoafinite" etkileşimleri aracılığı ile gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada, CB boyasının ligand olarak kullanıldığı bir afinite materyalinin bitkilerde yüksek bolluklu protein olduğu bilinen RuBisCO adsorpsiyonundaki etkinliği araştırıldı. Bu amaçla, ilk olarak poli(hidroksietil metakrilat) [PHEMA] mikroküreler sentezlendi. PHEMA mikroküreler CB boya ligandının kovalent olarak bağlanmasıyla modifiye edilerek CB-PHEMA mikroküreler hazırlandı. Hazırlanan CB-PHEMA mikroküreler ile sulu çözeltiden RuBisCO adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. RuBisCO adsorpsiyonuna boya ligand (CB) miktarı, pH, başlangıç RuBisCO derişimi, temas süresi ve sıcaklığın

etkisi araştırıldı. İzotermal, kinetik ve termodinamik analizler ile adsorpsiyon olayının fizikokimyasal doğası aydınlatıldı. Ayrıca, hazırlanan CB-PHEMA mikrokürelerin RuBisCO adsorpsiyonundaki tekrar kullanılabilirliği incelendi. Maksimum adsorpsiyonun gerçekleştiği koşullarda, CB-PHEMA mikrokürelerin ıspanaktan elde protein karışımından RuBisCO uzaklaştırma etkinliği sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile belirlendi.

## 2. Deneysel çalışmalar

### 2.1. Malzemeler

İspanak RuBisCO enzimi (EC 4.1.1.39) ve Cibacron Blue F3GA (CB) Sigma firmasından temin edildi (St. Louis, USA). Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) Fluka firmasından satın alındı. Azobisizobütironitril (AIBN) Merck firmasından temin edildi. Askorbik asit, aseton, gliserol, hidroklorik asit, izopropanol, polivinilpolipirrolidon (PVPP), fenilmetilsülfonil florür (PMSF),  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum tetraborat, triklorasetik asit (TCA), Trizma® baz, Trizma® hidroklorür ve Brilliant blue G Sigma firmasından temin edildi (St. Louis, USA). Protein boyası, sığır serum albumin (BSA), sodyum dodesil sülfat (SDS), akrilamid/bis-29:1, amonyum persülfat (APS), tetrametiletildiamin (TEMED), SDS-PAGE molekül ağırlığı standartları ve Tris/Glisin/SDS tamponu Bio-Rad firmasından satın alındı (California, USA). Deneysel kullanımlar için ultra saf su Elga Flex3 (Veloia Water Solutions & Technologies, France) saf su cihazı ile hazırlandı.

### 2.2. PHEMA mikrokürelerin sentezi ve karakterizasyonu

PHEMA mikroküreler süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlendi [22]. Dispersiyon fazı, 50 mL saf su içerisinde 0,2 g polivinilalkolün (PVA) çözünmesi ile hazırlandı. Organik fazın hazırlanması için; HEMA (4 mL) ve çapraz bağlayıcı EGDMA (4 mL), 8 mL toluen içerisinde çözüldü ve 0,1 g AIBN (başlatıcı) karışımın içerisine ilave edildi. Organik faz, sulu faz içerisinde dağıtılarak 400 rpm karıştırma hızında polimerizasyon reaktöründe karıştırıldı. Polimerizasyon karışımı reaktör içerisinde 65 °C 'de 4 saat ve 80 °C'de 2 saat süre ile polimerleştirildi. Elde edilen PHEMA mikroküreler, etil alkol ve saf su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen monomerler uzaklaştırıldı. Elde edilen mikroküreler vakum etüvünde 50 °C'de kurutuldu. Optik profilometre (Zeta Instruments) analizleri ile PHEMA mikrokürelerin düzgün küreler şeklinde olduğu tespit edildi. PHEMA mikroküreler 53-106  $\mu$ m çap aralığında elenerek daha sonraki çalışmalarda kullanıldı. Mikrokürelerin kimyasal yapı analizi için Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) ve morfolojik analizi için taramalı elektron mikroskopisi (SEM) (CARL ZEISS EVO 40) tekniği kullanıldı.

### 2.3. CB-PHEMA mikrokürelerin hazırlanması

4,0 g NaOH içeren 100 mL NaOH çözeltisine CB boya ligandı eklendi. Ardından 3,0 g PHEMA mikroküre çözeltiye ilave edilerek 80 °C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda 4 saat karıştırıldı [22]. CB boya ligandı ile modifiye edilen PHEMA mikroküreler santrifüjlenerek (5000 rpm, 15 dakika) ortamdaki suda ayrıldı ve etanol ve saf su ile yıkandı. Uygulanan yöntemde; CB derişimi 0,5-5,0 mg/mL aralığında değiştirilerek farklı CB içeriklerine sahip yedi farklı CB-PHEMA mikroküre hazırlandı. Hazırlanan CB-PHEMA mikroküreler 50 °C sıcaklıkta etüvde kurutuldu. CB-PHEMA mikrokürelerin %N içeriği elementel analiz ile belirlendi (Leco, CHNS-932, USA). %N miktarları

kullanılarak PHEMA mikrokürelere bağlanan CB miktarları mg CB/ g mikroküre olarak hesaplandı.

#### **2.4. RuBisCO adsorpsiyonuna CB miktarının etkisi**

Farklı CB içeriklerine sahip CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonu için kullanıldı. 0,05 g CB-PHEMA mikroküre, 3 mL 0,3 mg/mL RuBisCO çözeltisine (pH 8,0, 0,1 M fosfat tamponu) ilave edilerek 200 rpm karıştırma hızında oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. PHEMA mikrokürelere de aynı koşullar altında RuBisCO adsorpsiyonunda kullanıldı. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası RuBisCO çözeltilerindeki protein miktarı 280 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri ile UV spektrofotometre (Shimadzu, UV-1700) ile belirlendi. CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı Eşitlik (1) kullanılarak hesaplandı.

$$Q = \frac{[(C_0 - C)V]}{m} \quad (1)$$

Eşitlik (1)'de; Q mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı (mg RuBisCO/g mikroküre), C<sub>0</sub> ve C sırasıyla adsorpsiyon öncesi ve sonrası çözeltideki RuBisCO derişimi (mg/mL), V çözeltinin hacmi (mL) ve m mikroküre miktarıdır (g).

#### **2.5. pH etkisi**

RuBisCO adsorpsiyonuna pH etkisinin araştırılması için, pH 5,5 ile 9,0 aralığında 0,1M fosfat tamponları (PB) kullanılarak hazırlanan RuBisCO çözeltileri (3 mL, 0,15 mg/mL) 0,05 g CB-PHEMA mikroküre ile oda sıcaklığında 24 saat inkübe edildi (Karıştırma hızı: 200 rpm). Farklı pH değerlerine sahip RuBisCO çözeltilerinden adsorplanan RuBisCO miktarı Eşitlik (1) kullanılarak hesaplandı.

#### **2.6 Başlangıç RuBisCO derişiminin etkisi**

RuBisCO adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi 0,2 mg/mL-1,0 mg/mL RuBisCO derişim aralığında incelendi (pH 6,0). Bu amaçla, 0,05 g CB-PHEMA mikroküre 3 mL RuBisCO çözeltisi ile oda sıcaklığında 24 saat süre ile inkübe edildi. Adsorpsiyon çalışmaları üç farklı sıcaklıkta (4°C, 22 °C ve 35°C) gerçekleştirildi. PHEMA mikrokürelere ile RuBisCO adsorpsiyonu ise aynı RuBisCO derişim aralığında (0,2 mg/mL-1,0 mg/mL) 22 °C'de gerçekleştirildi. CB-PHEMA ve PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı Eşitlik (1) kullanılarak hesaplandı.

#### **2.7. Temas süresinin etkisi**

Temas süresinin adsorplanan RuBisCO miktarına etkisi üç farklı sıcaklıkta (4°C, 22 °C ve 35°C) araştırıldı. Bu amaçla; 30 mL RuBisCO çözeltisi (0,8 mg/mL, pH 6,0), 0,5 g CB-PHEMA mikroküre ile inkübe edildi. 24 saat süre ile belirli zaman aralıklarında RuBisCO çözeltisinden örnek alındı. Örneklerdeki RuBisCO derişimi spektrofotometrik olarak belirlenerek CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı hesaplandı.

#### **2.8. CB-PHEMA mikrokürelere tekrar kullanılabilirliği**

CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonundaki tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için RuBisCO adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsü 6 kez tekrarlandı. CB-PHEMA mikrokürelere (0,05 g), 3 mL 0,4 mg/mL RuBisCO çözeltisi (pH 6,0) ile 24 saat inkübe edildi. Adsorpsiyon sonrası CB-PHEMA mikrokürelere ortamdan ayrıldı ve 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,0) ile 3 kez yıkandı. Desorpsiyon 1 M etilen glikol çözeltisi (3

mL) kullanılarak gerçekleştirildi. Desorpsiyonun ardından mikroküreler fosfat tamponu (pH 6.0) ile yıkandı ve aynı koşullarda tekrar RuBisCO adsorpsiyonunda kullanıldı.

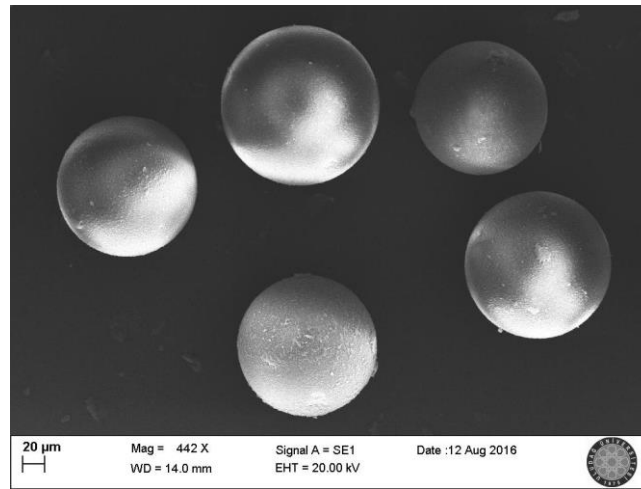
### 2.9. SDS-PAGE analizi

CB-PHEMA mikrokürelerin RuBisCO adsorpsiyonundaki etkinliği SDS-PAGE analizleri ile takip edildi. Bu amaçla; saf RuBisCO içeren çözeltiler ve ıspanak protein ekstraktı kullanıldı. Ispanak proteinlerinin ekstraksiyonu için uygulanan yöntemde; 1mM PMSF ve 1%  $\beta$ -merkaptoetanol (w/v) içeren borat tamponu (pH 6,0) ekstraksiyon tamponu olarak kullanıldı. Ispanak örneği, ekstraksiyon tamponu ve PVPP; 1:3:0,35 oranında karıştırıldı. Hazırlanan homojenat 90 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlendi (26.000 g, BeckmanCoulter, Allegra 64R). Süpernatant sırasıyla 0,45  $\mu$ m ve 0,22  $\mu$ m gözenek çapına sahip PVDF filtreden geçirildi. Taze hazırlanmış protein ekstraktı (3 mL, pH 6,0) ve saf RuBisCO çözeltisi (1 mg/mL, 3 mL, pH 6,0), 4 °C sıcaklıkta 24 saat süre ile CB-PHEMA mikroküreler ile inkübe edildi. Ardından mikroküreler santrifüjlenerek ortamdan ayrıldı (5000 g, 30 dakika). CB-PHEMA ve PHEMA mikrokürelerin saf RuBisCO çözeltilerinden ve/veya ıspanak protein ekstraktından RuBisCO adsorpsiyon etkinliği SDS-PAGE ile dikey jel sistemi (Biorad, Miniprotean 3 Cell, USA) kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla, adsorpsiyon öncesi ve sonrası saf RuBisCO çözeltilerinden ve ıspanak protein ekstraktından alınan protein örnekleri SDS-PAGE jellere yüklendi. Jele yüklenen örneklerdeki protein miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Elektroferez işleminin ardından jeldeki proteinler % 12 (v/v) TCA ile sabitlendi ve protein bantları Comassie Brilliant Blue G-250 boyama ile görüntüldü.

## 3. Sonuçlar ve tartışma

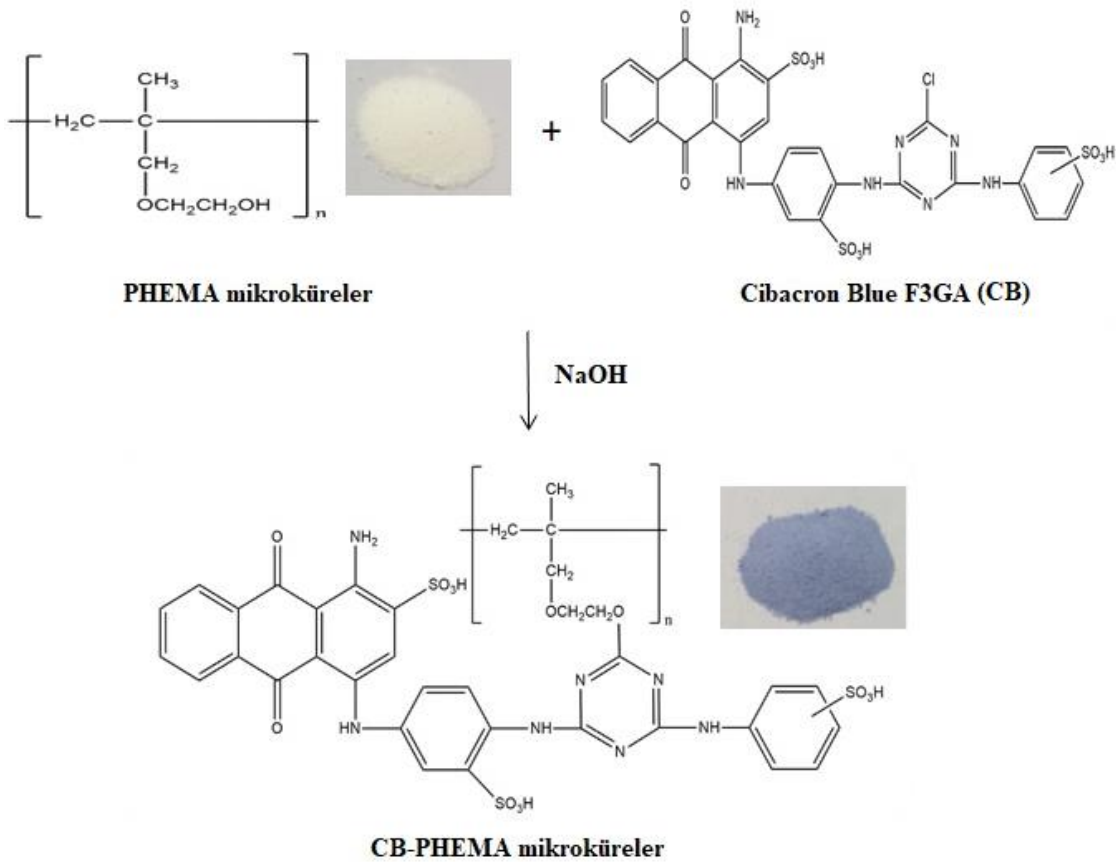
### 3.1. Mikrokürelerin kimyasal ve morfolojik özellikleri

PHEMA mikrokürelerin morfolojisi SEM ile karakterize edildi. Elde edilen SEM fotoğrafları uygulanan süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile küresel formda PHEMA mikrokürelerin başarıyla sentezlendiğini kanıtladı (Şekil 1). SEM analizleri PHEMA mikrokürelerin pürüzlü bir yüzeye sahip olduğunu gösterdi. Yüzey pürüzlüğü, yüzey alanını arttırdığı için adsorpsiyon kapasitesini olumlu yönde etkileyen bir parametredir.



Şekil 1. PHEMA mikrokürelerin SEM fotoğrafı.

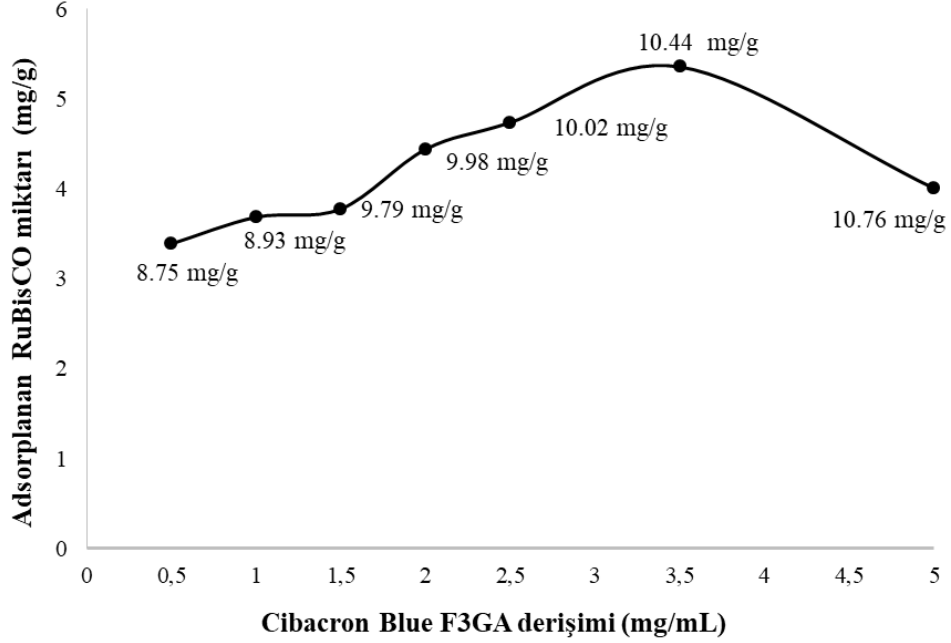
CB-PHEMA mikrokürelere, CB moleküllerinin PHEMA mikrokürelere kovalent olarak bağlanması ile hazırlandı (Şekil 2). CB-PHEMA ve PHEMA mikrokürelere kimyasal yapısı FTIR analizi ile belirlendi. PHEMA mikrokürelere ait FTIR spektrumunda; 1716  $\text{cm}^{-1}$  ve 1146  $\text{cm}^{-1}$  'de sırasıyla C=O ve C-O (ester) gerilme titreşimlerine ait absorpsiyon bandları gözlemlendi. 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  frekans aralığında gözlenen absorpsiyon bandı hidroksil gruplarına (-OH) aittir. CB-PHEMA mikrokürelere ait FTIR spektrumunda 1022  $\text{cm}^{-1}$  frekans değerinde ortaya çıkan absorpsiyon bandı, PHEMA mikrokürelere kovalent olarak bağlanan CB moleküllerindeki S=O simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklandı. Ayrıca, 849  $\text{cm}^{-1}$  and 897  $\text{cm}^{-1}$ 'de sırasıyla CB molekülünün primer ve sekonder amin gruplarına ait absorpsiyon bandları gözlemlendi. CB-PHEMA mikrokürelere ait FTIR spektrumunda gözlenen ve CB molekülünün varlığından kaynaklanan absorpsiyon bandları kovalent modifikasyonun başarıyla gerçekleştiğini kanıtladı.



Şekil 2. PHEMA mikrokürelere CB ile modifikasyonunun şematik gösterimi.

PHEMA mikrokürelere modifikasyonunda kullanılan CB çözeltisinin derişimi 0,5 ile 5,0 mg/mL aralığında değiştirilerek, değişen CB içeriklerine sahip yedi adet farklı CB-PHEMA mikroküre hazırlandı. Mikrokürelere CB içerikleri elementel analiz sonucu belirlenen % N miktarları kullanılarak hesaplandı ve CB-PHEMA mikrokürelere sulu çözeltiden RuBisCO adsorpsiyonunda kullanıldı. CB-PHEMA mikrokürelere CB içerikleri 8,75 mg CB/g mikroküre (0,5 mg/mL derişimde CB çözeltisi ile hazırlanan) ile 10,76 mg/g mikroküre (5,0 mg/mL derişimde CB çözeltisi ile hazırlanan) aralığında değiştirdi. Şekil 3'de CB içeriğinin CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyon kapasitesine etkisi gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre; CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı, artan CB içeriği ile arttı. Maksimum RuBisCO

adsorpsiyonu 3,5 mg/mL derişiminde CB kullanılarak hazırlanan (10,44 mg CB /g mikroküre) CB-PHEMA mikroküreler ile elde edildi. Daha yüksek CB içeriğine sahip CB-PHEMA mikroküreler (10,76 mg CB/g mikroküre) ile adsorplanan RuBisCO miktarı dikkate değer ölçüde azaldı. Bu sonuç; PHEMA mikrokürelerin yüzeyine immobilize edilen CB moleküllerinin miktarı arttıkça, CB moleküllerinin kendi aralarındaki etkileşimin de arttığını ve bu nedenle adsorplanan protein miktarının azalmış olabileceğini düşündürdü. RuBisCO adsorpsiyon çalışmaları için en yüksek RuBisCO adsorpsiyon kapasitesine sahip CB-PHEMA mikroküreler (10,44 mg CB / g polimer) kullanıldı.

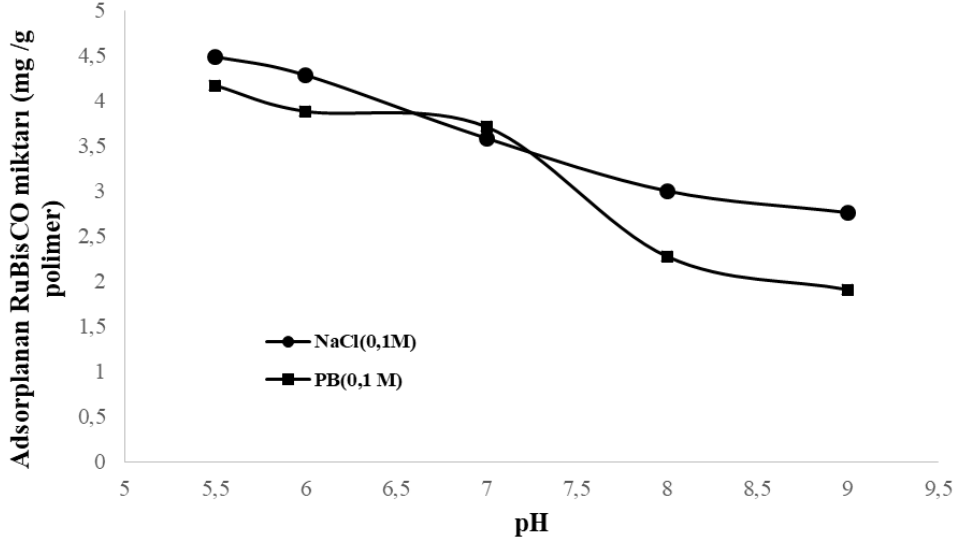


Şekil 3. CB içeriğinin CB-PHEMA mikroküreler üzerine RuBisCO adsorpsiyonuna etkisi (Başlangıç RuBisCO derişimi: 0,3 mg/mL; CB-PHEMA mikroküre miktarı: 0,05 g ; çözelti hacmi : 3 mL; pH: 8,0; sıcaklık : 22 °C; adsorpsiyon süresi : 24 saat).

### 3.2. Adsorpsiyon çalışmaları pH etkisi

Protein moleküllerinin ve/veya adsorbanın yükünü etkilediği için, ortamın pH değeri adsorpsiyon çalışmalarında önemli bir parametredir. RuBisCO proteini ve CB molekülü farklı pH değerlerinde farklı yükler taşımaktadır. Ortamın pH değerinin CB-PHEMA mikroküreler üzerine adsorplanan RuBisCO miktarına etkisi Şekil 4'te gösterildi. RuBisCO 5,5'ten daha küçük pH değerlerinde çözünür olmadığı için, adsorpsiyon çalışmaları fosfat tamponları (0,1 M) kullanılarak hazırlanan RuBisCO çözeltileri ile pH 5,5-9,0 aralığında gerçekleştirildi. Ayrıca RuBisCO çözeltilerine (pH 5,5-9,0) derişimi 0,1 M olacak şekilde NaCl eklenerek RuBisCO adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi araştırıldı.



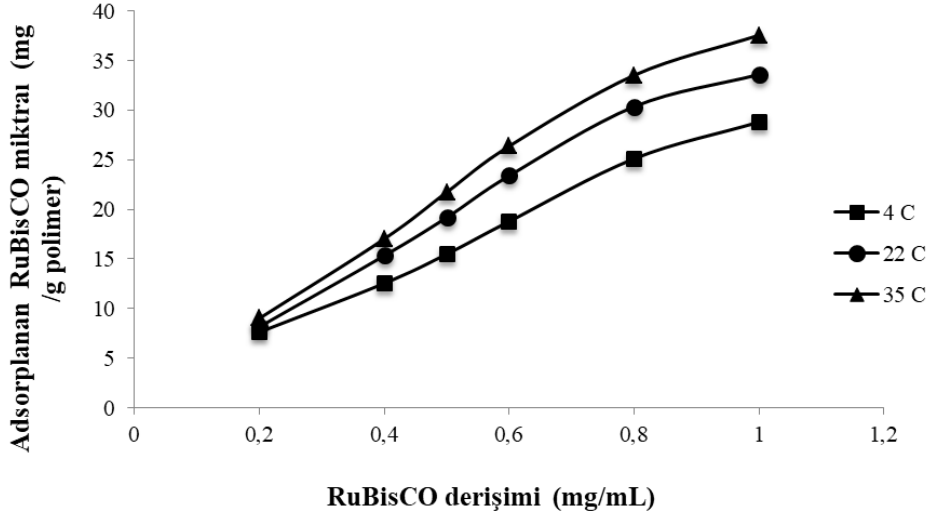


Şekil 4. pH değerinin CB-PHEMA mikrokürelere üzerine RuBisCO adsorpsiyonuna etkisi (Başlangıç RuBisCO derişimi: 0,15 mg/mL; CB-PHEMA mikroküre miktarı: 0,05 g ; çözeltili hacmi : 3 mL, sıcaklık : 22 °C, adsorpsiyon süresi : 24 saat).

Şekil 4'te görüldüğü gibi ortamın pH değeri arttıkça adsorplanan RuBisCO miktarı dikkate değer ölçüde azaldı. RuBisCO'nun izoelektrik noktası (pI) 5,5-6,0'dır [24] ve izoelektrik noktada RuBisCO proteininin net yükü sıfırdır. 6,0'dan büyük pH değerlerinde ise RuBisCO net bir negatif yüke sahiptir. CB molekülleri de yapısında yer alan sülfonat grupları nedeniyle negatif yüke sahiptir. Dolayısıyla, pH 5,5 ile 9,0 arasında negatif yük taşıyan CB ve RuBisCO arasında elektrostatik bir itme söz konusudur. Bu nedenle, pH arttıkça CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarının azaldığı düşünülmektedir. RuBisCO çözeltilerine NaCl ilave edilmesi ile tüm pH değerlerinde adsorplanan RuBisCO miktarında bir miktar artış gözlemlendi. Bu sonuç, Na<sup>+</sup> iyonlarının CB ve RuBisCO moleküllerinde bulunan negatif yüklü gruplara bağlanarak negatif yük yoğunluğunu azalttığını ve dolayısıyla elektrostatik itmenin azalması ile adsorplanan RuBisCO miktarının artmasına neden olduğunu düşündürdü. Bu koşullarda CB ve RuBisCO molekülleri arasında hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimlerinin daha etkin hale geleceği açıktır.

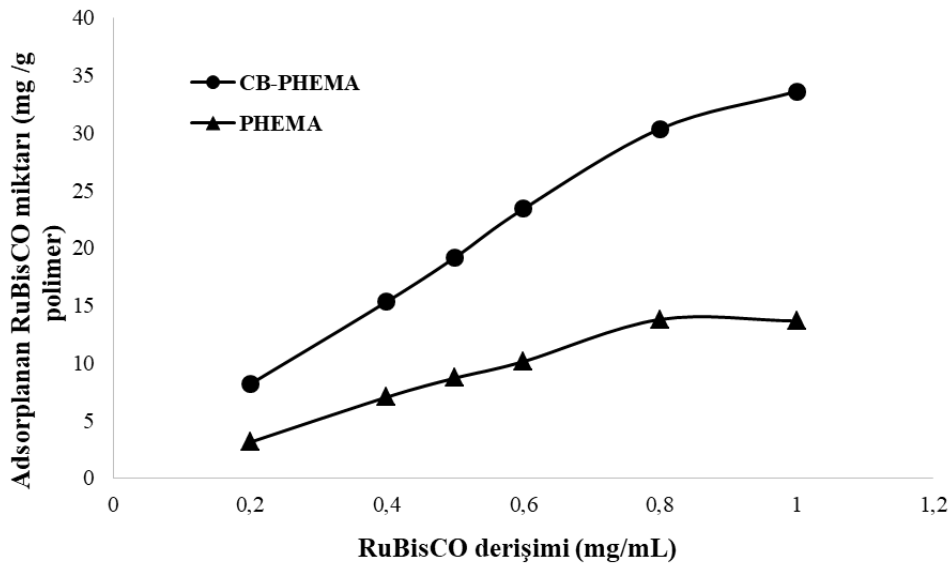
#### *Başlangıç RuBisCO derişiminin etkisi*

Başlangıç RuBisCO derişiminin CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonuna etkisi, 0,2 mg/mL-1,0 mg/mL RuBisCO derişim aralığında ve üç farklı sıcaklıkta (4°C, 22 °C ve 35 °C) incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 5'te verildi. Başlangıç RuBisCO derişiminin artmasıyla adsorplanan RuBisCO miktarı arttı. 1,0 mg/mL (pH 6,0) başlangıç RuBisCO derişiminde CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı, 4 °C, 22 °C ve 35 °C sıcaklıklarda sırasıyla 28,79 mg/g, 33,59 mg/g ve 37,54 mg/g olarak belirlendi.



Şekil 5. Başlangıç RuBisCO derişiminin CB-PHEMA mikrokürelere üzerine RuBisCO adsorpsiyonuna etkisi (CB-PHEMA mikroküre miktarı: 0,05 g ; çözelti hacmi :3 mL, pH: 6,0, adsorpsiyon süresi : 24 saat).

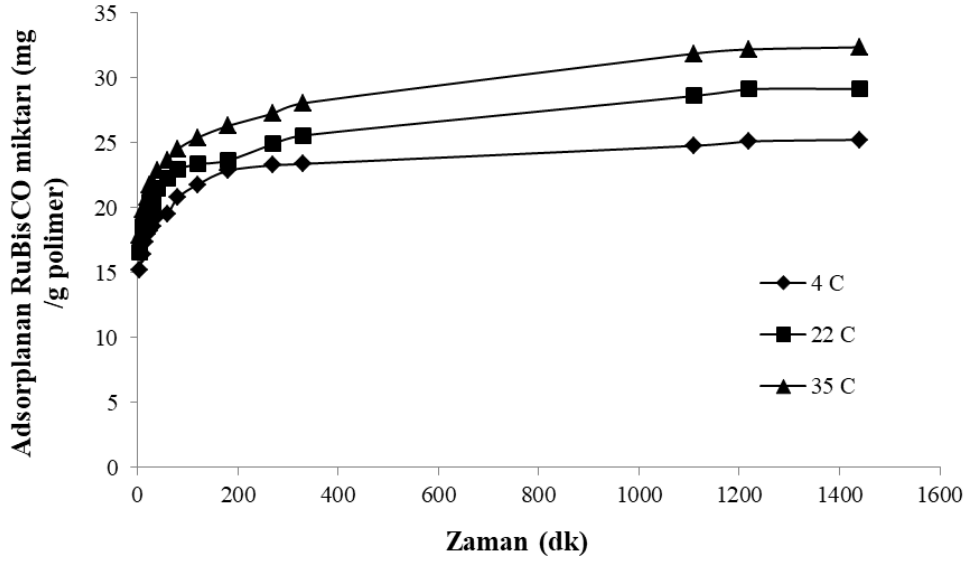
PHEMA mikrokürelere de aynı RuBisCO derişim aralığında (0,2 mg/mL-1,0 mg/mL) 22°C sıcaklıkta RuBisCO adsorpsiyonu için kullanıldı. PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı belirlenerek, 22°C sıcaklıkta CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı ile karşılaştırıldı (Şekil 6). 0,2 mg/mL ile 1,0 mg/mL derişim aralığında PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarı, tüm başlangıç derişimleri için CB-PHEMA mikrokürelere üzerine adsorplanan RuBisCO miktarından düşüktür. 22°C sıcaklıkta ve 1,0 mg/mL RuBisCO derişiminde adsorplanan RuBisCO miktarı, PHEMA ve CB-PHEMA mikrokürelere için sırasıyla 13,65 mg/g ve 33,59 mg/g olarak belirlendi. Bu sonuç, CB ile RuBisCO proteini arasında elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerin ortak etkisinden kaynaklanan spesifik bir etkileşim olduğunu açıkça kanıtladı.



Şekil 6. Başlangıç RuBisCO derişiminin PHEMA ve CB-PHEMA mikrokürelere üzerine RuBisCO adsorpsiyonuna etkisi (CB-PHEMA ve PHEMA mikroküre miktarı: 0,05 g ; çözelti hacmi :3 mL, pH: 6,0, sıcaklık: 22 °C; adsorpsiyon süresi : 24 saat).

*Temas süresinin etkisi*

Temas süresinin adsorplanan CB-PHEMA mikrokürelere adsorplanan RuBisCO miktarına etkisi üç farklı sıcaklıkta (4°C, 22 °C ve 35°C) araştırıldı. Adsorplanan RuBisCO miktarı yaklaşık 180 dakikada denge değerine ulaştı (Şekil 7). Bu sonuç adsorpsiyonun oldukça hızlı gerçekleştiğini gösterdi. Adsorplanan RuBisCO miktarı yükselen sıcaklık değeri ile arttı. Adsorplanan RuBisCO miktarı 4 °C, 22 °C ve 35 °C sıcaklık için sırasıyla 25,23 mg/g, 29,15 mg/g ve 32,35 mg/g olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonunun endotermik olduğunu gösterdi.



Şekil 7. Temas süresinin CB-PHEMA mikrokürelere üzerine RuBisCO adsorpsiyonuna etkisi (Başlangıç RubisCO derişimi: 0,8 mg/mL, CB-PHEMA mikroküre miktarı: 0,5 g ; çözelti hacmi :30 mL, pH: 6,0, adsorpsiyon süresi : 24 saat).

**3.3. İzotermal, kinetik ve termodinamik analizler**

Adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılmasında adsorpsiyon verilerinin kinetik ve izoterm modellere uygunluğunun araştırılması büyük bir öneme sahiptir. Kinetik, izoterm ve termodinamik parametrelerin belirlenmesi ile analit ve adsorban arasındaki etkileşimin kuvveti belirlenebilir. Ayrıca, entalpi değişimi ( $\Delta H^\circ$ ), entropi değişimi ( $\Delta S^\circ$ ), ve serbest enerji değişimi ( $\Delta G^\circ$ ) değerleri ile sırasıyla adsorpsiyon prosesinin doğası, adsorpsiyon sisteminin düzensizliği ve adsorpsiyonun kendiğinden gerçekleşebilirliği öngörülebilir. CB-PHEMA mikrokürelere üzerine RuBisCO adsorpsiyonu için üç farklı sıcaklıkta elde edilen adsorpsiyon verileri kullanılarak izotermal, kinetik ve termodinamik analizler yapıldı.

0,2 mg/mL ile 1,0 mg/mL RuBisCO derişim aralığında üç farklı sıcaklıkta (4 °C, 25 °C ve 35 °C) elde edilen adsorpsiyon verilerinin Langmuir, Freundlich ve Dubinin–Radushkevich (DR) izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı. Langmuir izoterm modeline göre; adsorpsiyon tek tabakalı, adsorban yüzeyi homojen ve adsorban yüzeyindeki bağlanma bölgeleri eş enerjilidir. Langmuir izoterminin doğrusal denklemi Eşitlik (2)'deki gibidir [25].

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_L K_L} + \frac{C_e}{Q_L} \quad (2)$$

Eşitlik (2)'de;  $C_e$  çözeltideki denge RuBisCO derişimini (mg/L);  $q_e$  denge anında adsorplanan RuBisCO miktarını (mg/g);  $Q_L$  yüzeydeki tek tabakalı adsorpsiyon için maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) ve  $K_L$  bağlanma bölgelerinin afinitesiyle ilgili Langmuir denge sabitini (L/mg) ifade etmektedir.

Freundlich izoterm modeli, heterojen bağlanma bölgeleri içeren adsorbanlarda adsorpsiyon prosesini açıklamak için kullanılmaktadır [26]. Freundlich izoterm modelinde bağlanma bölgeleri eş enerjili değildir. Ayrıca adsorbat molekülleri arasında etkileşim mümkündür. Freundlich izoterm modeli Eşitlik (3)'te verilen denklem ile ifade edilir.

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (3)$$

Eşitlik (3)'te;  $K_f$  Freundlich denge sabitini [(mg/g)(L/mg)<sup>1/n</sup>],  $C_e$  çözeltideki denge adsorbat derişimini (mg/L),  $q_e$  denge anında adsorplanan adsorbat miktarını (mg/g) ve  $n$  Freundlich sabitini (birimsiz) ifade etmektedir. Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri sıklıkla kullanılmasına rağmen adsorpsiyon mekanizmasını açıklayamaz. Dubinin-Radushkevich (DR) izoterm modeli adsorpsiyon serbest enerjisini hesaplamak için kullanılır. DR izoterm modeline ait denklem Eşitlik (4) 'teki gibidir [27].

$$\ln Q_e = \ln Q_{DR} - K_{DR} \mathcal{E}^2 \quad (4)$$

Eşitlik (4)'te;  $Q_e$  g mikroküre başına adsorplanan mg RuBisCO miktarını (mg/g),  $Q_{DR}$  maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g),  $K_{DR}$  DR sabitini (mol<sup>2</sup>/J<sup>2</sup>) ve  $\mathcal{E}$  ise Polanyi potansiyelini (J/mol) ifade etmektedir.

Polanyi potansiyeli Eşitlik (5) kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\mathcal{E} = RT \ln \left( 1 + \frac{1}{C_e} \right) \quad (5)$$

Eşitlik (5)'te;  $R$  gaz sabitini (J/mol K),  $T$  çözelti sıcaklığını (K),  $C_e$  ise çözeltideki denge RuBisCO derişimini (mg/L) ifade etmektedir.

Adsorpsiyon serbest enerjisi  $E_{fe}$  ise Eşitlik (6) yardımıyla hesaplanmaktadır.

$$E_{fe} = \frac{1}{\sqrt{-2K_{DR}}} \quad (6)$$

CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonu için belirlenen Langmuir ve Freundlich izoterm verileri Tablo 1'de özetlendi. 4°C, 22°C ve 35°C sıcaklıkta; Freundlich izoterm modeli için elde edilen korelasyon katsayıları, Langmuir izoterm modeli için elde edilen korelasyon katsayılarından daha yüksektir. Bu nedenle, CB-HEMA mikroküreler üzerine RuBisCO adsorpsiyonu Freundlich izoterm modeline uygundur. RuBisCO adsorpsiyonu heterojen bağlanma bölgelerinde çok tabakalı olarak gerçekleşmekte ve heterojen yüzey üzerinde adsorpsiyon ısısı ve ilgisi (afinitesi) eşit dağılmamaktadır. DR izoterminden hesaplanan  $E_{fe}$  değerleri, 4°C için 3,790 kJ/mol,

22°C için 3,750 kJ/mol ve 35°C için 3,900 kJ/mol'dür (Tablo 1).  $E_{fe}$  değerlerinin 8 kJ/mol'den küçük olması CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonunun fiziksel adsorpsiyon olduğunu gösterdi [28].

Tablo 1. CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonuna ait izoterm parametreleri.

Langmuir izoterm modeli			
Sıcaklık (K)	<b>277</b>	<b>295</b>	<b>308</b>
$Q_{deneyse}$ (mg/g)	28,79	33,59	37,54
$Q_L$ (mg/g)	57,8	83,3	208,3
$K_L$ (L/mg)	2,403	1,690	0,530
$R^2$	0,9308	0,8983	0,8034
Freundlich izoterm modeli			
Sıcaklık (K)	<b>277</b>	<b>295</b>	<b>308</b>
$K_F(mg/g)(L/mg)^{1/n}$	54,61	71,03	83,21
$n$	1,453	1,297	1,112
$R^2$	0,9949	0,9896	0,9975
DR izoterm modeli			
Sıcaklık (K)	<b>277</b>	<b>295</b>	<b>308</b>
$Q_{deneyse}(mg/g)$	28,79	33,59	37,54
$Q_{D-R}$ (mg/g)	34,63	43,80	49,20
$K_{D-R} \times 10^8 (mol^2/J^2)$	3,490	3,560	3,290
$E$ (kJ/mol)	3,790	3,750	3,900
$R^2$	0,9565	0,9707	0,9743

Kinetik çalışmalar 4 °C, 22 °C ve 35 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Sıcaklığın 4°C'den 35°C'ye yükselmesi ile CB-PHEMA mikrokürelere adsorplanan RuBisCO miktarının artması, adsorpsiyonun endotermik olduğunu gösterdi. 0,8 mg/mL başlangıç RuBisCO derişiminde üç farklı sıcaklıkta elde edilen adsorpsiyon verilerinin yalancı-birinci derece [29] ve yalancı-ikinci derece [30] kinetik modele uygunluğu araştırıldı. Kinetik modellere ait denklemler sırasıyla Eşitlik (7) ve Eşitlik (8)'deki gibidir.

$$\text{Yalancı birinci derece} \quad \log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (7)$$

$$\text{Yalancı ikinci derece} \quad \frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (8)$$

Eşitlik (7) ve Eşitlik (8)'de;  $k_1$  (1/dk) ve  $k_2$  ((g/mg)/dk) sırasıyla yalancı-birinci derece ve yalancı-ikinci derece adsorpsiyon hız sabitini,  $t$  zamanı (dk),  $q_e$  ve  $q_t$  ise sırasıyla dengede ve herhangi bir  $t$  (dk) anında adsorplanan RuBisCO miktarını (mg/g) ifade etmektedir. Eşitlik (7) ve Eşitlik (8) kullanılarak hesaplanan kinetik parametreler Tablo 2'de gösterildi. Yalancı-ikinci derece model için elde edilen korelasyon katsayısı değerlerinin daha büyük olması ( $\geq 0.9989$ ) ve deneysel olarak elde edilen  $q_e$  (deneysel) değerlerinin çalışılan tüm sıcaklıklarda hesaplanan  $q_e$  değerlerine yakın olması, RuBisCO adsorpsiyon prosesinin yalancı-ikinci derece kinetik modele uygun olduğunu gösterdi.

Tablo 2. CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonuna ait kinetik parametreler.

<b>Yalancı-birinci derece kinetik model</b>			
<b>Sıcaklık (K)</b>	<b>277</b>	<b>295</b>	<b>308</b>
$q_e$ deneysel (mg/g)	25,24	29,15	32,36
$q_e$ (mg/g)	7,948	9,867	11,860
$k_1$ (1/dk)	0,0053	0,0032	0,0035
$R^2$	0,9195	0,8771	0,9161
<b>Yalancı-ikinci derece kinetik model</b>			
<b>Sıcaklık (K)</b>	<b>277</b>	<b>286</b>	<b>298</b>
$q_e$ deneysel (mg/g)	25,24	29,15	32,36
$q_e$ (mg/g)	25,32	29,30	32,60
$k_2 \times 10^3$ ((g/mg)/dk)	2,91	1,67	1,37
$R^2$	0,9998	0,9999	0,9989

CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonuna ilişkin termodinamik parametreler; Gibbs serbest enerji değişimi ( $\Delta G^\circ$ ), entalpi değişimi ( $\Delta H^\circ$ ) ve entropi değişimi ( $\Delta S^\circ$ ) Van't Hoff eşitliği kullanılarak hesaplandı.

$$\ln K = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (9)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (10)$$

Gibbs serbest enerji değişimi ( $\Delta G^\circ$ ) değerleri; 4°C, 22°C ve 35 °C sıcaklık için sırasıyla -9,22 kJ/mol, -10,44 kJ/mol ve -11,33 kJ/mol olarak belirlendi. Negatif  $\Delta G^\circ$  değerleri CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyonunun kendiliğinden gerçekleştiğini gösterdi. Ayrıca,  $\Delta G^\circ$  değerlerinin artan sıcaklık ile azalması RuBisCO adsorpsiyonunun yüksek sıcaklıklarda daha istemli olduğunu kanıtladı. Entalpi değişimi ( $\Delta H^\circ$ ) +9,661 kJ/mol olarak hesaplandı ve RubisCO adsorpsiyonunun endotermik doğasını kanıtladı. Entropi değişimi ( $\Delta S^\circ$ ), +68,14 J/mol.K, RuBisCO adsorpsiyon prosesi sırasında sistemin düzensizliğinin arttığını gösterdi.

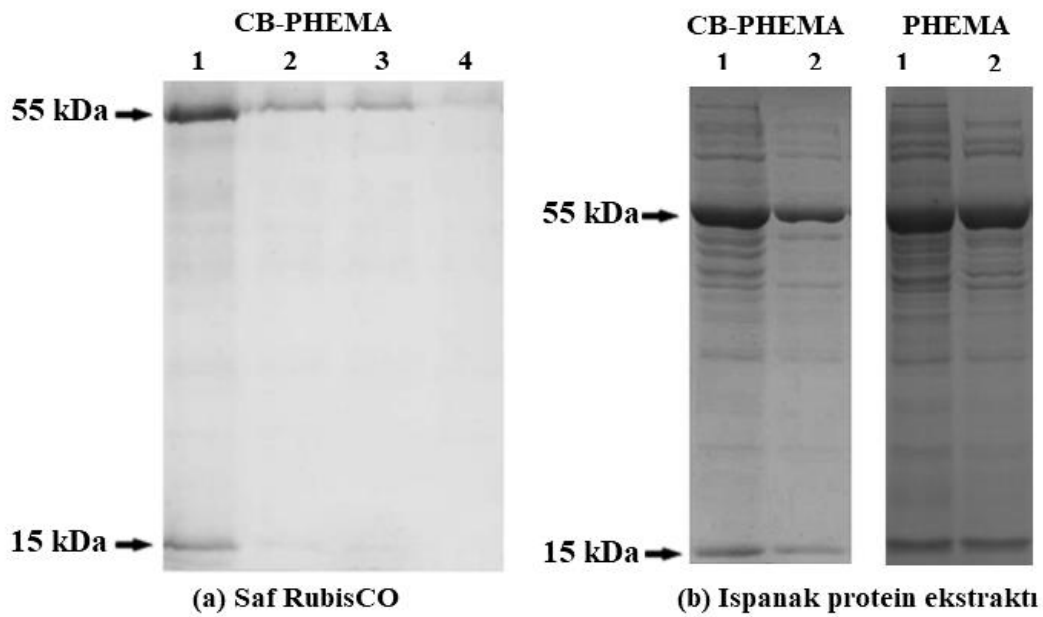
#### **3.4. CB-PHEMA mikrokürelerin tekrar kullanımı**

CB-PHEMA mikroküreler RuBisCO adsorpsiyonunda 6 kez tekrar kullanıldı. Tekrar kullanım sırasında; CB-PHEMA mikrokürelere adsorplanan RuBisCO miktarı sırasıyla 15,33; 15,28; 15,30; 15,32; 15,30 ve 15,29 mg/g olarak belirlendi. Desorpsiyon ajanı olarak 1M etilen glikol çözeltisi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre; CB-PHEMA mikrokürelere RuBisCO adsorpsiyon kapasitesinde belirgin bir azalma olmaksın tekrar tekrar kullanılabilir.

#### **3.5. Ispanak protein ekstraktından RuBisCO adsorpsiyonu**

CB-PHEMA mikroküreler ile RuBisCO adsorpsiyonu SDS-PAGE analizleri ile takip edildi. Bu amaçla; saf RuBisCO içeren çözeltiler (1 mg/mL, 3 mL, pH 6,0) ve ıspanak protein ekstraktı (3 mL, pH 6,0) mikroküreler (CB-PHEMA ve/veya PHEMA) ile muamele edildi. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası ortamdan alınan protein örnekleri SDS-

PAGE ile analiz edildi. Şekil 8 (a)'da; adsorpsiyon öncesi (1) ve adsorpsiyon sonrası (2,3,4) saf RuBisCO çözeltilerinden alınan protein örneklerinin SDS-PAGE analizi ile elde edilen protein bantları görülmektedir. Adsorpsiyon çalışmaları; 0,25 g , 0,5 g ve 1,0 g CB-PHEMA mikroküre kullanılarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE jelde 55 kDa ve 15 kDa molekül ağırlığında olmak üzere iki bant gözlemlendi. RuBisCO'nun bitki yapraklarındaki toplam çözümlü proteinlerin %50 sini oluşturduğu tahmin edilmektedir [31]. RuBisCO kloroplastların stromasında bulunur ve bitki türüne göre kloroplast proteinlerinin %15-50 sini oluşturur [32]. Yüksek bitkiler, algler ve siyanobakterilerde RuBisCO iki farklı alt birim sekiz adet kopyasından oluşur (Form I RuBisCO). Büyük alt birim 55 kDa ve küçük alt birim ise 15 kDa molekül ağırlığına sahiptir [33]. CB-PHEMA mikroküreler ile saf RuBisCO çözeltilerinden adsorpsiyon sonrasında protein bantlarının yoğunluğunun azaldığı ve bant yoğunluklarındaki azalışın, artan CB-PHEMA miktarı ile arttığı belirlendi.



Şekil 8. Saf RuBisCO çözeltilerine ve ıspanak protein ekstraktına ait SDS-PAGE jeller: (a) adsorpsiyon öncesi (1) ve 0,25 g (2) , 0,5 g (3) ve 1,0 g (4) CB-HEMA mikroküre ile adsorpsiyon sonrası RuBisCO çözeltilerinden alınan protein örneklerine (b) adsorpsiyon öncesi (1) ve 0,5 g (2) CB-HEMA/PHEMA mikroküre ile adsorpsiyon sonrası ıspanak protein ekstraktından alınan protein örneklerine aittir.

Ispanak protein ekstraktı ise; 0,5 g CB-PHEMA ve 0,5 g PHEMA mikroküre ile muamele edildi. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası ıspanak protein ekstraktı örnekleri SDS-PAGE jelde yürütüldü. Şekil 8 (b)'de adsorpsiyon öncesi (1) ve adsorpsiyon sonrası (2) protein ekstraktından alınan protein örneklerinin SDS-PAGE jel görüntüleri verildi. Adsorpsiyon öncesi ıspanak protein ekstraktına ait SDS-PAGE jeller incelendiğinde (Sıra 1); ekstrakt içerisinde farklı molekül ağırlığına sahip çok sayıda proteinin olduğu, ancak 55 kDa ve 15 kDa molekül ağırlığındaki protein bant yoğunluklarının RuBisCO varlığı nedeniyle oldukça yüksek olduğu görüldü. CB-PHEMA mikroküreler ile adsorpsiyon sonrasında (Sıra 2), 55 kDa ve 15 kDa molekül ağırlığındaki bant yoğunluklarının dikkate değer ölçüde azaldığı, ancak PHEMA mikroküreler ile muamele edilen protein örneklerine (adsorpsiyon sonrası) ait SDS-PAGE jelde (Sıra 2); aynı molekül ağırlıklarındaki protein bant yoğunluklarında belirgin bir azalmanın

olmadığı tespit edildi. Bu sonuç, CB molekülleri ile RuBisCO arasında spesifik bir etkileşim olduğunu açık bir şekilde kanıtladı. Hayvansal ve bitkisel hücrelerde biyobelirteç olarak kullanılan reseptör ve/veya sinyal/düzenleyici proteinler genellikle nispeten düşük bollukta bulunmakta ve bu proteinler yüksek bollukta bulunan proteinler tarafından maskelenmektedir [10, 34, 35]. Bitki proteom çalışmalarında, fotosentetik bitki dokularında biyobelirteç olarak kullanılacak fonksiyonel proteinlerin saptanmasında RuBisCO çok önemli bir sınırlayıcı proteindir [10]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, fotosentetik bitki dokularında yüksek bollukta bulunan RuBisCO proteininin uzaklaştırılmasında kullanılacak alternatif bir yöntemin geliştirilebilmesi için ümit vadetmektedir. Öte yandan, CB-PHEMA ile muamale edilmiş ıspanak proteinlerinin yürütüldüğü jelde, adsorpsiyon öncesi gözlemlenen çok sayıda farklı proteinin bandının da yoğunluklarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, CB-PHEMA mikrokürelerin RuBisCO yanında başka proteinleride adsorplamasından kaynaklanmaktadır. İmmunafinite tekniğinde de; ligand olarak kullanılan antikorların yüksek seçiciliklerine rağmen, hedef protein yanında çok sayıda protein immün afinite kolonlarına adsorplanmaktadır. İnsan albümin antikorları içeren immunafinite kolon kullanılarak insan plazmasından albumin uzaklaştırıldığında, albumin ile birlikte 32 adet farklı proteinin kolona adsorplandığı belirlenmiştir [36]. Aynı çalışmada, CB boya ligandı içeren ticari bir kolon ile insan plazmasından albumin uzaklaştırılmış ve albumin ile birlikte 60 adet farklı proteinin kolona adsorplandığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda; CB-PHEMA mikroküreler ile RuBisCO adsorpsiyonu sırasında ıspanak protein ekstraktından RuBisCO ile birlikte adsorplanan proteinlerin, 2D jel elektroforezi ve LC/MS/MS çalışmaları ile belirlenmesi uygun olacaktır.

## Kaynaklar

- [1] Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H.P., Rossingnol, M., Plant proteome analysis, **Proteomics**, 4, 285-298, (2004).
- [2] Rabilloud, T., Solubilization of proteins for electrophoretic analyses, **Electrophoresis**, 17,813–829. 1996.
- [3] Rose, J.K., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., Saravanan, R.S., Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools **Plant Journal**, 39,715–733, (2004).
- [4] des Francs, C.C., Thiellement, H., de Vienne, D., Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis: protease action as exemplified by Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase degradation and procedure to avoid proteolysis during extraction, **Plant Physiology**, 78,178–182, (1985).
- [5] Gegenheimer, P., Preparation of extracts from plants, **Methods in Enzymology**, 182,174–193, (1990).
- [6] Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Sanchez, J.C., Bairoch, A., Hochstrasser, D.F. Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: The effects of protein hydrophobicity and copy number, **Electrophoresis**, 19,1501– 1505, (1998).
- [7] Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research, **Electrophoresis**, 21,1104–1115, (2000).
- [8] Freeby, S, Berkelman, T, Paulus, A, Liu, N, Wehr, T, Academia, K, Walker, J. 2D-analysis of leaf protein samples treated with proteomimer beads under denaturing and non-denaturing conditions. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6441.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6441.pdf) (12.01.2021)



- [9] Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y.S., Kang, K.Y., Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays, **Electrophoresis**, 22, 2103–2109, (2001).
- [10] Xi, J.H., Wang, X., Li, S.Y., Zhou, X., Yue, L., Fan, J., Hao, D.Y., Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome, **Phytochemistry**, 67, 2341–2348, (2006).
- [11] Cellar, N.A., Kuppannan, K., Langhorst, M.L., Ni, W., Xu, P., Young, S.A., Cross species applicability of abundant protein depletion columns for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 861, 29–39, (2008).
- [12] Denizli, A., and Piskin, E., Dye-ligand affinity systems, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 49, 391–416, (2001).
- [13] Stellwagen, E., Chromatography on immobilised reactive dyes, **Methods in Enzymology**, 182, 343–357, (1990).
- [14] Roschlau, P., Hess, B., Affinity chromatography of yeast pyruvate kinase with Cibacron blue bound to Sephadex G-200, **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, 353, 441–443, (1972).
- [15] Lowe, C.R., Gald, M., Larsson, P.O., Ohlson, S., Small, D.A.P., Atkinson, T., High performance liquid affinity chromatography of proteins on Cibacron Blue F3GA bonded silica, **Journal of Chromatography**, 215-303, (1981).
- [16] Lowe, C.R., Hans, M., Spibey, N., Drabble, W.T., The purification of inosine-5-monophosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* by affinity chromatography on immobilized Procion dyes, **Analytical Biochemistry**, 104, 23–28, (1980).
- [17] Dean, P.D.G., Watson, D.H., Protein purification using immobilised triazine dyes, **Journal of Chromatography**, 165: 310–319, (1969).
- [18] Bollin, E., Vastola, K., Olezszak, P., Sulkowski, E., The interaction of mammalian interferons with immobilized Cibacron Blue F3GA: modulation of binding strength, **Preparative Biochemistry**, 8, 259–264, (1978).
- [19] Biellman, J.F., Samma, J.P., Branden, C.I., Eklund H., X-ray studies of the binding of Cibacron Blue F3GA to liver alcohol dehydrogenase, **European Journal of Biochemistry**, 102-107, (1979).
- [20] Travis, J., Pannell, R., Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography, **Clinica Chimica Acta**, 49, 49-52, (1973).
- [21] Travis, J., Brown, J., Tewksbury, D., Johnson, D., Pannell, R., Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma, **Biochemical Journal**, 157, 301-306, (1976).
- [22] Odabaşı, M., Denizli, A., Cibacron Blue F3GA incorporated magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for lysozyme adsorption, **Journal of Applied Polymer Science**, 93, 719–725, (2004).
- [23] Jankowski, W.J., Ansen, W.H., Sulkowski, E., Carter, W.A., Binding of human interferons to immobilized Cibacron Blue F3GA: The nature of molecular interaction. **Biochemistry**, 15, 5182-5187, (1976).
- [24] Nynäs, A.L., White proteins from green leaves in food applications. A literature study. Alnarp: Sveriges lantbruksuniversitet. (Introductory paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science, (2018).
- [25] Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part 1. Solids, **Journal of the American Chemical Society**, 38, 2221 – 2295, (1916).

- [26] Freundlich, H.M.F., Over the Adsorption in Solution, **Journal of Physical Chemistry**, 57, 385–471, (1906).
- [27] Dubinin, M.M., Radushkevich, L.V., The equation of the characteristic curve of activated charcoal, **Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR. Physical Chemistry Section**, 55,331–337, (1947).
- [28] Unlü, N., Ersoz M., Adsorption characteristics of heavy metal ions onto a low cost biopolymer sorbent from aqueous solutions, **Journal of Hazardous Materials**, 136, 272–280, (2006).
- [29] Lagergren, S., Zur theorie der sogenannten Adsorption gel oster stoffe, Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens, **Handlingar**, 25,4, 1–39, (1898).
- [30] Ho, Y.S., McKay, G., Pseudo-second-order model for sorption processes, **Process Biochemistry**, 34, 451–465, (1999).
- [31] Ellis, R.J., Most abundant protein in the World, **Trends in Biochemical Sciences**, 4, 241-244, (1979).
- [32] Vapaavuori, E.M., Correlation of activity and amount of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase with chloroplast stroma crystals in water-stressed willow leaves, **Journal of Experimental Botany**, 37, 174, 189-198, (1986).
- [33] Maeda, N., Kitano, K., Fukui, T., Ezaki, S., Atomi, H., Miki, K., Tadayuki Imanaka, T., Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus kodakaraensis* kod1 is composed solely of large subunits and forms a pentagonal structure, **Journal of Molecular Biology**, 293, 57-66, (1999).
- [34] Yang, H., Wang, G., Zhang, T., Beattie, J.H., Zhou S. Establishing an optimized method for the separation of low and high abundance blood plasma proteins. **Analytical Chemistry at Peer Journal**. DOI: 10.7717/peerj-achem.6, (2020).
- [35] Gupta R. High abundance proteins: Proteomer’s thorns in the flesh? **Journal of Proteomics & Bioinformatics**. 10, 7, 1000e35,(2017).
- [36] Zolotarjova, N., Nicol, G., Martosella, J., Yang, L-S., Zhang, K., Boyes, B., Evaluation of serum albumin depletion methods for proteomic analysis, **HPLC**, Nice, France, (2003).