

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

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

**$\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİNİN TANINMASINA YÖNELİK MOLEKÜLER  
DAMGALI HİDROJEL HAZIRLANMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Şeyda DİNSEVER**

**Danışman  
Doç. Dr. Ayşe DİNÇER**



**MANİSA-2018**

**Şeyda  
DİNSEVER**

***α*-AMİLAZ ENZİMİNİN TANINMASINA YÖNELİK MOLEKÜLER DAMGALI  
HİDROJEL HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**2018**

## TEZ ONAYI

**Şeyda DİNSEVER** tarafından hazırlanan " **$\alpha$ -Amilaz Enziminin Tanınmasına Yönelik Moleküler Damgalı Hidrojel Hazırlanması Ve Karakterizasyonu**"adlı tez çalışması 06/12/2018 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.

**Şeyda DİNSEVER**



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ .....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. $\alpha$ -Amilaz.....	4
2.1.1. $\alpha$ -Amilaz Enzimin Sınıflandırılması:.....	4
2.1.1.1. Endoamilazlar: .....	4
2.1.1.2. Ekzoamilazlar:.....	4
2.1.1.3. Dallanma Kırıcı Enzimler: .....	4
2.1.1.4. Transferazlar: .....	4
2.2. $\alpha$ -Amilazın Kullanım Alanları.....	6
2.3. Hidrojeller .....	8
2.3.1. Hidrojellerde Suyun Konumu.....	9
2.3.2. Hidrojellerin Şişme Özellikleri.....	10
2.3.2.1. Hidrojellerin Şişmesine Etki Eden Faktörler .....	11
2.3.3. Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	12
2.3.3.1. Homopolimer Hidrojeller .....	14
2.3.3.2. Kopolimer Hidrojeller .....	14
2.3.3.3. Çoklu Polimer Hidrojeller .....	14
2.3.3.4. IPN veya İç İç Geçmiş Polimerik Ağ Yapılı Hidrojeller .....	14
2.3.3.5 Fiziksel Yapılarına Göre Hidrojeller.....	15
2.3.3.6. İçerdikleri Yan Gruplara Göre .....	15
2.3.3.7. Çapraz Bağlanma Durumlarına Göre .....	15
2.3.4. Hidrojellerin Uygulama Alanları .....	16
2.4. Moleküler Damgalama Teknolojisi.....	19
2.4.1. Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri:.....	20
2.4.1.1. Kalıp molekül .....	20
2.4.1.2. Fonksiyonel monomerler.....	20
2.4.1.3. Çapraz bağlayıcılar.....	21
2.4.1.4. Çözücüler .....	21

2.4.1.5. Başlatıcılar.....	22
2.4.2. Moleküler Damgalama Yöntemleri .....	22
2.4.2.1. Kovalent Damgalama .....	22
2.4.2.2. Kovalent Olmayan Damgalama .....	23
2.4.3. Moleküler Damgalama Teknolojisinin Uygulama Alanları .....	23
2.5. Elektroforez .....	24
2.5.1. Elektroforezin Kullanım Alanları .....	26
2.5.2. Elektroforez Yöntemleri .....	26
2.5.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	28
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	28
3.2. Yöntem .....	29
3.2.1. Protein Tayini .....	29
3.2.2. Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	29
3.2.3. $\alpha$ -Amilazın Aktivite Tayini.....	30
3.2.4. $\alpha$ -Amilaz Damgalı Hidrojellerin Hazırlanması .....	31
3.2.5. $\alpha$ -Amilazın Hidrojelden Uzaklaştırılması.....	33
3.2.6. Protein Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu.....	34
3.2.7. MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine $\alpha$ -Amilazın Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu .....	35
3.2.7.1. Sürenin Etkisi .....	35
3.2.7.2. pH Etkisi.....	35
3.2.7.3. Sıcaklık Etkisi .....	36
3.2.7.4. $\alpha$ -Amilaz Konsantrasyonunun Etkisi .....	36
3.2.8. Adsorpsiyon İzotermi .....	36
3.2.9. Adsorpsiyon Termodinamiği .....	36
3.2.10. Adsorpsiyon Kinetiği.....	37
3.2.11. Tekrar Kullanılabilirlik Testi .....	37
3.2.12. $\alpha$ -Amilaz Damgalı Hidrojelin Seçimliliğinin İncelenmesi .....	37
3.2.13. Şişme Karakterizasyonu .....	38
3.2.14. Spektroskopik Karakterizasyon .....	39
3.2.14.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri... ..	39
3.2.14.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri .....	39
3.2.15. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Farklı Pankreatik Enzimleri İçeren Tabletten Seçimli Olarak Ayrılması .....	39

3.2.15.1. Örnek Hazırlığı.....	39
3.2.15.2. SDS-PAGE Elektroforez Uygulaması .....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	44
4.1. Protein ve Aktivite Standart Grafikleri .....	44
4.1.1. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması .....	44
4.1.2. Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	44
4.2. Farklı Monomerlerle Hazırlanan Hidrojellerin $\alpha$ -Amilaz Geri Bağlama Etkinliğinin Karşılaştırılması .....	45
4.3. Spektroskopik Karakterizasyon.....	47
4.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Analizi.....	47
4.3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri.....	49
4.4. Akrilamid Monomeri ile Hazırlanan MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine $\alpha$ -Amilazın Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu .....	50
4.4.1. Sürenin Etkisi.....	50
4.4.2. pH Etkisi .....	52
4.4.3. Sıcaklık Etkisi .....	53
4.4.4. $\alpha$ -Amilaz Konsantrasyonunun Etkisi .....	54
4.5. Adsorpsiyon İzotermi.....	55
4.5.1. Langmuir İzotermi .....	55
4.5.2. Freundlich İzotermi.....	57
4.6. Adsorpsiyon Kinetiği .....	60
4.6.1. Yalancı Birinci Mertebe Kinetiği .....	60
4.6.2. Yalancı İkinci Mertebe Kinetiği .....	61
4.6.3. Parçacık İçi Difüzyon Etkisi .....	63
4.7. Adsorpsiyon Termodinamiği.....	64
4.8. Tekrar Kullanılabilirlik Testi.....	66
4.9. $\alpha$ -Amilaz Damgalı Hidrojelin Seçimliliğinin Belirlenmesi.....	67
4.10. Şişme Karakterizasyonu .....	68
4.11. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Farklı Pankreatik Enzimler İçeren Tabletten Seçimli Olarak Ayrılması .....	70
4.12. SDS-PAGE Jel Elektroforezi ile $\alpha$ -Amilaz Bağlama Spesifikliğinin Belirlenmesi.....	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	74
KAYNAKLAR .....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	83

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Abs</b>	Absorbans
<b>AAm</b>	Akrilamid
<b>APS</b>	Amonyum Persülfat
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albumin
<b>DNS</b>	Dinitrosalisilikasit
<b>FT-IR</b>	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
<b>HEMA</b>	Hidroksietilmetakrilat
<b>MAA</b>	Metakrilik Asit
<b>MBA</b>	Metilenbisakrilamid
<b>MET</b>	$\beta$ -Merkaptoetanol
<b>MMA</b>	Metilmetakrilat
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>MIP</b>	Moleküler Damgalı Hidrojel
<b>MIT</b>	Moleküler Damgalama Teknolojisi
<b>NIP</b>	Damgalı Olmayan Hidrojel
<b>nm</b>	Nanometre
<b>SDS PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy (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-Vinilpiridin



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. $\alpha$ -Amilazın nişasta üzerindeki etkisi.....	5
Şekil 2.2. $\alpha$ -Amilazın yapısı.....	6
Şekil 2.3. <i>Aspergillus oryzae</i> .....	7
Şekil 2.4. Su absorplayan hidrojelin yapısal gösterimi .....	9
Şekil 2.5. Bir hidrojelin şematik olarak gösterilişi.....	11
Şekil 2.6. Moleküler damgalamanın şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.7. Moleküler damgalı polimerlere ait uygulama alanları.....	23
Şekil 2.8. Elektroforezde yüklü taneciklerin hareket edişi .....	24
Şekil 2.9. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) cihazının şematik gösterimi.....	25
Şekil 3.1. a) Yaş hidrojel görüntüsü b) Kurutulmuş hidrojel görüntüsü.....	34
Şekil 3.2. Hidrojellerin sıvı içerisindeki şişme görüntüsü .....	38
Şekil 3.3. Poliakrilamid jel üzerinde protein örneklerinin yürütülmesi .....	43
Şekil 4.1. Protein standart grafiği.....	44
Şekil 4.2. Maltoz standart grafiği .....	45
Şekil 4.3. Yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve yıkanmış NIP hidrojellere ait FTIR görüntüleri.....	48
Şekil 4.4. NIP hidrojelin a) 500x büyütme b) 10000x büyütme görüntüleri .....	50
Şekil 4.5. a) Yıkanmamış MIP hidrojelin 30000x büyütme b) Yıkanmış MIP hidrojelin 30000x büyütme görüntüsü .....	50
Şekil 4.6. $\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojeller üzerine adsorpsiyonu için optimum sürenin belirlenmesi .....	51
Şekil 4.7. $\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlanmasında pH'nın etkisi .....	52
Şekil 4.8. Amilazın MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlanmasında sıcaklığın etkisi .....	54
Şekil 4.9. $\alpha$ -Amilaz konsantrasyonunun etkisi.....	55
Şekil 4.10. MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir izoterm grafiği .....	56
Şekil 4.11. MIP ve NIP hidrojeller için Freundlich izoterm grafiği .....	58
Şekil 4.12. MIP ve NIP hidrojeller için yalancı birinci mertebe kinetik modeli .....	61
Şekil 4.13. MIP ve NIP hidrojeller için yalancı ikinci mertebe kinetik modeli.....	62
Şekil 4.14. MIP ve NIP hidrojeller için parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modeli. 63	
Şekil 4.15. $\ln K_c$ ye karşı $1/T$ grafiği .....	65
Şekil 4.16. MIP ve NIP hidrojeller için tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	67
Şekil 4.17. MIP ve NIP hidrojellerin şişme kapasitelerinin zamanla değişimi.....	69
Şekil 4.18. SDS-PAGE jel elektroforezi .....	72

## TABLO DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1. Hidrojellerin uygulama alanları.....	18
Tablo 3.1. Maltoz standart eğrisinin oluşturulması.....	30
Tablo 3.2. $\alpha$ -Amilaz aktivite tayini yöntemi .....	31
Tablo 3.3. Hidrojel hazırlanması işlem adımları.....	32
Tablo 3.4. Farklı kompozisyonlarda hidrojellerin hazırlanması .....	33
Tablo 4.1. Beş farklı monomerle hazırlanan hidrojellerin $\alpha$ -amilaz geri bağlama etkinliğinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.2. $R_L$ değerleri ve izoterm tipleri .....	57
Tablo 4.3. MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izotermine ait parametreler.....	59
Tablo 4.4. Kinetik parametreler ve korelasyon katsayıları .....	64
Tablo 4.5. MIP ve NIP hidrojeller için termodinamik parametreler.....	66
Tablo 4.6. MIP ve NIP hidrojeller için farklı proteinlerle seçimliliğinin karşılaştırılması .....	68
Tablo 4.7. Geri bağlama ve desorpsiyon çalışması sonrası yapılan protein ve aktivite tayinleri sonuçları.....	71

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşturulması süresince, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, tüm samimiyeti ve ilgisi ile desteğini esirgemeyen her zaman yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Ayşe DİNÇER' e teşekkür ederim.

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

Çalışmalarım sırasında destek olan Prof. Dr. Tülin AYDEMİR'e Arş. Gör. Ahmet ESER'e ve çalışma ortamında manevi desteklerini benden esirgemeyen çalışma ortamını paylaştığım arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bana en büyük desteği veren, amaçlarım doğrultusunda ilerlemem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan maddi ve manevi her şekilde destek olan ve her zaman yanımda olan annem, babam ve abime sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Şeyda DİNSEVER  
Manisa, 2018

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### **$\alpha$ -Amilaz Enziminin Tanınmasına Yönelik Moleküler Damgalı Hidrojel Hazırlanması Ve Karakterizasyonu**

**Şeyda DİNSEVER**

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

**Danışman: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER**

Moleküler damgalama teknolojisi (MIT), üzerinde hedef molekülü spesifik olarak tanıyan bağlanma bölgeleri içeren polimerlerin sentezlenmesine dayanmaktadır. Protein gibi biyomakromolekül damgalı polimerlerin sentezinde, makromolekül yapılarının büyük olması ve stabiliteilerinin düşük olmasından dolayı zorluklar yaşanabilmektedir. Tez çalışmasının ilk adımında farklı monomerler ile  $\alpha$ -amilazın kalıp molekül olarak kullanıldığı damgalı hidrojeller hazırlandı. Bu amaçla akrilamid (AAm), hidroksietilmetakrilat (HEMA), 1-vinilimidazol (1-VI), 4-vinilpiridin (4-VP) ve metakrilik asit (MAA) gibi farklı fonksiyonlara sahip monomerler denendi. Hazırlanan hidrojellerin damgalama etkinlikleri yapılan geri bağlama çalışmaları sonrasında hesaplandı. En yüksek  $\alpha$ -amilaz bağlama kapasitesine sahip olan hidrojel AAm monomeri ile hazırlanan hidrojel olarak belirlendi ve çalışmalara bu hidrojel üzerinden devam edildi. Hidrojellerin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile yapıldı. Maksimum  $\alpha$ -amilaz bağlama kapasitesine 120 dk geri bağlama süresinde, 25°C sıcaklıkta, pH 7,0 ortamında ve 2,5 mg/mL enzim konsantrasyonunda ulaşıldı. Farklı proteinler ( $\beta$ -glukozidaz, lipaz ve albumin) ile de damgalı hidrojelin seçimliliği test edildi ve damgalı hidrojelin  $\alpha$ -amilazı damgalama etkinliği diğer proteinlere göre daha yüksek olduğu görüldü. Optimize edilen koşullarda adsorpsiyon izotermi ve adsorpsiyon kinetikleri çalışıldı. Çapraz bağlı hidrojellerin şişme özelliklerini araştırmak amacıyla şişme testi uygulandı. Akrilamid monomeri ile hazırlanan  $\alpha$ -amilaz damgalı hidrojel farklı pankreatik enzimleri içeren tabletten  $\alpha$ -amilazın seçimli olarak ayrılmasında kullanıldı. Aktivite ve protein tayinleri yapılarak MIP ve NIP hidrojellerden geri kazanılan  $\alpha$ -amilaz aktivitesi belirlendi. Örneklerin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemiyle yapıldı.

**Anahtar Kelimeler:**  $\alpha$ -Amilaz, hidrojel, moleküler damgalama, afinite

**2018, 83 sayfa**

## ABSTRACT

M.Sc.Thesis

### Preparation and Characterization of Molecularly Imprinted Hydrogel for Recognition of $\alpha$ -Amylase Enzyme

Şeyda DİNSEVER

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe DİNÇER

Molecular imprinting technology (MIT) is based on the synthesis of polymers containing binding sites that specifically recognize the target molecule. In the synthesis of biomacromolecule imprinted polymers, such as proteins, there may be difficulties due to their large macromolecule structure and instability. In the first step of the thesis study, imprinted hydrogels were prepared with different monomers and  $\alpha$ -amylase was used as a template molecule. For this purpose, monomers with different functions such as acrylamide (AAm), hydroxyethylmethacrylate (HEMA), 1-vinylimidazole (1-VI), 4-vinylpyridine (4-VP) and methacrylic acid (MAA) were tested. Imprinting efficiencies of the prepared hydrogels were calculated after rebinding studies. The highest  $\alpha$ -amylase binding capacity was obtained with the hydrogel prepared with AAm monomer and further studies were performed with this hydrogel. Structural analysis of the imprinted hydrogel was done with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM) analysis. Maximum  $\alpha$ -amylase binding capacity was obtained at rebinding time of 120 minutes, when the temperature was 25 °C, pH of the medium was 7.0 and at 2.5 mg/mL enzyme concentration. The selectivity of the imprinted hydrogel was tested with different proteins ( $\beta$ -glucosidase, lipase and albumin) and  $\alpha$ -amylase imprinting efficiency of the hydrogel was found to be higher than other proteins. Under optimized conditions, adsorption isotherms and adsorption kinetics were studied. Swelling tests were done in order to investigate swelling properties of crosslinked hydrogels. The  $\alpha$ -amylase imprinted hydrogel prepared with the acrylamide monomer was used for the selective separation of the  $\alpha$ -amylase from the tablet containing different pancreatic enzymes. Activity and protein assays were performed to determine the  $\alpha$ -amylase activity recovered from MIP and NIP hydrogels. Purity control of the samples were done with SDS-PAGE.

**Keywords:**  $\alpha$ -Amylase, hydrogel, molecular imprinting, affinity

**2018, 83 pages**

## 1.GİRİŞ

Amilazlar, ilk defa 1811'de, Kirschhoff'un nişasta parçalayıcı enzimleri keşfetmesi ile kullanılmaya başlanmışlardır.  $\alpha$ -Amilazlar (E.C.3.2.1.1), endo-amilazlar sınıfından olan monomerik yapıdaki enzimlerdir. Nişastayı amiloz ve amilopektin olarak parçalayarak, glikojen ve buna bağlı oligo ve polisakkaridlerdeki  $\alpha$ -D(1,4)-glukozidik bağlarının hidrolizlerini maltodekstrin, malto-oligosakkaridler ve glukoz üretmek için katalizlemekle görevlidirler [1, 2].

$\alpha$ -Amilazlar  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlara etki ettiklerinden dolayı  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağ ile karşılaştıklarında bu bağa etki etmeden geçerler. Amilazlar; dünyadaki enzim üretiminin yaklaşık olarak % 30 luk kısmını oluşturarak farklı bir çok endüstri çeşitleri olan gıda, şeker, damıtma, fermentasyon, tekstil, kağıt, deterjan, eczacılık gibi uygulama alanlarına sahiptirler [3, 4].

Birçok mantar türünden  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi gerçekleştirilmektedir. Ticari olarak en çok kullanılanı *Aspergillus oryzae* adı verilen  $\alpha$ -amilazdır. Bu enzim nişastanın  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağlarını hidrolizleyen ancak  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlarına etki etmeyen endohidrolaz grubundan olan filamentli bir mantardır. Gıda enzimlerinin üretilmesi için güvenli bir organizma olarak nitelenen özellikte olan bu enzim etki ettiği substrat olan nişastayı parçalayarak % 60 oranında maltoza dönüştürebilmektedir [5, 6].

Hidrojeller, su sever polimerler olarak bilinmeleri nedeniyle "hidrofil polimerler" olarak da adlandırılırlar. Hidrofilik ( $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  $-\text{OH}$  ve  $-\text{NH}_2$ ) gruplara sahip olup suda çözünmeyen yani suyun büyük bir kısmını yapıları içerisine alabilen yapıda olan polimerlerdir [7]. Bu gruplardan dolayı polimerin hacminin ve kütesinin artmasıyla şişmeye başlarlar. Çapraz bağlı bu polimerdeki su sever hidrofil grupların fazla sayıda olması ile daha fazla şişme meydana gelmektedir [8]. Bu polimerler hem doğal (kitosan, alginat) hem de sentetik polimerlerden (akrilamid (AAM), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), metakrilik asit (MAA), 1-vinilimidazol (1-VI), 4-vinilpiridin (4-VP)) sentezlenebilmektedirler [9].

Polimerik hidrojeller çeşitli monomerlerle hazırlanabilmelerine rağmen, en yaygın kullanılan yöntem, hidrofilik yapıdaki iyonik olmayan akrilamid (AAm) gibi monomerlerin N-N-metilenbisakrilamid (MBA) gibi çapraz bağlayıcı ile serbest radikal olarak çapraz bağlanma kopolimerizasyonu oluşturmaya dayanmaktadır [10].

Moleküler damgalama teknolojisi (MIT), bir molekülün diğer molekülle tamamlayıcı bir yapı oluşturacak şekilde bağlanarak üzerinde hedef molekül tanıma özelliğine sahip merkezler içeren polimerlerin sentezlenmesi işlemine dayanmaktadır [11]. Moleküler damgalama işleminde polimerlerin sentezinin gerçekleşebilmesi için damgalamanın gerçekleşeceği hedef molekül olarak bilinen kalıp molekül ve çevresindeki fonksiyonel monomer ile birlikte çapraz bağlayıcının üç boyutlu etkileşimlerinin yer alması gerekmektedir. Moleküler damgalı polimerler (MIP) sentetik reseptörlerdir ve bu polimerlerin sentezlerinin basit olması, moleküler tanıma elverişli olmaları ve ucuz olmaları büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca MIP'ler fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı (yüksek sıcaklık, basınç ve pH) oldukça dayanıklıdır [12]. Moleküler damgalama kavramı ilk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [13].

Bu tez çalışmasında, kalıp molekül  $\alpha$ -amilaz kullanılarak protein damgalı poliakrilamid hidrojel (MIP) elde edildi. Bu amaçla akrilamid (AAm), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), 1-vinilimidazol (1-VI), 4-vinilpiridin (4-VP), metakrilik asit (MAA), gibi farklı fonksiyonlara sahip monomerler ile farklı kompozisyonlarda hidrojeller hazırlandı. Çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilenbisakrilamid (MBA), amonyum persülfat (APS) reaksiyon başlatıcı ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) reaksiyon hızlandırıcı olarak kullanıldı. Bu hidrojellerin damgalama faktörleri hesaplandı ve en yüksek damgalama faktörüne sahip hidrojel kompozisyonu üzerinden çalışmalara devam edildi. Geri bağlama çalışmalarının optimizasyonunda temas süresi, pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonunun etkisi incelendi. Yapılan optimizasyon çalışmalarına göre bağlanmanın gerçekleşme süresi 120 dk, optimum pH 7,0 olarak bulundu. Sıcaklık ve konsantrasyon etkilerine geçildiğinde tutunmanın gerçekleştiği en yüksek sıcaklık değeri 25°C ve maksimum kapasite ise 2,5 mg/mL olarak belirlendi.

Optimize koşullarda adsorpsiyon izotermeleri ve adsorpsiyon kinetikleri çalışıldı. MIP ve NIP hidrojellerin karakterizasyonu, FT-IR ve SEM analizi ile yapıldı.

Çapraz bağlı kopolimerlerin şişme özelliklerini araştırmak amacıyla hidrojellerin denge şişme değerleri ve şişme kapasitelerinin zamanla değişimi elde edilen verilerle hesaplandı. MIP ve NIP hidrojellerin seçiciliği farklı proteinlerle lipaz, BSA, ̢-glukozidaz ile test edildi. Aynı hidrojeller kullanılarak kaç kez geri bağlama çalışması yapılabileceği tekrar kullanılabilirlik testi ile belirlendi. Tez çalışmasının son kısmında ̑-amilaza spesifik hazırlanan moleküler damgalı hidrojel biyolojik ortamdan seçimli olarak ̑-amilazın ayrılmasında kullanılabilirliği için denendi.





## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. $\alpha$ -Amilaz

Amilazlar ( $\alpha$ -1,4-D-glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1.) nişastadaki  $\alpha$ -1,4 bağlarını hidrolize edebilen endüstriyel olarak önem taşıyan enzimlerdir [14, 15]. Endo-amilaz sınıfından olan  $\alpha$ -amilazlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi doğada yaygın olarak bulunabilen aynı zamanda bir salgı enzimi olarak görev yapan monomerik yapıdaki enzimlerdir. Endoamilazların bazı özelliklerinden sıcaklık stabiliteleri, hidrolitik özellikleri, optimum aktivite gösterdikleri pH aralıkları ve moleküler ağırlıkları gibi özelliklerinin farklı olduğu anlaşılmıştır [15, 16]. Amilazlar endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanma kırıcı enzimler ve transferazlar olarak olarak dört grupta incelenmektedirler.

#### 2.1.1. $\alpha$ -Amilaz Enzimin Sınıflandırılması:

**2.1.1.1. Endoamilazlar:** Nişasta ve glikojen gibi yapıların içerisindeki  $\alpha$ -1,4 bağlarının hidrolizlenmesinin ardından  $\alpha$ -anomerik ürünler oluştururlar. Bu yüzden  $\alpha$ -amilazlar bir endoamilaz grubu olarak bilinmektedirler [17].

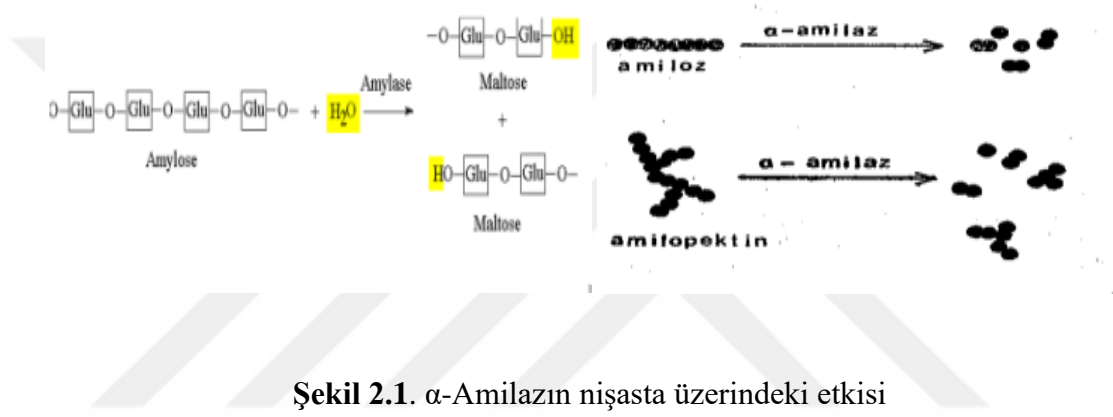
**2.1.1.2. Ekzoamilazlar:** Nişasta içerisindeki  $\alpha$ -1,4 ya da  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını hidrolizleyerek hidroliz ardından  $\alpha$ - veya  $\beta$ -anomerik formdaki ürünleri oluştururlar.

**2.1.1.3. Dallanma Kırıcı Enzimler:** Sadece  $\alpha$ -1,6 bağlarını hidrolizleyen uzun zincirli ürünler oluşturabilen enzimlerdir.

**2.1.1.4. Transferazlar:** Donör molekülün  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağını parçalayarak bir kısmını yeni bir glikozidik bağın formasyonu ile glikozidik alıcıya aktarmak için kullanırlar [18].

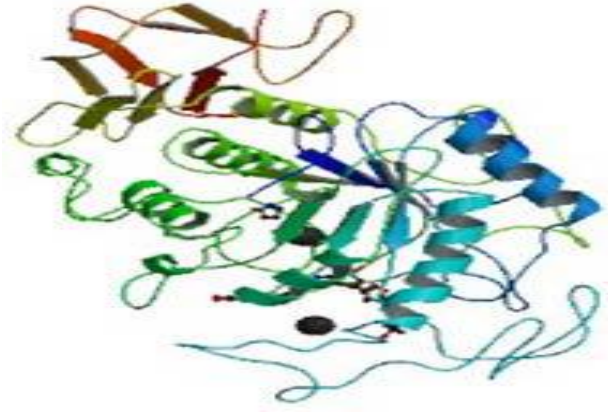
Endoamilazlara *Aspergillus oryzae*, *B.subtilis*, pankreas ve malttan elde edilenler örnek olarak gösterilebilir [19].

Özellikle nişasta gibi doğal kaynaklı hammaddelerin parçalanmasında kullanılmaktadırlar. Nişasta; büyük bir çoğunluğu soğuk suda çözünmeyen granüller yapıda olup, organizmalar için enerji kaynağı olan karbonhidratı depolayan ve bitki hücrelerinde de bulunan bir depo materyalidir. Nişasta yüksek moleküler ağırlıklı d-glikoz polimeri olup amiloz ve amilopektin olarak iki polimer karışımından oluşur. Amiloz; glikoz birimlerinin arasında  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan ve dallanmamış doğrusal bir yapıda olarak bulunur. Amilopektin ise glikoz birimleri arasında  $\alpha$ -1,4 bağlarının yanında dallanmış polimer özelliği gösteren ve dallanmış bölgelerde  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağları bulunduran yapısıdır [19, 20].



**Şekil 2.1.**  $\alpha$ -Amilazın nişasta üzerindeki etkisi

Pek çok mantar türünden  $\alpha$ -amilaz üretilmekte olup en çok incelenmekte ve genellikle ticari alanda kullanılmakta olanı *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazdır. Bu enzim nişastanın  $\alpha$ -(1,4) bağlarını hidrolize eden ancak  $\alpha$ -(1,6) bağlarına etki etmeyen bir endohidrolaz ailesi enzimidir. Bu enzim ile nişasta maltoza % 60 oranında dönüştürülebilmektedir [5].  $\alpha$ -Amilaz enzimi 55200 Da civarında molekül ağırlığına sahiptir ve sıcaklık etkisine karşı büyük ölçüde dayanıklılık sağlayabilen yapıdadır. Bu enzimin termostabilite özelliği, artan iyonik etkileşimleri, azalan yüzey alanı ve iç kısımdaki artan paketlenme sağlayıcı etkileşimleri dikkate değer özelliklerindedir [21, 22].



**Şekil 2.2.**  $\alpha$ -Amilazın yapısı [4]

$\alpha$ -Amilaz molekülü yapısında 478 aminoasit fazlalığı (9 adet triptofan) ve 294 adet su molekülü barındırmaktadır [21]. Bunun yanında  $\alpha$ -amilazın  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Cl}^-$  gibi iyonları da bağlama özelliği bulunmaktadır.  $\alpha$ -Amilaz, bünyesinde en az bir  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu barındıran metaloenzimdir. Bu durumda  $\alpha$ -amilazların aktif halde olabilmeleri için mutlaka kalsiyum iyonuna ihtiyaçları vardır [22, 23].

## 2.2. $\alpha$ -Amilazın Kullanım Alanları

$\alpha$ -Amilazın ekmek yapımı, glukoz veya fruktoz şurup üretimi, bira, nişasta, tekstil, kâğıt endüstrisi, deterjan endüstrisi gibi pek çok endüstriyel alanda kullanımı söz konusudur.

- Biracılıkta, sakkarifikasyon öncesi nişasta içeren hammaddelerin sıvılaştırılmasında,
- Nişasta endüstrisinde, özellikle dekstroz ve yüksek fruktoz içeren şurupların üretimi sırasında,
- Kâğıt endüstrisinde, yapıştırma ve kaplama maddelerinin yapımında,
- Tekstil endüstrisinde, ürünün, yapım esnasında karışmış olan nişastadan tamamen arıtılmasında,
- Şekercilikte; karışımlardaki viskozitelerinin düşürülmesinde ve fazla şekerin geri kazanılmasında,
- Ekmek endüstrisinde; hamurdaki fermente olabilir şekerlerin oluşumunun hızlandırılmasında ve ekmeğin bayatlama hızının azaltılmasında,

- Fermantasyon endüstrisinde; nişasta kaynaklı besi ortamı oluşturulmasında kullanılır [24].

### *Aspergillus oryzae*;

*Aspergillus oryzae*, proteaz, amilaz, selüloz da dahil olmak üzere büyük miktarlarda hidrolitik enzimler salgılayan bir mantar türüdür [25, 26]. Bu önemli üretimde endüstriyel enzimler, heterojen proteinler ve organik asitler yaygın olarak uygulanmaktadır. *Aspergillus oryzae* güvenli bir türdür ve genel olarak fermente gıdalar üretiminde kullanılmıştır [26]. *Aspergillus oryzae*, soya sosu, soya peyniri baharatı ve sirke üretimi de dahil olmak üzere geleneksel Japon fermantasyon endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan bir mantar türüdür [27]. Tüm dünyada geleneksel fermente gıda ürünlerinin üretiminde yaygın olarak yer almaktadır. Bununla birlikte *Aspergillus oryzae* kullanımı çeşitli modern biyoteknolojik uygulamalarda da devam etmektedir. Bu mantarın yeteneği büyük miktarlarda protein salgılamaktır [28]. Evrimsel olarak *A. oryzae*'ye daha yakın olan *Aspergillus niger* ile olan ilişki, proteaz üretiminde yüksek performansa sahiptir. Fermentasyonda daha iyi ürünler elde etmek için genellikle *A. oryzae* ile karıştırılır [29].



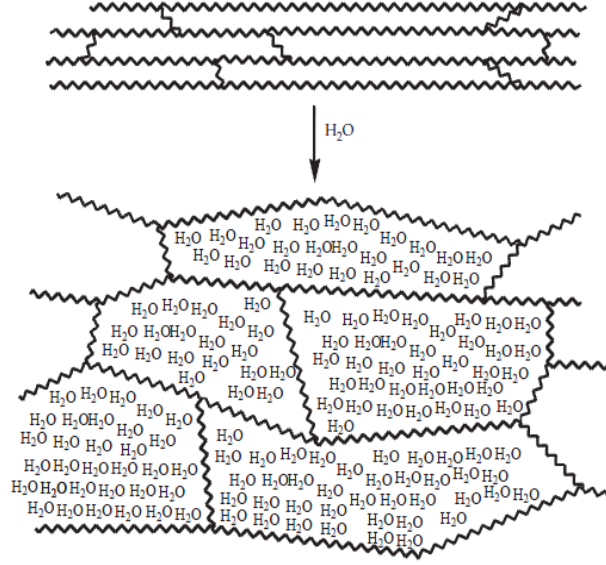
**Şekil 2.3.** *Aspergillus oryzae*

### 2.3. Hidrojeller

Hidrojeller denilen su içeren jeller olarakta bilinen bu jeller suda çözünme özelliği göstermeden şişebilen, üç boyutlu, çapraz bağlı, yapılarında su sever grupları barındıran ve ağ yapıları olan polimerler olarak adlandırılırlar. Hidrojeller yapılarında su sever grupları bulundurmaları sebebiyle hidrofil polimerler olarak da bilinmektedirler [30]. Yumuşaklıkları, su tutma kapasiteleri ve akıllı yapıda olmaları hidrojellerin benzersiz yapılar olduğunu göstermektedir [31].

1954 yılında Wichterle ve Lim tarafından ilk sentetik hidrojel belirlenmiş olup bununla birlikte hidrojel teknolojilerini bir çok alanda yaygın olarak uygulanabilir hale getirmiştir [32].

Hidrojeller; ana zincirleri arasında bulunan hidrojen bağları veya Van der Waals etkileşimleri gibi kuvvetlerden dolayı suda çözünmezdirler ve hidrojele hidrofilik karakter sağlayan  $-SO_3H$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-OH$  ve  $-NH_2$  gibi fonksiyonel grupları bulundururlar [33]. Bu şekilde hidrojeller çözünmeden ağırlıklarının yaklaşık % 20'sinden daha fazla oranda çözücüyü bünyelerine alarak suyu absorplayabilme yeteneklerinden dolayı suda belli bir denge hacmine kadar şişerler ancak orijinal şekillerini korumaya devam ederler [33, 34]. Hidrojeller şişmiş durumdayken yüksek oranda yumuşak ve kırılğan yapıya sahip olduklarından mekanik dayanımları da düşük olmaktadır [35]. Su almış bir hidrojinin yapısı Şekil 2.4 'teki gibi oluşmaktadır.



**Şekil 2.4.** Su absorplayan hidrojinin yapısal gösterimi [36]

Hidrojeller pH, sıcaklık, iyonik güç, çözücü bileşimi ve elektromanyetik radyasyon gibi dış çevrede meydana gelen değişimlerden etkilenecek şekilde şişme miktarlarında büyük değişimler meydana getirebilirler ve buna bağlı olarak “**şişme-büzüşme**” denilen davranışı gösterebilirler [36, 37]. Hidrojellerin, şişme oranı, mekanik dayanımı çapraz bağlanma yoğunluğuna bağlı olarak denetlenebilmektedir [38]. Çapraz bağlanmış hidrojeller; kendi içinde çözünmeyen ve hidrofilik fonksiyonel gruplar sayesinde büyük miktarda suyu emebilme özelliğine sahiptir [39]. Bunun yanında hidroksil grupları içeren çok sayıda çapraz bağlayıcı organik bileşikler çapraz bağ yoğunluklarını artırmak için kullanılırlar. Bu şekildeki tepkimelerde en çok kullanılan çapraz bağlayıcılar; N,N'-metilenbisakrilamid, etilen glikol dimetakrilat, 1,4 bütandiol dimetakrilat gibi bileşiklerdir [39].

### 2.3.1. Hidrojellerde Suyun Konumu

Bir jelin hidrojel olarak tanımlanabilmesi için yapısında polar grupların yanı sıra hidrofilik fonksiyonel gruplar olan  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$  ve  $-COOR$  gibi grupları bulundurması gerekir ve bu fonksiyonel gruplar su ile etkileşime geçerek hidrojen bağlarını oluştururlar [36, 40].

Hidrofilik fonksiyonel grupların fazla olması ile şişmenin miktarı arasında doğrudan bir ilişki olduğundan, şişmiş bir hidrojelde üç tür su bulunmaktadır [36, 40, 41].

- **Bağlanan su:** Hidrojin polar grupları ile hidrojen bağları oluşturan sudur.
- **Ara yüzey suyu:** Hidrojin hidrofob grubu çevresinde toplanan ve bağlı olmayan sudur.
- **Serbest ya da kütle su:** Hidrojin gözeneklerini dolduran ve hidrojelde etkileşme göstermeyen sudur. Bir bağ olmadığı sürece su molekülleri fiziksel olarak gözenek içerisinde yer almaktadır.

### 2.3.2. Hidrojellerin Şişme Özellikleri

Şişme, küçük molekül yapıları bir sıvının, hidrojin yapısında meydana gelen hızlı hacimsel değişimi ile birlikte yine hidrojel tarafından soğurulması süreci olarak bilinir. Küçük molekül bir sıvının hareketliliği çok yüksek ve bu yüzden büyük moleküller çözücü fazına geçerken zorlandıkları için çözünme göstermeyen hidrojel, içerisine fazla miktarda sıvı alarak şişme durumu gösterirler [42, 43].

Hidrojellerde şişme durumu sınırlı ya da sınırsız olabilmektedir. Sınırsız şişme; kendiliğinden çözeltiye dönüşebilen yani çözünme gerçekleştiren şişme durumudur. Bir hidrojin çözünmesinde görülen temel özellik karışan bileşen moleküllerinin büyüklük bakımından farklı boyutta olup bununla birlikte çok farklı hareketliliğe sahip olmasıdır [44, 45].

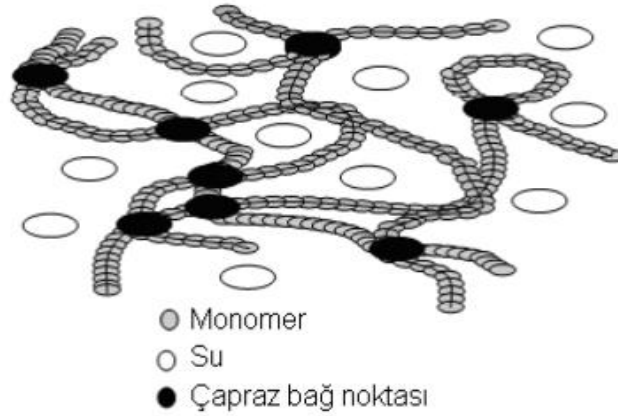
Sınırlı şişme küçük molekül sıvıların hidrojellerle etkileşmesi durumudur. Bu sıvıların hidrojeller tarafından tutulma aşaması sınırlanınca hidrojin kendiliğinden çözünmesi önlendiği gibi polimer zincirleri de birbirlerinden tam olarak ayrılma gösteremezler [44, 45].

### 2.3.2.1. Hidrojellerin Şişmesine Etki Eden Faktörler

Bir jelin şişmesine etki eden faktörler çeşitli yapılara bağlı olarak değişmektedir. Bunlar;

- Çapraz bağlanma derecesi
- Hidrojelin kimyasal yapısı,
- Hidrojelin geometrisi ve boyutu,
- Gözeneklilik,
- İyonik güç, şişme ortamının sıcaklık ve pH'ıdır [36].

Hidrojellerin şişme özelliğini etkileyen en önemli faktörlerden biri çapraz bağlanma oranıdır. Çapraz bağlanma oranının yüksek olması demek daha fazla çapraz bağlayıcının hidrojel yapısının içine girmesi demektir. Çapraz bağlanma oranı, çapraz bağlayıcının mol sayısının, polimerin tekrarlanan biriminin mol sayısına oranı olarak bilinir. Yüksek derecede çapraz bağlanmış haldeki hidrojeller daha sıkı bir yapıya sahip olduklarından daha az şişerler [34, 46].



Şekil 2.5. Bir hidrojelin şematik olarak gösterilişi [44]

Polimerin kimyasal yapısı da hidrojellerin şişme oranını etkileyen bir başka etkidir.

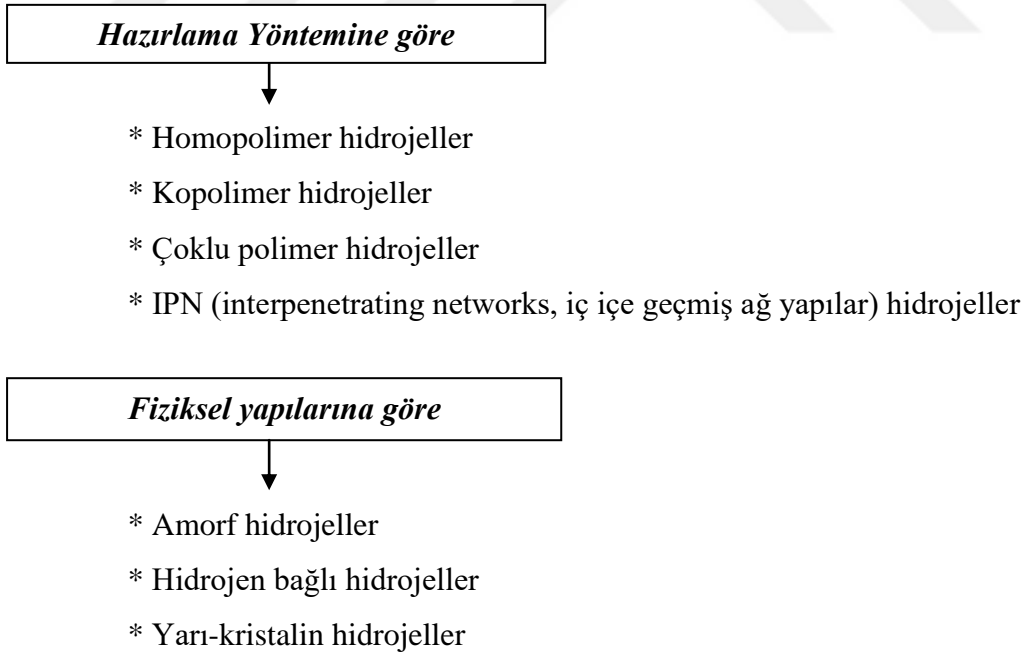


Hidrofilik grupları bulunduran hidrojel, hidrofobik grup bulunduran hidrojel ile karşılaştırıldıkları zaman daha yüksek derecede şişme gösterirler. Çünkü hidrofobik gruplar, suyun bulunduğu ortamlarda kendi içlerine kapanarak etkileşme göstermezler ve su moleküllerinin yapıya girmesine engel olurlar. Bu durum hidrojelün şişme özelliklerini etkiler [47, 48, 49].

Ortamın iyonik şiddeti ve pH'sındaki meydana gelen değişiklikler; iyonik şiddet ve pH'a duyarlı hidrojelün şişme özelliklerini etkiler. Sıcaklığa duyarlı hidrojel de şişme ortamında meydana gelebilecek sıcaklık değişimlerinden etkilenirler [49].

### 2.3.3. Hidrojelün Sınıflandırılması

Hidrojel, hazırlama yöntemlerine, fiziksel yapılarına, çapraz bağlanma durumlarına ve iyonik yüklerine (içerdikleri yan gruplar), su içeriklerine, kimyasal kararlılıkları gibi bazı kriterler göz önüne alınarak sınıflandırılabilirler [50]. Bu sınıflandırma şu şekilde açıklanabilir:



***Çapraz bağlanma durumlarına göre***



- \* Kimyasal çapraz bağlı hidrojel
- \* Fiziksel çapraz bağlı hidrojel

***İçerdikleri yan gruplara göre***



- \* Nötral (iyonik olmayan) hidrojel
- \* İyonik hidrojel ; - Anyonik hidrojel (negatif yüklü)
  - Katyonik hidrojel (pozitif yüklü)
  - Poliamfolitik 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

***Kaynaklarına göre***



- \* Doğal hidrojel
- \* Sentetik hidrojel

### ***Kimyasal kararlılıklarına göre***



- \* Biyolojik olarak bozunabilen hidrojel
- \* Biyolojik olarak bozunamayan hidrojel

#### **2.3.3.1. Homopolimer Hidrojeller**

Tek bir hidrofilik monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşan yapılardır. Bu yapılar monomerin yapısına ve polimerizasyon yöntemine bağlı olarak çapraz bağlı iskelet yapısında bulunabilirler [44, 51].

#### **2.3.3.2. Kopolimer Hidrojeller**

İki monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşurlar. Ancak monomerlerden birinin hidrofilik karakterde olması gerekir [52, 53].

#### **2.3.3.3. Çoklu Polimer Hidrojeller**

İki ya da daha fazla sayıdaki monomerlerin tepkimeleri ile oluşurlar. Hem pH'a hem de sıcaklığa karşı duyarlı olan p(N-izopropilakrilamid-akrilik asit-2-hidroksietil metakrilat) [p(NIPAAm-AA-HEMA)] örnek olarak verilebilir [53].

#### **2.3.3.4. IPN veya İç İç Geçmiş Polimerik Ağ Yapılı Hidrojeller**

Çapraz bağlanmış olan iki polimerik yapının fiziksel olarak birleşmesiyle meydana gelirler. Bu yapılardan en az biri diğer yapının varlığında meydana gelir veya çapraz bağlanır [54]. Eğer üç boyutlu yapıdaki polimer ağ diğer bir ağın içerisine geçerse “yarı-IPN” olarak isimlendirilir [55].

### 2.3.3.5. Fiziksel Yapılarına Göre Hidrojeller

- *Amorf Hidrojeller* : Makromolekül zincirleri gelişiğüzel yerleşmiştir.
- *Yarı-Kristalin Hidrojeller* : Yapı içerisinde makromolekül zincirlerinin düzenli olarak yerleştiğı kısımlar mevcuttur.
- *Hidrojen Bağlı Yapılar* : Hidrojen bağlarıyla 3 boyutlu yapıları meydana gelmiştir [56].

### 2.3.3.6. İçerdikleri Yan Gruplara Göre

- *Nötral Hidrojeller* : Bu hidrojeller, yapılarında yüklü gruplar bulundurmayan, iyonik olmayan homopolimerik veya kopolimerik nötr yani yüksüz hidrojellerdir. Bu hidrojellerin şişme ve büzüşme davranışları çevre sıcaklığındaki değışime bağılı olarak meydana gelir.
- *İyonik Hidrojeller* : Anyonik ya da katyonik gruplar bulunduran hidrojellerdir.
- *Amfolitik Hidrojeller* : Hem asidik hem de bazik grupları bir arada bulunduran hidrojellerdir [53, 57].

### 2.3.3.7. Çapraz Bağlanma Durumlarına Göre

- *Kimyasal Çapraz Bağlı Hidrojeller* :

Kimyasal bağlarla çapraz bağlanmanın olduğı ağılarda birleşim noktaları kalıcıdır ve konformasyonel değışimlerin sonucu olarak geri dönüşümsüz olduklarından yani tekrar çözünmediklerinden tersinmez olarak adlandırılırlar. Bu hidrojeller, sıcaklık, pH ya da çözücü bileşiminin değışmesi ile tekrar çözünmez durumdadırlar [32].

- *Fiziksel Çapraz Bağlı Hidrojeller* :

Fiziksel çapraz bağılı hidrojel sistemlerinde iyonik etkileşimler, kristallenme, kompleksleşme, hidrojen bağları ya da hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel etkileşimlerden kaynaklanan geçici birleşim noktaları oluşur.

Bu hidrojeller sıcaklık, pH ya da çözücü bileşimi gibi etkenlerin değişmesi ile homojen bir çözelti oluşturarak başlangıç koşullarına döndüklerinde yeniden jelleşme meydana getirirler. Bu nedenle tersinir jeller olarak adlandırılırlar [39].

#### 2.3.4. Hidrojellerin Uygulama Alanları

İnsan vücudu, hidrojelin yapısına benzerlik göstererek, fazla miktarda suyun ve biyomakromolekül yapıların birleşmesinden oluşurlar. Hidrojelin ve vücudun yüzey serbest enerjileri neredeyse aynıdır ve bu yüzden hidrojel ve hücre arasındaki etkileşimler daha az olmaktadır, bu şekilde yabancı cisim tepkimesinin meydana gelmesi önlenmektedir. Bu yüzden hidrojeller biyomalzeme olarak oldukça güvenilir olarak kullanılmaktadırlar [36, 38]. Hidrojellerin biyomalzeme olarak kullanımlarındaki avantajları şu şekilde verilebilir [58]:

- Hidrojeller suda çözünebilir maddeler için geçirgen yapıda olduklarından çeşitli atık monomerler, katalizörler, başlatıcılar ve diğer safsızlıklar yapıdan rahatlıkla çıkabilirler.
- Hidrojeller, vücut sıvılarına karşı az veya çok geçirgen yapıda olmasına rağmen besin ile oksijen gibi yararlı maddelerin geçmesini engellemezler.
- Hidrojeller yumuşak yapılardır. Hidrojel implant etrafında oluşan dokusu, tabaka ince ve dayanıklı olduğundan, kalınlaşma göstermezler.
- Hidrojellerin etrafındaki dokularla sürtünmesi daha azdır. Bu durum özellikle fazla miktarda su absorplayan hidrojeller için geçerli olmaktadır. Hidrojeller şişerek sadece hacimlerini arttırmazlar, ayrıca absorpladıkları su miktarından dolayı, plastikleştirici gibi davrandıklarından daha yumuşak olmaktadır.
- Şişmiş hidrojellerde bulunan suyun bir miktarı, polimer yapıdaki belli büyüklüğe sahip olan moleküller (özellikle ilaçlar) için difüzyon yolları sağlamaktadır.

Hidrojeller, biyomedikal alanda teşhis, tedavi ve implante edilir cihazlar (yapay deri, kimyasal sensörler (biyosensörler), kontakt lensler ve kontrollü ilaç taşıma sistemleri) olarak; çevre alanındaki ağır metallerin ve organik kirleticilerin çevrede tutulmasıyla atık suların temizlenmesinde süper emici polimerler olarak görev alırlar [59]. Ayrıca hidrojeller yüksek oranda su tutucu yapıda olmaları nedeni ile peçete ve çocuk bezi gibi temizlik malzemelerinin yapımında, yine gübrelerin ve tarım ilaçlarının kontrollü salım sistemlerinde kullanılmaktadırlar.

Hidrojellerin genel uygulama alanları şu şekildedir [32, 60]:

- Kontakt lensler, yapay organlar gibi malzemelerin yapımında,
- Kozmetik sektöründe,
- Kontrollü ilaç salım sistemlerinde,
- Tarımsal alanlarda,
- Gıda endüstrisinde katkı maddeleri olarak,
- Kimyasal sensör olarak (biyosensör),
- Doku mühendisliğinde doku iskelesi ve taşıyıcı yapı olarak.

**Tablo 2.1.** Hidrojellerin uygulama alanları

<i>Uygulama Alanı</i>	<i>Hidrojeller</i>
<b><i>Yara Örtüsü ;</i></b> Hidrojeller, esnek olmaları, dayanıklılıkları nedeniyle yanık tedavisinde kullanılabilir.	Polietilen glikol, Karboksimetil selüloz, Aljinat
<b><i>Doku Mühendisliğinde ;</i></b> Kemik doku iskelesi olarak kullanılabilir.	Polivinil alkol, Kollajen, Aljinat
<b><i>Kozmetik ve ilaç taşıma sistemlerinde ;</i></b> Hidrojellerin, biyouyumlulukları ve yüksek oranda su tutma kapasiteleri nedeniyle kullanılabilir.	Nişasta, Aljinat, Polivinil alkol, Akrilik asit, Metakrilik asit, Kitosan

Hidrojeller; endüstriyel açıdan oldukça önemi olan seyreltik haldeki sulu çözeltiler içerisinde büyük moleküllü yapıların ayrılmasında kullanılırlar. (Cussler ve ark., 1989) [61] şişmiş bir jelin suyu emerken, su içerisinde çözülmüş olan maddeleride dışarıda tutabildiğini ifade etmişlerdir. Bunun yanında hidrojeller moleküler ayırma işlemleri olarak, jel kromatografisi ve jel elektroforezinde görev almaktadırlar [62].

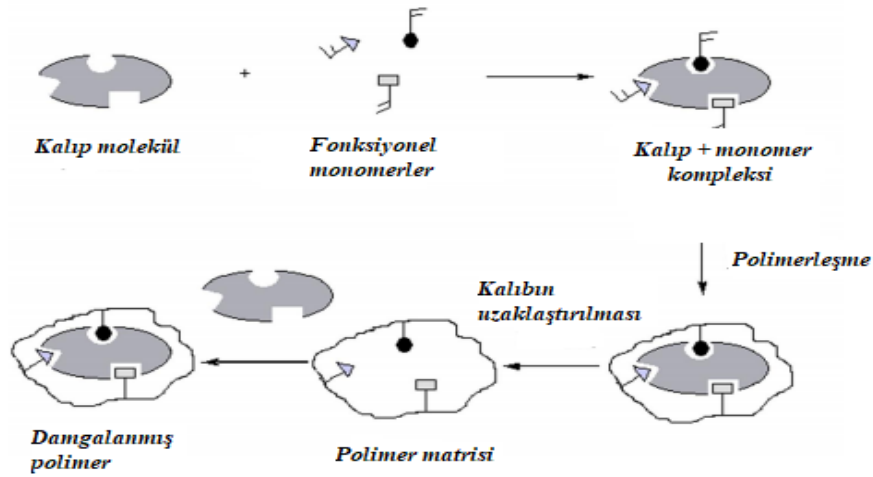
Hidrojellerin yaygın olarak kullanılan diğer bir uygulama alanı da yanık tedavisindeki kullanımınıdır. Hidrojellerin, esnek yapıya sahip olmaları ve dayanıklılıkları sebebiyle kullanım alanları artmaktadır. Oksijen ve su bazlı ilaçların geçişini sağlayan poliüretan membran destekli hidrojeller ise yapışkanlık hissi bırakmayan yanık sargıları olarak kullanılırlar [62].

Hidrojeller günümüzde doku mühendisliğinde kemik doku iskeleleri olarak, kimyasal sensörler (biyosensörler) ve ilaç salım sistemlerinde kullanılarak önemli role sahip olmuşlardır.

Aynı zamanda, proteinler ve DNA gibi hassas biyomakromoleküler yapıların enkapsülasyonu için oldukça güvenilir düzeydedirler [63].

#### 2.4. Moleküler Damgalama Teknolojisi

Moleküler damgalama teknolojisi, bir kalıp molekül dediğimiz hedef molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin kovalent olan ya da kovalent olmayan etkileşimler nedeniyle kompleks oluşturacak şekilde organize olması sonucunda kimyasal fonksiyona sahip materyallerin oluşturulmasına yönelik polimerlerin hazırlanmasına dayalı bir teknolojidir [64, 65]. Kısacası, moleküler olarak damgalanmış polimerler, kalıp molekülün çapraz bağlanan fonksiyonel monomerlerle polar olmayan uygun bir çözücü içerisinde karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır [66]. Moleküler damgalanmış polimerler sentezi ucuz, basit, kolay hazırlanabilme ve bir çok koşulda stabil olma gibi özelliklere sahip olduklarından tercih edilmektedirler [66]. Moleküler damgalama yöntemi ilk defa 1972 yılında Günter Wulff ve çalışma ekibi tarafından adlandırılarak fonksiyonel gruptaki seçici bağlanma bölgelerini oluşturabilmek amacıyla kullanılmıştır [67].



Şekil 2.6. Moleküler damgalamanın şematik gösterimi [66]



Moleküler damgalama yöntemi 3 adımda gerçekleşmektedir [68, 69].

- 1. Ön kompleksleşme:** Kalıp molekül ile polimerleşme gerçekleştirecek olan fonksiyonel monomerler arasında kompleksleşme meydana gelir.
- 2. Polimerizasyon:** Uygun çapraz bağlayıcının kullanılması ile kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşimin artırılması sağlanarak polimerleşme meydana gelir.
- 3. Kalıp molekülün uzaklaştırılması:** Polimerleşme sağlandıktan sonra kalıp molekül uzaklaştırılarak damgalanan polimer elde edilmiş olur. Bu polimer kalıp molekül için yüksek seçiciliğe sahiptir.

#### **2.4.1. Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri:**

##### **2.4.1.1. Kalıp molekül**

Moleküler damgalamada en önemli unsur fonksiyonel monomerlerle etkileşebilecek kalıp molekülün bulundurulmasıdır [70]. Bu kalıp molekülün polimerleşecek gruplara sahip olması, yüksek sıcaklıklara ve Uv ışınlarına karşı dayanıklı olması ve kararlı yapıya sahip olması istenen özellikler arasındadır. Kalıp molekülü, rahatlıkla uzaklaştırabilmek için genellikle ilaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotit bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar gibi küçük moleküller kalıp olarak kullanılabilir [71, 72].

##### **2.4.1.2. Fonksiyonel monomerler**

Hedef molekül ile damgalanmış polimerlerin damgalama bölgeleri arasında meydana gelen etkileşimlerden seçilecek olan monomerlerin fonksiyonel grupları sorumludur. Damgalama işleminde kalıp molekül ile monomer arasında gerçekleşen kompleksleşmenin kararlılığı fonksiyonel monomer seçimine bağlı olduğundan birden fazla monomer aynı anda kullanılacaksa bu monomerler aynı özellikteki kalıp molekül ile reaksiyona girmelidir [73].

Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip bazı fonksiyonel monomerlere örnek verecek olursak;

*Asidik monomerler:* Akrilik asit (AA), Metakrilik asit (MAA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA).

*Bazik Monomerler:* 4-vinilpiridin (4-VP), 2-vinilpiridin (2-VP), N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM).

*Nötral monomerler:* Akrilamid, 2-hidroksimetakrilat (HEMA), metilmetakrilat (MMA), stiren [74].

### 2.4.1.3. Çapraz bağlayıcılar

Seçicilik, damgalı polimerlerin sentezinde kullanılan çapraz bağlama maddesinin türü ve miktarından büyük ölçüde etkilenmektedir. Çapraz bağlayıcıların polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz) kontrolü, damgalanmış moleküllerin bağlanma bölümlerinin ve polimerin mekanik kararlılığını sağlamak en önemli 3 işlevidir [74]. Moleküler damgalama işlemlerinde polimerin mekanik dayanıklılığını ve kararlı olabildiğini sağlamak için çapraz bağlayıcı oranı tanıma alanlarının stabilitesini muhafaza edecek kadar yüksek olmalıdır. Genellikle % 80 in üzerinde çapraz bağ oranları olan polimerler için tercih edilmektedir [75].

Bu çapraz bağlayıcılar;

p-divinilbenzen (DVB), 1,3-diizopropenil benzen (DIP), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), tetrametildimetakrilat (TDMA), 1,4-fenilen diakrilamid, 1,4-diakrilol piperazin (DAP), N,N-metilenbisakrilamid, Pentaeritritoltetraakrilat (PETEA) gibi çapraz bağlayıcılar en çok tercih edilenler arasındadır [74].

### 2.4.1.4. Çözücüler

Çözücüler, polimerizasyon sırasında kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi bileşenlerin yanında polimerde gözeneklerin oluşmasını sağlayarak damgalanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında damgalamanın etkinliğini artırma gibi önemli bir alanda görev almaktadır [71].

MIP'lerin seçiciliği de bu gözeneklerin yapısına bağlı olarak değişir. Bu gözenekler, polimerin yapısındaki gözenek hacminin denetlenebilmesini sağlar. Çözücülerin bir diğer görevide tepkime ısısının polimerizasyon esnasında eşit olarak

dağıtımını sağlayabilmektir [76]. Genelde hedef molekülün yapısına ve çözünürlüğüne bakılarak çözücüler seçilmekte olup en çok seçilen çözücüler; asetonitril, kloroform, diklorometan, toluen, tetrahidrofuran gibi çözücülerdir.

#### **2.4.1.5. Başlatıcılar**

Farklı kimyasal özellik taşıyan birçok kimyasal başlatıcı, serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynağı olarak kullanılabilir. Bu başlatıcıların radikal formlarına dönüşebilme hızları ve şekilleri kimyasal yapılarının yanı sıra ısı, ışık veya kimyasal/elektrokimyasal etkilerle gerçekleşebilir [74]. Genellikle 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) ve 2,2'-azobis (izobütironitril) (AIBN) tercih edilmektedir.

#### **2.4.2. Moleküler Damgalama Yöntemleri**

Moleküler damgalama işlemi sırasında kalıp molekül ile monomerler arasında iki farklı (kovalent ve kovalent olmayan) damgalama meydana gelebilir [77].

##### **2.4.2.1. Kovalent Damgalama**

Kovalent damgalamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için en önemli adım kalıp molekülün monomerleri bağlayarak oluşturacağı kompleksleme sırasındaki kovalent bağın seçilmesidir [78].

Bu yöntemde kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki sentez oldukça kararlı ve stabil olarak gerçekleşirken bununla birlikte yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH gibi uygun polimerizasyon koşullarında polimerler sentezlenebilir. Ancak bağlanma kinetiği kovalent bağın oluşumu sebebiyle oldukça yavaş gerçekleşir. Schiff bazı, boronik asit esterleri, asetal, ketal, disülfid bağ oluşumu, koordinasyon bağları kullanılmakta olan kovalent bağ tiplerinden bazılarıdır [79].

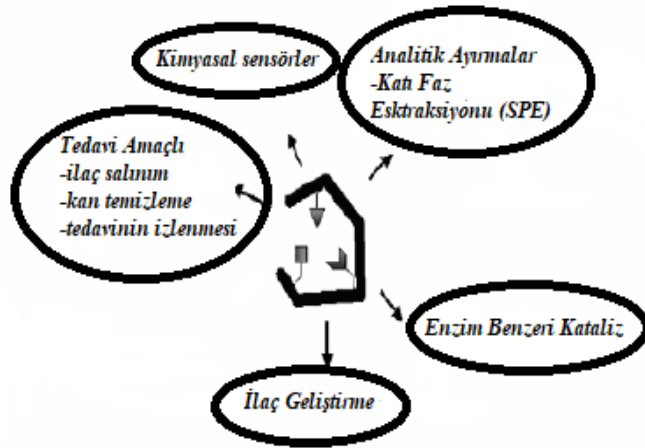
### 2.4.2.2. Kovalent Olmayan Damgalama

Kovalent olmayan damgalamada kalıp molekül ile monomerler kovalent olmayan etkileşimlerle birlikte bir araya gelmektedirler [77]. Bu etkileşimler hidrojen bağı, koordinasyon bağı oluşumu ve elektrostatik etkileşimlerdir [80].

Bu damgalama yönteminin avantajı, kalıp molekülün polimerden kolaylıkla uzaklaştırılmasını sağlayan basit bir yıkama işleminin gerçekleşmesi ve kalıp molekülün hızlı bir şekilde polimere geri bağlanmasıdır [77].

### 2.4.3. Moleküler Damgalama Teknolojisinin Uygulama Alanları

Moleküler damgalanmış polimerlerin uygulama alanları Şekil 2.7'deki gibi şematik olarak gösterilmektedir.

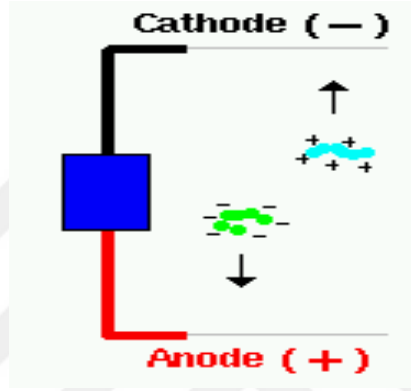


Şekil 2.7. Moleküler damgalı polimerlere ait uygulama alanları [78]

Moleküler damgalı polimerler afinite materyali, bağlama çalışmaları, katı-faz ekstraksiyonunda adsorban olarak kimya ve biyoloji gibi bir çok alanda kullanılmaktadır [69, 81].

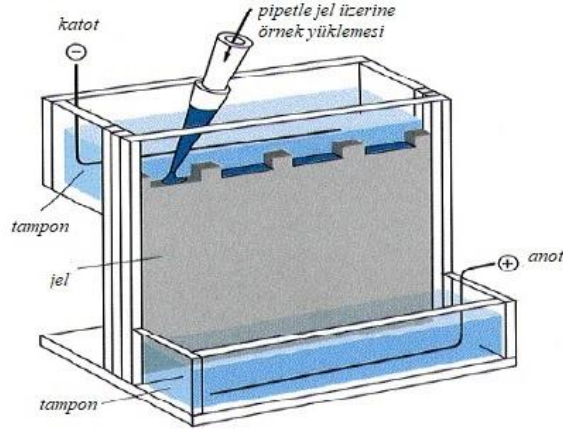
## 2.5. Elektroforez

Elektroforez; Moleküllerin ortamın pH'ına göre (+) veya (-) olarak yüklenerek bir elektriksel alanın üzerinde ayrılmasını gerçekleştiren bir yöntemdir ve bu sistem içerisinde moleküller yüklerine ve molekül büyüklüklerine göre ilerleyerek hareket etmektedirler [82]. Elektriksel alan üzerinde pozitif yüklü tanecikler katoda doğru hareket ederken katyon, negatif yüklü tanecikler anoda doğru hareket ederken anyon olarak nitelendirilirler [83].



Şekil 2.8. Elektroforezde yüklü taneciklerin hareket edişi [83]

Elektroforez; protein, aminoasit, peptidler ve nükleik asitler gibi yüklü taneciklerin belirli bir pH'da elektriksel bir alan üzerinde ve iyonize olan ortamdan molekül büyüklüğü veya yük farklarına göre ayrılması ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir [84]. Kısacası elektroforez; yüklü moleküllerin birbirinden ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. 1970 yılında Laemmli tarafından yayınlanan ve Laemmli yöntemi olarak bilinen SDS-PAGE yöntemi elektroforezde yaygın olarak kullanılmaktadır [85]. Bu yöntemle protein örneklerinde saflık analizi, molekül ağırlığını belirleme, proteinleri saflaştırma gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 2.9. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) cihazının şematik gösterimi [86]

Bir taneciğin göç oranı;

- Taneciklerin net yüküne
- Elektriksel alanın gücüne,
- Elektroforez ortamının yoğunluğuna,
- Sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir [83].

Elektroforetik sistemde analizi yapılacak olan numune öncelikle bir destek materyaline uygulanır. Genellikle elektroforetik sistemlerde destek materyali olarak jeller kullanılır ve bu jellerin içerisine uygun tampon ekleme işlemi yapılır. Bu jel desteği ile ayırımı gerçekleştirilecek olan moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, uygulanan elektriksel alana, biçimine ve boyutuna bağlı olarak değişmektedir [86]. Elektroforetik sistemde küçük moleküller hızlı hareket ederken, asimetrik ve büyük moleküller ise yavaş hareket ederler [87].

Elektroforez aygıtlarında iki önemli eşitlik yer alır [86, 88].

1. Ohm yasasına göre elektriksel alan; ( $V = I \times R$ ) akım ile direncin çarpımına eşittir.
2. Elektroforez cihazında direnç, ( $P = I^2 \times R$ ) akımın karesinin çarpımına eşittir. Bunun yanında direnç; jelin kesit alanı, uzunluğu ve tamponun iyonik kuvveti ile sağlanmaktadır.

### 2.5.1. Elektroforezin Kullanım Alanları

Elektroforez bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha çok nükleik asitler ve protein gibi makromoleküler yapıdaki maddelerin kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılmaktadır [89].

Elektroforezin en sık kullanıldığı alanlar;

- Proteinlerin molekül ağırlığını belirleme,
- Proteinleri saflaştırma,
- Proteinlerin saflık kontrolü,
- Kalıtsal olan veya kalıtsal olmayan hastalık belirleme,
- Bir proteinin izozimlerinin belirlenmesi (tanı koyma amaçlı, popülasyon çalışması ve adli tıpta) amacıyla kullanılmaktadır [89].

### 2.5.2. Elektroforez Yöntemleri

1. Poliakrilamid jel elektroforezi
2. Değişken alanlı jel elektroforezi
3. Agaroz jel elektroforezi
4. İki boyutlu elektroforez
5. İzoelektronik odaklanma
6. İmmünoelektroforez
7. Kılcal (kapiler) elektroforez

#### 2.5.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi proteinler için en iyi ayırma yöntemi olarak bilinmektedir. Bu yöntemle, proteinler elektriksel bir alan üzerinde iyonize bir ortamda moleküldeki yük farklılıklarına ya da molekülün büyüklüklerine göre kolaylıkla ayrılabilirler [83]. Proteinlerin ayrılmasında kullanılan jellerde genelde % 7,5 poliakrilamid bulunmaktadır. Bu jeller en iyi çözünmenin gerçekleştiği 30,000 - 300,000 Da arasında olan proteinler için kullanılmaktadır [20].

Akrilamid ve metilenbisakrilamidin derişimleri jeldeki porların büyüklüğünü ve jelin ayrıştırma gücünü etkilemektedir [83].

Elektroforezde geliştirilen çeşitli teknikler (SDS-PAGE) gibi tekniğin çok yönlü olarak kullanılabilirliğini arttırmış ve moleküler biyolojideki araştırmalar için en yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniği haline gelmiştir.

SDS-PAGE, denatüre edici maddeler olan sodyum dodesil sülfat,  $\beta$ -merkaptoetanol yardımı ile proteinlerin poliakrilamid jelde daha kolay ve hızlı bir şekilde ayrılmasını gerçekleştiren bir tekniktir [83]. Bu teknikte proteinler arasındaki elektriksel yük farkının ortadan kaldırılması etkin bir ayırımın yapılabilmesi için oldukça önemlidir [90].

SDS-PAGE sistemi, elektroforez tankı, jel kaseti, jellerin hazırlandığı cam plaklar, yükleme kuyularını oluşturan tarak ve standı, güç kaynağı ve tampon çözeltilerden meydana gelmektedir [83].



### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar;

$\alpha$ -Amilaz ( $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus oryzae* powder: -30 U/mg),  $\beta$ -glukozidaz ( $\beta$ -Glucosidase from almonds, 5,3 U/mg ve  $\geq 6$  U/mg) ve lipaz (Lipase from porcine pancreas 100-400 U/mg) enzimleri, hidroksietilmetakrilat (HEMA), 1-vinilimidazol (1-VI), 4-vinilpiridin (4-VP), metakrilik asit (MAA), akrilamid (AAm), N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), sodyum dodesil sülfat (SDS), asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH), coomassie brilliant blue G-250, sığır serum albümin (BSA), o-fosforik asit (o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) (% 99), sodyum asetat (CH<sub>3</sub>COONa), asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH), sitrik asit (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), sodyum sitrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), tris (hidroksimetil) aminometan (Tris), hidroklorik asit (HCl), potasyum fosfat dibazik (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), potasyum fosfat monobazik (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), potasyum bromür (KBr), 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS), çözünür nişasta, gliserol, metanol, coomassie brilliant blue R-250, bromfenol blue,  $\beta$ -merkaptetanol, glisin, elektroforez standart markerleri (20100-66000 Da). Tüm kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Farklı pankreatik enzimleri içeren tablet ticari olarak temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; UV-vis Spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU), FT-IR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) (Perkin Elmer Spectrum BX), Elektroforez (Atto AE 6125), pH metre (Inolab WTW Series), İnkübatör (GFL).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri hizmet alımı karşılığında alınmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Protein Tayini**

Protein miktarlarının tayini Bradford [91] yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bradford tarafından geliştirilmiş olan bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmakta olup, prensibi organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturmaya dayanmaktadır.

Bradford Reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml % 95 lik etanolde çözülüp, karıştırıcıda 1 saat karanlık kalacak şekilde karıştırıldı. Daha sonra üzerine 55 ml o-fosforik asit eklendi ve 30 dk boyunca karıştırılıp üzeri saf su ile 1 litreye tamamlanarak süzme işlemi gerçekleştirildi.

Standart Protein Eğrisi için; sığır serum albuminin (BSA) saf su ile 1 mg/mL'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,02-0,20 mg/mL arasında bir seri standart protein çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu protein çözeltilerinden 0,1 mL alındı ve üzerlerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk beklendi ve 595 nm de spektrofotometrik cihazda ölçüm alındı. Elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyonlara karşı grafiği çizildi ve böylece standart protein eğrisi oluşturuldu.

### **3.2.2. Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması**

Maltoz standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,1-0,4 mM aralığında bir seri standart maltoz standart çözeltisi saf su içerisinde hazırlanmış olan 1 mM stok maltoz çözeltisinden yola çıkılarak hazırlandı. Denemelerde kullanılacak olan DNS reaktifi; 1 g 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), 20 mL 2 N NaOH içerisinde çözüldü. Üzerine 50 mL saf suda çözülmüş olan 30 g Na.K tartarat eklenip son hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

**Tablo 3.1.** Maltoz standart eğrisinin oluşturulması

	<b>Kör</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Saf Su	1,00 mL	0,90 mL	0,80 mL	0,70 mL	0,60 mL
Maltoz					
Std.(1mM)	-	0,10 mL	0,20 mL	0,30 mL	0,40 mL
DNS	1,00 mL	1,00 mL	1,00 mL	1,00 mL	1,00 mL
Karıştırılır, kaynar su banyosunda 10 dk. tutulur, soğutulur.					
Saf Su	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL
Karıştırılır, köre karşı 540 nm de absorbans okunur.					

540 nm de alınan absorbans değerleri ile maltoz konsantrasyonları arasında standart grafiği çizildi.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesinin tayininde enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan maltoz miktarı çizilen standart grafiği kullanılarak bulundu.

### 3.2.3. $\alpha$ -Amilazın Aktivite Tayini

Bu çalışmada enzim aktivite tayini nişastanın hidrolizi ile açığa çıkan indirgen grupların 3,5-Dinitrosalisilik asit ile belirlenmesi yöntemine dayanan Bernfeld metodu [92] ile yapıldı.  $\alpha$ -Amilazın aktivitesi enzimin substratı olarak kullanılan nişasta ile tayin edildi. Bu metod reaksiyon sonrasında enzimatik hidroliz ile açığa çıkan maltozun 540 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır.

1 Ünite Enzim Aktivitesi: 37°C de dakikada 1  $\mu$ mol maltoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak adlandırılır.

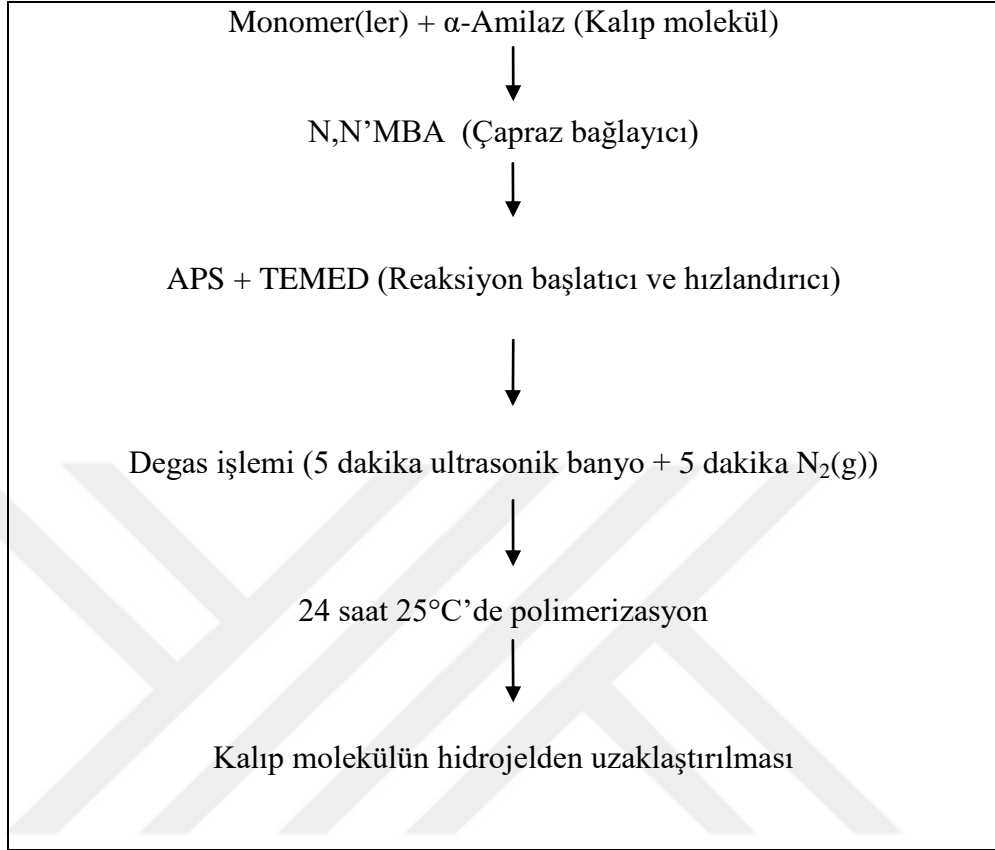
**Tablo 3.2.**  $\alpha$ -Amilaz aktivite tayini yöntemi

	<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
Saf Su	0,5 mL	0,48 mL
Substrat (Nişasta %1 (w/v))	0,5 mL	0,5 mL
Enzim	-	0,02 mL
İnkübasyon (37° C de 5 dk. )		
DNS	1 mL	1 mL
10 dk. kaynar su banyosunda bekletildikten sonra soğutulur.		
Saf Su	10 mL	10 mL
540 nm de ölçüm alınır.		
540 nm de ölçüm alındıktan sonra standart grafiğinden absorbans değerlerine karşı gelen konsantrasyon değeri bulundu ve aktivite hesaplamaları yapıldı.		

#### **3.2.4. $\alpha$ -Amilaz Damgalı Hidrojellerin Hazırlanması**

Farklı monomerler kullanılarak bir seri  $\alpha$ -amilaz damgalı hidrojeller (MIP) hazırlandı. Tüm damgalı hidrojeller için aynı koşullarda damgasız hidrojeller (kalıp molekül olmayan) de hazırlandı. Hidrojel hazırlanması işlem adımları Tablo 3.3’de, kullanılan kalıp molekül, monomer, çapraz bağlayıcı ve polimerizasyon başlatıcı ajan miktarları Tablo 3.4’de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Hidrojel hazırlanması işlem adımları

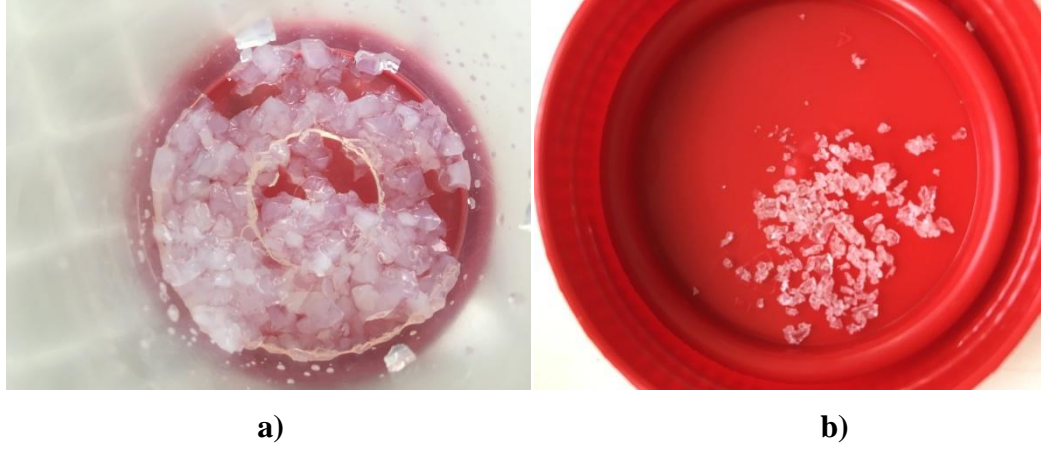


**Tablo 3.4.** Farklı kompozisyonlarda hidrojellerin hazırlanması

Yöntem	Kalıp Molekül $\alpha$ -Amilaz (mg)	Monomer (mmol)	Çapraz Bağlayıcı MBA (mmol)	Reaksiyon Başlatıcı %10 (w/v) APS ( $\mu$ l)	Reaksiyon Hızlandırıcı %5 (v/v) TEMED ( $\mu$ l)
1	12	AAm 0,76	0,039	20	20
2	12	AAm-1-VI 0,76-0,76	0,039	20	20
3	12	AAm-MAA 0,76-0,75	0,039	20	20
4	12	AAm-4-VP 0,76-0,75	0,039	20	20
5	12	AAm-HEMA 0,76-0,76	0,039	20	20

### 3.2.5. $\alpha$ -Amilazın Hidrojelden Uzaklaştırılması

Hazırlanan moleküler damgalı hidrojellerden kalıp  $\alpha$ -amilazın elüsyonu sırasıyla; SDS (%10 (w/v)) -  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (%10 (v/v)) çözeltisi ve en son aşamada saf su ile yapıldı.  $\alpha$ -Amilazın hidrojelden uzaklaştırılması 280 nm de yapılan ölçümlerle izlendi. Kontrol hidrojeller ise sentez sonrası ortamda kalan reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmadan önce saf su ile yıkandı. Yıkama işlemi gerçekleştirilen hidrojeller 1 gün boyunca 50 °C de etüvde kurutulmaya bırakıldı.



**Şekil 3.1.** a) Yaş hidrojel görüntüsü b) Kurutulmuş hidrojel görüntüsü

### 3.2.6. Protein Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu

Farklı monomerler ile hazırlanan MIP ve NIP hidrojeller için  $\alpha$ -amilazın geri bağlama etkinliği hesaplandı. Geri bağlama çalışması için;  $\alpha$ -amilaz damgalı ve damgasız kuru hidrojellerin (10 mg) her birine 1 mg/mL  $\alpha$ -amilaz çözeltisi (1 mL) eklendi ve 120 dakika inkübasyona bırakıldı. 10 dk 10000 rpmde santrifüj sonrası üst fazda bağlanmayan protein miktarı Bradford yöntemiyle hesaplandı. 5 farklı yöntemle hazırlanan hidrojellerdeki geri bağlama çalışmalarının ardından adsorpsiyon kapasiteleri (qe), damgalama etkinlikleri (IF) aşağıdaki bağıntılardan hesaplanarak karşılaştırıldı. En yüksek değer elde edildiği hidrojel üzerinden optimizasyon çalışmalarına geçildi.

$$\text{Adsorpsiyon kapasitesi: } q_e = \frac{C_0 \cdot V_0 - C_e \cdot V_e}{m} \quad (3.1)$$

m(g): hidrojel miktarı

C<sub>0</sub> (mg/mL): Başlangıç α-amilaz konsantrasyonu

C<sub>e</sub> (mg/mL): Süpernatanttaki α-amilaz konsantrasyonu

V<sub>0</sub> (mL): Başlangıç enzim çözeltisinin hacmi

V<sub>e</sub> (mL): Geri bağlama sonrası enzim çözeltisinin hacmi

$$\text{Damgalama etkinliği : } IF = qe (MIP) / qe (NIP) \quad (3.2)$$

### **3.2.7. MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine α-Amilazın Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu**

#### **3.2.7.1. Sürenin Etkisi**

MIP ve NIP hidrojeller üzerine α-amilazın maksimum miktarda bağlandığı sürenin belirlenmesi için, 30-240 dakika sürelerinde geri bağlama çalışmaları yapıldı. 2,5 mg/mL olarak hazırlanan α-amilaz enzim çözeltisi (1 mL) hidrojeller (10 mg) üzerine eklenerek belirlenen sürelerde oda sıcaklığında inkübe edildi. Geri bağlanan protein miktarı Bradford yöntemi ile hesaplandı ve optimum inkübasyon süresi belirlendi.

#### **3.2.7.2. pH Etkisi**

α-Amilazın MIP ve NIP hidrojellere geri bağlanmasında ortamın pH'ının etkisini incelemek üzere 0.1 M olacak şekilde bir seri farklı pH'larda tampon çözeltiler hazırlandı. Kullanılan tamponlar sırasıyla pH: 3.0-4.0 asetat tamponu; pH: 5.0-6.0 sitrat tamponu; pH: 7.0 fosfat tamponu; pH: 8.0-9.0 Tris-HCl tamponudur. Farklı pH değerlerinde hazırlanan 2,5 mg/mL α-amilaz çözeltisi MIP ve NIP hidrojeller üzerine eklendi. Belirlenen sürede inkübe edildikten sonra MIP ve NIP hidrojeller üzerine bağlanan protein miktarı hesaplandı.



### **3.2.7.3. Sıcaklık Etkisi**

$\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojellere geri bağlanmasında ortam sıcaklığının etkisini incelemek üzere farklı sıcaklık değerlerinde (25-50 °C) geri bağlama çalışmaları yapıldı. Belirlenen süre ve pH'da inkübe edildikten sonra MIP ve NIP hidrojeller üzerine bağlanan protein miktarı hesaplandı..

### **3.2.7.4. $\alpha$ -Amilaz Konsantrasyonun Etkisi**

$\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojellere geri bağlanmasında konsantrasyon etkisini incelemek üzere, 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (0,8-3,5 mg/mL)  $\alpha$ -amilaz çözeltileri eklenerek, optimum koşullarda geri bağlama çalışması yapıldıktan sonra MIP ve NIP hidrojeller üzerine bağlanan protein miktarı hesaplandı.

### **3.2.8. Adsorpsiyon İzotermleri**

Sabit sıcaklık ve basınçta adsorplanabilen madde miktarının, bu maddenin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olduğunu gösterir. Konsantrasyona karşı adsorplanan bu madde miktarının grafiğe geçirilmesiyle ortaya çıkan fonksiyona adsorpsiyon izotermi adı verilir [93, 94]. Bu izotermlerden en sık bilinenleri ve kullanılanları Langmuir ve Freundlich izotermleridir. Korelasyon katsayılarının 1'e olan yakınlığı izotermlerin uygunluk durumunu göstermektedir

### **3.2.9. Adsorpsiyon Termodinamiği**

Adsorpsiyonda adsorbatın, birikim ile daha düzenli hale geçmesi durumunda entropi azalmaktadır. Adsorpsiyonun kendiliğinden olabilmesi için (entalpi değişimi)  $\Delta H^\circ$  ve  $\Delta G^\circ$  (Gibbs serbest enerjisi) değerlerinin negatif olması gerekir [95, 96]. Kendiliğinden meydana gelen tepkimelerde serbest enerji azalır ve standart negatif olur. Bu durum gerçekleşen tepkimenin endotermik veya ekzotermik olduğunun bir göstergesi olarak bilinir.

### 3.2.10. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorbant ile adsorbentin temas süresinin belirlenmesi ile adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması kolaylaşmaktadır. Bu durumda adsorpsiyon hızının ve adsorpsiyonun hangi basamaklarda gerçekleştiği daha iyi anlaşılabilir [97]. Adsorpsiyonda reaksiyon basamaklarını belirlemede en çok kullanılan kinetik modeller yalancı birinci derece, yalancı ikinci derece ve parçacık içi difüzyon kinetikleridir. Bu kinetik modellerden elde edilen  $R^2$  değerleri ve hız kinetik katsayıları ( $k_1$ ,  $k_2$  ve  $k_p$ ) değerlendirilerek adsorpsiyonun hangi hız kinetik modeline uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

### 3.2.11. Tekrar Kullanılabilirlik Testi

Hidrojellerin tekrar kullanılabilirliğini test etmek üzere  $\alpha$ -amilaz adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi optimum koşullarda aynı hidrojeller kullanılarak yedi kez tekrar edildi. Bunun için MIP ve NIP hidrojeller üzerine (10 mg) üzerine 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 2,5 mg/mL olacak şekilde hazırlanan  $\alpha$ -amilaz enzim çözeltisinden (1 mL) eklenerek oda sıcaklığında belirlenen optimum sürede inkübasyona bırakıldı. Hidrojeller üzerinde tutunan protein miktarı belirlendi. Hidrojellerin rejenerasyonu için SDS (%10 (w/v))-CH<sub>3</sub>COOH (%10 (v/v)) çözeltisi, sonraki aşamada saf su ile yıkama işlemi yapıldı ve etüvde kurutuldu.

### 3.2.12. $\alpha$ -Amilaz Damgalı Hidrojelin Seçimliliğinin İncelenmesi

$\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojelin seçimliliğini incelemek amacıyla  $\alpha$ -amilazın yanında farklı proteinlerin (molekül ağırlıkları ( $M_A$ ): lipaz 48 kDa, BSA 66,5 kDa,  $\beta$ -glukozidaz 107 kDa) bağlanma ilgileri test edildi. 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 2,5 mg/mL olacak şekilde hazırlanan enzim çözeltileri (1 mL) MIP ve NIP hidrojeller üzerine uygulandı. Bağlanan protein miktarları ve seçicilik faktörleri (R) aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplandı.

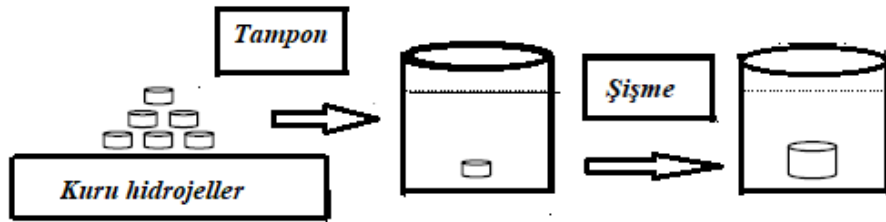
$$\text{Seçicilik fakt6r6} = R = IF_{(tem)} / IF_{(ana)} \quad (3.3)$$

$IF_{(tem)}$ =  $\alpha$ -Amilaz enzimi için bulunan damgalama etkinliği

$IF_{(ana)}$ = Diğer proteinler için bulunan damgalama etkinliği

### 3.2.13. Şişme karakterizasyonu

MIP ve NIP hidrojellerde Şişme etkisini test etmek amacıyla 25°C’da Şişme testleri uygulandı ve hidrojeller zamana karşı tampon 6zelti içerisinde Şişmeye bırakıldı. Hidrojellerin 6zelti içerisine bırakıldığı zaman t=0 olarak belirlendi ve belirli zaman aralıklarında (15-120 dk) 6zelti içerisinden hidrojeller alındı. Dış y6zeyindeki sıvı s6zge kağıdı yardımı ile kurulandı ve tartım alındı. Zamana bağlı olarak sabit k6tle değerleri elde edilene kadar Şişme testine devam edildi. DeđiŐmeyen k6tle değerleri elde edildiğinde Şişmenin dengeye geldiği kabul edildi ve deney sonlandırıldı.



Şekil 3.2. Hidrojellerin sıvı içerisindeki Şişme g6r6nt6s6

### **3.2.14. Spektroskopik Karakterizasyon**

#### **3.2.14.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri**

MIP ve NIP hidrojellerin FTIR spektrumu, hidrojellerin kurutulması ve ardından toz haline getirilmesi ile alındı. Bunun için kurutulmuş hidrojeller (1 mg), KBr (100 mg) ile homojen olarak karıştırıldı, pellet haline getirildi ve 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu alındı.

#### **3.2.14.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri**

MIP ve NIP hidrojellerin SEM ölçümlerinin yapılabilmesi için hidrojeller kurutuldu ve ardından toz haline getirildi. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır. SEM görüntüleri Carl Zeiss 300VP SEM cihazı ile alınmıştır. Kaplama işlemi de QUORUM Q150 RES cihazında yapılmıştır.

### **3.2.15. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Farklı Pankreatik Enzimleri İçeren Tabletten Seçimli Olarak Ayrılması**

#### **3.2.15.1. Örnek Hazırlığı**

Farklı pankreatik enzimler içeren (lipaz, proteaz ve amilaz) tablet içerisinden seçimli olarak  $\alpha$ -amilazın ayrılması test edildi. Bunun için tablet (0,5 g) toz haline getirilerek 15 mL 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde süspansiyon edildi. Çözünmeyen kısım santrifüjle uzaklaştırıldı ve üst fazdan 1 mL alınarak MIP ve NIP hidrojeller üzerine uygulandı. Protein desorpsiyonu 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponu kullanılarak yapıldı. Tüm aşamada örneklerde aktivite ve protein tayinleri ile SDS-PAGE elektroforez uygulamaları yapıldı.

### 3.2.15.2. SDS-PAGE Elektroforez Uygulaması

En yaygın kullanılan SDS-PAGE yöntemi, ilk kez 1970 yılında yayınlanan Laemmli yöntemi olarak bilinir. Laemmli yöntemine göre hazırlanan çözeltiler ve uygulama şekli aşağıdaki gibidir.

#### SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler

Bu çözeltiler;

- Akrilamid/N'-N'-metilenbisakrilamid (AAM/MBA): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g metilenbisakrilamid saf su içerisinde çözüldü ve iki çözelti birbiri içerisinde karıştırılarak son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.
- Ayırma jeli tamponu: (1.5 M Tris-HCl, pH 8,8)
- Yükleme jeli tamponu: (0.5 M Tris-HCl, pH 6,8)
- % 10 SDS: 10 g SDS 90 ml saf su içerisinde çözüldü, son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- % 10 Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 ml saf su içerisinde çözüldü. (Kullanılmadan önce taze olarak hazırlandı).
- Örnek uygulama tamponu: Saf su, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, gliserol, % 10 (w/v) SDS, % 0,5 (w/v) bromophenol blue)
- Yürütme (elektrot) tamponu (10x elektrot tamponu pH 8,3): 30,3 g Tris, 144 g glisin, 10 g SDS çözeltileri 1 litre saf su içerisinde çözüldü. Bu çözeltiden 50 ml alınıp, 500 ml'ye tamamlanarak tampon seyreltilmiş olarak hazırlandı.
- Boyama (Stain) çözeltisi: % 0,05 Coomassie Brilliant Blue R 250, % 10 (v/v) asetik asit, % 40 (v/v) metanol çözeltisi ile hazırlandı.
- Boya uzaklaştırma (Destain) çözeltisi: % 40 (v/v) metanol, % 10 (v/v) asetik asit çözeltisi ile hazırlandı.
- Protein standartları: Protein standardının (Sigma Marker wide range) içeriğinde Albumin ( $M_A$ : 66000 Da), Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ( $M_A$ : 36000 Da), Albumin, EGG ( $M_A$ : 45000 Da), Tripsin ( $M_A$ : 20100 Da), Karbonik Anhidraz ( $M_A$ : 29000 Da) bulunmaktadır.

## **Poliakrilamid (ayırma ve düzenleyici) jellerin hazırlanması**

Örneklerin SDS-PAGE de uygulanmasında % 12 ayırma (separating) ve % 4'lük düzenleyici (stacking) jeller kullanıldı.

- Ayırma (separating) jelinin hazırlanması (% 12)

<b>Ayırma jeli (% 12)</b>	
Saf su	6,8 mL
(AAm/MBA)	8 mL
Jel tamponu	5 mL
% 10 SDS	0,2 mL
% 10 APS	100 µL
TEMED	10 µL

Uygun bir konumda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere ayırma jeli tamponu hazırlandı. Plaka haline getirilen cam plaklar yürütme tankına yerleştirildi. Hazırlanan ayırma jeli tamponu otomatik pipet aracılığı ile iki cam arasına aktarıldı.

- Düzenleyici (stacking) jelinin hazırlanması (% 4)

<b>Düzenleyici jel (% 4)</b>	
Saf su	6,1 mL
(AAm/MBA)	1,3 mL
Jel tamponu	2,5 mL
% 10 SDS	0,1 mL
% 10 APS	50 µL
TEMED	10 µL

Ayırma jeli üstünde bulunan boşluğa göre yükleme jeli tamponu hazırlandıktan sonra iki camın en üst seviyesine kadar yükleme jeli otomatik pipet ile döküldü.

Protein örneklerinin yüklenebilmesi için tarak yardımıyla yükleme kuyucukları oluşturuldu. 1 gece oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Daha sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı.

➤ Protein örneklerinin hazırlanması

Saf Su	3,55 mL
0,5 M pH 6,8 Tris-HCl	1,25 mL
Gliserol	2,5 mL
% 10 SDS	2 mL
% 0,5 Bromophenol Blue	0,2 mL
$\beta$ -Merkaptoetanol	50 $\mu$ L

SDS-PAGE uygulaması öncesi 50  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptoetanol 950  $\mu$ L örnek tamponuna eklendi. Örnekler 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanıp örnek tamponu ile 1:2 oranında olacak şekilde seyreltildi ve 95°C'de 5 dk kaynatıldıktan sonra soğutulularak protein standartları ile birlikte kuyucuklara yüklendi.

➤ Poliakrilamid jelde protein örneklerinin yürütülmesi

İçerisinde jel bulunan cam plakalar elektroforezin iç standına yerleştirildikten sonra elektroforez tankına bırakıldı ve tanka yürütme (elektrot) tamponu eklendi. Hazırlanmış olan protein örnekleri, molekül ağırlığı bilinen diğer standart protein örnekleri ile birlikte yükleme jelindeki kuyucuklara yüklendi. Tank kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlandı ve düzenleyici jel boyunca 100 V, ayırma jeli boyunca da 120 V olacak şekilde akım verildi. Protein bantları jelin alt kısmına ulaştıktan sonra akım durduruldu ve jel sistemden çıkarıldı.



**Şekil 3.3.** Poliakrilamid jel üzerinde protein örneklerinin yürütülmesi

➤ Poliakrilamid jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi

Sistemden çıkarılan jel üzerinde protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için önce % 40 metanol + % 10 asetik asit çözeltisi içerisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra aynı jel boya çözeltisi içerisine aktarıldı. Burada en az 4 saat olacak şekilde oda sıcaklığında bekletildi. Boya çözeltisinden alınan jel, protein bantlarının dışında kalan boyayı gidermek için % 7 lik asetik asit çözeltisi ile yıkandı. Jel üzerindeki protein bantları görünür hale geldikten sonra bantların görüntüsünün fotoğrafı alındı.

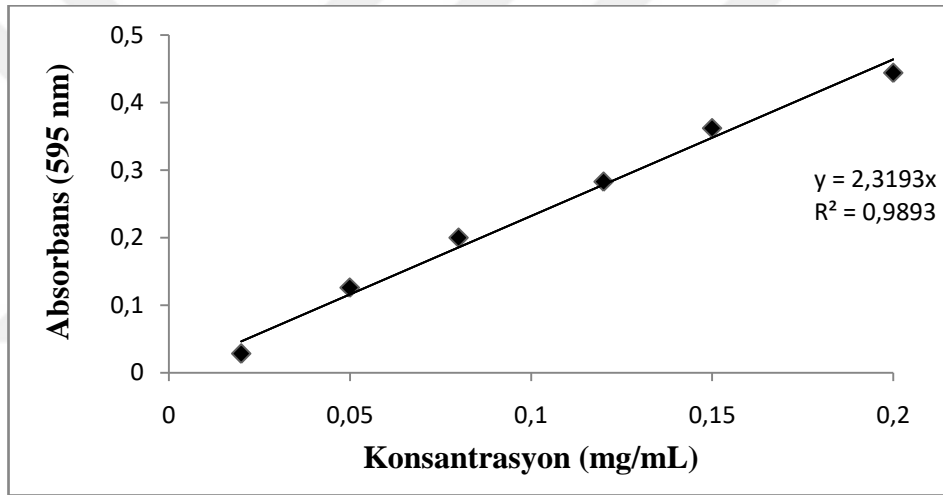


## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Protein ve Aktivite Standart Grafikleri

#### 4.1.1. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması

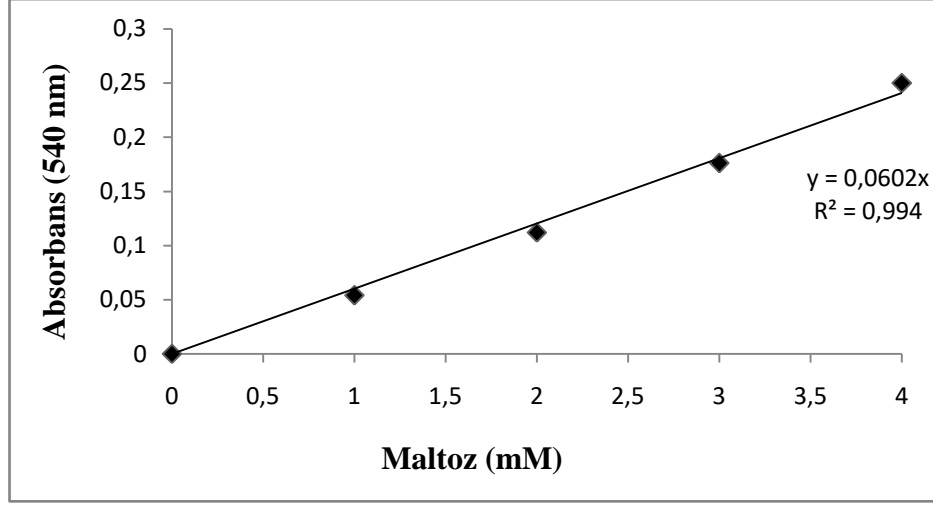
Standart protein eğrisinin çizimi için; 0,02-0,20 mg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albumin (BSA) çözeltilerinin hazırlanmasının ardından her bir standart için Bradford yöntemi uygulanarak absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyonlara karşı grafiği çizildi ve böylece standart protein eğrisi oluşturuldu. Bu grafik, örneklerin protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı.



Şekil 4.1. Protein standart grafiği

#### 4.1.2. Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması

Maltoz standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,1-0,4 mM aralığında bir seri maltoz standart çözeltisi hazırlandı.  $\alpha$ -Amilaz aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere DNS reaktifi ile maltoz indirgen şeker standart grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. Maltoz standart grafiği

#### 4.2. Farklı Monomerlerle Hazırlanan Hidrojellerin $\alpha$ -Amilaz Geri Bağlama Etkinliğinin Karşılaştırılması

Damgalama etkinliklerinin karşılaştırılmasından önce damgalı hidrojellerden kalıp molekül  $\alpha$ -amilazı uzaklaştırmak için SDS (% 10 (w/v) - CH<sub>3</sub>COOH (% 10 (v/v) (pH 2.8)) çözeltisi kullanıldı. Hawkins ve ark., 2005 yılında sığır hemoglobininin hidrojel bazlı polimerlerde damgalanması üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Hemoglobinin hidrojelden elüsyonunda SDS (% 10 (w/v) - CH<sub>3</sub>COOH (% 10 (v/v) (pH 2.8)) çözeltisi kullanmışlardır. Bu pH değerinde SDS negatif yüklüdür ve SDS etkileşimi 8 mM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda misel oluşturmaktadır. Elüsyon sırasında pozitif yüklü proteinler negatif yüzeye yapışırlar. Bu durum MIP üzerinden potansiyel olarak etkili olan kalıp proteinin çıkarılmasını sağlar. Çözelti içerisinde genel pH'ı düşürmeye yardımcı olarak asetik asit yer alır ve protein içerisindeki moleküller arası hidrojen bağlarını bozarak proteini denatüre eder. Bu bilgilere dayanarak SDS-AcOH çözeltisi kullanarak molekülden protein uzaklaştırmanın mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir [98].

Farklı monomerlerle hazırlanan hidrojellerin  $\alpha$ -amilaz geri bağlama etkinliğinin karşılaştırılması 1 mg/mL  $\alpha$ -amilaz çözeltisi kullanılarak yapıldı (Tablo 4.1).

Hidrojeller üzerinde tutunan protein miktarlarına göre damgalama etkinliği (IF) (qMIP/qNIP) değerinin en yüksek AAm monomeri ile hazırlanan hidrojin olduğu görüldü. Geri bağlama optimizasyon çalışmalarına bu hidrojel üzerinden devam edildi.

**Tablo 4.1.** Beş farklı monomerle hazırlanan hidrojellerin  $\alpha$ -amilaz geri bağlama etkinliğinin karşılaştırılması\*

<b>Monomer</b>	<b>MIP (mg/g)</b>	<b>NIP (mg/g)</b>	<b>IF qMIP/qNIP</b>
<b>AAm</b>	3,32	2,22	1,49
<b>AAm-1-VI</b>	2,78	2,56	1,08
<b>AAm-MAA</b>	3,76	3,26	1,15
<b>AAm-4-VP</b>	0,45	1,00	0,45
<b>AAm-HEMA</b>	0,24	1,1	0,21

\*Enzim miktarı: 1 mg/mL  $\alpha$ -Amilaz Süre: 120 dakika pH: 7.0 Sıcaklık: 25°C

Yu ve Mosbach'ın 1998 yılında yaptıkları çalışmada, AAm monomeri kullanılarak oluşturulan moleküler damgalı polimerlerin polar organik çözücülerde ve sulu ortamda MAA ve 4-VP gibi monomerler kullanarak oluşturulan moleküler damgalı polimerlere göre daha iyi tanıma özelliği gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bunun nedenini AAm'nin amid grubunun dielektrik sabitinin ve dipol momentinin daha fazla olması ve dolayısıyla kalıp molekül ile MAA'nin karboksil grubuna göre daha kuvvetli hidrojen bağı oluşturduğu şeklinde açıklamışlardır [99].

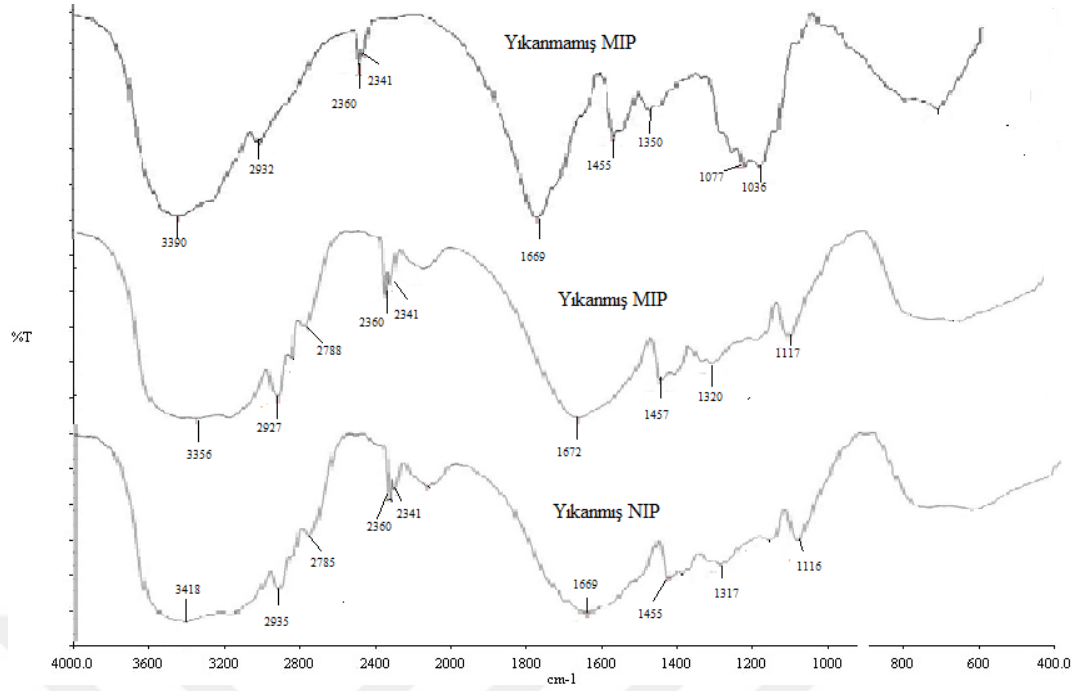
### **4.3. Spektroskopik Karakterizasyon**

Bu çalışmada hazırlanan MIP ve NIP hidrojellerin karakterizasyon çalışmaları FTIR ve SEM analizleri ile yapıldı.

#### **4.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Analizi**

Moleküllerin yaydığı elektromanyetik ışınımını inceleyen moleküler spektroskopisi olarak bilinmektedir. Bu yöntem ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir [100].

İnfrared spektroskopisinde, en önemli nokta spektrumların doğru olarak yorumlanmasıdır. Spektrumun yorumlanabilmesi bandların molekül üzerindeki hangi atom gruplarından kaynaklandığının belirlenebilmesine dayanır. İnfrared spektrumlar, uzak İnfrared ( $20-400\text{ cm}^{-1}$ ), orta İnfrared ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) ve yakın İnfrared ( $4000-12500\text{ cm}^{-1}$ ) olmak üzere üç temel bölgede incelenmektedir [101].



**Şekil 4.3.** Yıkanmamış MIP, yıkanmış MIP ve yıkanmış NIP hidrojellere ait FTIR görüntüleri

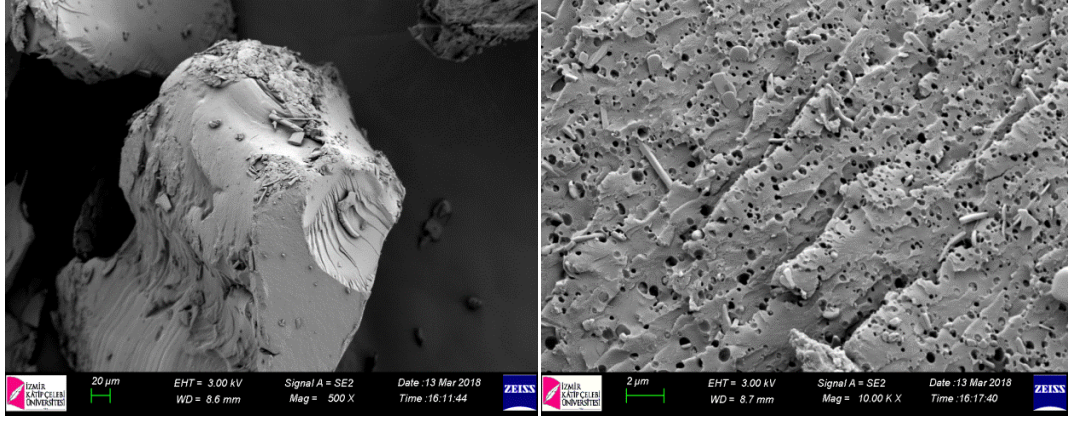
FT-IR ölçümleri sonucuna göre; hidrojellerin akrilamid içerdiği bu bantlardan anlaşılmıştır.

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  $2900\text{ cm}^{-1} - 2700\text{ cm}^{-1}$  aralığında bulunan dalga boyları çapraz bağlama ajanının (metilenbisakrilamid) varlığında meydana gelen  $\text{CH}_2$  gerilme titreşiminin simetrik ve asimetrik gerilmesine ait C-H gruplarını göstermektedir.  $1600\text{ cm}^{-1}$  lere 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  $1077$  ve  $1036\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarında görülen titreşimler ise yapıya  $\alpha$ -amilazın katıldığını göstererek yıkanmış NIP'e göre farklanmasını ifade etmektedir.

#### 4.3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri

Taramalı elektron mikroskobundaki görüntüler, yüksek voltaj ile hızlandırılmış olan elektronların örnek üzerine odaklanması sağlanarak örnek yüzeyinde taratılması ve bununla birlikte elektron ile örnek atomları arasında çeşitli girişimlerin meydana getirmiş olduğu etkilerin uygun algılayıcılar üzerinde toplanarak, sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılması ile oluşmaktadır. Bu algılayıcılar üzerinden gelen sinyaller ise dijital sinyallere dönüştürülerek bilgisayar ekranı üzerine yansıtılmaktadır [101]. Bulanık bir numunenin yüzeyi ince bir elektron demeti ile tarandıktan sonra numune önceden bir ışık iletici film ile kaplanmış olarak bulunur. Elektron demeti numuneye çarptığı zaman geriye saçılan elektronlar bir televizyon tüpünde elektron demetinin şiddetini düzeltmede kullanılarak mikroskop demetiyle bir tarama yapılmaktadır. Bu sinyal örneğe göre geniş alanlarda küçük olduğundan, görüntülerin derinliği büyük ve üç boyutlu olarak gözükürler [102].

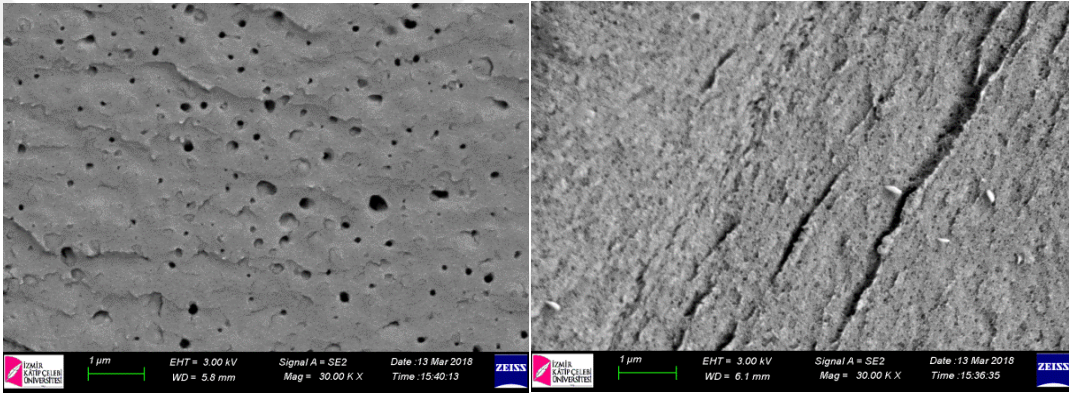
Hazırlanan hidrojellerin yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinebilmek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.4'te NIP hidrojel, Şekil 4.5'te MIP hidrojelin SEM görüntüleri görülmektedir. Yüzey görüntülerine göre MIP ve NIP hidrojellerin oldukça gözenekli bir yapıya sahip oldukları ve MIP hidrojelin yıkandıktan sonra yüzeyinin daha pürüzlü ve gözenekli hale geldiği görülmektedir.



a)

b)

**Şekil 4.4.** NIP hidrojin a) 500x büyütme b) 10000x büyütme görüntüleri



a)

b)

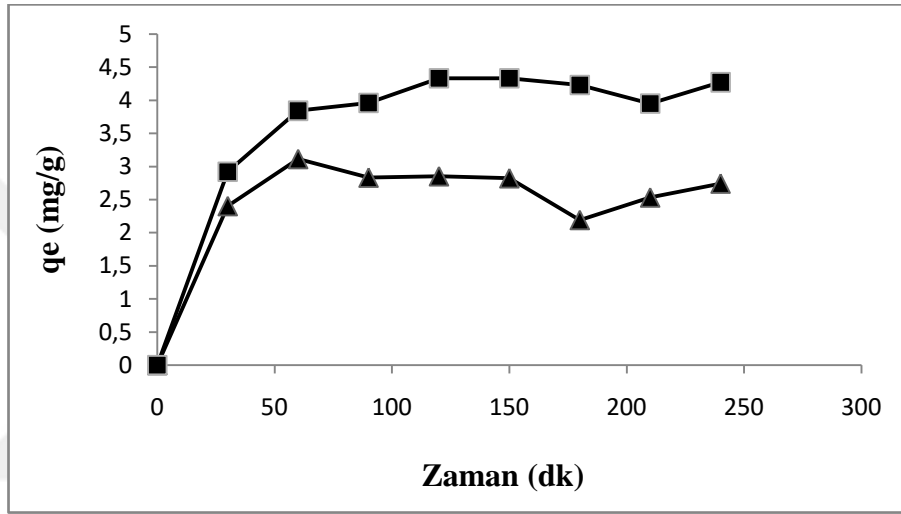
**Şekil 4.5.** a) Yıkanmamış MIP hidrojin 30000x büyütme b) Yıkanmış MIP hidrojin 30000x büyütme görüntüsü

#### 4.4. Akrilamid Monomeri ile Hazırlanan MIP ve NIP Hidrojeller Üzerine $\alpha$ -Amilazın Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu

##### 4.4.1. Sürenin Etkisi

MIP ve NIP hidrojinler üzerine  $\alpha$ -amilazın maksimum miktarda bağlandığı süreyi belirlemek üzere 30-60-90-120-150-180-210-240 dk sürelerle  $\alpha$ -amilaz enzimi (2,5 mg/mL) MIP ve NIP hidrojinler (10 mg) ile inkübe edildi.

Başlangıç protein miktarı ile süpernatanttaki protein miktarı arasındaki fark alınarak hidrojenlerin protein geri bağlama kapasitesi ( $q_e$ (mg/g)) hesaplandı. Şekil 4.6' da adsorpsiyonun ilk 60 dakikada artış göstermekte olduğu ve 120 dakikada geri bağlamanın dengeye geldiği görülmektedir. Bu durum damgalı bölgelerin  $\alpha$ -amilazla doygunluğa ulaştığını göstermektedir. NIP hidrojinin adsorpsiyon kapasitesi MIP hidrojele göre daha düşüktür. MIP hidrojelde kalıp molekülün şekline uygun adsorpsiyon kavimleri mevcuttur. Bundan dolayı NIP hidrojele göre daha yüksek geri bağlama kapasitesine sahiptir.



**Şekil 4.6.**  $\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojenler üzerine adsorpsiyonu için optimum sürenin belirlenmesi (MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲))

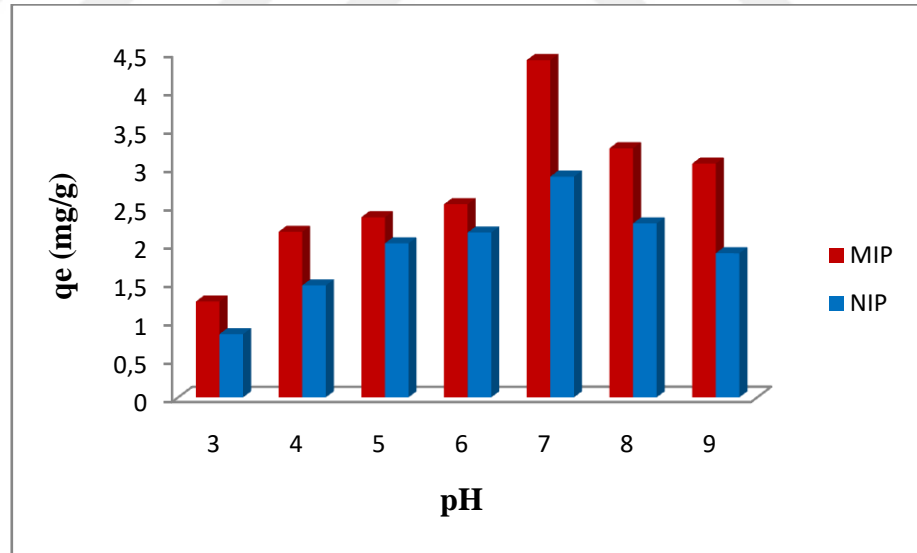
Verheyen ve ark., 2011 yılında proteinlerin moleküler olarak damgalanması için etkili olan faktörlerle ilgili çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırma için afinitede örneğin ligand ve reseptör maddelerin dengede kalmasını sağlayan önemli parametre olduğundan MIP'in dengeye gelmesini etkilemekte ve çapraz olarak bağlanmış bir polimer matrisindeki proteinlerin oldukça yavaş ilerlediği yaygın olarak bilinmekte olduğunu söylemişlerdir. Bu duruma bağlı olarak proteinlerin bağlanması için gereken süreyi etkileyen faktörler arasında polimer geometrisi, polimer hidrasyonu, çapraz bağ yoğunluğu, proteinin büyüklüğü ve sıcaklık gibi faktörlerin yer aldığını belirtmişlerdir [103].



#### 4.4.2. pH Etkisi

MIP ve NIP hidrojeller (10 mg) üzerine farklı pH değerlerinde hazırlanan 2,5 mg/mL  $\alpha$ -amilaz çözeltisi (1 mL) eklenerek 120 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından MIP ve NIP hidrojellerde tutunan protein miktarları hesaplandı. Hesaplama sonuçlarına göre en yüksek tutunma miktarları 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponu ortamında görüldü (Şekil 4.7). Buna göre MIP ve NIP hidrojeller üzerinde sırasıyla tutunan miktarlar 4,4 mg/g ve 2,8 mg/g olarak bulundu ve qMIP/qNIP oranı 1,5 olarak hesaplandı. Bundan sonraki çalışmalara pH 7,0 ortamında devam edildi.

$\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojeller pH 7,0 fosfat tamponu ortamında sentezlendi. Bu pH değerinde  $\alpha$ -amilazın geri bağlanması için jel içerisinde en uygun kavite oluşumu gerçekleşti. pH 7,0 nin altında ve üstündeki geri bağlama ortamlarında  $\alpha$ -amilazın yük durumu değiştiği için konformasyonunda da değişimler meydana gelmektedir. Bu nedenden dolayı  $\alpha$ -amilazın daha düşük oranlarda hidrojellere geri bağlandığı düşünülmektedir.



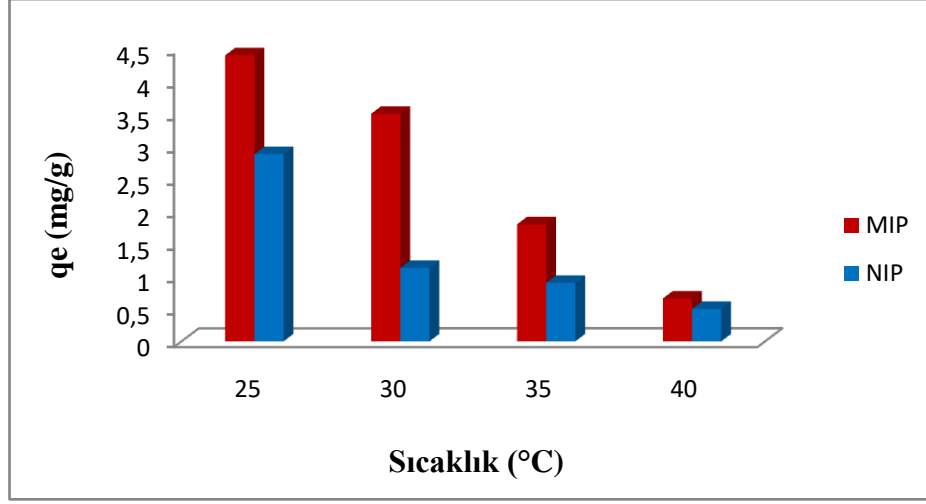
Şekil 4.7.  $\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlanmasında pH'in etkisi

Çorman'ın 2010 yılında moleküler damgalanmış nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve lizozim saflaştırılmasında kullanılması ile ilgili yaptıkları çalışmada lizozim adsorpsiyonuna pH'ın etkisini incelemişlerdir. Maksimum adsorpsiyonun pH 10.0 da gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Lizozimin izoelektrik noktasının 11,2 olup izoelektrik noktada proteinler yüksüz olduklarından izoelektrik noktaya yakın pH'larda elektrostatik etkileşimlerin minimum, hidrofobik etkileşimlerin ise maksimum olduğunu söyleyerek izoelektrik noktanın pH üzerindeki etkisini yorumlamıştır [104].

#### 4.4.3. Sıcaklık Etkisi

0.1 M pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan  $\alpha$ -amilaz çözeltisi (2,5 mg/mL) MIP ve NIP hidrojeller (10 mg) üzerine eklenerek farklı sıcaklık değerlerinde (25-30-35-40 °C) 120 dk inkübe edildi. MIP ve NIP hidrojellerde tutunan protein miktarları hesaplandı. Hesaplama sonuçlarına göre en yüksek tutunma miktarları 25°C'de görüldü (Şekil 4.8). Buna göre MIP ve NIP hidrojeller üzerinde tutunan miktarlar sırasıyla 4,4 mg/g ve 2,8 mg/g olarak bulundu ve qMIP/qNIP oranı 1,5 olarak hesaplandı. Bundan sonraki çalışmalara 25°C sıcaklıkta devam edildi.

$\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojeller 25°C de sentezlendi. Bu sıcaklık değerindeki enzim konformasyonuna göre jel içerisinde bağlanma bölgeleri oluştu. Sıcaklık artışıyla enzimin tersiyer yapısındaki değişimler meydana gelmektedir. Bu nedenle 25°C üzerindeki sıcaklık değerlerinde hidrojellere geri bağlama oranlarının düştüğü düşünülmektedir.

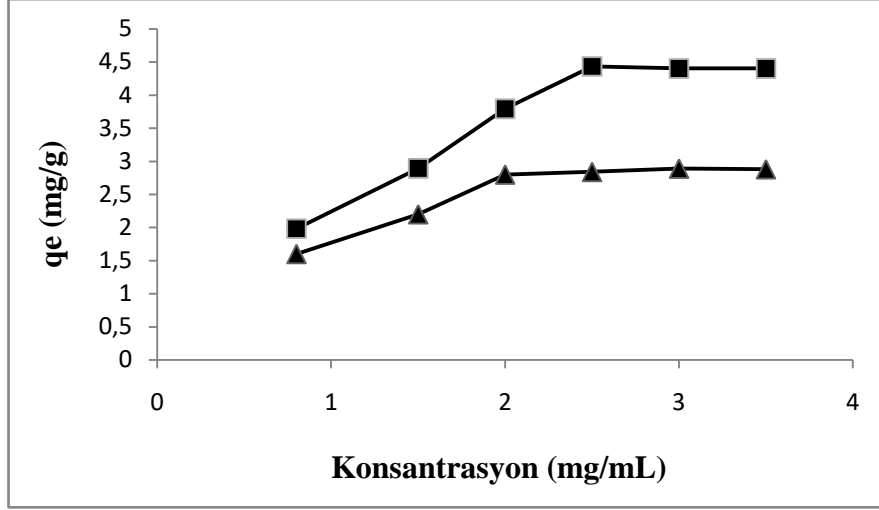


**Şekil 4.8.**  $\alpha$ -Amilazın MIP ve NIP hidrojel üzerine geri bağlanmasında sıcaklığın etkisi

#### 4.4.4. $\alpha$ -Amilaz Konsantrasyonunun Etkisi

$\alpha$ -Amilaz konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla, MIP ve NIP hidrojel (10 mg) üzerine; 0,8-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5 mg/mL arasında hazırlanan enzim çözeltileri (1 mL) eklenerek geri bağlama çalışması yapıldı. MIP ve NIP hidrojelde tutunan protein miktarları hesaplandı. Buna göre, adsorpsiyonun konsantrasyon artışı ile doğrusal olarak arttığı ve 2,5 mg/mL enzim çözeltisi kullanıldığında MIP ve NIP için sırasıyla 4,4 ve 2,8 mg/g olarak bulunması ile maksimum kapasiteye ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.9).

Çözeltideki  $\alpha$ -amilaz konsantrasyonunun artmasıyla gram hidrojel başına adsorplanan  $\alpha$ -amilaz miktarı artmış ve 2,5 mg/mL den sonra  $\alpha$ -amilazın konsantrasyonu doygunluğa ulaşmıştır.



**Şekil 4.9.**  $\alpha$ -Amilaz konsantrasyonunun etkisi  
(MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲))

Çorman'ın 2010 yılında lizozim saflaştırılması için moleküler damgalanmış nanopartikülleri hazırlayarak konsantrasyon etkisini incelemesi üzerine hazırladığı farklı lizozim konsantrasyonlarını lizozim damgalanmış ve damgalanmamış p(HEMA-MATrp) nanopartiküller üzerine uygulamıştır. Çözeltideki lizozim başlangıç derişiminin artmasıyla gram nanopartikül başına adsorplanan lizozim miktarı artmakta ve 2 mg/mL derişiminde doygunluğa ulaşmaktadır. Damgalanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 25 °C'de 1514,6 mg/g polimer olarak bulunurken damgalanmamış p(HEMA-MATrp) üzerine maksimum adsorpsiyon 856,3 mg/g nanopartikül olarak bulunmuştur [104].

#### 4.5. Adsorpsiyon İzotermi

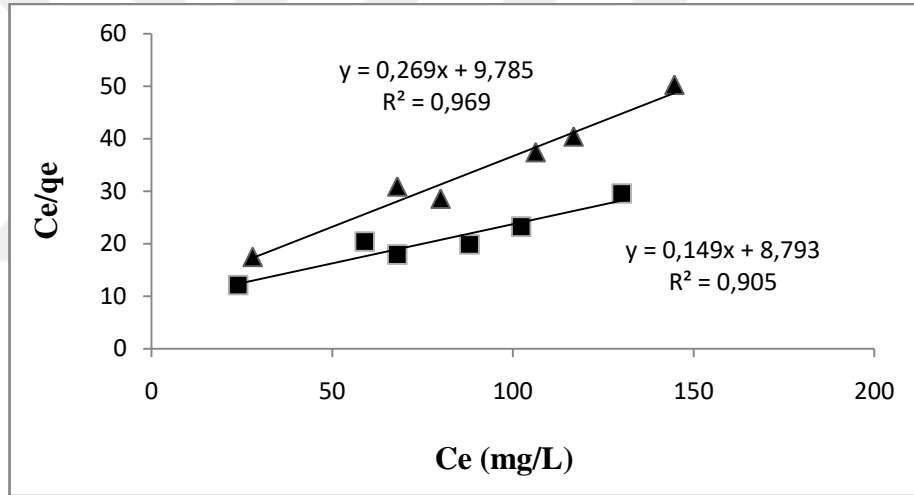
##### 4.5.1. Langmuir izotermi

Bu izoterm, adsorbentin yüzeyinde adsorplayıcı noktaların olduğunu ve denge halinde maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşarak, adsorbe edilen adsorbat miktarının sabitlenmiş olduğunu belirtir. Bu durumdan itibaren Langmuir izoterminde adsorpsiyon, adsorbatın konsantrasyonunun artışı ile doğrusal olarak artış göstermektedir.

Bu izoterm, adsorpsiyon enerjisinin tek tabakayla kaplanmış olduğunu ve dağılımının homojen bir şekilde gerçekleştiğini kabul eder [105].

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

<b>q<sub>e</sub> (mg/g):</b> Denge anındaki adsorbana bağlı protein miktarı
<b>C<sub>e</sub> (mg/mL):</b> Çözeltideki denge halindeki protein derişimi
<b>b (mL/mg):</b> Langmuir sabiti
<b>Q<sub>max</sub> (mg/g):</b> Maksimum protein adsorpsiyon kapasitesi



**Şekil 4.10.** MIP ve NIP hidrojel için Langmuir izoterm grafiği  
MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

Şekil 4.10'da Langmuir izoterm grafiğinde MIP ve NIP hidrojellerin q<sub>e</sub> değerleri sırasıyla 6,7 mg/g ve 3,7 mg/g olarak bulundu. α-Amilazın MIP ve NIP hidrojelleri geri bağlanmasında R<sub>L</sub> (dağılma sabiti) değerleri hesaplandı.

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

<b>b (mL/mg):</b> Langmuir sabiti
<b>C<sub>0</sub> (mg/L):</b> Maddenin çözültideki başlangıç konsantrasyonu

**Tablo 4.2.** R<sub>L</sub> değerleri ve izoterm tipleri

R <sub>L</sub> Değerleri	İzoterm Tipi
R <sub>L</sub> >1	Elverişli Olmayan
R <sub>L</sub> =1	Lineer
0<R <sub>L</sub> <1	Elverişli
R <sub>L</sub> =0	Tersinmez

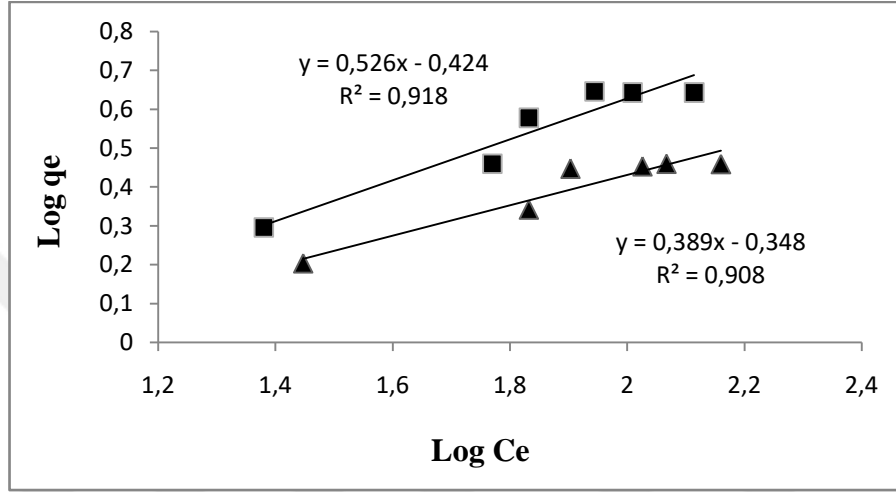
MIP için R<sub>L</sub>= 0,997, NIP için R<sub>L</sub>= 0,996 değerlerinin 0<R<sub>L</sub><1 aralığında olması izoterm elverişli olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak α-amilazın MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlanmasında tek tabakalı ve homojen bir bağlanmanın gerçekleştiği görülmüştür.

#### 4.5.2. Freundlich izotermi

Adsorpsiyon prosesini ifade eden Freundlich'e göre bir adsorbentin yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanlarının farklı türdeki adsorpsiyon alanlarından teşkil edilerek dağılımın heterojen olduğunu göstermektedir [106].

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

<b><math>q_e</math> (mg/g):</b> Denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan protein miktarı
<b><math>C_e</math> (mg/mL):</b> Çözeltideki proteinin denge derişimi
<b><math>K_f</math> (mg/g):</b> Adsorbanın bağıl adsorpsiyon kapasitesi sabiti
<b><math>1/n</math>:</b> Adsorpsiyon şiddeti sabiti



**Şekil 4.11.** MIP ve NIP hidrojel için Freundlich izoterm grafiği  
MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

Şekil 4.11’de  $\log q_e$ ’nin  $\log C_e$ ’ye karşı değişiminin grafiklendirilmesiyle oluşan doğrunun y ekseninin kesim noktası  $\log K_f$ ’yi ve eğimi de  $1/n$ ’i vermektedir. “n” değerinin 1’den büyük olarak bulunması durumu adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir [106]. MIP ve NIP hidrojellerin n değerleri sırasıyla  $1,90 \geq 1$  ve  $2,57 \geq 1$  olarak bulundu.

**Tablo 4.3.** MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izotermine ait parametreler

<i>Langmuir İzotermi</i>			<i>Freundlich İzotermi</i>			
	<b>Q</b> <b>(mg/g)</b>	<b>b</b> <b>(mL/mg)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>K<sub>F</sub></b> <b>(mg/g)</b>	<b>n</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>MIP</b>	6,71	0,0169	0,969	2,65	1,90	0,918
<b>NIP</b>	3,71	0,0275	0,905	2,22	2,57	0,908

Buna göre  $\alpha$ -amilaz damgalı hidrojelin (MIP) adsorpsiyon izotermi incelendiğinde Langmuir korelasyon katsayısı ( $R^2=0,969$ ) Freundlich korelasyon katsayısından ( $R^2= 0,918$ ) daha büyük olduğu için Langmuir izotermine daha uygun olduğu görülmektedir.

Verheyen ve ark., 2011 yılında proteinlerin moleküler olarak damgalanması için etkili olan faktörler ile ilgili yaptıkları araştırmada hemoglobin damgalı poliakrilamid hidrojeller sentezlemişlerdir. Bu çalışmada adsorpsiyon izotermine Langmuir izotermine uygun olduğunu elde ettikleri korelasyon katsayısı ( $R^2 = 0,9989$ ) ile kanıtlamışlardır [103].

Başka bir çalışmaya göre Zhao ve ark., 2015 yılında BSA proteininin tanınmasına yönelik moleküler damgalı kalsiyum alginat/poliakrilamid hidrojel filmi sentezlemişlerdir. Bu çalışmada adsorpsiyonun Langmuir izotermine uygun olduğunu belirtmişlerdir ve bağlama kapasitelerini sırası ile MIP ve NIP için 43,59 mg/mg ve 12,48 mg/g olarak bulmuşlardır [107].



## 4.6. Adsorpsiyon Kinetiği

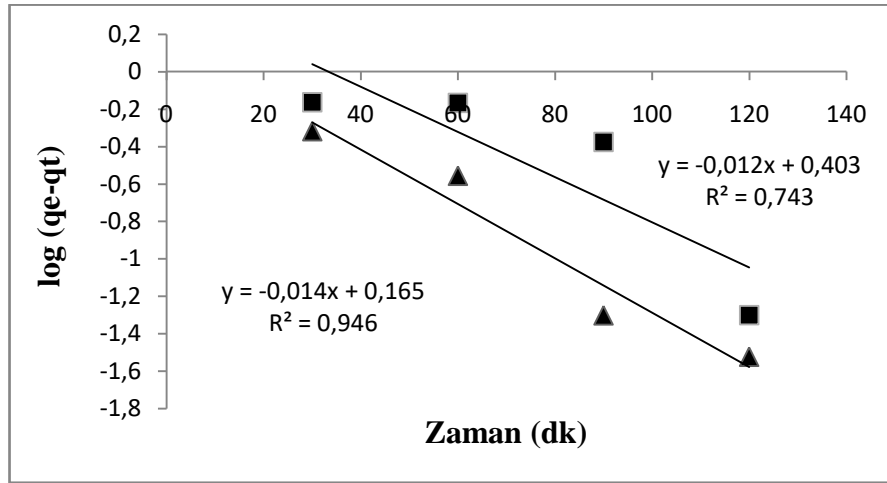
### 4.6.1. Yalancı Birinci Mertebe Kinetiği

Adsorpsiyon sistemlerinin reaksiyon derecelerini belirlemedeki genel olarak kullanılan kinetik modellerden biri Lagergren'in geliştirmiş olduğu yalancı birinci dereceden hız denklemdir [108]. Bu denklem bize hızın adsorbat konsantrasyonuna bağımlı olarak ilerlediğini ancak zamana ve adsorpsiyon kapasitesine bağlı olmadığını göstermektedir

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

<b>qt (mg/g):</b> t anında birim adsorbent üzerine adsorplanan protein miktarı
<b>k<sub>1</sub> (dk<sup>-1</sup>):</b> Birinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti
<b>qe (mg/g):</b> Denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan protein miktarı
<b>t (dk):</b> Süre

### Yalancı Birinci Mertebe Grafiği:



Şekil 4.12. MIP ve NIP hidrojeller için yalancı birinci mertebe kinetik modeli  
MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

Şekil 4.12’de MIP ve NIP hidrojeller için log(qe-qt) ile zaman (dk) arasında çizilen grafik görülmektedir. Buna göre MIP ve NIP hidrojeller için hız sabitleri ( $k_1$ ) sırası ile  $0,0276 \text{ dk}^{-1}$  ve  $0,322 \text{ dk}^{-1}$ , korelasyon katsayıları ( $R^2$ )  $0,743$  ve  $0,946$  olarak bulundu (Tablo 4.4).

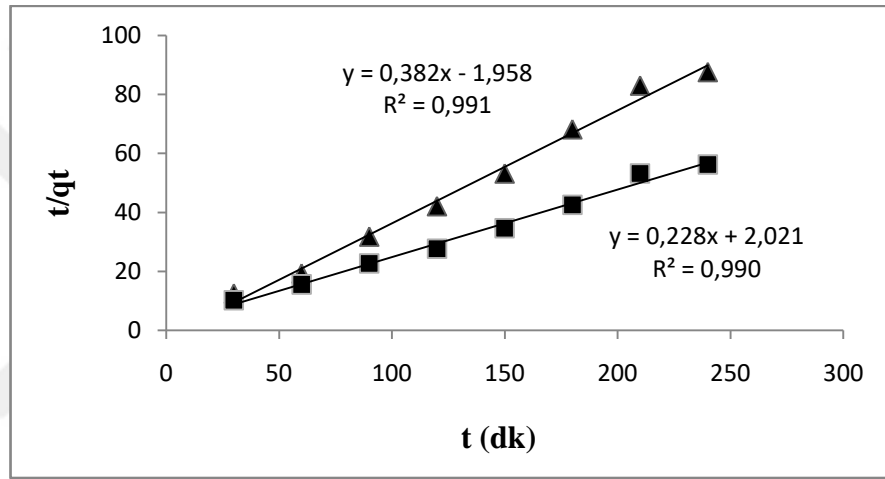
#### 4.6.2. Yalancı İkinci Mertebe Kinetiği

Adsorpsiyon sistemlerinin reaksiyon derecelerini belirlemede genel olarak kullanılan diğer bir ikinci kinetik model, 1995 yılında Ho ve Mckay tarafından geliştirilen, yalancı ikinci dereceden hız denklemdir. Bu denklem hızın adsorbat konsantrasyonundan bağımsız, ancak zamana ve adsorpsiyon kapasitesine bağlı olarak ilerlediğini göstermektedir [97, 108]

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

<b>qt (mg/g):</b> t anında birim adsorbent üzerine adsorplanan protein miktarı
<b>k<sub>2</sub> (g/mg dk<sup>-1</sup>):</b> İkinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti
<b>qe (mg/g):</b> Denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan protein miktarı
<b>t (dk):</b> Süre

### Yalancı İkinci Mertebe Grafiği



**Şekil 4.13.** MIP ve NIP hidrojeller için yalancı ikinci mertebe kinetik modeli  
MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

Şekil 4.13'te MIP ve NIP hidrojeller için  $t/q_t$ ' ye karşı  $t$ (dk) grafiği görülmektedir. Buna göre MIP ve NIP hidrojeller için hız sabitleri ( $k_2$ )  $0,0257$  ( $\text{g/mg dk}^{-1}$ ) ve  $0,0750$  ( $\text{g/mg dk}^{-1}$ ) ve korelasyon katsayıları ( $R^2$ ) ise  $0,990$  ve  $0,991$  olarak bulundu (Tablo 4.4). Korelasyon katsayıları incelendiğinde yalancı ikinci mertebe kinetik modelinin  $R^2$  değerinin yalancı birinci mertebe kinetik modeline göre 1'e daha yakın olduğu ve geri bağlama kinetiğinin bu nedenden dolayı yalancı ikinci mertebe kinetiğine uyduğunu göstermektedir.

### 4.6.3. Parçacık İçi Difüzyon Etkisi

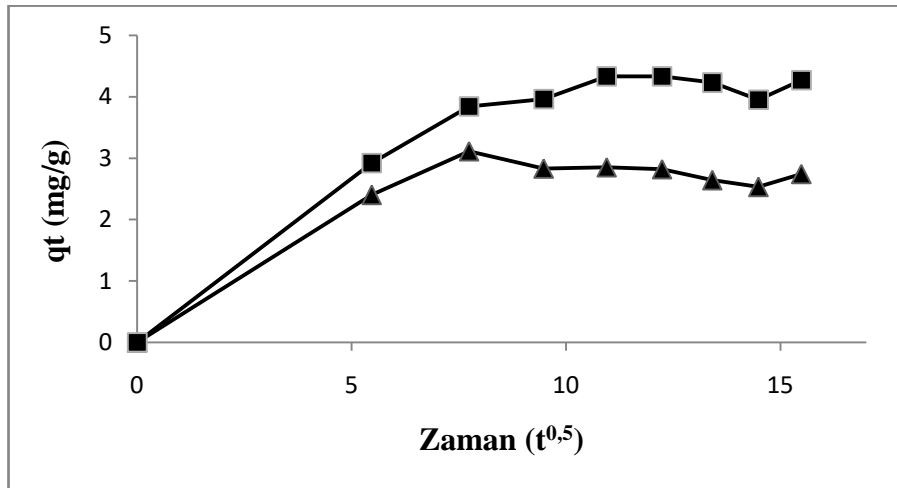
Bu aşama da adsorbat, adsorbentin gözenek boşluklarında tutunacağı yüzeye doğru hareket ederek ilerlemektedir. Parçacık içi difüzyon etkisinin bulunmasında;  $q_t$  değerinin zamanın kareköklerine karşı değişimi çıkartılır [109]. Ortaya çıkan grafiğin eğiminden yararlanarak formülden parçacık içi difüzyon hız sabiti  $k_p$  değerleri bulunur. Deneylemlerden elde edilen veriler, grafikler üzerinden değerlendirilerek adsorpsiyona en uygun olan izoterm ve adsorpsiyon hızının derecesi bulunur.

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

<b>qt (mg/g):</b> t anında birim adsorbent üzerine adsorplanan protein miktarı
--

<b>t (dk) :</b> Süre
----------------------

<b><math>K_p</math> (mg/g.dk<sup>0,5</sup>)</b> = Parçacık içi difüzyon hız sabiti
--



Şekil 4.14. MIP ve NIP hidrojeller için parçacık içi difüzyon etkisi kinetik modeli

MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

**Tablo 4.4.** Kinetik parametreler ve korelasyon katsayıları

	<i>Yalancı Birinci Mertebe</i>			<i>Yalancı İkinci Mertebe</i>			<i>Parçacık İçi Difüzyon Etkisi (t=120 dk)</i>	
	<b>q<sub>e</sub></b> (mg/g)	<b>k<sub>1</sub></b> (dk <sup>-1</sup> )	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>q<sub>e</sub></b> (mg/g)	<b>k<sub>2</sub></b> (g/mg.dk <sup>-1</sup> )	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>K<sub>p</sub></b> (mg/g.dk <sup>0,5</sup> )	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>MIP</b>	2,52	0,0276	0,743	4,38	0,0257	0,990	0,395	0,530
<b>NIP</b>	1,46	0,0322	0,946	2,61	0,0750	0,991	0,26	0,763

MIP ve NIP hidrojeller için parçacık içi difüzyonun etkisinin bulunmasında qt değerinin zamanın kareköküne karşı değişimi çıkartıldı. Elde edilen grafikte denklemin eğiminden MIP ve NIP hidrojeller için parçacık içi difüzyonun hız sabiti (k<sub>p</sub>) sırası ile 0,395 (mg/g.dk<sup>0,5</sup>) ve 0,26 (mg/g.dk<sup>0,5</sup>) ve korelasyon katsayısı (R<sup>2</sup>) değerleri ise sırası ile 0,530 ve 0,763 olarak hesaplandı (Tablo 4.4).

#### 4.7. Adsorpsiyon Termodinamiği

Belirli bir sıcaklık değerinde yapılan adsorpsiyon işleminde ΔG°'yi (Gibbs serbest enerjisi) bulmak için öncelikle denge sabiti olan K<sub>c</sub> bulunur. K<sub>c</sub>° değerinin 1/T değerine karşı grafik üzerine geçirilmesiyle oluşan doğrunun eğimi bulunur ve kesim noktasına göre de ΔH° (entalpi değişimi) ve ΔS° (entropi değişimi) hesaplanmaktadır [96].

$$K_c = \frac{c_a}{c_e} \quad (4.7)$$

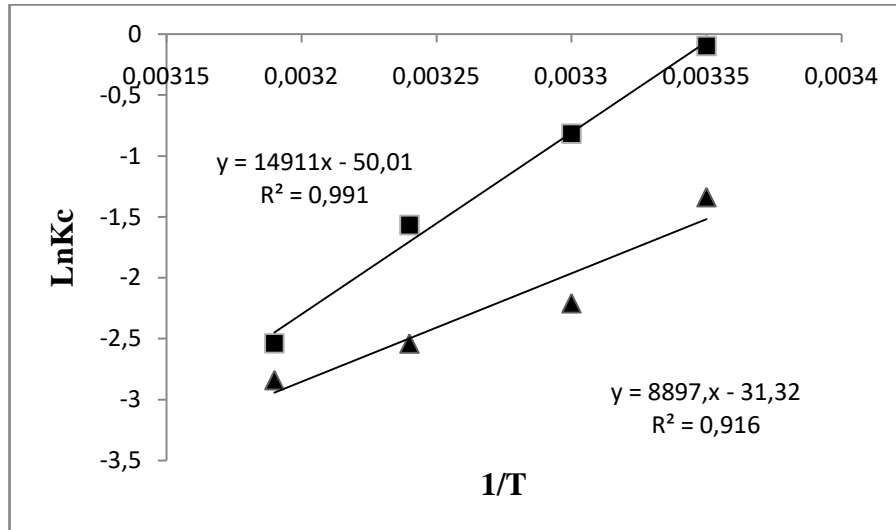
<b>K<sub>c</sub>:</b> Denge sabiti
<b>C<sub>a</sub> (mg/mL):</b> Adsorbent tarafından tutulan protein konsantrasyonu
<b>C<sub>e</sub> (mg/mL):</b> Çözeltide kalan protein konsantrasyonu

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

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

(R= Gaz sabiti (8,314 J/mol K))

<b>ΔG° (kJ/mol):</b> Gibbs serbest enerjisi
<b>ΔH° (kJ/mol):</b> Entalpi değişimi
<b>ΔS° (kJ/mol K):</b> Entropi değişimi
<b>T (Kelvin):</b> Mutlak sıcaklık



**Şekil 4.15.** LnKc ye karşı 1/T grafiği  
MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

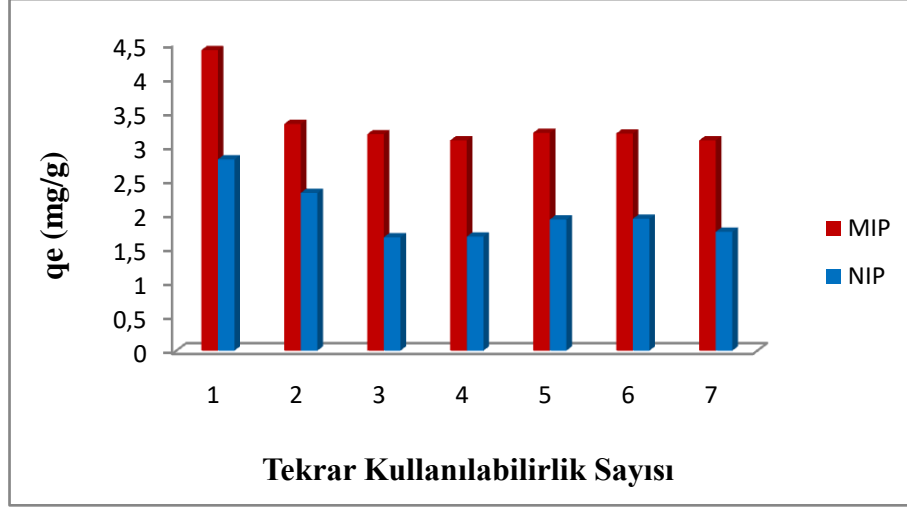
Grafikte MIP ve NIP için elde edilen eğimlerden yola çıkarak  $\Delta H^\circ$  (Entalpi değişimi),  $\Delta S^\circ$  (Entropi değişimi) ve  $\Delta G^\circ$  (Gibbs serbest enerjisi) değerleri bulundu. Adsorpsiyonun uygulanabilirliğinin olması için termodinamik verilerinin değerlendirilmesi oldukça önem teşkil eder. MIP hidrojel için  $\Delta H^\circ$  (adsorpsiyon entalpisi) ve  $\Delta S^\circ$  (adsorpsiyon entropisi) değerleri negatif olup; MIP için sırasıyla, -123,76 kJ/mol ve -0,415 kJ/mol,  $\Delta G^\circ$  (Gibbs serbest enerjisinin) değeri ise -0,09 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Buna göre görülen reaksiyon ekzotermiktir.  $\Delta H^\circ$ 'ın (adsorpsiyon entalpisi) negatif olması adsorpsiyonun ısı vererek gerçekleştiğini yani ekzotermik özelliğini açıklayan önemli bir faktördür.  $\Delta S^\circ$ 'nin (adsorpsiyon entropisi) sıfırdan farklı olması adsorpsiyon sırasında taneciklerin yüzeyde tutunma göstererek daha düzenli hale geçtiğini ve  $\Delta G^\circ$  (Gibbs serbest enerjisinin) değerinin negatif olarak çıkması da tepkimenin kendiliğinden gerçekleşebileceğini ifade etmektedir (Tablo 4.5)

**Tablo 4.5.** MIP ve NIP hidrojel için termodinamik parametreler

	$\Delta S$ (kJ/mol K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)
<b>MIP</b>	-0,415	-123,763	-0,09
<b>NIP</b>	-0,259	-73,843	3,6

#### 4.8. Tekrar Kullanılabilirlik Testi

MIP'lerin en önemli avantajı oldukça dayanıklı ve temizlenip tekrar tekrar kullanılabilir olmalarıdır. Hidrojellerin tekrar kullanılabilirliği testi için; adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi optimum koşullarda MIP ve NIP için aynı hidrojel kullanılarak yedi kez tekrar edildi. Bu durumda yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması sonucunda MIP ve NIP hidrojellerin 7 kez kullanım sonrasında sırasıyla % 70 ve % 60 geri bağlama kapasitesini koruduğu görüldü.



**Şekil 4.16.** MIP ve NIP hidrojel için tekrar kullanılabilirlik grafiği

Literatürlere göre bir destek materyalinin en önemli özelliklerinden biri defalarca kullanılabilmeye olanak vermesidir. Çorman'ın 2010 yılında lizozim saflaştırılması için damgalanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin tekrar kullanılabilirliğini incelemesi üzerine adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerini aynı hidrojelere kullanarak 5 döngü boyunca tekrar etmiştir ve 5 adsorpsiyon-desorpsiyon adımından sonra adsorplanan lizozim miktarında önemli bir azalma gözlenmediğini söylemiştir [104].

#### 4.9. $\alpha$ -Amilaz Damgalı Hidrojin Seçimliliğinin Belirlenmesi

$\alpha$ -Amilazın (55 kDa) yanında lipaz (48 kDa) , BSA (66,5 kDa),  $\beta$ -glukozidaz (107 kDa) gibi proteinler kullanılarak yapılan seçimlilik denemesinde elde edilen damgalama etkinliği (IF) ve seçicilik faktörü (R) değerleri Tablo 4.6'daki gibi hesaplanmıştır.

Lipazın molekül kütesinin  $\alpha$ -amilazın molekül kütesine yakın olması BSA ve  $\beta$ -glukozidazın ise  $\alpha$ -amilazın molekül kütesinden fazla olması seçiciliklerinin etkili şekilde belirlenebilmesi amacıyla seçilmiş proteinler olmasıdır.



**Tablo 4.6.** MIP ve NIP hidrojelilerin farklı proteinlerle seçimliliğinin karşılaştırılması

<b>Enzim</b>	<b>MIP (mg/g)</b>	<b>NIP (mg/g)</b>	<b>IF qMIP/qNIP</b>	<b>R</b>
<b><math>\alpha</math>-Amilaz</b>	4,40	2,80	1,57	
<b>Lipaz</b>	0,60	1,43	0,41	3,83
<b>BSA</b>	2,06	1,88	1,09	1,44
<b><math>\beta</math>-Glukozidaz</b>	0,29	0,60	0,48	3,27

Pang ve ark., 2006 yılında BSA damgalı yumuşak yapılı poliakrilamid jeller oluşturarak bu jeller üzerinde farklı proteinler (ovalbumin, hemoglobin ve c-globulin) ile seçicilik testleri yapmışlardır. BSA damgalı olan jellerin gösterdiği seçicilik diğer proteinler ile damgalanan jellerin gösterdiği seçicilikten daha yüksek değere sahip olmuştur. Bu durum BSA damgalı jellerin yüksek oranda seçicilikle daha iyi tanıma özelliği gösterdiğinin kanıtı olmuştur [110].

Zhao ve ark., 2015 yılında BSA damgalı hidrojel filmi kullanılarak gerçekleştirdikleri seçicilik testinde BSA ile birlikte farklı proteinler (ovalbumin, hemoglobin ve  $\gamma$ -globulin) kullanılmıştır. Damgalı hidrojin BSA'yı diğer proteinlere göre yüksek oranda tanıma özelliği gösterdiğini söylemişlerdir [107].

#### **4.10. Şişme Karakterizasyonu**

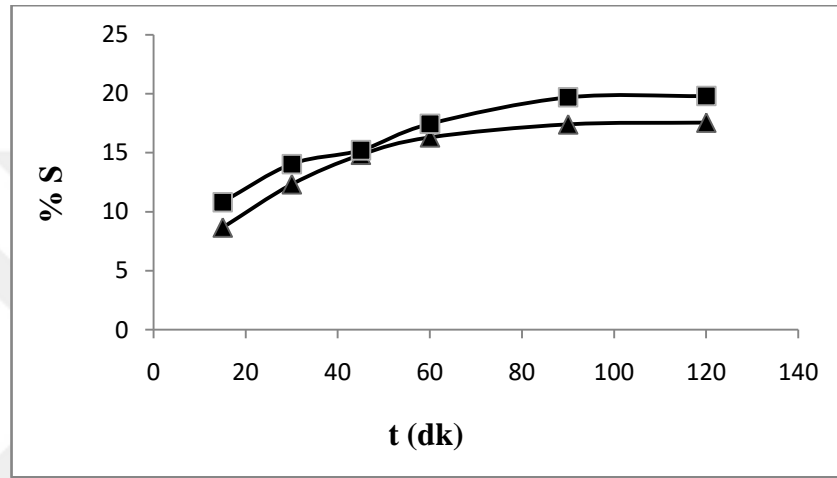
25°C'de 0.1 M pH 7,0 tampon çözeltisi içerisine bırakılan MIP ve NIP hidrojeliler 15-30-45-60-90-120 dk sonunda tampon çözeltisi içerisinden alındı ve dış yüzeyindeki sıvı kurularak tartıldı. Formül 4.10 kullanılarak hesaplanan % şişme değerlerine karşılık çizilen süre grafiği Şekil 4.17 'de görülmektedir. Şişme izoterminden görüldüğü üzere 120 dakika sonunda şişmenin dengeye geldiği gözlenmiştir. Buna göre bu sürenin sonunda şişme değerleri MIP ve NIP hidrojeliler için sırasıyla % 20 ve % 18 olarak bulundu.

% Şişme (% S);

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

**M<sub>0</sub> (mg):** Başlangıçtaki kuru hidrojelün kütlesi.

**M<sub>t</sub> (mg):** t süre sonundaki şişmiş hidrojelün kütlesi.



**Şekil 4.17.** MIP ve NIP hidrojellerin şişme kapasitelerinin zamanla değişimi  
MIP hidrojel (■), NIP hidrojel (▲)

Literatürlerdeki araştırmalara göre kuru polimerik ürünün suya konulma anı  $t=0$  olarak alınmıştır ve belirli süre aralıklarında sudan alınan örneklerin yüzeyindeki su kurulandıktan sonra tartılmıştır ve hesaplanan yüzde şişme değerlerinin bir süre sonra dengeye gelerek sabit bir denge değerine ulaştığı gözlemlendiği söylenmiştir [30, 33].

Sop 2013 yılındaki doku genişletme amaçlı kullanılacak hidrojel sentezi için, farklı monomerler (AAm, HEMA, MMA) ile sentezlediği hidrojellerin şişme kinetiğini incelemek üzere dinamik şişme testlerini fosfat tamponu çözeltisi kullanarak gerçekleştirmiştir ve şişme değerlerinin zamana karşı artış gösterdikten belirli bir süre sonra sabitlendiklerini belirtmiştir.

p(AAm-ko-HEMA) hidrojelleri için gerçekleştirdiği şişme testinde ise hidrojellerin 1 gün geçtikten sonra dengeye ulaştıklarını göstermiştir [36].

#### **4.11. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Farklı Pankreatik Enzimler İçeren Tabletten Seçimli Olarak Ayrılması**

Ticari olarak satılan farklı pankreatik enzimleri içeren tabletin temin edilmesiyle tablet içerisinde  $\alpha$ -amilazın seçimli olarak ayrılması damgalı hidrojel kullanılarak test edildi. Tablet ilk olarak toz haline getirildi ve sonrasında 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponunda süspanse edildi. Çözünmeyen kısmın santrifüjlenmesinin ardından üst faz MIP ve NIP hidrojeller üzerine uygulandı ve geri bağlama çalışması yapıldı. Ardından hidrojeller 0.1 M pH 7,0 fosfat tamponu çözeltisiyle yıkanarak desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Her bir aşamada aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Sonuçlar Tablo 4.7’de görülmektedir.

Geri bağlama ve desorpsiyon çalışması sonrası yapılan aktivite ve protein tayini sonuçlarına göre MIP hidrojelden NIP hidrojele göre daha yüksek spesifik aktivitede enzimin geri kazanımı gerçekleşti. MIP ve NIP hidrojellerden desorpsiyon sonrası  $\alpha$ -amilaz spesifik aktivite değerleri sırasıyla 33,97 U/mg ve 30,56 U/mg olarak hesaplandı. MIP ve NIP hidrojeller üzerinde tutunan enzim spesifik aktivite değerlerine göre de hesaplanan % geri kazanım değerleri sırasıyla % 71 ve % 21 olarak bulundu.

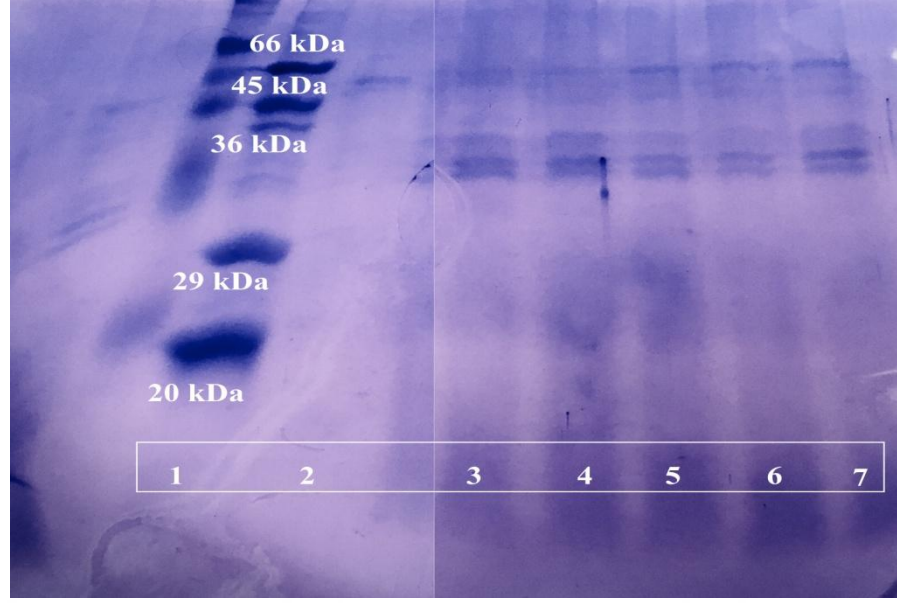
**Tablo 4.7.** Geri bağlama ve desorpsiyon çalışması sonrası yapılan protein ve aktivite tayinleri sonuçları

	Hidrojeller Üzerine Uygulanan Tablet Örneği			Geri Bağlama Sonrası Bağlanmayan Enzim (Üst Faz)		
	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<b>MIP Hidrojel</b>	188,5	0,88	214,2	167,8	0,446	190,6
<b>NIP Hidrojel</b>	188,5	0,88	214,2	159,3	0,600	181,0

	Hidrojeller Üzerine Tutunan Enzim (Hesaplanan)			Hidrojellerde Tutunan Enzimin Geri Alınması (Desorpsiyon)			% Geri Kazanım
	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	
<b>MIP Hidrojel</b>	20,7	0,434	47,69	29,9	0,0857	33,97	% 71
<b>NIP Hidrojel</b>	29,2	0,20	146	26,9	0,0747	30,56	% 21

#### 4.12. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi ile $\alpha$ -Amilaz Bağlama Spesifikliğinin Belirlenmesi

Farklı pankreatik enzimleri içeren tablet örneğinin MIP ve NIP hidrojeller üzerine uygulanması sonrası, MIP hidrojelin spesifikliği SDS-PAGE jel elektrofrezisi ile izlendi. Kuyucuklara tablet örneği, hidrojellere yapılan geri bağlama çalışması üst fazları (MIP ve NIP), desorpsiyon çalışması üst fazları (MIP ve NIP), protein standartları ve saf  $\alpha$ -amilaz enzimi uygulandı.



**Şekil 4.18.** SDS-PAGE jel elektroforezi; 1. Standart proteinler; Tripsin (20 kDa), Karbonik anhidraz (29 kDa), Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (36 kDa), Yumurta albümini (45 kDa), Sığır serum albümini (66 kDa) 2. Saf  $\alpha$ -amilaz, 3. Tablet örneğinin MIP'e uygulanan desorpsiyon üst fazı, 4. Tablet örneğinin NIP'e uygulanan desorpsiyon üst fazı, 5. Tablet örneğinin MIP'e uygulanan geri bağlama üst fazı, 6. Tablet örneğinin NIP'e uygulanan geri bağlama üst fazı, 7. Hidrojeller üzerine uygulanan tablet örneği,

7. kuyucukta farklı pankreatik enzimleri içeren tablet örneğinin protein profili görülmektedir. Farklı pankreatik enzimleri içerisinde bulunduran tabletin içerisinde  $\alpha$ -amilaz, lipaz ve proteaz olmak üzere bir enzim karışımı bulunmaktadır.  $\alpha$ -Amilaz damgalı ve damgasız hidrojeller (10 mg) üzerine tablet örneği uygulanmış ve 6. kuyucukta NIP hidrojele, 5. kuyucukta MIP hidrojele geri bağlama sonrası bağlanmayan proteinlerin profili görülmektedir. Burada bir miktar proteinin hidrojeller üzerinde tutunduğu görülmektedir. Hidrojeller üzerinde tutunan proteinlerin desorpsiyon işlemi ise 0,1 M pH 7.0 fosfat tamponu ile yapıldı. Desorpsiyon işlemi sonrasında örnekleri konsantre etmek için vakum altında kurutma işlemi uygulandı. 4. kuyucukta NIP hidrojel desorpsiyon örneği, 3. kuyucukta da MIP hidrojel desorpsiyon örneği protein profili görülmektedir. 2. kuyucukta ise damgalı hidrojel hazırlamada kullanılan saf  $\alpha$ -amilazın bantı görülmektedir.

Buna göre kıyaslama yapıldığında MIP hidrojel desorpsiyon örneğinde saf  $\alpha$ -amilaz bantının görüldüğü yerde protein bantının varlığı MIP hidrojelden  $\alpha$ -amilazın desorpsiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. NIP hidrojel desorpsiyon örneğinde ise saf  $\alpha$ -amilaz bantının görüldüğü yerde çok daha silik bir protein bantı görülmektedir. Burada damgalı (MIP) hidrojel üzerinde tutunan  $\alpha$ -amilaz enziminin damgasız (NIP) hidrojel üzerindeki göre daha fazla geri alınabildiği söylenebilir. Bununla birlikte hem MIP hem de NIP üzerinde proteaz enzimlerinin spesifik olmayan etkileşimlerle tutulduğunu gösteren protein bantları da görülmektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kalıp molekül  $\alpha$ -amilaz, monomer olarak HEMA, 1-VI, 4-VP, MAA, AAm, çapraz bağlayıcı MBA, reaksiyon başlatıcı APS, reaksiyon hızlandırıcı TEMED kullanılarak moleküler damgalama tekniği ile bir seri damgalı ve damgasız hidrojeller hazırlandı. Farklı monomerlerle hazırlanan hidrojellerin  $\alpha$ -amilaz geri bağlama etkinlikleri karşılaştırıldı ve damgalama etkinliği (*IF*) en yüksek olan AAm monomeri (*IF* 1,57) ile hazırlanan hidrojelin olduğu görüldü. Geri bağlama optimizasyon çalışmalarına bu hidrojel üzerinden devam edildi.

Hidrojellerin yapısal karakterizasyonlarını incelemek için FTIR ve SEM çalışmaları yapıldı. Hazırlanmış olan damgalı ve damgasız hidrojellerin fonksiyonel grupları FTIR analizi ile tespit edildi. Yüzey morfolojisi incelenmesi SEM analizi ile yapıldı. Yüzey görüntülerine göre MIP ve NIP hidrojellerin oldukça gözenekli bir yapıya sahip oldukları ve MIP hidrojelin yıkandıktan sonra yüzeyinin daha pürüzlü ve gözenekli hale geldiği görülmektedir.

**Tablo 5.1.**  $\alpha$ -Amilaz enziminin MIP ve NIP hidrojeller üzerine geri bağlama çalışmalarının optimizasyon sonuçları

	<b>MIP Hidrojel</b>	<b>NIP Hidrojel</b>
<b>Süre</b>	120 dk.	120 dk
<b>pH</b>	7.0	7.0
<b>Sıcaklık</b>	25°C	25°C
<b>Konsantrasyon</b>	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL

Adsorpsiyon izotermelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda MIP ve NIP hidrojeller için Langmuir ve Freundlich izoterm eşitlikleri hesaplandı. MIP ve NIP hidrojellerin adsorpsiyonunda korelasyon katsayıları ( $R^2$ ) incelendiğinde Langmuir korelasyon katsayısının Freundlich korelasyon katsayısından daha büyük olduğu için adsorpsiyonun Langmuir izotermine uygun olduğu görüldü.

MIP ve NIP hidrojellerin protein bağlama kapasiteleri (Langmuir) sırasıyla 6,7 mg/g ve 3,7 mg/g olarak bulundu ve adsorpsiyonda homojen bir şekilde dağılımın etkin olduğu görüldü.  $R_L$  değerleri MIP ve NIP için sırasıyla 0,997, 0,996 olarak hesaplandı ve bu değer  $0 < R_L < 1$  aralığında olması adsorpsiyonun elverişlilik durumunun sağlandığını gösterdi.

MIP ve NIP hidrojellerin adsorpsiyon kinetiklerinde hız basamaklarının belirlenmesi için iki farklı kinetik model üzerinde çalışma yapıldı. Buna göre yalancı birinci ve yalancı ikinci mertebe hız kinetiklerinin korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri incelendiğinde; yalancı birinci mertebe hız kinetiğinin MIP ve NIP için  $R^2$  değerleri 0,743 ve 0,946; yalancı ikinci mertebe hız kinetiğinin MIP ve NIP için  $R^2$  değerleri 0,990 ve 0,991 olarak hesaplandı. Buna göre yalancı ikinci mertebe kinetik modelinin  $R^2$  değerlerinin yalancı birinci mertebe kinetik modeline göre 1'e daha yakın olduğu ve geri bağlama kinetiğinin bu nedenden dolayı yalancı ikinci mertebe kinetiğine uyduğu görüldü.

Yapılan termodinamik hesaplar sonucunda, MIP hidrojeller için hesaplanan  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  ve  $\Delta G^\circ$  değerleri sırasıyla -123,76 kJ/mol, -0,415 kJ/mol ve -0,09 kJ/mol olarak bulundu.  $\Delta H^\circ$ 'ın negatif olması adsorpsiyonun ısı vererek gerçekleştiğini yani ekzotermik özelliğini açıklayan bir faktördür.  $\Delta S^\circ$ 'nin (adsorpsiyon entropisi) sıfırdan farklı olması adsorpsiyon sırasında taneciklerin yüzeyde tutunarak daha düzenli hale geldiğini ve  $\Delta G^\circ$  değerinin negatif çıkması tepkimenin kendiliğinden gerçekleşebileceğini ifade etmektedir.

MIP'lerin (damgalı hidrojel) en önemli avantajları oldukça dayanıklı ve tekrar tekrar kullanılabilir olmalarıdır. Hidrojellerin tekrar kullanılabilirliği, optimum koşullarda aynı hidrojellerin 7 kez tekrar kullanılmasıyla test edildi. 7 kez yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması sonrasında MIP ve NIP hidrojellerin sırasıyla % 70 ve % 60 oranında geri bağlama kapasitesini koruduğu gözlemlendi.

$\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojelin seçiciliğini incelemek amacıyla  $\alpha$ -amilazın ( $M_A$ : 55 kDa) dışında farklı proteinler ile (lipaz 48 kDa, BSA 66,5 kDa,  $\beta$ -glukozidaz 107 kDa) bağlanma ilgileri test edildi.



$\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojelin molekül kütlesine göre daha düşük ve daha yüksek molekül kütlesine sahip proteinlerle karşılaştırma yapılarak IF ve R değerleri hesaplandı.  $\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojellerin IF (qMIP/qNIP) değeri  $\alpha$ -amilaz için 1,57, BSA için 1,09,  $\beta$ -glukozidaz için 0,48, lipaz için 0,41 olarak bulundu. R değerlerine damgalı hidrojelin  $\alpha$ -amilaza olan seçimliliğinin diğer proteinlere göre daha yüksek olduğu görüldü.

$\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojellerin şişme karakterizasyonları incelendiğinde hidrojellerin şişme davranışlarının dengeye ulaşana kadar zamanla arttığı ve 120 dakika sonunda dengeye ulaştığı görüldü. MIP ve NIP hidrojellerin denge anındaki şişme değerleri sırasıyla % 20 ve % 18 olarak bulundu.

Proteinlerin buldukları kaynaktan izolasyonu ve saflaştırılması sırasında kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırmada kullanılan yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılarak protein saf halde veya safa yakın bir şekilde elde edilmektedir. Spesifik bir proteinin bir karışımdan izole edilebilmesi için bu proteinin kendine özgü fiziksel veya kimyasal özelliklerinin bilinmesi ve bu bilgiler doğrultusunda uygun saflaştırma yönteminin seçilmesi gereklidir. Her tür proteini saflaştırmak için tek ya da basit bir yöntem yoktur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle afiniteye dayalı ayırma yöntemlerinin protein saflaştırma işlem adımlarında uygulamaları artmıştır.  $\alpha$ -Amilaz damgalı hidrojellerin afinite materyali olarak kullanılabilirliği, ticari olarak satın alınan, farklı pankreatik enzimleri içeren tabletten,  $\alpha$ -amilazın seçimli olarak ayrılmasında test edildi. Aktivite ve protein tayinleri ile MIP ve NIP hidrojeller kullanılarak geri kazanılan  $\alpha$ -amilaz aktivitesi belirlendi. Örneklerin saflık kontrolü SDS-PAGE jel elektroforezi ile yapıldı.

## KAYNAKLAR:

- [1] Kadziola, A., Sùgaard, M., Svensson, B., Haser, R. "Molecular Structure of a Barley  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis". *Journal of Molecular Biology*. 1998, 278, 205-217.
- [2] Machius, M., Vertesy, L., Huber, R., Wiegand, G. "Carbohydrate and Protein-based Inhibitors of Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase: Structure Analysis and Comparison of Their Binding Characteristics". *Journal of Molecular Biology*. 1996, 260, 409-421.
- [3] Hmidet, N., Bayouth, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis NHI* cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 2008, 43, 499-510.
- [4] Rezzukoğlu, İ. Laktik Asit Bakterisinden  $\alpha$ -Amilaz İzolasyonu Ve Karakterizasyonu. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Diyarbakır, 2011, 65 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [5] Gary, D.B., Yaogand, L., Stephen, G.W. *Protein Science*. 1995, 4, 1730-1742, USA.
- [6] Öztolan, Ö.  $\alpha$ -Amilaz Dekstran Konjugatlarının Sentezi Ve Karakterizasyonu. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İstanbul, 2007, 70 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [7] Akhtar, M.F., Hanif, M., Ranjha, M.N. Methods of synthesis of hydrogels. . . A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016, 24(5), 554-559.
- [8] Altay, A. Hidrofobik Grup İçeren Poli (N-İzopropilakrilamid) Hidrojellerin Sentezi Ve Bunların Faz-Geçiş (Lcst) Sıcaklıklarının İncelenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya, 2010, 141 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [9] Kabiri, K., Zohuriaan-Mehr, M.J. Superabsorbent polymer materials: A review. *Iranian Polymer Journal*. 2008, 17(6), 451.
- [10] Devine, D.M., Higginbotham, C.L. The synthesis of a physically crosslinked NVP based hydrogel. *Polymer*. 2003, 44(26), 7851-7860.
- [11] Liu, J., Ying, X., Wang, H., Li, Xiao., Zhang, W. BSA imprinted polyethylene glycol grafted calcium alginate hydrogel microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016, DOI: 10.1002/app.43617.
- [12] Öncel, P. İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar. Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, 2013, 73 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [13] Wulff, G., Sarhan, A. Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1972, 11, 341-344.
- [14] Özdemir, A., Sidal, U. *Streptomyces Sp. Mc10* Suşunun Alfa Amilaz Üretim Kabiliyetinin Belirlenmesi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, C.B.U. *Journal of Science*. 2013, 9.1, 39 – 46.
- [15] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. "Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective". *Process Biochemistry*. 2003, 38, 1599-1616.
- [16] Aygan, A. Haloalkalofil *Bacillus Sp.* İzolasyonu, Amilaz, Selülaz Ve Ksilenz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2008, 186 s. (Doktora Tezi).
- [17] Pandey, A., Nigman, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2000, 31(2), 135-152.
- [18] Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 2002, 94(2), 137-155.

- [19] Tatar, S. Termofil Moderately Halofilik Bacillus Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2007, 95 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [20] Balkan, B. Katı Substrat Fermentasyonu İle Ham Nişastayı Parçalayan Yeni Bir Fungal Amilaz Üretimi, Saflaştırılması Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, 2008, 77 s. (Doktora Tezi).
- [21] Swift, H.J., Brady, L., Defwenda, Z.S., Dodson, J., Turkenburg, J. P. Acta Crystallographica Ssct. B V. 1991, 47, 535.
- [22] Quian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., Payan, F. “ The Active Center of a Mammalian  $\alpha$ -Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic  $\alpha$ -Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-Å”. Biochemistry. 1994, 33(20), 6284-6294.
- [23] Bush, D.S., Sticher, I., Huystee, R., Wanger, D., Jones, R.L. 1989, 264(32), 19392-19398.
- [24] İngiliz patenti no:1133046, 1968.
- [25] Chancharoonpong, C., Hsieh, Pao-Chuan., Sheu, Shyang-Chwen. Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. On Soybean Koji Fermentation. APCBEE Procedia 2012, 2, 57 – 61.
- [26] Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature 2005, 438(7071), 1157-61.
- [27] Masayuki, M., Osamu, Y., Katsuya, G. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. NCBI. 2008, 15(4), 173–183.
- [28] Hata Y., Ishida, H. Glucoamylase-encoding genes of *Aspergillus oryzae*—Monograph (in Japanese) Seibutsu-kogaku. Nos.n1. 2000, 78, 120–127.
- [29] Ward, OP., Qin, WM., Dhanjoon, J., Ye, J., Singh, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. Advances in Applied Microbiology. 2006, 58C, 1-75.
- [30] Durukan, H.B. Kimyasal Çapraz Bağlı Akrilamid/Sitrakonik Asit/Sodyum Akrilat Terpolimerlerinin Hazırlanışı, Karakterizasyonu ve Soğurum Özelliklerinin Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2007, 93 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [31] Devine, D.M., Higginbotham, C.L. The synthesis of a physically crosslinked NVP based hydrogel. Polymer. 2003, 44(26), 7851-7860.
- [32] Singh, A., Sharma, P.K., Garg, V.K., Garg, G. Hydrogels: A review. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010, 4(2), 97-105.
- [33] Bayraktar, İ. Manyetik Hidrojellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2013, 127 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [34] Balta, N. Akrilik Esaslı, İç İç Geçmiş Ağ Yapılı Polimerlerin (Ipn) Sentezi Ve Uygulamaları. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Programı, İstanbul, 2015, 90 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [35] Bal, A., Özkahraman, B., Gök, K.M., Acar, I. Sodyum Akrilat Esaslı Hidrojel ve Kriyojellerin Şişme, Adsorpsiyon ve Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi. 2014, 20(7), 258-265.
- [36] Sop, S.E. Doku Genişletme Amaçlı Hidrojel Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Kinetiği. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2013, 110 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [37] Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics. 2000, 50(1), 27-46.

- [38] Nam, K., Watanabe, J., Ishihara, K. Modeling of swelling and drug release behavior of spontaneously forming hydrogels composed of phospholipid polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, 275(1-2), 259-269.
- [39] Güney, H. Yüksek oranda şişebilen kimyasal çapraz bağlı akrilamid/itakonik asit hidrojenlerinde su ve model molekül soğurumunun temellerinin araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Aydın, 2006, 132 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [40] Datta, A. Characterization of polyethylene glycol hydrogels for biomedical applications. Thesis of Master of Science, Department of Chemical Engineering, India, 2007, 107 page, (Master of Science Thesis).
- [41] Peppas, N.A., Mikos, A.G. "Preparation methods and structure of hydrogels". *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. 1986, 1, 1-25.
- [42] Basan, S. "Polimer kimyası". Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları. Sivas, 2001, 60-128.
- [43] Özgündüz, H. İ. Akrilik Asit-Akrilamid-Poli(Vinil Alkol) İçeren Yarı-İpn Tipi Hidrojellerin Şişme Özellikleri Ve Lipaz Salım Davranışları. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006, 89 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [44] Kara, O. Kitosan, Akrilik Asit, Akrilamid, İtakonik Asit Ve Krotonik Asit Temelli Hidrojellerin Biyouyumluluklarının Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2008, 90 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [45] Tanaka, T. "Phase transition in polymer gels". *Scientific American*. 1985, 7, 110-112.
- [46] Deen, G.R., Santha, S. Influence of a new stiff crosslinker on the swelling of poly(N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate) hydrogels and silver nanocomposite. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2013, 62, 517-523.
- [47] Akçakaya, İ. İyonik Poli ( N,N Dimetilakrilamid-Ko-Akrilamid ) Hidrojellerinin Sentezi Ve Şişme Davranışları. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005, 3-5, 13-17. (Yüksek Lisans Tezi).
- [48] Demircan, E. Elucidation of the state of water in hydrogels. Thesis for Degree of Master of Science, Marmara University, Institute For Graduate Studies in Pure and Applied Sciences, 2006.
- [49] Ekren, H. Boyarmadde Soğurumu İçin Çapraz Bağlı Terpolimer Sentezi ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2015, 95 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [50] Gökalp, A. Gözenekli, iyonik süper absorban polimer jellerin hazırlanması ve karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Programı, İstanbul, 2009, 114 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [51] Hiemenz, P.C. *Polymer chemistry - the basic concepts*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 1984, 1-72.
- [52] Park, K., Shalaby, S.W.W., Park, H. "Biodegradable hydrogels for drug delivery" . Technomic Publishing Co. Inc. 1993, 1-12, 35-66.
- [53] Swami, S.N. "Radiation Synthesis of Polymeric Hydrogels for Swelling-Controlled Drug Release Studies". Doctor of Philosophy, University of Western Sydney New South Wales, 2004, Australia 188.
- [54] Zhang, J., Peppas, N.A. "Synthesis and characterization of pH and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylamide) interpenetrating polymeric Networks". *Macromolecules*. 2000, 33(1), 102-107 .
- [55] Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 2008, 33(11), 1088-1118.
- [56] Evcin, A. Polimer Malzemeler Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2017. <http://blog.aku.edu.tr/evcin/files/2017/05/10-polimer-uygulamalar> (01.04.2018).

- [57] Sahiner, N., Ozay, O., Aktas, N. The Removal of Cyanide Ions from Aquatic Environments by Quaternizable p(4-VP) Hydrogels of Different Dimensions. *Water Air Soil Pollution*. 2013, 224, 1393-1394.
- [58] Uysal, G. "Poli(vinil eter) bazlı ampifilik hidrojellerin sentezi ve kontrollü ilaç salım uygulamaları". Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001, 5-7. (Yüksek Mühendislik Tezi).
- [59] Mullarney, M.P., Seery, T.A., Weiss, R.A. Drug diffusion in hydrophobically modified N,N-dimethylacrylamide hydrogels. *Polymer*. 2006, 47(11), 3845-3855.
- [60] Gils, P.S., Ray, D., Mohanta, G.P., Manavalan, R., Sahoo, P.K. Designing of new acrylic based macroporous superabsorbent polymer hydrogel and its suitability for drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2009, 1, 43-54.
- [61] Gehrke, S.H., Cussler, E.L. Mass transfer in pH-sensitive hydrogels. *Chemical Engineering Science*. 1989, 44, 559-566.
- [62] Asıl, D. Kitosan-Polikrilik asit-Polisitronik asit içeren yarı ipn tipi hidrojellerin şişme özellikleri ve flukanazol salım davranışlarının incelenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2006, 105 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [63] Lin, C.C., Metters, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, 58(12), 1379-1408.
- [64] Wulff, G. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1995, 34(17), 1812-1832.
- [65] Mosbach, K., Ramström, O. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. *Biotechnology*. 1996, 14, 163-170.
- [66] Yan H., Row, H.K. Characteristic and synthetic approach of molecular imprinted polymer. *International Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2006, 7, 155-178.
- [67] Wulff, G., Poll, H.G. Enzyme-analog built polymers.23. Influence of the structure of the binding-sites on the selectivity for racemic-resolution. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1987, 188(4), 741-748.
- [68] Andersson, L.I. Molecular imprinting: Developments and Applications in the Analytical Chemistry Field. *Journal of Chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 2000, 745(1), 3-13.
- [69] Sellergren, B., Allender, C.J. Molecularly imprinted Polymers: A bridge to Advanced Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, 57(12), 1733-1741.
- [70] Sellergren, B. Enantiomer Separation Using Tailor-Made Phases Prepared by Molecular imprinting. *Practical Approach Chiral Separation Liquid Chromatography*. 1994, 69-93.
- [71] Spivak, A.S. Optimization, evaluation and characterization of molecularly Imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, 57(12), 1779-1794.
- [72] Cormack, P.A.G., Mosbach, K. Molecular imprinting: recent developments and the road ahead. *Reactive and Functional Polymers*. 1999, 41(1-3), 115-124.
- [73] Esteban, M.A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2001, 370(7), 795-802.
- [74] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis And Characterisation. *Journal Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and life sciences*. 2004, 804(1), 173-182.
- [75] David, R.K., Peppas, N.A. Mimicking biological delivery through feedback-controlled drug release systems based on molecular imprinting. *AIChE Journal. American Institute of Chemical Engineers*. 2009, 55(6), 1311-1324.
- [76] Öncel, P. İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar. Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, 2013, 73 s. (Yüksek Lisans Tezi).

- [77] Okutucu, B. Serotonin'e Spesifik Moleküler Damgalı Polimerlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, 2007, 172 s. (Doktora Tezi).
- [78] Dinçer, A. Glutatifonun Seçimi Ayırım ve Tayinine Yönelik Moleküler Damgalı Polimerlerin Hazırlanması ve Kromotografik Karakterizasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, 2007, 156 s. (Doktora Tezi).
- [79] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KgaA. Journal of the American Chemical Society. 2004, 126(3), 981-982.
- [80] Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R. Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance. Biosensors and Bioelectronics. 2005, 20(11), 2197-2202.
- [81] Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I. Molecular imprinting for bio and pharmaceutical analysis. Trends in Analytical Chemistry. 1999, 18(3), 146-154.
- [82][https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4444/mod\\_resource/content/0/11.%20hafta.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4444/mod_resource/content/0/11.%20hafta.pdf) (11.04.2018).
- [83] <https://docplayer.biz.tr/6629253-Sodyum-dodesil-sulfat-poliakrilamid-jel-elektroforezi-ile-proteinlerin-analizi.html> (22.04.2018)
- [84] Shaw, R.C., Prasad, R. Starch Gel Electrophoresis of Enzymes- A Compilation of Recipes. Biochemical Genetics. 1970, 4(2), 297-320.
- [85] Berkelman, T. Mini PROTEAN TGX Gel: A Versatile and Robust Laemmli-Like Procast Gel for SDS-PAGE. Chengjun Sun, Bio-Rad Laboratories. Inc.6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547.
- [86][https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/20613/mod\\_resource/content/0/Biyoteknoloji-de%20Kullan%C4%B1lan%20Y%C3%B6ntemler-II.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/20613/mod_resource/content/0/Biyoteknoloji-de%20Kullan%C4%B1lan%20Y%C3%B6ntemler-II.pdf) (16.04.2018).
- [87] Zihnioğlu, F. Protein saflaştırması ve karakterizasyonu elektroforetik yöntemler. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme, İzmir, 1996, 150.
- [88] Freeman, S., Herron, J.C. Evolutionary Analysis. Prentice-Hall. Inc. 2001., ISBN: 0-13-017291-X.
- [89] Gündürü, U. Batı karadeniz ve Trakya' da yayılıs gösteren *mus* l., 1758 (mammalia: rodentia) cinsinin allozim varyasyonları. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2008, 59 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [90] Enez, B. *Geobacillus Stearothermophilus*' Tan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin İzolasyonu, Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, 2011, 74 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [91] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry. 1976, 72, 248-254.
- [92] Bernfeld, P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$  Meth., Enzymology. 1955, 1, 149-158.
- [93] Gürellier, R. Sularda Düşük Derişimlerde Bulunan Uranyumun Polimerik Adsorbanla Tutulmasının Kinetik İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2004, 64 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [94] Muslu, Y. Çözümlü Problemlerle Temel Prosesler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 2000.
- [95] Dakıky, M., Khamıs, M., Manassra, A., Mer'eb, M. Selective Adsorption Of Chromium (VI) In Industrial Wastewater Using Low-Cost Abundantly Available Adsorbents. Advances In Environmental Research. 2002, 6(4), 533-540.
- [96] Nollet, H., Roels, M., Lutgen, P., Van Der Meeren, P., Verstraete, W. Removal Of Pcb's From Wastewater Using Fly Ash. Chemosphere. 2003, 53(6), 655-665.

- [97] Ho, Y.S., McKay, G. Pseudo-Second Order Model For Sorption By Peat. *Chemical Engineering Journal*. 1999, 70(2), 115-124.
- [98] Hawkins, M. D., Stevenson, D., Reddy, M.S. Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs). *Analytica Chimica Acta*. 2005, 542(1), 61–65.
- [99] Yu, C., Mosbach, K. Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group. *Journal of Molecular Recognition*. 1998, 11(1-6), 69–74.
- [100] Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., Logue, M.W. *Organik Kimya* (Ed: Prof.Dr Tahsin Uyar), Güneş Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2001, 1170 s.
- [101] Eker, E. Lantanborat Bileşiminin Katı Hal Yöntemi İle Sentezi ve Karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2006, 76 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [102] Beşergil, B. *Polimer Kimyası*. Gazi Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2003, 568 s.
- [103] Verheyen E., Schillemans, P.J., Wijk, V.M., Demeniex, M.A., Hennink, E.W., Nostrum van, F.C. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*. 2011, 32(11), 3008-3020.
- [104] Çorman, E.M. Moleküler Baskılanmış Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu Ve Lizozim Saflaştırılmasında Kullanılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2010, 75 sayfa. (Yüksek Lisans Tezi).
- [105] Benefield, L.D., Judkins, J.F., Weand, B.L. *Process Chemistry For Water And Wastewater Treatment*. Prentice-Hall. Inc, Englewood Cliffs. 1982, New Jersey. ISBN: 0137229755.
- [106] Chiou, M.-S., Li, H.-Y. Equilibrium And Kinetic Modeling Of Adsorption Of Reactive Dye On Cross-Linked Chitosan Beads. *Journal Of Hazardous Materials*. 2002, 93(2), 233-248.
- [107] Zhao, K., Chen, T., Lin, B., Cui, W., Kan, B., Yang, N., Zhou, X., Zhang, X., Wei, J. Adsorption and recognition of protein molecular imprinted calcium alginate/polyacrylamide hydrogel film with good regeneration performance and high toughness. *Reactive and Functional Polymers*. 2015, 87, 7–14.
- [108] Ho, Y.S., Wang, C.C. Pseudo-Isotherms For The Sorption Of Cadmium Ions Onto Tree Fern. *Process Biochemistry*. 2004, 39, 761-765.
- [109] Waranusantigul, P., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E. S. Kinetics Of Basic Dye (Methylene Blue) Biosorption By Giant Duckweed (*Spirodela Polyrrhiza*). *Environmental Pollution*. 2003, 125(3), 385-392.
- [110] Pang, X., Cheng, G., Zhang, Y., Lu, S. Soft-Wet Polyacrylamide Gel Beads With The Imprinting Of Bovine Serum Albumin. *Reactive and Functional Polymers* 2006, 66, 1182–1188.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Şeyda DİNSEVER

Doğum Yeri ve Yılı : Konak/İzmir, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : seydadnsever@hotmail.com

### **Eğitim Durumu**

Lise : Sıdıka Rodop Lisesi, 2011

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, 2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, 2018