

**POLİ(METAKRİLAMİD / SEPİYOLİT)
KOMPOZİT HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE
İNVERTAZ İMMOBİLİZASYONUNDA
KULLANILMASI**

ARZU ÇAKET

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
2013**

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİ(METAKRİLAMİD / SEPIYOLİT) KOMPOZİT HİDROJELLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE İNVERTAZ
İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI**

ARZU ÇAKET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. H. NURSEVİN ÖZTOP

SİVAS

2013

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

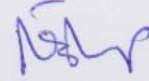
Başkan: Prof. Dr. Dursun SARAYDIN



Üye: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS



Üye (Danışman): Prof. Dr.H. Nursevin ÖZTOP



ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../20..

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. İNVERTAZ.....	3
2.1 İnvertaz Enziminin Çalışma Mekanizması.....	4
2.2 İnvertaz Aktivite Analizi.....	5
3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	7
3.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	8
3.1.1. Adsorbsiyon.....	8
3.1.2. Kovalent Bağlanma.....	9
3.1.3. İyonik Bağlanma.....	10
3.1.4. Çapraz Bağlanma	11
3.1.5. Hapsetme	11
3.1.5.1. Jel İçine Hapsetme	12
3.1.5.2. Mikrokapsülleme.....	12
3.2. İmmobilizasyonun Avantajları.....	13
4. KOMPOZİTLER.....	14
5. HİDROJELLER.....	16
6. METAKRİLAMİTLER.....	17
6.1. Metakrilamit ile yapılan çalışmalar.....	18
7. KİL.....	19
7.1. Sepiyolit.....	20

7.1.1. Sepiyolitinin Kullanım Alanları.....	23
8. KOMPOZİT HİDROJELLERİN KARAKTERİZASYONU.....	25
8.1. Spektroskopik Özellikler.....	25
8.2. Isısal Özellikler.....	25
8.3. Şişme Davranışı ve Difüzyon Türü.....	25
9. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
9.1. Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih.....	27
9.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
9.3. Kullanılan Cihazlar.....	27
9.4. Kompozit Hidrojellerin Hazırlanması.....	27
9.5. Kompozit Hidrojellerinin Karakterizasyonu	28
9.5.1. Spektroskopik Analiz.....	28
9.5.2. Isısal Analiz.....	28
9.5.3. Şişme Deneyleri.....	28
9.5.3.1. Dinamik Şişme Deneyleri.....	28
9.5.3.2. Şişmenin pH ile Değişimi	28
9.6. İnvvertazın PM ve PMS Hidrojellere İmmobilizasyonu.....	29
9.7. Serbest İnvvertaz Deneyleri.....	29
9.7.1. Serbest İnvvertazın Aktivite Analizi.....	29
9.7.2. Serbest İnvvertazın Optimum pH'sının Belirlenmesi.....	30
9.7.3. Serbest İnvvertazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	30
9.7.4. Serbest İnvvertazın Kinetik Parametrelerinin Bulunması	30
9.7.5. Serbest İnvvertazın Termal Kararlılığı.....	30

9.7.6. Serbest İvertazın Saklama Kararlılığı	31
9.8. İmmobilize İvertaz Deneylei.....	31
9.8.1. PMI ve PMSI'ın Aktivite Analizi.....	31
9.8.2. PMI ve PMSI'ın Optimum pH'sının Belirlenmesi.....	31
9.8.3. PMI ve PMSI'ın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	32
9.8.4. PMI ve PMSI'ın Kinetik Parametrelerinin Bulunması	32
9.8.5. PMI ve PMSI'ın Termal Kararlılığı.....	32
9.8.6. PMI ve PMSI'ın Saklama Kararlılığı.....	32
9.8.7. PMI ve PMSI'ın pH Kararlılığı	33
9.8.8. PMI ve PMSI'ın Kullanım Kararlılığı	33
10. BULGULAR.....	34
10.1. Kompozit Hidrojellerin Hazırlanması	34
10.2. Kompozit Hidrojellerin Karakterizasyonu.....	37
10.2.1. Spektroskopik Analiz.....	37
10.2.2. Isısal Analiz (TG)	37
10.2.3. Şişme Deneylei.....	40
10.2.3.1. Dinamik Şişme.....	40
10.2.3.2. Şişmenin pH ile Değişimi	46
10.3. İvertazın PM ve PMS Hidrojellere İmmobilizasyonu.....	49
10.4. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'ın Özelliklerinin Araştırılması.....	49
10.4.1. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'ın Optimum pH'sının Belirlenmesi.....	49

10.4.2. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	49
10.4.3. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Kinetik Parametrelerinin Bulunması.....	51
10.4.4. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi.....	54
10.4.5. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Saklama Kararlılığının Belirlenmesi.....	55
10.4.6. PMI ve PMSI'nin pH Kararlılığı.....	56
10.4.7. PMI ve PMSI'nin Kullanım Kararlılığı.....	57
11. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	58
12. KAYNAKLAR.....	66
13. ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

POLİ(METAKRİLAMİD / SEPIYOLİT) KOMPOZİT HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE İNVERTAZ İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI

Arzu ÇAKET

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Nursevin ÖZTOP

2013, 84 sayfa

Invertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere poli(metakrilamit) hidrojel ve yeni bir kompozit hidrojel olan poli(metakrilamit/sepiyolit) hidrojelinin (PMS) sentezlenmesi, karakterizasyonu, invertaz immobilizasyonunda kullanılması ve immobilize invertazın özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. PM hidrojel radikal katılma tepkimesiyle, PMS kompozit hidrojel sulu ortamda sepiyolit varlığında metakrilamitin radikal katılma tepkimesiyle hazırlandı. Hidrojellerin karakterizasyonu için FTIR/ATR analizi, termogravimetrik analiz ve şişme denemeleri yapıldı. PM ve PMS hidrojellerine invertaz immobilize edilerek immobilize invertazlar (PMI ve PMSI) oluşturuldu. Immobilize invertazların optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametrelerin bulunması, termal kararlılık, kullanım kararlılığı ve saklama kararlılığı deneyleri gerçekleştirildi.

FTIR/ATR spektrumunda metakrilamit ve sepiyolit için karakteristik pikler saptandı. Isısal analiz deneyleri hidrojellerin üç basamaklı ısısal bozunma tepkimesi verdiğini gösterdi. Şişme denemeleri sonucunda maksimum şişme değeri (S_{max}) PM için 25 °C'ta 3.42, 60 °C'ta 2.57, PMSI için 25 °C'ta 2.47, 60 °C'ta 2.24 olarak bulundu.

İmmobilize invertaz deneylerinde optimum pH değerleri serbest invertaz (I), PMI ve PMSI için sırasıyla 6.0, 4.0 ve 3.0, optimum sıcaklık değerleri I, PMI ve PMSI için sırasıyla 30 °C, 30 °C ve 50 °C olarak bulundu. Serbest invertaz ve PMI ve PMSI için V_{max} değerleri sırasıyla 1.68 $\mu\text{mol dk}^{-1}$, 3.64 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ ve 7.84 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ ve K_m değerleri 7.17 mM, 35.25 mM ve 71.41 mM olarak bulunmuştur. İmmobilize invertazlar serbest invertaza göre yüksek termal, kullanım ve saklama kararlılığına sahiptir. Bu sonuçlar poli(metakrilamit) ve poli(metakrilamit/sepiyolit hidrojellerinin invertaz immobilizasyonu için uygun destek olabileceğini göstermiştir.

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

PROPERTIES OF IMMOBILIZED INVERTASE ONTO POLY(METHACRYLAMIDE/SEPIOLITE) COMPOSITE HYDROGEL

Arzu ÇAKET

Cumhuriyet University

Faculty of Science

Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. H. Nursevin ÖZTOP

2013, 84 pages

The aim of the present study is preparation and characterization of poly(methacrylamide) hydrogel (PM) and a novel composite hydrogel, poly(methacrylamide/sepiolite) hydrogel (PMS) for immobilization of invertase and investigation of the enzymatic performance of this hydrogel. PM hydrogel was prepared by free radical crosslinking of methacrylamide, PMS hydrogel was prepared by free radical crosslinking of methacrylamide and sepiolite in aqueous solution. FTIR/ATR analysis, thermal analysis and assays of swelling were done for characterization of hydrogels. Then invertase was immobilized onto this hydrogels and immobilized invertases (PMI and PMSI) were prepared. The assays of optimum pH, optimum temperature, kinetic parameters, thermal, operational and storage stability were done.

In FTIR analysis the characteristic bands of methacrylamide and sepiolite were detected. In the experiments of thermal analysis, three types of the decomposition region of the hydrogels were found. In the swelling experiments the maximum swelling of PM (S_{max}) was found to be 3.42 at 25 °C and found to be 2.57 at 60 °C and the maximum swelling of PMS was found to be 2.47 at 25 °C and found to be 2.24 at 60 °C. Optimum pH values for free invertase, PMI and PMSI were found to be 6.0, 4.0 and 3.0 respectively, and the optimum temperatures are 30 °C, 30 °C and 50 °C for free

invertase, PMI and PMSI. It was found that K_m values of free invertase, PMI and PMSI were 7.17 mM, 35.25 mM and 71,41 mM respectively. V_{max} values were found that 1.68 $\mu\text{mole min}^{-1}$ for free invertase, 3,64 $\mu\text{mole min}^{-1}$ and 7.84 $\mu\text{mole min}^{-1}$ for PMSI respectively. The invertase immobilized hydrogels showed excellent temperature, storage and operational stability. These results showed that poly(methacrylamide/sepiolite) composite hydrogel is suitable support for immobilization of invertase.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde hiçbir desteğini ve bilimsel yardımlarını benden eksik etmeyen çok kıymetli ve sevgili hocam Prof. Dr. H. Nursevin ÖZTOP`a,

Polimer ile ilgili bilgilerini paylaşmaktan kaçınmayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Dursun SARAYDIN`a,

Polimerlerin TG ve FTIR/ATR analizlerindeki yardımı için Doç. Dr. Ahmet GÜLTEK`e,

Çalışmanın başından sonuna hep yanımda olan hiçbir şekilde yardımını ve psikolojik desteğini üzerimden eksik etmeyen sevgili hocam Ar. Gör. Ceylan HEPOKUR`a,

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen (F-350) Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Analiz çalışmaları boyunca bana evlerini açan ve destek olan manevi ailem Garip ERKAN, Ayşe ERKAN ve değerli arkadaşım Sultan ERKAN KARİPER`e,

Her hafta laboratuvar çalışmaları sonrası Şarkıyla dönüşümde beni karşılayan biricik abim M. İlker ÇAKET ve eşi Salihan ÇAKET`e,

Her zaman, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım babam Hamit ÇAKET ve canım annem Nilgün ÇAKET`e en içten ve sevecen duygularıyla,

teşekkür ederim....

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Sukrozun invertazla hidroliz tepkimesi.....	3
Şekil 2.2 İvertaz enziminin çalışma mekanizması.....	5
Şekil 3.1 Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon.....	8
Şekil 3.2 Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyon	9
Şekil 3.3. İyonik bağlanma yöntemi ile immobilizasyon	10
Şekil 3.4 Enzim molekülleri arası çapraz bağlama.....	11
Şekil 3.5 Hapsetme Yöntemleri.....	12
Şekil 6.1. Metakrilamitlerin genel yapısı.....	17
Şekil 7.1. Kilin iyon değişim işlemi.....	20
Şekil 7.2. Sepiyolit kristalinin yapısı	22
Şekil 10.1. PM hidrojelinin FTIR spektrumu.....	38
Şekil 10.2. PMS kompozit hidrojelinin FTIR spektrumu.....	38
Şekil 10.3. PM kompozit hidrojelinin termogramı.....	39
Şekil 10.4. PMS hidrojelinin termogramı.....	39
Şekil 10.5. PM ve PMS hidrojellerinin 25°C`ta şişme davranışının zamanla değişimi.....	41
Şekil 10.6. PM ve PMS kompozit hidrojellerinin 60°C`ta şişme davranışının zamanla değişimi	41
Şekil 10.7. PM kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi.....	42
Şekil 10.8. PMS kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi.....	42
Şekil 10.9. PM ve PMS kompozit hidrojellerinin 25°C`ta şişme hız grafiği.....	44
Şekil 10.10. PM ve PMS kompozit hidrojellerinin 60°C`ta şişme hız grafiği	44
Şekil 10.11. PM ve PMS ve kompozit hidrojellerinin 25°C`ta lnF-lnT grafiği.....	45
Şekil 10.12. PM ve PMS kompozit hidrojellerinin 60°C`ta lnF-lnT grafiği.....	45

Şekil 10.13. Metakrilamit hidrojelinin fotoğrafı.....	47
Şekil 10.14. Metakrilamit/sepiyolit hidrojelinin fotoğrafı.....	47
Şekil 10.15. PM kompozit hidrojellerinin pH duyarlı şişme davranışı	48
Şekil 10.16. PMS kompozit hidrojellerinin pH duyarlı şişme davranışı.....	48
Şekil 10.17. Serbest invertaz, PMI ve PMSI `ın optimum pH grafiği.....	50
Şekil 10.18. Serbest invertaz, PMI ve PMSI `ın optimum sıcaklık grafiği.....	50
Şekil 10.19. Serbest invertazın a) Michaleis- Menten b) Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 10.20. PMI `ın a) Michaleis- Menten b) Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 10.21. PMSI `ın a) Michaleis- Menten b) Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 10.22. Serbest invertaz, PMI ve PMSI `ın 50°C`ta termal kararlılığı.....	54
Şekil 10.23. Serbest invertaz, PMI ve PMSI `ın 70°C`ta termal kararlılığı.....	55
Şekil 10.24. Serbest invertaz, PMI ve PMSI `ın saklama kararlılığı	56
Şekil 10.25. PMI ve PMSI `ın pH kararlılığı.....	56
Şekil 10.26. PMI ve PMSI `ın kullanım kararlılığı.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Kompozit malzemeyi oluşturan matriks ve takviye malzemeleriç.....	14
Çizelge 7.1. Eskişehir yakınlarındaki bazı bölgelerin sepiyolit rezervleri.....	21
Çizelge 7.2. Sepiyolit kullanım alanları.....	24
Çizelge 10.1. PM ve PMS kompozit hidrojellerinin farklı sıcaklıklardaki şişme parametreleri.....	43
Çizelge 10.2. PM ve PMS kompozit hidrojellerinin değişik sıcaklıklardaki şişme kinetik parametreleri	46
Çizelge 11.1. Serbest invertaz, PMI ve PMSI için optimum sıcaklık, optimum pH ve kinetik parametreleri.....	63

ŞEMALAR DİZİNİ

Şema 10.1. Poli(metakrilamit) hidrojeli için önerilen başlama tepkimeleri.....	34
Şema 10.2. Poli(metakrilamit) hidrojeli için önerilen büyüme ve sonlanma tepkimeleri	35
Şema 10.3. Kompozit hidrojel oluşumu.....	36

1.GİRİŞ

Enzimler etkinleşme enerjisini düşüren, yaşayan hücreler içinde gerçekleşen kimyasal tepkimeleri hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimler son derece özgüdürlü bu yüzden bütün kimyasal tepkimelere katılmazlar, tepkime boyunca değiştirilemezler ve hızlı çalışırlar. Yapılarını oluşturan amino asitlerin primer dizilişi genler tarafından belirlenen sraya göre oluşur. Hücre içinde gösterdikleri aktiviteyi hücre dışında da gösterebilmeleri nedeniyle enzimlerin birçoğu hücreden ayrılabilir ve değişik ortamlarda kullanılabilirler. Enzimlerin bu özellikleri onların pek çok kimyasal ve endüstriyel işlemlerde kullanılmasına olanak sağlar. Biyolojik deterjanlar, bira endüstrisi, süt endüstrisi, nişasta endüstrisi, tekstil endüstrisi, deri endüstrisi, tıp ve eczacılık alanları enzimlerin kullanıldığı alanlardır (Nelson ve Cox, 2005).

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Pek çok endüstriyel, analitik ve klinik süreçlerde enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılmazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları pahalı olmaları nedeni ile süreçleri ekonomik olmaktan çıkmaktadır (Mormeneo ve Sentandreu, 1982, Moreno ve ark., 1990). Bu nedenle immobilize edilerek, immobilize enzimlerin kullanılması, kontrollü ürün oluşumu, elde edilen ürünlerin kolayca saflaştırılması ve tekrar kullanım gibi işlemi daha ekonomik hale getiren birçok avantaj sağlamaktadır. Enzim immobilizasyonu için adsorpsiyon, polimerik jeller ya da membranlar içerisine hapsetme, bifonksiyonel bir madde ile çapraz bağlama ya da kovalent bağlama gibi birçok kimyasal ve fiziksel yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında polimerik destek üzerine adsorpsiyon yapılması en eski uygulaması kolay bir yöntemdir. En önemli avantajı ise immobilize edilen enzimin aktifliğini büyük ölçüde veya tamamıyla koruması ve tersinir bir yöntem olduğundan destek maddesinin ve enzimin başka amaçlar için tekrar kullanımına olanak sağlamasıdır (Öztop ve ark., 2009).

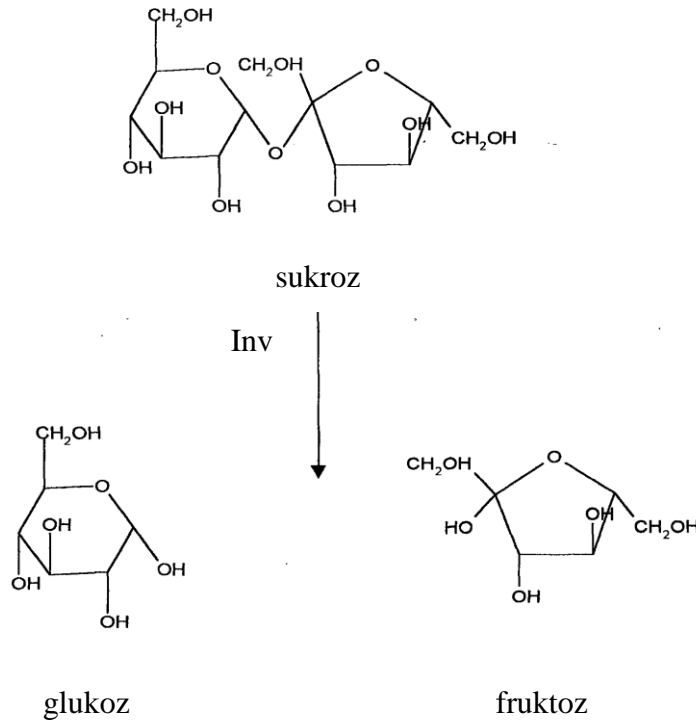
İmmobilize enzim çalışmalarında en önemli araştırma alanı uygun destek materyalinin bulunmasıdır. Doğal ve yapay polimerik materyaller değişik işlevsel gruplara sahip olmaları ve proteinlerin dış gruplarıyla kararlı bağlar oluşturabilmeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan desteklerdir. Polimer kompozitler makroskobik olarak birbirinden ayrı iki veya daha fazla malzemenin bir araya getirilmesi ile üretilen malzeme türüdür. Son yıllarda destek maddesi olarak ilgi çekmektedir. Kompozit

malzeme teknolojisi bugün hızla gelişmekte ve hemen hergün piyasaya yeni ürünler sunulmaktadır (Öztop ve Hepokur, 2007).

Bu çalışmada immobilizasyonda kullanmak için besin endüstrisinin önemli enzimi olan invertaz seçilmiştir ve Destek materyal olarak hidrojel ve kil-polimer kompozit hidrojellerinin (poli(metakrilamit) ve poli(metakrilamit)/sepiyolit) hazırlanması, karakterizasyon çalışmalarından sonra invertaz immobilizasyonunda kullanılması ve immobilize invertazın optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametrelerinin bulunması, termal kararlılık, pH kararlılığı, saklama kararlılığı ve depolama kararlılığının saptanması amaçlanmıştır.

2. İNVERTAZ

İnvertaz (β -D-fruktofuranozidaz E.C.3.2.1.26), doğada oldukça yaygın olarak bulunan hidrolaz sınıfı enzimdir. Çok sayıda α 1- β 2-glikozidik bağın hidrolizini katalizler (Guimaraes ve ark., 2007, Alvaro-Benito ve ark., 2007). İnvertaz, hafif krem renkli, suda çözünebilen, zengin karboksilik gruplu asidik bir enzimdir (Öztop ve Hepokur, 2007). Yiyecek ve içecek endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan invertaz, invert şeker (glukoz ve fruktoz) üretimi için sukroz hidrolizini katalizleyen bir glikoproteindir (Öztop ve ark, 2009, Dizge ve ark., 2007). Yüksek mannoz içeriği nedeniyle maya hücre dışı glikoproteinleri mannoproteinler olarak adlandırılırlar. İnvertaz, glikoprotein yapıda bir salgı proteini olması nedeniyle hem glikoproteinlerin işlenmesine yönelik çalışmalarda hem de proteinlerin hücre içi taşınması, salgı yolları ve çeşitli sinyal moleküllerin araştırılmasında uygun bir işaret protein olarak kullanılmaktadır (Rodriguez ve ark., 2001). *Saccharomyces cerevisiae* invertazı bunlardan biridir (Öztop ve Hepokur, 2007). İnvertaz sukroz hidrolizinde kullanıldığında oluşan ürünler glukoz ve fruktozdur (Chen ve ark., 2008, Öztop ve Hepokur, 2007). Sukroz polarize ışık düzlemini sağa, hidroliz sonucu oluşan şeker karışımı ise polarize ışık düzlemini sola çevirir (Saldamlı, 2005). İnvertaz enziminin katalizlediği tepkimenin mekanizması Şekil 2.1`de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Sukrozun invertazla hidroliz tepkimesi (Guimaraes ve ark., 2007)

Endüstriyel uygulamalar arasında kolay kristallenen sukrozun invertaz hidroliziyle fruktoz ve glukozla dönüştürülmesi en önemli uygulamalardan biridir. Asit ile hidroliz edildiğinde de aynı ürün oluşur. Fakat invert şeker asit hidrolizi ile oluşturulduğunda elde edilen renkli ürün invertaz hidrolizi sonucu oluşan ürün ile karşılaştırıldığında, bu ürün renksiz olduğu için daha avantajlıdır (Emregül ve ark., 2005).

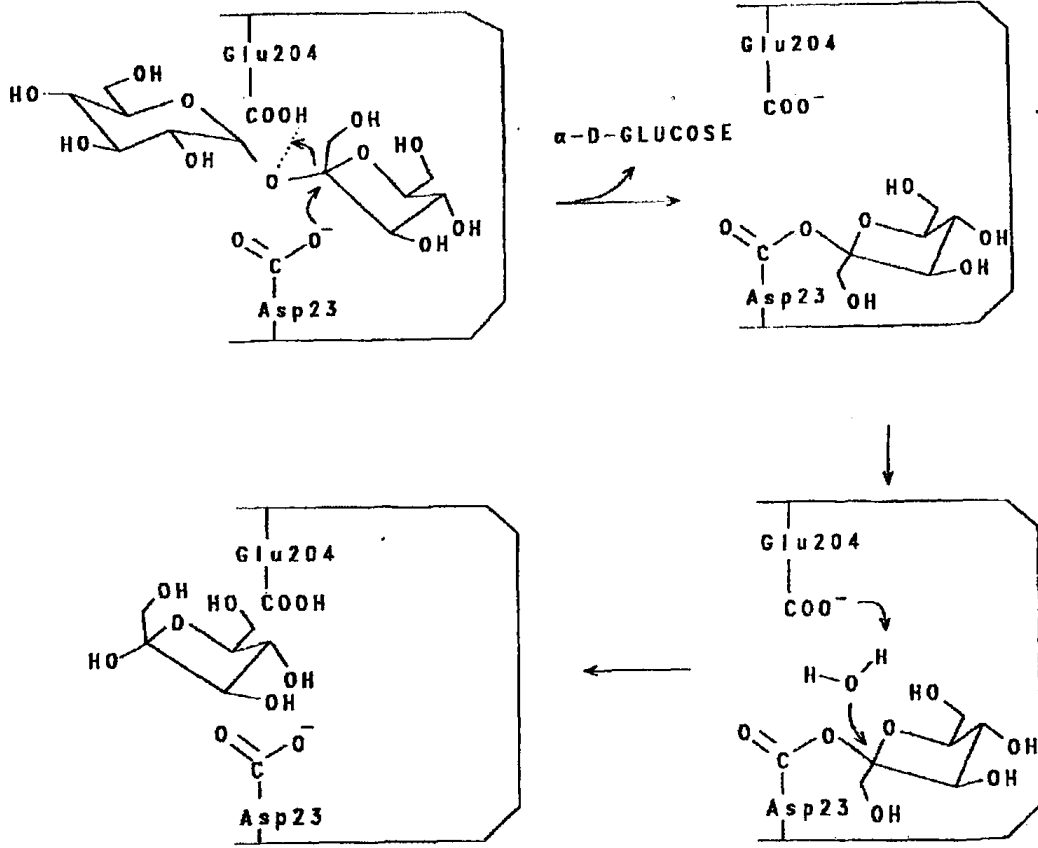
Sukrozun tatlılık derecesi 100 kabul edildiğinde invert şekeri oluşturan glukoz ve fruktozun tatlılık derecesi 70 ve 180`dir. Bu nedenle invert şeker eşdeğer miktardaki sukrozdan daha fazla tatlılık sağlar ve şekerli ürünlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılır (Saldamlı, 2005).

İnvert şeker yüksek derişimlerde sukroza göre daha az kristallenme özelliğine sahip olduğundan tatlı endüstrisinde, suni bal ve sıvı şekerin endüstriyel üretiminde de kullanılır. Ayrıca ürünlerin uzun süre taze ve yumuşak kalmasını sağlar (Işık ve ark., 2003).

İnvertaz enzimi temel biyosensör olarak kullanıldığında, ağır metal iyonlarının özellikle civanın saptanmasında kullanılır. İnvertaz bazı gıda fabrikalarında, temizleme aşamasında kullanılır. İnvertaz doğal olarak da bulunabilir. Böceklerin fenomenlerinde, nektarlarda, bal, polen, bitki, mantar ve bakterilerde bulunur (Öztop ve Hepokur, 2007).

2.1. İnvertaz Enziminin Çalışma Mekanizması

Asp-23, nükleofilik bir tepkime ile sukrozun fruktoz kısmıyla kovalent bir ara ürün oluşturur. Sukrozun glukoz kısmı ise Glu-204`ten bir proton alarak, glukoz olarak ayrılır. Daha sonra, su molekülünün nükleofilik tepkimesiyle fruktoz invertaz enziminden ayrılır. İnvertaz enziminin olası tepkime mekanizması Şekil 2.2`de gösterilmiştir (Reddy ve Maley, 1996).



Şekil 2.2. İvertaz enziminin çalışma mekanizması (Reddy ve Maley, 1996)

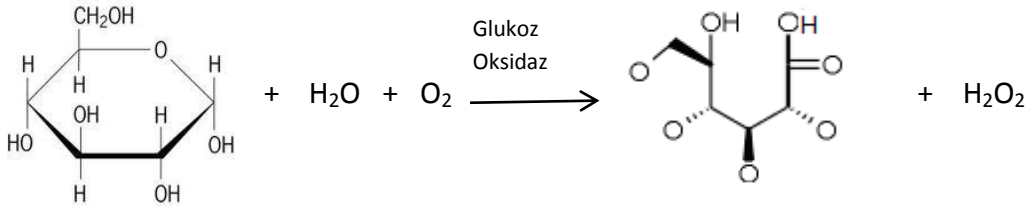
2.2. İvertaz Aktivite Analizi

İvertazın aktivitesi farklı yöntemler kullanılarak bulunmaktadır. Bu yöntemlerden biri sukroz hidrolizi sonucu oluşan glukozun spektrofotometrik olarak saptanmasıdır.

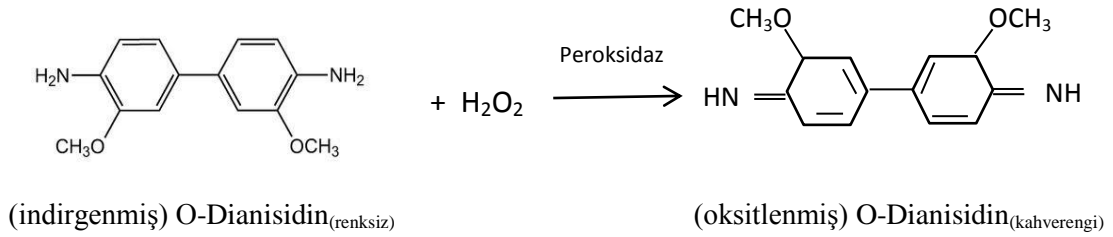
İvertaz ile sukroz hidrolizi için belli sıcaklık ve pH'ta dengeye getirilmiş sukroz çözeltisine eklenen enzim 5-15 dakika arasında inkübe edilir. Tepkimenin durdurulması için karışım kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilir. Bu zaman içinde Şekil 2.1'deki tepkimeye göre sukroz glukoz ve fruktoza dönüşür.

İvertazla sukroz hidrolizi sonucu oluşan glukozun spektrofotometrik analizi için kullanılan glukoz deney kiti (Sigma GAGO-20) çalışma yönteminde glukoz oksidaz, peroksidaz enzimleriyle o-dianisidin ve H_2SO_4 kullanılmaktadır.

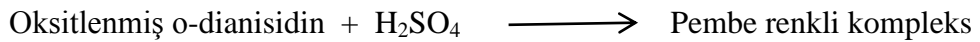
Glukoz, glukoz oksidaz enzimi ile glukonik asit ve H₂O₂'e çevrilir.



Hidrojen peroksit o-dianisidin ile peroksidaz varlığında tepkimeye girerek renkli ürün oluşturur.



Ortalama eklenen sülfürik asit oksitlenmiş o-dianisidin ile tepkimeye girerek kararlı pembe renkli kompleks oluşturur.



Tepkime sonucunda oluşan bu kompleksin soğurumu UV-VIS spektrofotometrede 540 nm'de okunur. Oluşan glukoz miktarının saptanması için Eşitlik 1 kullanılır (www.sigmaaldrich.com/catalog).

$$\text{Glukoz (mg)} = \frac{A_{540}(\text{örnek}) \times \text{standarttaki mg glukoz}}{A_{540}(\text{standart})} \quad (1)$$

Bulunan glukoz miktarından enzim aktivitesi dakikada hidrolizlenen mikromol sukroz olarak hesaplanır.

3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

İmmobilizasyonun anlamı enzimin katalitik aktivitesi korunurken katı taşıyıcılara bağlanması ya da belirli bir yere hapsedilmesidir. Enzim immobilizasyonu, temel araştırmalar ve ticari ilgilerin teknik süreçlerinde kullanılmak amacıyla uygulanmaktadır (Cirpan ve ark., 2002).

Biyokatalizörler, enzimler ve hücreler pH, sıcaklık, tuzlar, çözücüler, kendi kendini yok etme, inhibitörler ve zehirler gibi çevresel etkilerden korumak için matris içine sıklıkla immobilize edilir. İmmobilizasyon biyokatalizörün daha kolay kullanılmasına ve geri kazanılmasına olanak sağlar (Öztop ve ark. 2002). Enzimler endüstriyel amaçlar için büyük miktarlarda üretilmektedir. Enzim immobilizasyonunun başlıca avantajları şunlardır:

- ❖ Enzimin katalitik gücü büyük ölçüde kararlaştırılmış olur.
- ❖ Kolaylıkla tekrar tekrar kullanılabilir.
- ❖ Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilir.
- ❖ Sürekli üretim yapılabilir.
- ❖ Analiz süresi kısaldır.
- ❖ Üretim maliyeti düşer.

İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim, kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanır (Öztop ve Hepokur, 2007, Öztop ve Çetinus, 2003). Uygulamalarda immobilize enzimin başarısı kullanılan taşıyıcıların bu özelliklerine bağlıdır (Emregül ve ark., 2005, Kotwal ve Shankar, 2009). İmmobilize enzimin özelliği kullanılan taşıyıcının yapısına ve immobilizasyon yöntemine bağlı olmasına rağmen genellikle daha iyi termal ve pH kararlılığı gösterir (Manuel ve ark., 2010).

İmmobilize enzimin verimi hem bağlanma sırasında olan kayıplardan hem de enzim moleküllerinin gözeneklerden yavaş yavaş sızması ile azalır. Bu olaylar immobilizasyon verimini düşürür. Tepkime verimini artırmak için alınabilecek önlemler şunlardır:

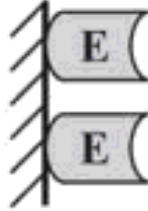
- Taşıyıcının tanecik boyutlarını düşürmek
- Yüksek özgül aktivitesi olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak
- Enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamak

Pek çok değişik doğal veya yapay matriksler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Öztop ve Hepokur, 2007). Enzim immobilizasyonu için kullanılan çeşitli yöntemler iki genel sınıfa ayrılabilir: Birincisi enzim ile kovalent bağların oluştuğu kimyasal yöntemler, ikincisi ise enzim ve destek arasında zayıf etkileşimlerin olduğu fiziksel yöntemlerdir (Öztop ve Çetinus, 1999.).

3.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

3.1.1. Adsorbsiyon

Bir enzimin bir katı üzerinde fiziksel adsorbsiyonu immobilize enzim hazırlamanın en basit yoludur. Yöntem katı destek ile enzimin derişik bir çözeltisinin karıştırılmasıyla, katı matriksin yüzeyi ve enzim proteini arasındaki özgöl olmayan fiziksel etkileşimlere dayanır (Şekil 3.1). Adsorbsiyonun başlıca avantajı genel olarak herhangi bir reaktan kullanımını gerektirmemesidir. Sonuç olarak adsorbsiyon ucuz, kolay uygulanan, kimyasal bağlanmaya göre enzimin daha az aktivite kaybını sağlayan bir yöntemdir. Çünkü bağlanma çoğunlukla hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleşir (Guisan, 2006).



Şekil 3.1. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon (Guisan, 2006)

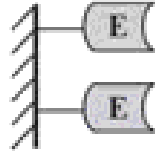
Adsorbsiyon ile enzim immobilizasyonu pH, sıcaklık, enzim-adsorban oranı ve iyon şiddeti koşullarına bağlıdır. Yöntemin en önemli dezavantajı destekten biyokatalizörün sızıntısıdır. Desorpsiyon birçok koşulda oluşabilir. Bazı zamanlar enzim kolaylıkla desorbe edilebilir. Sıcaklık, pH ve iyonik bağdaki çevresel değişiklikler desorpsiyona sebep olabilir. Akış hızı, kabarcık oluşması ve moleköl-molekül sürtünmesi gibi fiziksel faktörler desorpsiyona yol açabilir. Özgöl olmayan bağlanmada eğer substrat, ürün ve arta kalan kirlilikler destek ile etkileşirse sorunlar ortaya çıkabilir. V_{max} ve K_m parametrelerinin değişmesine yol açabilir. Ayrıca destek materyallerine protonların bağlanması optimum pH'ın 1-2 birim değişmesiyle sonuçlanabilir. Desteğe fazla yükleme olduğunda düşük katalitik aktiviteye yol açabilir.

Enzim molekülü ve destek arasındaki uygun alan yokluğunda sterik engele bağlı olarak sorunlar oluşabilir (Öztop ve Hepokur, 2007).

Adsorpsiyon yönteminde en çok kullanılan adsorbentler aktif karbon, silika jel, alümina, cam, nişasta, kil, concavalin A-Sefaroz, tanninaminoheksil selüloz, fenoksi asetil selülozdur (Guisan, 2006). Öztop ve ark.`nın yaptığı çalışmalarda poli(akrilamit)`i adsorbent olarak kullanmışlardır (Öztop ve ark., 2009, Öztop ve ark., 2010).

3.1.2. Kovalent Bağlanma

İmmobilizasyon çalışmalarının büyük kısmı enzimle katı bir destek matriks arasında kovalent bağ oluşturmaya yöneliktir (Şekil 3.2). Tepkime türü seçilirken, tepkimenin enzim aktivitesinde azalmaya sebep olmayacak ve enzimin aktif merkezi, kullanılan reaktanlar tarafından etkilenmeyecek şekilde çalışmaya uygun tepkimeler seçilmelidir (Guisan, 2006).



Şekil 3.2. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyon (Guisan, 2006)

Kovalent bağlanma yüksek kararlılığından dolayı en çok tercih edilen yöntemdir. Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller. Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısı ve işlevsel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır (Silva ve ark., 2009).

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkinleşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve tepkime sırasındaki özgül koşullara bağlıdır.

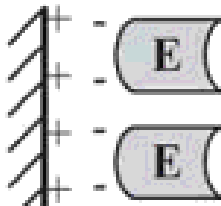
Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birincisi destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikincisi enzimin kovalent bağlanmasıdır. Destek maddesi hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi işlevsel grup taşımalıdır (Öztop ve Hepokur, 2007). Uygun şartlar altında proteinlerin kovalent bağ yapacak grupları şunlardır: Arjinin ve lizinin ϵ -amino ve α -amino grupları, aspartat ve glutamatın α -karboksil, β -karboksil ve γ -karboksil grupları, tirozinin fenol halkası, sisteinin tiol grubu, serin ve treoninin hidroksil grupları, histidinin imidazol grubu, triptofanın indol grubu (Guisan, 2006). İmmobilizasyon tepkimesinde taşıyıcıların içerdiği aktifleştiriciler olan diazonyum tuzu, asit azid, izosiyonat, imin, imido ester ve halojenürler gibi reaktif gruplar enzimlerin işlevsel grupları ile kovalent bağ oluştururlar. Kovalent bağlanma yöntemi enzimler için oldukça geniş olarak kullanılmasına rağmen, hücrenin immobilizasyonu için pek kullanılmamaktadır (Öztop ve Hepokur, 2007).

3.1.3. İyonik Bağlanma

Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması ile gerçekleşir. Bazı durumlarda iyonik bağlanma yanında fiziksel adsorbsiyon da etkili olabilmektedir.

İyonik bağlanma ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçılabilmektedir (Öztop ve Hepokur, 2007).

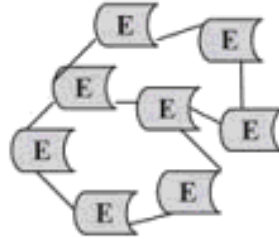
İyonik bağlanma yönteminde sıkça kullanılan adsorbentler katyon ve anyon değiştiriciler olarak ikiye ayrılmaktadır. Katyon değiştiriciler: CM-selüloz, dowex 50, amberlite CG-50. Anyon değiştiriciler: DEAE-selüloz, DEAE-sefadeks, amberlite IR-50 (Guisan, 2006).



Şekil 3.3. İyonik bağlanma yöntemi ile immobilizasyon (Guisan, 2006)

3.1.4. Çapraz Bağlanma

Enzim immobilizasyonu enzimlerin her birinin diğer bir enzim molekülüne (Şekil 3.3) ya da suda çözünmeyen bir matrisin fonksiyonel gruplarına moleküller arası çapraz bağlanmasıyla oluşur (Guisan, 2006).



Şekil 3.4. Enzim molekülleri arası çapraz bağlama (Guisan, 2006)

Çapraz bağlanma ile immobilizasyonda enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel işlevsel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken koşulların seçilmesi zordur. Bu yöntemin avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki veya çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir (Öztop ve Hepokur, 2007). Fakat bu yöntemde enzimlerin çapraz bağlanmasında bir kısım enzim moleküllerinin destek maddesi gibi davrandığından tepkimenin kontrolü zordur. Ayrıca tepkime düşük aktiviteyle sonuçlanır. Genel olarak çapraz bağlanmanın en iyi kullanımı diğer bir yöntem ile birlikte kullanılmasıdır. Yaygın olarak immobilize edilen enzimlerin kararlılığını sağlamada kullanılır.

Çapraz bağlama reaktanlarına örnek olarak glutaraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterohalkalı halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinler verilebilir (Guisan, 2006).

3.1.5. Hapsetme

Enzimlerin polimer jellerin kafesleri ve yarı geçirgen zarlar içine hapsetme yöntemleri olarak ikiye ayrılır ve Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Hapsetme Yöntemleri (Guisan, 2006)

3.1.5.1. Jel İçine Hapsetme

Bu yöntem düşük mol kütleli substrat ve tepkime ürünlerinin serbest difüzyonuna olanak sağlamaktadır; dolayısıyla büyük mol kütleli substrat ve ürün durumunda uygun değildir. Genel yöntem enzimin hidrofilik bir matrisin sulu bir çözeltide polimerizasyonu sırasında enzimin hapsedilmesidir. Enzim ve polimer matris arasında hiçbir bağ yoktur (Guisan, 2006). En çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Polimerleşme oluştuğunda, enzim molekülleri, çapraz bağlar arasında hapsedilmekte ve çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Çapraz bağ yüzdesi, enzim moleküllerinin hapsedilebileceği ve substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşabileceği oranda ayarlanmalıdır. Bu yöntem basit olduğundan ve çok az bir enzimle gerçekleştirilebildiğinden avantajlıdır (Öztop ve Hepokur, 2007).

3.1.5.2. Mikrokapsülleme

Mikrokapsülleme enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde hapsedilmesidir. Büyük proteinler ya da enzimler kapsülün içine geçemez, küçük substratlar ve ürünler yarı geçirgen zardan kolayca geçebilir. Birçok materyal 10-100 µm çapında çeşitli mikrokapsülleri oluşturmak için kullanılır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır. Yüzey-hacim oranının büyük olması, mikrokapsül içinde oluşan enzim substrat tepkimesini artırır. Mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein derişimine gerek olması ve yüksek mol kütleli substrat ve ürünler için sınırlı olması yöntemin dezavantajıdır (Öztop ve Hepokur, 2007).

3.2. İmmobilizasyonun Avantajları

Biyotıp, biyoteknoloji ve besin endüstrisi alanlarında enzimlerin uygulamaları her zaman uygun ve optimal değildir. Bu nedenle enzimler termal kararlılıklarını, geri kazanımlarını ve kullanım kararlılıklarını artırmak için immobilize edilirler (Öztop ve Çetinus, 2003).

İmmobilize enzimler katalizörler gibi kimyasal kullanımda büyük bir potansiyele sahiptir. Biyobozunur olması, düşük sıcaklıkta yüksek katalitik etki göstermesi ve özgülüğünden dolayı klasik katalizörlere göre avantajlıdır. İmmobilize enzim kullanımı tekrar kullanılabilirliği ve tepkime karışımlarından kolayca ayrılabilirdiği gibi üretim maliyetini de düşürür (Vujcic ve ark, 2010). Ayrıca Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum tepkime hızı (V_{max}) kullanılan taşıyıcının yapısına ve immobilizasyon yöntemine bağlı olmasına rağmen immobilize enzim daha iyi termal ve pH kararlılığı göstermektedir (Manuel ve ark., 2010).

Deneysel uygulamalar için bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimler, endüstriyel uygulamalar için mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Çünkü enzimlerin mikrobiyolojik kaynaklardan üretimi, bitki ve hayvanlardan elde edilmesinden daha düşük maliyetli, üretim zamanı daha kısa ve geniş aralıkta üretim yapılabilir. Mikrobiyolojik hücrelerden enzimlerin saflaştırılması yerine hücrenin immobilize edilmesi daha avantajlıdır. Sebepleri:

- Hücre içinde mevcut olan enzimler gerekli metabolik yollarda organize edilirler.
- Doğal hücrenin yeniden oluşumuyla kullanım kararlılığı artar.
- Hücre materyali saflaştırılmış enzimlerden daha ucuz ve daha bol miktarlarda bulunur.
- Enzim özütleme veya saflaştırma işlemine gerek kalmaz.
- Enzimin aktivitesi için gerekli koenzimler ve kofaktörler mevcut olup yeniden oluşma tepkimeleri hücrede mevcut metabolik yöntemlerle gerçekleştirilir.
- Enzim kararlılığı genellikle artar (Öztop ve Hepokur, 2007).

4. KOMPOZİTLER

İki veya daha fazla malzemenin, iyi özelliklerini bir araya getirmek ya da ortaya yeni bir özellik çıkarmak için, mikro veya makro seviyede heterojen karışımıyla oluşan malzemeye kompozit denir. Kompozit yapı oluşumuyla geliştirilmesi istenen özellikler şöyle sıralanabilir:

- ❖ Korozyon dayanımı
- ❖ Yüksek sıcaklık özellikleri
- ❖ Elektrik iletkenliği
- ❖ Isıl iletkenlik
- ❖ Kütle
- ❖ Fiyat
- ❖ Estetik görünüm

Kompozit malzemeler reçine (matris) ve takviye bileşenlerinden oluşur. Kompozitler temel olarak kalıp görevi gören reçine içine gömülmüş sürekli veya kırılmış elyaflardan oluşmaktadır. Bu bileşenler birbirleri içinde çözülmezler veya karışmazlar. Kompozit malzemelerde elyaf sertlik, sağlamlık gibi yapısal özellikleri, plastik reçine malzemesi ise elyafın yapısal bütünlüğü oluşturması için birbirine bağlanması, yükün elyaf arasında dağılmasını ve elyafın kimyasal etkilerden ve atmosfer şartlarından korunmasını sağlar. Kompozit malzemeyi oluşturan matris (takviyelendirilen malzeme) ve takviyeleyici malzeme olarak iki ana madde vardır. Bu yapı elemanlarının türleri Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir (Anbarasan ve ark., 2010).

Çizelge 4.1 Kompozit malzemeyi oluşturan matriks ve takviye malzemeleri
(Şahin, 2000)

Matris Malzemeler	Takviye Elemanları	Kompozit Yapının Şekli
Polimerler	Lifler	Tabakalar
Metaller	Kil-Kristal	Film-Folye
Seramikler	Pudra	Bal Peteği
	Yonga	Flament Sarılmış Yapılar
	Granül	Kaplamalar

Metal kompozitler (metal matrisli birleşik malzemeler; MMC); bir metalik faz ve bazı takviye malzemelerinden eritme, vakum emdirme, sıcak presleme ve difüzyon kaynağı gibi ileri yöntemler uygulanmasıyla elde edilirler. MMC`ler daha çok uzay ve havacılık alanlarında kullanılır.

Seramik kompozitler (seramik matrisli birleşik malzemeler; CMC); yapısal ve işlevsel nitelikli ileri teknoloji seramikleri içerirler. Başlıcaları Al_2O_3 , SiC, Si_3N_4 , B_4C , TiC`dir. Bu bileşikler değişik yapılarda olup amaca göre bir ya da bir kaçı beraber kullanılarak CMC`ler elde edilir. Sandviç zırhlar, çeşitli askeri amaçlı parçalar yapımı uzay araçları bu ürünlerin başlıca kullanım yerleridir.

Polimer kompozitler; endüstride çok geniş kullanım alanına sahiptir. Pekiştirici olarak cam ve karbon kullanılır. Polimer kompozitlerde kullanılan en önemli bağlayıcı malzeme polyester ve epoksidir. Pekiştirici liflerin miktarı arttıkça kompozitin dayanıklılığı yükselir. Polimer kompozitlerin en önemli özellikleri yüksek dayanıklılığı ve elastikliğidir (Öztop ve Hepokur, 2007).

5. HİDROJELLER

Polimerler, çok sayıda aynı ya da farklı atomik grupların kimyasal bağlarla az veya çok düzenli biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli yüksek mol kütleli bileşiklerdir. Polimerler, hidrofilik ve hidrofobik olarak iki gruba ayrılırlar (Öztop ve Hepokur, 2007). Büyük miktarda su tutma yeteneğine sahip, üç boyutlu, çapraz bağlı ve biyomühendislik, biyotıp, gıda endüstrisi, haberleşme teknolojisi, inşaat endüstrisi, kromotografî, su saflaştırma, ayırma işlemleri ve tarımda uygulama alanlarına sahip polimerler süperabsorbent veya hidrojel olarak tanımlanır (Karadağ ve ark., 2004). Hidrojeller, çözülmeden su tutma yeteneğine sahip olduğundan biyoaktif bileşiklerin immobilizasyonunda tercih edilmektedir (Saraydın ve ark., 2001). Biyomoleküller ve hücreler çeşitli yöntemlerin kullanılmasıyla farklı destekler üzerine ya da içine immobilize edilebilirler. İmmobilize edilen moleküller ve hücreler biyolojik aktivitelerini uzun süre tutmak için daha uygundur (Karadağ ve ark., 1994).

Hidrojeller pH, sıcaklık, iyonik güç gibi çevresel değişimlerden etkilenebilirler. Doku mühendisliği, yapay kas, algılama sistemleri gibi uygulamalarda bu değişimler oldukça önemlidir (Bajpai ve Singh, 2005). Ayrıca hidrojeller kontak lens ve yapay kornea gibi tıp alanlarında da kullanılmaktadır (Saraydın ve ark., 2005).

Hidrojellerin fiziksel ve kimyasal özellikleri hangi monomerlerden ve polimerlerden oluşturulduğuna bağlıdır. Jelatin, polisakkaridaz, çapraz bağlı polimer, polielektrot bileşikler içeren çeşitli kimyasal maddelerden oluşabilir (Karadağ ve ark., 1994).

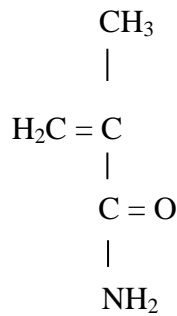
Fiziksel ve kimyasal yapılarına bağlı olarak nötral, iyonik ve iç içe geçmiş ağ yapılar olmak üzere üç tip hidrojel vardır. Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincir ya da dallarında hidroksil, karbonil, karboksil, amin, amid ve sülfonil gibi hidrojen bağı oluşturabilme özelliğine sahip su sever grupların bulunması gerekir. Bu gruplardan dolayı bağlı duruma geçen su nedeniyle jelin hacmi ve kütlesi artar, jel şişmeye başlar. Jeldeki su sever grupların artması ile jelin şişmeside artar. Şişmiş bir hidrojelde üç tür su bulunmaktadır. Polimerin polar grupları ile hidrojen bağları yapan bağlı sudur. Polimerin su sevmez grubu çevresinde toplanan ve sıkıca bağlı olmayan su ara yüzey suyudur. Bir bağ olmaksızın fiziksel olarak gözenek içinde yer alan su serbest sudur (Öztop ve Hepokur, 2007).

6. METAKRİLAMİT

Gelişen yeni polimer sentez yöntemleri sayesinde her gün yeni polimerler elde edilmektedir. Fonksiyonel gruplar, temel polimer zincirine, doğal özelliklerinden oldukça farklı özel bir karakter kazandırır; dolayısıyla substituentlerin bulunduğu pozisyonların çeşitliliğine bağlı olarak sentezlenen monomerlerin, monomer reaktivite oranları, camsı geçiş sıcaklıkları, antimikrobiyal özellikleri gibi karakteristik özelliklerine oldukça çeşitlilik kazandırır (Vogl, 1996).

Poliamitler önemli kondenzasyon polimerlerinden biridir. proteinlerde tekrar edilen birimlerin α -amino asitlerden geldiğini ve amino asitlerinde tekrar eden polimer zinciri bulunduğundan, poliamitlerin en önemli proteinler olduğu söylenebilir (Solomons ve Frhyle, 2002). Poliakrilamitler, amorf ve suda çözünebilir oldukları için endüstri ve ziraatta çokça kullanılırlar. Bu nedenle kataliz, polimer karışımları ve biyomedikal gibi temel çalışmalarda oldukça ilgi çekmektedirler. Sulu süspansiyonlarda katıları pıhtılastırma özelliğine dayanılarak kağıt endustrisinde, sulu proseslerde, madencilikte kullanılırlar.

Fonksiyonel bir monomer olan metakrilamit monomerleri ve polimerleri organik polimer sentezinde önemli bir yere sahiptir. Radikalik N-monosubstitue metakrilamit monomerleri ve kopolimerleri laboratuvarlarda çokça sentezlenen maddelerdendir. Metakrilamitin kimyasal yapısı Şekil 6.1`de gösterilmiştir.



Şekil 6.1. Metakrilamitin genel yapısı

Polimetakrilamit türevleri biyomedikal gibi çeşitli uygulamalarda suda çözünen polimerler olarak bilinirler. Ayrıca N-(2-hidroksipropil)metakrilamit (HPMA) kopolimerleri antikanser ilaç yapımında kullanılırlar (Wang ve ark., 2007). Metakrilamitler ve bunların N-monosubstitue türevleri asidik amit protonlarından dolayı

yalnızca radikalik metotla polimerize edilebilirler. Biyokimyasal uygunluğu sayesinde biyomedikalde polimerlerin kullanımı ile metakrilamit ve akrilamit türevleri büyük bir ilgi görmüştür (Jhon ve ark., 1997).

Bazı metakrilamit polimerleri ilaç yapımında kullanılmış ayrıca safra asidi gibi doğal bileşikler de yeni polimerlerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Son zamanlarda safra asit türevleri ile hazırlanan ısı hassasiyetli kopolimerler çok sayıda makalede yer almıştır. Son yıllarda her alanda kullanılmaya başlanan metakrilamitlerden ilaç endüstrisi, inşaat, sanayi, biyosensör yapımı ve tıbbi malzeme yapımı gibi birçok alanda yararlanılmaktadır. Bu amaçla bu polimerlerin özellikleri her geçen gün daha da iyileştirilip geliştirilmektedir (Avoce ve ark., 2003).

6.1. Metakrilamit İle Yapılan Çalışmalar

Metakrilamitle ilgili çok fazla çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bir kaçını aşağıda verilmiştir:

Paleologos E.K. ve Kontominas M.G.. Akrilamit ve metakrilamitin UV ve sıvı kromatografisindeki yüksek performanslarını belirlemişlerdir (Paleologos ve Kontominas, 2005).

V.D. Athawale ve ark. agar üzerine metakrilamitin serbest radikal kopolimerleşmesini incelemişlerdir (Athawale ve Padwaldeşai, 1998).

Jun Nie ve ark. olası bir, diş kaplaması gibi N-izopropil, N-metakriloksietil metakrilamit'i sentezleyip, karakterizasyonunu incelemişlerdir (Nie ve ark., 2000).

7. KİL

Killer tabakalı yapıya sahip, bol bulunan, ucuz ve doğal minerallerdir (Ekici ve ark., 2006). Mineroloji kaynaklarında üç farklı kil tanımı yapılmaktadır. Bunlar:

- Yarıçapı 1/256 mm`den daha küçük olan minerallerin kesri,
- Kil boyutunda olan sediment parçacıklarının tümü,
- Filosilikat grubunu içeren minerallerdir.

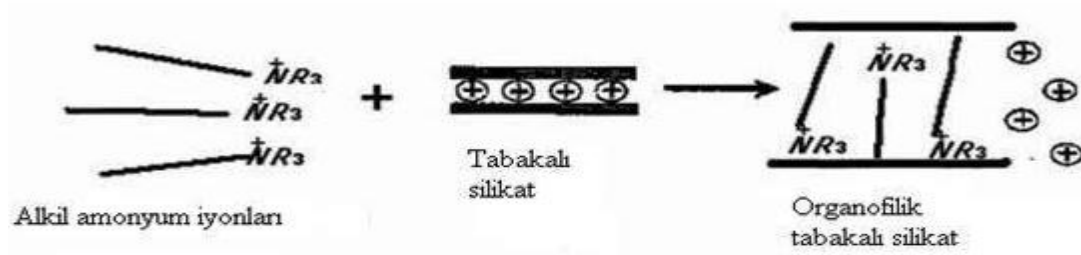
Killer doğada bol bulunmasına rağmen saf kil bulmak oldukça zordur. Kilin içerisinde en çok kalker, silis, mika ve demir oksit bulunur. Genellikle 0,002 mm`den daha küçük taneli malzemeye kil denilmektedir. Kil sarımsı, kırmızımsı ve esmer olabilir. Bu özelliğini bileşiminde bulunan yanıcı maddeler verir. Kilin su çekme özelliğinden dolayı her zaman nemlidir. Kil çok saf olduğu zaman hidrate alümin silikat (kaolinit) adını alır. Ve kaolinitin kimyasal formülü, $Al_2O_3 \cdot SiO_2 \cdot 2H_2O$ `dur (Öztop ve Hepokur, 2007).

Kil mineralleri T_2O_5 (T=Si, Al, Fe^{+3} vb.) bileşiminde iki boyutlu sürekli tetrahedral tabakalar içerirler. Tetrahedronlar paylaşılamayan köşeleri tabaka dışına yönelmek üzere üç köşesini kendi aralarında paylaşarak tetrahedral tabakaları oluşturur. Tetrahedral birim, içerisinde oktahedronların oluşturduğu oktahedral tabakalara ve katyonlara bağlıdır. İki türlü oktahedral tabaka bulunup, oktahedronların hepsinde veya üçte ikisinde katyon bulunmasına göre trioktahedral ve dioktahedral adını alır (Küçükçelebi ve ark., 2000).

Killer, su ile karıştırıldıklarında plastik ve daha fazla su ilavesinde kolloid özellik kazanırlar. Bu özellikleri onların mekanik ya da döküm yolu ile kalıcı bir şekil verilmesini sağlar. Pişirilen killer ise sert ve dayanıklı ürünler meydana getirirler. Sulu veya diğer çözeltilerdeki kolloid killer, bazı organik maddeleri ve katyonları absorbe eder.

Kil tabakaları hidrofilik, çoğu polimer ise hidrofobiktir. Polimer ve kilin etkileşimini artırmak için; kil inorganik katyonların iyon değişimi ile organofilik olana kadar modifiye edilir. Genellikle uzun zincirlerin sonunda bulunan amonyum kullanılır. Şekil 7.1`de iyon değişimi ile silikat tabakaları arasında amonyum iyonlarının etkileşimi görülmektedir. Bu modifikasyondan sonra kil, organo kil olarak adlandırılır. Modifiye

kil daha fazla organofiliktir. Yüzey enerjisi daha düşüktür ve organik polimerler için daha uygundur (Zheng, 2005).



Şekil 7.1. Kilin iyon değişim işlemi (Zheng, 2005)

Alkil amonyum iyonları; tabakalar arasında yerleşmiş iyonlarla çok kolay yer değiştirdikleri için yaygın olarak kullanılırlar. Alkil amonyum iyonlarının tabakalar arasında farklı yapılar oluşturması, kil tabakasının yük yoğunluğuna bağlıdır. Amonyum iyonlarının, silikat tabakaları arasında elektrostatik etkileşimi düşürmesinden dolayı polimerin içinde dağılımı kolaylaşır (Zheng, 2005).

Killer ucuz ve kolay bulunabildiğinden dolayı kullanımı fazladır. Üzerlerinde negatif yük taşıdıklarından pozitif yüklü türleri kolayca adsorplayabilirler. Bu adsorplama kilin yüzey alanı ve gözeneklerin büyüklüğüne bağlıdır (Öztop ve Hepokur, 2007). Tekstil ve boya sanayisinde bilinen iyi adsorbanlardır. Çoğu kil mineralleri organik ve inorganik molekülleri adsorplayabilmektedir (Ekici ve ark., 2006).

7.1. Sepiyolit

Killer tabaka yapılarındaki farklılıktan dolayı sınıflandırılabilirler. Bunlar montmorillonit, kaolinit, bentonit ve sepiyolittir (Öztop ve Hepokur, 2007). Sepiyolit, paligorskit-sepiyolit grubuna ait, magnezyum hidrosilikattan ibaret bir kil minarelidir. Sepiyolit kimyasal formülü $Mg_8Si_{12}O_{30}(OH)_4(H_2O)_4 \cdot 8H_2O$ şeklindedir (Giustetto ve ark., 2011).

Sepiyolit, doğada saf, kil ya da kil dışı minerallerle (özellikle dolomit) karışık halde bulunabilir. Gözenekli olanları suda yüzdüğünden denizköpüğü olarakta bilinir (Sarıtaş ve Arık, 1996). Doğada iki değişik yapıda çökelmektedir. Bunlardan birincisi; amorf, kompakt halde ve masif yumrular şeklinde olan ve lületaşı adı ile bilinen α -

sepiyolit, ikincisi ise; küçük, yassı ve yuvarlak partiküller veya amorf agregalar halinde oluşan β -sepiyolit'tir (Tekin, 2004).

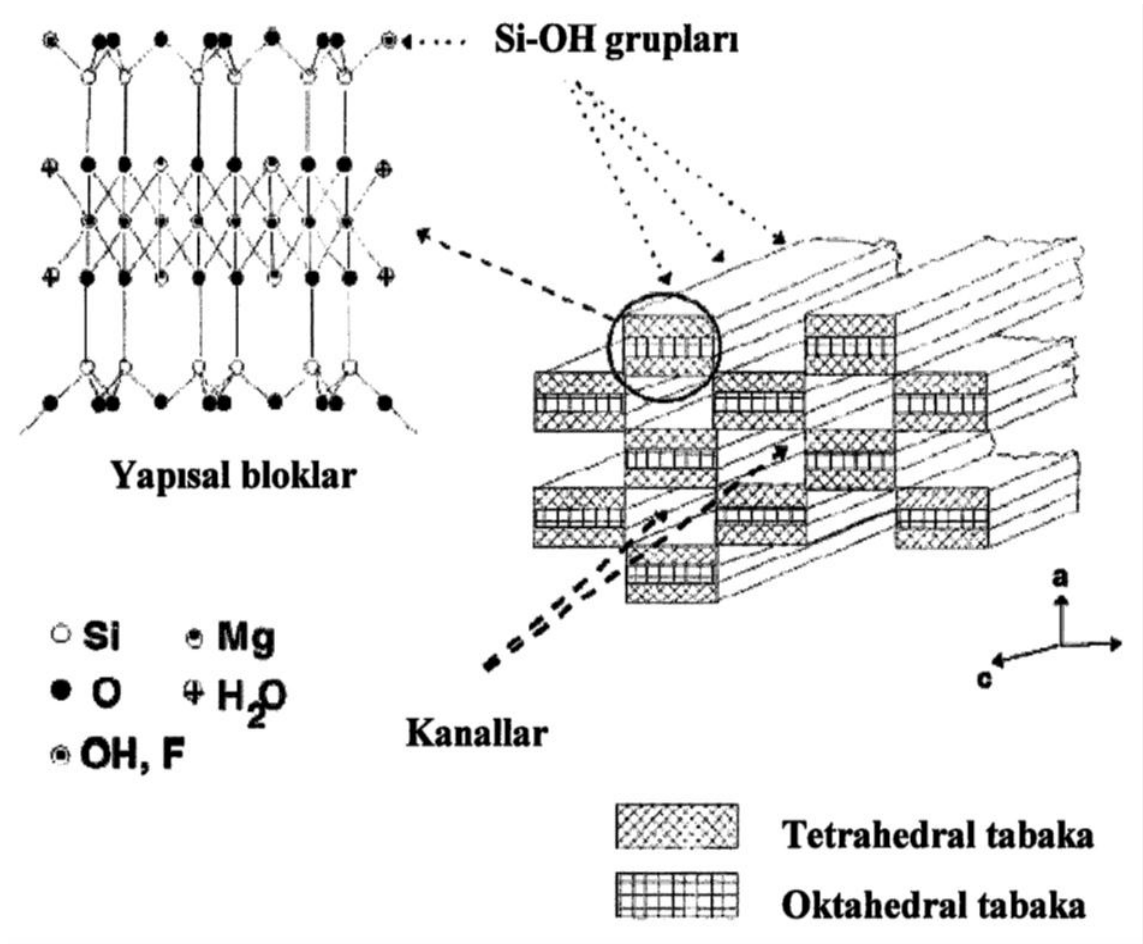
Sepiyolit geniş yüzey alanıyla ($340 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ civarı) açık bir yapıya ve boşlukların varlığından dolayı geniş bir hacme ($0,44 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) sahiptir (Öztop ve Hepokur, 2007). Sepiyolit yüksek yüzey aktivitesi, gözenekli ve geniş yüzey alanı olduğundan organik türler için de etkili bir adsorbandır (Sarıtaş ve Arık, 1996, Bingöl ve ark., 2010). Aralıklı oktahedral tabakalar ve T_2O_5 (T= Si, Al) birleşimiyle aralıksız iki boyutlu tetrahedral tabakalardan oluşmuştur. Yapı içinde iç kanal oluşumu oktahedral tabakada aralıklı olmasına neden olur, bu da yüksek adsorplama kapasitesini gösterir (Ekici ve ark., 2006). Sepiyolitın dış yüzey alanı ve gözenek alanı olmak üzere toplam yüzey alanı yaklaşık $550 - 700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ kadardır. Yüzey alanının bu derece fazla olması sepiyolitın indirgenme ve nitrülenme hızını önemli ölçüde artırmaktadır (Öztop ve Hepokur, 2007). Sepiyolit kimyasal bileşim ve renk durumuna göre kahverengi, bej ve beyaz olmak üzere üç çeşittir. Kahverengi sepiyolitler yaklaşık % 50-90 arası sepiyolit içerirken sepiyolitın dışındaki yapıyı dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) oluşturmaktadır. Bej ve beyaz sepiyolitlerin kahverengi sepiyolite göre sepiyolit miktarı azalırken dolomit miktarı artmaktadır. Her üç sepiyolit çeşidi içinde endüstriyel önemi fazla olan sepiyolit kahverengi sepiyolittir.

Ticari öneme sahip başlıca sepiyolit yatakları Nevada- ABD, Vallecas Vicalvaro- İspanya, Hunan- Çin, Eskişehir- Türkiye`de bulunmaktadır. Eskişehir yakınlarındaki sepiyolit rezervleri Çizelge 7.1`de gösterilmiştir (<http://www.maden.org.tr>).

Çizelge 7.1. Eskişehir yakınlarındaki Bazı Bölgelerin Sepiyolit Rezervleri
(<http://www.maden.org.tr>)

BÖLGE	REZERV (ton)
Yörükçayır	4.680.000
Kereztepe	3.200.000
Çerkezkireç	32.000.000
Söğütlük	16.800.000
TOPLAM	56.680.000

Sepiyolit, taban oksijen düzlemlerinden aşağı ve yukarı yönlerde düzenlenmiş Si-O tetrahedronları ile oktahedral tabakalardan oluşan bir kristal yapıya sahiptir. Burada tepe oksijenleri aynı yönde olan tetrahedronlar, X- kesenine paralel olarak uzanan şeritleri oluştururken, zıt yönde olanları da oktahedral katyonlara bağlanarak lif doğrultusunda (X-ekseni boyunca) sürekli, dik doğrultuda (Y-ekseni boyunca) sınırlı boyutta 2:1 katmanlı yapı oluştururlar. Şeritlerin sepiyolitte üç, paligorskite ise iki piroksen zincirinin birbirine bağlanmasıyla oluşan genişlikleri vardır. Şeritler arasındaki dikdörtgen kanallarda, Ca ve Mg iyonları ile değişen miktarlarda zeolitik su bulunur. Yapı formülünde H₂O olarak gösterilen su molekülleri ise şerit kenarlarındaki oktahedral Mg`a koordine olurlar. Sepiyolit kristal yapısı Şekil 7.2`de gösterilmiştir (Giustetto ve ark., 2011).



Şekil 7.2. Sepiyolit kristalinin yapısı (Alkan ve ark., 2006)

Farklı konumlarda olmak üzere sepiyolit yapılarında dört çeşit su molekülü tanımlanmıştır. Bunlar:

- I. Higroskopik su (kaba nem): Sepiyolit yüzeyine adsorplanmış su molekülü.
- II. Zeolitik su: Kendi aralarında ve bağıl su molekülleri ile hidrojen bağı yaparak kanal içlerinde veya yüzeyde yerleşmiş su molekülü.
- III. Bağıl su (kristal suyu): Talk benzeri zincirlerin kenarlarında bulunan ve yapıdaki oktahedral tabakanın uç magnezyum koordinasyonunda yer alan su molekülü
- IV. Hidroksil suyu (yapı suyu): Yapıdaki oktahedral tabakanın ortasında magnezyum koordinasyonunda hidroksil gruplarının bozunması sonucu oluşan su molekülü (Ekici ve ark., 2006)

Kil minerallerinin iç yapıları ve kimyasal bileşimlerinden yararlanılarak yapılan sınıflamaya göre sepiyolit kristal yapılarının zincir yapılı olan gruba aittir. Zincir yapısına sahip minerallerin kristal yapılarında üç tür aktif soğurma merkezi bulunmaktadır. Bunlar:

- Tetrahedral silika tabakasındaki oksijen atomları. Bu minerallerin tetrahedral tabakalarındaki düşük izomorf değişim derecelerinden dolayı oksijen atomları zayıf elektron taşıyıcısıdır ve bunların adsorbe türlerle etkileşimi de zayıf olacaktır.
- Yapıdaki zincirlerin kenarları da magnezyum iyonları ile koordine olmuş su molekülleri (her Mg^{+2} iyonu için iki H_2O molekülü). Bunlar, sorplanan türlerle hidrojen bağları oluşturabilir.
- Lif ekseni boyunca uzanan Si-OH gruplarıdır.

Bunlar tetrahedral tabakanın dış yüzeylerinde Si-O-Si bağlarının kırılması sonucu oluşurlar. Kırılmadan oluşan artık yük, bir proton veya bir hidroksil molekülü ile bağlanarak yükünü nötrleştirir. Bu gruplar, lif ekseni boyunca 5 Å aralıklarla dizilim gösterir ve bunların sıklığı, kristalin doğal yapısı ile liflerin boyutları ile ilişkilidir. Bu Si-OH grupları, sepiyolit dış yüzeyinde adsorplanan moleküllerle etkileşime girebilir ve belirli organik reaktifler ile kovalent bağ oluőturma yeteneğine sahiptir (Alvarez, 1984).

7.1.1. Sepiyolit Kullanım Alanları

Sepiyolit, katalitik ve reolojik özelliklerinden ve aynı zamanda geniş adsorpsiyon kapasitesinden dolayı yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Sepiyoliti soğurma özellikleri beyazlatıcı bir madde, süzme yardımcı dolgu maddesi, endüstriyel adsorbent ve pestisitleri tutması nedeniyle değerli kılarken reolojik özelliklerin asfalt kaplamalarında, çeşitli kozmetik ürünlerin, boyaların ve gübrelerin imalatında değerli kılmaktadır. Katalitik özellikleri ise sepiyoliti, katalizör taşıyıcı olması nedeni ile önemli kılmaktadır. Sepiyolitin çeşitli kullanım alanları Çizelge 7.2.'de verilmiştir (Alvarez, 1984).

Sepiyolit kendi kütlesinin %250 si kadar su tutabildiğinden adsorplama uygulamalarında kullanılır (Giustetto ve ark., 2011). Ayrıca yüksek oranda nem ve organik buharı emme kapasitesine sahiptir. Başlangıçta adsorpsiyon hızı, silika jel ya da aktif alüminaya göre düşük olmasına rağmen hekzan, benzen ve metil alkol gibi organik sıvıları çok daha yüksek kapasitede adsorplayabilir (Öztop ve Hepokur, 2007).

Çizelge 7.2. Sepiyolitin kullanım alanları (Alvarez, 1984)

Soğurma Özellikleri	Deterjan ve temizlik maddelerinde
	Renk giderici madde
	Deodarant etkili kağıt ve karbonsuz kopya kağıdı yapımında
	Hayvan altlığı
	Sigara filtrelerinde
Reolojik Özellikler	İlaç sanayinde
	Tarım ve böcek ilaçları taşıyıcısı
	Sondaj çamuru olarak
	Gres kalınlaştırıcı olarak
	Boyalarda
	Poliesterlerde
	Kozmetiklerde
Katalitik Uygulamalar	Tarımda Besicilikte
	Kauçuk sanayinde
Diğer Uygulamalar	Plastisollerde
	Asfalt kaplamalarında
	Katalizör taşıyıcısı olarak
	Seramik Üretiminde
Diğer Uygulamalar	Fren balatalarında asbest yerine
	Biyoreaktörlerde
	Kaplanmış ark-kaynak elektronlarında

8. KOMPOZİT HİDROJELLERİN KARAKTERİZASYONU

Kompozit hidrojeller hazırlandıktan sonra özelliklerini araştırmak için çalışmalar yapılır. Çünkü hazırlanan kompozit malzemeler kendisini oluşturan bileşenlerden birinin tek başına sahip olamadığı özelliklere sahiptir.

Kompozit hidrojellerin karakterizasyonu için en temel yöntemler spektroskopik ve ısıl özelliklerinin tanımlanmasına yönelik yöntemlerdir. Bu yöntemler ile birlikte şişme özellikleri, difüzyon türü ve difüzyon mekanizması araştırılmalıdır.

8.1. Spektroskopik Özellikler

Kompozit hidrojellerin karakterizasyonunda kullanılan spektroskopik yöntemlerden biri infrared (IR) spektroskopisidir. Günümüzde düşük derişimlerdeki örneklerle çalışan, en zayıf soğurumları da duyarlılıkla ölçebilen Fourier dönüşümlü IR spektrofotometreleri (FTIR) kullanılmaktadır (Öztop ve Hepokur, 2007).

8.2. Isıl Özellikler

Kompozit hidrojellerin ısıl kararlılıklarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi termogravimetrik (TG) analizidir. Polimerler ısıtıldıklarında fiziksel ve kimyasal değişikliklere uğrarlar. Isıl bozunma sırasında oluşan uçucu ürünler nedeniyle ortaya çıkan kütle kaybı termogravimetri ile incelenir. Kütle kaybı zamanın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kaydedilir (Öztop ve Hepokur, 2007).

8.3. Şişme Davranışı ve Difüzyon Türü

Çapraz bağlı ağ yapılı polimerler olan hidrojeller uygun çözücü ortamına konduktan sonra çözücünün yapıya girmesi ile şişerler. Kompozit hidrojellerin karakterizasyonunda şişme kinetiğinin incelenmesi difüzyon türü ve mekanizmasının aydınlatılmasında önemlidir. Polimerik yapıların şişme kinetiği ve difüzyon türünün açıklanmasında kullanılan en temel yasalar Fick yasalarıdır. Polimerlerin şişme kinetiği:

$$F = kt^n \quad (2)$$

eşitliği ile incelenmektedir. Bu eşitlikte F: jelin t anında aldığı çözücü miktarının dengede alınan çözücü miktarına oranı, k: jelin ağ yapısına bağlı olarak değişen bir sabit, n: çözücünün difüzyon türünü gösteren difüzyon üstelidir ve şişme kesri olarak tanımlanır.

Polimerlerde çözücünün difüzyon hızı ve çözücü sisteminin durulma hızı şişmeyi denetleyen iki önemli parametrelerdir. Difüzyon türü ve mekanizması bu parametrelere bağlı olarak aşağıdaki sınıflandırmaya göre yapılır;

1. Fick tipi difüzyon (Durum 1): Durulma hızının difüzyon hızından daha büyük olduğu ve denge şişme değerine kısa sürede ulaşıldığı difüzyon türüdür (Singh ve ark., 2007). Bu durumdaki şişme difüzyon ile denetlenir ve polimerik yapıya giren veya yapıdan çıkan türün miktarı zamanın karekökü ile orantılı olarak artar ($n=0,5$).
2. Süper durum (Durum 2): Difüzyon hızının durulma hızından daha büyük olduğu difüzyon türüdür ($n=1$).
3. Fick tipi olmayan ya da anormal tip difüzyon (Durum 3): Şişme üzerinde difüzyon ve durulmanın aynı anda etkin olduğu difüzyon türüdür ($0,5 < n < 1$).

Difüzyon türünün belirlenmesi için n parametresinin bilinmesi gerekir. Difüzyon üsteli n , şişmenin henüz dengeye ulaşmadığı bölgede, jele giren çözücü kesrinin % 60'lık kesimini oluşturduğu ($F < 0,6$) zaman aralığına kadar $\ln F - \ln t$ grafiğinin eğiminden hesaplanır (Peppas ve Ritger, 1987).

9. GEREÇ VE YÖNTEM

9.1. Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı, Hidrojel Araştırma Laboratuvarı ve Malatya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Haziran 2011 – Mayıs 2013 tarihleri arasında yapılmıştır.

9.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerden; CH_3COOH , CH_3COONa , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_2SO_4 , metakrilamid (M), N,N'-metilenbisakrilamid (NNMBA), amonyum persülfat (APS) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, sukroz, invertaz (EC.3.2.1.26), glukoz deney kiti, N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) Sigma (St.Louis,USA) firmasından sağlandı.

9.3. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde Unicam 400 S UV-VIS spektrofotometre, Nicolet-520 Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometresi (FTIR), Shimadzu 50 model Termogravimetrik Analizör (TGA), Grant-W14 su banyosu, Selecta çalkalamalı karıştırıcı, Orion 250 A pH metre, Sartorius BA 110S terazi kullanıldı.

9.4. Kompozit Hidrojellerin Hazırlanması

İnvertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere poli(metakrilamid); PM homopolimerik hidrojel ve poli(metakrilamid)/sepiyolit; PMS kompozit hidrojeller hazırlanmıştır.

PM hidrojellerinin hazırlanması için 0,05 mol metakrilamid monomeri, çapraz bağlayıcı olarak 25×10^{-4} mol NNMBA, başlatıcı olarak 5×10^{-4} mol APS ve hızlandırıcı olarak 25×10^{-4} mol TEMED karıştırıldıktan sonra 18 mm çaplı cam tüplerin içinde, oda sıcaklığında (23°C 'ta) 1 saat bekletilmiştir. PMS kompozit hidrojellerin hazırlanması için 18 mm çaplı cam tüplerin içinde 0,05 mol metakrilamid monomeri, 25×10^{-4} mol NNMBA suda çözülüp, başlatıcı olarak 5×10^{-4} mol APS, hızlandırıcı olarak 25×10^{-4} mol TEMED ve 212,5 mg sepiyolit karıştırıldıktan sonra, vortex üzerinde karıştırılarak 20 dakikada oda sıcaklığında kompozit hidrojeller oluşturuldu. Uzun silindirik yapıda elde

edilen hidrojeller tüplerin içerisinde çıkarılarak 3-4 mm boyutlarında kesilip, oda sıcaklığında kurutulmuştur.

9.5. Kompozit Hidrojellerinin Karakterizasyonu

9.5.1. Spektroskopik Analiz

Hazırlanan hidrojellerin spektroskopik analizi için Nicolet-520 marka (Perkin Elmer Spectrum 100 Pike Gladi) FTIR/ATR kullanıldı. PM ve PMS örnekleri öğütülerek KBr ile disk haline getirildikten sonra 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alındı.

9.5.2. Isısal Analiz

Hidrojellerin ısısal analizi için termogravimetrik analiz yapıldı. Yaklaşık 10 mg tartılarak öğütülen kuru örneklerin azot gazı (25 mL dk^{-1}) ortamında ve 10 $^{\circ}\text{C dk}^{-1}$ ısıtma hızında Shimadzu marka TGA-50 termogravimetrik analizörde termogramları alındı.

9.5.3. Şişme Deneyleri

Hidrojellerin dinamik şişme, pH duyarlı denge şişme denemeleri kütle ölçüm yöntemiyle yapıldı.

9.5.3.1. Dinamik Şişme Deneyleri

Şişme kinetiğinin incelenmesi için dinamik şişme denemeleri 25 $^{\circ}\text{C}$ ve 60 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda yapıldı. Yaklaşık 1,0 g kuru PM hidrojelleri ve PMS kompozit hidrojelleri 30 mL çift damıtık suyun içine konarak şişmeye bırakıldı. Düzenli zaman aralıklarında kompozit hidrojeller sudan alınarak yüzeyindeki su kurulanıp tartıldı ve yeniden damıtık su içine bırakıldı. Bu işlemlere sabit bir kütle elde edilene kadar devam edildi.

9.5.3.2. Şişmenin pH ile Değişimi

Değişik pH değerlerindeki (pH; 3,0-9,0) denge şişme denemeleri için 50 mM $\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COONa}$ ve 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ tamponları kullanıldı. Kuru kütlesi tartılan PM ve PMS örnekleri tampon çözeltilerde 25 $^{\circ}\text{C}$ ve 60 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda 24 saat süreyle bekletildi. Dengede şişen hidrojeller çözeltilerden alınarak kurulanıp tartıldı.

9.6. İvertazın PM Ve PMS Hidrojellerine İmmobilizasyonu

İvertazın immobilizasyonu için; PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojelden yaklaşık olarak 1 g tartıldı ve 50 mL 1 mg mL⁻¹lik invertaz çözeltisi içine eklendi. Çalkalamalı karıştırıcıda 22°C`ta 150 rpm karıştırma ile 3 saat bekletildi. Böylece PM hidrojeline immobilize olmuş invertazlar (PMI) ve PMS kompozit hidrojeline immobilize olmuş invertazlar (PMSI) oluşturuldu. İmmobilize invertazlar damıtık su ve 50 mM CH₃COOH-CH₃COONa tamponunda (pH; 4,8) yıkandı. Denemelerde kullanılanlara dek +4°C sıcaklıkta saklandı.

9.7. Serbest İvertaz Deneyleri

Serbest invertazla optimum pH ve optimum sıcaklığın belirlenmesi, kinetik parametreler olan K_m ve V_{max}`ın bulunması, termal kararlılık ve saklama kararlılığının araştırılması deneyleri yapıldı. Serbest invertazın aktivitesi sukrozun invertaz katalizli hidrolizi sonucu birim zamanda oluşan glukoz miktarının spektrofotometrik yöntem ile ölçümüyle saptandı.

9.7.1. Serbest invertazın Aktivite Analizi

Serbest invertazın aktivitesinin saptanması için diğer bölümlerde istenen amaca uygun pH değerindeki tampon çözeltilerde hazırlanmış değişik derişimlerdeki sukroz çözeltileri 37 °C`ta 5 dakika bekletilerek dengeye gelmeleri sağlandı. Bu çözeltilere 100 µL 1 mg mL⁻¹lik invertaz eklenip 37 °C`ta 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durdurulması için örnekler kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi.

Sukroz hidrolizi sonucu oluşan glukoz miktarının saptanması için standart olarak %0,1`lik benzoik asit içindeki 1 mg mL⁻¹ derişimde glukoz çözeltisi kullanıldı. Kör deneme için damıtık su kullanıldı. Örneklere, standarta ve köre glukoz deney kiti (glukoz oksidaz, peroksidaz ve o-dianisidin içerir) eklendikten sonra 37 °C`ta 30 dakika bekletildi. Her bir örneğe 12 N H₂SO₄ eklenerek tepkime durduruldu. Örneklerin ve standartın soğurumu köre karşı UV-VIS spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okundu. Gukoz miktarı Bölüm 2.2`deki Eşitlik 1`e göre hesaplandı. Enzim aktivitesi ise bulunan glukoz miktarından µmol sukroz/dk olarak hesaplandı.

9.7.2. Serbest İvertazın Optimum pH'sının Belirlenmesi

Serbest invertazın optimum pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (50 mM CH₃COOH-CH₃COONa pH; 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH; 6.0, 7.0, 8.0) tampon çözeltiler içindeki 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi hazırlanarak 37 °C'ta 5 dakika bekletildi. 100 µL 1 mg mL⁻¹'lik invertaz eklenip 37 °C'ta 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durdurulması için örnekler kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi. Bekleme işleminden sonra örneklerdeki glukoz miktarı Bölüm 9.7.1'deki yönteme göre bulundu.

9.7.3. Serbest İvertazın Optimum sıcaklığının Belirlenmesi

Serbest invertazın optimum sıcaklığının belirlenmesi için; 50 mM, enzimin optimum pH değeri olan 6.0 asetat tamponunda hazırlanmış 100 mM 20 mL sukroz çözeltileri değişik sıcaklıklarda (20,30,35,40,50,60,70 °C) 5 dakika bekletildi. Bu çözeltilere 100 µL 1 mg mL⁻¹'lik invertaz eklenerek her biri kendi sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durdurulması için örnekler kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra örneklerdeki glukoz miktarı ve enzim aktivitesi Bölüm 9.7.1'deki yönteme göre bulundu.

9.7.4. Serbest İvertazın Kinetik Parametrelerinin Bulunması

Serbest invertazın optimum sıcaklık ve optimum pH'ı belirlendikten sonra optimum pH'daki (pH; 6.0) tampon çözeltilerde değişik derişimlerde sukroz çözeltileri (5- 300 mM) hazırlandı. Bu çözeltilere invertaz eklenerek optimum sıcaklıkta (30 °C) sukroz hidrolizi, glukoz analizi ve enzim aktivitesi (Bölüm 9.7.1) uygulandı.

9.7.5. Serbest İvertazın Termal Kararlılığı

Serbest invertazın termal kararlılığının belirlenmesi için 50 mM asetat (pH; 4,8) tamponunda 1 mg mL⁻¹'lik enzim çözeltisi hazırlanıp 50 °C ve 70 °C sıcaklıklarda bekletildi. Belli zamanlarda bu çözeltilerden alınan 100 µL enzim 100 mM 20 mL sukroz çözeltilerine eklendi, optimum pH (pH;6.0) ve sıcaklıkta (30 °C) sukroz hidrolizi gerçekleştirilerek glukoz analizi ve enzim aktivitesi (Bölüm 9.7.1) uygulandı.

9.7.6. Serbest İvertazın Saklama Kararlılığı

Serbest invertazın saklama kararlılığının belirlenmesi için; 10 mL 1 mg mL⁻¹ enzim çözeltisi hazırlandı, pH=4.8 asetat tamponunda ve +4°C`de saklandı. Bu çözeltiden belli zaman aralıklarında 100 µL enzim alınarak 100 mM 20 mL sukroz çözeltilerine eklendi, optimum pH (pH;6.0) ve sıcaklıkta (30 °C) sukroz hidrolizi gerçekleştirilerek Bölüm 9.7.1`deki yöntemle göre glukoz analizi ve enzim etkinliği uygulandı.

9.8. İmmobilize İvertaz Deneyleri

İmmobilize invertazın karakterizasyonu için PMI hidrojel ve PMSI kompozit hidrojelinin FTIR spektrumları alındı. Optimum pH ve optimum sıcaklığın belirlenmesi, kinetik parametreler olan K_m ve V_{max} `ın bulunması, termal kararlılık, saklama kararlılığı, pH kararlılığı ve kullanım kararlılığının araştırılması deneyleri yapıldı. İmmobilize invertazın etkinliği sukrozun invertaz katalizli hidrolizi sonucu birim zamanda oluşan glukoz miktarının spektrofotometrik yöntem ölçümü ile saptandı.

9.8.1. PMI ve PMSI`ın Aktivite Analizi

PMI ve PMSI`ın etkinliğinin saptanması için istenen pH değerindeki tampon çözeltilerde hazırlanmış değişik derişimlerdeki sukroz çözeltileri 37°C`ta 5 dakika bekletilerek dengeye gelmeleri sağlandı. Bu çözeltilere yaklaşık 1,0 g şişmiş PMI ve PMSI eklenip 37°C`ta 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durdurulması için hidrojel ortamdan uzaklaştırıldı. Örneklerdeki aktivite analizi Bölüm 9.7.1`deki yöntemle göre yapıldı.

9.8.2. PMI ve PMSI`ın Optimum pH`ının Belirlenmesi

PMI ve PMSI`ın optimum pH`ının belirlenmesi için farklı pH`larda (50 mM CH₃COOH-CH₃COONa pH; 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH; 6.0, 7.0, 8.0) tampon çözeltiler hazırlandı. Bu tampon çözeltilerden 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi hazırlanarak 37°C`ta 5 dakika bekletilip dengeye gelmesi sağlandı. Yaklaşık 1,0 g şişmiş PMI ve PMSI hidrojel eklenip 37°C`ta 15 dakika inkübe edildi. Sukroz hidrolizi sonucu kompozit hidrojel çözeltilerinden alındı ve aktivite analizi Bölüm 9.7.1`deki yöntemle göre bulundu.

9.8.3. PMI ve PMST'ın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

PMI ve PMST'ın optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla PMI için 50mM CH₃COOH-CH₃COONa (pH; 3.0), PMSI için CH₃COOH-CH₃COONa (pH; 5.0) (optimum pH değerleri) tamponunda hazırlanmış 100mM 20 mL sukroz çözeltileri değişik sıcaklıklarda (20,30,35,40,50,60,70 °C) 5 dakika bekletildi. Yaklaşık 1,0 g şişmiş PMI ve PMSI hidrojelleri eklenip her biri kendi sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Sukroz hidrolizi sonucu kompozit hidrojeller çözeltilerden alındı ve aktivite analizi Bölüm 9.7.1'deki yöntemle yapıldı.

9.8.4. PMI ve PMST'ın Kinetik Parametrelerinin Bulunması

PMI ve PMST'ın optimum sıcaklık ve optimum pH'ı belirlendikten sonra optimum pH'daki (PMI için pH; 4.0, PMSI için pH; 3.0) tampon çözeltilerde değişik derişimlerde sukroz çözeltileri (5-300 mM) hazırlandı. Bu çözeltilere Yaklaşık 1,0 g MI ve MSI hidrojelleri eklenip eklenerek optimum sıcaklıklarında sukroz hidrolizi ve glukoz analizi Bölüm 9.7.1'deki yöntemle yapıldı.

9.8.5. PMI ve PMST'ın Termal Kararlılığı

PMI ve PMST'ın termal kararlılığının belirlenmesi için şişmiş PMI hidrojeli ve PMSI kompozit hidrojelinin 1 g tartıldı ve 50 mL 50mM asetat (pH; 4.8) tamponuna konarak 50°C sıcaklıkta bekletildi. Belli zamanlarda bu kompozit hidrojeller alınarak 100 mM 20 mL sukroz çözeltilerine eklendi, sukroz hidrolizi gerçekleştirildikten sonra hidrojeller çözeltilerden alınıp oluşan glukoz miktarı Bölüm 9.7.1'deki yöntemle yapıldı. Aynı işlemler 70 °C sıcaklık için tekrarlandı.

9.8.6. PMI ve PMST'ın Saklama Kararlılığı

Saklama kararlılığının belirlenmesi için PMI ve PMSI hidrojellerinin optimum sıcaklık ve pH'ta sukroz hidrolizi ile aktivitesi belirlendikten sonra bu hidrojeller 50mM asetat (pH; 4.8) tamponuna konarak +4 °C'ta bekletildi. Belli sürelerde bu çözeltilerden alınan hidrojeller sukroz hidrolizi ve glukoz analizi deneylerinde kullanıldı.

9.8.7. PMI ve PMST'ın pH Kararlılığı

PMI ve PMST'ın pH kararlılığının belirlenmesi için yaklaşık 1,0 g PMI ve PMST örnekleri tartılıp değişik pH'lardaki (50 mM $\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COONa}$ pH; 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH; 6.0, 7.0, 8.0) tampon çözeltiler içine kondu ve 30 dakika bekletildi. Buradan çıkarılan kompozit hidrojellerin sukroz analizi kendi optimum pH tamponunda hazırlanmış 100 mM 20 mL sukroz çözeltileri ile optimum sıcaklıklarında yapıldı. Hidrojeller çözeltilerden alındıktan sonra oluşan glukoz miktarı Bölüm 9.7.1'deki yöntemle ölçüldü.

9.8.8. PMI ve PMST'ın Kullanım Kararlılığı

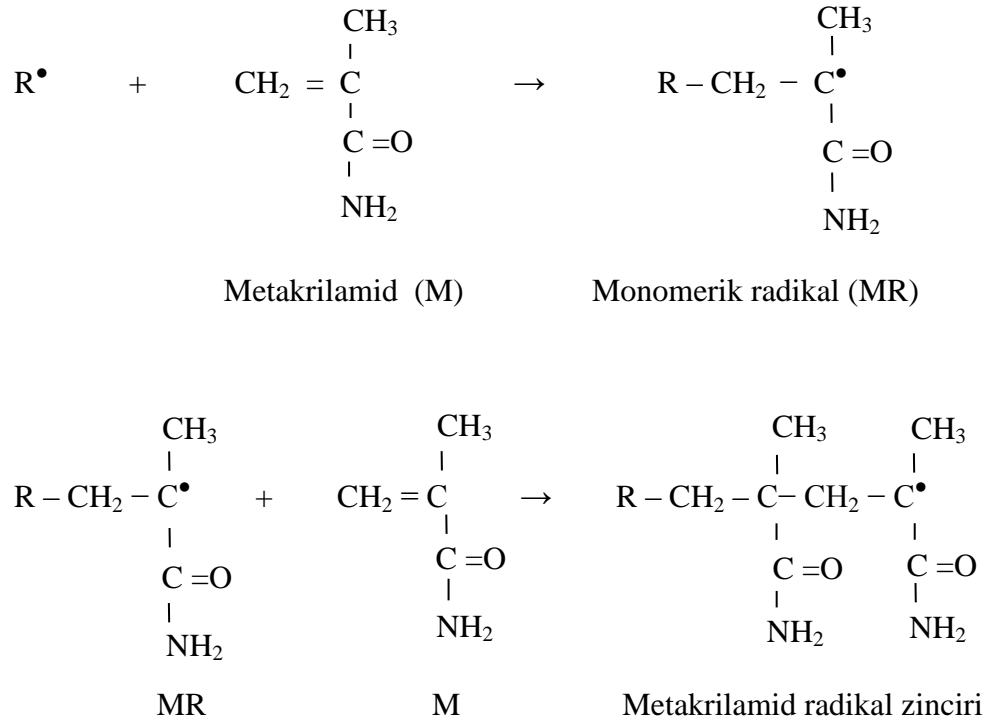
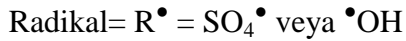
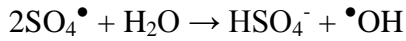
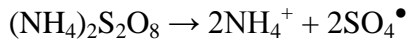
PMI ve PMST'ın kullanım kararlılığının belirlenmesi için şişmiş PMI hidrojelinin ve PMST kompozit hidrojelinin yaklaşık 1,0 g tartılarak 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi ile kendi optimum pH ve optimum sıcaklıklarında sukroz hidrolizi gerçekleştirilerek glukoz analizi yapıldı. Aynı hidrojeller damıtık su ve 50mM asetat (4,8) tamponunda yıkandıktan sonra 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi ile kendi optimum pH ve optimum sıcaklıklarında yeniden sukroz ve glukoz analizinde kullanıldı. Bu işlem aktivite düşene kadar tekrarlandı.

10. BULGULAR

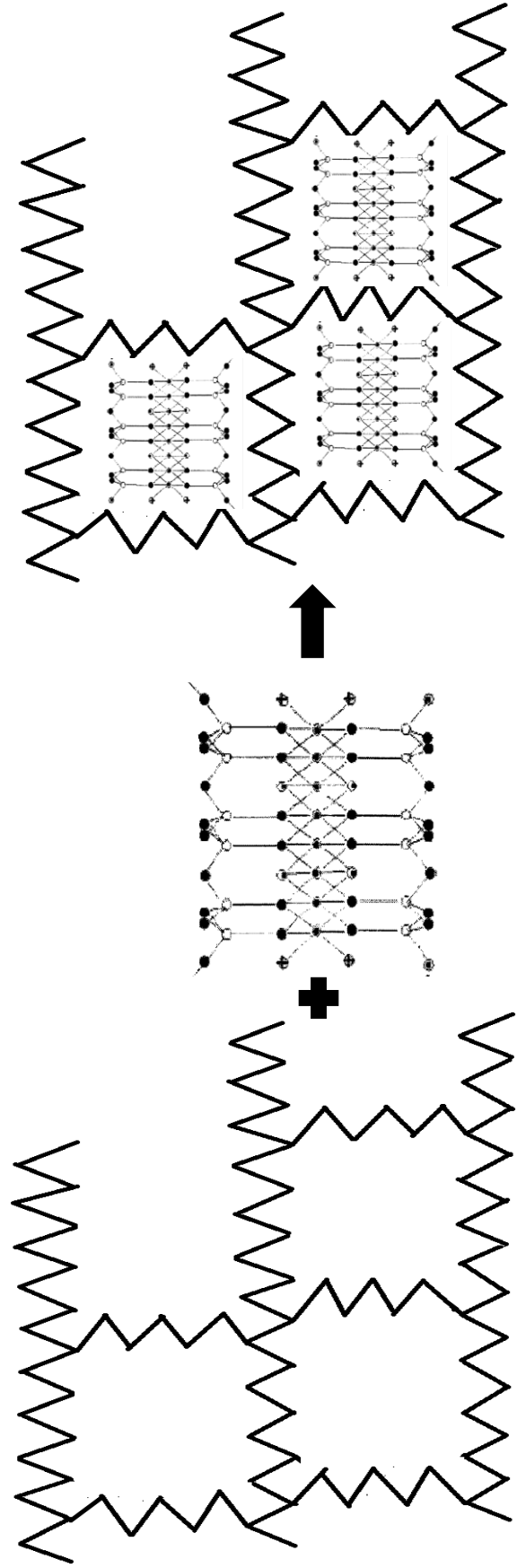
10.1. Kompozit Hidrojellerin Hazırlanması

İnvertaz immobilizasyonunda destek maddesi olarak poli(metakrilamid); PM ve poli(metakrilamid)/sepiyolit; PMS hidrojelieri seçilmiştir. PM hidrojelieri metakrilamid monomer, çapraz bağlayıcı olarak NNMBA, başlatıcı olarak APS ve hızlandırıcı olarak TEMED varlığında çözeltide radikalik katılma tepkimesi ile hazırlanmıştır. MS kompozit hidrojelieri ise aynı karışıma sepiyolit eklenerek hazırlanmıştır.

PM hidrojelinin çözeltide radikalik katılma tepkimesine ait olası polimerleşme mekanizması başlama, büyüme ve sonlanma basamakları halinde Şema 10.1 ve 10.2`te, PMS kompozit hidrojelinin oluşumu ise Şema 10.3`te gösterilmiştir.



Şema 10.1. Poli(metakrilamid) hidrojelinin oluşumu için önerilen başlama tepkimeleri



Şema 10.3. Kompozit hidrojel oluşumu

10.2. Kompozit Hidrojellerin Karakterizasyonu

İnvertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere hazırlanan PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojellerinin karakterizasyonu için FTIR, TG analizleri ve şişme deneyleri yapılmıştır.

10.2.1. Spektroskopik Analiz

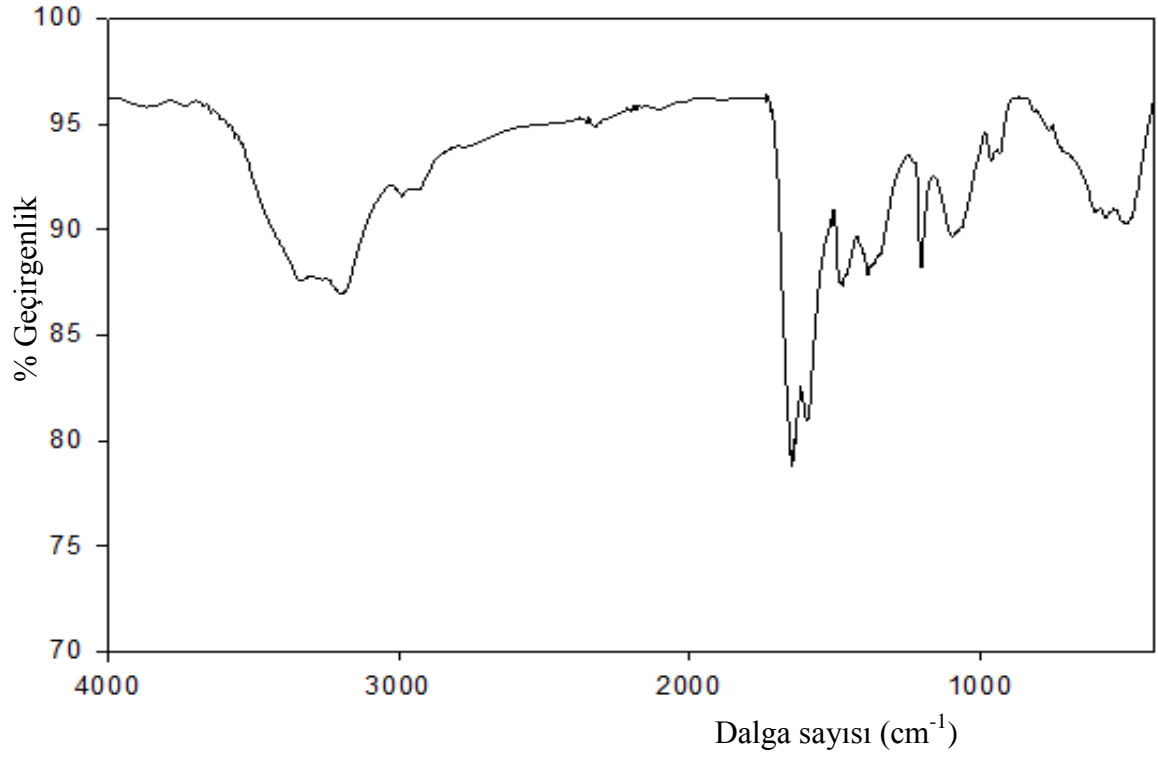
Hazırlanan kompozit hidrojellerin kimyasal yapılarını aydınlatmak için gerekli spektroskopik incelemeler, FTIR spektrofotometrisi ile yapılmıştır. PM ve PMS hidrojellerinin FTIR spektrumu alınarak Şekil 10.1 ve 10.2`de sunulmuştur.

Her iki spektrumda da 3000-3500 cm^{-1} arasındaki geniş bant metakrilamitin amino grubundaki -NH gerilme bandı ve sepiyolit -OH gerilme bandı olabilir. 1042 cm^{-1} bandı sepiyolitteki Si-O gerilme bandı, 1664 cm^{-1} bandı metakrilamitteki CO-NH bandı olabilir (Önal ve Çelik, 2006, Chen ve ark., 2007, Singh ve ark., 2009).

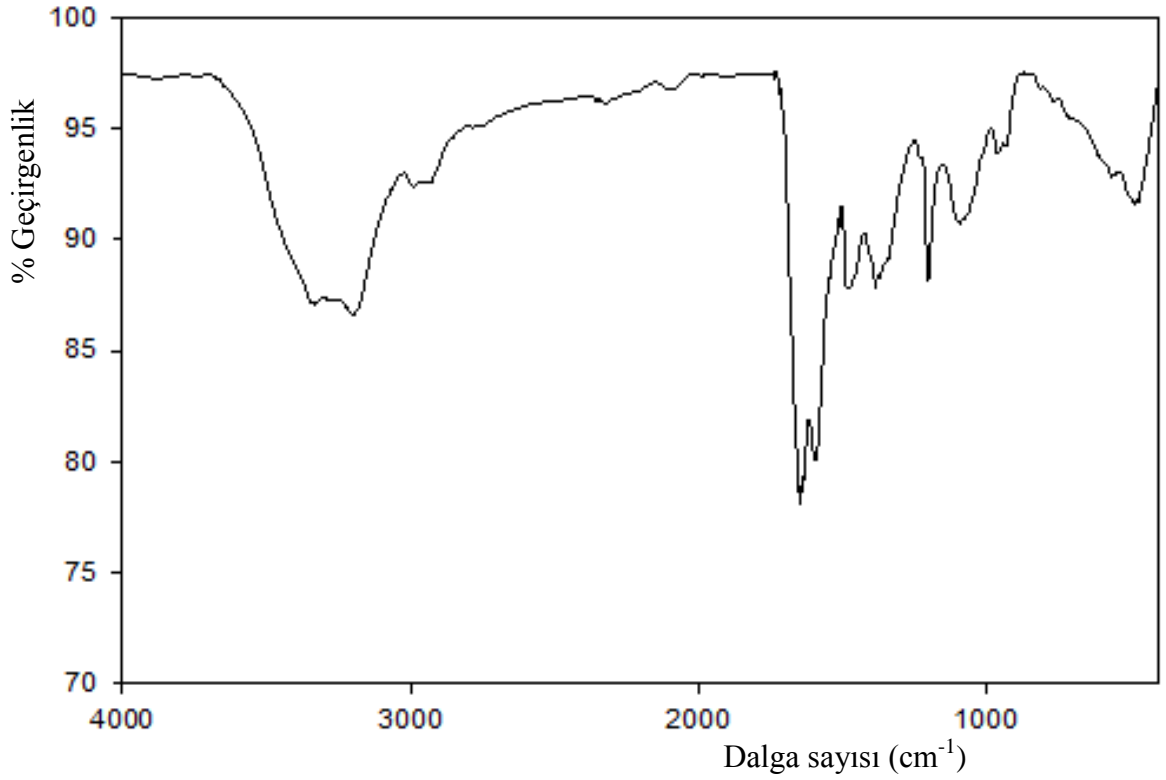
10.2.2. Isısal Analiz (TG)

Hazırlanan PM ve PMS hidrojellerinin ısısal bozunmalarının incelenmesi için 10 $^{\circ}\text{C dk}^{-1}$ ısıtma hızında, 20 $^{\circ}\text{C}$ ve 500 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında azot atmosferinde termogramları alınmıştır ve Şekil 10.3 ile 10.4`da gösterilmiştir.

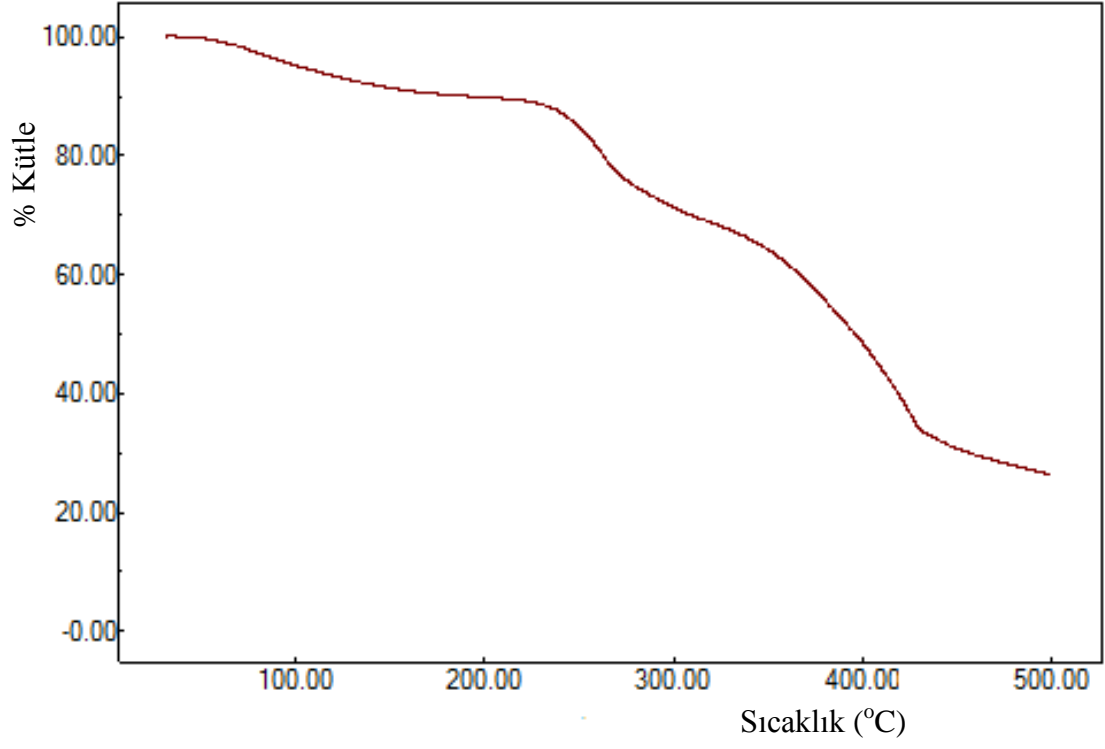
Termogramlardan kompozitlerin çok basamaklı ısısal bozunma tepkimesi verdiği görülmektedir. Termogramlardaki verilere göre, 200 $^{\circ}\text{C}$ `ye kadar olan kütle kaybı kompozitlerde yapısal bir bozunma olmadan yapıdaki su kaybını gösterir. 200 $^{\circ}\text{C}$ ile 350 $^{\circ}\text{C}$ arası sepiyolit için su kaybı olduğu söylenmiştir. Yaklaşık 330 $^{\circ}\text{C}$ `de dehidroksilasyon gerçekleşir (Lemic ve ark., 2005) 300 $^{\circ}\text{C}$ -450 $^{\circ}\text{C}$ arası PM ve çapraz bağlayıcıdaki amid yan grupları, 450 $^{\circ}\text{C}$ `den sonra polimetakrilamit temel zincirlerinin bozunması gerçekleşir (Öztop ve Hepokur, 2007). Sepiyolit eklenmesi PM hidrojelinin ısısal özelliğini değiştirmiştir ve biraz daha kararlı olmasını sağlamıştır. % 50 kütle kaybının olduğu sıcaklıkların PM için 400 $^{\circ}\text{C}$, PMS için 420 $^{\circ}\text{C}$ olması PMS`nin ısısal kararlılığının daha yüksek olduğu göstermiştir.



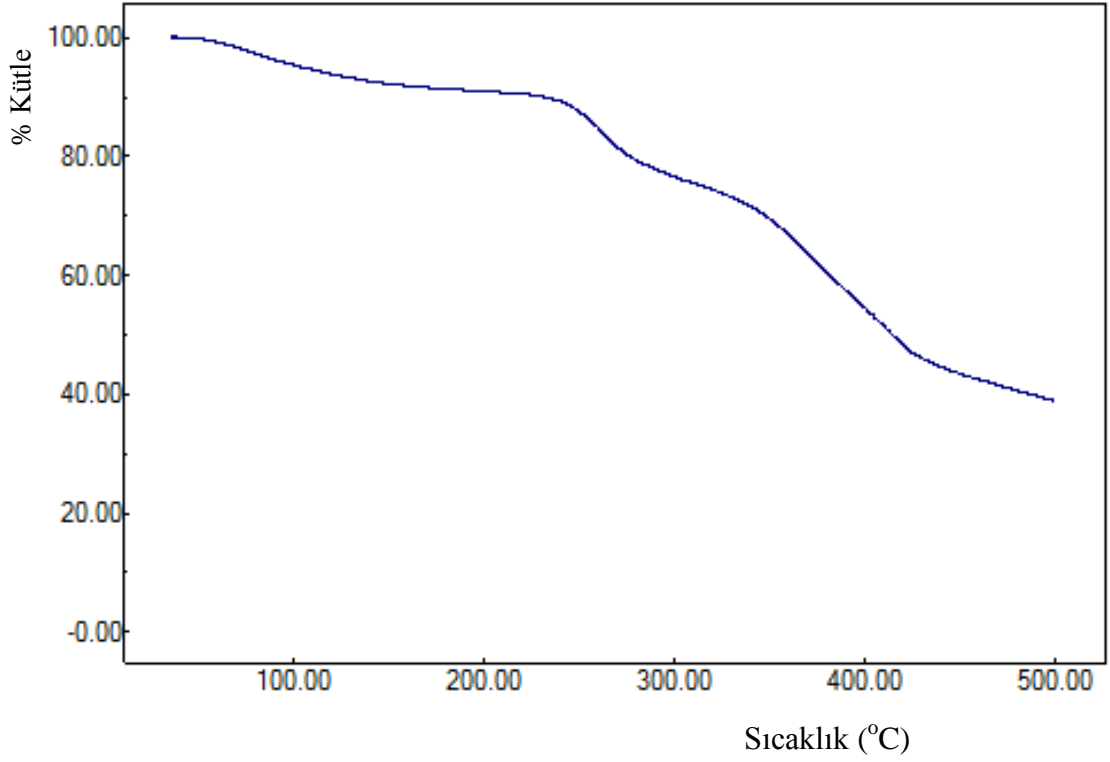
Şekil 10.1. PM hidrojelinin FTIR spekturumu



Şekil 10.2. PMS hidrojelinin FTIR spekturumu



Şekil 10.3. PM kompozit hidrojelinin termogramı



Şekil 10.4. PMS hidrojelinin termogramı

10.2.3. Şişme Deneyleri

Hidrojellerin çözücü ortamında şişebilmeleri çözücü ve hidrojin doğası ile yakından ilgilidir. Hazırlanan hidrojellerin şişme davranışının araştırılması için dinamik şişme, pH duyarlı denge şişme denemeleri kütle ölçüm yöntemiyle yapılmıştır.

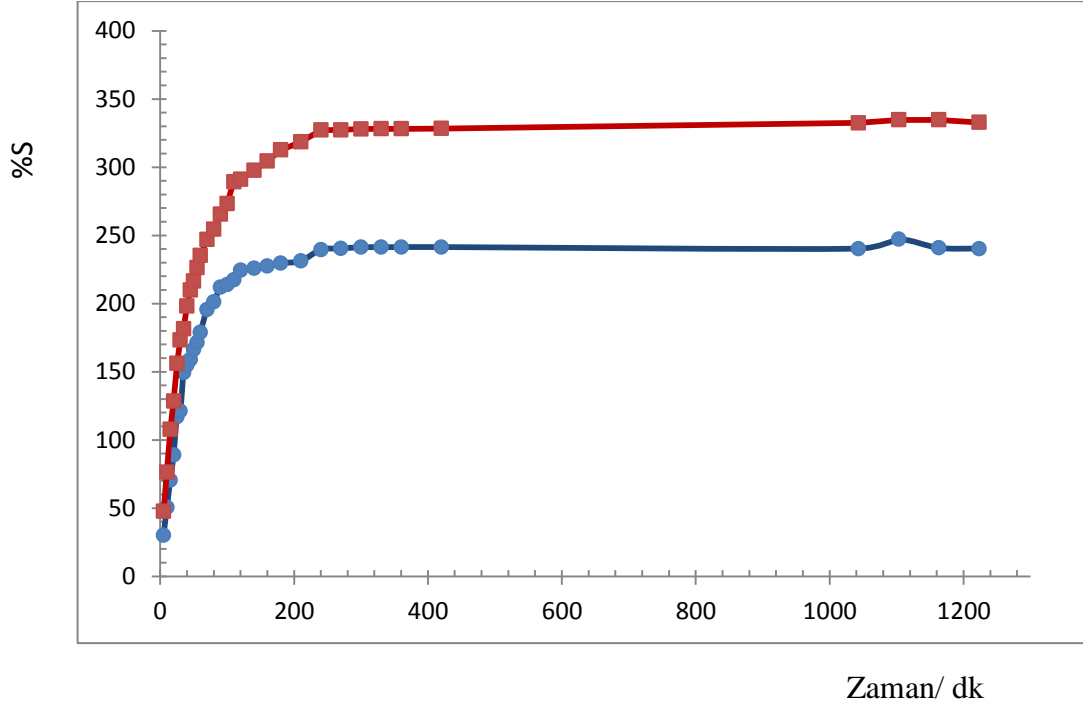
10.2.3.1. Dinamik Şişme

PM ve PMS kompozit hidrojellerinin dinamik şişme deneyleri kütlesi ölçülmüş (m_0) kuru kompozitlerin damıtık suya eklenmesi ile iki farklı sıcaklıkta (25 °C ve 60 °C) gerçekleştirilmiştir. Belli zaman aralıklarında kompozitler, sudan alınıp kurutularak yüzey suyundan arındırılmış ve şişmiş polimerlerin kütlesi (m_t) bulunmuştur. % şişme (% S) değerleri eşitlik 3`ten hesaplanmıştır.

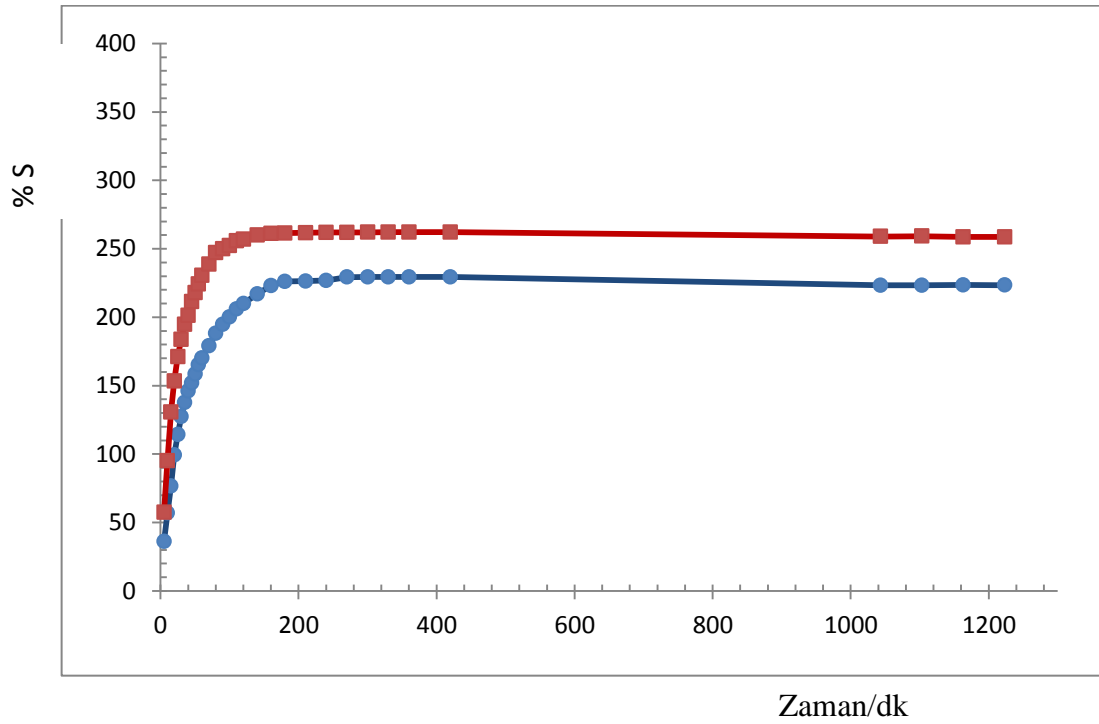
$$\%S = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

Hesaplanan %S değerinin zamanla değişimini gösteren grafikler Şekil 10.5 ve Şekil 10.6`de gösterilmiştir.

Şekil 10.5 ve 10.6`den görüldüğü gibi kompozit hidrojellerin şişmesi zamanla artmış ve belli bir süre sonra sabit bir değere ulaşmıştır. Şişmenin bu değeri denge şişme değeri olarak tanımlanır. Her iki şekilden görüleceği gibi PM kompozitleri PMS kompozitlerine göre daha fazla şişmiştir. Yapıya sepiyolit eklenmesi şişmeyi azaltmıştır.

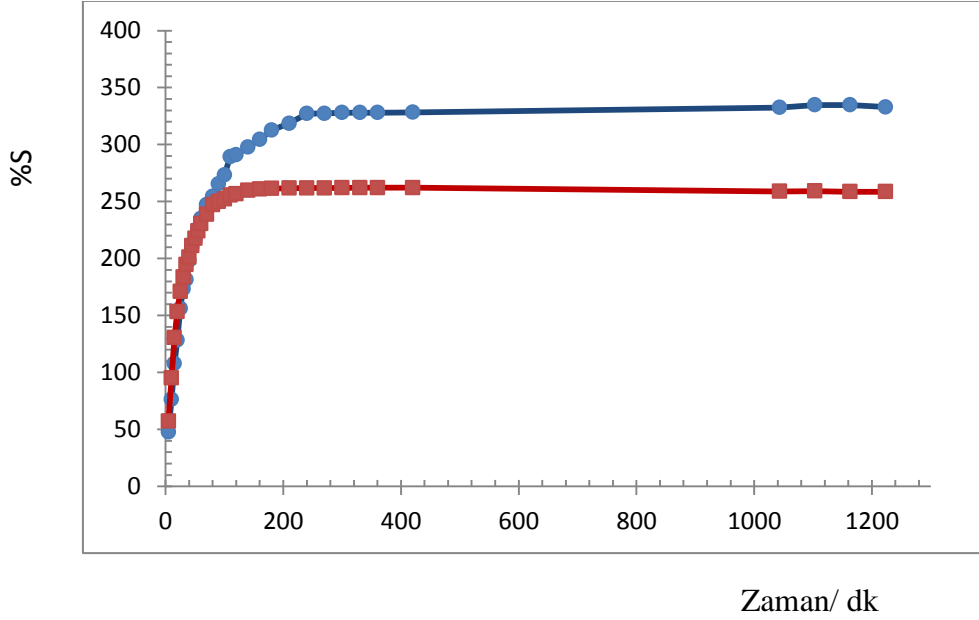


Şekil 10.5. PM ve PMS hidrojjlerinin 25 °C`ta şişme davranışının zamanla değişimi
(PM: ■ , PMS: ●)

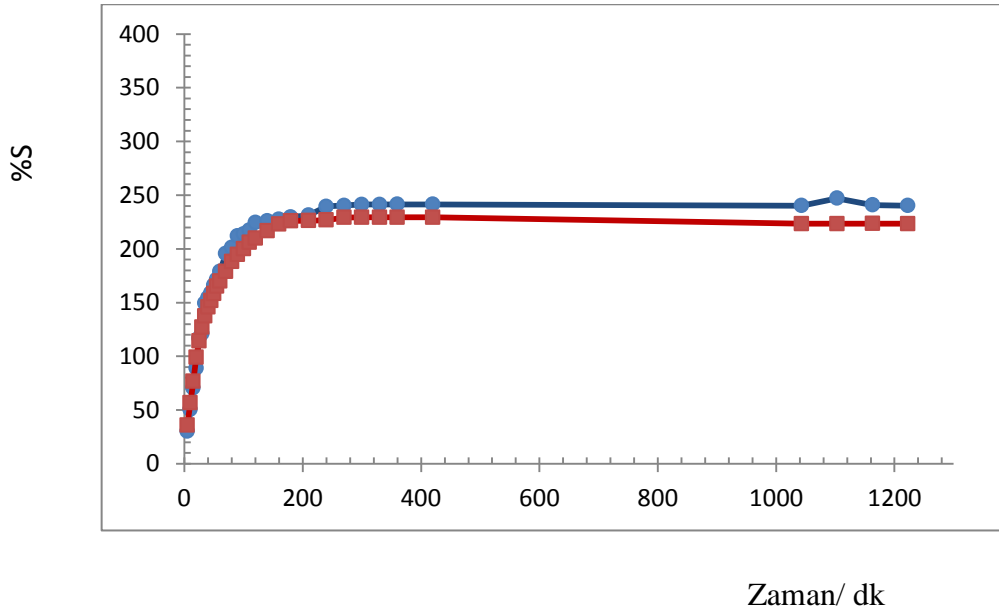


Şekil 10.6. PM ve PMS hidrojjlerinin 60 °C`ta şişme davranışının zamanla değişimi
(PM: ■ , PMS: ●)

Şekil 10.7 ve 10.8 'daki şişme eğrileri sıcaklığın PM hidrojeline ve PMS kompozit hidrojeline yaptığı etkiyi göstermektedir. Şekil 10.7 incelendiğinde sıcaklık artışının PM hidrojelinin şişmesini düşürdüğü görülmektedir. Şekil 10.8 incelendiğinde ise sıcaklık değişiminin PMS kompozit hidrojelinin şişmesine etki etmediği görülmektedir.



Şekil 10.7. PM hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi
(25 °C: ● ,60 °C: ■)



Şekil 10.8. PMS kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi
(25 °C: ● ,60 °C: ■)

PM ve PMS kompozit hidrojellerinin şişmesi ikinci derece kinetiğe uygulanabilir.

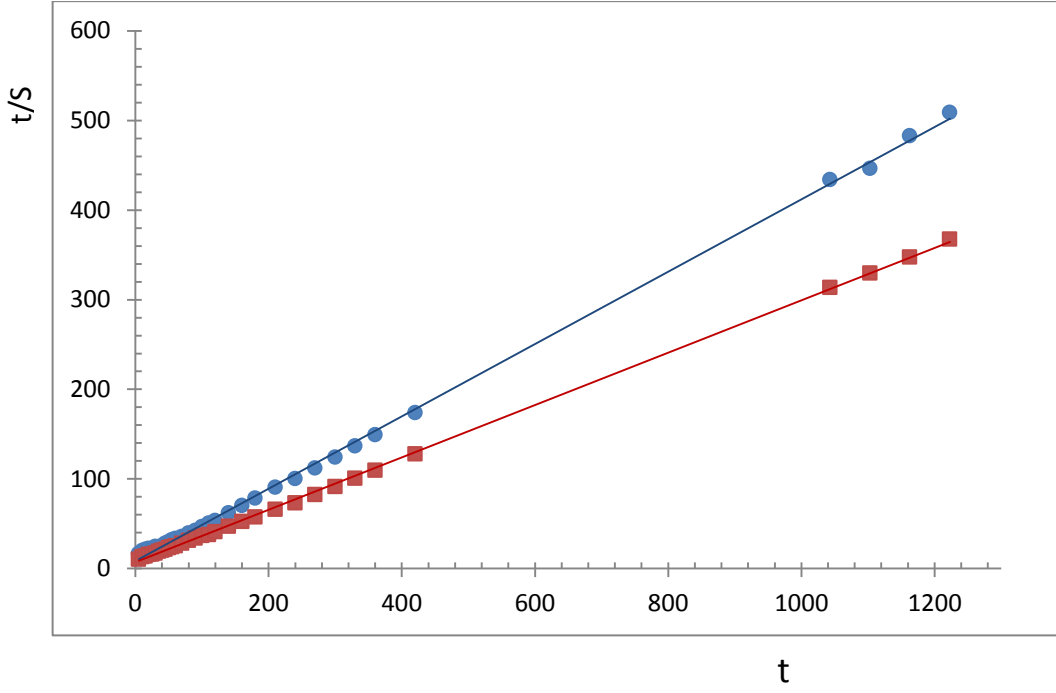
$$t/S = A + Bt \quad (4)$$

Burada $B = 1/ S_{\max}$; maksimum şişme veya denge şişmenin tersi, $A = 1 / k_s$ S_{\max}^2 ; şişmenin başlangıç hızının tersidir ($1 / r_o$) ve k_s şişme hız sabitidir (Saraydın ve ark., 1999). Eşitlik 4'e göre hidrojellerin $t / S - t$ grafiği çizilmiş ve Şekil 10.10 ve Şekil 10.11`de gösterilmiştir. Bu grafikten hesaplanan şişme hız sabiti değerleri Çizelge 10.1`de gösterilmiştir.

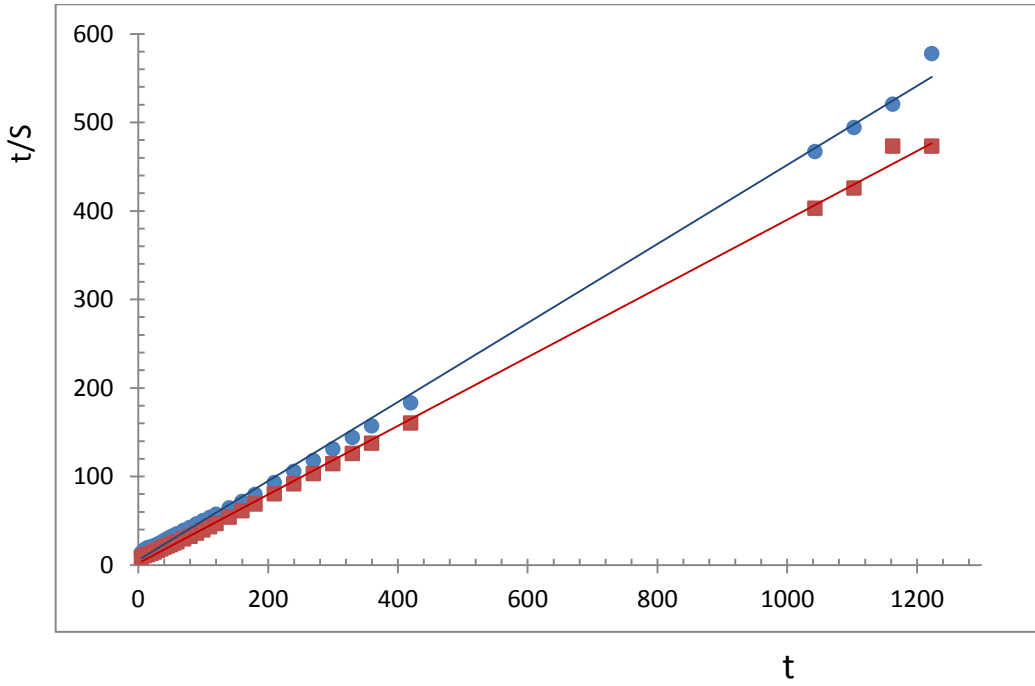
Çizelge 10.1. PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojelinin farklı sıcaklıklardaki şişme parametreleri

	PM	PMS
$r_o / g su(g jel dk)^{-1}$	0,13	0,11
25°C $S_{\max}/ g su (g jel)^1$	3,42	2,47
$k / g jel dk (g su)^{-1}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2}$
$r_o / g su(g jel dk)^{-1}$	0,51	0,17
60°C $S_{\max}/ g su (g jel)^1$	2,57	2,24
$k / g jel dk (g su)^{-1}$	$2,0 \times 10^{-1}$	$7,9 \times 10^{-2}$

Çizelge 10.1`den görüldüğü gibi 25 °C ve 60 °C`ta PM hidrojelinin gram hidrojel başına aldığı su miktarı PMS hidrojeline göre daha fazladır.

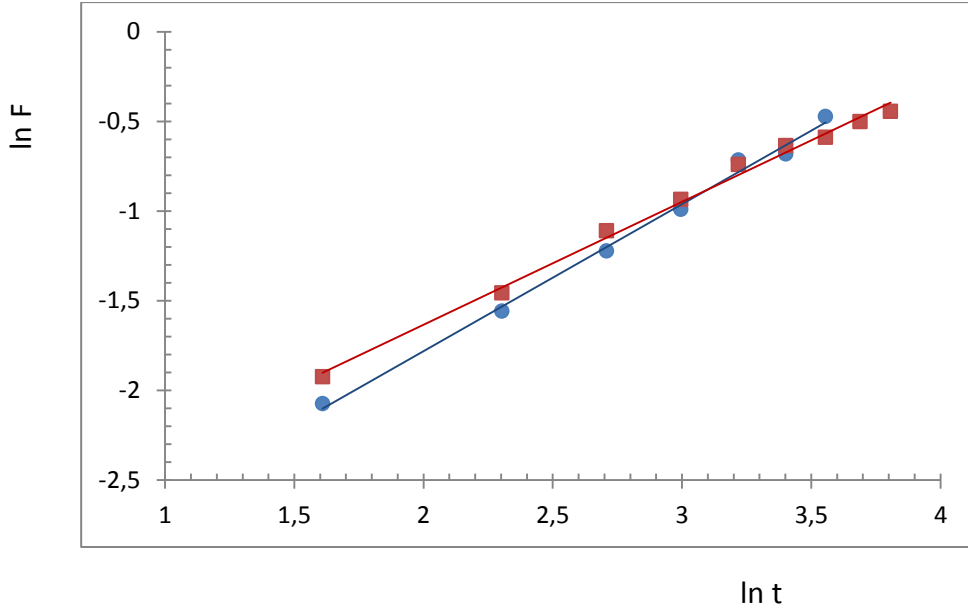


Şekil 10.9. PM ve PMS hidrojenlerinin 25 °C'ta şişme hız grafiği (PM: ■ , PMS:●)

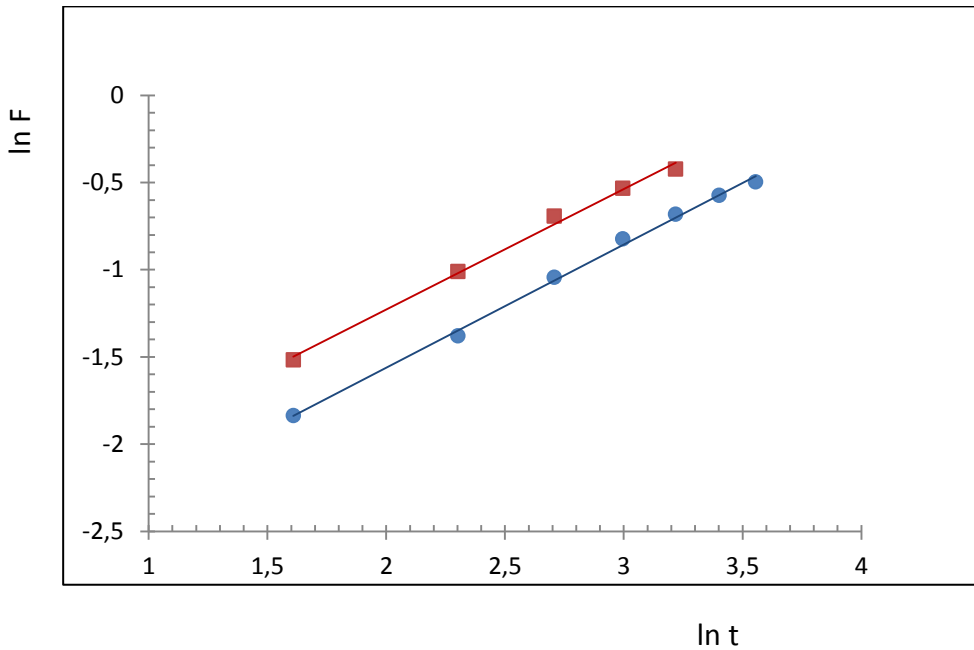


Şekil 10.10. PM ve PMS hidrojenlerinin 60 °C'ta şişme hız grafiği (PM: ■ , PMS:●)

PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojeline su difüzyonunun doğasını incelemek için Bölüm 6'daki Eşitlik 2'den yararlanılmıştır. Eşitlik 2, şişme kinetiği eğrilerindeki kütle artışı ilk % 60'lık bölümüne uygulanmıştır. 25 °C ve 60 °C'ta şişme için $\ln F - \ln t$ grafikleri oluşturulmuş ve Şekil 10.11 ile 10.12'te gösterilmiştir. Bu doğruların eğiminden n difüzyon katsayısı, kesim noktasından k değerleri bulunmuş ve Çizelge 10.2'de gösterilmiştir.



Şekil 10.11. PM ve PMS hidrojellerinin 25 °C'ta $\ln F - \ln t$ grafiği (PM: ■, PMS: ●)



Şekil 10.12. PM ve PMS hidrojellerinin 60 °C'ta $\ln F - \ln t$ grafiği (PM: ■, PMS: ●)

Çizelge 10.2. PM ve PMS kompozit hidrojenlerinin değişik sıcaklıklardaki şişme kinetik parametreleri

T / °C	PM		PMS	
	n	k	n	k
25	0,71	3,06	0,81	3,39
60	0,72	2,67	0,72	3,00

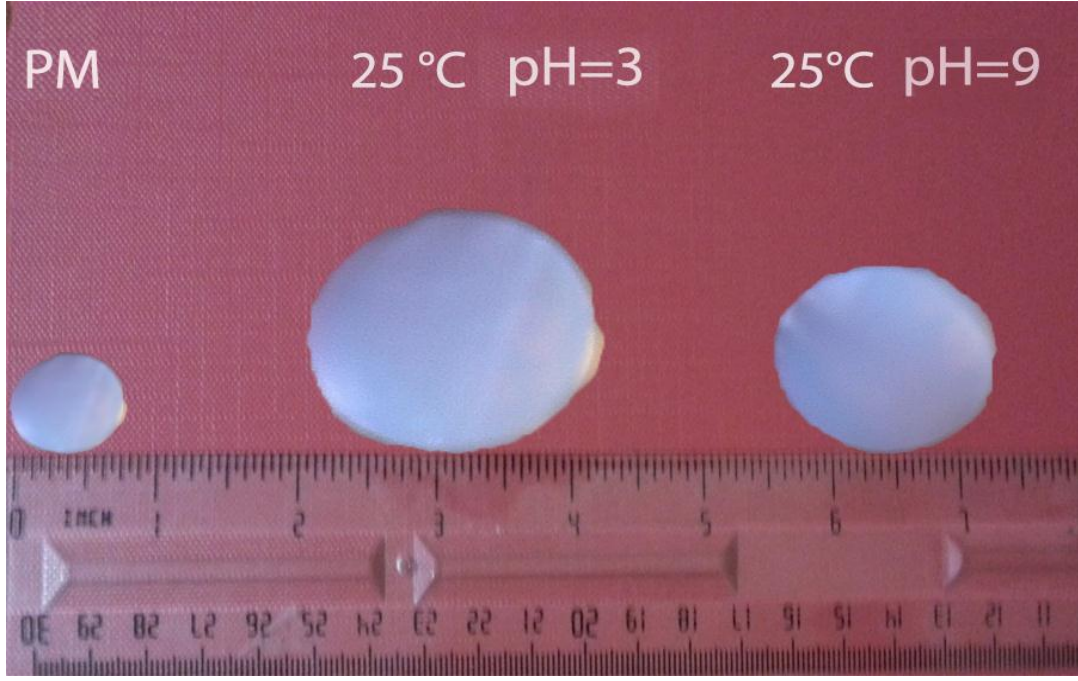
10.2.3.2. Şişmenin pH ile Değişimi

Hazırlanan PM hidrojenli ve PMS kompozit hidrojeninin şişme davranışlarına pH etkisinin belirlenmesi için pH 3 – 9'a ayarlanmış asetat ve fosfat tamponları içinde 25 ve 60 °C'ta denge şişme denemeleri yapılmıştır.

Kuru halde ve tampon çözeltilerde şişmiş olan hidrojenlerin fotoğrafları Şekil 13 ve 14 de gösterilmiştir. Fotoğraflardan görüldüğü gibi PM ve PMS hidrojenleri pH 3'te daha fazla şişme göstermiştir. Her üç halde de hidrojen yapısı düzgündür, kopma olmamıştır ve silindirik yapıdadır.

Kuru kütleleri (m_0) tartılan hidrojenler farklı pH'lardaki çözeltilerde 24 saat bekletilmiştir. Şişmiş hidrojenler tartılarak denge kütlesi (m_d) bulunmuş ve bu değerlerden Eşitlik 5'e göre denge şişme yüzdesi; % S_d değerleri hesaplanmıştır. Şişmenin pH ile değişimi Şekil 10.15 ve 10.16'da gösterilmiştir.

$$\%S_d = \frac{m_d - m_0}{m_0} \times 100 \quad (5)$$



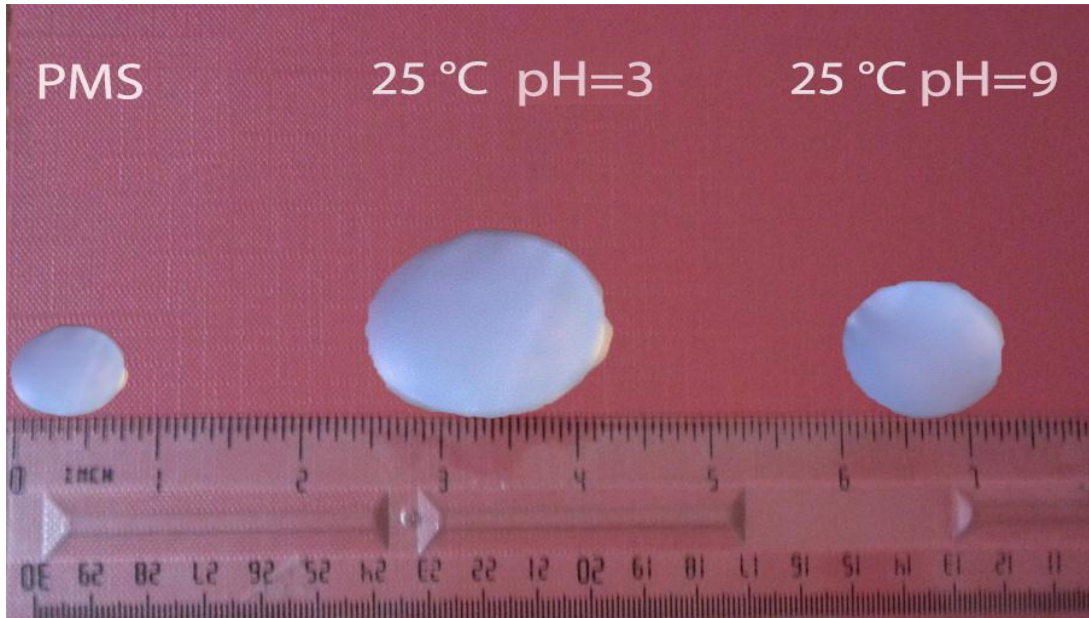
a

b

c

Şekil 10.13. PM hidrojelinin fotoğrafı

a) kuru halde **b)** pH 3'te şişmiş halde **c)** pH 9'da şişmiş halde



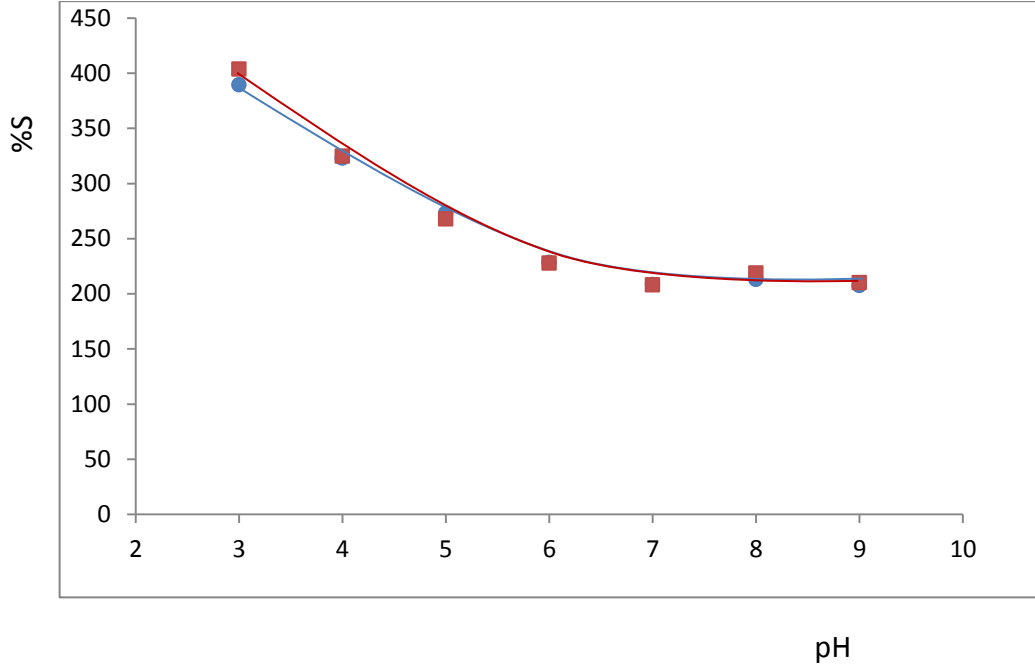
a

b

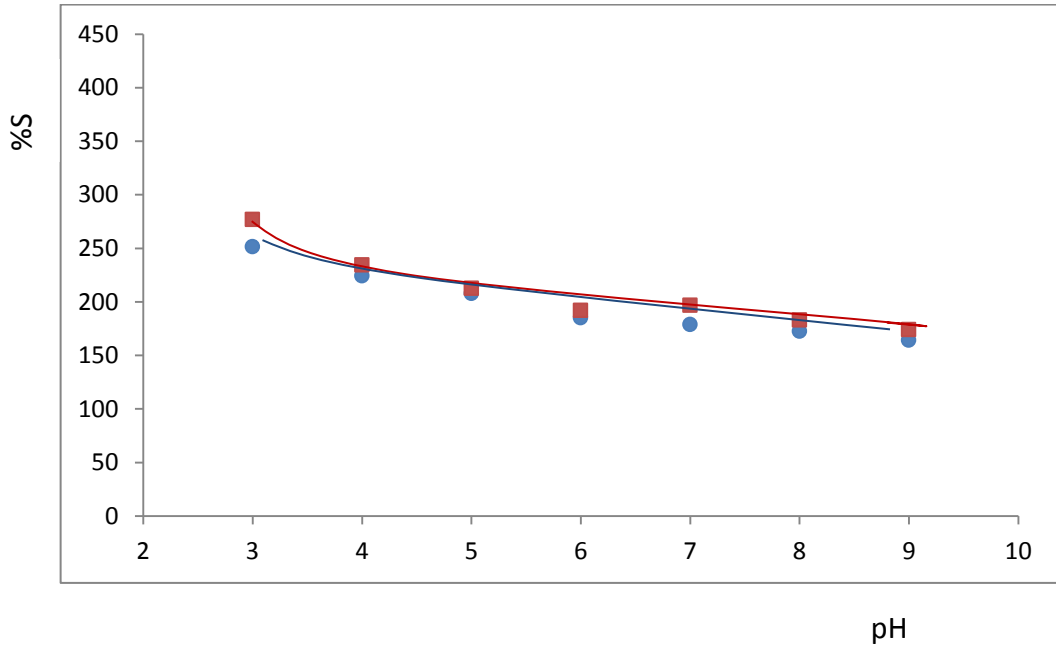
c

Şekil 10.14. PMS hidrojelinin fotoğrafı

a) kuru halde **b)** pH 3'te şişmiş halde **c)** pH 9'da şişmiş halde



Şekil 10.15 PM hidrojjlerinin şişmesinin pH ile değişimi (25 °C: ● , 60 °C: ■)



Şekil 10.16 PMS kompozit hidrojjlerinin şişmesinin pH ile değişimi
(25 °C: ● , 60 °C: ■)

Her iki hidrojel için de en yüksek şişme değeri pH 3'te bulunmuştur. PM hidrojjelinde şişme pH artışıyla pH 6 ya kadar % 50 oranında bir düşüş göstermiş ve sonra sabit kalmıştır. PMS hidrojjelinde ise şişme pH artışıyla pH 9'a kadar % 42

oranında bir düşüş göstermiştir. Her iki şekilden farklı pH değerlerindeki sıcaklık değişiminin şişmeyi etkilemediği görülmektedir.

10.3. İvertazın PM Hidrojeline ve PMS Kompozit Hidrojeline İmmobilizasyonu

İvertazın immobilizasyonu için hazırlanan ve karakterizasyonu yapılan PM hidrojeli ve PMS kompozit hidrojeli invertaz ile etkileştirilerek PM'e immobilize edilmiş invertaz (PMI) ile PMS'e immobilize edilmiş invertaz (PMSI) oluşturulmuştur.

10.4. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nın Özelliklerinin Araştırılması

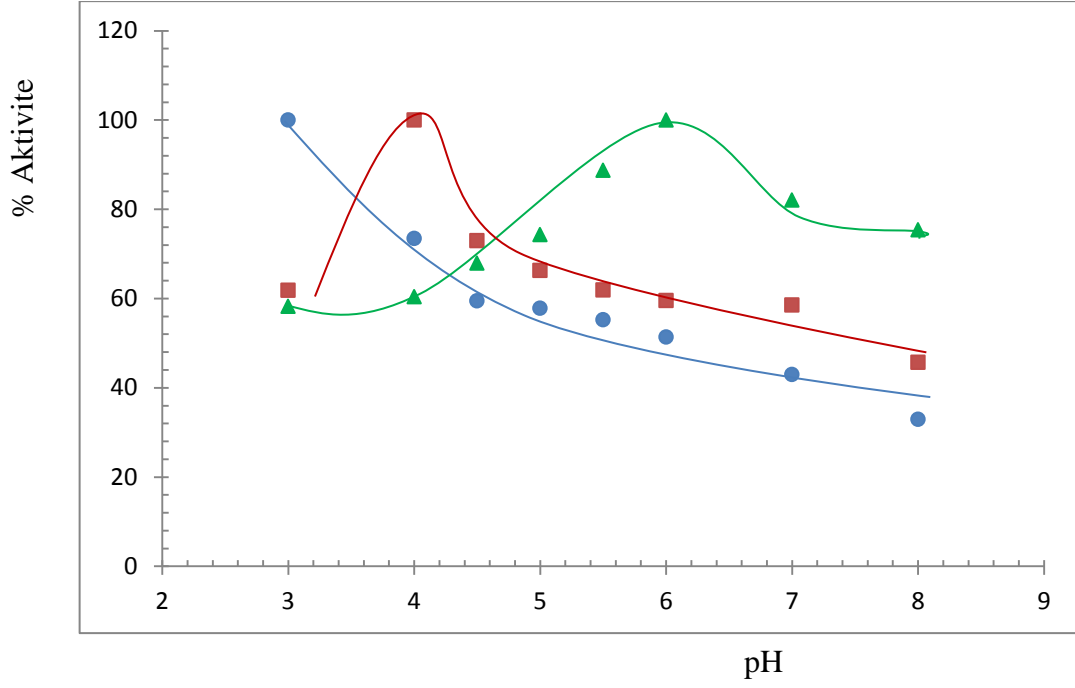
Serbest ve immobilize invertazın optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreler olan V_{max} ve K_m değerleri bulunmuştur. Ayrıca serbest invertazın termal kararlılık, saklama kararlılığı ve kullanım kararlılığı, PMI ve PMSI'nın termal kararlılık, saklama kararlılığı, pH kararlılığı ve kullanım kararlılığı deneyleri yapılmıştır.

10.4.1. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nın Optimum pH'sının Belirlenmesi

Serbest invertaz (I), PMI ve PMSI'nın Optimum pH'sının Belirlenmesi için enzim miktarı, substrat derişimi ve sıcaklık sabit tutularak 50 mM CH₃COOH-CH₃COONa ve 50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon çözeltilerde (pH; 3-8) invertaz aktivite deneyleri yapılmış, bulunan aktivite değerleri % aktivite cinsinden hesaplanıp pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir ve bu grafik Şekil 10.17'da gösterilmiştir. Bu grafiklerden görüleceği gibi Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nın Optimum pH değerleri sırasıyla 6.0, 4.0 ve 3.0 olarak bulunmuştur.

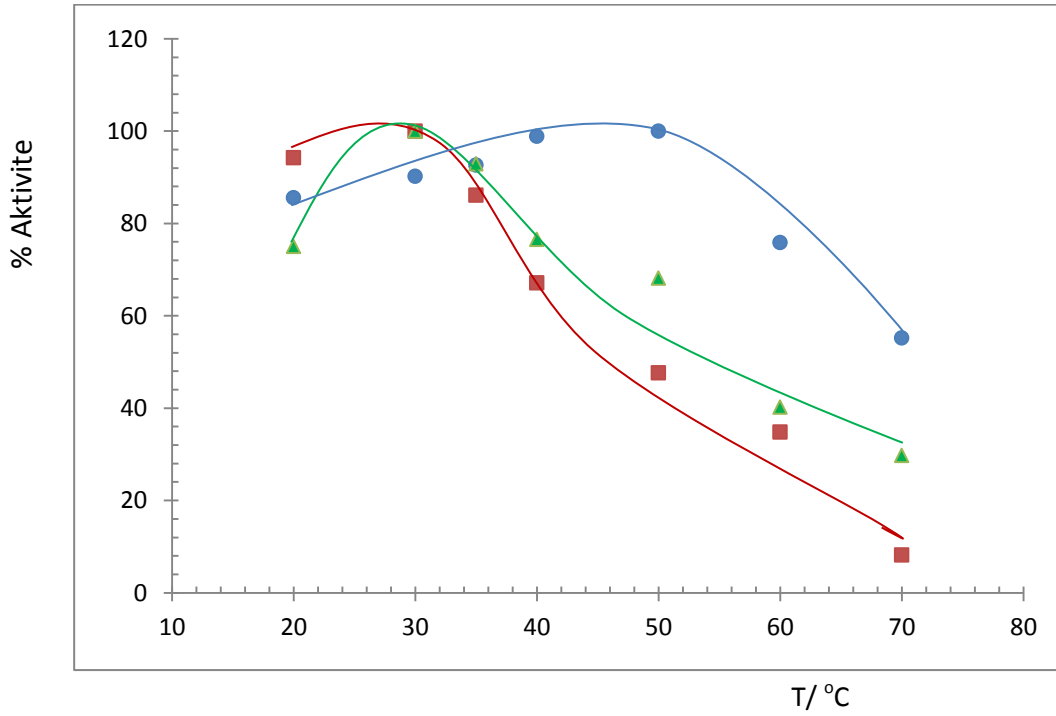
10.4.2. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nın optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla enzim miktarı, substrat derişimi ve optimum pH değerlerinde (pH; 6.0, 4.0, 3.0) değişen sıcaklıklarda (20-70 °C) enzim aktivitesi bulunmuştur. Aktivite değerleri % aktivite cinsinden hesaplanıp sıcaklığa karşı grafiğe geçirilmiştir ve bu grafik Şekil 10.18'de gösterilmiştir. Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nın optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 30 °C, 30 °C ve 50 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 10.17. Serbest invertaz, PMI ve PMSI'n optimum pH grafiği

(I: ▲, PMI: ■, PMSI: ●)

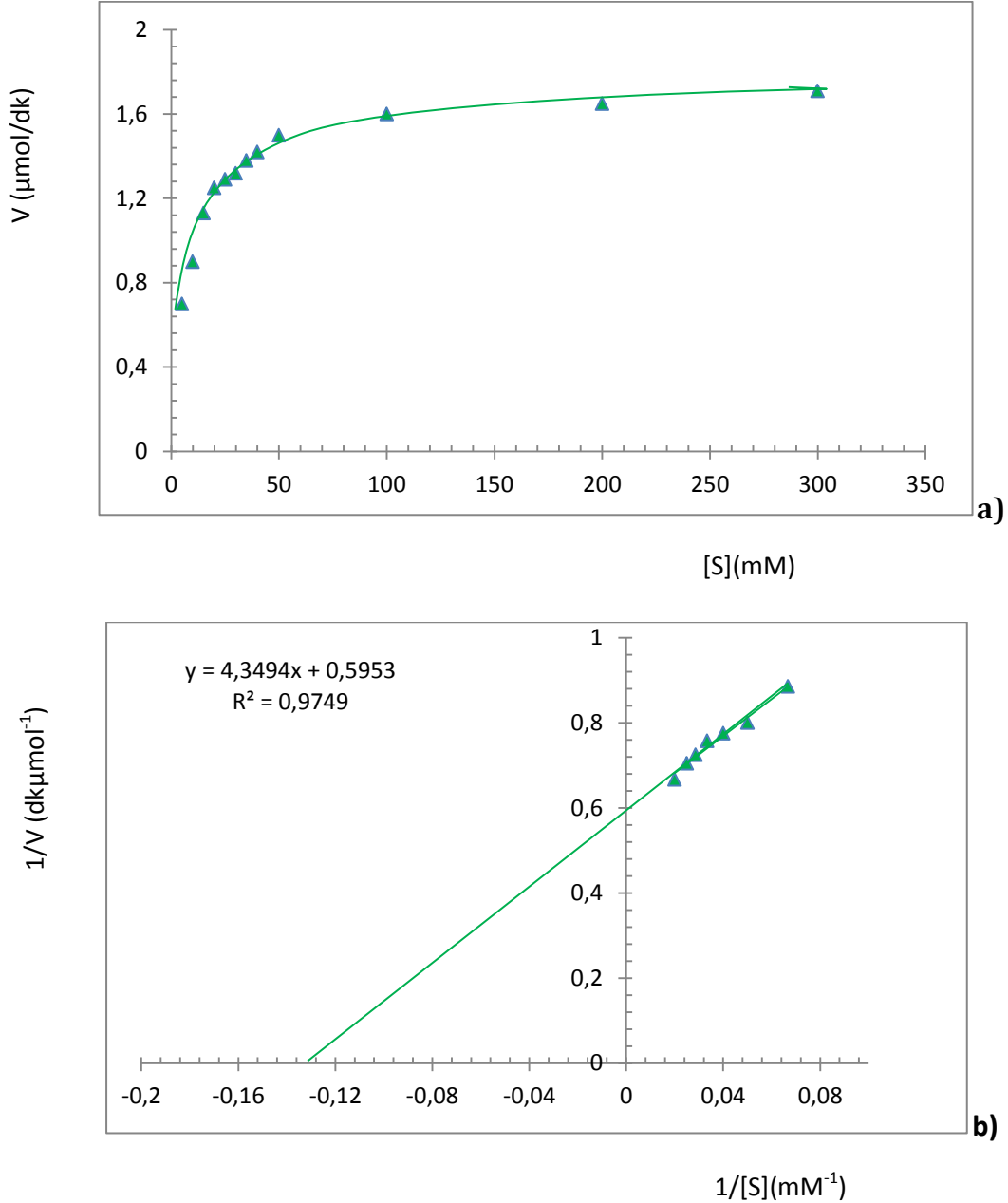


Şekil 10.18. Serbest invertaz, PMI ve PMSI'n optimum sıcaklık grafiği

(I: ▲ , PMI: ■ , PMSI: ●)

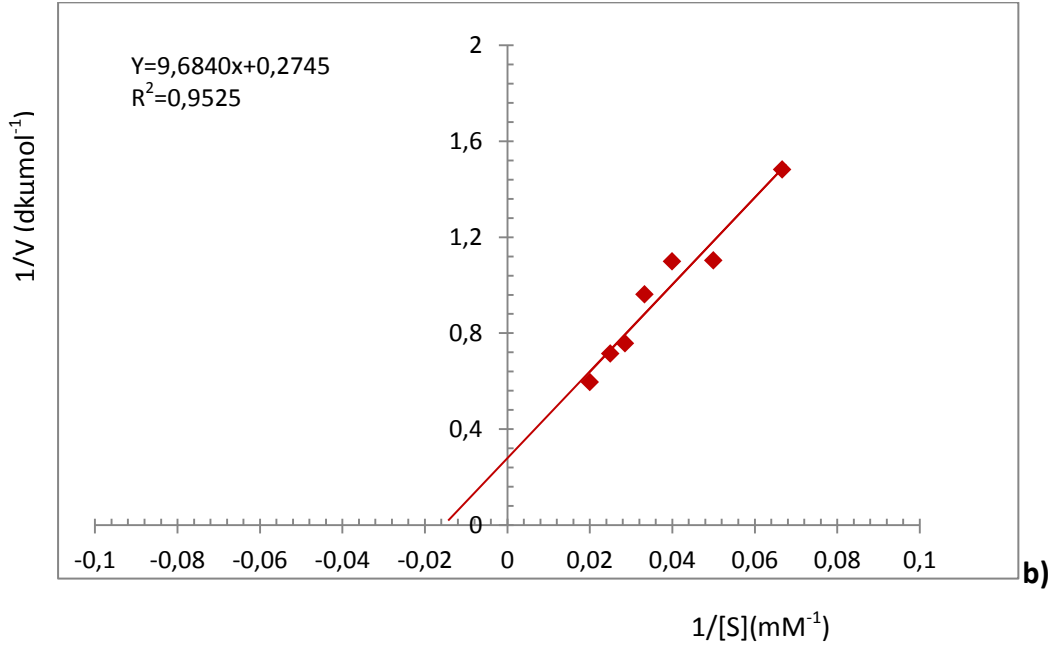
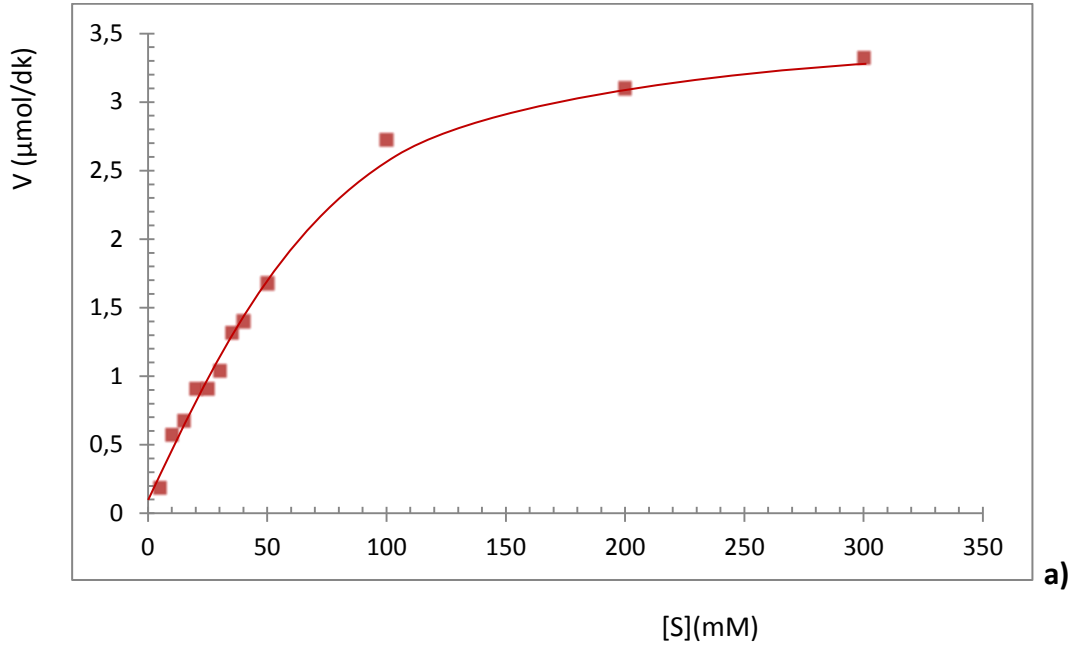
10.4.3. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Kinetik Parametrelerinin Bulunması

Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nin optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinde enzim miktarı sabit tutularak değişen substrat derişimlerinde enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Michaelis – Menten grafiği ve bu grafiklerin doğrusal kısmından Lineweaver – Burk grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafikler serbest invertaz, PMI ve PMSI için sırasıyla Şekil 10.19, 10.20, 10.21`te gösterilmiştir.



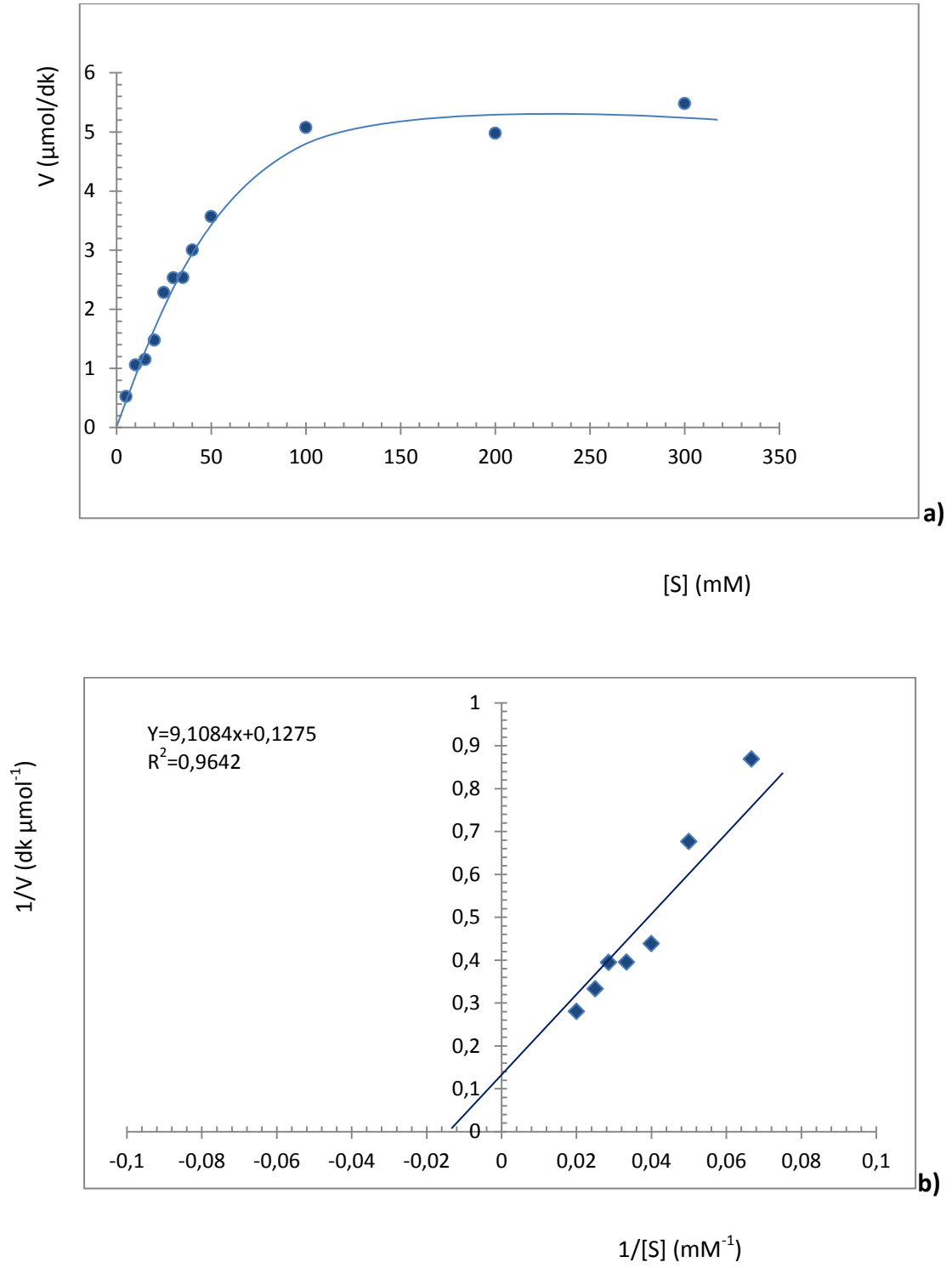
Şekil 10.19. Serbest invertazın a) Michaleis- Menten b) Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 10.19`deki grafikten serbest enzimin V_{max} değeri 1,68 µmol dk⁻¹ K_m değeri 7,17 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 10.20. PMI'nin a) Michaleis- Menten b) Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 10.20'deki grafikten PMI'nin V_{max} değeri 3,64 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ K_m değeri 35,25 mM olarak bulunmuştur.

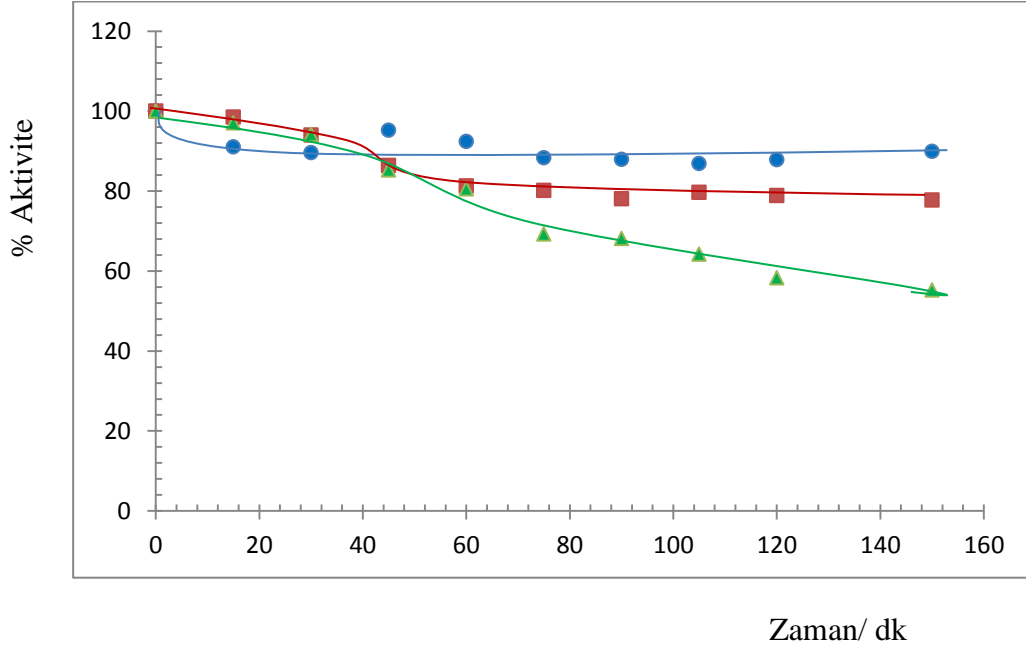


Şekil 10.21. PMSI'nin a) Michaelis- Menten b) Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 10.21`deki grafikten PMSI'nin V_{max} değeri $7,84 \mu\text{mol dk}^{-1}$ K_m değeri $71,41 \text{ mM}$ olarak bulunmuştur.

10.4.4. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

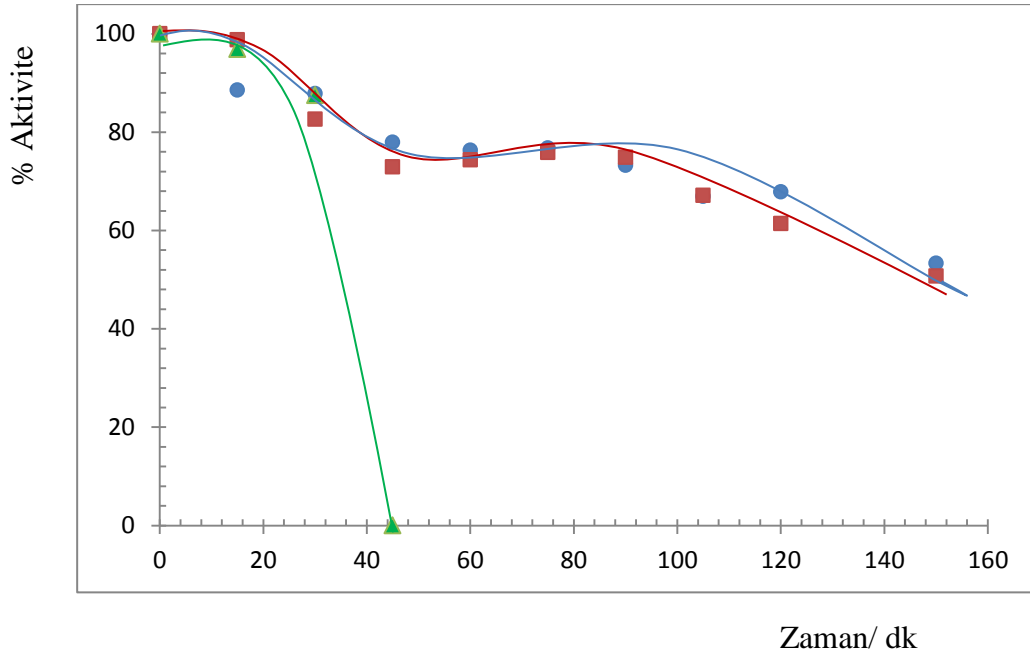
Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nin termal kararlılığının belirlenmesi için 50 °C ve 70 °C sıcaklıklarda bekletilen örneklere 150 dakika inkübasyon süresinde belli zamanlarda aktivite analizi yapılmıştır. Bulunan aktivite değerleri % aktivite olarak hesaplanıp zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 10.22 ve 10.23).



Şekil 10.22. Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nin 50 °C'ta termal kararlılığı

(I: ▲, PMI: ■, PMSI: ●)

Şekil 10.22'ten görüleceği gibi 50 °C'ta serbest enzim 80 dakikada aktivitesinin yaklaşık % 40'ını kaybetmiştir. PMI ve PMSI 150. dakikada bile aktivitelerinin % 80'ini korumuşlardır.



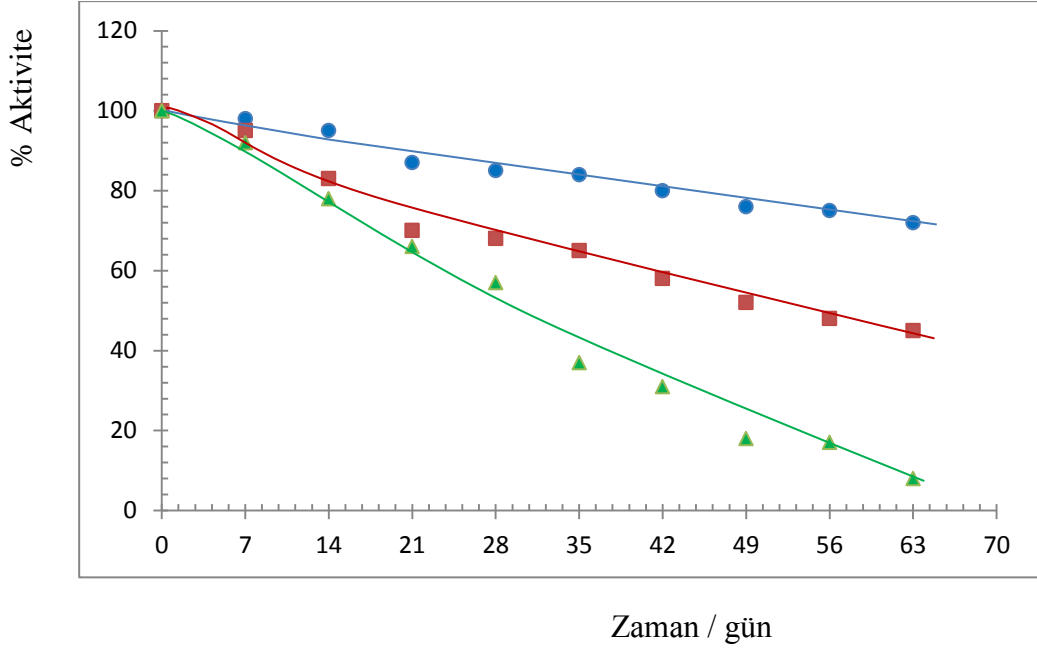
Şekil 10.23. Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nin 70 °C'ta termal kararlılığı
(I: ▲, PMI: ■, PMSI: ●)

Şekil 10.23'dan görüleceği gibi 70 °C'ta bekletilmiş olan serbest enzim ilk 20 dk aktivite gösterirken 45. dk'dan itibaren hiç bir aktivite göstermemiştir. PMI ve PMSI örneklerinde ise zamanla yavaş bir aktivite kaybı vardır ve 150. dk'da aktivitesinin % 50'sini korumuşlardır.

10.4.5. Serbest İvertaz, PMI ve PMSI'nin Saklama Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nin saklama kararlılığının belirlenmesi için optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinde sukroz hidrolizi ile aktivitesi belirlendikten sonra asetat tamponuna (pH; 4.8) konarak +4 °C'ta saklanmıştır. Serbest invertaz, PMI ve PMSI ile belli zaman aralıklarında aktivite analizi yapılmıştır. Bulunan aktivite değerleri % aktivite olarak hesaplanmış ve zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 10.24).

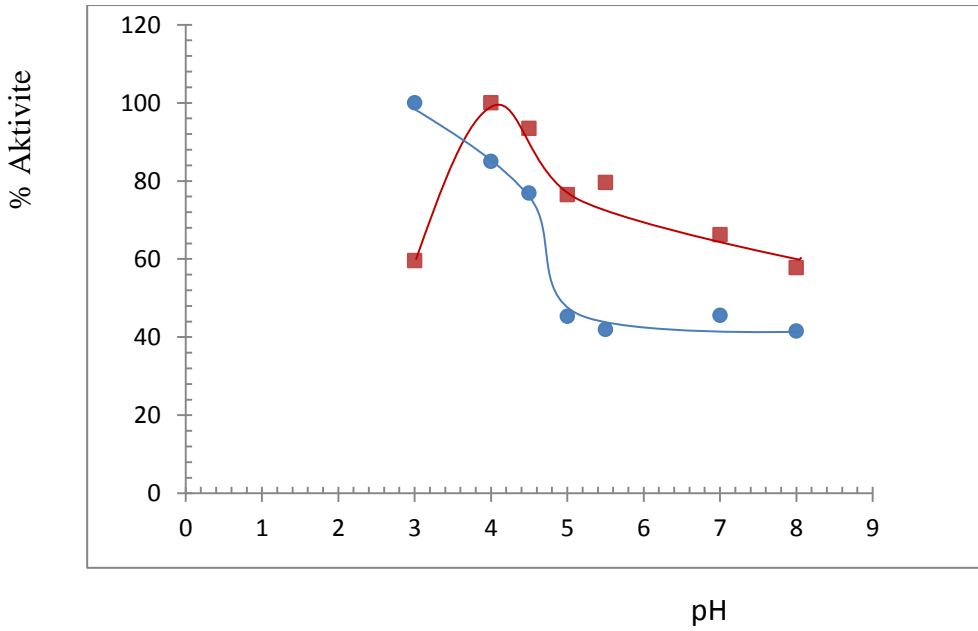
Serbest enzim saklama koşullarında 63 gün sonrasında aktivitesinin % 95'ini kaybetmiştir. Bu sürede PMI aktivitesinin % 50'sini ve PMSI ise aktivitesinin % 80'ini korumuştur. PMSI daha yüksek saklama kararlılığı göstermiştir.



Şekil 10.24. Serbest invertaz, PMI ve PMSI'nin saklama kararlılığı
(I: ▲, PMI: ■, PMSI: ●)

10.4.6. PMI ve PMSI'nin pH Kararlılığı

PMI ve PMSI'nin pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla değişik pH'larda (3-8) 30 dakika bekletilen hidrojellerle kendi optimum pH ve optimum sıcaklıklarında sukroz hidrolizi yapılmıştır. Bulunan aktivite değerlerinden % aktivite hesaplanarak pH'ya karşı grafiğe geçirilip, Şekil 10.25'de gösterilmiştir.

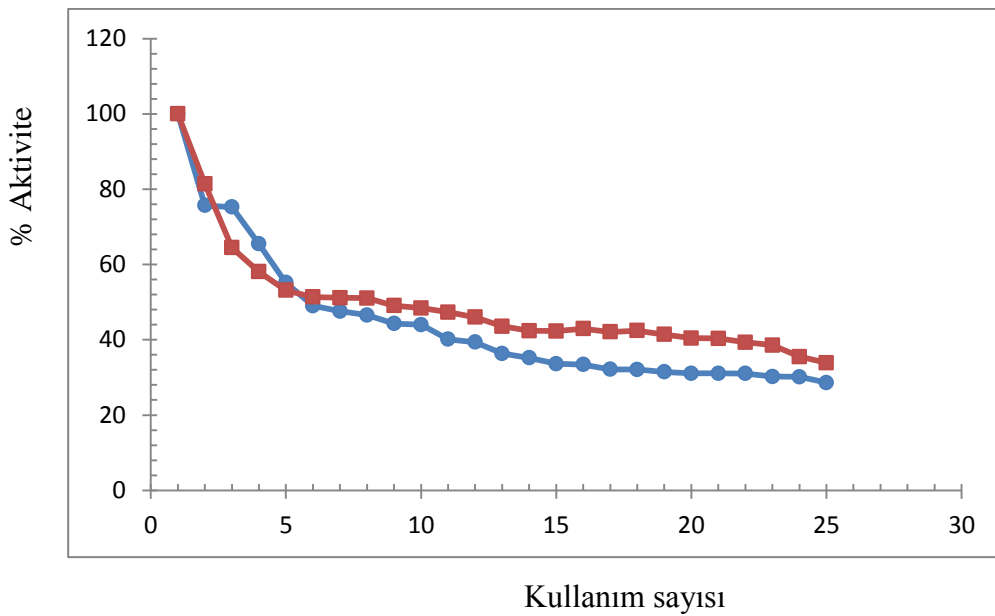


Şekil 10.25. PMI ve PMSI'nin pH kararlılığı (PMI: ■, PMSI: ●)

PMI pH; 4 ile pH; 6 arasında PMSI pH; 3 ile pH; 5.5 arasında yüksek aktivite verdiği gözlenmiştir. pH; 6 ile pH; 8 arasında ise PMI `ın % 40, PMSI `ın % 60 aktivite kaybettiği gözlenmiştir.

10.4.7. PMI ve PMSI`ın Kullanım Kararlılığı

PMI ve PMSI`ın kullanım kararlılığının bulunmasını için sukroz hidrolizi yapılan örnekler tekrar tekrar kullanılmıştır. Bulunan aktivite değerleri % aktivite olarak hesaplanarak kullanım sayısına karşı grafiğe geçirilmiştir ve Şekil 10.26`da gösterilmiştir.



Şekil 10.26. PMI ve PMSI `ın kullanım kararlılığı (PMI■ , PMSI:●)

PMI ve PMSI için ilk 6 kullanımda % 50 aktivite kaybı gözlenmiştir ve 25 kullanım sonucunda hem PMI hem de PMSI aktivitelerinin yaklaşık % 25`inin korumuşlardır.

11. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Endüstriyel alanda sıklıkla kullanılan invertaz enzimi immobilize edilip, serbest enzim ve immobilize enzimin farklı yönlerdeki kararlılıklarına bakıldığında immobilize enzimin daha kararlı olduğu görülmektedir. Bu özelliklerinden dolayı da immobilize enzimler serbest enzimin yerini almaktadır (Öztop ve Hepokur, 2007).

İnvertaz enziminin farklı desteklere immobilizasyonunu içeren çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle besin endüstrisinde önemli yere sahiptir. Bu çalışmada da farklı polimerler hazırlanıp, bu polimerin karakterizasyonunun yapılması ve immobilize enzimin özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

İmmobilize enzim hazırlanmasında seçilen destek materyal oldukça önemlidir. Çünkü desteğin yapısına bağlı olarak dezavantajlar olabilir. Destek materyalin enzimin kullanılacağı ortamda kararlı olmak, yüksek mekanik dayanıklılığa sahip olmak, substrat ve ürün difüzyonuna olanak sağlamak gibi özellikleri olmalıdır (Dizge ve ark., 2007).

Büyük oranda su tutma yeteneğine sahip, üç boyutlu, çapraz bağlı polimerler hidrojel olarak tanımlanır (Karadağ ve ark., 2004). Hidrojeller pH, sıcaklık, iyonik güç gibi çevresel değişimlerden etkilenebilirler. Hidrojellerin fiziksel ve kimyasal özellikleri hangi monomerlerden ve polimerlerden oluştuğuna bağlıdır (Karadağ ve ark., 1994). Ayrıca çözülmeyen su tutma yeteneğine sahip olduğundan biyoaktif bileşiklerin immobilizasyonunda tercih edilmektedir (Saraydın ve ark., 2001). Hidrojeller kille karıştırıldıklarında yeni bir kompozit materyal oluştururlar. Böylece kilin farklı bileşenleri adsorplama yeteneğiyle jellerin elastik ve geçirgenlik özellikleri birleştirilmiş olur. Polimer silikat kompozitler iyileştirilmiş mekanik ve materyal özelliklerine sahiptir. Killer süper adsorplayıcı olarak kompozitlerde kullanılırlar. Hem maliyeti düşürürler hem de şişme yeteneğini, termal kararlılığı ve mekanik kararlılığı artırır (Öztop ve Hepokur, 2007).

Bu çalışmada invertaz enziminin immobilizasyonu için polimer ve polimer kil kompozit hidrojelleri hazırlanmıştır. Polimerler için metakrilamit monomeri, kil olarak da sepiyolit seçilmiştir. Poli (metakrilamit) (PM) ve poli (metakrilamit)/sepiyolit (PMS) hidrojelleri çapraz bağlayıcı varlığında radikal katılma tepkimesi ile hazırlanmıştır.

Hazırlanan hidrojellerin kimyasal yapılarını belirlemek için FTIR/ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. Şekil 10.1 ve Şekil 10.2'deki spektrumlarda metakrilamit ve sepiyolite ait karakteristik bantlar görülmektedir.

Polimerler ısı etkisiyle bozunurlar. Hidrojellerde bağlı su kaybı, işlevsel grup ayrılması ve ana zincirin parçalanması basamakları gözlenir. Örneğin Çavuş S.'nin metakrilamit ile yapmış olduğu hidrojellerin ısısal bozunma analizi sonucunda üç basamaklı bir bozunma gözlemlenmiştir (Çavuş, 2010). PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojellerinin ısısal bozunmaları incelemek için TGA termogramları alınmıştır. Şekil 10.3 ve şekil 10.4 da sunulan termogramlara göre PM ve PMS hidrojellerinin üç basamaklı ısısal bozunmaya sahip olduğu görülmektedir. Bu basamaklarda hidrojeller bağlı suyu, yan zincir ayrılmasını ve sonuçta ana zincir parçalanmasını gerçekleştirmişlerdir. Her iki hidrojel de 200 °C sıcaklığa kadar önemli bir bozunma olmadan kütlelerini korumaktadır. Bu nedenle yüksek sıcaklıklarda bu hidrojellerle çalışma yapılabilir. Ayrıca termogramlardan polimere sepiyolit eklenmesinin ısısal kararlılığı arttırdığı saptanmıştır.

Polimerlerin çözücü ortamlarında şişmeleri, çözücü ve polimerin yapısına bağlıdır. Çözücü ve polimerin kimyasal yapılarının birbirine benzemesi, polimer-polimer ve çözücü molekülleri arasındaki etkileşim kuvvetlerinin, polimer-çözücü molekülleri arasındaki etkileşim kuvvetlerine yakın olması anlamına gelir. Bu yüzden şişme çalışmaları, polimerin şişme özelliği göstereceği çözücülerde yapılır (Öztop ve Hepokur, 2007). Polimerin şişmesi yapısında bulundurduğu hidroksil, karbonil, karboksil, amin gibi hidrojen bağı oluşturabilen grupları bulundurmasından kaynaklanır. Şekil 10.5 ve Şekil 10.6'de PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojellerin 25 °C ile 60 °C'deki şişme eğrilerinde şişmenin dengeye ulaşana kadar zamanla arttığı görülmektedir. Hidrojellerdeki su sever gruplar (amino ve hidroksil) şişmenin yüksek çıkmasını sağlamıştır (PM hidrojel 25 °C'ta % 342, PMS kompozit hidrojel % 247). Her iki sıcaklıkta da PM hidrojel PMS kompozitine göre daha fazla şişme özelliği gösterdiği görülmektedir. Sepiyolit eklenmesi şişmeyi azaltmıştır. Sepiyolit, çapraz bağla oluşan gözenekleri doldurarak suyla polimerin etkileşimini azaltmış olabilir. Şekil 10.7 ve şekil 10.8'de PM hidrojellerinin 25°C'de daha fazla şişme gösterdiği görülmektedir. Sıcaklık artışı şişmeyi azaltmıştır. Düşük sıcaklıklarda su ile hidrojeldeki amino gruplar arasında hidrojen bağı oluşumu nedeniyle şişme yüksektir. Sıcaklık artışı ile hidrojen bağları kopar, metakrilamitin hidrofobik gruplarının (-CH₃) etkileşimi artar

(Perez-Alvarez ve ark., 2009). Bu nedenle şişme sıcaklık artışı ile düşmüştür. Sıcaklık artışı PMS hidrojelinin şişmesini önemli oranda etkilememiştir.

PM ve PMS kompozitlerin şişmesi ikinci dereceden kinetiğe uymakta olup, şekil 10.9 ve Şekil 10.10`da gösterilen şişme hız grafiklerinden hesaplanan ve Çizelge 10.1`de belirtilen değerlere göre 25 °C`ta şişme hızlarında fark görülmezken, 60 °C`ta PM hidrojel PMS`den daha hızlı şişmiştir.

Hidrojellere suyun difüzyonunun incelenmesi için PM ve PMS kompozitlerine şekil 10.11 ve şekil 10.12`da gösterilen $\ln F - \ln t$ grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafiklerden yararlanılarak çözücünün difüzyon türünü gösteren difüzyon üsteli (n) hesaplanmıştır. Hesaplama sonucunda PM ve PMS hidrojellerinin n değeri 0,5 ile 1 arasında bulunmuştur (Çizelge 10.2). Bu aralıkta olan difüzyon türü anormal tip difüzyondur ve şişme üzerinde difüzlenme ve durulmanın aynı anda etkin olduğu difüzyon türüdür (Peppas ve Ritger, 1987).

PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojelinin farklı pH`lardaki şişme davranışlarına bakılarak şişmeye pH etkisi araştırılmıştır. Şekil 10.15 ve şekil 10.16`deki değerlere göre PM ve PMS hidrojellerinin en fazla şişmeyi pH 3`de gösterdiği ve pH değeri arttıkça şişme özelliğinin azaldığı görülmektedir. İyonlaşabilen işlevsel gruplara sahip polimerler pH duyarlı polimerlerdir. Karboksil gruplu olanların pH artışı ile şişmesi artarken amino gruplular da şişme azalır (Perez-Alvarez ve ark. 2008). Düşük pH değerlerinde metakrilamitin NH_2 grubunun iyonlaşması nedeniyle şişme yükselmiş olabilir

PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojellerinin karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra invertaz immobilizasyonunda kullanılmışlardır. İmmobilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra metakrilamit-invertaz (PMI) ve metakrilamit-sepiyolit-invertaz (PMSI) immobilize invertazları elde edilmiştir.

Serbest invertaz, PMI ve PMSI için farklı pH`lardaki aktiviteleri araştırılmış ve Şekil 10.17`de gösterilmiştir. Her bir enzim için bulunan optimum pH değerleri Çizelge 11.1`de gösterilmiştir. Serbest invertaz ve immobilize invertazların optimum pH değerlerine bakıldığında hepsinin farklı değerlerde olduğu görülür.

Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir. Genellikle

enzimlerin optimum pH değerleri 3-8 arasındadır. Kuvvetli asidik veya kuvvetli bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından tepkime hızı azalır ve sıfıra kadar düşebilir (Aksoy ve Hızır, 2006). PM ve PMS hidrojelleri enzimin asidik pH'larda denature olmasını engellemiş ve optimum pH değerini asidik bölgeye kaydırmıştır. Asidik pH değerlerinde hidrojeller yüksek şişme göstermektedir. Bu durum substratın hidrojele difüzyonunu kolaylaştırıp enzimle etkileşimini artırmış ve aktivite yüksek bulunmuştur.

Yapılan farklı çalışmalarda serbest invertaz için optimum pH değerlerinin 4.5, 5.5, 6.0, 7.0, 5.0 gibi farklı değerler aldığı saptanmıştır (Akgöl ve ark., 2001, Emregül ve ark., 2005, Manuel ve ark., 2010). Elde edilen bu sonuçlarla serbest invertazın elde edilmiş kaynağına bağlı olarak farklı pH'larda maksimum aktivite gösterebileceği gözlenmiştir. Poliyonik matriksler enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanıldığında, enzimin mikro çevresi ile tepkimenin ana çözeltisi arasında protonların farklı derişimlerde bulunmasına neden olurlar. Polianyonlar enzim etrafındaki protonları çekme eğiliminde iken polikasyonlar iterler. Dolayısıyla polimerik destek çevresindeki pH, ana çözeltinin pH değerinden farklı olabilir. pH'daki kayma aynı zamanda enzim tepkimesinin tipine ve matriksin yapısına bağlıdır. Diffüzyonel sınırlamalar nedeniyle de ana çözeltinin pH'sı tepkimenin meydana geldiği matriks çevresinin pH değerinden oldukça farklı olabilir. Literatürde poli (2-hidroksietil metakrilat-itakonikası) taneciklerine kovalent bağlanma ile invertaz immobilizasyonunda serbest invertazın pH'sı 4,5 bulunurken, immobilize enzimin pH değeri 5,5 bulunmuştur (Aksoy ve Hızır, 2006).

Enzim aktivitesi üzerinde etkili olan sıcaklık parametresi incelendiğinde, bütün kimyasal tepkimeler gibi enzimatik tepkimelerinde sıcaklık arttıkça tepkime hızı artar. Her enzimin bir optimum sıcaklığı vardır. Bu sıcaklıktan sonra aktivite düşer. Sıcaklık arttıkça önce tersiyer yapı, sonra ikincil yapı bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezinde etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir (Öztop ve Hepokur, 2007, Aksoy ve Hızır, 2006). Yapılan çalışmada serbest invertaz ve PMI'nin optimum sıcaklığı 30 °C, PMSI'nin optimum sıcaklığı 50 °C bulunmuştur. PMSI sıcaklıkla enzimde oluşacak inaktivasyonu engellemiş ve optimum sıcaklığı 50 °C'a kaydırmıştır.

Azodi M.ve ark. yaptıkları çalışmada serbest invertazın optimum sıcaklık değeri 57 °C, Miloradovic Z. ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise 60 °C olarak bulunmuştur. Aynı şekilde Cadena ve ark.'nın yaptığı çalışmada serbest invertaz, immobilize poliüretan ve

ferromagnetic dactronun optimum sıcaklıklarını 50°C olarak bulmuşlardır. (Azodi ve ark., 2011, Vujcic ve ark., 2010, Silva ve ark., 2009).

Serbest invertaz, PMI, PMSI'nin enzim kinetiği çalışmaları sonucu elde edilen verilerden Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek kinetik parametreler olan K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur (Şekil 10.19, Şekil 10.20, Şekil 10.21). Serbest invertazın, PMI ve PMSI'nin K_m ve V_{max} değerleri çizelge 10.1'de sunulmuştur. İmmobilizasyon hem K_m hem de V_{max} değerlerinde değişikliğe neden olmuştur. Çizelgedeki değerlere göre immobilize invertazların kinetik parametrelerinin serbest enziminkinden daha yüksek olduğu görülmektedir. K_m değişimi enzim konformasyonundaki değişimden çok sterik engelleme ve difüzyonal kısıtlamalara bağlıdır. V_{max} değerlerindeki artış ise enzimin aktif merkezinin immobilizasyondan etkilenmediğini göstermektedir.

Aksoy S. ve ark.'larının yaptığı invertaz immobilizasyonu çalışmasında serbest invertazın K_m değeri 15,2 mM ve V_{max} değeri $1,81 \times 10^{-4}$ mol/L.dk olarak bulunmuştur (Aksoy ve Hızır, 2006).

Işık S. ve ark.'nın yaptığı çalışmada serbest enzimin K_m değeri 59 mM, V_{max} değerinin $82,3 \mu\text{mol dk}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Polypyrrole-Inv'nin K_m değeri 53 mM, V_{max} değeri $2,6 \mu\text{mol dk}^{-1}$, poly 2-methybutyl-2-(3thienyl) acetat/ polypyrrole/Inv'nin K_m değeri 87mM, V_{max} değerinin $6,1 \mu\text{mol dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Işık ve ark., 2003).

Özgen C. ve ark. invertaz immobilizasyonu ile yaptığı çalışmada serbest invertazın K_m ve V_{max} değerlerini 24.3 mM ve $82.3 \mu\text{mol/dk.mL}$ olarak bulmuştur. Bu çalışmada immobilize olmuş polipirol ve kopolimer matrikslerin K_m değerleri benzerken V_{max} değerleri serbest enzimden daha küçüktür. Bu azalma enzim ve substratın bir araya gelmesini engelleyen bir mikro çevre sağlayan bu matrikslerin enzim katalizli tepkimenin tepkime hızını yavaşlatmasından ileri gelebileceğini açıklamışlardır (Özgen ve Büyükbayram, 2005).

Cadena ve ark.'nın yaptığı çalışmada serbest invertazın V_{max} değeri yaklaşık $445.3 \text{ U/mg protein}$ ve K_m değeri 61.2 mM olarak bulunmuştur. İmmobilize invertazın V_{max} 'ı ise $42.0 \text{ U/mg protein}$, K_m değeri ise 46.5 mM bulunmuştur (Cadena ve ark., 2010).

Çizelge 11.1. Serbest invertaz, PMI ve PMSI için optimum sıcaklık, optimum pH ve kinetik parametreleri

	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH	K _m (mM)	V _{max} (μmol dk ⁻¹)
I	30	6	7,17	1,66
PMI	30	4	35,25	3,64
PMSI	50	3	71,41	7,84

İmmobilizasyonun enzimin termal kararlılığını arttırdığı bulunmuştur (Şekil 10.22, Şekil 10.23). İmmobilizasyon serbest enzimde görülebilecek denaturasyonu önlediği için sıcaklıkla fazla aktivite kaybı gözlenmemiştir.

Zoran Vujcic ve ark.'nın yaptığı çalışmada 50 °C'ta serbest enzim 10 saat sonrasında aktivitesinin % 50'sini kaybetmiştir fakat immobilize enzimin aktivitesinde değişme olmamıştır. 70 °C'ta ise serbest enzim beşinci dakikadan sonra aktivitesinin tamamını kaybederken immobilize enzim % 50'sini kaybetmiştir. 30 dk sonrasında ise %10 aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Vujcic ve ark., 2010).

İmmobilize enzimler serbest enzime göre daha uzun süre saklanabilmektedir. PMI ve PMSI enzimleri serbest enzime göre yüksek saklama kararlılığı göstermiştir (Şekil 10.24). Sulu çözeltideki serbest enzim üç boyutlu yapının bozulması yani denaturasyon nedeniyle zamanla hızlı bir şekilde aktivite kaybeder. İmmobilize enzimler ise denaturasyona karşı kararlı haldedirler. PMSI, PMI'ya göre daha fazla saklama kararlılığı göstermiştir.

Akgöl S. ve ark. magnetic polivinil alkol üzerine invertaz immobilizasyonu yapmışlardır. Bu çalışmalarında serbest enzimin 28 gün sonrasında aktivitesini tamamen kaybettiğini, immobilize enzimin ise aynı zamanda aktivitesinin %62'sini koruduğunu bulmuşlardır (Akgöl ve ark., 2001).

Farklı pH'larda bekletildikten sonra gerçekleştirilen denemelerde immobilize invertazların yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 10.25). Bu durum pH 3-8 gibi geniş bir aralıkta enzimlerin çalışabileceğini göstermiştir. İmmobilizasyon pH değişimi ile denaturasyonu engellemiştir. Ayrıca PMI'nın pH kararlılığı PMSI'ya göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

İmmobilize enzimler tekrar tekrar kullanılabilirken serbest enzim için zor bir durumdur. Serbest enzim çözeltide çözünmüş halde bulunduğundan tekrar kullanılması için saflaştırma işlemi gerektirir. Bu nedenle serbest enzimin kullanım kararlılığından söz edilemez. Kullanım kararlılığı için çizilen grafik (Şekil 10.26) incelendiğinde immobilize enzimlerin kullanım kararlılığının yüksek olduğu saptanmıştır.

Poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matriksine uygulanan immobilize invertaz ile aktivite kaybı olmadan 50 ölçüm yapılmıştır (Dizge ve ark., 2007).

Mazı H.'nin yaptığı çalışmada immobilize invertazın 15 kullanım sonrasında aktivitesinin % 76'sını koruduğunu belirtmiştir (Mazı ve Kibarer, 2006).

Yapılan çalışmalar sonunda elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir.

1. PM hidrojel ve PMS kompozit hidrojel radikal katılma tepkimesiyle hazırlanmıştır.
2. Hidrojellerin FTIR analizlerinde karakteristik bantlar saptanmıştır.
3. Isısal analiz sonucu hidrojellerin üç basamaklı ısısal bozunma gösterdiği, PMS kompozitinin ısısal olarak PM'ye göre daha kararlı olduğu saptanmıştır.
4. Damıtık su içinde PM hidrojelleri PMS kompozit hidrojellerinden daha fazla şişme özelliği göstermiştir.
5. PM hidrojelinin damıtık sudaki şişmesi sıcaklıkla azalırken PMS kompozit hidrojelinin şişmesinde değişim gözlenmemiştir.
6. PM ve PMS hidrojellerinin difüzyon türü anormal tip difüzyon olarak bulunmuştur.
7. Şişmenin pH ile değişimi incelendiğinde en yüksek şişmenin her iki hidrojelde de pH 3'te olduğu, pH artışı ile şişmenin azaldığı gözlenmiştir.
8. İvertaz, PM ve PMS hidrojellerine immobilize edilerek PMI ve PMSI oluşturulmuştur.
9. Optimum pH analizinde PM ve PMS destekleri enzimin optimum pH'sını asidik bölgeye çekmiştir.
10. Optimum sıcaklık değerleri PMI ile serbest enzimde aynı bulunurken, PMSI'da daha yüksek bulunmuştur.
11. İmmobilizasyon K_m ve V_{max} değerlerini değiştirmiştir.
12. İmmobilize enzimler serbest enzime göre yüksek termal kararlılık göstermiştir.

13. İmmobilize enzimler serbest enzime göre yüksek saklama kararlılığı göstermiştir.
14. PMSI, PMI'ya göre daha fazla saklama kararlılığı göstermiştir.
15. Her iki immobilize enzimin pH kararlılığı yüksektir.
16. PMI'nın pH kararlılığı PMSI'ya göre daha yüksek bulunmuştur.
17. PMI ve PMSI hidrojellerinin kullanım kararlılıkları yüksektir.

Sonuç olarak PM hidrojeli ve PMS kompozit hidrojelinin yüksek termal kararlılık, yüksek pH kararlılığı, yüksek saklama kararlılığı göstermeleri nedeniyle invertaz immobilizasyonu için uygun destekler olduğu ve optimum pH ve optimum sıcaklıklarına bakılarak istenen uygulamalarda kullanılabilecekleri saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Akgöl S., Kaçar Y., Denizli A., Arica M.Y., 2001, Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres, *Food Chemistry*, 74, 281-288
- Alkan M., Doğan M., Demirbaş Ö., 2006, Kil mineralleri yüzeyine bazı biyomoleküllerin immobilizasyonu ve elektrokinetik özellikleri, *Doktora Tezi*
- Alvarez A., 1984, Palygorskite-Sepiolite occurrences, genesis and uses sepiolite properties and uses; Singer A., Galan E., *Elsevier*, 253-287
- Alvaro-Benito, M., De Abreu, M., Fernández-Arrojo, L., Plou, F.J., Jiménez-Barbero, J., Ballasteros, A., Polaina, J., Fernández- Lobato, M., 2007, Characterization of a β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose, *Journal of Biotechnology*, 132: 75- 81
- Anbarasan R., Arvind P., Dhanalakshmi V., 2011, Synthesis and Characterization of Polymethacrylamide–Clay Nanocomposites, *Journal of Applied Polymer Science*, 121, 563–573
- Athawale V.D. , Padwaldesai M.P., 1998, Free radical graft copolymerization of methacrylamide onto agar, *European Polymer Journal*, 35,1237-1243
- Avoce D., Liu H. Y., Zhu X. X., 2003, N-Alkylacrylamide copolymers with methacrylamide derivatives of cholic acid: synthesis and thermosensitivity, *Polymer*, 44, 1081-1087
- Azodi M., Falamaki C., Mohsenifar A., 2011, Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 154-160
- Bajpai S.K., Singh S., 2005, Analysis of swelling behaviour of poly (methacrylamide-co-methacrylicacid) hydrogels and effect of synthesis conditions on water up take, *Reactive & Functional Polymers*, 66, 431-440
- Bingöl D., N. Tekin, Alkan M., 2010, Brilliant Yellow dye adsorption onto sepiolite using a full factorial design, *Applied Clay Science*, 50, 315-321
- Cadena P. G., Wiggers F. N., Silva R. A., Filho J. L. L., Pimentel M. C.B., 2010, Kinetics and bioreactor studies of immobilized invertase on polyurethane rigid adhesive foam, *Bioresource Technology*, 102, 513-518
- Chen H., Zheng M., Sun H., Jia Q., 2007, Characterization and properties of sepiolite/polyurethane nanocomposites, *Materials Science and Engineering A*, 445–446, 725–730

- Chen T., Huang Y., Yang C.S., Yang C.C., Wang A., Sung H., 2008, Insights into the catalytic properties of bamboo vacuolar invertase through mutational analysis of active site residues, *Phytochemistry*, 70, 25-31
- Crini G., 2006, Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal, *Bioresource Technology*, 1061-1085
- Cirpan A., Alkan S., Toppare L., Hepuzer Y., Yagci Y., 2002, Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate, *Bioelectrochemistry*, 59, 29-33
- Çavuş S., 2010, Poly(methacrylamide-co-2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) Hydrogels: Investigation of pH- and Temperature-Dependent Swelling Characteristics and Characterization, *Journal of Polymer Science*, 48, 2497-2508
- Dizge N., Gunaydın O., Yılmaz F., Tanrıseven A., 2007, Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matrix, *Biochemical Engineering Journal*, 40, 64-71
- Ekici S., Işıkver Y., Saraydın D., 2006, Poly (acrylamide-sepiolite) composite hydrogels: preparation, swelling and dye adsorption properties, *Polymer Bulletin*, 57, 231-241
- Emregül E., Sungur S., Akbulut U., 2005, Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization, *Food Chemistry*, 97, 591-597
- Giustetto R., Wahyudi O., Corazzari I., Turci F., 2011, Chemical stability and dehydration behaviour of a sepiolite / indigo maya blue pigment, *Applied Clay Science*, 52, 41-50
- Guisan J.M., 2006, immobilization of enzymes and cells, Humana Press, Madrid
- Guimarães L.H.S., Terenzi H.F., Polizeli M.L.T., Jorge J.A., 2007, Production and characterization of a thermostable extracellular β - D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources, *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 52-57.
- Işık S., Alkan S., Toppare L., Cianga I., Yağcı Y., 2003, Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/ polypyrrole matrices, *European Polymer Journal*, 39, 2375-2381
- Giustetto R., Wahyudi O., Corazzari I., Turci F., 2011, Chemical stability and dehydration behaviour of a sepiolite / indigo maya blue pigment, *Applied Clay Science*, 52, 41-50
- Jhon M. S., Kim S. R., Yuk S. H., 1997, A semi-interpenetrating network system for a polymer membrane, *European Polymer Journal*, 33, 1009-1014
- Karadağ E., Saraydın D., Güven O., 2004, Water absorbency studies of γ -radiation crosslinked poly(acrylamide-co-2,3-dihydroxybutanedioic acid) hidrogels, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 225, 489-496

- Karadağ E, Saraydın D., Öztop H.N., Güven O., 1994, Adsorption of bovine serum albumin to acrylamide-itaconic acid hydrogels, *Biomaterials*, 15, 917-920
- Kotwal S. M., Shankar V., 2009, Immobilized invertase, *Biotechnology Advances*, 27, 311-322
- Küçükçelebi H., Taşer M., Armağan N., 2000, Ilgın-Harami kömür yatağı kilinin kristal yapısı, *S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17, 59-66
- Lemic J., Tomasevic-Canovic M., Djuricic M., Stanic T., 2005, Surface modification of sepiolite with quaternary amines, *Journal of Colloid and Interface Science*, 292, 11-19
- Manuel J., Raj L., Chauhan G.S., Azmi W., J.- H. Ahn, 2010, Kinetics study of invertase covalently linked to a new functional nanogel, *Bioresource Technology*, 102, 2177-2184
- Mazı H., Kibarer G., 2006, Synthesis and characterization of poly(maleic anhydride-*alt*-1-hexene), its graft poly(ethylene oxide) derivatives and immobilization of invertase enzyme onto the copolymer matrix, *Doktora Tezi*
- Moreno S., Sanchez Y., Rodriguez L., 1990, Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemistry Journal*, 267, 697-702
- Mormeneo S., Sentandreu R., 1982, Regulation of invertase synthesis by glucose in *saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology*, 152, 14-18
- Nelson D. L., Cox M.M., 2005, Biyokimyanın İlkeleri, Palme yayıncılık, 3. Baskı, (Çev: Kılıç N.), Ankara, 243-290
- Nie J., Lovell G., Bowman C.N., 2000, Synthesis and characterization of *N*-isopropyl, *N*-methacryloxyethyl methacrylamide as a possible dental resin, *Biomaterials*, 22, 535-540
- Önal M., Çelik M., 2006, Polymethacrylamide/Na-montmorillonite nanocomposites synthesized by free-radical polymerization, *Materials Letters*, 60, 48 – 52
- Özgen C., Büyükbayram A. E., 2005, Immobilization of invertase, polyphenol oxidase and glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene-capped polytetrahydrofuran and pyrrole, *Doktora Tezi*
- Öztop H.N., Hepokur C., Saraydın D., 2009, Acrylamide-sepiolite based composite hydrogels for immobilization of invertase, *Journal of Food Science*, 74, 1750-3841
- Öztop H.N., Hepokur C., 2007, İvertazın değişik desteklere immobilizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*
- Öztop H.N., Çetinus Ş.A., 2003, Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 889-894

- Öztop H.N., Hepokur C., Saraydın D., 2010, Poly(acrylamide/maleic acid)-sepiolite composite hydrogels for immobilization of invertase, *Polymer Bulletin*, 64, 27-40
- Öztop H.N., Öztop A. Y., Karadağ E., Işıkver Y., Saraydın D., 2002, Immobilization of *saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol, *Process Biochemistry*, 37, 651-657
- Öztop H.N., Çetinus Ş. A., 1999, Immobilization of catalase on chitosan film, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 497-501
- Paleologos E.K., Kontominas M.G., 2005, Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection, *Journal of Chromatography A*, 1077, 128-135
- Peppas N.A., Ritger P.L., 1987, A simple equation for description of solute release I. Fickian and Non-Fickian from non swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or disc, *Journal of Controlled Release*, 5, 23-26
- Perez-Alvarez L., Saez-Martinez V., Hernaez E., Katime I., 2008, Synthesis and characterization of pH-sensitive microgels by derivatization of npa-based reactive copolymers, *Materials chemistry and physics*, 112, 516-524
- Perez-Alvarez L., Saez-Martinez V., Hernaez E., Katime I., 2009, *Macromolecular chemistry and physics*, 210, 1120-1126
- Reddy A., Maley F., 1996, Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 13953-13958
- Rodriguez J., Perez J.A., Ruiz T., 2001, Expression of *Pichia anomala* invertase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in two different active forms of hypoglycosylated invertase, *Archives of Microbiology*, 175, 189-197
- Saldamlı İ., 2005, Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi yayınları, Ankara, 80-82
- Saraydın D., Karadağ E., Üzüm Ö.B., 2005, Water uptake in chemically crosslinked poly(acrylamide-co-crotonic acid) hidrogels, *Materials and Design*, 26, 265-270
- Saraydın D., Öztop H. N., Karadağ E., Öztop A. Y., Işıkver Y., Güven O., 2001, The use of immobilized *saccharomyces cerevisiae* on radiation crosslinked acrylamide-maleic acid hydrogel carriers for production of ethyl alcohol, *Process Biochemistry*, 37, 1351-1357
- Saraydın D., Öztop H.N., Karadağ E., Çaldıran Y., Güven O., 1999, Influence of some amino acids on the dynamic swelling behaviour of radiation-induced acrylamide hydrogel, *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 82, 115-125
- Sarıtaş S., Arık H., 1996, Sepiyolitten karbo-termal indirgeme ve nitrüleme yoluyla silisyum nitrür (Si₃N₄) seramik tozu üretimi parametrelerinin araştırılması, *Doktora Tezi*

Silva R.A., Cadena P.G., Jeronimo R.A.S., Melo J.M., Lima F. J.L., Pimentel M.C.B., 2009, Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast film and ferromagnetic dacron, *Bioresource Technology*, 101, 1595-1602

Singh B., Sharma N., Chauhan N., 2007, Synthesis, characterization and swelling studies of pH responsive psyllium and methacrylamide based hydrogels for the use in colon specific drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 69, 631–643

Singh B., Sharma V., Kumar A., Kumar S., 2009, Radiation crosslinked polymerization of methacrylamide and psyllium to develop antibiotic drug delivery device, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 338–347

Solomons G., Frhyle C., 2002, Organik Kimya, Literatur yayınları, 7. Baskı,(Çev: Okay G. ve Yıldırım Y.), İstanbul, 1258

Şahin Y., 2000, Kompozit Malzemeler Giriş, Gazi Kitabevi, Ankara, 13-17, 25-32

Tekin G., 2004, Perlit ve sepiyolitin amonyumheptamolibdat ile modifikasyonu ve elektrokinetik özellikleri, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Balıkesir, 6.2

Wang Y., Ye F., Jeong E.K., Sun Y., Parker D.P., Lu Z.R., 2007, Noninvasive visualization of pharmacokinetics, biodistribution and tumor targeting of poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] in mice using contrast enhanced MRI, *Pharmaceutical Research*, 24, 1208-1216

Vogl O., 1996, Polymers for the 21st century, *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 33, 963-993

Vujcic Z., Miloradovic Z., Milovanovic A., Bozic N., 2010, Cell Wall invertase immobilisation within gelatin gel, *Food Chemistry*, 126, 236-240

Zheng X., 2005, Applications of Polymer-Layered Clay Nanocomposites, Milwaukee, Wisconsin, Maguette Üniversitesi Doktora Tezi.

<http://www.sigma-aldrich.com/catalog/search/ProductInformation/sigma/GAGO20>

<http://www.maden.org.tr>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Arzu ÇAKET
Doğum Yeri ve Tarihi Erzurum, 23/06/1987
Yabancı Dil İngilizce
E-posta Adresi C_K_T051@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Yab. Dil Ağırlıklı Aksaray Lisesi, 2005
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, 2010, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya

İş Tecrübesi

Şarkışla Lider Kimya Öğretmeni, 2010-2013
Final Dershanesi
Özel Lale Koleji Kimya Öğretmeni, 2013-

Sertifikalar

Bilgisayar Sertifikası