T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN SCNP TABANLI YENİ POLİMER MATRİKS SENTEZİ

Fatma Nur ÇÖLMEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Fizikokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Demet KARACA BALTA

Mart, 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN SCNP TABANLI YENİ POLİMER MATRİKS SENTEZİ

Fatma Nur ÇÖLMEK tarafından hazırlanan tez çalışması 12.03.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Demet KARACA BALTA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Demet KARACA BALTA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Hale OCAK GÜMRÜKÇÜ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Ece ÖZDEMİR BABAVATAN, Üye
İstanbul Aydın Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Demet KARACA BALTA sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Enzim İmmobilizasyonu için SCNP Tabanlı Yeni Polimer Matriks Sentezi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fatma Nur ÇÖLMEK

İmza

Bu çalışma, BİDEB 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.



Aileme

TEŞEKKÜR

Lisans hayatımın en büyük şansı sizin öğrenciniz olmaktı ve sonrasında yüksek lisans ile devam eden bu yolculuğumda, bana hep inandığınız güler yüzünüzle ve sabrınızla her zaman yanımda olduğunuz için çok teşekkür ederim. Bu süreçte benden bilginizi, emeğinizi ve tecrübelerinizi esirgemediğiniz ve karakterinizle bana ilham olduğunuz için öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Demet KARACA BALTA'ya çok teşekkür ederim.

Değerli hocam Arş. Gör. Nilay ALTAŞ PUNTAR, bu süreçte bilginizi, desteğinizi ve tecrübelerinizi benden esirgemediğiniz için çok teşekkür ederim.

Bilgisini ve donanımını benden esirgemeyen hocam Prof. Dr. İ. Gökhan TEMEL' e çok teşekkür ederim.

Analizlerimin karakterizasyonu konusunda bana çokça yardımcı olan BezmiAlem Vakıf Üniversitesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Binnur Aydoğan TEMEL'e çok teşekkür ederim.

Değerli hocam Arş. Gör. Deniz KILIÇ ÖZTÜRK, bana sadece bir hoca değil aynı zamanda bir abla olduğunuz, hem akademik hayatımda hem sosyal hayatımda yolumu aydınlattığınız, tüm sorularıma sabırla cevap verdiğiniz ve düşmeme izin vermediğiniz için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim, canım annem Şaduman ÇÖLMEK, canım babam İbrahim ÇÖLMEK, canım abim Enes ÇÖLMEK, canım kardeşim Mustafa Talha ÇÖLMEK, sevgili yengem Mediha ÇÖLMEK ve varlığıyla hayatıma umut ve mutluluk getiren canım yeğenim Tuana Asel ÇÖLMEK'e çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimde tanışma şansı yakaladığım benim canım iyikim Buse ÖZSAN, seninle birlikte büyümek, anılar biriktirmek, birlikte gülebilmek o kadar kıymetliki. Bu zorlu süreçte beni yalnız bırakmadığın, nefes almamı sağladığın ve bana kız kardeş olduğun için sana çok teşekkür ederim.

Birlikte büyüdüğüm canım kuzenim Dr. Şeyma KURU, her zaman yanımda olduğun, güleryüzünle düşmeme izin vermediğin ve benim kız kardeşim olduğun için sana çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim sırasında BİDEB 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında sağladığı burs için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Fatma Nur ÇÖLMEK

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ **x**
KISALTMA LİSTESİ **xii**
ŞEKİL LİSTESİ **xiii**
TABLO LİSTESİ **xv**
ÖZET **xvii**
ABSTRACT **xviii**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
2 POLİMER KİMYASI **4**
2.1 Polimerlerin Sınıflandırılması 5
2.2 Polimerizasyon Reaksiyonları 8
2.2.1 Kondenzasyon (Basamaklı) Polimerizasyon…….. 8
2.2.2 Katılma (Zincir) Polimerizasyonu…….. 9
2.2.3 Halka Açılma Polimerizasyonu…… 17
2.3 Fotopolimerizasyon 18
2.3.1 Fotokimya…… 19
2.3.2 Elektronik Geçişler……... 20
2.3.3 Fotobaşlatıcılar…….....21
2.3.4 Fotopolimerizasyon Reaksiyonlarında Kullanılan Işık Kaynakları..23
2.3.5 Oksijenin Geciktirici Etkisi……...24
2.4 Polimerik Nanopartiküller 24
2.4.1 PNP'lerin Avantajları…… 26
2.4.2 PNP' lerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler……...26
2.4.3 PNP' lerin Hazırlanma Yöntemleri.....27

2.4.4 Tek Zincirli polimer Nanoparçacıklar (SCNP)……27

2.5 Jeller 35

2.5.1 Polimerik Jeller……36

2.5.2 Hidrojeller……36

3 ENZİMLER **42**

3.1 Enzim Aktivitesi 43

3.2 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler 43

3.2.1 Substrat ve Enzim Konsantrasyonu……..43

3.2.2 Sıcaklık…… 43

3.2.3 pH……..44

3.3 Enzim Aktivitesi 44

3.3.1 Üreaz Kaynakları…….. 45

3.3.2 Üreaz Kullanım Alanları……...45

3.3.3 Üreaz Enzimi ile Yapılmış Çalışmalar…… 46

3.4 Enzim İmmobilizasyonu 49

3.4.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri……..50

3.4.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırması……52

3.5 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri..... 53

4 MATERYAL ve YÖNTEM **54**

4.1 Kullanılan Kimyasallar 54

4.2 Kullanılan Cihazlar 56

4.3 Kullanılan Yöntemler..... 57

4.3.1 Destek Materyallerinin Sentezi…….57

4.3.2 Kullanılan Metodlar……..65

4.3.3 Serbest Enzim Çözeltisinin Hazırlanması…….70

4.3.4 İmmobilize Enzimin Aktivite ve Protein Tayini……...69

4.3.5 Üreaz' ın Destek Materyallerine İmmobilizasyonu……..70

4.3.6 İmmobilize Üreaz İçin Enzim Aktivitesi Yöntem Optimizasyonu...76

5 SONUÇ **77**

KAYNAKÇA **80**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **90**

SİMGE LİSTESİ

c	Işık Hızı
E	Fotonların Her Birinin Enerjisi
h	Planck sabiti
Mn	Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı
Tg	Camsı Geçiş Sıcaklığı
λ	Dalga Boyu
ύ	Dalga Sayısı
υ	Frekans

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AIBN	Azobisizobütironitril
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
BPO	Benzoil Peroksit
C\LR	Kontrollü/Yaşayan Radikal
$CDCl_3$	Dötoro Kloroform
CLRP	Kontrollü “Yaşayan” Radikal Polimerizasyon
CMS	Klorometilstiren
CRP	Kontrollü Radikal Polimerizasyonu
Cu	Bakır
DLS	Dinamik Işık Saçılım Spektroskopisi
DMF	Dimetilformamid
DODT	3,6-dioksa-1,8-oktanditiol
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
GMA	Glisidil Metakrilat
GPC	Principal Components Analysis
HOMO	En Yüksek Dolu Moleküler Orbital
IPN	İç içe Geçmiş Polimerik Hidrojeller
İmm	İmmobilizasyon
LED	Işık Yayan Diot
LUMO	En Düşük Boş Moleküler Orbital
MO	Moleküler Orbital
NMP	Nitroksi Aracılıklı Polimerizasyon
NP	Nanopartikül
P	Fosfor
PDI	Polidispersite
PNP	Polimerik Nanopartiküller

RAFT	Tersinir Eklenme Parçalanma Zincir Transfer Polimerizasyonu
ROMP	Halka Açılma Polimerizasyonu
S	Kükürt
SCF	Süperkritik Akışkan
SCNP	Tek Zincirli Polimer Nanoparçacık
SEC	Boyut Ayıklama Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Si	Silisyum
SRP	Serbest Radikal Polimerizasyonu
St	Stiren
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEMPO	2,2,6,6- tetrametil-1-piperidiniloksil
TH	Temel Hal
THF	Tetrahidrofuran
UH	Uyarılmış Hal
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Polimerlerin kullanım alanları……...**4**
Şekil 2.2 Fiziksel yapısına göre polimerler……...**6**
Şekil 2.3 Termoset ve termoplastik polimer örnekleri……..**7**
Şekil 2.4 Polimerlerin monomer yapısına göre sınıflandırılması……..**7**
Şekil 2.5 Polimerizasyon reaksiyonları……**8**
Şekil 2.6 AIBN ve BPO' nun şekli……..**10**
Şekil 2.7 Benzoil peroksit parçalanması ve radikal oluşumu……..**10**
Şekil 2.8 Serbest radikal polimerizasyonu başlama aşaması……...**10**
Şekil 2.9 Serbest radikal polimerizasyonu çoğalma aşaması……..**11**
Şekil 2.10 Serbest radikal polimerizasyonu birleşme ile sonlama basamağı……...**11**
Şekil 2.11 Serbest radikal polimerizasyonu orantısız sonlama basamağı……..**12**
Şekil 2.12 ATRP mekanizması [27]……..**14**
Şekil 2.13 RAFT mekanizması……..**15**
Şekil 2.14 NMP mekanizması……**16**
Şekil 2.15 TEMPO'nun yapısı……...**16**
Şekil 2.16 ROMP mekanizması……**18**
Şekil 2.17 Fotopolimerizasyon şeması [40]……...**19**
Şekil 2.18 Elektromanyetik spektrum……**20**
Şekil 2.19 Elektronik geçişlerin kuramsal enerji diyagramında gösterimi……**21**
Şekil 2.20 2,2-dimetoksi-1,2-difenil-etan-1-on ve Metoksibenzil radikalinin uv ışık altında ayrışmaları……...**22**
Şekil 2.21 Norish tip II başlatıcı ile alkil amino radikalleri oluşumu……**23**
Şekil 2.22 Organik ve inorganik nanopartiküller [53]……**25**
Şekil 2.23 Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan çeşitli tekniklerin şematik gösterimi [54]……..**27**
Şekil 2.24 A) SCNP sentezinin şematik gösterimi [57] (B) Bir polimer zincirinin molekül içi çapraz bağlanması için modlar [58]……...**28**

Şekil 2.25 SCNP'lerin sentezi için kullanılan dört stratejinin şematik gösterimi a) Bir homo-fonksiyonel zincir çökmesi; b) Hetero-bifonksiyonel zincir çökmesi; c) Çapraz bağlayıcı aracılı zincir çökmesi; d) İki bloklu veya üç bloklu kopolimerlerin tek blok çökmesi……..**30**

Şekil 2.26 SCNP uygulama alanları……**35**

Şekil 2.27 Hidrojelin ağ yapısı……**37**

Şekil 2.28 Kimyasal ve fiziksel hidrojel oluşumu [78]……...**39**

Şekil 2.29 Hidrojel kullanım alanları [81]……..……**41**

Şekil 3.1 Haloenzim ve apoenzim yapısı……..**42**

Şekil 3.2 Üreazın üç boyutlu yapısı …...……...**44**

Şekil 3.3 Enzim immobilizasyon yöntemleri……**50**

Şekil 4.1 NMP tekniği kullanılarak PSCMST kopolimer sentezi……..**57**

Şekil 4.2 PSCMST' nin $CDCl_3$' de alınan ^{1}H-NMR spektrumu……**58**

Şekil 4.3 DODT varlığında PSCMSDT sentezi…….....**59**

Şekil 4.4 PSCMSDT' nin $CDCl_3$' de alınan ^{1}H-NMR spektrumu……..**59**

Şekil 4.5 Sentezlenen PSCMSDT ve öncül polimerinin THF içerisinde alınan GPC kromatogramları **60**

Şekil 4.6 PSCMST ve PSCMSDT polimerlerinin DSC grafikleri……....**61**

Şekil 4.7 Amberlisit 15 varlığında GPSCMDT sentezi…….....**61**

Şekil 4.8 GPSCMDT' nin $CDCl_3$'de alınan ^{1}H-NMR spektrumu…….....**62**

Şekil 4.9 GPSCMDT, PSCMSDT, GMA ve DODT' un FT-IR spektrumları**.....63**

Şekil 4.10 Coomassie Blue G-250 boyasının proteine bağlanarak renkli kompleks oluşturması **66**

Şekil 4. 11 Standart protein eğrisi……..……**67**

Şekil 4. 12 Amonyum sülfat eğrisi……....**69**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler**…….26**
Tablo 2. 2 Hidrojellerin sınıflandırılması**……...38**
Tablo 3. 1 İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması**……...42**
Tablo 4. 1 Kullanılan kimyasallar**……..54**
Tablo 4.2 Kullanılan cihazlar**…….56**
Tablo 4.3 Hidrojel formülasyonları**……....64**
Tablo 4.4 GMA monomeri ile hazırlanan hidrojel formülasyonları**……..65**
Tablo 4.5 Üreaz' ın aktivite tayin yöntemi**…….68**
Tablo 4.6 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 25^{o}C, 12 saat inkübasyonu**….71**
Tablo 4.7 (%20' lik) Hidrojellere üreaz enziminin 25^{o}C, 12 saat inkübasyonu**…..71**
Tablo 4.8 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 25^{o}C, 24 saat inkübasyonu**….72**
Tablo 4.9 (%20' lik) Hidrojellere üreaz enziminin 25^{o}C, 24 saat inkübasyonu**….72**
Tablo 4.10 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 37^{o}C, 12 saat inkübasyonu**.73**
Tablo 4.11 (%20' lik) Hidrojellere üreaz enziminin 37^{o}C, 12 saat inkübasyonu**…74**
Tablo 4.12 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 37^{o}C, 24 saat inkübasyonu**...74**
Tablo 4.13 (%20' lik) Hidrojellere üreaz enziminin 37^{o}C, 24 saat inkübasyonu**…75**
Tablo 4.14 Hidrojellere 10, 20, 30 dk inkübasyon sonucu % verim değerleri**…….76**
Tablo 5.1 Sentezlenen polimerlerin GPC, DSC ve DLS sonuçları**……...78**

ÖZET

Enzim İmmobilizasyonu İçin SCNP Tabanlı Yeni Polimer Matriks Sentezi

Fatma Nur ÇÖLMEK

Kimya Anabilim Dalı
Fizikokimya Programı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Demet KARACA BALTA

Polimer biliminde son yirmi yılda gelişmekte olan ve günümüzde hızla büyüyen bir araştırma konusu olan tek-zincir polimer nanopartiküller (SCNP) 2001 yılında Mecerreyes, Hawker ve Miller tarafından ortaya atılan ve polimer zincirlerinin ayrı ayrı zincir içi çapraz bağlanma yoluyla nanoyapıların çökmesi veya katlanması ile oluşan yeni bir yöntemdir.

SCNP' lerin yakın gelecekte, spesifik ve biyomedikal uygulamalar için benzersiz özelliklerinden dolayı ilaç nanotaşıyıcıları olarak büyük bir etkisi olacağı gibi başlıca kullanım alanları peptitlerin hızlı hücresel alımını kolaylaştıran ilaç verme sistemleri, polimerik bileşiklerin reolojik özelliklerini ayarlamak için ajan olarak, antimikrobiyal ajanlar, sensörler, göz mercek implantları, ilaç konjugatları, görüntüleme ajanları olarak sayılabilir.

Enzimler, canlı hücrelerde kimyasal reaksiyonları hızlandırarak aktivasyon enerjisini düşüren ve genellikle protein yapısına sahip biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin endüstriyel kullanımında bazı zorluklarla karşılaşılabilmektedir. Enzimler, farklı endüstriyel sektörlerin karmaşık üretim süreçlerini kolaylaştırmak

amacıyla uzun bir süredir kullanılmaktadır. Günümüzde, sürdürülebilir üretim süreçlerine olan ihtiyaç, enzimlerin çeşitli endüstriyel alanlarda katalizör olarak kullanılmasını önemli ölçüde artırmıştır.

İmmobilize enzim terimi, belirli bir uzayda katalitik aktivitesini sürdürebilecek şekilde hapsedilmiş veya yerleştirilmiş enzimleri tanımlar. Bu sayede, bu enzimler sürekli ve tekrar tekrar kullanılabilir hale gelir. Enzim immobilizasyonunun ana amacı, reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilen ve tekrar kullanılabilen enzim formülasyonlarının elde edilmesidir.

Enzimler, suya çözünmeyen katı bir destek üzerine fiziksel veya kimyasal bağlarla yerleştirilerek veya mikrokapsüller içinde tutularak immobilize edilirler. İmmobilizasyon yönteminin başarısında, kullanılan taşıyıcının özellikleri de önemli bir rol oynamaktadır. İmmobilize enzim reaktörleri birçok kolaylık sağlasa da, taşıyıcı malzemelerin yüksek maliyeti nedeniyle immobilize enzimlerin geniş çapta kullanım alanı henüz sınırlıdır.

Bu çalışmada, optimum konsantrasyon ve şartlarda üreaz enziminin immobilizasyonu sırasında kullanılmak üzere SCNP içeren jellerin sentezlenmesi hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda yan zincirinde SCNP içeren glisidil metakrilat monomerinin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Sentezlenen monomerin etilenglikol dimetakrilat beraberinde hazırlanan hidrojeli, üreaz enziminin adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonu amacıyla taşıyıcı (destek materyali) olarak kullanıldı ve optimum koşullar belirlendi.

Anahtar Kelimeler: SCNP, Enzim İmmobilizasyonu, Nanoparçacık

ABSTRACT

SCNP-Based New Polymer Matrix Synthesis For Enzyme Immobilization

Fatma Nur ÇÖLMEK

Department of Chemistry

Master of Science

Supervisor: Prof. Dr. Demet KARACA BALTA

Single-chain polymer nanoparticles (SCNP), which has been developing in polymer science in the last twenty years and is a rapidly growing research topic today, was introduced by Mecerreyes, Hawker and Miller in 2001. It is a new method that consists of collapsing or folding nanostructures through individual intra-chain cross-linking of polymer chains.

SCNPs will have a great impact in the near future as drug nanocarriers due to their unique properties for specific and biomedical applications, as drug delivery systems that facilitate rapid cellular uptake of peptides, as agents to adjust the rheological properties of polymeric compounds, antimicrobial agents, sensors, eye lenses. implants, drug conjugates, imaging agents.

Enzymes are biological catalysts, mostly protein in nature, that accelerate chemical reactions in living cells by reducing the activation energy. Some problems are encountered during the use of enzymes in the industrial field. Enzymes have long been used to facilitate complex production steps/procedures in various industrial sectors. Nowadays, the demand for sustainable processes has greatly increased the application of enzymes as catalysts in various industrial sectors.

The term immobilized enzyme refers to enzymes that are confined or positioned in a defined space region in a way that preserves their catalytic activity, thus can be used continuously and repeatedly. The main goal of enzyme immobilization is to

create reusable enzyme preparations that can be easily separated from the reaction medium.

In this study, it was aimed to synthesize gels containing SCNP to be used during the immobilization of urease enzyme at optimum concentration and conditions. In line with this aim, the synthesis and characterization of glycidyl methacrylate monomer containing SCNP in its side chain was carried out. The hydrogel of the synthesized monomer prepared with ethyleneglycol dimethacrylate was used as a carrier (support material) for the immobilization of urease enzyme by adsorption method and optimum conditions were determined.

Keywords: SCNP, Enzyme Immobilization, Nanoparticle

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Nanoteknoloji alanındaki araştırmalar, maddenin yapısı hakkında eksik bilgilerin tamamlanmasına yardımcı olur, yeni uygulama alanları yaratır ve endüstriyel kullanımda yüksek kar elde etme potansiyeli sunar. Bu sebeplerle, nanoteknoloji, fizik, kimya, sağlık, gıda, elektronik, iletişim, mühendislik, enerji üretimi, tekstil ve ilaç gibi birçok bilim dalında en fazla tercih edilen konulardan biri haline gelmiştir. Polimerik nanopartiküller (NP'ler), 1 ila 100 nm aralığındaki partiküllerdir. Bu nanopartiküller, etkin maddelerin partikül içinde çözüldüğü, hapsedildiği ya da yüzeylerine adsorbe edilip bağlandığı matris sistemleri olarak işlev görür [1].

Tek zincirli polimerik nanopartiküller (SCNP), son zamanlarda nanobilim ve nanoteknolojide olağanüstü ve bazen benzersiz özellikleri nedeniyle öne çıkan ve molekül içi bağlanma yoluyla belirli bir dereceye kadar çökmüş bireysel polimer zincirlerinden oluşan tek moleküllü yumuşak nano nesnelerdir [2].

SCNP'ler, (ko)polimer zincirlerinin yüksek seyreltilmiş ortamlarda, kovalent, kovalent olmayan ya da dinamik kovalent bağlarla zincir içi çapraz bağlanması ile elde edilir [3]. Eğer ortam koşulları ultra seyreltik değilse, zincir içi bağlanma yerine zincirlerarası bağlanma meydana gelir. Zincir içi çapraz bağlama, kovalent, dinamik kovalent ve kovalent olmayan bağlanma yöntemleriyle sağlanır. Bu bağlanmalar, hidrojen bağları, metal ligasyonu, fotodimerizasyon, siklo-eklemeler, disülfit oluşumu ve tık kimyası gibi tekniklerle gerçekleştirilmiştir [4].

Tek zincirli polimer nanopartiküllerinin birkaç başka kullanımı da araştırılmıştır: mikroelektronik uygulamalar için gözenek oluşturucular; biyobilim için fonksiyonel nanopartiküller; geri dönüşümlü hidrojeller; reoloji değiştiriciler;

yüzey aktif maddeler; çözünmeyen supramoleküler filmler; ve tüm polimer nanokompozitler [5].

Enzimler, biyokimyasal süreçleri hızlandıran ve çoğunlukla protein yapısına sahip olan moleküllerdir. İmmobilize enzimler, belirli bir ortamda hapsolarak katalitik aktivitelerini korurlar. Bu enzimlerin özellikleri, kullanılan immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı tipine bağlı olarak değişir [6].

Tıbbi amaçlı uygulamalar için immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesinde en çok tercih edilen enzimlerden biri üreazdır. Üreaz, bağıl olarak düşük maliyetli, dayanıklı ve kolay izlenebilir olmasıyla öne çıkar. Ayrıca, kanda ve idrarda üre düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanıldığı için bu özellikler, üreazın seçilmesinde önemli rol oynamaktadır [7]. Üreaz için kullanılan en önemli immobilizasyon yöntemlerinden biri, adsorpsiyon yöntemidir. Bu yöntem, enzimin katı bir destek materyaline adsorbe edilmesiyle gerçekleştirilir. Bu süreç, zayıf bağlar (Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik kuvvetler) üzerinden gerçekleşen adsorpsiyon mekanizmalarına dayanır.

Enzim immobilizasyonunda farklı destek materyalleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında polimerik nanopartiküller sıklıkla tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan destek materyallerindendir. Polimerik jeller, sıvı ve katı arasında geçiş yapabilen, çok yönlü çapraz bağlı makromoleküler ağlardır. Böyle bir polimerik ağ, sıvı moleküllerle dolduğunda şişmiş bir yapı oluşturmakta ve bu sıvı su olduğunda polimerik jel, hidrojel olarak adlandırılmaktadır [8]. Enzim taşıyıcı materyallerinin boyutunun küçülmesi, genellikle immobilize enzimlerin etkinliğini artırır. Küçük partiküller, yüzeye bağlanma sırasında daha geniş bir yüzey alanına sahip olduklarından, enzimin materyale tutunabilmesi için daha fazla alan sağlarlar. Bu durum, partikülün birim kütlesi başına bağlanan enzim miktarını artırır [9].

1.2 Tezin Amacı

Bu tezde amaç yan zincirinde SCNP içeren bir monomerin, bir diakrilat beraberinde hazırlanan hidrojelinin, üreaz enzimine adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonu amacıyla taşıyıcı (destek materyali) olarak kullanılmasıdır.

Bu doğrultuda, ilk aşamada lineer polimer öncülü olarak nitroksi aracılıklı polimerizasyon (NMP) kullanılarak stiren-ko-klorometilstiren kopolimeri sentezlenmesi ve sonrasında bu kopolimerdeki klorometilstiren (CMS) ünitelerinden gelen Cl uçlarının bazılarına çapraz bağlayıcı olarak 3,6-dioksa-1,8-oktanditiol (DODT) takılarak tek zincirli polimerik nanopartikül elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek olan SCNP yapısının Glisidil metakrilat (GMA)'ın zincir ucundaki epoksit halkasını açarak takılması ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı kullanılarak, immobilizasyon için destek materyali olarak kullanılmak üzere hidrojeller oluşturulması amaçlanmıştır.

2
POLİMER KİMYASI

Polimer terimi, Yunanca kökenli olup, "çok" anlamına gelen "poly" ve "parça" anlamına gelen "meros" kelimelerinin birleşiminden ortaya çıkmıştır [10]. İlk polimerler 1492 yılında Amerikan Yerlileri tarafından doğal kauçuktan elde edilmiştir.

Polimer biliminin temelleri 1920 yılında Herman Staudinger'ın makromoleküler hipotezi ile atılmıştır [11]. Polimerler, monomer denilen küçük moleküllerin kovalent bağlarla birbirine bağlanarak sürekli bir şekilde çoğalması sonucunda meydana gelen büyük moleküllerdir. Bu birleşim, polimerlerin yüksek molekül ağırlığına ulaşmasını sağlar. Polimerler, uzun ve çeşitli moleküler büyüklüklere sahip zincirlerden meydana geldiği için sabit bir molekül ağırlığına sahip değildir. Bu nedenle, polimerlerin molekül ağırlığı hakkında konuşulurken genellikle ortalama molekül ağırlığı kavramı kullanılmaktadır [12].



Şekil 2.1 Polimerlerin kullanım alanları

Polimerler güçlü, esnek, hafif, elektriksel iletkenliği yüksek, kimyasal olarak inert, korozyona karşı dirençli ve dayanıklı maddelerdir [13]. Bu özellikleri sayesinde polimerler, başta kimya endüstrisi olmak üzere, son yıllarda tıp, biyokimya, moleküler biyoloji, makine, tekstil, sanayi ve fizik mühendisliği gibi birçok alanda da büyük ilgi görmektedir. Polimerler, günlük hayatımızda yaygın olarak kullandığımız plastikler, boyalar, yapıştırıcılar, poşetler, zemin kaplamaları, mutfak gereçleri, araba lastikleri gibi ürünlerin üretiminde temel malzeme olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.1) [14].

2.1 Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerler, sahip oldukları farklı özellikler nedeniyle çeşitli ölçütlere göre gruplandırılabilirler:

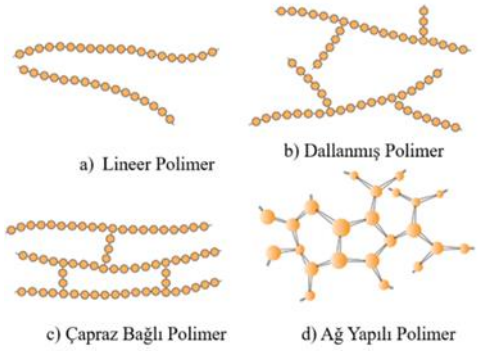
- Molekül ağırlığına göre (Oligomer, Makromolekül),
- Kaynağına göre (Doğal, Sentetik),
- Ana zincirini oluşturan atom türüne göre (Organik, Anorganik),
- Zincirin fiziksel yapısına göre (Düz, Dallanmış, Çapraz Bağlı),
- Zincir yapısına göre (Homopolimer, Kopolimer),
- Sentez yöntemine göre (Basamaklı, Katılma)
- Isıya karşı gösterdikleri tepkilere göre (Termoplastik, Termoset)

Polimerler, moleküler ağırlıklarına göre oligomerler ve polimerler olarak iki ana kategoriye ayrılır. Oligomerler, çoğunlukla 2 ila 10 arasında tekrarlayan birim barındıran ve düşük moleküler ağırlığa sahip olan bileşiklerdir. Polimerler ise, çok sayıda küçük molekülün bir araya gelerek oluşturduğu büyük moleküllerdir [14].

Polimerler, kaynaklarına göre üç kategoriye ayrılabilir: doğal, yarı sentetik ve sentetik. Doğal polimerler (biyopolimerler), bitki ya da hayvan kökenli polimerlerdir. Örnekler arasında selüloz, nişasta, ipek, yün ve reçineler bulunur. Yarı sentetik polimerler, doğal polimerlerin kimyasal işlemlerle modifiye edilerek yeni özellikler kazanmasıyla elde edilir. Selüloz esterler, bu tür polimerlere örnek olarak verilebilir. Sentetik polimerler ise tamamen yapay olarak, monomerlerin polimerizasyonu yoluyla üretilen polimerlerdir. Bu gruba polistiren, polietilen, naylon, teflon, bakalit ve PVC gibi polimerler dahildir [15].

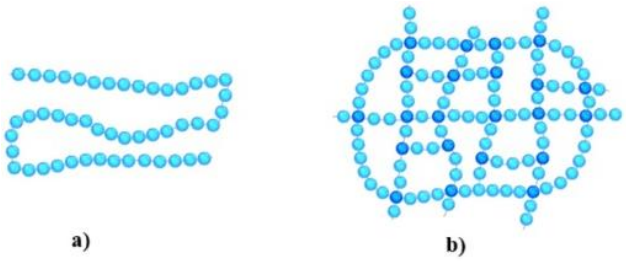
Polimerler, ana zincirindeki atom türüne göre organik ve anorganik olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Organik polimerlerde, ana zincir genellikle karbon atomlarından oluşur ve bu karbonlara hidrojen atomları bağlanır. Anorganik polimerlerde ise, ana zincirde silisyum (Si), fosfor (P) ve kükürt (S) gibi elementler bulunur. Anorganik polimerler, organik olanlara kıyasla daha yüksek sıcaklıklara karşı daha dayanıklı özellikler sergiler [16].

Polimer zincirleri, fiziksel yapısına göre üç ana grupta sınıflandırılır. Lineer polimerler, monomerlerin ardışık şekilde bağlanarak oluşturduğu uzun ve düz zincirlerden oluşur; polietilen gibi örnekleri vardır [17]. Dallanmış polimerler, lineer zincirlere yan zincirlerin eklenmesiyle oluşur ve bu dallanmalar polimerin özelliklerini değiştirir [14]. Çapraz bağlı polimerler, birbirine kimyasal bağlarla bağlı zincirlerden oluşan üç boyutlu ağ yapılarıdır. Isıyla erimez, çözücülerde çözünmez, dayanıklı ve sert özellikler gösterirler. Ağ yapılı polimerler, üç boyutlu bir yapı oluşturacak şekilde üç veya dört kovalent bağ içerebilir. Çapraz bağ yoğunluğu yüksek olan polimerler bu gruba dahildir. Epoksi, poliüretan ve fenolformaldehit gibi malzemeler, kendilerine has mekanik ve termal özellikler göstermektedir.



Şekil 2.2 Fiziksel yapısına göre polimerler

Polimerler, ısısal davranışlarına göre iki grupta incelenir (Şekil 2.3). Termoplastik polimerler**,** ısı ve basınç altında yumuşar ve tekrar şekillendirilebilirler. Bu polimerler çözücüler içinde çözünürler ve çapraz bağ içermezler. Zincir yapıları doğrusal ya da dallanmış olabilir. Termoset polimerler**,** çapraz bağlar içerir ve çözücülerde çözünmezler, ancak şişebilirler. Isıtıldıklarında erimezler, bunun yerine yüksek sıcaklıklarda bozunurlar [18].



Şekil 2.3 a) Termoplastik ve b) termoset polimer örnekleri

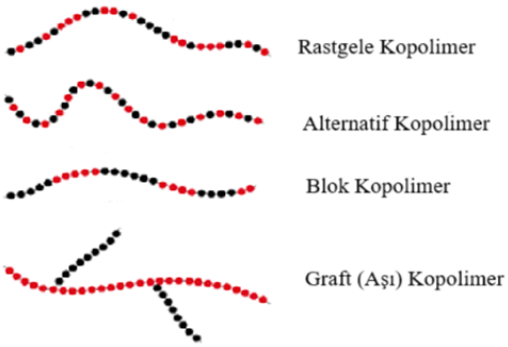
Polimer sentezi sırasında kullanılan monomer sayısına göre, polimerler homopolimer ve kopolimer olarak iki ana gruba ayrılır. Homopolimer, yalnızca bir tür monomerin kullanılarak üretilen polimerlerdir, oysa kopolimerler en az iki farklı monomerin kimyasal olarak birleştirilmesiyle oluşur. Kopolimerler, yapılarındaki farklılıklarına göre dört alt gruba ayrılır (Şekil 2.4):

• Rastgele (Gelişigüzel) Kopolimer: Farklı monomerlerin veya birimlerin zincir üzerinde rastgele bir şekilde dağılmasından oluşan kopolimerlerdir.

• Alternatif (Ardarda) Kopolimer: İki farklı monomerin, polimer zincirinde düzenli bir sırayla birbirini takip ederek sıralandığı kopolimerlerdir.

• Blok Kopolimer: Zincirdeki her monomerin uzun ve kesintisiz bir dizisini içeren, lineer yapılı kopolimerlerdir.

• Graft (Aşı) Kopolimer: Bir monomer zincirine, başka bir monomerin yan zincir olarak eklenmesiyle oluşan dallı yapıya sahip kopolimerlerdir.



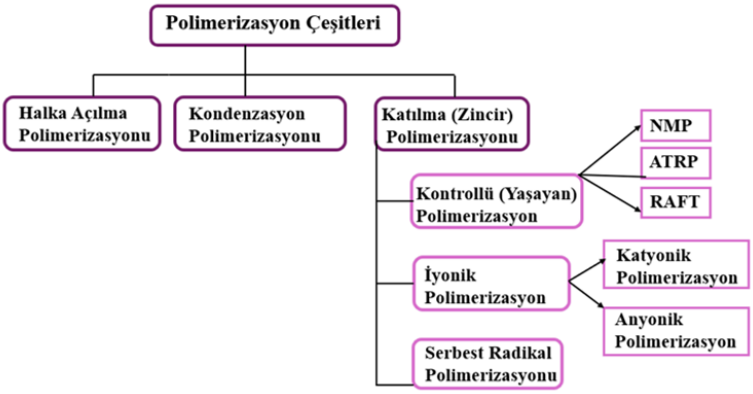
Şekil 2.4 Polimerlerin monomer yapısına göre sınıflandırılması

Polimerler, sentezleme yöntemlerine göre iki ana gruba ayrılır: katılma (zincir) polimerleri ve kondenzasyon (basamaklı) polimerleri. Kondenzasyon polimerleri, aynı ya da farklı moleküllerin reaksiyona girerek, metil alkol, su gibi küçük

moleküllerin salınmasıyla oluşan polimerlerdir. Katılma polimerleri ise, monomer birimlerinin, herhangi bir yan ürünün açığa çıkmadığı bir şekilde sürekli olarak birbirine eklenerek uzun zincirler oluşturduğu polimerlerdir [19].

2.2 Polimerizasyon Reaksiyonları

Bir veya birden fazla türdeki monomerin kimyasal reaksiyonlar sonucunda etkileşime girerek uzun zincirler halinde birleşmesi polimerizasyon olarak adlandırılır.



Şekil 2.5 Polimerizasyon reaksiyonları

2.2.1 Kondenzasyon (Basamaklı) Polimerizasyon

Kondenzasyon polimerizasyonu, iki veya daha fazla fonksiyonel gruba sahip benzer ya da farklı monomerlerin bir araya gelerek reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Eğer monomerlerdeki fonksiyonel gruplar iki ya da daha fazla ise, bu süreç sonucunda dallanmış veya çapraz bağlı yapılar oluşabilir. Bu tür fonksiyonel gruplara örnek olarak -OH, -COOH, $-NH_2$, -NCO gibi gruplar verilebilir [20].

Polimerizasyon süreci boyunca farklı boyutlarda polimer zincirleri bulunur. Bu zincirlerin büyümesi, adım adım gerçekleşir ve molekül ağırlığı hemen artmaz, ancak süreç sonunda yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerler elde edilir. Kademeli kütle artışı, istenilen yapı ve özelliklere sahip polimerlerin elde edilmesini kolaylaştırır. Polimerizasyon, monomerlerden biri tükenene kadar devam eder. Kondenzasyon polimerizasyonu ile, poliesterler, polieterler, poliamitler, poliüretanlar, poliimitler, fenol-formaldehit ve üre-formaldehit gibi çeşitli reçineler üretilebilir [21].

2.2.2 Katılma (Zincir) Polimerizasyonu

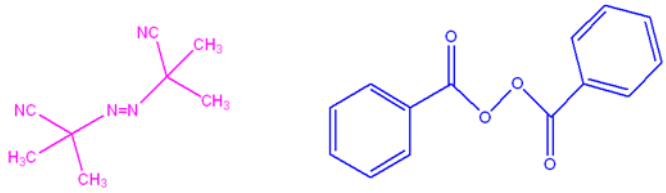
Bu polimerizasyon tipi, en az bir doymamış bağ içeren monomerlerle (örneğin stiren, vinil bileşenleri, etilen, α-olefinler ve konjuge diolefinler) gerçekleşir. Zincir polimerizasyonunun en belirgin özelliği, polimer zincirlerinin kısa bir sürede yüksek molekül ağırlıklarına (10^5 - 10^7 gibi) ulaşabilmesidir [21]. Bu süreçte, aktif merkez, yani zincir taşıyıcı, bir iyon ya da serbest radikal adı verilen, eşleşmemiş elektronu bulunan reaktif bir molekül olabilir. Bu aktif parçacıklar, monomerin çift bağını açarak ona bağlanır ve yeni bir aktif merkez oluşturur. Böylece uzun polimer zincirleri, doymamış monomerlerin birbirine eklenmesiyle oluşur. Polimer, daha fazla monomerle etkileşmediği sürece büyüme işlemi durur. Zaman ilerledikçe, monomerin polimere dönüşme oranı yükselirken, polimerin moleküler ağırlığında belirgin bir değişim gözlenmez. Reaksiyon süresi uzadıkça yalnızca dönüşüm miktarı artar.

Katılma polimerizasyonu, serbest radikallerle başlatıldığında serbest radikal polimerizasyonu olarak adlandırılır. Eğer iyonik aktif merkezler kullanılarak başlatılırsa, bu tür polimerizasyon iyonik katılma polimerizasyonu olarak bilinir. İyonik katılma polimerizasyonu, aktif merkezin yapısına göre anyonik ve katyonik olmak üzere ikiye ayrılır [21].

2.2.2.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu

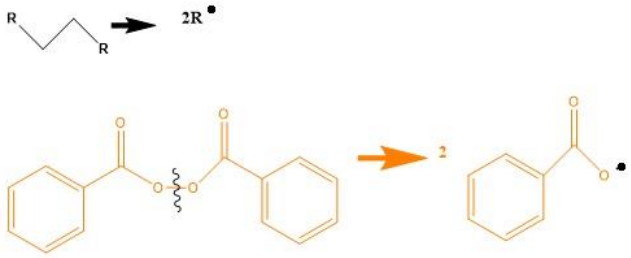
Serbest radikal polimerizasyonu, çiftleşmemiş elektronlara sahip, elektriksel olarak nötral serbest radikallerin etkisiyle başlatılan bir polimerizasyon türüdür. Bu radikaller, monomerlerin doymamış bağlarını açarak zincir büyümesini başlatır. 1930'lu yıllarda kimya alanında önemli bir yer edinmeye başlamış olan bu yöntem, özellikle etilen, stiren, vinil klorür, metil metakrilat ve vinil asetat gibi doymamış bağlara sahip monomerlerin polimerleşmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır [16]. Serbest radikal polimerizasyonu, üç aşamada gerçekleşir: başlama, ilerleme (çoğalma) ve sonlanma [16].

Başlama (Başlatma)**;** bu aşama iki reaksiyondan meydana gelir. Termal olarak kararsız bileşiklere başlatıcı denir. Genellikle benzoil peroksit (BPO) veya Azobisizobütironitril (AIBN) gibi serbest radikal üreten bileşiklerdir (Şekil 2.6).

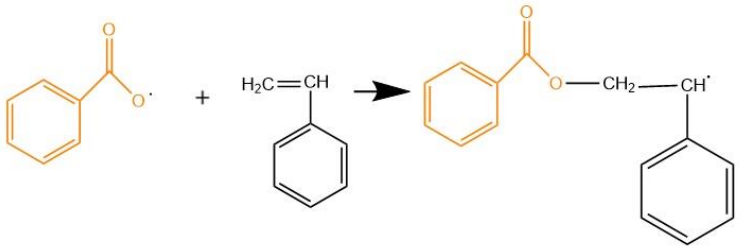


Şekil 2.6 a) AIBN ve b) BPO' nun şekli

Başlatıcı moleküllerden serbest radikaller oluşur (Şekil 2.7). Üretilen radikaller, vinil monomerlerin çift bağlarıyla reaksiyona girerek yeni bir radikal olan aktif merkezi oluşturur. Bu aktif merkez, yeterli bir süre boyunca aktif kalır ve bir polimer zincirinin oluşmasını sağlar (Şekil 2.8) [20]. Monomerlerin birbirine bağlanış şekilleri baş-baş, baş-kuyruk ve kuyruk-kuyruk katılması gibi olabilir [14]. Serbest radikal polimerizasyonunda, genel olarak baş-kuyruk katılması meydana gelir.



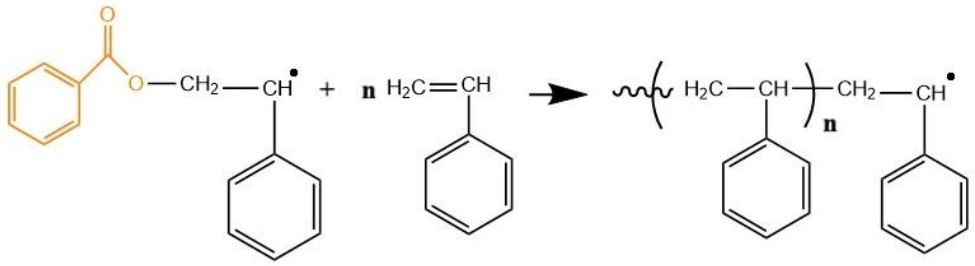
Şekil 2.7 Benzoil peroksit parçalanması ve radikal oluşumu



Şekil 2.8 Serbest radikal polimerizasyonu başlama aşaması

Çoğalma (İlerleme)**;** çoğalma aşamasında, aktif merkezde herhangi bir değişiklik olmaksızın, monomerler hızla ve sürekli olarak büyüyen polimer zincirine eklenir (Şekil 2.9). Bu süreç, monomerlerin aktif merkezle reaksiyona girerek zincir

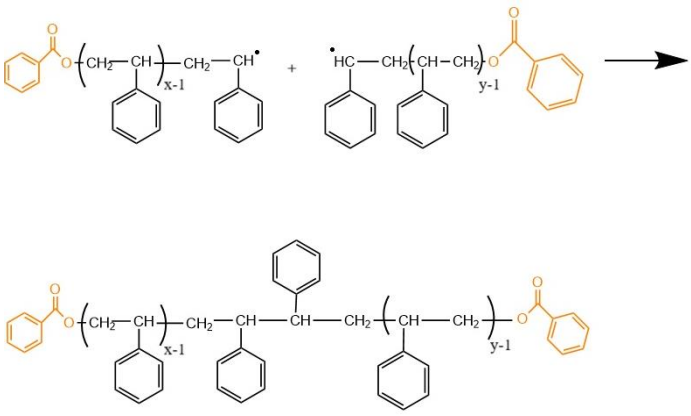
boyunca polimerin büyümesine devam etmesini sağlar. Polimerizasyon, her eklenen monomerle birlikte zincir boyunca aktif bir merkez oluşturarak sürer [19].



Şekil 2.9 Serbest radikal polimerizasyonu çoğalma aşaması

Sonlanma**;** sonlanma aşamasında, büyüyen iki polimer zincirinin radikalleri birleşir veya başka bir mekanizma ile büyür. Zincir sonlanması sırasında bu polimer zincirleri aktif radikallerin birleşmesiyle inaktif bir duruma gelirler. Polimerizasyonun sonlanması birleşmeyle ve orantısız sonlanma olmak üzere iki çeşitte olabilir [19].

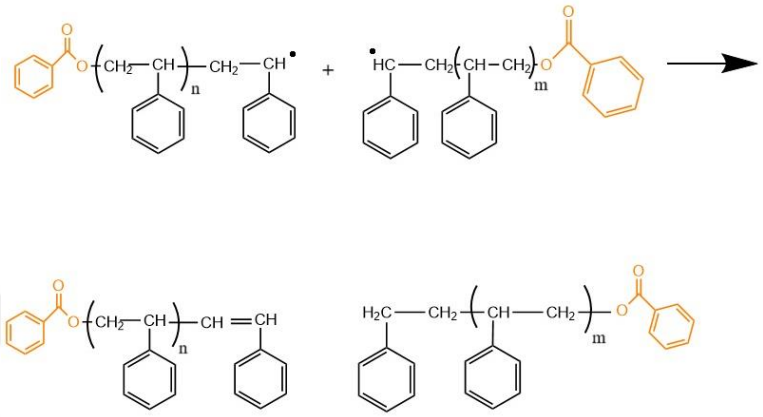
- Birleşerek sonlanma mekanizmasında, iki aktif radikal zinciri baş-baş düzeninde birleşir ve reaksiyona girerek tek bir polimer zinciri meydana getirir. Bu birleşme sonucu oluşan yeni polimer zincirinin uzunluğu, her iki radikal zincirinin uzunluklarından daha büyük olur. Bu durum, zincir büyümesinin sona ermesine yol açar ve polimerizasyon süreci tamamlanır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Serbest radikal polimerizasyonu birleşme ile sonlama basamağı

- Orantısız sonlanma, iki aktif zincir arasında bir hidrojen atomunun transferiyle gerçekleşir. Bu işlem sonucunda, her iki polimer zinciri de ilk

uzunluklarını korur. Ancak, bu zincirlerden birinde doymuş, diğerinde ise doymamış son gruplar bulunur ve böylece ölü polimerler elde edilir. Ölü polimer, artan radikalin büyümesinin sona erdiğini gösterir (Şekil 2.11). Sonlanma hız sabitlerinin değeri, ilerleme reaksiyonlarının hız sabitlerinden çok daha büyüktür.



Şekil 2.11 Serbest radikal polimerizasyonu orantısız sonlama basamağı

2.2.2.2 İyonik Polimerizasyon

İyonik polimerizasyon, zincir büyümesinin aktif merkezler aracılığıyla gerçekleştiği bir mekanizmadır. Bu polimerizasyon türünde, aktif merkezler katyonlar veya anyonlar olabilir. İyonik polimerizasyon iki ana kategoriye ayrılır: Katyonik polimerizasyon ve anyonik polimerizasyon.

Katyonik Polimerizasyon, başlatıcılar ve monomerlerin bir araya gelerek zincir büyümesini başlatmasını içerir. Bu polimerizasyon türünde, başlatma bir proton tarafından gerçekleştirilir ve zincir büyümesi karbonyum iyonlarıyla sağlanır. Başlama, büyüme ve sonlanma olmak üzere üç ana aşamadan oluşur.

Anyonik Polimerizasyon, negatif yüklü bir iyon, monomer molekülünün elektron çiftine saldırarak bu çiftleri molekülün sonuna iter ve aynı zamanda bir karbanyon oluşur. Bu karbanyon, zincir büyümesini sürdüren aktif uçtur. Anyonik polimerizasyonun başlama, büyüme ve zincir transferi tepkimeleri katyonik polimerizasyona benzer şekilde işler, ancak sonlanma reaksiyonları çok nadiren görülür. Anyonik polimerizasyonda sonlanma reaksiyonları genellikle görülmez, çünkü aktif karbanyon uçları genellikle stabil kalır ve sürekli olarak büyür. Bu

nedenle, iyonik polimerizasyon genellikle çok daha kontrollü ve belirli polimer özelliklerinin elde edilmesini sağlar [22].

2.2.2.3 Kontrollü (Yaşayan) Polimerizasyon (CRP)

CRP, katılma polimerizasyonu yapısına sahip ve aynı zamanda yaşayan polimerizasyon yönteminin uygulanabilmesini sağlayarak reaksiyon sürecinin kontrol edilmesini mümkün kılan bir tekniktir [23].

Serbest radikal polimerizasyonunda zincir büyümesi hızlı bir şekilde ilerlerken, CRP'de bu süreç daha kontrollü ve sürekli bir şekilde gerçekleşir. Bu durum, kütle artışı ve polimerlerin monomere dönüşümünün doğrusal bir şekilde artmasını sağlar. CRP, özellikle blok kopolimerlerin sentezinde yaygın olarak kullanılır. Bu tekniğin avantajları arasında, hedeflenen moleküler ağırlık, polimerin yapısı ve fonksiyonelliği gibi parametrelerin kontrol edilebilmesi bulunur [24].

CRP yöntemleri üç ana gruptan oluşur:

- Nitroksi Aracılıklı Polimerizasyon **(**NMP),
- Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP),
- Tersinir Ekleme-Parçalanma Zincir Transfer Polimerizasyonu **(**RAFT)

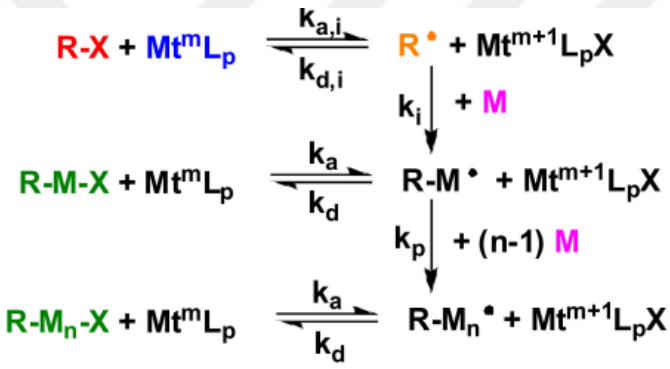
Bu yöntemlerle moleküler ağırlık, polidispersite ve blok yapı gibi parametreler istenilen şekilde şekillendirilebilir. Bahsi geçen yöntemlerin birbirlerinden farklı olmalarını sağlayan özellik tercih edilen deaktivatörlerdir. ATRP için metal halojenürler, RAFT için ditiyoesterler ve NMP için ise nitroksitler tercih edilir [25].

Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)

ATRP, kontrollü ve yaşayan radikal polimerizasyonlar için yaygın olarak tercih edilen oldukça etkili bir yöntemdir (Şekil 2.12). Bu yöntem, üç ana aşamada gerçekleşir: Başlama, büyüme ve sonlanma. Polimerizasyon süreci sonunda radikaller oluşur ve tüm monomerler tükenmiş olur. Reaksiyonun kontrol edilebilirliği, kullanılan metal ve ligandlara bağlıdır. ATRP'de tercih edilen metaller arasında Pd, Ni, Fe, Ru, Rh ve Cu bulunur [26]. Ancak Cu, düşük maliyeti ve etkinliğinin yüksek olması nedeniyle en yaygın olarak kullanılan metaldir. Bu

metaller, ligandlarla birleşerek katalizörleri oluştururlar. Düşük polidispersite indeksine sahip polimerler, örneğin stiren, akrilonitril ve metil metakrilat, bu yöntemle başarıyla sentezlenmiştir [27].

ATRP yönteminde sürekli ve denge halinde aktivasyon ve deaktivasyon adımları bulunur. Bu yöntemin avantajları arasında, farklı koşul ve çözücüler altında polimerizasyonun gerçekleştirilebilmesi, üretilen polimerlerin moleküler ağırlığının, yapısının ve polidispersitesinin hassas bir şekilde kontrol edilebilmesi yer alır. Ayrıca ATRP başlatıcıları, inorganik veya organik maddelere; hatta proteinlere bağlanabilir, böylece reaksiyon doğrudan bu yapıların üzerinde gerçekleşebilir. ATRP'nin güçlü yönlerine rağmen, polimerizasyon tamamlandıktan sonra kullanılan metallerin ortamdan uzaklaştırılması gerektiği gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır.



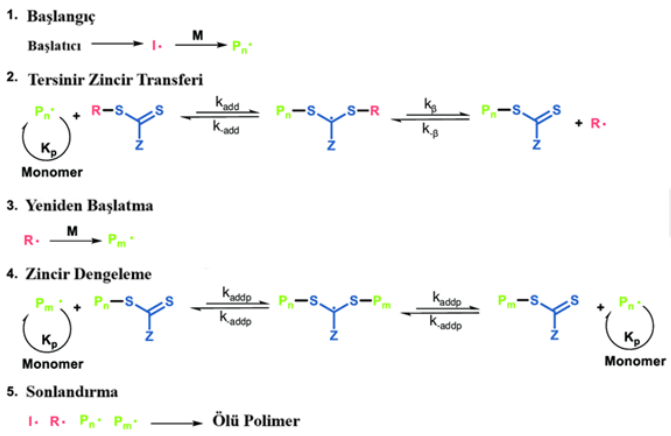
Şekil 2.12 ATRP mekanizması [27]

RAFT yöntemi, ilk kez 1998 yılında Rizzardo ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [28]. Bu yöntem, reaksiyonun kontrolünü, RAFT ajanı olarak kullanılan ditiyo bileşiği sayesinde sağlar (Şekil 2.13). RAFT polimerizasyonunun en belirgin özelliklerinden biri, metal kullanılmamasıdır. Bu, polimerizasyonun sonunda metalin ortamdan uzaklaştırılması için ek bir işlem gerekliliğini ortadan kaldırır [29]. Bu tür polimerizasyonlarda, zincir transfer ajanları reaksiyonun kontrolünü sağlar. Sonuç olarak, hemen hemen aynı uzunlukta polimer zincirleri elde edilir, bu da düşük polidispersite (PDI) değerlerine yol açar. RAFT yöntemi ile blok, kompleks ve yıldız yapılı polimerler sentezlenebilir.

RAFT polimerizasyonu, sürekli ve tersinir bir zincir transfer mekanizması ile işler. Polimerizasyon tamamlandığında, elde edilen ürün fonksiyonel bir RAFT ajanı içerir. RAFT ile elde edilen polimerler, ilaç taşıyıcı malzeme gibi çeşitli

uygulamalarda kullanılabilir. Bu yöntemin avantajları arasında, çok sayıda monomerle uyumlu olması, reaksiyon sonucunda yan ürünlerin oluşmaması, düşük moleküler ağırlıkla zengin monomer çeşitliliği sunması ve polimerlerin mimarisinde oynama yapılabilmesi yer alır. Ayrıca, her zincir mimarisi farklı fiziksel özellikler sağladığı için, RAFT ile sentezlenen polimerler geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılabilir.

Ancak RAFT yönteminin bazı dezavantajları da vardır. Örneğin, yapısında bakır veya diğer metaller bulunan polimerlerin sentezinde kullanılamaz. Ayrıca, RAFT ajanları genellikle zor sentezlenir ve bu ajanların reaksiyon sırasında kullanımı zordur. Bir diğer olumsuz özellik ise, ditiyoester gruplarının neden olduğu sarı veya pembe renklenmedir, bu da istenmeyen bir durumdur.



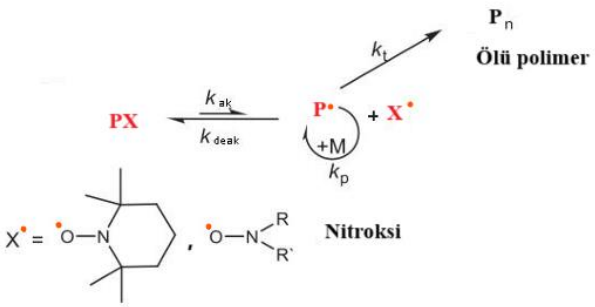
Şekil 2.13 RAFT mekanizması

Nitroksi Ortamlı Polimerizasyon (NMP)

Rizzardo ve Solomon, 1979 yılında nitroksit gruplarının karbon radikalleriyle etkileşerek alkoksi aminleri oluşturduğunu bildirdiğinde, kontrollü polimerleşme yönteminin temelleri atılmıştır [30]. Bu keşif, nitroksitlerin polimer stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaya başlamasına olanak sağlamıştır.

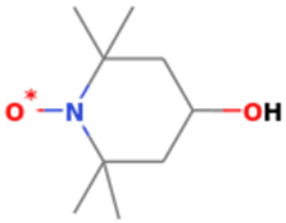
Nitroksitler, düşük sıcaklıklarda ve hava ortamında, elektron yapıları ve sterik özellikleri sayesinde kararlı bileşiklerdir. Nitroksit radikali, büyüyen polimer zincirine kovalent bağ ile bağlanarak polimerleşmeyi durdurur ve böylece polimer zincirinin son biriminde nitroksit grubu oluşur. Bu son grup, polimere "yaşayan" bir özellik kazandırır.

NMP’da denge halinde aktivasyon ve deaktivasyon basamakları bulunur. Bu yöntem ile düşük polidispersite (PDI)’ya sahip yüksek sertlikte akrilik reçineler kolaylıkla oluşturulabilir [31]. NMP, büyüyen radikal ile bir kontrol ajanı olarak işlev gören nitroksit arasındaki tersine çevrilebilir sonlandırma mekanizmasına dayanır ve bu süreç, baskın olarak bir alkoksiaminin oluşmasına yol açar. Bu mekanizma, polimerleşme sürecinin kontrollü bir şekilde devam etmesini sağlar (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 NMP mekanizması

NMP'nin diğer polimerizasyon türlerinden farkı, başlatıcıya ek olarak ortamda kararlı nitroksit radikallerinin kullanılmasındadır. Bu kararlı radikal, TEMPO adı verilen 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksil bileşiği olarak bilinir [32].TEMPO ortamdaki monomerle tepkimeye girmez, yan reaksiyona katılmaz ve polimerin zincir uzamasını kontrol eder (Şekil 2.15). TEMPO, düşük bir denge sabitine sahip olduğu için yalnızca stiren ve kopolimerlerinde başarıyla kullanılabilir [33].



Şekil 2.15 TEMPO’nun yapısı

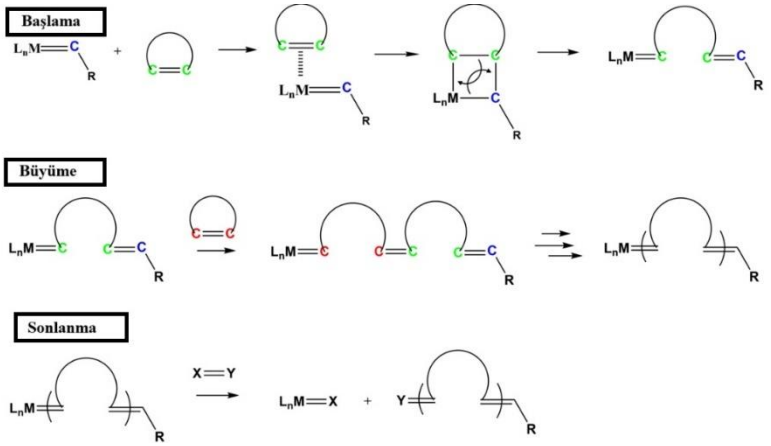
NMP reaksiyonlarında, ortam sıcaklığı düşürülerek TEMPO ile birleşmiş radikal zincirleri hareketsiz hale getirilebilir ve bu sayede polimerleşme süreci durdurulmuş olur. Bu mekanizma, büyüyen polimer zincirlerinin dışarıdan kontrol edilmesini ve istenildiği anda durdurulup tekrar başlatılabilmesini sağlar [34].

NMP yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir. NMP yönteminin uygulandığı sıcaklıklar, akrilat türevi monomerlerin kaynama noktasından daha yüksek olduğu için, bu metod akrilat türevlerinde etkin bir şekilde kullanılamamaktadır. Bunlara ek olarak yüksek sıcaklıklarda çalışmayı gerektirmesi, uzun reaksiyon süreleri ve yalnızca belirli monomer türleriyle uyumlu olması gibi faktörler bu yöntemin dezavantajlarına örnektir [35].

NMP yöntemimin avantajları ise bu yöntem ile düşük polidispersiteli polimerler üretebilmesi, asitler de dahil olmak üzere birçok monomerle uyumlu olması, organik sistemlerde kullanılabilmesi ve blok, aşı, yıldız gibi çeşitli kopolimer yapılarını başarıyla sentezleyebilmesi gibi özellikleri NMP'yi çekici kılar [35]. Ayrıca, kontrollü ve yaşayan özelliklerinin yanı sıra, katalizör olarak metal kullanılmaması ve polimerleşme sonrasında saflaştırma işlemi gerektirmemesidir. Ek olarak, bu sistem, yalnızca serbest nitroksit ilavesiyle geleneksel radikal polimerizasyon süreçlerinin avantajlarını sunarak hem ekonomik hem de pratik açıdan oldukça tercih edilen bir yöntemdir [36].

2.2.3 Halka Açılma Polimerizasyonu

Halka açılması polimerizasyonu, halkalı yapıya sahip bileşiklerin polimerleşmesi sürecini ifade eder (Şekil 2.16). Bu yöntemle, halkalı esterler (laktonlar), halkalı amidler (laktamlar), doymamış halkalı eterler ve halkalı aminler gibi bileşikler polimerize edilebilir [14].



Şekil 2.16 ROMP mekanizması

ROMP yönteminde, monomer molekülleri, katılma polimerizasyonundaki gibi sırayla zincirlere eklenir. Tıpkı katılma polimerizasyonunda olduğu gibi,

polimerizasyon ortamında sadece aktif zincirler ve monomer molekülleri arasında reaksiyon gerçekleşir. Bu nedenle, monomer yapılarına göre daha büyük iki polimerin birbirleriyle etkileşime girmesi mümkün değildir [37].

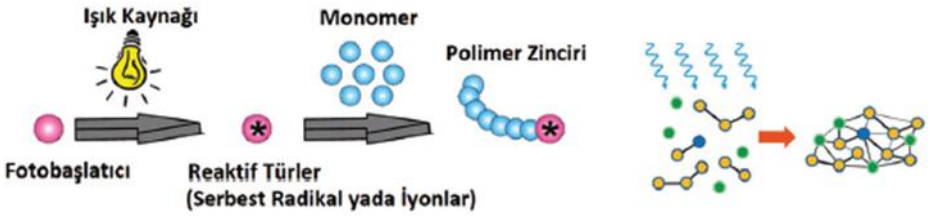
ROMP, kondenzasyon ve katılma polimerizasyonlarına benzer özellikler gösterir. Katılma polimerizasyonunda monomerlerde çift bağ varken, POMP yöntemindeki monomerlerin çift bağ içermesi zorunlu değildir. Katılma polimerizasyonunda, polimerizasyonun ilk aşamalarında yüksek molekül ağırlıklı polimerler oluşurken, ROMP yönteminde ise, tıpkı basamaklı polimerizasyondaki gibi, yüksek molekül ağırlıklı polimerler polimerizasyonun son aşamalarında meydana gelir [38].

Üç farklı çeşidi vardır:

- Katyonik halka sçılma polimerizasyonu,
- Anyonik halka açılma polimerizasyonu ve
- Koordinasyon-araya girme halka açılma polimerizasyonu.

2.3 Fotopolimerizasyon

Fotopolimerizasyon, polimerizasyonu başlatmak için ışığın kullanıldığı serbest radikal polimerizasyonunun özel bir türüdür (Şekil 2.17) [39]. Bu yöntemin geleneksel polimerizasyona göre birçok avantajı vardır, bunlar arasında daha düşük enerji tüketimi, daha az atık, daha yüksek üretkenlik (hızlı kürleşme) ve daha düşük reaksiyon sıcaklıkları sayılabilir. Işık kaynağı kesildiğinde polimerizasyon durur.



Şekil 2.17 Fotopolimerizasyon şeması [40]

Serbest radikal fotopolimerizasyonu, başlama (fotobaşlama), çoğalma (ilerleme ve zincir transferi) ve sonlanma (orantısız veya birleşerek) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Bu süreç, ışıkla üretilen radikal başlatıcıların monomerlerle etkileşimi sonucu gerçekleşir. Kullanılan monomerler, üzerlerindeki doymamış gruplar

sayesinde tipik zincir reaksiyonları verir. Fotokimyasal başlatma, genellikle uygun foto başlatıcıların veya duyarlılaştırıcıların yaklaşık 200 ila 400 nm dalga boyunda UV ışığına maruz bırakılmasıyla başlar. Foto-başlatıcılar, ışığa maruz kaldıklarında iki radikale ayrılırlar. Duyarlılaştırıcılar, başlatma adımı sırasında kimyasal olarak değişmeden kalırken, foto başlatıcılar tüketilir.

Işığın (fotonların) emilmesi, emici molekülleri aktif formlarına dönüştürür; bu aktif formlar hızla radikallere veya iyonlara ayrışır. Bu moleküler parçalar, polimerizasyon ve/veya çapraz bağlama reaksiyonlarını başlatır. Işığa duyarlılaştırıcılar durumunda, ışıkla etkinleşen moleküller enerjilerini doğrudan bir enerji alıcı moleküle aktarır ve bu molekül daha sonra ya hidrojen soyutlaması ya da foto parçalanma yoluyla radikaller üretir [41].

Işığın absorpsiyonu yalnızca başlatıcı molekülün aktif durumu ile temel durumu arasındaki enerji farkı fotonun enerjisine eşitse gerçekleşir. Bu enerji, frekansı (ν) veya dalga boyu (λ) ile orantılıdır ve Planck-Einstein ilişkisi ile hesaplanabilir:

$$E = h\upsilon = hc\backslash\lambda = \Delta E \tag{2.1}$$

E = Fotonların her birinin enerjisi

h = Planck sabiti (6,6256x10-34 J.s.foton^{-1})

υ = Işığın frekansı (s^{-1})

c = Işık hızı (2,9979x10^{8} m.s $^{-1}$)

λ = Işığın dalgaboyu (m)

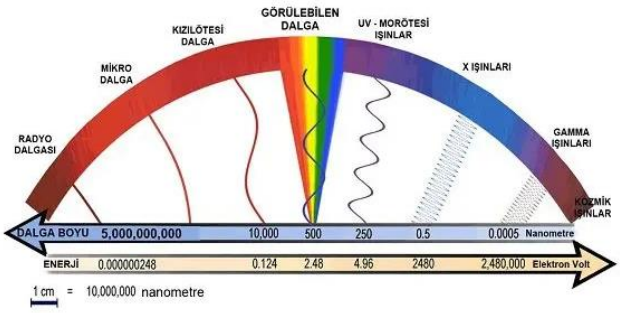
ύ = Dalga sayısı (m^{-1})

ύ = Dalga sayısı (m^{-1})

2.3.1 Fotokimya

Fotokimya, ışığın kimyasal reaksiyonlar üzerindeki etkilerini inceleyen bir alandır ve ultraviyole (100-400 nm), görünür ışık (400-750 nm) veya kızılötesi ışınımın (750-2500 nm) neden olduğu kimyasal değişimleri tanımlar [42] (Şekil 2.18). Fotokimya, fotosentez, görme ve D vitamini üretimi gibi doğal süreçler için kritik öneme sahiptir. Bu reaksiyonlar, yüksek enerjili fotonlar sayesinde termal yöntemlerle elde edilemeyen ara ürünlerin oluşmasını sağlar ve kısa sürede büyük

aktivasyon engellerini aşarak, termal işlemlerle gerçekleştirilemeyen reaksiyonların yapılmasına olanak tanır [43].



Şekil 2.18 Elektromanyetik spektrum

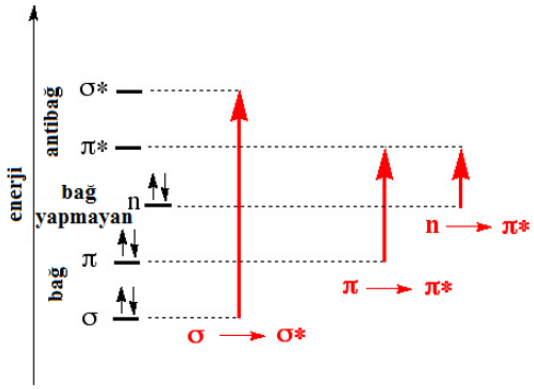
2.3.2 Elektronik Geçişler

Bir molekül, temel durumda en düşük enerji seviyesinde bulunur ve elektronlar en düşük enerjili moleküler orbitallere (MO) yerleşmiştir. Her moleküler orbital, iki ters spinli elektron alabilir. Elektronik olarak uyarılmış bir molekül, en yüksek dolu moleküler orbital (HOMO) ile en düşük boş moleküler orbital (LUMO) arasındaki enerji farkı kadar bir foton absorbe eder. Foton emildiğinde, bu enerji, bir elektronu bağlayıcı veya bağ yapmayan moleküler orbitallerden, anti bağlayıcı moleküler orbitallere taşımak için kullanılır [44].

Uyarılmış bir atom veya molekülde, elektronlar HOMO'dan LUMO'ya geçer ve bu geçiş, temel halden uyarılmış hale geçişi sağlar. Elektronik olarak uyarılmış halin enerjisi, uyarılmış (UH) ve temel (TH) hal enerjileri arasındaki farktır [45].

$$\Delta E = E(LU) - E(HO) = E(UH) - E(TH), E(TH) = 0 \qquad (2.2)$$

Işığa duyarlı gruplarda, bağ moleküler orbitalleri genellikle π orbitalleri, bağlayıcı olmayan orbitaller ise n orbitalleridir. Elektronlar bu orbitallerden, genellikle π* anti bağlayıcı orbitallere yükselir. Örneğin, karbonil grubunda hem π, hem de bağlayıcı olmayan orbitalleri bulunur ve ışık absorbe edildiğinde, elektronlar π veya bağlayıcı olmayan orbitallerden π* orbitallerine geçebilir. Fotokimyasal reaksiyonlarda, n-π* ve π-π* geçişleri en önemli geçişlerdir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Elektronik geçişlerin kuramsal enerji diyagramında gösterimi

σ→σ* Geçişleri: Bir moleküldeki σ bağ orbitalindeki bir elektron, vakum UV ışını alarak anti bağlayıcı σ* orbitaline geçer. Bu geçiş, diğer elektronik geçişlere göre yüksek enerji gerektirir.

n→σ Geçişleri*: Bu geçişler, bağ yapmayan orbitallerde bulunan elektron çiftlerinin yer aldığı bileşiklerde görülür. σ → σ* geçişlerine göre daha düşük enerji gerektirir ve genellikle 150–250 nm aralığındaki bölgelerde absorbe olur. Bu tür geçişler, düşük veya orta şiddette molar absorptivite değerlerine sahiptir ve genellikle 100–3000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ arasında yer alır.

n→π Geçişleri*: En düşük enerjiye sahip geçiş, bağ yapmayan elektron çiftlerinden yapılan n → π* geçişleridir. Bu geçişler, özellikle oksijen, azot ve sülfür gibi heteroatom içeren bileşiklerde görülür.

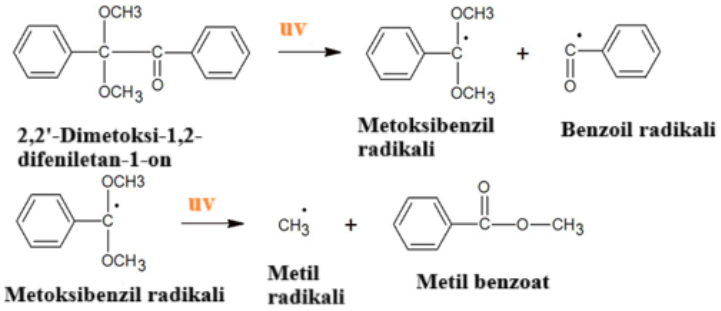
π→π Geçişleri*: Bir σ bağı içeren iki atomun p orbitalleri çakışarak π bağı oluşturur. Bu bağ yalnızca p orbitallerinin aynı düzlemde ve simetrik olduğunda oluşur. İki atomik orbitalin çakışması, iki farklı enerji seviyesinde moleküler orbitallerin oluşmasına yol açar.

2.3.3 Fotobaşlatıcılar

UV ışığına maruz kaldıklarında radikal üreten bileşiklere 'Fotobaşlatıcı' denir [44]. Bu radikaller, polimer zincir büyümesini başlatmak amacıyla monomerler ve/veya oligomerlerle reaksiyona girer. UV ile kürlenen yapıştırıcılar, mürekkepler ve kaplamalar, fotobaşlatıcıların temel bileşenleridir. Norish tip I ve II başlatıcılar olmak üzere fotobaşlatıcılar iki gruba ayrılabilir [45].

2.3.3.1 Norish Tip I Başlatıcılar

Aromatik karbonil bileşenleri, genellikle UV ışınlarıyla etkileşime girdiklerinde, C–C bağının homolitik olarak kırılması sonucu serbest radikaller oluşturur. Bu kırılmalar, çoğunlukla en zayıf bağ olan C–N ya da C–S bağlarında meydana gelir ve buna β–yarılması denir [46]. Eğer karbonil grubuna bitişik bağda bir kırılma olursa, bu durumda α–yarılması gerçekleşir. Bu tür başlatıcı örnekleri arasında benzil dimetil ketal, benzoin esterleri, hidroksi alkil fenil ketonlar, dialkoksi asetofenonlar, benzoil siklohekzanol, açilfosfin oksitler ve alkil amino ketonlar yer alır [47] (Şekil 2.20).

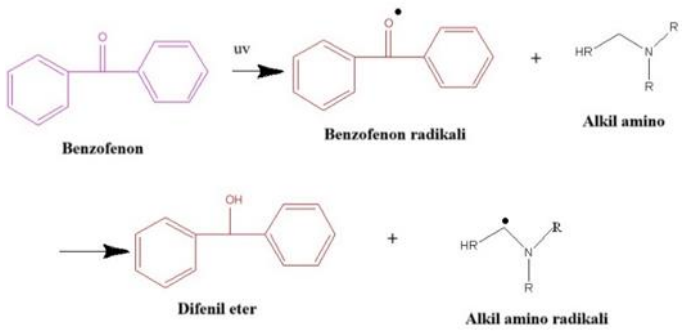


Şekil 2.20 2,2-dimetoksi-1,2-difenil-etan-1-on ve metoksibenzil radikalinin UV ışık altında ayrışmaları

2.3.3.2 Norish Tip II Başlatıcılar

II. tip fotobaşlatıcılar, uyarılmış hale geldiklerinde α-yarılması gerçekleştiremeyecek kadar düşük enerjiye sahip oldukları için, reaksiyon ortamında bir hidrojen verici molekülden hidrojen atomu soyutlayarak aktif hale gelirler. Bu tür başlatıcılara, "yardımcı başlatıcılar" denir [48]. Işık enerjisini absorbe ettiklerinde, yardımcı başlatıcı ile reaksiyona girerek foto uyarılmış başlatıcıyı oluştururlar. Yardımcı başlatıcının özelliklerine bağlı olarak, hidrojenin ayrılması, elektron transferi veya her iki işlem de aynı anda gerçekleşebilir [49].

Yaygın olarak kullanılan II. tip fotobaşlatıcılar arasında, benzofenon, tiyokzanton ve kamforkinon gibi aromatik ketonlar yer alır (Şekil 2.21). Tersiyer aminler, hidrojen atomlarını kolayca soyutlayabildikleri için yardımcı başlatıcı olarak kullanılırlar. Bu sayede fotopolimerizasyon süreçlerinde daha etkin bir başlangıç sağlanır [50].



Şekil 2.21 Norish tip II başlatıcı ile alkil amino radikalleri oluşumu

2.3.4 Fotopolimerizasyon Reaksiyonlarında Kullanılan Işık Kaynakları

Reaksiyonlarında kullanılan ışık kaynakları, polimerizasyonu başlatmak için çeşitli lambalar ve lazer sistemleri içerebilir. Yaygın olarak kullanılan bazı ışık kaynakları:

- Civa lambaları (Düşük, orta ve yüksek basınçlı): Polimerizasyon başlatmak için yaygın olarak kullanılan ışık kaynaklarıdır. Farklı basınç seviyelerine sahip civa lambaları, belirli dalga boylarında UV ışık üretir.
- Elektrotsuz lambalar: Elektrik akımı olmadan ışık üretimi sağlayan lambalardır. Çeşitli uygulamalarda kullanılır.
- Eksimer lambalar: Yüksek enerjili ışık üreten lambalardır ve genellikle kısa dalga boyu ışık yayarak spesifik polimerizasyon reaksiyonlarını başlatmak için kullanılır.
- Ksenon lambaları (Serbest çalışan ve pulslu): Ksenon lambaları yüksek yoğunluklu ışık sağlamak için kullanılır. Genellikle pulslu modelleri polimerizasyonun hızlandırılmasında etkilidir.
- Spot sertleştirme lambaları: Genellikle küçük alanlarda, belirli bir nokta üzerinde sertleştirme yapmak için kullanılır.
- Devamlı dalga ve pulslu lazerler: Bu lazerler, sürekli dalga veya pulslu biçimlerde ışık üretir ve özellikle hassas polimerizasyon işlemlerinde kullanılır.
- Işın emisyonu diodları: LED' ler, polimerizasyon reaksiyonlarını başlatmak için ışık sağlayabilir. Enerji verimli ve uzun ömürlüdürler.

Endüstriyel alanda, civa lambaları, eksimer lambalar ve ksenon lambalar daha yaygın olarak tercih edilir, çünkü bu lambalar yüksek verimlilikle istenen ışık spektrumlarını sağlayabilir [51].

2.3.5 Oksijenin Geciktirici Etkisi

Hidroperoksitlerin reaksiyonu sonlandırması, yüzeyde tamamlanmamış ağ yapıları ve kalan akrilat çifte bağları, genellikle oksijenin geciktirici etkisi olarak tanımlanır [49]. Fotopolimerizasyon, ışıkla başlatılan polimerizasyonlardır ve genellikle hava ortamında yapılır. Bu tür reaksiyonlarda ortamda bulunan oksijenin geciktirici etkisi, polimerizasyonun başlangıç süresinin uzaması, düşük polimerizasyon derecesi ve yavaş hız gibi sorunlara yol açar. Bu etkiler, özellikle ince filmlerde daha belirgin hale gelir. Oksijenin bu geciktirici etkisini ortadan kaldırmak için fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanır. Fiziksel yöntemler arasında oksijen bariyerleri olarak parafin yağlarının kullanılması veya daha yüksek ışık şiddetleriyle yüksek radikal konsantrasyonlarının oluşturulması yer alır. Nitrojen gazı veya polietilen filmle kaplama gibi yöntemler de oksijen inhibisyonunu engellemeye yardımcı olabilir, ancak bunlar maliyetli olabilir. Kimyasal yöntemler ise reaksiyon ortamındaki oksijenin azaltılması veya yeni oksijen bariyerlerinin geliştirilmesini içerir [48].

2.4 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller (PNP), katı veya kolloid şekillerde bulunabilen ve nanoküre ya da nanokapsül formunda olan polimerik sistemlerdir (Şekil 2.22). Bu nanopartiküller, ilaç taşıma gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılır [52].

Nanoküreler, etken maddelerin polimerik bir ortamda çözünmesi, parçalanarak yayılması veya adsorbe olması yoluyla oluşur. Etken madde, çekirdek yapısının içinde taşındığında ise bu yapılar nanokapsül olarak adlandırılır [1].



Şekil 2.22 Organik ve inorganik nanopartiküller [53]

Polimerik nanopartiküller, genellikle doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanır. Doğal polimerler arasında albumin, aljinat, jelatin ve kitosan gibi maddeler tercih edilirken, sentetik polimerler arasında poliakrilatlar, polikaprolaktonlar, polilaktitler, kopolimerler ve poliglikolitler gibi malzemeler kullanılmaktadır [53].

2.4.1 Polimerik Nanopartiküllerin Avantajları

Polimerik nanopartiküller, kolay sterilizasyon, fizyolojik ortamda parçalanabilirlik ve yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olup, biyolojik sistemlerde güvenli kullanımı sağlar. Etkin maddeyi hedef bölgelere yönlendirme ve kontrollü salınım yaparak tedavilerin daha etkili ve uzun süreli olmasını mümkün kılar. Nanopartiküller, hedefleme ligandları ile spesifik tedaviye olanak tanır ve biyolojik sıvılarda yüksek stabilite gösterir. Küçük boyutları sayesinde hücrelere kolayca nüfuz eder ve düşük sistemik toksisite ile tedavi sürecini güvenli hale getirir. Bu özellikler, polimerik nanopartikülleri ilaç taşıma sistemlerinde, kanser tedavisi, gen tedavisi ve diğer biyomedikal uygulamalarda kullanışlı hale getirir. Bu özellikler, polimerik nanopartikülleri ilaç taşıma sistemlerinde, kanser tedavisi, gen tedavisi ve diğer biyomedikal uygulamalarda kullanışlı hale getirir [1].

2.4.2 PNP' lerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan polimer türleri, üretim süreçlerinin güvenliği, etkinliği ve biyouyumluluğu açısından önemli rol oynamaktadır. Nanopartiküller, doğal polimerler (proteinler, polisakkaritler) ve sentetik polimerler (sentezlenen veya önceden sentezlenen) olmak üzere iki ana grupta

sınıflandırılabilir. Her iki polimer türünün de avantajları ve sınırlamaları vardır (Tablo 2.1).

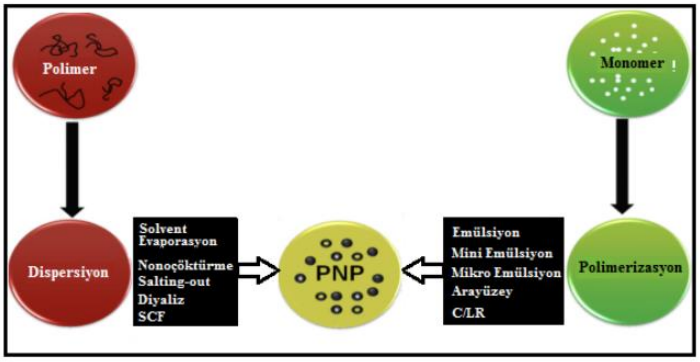
Tablo 2.1 Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler

NANOPARTİKÜL HAZIRLAMADA KULLANILAN POLİMERLER

Sentetik Polimerler	**Doğal Polimerler**	**Blok Kopolimerler**	**Kolloidal Stabilizanlar**
Poliakrilat	Kitosan	Polilaktid-Polietilen glikol (PLA-PEG)	Dekstran
Polimetakrilat	Aljinat	Poliepsilon\kaprolakton-Polietilen glikol (PCL-PEG)	Polivinil alkol
Polilaktid	Jelatin		
Polilaktid-ko-glikolid	Albümin		
Poli izo-bütil siyanoakrilat			
Poli n-bütil siyanoakrilat			

2.4.3 PNP' lerin Hazırlanma Yöntemleri

Polimerik nanopartiküller, iki farklı yöntemle nano boyutlarda oluşturulabilir. İlk yöntem, yukarıdan aşağıya yaklaşım olarak bilinir. Bu teknikte, polimer nanopartiküller çözücü buharlaştırma, diyaliz, süper kritik akışkan teknolojisi gibi yöntemlerle üretilir (Şekil 2.23). İkinci yöntem ise aşağıdan yukarıya yaklaşım olarak adlandırılır. Bu teknikte, polimer nanopartiküller, monomerlerinden miniemülsiyon, mikroemülsiyon ve arayüzey polimerizasyonu gibi yöntemlerle oluşturulur [54].



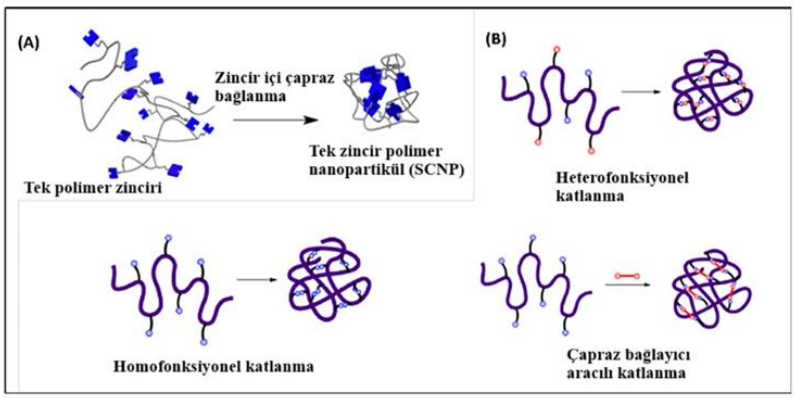
Şekil 2.23 Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan çeşitli tekniklerin şematik gösterimi [54]

Bu iki teknik arasındaki fark, üretim süreçlerinin başlangıcına dayanır; yukarıdan aşağıya yaklaşım, mevcut büyük yapıların küçültülmesi yoluyla nano boyutlarda parçacıkların elde edilmesine dayanırken, aşağıdan yukarıya yaklaşım, daha küçük birimlerden yani monomerlerden nano boyutlu yapılar oluşturmayı amaçlar.

2.4.4 Tek Zincirli Polimer Nanoparçacıklar (SCNP)

Polimerik nanopartiküller, tasarım esnekliği, biyouyumluluk ve biyolojik sistemlerdeki etkileşimlerini kontrol etme kabiliyeti gibi benzersiz özellikleri sayesinde son yıllarda geniş bir uygulama alanı bulmuştur [55]. Bu nanopartiküller, özellikle SCNP'ler gibi özel yapılarla daha da ilgi çekici hale gelmiştir. Tek zincirli nanopartikül (SCNP) kavramı ilk olarak Mecerreyes, Miller ve arkadaşları tarafından on beş yıl önce ortaya konmuştur [56]. Doğal biyomakromoleküllerin kendine has bir özelliği olan kendi kendine katlanma davranışından esinlenerek keşfedilmişlerdir.

SCNP'ler, ultra seyreltik ortam koşullarında tek bir polimer zincirinin molekül içi çapraz bağlanma yaparak kendi üzerine katlanıp sıkışmasıyla oluşturulan yapılardır (Şekil 2.24). Boyutları ise polimerik nanoparçacıkların ekstra küçültülmüş hali şeklindedir.



Şekil 2.24 A) SCNP sentezinin şematik gösterimi [57] (B) Bir polimer zincirinin molekül içi çapraz bağlanması için modlar [58]

SCNP'lerin inşa edilmesinde kullanılan sentetik metodolojiler arasında kovalent, dinamik kovalent ve kovalent olmayan çapraz bağlanma reaksiyonları bulunmaktadır. Bu reaksiyonlar, polimer zincirlerinin katlanmasına ve nanopartikül formasyonunun sağlanmasına yardımcı olur.

SCNP'lerin sentezinde, öncül polimer zincirinin konsantrasyonu kritik bir rol oynar. Polimer zincirinin konsantrasyonu, zincirin iç yapısını ve katlanma davranışını belirleyen önemli bir parametredir [59]. Düşük konsantrasyonlarda, moleküliçi etkileşimler baskın olur ve polimer zincirlerinin birbirleriyle etkileşime girmesi zordur. Bu durumda, moleküller arasında etkileşimler daha azdır ve zincirler genellikle kendi içlerinde etkileşerek katlanır. Konsantrasyon arttıkça, polimer zincirlerinin birbirleriyle etkileşim kurma olasılığı artar. Bu durumda, moleküller arası çapraz bağlanma baskın hale gelir ve daha büyük polimer ağları oluşabilir. Bu da SCNP'lerin istenmeyen bir şekilde büyümesine ve daha karmaşık yapılar oluşturmasına yol açabilir.

2.4.4.1 SCNP' lerin Sentezi

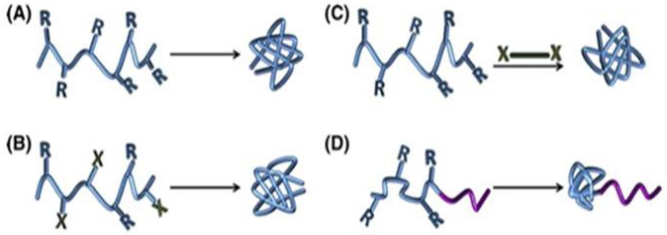
SCNP'lerin ilk sentezi Kuhn ve Blamer tarafından rapor edilmiştir [60]. SCNP'lerin sentezleme aşamaları genellikle üç temel basamaktan oluşur:

1. Öncül Polimer Sentezi: İlk olarak, SCNP'lerin sentezlenmesinde kullanılacak olan doğrusal polimer öncüsü üretilir. Dar boyut dağılımına sahip partiküller elde etmek için, polimer zincirlerinin kontrollü bir şekilde sentezlenmesi gereklidir. Bu nedenle, serbest radikal polimerizasyon yöntemi kullanılarak öncül bileşiklerin sentezi yapılır. Bu adımda, genellikle kontrollü polimerizasyon teknikleri kullanılarak polimer

zincirleri elde edilir. Bu aşamada polimerin yapısı ve uzunluğu, son üründeki boyut dağılımı ve diğer özellikler için belirleyici olur [61].

2. Polimerin İşlevselleştirilmesi: İkinci aşama, polimer zincirinin işlevselleştirilmesidir. Burada, zincirler üzerinde fonksiyonel gruplar eklenir. Bu fonksiyonel gruplar, polimer zincirlerinin birbirine bağlanarak katlanmasını sağlamak için kullanılır. Bu işlevselleştirme işlemi, SCNP'lerin spesifik özelliklerini belirler. Ayrıca, polimerin çözücülerle etkileşimi ve çapraz bağlanma yerlerinin kontrol edilmesi de bu aşamada yapılır.
3. Zincir İçi Etkileşimler ve Katlanma: Son adımda, polimer zincirleri zincir içi etkileşimlerle katlanarak SCNP'leri oluşturur. Bu etkileşimler, genellikle polimerin işlevselleştirilmiş gruplarının çapraz bağlanması yoluyla sağlanır. Bu aşama, genellikle çözücüler ve belirli sıcaklıklar altında gerçekleştirilir. Zincir içi etkileşimler sonucunda, polimer zincirleri bir araya gelir ve nanopartiküller şeklinde yapılaşır.

Homofonksiyonel zincir çöküşü, hetero-bifonksiyonel zincir çöküşü, çapraz bağlayıcı aracılı zincir çöküşü ve bloklu kopolimerlerin tek blok çökmesi, SCNP sentezinde kullanılan başlıca stratejilerdir [3]. Her biri polimer zincirinin katlanmasını ve nanopartikül oluşumunu sağlamak için farklı yöntemler uygular (Şekil 2.25).



Şekil 2.25 SCNP' lerin sentezi için kullanılan dört stratejinin şematik gösterimi A) Bir homo-fonksiyonel zincir çökmesi; B) Hetero-bifonksiyonel zincir çökmesi; C) Çapraz bağlayıcı aracılı zincir çökmesi; D) İki bloklu veya üç bloklu kopolimerlerin tek blok çökmesi

a) Homofonksiyonel Zincir Çöküşü (Şekil 2.25 A): Bu stratejide, polimer zinciri üzerinde aynı türde reaktif gruplar (örneğin çift bağlar veya benzeri kimyasal gruplar) bulunur. Bu reaktif gruplar, intramoleküler reaksiyonlar ile bir araya gelerek zincirin katlanmasına yol açar. Bu süreçte kullanılan reaktif grupların

yüzdesi %10 ile %100 arasında değişebilir. Kovalent veya kovalent olmayan bağlar kullanılabilir.

b) Hetero-bifonksiyonel Zincir Çöküşü (Şekil 2.25 B): Bu yaklaşımda, polimer zincirinde iki farklı fonksiyonel grup ("R" ve "X") bulunur. Bu iki grup, aynı polimer zincirinin içinde bir araya gelerek zincirin katlanmasını sağlar. Seyreltilmiş ortamda gerçekleşmesi gerekir çünkü fazla yoğunlukta çapraz bağlanma, istenmeyen sonuçlara yol açabilir. Hetero-fonksiyonel grupların oluşturduğu reaksiyonlar ile zincir katlanır.

c) Çapraz Bağlayıcı Aracılı Zincir Çöküşü (Şekil 2.25 C): Bu yöntemde, bir çapraz bağlayıcı kullanılır. Polimer zincirinin uçlarındaki fonksiyonel gruplar, çapraz bağlayıcı ile reaksiyona girerek zincirin katlanmasını sağlar. Bu yaklaşım, moleküller arası çapraz bağlanmayı önleyerek yalnızca zincir içi çapraz bağlanma sağlar. Avantajları ; polimerlerin daha kolay sentezi ve çapraz bağlayıcılar aracılığıyla ek işlevsellik sağlanabilmesidir.

d) İki Bloklu veya Üç Bloklu Kopolimerlerin Tek Blok Çöküşü (Şekil 2.25 D): Bu strateji, birden fazla bloktan oluşan kopolimerlerin tek bir blok üzerinde katlanmasını sağlar. Bu durumda, polimer zincirinin yalnızca bir bloğu katlanarak küre oluşturur, geri kalan blok ise bobin şeklinde kalır. Bu yöntem, "kurbağa yavrusu" veya "NP-bobin" yapıları üretir. Sonuç olarak; bloklardan sadece biri etkileşime girer ve bu blok küre şekline gelir , diğer blok ise bobin şeklinde kalır.

Bu dört strateji, SCNP'lerin sentezini kontrol etmek ve istenen özelliklere sahip nanopartiküller üretmek için çeşitli teknikler sunar. Seçilen strateji, elde edilmek istenen nanopartikül boyutu, şekli ve fonksiyonellik gibi faktörlere bağlı olarak belirlenir. Bu bilgiler, SCNP'lerin sentezinde optimize edilecek faktörlerin başında yer alır. Polimer zincirinin konsantrasyonu ve boyutu, nanopartiküllerin boyutunu, şeklini ve fonksiyonelliğini kontrol etmek için önemlidir.

2.4.4.2 SCNP' lerin Fiziksel Özellikleri ve Karakterizasyonu

SCNP'lerin fiziksel özellikleri, genellikle onları oluşturan polimer zincirlerinin özelliklerinden farklıdır. Bu özellikler, SCNP'yi oluşturan polimer zincirlerinin kimyasal bileşimi ve fonksiyonellikleri tarafından belirlenir. Bu nedenle, SCNP'lerin karakterizasyonu, onları daha iyi anlamak ve uygulamalarda nasıl kullanılacaklarını belirlemek için çok önemlidir. Bununla birlikte bu nanoyapıların morfolojilerini tespit etmek karakterizasyonun en zorlayıcı kısmıdır [62].

SCNP karakterizasyonunda kullanılan yöntemler:

Boyut Ayıklama Kromatografisi (SEC): SCNP'lerin boyutlarının belirlenmesinde ve moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılır. Moleküler ağırlık dağılımı, SCNP'lerin morfolojik özellikleri hakkında bilgi verir. Molekül içi çapraz bağlama, moleküler ağırlığı değiştirmezken, hidrodinamik hacim ve iç viskozite gibi özellikler, molekül ağırlığına etki eder [62].

Dinamik Işık Saçılımı (DLS): DLS, özellikle nanopartiküllerin (NP'ler) ve diğer kolloidal çözeltilerin karakterizasyonunda kullanılan popüler bir yöntemdir. Bu yöntem, nanomalzemelerin boyutlarını, dağılımlarını ve yüzey özelliklerini hızlı ve verimli bir şekilde belirlemek için yaygın olarak kullanılır. DLS, parçacıkların çözücüler içinde nasıl hareket ettiğini gözlemleyerek çeşitli parametreleri hesaplamaya yardımcı olur [63].

DLS tekniği, çözeltideki nanopartiküllerin bir lazer ışığına maruz bırakılması ile başlar. Lazer ışığı, çözeltideki parçacıklar tarafından saçılır. Saçılan ışık, partiküllerin hareketi ile bağlantılı olarak zaman içinde değişir. Parçacıkların hızına göre, ışığın saçılası ve bu saçımanın zaman içinde nasıl değiştiği ölçülerek partikül büyüklüğü ve dağılımı hesaplanır. Çözeltideki partiküllerin hızlarına bağlı olarak, kullanılan cihaz, bu ışık değişikliklerini analiz eder ve sonuçları parçacık büyüklüğü, dağılım indeksi, hidrodinamik büyüklük ve diffuziyon katsayısı gibi parametrelerle ilişkilendirir. Sonuç olarak, DLS, nanopartiküllerin boyutları ve dağılımları hakkında değerli bilgiler sağlayarak, polimerik ve diğer kolloidal çözeltilerin fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR): SCNP'lerin yapısal özelliklerini anlamak ve çapraz bağların kanıtlarını elde etmek için kullanılan diğer tekniklerdir. (NMR) gibi teknikler, moleküler düzeydeki değişiklikleri izlemek için faydalıdır.

Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC): GPC, polimerlerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan bir kromatografik yöntemdir. Bu teknik, polimerlerin molekül büyüklüğünü ölçmek ve karakterize etmek için yaygın olarak kullanılır. GPC'nin temel çalışma prensibi, moleküllerin kolon içinde bulunan jel gözeneklerinde ne kadar tutulduğuna dayanmaktadır [64].

GPC cihazı, içi belirli büyüklükteki gözeneklerle dolu bir jel ile kaplanmış bir kolona sahiptir. Kolonun içindeki jel genellikle çapraz bağlı polistiren veya gözenekli cam gibi maddelerden yapılır. Çözeltideki polimerler kolon içine verildiğinde, moleküller farklı hızlarla kolon boyunca hareket ederler. Molekül büyüklüklerine göre hareket ederler. Büyük moleküller, jel gözeneklerine giremedikleri için kolon boyunca hızlıca hareket eder ve kolonu ilk terk ederler. Küçük moleküller ise jel gözeneklerine girebilir ve burada daha uzun süre kalırlar, dolayısıyla kolonu en son terk ederler.

GPC analizinin çıktısı, polimerlerin molekül ağırlığının dağılımına göre bir pik (grafik) oluşturur. Eğer moleküller benzer büyüklükte ise tek bir keskin pik gözlemlenir. Farklı büyüklükteki moleküller ise geniş pikler oluşturur. Piklerin genişliği, moleküler ağırlık dağılımının genişliği hakkında bilgi verir.

Polimerler GPC tekniğiyle; moleküler ağırlık tespiti, polidispersite indeksi hesaplanması, viskozite analizi, polimerin katlanma, kümelenme ve dallanma oranlarının belirlenmesi, kopolimer bileşen oranlarının tespiti ve molekül büyüklüğünün hesaplanması gibi çeşitli özellikleri incelenebilir [64].

GPC cihazı, içi belirli büyüklükteki gözeneklerle dolu bir jel ile kaplanmış bir kolona sahiptir. Kolonun içindeki jel genellikle çapraz bağlı polistiren veya gözenekli cam gibi maddelerden yapılır. Çözeltideki polimerler kolon içine verildiğinde, moleküller farklı hızlarla kolon boyunca hareket ederler. Molekül büyüklüklerine göre hareket ederler. Büyük moleküller, jel gözeneklerine giremedikleri için kolon boyunca hızlıca hareket eder ve kolonu ilk terk ederler. Küçük moleküller ise jel gözeneklerine girebilir ve burada daha uzun süre kalırlar, dolayısıyla kolonu en son terk ederler.

GPC analizinin çıktısı, polimerlerin molekül ağırlığının dağılımına göre bir pik (grafik) oluşturur. Eğer moleküller benzer büyüklükte ise tek bir keskin pik

gözlemlenir. Farklı büyüklükteki moleküller ise geniş pikler oluşturur. Piklerin genişliği, moleküler ağırlık dağılımının genişliği hakkında bilgi verir.

Polimerler GPC tekniği ile; molekül ağırlığı tayini, polidispersite indeksi bulunması, viskozite analizi, polimerin katlanması, kümelenmesi ve dallanma oranı bulunması, kopolimer bileşim oranı bulunması molekül büyüklüğü hesabı gibi özellikler bulunabilir.

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM): SCNP'lerin morfolojisini incelemek için yaygın olarak kullanılır. SCNP'ler bir yüzey üzerine kurutulduğunda, çöken ipçiklerin boyutları AFM ile görselleştirilebilir. Bu, SCNP'lerin fiziksel yapılarının incelenmesine olanak tanır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): Numunelerin yüzey özelliklerini yüksek çözünürlükle incelemek için kullanılan güçlü bir karakterizasyon yöntemidir. SEM, özellikle malzeme bilimi, biyoloji, nanoteknoloji ve diğer birçok alanda yaygın olarak kullanılır [65].

SEM, numune yüzeyine odaklanmış bir elektron ışını gönderir. Bu elektronlar yüksek hızda hareket eder ve numuneye çarptıklarında çeşitli etkileşimlere girer. Elektronlar, numunenin yüzeyine çarptıklarında, çeşitli sinyaller üretir. Bu sinyaller arasında geri saçılma elektronları, sekonder elektronlar ve X-ışınları bulunur. Bu sinyaller, numunenin yüzey yapısı hakkında bilgi verir. Geri saçılan elektronları veya sekonder elektronları toplar. Bu toplama işlemi, numunenin yüzeyindeki topografyayı (yüzey şekilleri, çatlaklar, girintiler vb.) yüksek çözünürlükle görselleştirir. SEM, yüksek vakum ortamında çalışır. Bu, elektronların serbestçe hareket edebilmesi için gereklidir. Vakum ortamı ayrıca numunenin elektriksel iletkenliğini arttırarak, daha net ve doğru görüntüler alınmasını sağlar.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), yüzey morfolojisi ve yapısal analizlerin yapıldığı güçlü bir karakterizasyon aracıdır.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM): TEM, numunenin iç yapısının ayrıntılı bir şekilde incelenmesini sağlayan son derece güçlü bir karakterizasyon aracıdır. TEM, özellikle nanoteknoloji ve malzeme bilimi gibi alanlarda, çok küçük yapıların analizinde kullanılır. TEM'in çalışma prensibi, numuneden geçen bir elektron ışınının etkileşimlerine dayanır. Bu teknikte, elektron ışınları numuneden geçerken saçılır ve bu saçılma, numunenin yapısı hakkında bilgi sağlar.

TEM, çok yüksek enerjiye sahip elektron ışınları kullanır. Bu elektronlar, ince bir numune üzerinden geçirilir. Elektronlar, numunenin atomlarıyla etkileşime girerek saçılır. Elektronlar numunenin iç yapısına çarptıkça, saçılma olayları meydana gelir. Saçılan elektronlar, floresan bir ekranda negatif bir görüntü oluşturur. Bu şekilde numunenin iç yapısı, çok yüksek çözünürlükle gözlemlenebilir. TEM, nanometre ölçeğinde çözünürlük sağlar. Bu, özellikle nanoskaladaki yapıları (örneğin, nanopartiküller veya SCNP'ler gibi) analiz etmek için son derece önemlidir.

Yüksek çözünürlük ve bozulma riskinin olmaması, TEM'i SCNP'lerin boyut ve yapısını analiz etmek için çok değerli kılar. Bu sayede, nanoteknoloji ve polimer mühendisliği alanlarında yapılan araştırmaların doğru ve güvenilir verilerle desteklenmesine yardımcı olur [65].

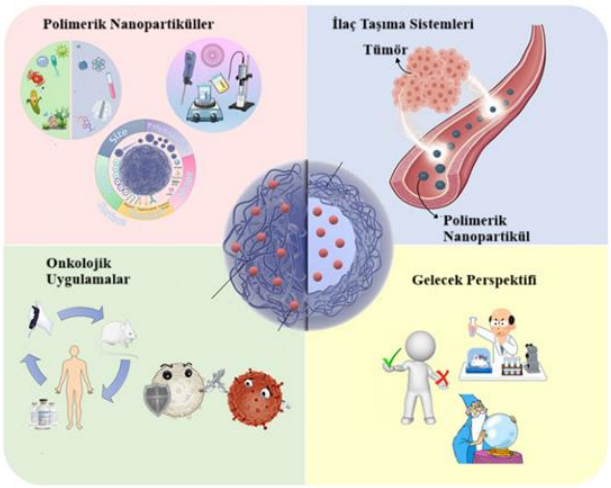
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC): DSC, termal analiz tekniklerinden biri olup, malzemelerin termal özelliklerini incelemek için kullanılır. DSC cihazı, bir örneğin ısıtılması, soğutulması ya da sabit bir sıcaklıkta tutulması sırasında soğurulan veya salınan enerji miktarını ölçer. Bu yöntem, bir örneğin fiziksel ve kimyasal değişim süreçlerini anlamak için çok yararlıdır.

DSC'de, örnek ve referans madde birbirleriyle karşılaştırılır. Analiz sırasında, örnek ile referans arasındaki sıcaklık farkı izlenir. Eğer örnekteki sıcaklık referansa göre farklı olursa, örneğe enerji eklenir ya da çıkarılır, bu da sıcaklık farkını dengelemeye yardımcı olur. DSC'de, örnekle referans arasındaki ısı farkı pozitifse (endotermik reaksiyon), örneğe enerji verilir ve pozitif bir sinyal kaydedilir. Negatif ısı farkı ise (ekzotermik reaksiyon) enerji kaybını gösterir ve negatif bir sinyal elde edilir.

Erime, kristalleşme, camsı geçiş ve entalpi değişimleri gibi parametreler hakkında bilgi sağlamak, yeni materyallerin tasarımında ve optimizasyonunda önemli bir rol oynar. Bu teknik, özellikle polimerlerin termal davranışlarını anlamada ve ürün tasarımında yön verici bir araç olarak kullanılmaktadır.

2.4.4.3 SCNP' lerin Uygulamaları

SCNP'ler üstün özelliklerinden dolayı birçok alanda çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.26). İşte bazı uygulama alanları; ilaç konjugatları, görüntüleme ajanı, göz mercek implantları, sensörler, antimikrobiyal ajanlar, peptitlerin hızlı hücresel alımını kolaylaştıran ilaç verme sistemleri [66]. SCNP'lerin bu geniş uygulama alanları, bu nanopartiküllerin çok yönlülüğünü ve farklı bilimsel ve endüstriyel alanlardaki potansiyelini göstermektedir.



Şekil 2.26 SCNP uygulama alanları

2.5 Jeller

Jeller, polimerlerin sıvıyı emerek veya bağlayarak oluşturduğu, elastik veya yarı elastik özellikler gösteren ve genellikle makromoleküllerden oluşan üç boyutlu ağ yapılarından meydana gelen malzemelerdir [67]. Bu yapılar, sıvıların belirli bir miktarını bünyelerinde tutarak, jelatinimsi bir özellik kazanır. Polimerik jeller, genellikle su, organik çözücüler veya biyolojik sıvılar gibi farklı sıvıları içine alabilir ve bu özellikleri onları çok yönlü ve farklı alanlarda kullanıma uygun hale getirir [69].

Jellerin esas bileşenleri şunlardır:

1. Polimer: Jel yapısının ana bileşeni olan polimer, ağ yapısını oluşturur. Bu ağ yapısı, genellikle kovalent ya da non-kovalent bağlar ile birbirine bağlanan polimer zincirlerinden oluşur.

2. Sıvı (Çözücü): Polimerin içinde çözünerek jel yapısına dâhil olan sıvıdır. Jelatinimsi özellik, polimerin bu sıvıyı absorplaması ile ortaya çıkar. Sıvı miktarı, polimerin 10-100 katı kadar olabilir.

Jel yapıların elastik özellikleri, sıvının, yapılarındaki özellikleri belirli bir oranda taşıması nedeniyle meydana gelir. Bu özellikler, özellikle biyomedikal, farmasötik, gıda ve kozmetik endüstrilerinde önemli uygulamalara sahiptir [69].

2.5.1 Polimerik Jeller

Polimerik jeller, fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanmış polimerik ağların aralıklı boşluklarında büyük miktarda sıvı tutan esnek yarı katı yapılardır [70]. Bu jeller, sırasıyla polimer ağlarından ve sıvıdan kaynaklanan hem elastik hem de viskoz özellikler gösterir. Bu jeller çeşitli uygulamalar için esnek ve uyarlanabilir özellikler sunar [71]. Bu jellerin sahip olduğu temel özelliklerden bazıları şunlardır:

Polimerik jeller, çözücüleri emerek şişme eğilimindedir. Bu özellik, özellikle ilaç taşıma sistemlerinde ve biyomedikal uygulamalarda faydalıdır, çünkü jelin içerdiği sıvı miktarı şişme sırasında değişebilir [72].

Zaman içinde polimerik jellerde meydana gelen büzülme, su kaybı veya çözünürlük değişiklikleri nedeniyle meydana gelir. Bu büzülme, bazı jellerin yaşlanma sürecinde gerçekleşebilir ve jelin mekanik özelliklerini etkileyebilir [73].

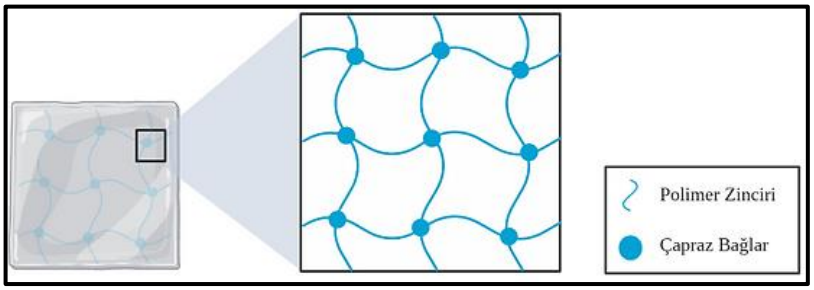
Polimerik jeller, zaman içinde kimyasal yapılarında değişiklikler yaşayabilir, bu da elastikiyet ve viskozite gibi özelliklerini değiştirebilir. Yaşlanma, özellikle biyomedikal alanlarda implantların performansını etkileyebilecek önemli bir faktördür [74].

Jel sistemlerinin sertliği, temel olarak bileşenlerin birbirine bağlanarak oluşturduğu sürekli ağ yapısından kaynaklanır. Bu ağ yapısı, jelin mekanik özelliklerini belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Ağ yapısı ne kadar güçlü ve sıkı olursa, jel sistemi o kadar sert ve dayanıklı olur.

2.5.2 Hidrojeller

1954'te Wichterle ve Lim'in ilk sentetik hidrojelleri üretmesi, hidrojel teknolojisinin gelişiminde önemli bir aşama olmuştur [75]. Bu buluş, polimer biliminde devrim yaratmış ve hidrojellerin çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmasının önünü açmıştır.

Hidrojeller, suyu yüksek oranda tutabilen, biyolojik ve fiziksel özellikleri ile birçok biyoteknolojik alanda büyük öneme sahip olan polimerik ağ yapılarıdır (Şekil 2.27). Hidrofilik doğaları, onların sıvıları içine alıp çözünmeden tutmalarını sağlar. Bu özellikleri, onları özellikle biyomedikal uygulamalarda çok değerli hale getirir.



Şekil 2.27 Hidrojelin ağ yapısı

Hidrojeller, özellikle –OH, –CONH–, –$CONH_2$– ve –SO_3H gibi hidrofilik fonksiyonel gruplar içerdiği için büyük miktarda suyu tutabilir [76]. Bu özellik, hidrojelin esnekliğini ve yumuşaklığını artırır. Hidrojeller genellikle biyouyumlu, çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilen malzemeler olarak kabul edilir. Bu nedenle, vücutta veya biyolojik ortamlarda güvenle kullanılabilirler. Su emme özellikleri nedeniyle şişen hidrojel ağları, yumuşak ve elastik özelliklere sahip olur, bu da onları özellikle doku mühendisliği ve yara iyileşmesi gibi biyomedikal uygulamalarda ideal kılar. Hidrofilik yapılar, biyolojik sıvılarla etkileşerek ilaçları kontrollü bir şekilde salabilen sistemler oluşturur. Bu özellik, ilaç taşıma ve tedavi sistemleri için önemlidir [76].

Hidrojeller, özellikle doku mühendisliği, yara iyileşmesi, göz içi lensler ve protein ayırma işlemleri gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu jeller, biyolojik ortamlarla uyumlu olduklarından, vücuda zarar vermeden doku onarımı ve tedavi süreçlerine katkı sağlar. Biyomedikal, farmasötik ve çevresel uygulamalar için ideal bir malzemedirler [75].

2.5.2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojellerin sınıflandırılması, çeşitli özelliklerine ve bileşenlerine göre farklı kriterlere dayanır (Tablo 2.2). Bu kriterler, hidrojelin kimyasal yapısını, hazırlama yöntemini ve kullanım alanlarını belirlemede önemli rol oynar.

Tablo 2.2 Hidrojellerin sınıflandırılması

HİDROJELLER			
Kaynağına Göre	**Çapraz Bağlanma Türüne Göre**	**Hazırlanma Yöntemlerine Göre**	**İyon Yüklerine göre**
Doğal	Fiziksel	Homopolimer	Nötral
Sentetik	Kimyasal	Kopolimer	Anyonik
Hibrit		İç içe geçmiş polimerik hidrojeller (IPN)	Katyonik
			Amfoterik

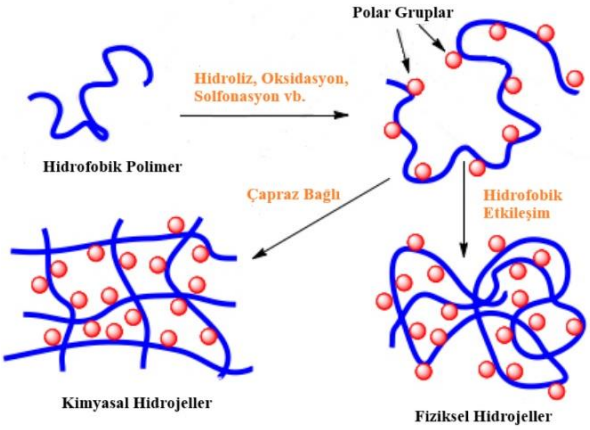
- Kaynağına göre hidrojeller; doğal, sentetik ve hibrit olmak üzere üç ana sınıfa ayrılırlar [77].

Doğal polimerler; biyolojik olarak türetilmiş, biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip malzemelerdir ve genellikle biyoteknoloji ve tıbbi uygulamalarda kullanılır. Kollajen ve jelatin, protein yapılı doğal polimerler olup, yara iyileşmesi ve doku mühendisliği gibi uygulamalarda tercih edilir. Agaroz ve aljinat ise polisakkarit yapılı polimerlerdir; agaroz biyolojik uygulamalarda, aljinat ise biyomedikal uygulamalarda özellikle yara iyileşmesi ve hücre taşıma için kullanılır.

Sentetik hidrojeller; kimyasal olarak sentezlenen ve biyolojik özelliklere sahip olmayan polimerlerden yapılır, ancak biyolojik fonksiyonlar kazandırılabilir. Akrilik Asit : Yüksek su tutma kapasitesine sahip, ilaç taşıma ve biyomedikal uygulamalarda kullanılan bir polimerdir. Akrilamid: Doku mühendisliği ve biyomedikal alanlarda su tutma özellikleriyle kullanılan bir polimerdir. Hidroksietil Metakrilat: Su tutma kapasitesine sahip metakrilik asit türevi, hidrojel formülasyonlarında kullanılır. Metakrilik Asit ve metil metakrilat : Polimerlerin çapraz bağlanmasını sağlayan, su emme özelliklerine sahip kimyasallardır.

Hibrit Polimerler (Doğal ve Sentetik Karışımı); doğal ve sentetik polimerlerin kombinasyonuyla hazırlanır. Bu polimerler, her iki türün avantajlarını bir araya getirir. Doğal polimerlerin biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu ile sentetik polimerlerin kontrollü özellikleri birleşir. Bu tür polimerler genellikle daha yüksek mekanik özellikler ve daha iyi biyouyumlu bir yapı sunar.

- Çapraz bağlanma türüne göre hidrojeller; fiziksel çapraz bağlı hidrojeller ve kimyasal çapraz bağlı hidrojeller olmak üzere iki çeşittir. (Şekil 2.28).



Şekil 2.28 Kimyasal ve fiziksel hidrojel oluşumu [78]

Fiziksel Çapraz Bağlı Hidrojeller: Van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi zayıf ikincil kuvvetlerle oluşur [79]. Bu etkileşimler polimer zincirleri arasında kendiliğinden oluşur, yani dış bir çapraz bağlayıcı maddeye gerek yoktur. Fiziksel çapraz bağlı jeller, genellikle daha esnek ve yeniden şekil alabilen yapılara sahiptir. Tersinmez (geri döndürülemez) olmayan jellerdir, yani sıcaklık, pH gibi dış etmenler ile çözünme süreçleri değiştirilebilir. Üretimi daha kolay ve daha düşük maliyetlidir. Çözünürlükleri ve su tutma kapasiteleri de yüksektir.

Kimyasal Çapraz Bağlı Hidrojeller: Kovalent bağlar polimer zincirleri arasında bulunur. Bu, güçlü kimyasal bağlarla yapılan çapraz bağlama işlemidir ve genellikle daha kalıcıdır. Tersinmez jellerdir, yani fiziksel etkileşimler tarafından çözülemezler. Bir kez çapraz bağlandıklarında, fiziksel şartlar (sıcaklık, pH vb.) değiştirilse bile çözünmezler. Kimyasal çapraz bağlar genellikle daha güçlüdür, bu da kimyasal çapraz bağlı jellerin daha dayanıklı olmasını sağlar [80].

- Hazırlanma yöntemlerine göre hidrojeller; üçe ayrılır. Bu sınıflandırma, hidrojellerin yapılarına ve polimer bileşiklerinin düzenlenişine göre yapılmaktadır.

Homopolimerik Hidrojeller: Tek bir monomer türünden türetilen polimer ağlarından oluşur. Yani, yalnızca bir monomer birimi, polimer zincirini oluşturur.

Genellikle tek bir kimyasal yapıya sahip olduğundan, yapıları daha basittir. Bu tür jellerin su tutma kapasitesi, kullanılan monomerin özelliklerine bağlıdır [81].

Kopolimerik Hidrojeller: İki veya daha fazla farklı monomer türünden türetilmiş polimer ağlarından oluşur. Bu monomerler, polimer zinciri boyunca farklı konfigürasyonlarda (blok, rastgele, alternatif) düzenlenmiş olabilir [81]. Kopolimerik yapılar, homopolimerlere kıyasla daha fazla çeşitlilik ve fonksiyonellik sunar çünkü farklı monomer türlerinin bir araya gelmesi, su tutma kapasitesini, biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği ve mekanik özellikleri iyileştirebilir.

İç İçe Geçmiş Ağ Yapılı (IPN) Hidrojeller: Birbirleriyle fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlı iki veya daha fazla polimer ağı iç içe geçerek oluşturulur. Bu tür jeller, birbirini içine geçiren iki bağımsız ağ yapısının birleşmesinden oluşur. IPN'lerde, bir ağın çapraz bağlama reaksiyonları bir diğerinin varlığını engellemez. Bu da iki ağın bir arada stabil kalmasını sağlar. Ancak, bu ağlar arasında kimyasal veya güçlü fiziksel etkileşimler yoktur [82].

Yarı IPN: Yarı IPN'ler, çapraz bağlı bir polimer sisteminin içine serbest polimer zincirlerinin çözünmesiyle oluşturulur. Yani, bir ağın içinde serbest polimerlerin varlığı söz konusu olabilir. Daha yüksek mekanik dayanıklılık, şişme kapasitesi ve stabilite sunar. Ayrıca, biyolojik ortamda daha iyi performans gösterme eğilimindedir.

- İyon yüküne göre hidrojeller; dört gruba ayrılırlar.

Nötral Hidrojeller: Yapılarında yüklü grup bulundurmayan homopolimerik veya kopolimerik hidrojellerdir. Bu hidrojellerin şişme davranışı, ortamda bulunan çözücünün osmotik basıncı ile polimerin yan zincirlerinin gerilme enerjisi arasında bir denge kurularak gerçekleşir. Şişme, bu dengeye ulaşana kadar devam eder. Ortamdaki sıcaklık değişimi, nötral hidrojellerin şişme ve büzülme davranışını etkiler. Bu tür jellerin şişme kapasitesi genellikle sıcaklık ve çözücünün osmotik basıncı gibi faktörlere duyarlıdır.

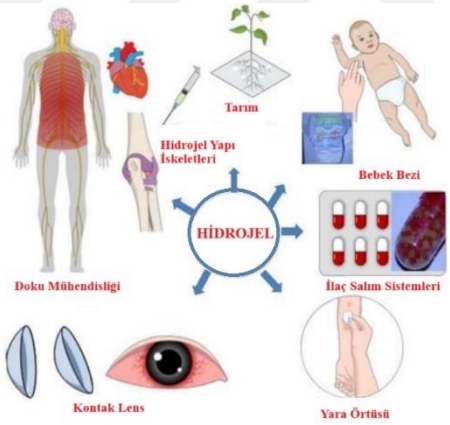
Anyonik Hidrojeller: Yapılarında karboksilik asit (–COOH) veya sülfonik asit (–SO_3H) gibi negatif yüklü gruplar içerir. Anyonik gruplar asidik pH'da iyonize olamadıkları için, bu ortamda büzüşme eğilimindedirler. Bazik pH'da ise negatif yükler iyonize olarak elektrostatik itme oluşturur ve bu da jelin şişmesine yol açar.

Katyonik Hidrojeller: Yapılarında amino grupları ($–NH_2$) gibi pozitif yük içeren bileşikler barındırır. Düşük pH'da katyonik gruplar iyonize olur ve elektrostatik itme sebebiyle şişme meydana gelir. Özellikle asitik ortamlar ve düşük pH koşullarında şişme davranışı gösterir.

Amfoterik Hidrojeller: Yapılarında hem negatif (anyonik) hem de pozitif (katyonik) yükler içeren gruplar barındırır. Bu hidrojellerin şişme veya büzülme davranışı, yapıdaki anyonik ve katyonik grupların oranına bağlı olarak pH değişimlerine tepki verir. Düşük pHda katyonik gruplar iyonize olur, şişme başlar. Yüksek pH ise anyonik gruplar iyonize olarak şişmeye neden olur.

2.5.2.2 Hidrojellerin Kullanım Alanları

Hidrojeller, üstün özellikleri sayesinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (Şekil 2.29). Bu özellikler, su tutma kapasiteleri, biyouyumlulukları ve çevresel uyaranlara duyarlılıkları gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu sebeplerle, hidrojeller özellikle biyomedikal ve sağlık alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [81].



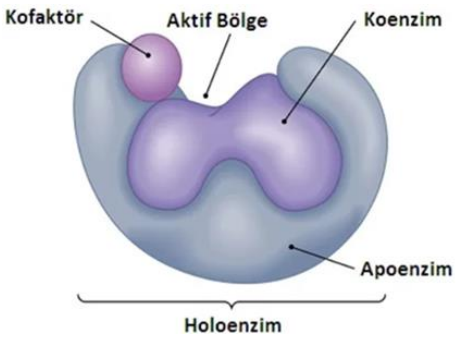
Şekil 2.29 Hidrojel kullanım alanları [81]

Hidrojeller, çevre, tarım ve gıda endüstrilerinde önemli kullanım alanlarına sahip, su tutma ve adsorpsiyon yetenekleriyle çevre kirliliği, tarımsal verimlilik ve gıda güvenliğine katkı sağlar. Biyolojik olarak parçalanabilir olmaları, sürdürülebilirlik sağlar. Elektriksel duyarlılıkları ve mekanik tepki verme özellikleri, onları yumuşak robotik, enerji depolama ve giyilebilir teknolojiler için değerli kılar. Bu polimerler, su emme kapasitesine sahip 3D yapılarla oluşturulurlar.

3
ENZİMLER

Enzimler, yaşayan hücreler içinde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlarda rol oynayan yüksek derecede spesifik biyokatalizörlerdir. Kimyasal süreçleri hızlandırma özellikleri sayesinde, enzimler geleneksel kimyasal yöntemlerin yerine geçme potansiyeline sahiptir ve bu da daha az kaynak tüketimi, daha az yan etki ve daha yüksek verimlilik gibi pek çok avantaj sağlar [83]. Ayrıca, enzimlerin ürün elde edildikten sonra ekonomik açıdan geri kazanılamaması ve maliyetlerinin yüksek olması gibi dezavantajları da mevcuttur.

Çoğu enzim, protein yapısına sahip olup, bazıları yalnızca proteinlerden oluşurken, bazıları apoenzim ve koenzim olmak üzere iki bileşenden meydana gelir. Apoenzim, enzimin protein kısmıdır ve katalitik aktivite için yardımcı moleküller gerektirir. Bu yardımcı moleküllere kofaktör denir ve genellikle metal iyonları veya organik gruplar olabilir. Bazı enzimler her iki bileşeni de kullanır. Eğer organik grup apoenzime sıkı bir bağla bağlıysa, buna prostetik grup denir; eğer bağ gevşekse ve ayrılabiliyorsa, buna koenzim denir [84]. Apoenzim ve koenzim birleştiğinde haloenzim veya bileşik enzim oluşur ve katalitik işlevi yerine getirir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Haloenzim ve apoenzim yapısı

Enzimler, çok çeşitli etki alanlarına sahip olduklarından, sınıflandırılmaları gerekmektedir. Uluslararası Biyokimya Birliği'ne (IUB) göre enzimler altı gruba sınıflandırılmaktadır: oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar. Bu biyomoleküller, yenilenebilir kaynaklardan türedikleri için özeldir ve bunların yarısından fazlası mantarlar tarafından, üçte biri bakteriler tarafından, yaklaşık %8'i hayvanlar tarafından ve yaklaşık %4'ü bitkiler tarafından üretilmektedir [85-87].

Günümüzde çeşitli biyoteknolojik, biyomedikal ve farmasötik uygulamalara sahip 4000'den fazla enzim bilinmektedir [88]. Enzimler, biyosensör olarak, biyomühendislikte, klinik tedavi ajanları olarak, modern tanı yöntemlerinde ve atık işleme, deri tabaklama ve rasemik karışımların çözümü gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılmaktadır [89].

3.1 Enzim Aktivitesi

Enzimler, biyolojik ortamlarda genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen, etkinliklerini sürdürebilirler. Enzim miktarının sınırlı olmasından dolayı, enzim etkinliği genellikle ölçülür. Bu etkinlik, belirli bir zaman diliminde ve en uygun koşullar altında enzim tarafından substratın ürüne dönüştürülme miktarıyla tanımlanır. Enzim ünitesi, 25°C'de ve optimal koşullarda, bir dakikada 1 mikromolar substratı ürüne dönüştüren enzim miktarını ifade eder.

3.2 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

3.2.1 Substrat ve Enzim Konsantrasyonu

Enzim miktarı sabit kaldığında, substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı da yükselir. Ancak, tüm enzimlerin aktif bölgeleri doygunluğa ulaştığında, reaksiyon hızı belirli bir düzeye sabitlenir [90].

3.2.2 Sıcaklık

Optimum sıcaklık, enzimlerin en yüksek etkinlik gösterdiği sıcaklık değeridir ve bu değer her enzim için farklılık gösterebilir. Çoğunlukla, memeli organizmalara ait enzimler, fizyolojik koşullar altında (37 °C) en verimli şekilde çalışır. Reaksiyon sıcaklığındaki değişiklikler, enzim aktivitesinin azalmasına veya proteinin denatüre olmasına neden olabilir [91].

3.2.3 pH

Optimum pH, enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeridir ve farklı enzimler için optimum pH değerleri değişiklik gösterebilir. Enzim, bu pH değerinden sapmaya başladıkça aktivite kaybı yaşar. pH'ın çok yüksek veya çok düşük olması durumunda, enzim denatüre olur ve bu da aktivite değerinin sıfırlanmasına yol açar [92] .

3.3 Enzim Aktivitesi

Üreaz enzimi (üre amidohidrolaz E.C. 3.5.1.5), üreyi hidrolize ederek amonyak ve karbonik asit üreten bir enzimdir (Şekil 3.2). Bu enzim, 1961 yılında Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından tanımlanmış ve 1972'de yapılan revizyonla enzim için bu numara atanmıştır [93].

$$(NH_2)_2\,CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3 \qquad (3.1)$$

Üreaz, 1926 yılında James B. Sumner tarafından fasulye (Canavalia ensiformis) tohumlarından kristalleştirilmiştir. Bu buluş, enzimlerin protein yapısında olduğunu kanıtlayarak, enzimlerin saf halde izole edilmesine olanak sağlamıştır. Üreazın toprakta bulunması ise ilk kez 1935 yılında Rotini tarafından bildirilmiştir [94]. O günden itibaren üreaz, üre gübrelemesi ve bitkilerdeki azot dengesinin düzenlenmesindeki kritik rolü nedeniyle sürekli araştırılmıştır.



Şekil 3.2 Üreazın üç boyutlu yapısı

Ürenin hidrolizi, doğal şartlar altında yavaş gerçekleşen bir süreçtir ve bu reaksiyon sonucunda amonyak ve siyanürik asit oluşur. Ancak üreaz enzimi mevcut olduğunda, reaksiyonun sonunda amonyak ve karbonik asit meydana gelir.

Karbonik asit, daha sonra karbondioksit ve amonyağa dönüşerek kendiliğinden parçalanır [95]. Üreaz enzimi üreyi hidrolize ederken karbamat adlı bir bileşik oluşur ve bu bileşik ayrılarak başka bir amonyak ve karbonik asit molekülü üretir. Bu süreç, pH artışına yol açarak kalsiyum kristallerinin çökelmesine neden olur.

Üreaz, kristallize edilen ilk enzim olup, nikel iyonlarının keşfedilen ilk enzimatik proteini olarak bilinir. Ayrıca, birçok hastalığın, özellikle kronik hastalıkların, gelişmesinde rol oynayabilen bir virülans faktörü olarak tanımlanmıştır. Üreazın üç boyutlu yapısı, 1930'larda X ışını kristallografisi ile belirlenmiş ancak tam olarak anlaşılması, bilgisayar teknolojilerinin ilerlemesiyle 1967 yılında mümkün olmuştur [96].

3.3.1 Üreaz Kaynakları

En yaygın üreaz içeren kaynaklar şunlardır:

- *Klebsiella aerogenes*: Geviş getiren hayvanların sindirim sisteminde bulunan bu bakteri, üreaz içerir ve azot metabolizmasında önemli bir rol oynar.
- *Bacillus pasteurii*: Toprakta, sularda ve pis sularda yaşayan bu bakteri, üreaz sayesinde bitkiler için toprağı azotça zenginleştirir ve bu özelliği özellikle ziraat alanında önemlidir.
- *Canavalia ensiformis*: Bir fasulye türüdür ve azot emiliminin yetersiz olduğu durumlarda, argininin açığa çıkardığı üreyi amonyağa çeviren üreaz içerir, böylece bitkiler için azot kaynağı oluşturur.
- *Helicobacter pylori*: İnsanlarda mide rahatsızlıklarına yol açan bu bakteri, mide asidik ortamını etkileyerek ülser ve diğer mide problemlerine neden olur.

3.3.2 Üreaz Kullanım Alanları

Üreaz enzimi, birçok endüstriyel alanda farklı uygulamalara sahiptir. Gıda örneklerinde, endüstriyel atık sularda, yer altı sularında ve çevresel ağır metal iyonlarının tespitinde model enzim olarak kullanılmaktadır [97]. Ayrıca üre, meyve sularından ve yiyeceklerden uzaklaştırılmakta; şaraptan üreyi temizleyerek etil karbamat oluşumunu engellemektedir. Kemoterapötiklerin etkinliğini artırmak için de kullanılabilmektedir. Üreaz, immünoglobulin tepkilerini tetikleyebilen bir

antijen olarak da işlev görür. Son yıllarda ise biyoçimento üretiminde, ürolitik aktivite gösteren mikroorganizmalar kullanılarak çeşitli endüstriyel uygulamalarda yer almaktadır.

3.3.3 Üreaz Enzimi ile Yapılmış Çalışmalar

Hearn ve Neufeld'in çalışmalarında, üreaz enzimi poli(metilen co-guanidin) kaplı aljinat boncuklar üzerine enkapsülasyon yöntemiyle immobilize edilmiştir [98]. Diğer bir çalışmada Chen ve Chiu, poli(N-izopropilakrilamit-co-N-akrilosüksinimido-co-2-hidroksietilmetakrilat) kompozit hidrojel membran üzerine kovalent bağlama yöntemiyle üreaz immobilize etmiştir [99]. Ayrıca, Arıca ve ekibi, epiklorohidrinle aktive edilmiş Poli(2-hidroksietilmetakrilat) membran üzerine kovalent bağlama yoluyla üreaz immobilizasyonu gerçekleştirmiş ve kolonda 40 saat sonunda %87 aktivite elde etmiştir [100].

DeGroot ve Neufeld tarafından yapılan bir çalışmada, üreaz enzimi kitosan kaplı aljinat kapsüllere enkapsülasyon yöntemiyle immobilize edilerek terapötik enzim tedavisi için potansiyel bir yöntem geliştirilmiştir [101]. El-Shora, jelde tutuklama yöntemiyle jelatin filmi glutaraldehit (GA) ile aktive edip üzerine üreaz enzimi immobilize etmiştir. Srivastava ve arkadaşları, glutaraldehit ile aktive edilmiş jelatin boncuklar üzerine adsorpsiyon yöntemiyle üreaz immobilize ederek kanda üre tayinini incelemişlerdir. Kayastha ve Srivastava ise kolon uygulaması için kitosan boncukları glutaraldehit ile aktive ederek, üzerine kovalent bağlama yöntemiyle üreaz enzimi immobilize etmişlerdir [102].

Martino ve ekibi, siklohekzil metakrilat ile modifiye edilmiş naylon membranlar üzerine kovalent bağlama yöntemiyle üreaz enzimi immobilize ederek biyoreaktör uygulaması yapmışlardır. Liang ve arkadaşları, kitosan-tripolifosfat kompleks boncukları üzerine glutaraldehit ile aktive ederek üreaz enzimi kovalent bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Kumar ve ekibi ise, glutaraldehit ile aktive edilmiş jelatin boncukları üzerine üreaz enzimi immobilize etmiş ve enzimin 90 gün boyunca depolama stabilitesi gösterdiğini gözlemlemişlerdir [103].

Turmanova ve ekibi, N,N'-disiklohekzilkaodiimid ile aktive edilmiş akrilik asitle birleştirilmiş polietilen film üzerine kovalent bağlama yöntemiyle üreaz enzimi immobilize etmiş ve 40°C'de 5 saatlik inkübasyon sonrasında enzimin aktivitesinin %40'ını koruduğunu gözlemlemişlerdir [104]. Yeon ve Lueptow ise, polipropilen

iplik taşıyıcısını N-(3-dimetilaminopropil) N'etilkarbodiimidhidroklorit ile aktive ederek, kovalent bağlama yöntemiyle üreaz enzimi immobilize etmiş ve kolon uygulaması gerçekleştirmişlerdir [105].

Reddy ve Kayastha, glutaraldehit ile aktive edilmiş alkilamin cam boncuklar üzerine üreaz enzimi immobilize ederek, kandaki üre miktarını belirlemişlerdir [106]. Aynı yıl, aynı araştırmacılar arilamin cam boncuklar üzerine kovalent bağlama yöntemiyle üreaz immobilize etmiş ve kandaki üre seviyesini ölçmüşlerdir. Kara ise, kitosan-aljinat kompleks boncukları üzerine enkapsülasyon yöntemiyle üreaz enzimi immobilize etmiş ve enzimin 20 kez yeniden kullanılabileceğini gözlemlemiştir [107]. Gabrovska ve ekibi, poli(akrilonitril)-kitosan kompozit membranlarını glutaraldehit ile aktive ederek üzerine üreaz enzimi immobilize etmiş ve bu immobilize enzimde 60 gün boyunca depolama kararlılığı gözlemlemişlerdir [108].

Nakarani ve Kayastha, enkapsülasyon yöntemiyle aljinat boncukları üzerine üreaz enzimi immobilize etmişlerdir [109]. Prakash ve ekibi, agaroz jel membran üzerinde jelde tutuklama yöntemiyle üreaz immobilize etmiş ve üre inhibisyonuna karşı direnç gözlemlemişlerdir. Mulagalapalli ve araştırma grubu, agar jel üzerine üreaz enzimi immobilize ederek, kandaki üre seviyesini incelemişlerdir. Hamdy ve diğerleri ise, 2-hidroksietil metakrilat ve itakonik asit kopolimer jel üzerine adsorpsiyon yöntemiyle üreaz enzimi immobilize etmiş ve ağır metal iyonlarına karşı gösterdiği dirençleri araştırmışlardır [110].

Pogorilyi ve ekibi, poli(3 merkaptopropil)siloksan üzerine üreaz enzimi immobilize etmiş ve bu enzim, 300 gün boyunca depolama stabilitesi kazanmıştır [111]. Başka bir çalışmada ise, dialdehit porous nişasta taşıyıcısı üzerine adsorpsiyon ve kovalent bağlama yöntemleriyle üreaz enzimi immobilize edilmiştir. Bu çalışmada, enzim aktivitesinin 10 kullanım sonrasında %75 oranında korunduğu gözlemlenmiştir [112].

Sahoo ve arkadaşları, fosfonat kaplı manyetik Fe3O4 partikülleri üzerine üreaz enzimi immobilize etmiş ve karbodiimid reaksiyonu ile immobilizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir [113]. Monier ve Sokkary ise, selülozik koton fiberleri üzerine üreaz enzimi immobilize etmiş ve 6 kullanım sonrasında %87'lik bir aktivite kaybı gözlemişlerdir [114]. Ayrıca, Pogorilyi ve ekibi, polisiloksan kaplı manyetik

nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle üreaz enzimi immobilize etmiş ve bu yöntemi incelemişlerdir [115].

3.4 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, hücredeki kimyasal reaksiyonları katalizleyen proteinler olup, sağlık ve endüstri alanlarında çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ancak, kullanılan enzimlerin yüksek maliyeti ve ürün elde edildikten sonra geri kazanılamamaları, maliyetleri artırmaktadır. Bu nedenle, enzimlerin ekonomik açıdan tekrar kullanılabilmesi için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir [116]. Bu teknikler, enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini artırarak çevresel faktörlere karşı dayanıklılık sağlar.

İmmobilizasyon, kelime anlamıyla "hareketsiz hale getirme" ya da "tutuklama" anlamına gelir. İmmobilizasyon, enzimlerin veya mikroorganizmaların fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktivitelerini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara bağlanması işlemidir [117].

İmmobilize enzim sistemleri, üç ana bileşenden oluşur: enzim, taşıyıcı (destek materyali) ve bağlanma şekli. Enzim, destek materyaline tutturulacak moleküldür, taşıyıcı ise enzimin tutunduğu materyaldir ve bağlanma şekli, enzimin taşıyıcıya nasıl tutturulacağını belirtir.

Enzimlerin immobilize edilmesi, özellikle verimli geri kazanım ve yeniden kullanım açısından büyük fayda sağlar. Ayrıca, immobilize enzimler genellikle daha yüksek stabiliteye sahiptir ve depolama ile çalışma koşullarına karşı daha dayanıklıdırlar. Bu, sıcaklık, pH, organik çözücüler ve denatürasyon gibi faktörlerden kaynaklanan etkinlik kaybını engeller [118].

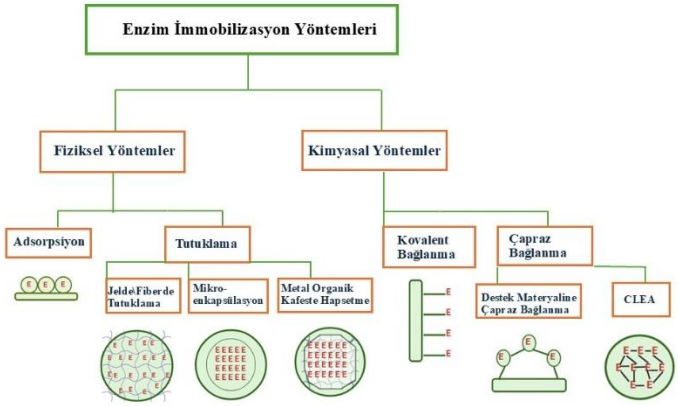
Ancak immobilizasyonun bazı zorlukları da bulunmaktadır. Enzimlerin aktivitesi, bazı durumlarda immobilizasyon işlemi sırasında kısmen veya tamamen kaybolabilir. Bu durum, kullanılan immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Saf enzimler genellikle pahalı maddeler oldukları için, uygun bir immobilizasyon yöntemi ve taşıyıcı materyali seçimi önemlidir.

İmmobilize enzimlerin tarihsel gelişimine bakıldığında, ilk kullanımının 19. yüzyılın başlarında endüstriyel alanda immobilize mikroorganizmalarla başladığı görülmektedir. Bu süreçte, enzimler saflaştırılmadan doğrudan mikroorganizmalarda bulunan aktif bileşenler kullanılarak immobilize edilmiştir. Bu yöntem, enzim immobilizasyon teknolojilerinin temellerini atmıştır. 1960'lı yıllarda ise teknolojiler geliştikçe, saflaştırılmış enzimler de immobilize edilmeye başlanmıştır. 1966 yılında Japonya'da, Chibata ve arkadaşları tarafından Aspergillus oryzae'den saflaştırılan aminoaçilaz enzimi immobilize edilerek L-amino asit üretiminde kullanılmıştır [119]. Bu dönemde, koenzimler, kofaktörler ve ko-immobilizasyon gibi daha karmaşık sistemler geliştirilmiştir.

3.4.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimlerin immobilizasyonu, kullanılan tekniklere göre enzimin kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişikliklere yol açabilir. Taşıyıcı matrisin ve çevresel faktörlerin, enzimin kararlılığı ve kinetik özellikleri üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Enzimin immobilize olduğu yüzey, enzimin üçüncül yapısını koruyarak, elektron geçişi veya hidrojen/kovalent bağlar oluşturabilir. Bu yüzden, enzimi bir yüzeye immobilize ederken, uygun bağlanma yöntemi seçmek önemlidir [120].

Enzim immobilizasyon teknikleri, fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak iki gruba ayrılır. Fiziksel yöntemler arasında adsorpsiyon, kapsülleme ve sınırlandırma yer alırken, kimyasal yöntemler kovalent bağlama ve çapraz bağlama şeklinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Enzim immobilizasyon yöntemleri

3.4.1.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yönteminde enzimler, taşıyıcı yüzeyine Van der Waals bağları, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları veya iyonik bağlarla bağlanır. Adsorpsiyon geri dönüşümlüdür ve enzimin katalitik aktivitesini genellikle korur, ancak etkileşimlerin zayıf olması nedeniyle taşıyıcıdan enzim sızıntısı gibi sorunlar yaşanabilir. Bu yöntem, ekonomik ve verimli olmasına rağmen, taşıyıcıda bozulmalar ve enzim aktivitesinde azalma gibi zorluklar yaratabilir.

3.4.1.2 Tutuklama

Tutuklama, enzimlerin düşük maliyetli polimerik ağlar içinde tutulduğu bir immobilizasyon yöntemidir ve enzimlerin bir arada toplanmasını önlemek için etkili bir strateji olarak kullanılır. Bu yöntemde, gözenekli matris enzimin etrafında oluşur ve polimerizasyon ilerledikçe enzimi sarar, böylece enzim matris içinde hareketsiz kalır. Kapsülleme yöntemi de benzer şekilde enzimleri ağlarda tutar, ancak substratlar ve ürünler geçiş yapabilir, bu da enzimlerin dışarıya salınımını engeller ve stabiliteyi artırır.

Bu yöntemlerde, enzimin doğrudan reaksiyon ortamı ile teması yoktur, böylece inaktivasyon riski azalır ve enzimler daha uzun süre stabil kalır. Kapsülleme ve sınırlandırma yöntemleri, düşük maliyetli, basit ve hızlı olmasının yanı sıra, küçük ölçekli uygulamalar için uygundur. Ancak bu yöntemlerin temel zorluğu, taşıyıcı matrisinin gözenek boyutlarını kontrol etmek ve enzimlerin sızmasını engellemektir. Gözenek boyutlarındaki yetersizlikler, enzimin taşıyıcıdan sızmasına veya substratların/ürünlerin difüzyonunun hızlanmasına yol açabilir. Bu nedenle, kapsülleme ve sınırlandırma yöntemlerinin kovalent bağlanma gibi diğer yöntemlerle birlikte kullanılması önerilmektedir.

3.4.1.3 Kovalent Bağlama

Kovalent bağlanma, atomlar arasındaki elektron çifti kullanımıyla gerçekleşir. Enzimlerin taşıyıcı yüzeyine kovalent bağlanması "doğrudan" bağlanma olarak adlandırılır. Ancak taşıyıcı malzemelerde genellikle kovalent bağ kuracak reaktif gruplar bulunmadığı için, taşıyıcı önce reaktif gruplarla aktive edilir. Ardından, bu aktive edilmiş taşıyıcıya enzim bağlanır. Kovalent bağlar güçlü kimyasal bağlar olduğundan, enzimin taşıyıcıya sıkıca tutunmasını sağlar ve enzimin ısı, çözücüler, pH gibi denatüre edici etkilere karşı yapısını korur. Enzim ve taşıyıcı arasında

bağlanmayı sağlamak için genellikle glutaraldehit gibi ara maddeler kullanılır. Bu ara maddeler, taşıyıcıyı aktive ederken enzime de yüksek katalitik aktivite kazandırır. Glutaraldehit, kovalent bağ oluşturma ve enzimin amino grubu ile etkileşime girme yeteneğine sahip aldehit gruplarına sahiptir.

3.4.1.4 Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama, enzimin bağlanması için taşıyıcı kullanmaya gerek duymayan ve enzimin stabilitesini artırmak amacıyla kullanılan bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem, bir reaktif (ara madde) kullanılarak enzimin yüzeyindeki belirli amino asit grupları arasında moleküller arası ve molekül içi çapraz bağların oluşmasını sağlar. Çapraz bağlama ajanları, enzimin yüzeyindeki amino asitlerle kovalent bağ kurabilen fonksiyonel gruplara sahip moleküllerdir ve bu sayede enzimi dış etmenlerden korur. Çapraz bağlama işlemi, enzimin stabilitesini artırır ve yeniden kullanılabilirliğini geliştirir, sonuçta suda çözünmeyen yüksek moleküllü bir enzim örgüsü oluşur [117].

Çapraz bağlama yöntemlerinde en çok tercih edilen teknikler arasında kristalleştirme, atomizasyon ve agregasyon yer alır. Enzimler, bu yöntemlerde çapraz bağlama maddeleriyle immobilize edilir. Çapraz bağlı enzim agregatları (ÇBEA), üzerinde en fazla çalışılan çapraz bağlama türüdür. ÇBEA'lar, enzimin bir arada çapraz bağlanarak oluşturulmasıyla elde edilir. Bu süreçte, çökeltiler kullanılarak enzim agregasyonu sağlanır, ardından iki işlevli reaktiflerle enzimler çapraz bağlanır. Agregasyondan sonra enzimlerin aktif bölgeleri ve katalitik aktiviteleri korunur.

3.4.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırması

Enzim immobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantaj olacak şekilde karşılaştırılmaları Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1 İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması [6]

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar
Adsorpsiyon	Kolay ve kısa süreli uygulanır, nispeten ucuzdur, reaktif gerektirmez, difüzyon sınırlaması yoktur, minimum aktivasyon adımları içerir ve enzimler için daha az bozucudur.	Düşük verim, kinetik bozulma, pH stabilitesinde değişim ve enzim desorpsiyonu görülür.
Kovalent Bağlanma	Geniş uygulanabilir, basit, çeşitli taşıyıcılarla uyumlu, enzimlerle güçlü bağlanan ve sızıntı yapmayan bir yöntemdir.	Rekabetçi inhibisyon, kimyasal modifikasyon ve konformasyon kaybı görülür.
Sınırlandırma	Hızlı, düşük maliyetli, algılama için uygun ve küçük ölçeklerde kolay uygulanabilen bir immobilizasyon yöntemidir.	Mikrobiyal kontaminasyon, enzim sızıntısı, difüzyon sınırlamaları ve düşük endüstriyel uygulanabilirlik görülür.
Enkapsülasyon	Uygun maliyetli, uzun vadeli stabil, saflaştırma gerektirmeyen ve çoklu enzimleri koruyarak immobilize eden bir yöntemdir.	Düşük enzim konsantrasyonu, gözenek sınırlamaları ve istenmeyen ürün oluşumu görülebilir.
Çapraz Bağlanma	Taşıyıcı gerektirmeyen, basit, hızlı, ucuz ve endüstriyel olarak yaygın kullanılan bir yöntemdir.	Denatürasyon riski taşır ve çok işlevli reaktifler gerektirir.

3.5 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri

Matrisin özellikleri, immobilize enzim sisteminin verimliliğini belirleyen önemli bir faktördür. İdeal taşıyıcıların sahip olması gereken özellikler arasında fiziksel dayanıklılık, hidrofiliklik, enzimlere karşı inertlik, biyouyumluluk, mikrobiyal direncin bulunması ve düşük maliyetle erişilebilirlik yer alır.

Taşıyıcı olarak, selüloz, aljinat, kitin, kollajen, kitosan, nişasta ve pektin gibi doğal polimerler kullanılmaktadır. Ayrıca, mekanik stabilitesi yüksek ve kolayca modifiye edilebilen sentetik polimerler de tercih edilmektedir. Enzimlerin immobilizasyonu için alümina, silika, zeolitler ve gözenekli silikalar gibi inorganik taşıyıcılar da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Doğru taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçimi, endüstriyel uygulamalarda büyük önem taşır. Taşıyıcının türü, enzimlerin depolama stabilitesini, enzim aktivitesini ve optimum sıcaklık ile pH aralığını etkiler. Bazı taşıyıcılar, enzimlerin aktivitesinin günlerce devam etmesini sağlarken, diğerleri sadece birkaç saat süreyle etkinliği koruyabilir [6].

4
MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılan kimyasallar, formülleri ve üretici firmaları ile Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	**Formülleri**	**Üretici Firma**
Stiren	C_8H_8	Merck
Klorometilstiren (CMS)	C_9H_9Cl	Acros Organics
Azobisizobütironitril (AIBN)	$C_8H_{12}N_4$	Aldrich
TEMPO	$C_9H_{18}NO$	Aldrich
Aseton	CH_3OCH_3	Merck
Kloroform	$CHCl_3$	ISOLAB
Tetrahidrofuran (THF)	C_4H_8O	Sigma-Aldrich
Hegzan	C_6H_{14}	ISOLAB
Potasyum Hidroksit	KOH	Merck
3,6-Dioksa-1,8-oktanditiol (DODT)	$C_6H_{14}O_2S_2$	TCI
Amberlisit 15	$C_{18}H_{18}O_3S$	Merck

Tablo 4.1 Kullanılan kimyasallar (devamı)

Etanol	C_2H_6O	ISOLAB
Sodyum Nitroprussür Dihidrat	$Na_2[Fe(CN)_5NO]\cdot 2H_2O$	Merck
Üreaz	-	Merck
Üre	CH_4N_2O	Merck
Fenol	C_6H_6O	Merck
Irg-127	$C_{21}H_{24}O_4$	İGM
Etilen Dimetakrilat (EGDMA)	$C_{10}H_{14}O_4$	Aldrich
Coomassie Brillant Blue G-250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Acros Organics
Dipotasyum Fosfat	K_2HPO_4	Merck
Monopotasyum fosfat	KH_2PO_4	Merck
Sodyum Hidroksit	NaOH	Sigma-Aldrich
Sodyum Hipoklorit	NaClO	Çiçeğim
Fosforik Asit	H_3PO_4	Merck
Dimetilformamid (DMF)	C_3H_7NO	Carlo Erba

4.2 Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılan cihazlar markaları ile Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	**Markası**
Ultrasonik Banyo	ISOLAB
FT-IR	Bruker
NMR	Bruker Avence III 500 MHz
UV-Vis	Shimadzu UV-2600
Etüv	MİKROTEST MST-55
Rotary evaporatör	Heidolph
Isıtıcı	Heidolph
pH metre	Sartorius
Soğutucu Dolap	Uğur
Rotatör\ Dikey Döndürücü	Biosan Bio RS-24
GPC Cihazı	Viscotek GPCmax, 2001 Autosampler
Fotoreaktör	Kerman UV
DLS Cihazı	Malvern Nano ZSP
Vakum Etüv	Weightlab Instruments WF-HTV25
DSC Cihazı	TA Instrument Discovery DSC 250
Saf Su Cihazı	Merck Millipore Direct-Q 3

4.3 Kullanılan Yöntemler

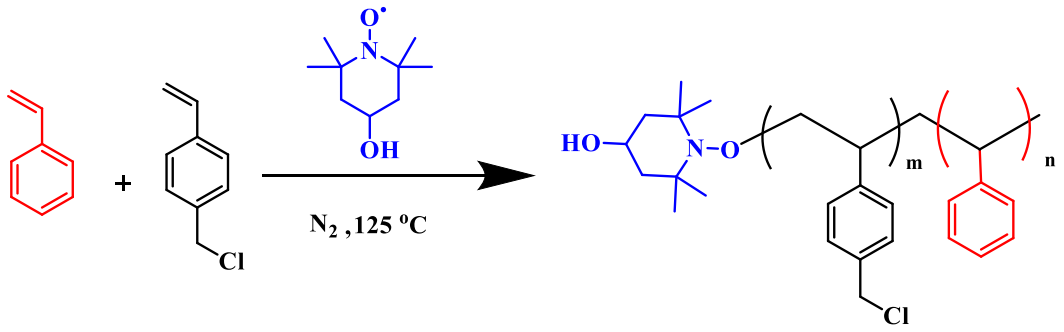
Bu tez çalışmasında öncelikle destek materyallerinin sentezi yapıldı ve ardından bu destek materyalleri ile üreaz enzimine enzim immobilizasyonu uygulandı.

4.3.1 Destek Materyallerinin Sentezi

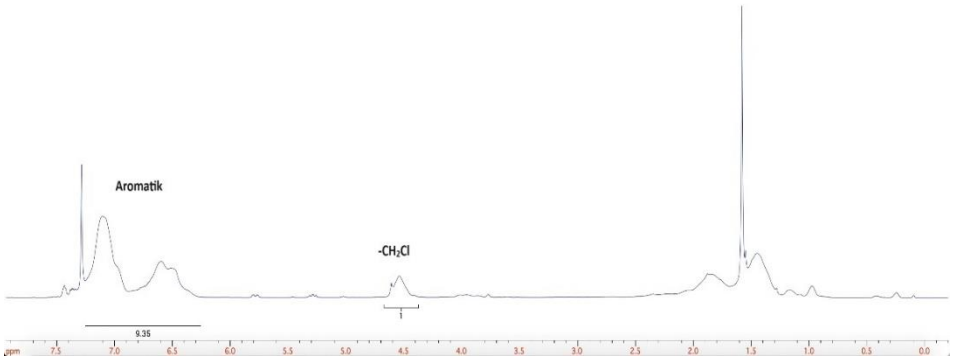
Destek materyallerinin sentezi 5 farklı aşamada gerçekleştirildi.

4.3.1.1 Stiren-Klorometilstiren Kopolimer (PSCMST) Sentezi

İlk olarak, poli (stiren-ko-klorometilstiren), stiren: klorometilstiren / 85: 15 (PSCMS) besleme oranı kullanılarak NMP polimerizasyonu ile AIBN ve TEMPO varlığında azot gazı geçirilerek gerçekleştirildi (Şekil 4.1). Stiren ve klorometilstiren monomerleri içerisindeki inhibitörleri uzaklaştırmak amacıyla bazik alüminadan geçirildi. Stiren (3,8 mL; 33 mmol), klorometilstiren (0,82 mL; 5,82 mmol), AIBN (10 mg; 0,06 mmol) ve TEMPO (30 mg; 0,194 mmol) sırasıyla yandan vanalı balona eklendi ve manyetik balık ile karıştırıldı. Reaksiyon balonundan azot geçirilerek vakum uygulandı. Polimerleşme reaksiyonu, 125°C sabit sıcaklıkta yağ banyosunda 24 saat süresince gerçekleştirildi. 24 saat sonunda polimerizasyon karışımı, THF' de seyreltildi ve metanol içerisinde çöktürüldü. Daha sonra polimer süzgeç kağıdından süzülerek vakum etüvünde kurumaya bırakıldı. Sentezlenen polimerin karakterizasyon için ^{1}H-NMR, GPC, DLS ve DSC kullanıldı. (Verim: 72%) GPC, Mn= 14800 g/mol, Mw/Mn= 1,4; Tg= 92,75°C; Rh= 7,55 nm.



Şekil 4.1 NMP tekniği kullanılarak PSCMST kopolimer sentezi



Şekil 4.2 PSCMST'nin $CDCl_3$'de alınan ^{1}H-NMR spektrumu

Sentezlenen PSCMST kopolimerinin yapısı ve bileşimi ^{1}H-NMR (Şekli 4.2) ve GPC kullanılarak belirlendi. ^{1}H-NMR'ında 4,5 ppm'de görülen CMS ünitelerinin metilen protonlarının 6,30 ve 7,25 ppm arasında St ve CMS ünitelerinin aromatik protonlarına oranlanmasıyla kopolimerde % 79 mol stiren ve % 21 mol klorometilstiren ünitesinin (32 klor ünitesi) bulunduğu hesaplandı.

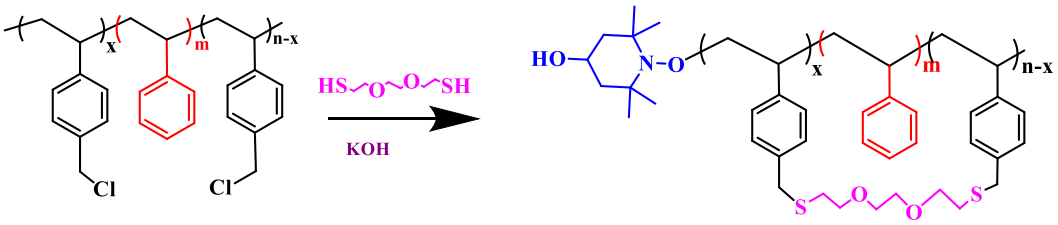
THF' te alınan GPC kromatogramına göre sayıca ortalama molekül ağırlığı 14800 g/mol ve polidispersite değeri 1,4 olarak belirlendi (Şekil 4.5). DSC ile yapılan termal analizinde Tg değerinin 92,75^{o}C (Şekil 4.6) ve DLS ile yapılan boyut analizinde Rh değeri 7,55 nm olarak hesaplandı.

4.3.1.2 Klorometilstiren- Stiren Kopolimerinin Çapraz Bağlayıcı Varlığında SCNP Sentezi (PSCMSDT)

Tek zincirli polimerik nanopartikül (SCNP) sentezi, seyreltme oranı 1:1 olacak şekilde PSCMST kopolimerinde bulunan klor ünitelerinin bir kısmına KOH varlığında çapraz bağlayıcı olarak 3,6-dioksa-1,8-oktanditiol (DODT) takılmasıyla gerçekleştirildi (Şekil 4.3).

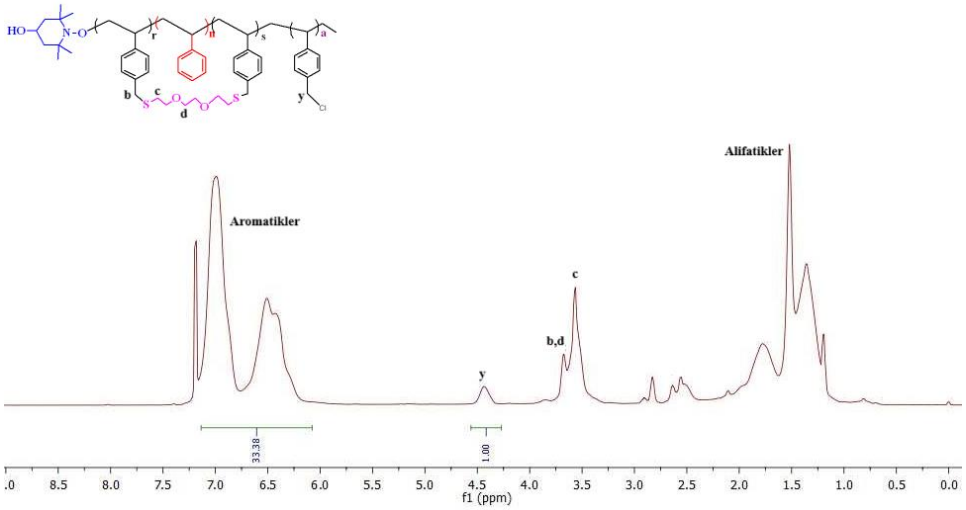
Öncelikle 1L'lik reaksiyon balonuna PSCMST kopolimeri (500 mg; 3,96 x 10^{-5} mol) eklenerek 480 mL asetonda çözüldü ve manyetik balık ile 1 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. 1 gün sonrasında buz banyosuna alınan polimer çözeltisine KOH (177 mg; 7,4 x 10^{-4}mol) 10 mL soğuk asetonda çözülerek damla damla eklendi ve ardından DODT (116 µL; 7,14 x 10^{-4}mol) 10 mL soğuk asetonda çözülerek damlatma hunisiyle polimer çözeltisine damla damla eklendi. Daha sonra polimer çözeltisi buz banyosunda 4 saat boyunca karıştırıldıktan sonra 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmaya devam edildi. 24 saatin sonunda çözücü döner buharlaştırıcıda tamamen uçuruldu. Balonda kalan polimer THF ile çözüldü ve

hegzanda çöktürüldü. Elde edilen tek zincirli polimerik partikül süzgeç kağıdından süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. (Verim: %88) ^{1}H-NMR, GPC, DLS ve DSC ile karakterize edildi. GPC, Mn = 9872 g/mol, Mw/Mn= 1,5; Tg= 122^{o}C; Rh= 6,7 nm.



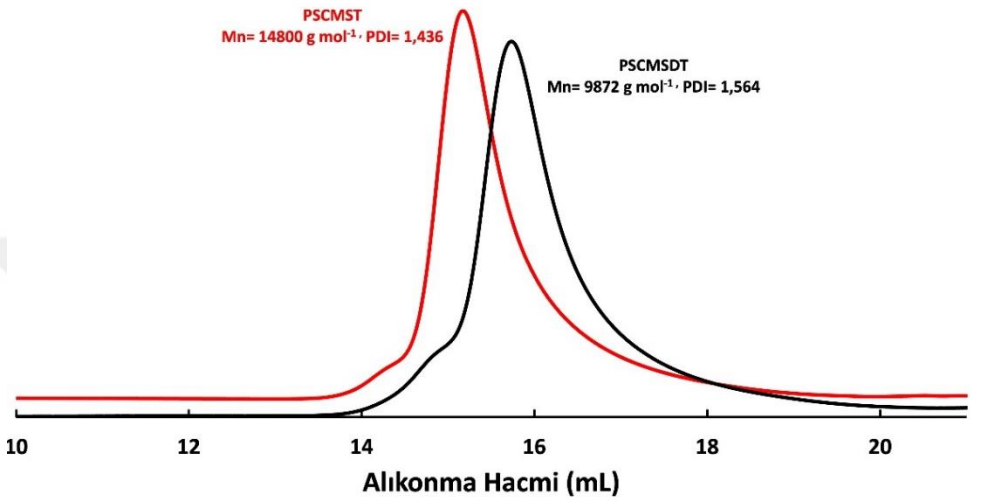
Şekil 4.3 DODT varlığında PSCMSDT sentezi

Şekil 4.4'de verilen ^{1}H-NMR spektrumuna bakıldığında simetrik olarak 3,70; 3,74 ve 3,54 ppm'de 4'er adet metilen protonu (sırasıyla b, c ve d (Şekil 4.4)) yapıya DODT'un takıldığını göstermektedir. Buna göre yapıya 13 adet DODT takıldığı ve 6 adet -Cl ünitesinin açıkta kaldığı hesaplandı. Şekil 4.9' da verilen FT-IR spektrumunda, DODT'un 2500 cm^{-1}'de verdiği pikin, SCNP yapısına katılmasıyla kaybolduğu görülmektedir.



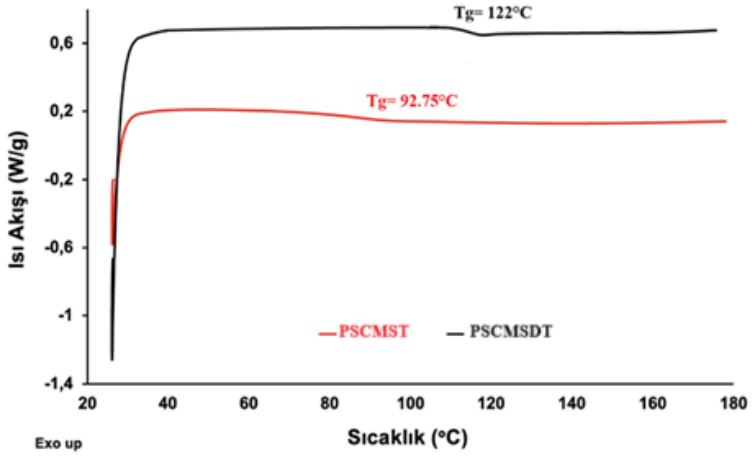
Şekil 4.4 PSCMSDT'nin $CDCl_3$'de alınan ^{1}H-NMR spektrumu

SCNP yapılarının zincir içi çapraz bağlanma ile boyutlarının küçülmesi yani hidrodinamik hacimlerinin azalması nedeniyle, öncül polimerlerine göre daha düşük molekül ağırlığı sergilediği bilinmektedir. THF içerisinde alınan GPC ölçümüne göre molekül ağırlığı 14800'den 9872'ye düştüğü görüldü (Şekil 4.5). Bununla birlikte DLS ölçümüne göre partikül boyutu 7,55 nm'den 6,7 nm'ye azaldığı belirlendi (Tablo 5.1).



Şekil 4.5 Sentezlenen PSCMSDT ve öncül polimerinin THF içerisinde alınan GPC kromatogramları

Zincir içi çapraz bağlanma ile termal olarak daha kararlı hale geçen SCNP yapılarının camsı geçiş sıcaklıkları öncül polimerlerine göre daha büyük izlenmektedir. Sentezlenen PSCMSDT'nin Tg değeri DSC ölçümünden öncül polimerine göre (Tg: 92,75^{o}C) yükselerek 122 ^{o}C olarak ölçüldü (Şekil 4.6) (Tablo 5.1).

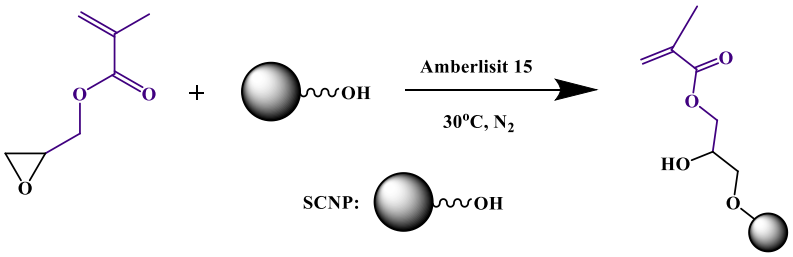


Şekil 4.6 PSCMST ve PSCMSDT polimerlerinin DSC grafikleri

4.3.1.3 Glisidil metakrilat monomerine Amberlisit 15 varlığında PSCMSDT'nin Takılması (GPSCMDT)

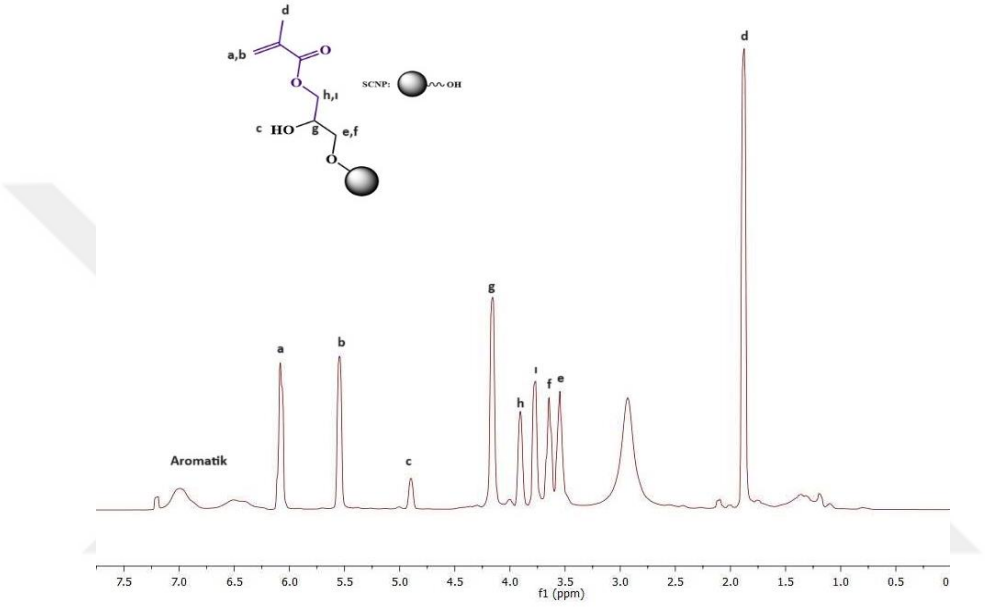
Glisidil metakrilat (GMA) monomerinin yapısındaki epoksit halkasına sentezlenen SCNP yapısı, polimer zincirleri ucunda bulunan -OH grupları vasıtasıyla amberlisit 15 varlığında takıldı (Şekil 4.7).

İlk olarak 100 mL'lik tek boyunlu reaksiyon balonuna PSCMSDT (500 mg; 5,1 x 10^{-4} mol) polimeri eklenerek 50 mL asetonda çözüldü. Ardından reaksiyon balonuna bazik alüminadan geçirilen GMA (7 mL; 5,21 x 10^{-2} mol) ve Amberlisit 15 (6 mg, 1,9 x 10^{-5}mol) eklendi. Daha sonra reaksiyon karışımı 30^{o} C' deki ultrasonik banyoda 3 saat boyunca degaze edildi. 3 saatin sonunda aseton döner buharlaştırıcıda tamamen uçuruldu. Balonda kalan monomer THF ile çözüldü ve hekzanda çöktürüldü. Elde edilen monomer vakum etüvünde kurutuldu (Verim: %65). ^{1}H-NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.



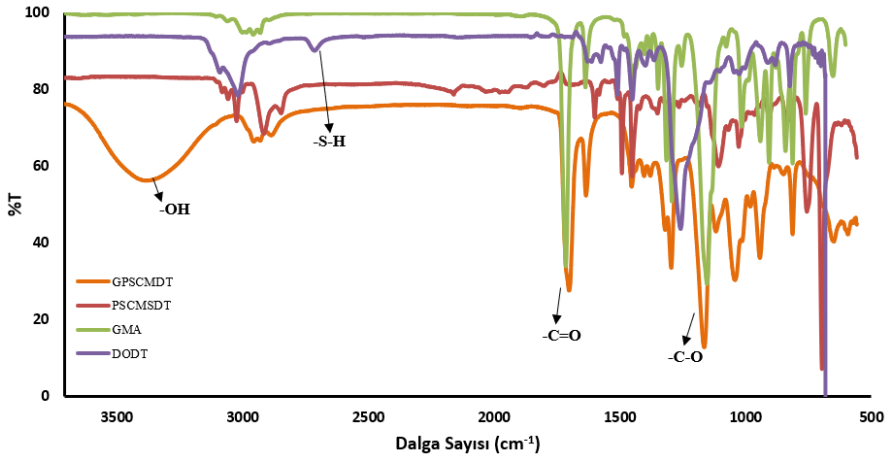
Şekil 4.7 Amberlisit 15 varlığında GPSCMDT sentezi

Şekil 4.8'daki NMR spektrumuna göre 6,18-7,2 ppm aralığında SCNP yapısındaki aromatik protonlar çıkarken, GMA nın yapısındaki akrilat çift bağları ucundaki -CH_2 protonları 6.14 (a) ve 5,57 (b) ppm'de yer almaktadır. d ile gösterilen -CH_3 protonları 1,8' de keskin bir singlet vermektedir. GMA' nın yapısındaki epoksi halkasının açılarak GPSCMDT'nin oluşmasıyla 5,77 ppm'de -OH'a ait proton gözlemlenirken 3,48-4,25 ppm arasında görülen e, f, g, h ve ı protonları yapının başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 GPSCMDT' nin $CDCl_3$'de alınan ^{1}H-NMR spektrumu

Şekil 4.9'daki GMA, DODT, PSCMST ve GPSCMDT' nin FT-IR spektrumlarının karşılaştırmaları verilmiştir. DODT'un yapısında bulunan yaklaşık 2700 cm^{-1}'de görülen -S-H pikinin PSCMST' de kaybolduğu gözlenmiştir. GMA' nın yapısındaki epoksi halkasının açılarak, yapıya PSCMST' nin takılması sonucunda oluşan GPSCMDT' ye ait -OH piki 3400 cm^{-1}' de gözlenmiştir. Bununla birlikte GPSCDT' ye ait FT-IR spektrumunda 1740 cm^{-1}' de gözlenen -C=O ve 1130 cm^{-1}'de gözlenen eter pikleri PSCMSDT tek zincir katlanmalı nanoparçacığının glisidil metakrilat monomerine bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 GPSCMDT, PSCMSDT, GMA ve DODT' un FT-IR spektrumları

4.3.1.4 GPSCMDT ile Hidrojel Yapımı

Bir payreks tüp içerisinde, 100 mg GPSCMDT monomeri 0,3 mL DMF içerisinde çözüldü. Ardından çapraz bağlayıcı olarak içerisine, çapraz bağlayıcı oranları ağırlıkça %10 ve %20 olacak şekilde etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve fotobaşlatıcı olarak Irg-127 eklenerek Tablo 4.3'te verilen süreler boyunca 18 adet 8W' lık mor lamba içeren fotoreaktörde aydınlatıldı.

Tablo 4.3' te örneklerin isimlendirmeleri; GPSCMDT monomeri ile sentezlenen jellere SJ kodu; GMA ile sentezlenen jellere ise BJ kodu verilerek oluşturulmuştur. Bu kodların yanındaki ilk rakam jel sıra numarasını; sondaki rakam ise içerdiği çapraz bağlayıcı oranını göstermektedir (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3 Hidrojel formülasyonları

Numune	Çapraz Bağlayıcı Oranı (%)	Çapraz Bağlayıcı (EGDMA, µL)	Irg-127 (mg)	Monomer (mg)	Çözücü (DMF, mL)	Aydınlatma Süresi (Saat)
SJ11	10	14	2,7	100	0,3	3
SJ21	10	14	2,7	100	0,3	3
SJ31	10	14	2,7	100	0,3	3
SJ41	10	14	2,7	100	0,3	3
SJ12	20	27	2,9	100	0,3	1
SJ22	20	27	2,9	100	0,3	1
SJ32	20	27	2,9	100	0,3	1
SJ42	20	27	2,9	100	0,3	1

4.3.1.5 Karşılaştırma Amaçlı Hidrojel Yapımı

Bir payreks tüp içerisine 1 mL bazik alüminadan geçirilmiş GMA konarak içerisine çapraz bağlayıcı oranları %10 ve %20 olacak şekilde etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve Irg-127 eklendi. Formülasyon tam olarak çözündükten sonra 10 dakika süre ile 18 adet 8W' lık mor lamba içeren fotoreaktörde aydınlatıldı (Tablo 4.4).

Tablo 4. 4 GMA monomeri ile hazırlanan hidrojel formülasyonları

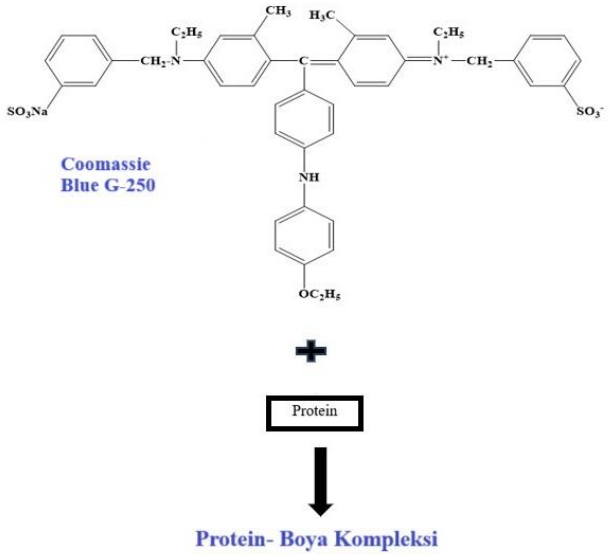
Numune	Çapraz Bağlayıcı Oranı (%)	Çapraz Bağlayıcı (EGDMA, µL)	Irg -127 (mg)	GMA (mL)	Aydınlatma Süresi (Dakika)
BJ11	10	142	28	1	10
BJ21	10	142	28	1	10
BJ31	10	142	28	1	10
BJ41	10	142	28	1	10
BJ12	20	284	31	1	10
BJ22	20	284	31	1	10
BJ32	20	284	31	1	10
BJ42	20	284	31	1	10

4.3.2 Kullanılan Metodlar

Deneysel çalışmada 4 farklı metod kullanıldı.

4.3.2.1 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Protein miktarını belirlemek için yaygın olarak Bradford yöntemi kullanılır [121]. Bu yöntemde, Coomassie Blue G-250 boyası proteine bağlanarak renkli kompleksler oluşturur (Şekil 4.10). Boya, asidik ortamda kırmızı-kahverengi renkte olup 465 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Proteinle etkileşime giren boya, mavi renkte bir kompleks oluşturur ve bu kompleksin en yüksek absorbansı 595 nm'de gözlemlenir, böylece protein miktarı hassas bir şekilde ölçülür.



Şekil 4.10 Coomassie Blue G-250 boyası proteine bağlanarak renkli kompleks oluşturması

- Bradford Ayıracının Hazırlanması

100 mg Coomassie Blue G-250, 50 mL %96 (v/v) etanolde çözüldü. Ardından, 100 mL %85 (v/v) o-fosforik asit eklendi. Karışıma distile su ilave edilerek toplam hacim 1 L'ye getirildi ve karışım homojen olması için Whatman (No:1) süzgeç kağıdından süzüldü. Son olarak, çözeltinin ışık geçirmemesi için koyu renkli bir şişede muhafaza edildi.

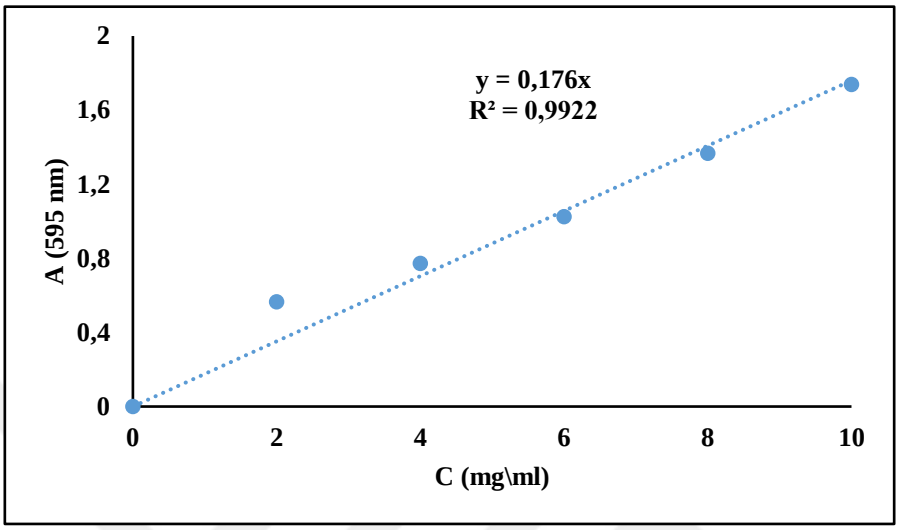
- Deneyin Yapılışı

Bir tüpe 2 mL Bradford reaktifi eklenip, üzerine 20 µL protein örneği ilave edildi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekletildi ve oluşan mavi renkli çözeltinin absorbansı 595 nm'de, köre karşı ölçüldü. Elde edilen absorbans değeri, daha önce sığır serum albumini ile oluşturulan protein standart eğrisine uygulanarak örneğin protein konsantrasyonu mg/mL cinsinden belirlendi.

4.3.2.2 Protein Standart Eğrisinin Hazırlanması

Protein standardı olarak sığır albümini (BSA) kullanıldı. BSA stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak 2-10 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu standartlara modifiye Bradford yöntemi uygulanarak ölçümler yapıldı [122]. Deney beş kez tekrarlandı ve her ölçümde elde edilen absorbans değerlerine en küçük kareler yöntemiyle regresyon denklemi oluşturuldu. Elde

edilen standart eğri, örneklerin protein miktarlarını hesaplamak için kullanıldı (Şekil 4.11). Protein standart eğri denklemi ile, çalışma örneklerinin 595 nm'de ölçülen absorbans değerleri kaydedildi ve bu verilere dayanarak protein miktarları mg/mL cinsinden hesaplanmışdı**.**



Şekil 4.11 Standart protein eğrisi

4.3.2.3 Enzim Aktivite Tayini

Üreazın aktivitesi, Tunalı'nın yöntemine göre substrat konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde hazırlandı [122]. Bu amaç için çözeltiler hazırlandı.

Alkali Hipoklorit Reaktifi: 5 gram NaOH 100 ml distile suda çözüldü. Elde edilen bu çözeltiden ve litrede 26 gram NaOCl bulunan ticari sodyum hipoklorit yani çamaşır suyundan eşit hacimlerde alınarak alkali hipoklorit reaktifi çözeltisi oluşturuldu.

Fenol Reaktifi: 1 gram fenol 100 ml dlstile suda çözüldü. Ayrı bir beherde 25 mg sodyum nitroprussür dihidrat 50 ml distile suda çözüldü. Bu iki çözeltiden eşit hacimlerde alınarak fenol reaktifi çözeltisi hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi: Ana stok olarak mg\ml konsantrasyonda hazırlandı.

- Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpünde 10 µL substrat ve 100 µL enzim çözeltisi karıştırıldı, üzerine 1890 µL fosfat tamponu (50 mM, pH 7,6) eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 500 µL fenol reaktifi ve 500 µL alkali hipoklorit çözeltisi eklendi, ardından tüp 60°C'deki su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Kör çözeltisi

hazırlamak için substrat ve enzim yerine 1990 µL fosfat tamponu kullanılarak aynı işlem tekrarlandı. Absorbansı 630 nm'de, köre karşı ölçüldü. Elde edilen absorbans değeri, daha önce oluşturulan amonyum sülfat standart eğrisine uygulanarak örneğin aktivite değerleri U/mg protein cinsinden belirlendi. Deneyin detayları Tablo 4.5' te verilmiştir.

Tablo 4. 5 Üreaz' ın aktivite tayin yöntemi

	Kör (µL)	**Numune (µL)**
Distile Su	10	-
Fosfat Tamponu (pH 7,6)	1990	1890
Üre Çözeltisi	-	10
Üreaz Çözeltisi	-	100
15 dakika oda sıcaklığında beklenir.		
Fenol Reaktifi	500	500
Alkali Hipoklorit Reaktifi	500	500
5 dakika, 60^{o}C' lik su banyosunda inkübasyona bırakılır.		
630 nm'de absorbans okunur.		

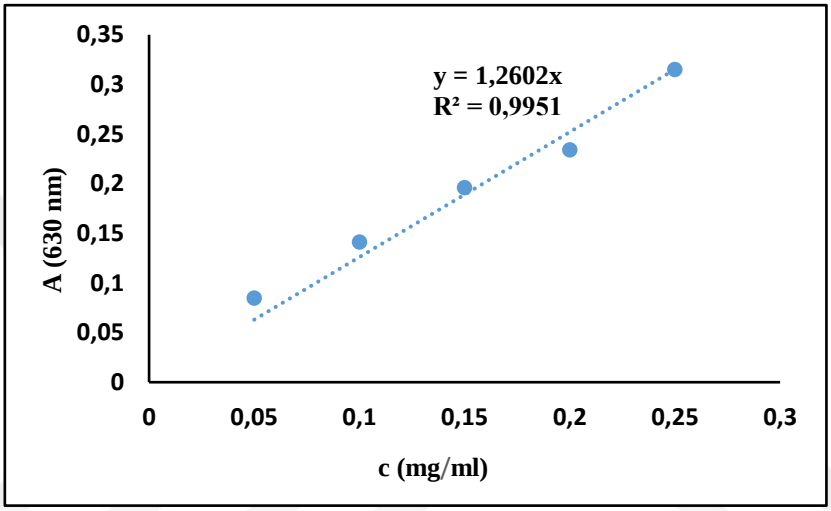
- 1 Enzim ünitesi, 25°C ve pH 7 koşullarında bir dakikada 1 µmol substratın ürüne dönüşümünü sağlayan enzim miktarını ifade eder.

- Spesifik aktivite ise, bu enzim ünitesinin, enzim miktarını belirten mg protein başına bölünerek hesaplanır.

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = [(\mu\text{mol Amonyak} \times V_{\text{toplam}}) / (t\ (\text{dk}) \times \text{mg protein} \times V_{\text{örnek}})] \quad (4.1)$$

4.3.2.4 Amonyum Sülfat (NH_4SO_4) Standart Eğrisinin Hazırlanması

Stok amonyum sülfat çözeltisi, mg/mL konsantrasyonda distile su içerisinde hazırlandı. Bu çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak, 0,2-1 mg/mL konsantrasyon aralığında standart çalışma çözeltileri elde edildi. Hazırlanan bu standart çözeltilere Tunalı' nın metodu uygulandı [123]. Her bir konsantrasyon için deneyler beş kez tekrarlandı ve elde edilen sonuçların en küçük kareler yöntemiyle regresyon denklemi bulundu. Elde edilen standart eğri, örneklerin aktivitelerini hesaplamak için kullanıldı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Amonyum Sülfat Kalibrasyon Eğrisi

4.3.3 Serbest Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

50 mg üreaz 10 mL fosfat tampon (10 mM; pH 7,6) içinde hazırlandı. Bu çözeltide aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı. Denemeler beşli tekrarla yapıldı ve ortalaması alındı. Serbest enzim çözeltisinin protein ve aktivite tayini yukarıda açıklanan yöntemlere göre yapıldı.

4.3.4 İmmobilize Enzimin Aktivite ve Protein Tayini

Bir deney tüpüne üreaz immobilize edilen bir adet hidrojel ve 2,5 mL fosfat tamponu (pH 7,6) eklenerek yatay çalkalayıcıda 30 rpm'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonundaki çözelti içerisinden 100 µL alınarak üzerine 10 µL substrat ve 1890 µL fosfat tamponu eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 500 µL fenol reaktifi ve 500 µL alkali hipoklorit çözeltisi eklendi, ardından tüp 60°C'deki su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Kör çözeltisi hazırlamak için substrat ve enzim yerine 1890 µL fosfat tamponu kullanılarak aynı

işlem tekrarlandı. Absorbansı 630 nm'de, köre karşı ölçüldü. Elde edilen absorbans değeri, daha önce oluşturulan amonyum sülfat standart eğrisine uygulanarak örneğin aktivite değeri U/mg protein cinsinden belirlendi.

İmmobilize enzimin protein tayini, protein standart eğri denklemine göre hesaplandı ve serbest enzimin protein miktarından yıkama suyunun protein miktarı çıkarılarak gerçekleştirildi.

4.3.5 Üreaz' ın Destek Materyallerine İmmobilizasyonu

Üreaz enzimi, destek materyali olarak GPSCMDT monomeri ile hazırlanmış hidrojellere (SJ kodlu) ve karşılaştırma amacıyla GMA ile hazırlanmış hidrojellere (BJ kodlu) adsorpsiyon yoluyla immobilize edildi. İmmobilizasyon işlemi iki farklı sıcaklıkta (25^{o}C, 37^{o}C) ve iki farklı sürede (12 saat, 24 saat) gerçekleştirildi.

4.3.5.1 Hidrojellere Üreaz Enziminin Adsorpsiyonu 25^{o}C

% 10 ve %20 oranlarında çapraz bağlayıcı içeren hidrojellere (SJ ve BJ kodlu) 25^{o}C' de, 12 saat ve 24 saat olmak üzere iki farklı sürede üreaz enziminin adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonu gerçekleştirildi. Amaç; aynı sıcaklıkta sürenin immobilizasyona etkisini gözlemleyebilmek ve farklı konsantrosyonlarda hazırlanan hidrojellerin bu değişimler karşısındaki davranışlarını incelemektir.

A) Hidrojellere İmmobilizasyon, 12 Saat

Bir tüpe mL' de 5 mg protein içeren serbest enzim çözeltisi ile SJ kodlu hidrojel eklendi. 25°C'de Biosan Multi Bio RS-24 yatay çalkalayıcı cihazı ile 1 saat 30 rpm çalkalandıktan sonra 12 saat boyunca inkübe edildi. 12 saat sonunda enzim immobilize edilmiş jel, enzim çözeltisi içinden çıkarıldı ve 10 ml distile su ile yıkandı. Yıkama suyunda enzim aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

İmmobilize üreaz kaplı hidrojellerde enzim aktivite tayini gerçekleştirildi, immobilizasyon verimleri hesaplandı. Bu prosedür çapraz bağlayıcı oranı %10 jellere (Tablo 4.6), %20 olan jellere (Tablo 4.7) ve aynı anda karşılaştırma amaçlı yapılan yapılan BJ hidrojellerine de bu prosedür uygulandı.

Tablo 4. 6 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 25ºC, 12 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg\mL)	Total Ünite (U\mL)	Spesifik Aktivite (U\mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,60	0,47	0,13	-
SJ11 (İmm Enzim)	3,03	0,096	0,031	84,16
BJ11 (İmm. Enzim)	2,1	0,096	0,045	58,33

Tablo 4. 7 (%20' lik) Hidrojellere üreaz enziminin 25ºC, 12 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg\mL)	Total Ünite (U\mL)	Spesifik Aktivite (U\mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,34	0,35	0,11	-
SJ12 (İmm Enzim)	0,77	0,07	0,09	23,05
BJ12 (İmm. Enzim)	0,26	0,11	0,42	7,8

B) Hidrojellere İmmobilizasyon, 24 Saat

Aynı sıcaklıkta sürenin immobilizasyona etkisini gözlemleyebilmek için, aynı koşullarda sadece inkübasyon süresi 24 saat yapılarak bu süre sonunda yukarıdaki işlemler aynen tekrar edildi. Bu prosedür çapraz bağlayıcı oranı %10 jellere (Tablo 4.8) ve %20 olan jellere uygulandı (Tablo 4.9).

Tablo 4. 8 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 25^{o}C, 24 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,5	0,4	0,11	-
SJ21 (İmm Enzim)	1,5	0,043	0,03	42,85
BJ21 (İmm. Enzim)	2,17	0,038	0,017	62

Tablo 4. 9 (%20' lik) Hidrojellere üreaz enziminin 25^{o}C, 24 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,33	0,42	0,13	-
SJ22 (İmm Enzim)	3,04	0,062	0,021	91,3
BJ22 (İmm. Enzim)	1,67	0,06	0,036	50,2

4.3.5.2 Hidrojellere Üreaz Enziminin Adsorpsiyonu 37^{o}C

% 10 ve %20 oranlarında çapraz bağlayıcı içeren hidrojellere (SJ ve BJ kodlu) 37^{o}C' de, 12 saat ve 24 saat olmak üzere iki farklı sürede üreaz enziminin adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonu gerçekleştirildi. Amaç; aynı sıcaklıkta sürenin immobilizasyona etkisini gözlemleyebilmek ve farklı konsantrosyonlarda hazırlanan hidrojellerin bu değişimler karşısındaki davranışlarını incelemektir.

A) Hidrojellere İmmobilizasyon, 12 Saat

Bir tüpe mL' de 5 mg protein içeren serbest enzim çözeltisi ile SJ kodlu hidrojel eklendi. 37°C'de Biosan Multi Bio RS-24 yatay çalkalayıcı cihazı ile 1 saat 30 rpm çalkalandıktan sonra 12 saat boyunca inkübe edildi. 12 saat sonunda enzim immobilize edilmiş jel, enzim çözeltisi içinden çıkarıldı ve 10 ml distile su ile yıkandı. Yıkama suyunda enzim aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı. İmmobilize üreaz kaplı hidrojellerde enzim aktivite tayini gerçekleştirildi, immobilizasyon verimleri hesaplandı. Bu prosedür çapraz bağlayıcı oranı %10 jellere (Tablo 4.10) ve %20 olan jellere uygulandı (Tablo 4.11). Aynı anda karşılaştırma amaçlı yapılan yapılan BJ hidrojellerinede bu prosedür uygulandı.

Tablo 4. 10 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 37ºC, 12 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,3	0,4	0,12	-
SJ31 (İmm Enzim)	0,66	0,065	0,098	20
BJ31 (İmm. Enzim)	0,94	0,096	0,102	28,5

Tablo 4. 11 (%20' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 37^{o}C, 12 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,6	0,4	0,11	-
SJ32 (İmm Enzim)	2,9	0,072	0,025	81
BJ32 (İmm. Enzim)	1,3	0,072	0,055	36,11

B) Hidrojellere İmmobilizasyon, 24 Saat

Aynı sıcaklıkta sürenin immobilizasyona etkisini gözlemleyebilmek için, aynı koşullarda sadece inkübasyon süresi 24 saat yapılarak bu süre sonunda yukarıdaki işlemler aynen tekrar edildi. Bu prosedür çapraz bağlayıcı oranı %10 jellere (Tablo 4.12) ve %20 olan jellere uygulandı (Tablo 4.13).

Tablo 4. 12 (%10' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 37^{o}C, 24 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,47	0,4	0,12	-
SJ41 (İmm Enzim)	3,05	0,072	0,023	87,9
BJ41 (İmm. Enzim)	1,83	0,084	0,046	52,7

Tablo 4. 13 (%20' luk) Hidrojellere üreaz enziminin 37ºC, 24 saat inkübasyonu

Örnekler	Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	%Tutuklanma
Serbest Enzim	3,52	0,42	0,12	-
SJ42 (İmm Enzim)	2,97	0,05	0,017	84,37
BJ42 (İmm. Enzim)	0,6	0,084	0,14	17,04

4.3.6 İmmobilize Üreaz İçin Enzim Aktivitesi Yöntem Optimizasyonu

Üreaz immobilize edilen hidrojellere aktivite tayini için, ön inkübasyon sürelerinin total ünite ve aktivite değerine etkisi incelendi. Tüm koşullar incelendiğinde SJ kodlu jellerin BJ kodlu jellere göre daha yüksek tutuklanma oranı olduğu görülmüştür ve bu tezimizin amacıyla uyuşmaktadır.

SJ22 ve SJ32 kodlu jellerin üreaz enzimini tutuklanma oranlarında (%91, %81) çok büyük bir fark görülmemiştir. Konsantrasyon olarak %20 çapraz bağlayıcı içeren bu jellerde SCNP içeren monomer miktarı daha azdır. Aynı zamanda bu jellerin immobilizasyon koşulu 24 saat ve 37ºC' dir. Bu koşullarda ekstra enerji ve süre kaybına sebep olacağı için tercih edilmemiştir. SJ11 kodlu jelin %84 oranında enzimi absorpladığı görülmüştür. Bu jelin immobilizasyon koşulu ise oda sıcaklığı (25ºC) ve 12 saattir.

Tüm sayısal veriler incelendiğinde; % 10 çapraz bağlayıcı içeren SJ kodlu jellerin ortam sıcaklığının kolay uygulanabilir olması, daha fazla miktarda SCNP içeren monomer içermesi ve kısa sürede daha yüksek verim elde edilebilmesi sayesinde destek materyali olarak daha uygun olacağına karar verildi.

Karar verildikten sonra; bir tüpe üreaz immobilize edilen hidrojeller ve 2,5 mL fosfat tamponu (pH 7,6) eklenerek yatay çalkalayıcıda 30 rpm'de 10, 20 ve 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir substrat çözeltisi içerisinden enzim örnekleri alınarak absorbansı 630 nm'de, köre karşı ölçüldü.

Elde edilen absorbans değeri, daha önce oluşturulan amonyum sülfat standart eğrisine uygulanarak aktivite değerleri U/mg protein cinsinden belirlendi.

Tablo 4.14 incelendiğinde inkübasyon süresinin artması ile aktivitenin aynı lineerlikte artmadığı, aktivitedeki artışın oldukça az olduğu görüldü. Tüm bu sonuçlar ele alındığında çalışmadaki her üç immobilize enzim içinde 10 dk inkübasyon süresinin, maliyet ve enerji açısından düşünüldüğünde daha avantajlı olabileceğine karar verildi.

Tablo 4. 14 Hidrojellere 10, 20, 30 dk inkübasyon sonucu % verim değerleri

Örnek	**Protein Miktarı (mg/mL)**	**Total Ünite (U/mL)**	**Spesifik Aktivite (U/mg protein)**	**% Tutuklanma Oranı**	**% Total Ünite Verimi**	**% Aktivite Verimi**
SJ51[a]	2,92	0,088	0,031	82,25	22	28,2
SJ61[b]	3,03	0,087	0,029	85,84	22,5	27,27
SJ71[c]	3,09	0,089	0,029	85,83	20,5	25

(a; 10 dk inkübasyon \ b; 20 dk inkübasyon \ c; 30 dk inkübasyon)

5
SONUÇ

Tek zincir nanopartikül (SCNP) sentezi, çalışma grubumuz tarafından uzun bir süredir araştırılmakta ve bu alanda çeşitli yayınlar yapılmaktadır [124-127].

Bu tez çalışmasında poli(stiren-ko-klorometilstiren) kopolimeri 3,6-dioksa-1,8-oktanditiol (DODT) çapraz bağlayıcısı beraberinde sistem içi çapraz bağlanma yöntemi ile SCNP' ye dönüştürüldü ve karakterize edildi. Kopolimer sentezi TEMPO-OH ile NMP polimerizasyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Sentezlenen SCNP yapısı glisidil metakrilat monomerinin epoksi halkasının açılmasıyla yapıya takıldı ve yan zincirinde SCNP içeren yeni bir monomer sentezlendi.

Sentezlenen bu monomer, etilen glikol dimetakrilat ve Irg-127 fotobaşlatıcısı kullanılarak fotopolimerizasyon tekniği ile farklı oranlarda hidrojeller hazırlandı. Hazırlanan bu hidrojeller, adsorpsiyon yöntemi ile üreaz enzimine immobilizasyonu amacıyla ilk kez taşıyıcı (destek materyali) olarak kullanıldı.

NMP polimerizasyonu ile sentezlenen öncül kopolimer PSCMST ve DODT çapraz bağlayıcısı kullanılarak elde edilen tek zincir katlanmalı nanopolimer PSCMSDT' ye ait molekül ağırlığı, partikül boyutu ve camsı geçiş sıcaklıkları Tablo 5.1'de verildi.

SCNP'lerin moleküler ağırlıklarının doğrusal öncül polimerlerine göre hidrodinamik hacimleri küçüldüğünden dolayı daha küçük olduğu bilinmektedir. Bununla beraber intramoleküler çapraz bağlanma sonucu oluşan SCNP'lerin partikül boyutları da doğrusal polimelerlerine kıyasla daha küçüktür. Zincir içi katlanma sebebiyle SCNP yapılarının Tg değerleri ise öncül polimerlerine göre daha yüksektir. Tüm bu veriler doğrultusunda Tablo 5.1'e bakıldığında elde edilen sonuçlara göre SCNP yapısının oluştuğu görüldü.

Tablo 5. 1 Sentezlenen polimerlerin GPC, DSC ve DLS sonuçları

Polimer	**Mn (g/mol)**	**PDI**	**Partikül Boyutu (nm)**	**Tg (ºC)**
PSCMST	14800	1,4	7,55	92,75
PSCMSDT	9872	1,5	6,7	122

Sentezlenen PSCMSDT nanopolimer yapısı glisidil metakrilat monomerine epoksi halkasından takılarak yeni monomer yapısı GPSCMDT elde edildi. GPSCMDT'nin yapısı ^{1}H-NMR ve FT-IR kullanılarak aydınlatıldı.

GPSCMDT monomeri DMF içerisinde çözüldü. Ardından çapraz bağlayıcı olarak içerisine, çapraz bağlayıcı oranları ağırlıkça %10 ve %20 olacak şekilde etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve Irg-127 eklenerek 18 adet 8W' lık mor lamba içeren fotoreaktörde belli sürelerde aydınlatılarak jel sentezleri gerçekleştirildi.

İlk defa yan zincirinde SCNP içeren bir monomerden elde hidrojeller, üreaz enziminin adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonu amacıyla ilk defa taşıyıcı olarak kullanıldı. Üreaz enziminin destek materyaline bağlanması adsorpsiyon yöntemiyle yapıldı.

İmmobilizasyon işlemi iki farklı sıcaklıkta (25ºC, 37ºC) ve iki farklı sürede (12 saat, 24 saat) gerçekleştirildi. Enzim aktivite çalışmaları gerçekleştirilerek en uygun aktivite koşullarının; %10 konsantrasyon, 25ºC ve 12 saat olduğu belirlendi.

SJ11 kodlu jelin tutuklanma oranı %84 olarak bulundu. Ortam sıcaklığının kolay uygulanabilir olması, daha fazla miktarda SCNP içeren monomer içermesi ve kısa sürede daha yüksek verim elde edilebilmesi sayesinde destek materyali olarak SJ11'in kullanıma uygun olduğu görüldü. Bu jelin yüksek absorpsiyon yeteneğine karşılık spesifik aktivite ve total ünite değerleri düşüktür. Ek olarak bu iki parametreye iyileştirme çalışmaları yapılabilir.

Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonu sonucu yüksek verimde tutuklanma sağlandı. Fakat enzim ile taşıyıcı arasında güçlü bir bağ oluşmazsa enzim desorpsiyon sonucu serbest kalır ve reaksiyon ortamına geçerek ürünlerin kirlenmesine yol açabilir. Bu durum, özellikle yüksek substrat konsantrasyonlarında sorun yaratabilir.

Optimum çalışma koşulları 25^{o}C ve 12 saat olarak belirlenen üreaz enziminin adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonu amacıyla, taşıyıcı olarak yan zincirinde SCNP içeren GMA monomerinden sentezlenen hidrojellerin; yapısında sadece GMA monomeri olan jellere kıyasla (%84 / %58) daha yüksek verimde tutuklanma oranı elde edildi.

KAYNAKÇA

[1] S. Derman, K. Kızılbey, ve Z. M. Akdeste, "Polymeric nanoparticles", SIGMA, c. 31, sy 1, Art. sy 1, Mar. 2013.

[2] A. Nitti, R. Carfora, G. Assanelli, M. Notari, ve D. Pasini, "Single-Chain Polymer Nanoparticles for Addressing Morphologies and Functions at the Nanoscale: A Review", ACS Appl. Nano Mater., c. 5, sy 10, ss. 13985-13997, Eki. 2022, doi: 10.1021/acsanm.2c02313.

[3] M. K. Aiertza, I. Odriozola, G. Cabañero, H.-J. Grande, ve I. Loinaz, "Single-chain polymer nanoparticles", Cell Mol Life Sci, c. 69, sy 3, ss. 337-346, Eki. 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0852-x.

[4] M. Gonzalez-Burgos, A. Latorre-Sanchez, ve J. A. Pomposo, "Advances in single chain technology", Chem. Soc. Rev., c. 44, sy 17, ss. 6122-6142, Ağu. 2015, doi: 10.1039/C5CS00209E.

[5] J. Rubio-Cervilla, E. González, ve J. A. Pomposo, "Applications of Single-Chain Polymer Nanoparticles", Single-Chain Polymer Nanoparticles, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, ss. 341-388. doi: 10.1002/9783527806386.ch9.

[6] B. Türköz, A. Özçelik, ve E. Karacabey, "Gıda endüstrisinde immobilize enzim uygulamaları", NÖHÜ Müh. Bilim. Derg., c. 13, sy 3, Art. sy 3, Tem. 2024, doi: 10.28948/ngumuh.1487845.

[7] B. Sahin, B. Ozbey-Unal, N. Dizge, B. Keskinler, ve C. Balcik, "Optimization of immobilized urease enzyme on porous polymer for enhancing the stability, reusability and enzymatic kinetics using response surface methodology", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, c. 240, s. 113986, Ağu. 2024, doi: 10.1016/j.colsurfb.2024.113986.

[8] M. Chelu ve A. M. Musuc, "Polymer Gels: Classification and Recent Developments in Biomedical Applications", Gels, c. 9, sy 2, Art. sy 2, Şub. 2023, doi: 10.3390/gels9020161.

[9] H. Jia, G. Zhu, ve P. Wang, "Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility", Biotechnol Bioeng, c. 84, sy 4, ss. 406-414, Kas. 2003, doi: 10.1002/bit.10781.

[10] M. Chanda, Introduction to Polymer Science and Chemistry: A Problem-Solving Approach, Second Edition, 2. bs. Boca Raton: CRC Press, 2013. doi: 10.1201/b14577.

[11] S. Koltzenburg, M. Maskos, ve O. Nuyken, Polymer Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. doi: 10.1007/978-3-662-49279-6.

[12] G. Allen, J. C. Bevington, ve G. C. Eastmond, Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions & Applications of Polymers. Elsevier Science & Technology Books, 1989.

[13] S. Cichosz, A. Masek, ve M. Zaborski, "Polymer-based sensors: A review", Polymer Testing, c. 67, sy Complete, ss. 342-348, 2018, doi: 10.1016/j.polymertesting.2018.03.024.

[14] A. L. Gupta, Polymer Chemistry. Pragati Publications, 2010.

[15] Y. Gnanou ve M. Fontanille, Organic and Physical Chemistry of Polymers, 1st edition. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2008.

[16] C. E. C. Jr, Carraher's Polymer Chemistry, 9. bs. Boca Raton: CRC Press, 2016. doi: 10.1201/b15405.

[17] H.-G. Elias, Macromolecules. (ǂ Vol. ǂ 3), Physical Structures and Properties. Weinheim: WILEY-VCH, 2008. Erişim: 27 Ocak 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://plus.cobiss.net/cobiss/sr/en/bib/512081043.

[18] D. I. Bower, An introduction to polymer physics, Nachdr. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2008.

[19] J. W. Nicholson, The Chemistry of Polymers. Royal Society of Chemistry, 1997.

[20] D. of C. F. J. Davis, Polymer Chemistry: A Practical Approach. Oxford, 2004.

[21] R. Narain, Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications. Elsevier, 2020.

[22] M. Saçak, "Polimer Kimyası", Gazi Kitabevi, Ankara, 2018.

[23] K. Matyjaszewski, D. A. Shipp, J.-L. Wang, T. Grimaud, ve T. E. Patten, "Utilizing Halide Exchange To Improve Control of Atom Transfer Radical Polymerization", Macromolecules, c. 31, sy 20, ss. 6836-6840, Eki. 1998, doi: 10.1021/ma980476r.

[24] R. B. Grubbs ve R. H. Grubbs, "50th Anniversary Perspective: Living Polymerization—Emphasizing the Molecule in Macromolecules", Macromolecules, c. 50, sy 18, ss. 6979-6997, Eyl. 2017, doi: 10.1021/acs.macromol.7b01440.

[25] I. S. Altarawneh, V. G. Gomes, ve M. H. Srour, "Polymer chain extension in semibatch emulsion polymerization with RAFT-based transfer agent: The influence of reaction conditions on polymerization rate and product properties", Journal of Applied Polymer Science, c. 114, sy 4, ss. 2356-2372, 2009, doi: 10.1002/app.30752.

[26] P. Pal, J. P. Pandey, ve G. Sen, "Chapter 5 - Synthesis and Application as Programmable Water Soluble Adhesive of Polyacrylamide Grafted Gum Tragacanth (GT-g-PAM)", içinde Biopolymer Grafting, V. K. Thakur, Ed., Elsevier, 2018, ss. 153-203. doi: 10.1016/B978-0-12-810462-0.00005-3.

[27] G. Illés vd., "Synthesis of New Type Polymers by Quasi-Living Atom Tansfer Radical Polymerization", Polymers, c. 14, sy 14, Art. sy 14, Oca. 2022, doi: 10.3390/polym14142795.

[28] G. Moad, E. Rizzardo, ve S. H. Thang, "Living Radical Polymerization by the RAFT Process", Aust. J. Chem., c. 58, sy 6, ss. 379-410, Haz. 2005, doi: 10.1071/CH05072.

[29] G. Moad, E. Rizzardo, ve S. H. Thang, "Radical addition–fragmentation chemistry in polymer synthesis", Polymer, c. 49, sy 5, ss. 1079-1131, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2007.11.020.

[30] D. Gigmes, Ed., Nitroxide mediated polymerization: from fundamentals to applications in materials science. içinde RSC polymer chemistry series, no. 19. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016.

[31] K. S. Kazanskii, "Comments on 'Living Polymerization: Rationale for Uniform Terminology' by Darling et al.", Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, c. 38, sy 10, ss. 1731-1733, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1099-0518(20000515)38:10<1731::AID-POLA310>3.0.CO;2-3.

[32] K. Matyjaszewski ve J. Spanswick, "Controlled/living radical polymrization", Materials Today, c. 8, sy 3, ss. 26-33, Mar. 2005, doi: 10.1016/S1369-7021(05)00745-5.

[33] E. Harth, B. V. Horn, ve C. J. Hawker, "Acceleration in nitroxide mediated 'living' free radical polymerizations", Chem. Commun., sy 9, ss. 823-824, Oca. 2001, doi: 10.1039/B102145C.

[34] H. Höcker, "Comments on 'Living Polymerization: Rationale for Uniform Terminology' by Darling et al.", Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, c. 38, sy 10, ss. 1725-1725, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1099-0518(20000515)38:10<1725::AID-POLA240>3.0.CO;2-2.

[35] J. Nicolas, Y. Guillaneuf, C. Lefay, D. Bertin, D. Gigmes, ve B. Charleux, "Nitroxide-mediated polymerization", Progress in Polymer Science, c. 38, sy 1, ss. 63-235, Oca. 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2012.06.002.

[36] T. Bozkuş, "Halka Açılması Polimerizasyonu ve Fotokimyasal Katyonik Polimerizasyon Yöntemlerinin Birleştirilmesiyle Farklı Kollu AB_2 Tipi Yıldız Kopolimerlerinin Sentezi", Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2019.

[37] M. Persico ve G. Granucci, Photochemistry: A Modern Theoretical Perspective, 1st ed. 2018 edition. New York, NY: Springer, 2018.

[38] Guillet, Polymer Photophysics and Photochemistry: An Introduction to the Study of Photoprocesses in Macromolecules, 1st edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

[39] A. Endruweit, M. S. Johnson, ve A. C. Long, "Curing of composite components by ultraviolet radiation: A review", Polym. Compos., c. 27, sy 2, ss. 119-128, Nis. 2006, doi: 10.1002/pc.20166.

[40] B. Wardle, Principles and Applications of Photochemistry. John Wiley & Sons, 2009.

[41] N. M. B. Muhsin, "Review on Effects of Photo-Processes in Environment".

[42] B. Jędrzejewska ve B. Ośmiałowski, "Difluoroboranyl derivatives as efficient panchromatic photoinitiators in radical polymerization reactions", Polym. Bull., c. 75, sy 7, ss. 3267-3281, Tem. 2018, doi: 10.1007/s00289-017-2201-1.

[43] C. Decker, "Photoinitiated crosslinking polymerisation", Progress in Polymer Science, c. 21, sy 4, ss. 593-650, Oca. 1996, doi: 10.1016/0079-6700(95)00027-5.

[44] R. Liska, "Industrial Photoinitiators: A Technical Guide. by W. Arthur Green.", ChemPhysChem, c. 12, sy 7, ss. 1389-1389, 2011, doi: 10.1002/cphc.201000542.

[45] M. Kaur ve A. K. Srivastava, "PHOTOPOLYMERIZATION: A REVIEW", Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, c. 42, sy 4, ss. 481-512, Oca. 2002, doi: 10.1081/MC-120015988.

[46] M. A. Tasdelen, N. Moszner, ve Y. Yagci, "The use of poly(ethylene oxide) as hydrogen donor in type II photoinitiated free radical polymerization", Polym. Bull., c. 63, sy 2, ss. 173-183, Ağu. 2009, doi: 10.1007/s00289-009-0079-2.

[47] C. Altinkok, F. Oytun, F. Basarir, ve M. A. Tasdelen, "Cysteamine-functionalized silver nanowires as hydrogen donor for type II photopolymerization", Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, c. 346, ss. 479-484, Eyl. 2017, doi: 10.1016/j.jphotochem.2017.06.035.

[48] J. G. Drobny, Radiation Technology for Polymers, 3. bs. Boca Raton: CRC Press, 2021. doi: 10.1201/9780429201196.

[49] R. H. Petrucci, F. G. Herring, J. D. Madura, ve C. Bissonnette, General Chemistry: Principles and Modern Applications, 10th edition. Toronto: Pearson Prentice Hall, 2010.

[50] B. B. N. (FRW) L. B. Bhushan, Springer Handbook of Nanotechnology, 3rd edition. Berlin New York: Springer Verlag, 2010.

[51] Andaç M, Dikbaş Ç, Akyüz G. Nanopartiküllerin genel özellikleri, sentez ve karakterizasyon teknikleri. Yavuz O, editör. Farmakoloji ve Toksikolojide Nanoteknoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2022. p.1-10.

[52] J. P. Rao ve K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters", Progress in Polymer Science, c. 36, sy 7, ss. 887-913, Tem. 2011, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.

[53] R. Chen ve E. B. Berda, "100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Re-examining Single-Chain Nanoparticles", ACS Macro Lett., c. 9, sy 12, ss. 1836-1843, Ara. 2020, doi: 10.1021/acsmacrolett.0c00774.

[54] M. K. Aiertza, I. Odriozola, G. Cabañero, H.-J. Grande, ve I. Loinaz, "Single-chain polymer nanoparticles", Cell Mol Life Sci, c. 69, sy 3, ss. 337-346, Eki. 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0852-x.

[55] S. Mavila, O. Eivgi, I. Berkovich, ve N. G. Lemcoff, "Intramolecular Cross-Linking Methodologies for the Synthesis of Polymer Nanoparticles", Chem. Rev., c. 116, sy 3, ss. 878-961, Şub. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00290.

[56] R. Li ve B. J. McCoy, "Inter- and Intramolecular Crosslinking Kinetics: Partitioning According to Number of Crosslinks", Macromolecular Rapid Communications, c. 25, sy 11, ss. 1059-1063, 2004, doi: 10.1002/marc.200400058.

[57] E. Verde-Sesto, A. Blázquez-Martín, ve J. A. Pomposo, "Advances in the Phototriggered Synthesis of Single-Chain Polymer Nanoparticles", Polymers (Basel), c. 11, sy 11, s. 1903, Kas. 2019, doi: 10.3390/polym11111903.

[58] J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che, ve S. C. Low, "Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering", Nanoscale Res Lett, c. 8, sy 1, s. 381, Eyl. 2013, doi: 10.1186/1556-276X-8-381.

[59] W. Kuhn ve G. Balmer, "Crosslinking of single linear macromolecules", Journal of Polymer Science, c. 57, sy 165, ss. 311-319, 1962, doi: 10.1002/pol.1962.1205716524.

[60] D. Sun, M. O. R. Siddiqui, ve K. Iqbal, "Specialty testing techniques for smart textiles", Smart Textile Coatings and Laminates, W. C. Smith, Ed., The Textile Institute Book Series. , Woodhead Publishing Ltd., 2019, ss. 99-116. doi: 10.1016/B978-0-08-102428-7.00004-3.

[61] J. A. Pomposo, Ed., Single-Chain Polymer Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Simulations, and Applications, 1st edition. Wiley-VCH, 2017.

[62] I. Perez-Baena vd., "Endowing Single-Chain Polymer Nanoparticles with Enzyme-Mimetic Activity", ACS Macro Lett, c. 2, sy 9, ss. 775-779, Eyl. 2013, doi: 10.1021/mz4003744.

[63] A. Zielińska vd., "Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology", Molecules, c. 25, sy 16, s. 3731, Ağu. 2020, doi: 10.3390/molecules25163731.

[64] A. Gagliardi vd., "Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors", Front. Pharmacol., c. 12, Şub. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.601626.

[65] V. Venugopal, Marine Polysaccharides: Food Applications. Boca Raton: CRC Press, 2016. doi: 10.1201/b10516.

[66] N. Wanasingha, P. Dorishetty, N. K. Dutta, ve N. R. Choudhury, "Polyelectrolyte Gels: Fundamentals, Fabrication and Applications", Gels, c. 7, sy 3, Art. sy 3, Eyl. 2021, doi: 10.3390/gels7030148.

[67] R. Santanu, S. D. Hussan, G. Rajesh, ve M. Daljit, "A REVIEW ON PHARMACEUTICAL GEL", c. 1.

[68] A. K. Nayak ve B. Das, "1 - Introduction to polymeric gels", içinde Polymeric Gels, K. Pal ve I. Banerjee, Ed., içinde Woodhead Publishing Series in Biomaterials. , Woodhead Publishing, 2018, ss. 3-27. doi: 10.1016/B978-0-08-102179-8.00001-6.

[69] Y. Ohsedo ve C. Takagi, "Development of Low-Molecular-Weight Gelator/Polymer Composite Materials Utilizing the Gelation and Swelling Process of Polymeric Materials", Gels, c. 10, sy 5, s. 298, Nis. 2024, doi: 10.3390/gels10050298.

[70] O. Lyubimova, X. Liu, S. Gusarov, A. E. Kobryn, ve A. Kovalenko, "Solvation structure and gelation ability of polyelectrolytes: predictions by quantum chemistry methods and integral equation theory of molecular liquids", Procedia Computer Science, c. 4, ss. 1186-1192, Oca. 2011, doi: 10.1016/j.procs.2011.04.127.

[71] B. Neeraj, "TOPICAL GEL: A REVIEW", WJPPS, ss. 303-313, Nis. 2017, doi: 10.20959/wjpps20174-8858.

[72] P. Dcosta, A. R. Shabaraya, ve F. C. Miranda, "Hydrogel in Novel Drug Delivery_A Review", c. 7, sy 4, 2022.

[73] J. Li ve D. J. Mooney, "Designing hydrogels for controlled drug delivery", Nat Rev Mater, c. 1, sy 12, s. 16071, Eki. 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2016.71.

[74] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, ve H. Md Akil, "Classification, processing and application of hydrogels: A review", Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, c. 57, ss. 414-433, Ara. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.

[75] H. J. Chung ve T. G. Park, "Self-assembled and nanostructured hydrogels for drug delivery and tissue engineering", Nano Today, c. 4, sy 5, ss. 429-437, Eki. 2009, doi: 10.1016/j.nantod.2009.08.008.

[76] W. E. Hennink ve C. F. van Nostrum, "Novel crosslinking methods to design hydrogels", Adv Drug Deliv Rev, c. 54, sy 1, ss. 13-36, Oca. 2002, doi: 10.1016/s0169-409x(01)00240-x.

[77] K. Pal, A. K. Banthia, ve D. K. Majumdar, "Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications", Des. Monomers Polym., c. 12, sy 3, ss. 197-220, Oca. 2009, doi: 10.1163/156855509X436030.

[78] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review", Journal of Advanced Research, c. 6, sy 2, ss. 105-121, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.

[79] L. Pescosolido vd., "In situ forming IPN hydrogels of calcium alginate and dextran-HEMA for biomedical applications", Acta Biomater, c. 7, sy 4, ss. 1627-1633, Nis. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.040.

[80] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, ve H. Ichikawa, "Hydrogels in pharmaceutical formulations", Eur J Pharm Biopharm, c. 50, sy 1, ss. 27-46, Tem. 2000, doi: 10.1016/s0939-6411(00)00090-4.

[81] E. Busto, V. Gotor-Fernández, ve V. Gotor, "Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis", Chem. Soc. Rev., c. 39, sy 11, ss. 4504-4523, Eki. 2010, doi: 10.1039/C003811C.

[82] K. Varaprasad, G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M. M. Yallapu, ve R. Sadiku, "A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications", Materials Science and Engineering: C, c. 79, ss. 958-971, Eki. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.05.096.

[83] M. Misson, H. Zhang, ve B. Jin, "Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications", Journal of The Royal Society Interface, c. 12, sy 102, s. 20140891, Oca. 2015, doi: 10.1098/rsif.2014.0891.

[84] R. B. Rucker ve W. Chowanadisai, "Coenzymes and Cofactors", içinde Encyclopedia of Food and Health, B. Caballero, P. M. Finglas, ve F. Toldrá, Ed., Oxford: Academic Press, 2016, ss. 206-224. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00181-1.

[85] A. Illanes, A. Cauerhff, L. Wilson, ve G. R. Castro, "Recent trends in biocatalysis engineering", Bioresource Technology, c. 115, ss. 48-57, Tem. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.050.

[86] S. Jemli, D. Ayadi-Zouari, H. B. Hlima, ve S. Bejar, "Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes", Critical Reviews in Biotechnology, c. 36, sy 2, ss. 246-258, Mar. 2016, doi: 10.3109/07388551.2014.950550.

[87] N. U. Haq vd., "Sciendo", Polish Journal of Chemical Technology, c. 26, sy 3, ss. 8-15, Eyl. 2024, doi: 10.2478/pjct-2024-0024.

[88] M. B. Sales vd., "Sustainable Feedstocks and Challenges in Biodiesel Production: An Advanced Bibliometric Analysis", Bioengineering, c. 9, sy 10, s. 539, Eki. 2022, doi: 10.3390/bioengineering9100539.

[89] W. K. Chui ve L. S. C. Wan, "Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres", Journal of Microencapsulation, c. 14, sy 1, ss. 51-61, Oca. 1997, doi: 10.3109/02652049709056467.

[90] S. F. Sousa, M. J. Ramos, C. Lim, ve P. A. Fernandes, "Relationship between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases", ACS Catal., c. 5, sy 10, ss. 5877-5887, Eki. 2015, doi: 10.1021/acscatal.5b00923.

[91] W. T. Frankenberger ve J. B. Johanson, "Effect of pH on enzyme stability in soils", Soil Biology and Biochemistry, c. 14, sy 5, ss. 433-437, Oca. 1982, doi: 10.1016/0038-0717(82)90101-8.

[92] F. Kara, G. Demirel, ve H. Tümtürk, "Immobilization of urease by using chitosan-alginate and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/kappa-carrageenan supports", Bioprocess Biosyst Eng, c. 29, sy 3, ss. 207-211, Ağu. 2006, doi: 10.1007/s00449-006-0073-0.

[93] S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana, ve C. Gessa, "Urease from the soil bacterium Bacillus pasteurii: Immobilization on Ca-polygalacturonate", Soil Biology and Biochemistry, c. 28, sy 6, ss. 811-817, Haz. 1996, doi: 10.1016/0038-0717(96)00020-X.

[94] V. Anitha, K. Abinaya, S. Prakash, A. Seshagiri Rao, ve B. Vanavil, "Bacillus cereus KLUVAA Mediated Biocement Production Using Hard Water and Urea", Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, c. 32, sy 2, ss. 257-266, Tem. 2018, doi: 10.15255/CABEQ.2017.1096.

[95] H. A. M. Takci ve P. Bakirhan, “Kilis Topraklarından İzole Edilen Bacillus B10 Suşunun Üreaz Üretiminin İstatiksel Optimizasyonu”.

[96] M. Hosseini, F. Babaha, ve M. T. Sh. Al-Rubaye, “Urease-Producing Halophilic Bacteria Isolated from Bahr Al-Milh Salt Lake, Karbala, Iraq”, J PURE APPL MICROBIO, c. 11, sy 2, ss. 711-716, Haz. 2017, doi: 10.22207/JPAM.11.2.09.

[97] V. Achal, “Characterization of Two Urease-Producing and Calcifying Bacillus spp. Isolated from Cement”, J. Microbiol. Biotechnol., c. 20, sy 11, ss. 1571-1576, Kas. 2010, doi: 10.4014/jmb.1006.06032.

[98] E. Hearn ve R. J. Neufeld, “Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease”, Process Biochemistry, c. 35, sy 10, ss. 1253-1260, Tem. 2000, doi: 10.1016/S0032-9592(00)00172-2.

[99] J. P. Chen ve S. H. Chiu, “A poly(N-isopropylacrylamide-co-N-acryloxysuccinimide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) composite hydrogel membrane for urease immobilization to enhance urea hydrolysis rate by temperature swing”, Enzyme and Microbial Technology, c. 26, sy 5-6, ss. 359-367, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0141-0229(99)00181-7.

[100] G. Bayramoğlu, Y. Kaçar, A. Denizli, ve M. Yakup Arıca, “Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix”, Journal of Food Engineering, c. 52, sy 4, ss. 367-374, May. 2002, doi: 10.1016/S0260-8774(01)00128-5.

[101] A. R. DeGroot ve R. J. Neufeld, “Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α-chymotrypsin with chitosan membranes”, Enzyme and Microbial Technology, c. 29, sy 6, ss. 321-327, Eki. 2001, doi: 10.1016/S0141-0229(01)00393-3.

[102] P. K. Srivastava, A. M. Kayastha, ve null Srinivasan, “Characterization of gelatin-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor”, Biotechnol Appl Biochem, c. 34, sy 1, ss. 55-62, Ağu. 2001, doi: 10.1042/ba20010016.

[103] “Immobilization of jack bean (Canavalia ensiformis) urease on gelatin and its characterization”, Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, c. 5, sy 1, ss. 43-47, Mar. 2005, doi: 10.3742/OPEM.2005.5.1.043.

[104] S. Turmanova, T. Godjevargova, ve N. Vasileva, “Immobilization of urease on cation-exchange membranes prepared by radiation-initiated graft copolymerization of acrylic acid on polyethene thin films”, Polym. Bull., c. 55, sy 6, ss. 467-475, Ara. 2005, doi: 10.1007/s00289-005-0456-4.

[105] K.-H. Yeon ve R. M. Lueptow, “Urease immobilization on an ion-exchange textile for urea hydrolysis”, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, c. 81, sy 6, ss. 940-950, 2006, doi: 10.1002/jctb.1471.

[106] K. R. C. Reddy ve A. M. Kayastha, “Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, c. 38, sy 2, ss. 104-112, Şub. 2006, doi: 10.1016/j.molcatb.2005.12.001.

[107] F. Kara, G. Demirel, ve H. Tümtürk, "Immobilization of urease by using chitosan-alginate and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/kappa-carrageenan supports", Bioprocess Biosyst Eng, c. 29, sy 3, ss. 207-211, Ağu. 2006, doi: 10.1007/s00449-006-0073-0.

[108] K. Gabrovska, A. Georgieva, T. Godjevargova, O. Stoilova, ve N. Manolova, "Poly(acrylonitrile)chitosan composite membranes for urease immobilization", J Biotechnol, c. 129, sy 4, ss. 674-680, May. 2007, doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.01.014.

[109] M. Nakarani ve A. M. Kayastha, "Kinetics and diffusion studies in urease-alginate biocatalyst beads", Advances in Traditional Medicine, c. 7, sy 1, ss. 79-84, 2007, doi: 10.3742/OPEM.2007.7.1.079.

[110] S. M. Hamdy, S. El-Sigeny, ve M. F. Abou Taleb, "Immobilization of Urease on (HEMA/IA) Hydrogel Prepared by Gamma Radiation", Journal of Macromolecular Science, Part A, c. 45, sy 12, ss. 980-987, Eki. 2008, doi: 10.1080/10601320802453740.

[111] R. P. Pogorilyi, V. P. Goncharik, L. I. Kozhara, ve I. L. Zub, "Covalent immobilization of urease on polysiloxane templates containing 3-aminoproply and 3-mercaptoproply groups", Prikl Biokhim Mikrobiol, c. 44, sy 6, ss. 621-625, 2008.

[112] Z. Luo ve X. Fu, "Immobilization of urease on dialdehyde porous starch", Starch Stärke, c. 62, sy 12, ss. 652-657, Ara. 2010, doi: 10.1002/star.201000067.

[113] B. Sahoo, S. K. Sahu, ve P. Pramanik, "A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, c. 69, sy 3, ss. 95-102, May. 2011, doi: 10.1016/j.molcatb.2011.01.001.

[114] M. Monier ve A. M. A. El-Sokkary, "Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease", Int J Biol Macromol, c. 51, sy 1-2, ss. 18-24, 2012, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.04.019.

[115] R. P. Pogorilyi, I. V. Melnyk, Y. L. Zub, G. A. Seisenbaeva, ve V. G. Kessler, "Immobilization of urease on magnetic nanoparticles coated by polysiloxane layers bearing thiol- or thiol- and alkyl-functions", J. Mater. Chem. B, c. 2, sy 18, ss. 2694-2702, Nis. 2014, doi: 10.1039/C4TB00018H.

[116] N. K. Yetim, E. H. Özkan, ve N. Sarı, "Polimerik Nanoküreler Üzerine Enzim İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu", Süleyman Demirel University Faculty of Arts and Science Journal of Science, c. 14, sy 1, Art. sy 1, May. 2019, doi: 10.29233/sdufeffd.479246.

[117] W. Liu, L. Wang, ve R. Jiang, "Specific Enzyme Immobilization Approaches and Their Application with Nanomaterials", Top Catal, c. 55, sy 16-18, ss. 1146-1156, Kas. 2012, doi: 10.1007/s11244-012-9893-0.

[118] V. L. Sirisha, A. Jain, ve A. Jain, "Enzyme Immobilization", c. 79, ss. 179-211, 2016, doi: 10.1016/bs.afnr.2016.07.004.

[119] B. Brena, P. González-Pombo, ve F. Batista-Viera, "Immobilization of enzymes: a literature survey", Methods Mol Biol, c. 1051, ss. 15-31, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_2.

[120] D.-M. Liu, J. Chen, ve Y.-P. Shi, "Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization", TrAC Trends in Analytical Chemistry, c. 102, ss. 332-342, May. 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.03.011.

[121] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry, c. 72, sy 1, ss. 248-254, May. 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[122] N. A. Kiymaz, "Bazı Bitkilerde Pullulanaz Aktivitesinin Araştırılması, Pullulanazın Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu", Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2013.

[123] S. Tunalı, "Fındıktan (Corylus maxima Miller) Üreazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu", Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2008.

[124] M. Keklik, I. Akar, B. A. Temel, D. K. Balta, ve G. Temel, "Single-chain polymer nanoparticles via click crosslinking and effect of photoinduced radical combination on crosslink points", Polymer International, c. 69, sy 10, ss. 1018-1023, 2020, doi: 10.1002/pi.6057.

[125] D. Kilic, C. Pamukcu, D. K. Balta, B. A. Temel, ve G. Temel, "Rapid synthesis of fluorescent single-chain nanoparticles via photoinduced step-growth polymerization of pendant carbazole units", European Polymer Journal, c. 125, s. 109469, Şub. 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109469.

[126] I. Dashan, D. K. Balta, B. A. Temel, ve G. Temel, "Preparation of Single Chain Nanoparticles via Photoinduced Double Collapse Process", Macromolecular Chemistry and Physics, c. 220, sy 10, s. 1900116, 2019, doi: 10.1002/macp.201900116.

[127] S. Babaoglu, D. Karaca Balta, ve G. Temel, "Synthesis of photoactive single-chain folded polymeric nanoparticles via combination of radical polymerization techniques and M enschutkin click chemistry", J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., c. 55, sy 12, ss. 1998-2003, Haz. 2017, doi: 10.1002/pola.28571.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Balta, D. K., Puntar, N. A., Çölmek, F. N., (2024), "NEW SCNP-BASED POLYMER MATRIX SYNTHESIS FOR ENZYME", 5th INTERNATIONAL BURSA SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS, 1-3 Mart 2024, Bursa, Türkiye, The Proceedings Book, ss 379.