

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**LİPAZ ENZİMİNİN TANINMASINA YÖNELİK MOLEKÜLER
DAMGALI HİDROJEL HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Tuğba ÇELEBİ

**Danışman
Doç. Dr. Ayşe DİNÇER**



MANİSA-2019

TEZ ONAYI

Tuğba ÇELEBİ tarafından hazırlanan "**LİPAZ ENZİMİNİN TANINMASINA YÖNELİK MOLEKÜLER DAMGALI HİDROJEL HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**" adlı tez çalışması 01/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Doç. Dr. Ayşe Dinçer**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Tülin AYDEMİR**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU**
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Tuğba ÇELEBİ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	I
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Lipaz.....	4
2.1.1. Lipazın Yapısı.....	5
2.1.2. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar.....	7
2.1.3. Lipaz Türleri.....	8
2.1.4. Lipazların Uygulama Alanları.....	8
2.2. Hidrojeller.....	10
2.2.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	11
2.2.2. Hidrojellerin Kullanım Alanları.....	12
2.3. Moleküler Damgalama Yöntemi.....	12
2.3.1. Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri.....	14
2.4. Elektroforez Yöntemi.....	17
2.4.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi.....	18
2.5. Tezin Amacı.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.2. Yöntemler.....	23
3.2.1. Protein Tayini.....	23
3.2.2. p-Nitrofenol Standart Eğrisinin Oluşturulması.....	24
3.2.3. Lipaz Aktivite Tayini.....	25
3.2.4. Lipaz Damgalı ve Damgasız Hidrojellerin Hazırlanması.....	26
3.2.5. Kalıp Molekülün Hidrojelden Uzaklaştırılması.....	28
3.2.6. Protein Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu.....	29
3.2.7. Lipazın MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu.....	30
3.2.7.1. Sürenin Etkisi.....	30
3.2.7.2. pH Etkisi.....	30
3.2.7.3. Sıcaklık Etkisi.....	30
3.2.7.4. Lipaz Konsantrasyonunun Etkisi.....	31
3.2.8. Adsorpsiyon İzotermleri.....	31
3.2.9. Adsorpsiyon Kinetiği.....	31
3.2.10. Adsorpsiyon Termodinamiği.....	32
3.2.11. MIP ve NIP Hidrojellerin Seçimliliğinin İncelenmesi.....	32
3.2.12. Şişme Karakterizasyonu.....	32
3.2.13. Tekrar Kullanılabilirlik Testi.....	33
3.2.14. Spektroskopik Karakterizasyon.....	33
3.2.14.1. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FTIR)...	33
3.2.14.2. Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM).....	33
3.2.15. Farklı Pankreatik Enzimleri İçeren Tabletten Lipaz Enziminin Seçimli Olarak Ayrılması.....	34

3.2.15.1. Örneklerin Hazırlanması	34
3.2.15.2. SDS-PAGE Elektroferez Uygulaması	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39
4.1. Protein ve Aktivite Standart Grafikleri	39
4.1.1. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması	39
4.1.2. p-Nitrofenol Standart Eğrisinin Oluşturulması.....	39
4.2. Farklı Monomerlerle Hazırlanan Hidrojellerin Lipaz Geri Bağlama Etkinliğinin Karşılaştırılması	40
4.3. Spektroskopik Karakterizasyon	44
4.3.1. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FTIR)	44
4.3.1.1. Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM).....	50
4.4. AAm Monomeri ile Hazırlanmış MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine Lipazın Geri Bağlanmasında pH ve Sıcaklığın Etkisi	52
4.4.1. pH Etkisi	52
4.4.2. Sıcaklığın Etkisi	53
4.5. AAm, AAm-1-VI, AAm-MA Monomerleri ile Hazırlanmış MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine Lipazın Geri Bağlanmasında Süre ve Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	54
4.5.1. Sürenin Etkisi.....	54
4.5.2. Lipaz Konsantrasyonunun Etkisi	56
4.6. Adsorpsiyon İzotermi	59
4.6.1. Langmuir İzotermi	59
4.6.2. Freundlich İzotermi.....	62
4.7. Adsorpsiyon Kinetiği	66
4.7.1. Yalancı Birinci Mertebe Kinetiği	67
4.7.2. Yalancı İkinci Mertebe Kinetiği	69
4.7.3. Parçacık İçi Difüzyon Etkisi	70
4.8. Adsorpsiyon Termodinamiği	75
4.9. Lipaz Damgalı ve Damgasız Hidrojelin Seçimliliğinin İncelenmesi	77
4.10. Şişme Karakterizasyonu	78
4.11. Tekrar Kullanılabilirlik Testi	79
4.12. Pankreatik Enzim Tabletinden Lipaz Enziminin Seçimli Olarak Ayrılması	80
4.13. SDS-PAGE Jel Elektrofrez ile Lipaz Bağlama Spesifikliğinin Belirlenmesi	82
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAm	Akrilamid
APS	Amonyum Persülfat
BSA	Sığır serum albümin
DMAEMA	2-dimetil aminoetilmetakrilat
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
KBr	Potasyum Bromür
MA	Metil Akriyat
MAA	Metakrilik asit
MBA	Metilen-bis-akrilamid
MIP	Moleküler Damgalı Polimer
MIT	Moleküler Damgalama Teknolojisi
mg	Miligram
mL	Mililitre
NIP	Damgasız Polimer
p-NP	p-Nitrofenol
p-NPP	p-Nitrofenil palmitat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiamin
UV	Ultraviyole
1-VI	1-Vinil imidazol
4-VP	4-Vinil piridin
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Yağların hidroliz reaksiyonu	4
Şekil 2.2. Doğal α/β hidrolaz katlanması	5
Şekil 2.3. Lipazın üç boyutlu yapısı	6
Şekil 2.4. Lipaz reaksiyonlarının şematik olarak gösterilişi.....	7
Şekil 2.5. Hidrojel ağ yapısının şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.6. Moleküler Damgalı Polimerlerin Hazırlanması	13
Şekil 2.7. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) a) Elektroforez işleminin görünüşü, b) Protein karışımının jeldeki hareketi.	20
Şekil 3.1. Bradford yöntemi ile protein tayini çalışması	24
Şekil 3.2. Farklı monomerler kullanılarak hazırlanan hidrojeller	26
Şekil 3.3. Hidrojel hazırlanmasında kullanılan fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcının yapısı.....	28
Şekil 3.4. Yıkanmış ve yıkanmamış hidrojeller a) Yıkanmış MIP ve NIP hidrojeller, b) Kurutulmuş MIP ve NIP hidrojeller	29
Şekil 3.5. Tez çalışmasında kullanılan elektroforez düzeneği.....	36
Şekil 3.6. Poliakrilamid jelde protein örneklerinin yürütülme işlemi	38
Şekil 4.1. Protein standart grafiği	39
Şekil 4.2. p-Nitrofenol Standart Grafiği	40
Şekil 4.3. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları a) Yıkanmamış MIP, b) Yıkanmış MIP, c) NIP Hidrojel	45
Şekil 4.4. AAm-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları a) Yıkanmamış MIP, b) Yıkanmış MIP, c) NIP Hidrojel	47
Şekil 4.5. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları a) Yıkanmamış MIP, b) Yıkanmış MIP, c) NIP Hidrojel	49
Şekil 4.6. Yıkanmamış MIP hidrojel a) 100x b) 20000x, yıkanmış MIP Hidrojel c) 100x d) 30000x, e) yıkanmamış NIP 20000x, f) yıkanmış NIP 20000x büyütme sonrası görüntüleri (<i>AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller</i>)	51
Şekil 4.7. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin geri bağlanmasında pH'ın etkisi.....	52
Şekil 4.8. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin a) pH 3,0 b) pH 7,0 geri bağlanmasında sıcaklığın etkisi.....	53
Şekil 4.9. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin a) pH 3,0 b) pH 7,0 geri bağlanmasında sürenin etkisi.....	54
Şekil 4.10. MIP ve NIP hidrojeller a) AAm-1-VI b) AAm-MA üzerine lipaz enziminin geri bağlanmasında sürenin etkisi	55
Şekil 4.11. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin a) pH 3,0 b) pH 7,0 geri bağlanmasında enzim konsantrasyonunun etkisi.....	57
Şekil 4.12. MIP ve NIP hidrojeller a) AAm-1-VI b) AAm-MA üzerine lipaz enziminin geri bağlanmasında enzim konsantrasyonunun etkisi.....	58
Şekil 4.13. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir izoterm grafiği a) pH 3,0 b) pH 7,0	60
Şekil 4.14. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan a) MIP b) NIP hidrojel için Langmuir izoterm grafiği.....	60
Şekil 4.15. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan a) MIP b) NIP hidrojel için Langmuir izoterm grafiği.....	61
Şekil 4.16. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Freundlich izoterm grafiği a) pH 3,0 b) pH 7,0	63

Şekil 4.17. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan a) MIP b) NIP hidrojel için Freundlich izoterm grafiği	63
Şekil 4.18. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan a) MIP b) NIP hidrojel için Freundlich izoterm grafiği	64
Şekil 4.19. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için yalancı birinci mertebe kinetik modeli a) pH 3,0 b) pH 7,0	68
Şekil 4.20. a) AAm-1-VI b) AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için yalancı birinci mertebe kinetik modeli	68
Şekil 4.21. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için yalancı ikinci mertebe kinetik modeli a) pH 3,0 b) pH 7,0	69
Şekil 4.22. a) AAm-1-VI b) AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için yalancı ikinci mertebe kinetik modeli	70
Şekil 4.23. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modeli a) pH 3,0 b) pH 7,0	71
Şekil 4.24. a) AAm-1-VI b) AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modeli	72
Şekil 4.25. AAm monomeri ile hazırlanmış hidrojellere a) pH 3,0 b) pH 7,0'de yapılan geri bağlama çalışmasının $\ln Kc$ 'ye karşı $1/T$ grafiği	76
Şekil 4.26. AAm monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojellerin şişme kapasitelerinin zamanla değişimi a) pH 3,0 b) pH 7,0	78
Şekil 4.27. AAm monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojeller için yapılan tekrar kullanılabilirlik çalışması a) pH 3,0 b) pH 7,0	79
Şekil 4.28. MIP ve NIP hidrojeller üzerine tablet örneği uygulama çalışmasının SDS-PAGE Jel Elektforezi sonuçları	82

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Lipazların başlıca kullanım alanları ve kullanım amaçları	9
Tablo 2.2. Asidik, bazik ve nötral fonksiyonel monomerlere örnekler.....	15
Tablo 2.3. İdeal MIP'in taşınması gereken özellikler	17
Tablo 3.1. <i>p</i> -Nitrofenol standart eğrisi	24
Tablo 3.2. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi	25
Tablo 3.3. Farklı monomerler kullanarak hidrojel sentezleme.....	27
Tablo 3.4. Ayırma ve düzenleyici jellerin hazırlanışı	36
Tablo 3.5. Örnek tamponunun hazırlanışı	37
Tablo 4.1. Farklı monomerlerle hazırlanan hidrojellerin farklı pH değerlerindeki lipaz geri bağlama etkinliğinin karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.2. R_L değerleri ve izoterm tipleri.....	61
Tablo 4.3. Farklı monomerlerle hazırlanan hidrojellerin R_L (dağılma) sabiti	62
Tablo 4.4. AAm ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izotermine ait parametreler (<i>pH</i> 3,0 ve <i>pH</i> 7,0)	64
Tablo 4.5. AAm-1-VI ve AAm-MA ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izotermine ait parametreler.....	65
Tablo 4.6. AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları (<i>pH</i> 3,0)	72
Tablo 4.7. AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları (<i>pH</i> 7,0)	72
Tablo 4.8. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan hidrojeller için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları	73
Tablo 4.9. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojeller için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları	73
Tablo 4.10. AAm monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojeller için termodinamik parametreler (<i>pH</i> 3,0 ve <i>pH</i> 7,0)	75
Tablo 4.11. MIP ve NIP hidrojeller için farklı proteinlerle seçimliliğinin karşılaştırılması.....	77
Tablo 4.12. MIP ve NIP hidrojellere pH 7,0 fosfat tamponunda çözünen tablet ile geri bağlama ve desorpsiyon çalışmalarının aktivite ve protein tayini sonuçları.....	81
Tablo 5.1. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (<i>pH</i> 7,0).....	87
Tablo 5.2. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (<i>pH</i> 3,0).....	88
Tablo 5.3. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (<i>pH</i> 3,0).....	89
Tablo 5.4. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (<i>pH</i> 3,0).....	90

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gosteren, kendisini tanımaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Dinçer'e, Prof. Dr. Tülin Aydemir'e, kimya bölümü öğretim üyelerine, hayatımın tüm zorlu aşamalarında beni yüreklendiren ve desteğini hiç eksik etmeyen yol arkadaşım Burak Büyük'e, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan annem Hülya Çelebi'ye, babam Orhan Çelebi'ye ve kardeşim Berk Çelebi'ye yürekten teşekkür ederim.

Tuğba ÇELEBİ
Manisa, 2019



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lipaz Enziminin Tanınmasına Yönelik Moleküler Damgalı Hidrojel Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tuğba ÇELEBİ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

Tez çalışmasında, moleküler damgalama tekniği ile hidroksietilmetakrilat (HEMA), 1-vinilimidazol (1-VI), metil akrilat (MA), akrilamid (AAm), 2-dimetil aminoetil metakrilat (2-DMAEMA) gibi farklı fonksiyonlara sahip monomerler kullanılarak lipaz damgalı (MIP) ve damgasız (NIP) hidrojeller hazırlandı. Hazırlanan bu hidrojeller için lipaz geri bağlama çalışmaları farklı pH ortamlarında gerçekleştirildi. MIP ve NIP hidrojellerde tutunan protein miktarları ve damgalama etkinliği (IF) değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı. AAm, AAm-1-VI, AAm-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojellerin damgalama etkinliklerinin yüksek olduğu görüldü ve çalışmalara bu hidrojeller üzerinden devam edildi. Lipaz enziminin seçimli ayırımına yönelik hazırlanan hidrojinin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi ve yüzey morfolojilerinin analizi ise taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile yapıldı. Lipaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlama koşullarının optimizasyonu amacıyla inkübasyon süresi, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve pH etkisi incelendi. MIP ve NIP hidrojeller üzerine enzimin maksimum bağlanması 25 °C, pH 3,0 ve 90 dk.'da gerçekleşti. Başlangıç enzim konsantrasyonu 5 mg/mL'ye ulaştığında adsorpsiyonun doygunluğa ulaştığı görüldü. Optimize edilen koşullarda adsorpsiyon izotermi ve adsorpsiyon kinetikleri çalışıldı. Lipaz damgalı hidrojinin seçimliliğinin incelenmesi amacıyla geri bağlama çalışması α -amilaz, β -glukozidaz ve sığır serum albümin (BSA) ile gerçekleştirildi. MIP hidrojellerin bu enzimlere ve proteine karşı seçimliliğinin düşük olduğu görüldü. MIP ve NIP hidrojellerin şişme özelliklerini araştırmak amacıyla şişme testi uygulandı. Akrilamid monomeri ile hazırlanan lipaz damgalı hidrojel farklı pankreatik enzimleri içeren ortamdan lipazın seçimli olarak ayrılmasında kullanıldı. Örneklerin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemiyle yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, hidrojel, moleküler damgalama, adsorpsiyon.

2019, 95 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

Preparation and Characterization of Molecularly Imprinted Hydrogel for Recognition of Lipase Enzyme

Tuğba ÇELEBİ

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe DİNÇER

In the thesis study, using the molecular imprinting technique, lipase imprinted (MIP) and non-imprinted (NIP) hydrogels were prepared using monomers with different functions such as hydroxyethylmethacrylate (HEMA), 1-vinylimidazole (1-VI), methyl acrylate (MA), acrylamide (AAM), 2-dimethyl aminoethyl methacrylate (2-DMAEMA). Lipase rebinding studies were performed in different pH environments for these prepared hydrogels. The amount of protein adsorbed on MIP and NIP hydrogels and imprinting efficiency (IF) values were calculated and compared. Imprinting efficiencies found to be high for the hydrogels prepared with AAM, AAM-1-VI, AAM-MA monomers so further studies were performed with these hydrogels. Determination of functional groups and surface morphology analysis of molecularly imprinted hydrogels for recognition of lipase enzyme were done by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) scanning electron microscopy (SEM). For optimization of rebinding conditions of lipase enzyme on MIP and NIP hydrogels, effect of pH, contact time, temperature and enzyme concentration were investigated. Maximum rebinding of lipase enzyme on MIP and NIP hydrogels were occurred at 25 °C, pH 3.0 and 90 min. When the initial enzyme concentration reached to 5 mg/mL, the adsorption reached to saturation. Adsorption isotherms and adsorption kinetics were studied under optimized conditions. In order to investigate the selectivity of lipase imprinted hydrogel, rebinding studies were performed with α -amylase, β -glucosidase and BSA. Selectivity of lipase imprinted hydrogels was found to be low towards these enzymes and protein. Swelling test was performed to investigate swelling properties of MIP and NIP hydrogels. The lipase imprinted hydrogel prepared with the acrylamide monomer was used to selectively separate lipase from the medium containing different pancreatic enzymes. The purity control of the samples was done by SDS-PAGE method.

Keywords: Lipase, hydrogel, molecular imprinting, adsorption.

2019, 95 page

1.GİRİŞ

Lipazlar (hidrolazlar, EC. 3.1.1.3) hidrolazlar sınıfında yer alırlar ve trigliseritlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Suda çözünmeyen trigliseritlerin, di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar hidroliz tepkimelerini gerçekleştirmesinin yanı sıra bazı esterlerin transesterifikasyonu gibi esterlerin sentezini katalizleyen asimetric seçicilik özellikleri sergilerler. Lipaz enzimlerinin özgül kimyasal transformasyonlarda örneğin biyotransformasyonlardaki rolleri onların endüstriyel alanlarda popüler olmalarını sağlamaktadır. Lipazlar bu özellikleri sayesinde yiyecek, deterjan, kimya ve ilaç endüstrisinde oldukça gözde enzimlerden biridir. Lipazlar hem sulu hem de organik çözücülerde birçok reaksiyonu gerçekleştiren en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazların önemli biyokatalizörlerin başında gelmesinin sebebi, geniş bir substrat aralığının olması, aşırı sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere ve enantiyoselektiviteye karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde.

Hidrojel ler ya da diğer bir deyişle su içeren jeller, hidrofilik ve suda çözünmezlikle karakterize edilen polimerlerdir. Suda çözünmeyip şişebilen yani suyun büyük bir kısmını yapıları içerisine alabilen, üç boyutlu polimerik ağlar olup, hem doğal hem de sentetik polimerlerden sentezlenebilmektedirler. Sentetik hidrojel lerin sentezinde, metakrilik asit (MAA), akrilamid (AAm), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), akrilik asit (AA), N-vinilpirolidon (NVP) gibi monomerler kullanılmaktadır. Bunun yanında sentetik hidrojel ler, şişme özelliklerini ve biyoyumluluklarını artırmak amacıyla, selüloz, kitosan, jelatin gibi biyopolimerlerle modifiye edilerek kullanılabilirlerdir. Hidrojellerin su absorplama yetenekleri polimer iskeletine bağlı hidrofilik fonksiyonel grupların varlığından kaynaklanırken, çözünmeye karşı dirençleri ağ zincirleri arasındaki çapraz bağlardan kaynaklanmaktadır. Suda bir denge hacmine kadar şişerler fakat orijinal şekillerini korurlar. Yumuşak oluşları, canlı dokulara benzer kauçuğumsu yapıları, akıllı oluşları ve su tutma kapasiteleri hidrojel leri eşsiz malzemeler haline getirmektedir.

Moleküler damgalama teknolojisi (MIT) istenen bir madde ile onun analogları veya tek bir enantiomer için spesifik moleküler tanıma özelliklerine sahip polimerlerin hazırlanmasına yönelik hızlı bir şekilde gelişen bir tekniktir. Moleküler damgalı polimerlerin (MIP) sentezi basit ve ucuz bir işlemdir. Bir veya birkaç tipte polimer oluşturan bileşenler (fonksiyonel monomerler) kalıp molekülün yapısına göre etrafında uygun bir şekilde düzenlenirler. Kalıp molekül ile monomerler arasındaki etkileşimler kovalent veya non-kovalent şekilde olabilir. Ortama matriks oluşturan materyal yani çapraz bağlayıcı, porojenik bir çözügen ve başlatıcı eklenir. Polimerizasyon UV ışık veya ısı ile etkisiyle başlar. Polimerizasyon sırasında monomer(ler) ve kalıp molekül arasında oluşan kompleks stabilize olur ve sonuçta yüksek derecede çapraz bağlı sert poröz yapılu polimer elde edilir. Kalıp molekülün polimerden kısmen veya tamamen uzaklaştırılması, polimerin bir çözügen sistemiyle yıkanması, kimyasal hidroliz ile veya ikisinin kombinasyonu şeklinde bir yıkamayla gerçekleşir. Kalıp molekülün uzaklaştırılmasıyla polimerde damgalanan bölgeler kalıp molekülün veya yapısal analoglarının tekrar bağlanması için uygun hale gelir.

Moleküler baskılı polimerler, belirli bir molekülü (veya onun bir türevini) kimyasal olarak tanıma özelliğine sahip kalıp içeren polimerik katı malzemelerdir. Moleküler baskılı polimerler, düşük maliyetleri, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları ve yüksek depolama dayanıklılıkları nedeniyle son yıllarda ilgi çeken çalışma alanları arasında yer almaktadır.

Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları daha iyi, daha seçici ve duyarlı analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Şimdiye kadar MIP'ler sıvı kromatografisi kapilarelektroforez ve kapilarelektrokromatografi ve solid-faz ekstraksiyonu gibi pek çok analitik çalışmada kullanılmıştır. Moleküler baskılama, ilaçların, herbisitlerin, aminoasitlerin ve türevlerinin, peptitlerin, proteinlerin vb. bileşiklerin seçici tanıma matrikslerinin hazırlanması için geliştirilmiş bir yöntem olmuştur. MIP adsorbentler, ilaçların katı faz ekstraksiyonunda, proteinlerin, aminoasitlerin, DNA ve RNA'nın,

peptidlerin, hormonların ayrılması ve gıdalardan pek çok maddenin ayrımı ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır.

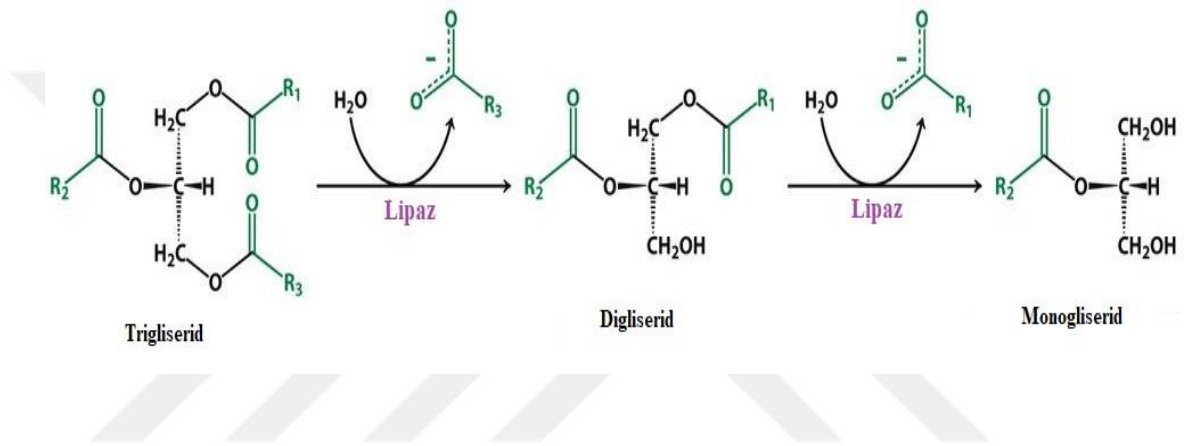
Doğada en çok bulunan ve en önemli makromolekül gruplarından biri proteinlerdir. Hücrede pek çok işlev binlerce farklı tipte protein molekülü tarafından yürütülür. Proteinler besin kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra organizmayı tanımlayıcı yapısal bilgileri sunan moleküllerdir. Bu bilgilere ulaşmak ise proteinlerin bir elektrik alana bırakıldığında, net bir yüke sahip olmalarından dolayı bir elektrotta ya da diğerine doğru hareket etme prensibine dayanan ve elektroforez olarak bilinen yöntemle mümkündür. Bu yöntem proteinlerin analizinde ve ayrılmasında geniş çapta kullanılır. Proteinlerin elektroforetik ayrımında genelde en iyi ayrışımın sağlandığı poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği uygulanır.

Tez çalışmasında öncelikle moleküler damgalama tekniği ile farklı monomerler kullanılarak lipaza spesifik hidrojeller hazırlandı. Seçicilik faktörü yüksek olan hidrojellerde lipazın MIP ve NIP üzerine geri bağlama koşullarının optimizasyonu yapıldı. Lipaz damgalı hidrojeller kullanılarak farklı pankreatik enzimleri içeren tabletten lipazın seçimli olarak ayrılması test edildi. Saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat (SDS-PAGE) yöntemiyle yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipaz

Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolazlar, EC 3.1.1.3) gliserin ester bağlarının parçalanmasını sağlayan hidrolaz grubu enzimlerdir. Sulu ortamlarda yağları hidrolizleyerek monogliserid, digliserid, serbest yağ asitlerinin ve gliserol oluşumunu katalizlerken, su miktarının sınırlı olduğu hidrofobik organik çözümlerde gliserol ve yağ asitlerinden açilgliserol oluşumunu katalizlemektedir [1].



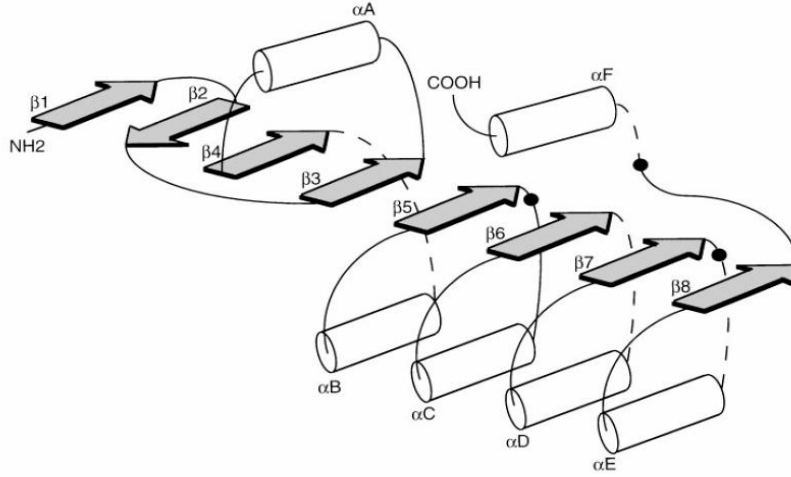
Şekil 2.1. Yağların hidroliz reaksiyonu

Lipazların göze çarpan en önemli özellikleri sulu ve susuz (organik) fazların ara yüzeyinde reaksiyon göstermeleridir ki bu özellikleriyle esterazlardan ayrılırlar. Lipaz ara yüzey aktivasyon düşüncesi, onların katalitik aktivitelerinin genellikle substratlarının agregasyon haline bağlı olması gerçeğinden doğar. Ancak lipazlar ve lipidlerin ara yüzeylerde birbirlerini nasıl etkiledikleri halen tam olarak açıklanamamıştır ve bu konu yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir [2].

Lipazın molekül ağırlığı 48.000 dalton, izoelektrik noktası ise 5,9'dur.

2.1.1. Lipazların Yapısı

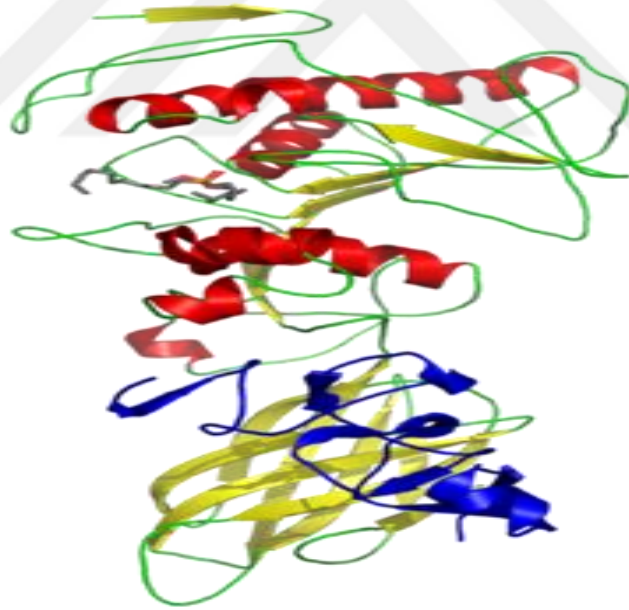
Şu ana kadar farklı kaynaklardan saflaştırılan lipazların üç boyutlu yapılarının birbirine büyük oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. 1990 ile 1995 yılları arasında 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı aydınlatılmıştır. Bu enzimlerin moleküler büyüklükleri, substrat spesifiklikleri ve aktivatörleri dışında, çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, tüm lipazlarda karakteristik olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı göze çarpmaktadır. α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin iç yapısı incelendiğinde paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper heliksel dönüşlerle bir şerit şeklini aldığı görülmüştür [3].



Şekil 2.2. Doğal α/β hidrolaz katlanması

Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N- kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır [4]. Bu gruptaki enzimlerin farklı seviyelerdeki benzerliklerinin dışında bir sıralama istisnai olarak sıkça gözlenmiştir; pentapeptit Gli-X-Ser-X-Gli. Bu serin amino asidinin yapıda korunması ve bunun değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitilmesi bu amino asidin kataliz için çok önemli ve gerekli olduğunu göstermiştir. Bunun topografik yerleşimi de korunmuş ve belirgindir; protein zincirinin gergin bir bölümünün en üstünde bulunmaktadır. Fakat

bu gergin bölümün serin amino asidine yakın -2 ve +2 pozisyonlarındaki amino asitlerinin küçük yan zincir gruplar içermesi mecburidir. Katalitik serin amino asidine ilave olarak çoğu lipazın aktif merkezi histidin ve başka bir amino asit (Asp veya Glu) daha içerir. Nükleofilik serin bir β bandı ile α heliksinin karşısında yer alırken histidin, aspartik asit ve glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır. Katalitik bölgeyi içeren amino asitler çoğu lipaz yapısında korunur. Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin aminoasidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Serinin nükleofilik oksijeni trigliserid ile tetrahedral hemiasetal bir ortam oluşturur. Hemiasetalin ester bağı hidroliz olur ve diaçilgliserid serbest kalır. Aktif merkezdeki serin açil esterinin bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açil enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir. Katalitik prosesin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır [5].



Şekil 2.3. Lipazın üç boyutlu yapısı

2.1.2 Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

➤ Hidroliz

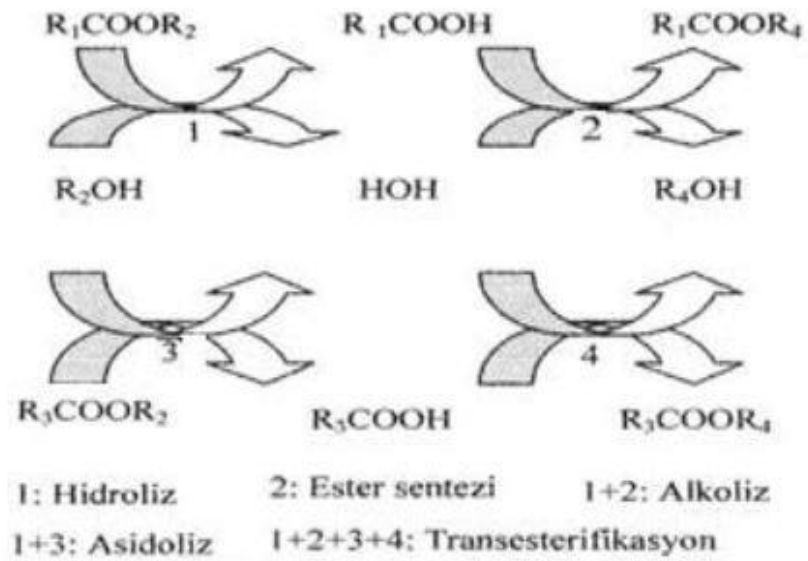
Ester bağlarının hidrolizi lipazlar tarafından katalize edilebilir.

➤ Esterleşme

Esterleşme reaksiyonunda alkolle tepkimeye girecek maddeler; asit klorür, anhidrit ester, amit, nitril, asit tuzu gibi maddelerdir. Bu maddelerin etkinlikleri asit klorür> anhidrit> ester> amit, nitril> asit tuzu > asit sırasıyla azalır.

➤ Ester Değişimi

Lipazla olan reaksiyonlar sonucu bir esterden ve yanında başka bir reaktif kullanarak yeni bir ester oluşumudur.



Şekil 2.4. Lipaz reaksiyonlarının şematik olarak gösterilişi

2.1.3. Lipaz Türleri

➤ Mikrobiyal Lipazlar

Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar, mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi, mikropların kolay yetiştirilebilmeleri ve lipazlarının çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir. Mikrobiyal lipazların üretimi için küfler en uygun kaynak olup, özellikle gıda sanayinde kullanılan enzimlerin endüstriyel üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

➤ Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazlar glikoprotein yapısındadırlar, fakat bazı hücre dışı bakteriyel lipazlar lipoprotein yapısındadırlar. Çoğu bakteride enzim üretiminin bazı polisakkaritler tarafından etkilendiğini bildirmiştir. Şimdiye kadar çoğu bakteriyel lipazların yapıcı ve substratlarına karşı özgül olmadığı ve az bir kısım bakteriyel lipazların da ısıya karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir.

➤ Fungal Lipazlar

Fungal lipazlar üzerinde 1950'lerden beri çalışılmaktadır ve Lawrence, Brockerhoff ve Jensen kapsamlı görüşler sunmuşlardır. Bu lipazlar, düşük maliyetli soy verme özelliklerinin olması, ısıya ve pH'ya karşı dayanıklı olmaları, substrat özgülüğü ve organik çözücülerde aktif olmalarından dolayı kullanılmaktadırlar. Ticari lipazların başlıca üreticileri *Aspergillus niger*, *Candidacylindracea*, *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R.delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* türleridir.

2.1.4 Lipazların Uygulama Alanları

Lipazlar endüstriyel olarak birçok alanda kullanılmaktadır (Tablo 2.1.). Endüstriyel alanda hem hayvansal hem bitkisel hem de mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar kullanılmaktadır. En fazla mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır.

Mikrobiyal lipazlar arasında fungal lipazlar ekstraselüler enzim ürettikleri için ilk sırada tercih edilmektedirler. Fungal lipazlar biyoteknolojik açıdan önemli enzim grupları arasında yer almaktadırlar. Çünkü çok yönlü uygulama alanına sahip

olmalarının yanında oldukça kolay üretime sahiptirler. Fungal lipazlar enzimatik uygulamalarda çok yönlüdürler ve yüksek substrat spesifitesine sahiptirler. Diğer birçok endüstriyel enzim gibi lipazlar da rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaya başlanmıştır. Fungal lipazlar endüstriyel alanda oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Lipazlar besin üretiminde, deri, tekstil, deterjan, kağıt üretimi, medikal alanda, kozmetik sektöründe ve bunun gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

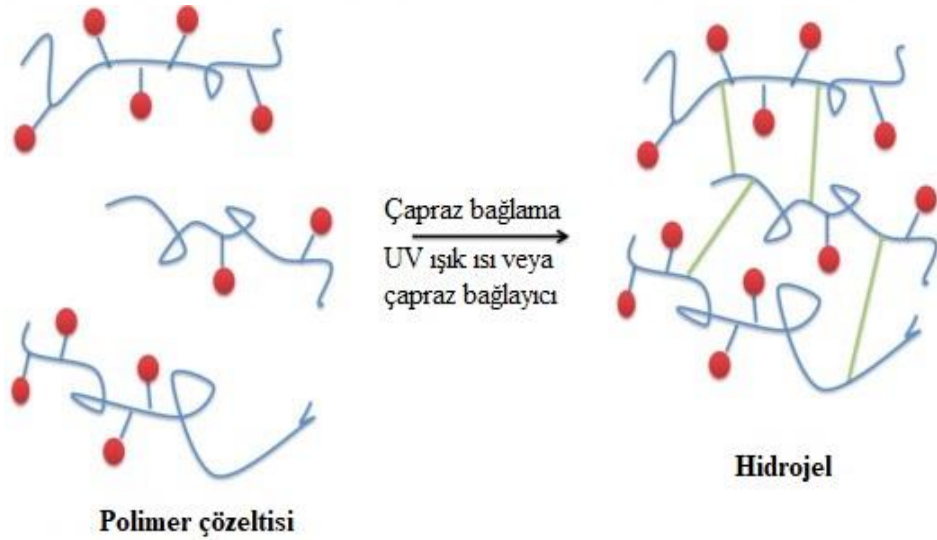
Tablo 2.1. Lipazların başlıca kullanım alanları ve kullanım amaçları

Sanayi Dalı	Etki	Ürün
Unlu mamuller	Lezzet artırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamuller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez Hidroliz	Kimyasallar Sörfektanlar gibi temizleme Ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, Nemlendirme ajanları
Süt ve süt mamulleri	Süt yoğurunun hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması Tereyağın modifiye edilmesi	Lezzet ajanları Peynir Tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin Yağ asitleri, gliserol, mono ve diğliseridler
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve balık	Lezzet geliştirilmesi ve yağın uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Transesterifikasyon	Özellikle lipitler Sindirim destekçileri

2.2. Hidrojeller

Hidrojeller, suda şişen hidrofilik polimerden oluşan çoklu bileşenli sistemlerdir [6]. Yapılarına çözücü alma kapasiteleri kendi kütlelerinin en az %20'si olan çapraz bağlı polimerler ise kserojel olarak tanımlanırlar [7,8]. Polimer jellerinin sentez şartları, yapıları ve özellikleri arasındaki ilişkiler 1940'lı yıllardan beri yoğun araştırmalara konu olmuştur. Polimer jellerinin özelliklerini, örneğin çözücü absorplama kapasitesini ağ yapıları belirler. Son yıllarda kendi kütlelerinin bin katı kadar sıvıyı absorplayan hidrojeller sentezlenmiştir [9].

Hidrojeller, üç boyutlu çapraz bağlı hidrofilik özellikte ağ yapılı polimerlerdir [10,11]. Hidrojeli oluşturan ağ yapı, çapraz bağlarla birbirine bağlanmış polielektrolit zincirlerden oluşur. Bu zincirlerde substitue grup olarak genellikle karboksilli asit grupları bulunur. Polimer zincirleri üzerindeki negatif yükler birbirlerini iterler ve genişlerler. Karboksil grupları ayrıca suyla hidrojen bağları oluşturarak etkileşirler. Çapraz bağların varlığı polimer zincirlerinin çözünmeksizin jel halinde şişmesini sağlar.



Şekil 2.5. Hidrojel ağ yapısının şematik gösterimi

2.2.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller; hazırlama yöntemlerine, iyonik yüklerine, fiziksel yapılarına, kaynaklarına, su içeriklerine ve kimyasal kararlılıklarına bağlı olarak sınıflandırılabilirler [12].

Hazırlama Yöntemine Göre Hidrojeller;

- ❖ Homopolimerik hidrojeller
- ❖ Kopolimerik hidrojeller
- ❖ Çoklu polimerik hidrojeller
- ❖ İç içe geçmiş ağ yapılı polimerler (IPN)

İçerdikleri Yan Gruplara Göre Hidrojeller;

- ❖ Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller
- ❖ İyonik hidrojeller .
 - Anyonik (negatif yüklü) hidrojeller
 - Katyonik (pozitif yüklü) hidrojeller
 - Poliamfolitik hidrojeller

Fiziksel Yapılarına Göre Hidrojeller;

- ❖ Amorf hidrojeller
- ❖ Yarı-kristalin hidrojeller
- ❖ Hidrojen bağlı hidrojeller

Çapraz Bağlanma Durumlarına Göre Hidrojeller;

- ❖ Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller
- ❖ Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller

Kaynaklarına Göre Hidrojeller;

- ❖ Doğal hidrojeller
- ❖ Sentetik hidrojeller

Su İçeriklerine Göre Hidrojeller;

- ❖ Düşük şişme dereceli (20-50%) hidrojeller
- ❖ Orta şişme dereceli (50-90%) hidrojeller
- ❖ Yüksek şişme dereceli (90-99,5%) hidrojeller
- ❖ Süper-absorbant (>99,5%) hidrojeller

Kimyasal Kararlılıklarına Göre Hidrojeller;

- ❖ Biyolojik olarak bozunabilen hidrojeller
- ❖ Biyolojik olarak bozunamayan hidrojeller

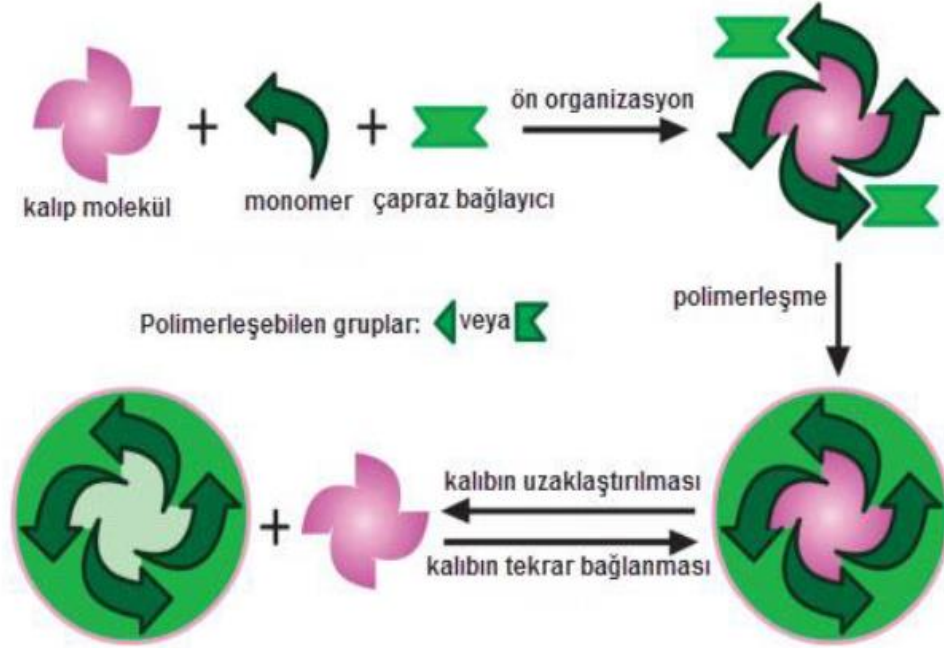
2.2.2. Hidrojellerin Kullanım Alanları

Hidrojeller bağıl olarak yüksek su içeriklerinden dolayı; biyomedikal, gıda ve çevresel alanlarda geniş bir kullanım alanına sahiptirler [13]. İn vivo uygulamalarda implant olarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra yumuşak doku değişimi, yara bezi, kontakt lens ve katater olarak da kullanılırlar [14,15]. Özel fonksiyonel gruplar içeren çeşitli monomerlerden oluşan yapı; afinite ayırımı alanında hidrojellerin kullanılmasına yol açmıştır [16]. Hidrojeller proteinlere, enzimlere, biyomoleküllere, pigmentlere, anyonlara, katyonlara veya boyalara duyarlı olacak şekilde tasarlanabilir. Kontrollü bir salım sisteminde ilaç, pestisit veya diğer bir biyoaktif ajan taşıyıcıya tutturulur. Bu taşıyıcı genellikle polimerik bir malzeme olur. Daha sonra maddenin salım hızı belirlenir. Bu tür sistemlerin hazırlanmasında hidrojeller sıklıkla kullanılır [15,17].

2.3. Moleküler Damgalama Yöntemi

Moleküler damgalı polimerlerin oluşumu 3 adımda özetlenebilir. 1) Hedef (kalıp) molekül ile polimerize olabilecek fonksiyonel gruplara sahip monomerler arasında kovalent/kovalent olmayan etkileşimlere dayalı kompleks oluşumu, bu adımda kalıp molekül etrafını monomerler sararak pre-kompleks

oluşturulur. 2) Ortamda bulunan polimerizasyon ajanları (porojen, çapraz bağlayıcı, insiyatör) ile kalıp-monomer etkileşimi artarak kalıp molekülün polimer içerisinde bağlanma bölgeleri (kalıp moleküle spesifik boşluklar) oluşur. 3) Kalıp molekül uygun yöntemler ile (çözgen ekstraksiyonu, hidroliz) polimerden uzaklaştırılır ve tekrar ortama konulduğunda bu bağlanma bölgelerine yeniden bağlanır [18].



Şekil 2.6. Moleküler Damgalı Polimerlerin Hazırlanması

Moleküler damgalı polimerlerin başlangıcı sayılan ilk çalışma Rus bilim adamı Polyakov tarafından yapıldı. Gerçekleştirilen araştırmada, jelatasyon ajanı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ kullanarak sodyum silikatı sulu ortamda polimerize etti ve ortama toluen ekledi, silika parçacıklarını kuruttu, sonucunda silikanın yüzeyinde eklenen tolueni tanıyan bölgelerin oluştuğunu gördü [19]. Bu yıllarda antijen-antikor tanıma mekanizmaları aydınlatılmadığı için silikanın seçimli tanıma mekanizması da tam olarak anlaşılamadı. Silika yüzeyinde tanıma bölgeleri oluşturmadaki en büyük adım Curti'nin mandelik asit ve kamhorsülfonik asit enantiomerlerini ayırabilen silika boncuklarını kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak kullanmasıdır [20]. Bu çalışma, benzer moleküllerin ayırımında moleküler damgalı silikanın

kullanabilirliğini gösteren bir örnektir. Sagiv, silika parçacıklarının yüzeyine oktadesiltrimetoksisilanlar aracılığıyla kimyasal adsorpsiyonu gerçekleştirdi [21]. Böylece silikanın yüzeyi türevlendirilmeden de birçok molekül tanıyıcı hale geldi. Silika ile sınırlı sayıda molekül tanıyıcı sistemler bulk (yığın) MIP çalışmalarının başlangıcını oluşturmaktadır. Mosbach ve grubu, organik silan kokteyli (amino, fenil, dodesil ve glisidozil özelliklerini içeren) kullanarak silikada boya damgalama çalışmalarını gerçekleştirmektedir. Ancak; silika parçacıklarının kullanım alanları genelde dönüşümsüz kovalent, metal- koordinasyon ya da zayıf kovalent olmayan etkileşimler ile tanıyıcıya dayanan molekül ve monomer sistemleri ile sınırlıdır [22]. Son yıllarda; silika sistemlerine ilave olarak polisilan sıvı kristal polimerleri, karbon/fuleren, zeolit ve CdS/ZnS gibi inorganik matrikslerde damgalama çalışmaları da hız kazanmıştır [23].

2.3.1. Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri

Moleküler damgalı polimer tasarlanması ve hazırlanması aşamasında polimerizasyon bileşenlerinin; kalıp molekül, monomer(ler), çapraz bağlayıcı, insiyatör ve uygun porojenin tespiti başarılı bir polimer dizaynı için önemli bir adımdır. Uygun bileşenlerin seçilmesi hazırlanan polimerin amaca uygunluğunu ve kullanılabilirliğini sağlayan en önemli faktördür. Bileşenler ve sahip olmaları gereken genel özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

❖ Kalıp Molekül

MIP prosesinde, fonksiyonel monomerler ile kovalent/non-kovalent bağlanabilen kalıp moleküller en önemli bileşendir. İdeal kalıp molekül serbest radikal polimerizasyon sürecinde kimyasal olarak inert olandır. Polimerizasyona kalıp molekülün doğrudan yada dolaylı olarak katılması damgalı polimer oluşum kinetiğini olumsuz etkiler. Kalıp molekülün polimerize olabilen gruba sahip olmaması, serbest radikal polimerizasyonunu inhibe edici tiyol yada hidrokinon gibi grupları olmaması, yüksek sıcaklıklara yada UV ışına dayanıklı olması istenen özellikleridir. Çalışılan bazı kalıp moleküllere örnek olarak; amino asitler, peptidler, steroid hormonlar, koenzimler, karbohidratlar, bazı ilaçlar, pestisitler, proteinler, nükleik asitler, hücreler ve virüsler sayılabilir.

❖ Fonksiyonel monomerler

Damgalı polimerlerdeki bağlanma bölgelerinin kalıp molekül ile etkileşiminden monomerlerin fonksiyonel grupları sorumludur. İdeal bağlanmanın gerçekleşmesi amacıyla non-kovalent damgalamada monomerin aşırısı kullanılır (4:1, monomer: kalıp molekül). Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimin uygun olması (hidrojen bağı donörü ile hidrojen bağı akseptörü gibi) kompleks oluşumunu ve damgalamanın etkisini artırır. İki yada daha fazla monomerin bir arada kullanıldığı “kokteyl” polimerizasyon sistemlerinde monomerlerin birbiriyle etkileşimini önlemek için ortamda uygun oranlarda olmaları gerekir.

Tablo 2.2. Asidik, bazik ve nötral fonksiyonel monomere örnekler

<i>Asidik Monomerler</i>	<i>Bazik Monomerler</i>	<i>Nötral Monomerler</i>
Metakrilik asit (MAA), Akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA,) P-Vinil benzoik asit	4-Vinil piridin (4-VP), 2-Vinil piridin (2-VP), N,N'- dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM), 1-Vinil imidazol (1-VI)	Akrilamid (AAM), Metil akrilat (MA), 2-Hidroksi metakrilat (HEMA), Metil Metakrilat (MMA), Stiren, Akrilonitril (AN)

❖ Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler damgalı polimer hazırlanmasında çapraz bağlayıcıların üç işlevi; polimerin morfolojisinin kontrolü (jel tip, makroporöz yada mikrojel formatı), polimerde oluşan bağlanma bölgelerinin stabilizasyonu ve polimerin mekanik stabilitesini sağlamaktır. Makroporöz yapı polimer oluşturmak için yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanılması (polimer karışımının %80'ni oranında) ve polimerizasyon esnasında çapraz bağlayıcı ile monomerler arasındaki etkileşimin kontrol altında tutulması gerekir. Çoğu kez istenmeyen etkileşimlerin gerçekleşmesi (vinil monomerleri bir çok çapraz bağlayıcı ile reaksiyon verebilir) polimerin tanıma etkinliği olumsuz etkiler.

❖ **Başlatıcılar (İnsiyatörler)**

Serbest radikal polimerizasyonunun bağlamasını sağlayan moleküllerdir. Polimerizasyonun gerçekleştirileceği koşula göre örneğin hidrojen bağı oluşumuna dayanan polimerler hazırlanırken genelde düşük sıcaklıklarda reaksiyonu başlatan UV insiyatörler kullanılır. Ayrıca kalıp molekülün termal ve UV stabilitesi de insiyatör seçiminde önemli bir faktördür.

❖ **Çözgen (porojen)**

Çözgen; kalıp molekül, monomer, çapraz bağlayıcı ve insiyatörü tek faz halinde çözmesinin yanı sıra polimerde kavite (porların) oluşumundan da sorumlu olduğu için MIP terminolojisinde porojen olarak adlandırılır. Makroporöz polimerlerde oluşan polimerin morfolojisi ve porların boyutları çözgenden doğrudan etkilenir. Por oluşumunun yanı sıra non-kovalent damgalamada kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşimin hangi bağ türünde ne olacağını da kullanılan porojen belirler. Hidrojen bağı oluşumu çözgenin polaritesine ve hidrojen bağı yapabilme etkinliğine, iyonik etkileşimler düşük sıcaklıkta, dipolar etkileşimler polar çözgenlerde oluşur. Genelde kalıp molekülün yapısına ve çözünürlüğüne bağlı olarak uygun ve yüksek bağlanma afinitesini sağlayacak çözgenler seçilir. Hidrojen bağı oluşumuna dayanan polimerlerde genelde asetonitril, kloroform, diklorometan, toluen, tetrahidrofuran seçilebilir. Hidrofobik etkileşimlere dayalı bir polimer hazırlanacaksa en uygun çözgen sudur.

Başarılı bir damgalı polimerin oluşturulması:

İyi bir MIP oluşumunu etkileyen faktörler;

- Monomer kalıp oranı
- Fonksiyonel monomerin asidik ya da bazik karakteri
- Porojen (çözgen) seçimi
- Polimerizasyon koşulu
- Kalıp molekülün ve polimerin konformasyonu
- Çapraz bağlayıcının oranı

İyi bir MIP'te olması gereken özellikler Tablo 2.3. 'de verilmiştir.

Tablo 2.3. İdeal MIP'in taşınması gereken özellikler [24]

<u>Sentez Metodu</u>
Bir ya da birkaç kolay adımda polimer gerçekleştirilmesi, Polimerizasyon oluşumu esnasında hata oluşumunu en aza indirecek dinamik damgalanması, Oluşacak polimerin fonksiyonelliği.
<u>Fiziksel Özellikler</u>
Yüksek stabilitede homojen damgalı bölgelerin bulunması, Çözünür ya da çözünmez kaliteli polimer karakterinde olması, Tekrar kullanılabilirliğinin iyi olması, Bağlanma bölgelerinin spektral yöntemler ile karakterize edilebilmesi.
<u>Bağlanma Karakteristiği</u>
Olabildiğince yüksek afinitede kalıp molekülün bağlanabilmesi, Olabildiğince yüksek seçicilikte kalıp molekülün geri bağlanabilmesi, Hızlı bağlanma kinetiği, Bağlanma kinetiğinin kolaylıkla analizlenebilmesi.

2.4. Elektroforez Yöntemi

Doğada en çok bulunan ve en önemli makromolekül gruplarından biri proteinlerdir. Hücrede pek çok işlev binlerce farklı tipte protein molekülü tarafından yürütülür. Proteinler besin kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra organizmayı tanımlayıcı yapısal bilgileri sunan moleküllerdir. Bu bilgilere ulaşmak ise proteinlerin bir elektrik alanı bırakıldığında, net bir yüke sahip olmalarından dolayı bir elektrota ya da diğerine doğru hareket etme prensibine dayanan ve elektroforez olarak bilinen yöntemle mümkündür. Bu yöntem proteinlerin analizinde ve ayrılmasında geniş çapta kullanılır.

Elektroforezin Kullanım Alanları:

- Saflık kontrolü
- Molekül kütlesi belirleme
- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık belirleme
- Enzim izozimlerinin belirlenmesi

Proteinlerin amino asit dizilimleri farklı olduğu için, net yükleri, büyüklük ve şekilleri de farklıdır. Tüm bu faktörler, proteinlerin elektroforezde nasıl hareket edeceklerini belirler.

Elektroforez Çeşitleri:

- Kağıt ve selüloz asetat elektroforezi
- İnce tabaka elektroforezi
- Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
- Agaroz jel elektroforezi

Proteinlerin elektroforetik ayrımında genelde en iyi ayrışımın sağlandığı poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği uygulanır [25].

2.4.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Doğada en çok bulunan ve en önemli makromolekül gruplarından biri proteinlerdir. Hücrede pek çok işlev binlerce farklı tipte protein molekülü tarafından yürütülür. Proteinler besin kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra organizmayı tanımlayıcı yapısal bilgileri sunan moleküllerdir. Bu bilgilere ulaşmak ise proteinlerin bir elektrik alana bırakıldığında, net bir yüke sahip olmalarından dolayı bir elektrota ya da diğerine doğru hareket etme prensibine dayanan ve elektroforez olarak bilinen yöntemle mümkündür. Bu yöntem proteinlerin analizinde ve ayrılmasında geniş çapta kullanılır. Proteinlerin elektroforetik ayrımında genelde en iyi ayrışımın sağlandığı poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği uygulanır [25].

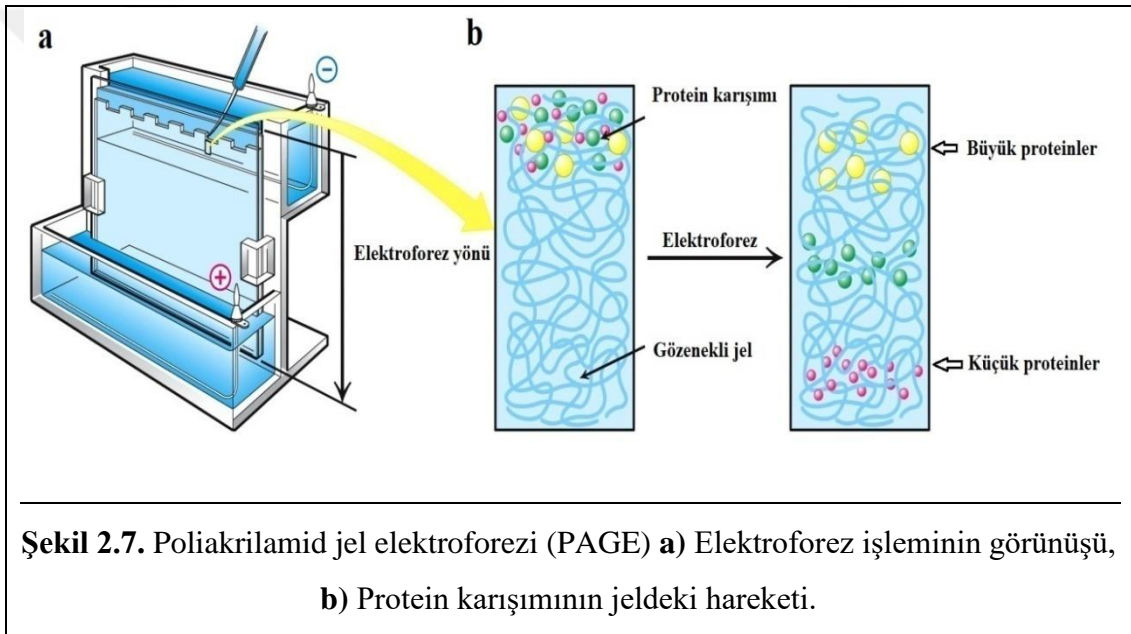
Pek çok türün tohum depo proteinleri moleküler sistematik çalışmalarında 1960'lerden beri kullanılmaktadır. Tohum protein profilleri genetik homolojinin

moleküler seviyede araştırılmasında, taksonomik, fenetik ve filogenetik (soyoluş) problemlerin çözülmesinde kullanılan bir tekniktir [26]. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) bitki koleksiyonlarının genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tohum depo proteinleri tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin analizinde, genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında, genom ilişkilerinin belirlenmesinde, mahsullerin geliştirilmesinde genetik belirteç (marker) olarak kullanılmaktadır. Elektroforezle elde edilen tohum depo protein profilleri pek çok türün taksonomik ve evrimsel problemlerini çözmekte kullanılmaktadır. Çünkü elde edilen bant örüntüleri (desenleri) her tür için özel ve doğrudan doğruya genotipe bağlıdır. Tohum depo proteinlerinin elektroforezinin geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre avantajı, gelişme mevsimlerinden bağımsız olması, bitkilerin yetiştirilmesine gerek olmaması, materyalin tüm yıl boyunca elde edilebilir olması, hızlı analiz edilebilmesi, saklanmasıdaki kolaylıklar ve ihtiyaç duyulan örneğin az olmasıdır [27].

SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlere de yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu (derişimi) artırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS-PAGE hızlı, duyarlı ve geniş çapta kullanılan bir tekniktir. Bu teknik bir protein örneğinin saflık derecesini belirlemek, bilinmeyen bir proteinin molekül kütlesini hesaplamak ve bir protein içindeki polipeptid alt birimlerinin sayısını ortaya çıkarmak üzere kullanılabilir [28].

Poliakrilamid jel elektroforez tekniğinde destek ortamı olan poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin çapraz bağlayıcı moleküller (N,N'-metilen-bis-akrilamid) yardımıyla kovalent olarak bağlanmasından oluşan bir polimerdir. Polimerizasyon başlatıcı olarak amonyum persülfat kullanılırken TEMED (N,N,N',N'tetrametilenetilendiamin) ise katalizör olarak görev yapar. Jeldeki porların büyüklüğü polimerizasyona giren akrilamid konsantrasyonuyla orantılıdır. Konsantrasyon arttıkça porların çapı daralmaktadır. Bu yüzden çalışılan protein molekülünün ağırlığına bağlı olarak jelin akrilamid konsantrasyonu ayarlanmaktadır.

Bu teknikte proteinleri denatüre etmek için genellikle negatif yüklü sodyum dodesil sülfat kullanılmaktadır. SDS molekülleri proteinin tersiyer (üçüncül) ve kovalent yapısını belirleyen bütün kovalent bağları kopararak proteinleri denatüre eder ve ayırım için bir faktör olan şekil elimine edilmiş olur. Proteine bağlanacak olan SDS moleküllerinin sayısı proteinin molekül ağırlığına bağlıdır. Sonuç olarak her protein şekli hesaba katılmaksızın eşit yük yoğunluğuna sahip olur ve jel üzerinde eşit güce maruz kalır. Bununla beraber akrilamid yüksek oranda polimerize olduğundan dolayı büyük protein molekülleri küçük proteinlere göre jelde daha üst seviyede tutulurlar. Sonuç olarak proteinler moleküller ağırlıklarına göre ayrılmış olurlar [29].



Şekil 2.7. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) **a)** Elektroforez işleminin görünüşü, **b)** Protein karışımının jeldeki hareketi.

2.5. Tezin Amacı

Bu çalışmada enzim saflaştırma işlemi afiniteye dayalı ayırma yöntemiyle yapıldı. Bu yöntem, ekonomik ve daha kısa sürede saf enzim elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Tez çalışmasında öncelikle moleküler damgalama tekniği ile farklı monomerler kullanılarak lipaza spesifik hidrojeller hazırlandı. Seçicilik faktörü yüksek olan hidrojeller afinite materyali olarak kullanıldı. Lipaz enziminin seçimli ayırımına yönelik hazırlanan hidrojellerin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi ve yüzey morfolojilerinin analizi ise Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapıldı. Lipaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller

üzerine geri bağlama koşullarının optimizasyonu amacıyla pH, inkübasyon süresi, enzim konsantrasyonu ve sıcaklık etkisi incelendi. Optimize edilen koşullarda MIP ve NIP hidrojellerin lipaz bağlama kapasitesi belirlendi. Adsorpsiyon izotermi olan Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri, adsorpsiyon kinetiği ve adsorpsiyon termodinamiği incelendi. MIP ve NIP hidrojellerin şişme özelliklerini araştırmak amacıyla zamana karşı şişme testi uygulandı. Hidrojellerin dayanıklılığı ve tekrar kullanılabilirliği 5 defa yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi ile incelendi. Lipaz damgalı ve damgasız hidrojelini seçimliliğinin incelenmesi amacıyla geri bağlama çalışması α -amilaz, β -glukozidaz ve BSA gibi farklı proteinler ile gerçekleştirildi. Hidrojelin afinite materyali olarak kullanılabilirliği, ticari olarak satın alınan içerisinde lipaz, α -amilaz ve proteolitik enzimler bulunduran tablet içerisinde lipazın geri kazanımı AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller ile test edildi. Saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Yapılan araştırmalar sonucunda ekonomik, uzun işlem adımları gerektirmeyen ve enzim saflaştırma adımlarında uygulama alanı bulan afinite materyali sentezlendi.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kullanılan kimyasallar;

Lipaz (Domuz pankreatik lipazı 100-400 U/mg), α -Amilaz (*Aspergillus oryzae* α -amilazı toz: -30 U/mg) ve β -glukozidaz (Badem β -glucosidazı, 5,3 U/mg ve ≥ 6 U/mg) enzimleri, sığır serum albumin (BSA), akrilamid (AAm), metil akrilat (MA), 1-vinilimidazol (1-VI), N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA), hidroksietilmetakrilat (HEMA), 2-dimetil aminoetilmetakrilat (DMAEMA), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), sodyum dodesil sülfat (SDS), asetik asit (CH₃COOH), o-fosforik asit (o-H₃PO₄), etanol (C₂H₅OH), metanol (CH₃OH), bütanol (C₄H₉OH), sodyum asetat (CH₃COONa), asetik asit (CH₃COOH), sitrik asit (C₆H₈O₇), sodyum sitrat (C₆H₅Na₃O₇), potasyum dihidrojenfosfat (KH₂PO₄), dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), tris (hidroksimetil amino metan), hidroklorik asit (HCl), potasyum bromür (KBr), gliserol, β -merkaptotanol, glisin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, bromfenol blue, paranitrofenil palmitat (p-NPP), p-nitrofenol (p-NP), triton X-100, propanol, gumarabik.

Tüm kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan Cihazlar

- UV-VIS Spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU)
- FT-IR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) (Perkin Elmer Spectrum BX)
- Elektroforez (Atto AE 6125)
- pH metre (Inolab WTW Series)
- İnkübatör (GFL)
- Terazi (Sartorius)
- Su banyosu (Bandelin Sonorex)

- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

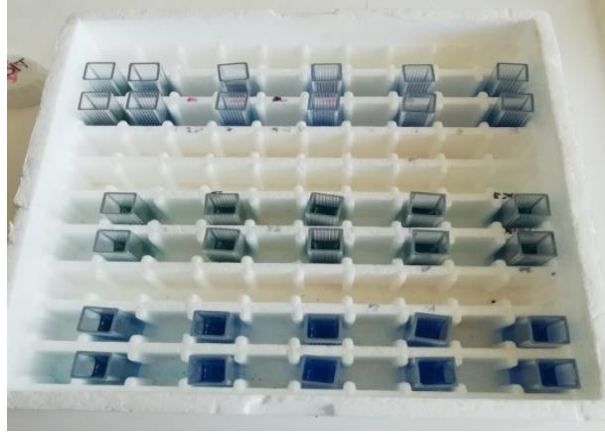
3.2. Yöntem

3.2.1. Protein Tayini

Protein miktarı tayini ise Bradford yöntemi ile gerçekleştirildi. Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı bu yöntem organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır [30].

Bradford Reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 alınarak üzerine 50 mL % 95 lik etanol ilave edildi. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra üzerine o-fosforik asitten 55 mL ilave edildi ve 30 dk boyunca karıştırıldıktan sonra distile su ile karışım 1 litreye tamamlandı. İyice çalkalandıktan sonra süzgeç kâğıdı yardımı ile süzüldü, süzüntü reaktif şişelerine aktarıldı.

Standart Protein Eğrisi için; Sığır Serum Albüminin (BSA) saf su ile 1 mg/mL'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözülden 0,02-0,2 mg/mL arasında olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra bu protein çözeltilerinden 0,1 mL alınıp üzerlerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk beklendi ve 595 nm de spektrofotometrik cihazda ölçümleri alındı. Elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesiyle ve standart protein eğrisi oluşturuldu.



Şekil 3.1. Bradford yöntemi ile protein tayini çalışması

3.2.2. p-Nitrofenol Standart Eğrisinin Oluşturulması

p-Nitrofenol standart grafiği oluşturmak için 0,01 mM-0,16 mM aralığında p-nitrofenol çözeltileri hazırlandı. Çözeltileri hazırlamak için tampon olarak; 200 mg Triton X-100 üzerine 50 mg gum arabik 25 mL pH 7.0 (0,05 M) fosfat tamponu ilave edildi ve 9:1 oranında olacak şekilde propanol ile karıştırıldı. Hazırlanan p-nitrofenol çözeltilerinin üzerine %1 (w/v)' lik Tris çözeltisinden 1 mL ilave edilerek 410 nm de ölçümü alındı.

Tablo 3.1. p-Nitrofenol standart eğrisi

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Distile Su (mL)	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mM p-NP çözeltisi (µL)	-	10	20	30	40	60	80	100	120	140	160
Tampon (µL)	-	990	980	970	960	940	920	900	880	860	840
%1'lik Tris (w/v) çözeltisinden 1 mL eklenir.											
410 nm' de ölçüm alınır											

3.2.3. Lipaz Aktivite Tayini

Pankreatik lipaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde, substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) kullanıldı. *p*-NPP ile yapılan enzim aktivitesi çalışmalarında aktivite *p*-NPP'in enzimatik hidroliziyle gerçekleştirilmektedir [31]. Hidroliz sonucunda *p*-nitrofenol (*p*-NP) oluşmakta ve çözeltinin berrak sarı rengi enzim aktivitesine bağlı olarak daha koyu bir sarı renk almaktadır. Sonuç olarak *p*-NP oluşumundan kaynaklanan absorbans artışı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

- Bir Uluslararası Ünite (International Unit: IU) lipaz aktivitesi, 25°C de ve standart koşullarda dakikada 1 µmol *p*-NPP hidrolizini katalizleyen lipaz miktarı olarak tanımlanmıştır. (µmol/dk)

Tablo 3.2. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi

	Kör	Örnek
Saf Su	100 µL	---
Substrat	900 µL	900 µL
Enzim	----	100 µL
İnkübasyon (15 dakika, 37 °C' de)		
% 1' lik Tris Bazı	1000 µL	1000 µL
Santrifüj (6000 rpm, 15 dakika)		
410 nm'de ölçüm alınır.		

Substrat Çözelti: Çözelti A: 200 mg Triton X-100 tartıldıktan sonra üzerine 50 mg gum arabik ve 25 mL pH 7.0 (0,05 M) fosfat tamponu eklendi. Çözelti B: 7,5 mg *p*-NPP tartılarak üzerine 5 mL propanol ilave edildi. Çözelti A'dan 8,1 mL ve çözelti B'den 900 µL karıştırılarak substrat çözeltisi hazırlandı.

Aktivite Hesaplamaları için ;

$$\text{Ünite (U)} = \frac{p - \text{nitrofenol } (\mu\text{mol})}{\text{İnkübasyon süresi (dk)}} = \mu\text{mol/dk}$$

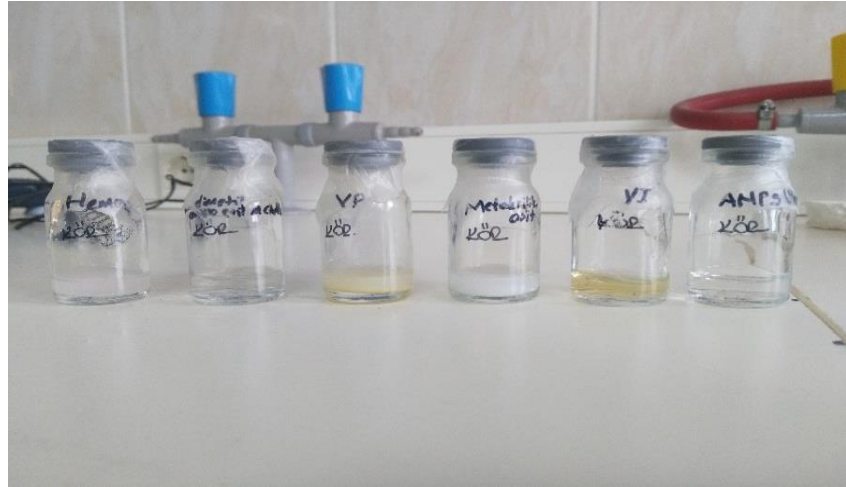
$$\text{Hacimsel Aktivite (U/mL)} = \frac{\mu\text{mol / dk}}{\text{Enzim miktarı (mL)}}$$

$$\text{Total Aktivite (U)} = \text{Hacimsel Aktivite } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) \times \text{Total Hacim}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Hacimsel Aktivite (U/mL)}}{\text{mg protein /mL}}$$

3.2.4. Lipaz Damgalı ve Damgasız Hidrojellerin Hazırlanması

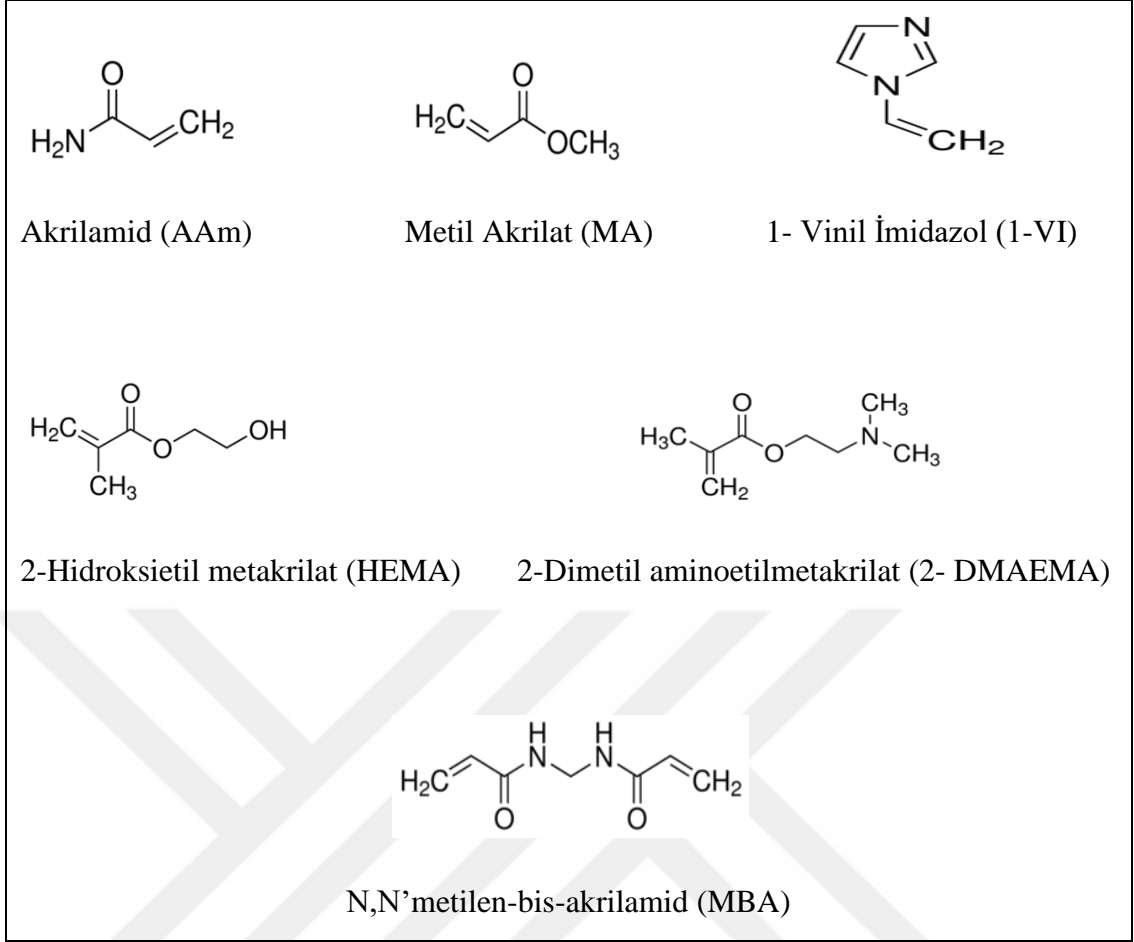
AAM, HEMA, 1-VI, MA, 2-DMAEMA gibi farklı fonksiyonlara sahip yardımcı monomerler kullanılarak moleküler damgalı (MIP) ve damgasız (NIP) olmak üzere farklı yapıda hidrojeller hazırlandı (Tablo 3.2.).



Şekil 3.2. Farklı monomerler kullanılarak hazırlanan hidrojeller

Tablo 3.3. Farklı monomerler kullanarak hidrojel sentezleme

	MIP <i>Damgalı hidrojel</i>	NIP <i>Kontrol hidrojel</i>
<i>Kalıp Molekül</i> <i>Lipaz</i>	10 mg	-
<i>Fosfat Tamponu</i> (0,05 M, pH 7.0)	1 mL	1 mL
<i>Monomer</i> AAm AAm-1-VI AAm-MA AAm-HEMA AAm-2-DMAEMA	0,76 mmol (54 mg)	0,76 mmol (54 mg)
<i>Çapraz Bağlayıcı</i> N,N'-metilen-bis- akrilamid (MBA)	0,039 mmol (6 mg)	0,039 mmol (6 mg)
<i>Reaksiyon Başlatıcı</i> Amonyum Persülfat (APS)	% 10 (w/v) 20 µl	% 10 (w/v) 20 µl
<i>Hızlandırıcı</i> N,N,N',N'- tetrametiletildiamin (TEMED)	% 5 (v/v) 20 µl	% 5 (v/v) 20 µl

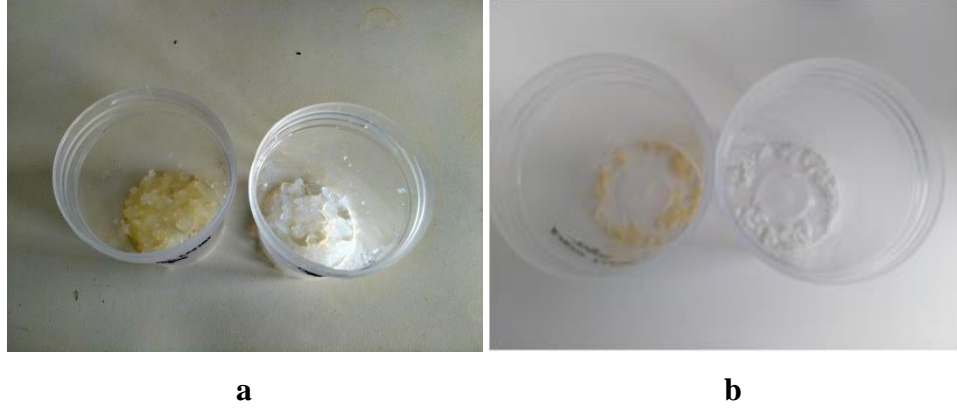


Şekil 3.3. Hidrojel hazırlanmasında kullanılan fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcının yapısı

3.2.5. Kalıp Molekülün Hidrojelden Uzaklaştırılması

MIP hidrojelden kalıp molekül lipazın elüsyonu önce (SDS) (%10 (w/v)) - (CH₃COOH) (%10 (v/v)) çözeltisi ile daha sonra saf su ile yapıldı. NIP hidrojeller için ise yıkama işlemi sadece saf su ile yapıldı. Böylece reaksiyona girmemiş monomerler ortamdan uzaklaştırıldı. Kalıp molekülün hidrojelden uzaklaşması 280 nm'de alınan ölçümler ile izlendi.

Yıkamış olan moleküler damgalı ve kontrol hidrojeller 24 saat boyunca 50 °C'de etüvde kurutuldu (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Yıkanmış ve yıkanmamış hidrojeller **a)** Yıkanmış MIP ve NIP hidrojeller, **b)** Kurutulmuş MIP ve NIP hidrojeller

3.2.6. Protein Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu

Geri bağlama çalışmaları için lipaz damgalı ve damgasız hidrojellerden 10 mg tartıldı daha sonra üzerine 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan lipaz çözeltisinden 1 mL ilave edildi. 90 dakika inkübasyonda bırakıldı ve sonrasında 10 dk 10000 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernatantta Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı ve tutunmayan protein miktarı belirlendi. Başlangıç lipaz çözeltisinin konsantrasyonundan çıkarılarak tutunan protein miktarı elde edildi. Farklı monomerler kullanılarak hazırlanan hidrojeller için adsorpsiyon kapasiteleri (q_e), damgalama etkinlikleri (IF) ve seçicilik faktörleri (R) bulundu. En verimli sonucu veren hidrojel üzerinden optimizasyon çalışmaları yapıldı.

➤ Adsorpsiyon kapasitesi ; $q_e = \frac{(C_0 \cdot V_0 - C_e \cdot V)}{W_d}$

- W_d (g): Hidrojel miktarı
- C_0 (mg/mL): Başlangıç enzim konsantrasyonu
- C_e (mg/mL): Süpernatanttaki protein konsantrasyonu
- V_0 (mL): Hidrojeller üzerine eklenen enzim çözeltisinin hacmi
- V (mL): Geri bağlama sonrası enzim çözeltisinin hacmi

➤ Damgalama etkinliği; $IF = q_e (\text{MIP}) / q_e (\text{NIP})$

3.2.7. Lipazın MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu

3.2.7.1. Sürenin Etkisi

Optimum inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için 30-180 dakika aralıklarında geri bağlama çalışmaları yapıldı. Lipaz damgalı ve damgasız hidrojellerden 10 mg alınarak üzerine 5 mg/mL olarak hazırlanan enzim çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Örnekler belirlenen zaman aralıklarında inkübe edildikten sonra santrifüjlendi. Geri bağlanan protein miktarı Bradford yöntemi ile hesaplandı ve optimum inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.7.2. pH Etkisi

Enzimler, elektrolit karakterli olduklarından, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir. Lipaz enziminin NIP ve MIP hidrojellere geri bağlanmasında pH etkisini incelemek amacıyla pH 3.0 – pH 8.0 aralığında 0,05 M olacak şekilde asetat (pH 3.0 – 4.0), sitrat (pH 5.0 – 6.0), fosfat (pH 6.0 – 7.0), Tris-HCl (pH 7.0 – 8.0) olmak üzere farklı tamponlar hazırlandı. MIP ve NIP hidrojellerden 10 mg alınarak, üzerine 5 mg/mL olacak şekilde her bir tamponla ayrı ayrı hazırlanmış olan lipaz çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Belirlenen sürede inkübe edildikten sonra santrifüj yapıp üst faz ölçümü alındı. Hesaplanan protein miktarlarından yola çıkılarak optimum pH değerleri belirlendi.

3.2.7.3. Sıcaklık Etkisi

Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla 25-55 °C aralığında değişen sıcaklıklarda MIP ve NIP hidrojeller için geri bağlama çalışmaları gerçekleştirildi. MIP ve NIP hidrojellerden 10 mg alınarak, 5 mg/mL lipaz çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Belirlenen optimum pH ve optimum sürede yapılan çalışmada, hesaplanan protein miktarlarından yola çıkılarak optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.2.7.4. Lipaz Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum enzim konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, lipazın 1-6 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda enzim çözeltileri hazırlandı. 10 mg tartılan MIP ve NIP hidrojellerin üzerine farklı konsantrasyondaki enzim çözeltilerinden 1 mL eklendi. Belirlenen sürede inkübe edildikten sonra santrifüjlendi ve üst faz ölçümleri alındı. Hesaplanan protein miktarlarından yola çıkılarak optimum konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.2.8. Adsorpsiyon İzotermi

Sabit sıcaklıkta adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı ile denge basıncı veya derişimi arasındaki bağıntıya adsorpsiyon izotermi adı verilmektedir. Adsorplanan maddenin miktarı, adsorplanacak maddenin özelliklerine, derişimine ve sıcaklığına bağlı olarak değişim göstermektedir [32]. Optimum koşullar belirlendikten sonra elde edilen verilerin Langmuir-Freundlich izotermine uygunlukları araştırıldı.

3.2.9 Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorplanan madde-adsorban temas süresi belirlenebildiği gibi, adsorpsiyon işleminin hızının adsorpsiyonun hangi basamağı tarafından belirlendiği de anlaşılabilir. Bir çözeltide bulunan adsorbatın adsorbent tarafından adsorplanması 4 temel aşamada gerçekleşir: [33,34,35].

1. Adsorbat, adsorbenti kapsayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur. Adsorpsiyon işlemi sırasında belirli bir hızla karıştırma işlemi yapıldığından bu aşama göz önünde bulundurulmaz.

2. *Sınır tabakası difüzyonu*: Film tabakasına gelen adsorbat buradaki durgun kısımdan ilerleyerek adsorbentinpor yapısına doğru nüfuz eder.

3. *Parçacık içi difüzyon*: Bu aşama da adsorbatadsorbentin gözenek boşluklarında hareket ederek tutunacağı yüzeye doğru ilerler.

4. *Sorpsiyon*: Bu aşamada adsorbatadsorbentin gözenek yüzeyine tutunur.

Zamana karşı adsorblanan madde miktarı yalancı birinci derece, yalancı ikinci derece ve parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modelleri ile incelendi. Kinetik parametreler hesaplandı ve adsorpsiyonun hangi kinetik modele uygun olduğu belirlendi.

3.2.10. Adsorpsiyon Termodinamiği

Literatüre göre adsorpsiyonun gerçekleşebilmesi için gereken enerjilerin iki farklı yolla hesaplanabildiği ifade edilmektedir:

- Adsorpsiyonda, adsorplanan madde birikim ile daha düzenli hale geçtiği için entropi azalmaktadır. Adsorpsiyonun kendiliğinden gerçekleşebilmesi için adsorpsiyon olayının ekzotermik olması gerekmektedir [36].
- Adsorplanan maddenin adsorpsiyon davranımı Langmuir adsorpsiyon izoterminden de hesaplanabilmektedir.

3.2.11. MIP ve NIP Hidrojelin Seçimliliğinin İncelenmesi

MIP ve NIP hidrojelin seçimliliğinin incelenmesi amacıyla geri bağlama çalışması farklı proteinler ile gerçekleştirildi. 0,05 M pH 7.0 fosfat tamponunda 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan α -amilaz, β -glukozidaz ve BSA çözeltilerinden 1 mL alınarak MIP ve NIP hidrojeller üzerine uygulandı ve bağlanan protein miktarları tayini edildi.

3.2.12. Şişme Karakterizasyonu

MIP ve NIP hidrojellerin şişme kapasitelerini belirlemek amacıyla, 10 mg tartılan hidrojellere oda sıcaklığında belirli zaman aralıklarında (15-120 dk) 1 mL (0.05 M) pH 3.0 asetat ve pH 7.0 fosfat tampon çözeltileri ayrı ayrı ilave edilerek karıştırıcıya bırakıldı. Belirlenen her süre sonrasında karıştırıcıdan alınan hidrojellerin dışında kalan sıvı süzgeç kağıdı yardımıyla çekildi ve hidrojellerin tartımı alındı. Şişme kapasitesi dengeye gelene kadar aynı işlemlere devam edildi.

3.2.13. Tekrar Kullanılabilirlik Testi

MIP ve NIP hidrojellerin tekrar kullanılabilirliklerini test etmek amacıyla aynı hidrojeller üzerinden optimum koşullarda 5 defa geri bağlama çalışmaları yapıldı. Her geri bağlama sonrasında hidrojellerin rejenerasyonu amacıyla, MIP ve NIP hidrojeller (SDS) (%10 (w/v)) - (CH₃COOH) (%10 (v/v)) çözeltisi sonrasında saf su ile yıkandı. Kurutulduktan sonra geri bağlama işlemlerine devam edildi. Bradford yöntemine göre her bir aşamadaki hidrojele tutunan protein miktarı tespit edildi.

3.2.14. Spektroskopik Karakterizasyon

3.2.14.1. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FTIR)

FTIR Spektrum Cihazı organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılır. IR bölgesi elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile mikro dalga bölgesi arasında yer alır. Bu bölge 4000-4500 cm⁻¹ dalga boyu arasındadır. IR spektrumu organik maddenin yapısı ile ilgili bilgiler sağlamaktadır.

MIP ve NIP hidrojellerin FTIR spektrumunun alınması için hidrojellerin yıkanmış ve yıkanmamış halleri kurutulduktan sonra toz haline getirildi. Kurutulmuş hidrojeller (1 mg), KBr (100 mg) olmak üzere homojen bir karışım elde edildi ve 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu alındı.

3.2.14.2. Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM)

Tarayıcı Elektron Mikroskobu, katıların yüzeylerini elektron ışınları ile tarayarak görüntülerini veren bir elektron mikroskobudur. Yüzeydeki elektriksel aktivite, örneklerin Tarayıcı Elektron Mikroskobu ile tanımlanması için en önemli etkidir. Buna bağlı olarak bazı numuneler hazırlanırken iyonlaşmadan korumak amacıyla altın ile kaplanırlar.

MIP ve NIP hidrojenlerin SEM ölçümlerinin alınabilmesi amacıyla yıkanmış ve yıkanmamış hidrojenler ayrı ayrı kurutulup toz haline getirildi. SEM ölçümleri hizmet alımı karşılığında yaptırıldı.

3.2.15. Farklı Pankreatik Enzimleri İçeren Tabletten Lipaz Enziminin Seçimli Olarak Ayrılması

3.2.15.1. Örneklerin Hazırlanması

İçerisinde farklı enzimler bulunduran (lipaz, amilaz ve proteaz) tablet içerisinden seçimli olarak lipaz enziminin ayrılmasını test etmek amacıyla tablet toz haline getirildi ve üzerine 15 mL tampon çözelti ilave edildi. Santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvıda aktivite ve protein tayini yapıldı. Daha sonra üst fazdan 1 mL alınarak NIP ve MIP hidrojenlerine uygulandı. Alınan üst sıvılardan tekrar aktivite ve protein tayini yapıldı. Tutunan lipazın desorpsiyonu için tampon çözelti ilave edilerek yapılan çalışmada üst fazdan alınan ölçümler sonucunda protein ve aktivite hesaplamaları yapıldı. Hazırlanmış olan tablet üst faz, geri bağlama ve desorpsiyon üst sıvıları SDS-PAGE elektroforezinde uygulandı.

3.2.15.2. SDS-PAGE Elektroforez Uygulaması

▪ *SDS-PAGE İçin Kullanılan Tampon Çözeltiler*

- ❖ Yükleme jeli tamponu: (0.5 M Tris-HCl, pH 6,8)
- ❖ Ayırma jeli tamponu: (1.5 M Tris-HCl, pH 8,8)
- ❖ % 10 SDS: 10 g SDS 90 mL saf su içerisinde çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- ❖ Akrilamid/N'-N'-metilenbisakrilamid (AAM/MBA): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g metilenbisakrilamid saf su içerisinde çözülüp karıştırıldıktan sonra hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- ❖ Yürütme (elektrot) tamponu (10x elektrot tamponu pH 8,3): 30,3 g Tris, 144 g glisin, 10 g SDS çözeltileri 1 litre saf su içerisinde çözüldü. Bu çözeltilerden 50 mL alınıp, 500 mL'ye tamamlanarak tampon seyreltilmiş olarak hazırlandı.

- ❖ Örnek uygulama tamponu: Saf su, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, gliserol, % 10 (w/v) SDS, % 0,5 (w/v) brom fenol blue)
- ❖ % 10 Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 mL saf su içerisinde çözüldü. (Kullanım öncesi taze olarak hazırlandı).
- ❖ Boya uzaklaştırma (Destain) çözeltisi: % 40 (v/v) Metanol ve % 10 (v/v) Asetik asit çözeltisi ile hazırlandı. 400 mL metanol üzerine 100 mL asetik asit çözeltisi ilave edildi ve hacim 1000 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- ❖ Boyama (Stain) çözeltisi: % 0,05 Coomassie Brilliant Blue R 250, % 10 (v/v) Asetik asit, % 40 (v/v) Metanol çözeltisi ile hazırlandı.
- ❖ Yıkama Çözeltisi: % 7'lik asetik asit çözeltisi hazırlandı. 70 mL asetik asit alınarak hacim 1000 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- ❖ Protein standartları: Protein standardının (Sigma Marker widerange) içerisinde Albümin (M_A: 66000 Da), Albümin EGG (M_A: 45000 Da), Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (M_A: 36000 Da), Karbonik anhidraz (M_A: 29000 Da), Tripsinojen (M_A: 24000 Da), Tripsin (M_A: 20100 Da), α-Laktalbumin (M_A: 14200 Da) bulunmaktadır.

▪ ***Poliakrilamid (Ayrırma ve Düzenleyici) Jellerin Hazırlanması***

SDS-PAGE de % 12 ayırma (separating) ve % 4'lük düzenleyici (stacking) jeller kullanıldı. Cam plaklar öncelikle metanolle temizlendi daha sonra birbirlerine sabitlenecek şekilde üst üste tutturuldu ve yürütme tankına yerleştirildi. Ayırma jeli iki cam arasına aktarıldı. Faz ayırımının sağlanması için üzerine 2 mL bütanol ilave edildi ve jel donmak üzere bekletildi. Düzenleyici jel dökülmeden önce üstte kalan bütanol geri alındı ve iki camın en üst seviyesine kadar pipet yardımı ile düzenleyici jel konuldu.

Tablo 3.4. Ayırma ve düzenleyici jellerin hazırlanışı

	<i>%12'lik Ayırma Jeli</i>	<i>%4'lük Düzenleyici Jel</i>
Saf su	6,8 mL	6,1 mL
(AAm/MBA)	8 mL	1,3 mL
Jel Tamponu	5 mL	2,5 mL
% 10 SDS	0,2 mL	0,1 mL
% 10 APS	100 μ L	50 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

Hazırlanan örneklerinin yüklenebilmesi için tarak yardımıyla jelde yükleme kuyucukları oluşturuldu. 1 gece bekletildi ve polimerleşme sağlandı. Daha sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı.



Şekil 3.5. Tez çalışmasında kullanılan elektroforez düzeni

▪ **Örnek Tamponunun Hazırlanması**

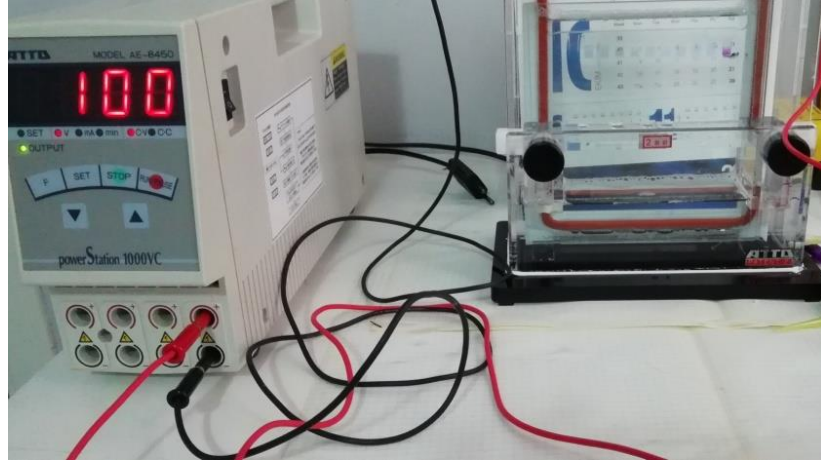
Tablo 3.5. Örnek tamponunun hazırlanışı

β -merkaptotanol	50 μ L
0,5 M pH 6,8 Tris-HCl	1,25 mL
Gliserol	2,5 mL
% 10 SDS	2 mL
% 0,5 Brom Fenol Blue	0,2 mL
Saf su	3,55 mL

Örnekler kuyucuklara uygulanmadan önce 950 μ L örnek tamponundan alınarak 50 μ L β -merkaptotanol eklendi. 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan örnekler, örnek tamponu ile 1:2 oranında seyreltildi ve 5 dk kaynatılıp soğutulduktan sonra kuyucuklara uygulandı.

▪ **Protein Örneklerinin Poliakrilamid Jelde Yürütülmesi**

Protein örnekleri (50 μ L) ve standart proteinleri (20 μ L) kuyucuklara uygulandıktan sonra birbirine tutturulmuş olan camların üstünü geçecek şekilde elektrot (yürütme) tamponu koyuldu. Daha sonra elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlandı ve akım 100 V ayarlandı. Protein örnekleri jelin en alt kısmına inene kadar akım verilmeye devam edildi. Belirlenen yere ulaşıldığı anda akım durduruldu ve jel camların arasından spatül yardımıyla alındı.



Şekil 3.6. Poliakrilamid jelde protein örneklerinin yürütülme işlemi

▪ ***Poliakrilamid Jeldeki Protein Bantlarının Görüntülenmesi***

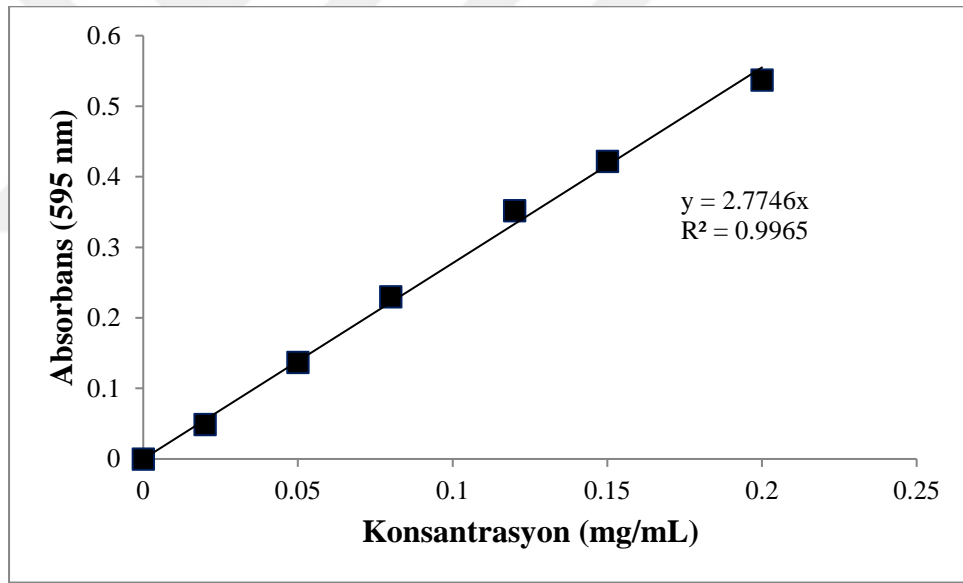
Elektroforez sisteminden çıkarılan jel bantların görünürlüğüne sağlamak amacıyla öncelikle %40 metanol + %10 asetik asit çözeltisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra bantların boyanması için boya çözeltisinde 24 saat boyunca bırakıldı. Protein bantının dışında kalan bölgenin boyasının giderilmesi için %7'lik asetik asit çözeltisinde bekletilerek belirli zaman aralıklarında sıvısı değiştirilerek yıkama gerçekleştirildi. Jelin rengi boyadan arındığında yıkama işlemine son verildi. Protein bantları gözlemlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Protein ve Aktivite Standart Grafikleri

4.1.1. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması

Standart Protein Eğrisi için; Sığır Serum Albüminin (BSA) saf su ile 1 mg/mL'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,02-0,2 mg/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Daha sonra bu protein çözeltilerinden 0,1 mL alınıp üzerlerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk beklendi ve 595 nm'de spektrofotometrik ölçümleri alındı. Elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyonlara karşı grafiği çizildi ve standart protein eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.1).

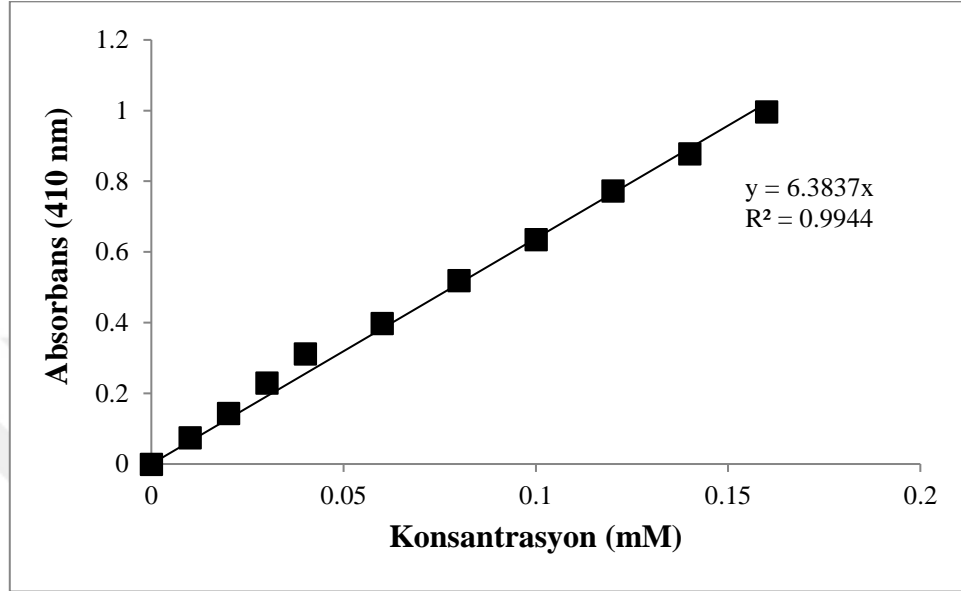


Şekil 4.1 Protein standart grafiği

4.1.2. p-Nitrofenol Standart Eğrisinin Oluşturulması

p-Nitrofenol standart grafiği oluşturmak için 0,01 mM-0,16 mM aralığında p-nitrofenol çözeltileri hazırlandı. Çözeltileri hazırlamak için tampon olarak; 200 mg Triton X-100 üzerine 50 mg gum arabik, 25 mL pH 7,0 (0,05 M) fosfat tamponu ilave edildi ve 9:1 oranında olacak şekilde propanol ile karıştırıldı. Hazırlanan p-

nitrofenol çözeltilerinin üzerine %1 (w/v)'lik Tris çözeltisinden 1000 µL ilave edilerek 410 nm'de ölçümü alındı. Elde edilen absorbans değerlerine karşı konsantrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. p-Nitrofenol Standart Grafiği

4.2. Farklı Monomerlerle Hazırlanan Hidrojellerin Lipaz Geri Bağlama Etkinliğinin Karşılaştırılması

Moleküler damgalamada fonksiyonel monomer seçimi büyük önem taşır çünkü fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimler MIP'lerin afinitesini belirler. Etkileşim sayısı ne kadar fazla ise o kadar iyi sonuç alınır. Dikkat edilmesi gereken bir noktada hedef molekülün veya analoglarının geri bağlanmasının hızlı bir şekilde gerçekleşmesidir. İyonik etkileşimlere ve hidrojen bağ oluşumuna dayanan etkileşimler ile bu sağlanabilir [37].

Genellikle moleküler damgalama çalışmalarında tek fonksiyonel monomer seçilmesine rağmen iki veya daha fazla fonksiyonel monomerin aynı anda kullanımı da tanıma kapasitesinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında ikili monomer sistemlerinin kullanıldığı damgalı polimerlerde, polimerlerin daha iyi tanıma özelliği gösterdiği rapor edilmiştir. Buna dayanarak, tez

çalışmasında AAm ile birlikte farklı monomer kombinasyonları ile MIP ve NIP polimerler hazırlandı. Polimerlerin lipazı bağlama ilgisi test edildi.

Tez çalışmasında; AAm, 1-VI, MA, HEMA, 2-DMAEMA gibi farklı fonksiyonlara sahip monomerler kullanılarak MIP ve NIP hidrojeller hazırlandı. Hazırlanan bu hidrojeller için lipaz geri bağlama çalışmaları pH 3,0 (0,05 M asetat), pH 7,0 (0,05 M fosfat) ve pH 8,0 (0,05 M Tris-HCl) olmak üzere farklı pH ortamlarında gerçekleştirildi. Üç farklı pH değerinde yapılan geri bağlama çalışmasında MIP hidrojeller ve NIP hidrojeller üzerinde tutunan protein miktarları hesaplandı. Buna göre geri bağlama çalışmalarında, pH farklanmasının hidrojellerin protein tutma kapasitesinin belirlenmesinde oldukça etkili olduğu görüldü (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Farklı monomerlerle hazırlanan hidrojellerin farklı pH değerlerindeki lipaz geri bağlama etkinliğinin karşılaştırılması

pH	Monomer	MIP (mg/g)	NIP (mg/g)	IF (qMIP/qNIP)
pH 3	AAm	19,17	7,86	2,44
pH 7		8,34	3,35	2,48
pH 8		2,87	1,47	1,95
pH 3	AAm-1-VI	17,8	4,53	3,93
pH 7		3,9	3,7	1,05
pH 8		15,96	11,16	1,43
pH 3	AAm-MA	23,48	4,49	5,23
pH 7		2,7	1,6	1,68
pH 8		11,43	10,5	1,08
pH 3	AAm-2-DMAEMA	15,3	17,05	0,89
pH 7		5,8	3,63	1,59
pH 8		11,65	9,1	1,28
pH 3	AAm-HEMA	13,4	8,24	1,62
pH 7		4,6	3,6	1,27
pH 8		4,74	3,16	1,5

Moleküler damgalı polimerlerin hazırlanmasında, monomer-monomer etkileşimini minimuma indirmek için AAm ve HEMA gibi nötral fonksiyonel monomerler kullanılmaktadır [37]. AAm ve HEMA monomerlerinin hidrojen bağı yapma kapasitesi yüksektir. HEMA monomeri hidrofilik karakterde, minimum düzeyde spesifik olmayan protein etkileşimleri sağlayan, yüksek kimyasal ve mekanik kararlılığı ve mikrobiyal ve enzimatik saldırılara karşı dayanıklı olan bir monomerdir [38,39,40].

1-vinil imidazolün bağlama özelliği imidazol halkasındaki 3 no'lu pozisyonunda bulunan elektron donoru azot atomundan kaynaklanmaktadır. İmidazol halkası önemli bir amino asit olan histidine bulunur. Polimerik imidazollerin bazikliği ($pK_{BH^+} = 5-6$) kuvvetli baz olan aminler ile zayıf bazik amidler ve eterler arasındadır. Aminlerden farklı olarak imidazol birimleri düşük pH'larda tamamen protonlanmazlar, hidrojen ve donör-akseptör bağlanmasında oldukça aktiftirler [41]. Bundan dolayı fizyolojik pH aralığında, imidazol içeren poliamfolitler spesifik olarak biyolojik aktif bileşiklerin dizaynı ve biyoseparasyon metotlarında kullanılır.

AAm, AAm-1-VI, AAm-MA monomerleri hazırlanan damgalı olmayan hidrojellerde tutunan protein miktarının düşük, damgalı hidrojellerde ise daha yüksek miktarda protein bağlandığı görülmektedir. Hesaplanan IF değerlerine göre, bu hidrojellerin lipazın seçimli ayırımında kullanılabileceğini göstermektedir. Hidrojeller üzerinde tutunan protein miktarlarına göre damgalama etkinliği IF ($qMIP/qNIP$) yüksek olan AAm (pH 3 ve 7), AAm-1-VI (pH 3,0) ve AAm-MA (pH 3,0) monomerleriyle hazırlanan hidrojeller ile çalışmalara devam edildi. IF, iki molekül arasındaki denge assosiyasyonu veya dissosiyasyonunun oranlanmasıyla belirlenir. Nonkovalent damgalı polimerler için IF değerinin 1,1'in üzerinde olması beklenir. Yüksek assosiyasyon sabitine sahip damgalı polimerler yüksek seçicilik gösterirler [42].

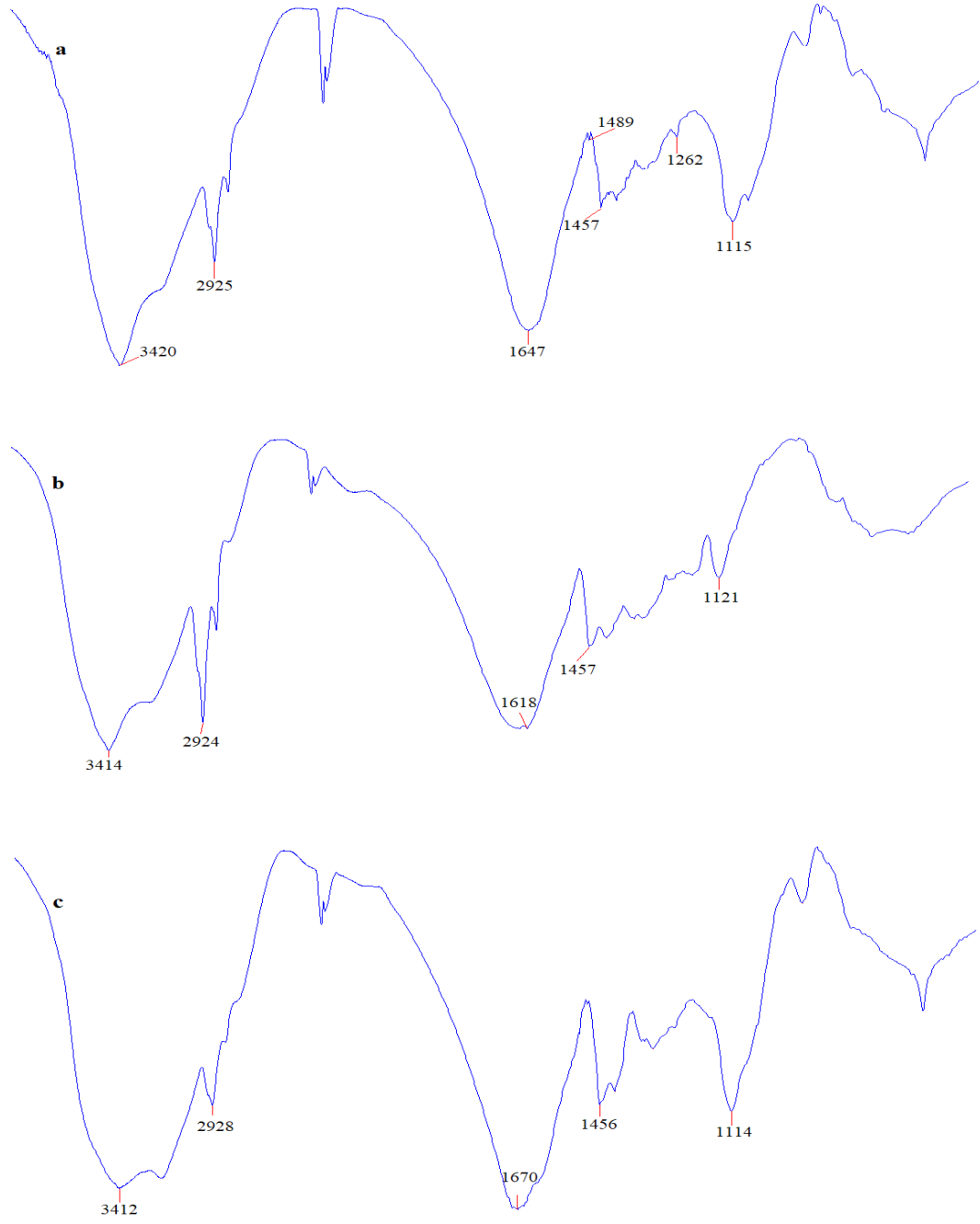
Mosbach akrilamidin polar çözügenlerin kullanıldığı durumlarda alternatif olarak kullanılabileceğini ve MIP'in daha iyi tanıma özelliği gösterebileceğini belirtmiştir. Yaptıkları çalışmada bazı durumlarda AAm bazlı MIP'lerin bazik monomer 4-Vpy veya 4-Vpy'in MAA ile kombinasyonu ile hazırlanan MIP'lerden daha iyi tanıma özelliği gösterebileceğini rapor etmişlerdir. Bunun nedeni AAm'nın

amid grubunun dielektrik sabitinin ve dipol momentinin daha fazla olmasından dolayı MAA'nın karboksil grubundan daha kuvvetli hidrojen bağı yapması olarak açıklanmıştır [43,44,45].

4.3. Spektroskopik Karakterizasyon

4.3.1. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FTIR)

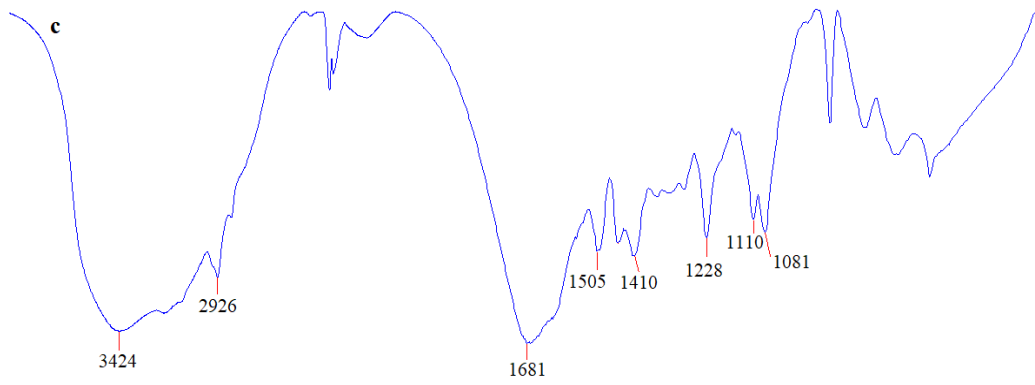
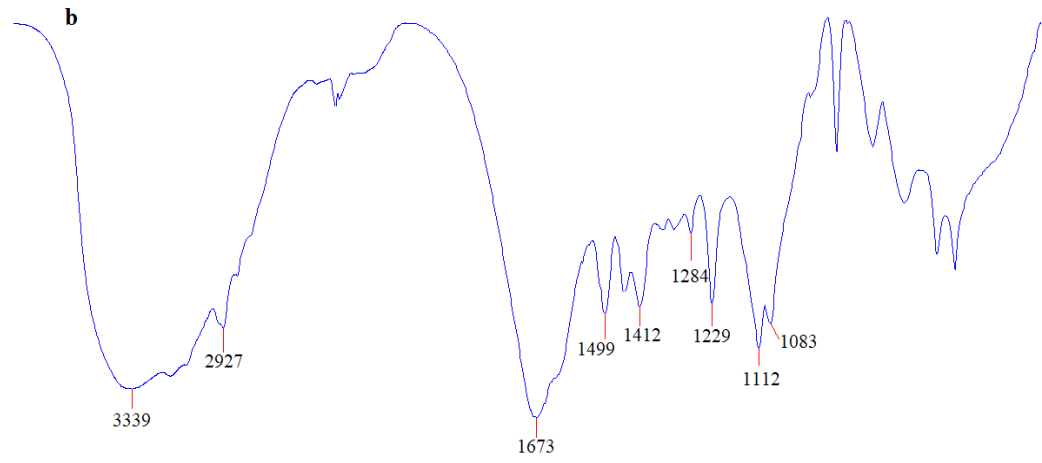
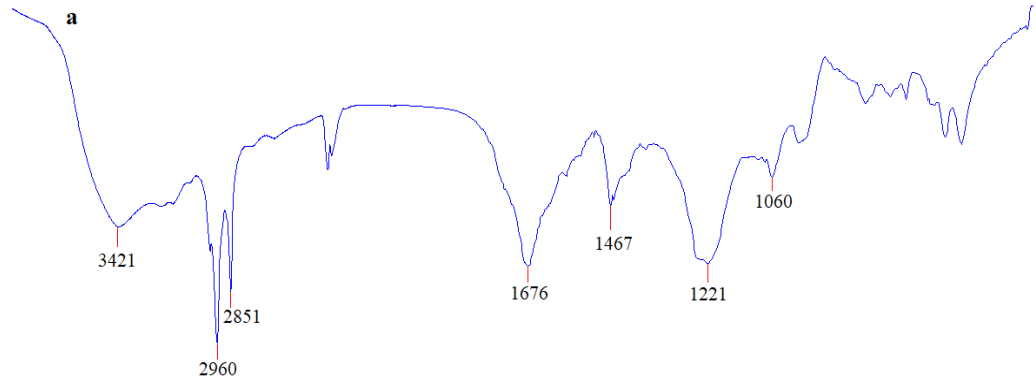
AAM, AAM-VI ve AAM-MA olmak üzere farklı monomerlerle hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları Fourier Transform Kızılötesi spektrometresi (FTIR Perkin Elmer spektrumu BX) ile görüntüledi. FTIR spektrumları 4000-400 cm^{-1} aralığında alındı. MIP ve NIP hidrojellerin FTIR spektrumları Şekil 4.3 - 4.4 ve 4.5 'de verildi.



Şekil 4.3. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojenlerin IR spektrumları **a)** Yıkanmamış MIP, **b)** Yıkanmış MIP, **c)** NIP Hidrojel

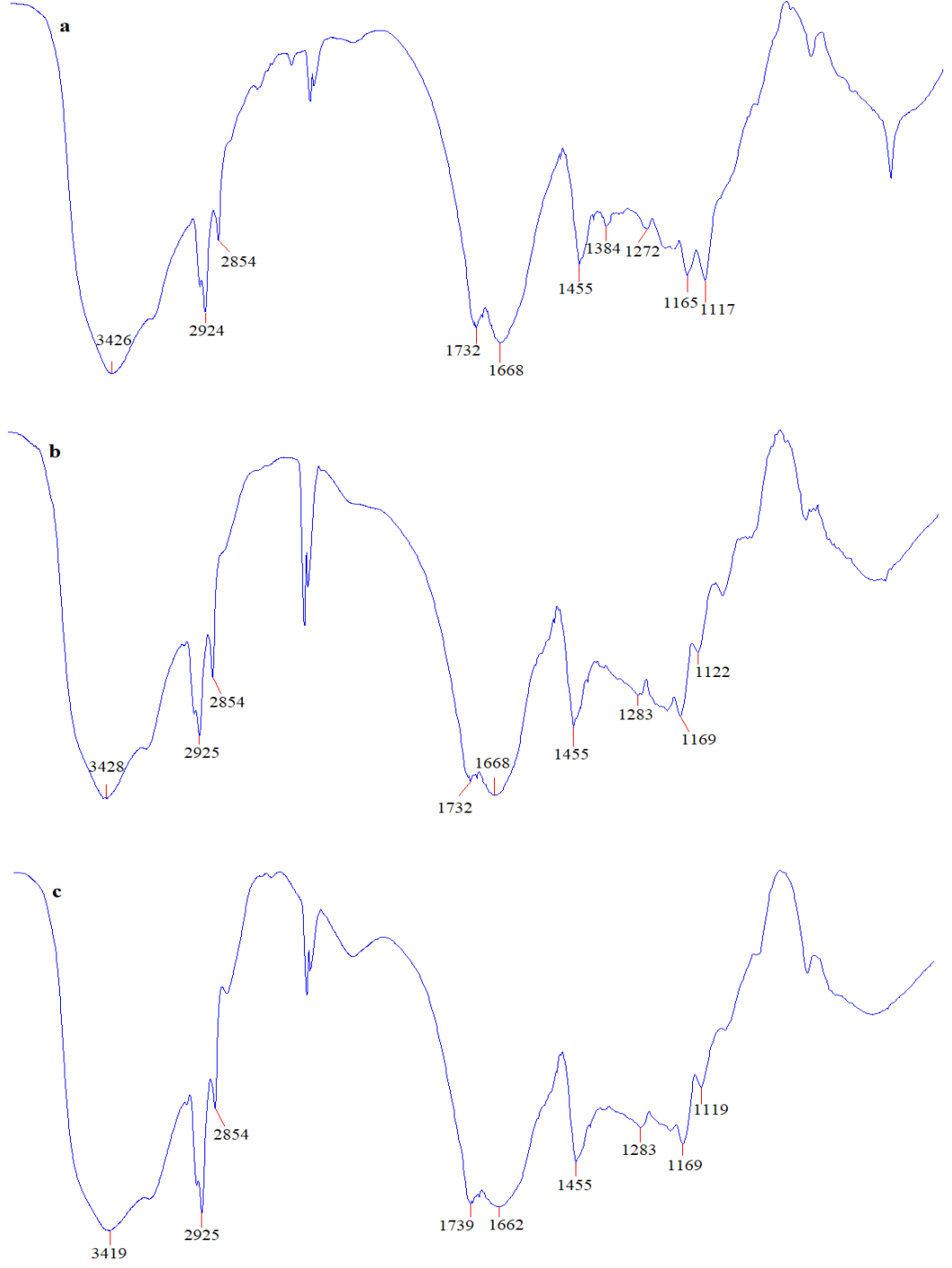
AAm içeren hidrojellerde 3500-3200 cm^{-1} arasındaki dalga boyları CONH_2 gruplarını göstermektedir. FTIR verilerine göre yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve NIP hidrojeller için değerlendirme yapıldığında 3500-3400 cm^{-1} arasındaki dalga boyları bu durumu doğrulamaktadır. 2900-2700 cm^{-1} aralığında görülen dalga boyları ise çapraz bağlama ajanının (N,N metilen bisakrilamid) varlığında meydana gelen CH_2 gerilme titreşimlerinin simetrik ve asimetric gerilmesine ait C-H gruplarını göstermektedir. 1600 cm^{-1} 'lerde görülen grup ise akrilamidin C=O gerilim bandına ait spektrumdaki en kuvvetli bölgedir. 1400-1000 cm^{-1} arasında görülen titreşimler ise C-N gerilme titreşimleridir. Yıkanmamış MIP hidrojelde akrilamid ve çapraz bağlayıcının verdiği piklerin dışında 1262 cm^{-1} dalga boyunda görülen titreşimler yapıya lipazın katıldığını göstermektedir.





Şekil 4.4. AAm-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları **a)** Yıkanmamış MIP, **b)** Yıkanmış MIP, **c)** NIP Hidrojel

AAm-VI monomerleri ile hazırlanan hidrojellerin IR spektrumları incelendiğinde, AAm varlığından kaynaklı $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalga boyları CONH_2 gruplarını göstermektedir. FTIR verilerine göre yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve NIP hidrojeller için değerlendirme yapıldığında $3500-3400\text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalga boyları bu durumu doğrulamaktadır. $2900-2700\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen dalga boyları ise çapraz bağlanma ajanının (N,N metilen bisakrilamid) varlığında meydana gelen CH_2 gerilme titreşimlerinin simetrik ve asimetric gerilmesine ait C-H gruplarını göstermektedir. 1600 cm^{-1} 'lerde görülen grup ise akrilamidin C=O gerilim bandına ait spektrumdaki en kuvvetli bölgedir. Yıkanmış MIP ve NIP hidrojellerde sırasıyla 1499 ve 1505 cm^{-1} 'de görülen dalga boyları ise C=N gerilme titreşimlerini göstermekle birlikte yapıdaki vinil imidazol varlığını kanıtlamaktadır. $1400-1000\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen titreşimler ise C-N gerilme titreşimleridir. Yıkanmamış MIP hidrojelde akrilamid, vinil imidazol ve çapraz bağlayıcının verdiği piklerin dışında 2851 ve 1467 cm^{-1} dalga boyunda görülen titreşimler yapıya lipazın katıldığını göstermektedir.

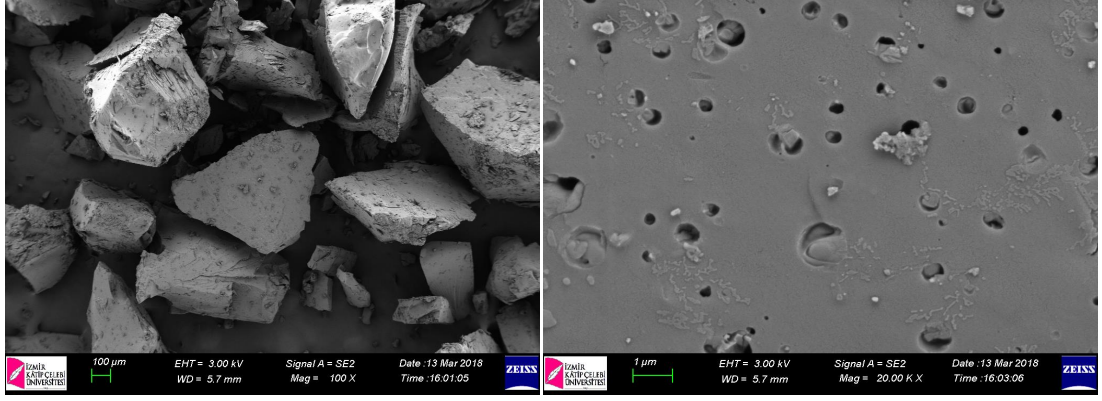


Şekil 4.5. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojenlerin IR spektrumları a) Yıkanmamış MIP, b) Yıkanmış MIP, c) NIP Hidrojel

AAm-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojenlerin IR spektrumları incelendiğinde, AAm varlığından kaynaklı $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalga boyları CONH_2 gruplarını göstermektedir. FTIR verilerine göre yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve NIP hidrojenler için değerlendirme yapıldığında $3500-3400\text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalga boyları bu durumu doğrulamaktadır. $2900-2700\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen dalga boyları ise çapraz bağlanma ajanının (N,N metilen bisakrilamid) varlığında meydana gelen CH_2 gerilme titreşimlerinin simetrik ve asimetrik gerilmesine ait C-H gruplarını göstermektedir. 2854 cm^{-1} de oluşan dalga boyu metil akrilamid monomerinin metoksi (OCH_3) grubunu göstermektedir. 1700 cm^{-1} 'lerde görülen grup ise akrilamid ve metil akrilamidin $\text{C}=\text{O}$ gerilim bandına ait spektrumdaki en kuvvetli bölgedir. 1600 cm^{-1} 'lerde görülen dalga boyu ise metil akrilamid kaynaklı $\text{C}=\text{C}$ gerilme titreşimleridir. $1400-1000\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen titreşimler ise C-N gerilme titreşimleridir. Yıkanmamış MIP hidrojenelde akrilamid, metil akrilat ve çapraz bağlayıcının verdiği piklerin dışında 1384 cm^{-1} dalga boyunda görülen titreşimler yapıya lipazın katıldığını göstermektedir.

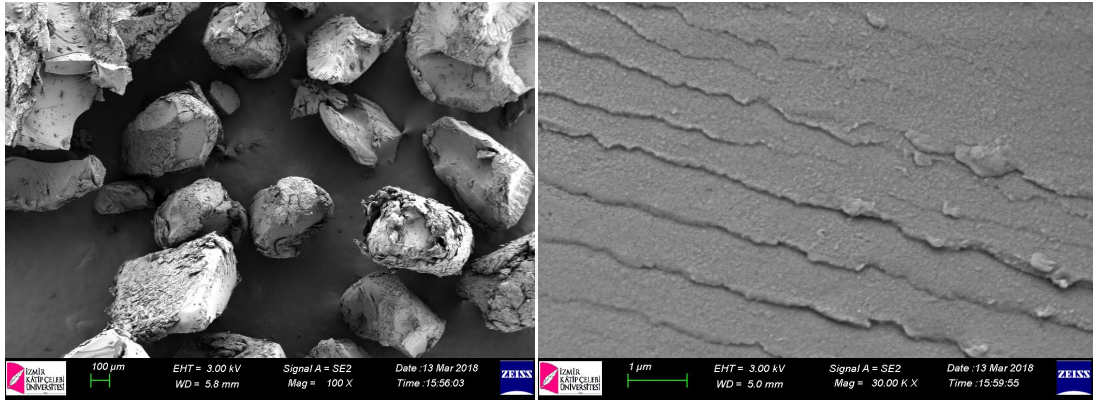
4.3.2. Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM)

AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojenlerin yüzey morfolojisini incelemek için SEM görüntüleri alındı. Şekil 4.6. incelendiğinde, hidrojenlerin gözenekli bir yapıya sahip oldukları, MIP ve NIP hidrojenler için yıkama sonrası gözenekli yapının daha pürüzlü hale geldiği görülmektedir.



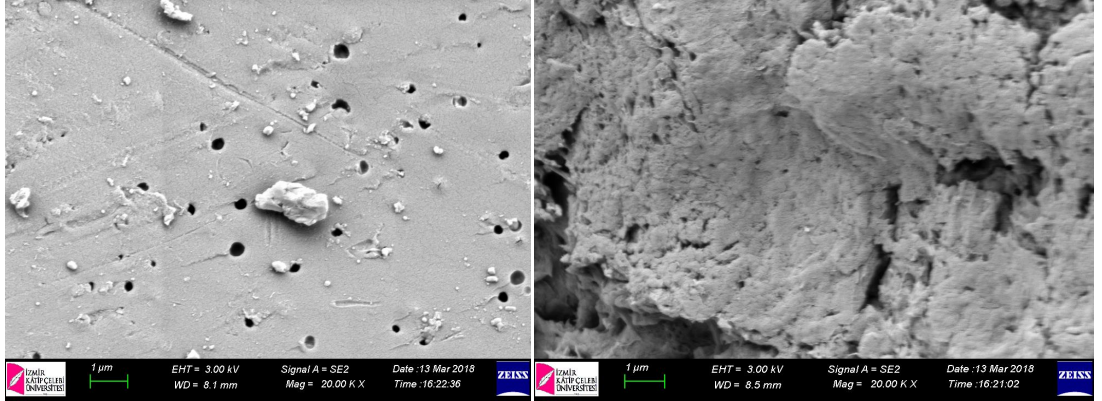
a

b



c

d



e

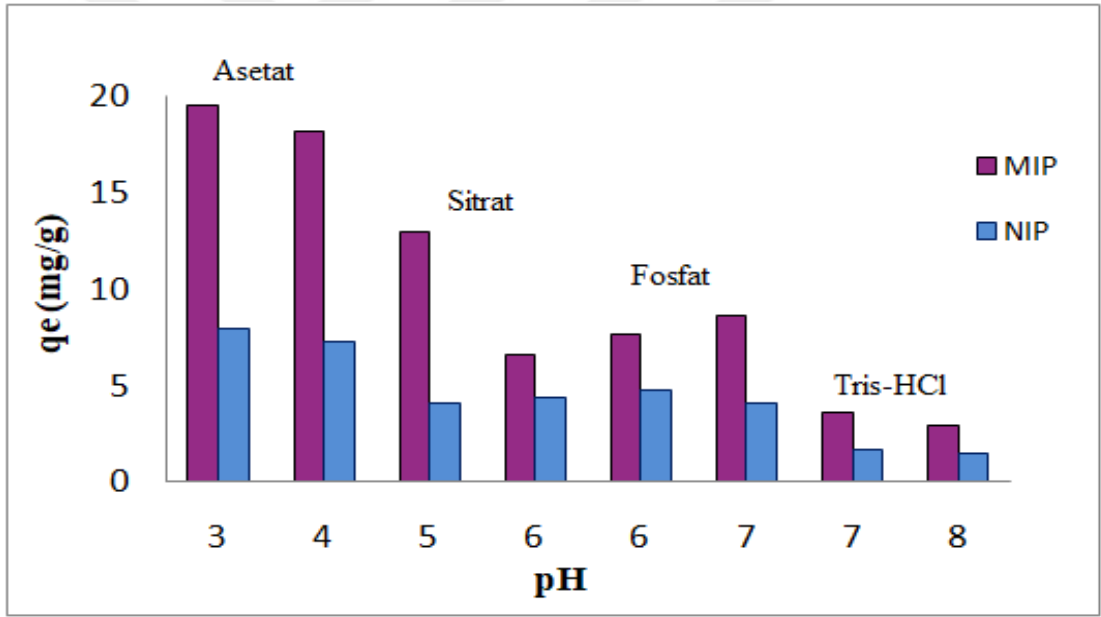
f

Şekil 4.6. Yıkanmamış MIP hidrojel **a)** 100x **b)** 20000x, yıkanmış MIP hidrojel **c)** 100x **d)** 30000x, **e)** yıkanmamış NIP 20000x, **f)** yıkanmış NIP 20000x büyütme sonrası görüntüleri (*AAM monomeri ile hazırlanan hidrojeller*)

4.4. AAm Monomeri ile Hazırlanmış MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine Lipazın Geri Bağlanması pH ve Sıcaklığın Etkisi

4.4.1. pH Etkisi

AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller üzerine lipazın geri bağlama çalışmalarında pH'ın etkisi incelendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda en yüksek IF değeri 2,46 olarak asetat tamponu ile hazırlanan pH 3,0 ortamında elde edildi. pH 3,0'de tutunan protein miktarları $q_{e(MIP)}$ 19,53 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 7,93 mg/g olarak kaydedildi (Şekil 4.7). Geri bağlama çalışmalarının optimizasyon aşamalarında, hem pH 3,0 hem de hidrojellerin hazırlandığı pH 7,0 fosfat tamponu ortamında çalışmalar yürütüldü.



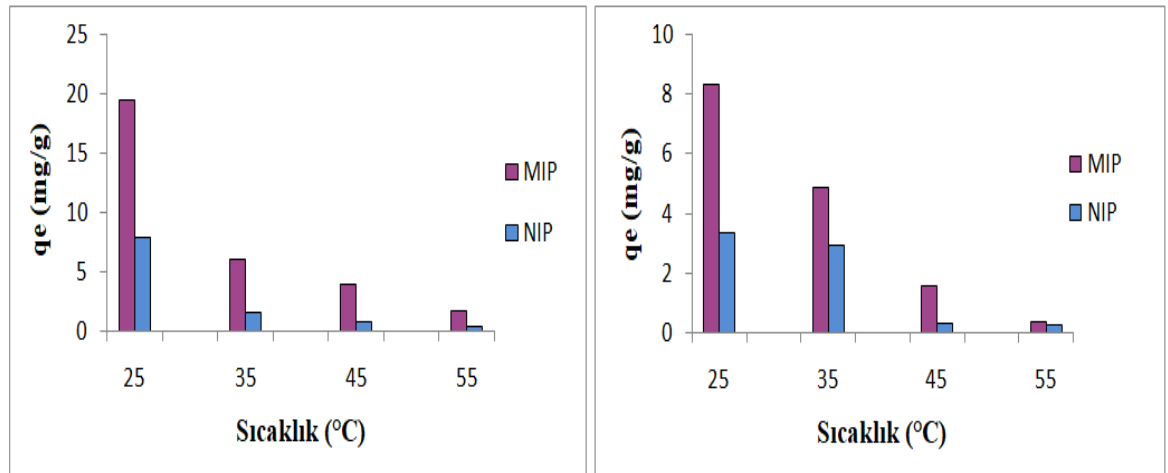
Şekil 4.7. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin geri bağlanmasında pH'ın etkisi

(Lipaz: 5 mg/mL, inkübasyon süresi: 90 dk, t: 25 °C, hidrojel miktarı: 10 mg)

Abd El-Aal, ve ark. fonksiyonel monomer olarak AAm ve DMAEMA, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA) ve insan serum albüminin kalıp molekül olarak kullanıldığı pH duyarlı nötral ve katyonik damgalı polimerler hazırlamışlardır. Polimerler pH 2,7, 4,7 ve 6,7 olmak üzere üç farklı pH ortamında hazırlanmış ve adsorpsiyon çalışmaları da bu pH ortamlarında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. En yüksek IF değeri pH 6.7 ortamında hazırlanmış nötral polimerler ile yapılan çalışmada pH 6,7'de bulunurken, katyonik polimerlerde ise en yüksek IF değerinin pH 4.7'de bulunduğunu rapor etmişlerdir [46].

4.4.2. Sıcaklık Etkisi

Farklı sıcaklık değerlerinde yapılan geri bağlama çalışmaları ile optimum geri bağlama sıcaklığı belirlendi. Optimum sıcaklığın hem pH 7,0 fosfat tamponu hem de pH 3,0 asetat tamponu ile yapılan geri bağlama çalışmaları için 25°C olduğu tespit edildi. pH 3,0'de $q_{e(MIP)}$ 19,53 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 7,93 mg/g, IF değeri 2,46 bulunurken, pH 7,0'de $q_{e(MIP)}$ 8,34 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 3,36 mg/g ve IF değeri 2,48 olarak bulundu (Şekil 4.8).



a

b

Şekil 4.8. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin a) pH 3,0 b) pH 7,0 geri bağlanmasında sıcaklığın etkisi

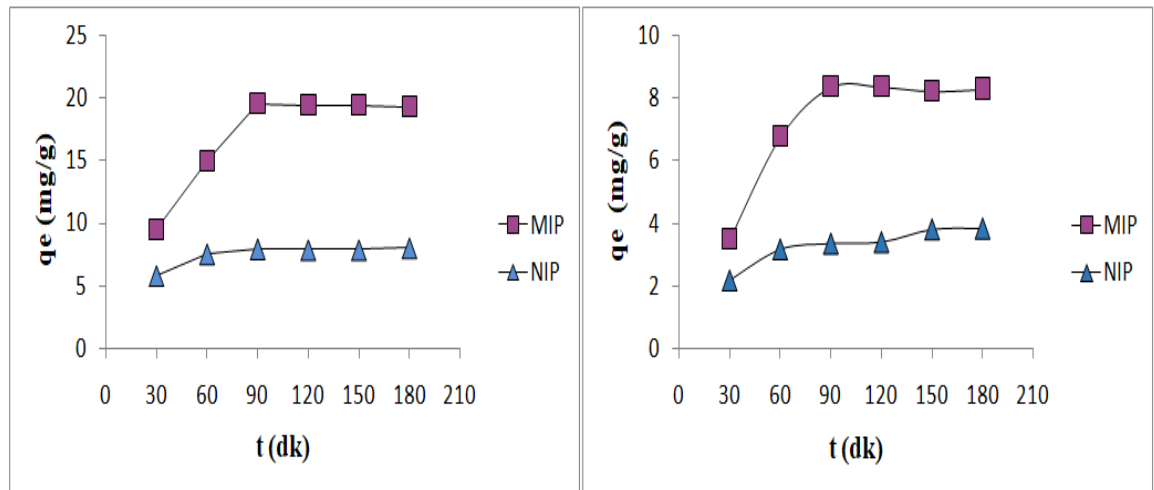
(Lipaz: 5 mg/mL, inkübasyon süresi: 90 dk, hidrojel miktarı: 10 mg)

Pank ve ark. fonksiyonel monomer olarak akrilamid, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid kullanarak sığır serum albüminin (BSA) moleküler damgalanması üzerine yaptıkları çalışmada, BSA'nın geri bağlanması için optimum sıcaklığı 20°C olarak bulmuşlardır [47].

4.5. AAm, AAm-1-VI ve AAm-MA Monomerleri ile Hazırlanmış MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine Lipazın Geri Bağlanmasında Süre ve Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

4.5.1. Sürenin Etkisi

Farklı sürelerde yapılan geri bağlama çalışmaları sonrasında hidrojeller üzerine enzimin optimum bağlanması için gereken süre 90 dakika olarak belirlendi. AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller için pH 3,0'de $q_{e(MIP)}$ 19,53 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 7,93 mg/g, IF değeri ise 2,46 bulunurken, pH 7,0'de $q_{e(MIP)}$ 8,34 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 3,4 mg/g, IF değeri ise 2,45 olarak bulundu (Şekil 4.9).



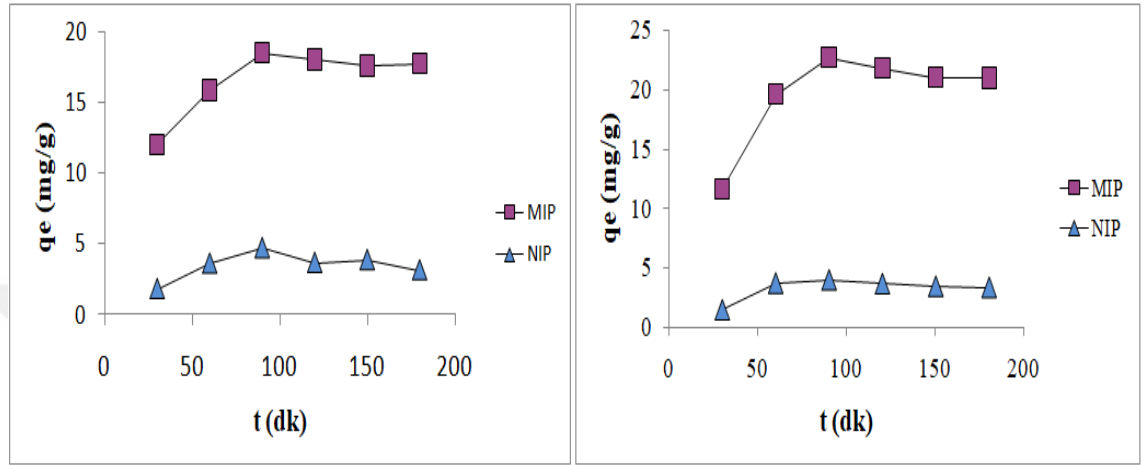
a

b

Şekil 4.9. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin a) pH 3,0 b) pH 7,0 geri bağlanmasında sürenin etkisi

(Lipaz: 5 mg/mL, t: 25 °C, hidrojel miktarı: 10 mg)

AAM-1-VI monomerleri ile hazırlanmış hidrojellerde pH 3,0'de $q_{e(MIP)}$ 18,45 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 4,73 mg/g, IF değeri 3,9 olarak bulunurken, AAM-MA monomerleri ile hazırlanmış hidrojellerde pH 3,0'de $q_{e(MIP)}$ 22,72 mg/g , $q_{e(NIP)}$ 4,02 mg/g , IF değeri ise 5,65 olarak bulundu (Şekil 4.10).



a

b

Şekil 4.10. MIP ve NIP hidrojeller a) AAM-1-VI b) AAM-MA üzerine lipaz enziminin geri bağlanmasında sürenin etkisi

(Lipaz: 5 mg/mL, t: 25 °C, hidrojel miktarı: 10 mg, pH 3,0)

Adsorpsiyon kapasitesi zamana bağlı olarak artış göstermektedir. 90 dakika sonunda lipaz enzimin damgalı bölgelere geri bağlandığı ve bağlanmanın dengeye ulaştığı görülmektedir. NIP hidrojelin adsorpsiyon kapasitesi MIP hidrojele göre daha düşüktür. MIP hidrojelin geri bağlama kapasitesi NIP hidrojelle karşılaştırıldığında, daha yüksek bir geri bağlama kapasitesinin elde edildiği açıktır. NIP hidrojeldeki düşüklüğün sebebi ise lipaz için kavite bölgelerinin oluşmamasından kaynaklanmaktadır.

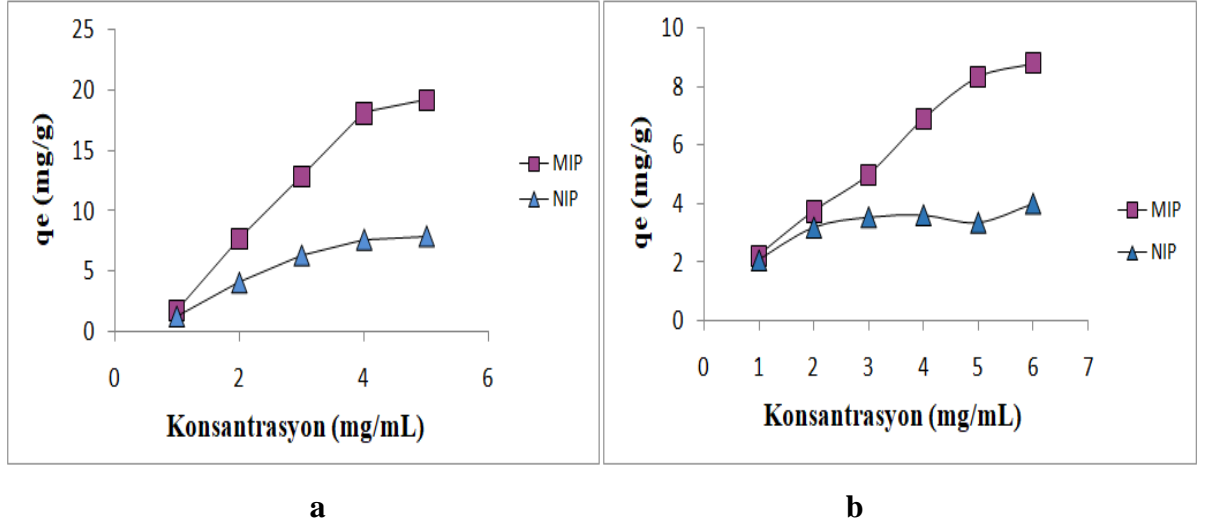
Culver ve ark. lizozimin moleküler damgalanması üzerine yaptıkları çalışmada bağlanma kinetiğinin karakterizasyonunu incelemiştir. Fonksiyonel monomer olarak MAA, DMAEMA ve AAm ve çapraz bağlayıcı olarak N,N'-

metilen-bis-akrilamid (MBA) kullanılarak hazırladıkları MIP ve NIP hidrojelleri 1-60 dakika arasında değişen sürelerde inkübe etmişler ve her iki hidrojel için de lizozim eklenmesinden 2 dakika sonrasında bağlanma dengesine ulaşıldığını kaydetmişlerdir [48].

Zhang ve ark. ise akrilik asit ve akrilamid monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid ve kalıp molekül olarak BSA kullanarak hazırladıkları moleküler damgalı hidrojeller ile yaptıkları çalışmalar sonucunda, MIP ve NIP'te BSA'nın optimum bağlanması için gereken süreyi 2 saat olarak tespit etmişlerdir [49].

4.5.2. Lipaz Konsantrasyonunun Etkisi

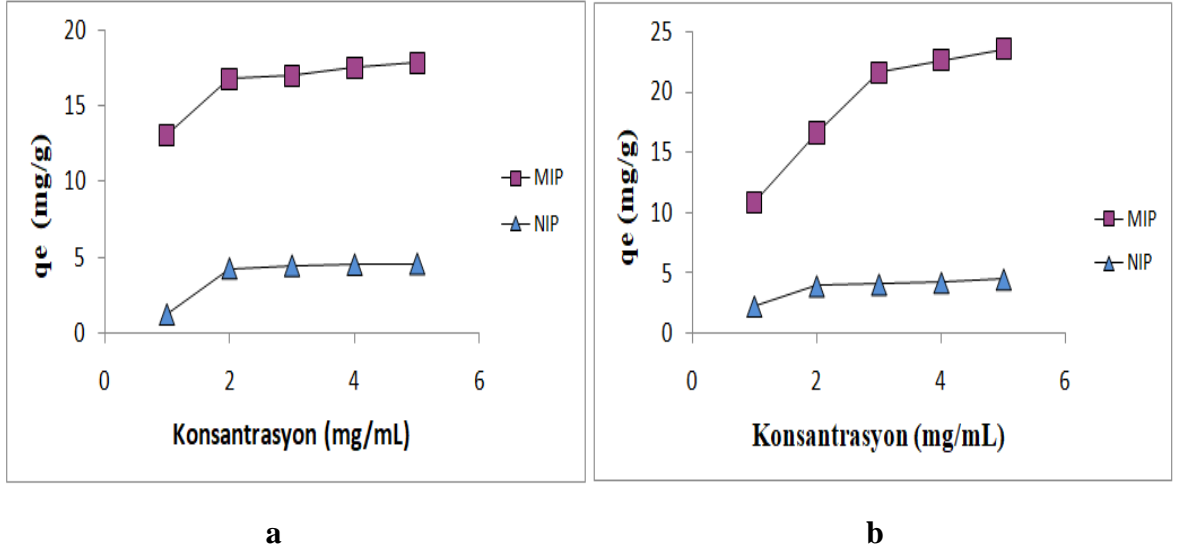
Hidrojellerin maksimum lipaz geri bağlama kapasitelerini belirlemek amacıyla hem pH 3,0 asetat, hem de pH 7,0 fosfat tamponunda 1-6 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda enzim çözeltileri kullanılarak geri bağlama çalışmaları gerçekleştirildi. Yapılan hesaplamalar sonucunda farklı monomerler ile hazırlanmış hidrojellerde, enzim konsantrasyonu artışıyla protein bağlama kapasitelerinin doğru orantılı olarak artış gösterdiği görüldü. AAm ile hazırlanan hidrojellerde her iki pH değeri içinde 5 mg/mL enzim konsantrasyonunda maksimum geri bağlama kapasitesine ulaşıldığı ve pH 3,0'de $q_{e(MIP)}$ 19,17 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 7,86 mg/g IF değeri ise 2,44 bulunurken, pH 7,0'de $q_{e(MIP)}$ 8,34 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 3,36 mg/g IF değeri ise 2,48 olarak bulundu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine lipaz enziminin **a) pH 3,0 b) pH 7,0** geri bağlanmasında enzim konsantrasyonunun etkisi

(İnkübasyon süresi: 90 dk, t: 25 °C, hidrojel miktarı: 10 mg)

AAM-1-VI monomerleri ile hazırlanan hidrojellerde yapılan hesaplamalar sonucunda, konsantrasyon artışıyla q_e değerlerinin doğrusal bir artış gösterdiği, 3 mg/mL enzim konsantrasyonunda maksimum tutunma kapasitesine ulaşıldığı görüldü. Buna göre pH 3,0 'de $q_{e(MIP)}$ 17 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 4,41 mg/g, IF değeri 3,85 olarak bulunurken, AAm-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojellerde ise doyumluğa 5 mg/mL enzim konsantrasyonunda ulaşıldığı tespit edildi. Buna göre pH 3,0'de $q_{e(MIP)}$ 23,48 mg/g, $q_{e(NIP)}$ 4,49 mg/g, IF değeri ise 5,23 olarak bulundu (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MIP ve NIP hidrojel a) AAm-1-VI b) AAm-MA üzerine lipaz enziminin geri bağlanmasında enzim konsantrasyonunun etkisi

(İnkübasyon süresi: 90 dk, t: 25 °C, hidrojel miktarı: 10 mg, pH 3,0)

Chen ve ark. akrilamid ve metakrilik asit monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid kullanarak, lizozimin moleküler damgalanması üzerine yaptıkları çalışmada MIP ve NIP hidrojellerin her ikisi içinde 5 mg/mL de maksimum tutunma kapasitesine ulaşıldığını kaydetmişlerdir [50].

Zhang ve ark. ise akrilik asit ve akrilamid monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid ve kalıp molekül olarak BSA kullanarak moleküler damgalı hidrojel hazırlamışlardır. Yapılan konsantrasyon çalışmalarının sonucunda MIP ve NIP için 1 mg/mL de maksimum tutunma kapasitesine ulaşıldığını belirlemişlerdir [49].

Ji ve ark. AAm ve DMAEMA monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid kullanarak lizozimin moleküler damgalanması üzerine yaptıkları çalışmada ise MIP ve NIP için maksimum tutunma kapasitesine 0,5 mg/mL de ulaştıklarını belirtmişlerdir [51].

4.6. Adsorpsiyon İzotermi

4.6.1. Langmuir İzotermi

. Langmuir izotermi, katı yüzeyler üzerinde aktif adsorpsiyon alanlarında meydana gelen tutulmanın fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon olup olmadığını diğer izotermelere göre daha iyi açıklamaktadır [52]. Langmuir izotermi şu kabullere dayalıdır:

- Adsorpsiyon tek tabakada gerçekleşir ve dağılımı homojendir. Her aktif merkez ancak bir molekül adsorplar.
- Adsorplanan moleküller arasında etkileşim ve rekabet yoktur. Adsorpsiyon entalpisi tüm adsorbat molekülleri için eşittir.
- Materyalin tüm yüzeyi aynı adsorpsiyon aktivitesine sahiptir ve enerji bakımından ünitardır. Adsorpsiyon entalpisinin bütün moleküller için aynı olduğu varsayılmaktadır.

Langmuir adsorpsiyon izotermi model denklemini Eşitlik (4.1)'de verilmiştir.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_b} + \frac{1}{Q} \cdot C_e \quad (4.1)$$

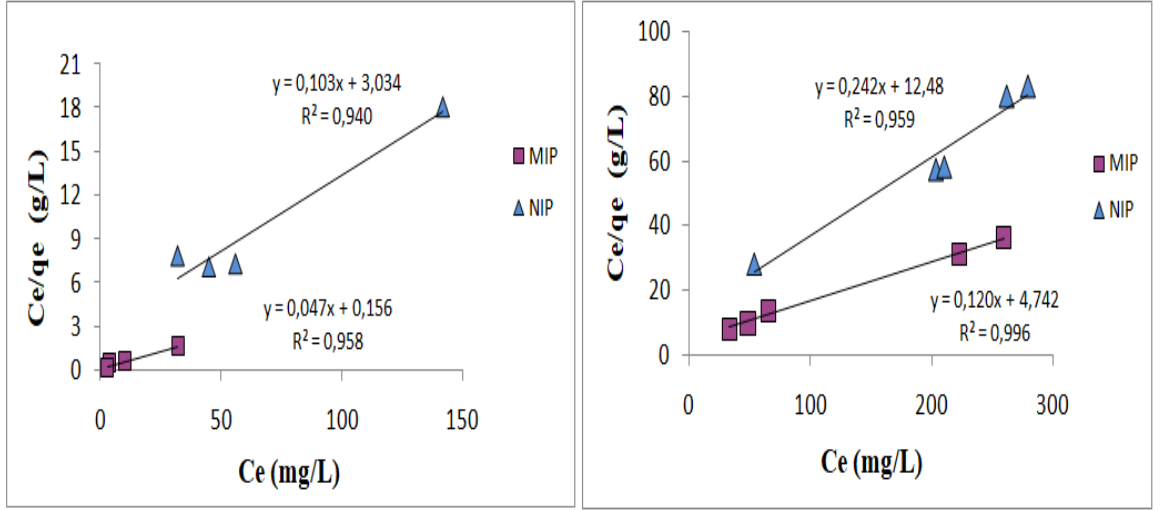
b (L/mg): Langmuir sabiti

q_e (mg/g): Denge anındaki adsorbana bağlı protein miktarı

C_e (mg/L): Çözeltideki denge halindeki protein derişimi

Q_{max} (mg/g): Maksimum proteinadsorpsiyon kapasitesi

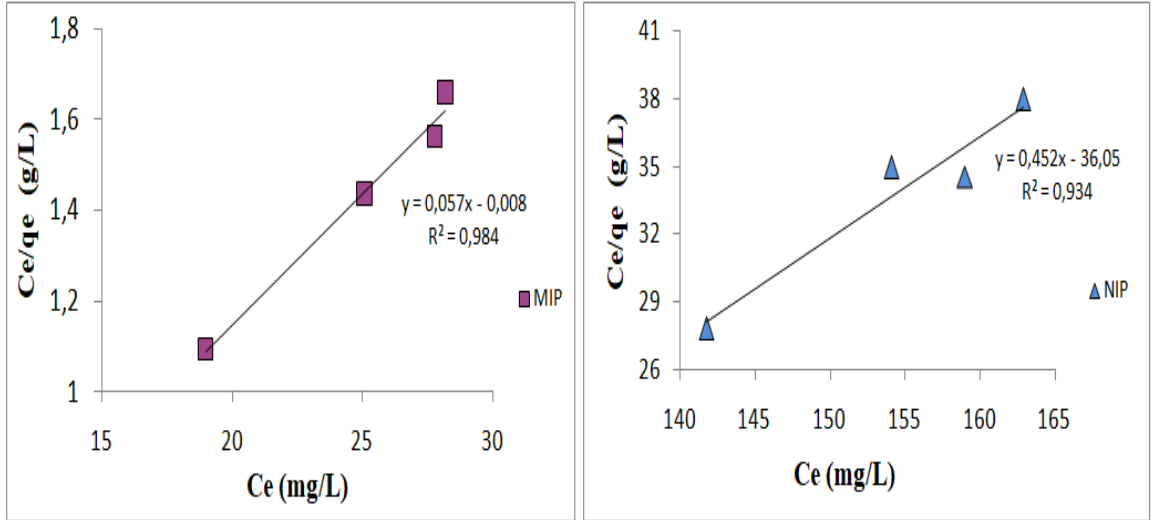
Deneyisel olarak elde edilmiş C_e değerlerine karşılık C_e/q_e grafiğı bir doğru veriyorsa, adsorpsiyonun Langmuir modeline uyduğı söylenebilir. Elde edilen bu doğrunun eğimi ve eksen kesim noktası Langmuir izoterm sabitlerini vermektedir.



a

b

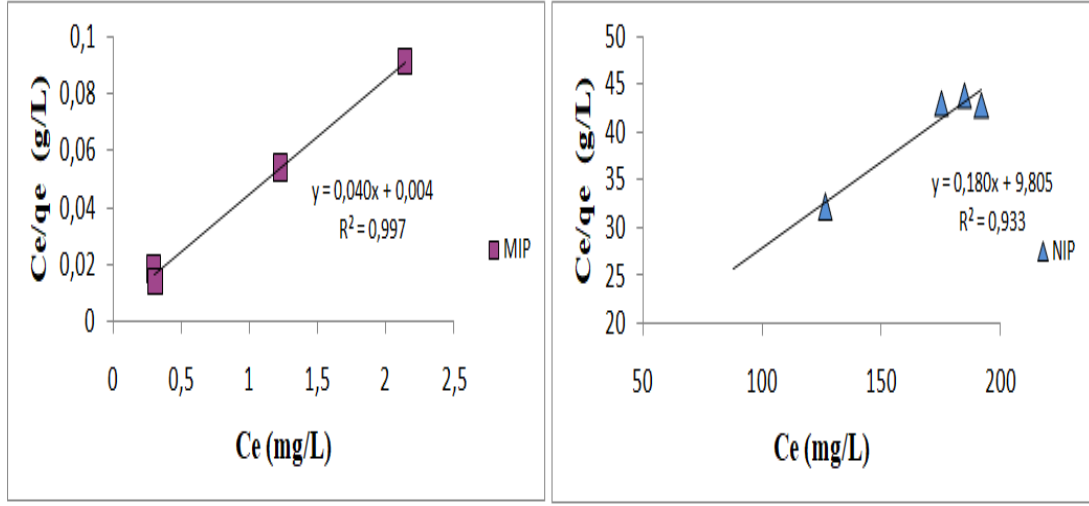
Şekil 4.13. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir izoterm grafiği a) pH 3,0 b) pH 7,0



a

b

Şekil 4.14. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan a) MIP b) NIP hidrojeller için Langmuir izoterm grafiği



a

b

Şekil 4.15. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan a) MIP b) NIP hidrojel için Langmuir izoterm grafiği

Adsorpsiyonun elverişliliğini bulmak için boyutsuz R_L (dağılma) sabiti hesaplanır ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması elverişlilik durumunun sağlandığına işaret eder. Dağılma sabiti formülü Denklem (4.2)'de verilmiştir.

$$R_L = \frac{1}{1 + b \cdot C_0} \quad (4.2)$$

b (L/mg): Langmuir sabiti

C_0 (mg/L): Maddenin çözeltideki başlangıç konsantrasyonu

Tablo 4.2. R_L değerleri ve izoterm tipleri [53]

R_L Değerleri	İzoterm Tipi
$R_L > 1$	Elverişli Olmayan
$R_L = 1$	Lineer
$0 < R_L < 1$	Elverişli
$R_L = 0$	Tersinmez

Tablo 4.3. Farklı monomerlerle hazırlanan hidrojellerin R_L (dağılma) sabiti

	R_L (MIP)	R_L (NIP)
AAm (<i>pH</i> 3)	0,399	0,854
AAm (<i>pH</i> 7)	0,888	0,913
AAm-VI (<i>pH</i> 3)	0,044	0,962
AAm – MA (<i>pH</i> 3)	0,032	0,917

Tablo 4.3'e göre farklı monomerler için hesaplanan R_L (dağılma) sabiti değerinin $0 < R_L < 1$ aralığında olduğu böylelikle izotermin elverişli olduğu görülmektedir.

4.6.2. Freundlich İzotermi

Freundlich izotermi, heterojen yüzeyde meydana gelen fiziksel ve tersinir olabilen bir adsorpsiyona işaret eder. Aynı zamanda bu izoterm, heterojen yüzey üzerinde adsorpsiyon ısısının ve ilgisinin eşit dağılmadığı, çok tabakalı adsorpsiyon için de kullanılabilir. Freundlich model denklemi Eşitlik (4.3)'de verilmiştir.

$$\log q_e = \log K_F \frac{1}{n} + \log C_e \quad (4.3)$$

q_e (mg/g): Denge anındaki adsorbana bağlı protein miktarı

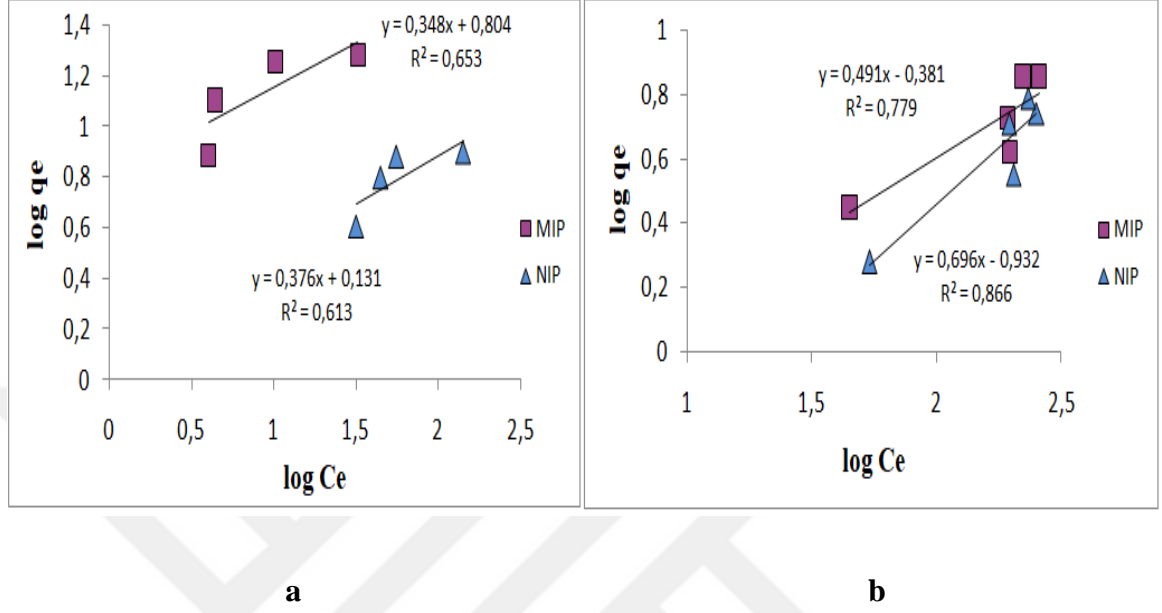
C_e (mg/L): Çözeltideki proteinin denge derişimi

K_F (mg/g): Adsorbantın bağıl adsorpsiyon kapasitesi sabiti

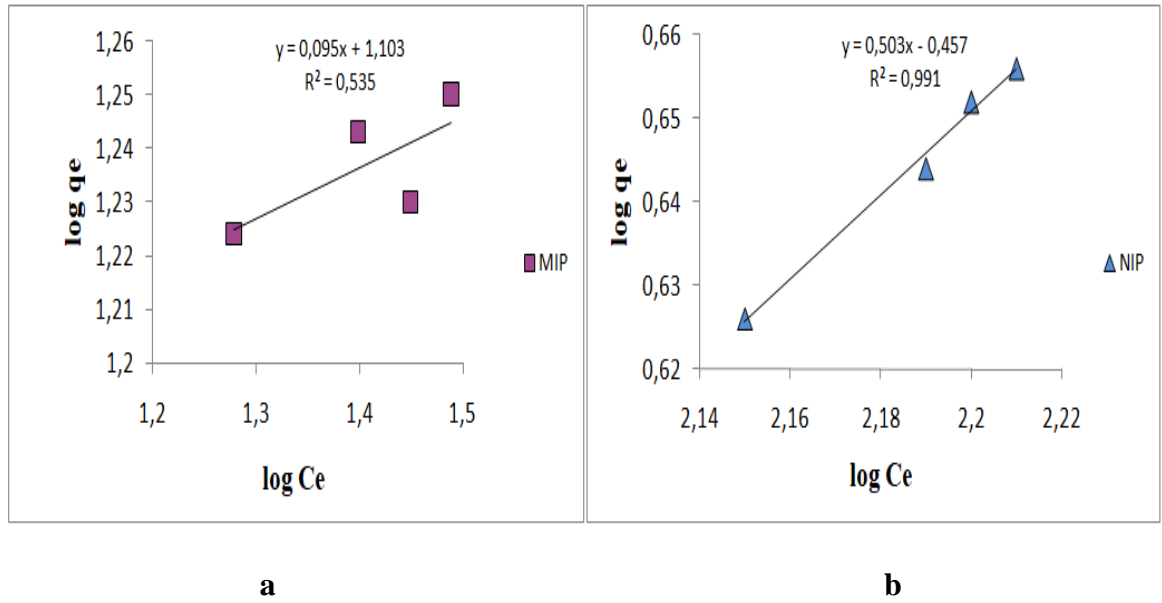
n : Adsorpsiyon yoğunluğunu

Log q_e 'nin log C_e 'ye karşı çizilen grafiğinin eğiminden $1/n$, y ekseninin kesim noktasından ise log K_F bulunur. log K_F ve n değerlerinin büyük olması;

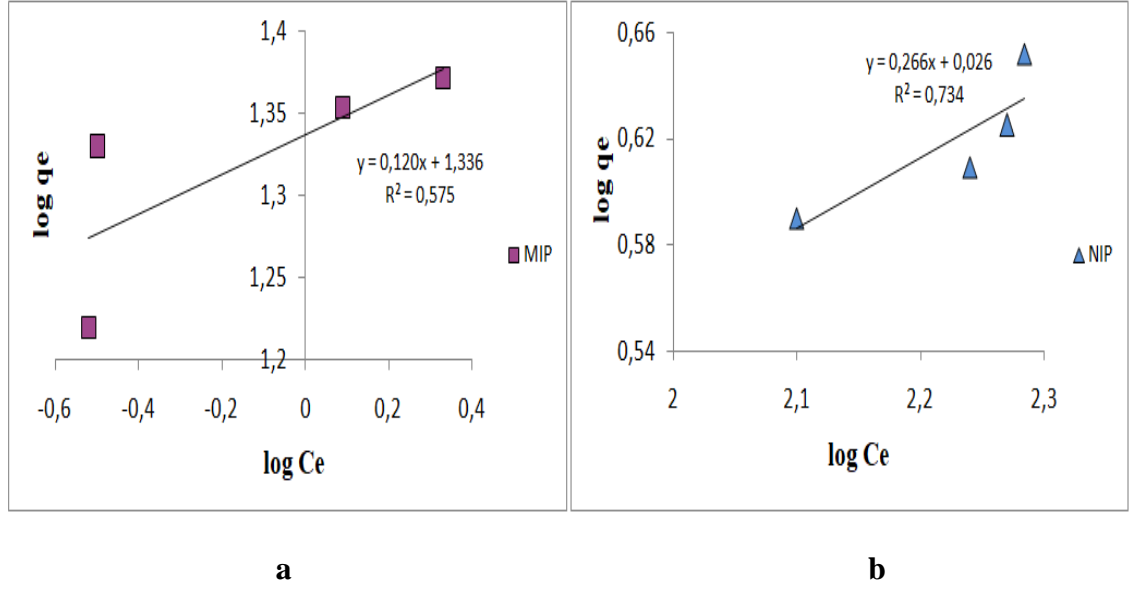
sorbentin, adsorpsiyona eğilimi olduğunu ve adsorplama kapasitesinin yüksek olduğunu , “n” değerinin 1’den büyük bulunması ise adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir [54].



Şekil 4.16. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel için Freundlich izoterm grafiği **a)** pH 3,0 **b)** pH 7,0



Şekil 4.17. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan **a)** MIP **b)** NIP hidrojel için Freundlich izoterm grafiği



Şekil 4.18. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan **a)** MIP **b)** NIP hidrojel için Freundlich izoterm grafiği

Tablo 4.4. AAm ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izotermelerine ait parametreler (*pH 3,0 ve pH 7,0*)

AAm		<i>Langmuir Adsorpsiyon İzotermi</i>			<i>Freundlich Adsorpsiyon İzotermi</i>		
		Qmax (mg/g)	b (L/mg)	R ²	K _F (mg/g)	n	R ²
pH 3,0	MIP	21,27	0,301	0,958	6,36	2,87	0,653
	NIP	9,7	0,034	0,940	1,35	2,65	0,613
pH 7,0	MIP	8,33	0,025	0,996	2,4	2,03	0,779
	NIP	4,13	0,019	0,959	8,55	1,43	0,866

Tablo 4.5. AAm-1-VI ve AAm-MA ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izotermlerine ait parametreler

		<i>Langmuir Adsorpsiyon İzotermi</i>			<i>Freundlich Adsorpsiyon İzotermi</i>		
		Q_{max} (mg/g)	b (L/mg)	R²	K_F (mg/g)	n	R²
AAm-1-VI (pH 3,0)	MIP	17,54	7,12	0,984	12,68	10,52	0,535
	NIP	2,21	0,013	0,934	2,86	1,98	0,991
AAm-MA (pH 3,0)	MIP	25	10	0,997	21,68	8,33	0,575
	NIP	5,55	0,018	0,933	1,06	3,76	0,734

AAm, AAm-1-VI ve AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin Langmuir ve Freundlich izotermlerine ait parametreler hesaplandı. Buradan yola çıkarak, AAm monomeri içeren hidrojellerin pH 3,0 asetat tamponu ile yapılan geri bağlama çalışmasında 'n' değeri MIP için 2,87 NIP için 2,65 bulunurken, pH 7,0 fosfat tamponunda yapılan geri bağlama çalışmasında MIP için 2,03 NIP için ise 1,43 olarak bulundu.

AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerde 'n' değeri sırasıyla 1,98 ve 10,52 bulunurken, AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için sırasıyla 3,76 ve 8,33 olarak bulundu.

Yapılan tüm çalışmalarda 'n' değerlerinin 1'den büyük olması ise adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir.

AAm monomeri ile hazırlanan hidrojellerin pH 3,0 asetat ve pH 7,0 fosfat tamponu ile yapılan geri bağlama çalışmasında adsorpsiyon izotermleri incelendiğinde her iki çalışma için de MIP ve NIP hidrojellerin Langmuir

korrelasyon katsayısı Freundlich korrelasyon katsayısından daha büyük olduğu görüldü. Bu nedenle Langmuir izotermine uygun olduğu tespit edildi (Tablo 4.4).

AAM-1-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerde ise NIP hidrojinin korrelasyon katsayısının Freundlich izotermine daha büyük olduğu görülmektedir. Bu durum NIP hidrojinin Freundlich izotermine uygunluğunu göstermektedir. Freundlich izotermine uyumluluğu adsorpsiyonun heterojen olarak gerçekleştiğini açıklamaktadır. MIP hidrojelinde ise Langmuir korrelasyon katsayısının daha büyük olması nedeniyle Langmuir izotermine uyumludur (Tablo 4.5).

AAM-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için ise Langmuir korrelasyon katsayısının Freundlich korrelasyon katsayısından daha büyük olduğu görülmektedir (Tablo 4.5). Buda her ikisinin Langmuir izotermine uygun olduğunu göstermektedir. Bu durum adsorpsiyon alanının homojen olduğunu ve tek tabaka halinde kaplanmış olduğunu göstermektedir.

Clegg ve ark. fonksiyonel monomer olarak; MAA, DMAEMA ve AAM, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA) ve kalıp molekül olarak tripsin, lizozim ve sitokrom c enzimlerinin kullanıldığı moleküler damgalı hidrojeller hazırlamışlardır. Yaptıkları çalışmalarının sonucunda adsorpsiyonun Freundlich izotermine uyduğunu tespit etmişlerdir [55].

Zhang ve ark. ise akrilik asit ve akrilamid monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid ve kalıp molekül olarak BSA kullanarak hazırladıkları moleküler damgalı hidrojeller ile yaptıkları çalışmalar sonucunda adsorpsiyonun Langmuir izotermine uyduğunu tespit etmişlerdir [49].

4.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği çalışmaları, etkin adsorban-adsorplanan temas süresinin bulunmasına imkan vermesinin yanı sıra, adsorpsiyonun hızının adsorpsiyonun hangi basamağı tarafından belirlendiğini de açıklar.

Adsorpsiyon dört ana basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta gaz ya da sıvı fazdaki adsorplanan madde, adsorbanı kaplayan bir film tabakasına doğru difüzyonlanır, bu kademe hızlıdır ve hız belirleyici değildir. Fakat adsorbanın bulunduğu fazın hareketsiz olması söz konusu ise, bu basamak en yavaş olur ve adsorpsiyon hızı buna göre belirlenir. İkinci basamakta, film tabakasına ulaşan adsorplanan, burada bulunan durgun kısımdan ilerleyerek adsorbanın gözeneklerine doğru hareket eder, bu hareket ise film-kütle transferi veya sınır tabaka difüzyonu olarak isimlendirilmektedir. Daha sonraki basamakta, adsorplanan adsorbanın gözenek boşluklarında hareket ederek adsorpsiyonun gerçekleşeceği yüzeye doğru ilerler bu da gözenek difüzyonu olarak adlandırılır. Son olarak adsorplanan, adsorbanın gözenek yüzeyinde adsorplanır ve bu basamak adsorpsiyon sürecinin en hızlı aşamasıdır [56]. Adsorpsiyon hızını belirlemek için aşağıdaki eşitlikler kullanılmaktadır.

4.7.1. Yalancı Birinci Mertebe Kinetiği

Birinci dereceden adsorpsiyon kinetiği (Lagergren eşitliği) aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir. Bu mertebe hızın adsorbat konsantrasyonuna bağımlı olarak ilerlediğini fakat zaman ve adsorpsiyon kapasitesine bağımlı olmadığını göstermektedir [57].

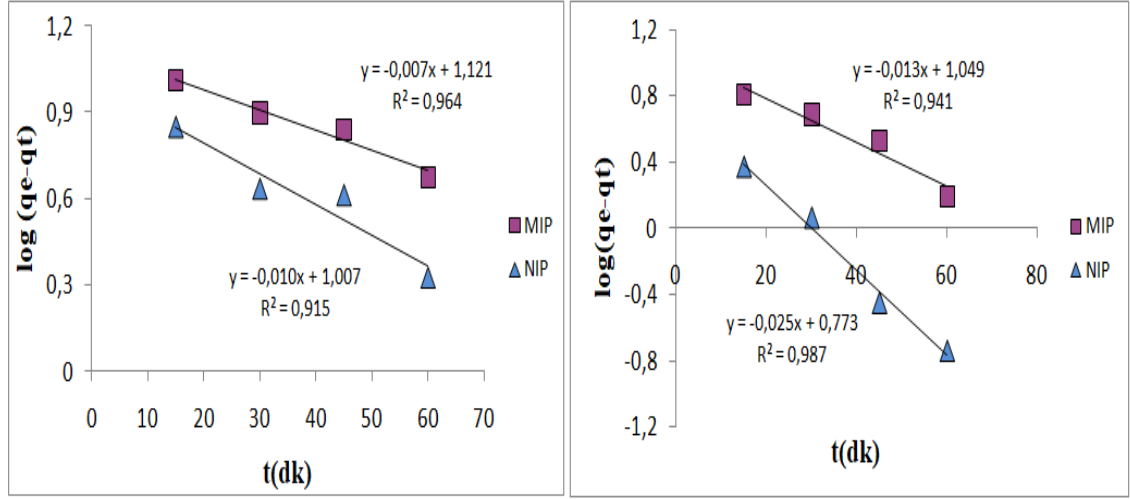
$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} \cdot t \quad (4.4)$$

k_1 (dk⁻¹): Birinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti

q_t (mg/g): Herhangi bir zamanda adsorbe edilen madde miktarı

q_e (mg/g): Denge halinde adsorbe edilen madde miktarı

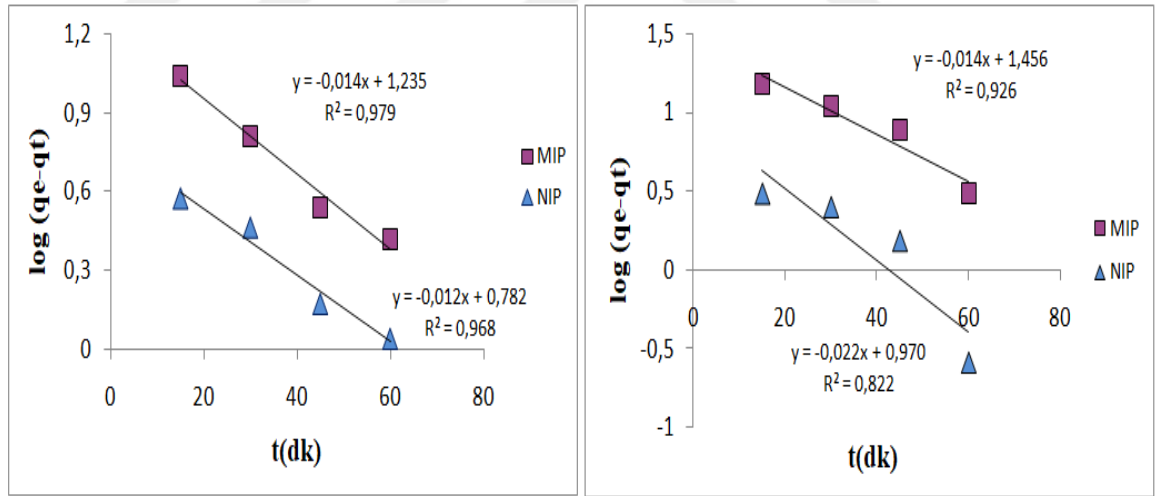
t (dk): Süre



a

b

Şekil 4.19. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel için yalnızca birinci merteye kinetik modeli a) pH 3,0 b) pH 7,0



a

b

Şekil 4.20. a) AAm-1-VI b) AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel için yalnızca birinci merteye kinetik modeli

4.7.2. Yalancı İkinci Mertebe Kinetiği

Ho tarafından 1995 yılında geliştirilen yalancı ikinci dereceden hız denkleminin adsorbat konsantrasyonundan bağımsız, katı fazdaki adsorpsiyon kapasitesine ve zaman bağlı olduğunu göstermiştir [58].

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad (4.5)$$

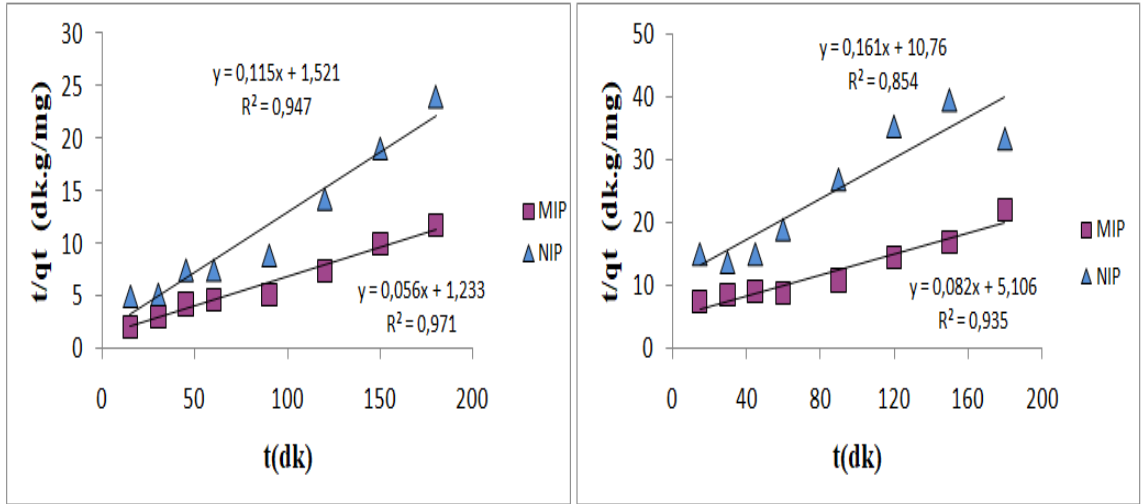
k_2 (g/mg dk⁻¹): İkinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti

q_t (mg/g): Herhangi bir zamanda adsorbe edilen madde miktarı

q_e (mg/g): Denge halinde adsorbe edilen madde miktarı

t (dk): Süre

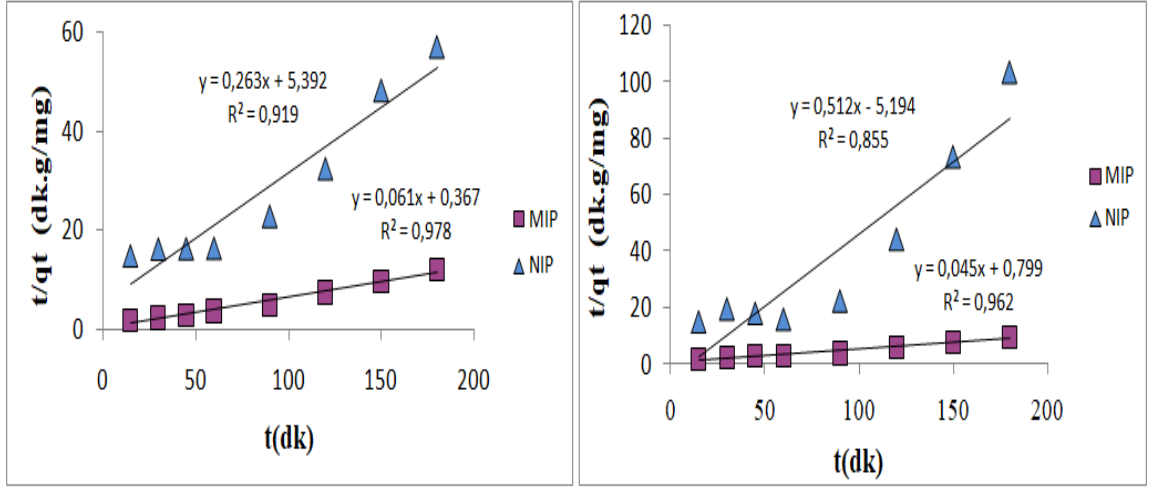
b



a

b

Şekil 4.21. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel için yalancı ikinci mertebe kinetik modeli a) pH 3,0 b) pH 7,0



a

b

Şekil 4.22. a) AAm-1-VI b) AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için yalancı ikinci mertebe kinetik modeli

4.7.3. Parçacık İçi Difüzyon Etkisi

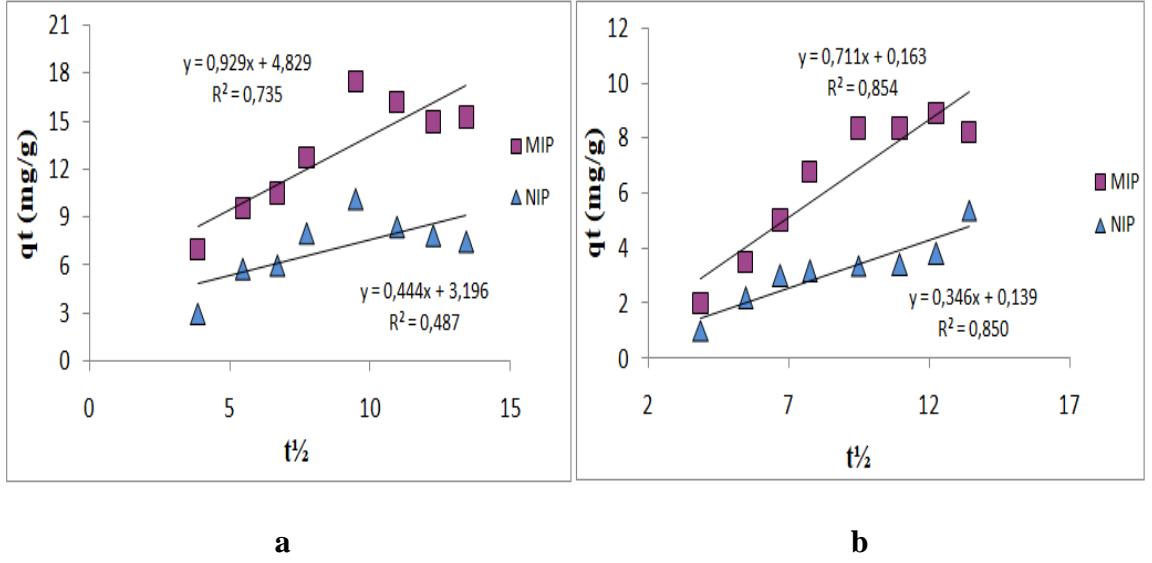
Adsorpsiyon işlemine parçacık içidifüzyonunun etkisinin bulunması ise q_t değerinin zamanın kareköküne karşı grafiği çizilerek anlaşılır. Eğim, hız sabitini vermektedir [59].

$$K_p = \frac{q_t}{t^{0,5}} \quad (4.6)$$

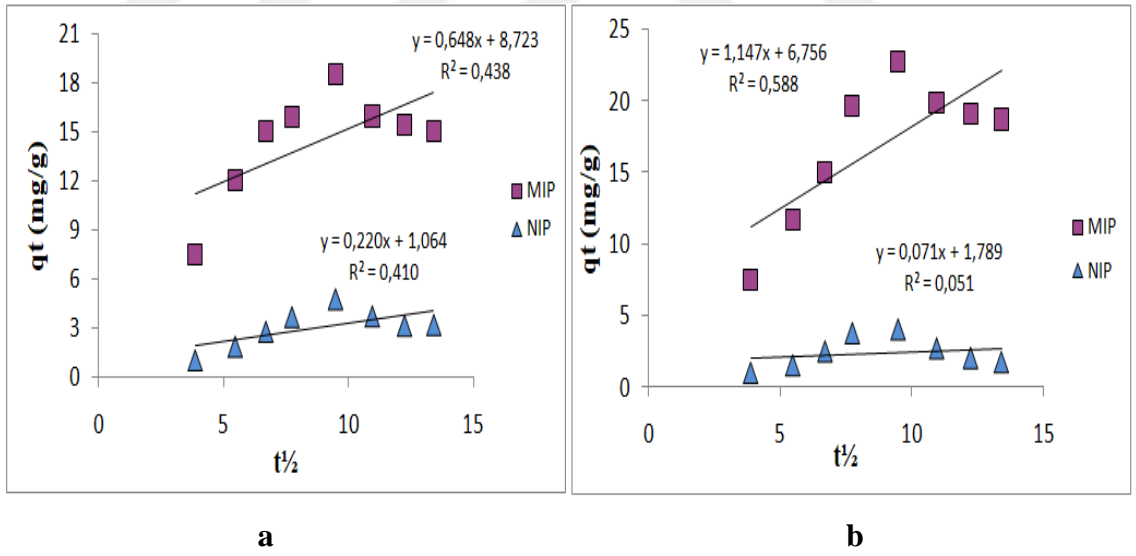
$K_p(\text{mg/g.dk}^{0,5})$: Parçacık içi difüzyon hız sabiti

q_t (mg/g): Herhangi bir zamanda adsorbe edilen madde miktarı

t (dk): Süre



Şekil 4.23. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel için parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modeli **a)** pH 3,0 **b)** pH 7,0



Şekil 4.24. a) AAm-1-VI b) AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel için parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modeli

Log ($q_e - q_t$) ile t/q_t değerlerinin t değerine karşı ve q_t değerlerinin $t^{1/2}$ değerine karşı ayrı ayrı grafiğe dökülmesiyle k_1 , k_2 , ve k_p değerleri hesaplandı.

Tablo 4.6. AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları (*pH 3,0*)

Yalancı Birinci Mertebe		Yalancı İkinci Mertebe		Parçacık İçi Difüzyon Etkisi	
MIP	NIP	MIP	NIP	MIP	NIP
k_1 (dk ⁻¹)	k_1 (dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_p (mg/g.dk ^{0,5})	k_p (mg/g.dk ^{0,5})
0,016	0,023	0,0025	0,0087	0,929	0,444
q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)		
13,21	10,16	17,85	8,69		
R^2	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2
0,964	0,915	0,971	0,947	0,735	0,487

Tablo 4.7. AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları (*pH 7,0*)

Yalancı Birinci Mertebe		Yalancı İkinci Mertebe		Parçacık İçi Difüzyon Etkisi	
MIP	NIP	MIP	NIP	MIP	NIP
k_1 (dk ⁻¹)	k_1 (dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_p (mg/g.dk ^{0,5})	k_p (mg/g.dk ^{0,5})
0,028	0,055	0,0013	0,0024	0,711	0,346
q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)		
11,94	5,92	12,19	6,21		
R^2	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2
0,941	0,987	0,935	0,854	0,854	0,850

Tablo 4.8. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan hidrojel için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları

Yalancı Birinci Mertebe		Yalancı İkinci Mertebe		Parçacık İçi Difüzyon Etkisi	
MIP	NIP	MIP	NIP	MIP	NIP
k_1 (dk ⁻¹)	k_1 (dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_p (mg/g.dk ^{0,5})	k_p (mg/g.dk ^{0,5})
0,032	0,028	0,01	0,013	0,648	0,220
q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)		
17,18	6,05	16,39	3,8		
R^2	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2
0,979	0,968	0,978	0,919	0,438	0,410

Tablo 4.9. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojel için kinetik parametreler ve korrelasyon katsayıları

Yalancı Birinci Mertebe		Yalancı İkinci Mertebe		Parçacık İçi Difüzyon Etkisi	
MIP	NIP	MIP	NIP	MIP	NIP
k_1 (dk ⁻¹)	k_1 (dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_2 (g/mg dk ⁻¹)	k_p (mg/g.dk ^{0,5})	k_p (mg/g.dk ^{0,5})
0,032	0,05	0,0025	0,05	1,147	0,071
q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)	q_e (mg/g)		
28,57	9,33	22,22	1,95		
R^2	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2
0,926	0,822	0,962	0,855	0,588	0,051

Deneylerden elde edilen veriler, grafikler üzerinden değerlendirilerek adsorpsiyona en uygun olan izoterm ve adsorpsiyon hızının derecesi bulundu.

Buna göre q_e değerleri ve korrelasyon katsayılarının 1'e yakınlığı göz önünde bulundurularak AAm monomeri ile hazırlanmış olan MIP ve NIP hidrojellerin pH 3,0 asetat tamponunda yapılan geri bağlama çalışmasında, yalancı 2.mertebe korelasyon katsayısının yalancı 1.mertebe korrelasyon sayısından büyük olduğu bu nedenle yalancı ikinci mertebe kinetiğine uyduğunu görülmektedir (Tablo 4.6).

AAm monomeri ile hazırlanmış olan MIP ve NIP hidrojellerin pH 7,0 fosfat tamponunda yapılan geri bağlama çalışmasında ise yalancı 1.mertebe korrelasyon katsayısının yalancı 2.mertebe korrelasyon katsayısından büyük olduğu böylelikle yalancı birinci mertebe kinetiğine uyduğunu görülmektedir (Tablo 4.7).

AAm-1-VI monomeri ile hazırlanmış olan MIP ve NIP hidrojellerin geri bağlama çalışmasının yalancı 1.mertebe korrelasyon katsayısının yalancı 2.mertebe korrelasyon sayısından büyük olduğu yalancı birinci mertebe kinetiğine uyduğunu görülmektedir (Tablo 4.8).

AAm-MA monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin geri bağlama çalışmasında ise yalancı 2.mertebe korrelasyon katsayısının yalancı 1.mertebe korrelasyon sayısından büyük olduğu görülmektedir (Tablo 4.9). Bu da yalancı ikinci mertebe kinetiğine uygunluğunu göstermektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında, El-Aal ve ark. fonksiyonel monomer olarak AAm ve DMAEMA, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid kullanarak hazırladıkları hidrojellere insan serum albüminin moleküler damgalanması üzerine yaptığı kinetik çalışmalarının sonucunda adsorpsiyonun yalancı ikinci mertebeye uyduğunu tespit etmişlerdir [46].

Parçacık içi difüzyon etkisi incelendiğinde hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerde korrelasyon katsayısının 1'den oldukça düşük olduğu ve eğim ekseninin orjinden geçmediği görülmektedir. Bu bilgilere dayanarak lipazın MIP ve NIP

hidrojellerin üzerindeki tutunmasının yüzeyde gerçekleştiği söylenebilir. Bu durum parçacık içi difüzyonun etkili olmadığını göstermektedir.

4.8. Adsorpsiyon Termodinamiği

Termodinamik parametrelerin hesaplanmasında ΔG^0 'yi bulmak amacıyla denge sabiti olan K_c 'nin konsantrasyonlara karşı grafiğe dökülmesiyle bulunmaktadır. $\ln K_c$ değerinin $1/T$ değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşan doğrunun eğimi ve kesim noktası ile de ΔH^0 ve ΔS^0 değerleri hesaplanmaktadır [60].

$$K_c = \frac{C_a}{C_e} \quad (4.7)$$

K_c : Denge sabiti

C_a (mg/mL): Adsorbent tarafından tutulan protein konsantrasyonu

C_e (mg/mL): Çözeltide kalan protein konsantrasyonu

$$\ln K_c = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{R} \times \frac{1}{T} \quad (4.8)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4.9)$$

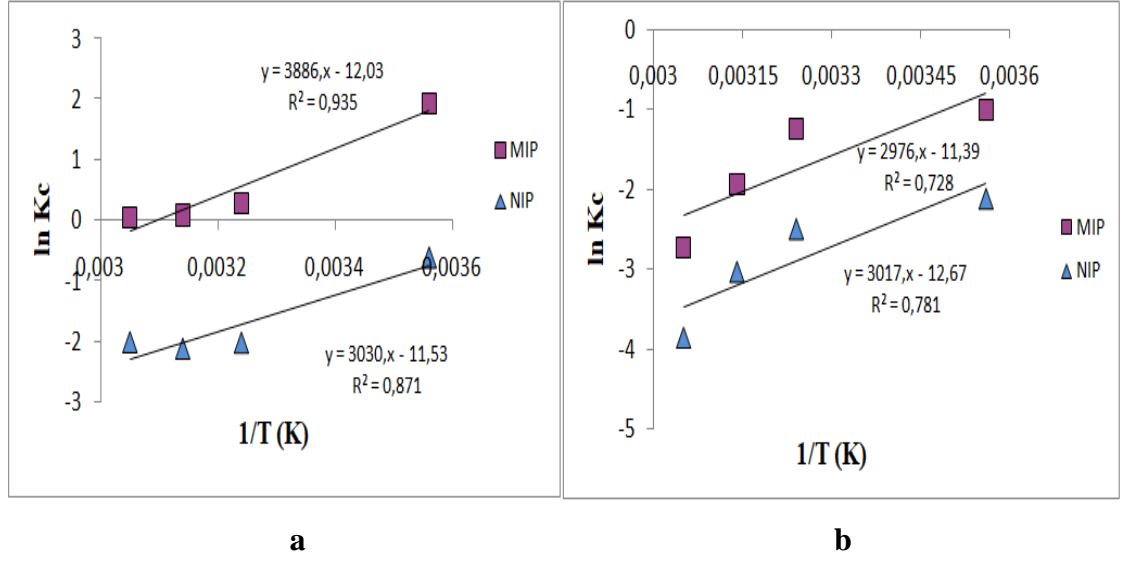
ΔG^0 (kJ/mol): Gibbs serbest enerji değişimi

ΔH^0 (kJ/mol): Entalpi değişimi

ΔS^0 (kJ/mol K): Entropi değişimi

T (Kelvin): Mutlak sıcaklık

R : Gaz sabiti



Şekil 4.25. AAm monomeri ile hazırlanmış hidrojelere **a)** pH 3,0 **b)** pH 7,0'de yapılan geri bağlama çalışmasının LnKc'ye karşı 1/T grafiği

Tablo 4.10. AAm monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojeller için termodinamik parametreler (pH 3,0 ve pH 7,0)

AAm		ΔS° (kJ/mol K)	ΔH° (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
pH 3,0	MIP	-0,98	-318,65	-26,61
	NIP	-0,95	-248,46	34,64
pH 7,0	MIP	-0,93	-244,03	33,11
	NIP	-1,04	-247,39	62,53

Tablo 4.10 incelendiğinde AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojenlerin hem pH 3,0 asetat, hemde pH 7,0 fosfat tamponunda yapılan geri bağlama çalışması için hesaplanan termodinamik parametrelerde ΔH° 'ın negatif değere sahip olduğu görülmektedir. Bu durum adsorpsiyonun ekzotermik bir davranım gösterdiğini, ΔS° 'ın negatif değeri ise çözünen-çözelti (adsorban-sıvı faz) arayüz adsorplanan derişiminde azalmayı göstermekte olup aynı zamanda katı faz üzerinde adsorplanan derişimin arttığını belirtmektedir. pH 3,0 ile yapılan geri bağlama çalışmasında MIP hidrojelde ΔG° 'nin negatif değeri olması ise adsorpsiyonun kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir.

4.9. Lipaz Damgalı ve Damgasız Hidrojelin Seçimliliğinin İncelenmesi

MIP ve NIP hidrojenin seçimliliğinin incelenmesi amacıyla geri bağlama çalışması lipaz, α -amilaz, β -glukozidaz ve BSA gibi farklı proteinler ile gerçekleştirildi. Çalışmada NIP ve MIP hidrojel için tutunan protein miktarları ve IF değeri bulundu (Tablo 4.11). Buna göre MIP hidrojenlerin farklı enzimlerle yapılan geri bağlama çalışmasında bu enzimleri tutmadığı hesaplanan protein miktarlarından anlaşılmaktadır. Lipaz enzimi ile yapılan geri bağlama çalışmasında ise tutunan protein miktarının oldukça arttığı görüldü ve IF değeri 2,48 ($IF > 1$) olarak bulundu.

Tablo 4.11. MIP ve NIP hidrojenler için farklı proteinlerle seçimliliğinin karşılaştırılması

	MIP (mg/g)	NIP (mg/g)	IF (qMIP/qNIP)
Lipaz	8,34	3,35	2,48
α-Amilaz	0,98	2,8	0,35
β-Glukozidaz	0,5	2,5	0,2
BSA	0,01	2,32	0,004

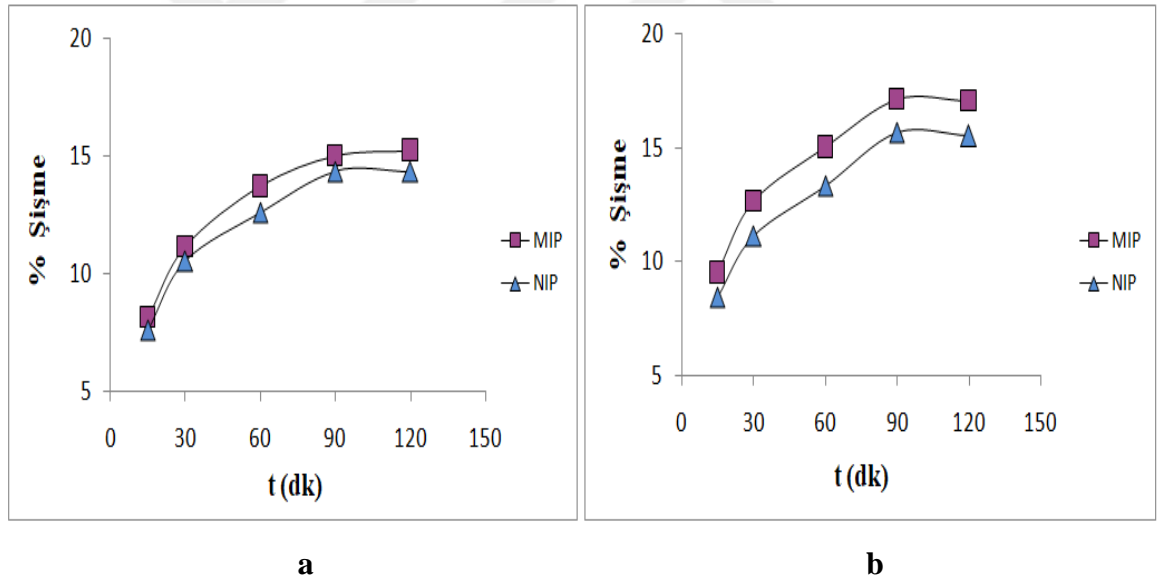
4.10. Şişme Karakterizasyonu

AAM monomeriyle hazırlanmış olan MIP ve NIP hidrojellerin şişme kapasitelerini belirlemek amacıyla, 10 mg tartılan hidrojelere oda sıcaklığında belirli zaman aralıklarında (15-120 dk), 1 mL pH 3,0 asetat ve pH 7,0 fosfat tampon çözeltileri ile ayrı ayrı yapılan çalışmada eşitlik 4.10 kullanılarak hesaplanan % şişme değerleri zamana karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.23).

$$\% \text{ Şişme (\% S)} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (4.10)$$

M_0 (mg): Başlangıçtaki kuru hidrojin kütlesi

M_t (mg): t süre sonundaki şişmiş hidrojin kütlesi



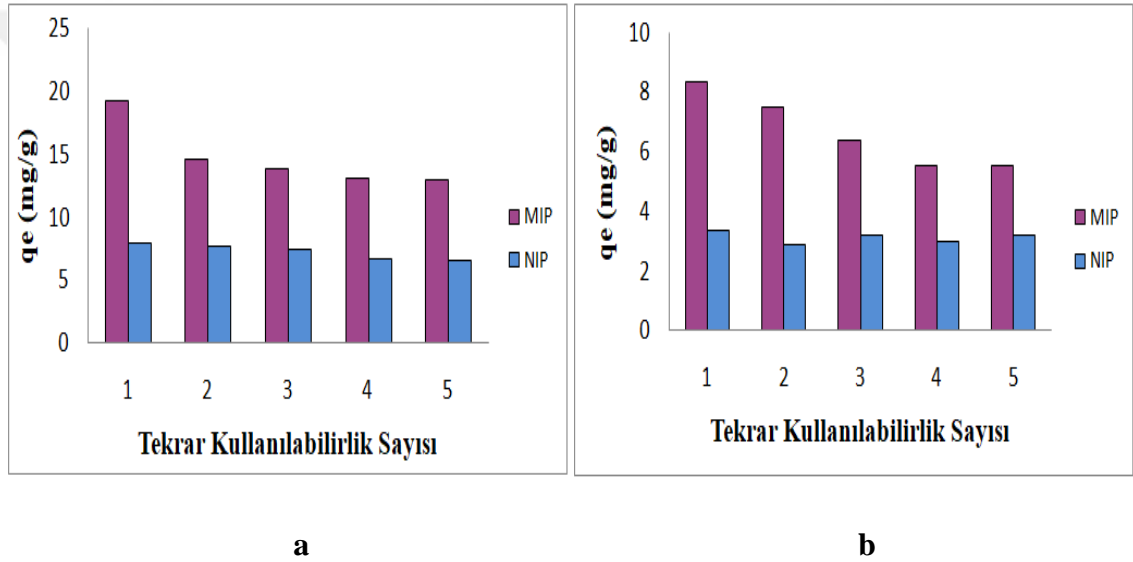
Şekil 4.26. AAM monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojellerin şişme kapasitelerinin zamanla değişimi a) pH 3,0 b) pH 7,0

Şişme izotermeleri incelendiğinde hem pH 3,0 asetat hemde pH 7,0 fosfat tamponuyla yapılan çalışmada 90 dakika sonunda şişmenin dengeye geldiği görülmektedir (Şekil 4.26). pH 3,0 asetat tamponunda yapılan çalışma için 90 dakika sonunda şişme değerleri MIP ve NIP hidrojeller için sırasıyla % 15 ve % 14 olarak

bulunurken pH 7,0 fosfat tamponunda yapılan çalışma için 90 dakika sonundaki şişme değerleri MIP ve NIP hidrojel için sırasıyla %17 ve %16 olarak bulundu.

4.11. Tekrar Kullanılabilirlik Testi

AAM monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojellerin tekrar kullanılabilirliklerini test etmek amacıyla aynı hidrojel üzerinden hem pH 3,0 asetat hemde pH 7,0 fosfat tamponunda optimum koşullarda 5 kez geri bağlama çalışmaları yapıldı.



Şekil 4.27. AAM monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojeller için yapılan tekrar kullanılabilirlik çalışması a) pH 3,0 b) pH 7,0

MIP ve NIP hidrojellerin pH 3,0 asetat tamponunda yapılan tekrar kullanılabilirlik çalışmasında 5 kez kullanım sonrasında sırasıyla % 68 ve % 84 geri bağlama kapasitesini koruduğu görülürken, pH 7,0 fosfat tamponunda yapılan tekrar kullanılabilirlik çalışması için MIP ve NIP hidrojeller ise sırasıyla % 66 ve % 96 oranında geri bağlama kapasitesini koruduğu görüldü (Şekil 4.27).

4.12. Pankreatik Enzim Tabletinden Lipaz Enziminin Seçimli Olarak Ayrılması

İçerisinde lipaz, α -amilaz ve proteolitik enzimler bulunduran tablet içerisinden lipazın geri kazanımı AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller ile test edildi. Lipaz aktivite tayinleri *p*-NPP 'ün substrat olarak kullanılması ile yapıldı. Hidroliz sonucunda *p*-nitrofenol (*p*-NP) oluşmakta ve çözeltinin berrak sarı rengi enzim aktivitesine bağlı olarak daha koyu bir sarı renk almaktadır. Sonuç olarak *p*-NP oluşumundan kaynaklanan absorbans artışı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Protein tayini ise Bradford yöntemine dayanarak yapıldı.

Tablet (0,5 g) 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponunda çözüldükten sonra santrifüjlenip üst fazda aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Tablet örneğinden lipaz enziminin seçimli olarak alınması amacıyla AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller adsorban olarak kullanıldı. Geri bağlama sonrasında hidrojellerden lipaz enziminin desorpsiyonu 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponu ile yapıldı. Aktivite ve protein tayin sonuçları Tablo 4.12'de verildi.

Tablo 4.12. MIP ve NIP hidrojellere pH 7,0 fosfat tamponunda çözünen tablet ile geri bağlama ve desorpsiyon çalışmalarının aktivite ve protein tayini sonuçları

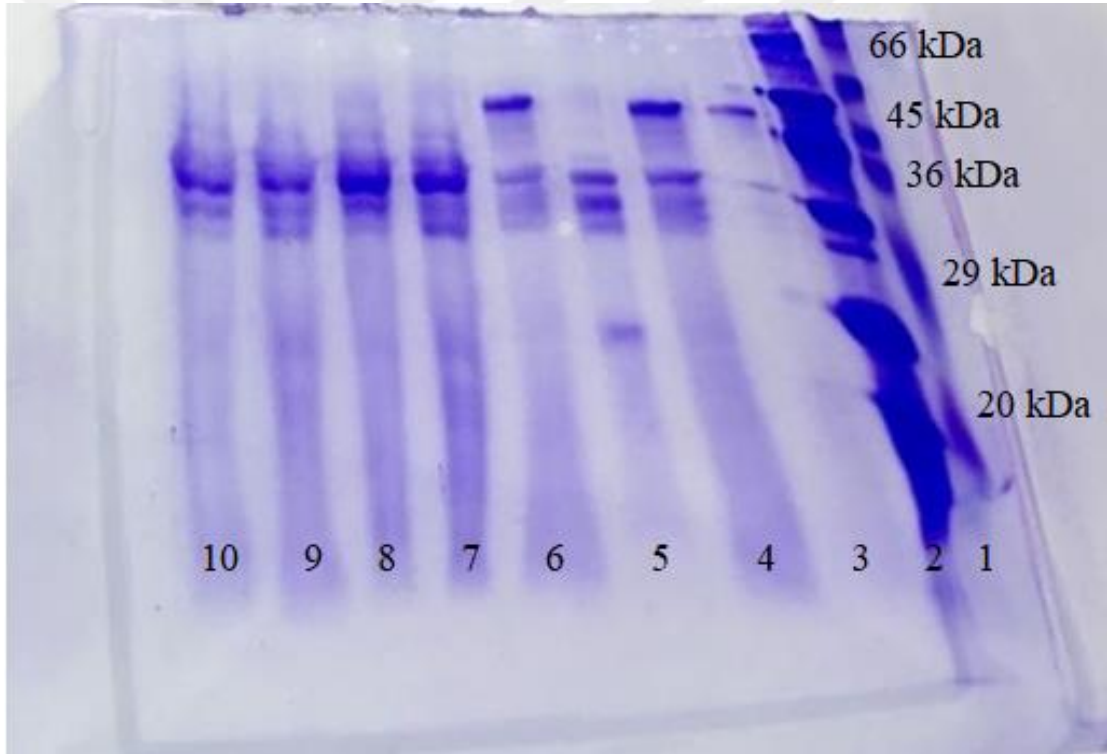
	Hidrojeller Üzerine Uygulanan Tablet Örneği			Geri Bağlama Sonrası Bağlanmayan Enzim (Üst Faz)		
	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
MIP Hidrojel	0,05	0,88	0,05	0,007	0,55	0,01
NIP Hidrojel	0,05	0,88	0,05	0,003	0,59	0,006

	Hidrojeller Üzerine Tutunan Enzim (Hesaplanan)			Hidrojellerde Tutunan Enzimin Geri Alınması (Desorpsiyon)			% Geri Kazanım
	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	
MIP Hidrojel	0,04	0,33	0,12	0,02	0,18	0,11	%53,22
NIP Hidrojel	0,04	0,29	0,15	0,02	0,16	0,14	%54,63

Tablo 4.12. incelendiğinde 0,88 mg/mL proteinin, MIP hidrojelde 0,33 mg/mL'si, NIP hidrojelde ise 0,29 mg/mL'sinin tutunduğu, desorpsiyon çalışmalarının sonucunda MIP hidrojelde 0,18 mg/mL, NIP hidrojelde ise 0,16 mg/mL proteinin geri alınabildiği görülmektedir.

4.13. SDS-PAGE Jel Elektroforezi ile Lipaz Bağlama Spesifikliğinin Belirlenmesi

Lipaz enziminin spesifikliğinin ve hidrojellere bağlama etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla ticari olarak satın alınan pankreatik enzim içeren tablet tozu 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponunda çözüldü ve AAm monomeri ile hazırlanmış MIP ve NIP hidrojeller üzerine uygulandı. (Şekil 4.28.).



Şekil 4.28. MIP ve NIP hidrojeller üzerine tablet örneği uygulama çalışmasının SDS-PAGE Jel Elektroforezi sonuçları, 1-2) Standart protein marker (Colorbust elektroforez marker 20-66 kDa), 3) Saf lipaz enzimi, 4) Tablet örneği, 5) MIP hidrojellere örnek uygulama sonrası adsorbe olmayan sıvıları, 6) NIP hidrojellere örnek uygulama sonrası adsorbe olmayan sıvıları, 7) MIP hidrojellerin desorpsiyon örnekleri, 8) NIP hidrojellerin desorpsiyon örnekleri, 9-10) MIP ve NIP desorpsiyon örneklerinin 1:1 seyreltilmiş sıvıları.

Tablet örneğinde lipaz enziminin varlığı (4.kuyucuk), saf lipazın elektroforez görüntüsüyle (3.kuyucuk) karşılaştırılarak tespit edildi. Tablet örneğinin MIP hidrojele uygulanan geri bağlama üst fazında lipaz enziminin bulunduğu bölgede bant görülmemesi MIP tarafından lipazın tutulduğunu göstermektedir (5. Kuyucuk). Tablet örneğinin NIP hidrojele uygulanan geri bağlama üst fazında (6. Kuyucuk) lipaz enziminin bulunduğu bölgede bant görülmesi NIP üzerinde lipaz adsorpsiyonunun daha az olduğunu göstermektedir.

MIP ve NIP için desorpsiyon sıvılarının jel profilleri ise 7. ve 8. kuyucuklarda görülmektedir. 9. ve 10. kuyucuklarda ise desorpsiyon sıvılarının 1:1 oranında seyreltilmiş halleri uygulanmıştır. Desorbe olan protein miktarı düşük olduğundan hem MIP hemde NIP hidrojeller için lipaz enziminin bulunduğu bölgede silik bir bant görülebilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında öncelikle moleküler damgalama tekniği kullanılarak HEMA, 1-VI, MA, AAm, 2-DMAEMA gibi farklı fonksiyonlara sahip yardımcı monomerler kullanılarak MIP ve NIP olmak üzere farklı yapıda hidrojeller hazırlandı. Farklı monomerler ile hazırlanan hidrojellerin lipaz bağlama kapasitelerini karşılaştırmak üzere, lipaz geri bağlama çalışmaları farklı pH ortamlarında gerçekleştirildi. MIP ve NIP hidrojellerde tutunan protein miktarları ve damgalama etkinliği IF değerleri hesaplandı. AAm, AAm-1-VI, AAm-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojellerin IF değerleri diğer monomerler ile hazırlanan hidrojellerden yüksek olması nedeniyle deneysel çalışmalar bu hidrojeller üzerinden gerçekleştirildi.

Lipaz enziminin seçimli ayırımına yönelik hazırlanan hidrojelin yapısal karakterizasyonu FTIR analizi ve yüzey morfolojilerinin analizi ise SEM ile yapıldı. Yüzey görüntülerine göre MIP ve NIP hidrojellerin oldukça gözenekli bir yapıya sahip oldukları ve MIP hidrojelin yıkandıktan sonra yüzeyinin daha pürüzlü ve gözenekli hale geldiği görülmektedir.

Lipaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlama koşullarının optimizasyonu amacıyla pH etkisi, temas süresi, sıcaklık ve enzim konsantrasyonu incelendi. AAm, AAm-1-VI, AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine enzimin optimum geri bağlama süresi 90 dakika, optimum geri bağlama sıcaklığı 25 °C ve optimum pH 3,0 olarak belirlendi. Başlangıç enzim konsantrasyonu 5 mg/mL'ye ulaştığında adsorpsiyonun doygunluğa ulaştığı görüldü. Optimize edilen koşullarda adsorpsiyon izotermi ve adsorpsiyon kinetikleri çalışıldı.

AAm monomerleri ile hazırlanan hidrojellerde pH 3,0 ve pH 7,0 fosfat tamponunda yapılan geri bağlama çalışmaları sonucunda korrelasyon katsayısının Langmuir izotermine daha büyük olması nedeniyle adsorpsiyonun Langmuir izotermine uyumlu olduğu görülmektedir. AAm-MA ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin de Langmuir izotermine uyumlu olduğu görülmektedir. Bu durum

adsorpsiyon alanının homojen olduğunu ve tek tabaka halinde kaplanmış olduğunu göstermektedir.

AAM-1-VI ile hazırlanan hidrojelde MIP hidrojel Langmuir izotermi ile uyumluyken, NIP hidrojin Freundlich izotermine uygun olduğu tespit edildi. Freundlich izotermine uyumluluğu ise adsorpsiyonun heterojen olarak gerçekleştiğini açıklamaktadır.

AAM (pH 7,0) ve AAM-1-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojelde adsorpsiyon kinetiğinin yalancı 1.mertebeğe uyumlu olduğu görüldü. Bu durumda, tepkime hızının konsantrasyona bağı olarak değişim gösterdiği anlaşılmaktadır. AAM monomeri (pH 3,0) ve AAM-MA monomerleri ile hazırlanan hidrojelde adsorpsiyon kinetiğinin yalancı 2.mertebeğe uygun olduğu tespit edildi. Bu durum ise, tepkime hızının adsorbat konsantrasyonundan bağımsız, adsorpsiyon kapasitesine ve zamana bağı olduğunu göstermektedir.

Parçacık içi difüzyon etkisi incelendiğinde hazırlanan MIP ve NIP hidrojelde korrelasyon katsayısının 1'den oldukça düşük olduğu ve eğim ekseninin orjinden geçmediği görülmektedir. Bu durum göz önüne alınarak enzimin hidrojel üzerindeki tutunmasının yüzeyde gerçekleştiği söylenebilir. Bu da parçacık içi difüzyonun etkili olmadığını göstermektedir.

AAM monomeri pH 3,0 asetat tamponu ile yapılan termodinamik çalışmalarında ΔG° değerinin (-26,61) negatif çıkması tepkimenin kendiliğinden gerçekleşebileceğini ifade etmektedir. pH 7,0' de pozitif bir değer vermesi (33,11) ise tepkimenin kendiliğinden gerçekleşmediğini göstermektedir. ΔH° 'ın negatif olması adsorpsiyonun ısı vererek gerçekleştiğini yani ekzotermik özelliğini açıklayan bir faktördür. ΔS° 'ninsıfırdan farklı olması ise adsorpsiyon sırasında taneciklerin yüzeyde tutunarak daha düzenli hale geldiğini göstermektedir.

Lipaz damgalı ve damgasız hidrojin seçimliliğinin incelenmesi amacıyla geri bağlama çalışması α -amilaz, β -glukozidaz ve BSA gibi farklı proteinler ile gerçekleştirildi. Buna göre MIP hidrojelde farklı enzimlerle yapılan geri bağlama çalışmasında bu enzimleri tutmadığı hesaplanan protein miktarlarından anlaşıldı.

MIP ve NIP hidrojellerin şişme özelliklerini araştırmak amacıyla şişme testi uygulandı. AAm monomeri ile hazırlanan pH 3,0'te yapılan geri bağlama çalışmalarında MIP ve NIP hidrojelde şişme kapasiteleri sırasıyla % 14 ve % 15 bulunurken, pH 7,0 de yapılan geri bağlama çalışmaları için sırasıyla % 17 ve % 16 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre hidrojellerin şişme durumlarında pH'ın önemli bir etkisi olmadığı görüldü.

MIP hidrojellerin en önemli avantajlarından biri de oldukça dayanıklı ve tekrar tekrar kullanılabilir olmalarıdır. AAm monomeri ile hazırlanan hidrojellerin tekrar kullanılabilirliği, optimum koşullarda aynı hidrojellerin 5 kez tekrar kullanılmasıyla test edildi. 5 kez yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları sonucunda pH 3,0 ile yapılan çalışmada MIP ve NIP hidrojellerin sırasıyla, % 68 ve % 84 oranında, pH 7,0 ile yapılan çalışmada sırasıyla % 66 ve % 96 oranında geri bağlama kapasitelerini koruduğu görüldü.

Lipaz damgalı hidrojellerin afinite materyali olarak kullanılabilirliği, ticari olarak satın alınan içerisinde lipaz, α -amilaz ve proteolitik enzimler bulunduran tablet içerisinde lipazın geri kazanımı AAm monomeri ile hazırlanan hidrojeller ile test edildi.

Yüksek lisans çalışmasının deneysel sonuçları özet şeklinde Tablo 5.1-5.2-5.3 ve 5.4' te verildi.

Tablo 5.1. AAm monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (*pH 7,0*)

	MIP	NIP
Seçilen Fonksiyonel Monomer	AAm	AAm
Optimum Temas Süresi	90 dk	90 dk
Optimum Sıcaklık	25 °C	25 °C
Deneysel Kapasite	8,34 mg/g	3,36 mg/g
İzoterm Modeli	Langmuir İzotermi $R^2= 0,996$	Langmuir İzotermi $R^2= 0,959$
Kinetik Modeli	Yalancı 1. Mertebe Modeli $q_e= 11,94$ mg/g	Yalancı 1. Mertebe Modeli $q_e= 5,92$ mg/g
ΔG (J/mol)	33,11	62,53
ΔH (J/mol)	-244,03	-247,39
ΔS (J/mol K)	-0,93	-1,04
% Şişme	17	16
Tekrar Kullanılabilirlik	5 kez	5 kez

Tablo 5.2. AAm monomer ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojjeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (*pH 3,0*)

	MIP	NIP
Seçilen Fonksiyonel Monomer	AAm	AAm
Optimum Temas Süresi	90 dk	90 dk
Optimum Sıcaklık	25 °C	25 °C
Deneysel Kapasite	19,17 mg/g	7,86 mg/g
İzoterm Modeli	Langmuir İzotermi $R^2= 0,958$	Langmuir İzotermi $R^2= 0,940$
Kinetik Modeli	Yalancı 2. Mertebe Modeli $q_e= 17,85$ mg/g	Yalancı 2. Mertebe Modeli $q_e=8,69$ mg/g
ΔG (J/mol)	-26,61	34,64
ΔH (J/mol)	-318,65	-248,46
ΔS (J/mol K)	-0,98	-0,95
% Şişme	15	14
Tekrar Kullanılabilirlik	5 kez	5 kez

Tablo 5.3. AAm-1-VI monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (*pH 3,0*)

	MIP	NIP
Seçilen Fonksiyonel Monomer	AAm-1-VI	AAm-1-VI
Optimum Temas Süresi	90 dk	90 dk
Deneysel Kapasite	17 mg/g	4,41 mg/g
İzoterm Modeli	Langmuir İzotermi $R^2= 0,984$	Freundlich İzotermi $R^2= 0,991$
Kinetik Modeli	Yalancı 1. Mertebe Modeli $q_e= 17,18$ mg/g	Yalancı 1. Mertebe Modeli $q_e= 6,05$ mg/g

Tablo 5.4. AAm-MA monomerleri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojel ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları (*pH 3,0*)

	MIP	NIP
Seçilen Fonksiyonel Monomer	AAm-MA	AAm-MA
Optimum Temas Süresi	90 dk	90 dk
Deneysel Kapasite	23,48 mg/g	4,49 mg/g
İzoterm Modeli	Langmuir İzotermi $R^2= 0,997$	Langmuir İzotermi $R^2= 0,933$
Kinetik Modeli	Yalancı 2. Mertebe Modeli $q_e= 22,22$ mg/g	Yalancı 2. Mertebe Modeli $q_e= 1,95$ mg/g

KAYNAKLAR

- [1] Gjellesvik M.A. Islam, F. Parveen, K. Hossain, S. Khatun, Md. R. Karim G.S. Kim, N. Absar and Md. S. Haque Purification and Biochemical Characterization of Lipase from the Dorsal Part of *Cirrhinus reb.* Thai Journal of Agricultural Science 2009, 42(2): 71-80
- [2] Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee. Production, purification, Characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, U.C. 2001, 19; 627–662
- [3] Öztürk B. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 2002, 12:20-23.
- [4] Akoh C.C. and Min D.B. *Microbial Lipase and Enzymatic Interesterification Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcel Deccer, Inc, New York. 1998, 641698.
- [5] Petersen M.T.N., Fojan P. and Petersen S.B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of biotechnology*, 2001, 85 issue 2:119-131.
- [6] Şen, M. ve Güven, O. “Prediction of the Swelling Behaviour of Amphiphilic Hydrogels and the Determination of Average Molecular Weight Between Cross-links”, *Computational and Theoretical Polymer Science*, 2000, 11:475482.
- [7] Huglin, M.B. and Zakaria, M.B. “Swelling Properties of Copolymeric Hydrogels Prepared by Gamma Irradiation”, *Journal of Applied Polymer Science*, 1986, 31:457-475.
- [8] Saraydın, D. *Akrilamit-Maleik Asit Hidrojellerinin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Bazı Su Kirleticilerinin Tutulmasında Kullanımı*, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 1992, (Doktora Tezi)
- [9] Sarıışık, S.B. *Akrilamit ve (2-akrilamido-2-metil propan sülfanik asit) Anyonik Hidrojellerinin Suda ve Tuz Çözeltilerinde Şişme Özelliklerinin İncelenmesi*, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 1997, (Yüksek Lisans Tezi)
- [10] Qui, Y. and Park, K. Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery”, *Advanced Drug Deliver Reviews*, 2001, 53:321-339.
- [11] Gupta, P., Vermani, K. and Garg, S. “Hydrogels from Controlled Release to pH Responsive Drug Delivery”, *Drug Discovery Today*, 2002. 7:569-578.
- [12] Swami, S.N. *Radiation Synthesis of Polymeric Hydrogels for Swelling Controlled Drug Release Studies*, Doctor of Philosophy, University of Western Sydney New South Wales, Australia, 2004.
- [13] Taşdelen, B., Apohan, N., Güven, O. and Baysal, B.M., “Swelling and Diffusion Studies of poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) Copolymeric Hydrogels in Water and Aqueous Solutions of Drugs”, *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 91:911-915.
- [14] Kaetsu I. and Okamura S., “Radiation Synthesis of Polymeric Materials for Biomedical and Biochemical Applications”, *Advances in Polymer Science*, 1993, 105:81-97.
- [15] Rosiak, I.M., Ulanski, L.A., Pajewski, F., Yosii, F. and Makuuchi, K. “Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Purposes”. *Radiation Physics and Chemistry*, 1995, 46:161-168.
- [16] Güven, O., Şen, M., Karadağ, E. and Saraydın, D. “A Review on the Radiation Synthesis of Copolymeric Hydrogels for Adsorption and Separation Purposes”, *Radiation Physics and Chemistry*, 1999, 56:381-386.
- [17] Vasquez, B., Gruchaga, M., Goni, I. and Roman, A.S. “pH-Sensitive Hydrogels Based on Non-Ionic Acrylic Copolymers”, *Biomaterials*, 1997, 18:521-526.

- [18] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J. and Whitcombe, M.J. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including J. Mole. Recognit., 2003, 19:106-180.
- [19] Polyakov M.V. Adsorption properties and structure of silica gel, Zhur. Fiz. Khim, 1931, 2: 799–805.
- [20] Curti, R., Colombo, U. Chromatography of stereoisomers with 'tailor made' compounds, J. Am. Chem. Soc. 1952, 74: 3961–3961.
- [21] Sagiv, J. Organized monolayers by adsorption. III. Irreversible adsorption and memory effects in skeletonized silane monolayers, Isr. J. Chem, 1979, 18: 346– 353.
- [22] Mosbach, K., Ramson, O., The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, Biotechnol., 1996, 14: 163–170.
- [23] Ishii, T., Nakashima, Y., Shinkai S. Regioselective introduction of two boronic acid groups into fullerene using saccharides as imprinting templates. Chem. Commun. 1998, 1047–1048.
- [24] Zimmerman, S.C. and Lemcoff, N.G. Synthetic hosts via molecular imprinting are universal synthetic antibodies realistically possible Chem Commun, 2004, 5–14.
- [25] Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul, Üni., BİYOGEM Yayın No: 2, Nobel Tıp Kitabevi, 2004.
- [26] Singh A.K., Mengesha, H.M., Ramaiah, C.D. Phylogenetic relations in section Arachis based on seed protein profile, Theoretical and Applied Genetics, 1991, 82: 593-597.
- [27] Babaoğlu S., Açık L., Çelebi A., Adıgüzel, N. Molecular Analysis of Turkish Alyssum L. (Brassicaceae) Species by RAPD-PCR and SDS-PAGE methods., G.U. Journal of Science, 2004, 17(3):25-33.
- [28] Tutar, Y., Geçkil, H., Karataş, A. Biyokimya, 3ncü baskıdan çeviri, Nobel Yayınevi, Ankara, 2010, 438 s.
- [29] Aslan, A. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin analizi, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004.(Yüksek Lisans Semineri)
- [30] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. Analytical Biochemistry, 1975, 72: 248-254.
- [31] Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25 : 522-529.
- [32] Muslu, Yılmaz. Çözümlü Problemlerle Temel Prosesler, Aktif Yayın, 2000.
- [33] Sawyer, C. N., Mccarty P. L. Chemistry For Environmental Engineering. Mcgraw Hill Inc., Singapore, 1978, 519s
- [34] Chu, H. C. ve Chen, K.M. Reuse Of Activated Sludge Biomass: I. Removal Of Basic Dyes On Biomass. *Processbio*, 2002, 37: 1129-1134
- [35] Keskinan, O., Goksu, M. Z. L., Yuceer, A., Basıbuyuk, M., Forster, C. F. Heavy Metal Adsorption Characteristics Of A Submerged Aquatic, 2003.
- [36] Nollet, H., Roels, M., Lutgen, Yash, P., Van Der Meeren P., Verstraete, W., Removal Of PCBs From Wastewater Using Fly Ash, *Chemosphere*, 2003, 53:655-665
- [37] Masquè N., Marcè R.M., Borrull F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction, *Trends in Anal. Chem*, 2001, 20(9): 477-487.

- [37] Tunç, Y., Hasırcı, N., Yeşilada, A., Ulubayram, K., Comonomer Effects on Binding Performances and Morphology of Acrylate-Based Imprinted Polymers, *Polymer*, 2006, 47, 6931-6940.
- [38] Denizli, A., Kocakulak, M., Piskin, E., Bilirubin Removal from Human Plasma in a Packed Bed Column System with Dye-Affinity Microbeads, *Journal of Chromatography B*, 1998, 707, 25-31.
- [39] Odabaşı, M., Denizli, A., Polyhydroxyethylmethacrylate Based Magnetic DNA-Affinity Beads for Anti-DNA Antibody Removal from Systemic Lupus Erythematosus Patient Plasma, *Journal of Chromatography B*, 2001, 760, 137- 148.
- [40] Denizli, A., Preparation of Immuno-Affinity Membranes for Cholesterol Removal from Human Plasma, *Journal of Chromatography B*, 2002, 772, 357- 367.
- [41] Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Tenhu H., Aseyev V., Hirvonen S.-P., Mikhaleva A.I. Copolymers of 1-vinylimidazole and (meth)acrylic acid: Synthesis and polyelectrolyte properties, *Eur. Polym. J.* 2004, 40:1027–1032.
- [42] Hilt J.Z., Byrne M.E. Configurational biomimesis in drug delivery:molecular imprinting of biologically significant molecules, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004, 56:1599– 1620.
- [43] Yu C., Mosbach K. Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group, *J. Mol. Recog.*, 1998, 11:69–74.
- [44] Zheng N., Li Y.Z., Chang W.B., Wang Z.M., Li T.J. Sulfonamide imprinted polymers using co-functional monomers, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 452:277–283.
- [45] Zhou J., He X., Li Y. An acrylamide-based molecularly imprinted polymer for the efficient recognition of optical amino acid hydantoins, *Anal. Commun.*, 1999, 36, 243–246.
- [46] Abd El-Aal M., Al-Ghobashy M., Fatalla F. Preparation and characterization of pH-responsive polyacrylamide molecularly imprinted polymer, 2017.
- [47] Pang X., Cheng G., Zhang Y., Lu S. Soft-wet polyacrylamide gel beads with the imprinting of bovine serum albumin, 2006.
- [48] Culver H., Steichen S., Peppas N., A Closer Look at the Impact of Molecular Imprinting on Adsorption Capacity and Selectivity for Protein Templates.
- [49] Zhang C., Wang Y., Guo J., Liu Y., Zhou Y. Chitosan nanoparticle carrier based on surface molecularly imprinted polymers for the recognition and separation of proteins, 2015.
- [50] Chen Z., Hua Z., Xu L., Huang Y., Zhao M., Li Y. Protein-responsive imprinted polymers with specific shrinking and rebinding, 2008.
- [51] Ji S., Li N., Shen Y., Li Q., Qiao J., Li Z. Poly(amino acid)-based thermoresponsive molecularly imprinted magnetic nanoparticles for specific recognition and release of lysozyme, 2016.
- [52] Sarıkaya, Y. *Fizikokimya*, Gazi Kitabevi, Genişletilmiş 6. Baskı, Ankara, 1993.
- [53] Aksu, Z., Yener, J., A Comparative Adsorption/Biosorption Study Of Mono-Chlorinated Phenols On To Various Sorbents, *Waste Management*, 2001, 21:695-702
- [54] Chiou, M.-S., Li, H.-Y., Equilibrium And Kinetic Modeling Of Adsorption Of Reactive Dye On Cross-Linked Chitosan Beads. *Journal Of Hazardous Materials*, 2002, 93(2): 233-248
- [55] Clegg R., Zhong J., Irani A., Gu J., Spencer D., Peppas N. Characterization of protein interactions with molecularly imprinted hydrogels that possess engineered affinity for high isoelectric point biomarkers 2017.

- [56] Basıbuyuk, M. and Forster, C.F, An Examination Of Adsorption Characteristics Of Basic Dye On To Live Activated Sludge System. *Process Biochem.*, 2003, 38:1311-1316
- [57] Ho, Y.S., Wang,C.C. Pseudo-Isotherms For The Sorption Of Cadmium Ions Onto Tree Fern. *Process Biochem.*, 2004, 39:759-763
- [58] Ho,Y.S., Mckay, G. Pseudo-Second Order Model For Sorption Processes. *Process Biochem.*, 1999, 34:451-465.
- [59] Waranusantgul, P., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E. S. Kinetics Of Basic Dye Biosorption By Giant Duckweed. *Environmental Pollution*, 2003. 125:385-392
- [60] Dakıky, M., Khamıs, M., Manassra, A., Mer'eb, M., Selective Adsorption Of Chromium In Industrial Wastewater Using Low-Cost Abudantly Available Adsorbents. *Advances In Environ. Res*, 2002.6:533- 540



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğba Çelebi

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : tugbacelebi_@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Sıdıka Rodop Lisesi, 2011

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2019

Mesleki Deneyim

Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme Ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi
2014 (20 Gün Staj)

İzsu- Atıksu Arıtma Tesisleri 2015 (20 Gün Staj)

Kongre

Çelebi T., Dinçer A. Selective Adsorption of Lipase Using Molecularly Imprinted Hydrogel. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018). Poster Sunumu, 2018.