

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

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

**$\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SEÇİMLİ AYRIMINA YÖNELİK  
HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Mervecan SEVİLDİK**

**Danışman  
Doç. Dr. Ayşe DİNÇER**



**MANİSA-2018**

**Mervecan  
SEVİLDİK**

**$\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SEÇİMLİ AYRIMINA YÖNELİK HİDROJELLERİN  
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**2018**

## TEZ ONAYI

Mervecan SEVİLDİK tarafından hazırlanan " **$\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SEÇİMLİ AYRIMINA YÖNELİK HİDROJELERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**"adlı tez çalışması xx/xx/xxxx 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 DİNÇER**  
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.

**Mervecan SEVİLDİK**



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ .....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. $\beta$ -Glukozidaz .....	4
2.2. Hidrojeller .....	6
2.2.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	8
2.2.2. Hidrojellerin Kullanım Alanları .....	9
2.3. Moleküler Damgalama Teknolojisi.....	10
2.3.1.Moleküler Damgalama Yöntemleri .....	11
2.3.2. Moleküler Damgalamada Kullanılan Bileşenler .....	14
2.4. Elektroforez Yöntemi .....	16
2.4.1. Poliakrilamid Jeller .....	17
2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) .....	18
2.5. Tezin Amacı .....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	20
3.1. Materyal .....	20
3.2. Yöntem .....	20
3.2.1 Protein Tayini ve Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması .....	20
3.2.2. p-Nitrofenol Standart Grafiğinin Oluşturulması.....	21
3.2.3. Glukozidaz Aktivite Tayini .....	21
3.2.4. MIP ve NIP Hidrojellerin Hazırlanması.....	22
3.2.5. MIP ve NIP Hidrojellerin Karakterizasyonu .....	24
3.2.6. Geri Bağlama Çalışmaları.....	24
3.2.7. Çapraz Tanıma Testi.....	25
3.2.8. Tekrar Kullanılabilirlik.....	25
3.2.9. Şişme Testi.....	25
3.2.10. $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Bademden Kısmi Saflaştırılması.....	26
3.2.10.1. Bademlerin Homojenizasyonu.....	26
3.2.10.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme.....	26
3.2.11. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Yöntemi .....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	29
4.1. Protein Tayini ve Protein Standart Grafiği .....	29
4.2. p-Nitrofenol Standart Grafiği .....	29
4.3. MIP ve NIP Hidrojellerin Sentezi .....	30
4.4. MIP ve NIP Hidrojellerin Karakterizasyonu.....	33
4.4.1. FTIR ve SEM Analizi .....	33
4.4.1.1.FTIR Analizi .....	33
4.4.1.2. SEM Analizi.....	34

4.5. Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu.....	35
4.5.1. Temas Süresi Etkisi .....	35
4.5.2. Sıcaklığın Etkisi.....	36
4.5.3. pH' ın Etkisi .....	37
4.5.4. Başlangıç Enzim Konsantrasyonunun Etkisi.....	38
4.6. Adsorpsiyon İzotermi.....	40
4.7. Kinetik Parametrelerin İncelenmesi .....	42
4.8. Termodinamik Parametrelerin İncelenmesi .....	45
4.9. Çapraz Tanıma Testi .....	46
4.10. Tekrar Kullanılabilirlik.....	47
4.11. Şişme Testi .....	48
4.12. $\beta$ -Glukozidazın Kısmi Saflaştırılması .....	50
4.12.1. Bademlerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme Bulguları.....	51
4.13. SDS-PAGE Yöntemi.....	53
5. SONUÇ .....	55
KAYNAKLAR .....	57
ÖZGEÇMİŞ .....	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AA</b>	Akrilamid
<b>APS</b>	Amonyum Persülfat
<b>BSA</b>	Sığır serum albümin
<b>FTIR</b>	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
<b>HEMA</b>	Hidroksietilmetakrilat
<b>MAA</b>	Metakrilik Asit
<b>MBA</b>	Metilen-bis-akrilamid
<b>MET</b>	$\beta$ -Merkaptoetanol
<b>MIP</b>	Moleküler Damgalı Polimer
<b>MIT</b>	Moleküler Damgalama Teknolojisi
<b>mL</b>	Mililitre
<b>NHMA</b>	N-hidroksimetilakrilamid
<b>NIP</b>	Damgasız Polimer
<b>NiPAm</b>	N-izopropilakrilamid
<b>p-NP</b>	p-Nitrofenol
<b>p-NPG</b>	p-Nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>1-VI</b>	1-Vinilimidazol
<b>4-VP</b>	4-Vinil piridin
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogram
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Pirinç $\beta$ -Glukozidazının üç boyutlu yapısı.....	5
Şekil 2.2. Polimerik jel ağ yapısının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.3. Moleküler damgalamanın şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.4. Sodyum dodesil sülfat yapısı .....	18
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcının yapısı .....	23
Şekil 4.1. Protein standart grafiği.....	29
Şekil 4.2. p-Nitrofenol standart grafiği .....	30
Şekil 4.3. Çapraz bağlı a)NIP b)MIP hidrojeli.....	31
Şekil 4.4. MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları .....	33
Şekil 4.5. SEM mikrografları .....	35
Şekil 4.6. Geri bağlama üzerine temas süresinin etkisi.....	36
Şekil 4.7. Geri bağlama üzerine sıcaklığın etkisi .....	37
Şekil 4.8. Geri bağlama üzerine pH'ın etkisi	38
Şekil 4.9. Geri bağlama üzerine başlangıç enzim konsantrasyonunun etkisi	39
Şekil 4.10. MIP ve NIP hidrojellere $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun Freundlich izoterm grafiği	40
Şekil 4.11. MIP ve NIP hidrojellere $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun Langmuir izoterm grafiği	41
Şekil 4.12. MIP ve NIP hidrojellere $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun yalancı 1.mertebe grafiği	43
Şekil 4.13. MIP ve NIP hidrojellere $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun yalancı 2.mertebe grafiği	44
Şekil 4.14. MIP ve NIP hidrojellerin $\ln K_d$ 'ye karşı $1/T$ grafiği	45
Şekil 4.15. MIP ve NIP hidrojellerinin tekrar kullanılabilirlik grafiği	47
Şekil 4.16. MIP ve NIP hidrojellerin farklı zaman aralıklarındaki şişme oranı	49
Şekil 4.17. $\beta$ -Glukozidazın kısmi saflaştırılmasına yönelik uygulanan saflaştırma basamakları	50
Şekil 4.18. Bademden $\beta$ -Glukozidaz enziminin izolasyonunda uygulanan farklı oranlarda amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen aktivite ve protein miktarı grafiği	52
Şekil 4.19. SDS-PAGE analizinin sonuçları	53



## TABLO DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1. Hidrojellerin sentezinde kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin bazı avantaj ve dezavantajları .....	8
Tablo 2.2. Hidrojellerin uygulama alanları .....	10
Tablo 2.3. Moleküler damgalama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları..	13
Tablo 2.4. Yaygın olarak kullanılan asidik, bazik ve nötral bazı fonksiyonel monomerler .....	15
Tablo 3.1. p-Nitrofenol standart eğrisi oluşum tablosu.....	21
Tablo 3.2. Aktivite tayin yöntemi .....	22
Tablo 3.3. MIP ve NIP Hidrojellerin hazırlanmasına yönelik kullanılan kimyasallar .....	23
Tablo 3.4. SDS-PAGE için ayırma ve düzenleyici jelin hazırlanışı .....	27
Tablo 3.5. Örnek tamponunun hazırlanışı.....	27
Tablo 3.6. Yürütme tamponu hazırlanışı .....	28
Tablo 4.1. Farklı monomerler ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin geri bağlama sonuçları ve IF değerleri.....	30
Tablo 4.2. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin sonuçları	42
Tablo 4.3 Yalancı 1. mertebe ve yalancı 2.mertebe kinetik modellerinin sonuçları .....	44
Tablo 4.4. Termodinamik Parametreler .....	46
Tablo 4.5. $\beta$ -Glukozidaz, $\alpha$ -amilaz ve lipaz ile yapılan çapraz tanıma testi .....	46
Tablo 4.6. Bademden $\beta$ -Glukozidaz enziminin izolasyonunda uygulanan farklı oranlarda amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları .....	51
Tablo 5.1. MIP ve NIP hidrojeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları .....	56

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Dinçer'e, hayatım boyunca beni her alanda maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışmaya 2017-003 kodlu araştırma projesi kapsamında destek veren Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Mervecan SEVİLDİK  
Manisa, 2018



## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

### **$\beta$ -Glukozidaz Enziminin Seçimli Ayrımına Yönelik Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

**Mervecan SEVİLDİK**

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER**

Tez çalışmasının ilk adımında moleküler damgalama tekniği ile akrilamid (AA), hidroksietilmetakrilat (HEMA), 1-vinilimidazol (1-VI), 4-vinil piridin (4-VP), metakrilik asit (MAA) gibi farklı fonksiyonlara sahip monomerler kullanılarak  $\beta$ -glukozidaz damgalı hidrojeller hazırlandı. Hidrojellerin damgalama etkinlikleri karşılaştırıldı ve en yüksek damgalama etkinliğine sahip hidrojelin akrilamid monomeri ile hazırlanan hidrojelin olduğu görüldü.  $\beta$ -Glukozidaz enziminin seçimli ayırımına yönelik hazırlanan hidrojelin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi ve yüzey morfolojilerinin analizi ise taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile yapıldı.  $\beta$ -Glukozidaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlama koşullarının optimizasyonu amacıyla inkübasyon süresi, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve pH etkisi incelendi. Deneysel çalışmalar sonucunda MIP ve NIP hidrojeller üzerine enzimin optimum geri bağlama süresi 120 dakika, optimum geri bağlama sıcaklığı 25 °C ve optimum pH 7,0 olarak belirlendi. Başlangıç enzim konsantrasyonu 2,5 mg/mL'ye ulaştığında adsorpsiyonun doygunluğa ulaştığı görüldü. Bu verilerden yola çıkarak adsorpsiyon izotermi olan Langmuir ve Freundlich izotermi oluşturuldu. Freundlich izoterm modelinin MIP ve NIP hidrojeline enzim adsorpsiyonunu Langmuir izoterm modeline göre daha iyi tanımladığı görüldü. MIP ve NIP hidrojellerin  $\beta$ -glukozidaz adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 7,2 mg/g ve 4,6 mg/g olarak hesaplandı. Deneysel veriler doğrultusunda kinetik analiz sonucu adsorpsiyon kinetiğini en iyi yalancı ikinci derece modelinin temsil ettiği belirlendi. Adsorpsiyonunun sıcaklıkla azalması adsorpsiyonun ekzotermik olduğunu gösterdi.

Çapraz bağlı hidrojellerin şişme özellikleri zamana bağlı olarak incelendi. Her iki hidrojelin şişme oranının yaklaşık 90 dakika sonunda dengeye geldiği ve belirlenen süre sonunda MIP ve NIP için maksimum şişmenin % 24,79 ve % 16,43 oranında olduğu görüldü.  $\beta$ -Glukozidaz damgalı hidrojelin seçiciliği farklı enzimler ( $\alpha$ -Amilaz ve lipaz) ile çapraz tanıma testleri yapılarak ölçüldü. Tezin son kısmında hazırlanan  $\beta$ -glukozidaz damgalı hidrojelin afinite materyali olarak kullanılabilirliği test edildi.

**Anahtar Kelimeler:**  $\beta$ -Glukozidaz, hidrojel, moleküler damgalama, afinite, adsorpsiyon.

**2018, 60 sayfa**

## ABSTRACT

### Master of Science Thesis

#### Preparation and Characterization of Hydrogels for Selective Separation of $\beta$ -Glucosidase Enzyme

Mervecan SEVİLDİK

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe DİNCER

In the first step of the thesis study,  $\beta$ -glucosidase imprinted hydrogels were prepared using monomers having different functions such as acrylamide (AA), hydroxyethylmethacrylate (HEMA), 1-vinylimidazole (1-VI), 4-vinylpyridine (4-VP), methacrylic acid. The imprinting efficiencies of the hydrogels were compared and it was seen that the hydrogel with the highest imprinted efficiency was prepared with the acrylamide monomer. Structural characterization of hydrogel prepared for the selective separation of  $\beta$ -glucosidase enzyme was performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis and surface morphology analysis by scanning electron microscopy (SEM). Effect of incubation time, pH temperature and enzyme concentration were examined in order to optimize the rebinding conditions of  $\beta$ -glucosidase enzyme on MIP and NIP hydrogels. As a result of experimental studies, optimum rebinding time of enzyme on MIP and NIP hydrogels was determined as 120 min, optimum rebinding temperature as 25 ° C and optimum pH 7.0. When the initial enzyme concentration reached 2.5 mg / mL, the adsorption reached saturation. From these data, adsorption isotherms like Langmuir and Freundlich isotherms were formed. It is seen that the Freundlich isotherm model describes the MIP and NIP hydrogel adsorption better than the Langmuir isotherm model.  $\beta$ -Glucosidase adsorption capacities of MIP and NIP hydrogels were calculated as 7.2 mg / g and 4.6 mg / g, respectively. Kinetic analysis of the experimental data showed that the pseudo second order model represented the best adsorption kinetics. The decrease in adsorption with temperature showed that the adsorption was exothermic.

The swelling properties of cross-linked hydrogels were studied related time. It was observed that the rate of swelling of both hydrogels reached equilibrium at the end of 90 minutes and the maximum swelling ratio was calculated as 24.79% and 16.43%. The selectivity of  $\beta$ -glucosidase imprinted hydrogel was measured by cross-recognition tests with different enzymes ( $\alpha$ -Amylase and lipase). The availability of  $\beta$ -glucosidase imprinted hydrogel prepared as the affinity material was tested at the end of the thesis.

**Keywords:**  $\beta$ -Glucosidase, hydrogel, molecularly imprinted, purification, affinity, electrophoresis, adsorption.

**2018, 60 page**

## 1. GİRİŞ

Bakteriler, mantarlar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak bulunan  $\beta$ -glukozidaz (E.C.3.2.1.21) disakkaritlerde veya glukoz bağı moleküllerdeki  $\beta$ -glukozidik bağlarını hidrolizleyen enzimdir. Bakteri ve mantarlarda bulunan  $\beta$ -glukozidazlar selülaz enzim sisteminin (sellobiohidrolaz, endo-  $\beta$ -glukonaz ve  $\beta$ -glukozidaz) bir parçası olarak selüloz ve sellobioz yıkılmasındaki rolüdür. Ayrıca  $\beta$ -glukozidaz endojen siyanojenik glikozitlerdeki  $\beta$ -glukozidik bağın hidrolizi ile aglikan ve siyanohidrinlerin oluşumunu katalizler. Bitki  $\beta$ -glukozidazların önemli bir fonksiyonları da inaktif hormon glukozid bileşiklerinden aktif hormon formlarını serbestleştirerek; sitokinin, giberellin ve oksin gibi bitki hormonlarının biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesi ile ilgilidir. Bunlara ek olarak  $\beta$ -glukozidaz gıda, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip çeşitli glikozitlerin sentezinde kullanılabilir. Ayrıca  $\beta$ -glukozidazın antioksidan olma, kan glukoz düzeyini düşürme, zarları donma-çözülme hasarlarından koruma, tirozinazı inhibe etme gibi çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır.

Hidrojeller, sulu ortam ile temas ettiğinde çözünmeyen, suyun büyük miktarını bünyesinde tutarak şişme özelliği gösteren, çok sayıda hidrofilik gruplar içeren, üç boyutlu-ağ yapılı polimerlerdir. Hidrojellerin şişme özellikleri, pH, sıcaklık, elektrik alan, morötesi ışınım gibi dış etkenlere bağlı olarak değişim gösterdiği için "akıllı polimerler" de denilmektedir. Kimyasal ve fiziksel yapılarına bağlı olarak nötral hidrojeller, iyonik hidrojeller, iç içe geçmiş ağ yapılar olmak üzere üç tip hidrojel vardır. Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincir ya da yan dallarında hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğine sahip hidrofilik grupların bulunması gerekir. Çapraz bağı polimerdeki hidrofilik grupların fazla sayıda olması daha fazla şişmeye sebep olur. Değişik geometrik şekillerde hazırlanma kolaylığı, yüksek su içeriği, yumuşak ve elastik yapısı, biyolojik sıvılar ile uyumlu olması ve etrafındaki dokulara maksimum uyum göstermesi gibi eşsiz özelliklere sahip olmaları hidrojellerin biyomateryal olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Hidrojeller; eczacılık, tıp, veterinerlik, ziraat, biyomühendislik, inşaat ve tekstil sektörlerinde; ilaç salımı, çocuk bezi, moleküler elek, kontak lens, yapay organ, nem tutucu olarak kullanılmaktadır.

Biyoteknolojide özellikle Moleküler Damgalama Teknolojisi (MIT) ile biyoaktif proteinlerin ayrılmasında hidrojellerden faydalanılmaktadır. Moleküler damgalama teknolojisi istenen bir madde ile onun analogları veya tek bir enantiyomer için spesifik moleküler tanıma özelliklerine sahip polimerlerin hazırlanmasına yönelik hızlı bir şekilde gelişen bir tekniktir. Moleküler damgalanmış polimerler yapay reseptörleri ile malzeme biliminde yeni bir sınıf oluştururlar. Keşfedilmelerinden bu yana bilim adamlarının ve mühendislerin ilgisini çekerek kromatografik adsorplayıcıların, membranların, sensörlerin, yapay enzim ve reseptörlerin elde edilmesini sağlamışlardır.

Moleküler damgalama kısaca, üzerinde hedef molekülü tanıma özelliği taşıyan merkezler içeren polimerlerin sentezlenmesi işlemidir. Sentez için iki temel gereksinim vardır: ilki hedef molekül veya diğer bir deyişle damgalanacak molekül; ikincisi, hedef molekül ile etkileşebilecek (kovalent ya da non-kovalent bağlanma ile) işlevsel bir monomer. Moleküler damgalama işlemi: 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 etkisi ile başlar. Polimerizasyon sırasında monomerler ve kalıp molekül arasında oluşan kompleks stabilize olur ve sonuçta yüksek derecede çapraz bağlı sert, poröz yapıya 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 damgalı polimerler çok iyi termal ve kimyasal stabiliteye sahip olduklarından sert koşullarda kullanılabilirler. Moleküler damgalı polimerler düşük maliyet, hazırlama kolaylığı, depolama stabilitesinin iyi olması, aktivite kaybı olmadan birçok kez kullanılabilirliği, yüksek mekanik kararlılık, sıcaklık ve basınca dayanıklılık gibi birçok avantaja sahiptir.

Bir kaynaktan yola çıkarak enzim saflaştırılması oldukça zaman alan ve pek de ekonomik olmayan işlem adımlarını içerir. Afiniteye dayalı ayırma yöntemlerinin saflaştırma işlem adımlarında kullanılması daha kısa sürede saf enzim eldesini mümkün kılabilir. Tez çalışmasının ilk adımında moleküler damgalama tekniği ile farklı monomerler kullanılarak  $\beta$ -glukozidaza spesifik hidrojeller hazırlandı. Optimize edilecek koşullarda, hazırlanan hidrojellerin seçicilik faktörleri hesaplandı. Seçicilik faktörü yüksek olan hidrojelin afinite matrisi olarak kullanılabilirliği, daha sonra fermantasyon teknolojisi ile üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin saflaştırılmasında test edildi. Saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yapıldı.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. $\beta$ -Glukozidaz

Beta glukozidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan altı sınıflandırma biriminden Hidrolazların bulunduğu sınıfta yer alırlar [1]. Sistematik adı  $\beta$ -D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan  $\beta$ -glukozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki  $\beta$ -glukozid bağlarını hidroliz edebilen enzimlerdir.  $\beta$ -Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak buldukları ve biyolojik yollarda önemli görevlerinin olduğu bilinmektedir [2].

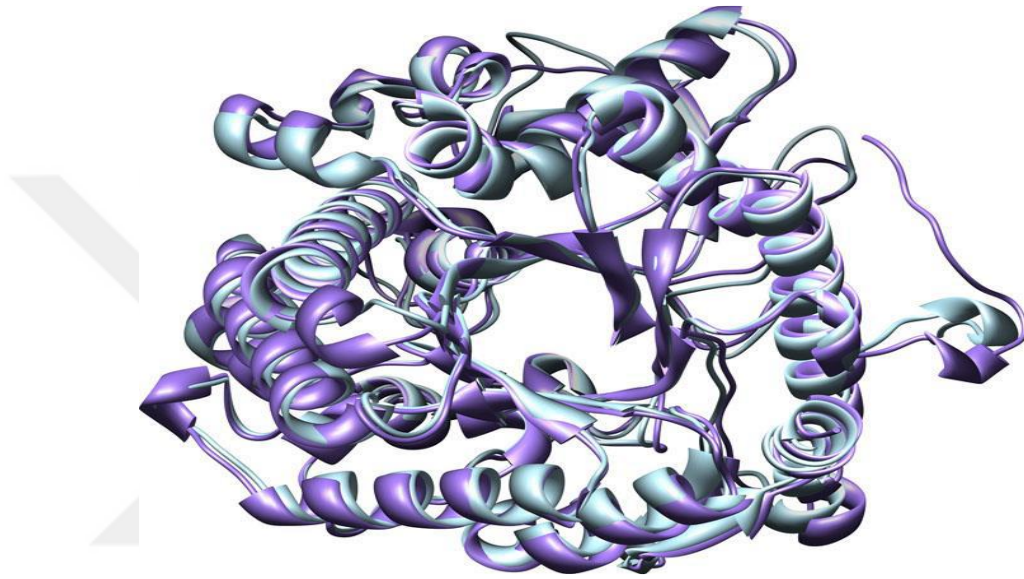
$\beta$ -Glukozidazlar tarafından katalizlenen  $\beta$ -glukozidik bağlarının hidrolizi sonucu disakkarit, oligosakkarit ya da konjuge olmuş glukozidler oluşur. Bu yüzden doğada farklı rollere sahip  $\beta$ -glukozidazlar bulunur. Enzimatik sistemdeki mevcudiyetleri bitkinin biyokütlesinin yıkımın ve insanlarda Gaucher's hastalığı gibi moleküler patolojilerin açığa çıkmasını sağlar [3].  $\beta$ -Glukozidazların başka bir önemli özelliği de şekerlerin ve şeker türevlerinin spesifik enzimatik sentezi için önemli olan transglukozidasyon (glukozidik birimlerin transferi gibi) aktivitesine sahip olmasıdır [3].

Bitki  $\beta$ -glukozidazların diğer önemli bir fonksiyonları da inaktif hormonglukozid bileşiklerinden aktif hormon formlarını serbestleştirerek; sitokinin, giberellin ve oksin gibi bitki hormonlarının biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesi ile ilgilidir.

Bunlara ek olarak gıda, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip çeşitli glikozitlerin sentezinde kullanılabilir. Ayrıca  $\beta$ -glukozidazın antioksidan olma, kan glukoz düzeyini düşürme, zarları donma-çözülme hasarlarından koruma, tirozinazı inhibe etme gibi çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır.



$\beta$ -Glukozidazlar tüm canlı organizmalarda birçok biyolojik işlevde rol oynamaktadır. Bu sebeple  $\beta$ -glukozidaz enzimleri ile protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık çalışılmaktadır.  $\beta$ -Glukozidazlar (özellikle Familya 1 enzimleri) bitkilerde biyolojik bazı süreçlere katılırlar. Bu süreç; herbivor, insektlar ve bitki zararlarına karşı savunma, besin kalitesinin artışı, yenilenebilir yakıt üretimi, lignin biyosentezi ve kağıt kalitesinin artışı, sekonder bitki metabolizması ve kanserojen etkidir [3].



**Şekil 2.1.** Pirinç  $\beta$ -Glukozidazının üç boyutlu yapısı [4]

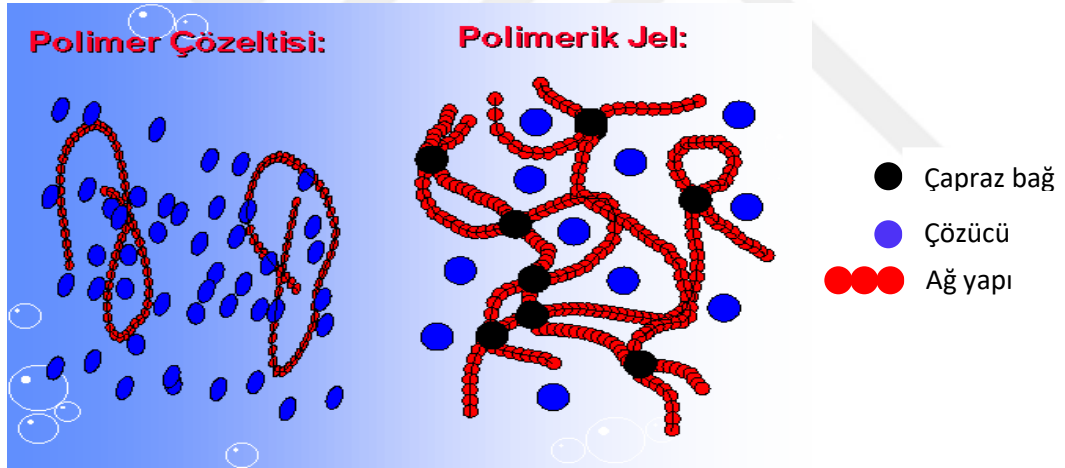
$\beta$ -glukozidazın molekül ağırlığı 135 kDa, izoelektrik noktası (pI) 7,31'dir. Badem  $\beta$ -glukozidazı molekül ağırlıkları 65 kDa olan 2 eşit alt biriminden oluşan bir homodimer glikoproteindir.

Çalışmalarda incelenen Aile1  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin monomerleri SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında tespit edilmiştir. Tespit edilen bu monomerlerin polipeptid uzunlukları 447 aminoasitten (*Bacillus polymixia*'da olduğu gibi) 527 aminoasite (beyaz hardal mirosinazı) kadar değişiklik göstermektedir. Eubakteria ve arkebakterilerdeki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha kısa olması beklenirken ökaryotlardaki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha uzun olması beklenmektedir[4].

## 2.2. Hidrojeller

Hidrojeller ya da diğer bir deyişle su içeren jeller, hidrofilik ve suda çözünmezlikle karakterize edilen, hidrofilik homopolimerler veya kopolimerlerden oluşan polimerlerdir. Hidrojeller suda çözünmeyip şişebilen, yani suyun büyük kısmını yapıları içerisine alabilen, üç boyutlu polimerik ağlar olup, hem doğal hem de sentetik polimerlerden hazırlanabilmektedirler. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir [5].

Hidrojellerin çapraz bağlanmaları ağı yapıyı ve suda çözünmemeyi sağlarken, hidrojellere gerekli mekanik dayanımı ve fiziksel bütünlüğü de sağlamaktadır. Böylece hidrojeller çözünmeden kütlelerinin %20'sinden fazla suyu adsorplayabilmekte ve şişmiş hale gelebilmektedirler [6].



**Şekil 2.2.** Polimerik jel ağ yapısının şematik gösterimi [7]

Hidrojeller dış çevreye bağlı olarak şişme-büzüşme davranışı gösterebilirler. Dış çevrede meydana gelen pH, sıcaklık, iyonik güç, çözücü bileşimi ve elektromanyetik radyasyon değişimlerine karşı şişme oranlarında büyük değişimler gösteren bu hidrojeller uyarı-cevap hidrojelleri olarak adlandırılırlar. Hidrojellerin su adsorplama hızı suyun difüzyonu ile sınırlandırıldığından, hidrojelin küçük boyutta olması hızlı şişmeye yol açmaktadır [8].

Hidrojellerin, mekanik dayanım ve şişme oranı gibi fiziksel özellikleri çapraz bağlanma yoğunluğu ile de kontrol edilmektedir. Çapraz bağ yoğunluğu çapraz bağlar arasında tekrar eden ortalama monomer sayısının ifadesidir. Yüksek derecede çapraz bağlanmış hidrojeller daha sıkı bir örgüye sahiptirler ve daha az şişerler. Çünkü çapraz bağlanma, polimer zincirinin hareket yeteneğini engeller, böylece jelin şişme miktarı düşer. Çapraz bağ yoğunluklarını artırmak ve çapraz bağ oluşumunu hızlandırmak için kullanılan ve üzerlerinde hidroksil grupları içeren çok sayıda çapraz bağlayıcı organik bileşik vardır. Çapraz bağlanma tepkimelerinde en çok kullanılan çapraz bağlayıcılar; N,N'- metilenbisakrilamid, etilen glikol dimetakrilat, 1,4 bütandiol dimetakrilat gibi iki fonksiyonlu; trimetilol propantriakrilat ve trimetilol propantrimetakrilat gibi üç fonksiyonlu bileşiklerdir [8].

İlk sentetik hidrojinin 1954 yılında Wichterle ve Lim tarafından tanımlanması ile hidrojel teknolojileri pek çok alanda sıklıkla kullanılır olmuştur. Yumuşak oluşları, akıllı yapıları ve su tutma kapasiteleri hidrojelleri eşsiz malzemeler haline getirmektedir [8]. Hidrojeller çok sayıda kullanım alanına sahiptirler. Oksijen geçirgenlikleri ve canlı doku ve kan ile mükemmel uyumlulukları gibi uygun fiziksel özellikleri nedeniyle medikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar. Hidrojellerin biyomedikal alanda kullanılması, Wichterle ve Lim tarafından çapraz bağlı poli(hidroksietil metakrilat) hidrojinin (pHEMA) geliştirildiği ve daha sonraları yumuşak kontakt lens olarak patentlendiği 1960 yılına kadar uzanmaktadır. Hidrojellerin geliştirilmesinde kullanılan pHEMA ve poli(metil metakrilat) (pMMA) gibi sentetik polimerler dışında, biyopolimerler olarak adlandırılan doğal polimerlerin kullanılması yıllar içinde giderek önem kazanmıştır. Hidrojellerin sentezinde kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin bazı avantaj ve dezavantajları olup, Tablo 2.1.'de gösterilmektedir [8].

**Tablo 2.1.** Hidrojellerin sentezinde kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin bazı avantaj ve dezavantajları

<b>Karakteristikleri</b>	<b>Doğal Kaynaklı</b>	<b>Sentetik</b>
Hazırlama Yöntemi	Doğal polimerler kullanılarak	Kimyasal polimerizasyon ile
Avantaj	- Biyouyumlu - Biyobozunur - Hücrel aktiviteyi destekler	- Yapısında doğal biyoaktif özellikler bulunmaz - Ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip
Dezavantaj	- Yeterli mekanik özelliklere sahip değil - Patogen içerebilir - Bağışıklık ve iltihaplı yanıtlara neden olabilir	- Biyobozunur değil - Toksik
Örnekler	- Kolajen ve jelatin gibi proteinler - Aljinat ve agaroz gibi polisakkaritler	- Akrilik asit (AAc), Akrilamid (AAm) - Hidroksietil metakrilat (HEMA) - Metakrilik asit (MAA) - Metil metakrilat (MMA)

### 2.2.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller, bazı kriterler göz önüne alınarak sınıflandırılmışlardır.

Bu sınıflandırma aşağıdaki alt başlıklar halinde açıklanmıştır [8]:

*Hazırlama yöntemine göre:*

- Homopolimer hidrojeller
- Kopolimer hidrojeller
- Çoklu polimer hidrojeller
- IPN (interpenetrating networks, iç içe geçmiş ağ yapılar) hidrojeller

*İçerdikleri yan gruplara göre*

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

#### *Fiziksel yapılarına göre*

- Amorf hidrojel
- Yarı-kristalin hidrojel
- Hidrojen bağı hidrojel

#### *Çapraz bağlanma durumlarına göre*

- Fiziksel çapraz bağı hidrojel
- Kimyasal çapraz bağı hidrojel

#### *Kaynaklarına göre*

- Doğal hidrojel
- Sentetik hidrojel

#### *Su içeriklerine göre*

- Düşük şişme dereceli (% 20-50) hidrojel
- Orta şişme dereceli (% 50-90) hidrojel
- Yüksek şişme dereceli (%90-99.5) hidrojel
- Süper-absorban (>% 99.5) hidrojel

#### *Kimyasal kararlılıklarına göre*

- Biyolojik olarak bozunabilen hidrojel
- Biyolojik olarak bozunamayan hidrojel

### **2.2.2. Hidrojellerin Kullanım Alanları**

Günümüzde hidrojel en çok süper absorban polimer (SAP) olarak çocuk bezi ve hijyenik ped yapımında kullanılmaktadır. Diğer yandan ziraatta toprakta su tutucu malzeme olarak, oral ve kontrollü salınım sistemlerinde, kontakt lenslerde, yara örtülerinde, harekete geçiricilerde (actuator), biyosensörlerde, yapay organların yapımında da uygulama alanı giderek genişlemektedir [9].

Ayrıca hidrojel; buldukları ortamın iyonik şiddet, elektromanyetik ışıma, pH ve sıcaklık gibi dış çevre koşullarındaki değişimlere, hacimlerini yüzlerce kat artırıp azaltarak kontrollü bir şekilde cevap verebilmeleri sayesinde biyomedikal,

biyolojik algılamalarda, ilaç salınımlarında, doku dejenerasyonunda, farmasötik, teknoloji ve tarımsal alanda geniş kullanım alanları bulmuştur.

Hidrojellerin uygulama alanları ve bu alanlarda kullanılan polimerler Tablo 2.2'de özetlenmiştir:

**Tablo 2.2.** Hidrojellerin uygulama alanları

<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Hidrojeller</b>
Yara örtüsü	Poliüretan, polietilen glikol, polipropilen glikol, polivinil pirolidon, metil selüloz, karboksimetil selüloz, aljinat
İlaç taşıma ve farmasötik	Polivinil pirolidon, nişasta, poliakrilik asit, karboksimetil selüloz, polivinil alkol, akrilik asit, metakrilik asit, kitosan
Diş malzemesi	Hidrokolloidler
Doku mühendisliği, implantlar	Polivinil alkol, poliakrilik asit, hyalüronan, kollajen
Enjekte edilebilir polimer sistem	Poliesterler, polipeptitler, kitosan
Teknik ürünler (kozmetik, farmasötik)	Arap zıncığı, pektin, kitin, kitosan, heparin, nişasta, aljinat
Diğerleri (tarım, atık arıtma, ayırma vb)	Nişasta, polivinil alkol, poli(N-izopropil akrilamid), polivinilmetil eter

### 2.3. Moleküler Damgalama Teknolojisi

Modern biyoteknoloji alanında yasa dışı ilaçların ve kimyasal savaş ajanlarının ortaya çıkarılması, bununla birlikte klinik teşhislerde, çevresel analizlerde, gıda analiz ve üretiminde yeni talepler ve fırsatların belirlenmesiyle hedef moleküle spesifik biçimde bağlanma yeteneğine sahip biyomimetik reseptör sistemlerini içeren hassas ve seçici uygulama alanları ortaya çıkmıştır. Bu sebepten dolayı farklı yöntemler ortaya çıkmıştır ve bunlardan biri de moleküler damgalama yöntemidir [10].

Moleküler damgalama yönteminin temelleri Wulff ve Mosbach tarafından atılmış (1972) ve yöntem; monomer, çapraz bağlayıcı ve analit (kalıp molekül) eşliğinde, polimerizasyon sonucu bağlanma yerleri oluşturulmasına dayanır. Ancak bu konunun temelleri çok daha eskilere, 1890'lı yıllarda Fischer'in öne sürdüğü "anahtar-kilit modeli"ne kadar gitmektedir [7].

Bir veya bir kaç tipte polimer oluşturan bileşenler (fonksiyonel monomerler) kalıp molekülün yapısına göre etrafında kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle uygun bir şekilde düzenlenerek kompleks oluşturur. Ortama matriks oluşturan materyal yani çapraz bağlayıcı, porojenik bir çözügen ve başlatıcı eklenir. Polimerizasyon UV ışık veya ısı etkisi ile başlar. Polimerizasyonun gerçekleşme aşamaları Şekil 2.3.'de görülmektedir. Polimerizasyon sırasında monomer(ler) ve kalıp molekül arasında oluşan kompleks stabilize olur ve sonuçta yüksek derecede çapraz bağlı, sert poröz yapıya 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. Sonuç olarak ayırma, kimyasal tayin ve kataliz gibi işlemler için hedef molekülü seçici bir şekilde tanıyabilme yeteneğine sahip ideal bir malzeme elde edilmektedir.

Moleküler damgalama yönteminin en ilgi çeken yanlarından biri; yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça kullanışlıdır ve hazırlama prosedür maliyeti düşük, kolay ve hazırlanan hidrojel yıllarca kullanılabilir. Bunlara ek olarak çeşitli analitlere uygulanması; küçük organik moleküllerin (tıbbi ilaçlar, pestisitler, aminoasitler ve peptitler, nükleotid bazlar, steroidler ve şekerler) damgalaması iyi olmakla birlikte proteinler, mineral kristaller ve hücreler gibi büyük organik moleküllerin damgalanması sorunlu olmasına rağmen kısmen de olsa damgalanabilirler.

### **2.3.1.Moleküler Damgalama Yöntemleri**

Moleküler damgalama yöntemi hedef molekül ile monomer arasındaki etkileşim türüne göre kovalent ve kovalent olmayan damgalama olmak üzere iki gruba ayrılır:

**1. Kovalent damgalama:** Kovalent damgalama yönteminde, hedef molekül ile monomer kompleksi Schiff bazı, ketal, esterler, amidler ve boronik asitlerin tersinir kovalent bağlanması ile oluşur [10]. Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirlerine tersinir kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon işleminden sonra tersinir kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül, damgalanmış polimerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşması sağlanır.

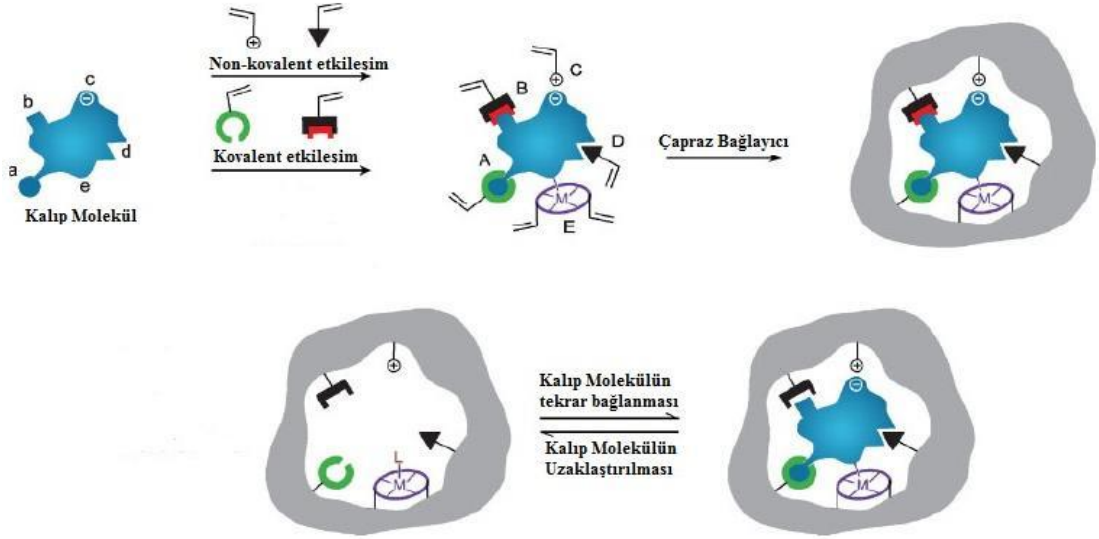
**2. Non-kovalent etkileşimler:** Bu yöntem de hidrojen bağı, elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşim, yük transferi, metal şelat ve Van der Waals gibi zayıf kovalent olmayan etkileşimler sayesinde hedef molekül ve seçilen monomerler ile ön kompleks oluşarak uygun çözücülerle hedef molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekülün uygun boşluklara tekrar bağlanması aynı kovalent olmayan etkileşimler ile gerçekleşir.

Kovalent olmayan etkileşimde kalıp molekül olarak hidroksil, karboksil, amino ve amit gibi polar grupları olan bileşikler seçilmelidir [10].



**Tablo 2.3.** Moleküler damgalama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

<b>Yöntem</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
<b>Kovalent damgalama</b>	<p>Kararlı kalıp-monomer kompleksi oluşur ve bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı gerçekleşir.</p> <p>Konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulduğu için polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH gibi) istenildiği gibi ayarlanabilir.</p>	<p>Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez işlemi ekonomik değildir.</p> <p>Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır.</p> <p>Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetikleri yavaştır.</p> <p>Polimerizasyondan sonra hedef molekülü uzaklaştırmak zordur.</p>
<b>Non-kovalent etkileşimler</b>	<p>Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur.</p> <p>Kalıp molekül, polimerizasyondan sonra polimerden kolayca uzaklaştırılır; çünkü kovalent olmayan etkileşimler kovalent etkileşimlere göre daha zayıftır.</p> <p>Hedef molekülün tekrar bağlanma kinetiği hızlıdır.</p> <p>Kovalent olmayan damgalama, kovalent damgalama metoduna göre daha kolaydır ve kovalent bağlanmaya göre daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşmaktadır.</p>	<p>Kovalent olmayan etkileşimleri arttırmak amacıyla uygulanabilecek polimerizasyon koşulları sınırlıdır.</p> <p>Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir ve bağlanma seçiciliğini azaltır.</p>



**Şekil 2.3.** Moleküler damgalamanın şematik görünümü [11].

Etkili bir moleküler damgalama elde edebilmek için damgalama işleminde; fonksiyonel monomer, analit (damgalanacak molekül veya iyon), çapraz bağlayıcı, polimerizasyon için çözücü ve başlatıcı kullanılır [10].

### 2.3.2. Moleküler Damgalamada Kullanılan Bileşenler

**1. Fonksiyonel monomerler:** Damgalama işlemi esnasında monomer-kalıp kompleksinin kararlı olması için fonksiyonel monomer seçimi çok önemlidir. Fonksiyonel monomerin, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun fonksiyonel bağlanma bölgelerinin sayısı önem taşımaktadır. Kompleks oluşumu ve damgalama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerlerin ve damgalanacak molekül veya iyonun fonksiyonel gruplarının uyumu gereklidir.

**Tablo 2.4.** Yaygın olarak kullanılan asidik, bazik ve nötral bazı fonksiyonel monomerler

<b>Fonksiyonel Monomerler</b>		
<b>Asidik</b>	<b>Bazik</b>	<b>Nötral</b>
Metakrilik asit (MAA), p-Vinilbenzoik asit, Akrilik asit, 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA)	4-Vinil piridin(4-VP), 2-Vinil piridin (2-VP), N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM)	Akrilamid, Metakrilamit, 2-hidroksi metakrilat (HEMA), Akrilonitril (AN), Metilmetakrilat (MMA), Stiren, Etilstiren

**2. Hedef/Kalıp molekül:** Damgalanacak molekülün polimerleşecek grup içermesi, reaksiyonu engelleyecek veya yavaşlatacak grubun olması ve yüksek sıcaklıklarda damgalanan molekülün kararlılığı önemli parametrelerdir. Kalıp molekülde bağ yapan grupların sayısı arttıkça bağlanma etkileşimi de artmaktadır. Moleküler damgalama tekniği kullanılarak yapılan enantiomerik ayrımlarda, kalıp molekül üzerindeki fonksiyonel gruplar sistematik olarak değiştirilerek enantiyomerlerin seçiciliği kıyaslanır [10].

**3. Çapraz bağlayıcılar:** Çapraz bağlayıcılar polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz halinde olması) kontrol edilmesini, damgalanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinin de mekanik kararlılığının olmasını sağlar [10]. Çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer arasında stokiyometrik dengenin olması gerekir. Çok büyük mol oranlarında çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimler göstererek damgalamanın etkinliğini azaltmaktadır. Çok küçük mol oranlarında ise, kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır. Hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve yine etkin bir sonuç elde edilemez. Etilenglikol dimetakrilat (EDMA), N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA) ve divinil benzen yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır [10].

**4. Çözücüler:** Damgalama yönteminin türüne bağlı olarak uygun çözücüler kullanılır. Kovalent olmayan damgalama polimerizasyonun da, damgalanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevi de vardır. Aynı zamanda kalıp ve fonksiyonel monomer arasında kovalent olmayan etkileşim oluşumunu ve damgalama etkisini arttırmak için çözücü seçimi önemlidir. Ayrıca polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısını eşit yayarak, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellemektedir [10].

**5. Polimerizasyon başlatıcılar:** Farklı kimyasal özelliklere sahip birçok kimyasal başlatıcı, serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynak olarak kullanılmaktadır [10]. Başlatıcı olarak genellikle amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), 2,2- azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır.

#### **2.4. Elektroforez Yöntemi**

Elektroforez temelde, proteinlerin, amino asitlerin, nükleotid ve nükleik asitlerin elektrik akımı ve uygun pH'daki tampon solüsyonlarında net elektrik yüküne, molekül büyüklüklerine ve şekillerine göre göç ederek ayrıştırılması, saflaştırılması veya karakterizasyonu işlemlerinde kullanılan bir yöntemdir. Karışımdaki her molekülün kendine özgü bir yük ve boyutu olması beklenir ki bunun sonucu da elektrik alandaki göçü de kendine özgüdür. Yükü aynı olan iki molekülden boyutu küçük olan elektrik alanda daha hızlı hareket eder. Aynı şekilde yükü fazla olan molekül de yükü az olandan daha hızlı hareket eder.

Bir molekülün hareket etme hızı bir takım etkenlerle belirlenir;

- a) Molekülün elektrik yükünün, molekülün kütlesine olan oranı. Elektriksel yükü yüksek, kütlesi küçük olan moleküller daha hızlı hareket ederler.
- b) Molekülün fiziksel büyüklüğü. Küçük moleküller jeldeki gözeneklerden daha kolaylıkla geçerler ve dolayısıyla daha hızlı hareket ederler.
- c) Moleküllerin hareket ettikleri ortamın iyonik şiddetine, viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır.

Elektroforez için gerekli olan cihaz, genelde bir güç kaynağı ve elektroforez ünitesinden oluşur (düz yatak; horizontal, dikey; vertikal slab jel veya tüp (disk) sistemi).

Elektroforezde; genelde örnek bir destek matriksi üzerinde göç eder. Bu matriks; kağıt, selüloz asetat, nişasta jel, agaroz veya poliakrilamid jel olabilir.

Proteinlerin saflaştırılmasında genel olarak Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE); protein saflığının kontrolü, fraksiyonlama, saf proteinin alt birim yapısının incelenmesi, molekül kütlesi tayini, izoelektrik nokta tayini, izoenzimlerin belirlenmesi vb. kullanım alanlarına sahiptir.

#### **2.4.1. Poliakrilamid Jeller**

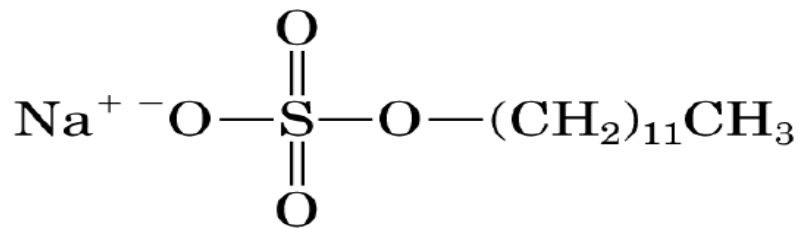
Poliakrilamid jelleri, akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajanla polimerizasyonu sonucu meydana gelir. Poliakrilamid jeller için, en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan N.N-metilen bisakrilamittir. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluştururlar. Böylece ağimsı bir yapı meydana gelir. Kimyasal polimerizasyon oluşumuna sebep olan amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'- tetrametiletildiamin (TEMED)'dir. APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar [12].

Poliakrilamid jel, serum proteinlerinin, proteinlerin genetik varyasyonlarının ve izozimlerin analizinde en iyi sonuç veren elektroforez ortamıdır. En önemli avantajı jel konsantrasyonunun kesin olarak belirlenip değiştirilebilmesi ve böylece gözenek büyüklüğünün istenen şekilde saptanmasına olanak vermesidir. Jel konsantrasyonu arttırıldığında gözenek çapları küçülür ve jel moleküler elek görevi yaparak ayrıştırmayı sağlar [12].

#### 2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jel elektrofrezinin en yaygın olarak kullanılanıdır ve protein karışımlarının özelliklerini analizlemek açısından önemlidir. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve proteinin boyutuna göre bir ayırım yapması sebebiyle bağıl moleköl kütle tayininde de kullanılır [12].

Sodyum dodesil sülfat yani SDS, deterjan etkisi ile polipeptidlerin katlanmış yapısını bozarken alt ünite etkileşimlerini de bozar. SDS (-) yük taşıdığı için peptidlere de yüksek oranda negatif yük kazandırır. SDS'in de varlığında, polipeptid zincirlerinin net yükü maskelenir ve negatif yüklü SDS molekülleri içeren bir seri oluşur. Elektrofretik ayırma sadece etkin moleköl kütleyle bağıdır ve jeldeki moleköl elek doğrultusunda ayrılma gerçekleşir. Kullanılan poliakrilamid jel konsantrasyonu etkin ayırmayı sağılayan olgudur. SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler; merkaptetanöl, SDS, bromfenöl blue ve sükröz veya gliseröl içeren tamponla muamele edilirler. Merkaptetanöl; proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağılarını indirger. SDS ise proteini denatüre ederek kuvvetlice bir SDS moleköl her bir, iki aminoasit aralığına bağılanarak, yük maskelenir. Bromfenöl blue; iyonize olabilen bir boyadır ve elektrofrezin kolay izlenebilmesi açısından ortama ilave edilir. Sükröz veya gliseröl ise örnek solüsyona bir yoğunluk kazandırması ve elektrofrez hücreğine uygulandığında örneğin elektrofrez tamponunda kolayca çökmesini sağılamak açısından kullanılır [13].



Şekil 2.4. Sodyum dodesil sülfat yapısı

SDS-PAGE için en çok kullanılan sistem Laemmli tarafından geliştirilmiştir. Heterojen tampon sistemi temeline dayanır, ortamda ilave olarak %0.1 SDS mevcuttur. Laemmli sisteminin ayırma kapasitesi çok iyidir, çünkü çalışılan proteinler; yürütme jeline girmeden önce düzenleyici (stacking gel) jel de;

elektroforez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenir ve konsantre edilirler [13].

## 2.5. Tezin Amacı

Bir kaynaktan yola çıkarak enzim saflaştırılması oldukça zaman alan ve pek de ekonomik olmayan işlem adımlarını içerir. Afiniteye dayalı ayırma yöntemleri saflaştırma işlem adımlarında kullanılarak daha kısa sürede saf enzim eldesini mümkün kılabilir. Bu amaçla çalışmanın ilk adımında moleküler damgalama tekniği ile farklı monomerler kullanılarak  $\beta$ -glukozidaza spesifik hidrojeller hazırlandı ve en yüksek kapasiteye sahip hidrojel afinite materyali olarak deneylerde kullanıldı.  $\beta$ -Glukozidaz enziminin seçimli ayırımına yönelik hazırlanan hidrojelin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi ve yüzey morfolojilerinin analizi ise taramalı elektron mikroskopi (SEM) ile yapıldı.  $\beta$ -Glukozidaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlama koşullarının optimizasyonu amacıyla inkübasyon süresi, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve pH etkisi incelenerek optimize edilen koşullarda, hidrojellerin enzimleri bağlama kapasiteleri belirlendi. Adsorpsiyon izotermi olan Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri ve adsorpsiyon kinetiği incelendi. Çapraz bağlı hidrojellerin şişme özellikleri zamana bağlı olarak incelendi.  $\beta$ -Glukozidaz damgalı hidrojelin seçiciliği farklı enzimler ( $\alpha$ -Amilaz ve lipaz) ile çapraz tanıma testleri yapılarak ölçüldü. Hidrojelin afinite matriksi olarak kullanılabilirliği, daha sonra bir kaynaktan yola çıkarak  $\beta$ -glukozidaz enziminin saflaştırılmasında test edildi. Saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda ucuz ve kolay bir şekilde hazırlanan ve enzim saflaştırma adımlarında uygulama alanı bulan bir afinite materyali sentezlenmiş oldu.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

$\beta$ -Glukozidaz (badem  $\beta$ -Glukozidazı,  $\geq 6$  U/mg),  $\alpha$ -amilaz, lipaz ve sığır serum albümin (BSA), akrilamid (AA), hidrosietilmetakrilat (HEMA), 1-vinilimidazol (1-VI), 4-vinil piridin (4-VP), metakrilik asit (MAA), N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), Brillant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, ColorBurst Electrophoresis Marker (M.W. 8,000-220,000) sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum sülfat, diyaliz membranı (MC18X100), p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid (p-NPG), p-nitrofenol (p-NP), asetik asit, aseton, sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sitrik asit, trisodyum sitrat, potasyum monobazik ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), potasyum dibazik ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), asetik asit, sodyum asetat, trizma, HCl, kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich tarafından temin edildi.

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer spectrum BX), UV-Vis spektrofotometre (UV-1800, Shimadzu, Japan), pH metre (Inolab WTW series), inkübatör (GFL), ultrasonik banyo (BANDELIN SONOREX) kullanıldı.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1 Protein Tayini

Protein tayini Bradford yöntemi ile gerçekleştirildi. Bradford tarafından geliştirilen bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır, organik boya ların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır [14].

Bradford Reaktifi: 20 mg Coomassie Brilliant Blue, 25 mL %95 lik etanolde çözüldü ve karanlık ortamda manyetik karıştırıcıda 60 dk karıştırıldı. Daha sonra üzerine 27,5 mL o-fosforik asit eklendi ve 30 dk karıştırıldı. 500 mL' ye saf su ile tamamlandıktan sonra süzgeç kâğıdından süzüldü.

Standart Protein Eğrisi için; 1 mg/mL sığır serum albümin (BSA) çözeltilisinden yola çıkarak 0,02-0,05-0,08-0,12-0,15 mg/mL olacak şekilde 5 ayrı



konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu protein çözeltilerinden 0,1 mL alınıp üzerlerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi ve spektrofotometrede 595 nm' de ölçüm alındı. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve böylece standart protein eğrisi oluşturuldu.

### 3.2.2. p-Nitrofenol Standart Grafiğinin Oluşturulması

p-Nitrofenol (pNP) standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,01-0,1 mM aralığında bir seri p-nitrofenol standart çözeltisi pH 5,0 sitrat tamponu içerisinde hazırlanmış olan 0,1 M stok p-nitrofenol çözeltisinden yola çıkarak hazırlandı. Üzerine 2 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendi ve 400 nm'de alınan absorbans değerleri ile p-nitrofenol konsantrasyonları arasında standart grafiği çizildi. β-Glukozidaz aktivitesinin tayininde enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan p-nitrofenol miktarı, çizilen standart grafiği kullanılarak bulundu.

**Tablo 3.1.** p-Nitrofenol standart eğrisi oluşum tablosu

	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	50	60	70	80	90	100
Tampon (µL)	-	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900
1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> çözeltisinden 2 mL eklendi.											
400 nm'de ölçüm alındı.											

### 3.2.3. β-Glukozidaz Aktivite Tayini

β-Glukozidaz aktivitesi enzimin sentetik substratı olan p-nitrofenil-β-D-glukopiranozid (p-NPG) kullanılarak ölçüldü (Tablo 3.2.) [3]. Enzimatik reaksiyon 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklenerek durduruldu. Aktivite tayini, reaksiyon sonunda enzimatik hidroliz sonrasında açığa çıkan p-Nitrofenol (p-NP)' un 400 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Bir ünite enzim aktivitesi; 37 °C' de dakikada açığa çıkan µmol p-NP olarak tanımlanmıştır.

**Tablo 3.2.** Aktivite tayini prosedürü

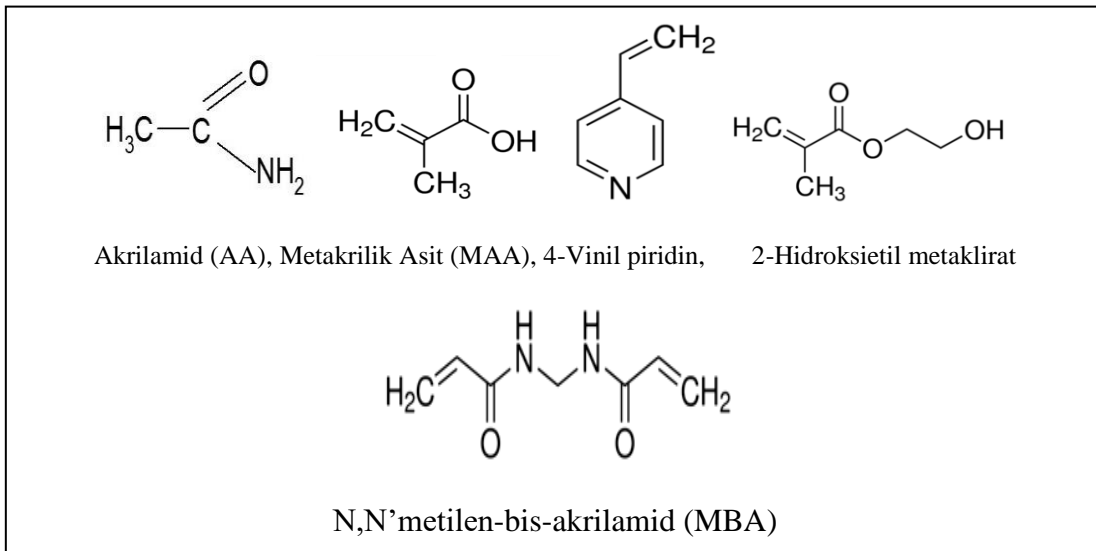
	<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
Saf Su	50 µL	-
5 mM p-NPG	950 µL	950 µL
Serbest Enzim	-	50 µL
İnkübasyon (37 °C' de 1 dk)		
1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 mL	2000 µL
400 nm' de ölçüm alınır.		

### 3.2.4. MIP ve NIP Hidrojellerin Hazırlanması

$\beta$ -glukozidaz damgalı hidrojel hazırlamak üzere ilk olarak kalıp protein  $\beta$ -glukozidaz (10 mg) 1 mL fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0) içerisinde çözüldü. Sırasıyla ortama Tablo 3.3'de belirtilen oranlarda ve Şekil 3.1'de yapıları gösterilen fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı eklenerek prepolimerizasyon karışımı 10 dakika boyunca çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için ultrasonik banyoda bekletildi. Polimerizasyon APS ve TEMED eklenerek başlatıldı. 12 saat oda sıcaklığında hidrojel oluşumu gerçekleştikten sonra kalıp molekül  $\beta$ -glukozidazın elüsyonu SDS (% 10, w/v) içeren asetik asit çözeltisi (%10, v/v) ile yapıldı. 280 nm'de yapılan ölçümlerle süpernatantta hiçbir protein saptanmayana kadar yıkama işlemine devam edildi. Son aşamada SDS ve asetik asidi uzaklaştırmak üzere deiyonize su ile yıkama yapıldı. Aynı monomer ve çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak kalıp protein  $\beta$ -glukozidaz içermeyen damgalanmamış kontrol hidrojelleri (NIP) hazırlandı. Tüm MIP ve NIP hidrojeller kullanılmadan önce 12 saat 50 °C'de kurutuldu.

**Tablo 3.3.** MIP ve NIP Hidrojellerin hazırlanmasına yönelik kullanılan kimyasallar

Fonksiyonel Monomer	Kalıp Molekül	Çapraz Bağlayıcı	Çözücü
AA, 54 mg (0,76 mmol)	$\beta$ -Glukozidaz, 10mg	MBA, 6 mg	Fosfat Tamponu, 1mL (100 mM, pH 7.0)
AA, 54 mg 1-VI, 68,8 $\mu$ L (0,76 mmol)	$\beta$ -Glukozidaz, 10mg	MBA, 6 mg	Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0), 1mL
AA, 54 mg 4-VP, 81,9 $\mu$ L (0,76 mmol)	$\beta$ -Glukozidaz, 10mg	MBA, 6 mg	Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0), 1mL
AA, 54 mg HEMA, 92 $\mu$ L (0,76 mmol)	$\beta$ -Glukozidaz, 10mg	MBA, 6 mg	Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0), 1mL
AA, 54 mg MAA, 64 $\mu$ L (0,76 mmol)	$\beta$ -Glukozidaz, 10mg	MBA, 6 mg	Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0), 1mL



**Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcının yapısı

### 3.2.5. MIP ve NIP Hidrojellerin Karakterizasyonu

Akrilamid esaslı hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin karakterizasyonu için KBr pellet yöntemi kullanılarak FTIR spektroskopisi ile, yapıdaki grupların ve bağların tiplerini tanımlamak için uygun bir teknik olarak düşünülmüştür. Spektrumlar oda sıcaklığında 4000 ila 400 cm<sup>-1</sup> arasında kaydedildi.

MIP ve NIP hidrojeller taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. SEM analizi için, numuneler vakumla kurutuldu ve zar yüzeyi morfoloji karakterizasyonu için altın ince film ile kaplandı. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi hizmet alımı karşılığında Katip Çelebi Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda yaptırılmıştır.

### 3.2.6. Geri Bağlama Çalışmaları

Her bir geri bağlama deneyinde 0,01 g kurutulmuş hidrojel (MIP, NIP) ve 1 mL β-glukozidaz enzim çözeltisi kullanıldı. Hidrojeller üzerine enzimin geri bağlama çalışmalarında temas süresi, sıcaklık, pH ve enzim konsantrasyonu gibi çeşitli parametrelerin etkisi incelendi. Temas süresinin β-glukozidaz geri bağlama üzerindeki etkisi, temas süresinin 15 ila 120 dakika arasında değiştirilmesiyle çalışıldı. Sıcaklığın geri bağlama üzerindeki etkisi, çeşitli sıcaklık değerlerinde (25-40 °C) incelendi. Geri bağlama çalışmasında pH'ın etkisini incelemek üzere pH 3,0-4,0 asetat, pH 5,0-6,0 sitrat, pH 7,0 fosfat ve pH 8,0 tris-HCl (0,05 M) tamponları ile çalışıldı. Enzim konsantrasyonunun geri bağlama üzerindeki etkisi de 1-3,5 mg/mL konsantrasyon aralığında kaydedildi. Geri bağlama sonrasında hidrojeller santrifüjlendi ve üst fazda bağlanmamış protein Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak 595 nm'de ölçüldü.

Hidrojel üzerinde adsorbe edilen enzim miktarı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$Q_e = \frac{(C_oV_o - C_eV)}{m} \quad (1)$$

Burada C<sub>o</sub> başlangıç ve C<sub>e</sub> denge halindeki enzim miktarı, V<sub>o</sub> başlangıç ve V denge halindeki hacim, m ise deneyde kullanılan kuru hidrojelin miktarını temsil etmektedir.

Damgalı hidrojellerin spesifik tanıma özelliği damgalama faktörü (IF) kullanılarak hesaplandı:

$$IF = \frac{q_{MIP}}{q_{NIP}} \quad (2)$$

Burada  $q_{MIP}$  damgalı hidrojin üzerinde tutunan protein miktarı (mg/g),  $q_{NIP}$  damgalanmamış hidrojin üzerinde tutunan protein miktarını göstermektedir.

### 3.2.7. Çapraz Tanıma Testi

Hidrojinlerin kullanım alanı açısından spesifik özellik göstermesi son derece önemlidir. Hazırlanan MIP ve NIP hidrojinlerin  $\beta$ -glukozidaz enzimine spesifikliğini test etmek amacıyla, 2,5 mg/mL  $\alpha$ -amilaz, 1 mg/mL lipaz çözeltilerinden 1 mL hidrojinlere uygulandı. Geri bağlama sonrasında hidrojinler santrifüjlendi, (1) ve (2) numaralı formüle göre hidrojinler üzerinde tutunan protein miktarı ve damgalama etkinlikleri hesaplandı.

Farklı proteinlerin etkinliklerinin karşılaştırılması için seçicilik faktörü kullanıldı (3)

$$R = \frac{IF_{tem}}{IF_{ana}} \quad (3)$$

Burada  $IF_{tem}$   $\beta$ -glukozidazın damgalama etkinliğini,  $IF_{ana}$  diğer enzimler için hesaplanan damgalama etkinliği olarak tanımlanmaktadır..

### 3.2.8. Tekrar Kullanılabilirlik

Potansiyel pratik uygulama için, hidrojinlerin yeniden kullanılması önemlidir. Tekrar kullanılabilirliği test etmek için geri bağlama yapılan hidrojinler önce kurutuldu. Desorpsiyon işlemi fosfat tamponu (0,5 M pH 7,0) kullanılarak gerçekleştirildi ve her kullanım öncesi hidrojinler kurutuldu. Aynı hidrojinler kullanılarak adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi 4 kez tekrarlandı ve her işlemden sonra adsorplanan protein miktarları (1) numaralı formüle göre hesaplandı.

### 3.2.9. Şişme Testi

Akrilamid monomeri ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojinlerin zamana bağlı şişme testi gerçekleştirildi. Kuru olarak tartılan MIP ve NIP hidrojinlerin üzerine 1 mL fosfat tamponu (0,1 M pH 7,0) eklendi ve 25 °C'de, 15-30-60-90-120 dk inkübasyon sürelerinde çalkalandı. Hidrojinler, belirtilen zaman aralıklarında tampon çözeltisi içerisinde çıkarıldı ve yüzey suyu süzgeç kağıdı ile alındıktan sonra tartıldı. Denge durumuna ulaşıldığında, şişmiş hidrojin en yüksek şişme değerine sahiptir. Deney sonucunda hidrojinlerin şişme değeri aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\text{Şişme (\%)} = \frac{W_s - W_o}{W_o} \times 100 \quad (4)$$

Burada  $W_o$ , hidrojinlerin başlangıç ve  $W_s$ , farklı şişme sürelerine ait ağırlığıdır.

### **3.2.10. $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Bademden Kısmi Saflaştırılması**

#### **3.2.10.1. Bademlerin Homojenizasyonu**

Sert kabuklarından çıkartılan badem içlerinin her 1 gramına 8 mL soğutulmuş aseton (-20°C) eklendi ve porselen havanda ezilerek homojenize edildi. Homojenatın filtre kağıdından süzülmesi ile fenolik bileşikler ve bazı lipidler de süzüntü ile birlikte uzaklaştırıldı. Filtre kağıdının üstünde kalan kısım tekrar porselen havan haznesine alınarak işlem yukarıda anlatıldığı şekilde 3 kez tekrarlandı. Son süzme işlemi sonucunda filtre kağıdında kalan katı ekstrakt asetonun uçurulması amacıyla 24 saat 5°C bekletildi ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de derin dondurucuda saklandı [2].

#### **3.2.10.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme**

Aseton muamelesi sonrasında elde edilen katı preparat (500 mg) 50 mM pH 5.0 sitrat tamponunda (25 mL) süspanse edildi. 1 saat boyunca buz banyosunda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve sonrasında 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Elde edilen süpernatanta %20-70’lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında elde edilen her bir çökelek 50 mM pH 5.0 sitrat tamponunda (4 mL) süspanse edilerek diyalizlendi. Diyaliz sonrasında elde edilen örneklerde  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi ve protein miktarları ölçüldü.

#### **3.2.11. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Yöntemi**

Örneklerin saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli yöntemine göre yapıldı. Jellerin hazırlanış şekilleri Tablo 3.4’de verilmiştir. Bu yöntemle her bir protein ve protein alt ünitelerini jel üzerinde tek bant oluşturacak şekilde ayırt etmek mümkündür. Bu metot proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemede kullanıldığı gibi saflaştırılmış proteinlerin saflık derecelerinin belirlenmesinde de kullanılabilir.

Metodun uygulanması:

1. Cam plakalar etanol ve saf su ile temizlenerek oda sıcaklığında kurutuldu.
2. Cam plakalar arasına  $\approx$ 1 mm kalınlığında spacer adı verilen boşluk oluşturucu konuldu ve plakalar plaka tutucuya yerleştirildi.
3. Bir beher içerisine ayırım yapılacak ayırma (separating) ve düzenleyici (stacking) jel tabakaları Tablo 3.4’de gösterildiği şekilde hazırlandı:

**Tablo 3.4.** SDS-PAGE için ayırma ve düzenleyici jelin hazırlanışı

Kullanılan Kimyasallar	%12'lik Ayırma Jeli	%4'lük Düzenleyici Jel
	Hacim (mL)	
Deiyonize Su	6,8	6,1
%30'luk AA/MBA çözeltisi	8	1,3
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5	2,5
%10'luk SDS çözeltisi	0,2	0,1
%10'luk APS çözeltisi	0,1	0,05
TEMED	0,01	0,01

4. Ayırıcı jel için 10 mL'lik pipet ile jel karışımı cam plakalar arasında yukarıdan  $\approx 12$ cm boşluk bırakacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jel polimerize olmadan üzerine 2 mL bütanol ilave edildi ve jel 2 saat oda sıcaklığında polimerize olması için bırakıldı. Jelin polimerize olduğundan emin olduktan sonra üzerindeki bütanol tabakası alındı ve düzenleyici jel Tablo 3.4'de gösterildiği şekilde hazırlandı. Hazırlanan jel karışımı ayırım jelinin üzerine döküldü ve kuyucukları oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı. Bu tarak 12 adet diş içeriyor ve bu dişlerin bulunduğu kısımlar jel üzerinde polimerizasyondan sonra kuyucuk olarak kalır. Jelin polimerleşmesi için oda sıcaklığında gece boyunca beklendi.

5. Analiz edilecek protein örnekleri için kullanılan örnek tamponu Tablo 3.5'de gösterildiği şekilde hazırlandı:

**Tablo 3.5.** Örnek tamponunun hazırlanışı

Kullanılan Kimyasallar	Hacim (mL)
Deiyonize Su	3,55
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25
Gliserol	2,5
%10' SDS çözeltisi	2
%5'lik Bromfenol Blue çözeltisi	0,2
0,95 mL örnek tamponu üzerine 0,05 mL $\beta$ -merkaptoetanol eklendikten sonra 1:2 oranında protein örnekleri ile karıştırıldı.	

6. Protein örneklerinin yürütülmesi için içerisinde polimerize olmuş jel bulunan cam tabakalar spacer çıkarılarak tank içerisine yerleştirildi. Tablo 3.6'da gösterilen şekilde hazırlanan yürütme tamponu, 10 kat seyreltilerek tank içerisine eklendi.

**Tablo 3.6.** Yürütme tamponu hazırlanışı

<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>Miktar (g)</b>
Tris bazı	30,3
Glisin	144
SDS	10
Tartılan kimyasallar 1 L'ye deiyonize su ile tamamlandı.	

Yürütme işlemi düzenleyici jel de 80 V, ayırıcı jelde 100 V'da gerçekleştirildi.

7. Protein yürütmesi bittikten sonra saf su ile jel, plakalardan zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Jel üzerindeki proteinler boyanmadan önce jel üzerinde sabitlenmesi fiksasyon ile sağlandı. Bunun için jel %40'lık (v/v) metanol, %10'luk (v/v) asetik asit içeren çözelti içerisinde 1 saat bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra jel saf su ile yıkandı ve boyama işlemine geçildi.

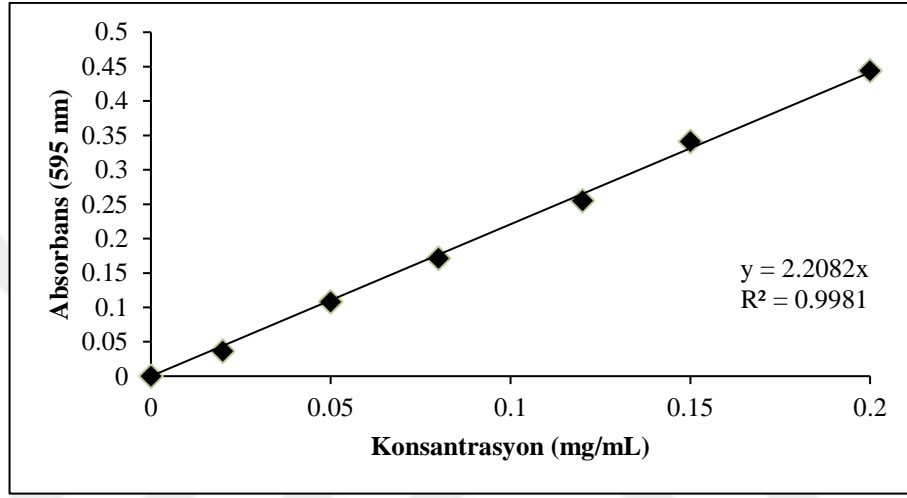
8. Boyama işlemi için %0,25'lik (w/v) Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 çözeltisi fiksasyon çözeltisi ile hazırlandı. Hazırlanan boya çözeltisi jele uygulandıktan sonra gece boyunca bekletildi. Boya, jelin yüzeyini tamamen boyadığı için protein olmayan bölgelerden uzaklaştırılması amacıyla jel %7'lik (v/v) asetik asit çözeltisi ile yıkandı.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Protein Tayini ve Protein Standart Grafiği

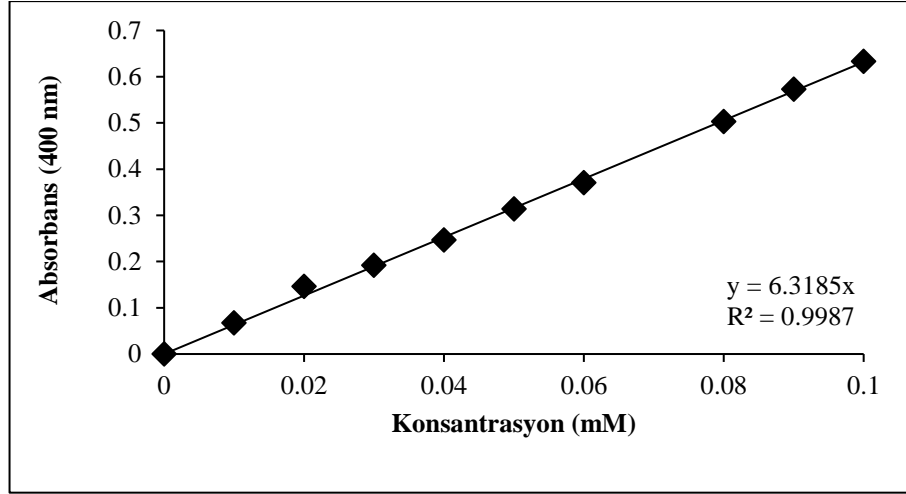
Protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldı. 0,02-0,15 mg/mL aralığında sığır serum albumini standart çözeltileri kullanılarak oluşturulan standart grafiği şekil 4.1'de görülmektedir. Standart grafiği kullanılarak MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlanan protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.1. Protein standart grafiği

### 4.2. p-Nitrofenol Standart Grafiği

Enzim aktivite hesaplamalarında kullanılmak üzere p-nitrofenol (pNP) standart eğrisinin oluşturulmasında 0,01-0,1 mM aralığında p-nitrofenol standart çözeltileri hazırlandı. Üzerlerine 2 mL 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi eklendi ve 400 nm'de alınan absorbans değerleri ile p-nitrofenol konsantrasyonları arasında Şekil 4.2'de yer alan standart grafiği çizildi.



Şekil 4.2. p-Nitrofenol standart grafiği

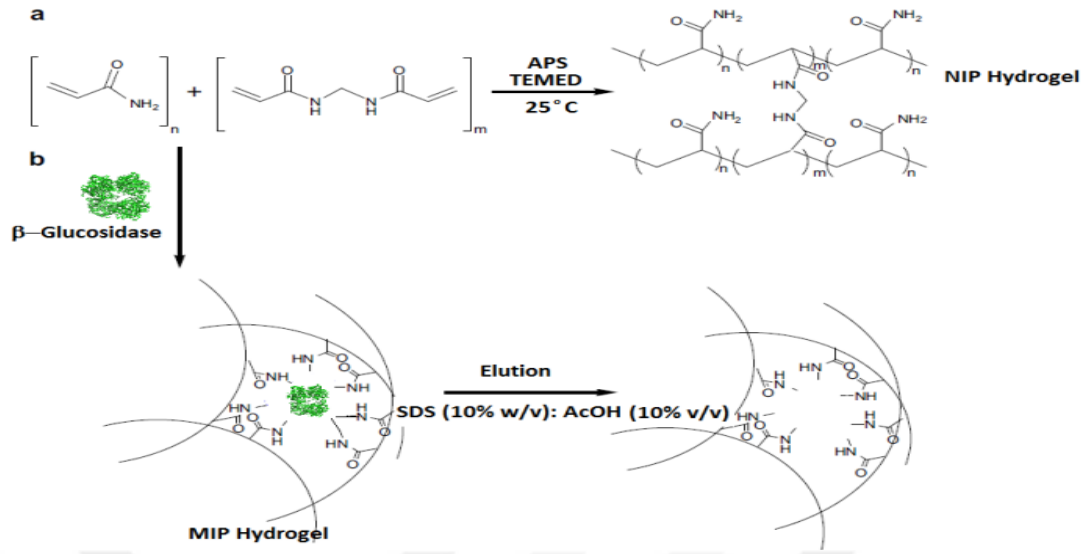
### 4.3. MIP ve NIP Hidrojellerin Sentezi

Tablo 4.1’de farklı monomerler ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller üzerine 1 mg/mL)  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi ile yapılan geri bağlama sonuçları görülmektedir. IF değeri  $\geq 1$  olan hidrojel kompozisyonunun akrilamid ile hazırlanan hidrojel olduğu görülmektedir. Deneysel çalışmalara akrilamid monomeri ile hazırlanan hidrojel üzerinden devam edildi.

**Tablo 4.1.**Farklı monomerler ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin geri bağlama sonuçları ve IF değerleri

Fonksiyonel Monomer	MIP	NIP	IF Değeri
AA	3,74 mg/g	2,54 mg/g	1,47
AA, 1-VI	Oluşmadı	0,573 mg/g	-
AA, 4-VP	Oluşmadı	1,004 mg/g	-
AA, HEMA	0,2166 mg/g	Oluşmadı	-
AA, MAA	0,0217 mg/g	0,0323 mg/g	0,67

\*Koşullar: 25°C’de, 0,01 g hidrojel, 2,5 mg/mL  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda, 120 dk inkübasyon süresinde).



**Şekil 4.3.** Çapraz bağlı a)NIP b)MIP hidrojeli [15]

EL-Sharif ve ark. 2013, tampon çözelti ve pH etkisini araştırmak amacıyla moleküler damgalı hidrojeller hazırlamışlardır. Hidrojel MIP'leri için AA (54 mg), N-hidroksimetilakrilamid (NHMA) (77 mg) ve N-izopropilakrilamid (NiPAm) (85,6 mg) monomerleri için ayrı ayrı çapraz bağlayıcı olarak bis-AA (6 mg) ve kalıp proteini (12 mg) 1 mL fosfat tamponu veya deiyonize suya eklenerek hazırlanmıştır. Çözelti azot ile 5 dakika muamele edilmiş, bunu takiben %10'luk (w/v) APS çözeltisinden 20 µl ve %5'lik (v/v) TEMED çözeltisinden 20 µl eklenmiştir. Polimerizasyon gece boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyondan sonra hidrojeller 5 kere 1 mL deiyonize su veya tampon çözeltileriyle (50 mM pH 7,4 Tris; 50 mM pH 7,4 suksinat; 50 mM pH 2,9 suksinat; 150 mM pH 7,4 fosfat and pH 4,7 fosfat tamponu) koşullandırılmıştır. Bunu takiben 1 mL hacimde %10'luk asetik asit-SDS çözeltisi ile beş kere yıkama yapılmıştır. Akrilamid esaslı moleküler damgalı polimerler (MIP) kalıp molekül olarak sığır hemoglobin (BHb), miyoglobin (EMb) ve sığır katalazı (BCat) kullanılmıştır. Oluşturulan her MIP için bir protein yokluğunda damgalanmamış kontrol polimeri (NIP) hazırlanmıştır [8]. Çalışmada yıkama ve yeniden yükleme için deiyonize su, fosfat tamponu (PBS), tris (hidroksimetil) aminometan (Tris) tamponu ve suksinat tamponu etkisi araştırılmıştır. Çalışma boyunca MIP seçiciliğinin akrilamid için en yüksek, ardından N-hidroksimetilakrilamid, ve daha sonra N-izopropilakrilamid

MIP'ler olduğu görülmüştür. MIP'lerin seçiciliği NIP'ler ile karşılaştırıldığında tampon koşullarına ve pH sırasına Tris>PBS>süksinat göre azalmıştır [16].

Adrus ve ark. 2012, sıcaklığa duyarlı lizozim damgalı N-izopropilakrilamid bazlı hidrojeller hazırlamışlardır. Tris-HCl tampon çözeltisi (10 mM, pH 7,0) içinde ana monomer olarak NIPAm, yardımcı monmer olarak MAA, çapraz bağlayıcı olarak MBA kullanılarak NIP ve kalıp molekül lizozim eklenerek de MIP hidrojelleri hazırlanmıştır. Polimerizasyon işleminden sonra reaksiyona girmemiş monomerleri uzaklaştırmak amacıyla NaCl çözeltisi (0,3 veya 1,0 M) ile birkaç defa yıkama yapılmıştır. Hidrojel ve kalıp molekül çökmesi olmadan kalıp molekül giderimi ılımlı bir NaCl konsantrasyonu kullanarak mümkün olmuştur ve tuz konsantrasyonu 0,3 M kalıp molekül için uygun bulunmuştur [17].

Wang ve ark. 2012, sığır serum albumini tanımaya yönelik sıcaklığa duyarlı moleküler damgalı hidrojeller hazırlamışlardır. Hidrojellerin sentezi için monomer olarak 2-akrilamido-2-metilpropanosulfonik asit (AMPS), N-izopropilakrilamid ve akrilamid, çapraz bağlayıcı MBA, polimerizasyonu başlatıcı olarak amonyum persulfat ve TEMED Tris-HCl (10 mmol/L, pH 7,0) kullanılmıştır. Polimerizasyonlar karşılaştırma amacıyla -20 ve 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada HEMA, akrilamid ile karşılaştırma amacıyla başka bir fonksiyonel olarak kullanılmıştır. Karşılaştırma sonucunda akrilamid için 2,56, HEMA için 1,63 olarak hesaplanan en iyi kapasite ve damgalama faktörüne sahip olan monomerin akrilamid olduğu görülmüştür. Bunun akrilamiddeki amino grubunun güçlü elektrostatik etkileşim sayesinde olduğu düşünülmüştür [10].

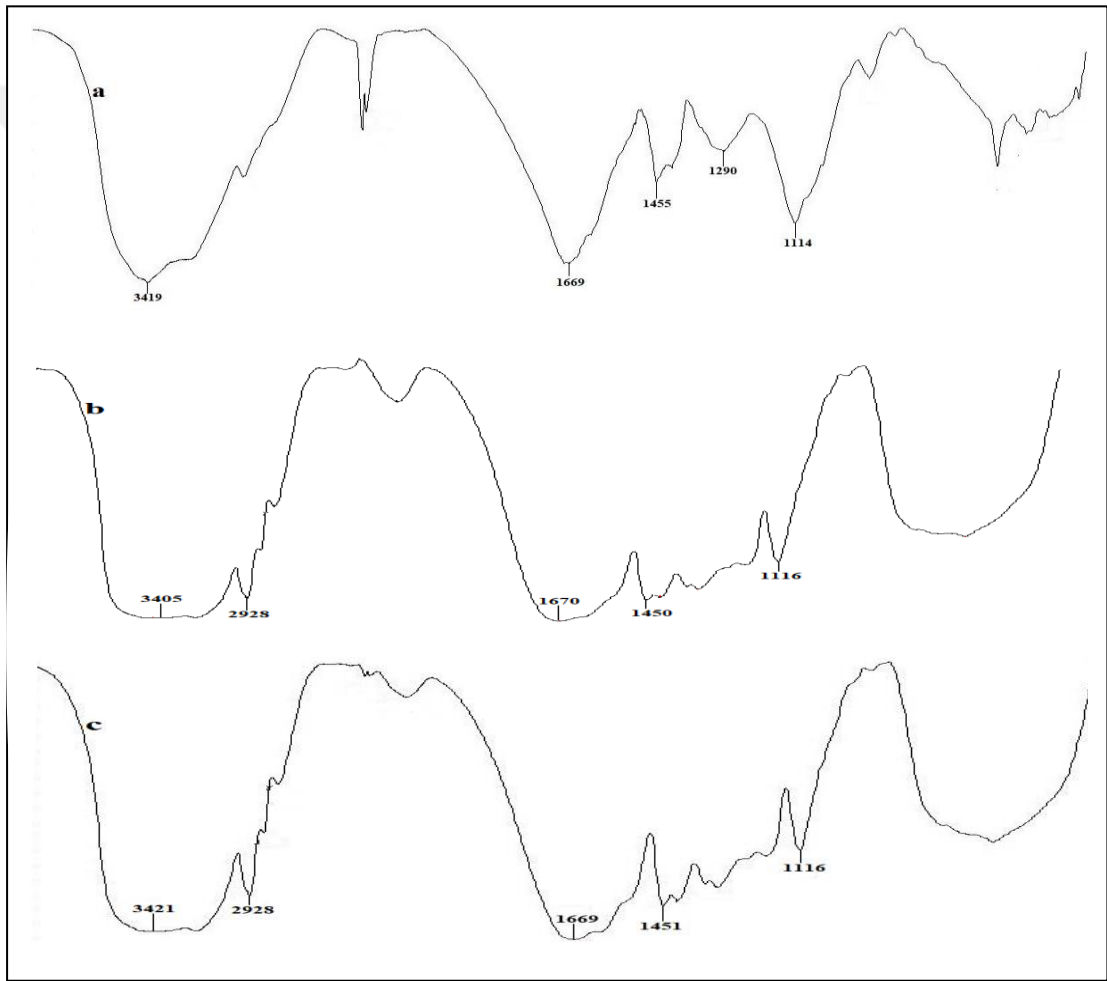
Luo ve ark. 2016, lizozim damgalı polimerler üzerinde araştırma yapmışlardır. Hidrojel sentezi için monomer olarak AA, çapraz bağlayıcı olan MBA, polimerizasyonu başlatıcı olarak APS ve TEMED kullanmışlardır. MIP hidrojeller için bu kimyasalları lizozim varlığında fosfat tamponunda (pH7,0, 20mM) çözmüşlerdir. Aynı şekilde NIP hidrojelleri de lizozim yokluğunda zırlanmıştır. Polimerizasyon 30°C su banyosunda gece boyunca gerçekleşmiştir. Elde edilen jeller deiyonize su ile yıkanmış ve vakum altında kurutulduktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir [19].

## 4.4. MIP ve NIP Hidrojellerin Karakterizasyonu

### 4.4.1. FTIR ve SEM Analizi

#### 4.4.1.1. FTIR Analizi

MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları Fourier Transform Kızılötesi spektrometresi (FTIR Perkin Elmer spektrumu BX) ile kaydedildi. FTIR spektrumları 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında alındı. Hidrojeller, su ile ilgili girişimlerini önlemek için önceden 24 saat 50 °C'de kurutuldu. MIP ve NIP hidrojellerinin FTIR spektrumları Şekil 4.4'de görülmektedir.

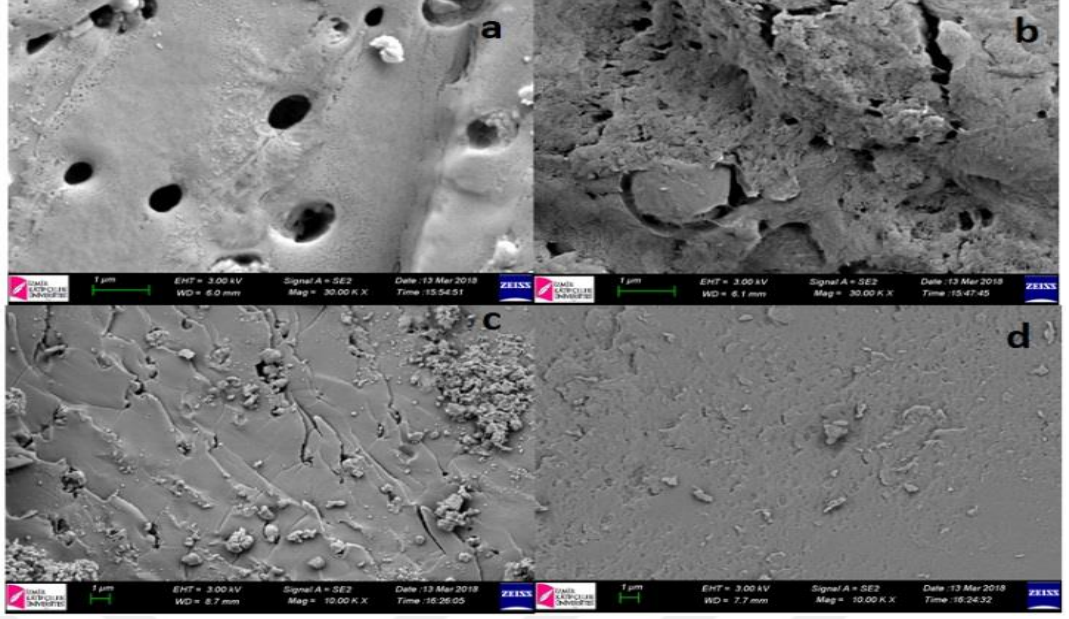


Şekil 4.4. MIP ve NIP hidrojellerin IR spektrumları a) Yıkılmamış MIP, b) Yıkılmış MIP, c) NIP Hidrojel

Akrilamid içerikli hidrojellerde 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki dalga boyları  $\text{CONH}_2$  gruplarını gösterir. Bulgulara göre yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve yıkanmış NIP için elde edilen 3300-3400  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki dalga boyları bu durumu doğrulamaktadır. Yine sırasıyla yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve yıkanmış NIP için bulunan 2900-2700  $\text{cm}^{-1}$  aralığında bulunan dalga boyları çapraz bağlanma ajanının (N,N metilen bisakrilamid) varlığında meydana gelen  $\text{CH}_2$  gerilme titreşiminin simetrik ve asimetrik gerilmesine ait C-H gruplarını göstermektedir. 1600  $\text{cm}^{-1}$  larda ortaya çıkan grup ise akrilamidin C=O gerilim bandına aittir. 1000-1400  $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen titreşimler ise C-N gerilme titreşimleri olarak bilinmektedir. Yıkanmamış MIP için akrilamid ve N,N metilen bisakrilamid için görülen piklere ek olarak 1290  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda görülen titreşimler ise yapıya  $\beta$ -glukozidazın katıldığını göstererek yıkanmış MIP ve NIP' e göre farklılık göstermesini ifade etmektedir.

#### 4.4.1.2. SEM Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey morfolojisini ve hidrojin temel fiziksel özelliklerini karakterize etmek için önemli bir araç olmuştur. Hidrojin parçacık şekli, gözenekliliği ve uygun boyut dağılımını belirlemek için yararlıdır. Hidrojellerin taramalı elektron mikrografları, Şekil 4.5'de gösterilmektedir. Hidrojellerin yüzey alanında bir artış sağlayan gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Bu durum geri bağlama çalışmalarında enzim moleküllerinin bu gözeneklere kolayca tutunmasına olanak sağlar. Yıkamadan önce hidrojeller gözenekli ve düz bir yüzeye sahipken yıkama yapıldıktan sonra hidrojellerin yüzeyinin pürüzlü bir yapıda olduğu görülmektedir.

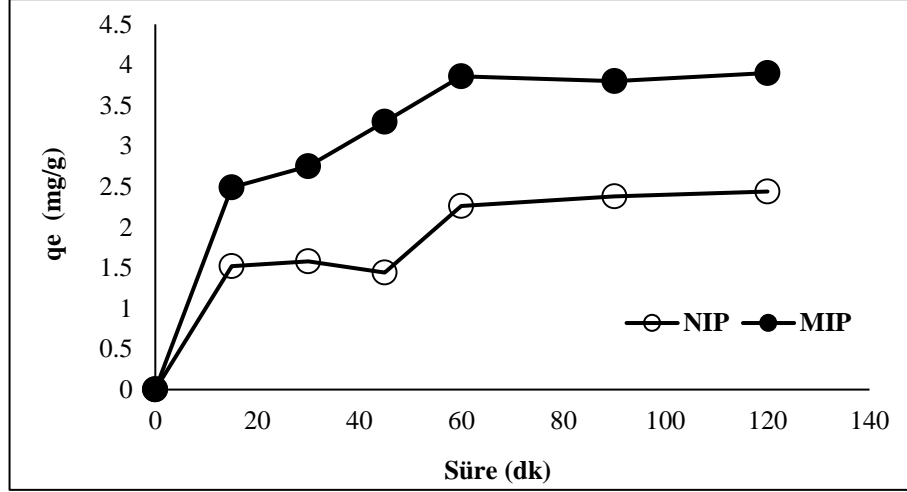


**Şekil 4.5.** SEM mikrografları. a)  $\beta$ -Glukozidaz damgalı hidrojel (x 30000), b) MIP (x30000), c) damgalama yapılmayan hidrojel (x10000), d) NIP (x10000)

## 4.5. Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu

### 4.5.1. Temas Süresi Etkisi

MIP ve NIP hidrojel (0,01 g) üzerine 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0) hazırlanan 2,5 mg/mL  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi uygulandı. Örnekler çalkalayıcıda 15-30-45-60-90-120 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında MIP ve NIP hidrojel üzerine geri bağlanan protein miktarları (qe) hesaplandı (Şekil 4.6). Farklı sürelerde elde edilen qe (mg/g) değerleriyle çizilen grafikten optimum inkübasyon süresi 120 dk olarak belirlendi.



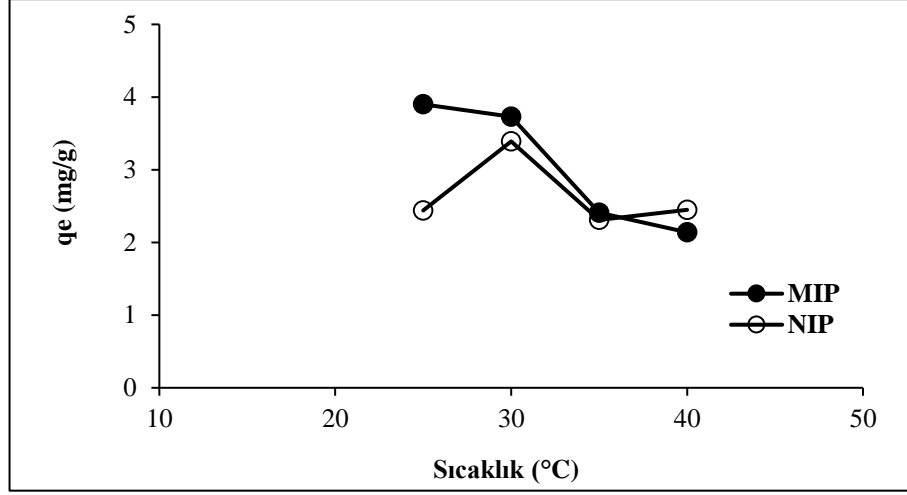
**Şekil 4.6.** Geri bağlama üzerine temas süresinin etkisi (Koşullar: 25°C oda sıcaklığında, 0,01 g hidrojel, 2,5 mg/mL  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda))

Luo ve ark. 2016, hazırladıkları hidrojele lizozim (0,25 mg/mL) adsorpsiyonunun kinetiğini inkübasyon süresinin 1-5 saat arasında düzenli aralıklarla değiştirilmesiyle test etmişlerdir. Çalışma sonucunda MIP'lerin kapasitesinin zamanla artmaya devam ettiği ve 5 saatin sonunda dengeye ulaştığı görülmüştür. 4 saat inkübasyon süresi sonunda MIP'lerin maksimum kapasitesi 3,7 mg/g ve NIP'lerin maksimum kapasitesi 0,84 mg/g olarak kaydedilmiştir [19].

#### 4.5.2. Sıcaklığın Etkisi

MIP ve NIP hidrojeller (0,01 g) üzerine 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0) hazırlanan 2,5 mg/mL  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi uygulandı ve inkübatörde 25-30-35-40 °C 'de 120 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlanan protein miktarları (qe) hesaplandı. Farklı sıcaklıklarda elde edilen qe değerleriyle çizilen grafikte görüldüğü üzere optimum geri bağlama sıcaklığı 25 °C olarak belirlendi. Hidrojellerin hazırlama koşullarına bağlı olarak damgalamanın gerçekleştiği ve anahtar kilit uyumu gösterecek şekilde uygun konformasyonun sağlanması durumunda adsorpsiyonun gerçekleşebileceği düşünülmektedir.. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda proteinlerin denatürasyona uğraması bağlanma kapasitesinin düşmesine neden olmaktadır.



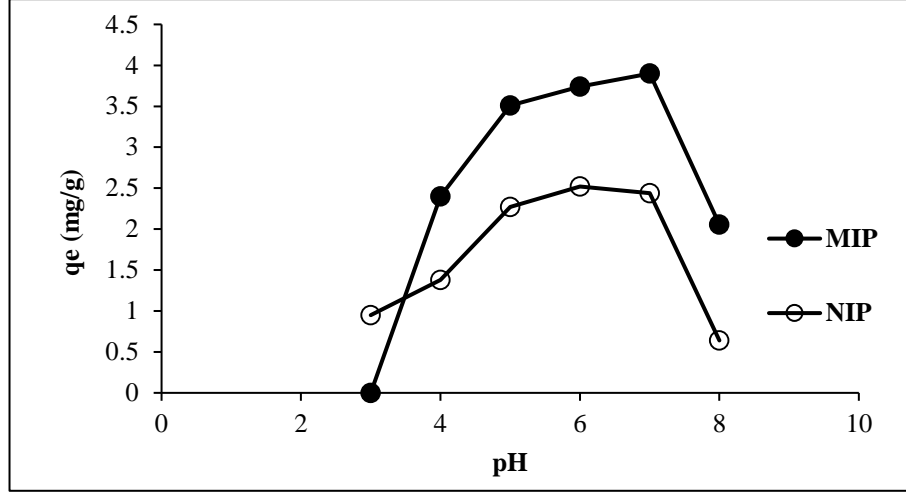


**Şekil 4.7.** Geri bağlama üzerine sıcaklığın etkisi grafiği (Koşullar: 0,01 g hidrojel, 2,5 mg/mL  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu), inkübasyon süresi: 120 dk)

Wang ve ark. 2012, sığır serum albumini tanımaya yönelik 2-akrilamido-2-metilpropanosülfonik asit (AMPS), N-izopropilakrilamid (NIPAM) ve akrilamid ile hazırladıkları sıcaklığa duyarlı MIP ve NIP sentezleyerek sıcaklık etkisini incelemişlerdir ve maksimum kapasiteye 30°C'de ulaşmışlardır. [18].

#### 4.5.3. pH'ın Etkisi

$\beta$ -Glukozidaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlama çalışmasında pH'ın etkisini incelemek üzere pH aralığı 3,0-8,0 arasında değişen tampon ortamlarında 2,5 mg/mL olacak şekilde hazırlanan  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltileri kuru hidrojeller üzerine uygulandı. Oda sıcaklığında 120 dk inkübasyon sonunda hidrojeller üzerine geri bağlanan protein miktarları (qe) tayin edildi. Şekil 4.8'de görülen pH'a bağımlı olarak çizilen qe grafiğinde optimum geri bağlama pH değeri 7,0 olarak bulundu. Bu durum nötral şartlarda hazırlanan hidrojel üzerinde  $\beta$ -glukozidazın o pH değerindeki konformasyonuna uygun spesifik bağlanma bölgelerinin oluştuğunu ve farklı pH değerlerinde enzimin tersiyer yapısında meydana gelen değişimler nedeniyle geri bağlama miktarlarında düşüş olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 4.8.** Geri bağlama üzerine pH'nin etkisi grafiği (Koşullar: 25°C oda sıcaklığında, 0,01 g hidrojel, 2,5 mg/mL  $\beta$ -Glukozidaz enzim çözeltisi)

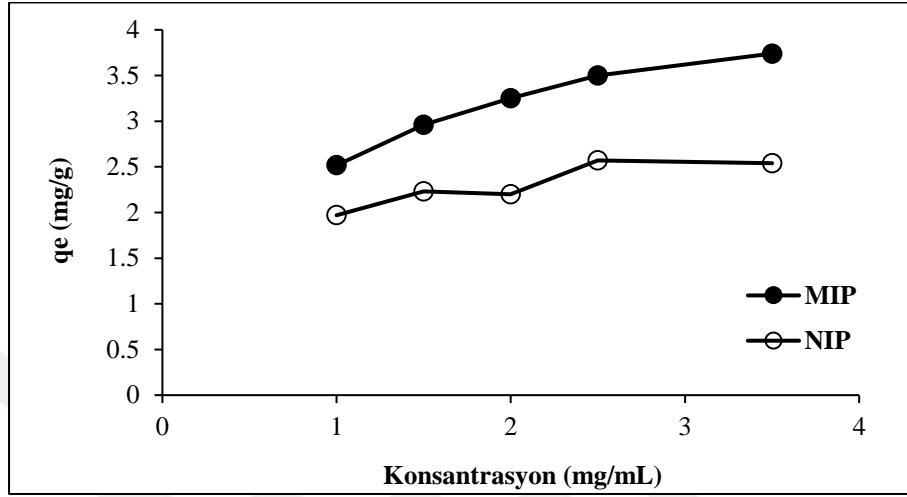
Luo ve ark. 2016, akrilamid ve N,N metilen bisakrilamid ile hazırladıkları MIP üzerine 250  $\mu$ g/mL lizozim adsorpsiyonunun pH etkisini pH 6,0-7,0-8,0'de incelemişlerdir. İnceleme sonucunda adsorpsiyon kapasitesinde pH 6,0'dan 7,0'ye keskin bir çıkış ve pH 7,0'den 8,0'e keskin bir düşüş gözlemlemişler ve bu keskin düşüşün düşük pH ortamının adsorpsiyon prosesini elverişsiz kılarak proteinlerde denatürasyona neden olduğu düşünülmüştür. [19]

Gupta ve ark. 2018, fonksiyonel monomer akrilik asit ve çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat kullanarak moleküler damgalı manyetit polimer hazırlamışlardır. Hazırladıkları polimeri bal ve sebze örneklerinden imidaklopridinini seçici olarak ayrılması amacıyla adsorban olarak kullanmışlardır. Adsorpsiyon verimi pH'nin etkisini incelemek için pH 4,0, 7,0 ve 9,2'de adsorpsiyon çalışmaları yapmışlardır. Deney sonucunda en iyi adsorpsiyon kapasitesi pH 7,0'da ardından pH 9,2'de elde edilmiştir. Asidik pH'da kapasitenin düşük çıkması imidaclopridin tuz oluşturduğu ve fonksiyonel grupların protonlanarak MIP'in aktif bölgelerini etkilendiği düşünülmüştür [20].

#### 4.5.4. Başlangıç Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

4 mg/mL stok  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisinden (0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ) yola çıkarak hazırlanan konsantrasyonları 1-1,5-2-2,5-3,5 mg/mL olan enzim çözeltileri MIP ve NIP hidrojel üzerine uygulandı. 120 dk inkübasyon sonunda geri bağlanan protein miktarları (qe) hesaplandı. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi

hidrojellerin  $\beta$ -glukozidaz bağlama kapasitesi konsantrasyon artışıyla orantılı olarak artış gösterdi. 2,5 mg/mL başlangıç enzim konsantrasyonunda ise bağlanan protein miktarının dengeye ulaştığı görüldü. MIP hidrojel protein bağlama kapasitesi 3,74 mg/g ve NIP hidrojel protein bağlama kapasitesi ise 2,54 mg/g olarak hesaplandı. Optimize edilen koşullarda IF değeri 1,47 olarak bulundu.



**Şekil 4.9.** Geri bağlama üzerine konsantrasyon etkisi grafiği (Koşullar: 25°C oda sıcaklığında, 0,01 g hidrojel, 2,5 mg/mL  $\beta$ -Glukozidaz enzim çözeltisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda))

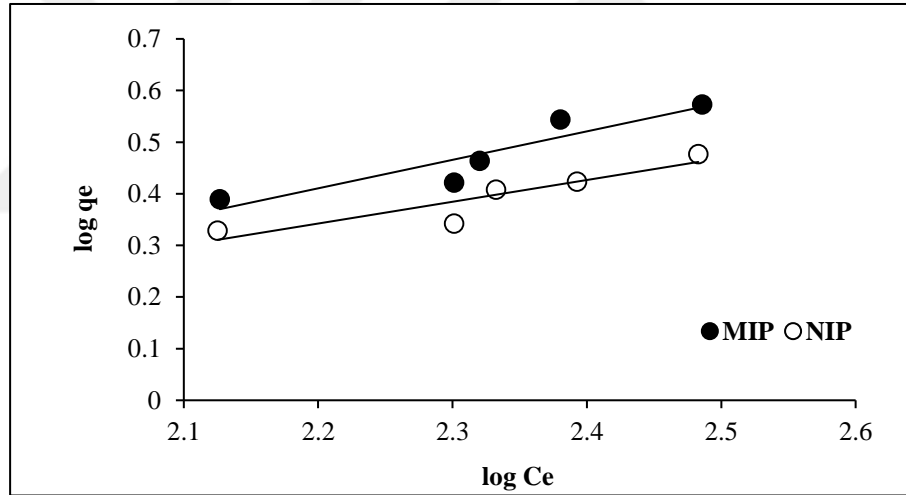
Wang ve ark. 2012, 2-akrilamido-2-metilpropano sülfonik asit (AMPS), N-izopropilakrilamid (NIPAm) ve akrilamid (AAm) ile sıcaklığa duyarlı hidrojeller hazırlamışlardır. Sığır serum albumini tanımaya yönelik hazırladıkları hidrojellerin kapasitelerini tespit etmek amacıyla 2,5 mg/mL BSA'dan 4 mL hidrojellere ekleyerek adsorpsiyon çalışması yapmışlardır. Deneysel maksimum adsorpsiyon kapasiteleri kademeli olarak yaklaşık 20 saatte elde edilmiştir. Damgalı hidrojellerin damgasız hidrojellere göre daha fazla BSA adsorbe ettiği gözlemlenmiştir. Bu sonuç, fonksiyonel grupların mekaniksel yönelimini doğrulamış ve damgalama işlemi sırasında damgalı hidrojellerde tanıma alanlarının mekaniksel bütünlüğü oluşturulduğu gözlemlenmiştir. Polimerize hidrojellerin damgalama faktörü  $-20^{\circ}\text{C}$  ve  $25^{\circ}\text{C}$  için sırasıyla 2,73 ve 2,26 olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda damgalı hidrojellerin ortalama 68 mg/g, damgalanmamış hidrojellerin adsorpsiyon kapasitesi ortalama 23 mg/g olarak kaydedilmiştir. [18].

#### 4.6. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi herhangi bir adsorpsiyon sisteminin tasarımında temel öneme sahiptir. Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan iki izoterm modeli, yani Freundlich modeli ve Langmuir modeli adsorpsiyon sürecini tanımlamak için kullanıldı. Freundlich izoterm heterojen bir yüzey enerji sistemini işaret eder ve adsorpsiyon prosesini belirli bir adsorbant üzerine adsorbe edilen çözünmüş madde miktarının solüsyondaki çözünenin konsantrasyonuna oranı farklı konsantrasyonlarda sabit değildir. Freundlich modelinin logaritmik formu denklemlerle verilir (5).

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad (5)$$

Burada  $q_e$  adsorbe edilen miktardır ve  $K_f$  ve  $n$  sırasıyla adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon yoğunluğu ile ilgili Freundlich sabitleridir.  $\log q_e$ ,  $\log C_e$ 'ye karşı çizildiğinde (Şekil 4.10'da),

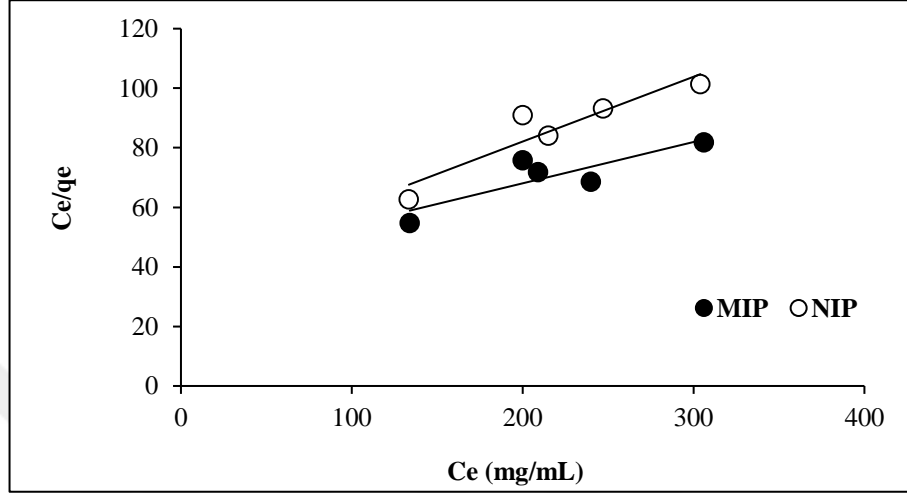


**Şekil 4.10.** MIP ve NIP hidrojellere  $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun Freundlich izoterm grafiği

Adsorpsiyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılan bir başka izoterm Langmuir izotermidir. Bu izoterm, adsorbent yüzeyinde adsorplayıcı noktaların olduğunu ve denge halinde maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılarak, adsorbe edilen adsorbat miktarı sabitlenmiş olur. Bu durumdan itibaren Langmuir izotermine adsorpsiyon, adsorbatın konsantrasyonunun artışı ile doğrusal olarak artış göstermektedir. Bu izoterm, adsorpsiyon enerjisinin tek tabakayla kaplanmış olduğunu ve dağılımın homojen bir şekilde gerçekleştiğini kabul eder (Şekil 4.11).

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q^{\circ}b} + \frac{C_e}{Q^{\circ}} \quad (6)$$

Burada  $q_e$  (mg/g), denge anındaki adsorbana bağlı protein miktarı,  $C_e$  (mg/mL): Çözeltideki denge halindeki protein derişimi,  $b$  (L/mg): Langmuir sabiti,  $Q_{max}$  (mg/g): Maksimum protein adsorpsiyon kapasitesini ifade etmektedir.



**Şekil 4.11.** MIP ve NIP hidrojellere  $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun Langmuir izoterm grafiği

Ayırma faktörü  $R_L$  (boyutsuz faktör) bir Langmuir modelinin tercih edilirligini gösteren temel özelliğidir ve adsorpsiyon sürecinin  $R_L$  değeri aşağıdaki denklem (7) kullanılarak hesaplanır:

$$R_L = \frac{1}{1 + b C_0} \quad (7)$$

$C_0$ , başlangıçtaki boya konsantrasyonu (mg/L) ve  $b$  Langmuir sabiti (L/mg).

$R_L$ 'yi gösterir

$R_L$  değeri aşağıda verilen adsorpsiyon sürecini ifade eder:

$R_L > 1$  Olumsuz

$R_L = 1$  Doğrusal

$0 < R_L < 1$  Olumlu

$R_L = 0$  Geri Dönüşümsüz

**Tablo 4.2.** Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm parametreleri

Langmuir İzotermi		Freundlich İzotermi	
MIP	NIP	MIP	NIP
$R^2=0,733$	$R^2=0,864$	$R^2=0,879$	$R^2=0,835$
$Q_{\max}= 7,2$ mg/g	$Q_{\max}=4,6$ mg/g	$K_F=0,16$ mg/g	$K_F=0,26$ mg/g
$b=0,0034$ L/mg	$b=5,64 \cdot 10^{-3}$ L/mg	$n=1.5267$ L/mg	$n=1,3089$ L/mg
$R_L=0,988$	$R_L=0,980$		

Luo ve ark. 2016, hazırladıkları lizozim damgalı poliakrilamid hidrojellerle yaptıkları çalışmada, oda sıcaklığında 0,05 ila 1,0 mg/mL (fosfat tamponu, pH 7,0) lizozim konsantrasyon aralığında, 4 saat inkübasyon süresinde adsorpsiyon izotermi tutunan madde miktarına göre incelemiştir. 0.25 mg/mL lizozim konsantrasyonunda MIP ve NIP dengeye ulaşmış ve maksimum adsorpsiyon kapasiteleri 3,78 mg/g ve 0,92 mg/g olarak hesaplanmıştır [19].

Zhong ve ark., BSA'nın seçimli ayırımına yönelik hazırladıkları MIP ve NIP'lerin adsorpsiyon izotermelerini Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri üzerinden inceleyerek  $R^2$  değerlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak Langmuir modelinin  $R^2 > 0.98$  olması nedeniyle uygun adsorpsiyon modeli olduğu görülmüştür [21].

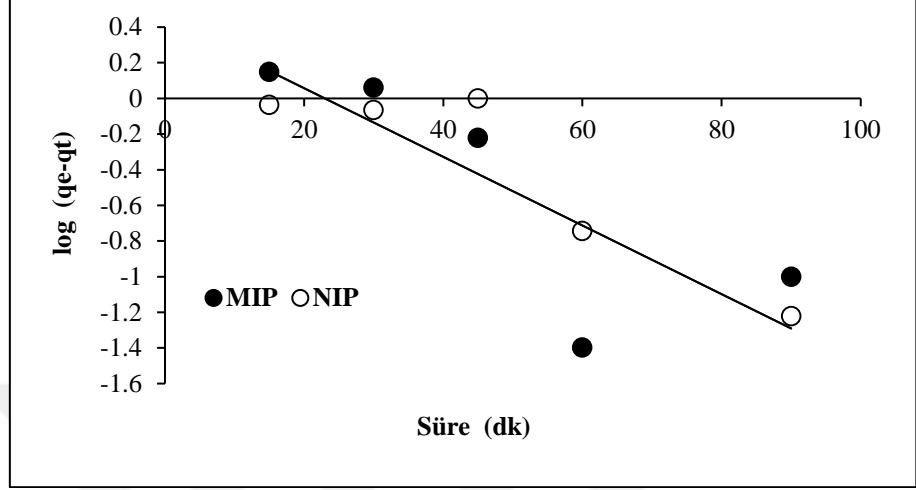
#### 4.7. Kinetik Parametrelerin İncelenmesi

Adsorpsiyon kinetiğinin adsorpsiyon verimi ile ayrılmaz bir ilişkisi vardır. Adsorpsiyon mekanizmasını incelemek ve hız belirleme adımını doğrulamak için, adsorpsiyon kinetiği verilerine uyacak şekilde yalancı birinci derece ve yalancı-ikinci dereceden yararlanılmıştır. Yukarıda belirtilen iki modelin sonuçları Tablo 4.3'de görülmektedir.

Yalancı birinci dereceden hız denkleminin lineer şekli denklem (8) tarafından verilir:

$$\log (q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (8)$$

Burada  $q_t$ , adsorbat miktarının  $t$  zamanında geri bağlamasıdır (mg/g),  $q_e$  dengedeki adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g) ve  $k_1$ , yalancı birinci dereceden hız sabitidir.

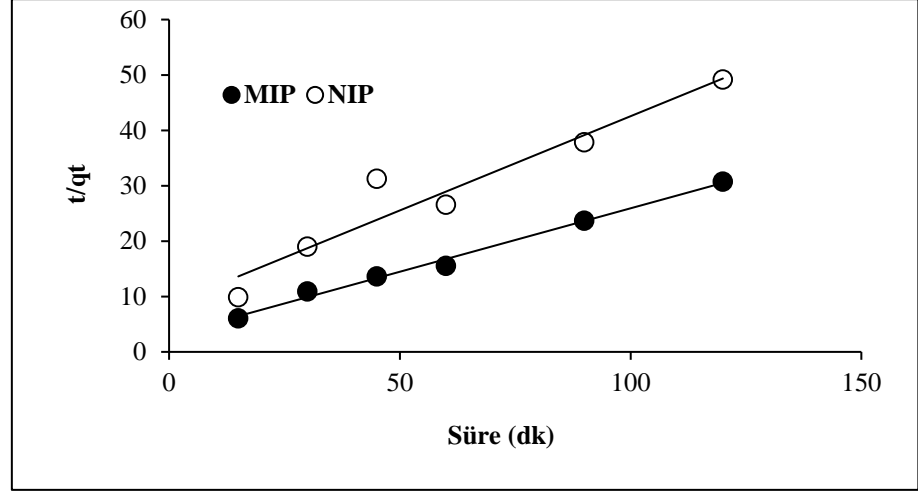


**Şekil 4.12.** MIP ve NIP hidrojellere  $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun yalancı 1.mertebe grafiği

Yalancı ikinci dereceden hız denkleminin lineer şekli denklem (9) tarafından verilir:

$$\frac{t}{qt} = \frac{1}{qe^2K_2} + \frac{t}{qe} \quad (9)$$

Burada  $k_2$ , yalancı ikinci dereceden hız sabiti. Yalancı ikinci dereceden hız sabiti ve  $t/qt$  'nin  $t$ 'ye karşı çizilen grafiğinin eğim kesişiminden bulunur (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** MIP ve NIP hidrojellere  $\beta$ -Glukozidaz adsorpsiyonunun yalancı 2.mertebe grafiği

**Tablo 4.3** Yalancı 1. mertebe ve yalancı 2.mertebe kinetik modellerinin sonuçları

Yalancı 1.Mertebe		Yalancı 2.Mertebe	
MIP	NIP	MIP	NIP
$R^2=0,661$	$R^2=0,840$	$R^2=0,992$	$R^2=0,920$
$q_e = 2,76 \text{ mg/g}$	$q_e = 2,63 \text{ mg/g}$	$q_e= 4,36 \text{ mg/g}$	$q_e= 2,94\text{mg/g}$
$k_1 = 0,0437 \text{ g/mg.dk.}$	$k_1 = 0,0392 \text{ g/mg.dk.}$	$k_2= 0,0175 \text{ g/mg.dk.}$	$k_2= 0,0137 \text{ g/mg.dk.}$

DeneySEL veriler ile Tablo 4.3'deki korelasyon katsayısının ( $R^2$ ) 1'e yakınlığı ve  $q_e$  değerinin dENEYSEL kapasite değerine yakın olması nedeniyle adsorpsiyon mekanizmasının en iyi yalancı ikinci mertebe kinetik modeli ile uyum içinde olduğu görüldü. Buna göre hidrojel üzerindeki fonksiyonel gruplar ile enzim arasında oluşan güçlü etkileşimin sonucu olarak adsorpsiyon mekanizmasının gerçekleştiğini göstermektedir.

Zhao ve ark., polipropilen fiber ve akrilamid ile çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen bisakrilamid kullanarak sığıR serum albümini (BSA) tanımaya yönelik MIP ve NIP hidrojeller hazırlamışlardır. Adsorpsiyon kinetiğini incelemişler ve MIP'ler de ilk 50 dk adsorpsiyon kapasitesinde artışın olduğunu sonrasında kapasitenin dengeye ulaşarak zamanla azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca BSA'nın MIP'ler



üzerindeki adsorpsiyonunun NIP'lere oranla 3 kat daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir [22].

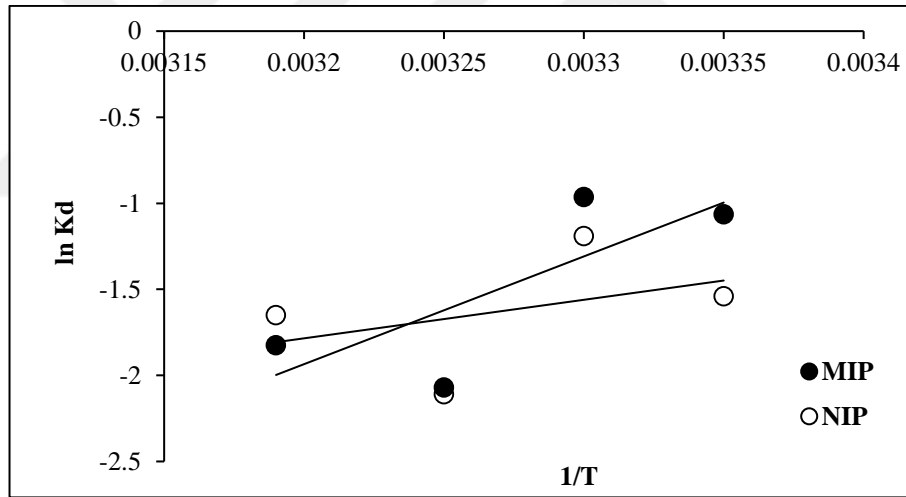
#### 4.8. Termodinamik Parametrelerin İncelenmesi

Çevresel süreçlerde, hangi sürecin kendiliğinden oluşacağını belirlemek için hem enerji hem de entropi faktörleri göz önünde bulundurulmalıdır. Kinetik çalışma, bir adsorpsiyon prosesi için önemlidir çünkü adsorbatın alım oranını gösterir ve tüm adsorpsiyon sürecinin kalan süresini kontrol eder.

Tutunan enzim miktarı aşağıdaki denklemlere göre hesaplanmıştır:

$$Kc = \frac{Xe}{Ci - Xe} \quad (10)$$

Burada  $Xe$ , dengedeki polimerler üzerine adsorbe edilen enzim konsantrasyonu, mg/mL,  $Ci$ , başlangıç enzim konsantrasyonu, mg/mL'dir.  $Kc$  denge sabiti 298-313 K değerleri için hesaplandı (Şekil 4.14)



Şekil 4.14. MIP ve NIP hidrojenlerin ln Kd'ye karşı 1/T grafiği

Denklem (11),  $\ln Kc$  ve  $1/T$  grafiğinden yararlanılarak Tablo 4.4'de yer alan, adsorpsiyonun standart entalpi ( $\Delta H^\circ$ ) ve entropisini ( $\Delta S^\circ$ ) değerlendirmeyi sağlar.

$$\ln Kc = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (11)$$

Burada  $R$  (8,314 J/mol K), gaz sabiti ve  $T$ , mutlak sıcaklıktır.  $-\Delta H^\circ/R$  eğim değerleri ve Şekil 4.14 'deki  $\Delta S^\circ/R$  kesişme noktaları, enzimin hidrojenler üzerine adsorpsiyonu için  $\Delta H^\circ$  ve  $\Delta S^\circ$  'dir. Termodinamik parametrelerin ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ )

değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.  $\Delta H^\circ$  ve  $\Delta S^\circ$  adsorpsiyonunun negatif değeri ile sisteminin ekzotermik olduğu ve düzensizliği azalttığı görülmektedir.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (12)$$

**Tablo 4.4.** Termodinamik Parametreler

	T (K)	$\Delta G$ (J/mol)	$\Delta H$ (J/mol)	$\Delta S$ (J/mol K)
<b>MIP</b>	298	2404	-52029	-183
<b>NIP</b>	298	3597	-18615	-74

#### 4.9. Çapraz Tanıma Testi

MIP ve NIP hidrojeller üzerine fosfat tamponunda (0,1 M, pH 7,0) hazırlanan 2,5 mg/mL  $\alpha$ -amilaz, 1 mg/mL lipaz çözeltilerinden 1 mL uygulandı. 120 dk inkübasyon süresi sonunda örnekler 10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üst fazlara 595 nm' de protein tayini yapıldı. MIP ve NIP için karşılaştırma proteinleri olan  $\alpha$ -amilaz, sığır serum albumin ve lipazın geri bağlama kapasiteleri Tablo 4.5'de gösterildi. Sonucunda moleküler damgalama sayesinde  $\alpha$ -amilaz ve lipazın damgalama faktörleri (IF)  $\beta$ -glukozidaza kıyasla düşük çıkarak hidrojellerde  $\beta$ -glukozidaza spesifik bağlanma bölgelerinin bulunduğu göstergesi olmuştur.

**Tablo 4.5.**  $\beta$ -Glukozidaz,  $\alpha$ -amilaz ve lipaz ile yapılan çapraz tanıma testi

Proteinler	Qe (mg/g) (MIP)	Qe (mg/g) (NIP)	IF Değeri	R
<b><math>\beta</math>-Glukozidaz</b>	3,74	2,54	1,47	
<b><math>\alpha</math>-Amilaz</b>	1,35	1,41	0,95	1,54
<b>Lipaz</b>	5,46	5,42	1,01	1,45

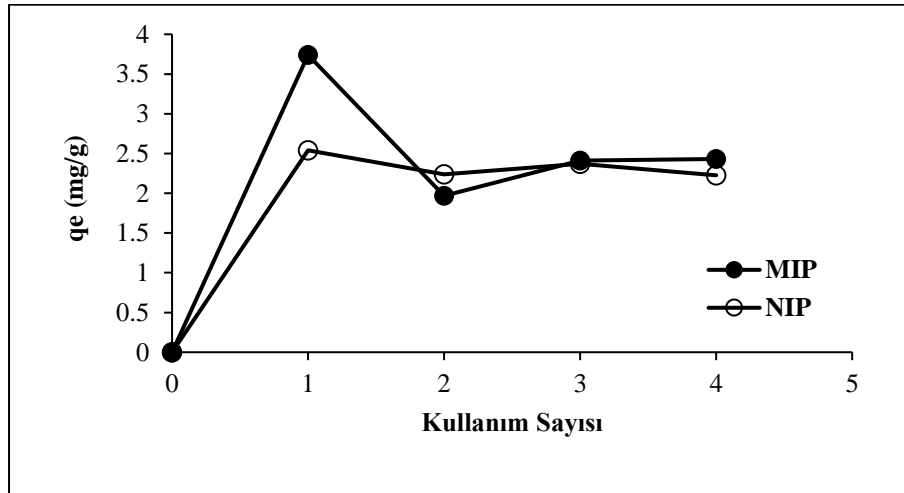
Wang ve ark., sıcaklığa duyarlı sığır serum albumini tanımaya yönelik hazırladıkları hidrojellerin seçicilik faktörlerini, sığır hemoglobin, ovalbumin, lizozim ve sitokrom c proteinleri kullanarak hesaplamışlardır. Deney sonucunda

BSA damgalı hidrojinin IF değerinin diğer proteinler için düşük çıktığı gözlemlenmiştir [18].

Zhong ve ark. 2015, bir manyetit birleştiren halloysit nanotüp kullanarak N-izopropil akrilamid ve metakrilik asit monomerleri ile çapraz bağlayıcı olarak bis akrilamis kullanarak manyetit polimer hazırlamışlardır. Hazırladıkları polimer ile moleküler damgalama teknolojisini kullanarak BSA'nın seçimli ayırımına yönelik çalışmalar yapmışlardır. BSA'nın seçimli ayırımına yönelik lizozim, ovalbumin ve sığır pankreasından tripsini karşılaştırma amacıyla adsorpsiyon deneyinde kullanmışlardır. Deney sonucunda IF değerleri hesaplanarak karşılaştırma proteinlerinin BSA'ya kıyasla daha düşük IF değerine sahip olduğu grlmştir. Böylece adsorpsiyon kapasitesinin polimerde oluşan şekil hafızasına, proteinlerin pI değerine bağlı olarak elektrostatik çekim kuvvetlerine, kovalent olmayan bağlanmalara, hidrojen bağlarına ve hidrofobik etkileşimlere bağlı olduğu grlmştir [21].

#### 4.10. Tekrar Kullanılabilirlik

Hidrojellerin kullanım kapasitelerini tespit etmek amacıyla aynı hidrojeller kullanılarak dört kez adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması yapıldı. Hidrojellerin ikinci kullanımda kapasitelerinin düştüğü, dört kullanım sonunda dengeye ulaşarak kullanım kapasitelerinin değişmediği görüldü (şekil 4.15).



**şekil 4.15.** MIP ve NIP hidrojellerinin tekrar kullanılabilirlik grafiği (Koşullar: Oda sıcaklığında, 0,01 g hidrojel, 2,5 mg/mL  $\beta$ -Glukozidaz enzim zeltisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda))

Wang ve ark. 2012, sıcaklığa duyarlı sığır serum albumini tanımaya yönelik hazırladıkları hidrojenlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemiştir. BSA adsorpsiyon-desorpsiyon prosedürleri aynı hidrojenlerle 6 kez tekrarlanmıştır. Her adsorpsiyon aşamasından sonra, MIP ve NIP yoğun olarak NaCl (1,0 mol/L) ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları sonucunda hidrojenlerin adsorpsiyon kapasitelerini % 85 gibi bir değerde koruduğu gözlemlenmiştir [18].

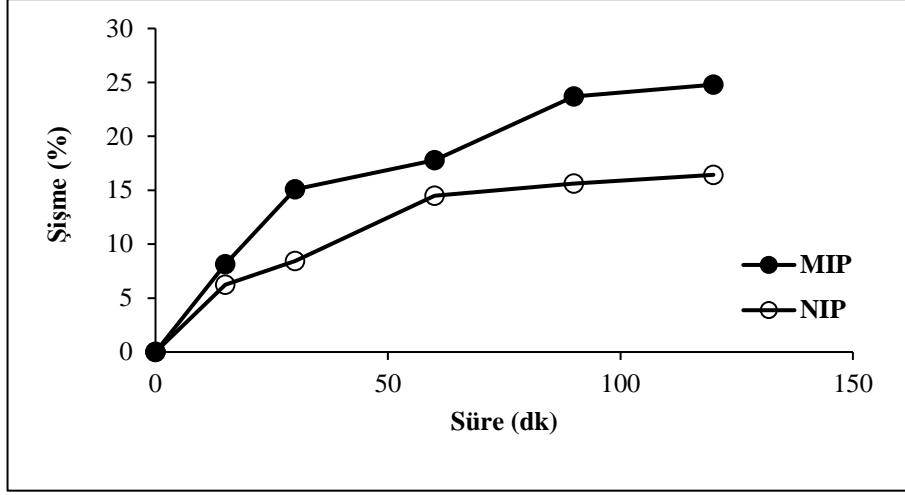
Bhattacharyya ve ark., sodyum karboksimetil selulozun sulu çözeltisinde akrilamid, hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerleri ve çapraz bağlayıcı olarak N, N'-metilen bisakrilamidi kullanarak yarı geçirgen ağ yapılı (IPN) hidrojel ve akrilamid HEMA kopolimerizasyonunda hidrojel hazırlamışlardır. Hazırladıkları hidrojenlerin tekrar kullanılabilirliğini test etmek amacıyla desorpsiyon çalışması yapmışlar ve pH 3'te maksimum (% 98.7'ye kadar) desorpsiyonu sağlamışlardır. Tekrar kullanılabilirlik için adsorpsiyon/desorpsiyon deneylerini 5 kez tekrarlamışlar ve hidrojenlerin kapasitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir [23].

#### **4.11. Şişme Testi**

Hidrojel olarak tanımlanan ağ yapılı, çapraz bağlı polimerik ve kopolimerik sistemlerin çok iyi su tutma yeteneklerinin olduğu bilinmektedir. Hidrojenlerin denge su içerikleri; ağ yapının, çapraz bağlanma oranının, hidrofilitesinin ve fonksiyonel grupların iyonlaşma derecelerinin bir fonksiyonudur ve şişme kapasitelerini etkiler[6].

MIP ve NIP hidrojenlerin şişme oranı, kuru hidrojel ile farklı zaman aralıklarında sulu ortamda bekletilen ıslak hidrojenlerin ağırlığının kaydedilmesi ile belirlendi.

MIP ve NIP hidrojenlerin zamana bağımlı şişme grafiği Şekil 4.16'da görülmektedir. Her iki hidrojenin şişme oranının yaklaşık 90 dakika sonunda dengeye geldiği ve belirlenen süre sonunda MIP ve NIP için maksimum şişmenin % 24,79 ve % 16,43 oranında olduğu görüldü.



**Şekil 4.16.** MIP ve NIP hidrojenlerin farklı zaman aralıklarındaki şişme oranı(Koşullar: Oda sıcaklığında, 0,01 g hidrojel, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda)

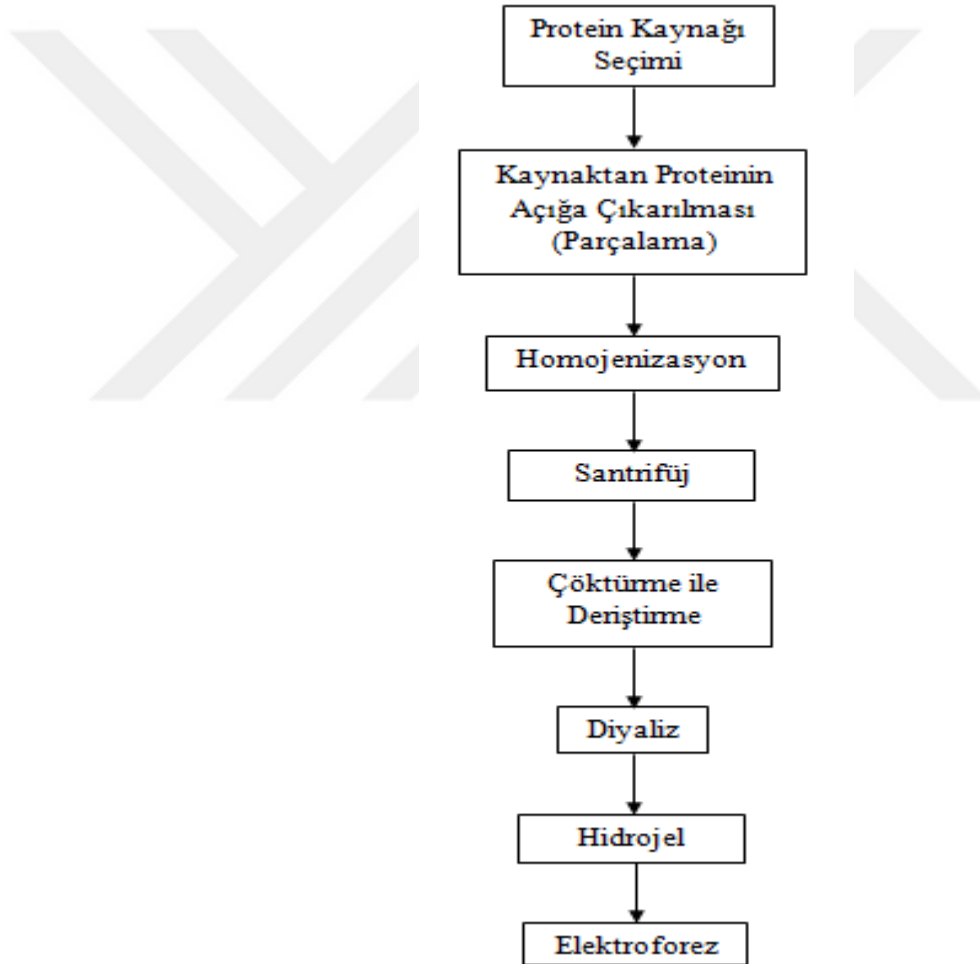
Bal ve ark., akrilat esaslı hidrojel ve kriyojenlerin şişme davranışlarını incelemişlerdir. Hidrojenin 48 saat sonundaki denge şişme değeri (adsorpsiyon kapasitesi), 75 g H<sub>2</sub>O/g jel iken, kriyojenin denge şişme değeri ise 38 g H<sub>2</sub>O/g jel bulunmuştur. Beklenildiği gibi, akrilat esaslı kriyojenlerin daha sıkı yapısından dolayı, kriyojenler hidrojenlerden %50 daha az oranda su absorplamıştır [24].

Bhattacharyya ve ark., sodyum karboksimetil selulozun sulu çözeltisinde akrilamid, hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerleri ve çapraz bağlayıcı olarak N, N'-metilen bisakrilamidi kullanarak yarı geçirgen ağ yapılı (IPN) hidrojel ve akrilamid HEMA kopolimerizasyonunda hidrojel hazırlamışlardır. Hazırladıkları hidrojenleri tekstil boyalarının (bazik fuksin ve metil violet) adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Şişme testi için kuru hidrojenler 30 °C'de 48 saat boyunca pH 7'de su ile muamele edilmiştir. 48 saat sonunda dengeye ulaşarak IPN hidrojenlerin kopolimerlerden daha yüksek denge şişme %'sine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak karboksimetil selulozun hidrofilikliği artırarak daha fazla su adsorplayabildiği düşünülmüştür [23].

#### 4.12. $\beta$ -glukozidazın Kısmi Saflaştırılması

Protein saflaştırmanın amacı saf protein elde etmek değil daha sonraki çalışmalar için kullanılabilir bir protein preparatı hazırlamaktır [25]. Saflaştırılan proteinler; biyoteknolojik alanda, endüstriyel alanda, analitik veya tedavi edici amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir.

Proje kapsamında hazırlanan  $\beta$ -glukozidaz damgalı hidrojel, bademden  $\beta$ -glukozidaz enziminin seçimli olarak ayrılması için afinite materyali olarak kullanıldı.  $\beta$ -Glukozidazın kısmi saflaştırılmasına yönelik olarak uygulanan saflaştırma basamakları şekil 4.17' da verilmiştir:



**Şekil 4.17.**  $\beta$ -Glukozidazın kısmi saflaştırılmasına yönelik uygulanan saflaştırma basamakları

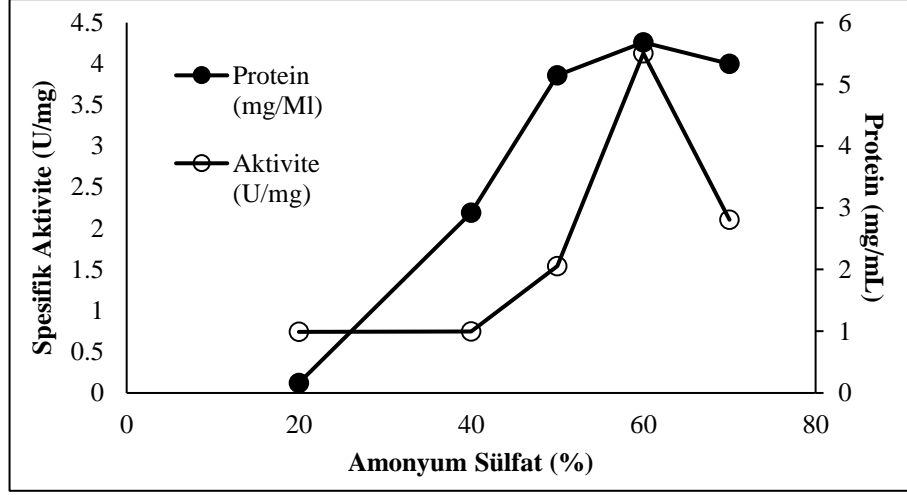
#### 4.12.1. Bademlerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme

##### Bulguları

Bademlerin -20 °C'ye soğutulmuş aseton ile homojenizasyonu, asetonun uçurulması ve tampon ile çözülmesiyle elde edilen ham ekstraktta  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi ve protein miktarı belirlendi (Tablo 4.6, Şekil 4.18). Aseton ekstraksiyonu sonrası elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 50 mL sitrik asit (50 mM, pH:5) tamponunda çözüldü.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi yapıldığında ise en yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivitesinin %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeltide olduğu belirlendi. Tablo 4.6'deki bademden  $\beta$ -glukozidaz enziminin izolasyonunda uygulanan farklı oranlarda amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları tablosunda gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çökeleğin en yüksek spesifik aktivitesi 5,502 U/mg ve protein miktarı 4,26 mg/mL olarak belirlendi.

**Tablo 4.6.** Bademden  $\beta$ -Glukozidaz enziminin izolasyonunda uygulanan farklı oranlarda amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Amonyum Sülfat Çöktürme Oranı (%)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
20	0,572	0,12	0,9899
40	1,296	2,19	0,9968
50	8,99	3,86	2,056
60	28,172	4,26	5,502
70	23,17	4	2,808



**Şekil 4.18.** Bademden  $\beta$ -glukozidaz enziminin izolasyonunda uygulanan farklı oranlarda amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen aktivite ve protein miktarı grafiği

Ergöçen'in  $\beta$ -glukozidaz enziminin kayısı (*Prunus Armeniaca*) çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışması kapsamında yaptığı amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda en yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivitesinin %50'lik amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen çökeltide olduğunu ve 13,6 U/mL olarak belirlemiştir [2].

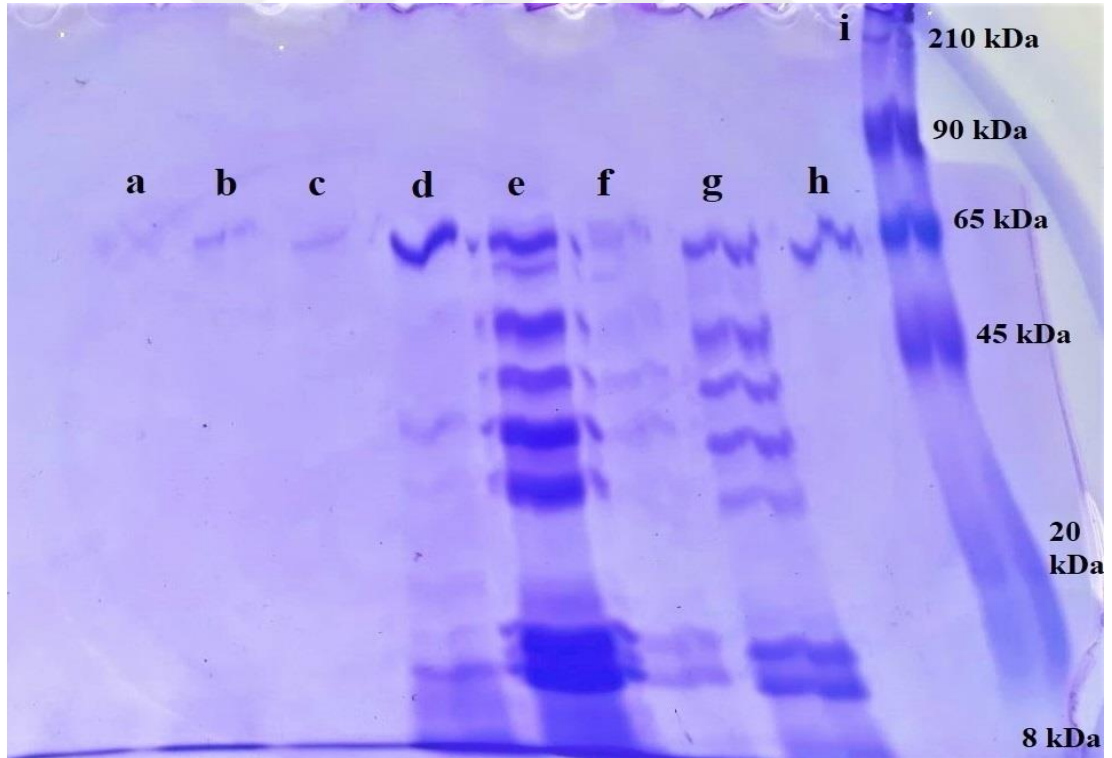
Acar, mandalina (*Citrus reticula*) meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin nanopartiküllere immobilizasyonu ve meyve suyu aroma artırma etkisi çalışmasında enzimin saflaştırmasına yönelik yaptığı amonyum sülfat çöktürmesi aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük ( $\approx 5,77$  g) ancak enzim aktivitesinin yüksek ( $\approx 360,29$  EU) olduğu aralığı referans olarak çalışmalarında kullanmak için %40-80 amonyum sülfat tuz çöktürmesi aralığını uygun görmüştür [26].

Ekmekci, Malatya kayısı (*Prunus Armeniaca* L.) çekirdeğinden  $\beta$ -glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında saflaştırmaya yönelik yaptığı amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi aşamasında protein miktarının (8,224 mg/mL) düşük, enzim aktivitesinin (77,307 U/mL) yüksek olduğu aralığı % 20-60'lık tuz konsantrasyonu aralığı olarak tespit etmiştir [4].



#### 4.13. SDS-PAGE Yöntemi

$\beta$ -Glukozidaz enziminin bademden izolasyonunda uygulanan saflaştırma adımlarında enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 3.2.11.'de anlatıldığı biçimde SDS-PAGE uygulaması yapıldı. Protein bantları içeren jelin görüntüsü Şekil 4.19'da görülmektedir.  $\beta$ -Glukozidaz enzimi molekül kütlesi 130 kDa olan iki alt birimden oluşmuş bir homodimer enzimidir. SDS-PAGE görüntülerinde (Şekil 4.19)  $\beta$ -glukozidaz enziminin molekül büyüklüğü yaklaşık 65 kDa olarak bulundu (h). MIP ve NIP hidrojel üzerine diyaliz sonrası elde edilen badem örneği uygulandı (e). MIP hidrojele bağlanmayan protein profili (d) kuyucuğunda görülmektedir. Hidrojellerde tutunan proteinin desorpsiyonu 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ile yapıldı. NIP hidrojelinde desorpsiyon sonrasında protein profilinde (b)  $\beta$ -glukozidaza ait protein varlığı görülmektedir. Proje kapsamında hazırlanan  $\beta$ -glukozidaz damgalı hidrojel, seçimli olarak bademden  $\beta$ -glukozidazın ayrılmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.



**Şekil 4.19.** SDS-PAGE analizinin sonuçları a) NIP'in desorpsiyon sıvısı, b) MIP'in desorpsiyon sıvısı, c) MIP'in geri bağlama sonrası üst sıvısı (10 kat seyreltme), d) MIP'in geri bağlama sonrası üst sıvısı, e) Diyaliz sonrası sıvısı, f) Aseton çöktürmesi (5 kat seyreltme), g) Aseton çöktürmesi, h) Saf  $\beta$ -glukozidaz enzimi i) Standart protein marker (Colorbust elektroforez marker 8-210 kDa)

Shi ve ark., sığır kanından hemoglobini tanımaya yönelik sol-jel metodu ile manyetit moleküler damgalı polimer sentezlemişlerdir. SDS-PAGE analizi sonucunda MIP'lerin sığır hemoglobinin spesifik olarak ayırımında uygulanabilirliğinin sonucuna ulaşmışlardır [27].

Li ve ark., N-izopropilakrilamid, akrilik asit, akrilamid, N-[3- (Dimetilamino) propil] metakrilamid ve çapraz bağlayıcı olarak metilen bisakrilamid kullanarak termo-duyarlı lizozim damgalı nanojeller hazırlamışlardır. MIP nanojellerinin seçiciliği SDS-PAGE ile nitel olarak analiz edilmiştir. Karışık protein karışımı SDS-PAGE'e uygulanmış ve analiz sonucunda görünen bantlara göre lizozim damgalı MIP nanojellerin kalıp proteinine yüksek seçicilik gösterdiği gözlemlenmiştir [28].



## 5. SONUÇ

Bu çalışmada,  $\beta$ -glukozidaz damgalı hidrojelin hazırlanması için kolay ve basit bir yöntem sunulmaktadır. İlk olarak  $\beta$ -glukozidaz enziminin seçimli ayırımına yönelik en uygun hidrojelin AA-MBA ile hazırlanan hidrojel olduğuna karar verildi. Geri bağlama çalışmalarının optimizasyonu amacıyla çeşitli parametreler incelendiğinde, adsorbatın sıcaklık, temas süresi, pH ve konsantrasyonlarının, toplam adsorpsiyon sürecini düzenlediği ortaya çıkmıştır. Optimum geri bağlama oda sıcaklığında (25 °C), pH 7,0 ve 120 dakikalık temas süresinde gerçekleşti. Damgalı hidrojellerde bulunan yüksek afineteye sahip bağlanma bölgeleri sayesinde kalıp molekül daha az dirençle hidrojele bağlanmıştır. Spesifik bağlanma bölgesi bulunmayan NIP'lerin kapasitesi MIP'lere göre daha düşük çıkmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi, sırasıyla MIP ve NIP için 3,74 ve 2,54 mg/g oldu.  $\Delta G$  değerleri, incelenen sıcaklık aralığında pozitif ve sürecin kendiliğinden olmadığını ortaya çıkarır. Adsorpsiyon sürecinin termodinamik parametreleri, enzim adsorpsiyonunun sıcaklık değişikliklerine göre nasıl değişebileceğini tahmin etmede yardımcı olur. Bu çalışmada, pozitif  $\Delta G$  değeri, 298'de MIP ve NIP için sırasıyla 2404 j mol<sup>-1</sup> ve 3597 j mol<sup>-1</sup> olarak hesaplandı.  $\Delta H$  (-52029 j mol<sup>-1</sup> ve -18615 j mol<sup>-1</sup>) 'ın negatif değeri, enzim adsorpsiyon işleminin hidrojeller için ekzotermik olduğunu gösterdi. Hidrojel üzerine enzim adsorpsiyonu için izoterm modelleri incelendi ve en yüksek korelasyon katsayılarının Freundlich izoterm modeli ile görülerek MIP ve NIP için sırasıyla 0,879 ve 0,835 olarak bulundu ve bu adsorpsiyonun heterojen olarak gerçekleştiğini açıklamaktadır. Ayrıca, Freundlich modelinde yer alan n değerinin >1'den olması uygun adsorpsiyon koşullarını temsil eder.  $R_L$  değerlerinin 0-1 aralığında olduğu Tablo 4.2'de gösterildiği gibi bulundu. Bu sonuca göre  $\beta$ -glukozidazın hidrojel üzerine adsorpsiyon süreci uygundur. Hidrojellerin teorik kapasite değeri, yalancı ikinci dereceden model kinetiğinin durumunda deneysel kapasite değerine çok yakındı. Yalancı ikinci dereceden model, verileri en iyi şekilde açıkladı.

Yüksek lisans çalışmasının deneysel sonuçları özet şeklinde Tablo 5.1'de belirtildi.

**Tablo 5.1.** MIP ve NIP hidrojeller ile yapılan geri bağlama çalışmalarının sonuçları

	<b>MIP</b>	<b>NIP</b>
<b>Seçilen Fonksiyonel Monomer</b>	AA	AA
<b>Optimum Temas Süresi</b>	120 dk	120 dk
<b>Optimum Sıcaklık</b>	25 °C	25 °C
<b>Optimum pH</b>	7,0	7,0
<b>Deneysel Kapasite</b>	3,74 mg/g	2,54 mg/g
<b>İzoterm Modeli</b>	Freundlich İzotermi $R^2=0,879$	Freundlich İzotermi $R^2=0,835$
<b>Kinetik Modeli</b>	Yalancı 2. Mertebe Modeli $q_e= 4,36$ mg/g	Yalancı 2. Mertebe Modeli $q_e= 2,94$ mg/g
<b><math>\Delta G</math> (J/mol)</b>	2404	3597
<b><math>\Delta H</math> (J/mol)</b>	-52029	-18615
<b><math>\Delta S</math> (J/mol K)</b>	-183	-74
<b>% Şişme</b>	24,79	16,43
<b>Tekrar Kullanılabilirlik</b>	4 kez	4 kez

\*Çalışmalar, hazırlanan her hidrojel için 3'er paralel ile 2 kere tekrarlanarak Tablo 5.1'de belirtilen sonuçlar elde edildi.

## KAYNAKLAR

- [1] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical Journal* 1991 Dec 1;280 ( Pt 2):309-16.
- [2] Ergöçen Gözde.  $\beta$ -glukozidaz enziminin kayısı (*Prunus Armeniaca*) çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana, 2013, 45. (Yüksek Lisans Tezi).
- [3] Çelik Akile.  $\beta$ -glukozidaz enziminin farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu ve farklı çay örnekleri üzerine aroma artırıcı özelliklerinin incelenmesi. Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Manisa, 2015, 78. (Yüksek Lisans Tezi).
- [4] Ekmekçi Zeki. Malatya kayısı (*Prunus Armeniaca L.*) çekirdeğinden beta-glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 2016, 64. (Yüksek Lisans Tezi).
- [5] Hasgül Banu. Karragenan Katkılı yeni polimer/kil kompozit hidrojellerinin sentezi, karakterizasyonu ve potansiyel soğurum kapasitelerinin araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2013, 125. (Yüksek Lisans Tezi).
- [6] Üzüm Ömer Barış, Kundakçı Semiha, Armağan Armağan, Karadağ Erdener. kimyasal çapraz bağlanmış AAm/AMPS kopolimerlerinde şişme karakterizasyonu. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, 2005.
- [7] Hazer Orhan. Yeni şelat yapıcı reçine sentezleri ve analitik uygulamaları. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kayseri, 2008, 112. (Doktora Tezi).
- [8] Sop Elif Suna. Doku genişletme amaçlı hidrojel sentezi, karakterizasyonu ve şişme kinetiği. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2013, 110. (Yüksek Lisans Tezi).
- [9] Çakmak Hüsniye. fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin sentezi ve karakterizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 2013, 67. (Yüksek Lisans Tezi).
- [10] Çorman Mehmet Emin. Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve lizozim saflaştırılmasında kullanılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2010, 75. (Yüksek Lisans Tezi).
- [11] Sevindik Yunus. Aspartamın yapay reseptörlere dayalı moleküler baskılı polimerleri ve moleküler modellenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ, 2017, 40. (Yüksek Lisans Tezi).
- [12] Gündürü Ufuk. Batı Karadeniz ve Trakya’ da yayılış gösteren *mus L.*, 1758 (Mammalia: Rodentia) cinsinin allozim varyasyonları. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2008, 59. (Yüksek Lisans Tezi).
- [13] Telefoncu Azmi. Protein saflaştırılması ve karakterizasyonu. Azmi Telefoncu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, Aydın, Türkiye, 1997, 278.
- [14] Daştan D. S., Zonus N., Yalçın İ., Daştan T. Bazı meşe ve gül türlerinin galli ve galsiz bireylerindeki, total protein içeriğinin farklı yöntemler kullanılarak araştırılması. *Fen Bilimleri Dergisi*. 2012, Cilt 33, No. 1.
- [15] Pan J., Xue X., Wang J., Xie H., Wua Z. Recognition property and preparation of staphylococcus aureus protein A-imprinted polyacrylamide polymers by inverse-phase suspension and bulk polymerization. *Polymer*. 2009, 50, 2365-2372.

- [16] EL-Sharif H. F., Phan Q. T., Reddy S. M., 2014. Enhanced selectivity of hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs) following buffer conditioning. *Analytica Chimica Acta* 809 (2014) 155– 161.
- [17] Adrus N., Ulbricht M. Molecularly imprinted stimuli-responsive hydrogels for protein recognition. *Polymer*. 2012, 53 (2012) 4359e4366.
- [18] Wang Y., Ran D., Jie X., Nie C. Bovine serum albumin recognition via thermosensitive molecular imprinted macroporous hydrogels prepared at two different temperatures. *Analytica Chimica Acta*. 2012, 723 (2012) 45– 53.
- [19] Luo A., Xie B. Research on the lysozyme imprinted polymers. 2nd International Conference on Machinery, Materials Engineering, Chemical Engineering and Biotechnology (MMECEB 2015) Atlantis Press. 2016.
- [20] Gupta S., Kumar N., Narayanan N. Application of magnetic molecularly imprinted polymers for extraction of imidacloprid from eggplant and honey. *Food Chemistry*, 2018, 255 (2018) 81–88.
- [21] Zhong S., Zhu X., Li H., Zhou H. Fabrication and evaluation of protein imprinted polymer based on magnetic halloysite nanotubes.
- [22] Zhao K., Lin B., Cui W., Feng L., Chen T., Wei J. Preparation and adsorption of bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide hydrogel membrane grafted on non-woven polypropylene. *Talanta* 121(2014)256–262.
- [23] Bhattacharyya R., Ray S. K., Kinetic and equilibrium modeling for adsorption of textile dyes in aqueous solutions by carboxymethyl cellulose/poly(acrylamide-co-hydroxyethyl methacrylate) semi-interpenetrating network hydrogel. *Polymer Engineering and Science*-2013. DOI 10.1002/pen.23501.
- [24] Bal A., Özkahraman B., Gök M. K., Acar I., Sodyum akrilat esaslı hidrojel ve kriyojellerin şişme, adsorpsiyon ve mekanik özelliklerinin incelenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(7), 258-265, 2014.
- [25] Telefoncu Azmi. Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Azmi Telefoncu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, Aydın, Türkiye, 1997, 278.
- [26] Acar Mesut. Mandalina (*Citrus reticula*) Meyvesinden saflaştırılan beta-glukozidaz enziminin nanopartiküllere immobilizasyonu ve meyve suyu aroma artırma etkisi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 2013, 109. (Yüksek Lisans Tezi).
- [27] Shi L., Tang Y., Hao Y., He G., Gao R., Tang X. Selective adsorption of protein by a high-efficiency Cu<sup>2+</sup>-cooperated magnetic imprinted nanomaterial. *Journal of Separation Science*, 2016, 39, 2876–2883.
- [28] Li B., Pan G., Guo Q., Cao C., Yang H. The Royal Society of Chemistry 2013, 9, 3840–3850.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mervecan SEVİLDİK

Doğum Yeri ve Yılı : Şanlıurfa, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : m-sevildik@hotmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Manisa Lisesi, 2011

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2018

### Mesleki Deneyim

Componenta Dökümcülük Tic. ve San. A.Ş. .2013 (20 Gün Staj)

Petkim Petrokimya Holding A.Ş. 2014 (20 Gün Staj)

Manisa Celal Bayar Üniversitesi 2015-2016

### Kongre

Sevildik M., Dinçer A., Aydemir T. Removal of Azo Dyes From Aqueous Solutions By Using Eggshell Membrane. 10th Aegean Analytical Chemistry Days. Poster Sunumu, 2016.

Sevildik M., Dinçer A., Aydemir T. Beta Glucosidase Recognition By Imprinted Polyacrylamide Hydrogels. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018). Poster Sunumu, 2018.

## **Proje**

Dinçer A., Aydemir T., Sevildik M., Dinsever Ş. Enzimlerin Seçimli Ayrımına Yönelik Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Bilimsel Araştırma Projesi (Proje No: 2017-003).

