

**JELATİN HİDROJELLERİNİN SENTEZLENMESİ,
ŞİŞME/BOZUNMA DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ
VE UYGUN İMMOBİLİZE LİPAZ-JELATİN HİDROJEL
SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI**

Gülen Oytun AKALIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2011
ANKARA**

Gülen Oytun AKALIN tarafından hazırlanan “JELATİN HİDROJELLERİNİN SENTEZLENMESİ, ŞİŞME/BOZUNMA DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE UYGUN İMMOBİLİZE LİPAZ-JELATİN HİDROJEL SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehlika PULAT

.....

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet SAÇAK

.....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Mehlika PULAT

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Selma ATEŞ

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih 05/01/2011

Bu tez ile G.. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülen Oytun Akalın

**JELATİN HİDROJELLERİNİN SENTEZLENMESİ,
ŞİŞME/BOZUNMA DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE
UYGUN İMMOBİLİZE LİPAZ-JELATİN HİDROJEL
SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Gülen Oytun Akalın

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2011**

ÖZET

Sunulan çalışmada lipaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere bir seri jelatin hidrojel üretilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda farklı oranlarda glutaraldehit (GA) çapraz bağlayıcısı içeren jelatin hidrojelleri hazırlandı ve bu hidrojellerin jelleşme yüzdeleri hesaplandı. Çapraz bağlayıcı miktarının artmasıyla jelleşme yüzdelerinin arttığı belirlendi. Hidrojellerin şişme davranışları zamana karşı incelendi. Tüm hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla arttığı ve yaklaşık 48 saat sonra dengeye ulaştığı gözlemlendi. Artan çapraz bağlayıcı miktarıyla şişme değerlerinin azaldığı belirlendi. 37°C’de ve pH=7,4’de en çok şişen hidrojinin G-1 hidroji olduğu saptandı. Hidrojellerin şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi incelendi. Sıcaklık artışıyla şişme değerlerinin arttığı ve 40°C’de en yüksek değerine ulaştığı gözlemlendi. Ayrıca hidrojellerin şişme davranışlarının pH ile değişimi de incelendi. Hidrojellerin düşük pH değerlerinde çok şiştiği, pH arttıkça şişme değerlerinin düştüğü ve pH=5,0’dan sonra şişme değerlerinin yeniden yükseldiği gözlemlendi. Hidrojellerin bozunma davranışları 37°C’de ve pH=7,4’de zamana karşı incelendi ve en düşük çapraz bağlayıcı içeren

G-1 hidrojelinin 14 günde, diğer hidrojellerin ise yaklaşık olarak 30 günde tamamen bozunduğu gözlemlendi.

Jelleşme ve şişme/bozunma testlerinin sonuçlarından yararlanılarak lipaz immobilizasyonuna uygun olarak G-2 hidrojeli seçildi. En verimli lipaz immobilizasyon koşullarını belirlemek amacıyla, seçilen G-2 hidrojeline karbodiimid (CDI) kullanılarak kovalent bağlanma yöntemi ile farklı derişimlerde lipaz immobilize edildi. İmmobilizasyonun gerçekleştiğini belirlemek amacıyla FTIR analizleri yapıldı. İmmobilize ve serbest lipazların aktivitelerine bakıldı ve serbest lipazın immobilize lipazlara göre daha aktif olduğu belirlendi. Daha sonra serbest ve immobilize lipazların kinetik parametreleri, K_m ve V_{mak} değerleri, tayin edildi. Serbest ve immobilize lipazlar için K_m değerleri sırasıyla 0,290 mM, 0,422 mM, V_{mak} değerleri sırasıyla 0,089 mM.dak⁻¹, 0,080 mM.dak⁻¹ olarak bulundu. Serbest ve immobilize lipazlar 4°C'de 48 gün depolandıklarında, başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %32 and %92'sini korudukları bulundu. Lipaz immobilize jelatin hidrojelinin 10 kez kullanımı sonucunda başlangıç aktifliğinin %68'ini koruduğu saptandı.

Bilim Kodu : 201.1.117
Anahtar Kelimeler : Hidrojel, jelatin, glutaraldehit, lipaz, enzim immobilizasyonu.
Sayfa adedi : 89
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Mehlika Pulat

**GELATIN HYDROGELS SYNTHESIS, SWELLING/DEGRADATION
BEHAVIOURS INVESTIGATION AND FORMATION OF SUITABLE
IMMOBILIZED LIPASE-GELATIN HYDROGELS SYSTEMS
(M. Sc. Thesis)**

Gülen Oytun Akalın

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
January 2011**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to produce a serial of gelatin hydrogel for utilizing in lipase immobilization. In order to do that gelatin hydrogels containing glutaraldehyde crosslinking in different values were prepared and the gelation percentages were calculated. It was found that with increase of the amount of crosslinking, gelation percentages increased as well. The swelling behaviour of hydrogels were investigated as a function of time. The percentage swelling of all the hydrogels were increased with time and after 48 hours constant percentage swelling were observed. It was determined that with increase of the amount of crosslinking, the swelling percentages increased as well. G-1 hydrogel was determined as the most swollen hydrogel at pH=7.4 and 37°C. The swelling behaviours of hydrogels were also investigated by changing the temperature. The swelling values increased with temperature and maximum swelling percentage were observed at 40°C for all the hydrogels. The swelling behaviours of hydrogels were also investigated by changing pH. It was observed that all the hydrogels were swollen more at low pH values but the percentage swelling values decreased with the increasing pH values

and after at pH=5.0 it reincreased. The degradation behaviours of hydrogels were observed in terms of time at pH=7.4 and 37°C. It was observed that G-1 hydrogel containing the least crosslinking degraded completely in 14 days, other hydrogels degraded completely in almost 30 days.

By benefiting from the results of the gelation and swelling/degradation tests, G-2 hydrogel was chosen as in accordance with lipase immobilization. In order to determine the most efficiency lipase immobilization conditions, lipase was immobilized to the chosen G-2 hydrogel in different concentrations with the method of covalent bond by using carbodiimide (CDI). The FTIR analyzes were made for confirming the realization of the immobilization. The activities of immobilized and free lipases were examined and it was seen that free lipase was more active than immobilized lipases. After the kinetic parameters of the free and immobilized lipases, K_m and V_{max} , were assayed. K_m and V_{max} were calculated for free lipase as K_m value is 0.290 mM, V_{max} value is 0.089 mM.dak⁻¹ and for immobilized lipase K_m value is 0.422 mM, V_{max} value is 0.080 mM.dak⁻¹. After 48 days of storage at 4°C, free and immobilized lipases retained %32 and %92 their orginal activities, respectively. Gelatin hydrogel immobilized lipase used repeatedly 10 times in a day and it was retained %68 their orginal activitiy.

Science Code : 201.1.117

Key Words : Hydrogels, gelatin, glutaraldehyde, lipase, enzyme immobilization.

Page Numbers : 89

Advisor : Prof.Dr. Mehlika PULAT

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, tezimin yönlendirilmesi ve yürütülmesi sırasında büyük emeği geçen ve yakın ilgisiyle beni sürekli destekleyen sayın hocam Prof. Dr. Mehlika PULAT'a, yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü zorlukta yanımda olan değerli arkadaşlarım Nur TAN'a ve Özlem EROL'a, desteğini hep hissettiğim sevgili arkadaşlarım Yasemin ÜNAL'a ve Fadime ŞAHİN'e, her türlü sıkıntılarımda ve sevinçlerimde hep yanımda olan, benden desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hidrojeller	3
2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması	4
2.1.2. Hidrojellerde suyun konumu.....	9
2.1.3. Hidrojellerin şişmesi	10
2.1.4. Biyomalzeme olarak hidrojeller	11
2.2. Biyobozunur Polimerler	12
2.3. Enzimler ve Sınıflandırılmaları.....	14
2.3.1. Enzim aktifliğini etkileyen faktörler	17
2.3.2. Enzim immobilizasyonu.....	19
2.3.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri	21
2.4. Çalışmada Kullanılan Temel Kimyasal Maddeler	27
2.4.1. Jelatin.....	27
2.4.2. Glutaraldehit (GA)	29

Sayfa

2.4.3. Lipaz	30
2.4.4. Karbodiimid (CDI)	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	33
3.2. Jelatin Hidrojellerin Hazırlanması	34
3.3. Jelatin Hidrojellerin Jelleşme Yüzdelерinin Gravimetrik Olarak Tayini	34
3.4. Jelatin Hidrojellerinin Şişme Davranışlarının Tayini.....	35
3.4.1. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişiminin incelenmesi.....	35
3.4.2. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişiminin incelenmesi.....	36
3.4.3. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişiminin incelenmesi.....	36
3.5. Jelatin Hidrojellerinin Bozunma Davranışlarının Tayini	36
3.6. Lipaz İmmobilize Edilmiş Hidrojel Üretimi.....	37
3.7. Jelatin Hidrojele İmmobilize Olan Lipaz Enziminin MiktarınınTayini	38
3.8. FTIR.....	39
3.9. p-NPP'ın UV-spektrofotometrik Analizi.....	39
3.10. Serbest Lipazın Aktivite Tayini	41
3.11. İmmobilize Lipazların Aktivitelerinin Tayini	42
3.12. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitelerine Substrat Derişiminin Etkisi.....	43
3.12.1. Serbest lipazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi.....	44

Sayfa

3.12.2. İmmobilize lipazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi.....	44
3.13. Serbest Lipazın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi.....	45
3.14. İmmobilize Lipazın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi.....	45
3.15. İmmobilize Lipazın Aktivitesinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	45
4. DENEYSEL BULGULAR VE YORUM.....	46
4.1. Jelatin Hidrojel Oluşum Mekanizması ve Jelleşme Yüzdeleri.....	46
4.2. Jelatin Hidrojellerinin Şişme Deneylerinin Sonuçları	48
4.2.1. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi	48
4.2.2. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi	50
4.2.3. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişimi	51
4.3. Jelatin Hidrojellerinin Bozunma Davranışları	52
4.4. FTIR Analizleri.....	53
4.5. Farklı Lipaz Derişimlerinin İmmobilize Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi ve Serbest Lipaz Aktivitesi ile Karşılaştırılması.....	57
4.6. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi.....	60
4.7. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi.....	62
4.8. İmmobilize Lipaz Aktivitesinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	63
5. SONUÇLAR	65

Sayfa

KAYNAKLAR	68
EKLER	76
EK-1. pH=7,4 fosfat tamponunun hazırlanması	77
EK-2. pH=2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,4; 8,0; 10,0; 12,0; Britton–Robinson tampon (BRT) çözeltilerinin hazırlanması	78
EK-3. pH=6,9 fosfat tamponunun hazırlanması	79
EK-4. Hidrojellerin zamana karşı ortalama % şişme değerleri	80
EK-5. Hidrojellerin ortalama %şişme değerlerinin sıcaklıkla değişim sonuçları	81
EK-6. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin pH ile değişim sonuçları	82
EK-7. Hidrojellerin zamana karşı ortalama %bozunma (% kütle kaybı) değerlerinin sonuçları.....	83
EK-8. Serbest lipazın aktivitesine substrat derişimin etkisinin sonuçları.....	84
EK-9. İmmobilize lipazın aktivitesine substrat derişimin etkisinin sonuçları.....	85
EK-10. Serbest lipazın aktivitesine depolama süresinin etkisinin sonuçları	86
EK-11. İmmobilize lipazın aktivitesine depolama süresinin etkisinin sonuçları	87
EK-12. İmmobilize lipazın aktivitesine kullanım sayısının etkisinin sonuçları	88
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Hidrojellerin sınıflandırılmaları.....	5
Çizelge 3.1. Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan maddelerin miktarları	34
Çizelge 4.1. Hidrojellerin jelleşme yüzdeleri.....	48
Çizelge 4.2. İmmobilize ve serbest lipazların aktiviteleri	59
Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lipazların K_m ve V_{mak} değerleri	61

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Çapraz bağlı hidrojin yapıları	4
Şekil 2.2. Kimyasal hidrojinlerin oluşum tepkimeleri.....	6
Şekil 2.3. Fiziksel çapraz bağlanma	8
Şekil 2.4. Hidrojinin ağ yapısını şematik gösterimi	9
Şekil 2.5. Şişmiş bir hidrojeldeki suyun bulunma çeşitleri	10
Şekil 2.6. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli	16
Şekil 2.7. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi.....	18
Şekil 2.8. Enzim immobilizasyon yöntemleri	21
Şekil 2.9. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.10. Jelatinin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.11. Glutaraldehitin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.12. Lipazın etkilediği hidroliz tepkimesi	30
Şekil 2.13. CDI ile aktifleştirilmiş jelatin materyaline lipaz immobilizasyonu.....	38
Şekil 3.1. 4,00 mg/mL (pH=7,4) lipaz çözeltisinin 190-800 nm arasındaki tam spektrumu.....	38
Şekil 3.2. Lipazın kalibrasyon grafiğı (λ_{mak} = 300 nm'de, pH=7,4).....	39
Şekil 3.3. 0,50 mM p-NPP çözeltisinin 190-800 nm arasındaki tam spektrumu	40
Şekil 3.4. p-NPP'ın kalibrasyon grafiğı	41
Şekil 3. 5. Lipazın katalizlediği tepkimenin şematik gösterimi.....	42

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Çapraz bağlı jelatin hidrojel oluşumunun tepkime mekanizması	47
Şekil 4.2. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin zamanla değişim grafiği (37°C, pH=7,4).....	49
Şekil 4.3. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi grafiği (pH=7,4 , 48 saat)	50
Şekil 4.4. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin pH ile değişimi grafiği (37°C,48 saat).....	52
Şekil 4.5. Hidrojellerin ortalama %bozunma değerlerinin zamanla değişim grafiği (37°C, pH=7,4).....	53
Şekil 4.6. Saf jelatinin FTIR spekturumu	54
Şekil 4.7. CDI ile aktifleştirilmiş jelatin hidrojelinin FTIR spektrumu	55
Şekil 4.8. Saf lipazın FTIR spektrumu	56
Şekil 4.9. Lipaz immobilize edilmiş jelatin hidrojelinin FTIR spektrumu	57
Şekil 4.10. Serbest (-●-) ve immobilize lipazlar (-●-) için Lineweaver-Burk grafiği	60
Şekil 4.11. Serbest (-●-) ve immobilize lipazların (-●-) maksimum aktivitesinin depolama süresi ile değişiminin grafiği	62
Şekil 4.12. İmmobilize lipazın maksimum aktivitesinin kullanım sayısı ile değişiminin grafiği	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
m_s	Şişmiş hidrojel kütlesi
m_i	Kuru hidrojel kütlesi
w	Şişmiş jel disk kütlesi
w_0	Şişmemiş jel disk kütlesi
k_i	Hidrojellerin 48 saat sonunda en çok şişmiş halinin kütlesi
k_s	Bozunmakta olan hidrojellerin t anındaki kütlesi
ΔA	Absorbans değişimi
A_0	t = 0 anında absorbans değeri
S	Substrat derişimi
t	Zaman
V	Aktiflik (hız)
U	Aktiflik (ünite)
V_{mak}	Maksimum hız
K_m	Michaelis-Menten sabiti
Kısaltmalar	Açıklama
GA	Glutaraldehit
CDI	N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorid
p-NPP	p-Nitrofenil palmitat
BRT	Britton-Robinson tamponu

1. GİRİŞ

Hidrojeller, suda çözünmeden şişebilen, üç boyutlu, çapraz bağlı polimerik yapılar olup, kimyasal veya fiziksel çapraz bağların varlığı nedeniyle suda çözünmezler [1]. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı; kimyasal bağlar, iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir [2].

Hidrojeller, tıbbi uygulamalar açısından sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle son yıllarda ilgi odağı durumundadırlar. Biyouyumlulukları, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle tıpta ve farmasötik alanlarında yaygın olarak kullanılırlar [3]. Kullanım yerlerine kontak lens, biyosensörler, yapay kalp, kas ve deri materyalleri, kontrollü ilaç salım sistemleri ve enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli örnekler verilebilir [4].

Jelatin biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevsel özelliklere sahip olan doğal ve biyobozunur bir polimerdir. Jelatin, hayvan derisinin, kemiğinin ve bağlayıcı dokuların temelini oluşturan, lifli bir protein olan kollajenin, termal bozunmasıyla veya fiziksel ve kimyasal bozunmasıyla elde edilir. Biyobozunur olmasında ve toksik özelliğe sahip olmamasından dolayı jelatin, eczacılıktan, gıda endüstrisine; endüstriyel uygulamalardan tıbbi alanlara kadar yaygın olarak kullanılır. Jelatin sahip olduğu bu özelliklere rağmen düşük mekanik kararlılığa sahiptir fakat fiziksel veya kimyasal olarak kolayca çapraz bağlanabildiği için mekanik kararlılığı artırılabilir [5,6].

Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilen, biyokimyasal tepkimelerin ilerlemesini ve düzenlenmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir [7]. Enzimler yüksek katalitik etkinliğe ve yüksek seçiciliğe sahip olmalarına karşın saflaştırılmaları pahalı olup, ortam koşullarına karşı dayanıklılıkları da azdır [8,9]. Bu problemlerin üstesinden gelmek amacıyla enzimler katı veya çözünmeyen bir desteğe immobilize edilir ve böylece enzimlerin hem işlevsel kararlılıkları artırılır hem de onların defalarca kullanılmaları sağlanır. Ayrıca

immobilizasyon, substratların ürünlere dönüştürülmesinden sonra enzimlerin, substrat ve ürünlerle birlikte bulunduğu çözeltiden ayrılmasını da kolaylaştırır. İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre daha yüksek verim elde ederler ve daha ekonomiktirler [10]. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride, organik sentezlerde, analitik ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır [8,9].

Endüstriyel öneme sahip enzimlerden biri de lipaz enzimidir. Bu enzim gliserin ile yağ asitlerinden oluşan esterleri hidroliz eder. Hem sulu hem de susuz ortamda, gerçekleşmesi güç tepkimeleri katalizleyebilmelerinden dolayı da en önemli biyokatalizörler arasında yer alır. Bu yüzden endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmobilizasyonun genel avantajlarından ötürü, lipaz genellikle immobilize olarak endüstride kullanılmaktadırlar [11].

Sunulan çalışmada lipaz immobilize edilmiş jelatin hidrojelinin üretimi ve bu lipaz–hidrojel sisteminin etkinliğinin incelenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda ilk olarak farklı oranlarda glutaraldehit (GA) çapraz bağlayıcısı kullanılarak bir seri jelatin hidrojellerinin hazırlanması ve bu hidrojellerin şişme/bozunma davranışlarının belirlenmesi hedeflendi. Şişme/bozunma deneylerinin sonuçlarından yararlanarak, lipaz immobilizasyonunda kullanılacak uygun hidrojin seçilmesine ve lipazın jelatin hidrojele kovalent bağlama yöntemiyle immobilize edilmesine karar verildi. İmmobilizasyon için uygun lipaz derişimini belirlemek amacıyla, seçilen hidrojel örneğe immobilizasyon işleminin farklı derişimdeki lipaz çözeltilerinde yürütülmesi amaçlandı. İmmobilizasyon için uygun lipaz derişimi belirlendikten sonra serbest ve immobilize lipazların aktivitelerine bakılmasına karar verildi. Serbest ve immobilize lipazların aktivitelerine substrat derişiminin etkisinin de incelenmesi planlandı. Ayrıca immobilize lipaz-hidrojel sisteminin aktifliğine depolama süresinin ve kullanım sayısının etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

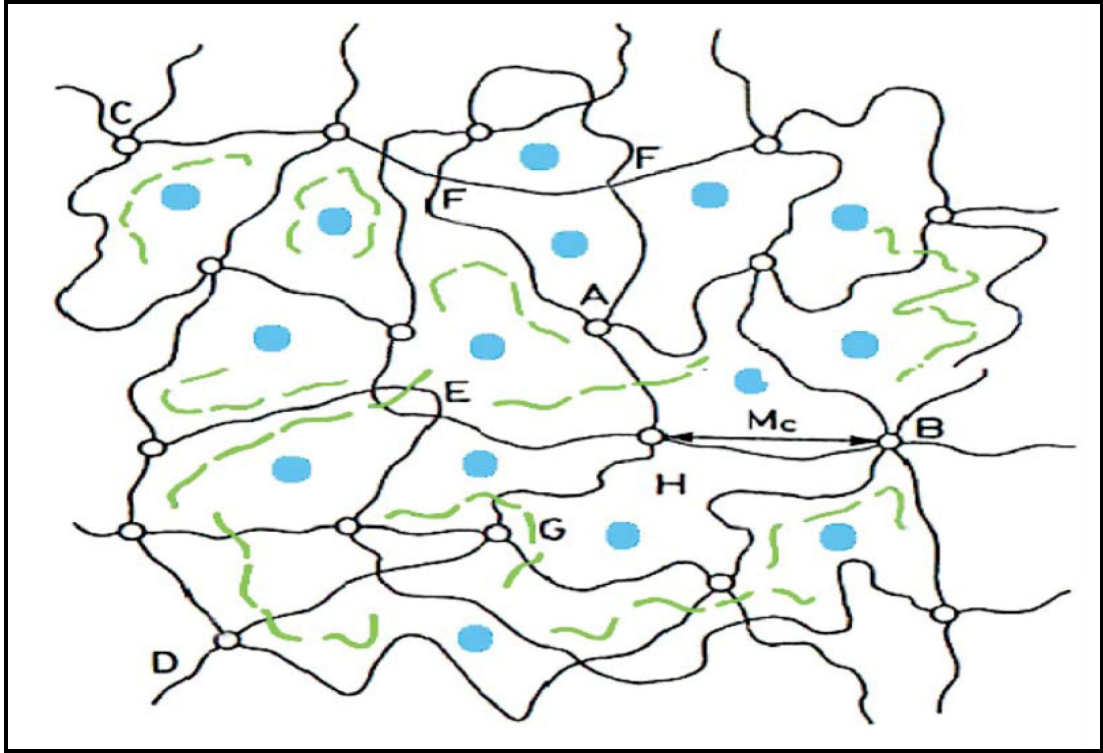
Bu bölümde çalışma konumuzla ilgili genel bilgiler alt başlıklar halinde sunulmuştur.

2.1. Hidrojeller

Hidrojeller, su içerisinde çözünmeden şişebilme özelliğine sahip, çapraz bağlı, üç boyutlu ağ yapılı polimerlerdir [12,13]. Su içeriği kendi kütlesinin %100'ünden fazla olan hidrojellere de süper absorbant denir [14,15]. Su dışında çözücülerde en az %20 ve daha fazla miktarlarda şişebilen jeller ise kserojel olarak adlandırılır [16,17]. Yapılarında çok fazla miktarda su bulundurma, yumuşak ve esnek olma gibi birçok fiziksel özelliklerden dolayı hidrojeller, canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük bir benzerlik gösterirler [18,3].

Hidrojeller, su sever olmaları nedeniyle hidrofil polimerler olarak da adlandırılırlar. Üç boyutta çapraz bağlanmalarla oluşan ağ yapısındaki bağlar kovalent ya da iyoniktir. Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincirinde ya da yan dallarında hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğine sahip su sever grupların bulunması gerekir. Bu gruplardan dolayı bağlı duruma geçen su nedeniyle çapraz bağlı polimer hacim ve kütle artışıyla şişmeye başlar. Çapraz bağlı polimerdeki su sever grupların fazla sayıda olması daha fazla şişmeye sebep olur. Bir hidrojelin çapraz bağlı yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir [19,20].

Kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla hidrojellerin üç boyutlu yapısı gerçekleşir [2]. Hidrofobik etkileşimler, fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimler olduğundan, jelin şişme davranışını doğrudan etkilemektedir. Fiziksel çapraz bağlı jellerin dış çevre değişimine fazlaca duyarlı oldukları bilinmektedir [2,21].



Şekil 2.1. Çapraz bağlı hidrojinin yapısı. **A:** Dört fonksiyonlu çapraz bağlar, **B:** Çok fonksiyonlu çapraz bağlar, **C-D:** Zincir uçları, **E:** Dolaşmış ve birbirine karışmış polimer zincirler, **F:** İki zincir takılması, **G:** Çapraz bağlanmamış küçük zincirler, **Mc:** İki çapraz bağ merkezi arasındaki zincirin molekül kütlesi, **H:** Çapraz bağlar arasındaki boşluk, **•**: Çapraz bağlar arasındaki boşluklara difüzlendi çözünü.

2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojel, hazırlama yöntemlerine, iyonik yüklerine, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma durumlarına bağlı olarak sınıflandırılabilirler [2,22,23]. Bu sınıflandırma Çizelge 2.1'de şematik olarak gösterilmiş ve önemli hidrojel türlerinden bazıları alt başlıklar halinde açıklanmıştır.

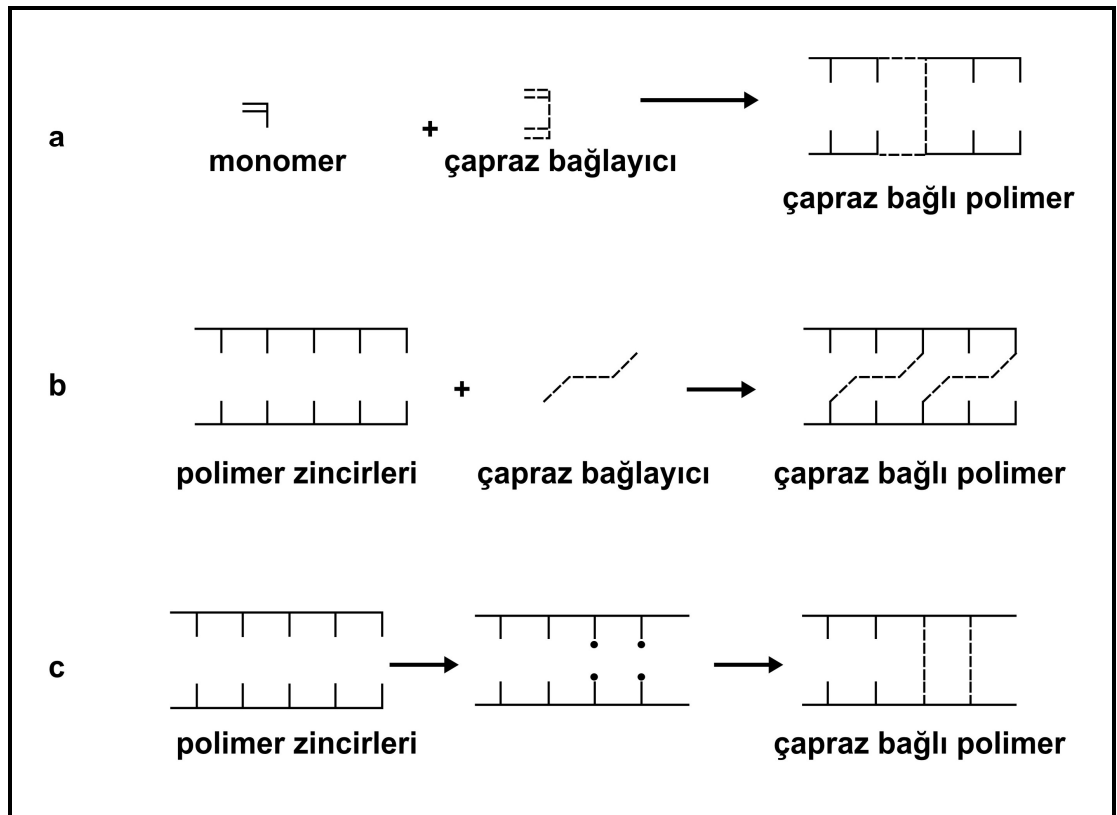
Çizelge 2.1. Hidrojellerin sınıflandırılmaları

✕ Hazırlama yöntemine göre
❖ Homopolimer hidrojeller
❖ Kopolimer hidrojeller
❖ Çoklu polimer hidrojeller
❖ IPN (interpenetrating networks) hidrojeller
✕ İçerdikleri yan gruplara göre
❖ Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller
❖ İyonik hidrojeller
— Anyonik (negatif yüklü) hidrojeller
— Katyonik (pozitif yüklü) hidrojeller
— Poliamfolitik hidrojeller
✕ Fiziksel yapılarına göre
❖ Amorf hidrojeller
❖ Yarı - kristalin hidrojeller
❖ Hidrojen bağlı hidrojeller
✕ Çapraz bağlanma durumlarına göre
❖ Fiziksel hidrojeller
❖ Kimyasal hidrojeller
✕ Kaynaklarına göre
❖ Doğal hidrojeller
❖ Sentetik hidrojeller
✕ Su içeriklerine göre
❖ Düşük şişme dereceli (%20-50) hidrojeller
❖ Orta şişme dereceli (%50-90) hidrojeller
❖ Yüksek şişme dereceli (%90-99,5) hidrojeller
❖ Süper-absorbant (>%99,5) hidrojeller
✕ Kimyasal kararlılıklarına göre
❖ Biyobozunur hidrojeller
❖ Biyobozunmayan hidrojeller

Tek bir hidrofilik monomerden oluşturulan hidrojellere homopolimer hidrojeller denir. İki monomerin çapraz bağlanması ile hazırlanan ve monomerlerinden en az bir tanesi hidrofilik yapıda olan hidrojellere ise kopolimer hidrojeller denir. Çapraz bağlanma kovalent ya da iyonik olarak gerçekleşebilir [23].

Çapraz bağlanma durumlarına göre hidrojeller; kimyasal hidrojeller ve fiziksel hidrojeller olarak ikiye ayrılırlar. Çapraz bağlı hidrojellerdeki polimer zincirleri birbirlerine güçlü kovalent bağlarıyla bağlanmışlardır [24,25].

Kimyasal hidrojeller: Zincirler arası kuvvetli kimyasal bağlarla çapraz bağlanmanın gerçekleştiği hidrojellerdir. Sıcaklık, pH ya da çözücü bileşiminin değişmesi ile zincirler birbirlerinden ayrılamaz, bu yüzden çözünmezdirler [13,26].

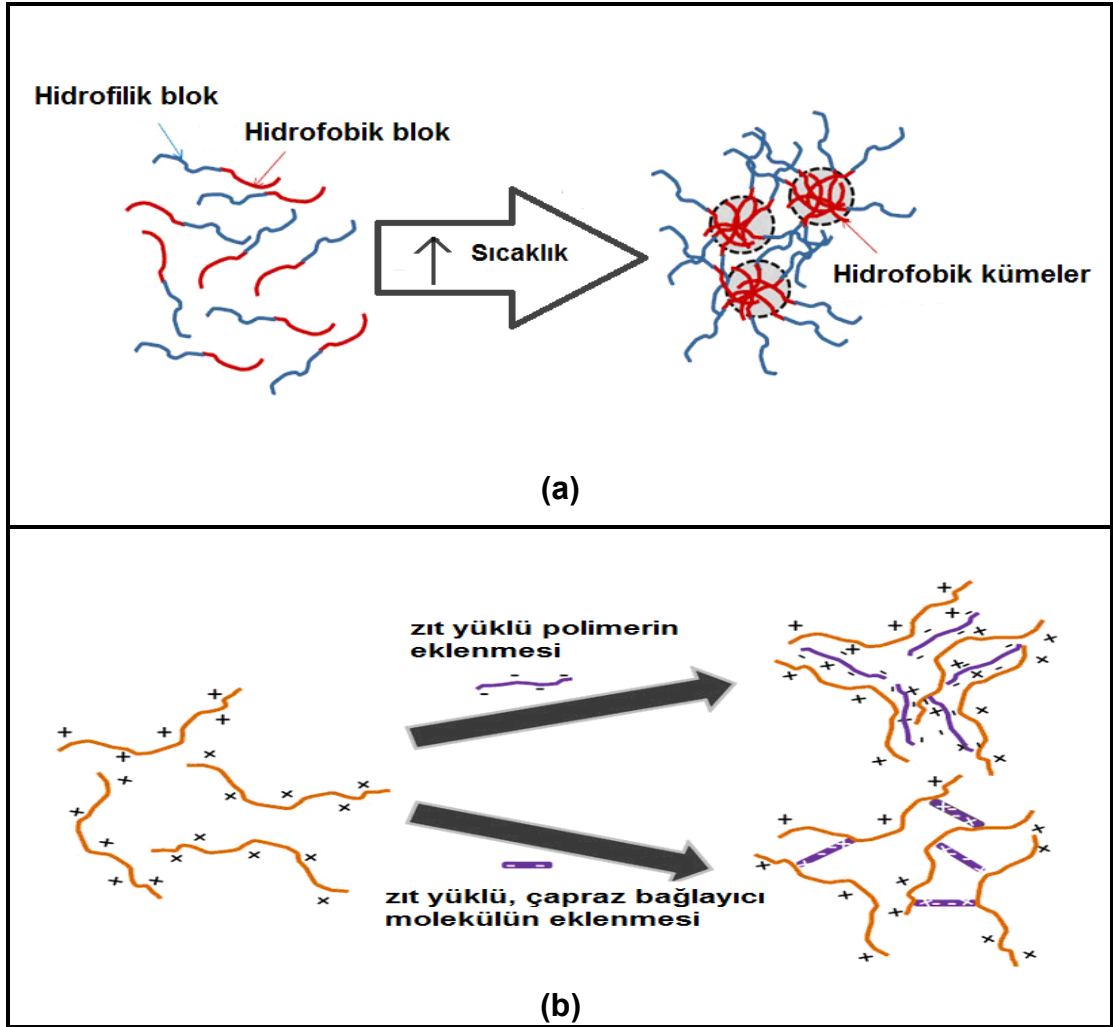


Şekil 2.2. Kimyasal hidrojellerin oluşum tepkimeleri.

Şekil 2.2'de kimyasal hidrojenlerin oluşum tepkimeleri sunulmuştur. Tepkime, monomerden polimer oluşumu sırasında çapraz bağlayıcının ana zincirde yer alması şeklinde olabileceği gibi (a), oluşmuş polimer zincirlerinin çapraz bağlayıcı ile kovalent bağlarla bağlanması şeklinde de (b) olabilmektedir. Ayrıca çapraz bağlayıcı kullanılmaksızın, iyonlaştırıcı ışınlar ile çapraz bağlanma (c) gerçekleştirilerek de kimyasal hidrojel elde edilebilmektedir. İyonlaştırıcı ışınlar, suda ve havada basit molekülleri iyonlaştıracak kadar enerji taşıyan elektromagnetik yayınlardır [27]. Şekil 2.2.a'da verilen tepkimede, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilenbisakrilamid, etilen glikol dimetakrilat, 1,4 bütandiol dimetakrilat, gibi iki fonksiyonlu veya trimetilol propantriakrilat, trimetilol propantrimetakrilat gibi üç fonksiyonlu çapraz bağlayıcılar kullanılabilir. Şekil 2.2.b'de verilen tepkime tiplerinde GA, formaldehit, asetaldehit gibi çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır [25,27].

Fiziksel hidrojenler: Zincirler arası hidrojen bağları, iyonik bağlar, koordinasyon bağları, hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel etkileşimler ile çapraz bağlanmanın gerçekleştiği hidrojenlerdir. Bunlar sıcaklık, pH ya da çözücü bileşiminin değişmesi ile homojen bir çözelti oluştururlar. Şekil 2.3'de hidrofobik ve iyonik etkileşimler sonucu fiziksel hidrojenlerin oluşumu gösterilmektedir.

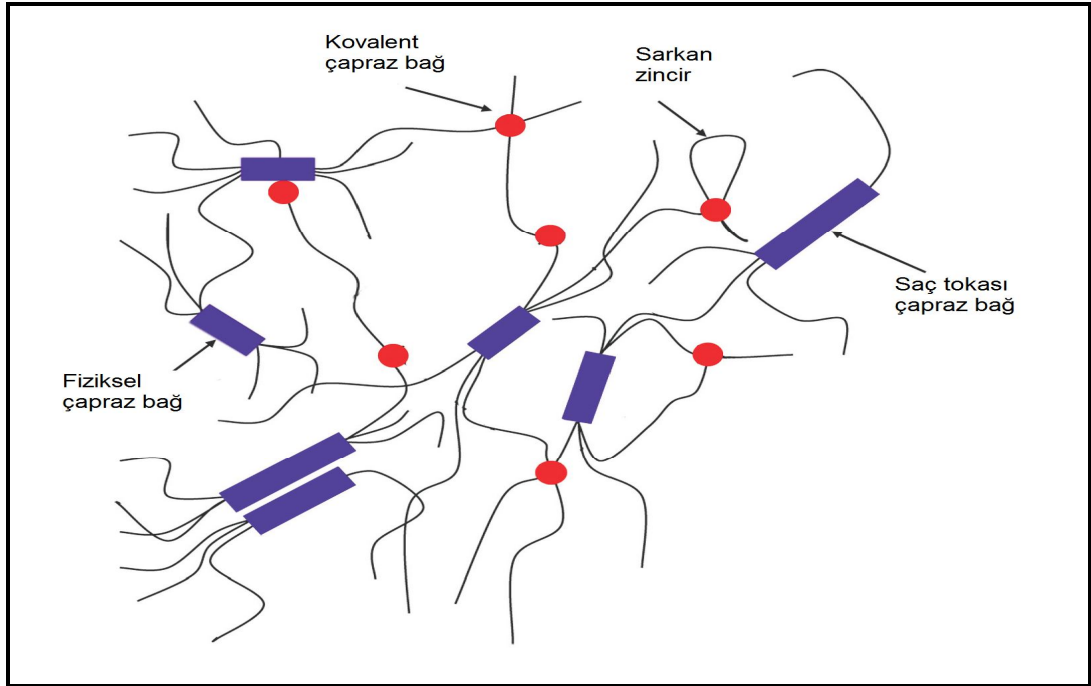
Hidrofobik etkileşimler sonucu hidrojel oluşumunda, hidrofobik grupların aşırı polimerizasyon yöntemiyle hidrofilik polimer zincirlerine bağlamasıyla veya bir blok kopolimer sentezlenmesiyle amfilik (hidrofilik ve hidrofobik grupların her ikisini de içeren yapı) bir polimer elde edilir. Bu amfilik polimerler düşük sıcaklıkta suda çözünebilirler. Sıcaklık arttıkça hidrofobik grupların etrafındaki su miktarı azalır ve hidrofobik gruplar kendi aralarında kümelenerek hidrojel oluştururlar. Jelleşmenin oluşturduğu sıcaklık; polimerin derişimine, hidrofobik bloğun uzunluğuna ve polimerin kimyasal yapısına bağlıdır [28].



Şekil 2.3. Fiziksel çapraz bağlanma; a) Hidrofobik etkileşim b) İyonik etkileşim

İyonik etkileşimler sonucu hidrojel oluşumunda, zıt yüklü iki polimer arasında veya zıtlı yüklü bir çapraz bağlayıcı ile polimer arasında medyana gelen yük etkileşimleri sonucu hidrojel oluşumu gerçekleşir [28].

Hidrojellerde fiziksel ve kimyasal çapraz bağlanma Şekil 2.4'de görüldüğü gibi bir arada bulunabilir. Yapıda aynı zamanda fiziksel bağlı iki veya üç zincirin birbirine bağlanması sonucu saç tokası çapraz bağı olarak adlandırılan fiziksel ağ oluşumu da meydana gelebilir [29].

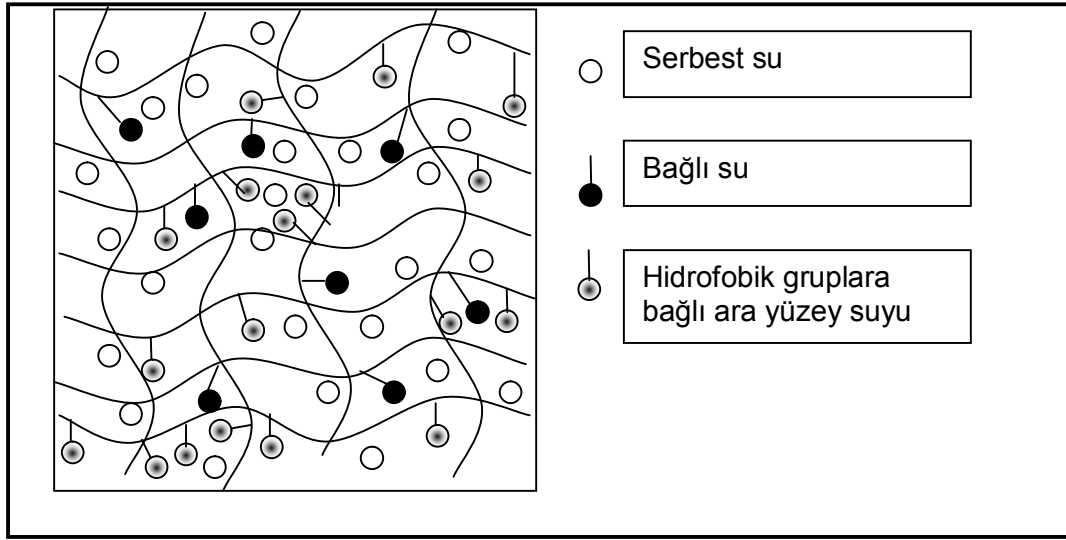


Şekil 2.4. Hidrojelin ağ yapısının şematik gösterimi

2.1.2. Hidrojellerde suyun konumu

Çapraz bağlı homopolimerik veya kopolimerik yapıların hidrojel olarak tanımlanabilmesi için yapısında $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-COOR$ gibi polar ve hidrofilik grupların bulunması gerekir [30,31]. Bu gruplar su ile etkileşerek hidrojen bağları oluştururlar. Bağlı duruma geçen su moleküllerinin varlığı ile hidrofilik fonksiyonel gruplar çevresinde kütsel bir büyüme olur ve çapraz bağlı polimer şişmeye başlar. Hidrofilik grupların fazlalığı ile şişmenin miktarı arasında bir ilişki vardır [32]. Şişmiş bir hidrojelde Şekil 2.5’de görüldüğü gibi üç tür su bulunmaktadır [33].

- **Bağlı su:** Polimerin polar grupları ile hidrojen bağları yapan sudur.
- **Ara yüzey suyu:** Polimerin hidrofobik grubu çevresinde toplanan ve sıkıca bağlı olmayan sudur.
- **Serbest ya da kütle suyu:** Polimerin gözeneklerini dolduran su, normal su gibi davranır ve polimerle etkileşmez.



Şekil 2.5. Şişmiş bir hidrojeldeki suyun bulunma çeşitleri

2.1.3. Hidrojellerin şişmesi

Şişme, polimer yapısındaki belirli bir hacmin ani değişimidir. Şişme yalnızca küçük çözücü moleküllerinin polimerin gözenek ve boşluklarına dolarak polimer fazına geçmesi olayı değildir.

Şişme sırasında çözücü molekülleri yapısal boşluklara girerken, polimerin süper moleküler yapılarının arasını zorla açar. Buna yapılar arası şişme denir. Eğer çözücü molekülleri yapıların içine girerse, makromoleküller zorla açılır. Buna da yapı içi şişme denir. Çözücü içeriği artarken, polimer yapısı yavaş yavaş birbirinden ayrılır ve çözeltide içinde çözücü bulunan oynak bir polimerik ağ yapı meydana gelir [32].

Şişme, polimer moleküllerinin çok büyük olmasından dolayı tek yönlü karışmadır. Küçük molekülü bir sıvının polimerdeki bir çözeltisi olan şişmiş polimer, saf haldeki küçük molekülü sıvı tabakası ile belli bir süre için birlikte bulunur. Biraz sonra, polimer zincirleri yeterli bir miktarda birbirlerinden uzaklaştıkları zaman, çözücü molekülleri polimer içine yavaş yavaş difüzyonla başlar. Burada daha derişik bir çözelti tabakası ile daha

seyreltik bir çözelti tabakası bir arada bulunur. Bir süre daha geçtikten sonra, bu iki tabakanın derişimleri birbirine eşit olur ve tek fazlı homojen bir sisteme oluşur.

Şişme sınırlı veya sınırsız olabilir. Sınırsız şişme kendiliğinden çözeltiye dönüşen şişmedir. Böyle bir olaya çözünme denir. Sınırlı şişme ise küçük moleküllü sıvılar ile polimerlerin etkileşmesidir. Sıvıların polimer tarafından tutulma aşaması sınırlandığı zaman, polimerin kendiliğinden çözünmesi mümkün olmaz yani polimer zincirleri tam olarak ayrılamazlar. Sonuçta birisi küçük moleküllü sıvının polimerdeki çözeltisi ve diğeri saf haldeki küçük moleküllü sıvı olmak üzere iki faz bir arada bulunur. Bu fazlar açıkça gözle görülebilir bir ara yüzey ile ayrılmıştır ve dengededir.

Şişme, polimerik ağ yapılarının karakteristik bir özelliğidir. Çapraz bağlanma miktarına bağlı olarak polimerik ağlar çözünmeden çok yüksek miktarda sıvı absorplayabilirler [34].

2.1.4. Biyomalzeme olarak hidrojeller

Hidrojellerin biyomalzeme olarak kullanımlarındaki avantajları aşağıdaki gibi verilebilir [35].

- ❖ Hidrojeller suda çözünen maddeler için geçirgen olduklarından atık monomerler, başlatıcılar, katalizörler, stabilizatörler ve diğeri safsızlıklar yapıdan kolaylıkla ayrılabilir.
- ❖ Hidrojeller, vücut sıvılarına karşı az ya da çok geçirgen olduklarından, besin, oksijen gibi yararlı maddelerin geçişine engel oluşturmazlar.
- ❖ Hidrojeller yumuşaktır. Hidrojel implantının etrafında oluşan doku tabakası ince ve dayanıklıdır ayrıca kalınlaşma eğilimi de yoktur.
- ❖ Hidrojeller, mukoza zarı ve dokulara düşük yapışma özelliği gösterirler.
- ❖ Kuru hidrojeller, bazı yollarla belli miktarda su absorplayabilirler. Bu özellik, aşırı miktardaki vücut sıvılarının atılmasında kullanılmaktadır.

- ❖ Şişmiş hidrojellerdeki suyun bir kısmı, polimer yapıda belli büyüklükteki moleküller (özellikle ilaçlar) için difüzyon yolları sağlar. Aynı zamanda polimerik yapı, sahip olduğu örgü nedeniyle büyük moleküller, hücreler ve bakteriler için bariyer gibi davranmaktadır.

Hidrojeller çok iyi su tutabilme ve sulu ortamda şişebilme yeteneklerinden dolayı biyoteknoloji, biyomühendislik, biyomedikal, eczacılık, tarım, veterinerlik, yiyecek endüstrisi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomateryal özelliğe sahip hidrojeller, biyotıp, eczacılık, veterinerlik gibi alanlarda; kontrollü salınım sistemleri, yapay organ yapımı, kontakt lens yapımı, enzim immobilizasyon sistemleri, ilaç taşıyıcı sistemler, kemik hastalıkları tedavisi için materyal, sentetik kıkırdak, yara örtü/zarı, ameliyat ipliği ve buna benzer pek çok uygulamada etkin olarak kullanılırlar [36,37].

2.2. Biyobozunur Polimerler

Biyobozunur polimerleri tam olarak anlayabilmek için öncelikli olarak bazı teknik terimlerin tanımını yapmak gereklidir [38,39].

- Parçalanma: Malzemelerinin çeşitli bozunma mekanizmaları ile çok küçük parçalara ayrılmasıdır.
- Bozunma (degradasyon): Malzemenin kimyasal yapısında geri dönüşümsüz olarak meydana gelen, genellikle bütünlük, yapı, molekül ağırlığı ve mekanik davranışı gibi özelliklerindeki gözlenen azalma ile tanımlanabilen belirgin değişiktir. Bozunma çevresel koşullardan etkilenir ve belirli bir süreçte bir ya da daha fazla adımda gerçekleşir.
- Bozunur malzeme: Belirli bir süre zarfında belirli test yöntemleri kullanılarak bozunma miktarı ölçülebilen malzemeye bozunur malzeme denir.
- Biyobozunma: Bir malzemenin yaşayan organizmalar tarafından kimyasal olarak bozunması ve fiziksel özelliklerinin değişmesi olayıdır.

- Biyobozunur polimerler: Doğal olarak var olan mikroorganizmalar, bakteriler, mantar ve algler tarafından bozunmaya uğrayabilen polimerlerdir.

Biyobozunur bir malzemenin sahip olması gereken başlıca özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir [40]:

- ❖ Malzeme vücuda uygulandıktan sonra iltihap oluşturmamalı ve toksik etki göstermemelidir.
- ❖ Malzeme kabul edilebilir bir kullanım süresine sahip olmalıdır.
- ❖ Malzemenin bozunma süresi, dokunun iyileşme ve yenilenme süresi ile uyum sağlamalıdır.
- ❖ Malzemenin mekanik özellikleri uygulama alanı ile uyum sağlarken, bozunma dokunun iyileşme ve yenilenme sürecinde mekanik özellikleri olumsuz yönde etkilememelidir.
- ❖ Bozunma ürünleri toksik olmamalı, metabolize edilebilmeli ve vücuttan kolayca atılmalıdır.
- ❖ Malzeme uygulama alanına göre istenen şekli alabilmeli ve uygun geçirgenlikte olmalıdır.

Biyobozunur polimerler, suda çözünebilir formlara dönüşmeden önce vücutta kimyasal tepkime ile değişime uğramaktadır. Parçalanmaları, genellikle uzun bir zaman periyodunda oluşan hidroliz gibi bir kimyasal tepkime içerdiğinden, daha uzun süreli (birkaç gün–birkaç yıl) etken madde salımı için kullanılmaktadır. Bir biyobozunur polimerlerin vücuttaki değişimleri temel olarak iki yolla olabilmektedir [39,40].

Bunlardan birincisi; polimer, -OH, -COOH veya diğer hidratize grupları oluşturmak üzere, vücutta hidrolize uğrayan bir yan zincir gruplarına sahip olmasından dolayı polimerin bozunarak suda çözünebilir hale geçmesidir. İkinci bozunma yolu; Suda çözünebilen bir polimerin, hidroliz olabilen bir çapraz bağlayıcı madde ile çapraz bağlanmasıyla polimer çözünmeyen forma

dönüşür. Ancak vücutta bu çapraz bağların hidroliz olmasıyla veya parçalanmasıyla biyobozunma gerçekleşir.

Biyobozunur polimerler, doğal veya sentetik olabilirler. Polimerik biyomalzemelerin biyobozunması, polimer zincirindeki bağların hidrolitik ya da enzimatik olarak kırılması ile gerçekleşir. Bu nedenle de polimerik biyomalzemeleri bozunma kinetiğine göre hidrolitik olarak bozunan polimerler ve enzimatik olarak bozunan polimerler diye de ikiye ayırabiliriz [41].

Doğal polimerler klinik olarak kullanılan ilk biyobozunur polimerlerdir. Birçoğu enzimatik olarak bozunmaya uğrar. Aynı zamanda biyolojik olarak üretilirler ve benzersiz özelliklere sahiptirler. Proteinler (kollajen, jelatin, elastin vb.), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin vb.) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) başlıca doğal polimerlerdir. Enzimatik olarak bozunan doğal polimerlerin in vivo bozunma oranları uygulandıkları bölgeye ve maruz kaldıkları enzimin derişimine bağlıdır. Bu tür polimerlerin kimyasal modifikasyonları da bozunma miktarını ve süresini de etkiler. Doğal polimerler biyoaktivite ve modifiye edilebilme gibi bazı avantajlara sahiptirler. Ayrıca zehir etkisi göstermezler ve iltihaplanma gibi istenmeyen tepkimeler vermezler. Ancak elde edildikleri kaynağa bağlı olarak yüksek sıcaklıkta bozunmaları gibi dezavantajları da bulunmaktadır [42].

2.3. Enzimler ve Sınıflandırılmaları

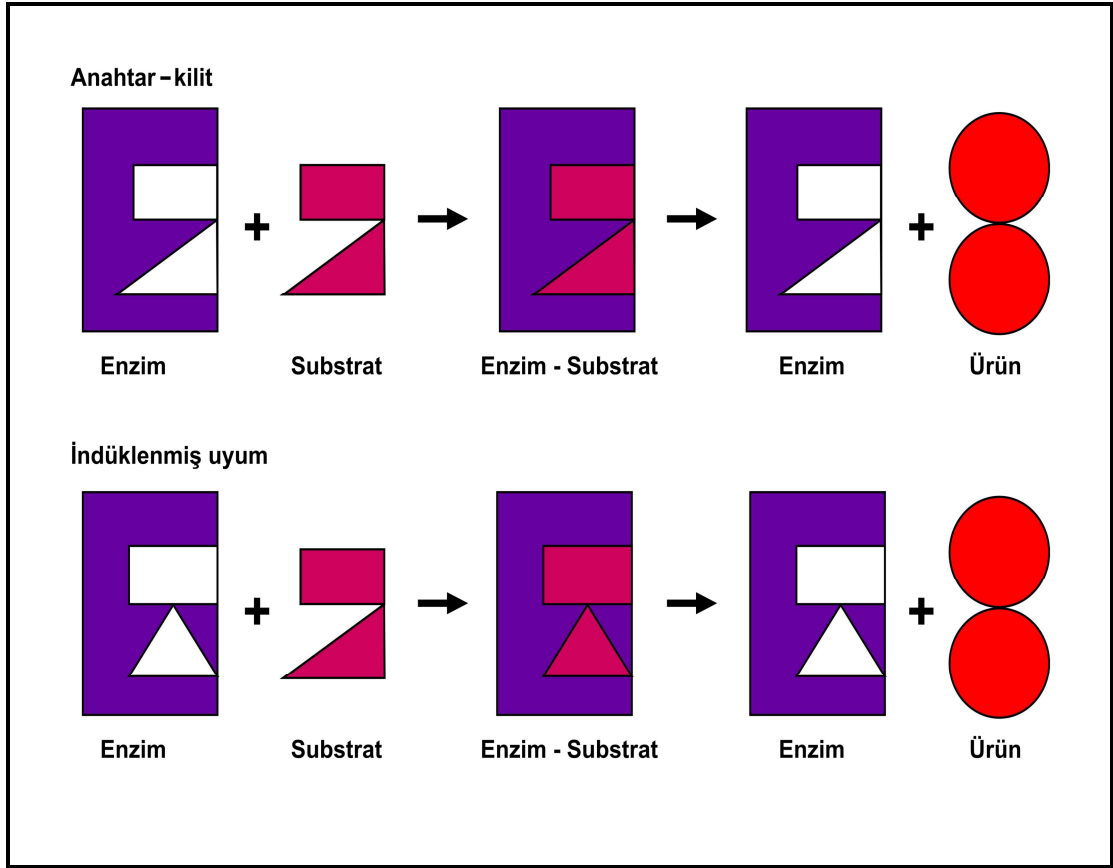
Enzimler, canlı organizmadaki biyokimyasal tepkimelerin ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlayan, belirli kimyasal tepkimeleri hızlandıran protein yapısındaki bileşiklerdir. Enzimler substratlara göre binlerce kat büyük moleküllerdir. Enzimler çok büyük olmalarına rağmen aktif merkezi yani asıl tepkimeyi yürüten kısmı oldukça küçük bir bölgedir. Substratla olan tepkime bu küçük bölge üzerinden yürür [43].

Enzimlerin etkinlikleri kimyasal katalizörlerden 10^6 - 10^{16} kat daha fazladır. Enzimlerle gerçekleştirilen tepkimelerde genellikle yan ürün meydana gelmez, tepkime verimi %100'lere ulaşabilir. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Molekülü yakın olsa bile bunun dışındaki maddelere karşı etkinlik göstermezler. Bu seçicilik özelliklerinden dolayı, en basit hücrede bile aynı anda çok sayıda biyokimyasal tepkime meydana gelebilir [43]. Bu özgüllük sayesinde istenen tepkimenin katalizlenmesi ve de istenen tek bir son ürünün eldesi mümkün olmaktadır. Bu da yüksek bir tepkime verimine ulaşabilmeye imkân sağlamaktadır [9]. Enzimler özgül oluşları, çok düşük derişimlerde bile substrat tepkimelerini katalizleyebilmeleri ve in vitro şartlarda aktivite gösterebilmelerinden dolayı tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kâğıt, tekstil, deterjan vb. birçok endüstriyel kullanım alanına sahiptirler [44].

Enzimlerin etki mekanizması iki farklı açıdan ele alınabilir. Bunlardan birincisi tepkime süresince gerçekleşen enerji değışikliklerinin, diğeri ise kataliz sırasında aktif bölgedeki yapısal değışikliklerin incelenmesi ile ilişkilidir.

Moleküllerin birbirleri ile tepkimeye girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi (E_a) olarak bilinen bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Ortama biyolojik bir katalizör olan enzimlerin ilave edilmesiyle daha çok substrat molekülü aktivasyon enerji engelini aşabilmekte, tepkime hızı ve birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır [45].

Enzimin aktif bölgeleri bir yarık veya çatlak şeklindeki oyuklardır. Bu bölgeler kataliz için gerekli temel polar artıklar da içerirler. Yapıları bilinen enzimlerin hepsinde, substrat molekülleri suyun ayrılması ile yarıklara bağlanırlar. Aktif bölgeler, bir enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturur ve bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştiği yer (katalitik bölge) olmak üzere iki kısımdan oluşur [45].



Şekil 2.6. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli

Bir enzimin yapısındaki aminoasit artıklarının çoğu substratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik bölgede serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur [46]. Şekil 2.6'daki şematize tepkimede görüldüğü gibi enzimler kendi özgül substratlarıyla ya "anahtar kilit" ya da "indüklenmiş uyum" modeliyle etkileşirler. Anahtar kilit modelinde, aktif bölge ile substrat, bir anahtar ile kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. İndüklenmiş uyum modelinde ise, enzim substrat ile buluştuktan sonra substrat enzimin özel yapısını almakta ve aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu olaya "sonradan olma uyum" da denilebilir [47].

Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC), katalizledikleri tepkime tipine göre enzimleri altı grupta toplamışlardır. Bunlar [45]:

- Oksidoredüktazlar: Redoks tepkimelerini katalizleyen (elektron aktarılmasını sağlayan) enzimlerdir.
- Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferinin olduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
- Hidrolazlar: C-N, C-O, C-C bağlarını su yardımıyla koparan enzimlerdir. Lipazlar bu grupta olan enzimlerdir.
- Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi bağların kırılmasını, bazı grupları ayırarak katalizleyen enzimlerdir. Bu tepkimeler sırasında çift bağ oluşumu sıcaklıkla gözlenen bir durumdur. Tersinir olarak bazı grupların çift bağa katılmasını katalizleyebilirler.
- İzomerazlar: Substratın izomerinin olduğu tepkimeleri katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir.
- Ligazlar: Bağ oluşumunun gerçekleştiği tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.

2.3.1. Enzim aktifliğini etkileyen faktörler

Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin hızını etkileyen faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Ortamın pH'ı
- Sıcaklık
- Enzim derişimi
- Substrat derişimi
- Zaman
- İnhibitörler

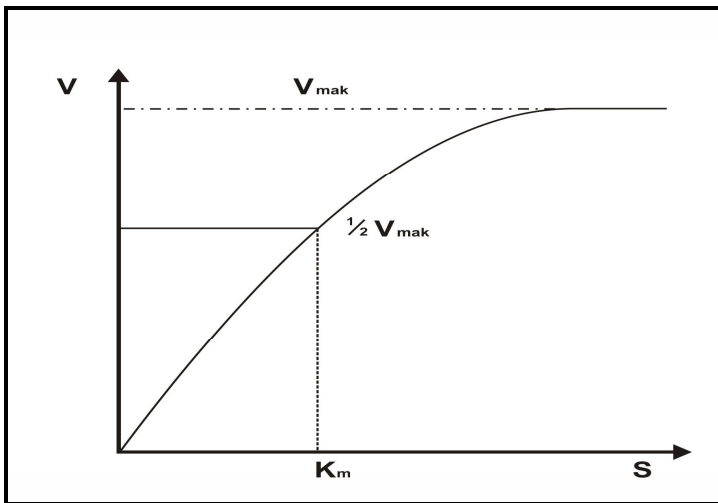
Enzimler katalitik aktivite gösterirken ortamın hidrojen iyonu derişimine bağlı olarak aktiflikleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük, bazıları ise yüksek pH seviyelerinde daha aktiftirler fakat çoğunlukla enzim aktifliği nötral ortamlarda

en fazladır. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı adı verilir.

Enzimatik tepkimelerde de diğer tepkimelerde olduğu gibi sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmalara bağlı olarak genellikle tepkime hızı artmaktadır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılıklarını yitirirler ve denatüre olurlar. Böylece tepkime hızı da azalır. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir.

Enzimatik bir tepkimede ortamda fazla miktarda enzim bulunması halinde tepkimenin hızı, enzim derişimi ile orantılı olarak artmaktadır. Denge halindeyken enzim derişiminin denge sabitine üzerine etkisi yoktur.

Ortamda bulunan enzim derişimi ve diğer koşullar değişmediğinde tepkimenin hızı, başlangıçta substrat derişiminin artmasıyla doğrusal bir artış göstermektedir. Enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında ise tepkime hızı değişmeden devam eder (Şekil 2.7). Bu durumda enzim maksimum hıza (V_{mak}) ulaşmış olur. Bundan sonra substrat derişiminin artması tepkime hızını değiştirmez.



Şekil 2.7. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi

Enzim maksimum hızdayken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat derişimine *Michaelis-Menten* sabiti (K_m) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar küçüktür.

Enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddeler olan inhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını ve böyle enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler.

Bir enzimatik tepkimenin hızı, belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ya da belirli bir zamanda harcanan substrat miktarı ile belirlenmektedir. Bir enzim tarafından katalizlenen tepkime sürerken tepkime hızı giderek azalır. Bu azalma, tepkime devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde tepkime oluşturmaları, enzimin zamanla inaktivite olması, tepkimeyi önleyen maddelerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi faktörlerden dolayı olabilir [47-49].

2.3.2. Enzim immobilizasyonu

Enzimler yüksek bir hızla katalizlenebilmelerine ve özgül olmalarına rağmen saflaştırılmaları özel teknikler gerektirdiği için maliyetleri oldukça yüksektir. Ayrıca serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda tepkime ortamından uzaklaştırılması çok zordur. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar kullanılmasını engeller. Tepkimenin istenilen anda durdurulması için inhibitör kullanıldığında ise tepkime sonunda oluşan ürünlerin ortamdan arıtılması için tekrardan ayırma işlemlerine gerek duyulmaktadır. Bu da maliyeti bir kat daha arttırır [9,50]. İmmobilizasyon, serbest enzimlerde görülen bu sorunları ortadan kaldırmak için kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir. Enzim immobilizasyonu; enzimatik tepkimelerde enzimlerin katalitik aktifliğinin korunması, tekrar ve sürekli kullanımının sağlanması amacıyla bir destek (taşıyıcı) maddesine fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle tutturulması olarak tanımlanabilir [51,52].

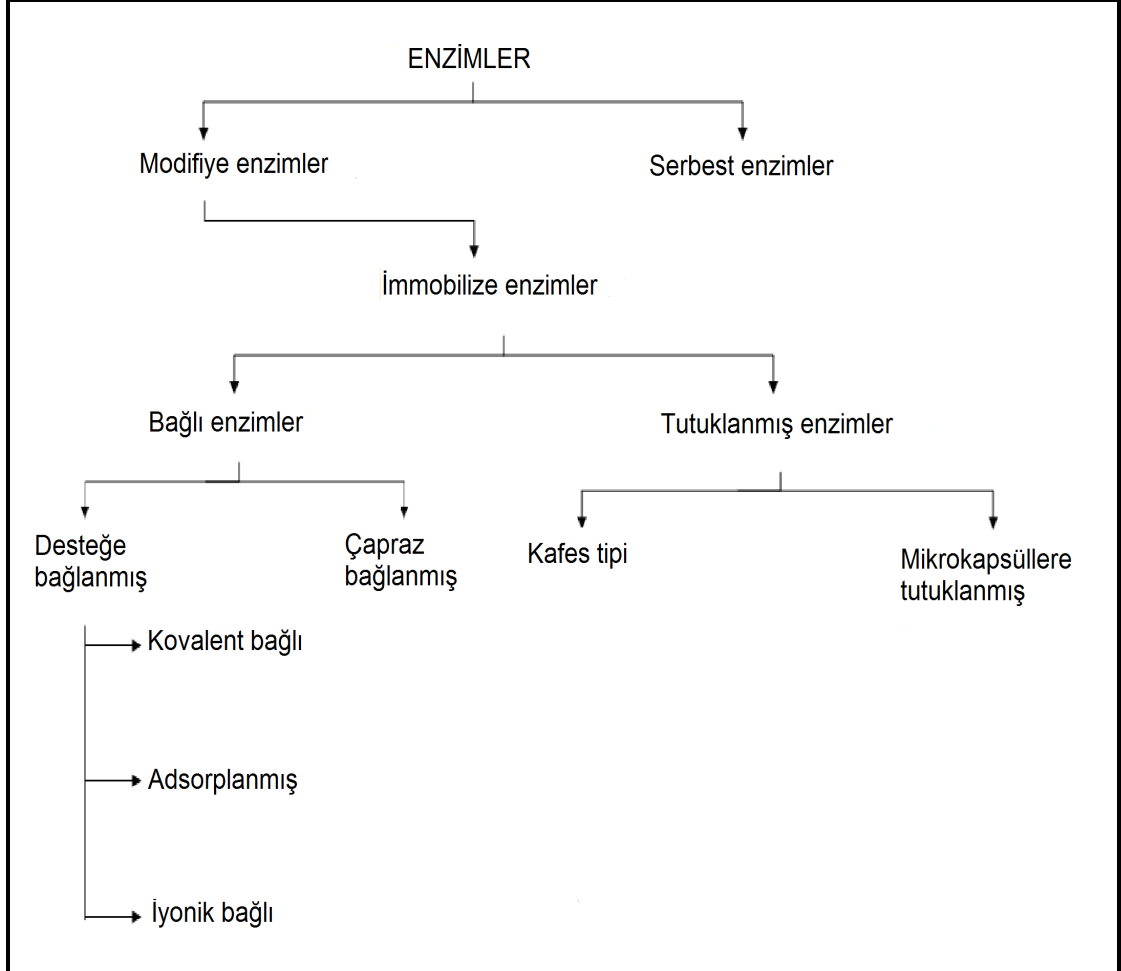
Enzimlerin immobilize edilmelerinin en önemli avantajları aşağıda özetlenmiştir [53,54]:

- ❖ İmmobilize enzimler çevre koşullarına (sıcaklık, pH ve organik reaktifler vb.) karşı dayanıklıdır.
- ❖ İmmobilize enzimlerin kararlılığı yüksektir, sürekli ya da tekrar kullanımları mümkündür, enzim ürünlerden kolayca ayrılabilir.
- ❖ İmmobilize enzimler substrat ve ürünün inhibisyonuna karşı koyarlar ve enzimin aktifliğini uzun süre korumasını sağlarlar.
- ❖ İmmobilize enzimlerde ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ❖ Tepkime süresi kısalmış ve çok basamaklı tepkimelere uygunluğu artar.
- ❖ İmmobilize enzimler bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
- ❖ İmmobilize enzimlerin birçok kere kullanılabilmesi maliyeti düşürmektedir.
- ❖ İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de destek materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanır.

Enzimin immobilize edilmesinin dezavantajları da vardır. Bunlardan başlıcaları aşağıda özetlenmiştir [55]:

- ❖ İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktivitesi azalabilir veya kaybolabilir.
- ❖ Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- ❖ Enzim destek materyalinin maliyeti yüksektir.

2.3.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri



Şekil 2.8. Enzim immobilizasyon yöntemleri

İmmobilizasyon işleminde, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarını ve kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzimde aktivite kaybına neden olmayacak bir yöntem seçilmesi çok önemlidir [9]. Bu nedenle bağlanma sırasında enzimin aktif bölgesi belirli gruplarla korunur. Bağlanma sonrasında ise bu koruyucu gruplar, enzimde aktivite kaybına neden olmadan uzaklaştırılır. Bazı durumlarda bu koruyucu etki substrat ya da yarışan tip inhibitör ile sağlanabilir. Şekil 2.8’de endüstride kullanılmakta olan çeşitli immobilizasyon yöntemleri sunulmaktadır [56].

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik destek kullanılmaktadır. Bunlara poliakrilamitler, polipeptitler, selüloz, kollojen, agaroz, kitosan, jelatin, aljinat, kil, cam, silikajel örnek olarak verilebilir [49,8].

Destek malzemeye bağlanma bilinen en eski immobilizasyon yöntemidir. Enzimlerin suda çözünmeyen desteklere bağlanması şeklinde gerçekleşir. Desteğin seçilmesi immobilize enzimin performansı açısından büyük önem taşımaktadır. Destek seçiminde dikkat edilmesi gereken özellikler şunlardır [57]:

- ❖ Geniş yüzey alanı
- ❖ Tanecik boyutu ve şekli
- ❖ Kimyasal bileşimi
- ❖ Hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı
- ❖ Geçirgenliği
- ❖ Hidrofilik karakteri
- ❖ Kimyasal, mekanik ve ısı kararlılığı
- ❖ Yüksek sertliği
- ❖ Mikrobiyal saldırılara karşı dayanıklılığı
- ❖ Rejenerasyon kabiliyeti
- ❖ Toksik olmama

Enzimin desteğe fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi şematik olarak Şekil 2.9.a'da gösterilmiştir [57]. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi suda çözünmeyen katı desteğin enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda hidrofobik bağlanma gerçekleşebilmekte, ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler de etkili olmaktadır [58]. Bu etkileşimlerden dolayı desteğin enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Yani, enzim veya destekte kimyasal değişim gerçekleşmemektedir Fiziksel adsorpsiyonda enzim ve

destek arasındaki bağlanma kuvvetleri zayıf olduğundan desteğe adsorplanmış enzim destekten ayrılabilir. Ayrıca bu yöntemde ortamda bulunan diğer protein veya maddeler de destek üzerine adsorplanabilir. Bu da immobilize enzimin özelliklerinin değişmesine, aktivasyonunun düşmesine sebep olur [52,58].

Enzimin desteğe iyonik bağlanma yöntemi ile immobilize edilmesi şematik olarak Şekil 2.9.b'de gösterilmiştir [50,57]. İyonik bağlanma yöntemi, enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntılar içeren bir desteğe iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. Uygulanmasının kolay olması, desteğin yenilenebilir olması ve enzimin modifiye olmaması yöntemin kullanımını arttıran özelliklerdir. Genellikle destek olarak iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Enzim ile destek arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyonda olduğundan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmada olduğundan daha zayıftır. Bu nedenle de enzimin destekten ayrılma olasılığı vardır.

Enzimin suda çözünmeyen bir desteğe kovalent olarak bağlanması yöntemi şematik olarak Şekil 2.9.c'de sunulmuştur. Genellikle bağlanma, enzimin nükleofilik grubuyla desteğin fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu ($-NH_2$), karboksil grubu ($-CO_2H$), sülfhidril grubu ($-SH$), hidroksil grubu ($-OH$), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur [52,56].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir [59]. Kovalent bağlanma aşağıda verilen tepkime türleri üzerinden yürür [57]:

- Diazotizasyon: Destek-N=N-Enzim
- Amid Bağı Oluşumu: Destek-CO-NH-Enzim

- Schiff Baz Bağ Oluşumu: Destek-CH=N-Enzim
- Alkilasyon ve Arilasyon:
Destek-CH₂-NH-Enzim,
Destek-CH₂-S-Enzim
- Amidasyon Tepkimesi: Destek-CNH-NH-Enzim
- Tiyol-Disülfid Yer Değiştirmesi: Destek-S-S-Enzim
- Civa-Enzim Yer Değiştirmesi
- Bifonksiyonel Ajanlarla Desteğe Bağlanma:
Destek-O(CH₂)N=CH(CH₂)₃CH=N-Enzim

Kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzimler şu avantajlara sahiptir:

- Oluşan sıkı bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı ya da parçalanmayla karşılaşmaz.
- Immobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir çünkü enzim desteğin yüzeyinde tutturulmuştur.
- Enzim molekülleriyle destek materyali arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle çoğunlukla ısı kararlılığında bir yükseliş görülebilir.

Diğer yandan kovalent bağlanmanın dezavantajları da vardır, bunlar ise:

- Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlarla bozulabilir.
- Enzim molekülleriyle destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketini engelleyebilir ve bu da enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açabilir.

Enzimlerin çapraz bağlanma ile immobilizasyonu, diğer protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir destek üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla sağlanmaktadır (Şekil 2.9.d). Ancak proteinlerin bir kısmının destek gibi davranmasından dolayı, enzimler de kendi kendilerine çapraz bağlanabilirler, çapraz bağlanmış enzimler daha

sonra çözünmeyen makromoleküller haline gelirler. Bu da enzimatik aktivitenin düşmesine dolayısıyla maliyetin artmasına neden olur. Bu dezavantajından dolayı çapraz bağlamanın diğer immobilizasyon metotlarından biriyle kullanılması daha iyidir [50,57]. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu gerçekleştirilirken çapraz bağlanma da uygulandığında desorpsiyon çok az olmaktadır.

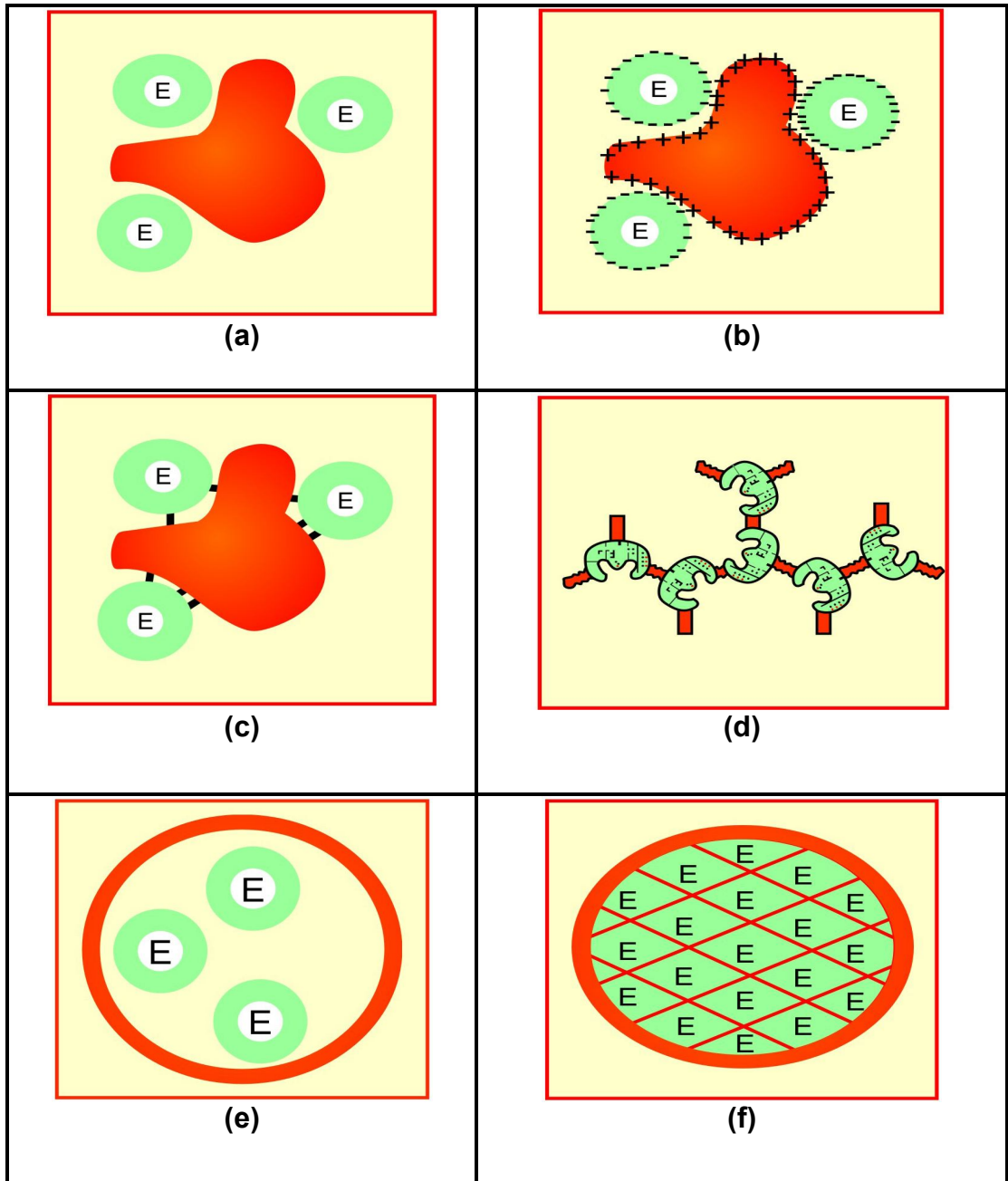
Tutuklama yöntemiyle immobilizasyonda enzim kafes görevi gören polimer matriks veya membran içerisinde tutulmaktadır. Bu tutulma öyle bir şekilde gerçekleşir ki, substratın içeri girmesine izin verilirken, enzim içeride muhafaza edilmekte, oluşan ürün ise matriksten dışarı çıkabilmektedir. Bu nedenle tutuklama yöntemi, her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek gibi geniş uygulanabilirlik alanına sahiptir.

Tutuklama yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayrılan en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Bu yöntem mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır [50,52,60].

Mikrokapsülleme yönteminde enzim yarı geçirgen polimer membran içerisinde tutuklanır (Şekil 2.9.e). Bu yöntemin avantajları substratla enzime geniş yüzey alanı sağlaması ve değişik tipte enzimlerin de hemen hemen aynı yöntemle immobilize edilebilir olmasıdır. Bazı durumlarda enzimin inaktive olması, membran duvarına yapışması ve mikrokapsüllerden damlaması yöntemin dezavantajları arasında sayılmaktadır [60].

Kafes tipi immobilizasyon yöntemi şematik olarak Şekil 2.9.f'de gösterilmiştir. Yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması yoluyla immobilizasyon türü kafes türü hapsetme olarak adlandırılır. Kafes tipi immobilizasyonda; çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat

moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına neden olabilir. Bu oran enzime ve desteğe bağlı olarak değişir. Bu yöntemle immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekülü olması gerekir [61].



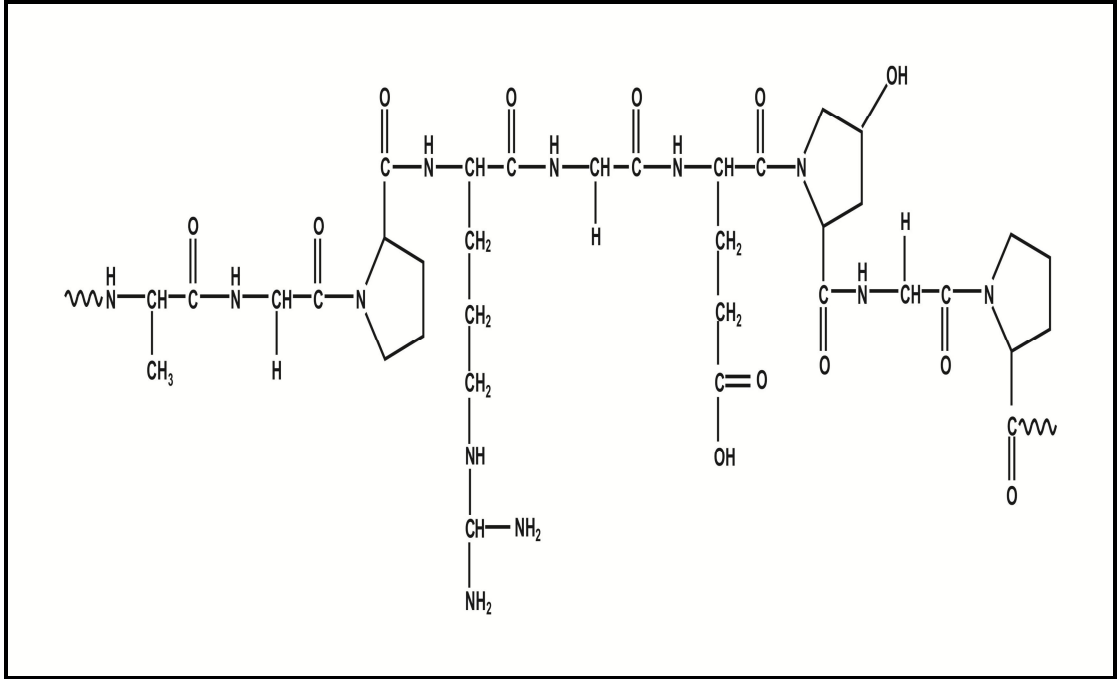
Şekil 2.9. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

2.4. Çalışmada Kullanılan Temel Kimyasal Maddeler

2.4.1. Jelatin

Jelatin, hareket sisteminin yapı taşlarını oluşturan özellikle kemikte, kıkırdakta, eklemlerde ve dokularda bulunan, lifli bir protein olan kollajenden elde edilmektedir. Kollajen vücudun çok önemli bir yapı taşıdır, içinde kollajen olmayan organ ya da doku yoktur. Bu protein üçlü helis diye adlandırılan, birbirlerine sarılı üçlü alfa zincirlerinden (polipeptit alt birimlerinden) oluşan bir yapıya sahiptir [62]. İki tip jelatin vardır. A tipi jelatin (izoelektrik noktası 6-8) kollajenin asit hidrolizine tabi tutulmasıyla elde edilir. B tipi jelatin (izoelektrik nokta 4,7-5,3) ise kollajenin bazik veya alkali hidrolizine tabi tutulmasıyla sentezlenir [63,64]. Jelatin üretimi sırasında, kollajen yüksek sıcaklıkta, seyreltik asitle veya bazla muamele edilir. Bu süreçte kollajendeki hidrojen bağları kopar, polipeptit zincirleri birbirlerinden ayrılır ve denatürasyon sonucu jelatin elde edilir [65]. Çok ucuz ve kolay elde edilebilen jelatin karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini içerir [5,63]. Bu aminoasitler jelatinin üçlü helis bir yapı oluşturmada ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir [66]. Jelatin kimyasal yapısı Şekil 2.10'da gösterilmiştir.

Jelatin, renksiz veya soluk sarı renkli, şeffaf yaprak, toz veya granül halde bulunur. Jelatin saf soğuk suda çözünmez, sadece nem kapar ve şişer. Jelatin sıcak suda çözünür fakat 40°C'nin üstündeki sıcaklıklarda sistem sol haline geçer. Böylece jelatin çözeltisi tekrardan soğutulduğunda yine jelleşme meydana gelir. Bu olay jelatinin termal olarak tersinir jel oluşum özelliğine sahip olmasından dolayı gerçekleşir [63].



Şekil 2.10. Jelatinin kimyasal yapısı

Jelatin toksik ve tahriş edici olmayan, biyobozunur ve son derece biyoyoumlu bir polimerdir. Antijenik özellik taşımaz ve immunojenik değildir. Kolay jelleşme özelliğine sahip olduğundan hidrojel hazırlamasında çok yaygın kullanılır [67]. Son yüzyıl boyunca deneysel çalışmaların büyük bir kısmı jelatin jellerinin yapısal ve mekanik özelliklerinin araştırmasına yönelik olmuştur [68].

Jelatin biyomalzeme olarak kullanılması pek çok avantaj sağlamaktadır. Ancak düşük mekanik özellik gibi bir dezavantaja da sahiptir. Bu da biyomedikal uygulamalardaki alanlarını kısıtlar. Fakat yan zincirlerinde çok fazla sayıda fonksiyonel gruplara sahip olmasından dolayı kolaylıkla modifiye edilebilir ve bu şekilde mekanik özellikleri geliştirilebilir. Jelatinin ultraviyole ve gama ışınlanması yoluyla fiziksel çapraz bağlanması sağlanabilir. Ayrıca jelatin kolayca kimyasal olarak da çapraz bağlanabilir. Çapraz bağlanmasıyla termal ve mekanik kararlılığı arttığı için uzun süreli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Genellikle çapraz bağlayıcı olarak bifonksiyonel

ajanlar olarak bilinen GA, diizosiyanat, karbodiimidler, poliepoksi bileşikleri de kullanılabilir [5,63].

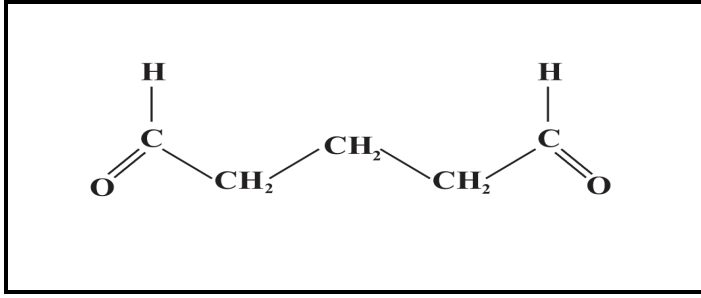
Jelatin eczacılıkta (tablet, pastil, sert-yumuşak kapsül), gıda endüstrisinde, kozmetikte, ilaç taşıyıcı sistemlerde, implantlarda, yara tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [65]. İmmobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyon, tuza ya da pH ayarlanmasına gerek duymaz. Bu da jelatinin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır [29].

Jelatinin dünya çapındaki talebi yıllardan beri gittikçe artmaktadır. Son yayınlanan rapora göre jelatinin dünyadaki yıllık üretimi yaklaşık olarak 326.000 ton olarak belirtilmiştir. En yüksek üretim domuz derisinden elde edilen jelatine gözlenmiştir (%46), ardından ise büyükbaş hayvanlardan (%29), kemiklerden (%23) ve diğer kaynaklardan (%15) elde edilen jelatin gelir [65].

2.4.2. Glutaraldehit (GA)

GA özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Özellikle jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturmaya esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça kullanılır. Yöntem kolay uygulanabilir olması dışında immobilize sistemin termal, işlevsel ve aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir. GA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.11'de gösterilmiştir.

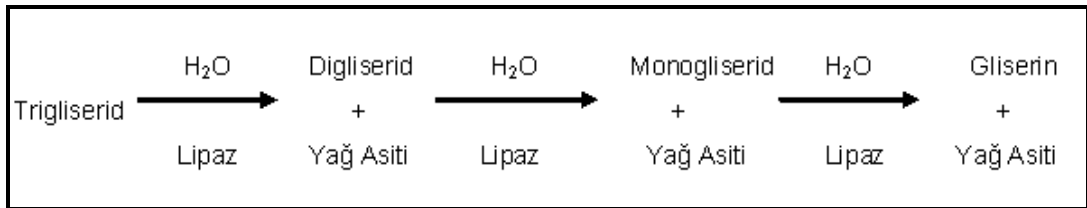
GA mikroorganizmalar için kısmen toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı %1'in altındaki derişimlerde GA kullanılarak toksik etki en aza indirilerek, immobilizasyonlar da gerçekleştirilebilmektedir [69].



Şekil 2.11. Glutaraldehyd kimyasal yapısı

2.4.3. Lipaz

Yağların hidrolizini sağlayan lipaz, karboksilik ester hidrolaz sınıfından bir enzimdir. Yağ asitlerinin gliserol veya başka alkollerle yapılmış olduğu ester bağlarını hidroliz eder [70,71]. Lipaz, suda çözünen bir enzim olup yağların ancak yüzeyine tesir eder. Emülsifiye olmuş uzun zincirli trigliseridler üzerinde aktiflik gösterirler. Etkin olduğu hidroliz tepkimesi genel olarak Şekil 2.12’de verilmektedir [72]. Hidroliz sonucu digliserid, monogliserid, gliserin ve yağ asidi oluşur.



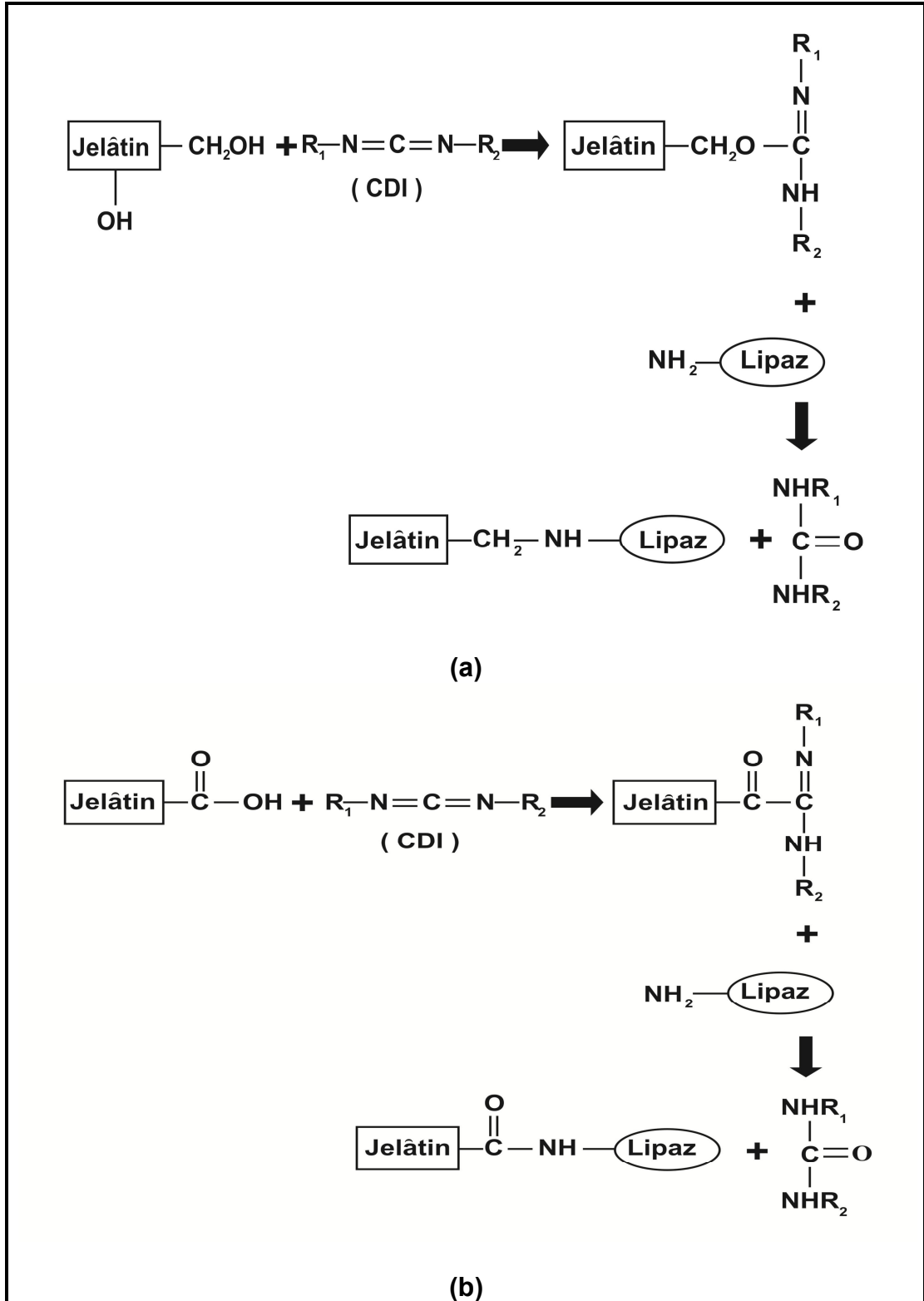
Şekil 2.12. Lipazın etkilediği hidroliz tepkimesi

Lipazlar; hayvansal, bitkisel ve mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilebilirler. Memelilerde lipaz pankreas tarafından sentezlenir. Bitkisel lipazlar; hint yağı, gene otu gibi bitkilerin yağlı tohumlarında bulunur. Mikroorganizma kaynaklı lipazlar ise bakteri, maya ve mantarlardan elde edilebilir. Mikrobiyal lipazlar, bitki ve hayvan kaynaklı lipazlara göre daha geniş uygulama alanına sahiptir. Bunun sebebi mikroorganizmaların kolay ve hızlı çoğalabilmeleri ve ayrıca lipazlarının çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok tepkimeyi katalizleyebilmeleridir [73,74].

Lipazların gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayinde uygulama alanları bulunmaktadır. Deterjanlarda kullanımı yağ kaynaklı lekelerin kolayca çıkarılması amacıyla, dericilikte yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için kullanılmaktadır. Kâğıt endüstrisinde, üretilen kâğıt hamurundan trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini ayırmak için kullanılır. Gıda endüstrisinde ise lipazların meşrubat berraklaştırılması, bira üretimi, düşük laktozlu süt üretimi, ekmek üretimi, peynir olgunlaştırılmasında gibi kullanım yerleri vardır [75-77].

2.4.4. Karbodiimid (CDI)

CDI, enzim immobilizasyonu işlemlerinde destek materyalini aktifleştirmek amacı ile sıklıkla kullanılan önemli bir ara kimyasal maddedir [9,11]. Şekil 2.13'de sunulan kimyasal yapısında da görüldüğü gibi, hem destek materyalindeki $-CH_2OH$, $-COOH$ ve $-OH$ gruplarına hem de enzimdeki $-NH_2$ grubuna bağlanabilme özelliğine sahiptir [78, 79]. Aynı şekildeki tepkimede jelatin desteğine CDI ve lipaz bağlanma yolları şematik olarak öngörülmüştür.



Şekil 2.13. CDI ile aktifleştirilmiş jelatin materyaline lipaz immobilizasyonu

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde sürdürülen deneysel çalışmalar ayrıntıları ile açıklanmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

- ✕ Lipaz (*Candida Rugosa*, Sigma)
- ✕ p-NPP (Sigma, $C_{22}H_{35}NO_4$)
- ✕ Jelatin (Fluka, pH=3,8-7,6)
- ✕ GA (%25, Sigma-Aldrich)
- ✕ Etanol (Sigma-Aldrich)
- ✕ CDI (Sigma)
- ✕ Borik asit (BDH, Merck)
- ✕ H_3PO_4 (Merck)
- ✕ NaOH (Merck)
- ✕ Asetik asit (Merck)
- ✕ KBr (Aldrich)
- ✕ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Sigma)
- ✕ Etüv (Ultralab U-120)
- ✕ Terazî (Scaltec)
- ✕ Su banyosu (Memmert)
- ✕ Manyetik karıştırıcı (Şimşek Labortechnik)
- ✕ pH metre (Cyberscan 500)
- ✕ UV spektrofotometresi (Labormed Double Beam UV-visible spektrofotometre)
- ✕ FTIR (Mattson 1000 model infrared spektrometresi)
- ✕ İnkübatör (Binder)

3.2. Jelatin Hidrojellerin Hazırlanması

Çizelge 3.1’de sunulan oranlarda GA içeren jelatin hidrojeller kimyasal çapraz bağlama yöntemiyle üretildi. İlk basamakta %10’luk jelatin çözeltisi hazırlandı. Dört ayrı cam tüpe bu çözelti konulduktan sonra tüplere Çizelge 3.1’de verilen oranlara denk gelecek şekilde %25’lik GA çözeltisi ilave edildi. Bu karışımlar iyice karıştırıldıktan sonra 24 saat oda şartlarında bekletildi. Tepkime sonunda silindir bloklar şeklinde elde edilen hidrojeller cam tüpler kırılarak dışarı çıkarıldı; 0,5 cm kalınlığında diskler halinde kesildi ve oda şartlarında bir gece bekletildi. Ardından bol saf su içinde defalarca yıkanarak polimerleşmeye girmeyen bileşenlerin uzaklaşması sağlandı ve bu numuneler sabit tartıma gelinceye kadar önce havada, daha sonra 37°C’de etüvde kurutuldu.

Çizelge 3.1. Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan maddelerin miktarları

Bileşenler Jelatin Hidrojeller	% 10’luk Jelatin çözeltisi (mL)	% 25’lik GA çözeltisi (g)	Yorum
G-1	10	0,2	Yumuşak
G-2	10	0,4	Sert
G-3	10	1,2	Sert
G-4	10	2,0	Sert

3.3. Jelatin Hidrojellerin Jelleşme Yüzdelерinin Gravimetrik Olarak Tayini

Bölüm 3.1’de belirtilen şekilde elde edilen hidrojeller sabit tartıma gelene kadar etüvde kurutuldu (m_i), sonra 250,0 mL saf su içine konularak ve su banyosu sürekli tazelenerek 48 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda sudan çıkarılan hidrojeller tekrar sabit tartıma gelene kadar

kurutuldu (m_s). Her bir hidrojin jelleşme yüzdesi Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplandı [80,81].

$$\text{Jelleşme Yüzdesi} = \frac{m_s}{m_i} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4. Jelatin Hidrojellerinin Şişme Davranışlarının Tayini

Bu bölümde hidrojinlerin zaman, sıcaklık ve pH değişimlerine karşı şişme davranışlarının incelenmesi anlatıldı. Tüm deneyler üçer örnek üzerinden yürütüldü.

3.4.1. Jelatin hidrojinlerin şişme değerlerinin zamanla değişiminin incelenmesi

Hidrojinlerin şişme değerlerinin zamanla değişimi 37°C'de 48 saat süreyle incelendi. Etüvde kurutulup sabit tartıma getirilen disk şeklindeki kuru hidrojinlerin ilk tartımları (w_0) alındıktan sonra, hidrojinler 50,0 mL fosfat tamponu (bkz. Ek:1) (pH=7,4) içeren ağzı kapalı şişelere konuldu. Belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan hidrojinler, yüzeyleri hafif bir şekilde kâğıtla kurulanarak tartıldı ve tekrar şişme ortamına konuldu. Bu işleme hidrojinler denge şişme değerine ulaşmaya kadar devam edildi ve hidrojin disklerin kütlelerindeki değişimler kaydedildi. Her bir hidrojinin yüzde şişme değeri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplandı [5,78].

$$\text{Şişme (\%)} = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

3.4.2. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişiminin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi pH=7,4'de denge şişme değerinin elde edildiği 48 saat süreyle incelendi. Etüvde sabit tartıma getirilen disk şeklindeki kuru hidrojeller, 50,0 mL pH=7,4 fosfat tamponu içeren ağzı kapalı şişelere konuldu. Hidrojellerin şişme değerlerine sıcaklık etkisini incelemek için 4; 10; 20; 30; 37; 40; 50 ve 60°C sıcaklıklarındaki inkübatörde ve etüvde çalışıldı. Her sıcaklıkta, 48 saat bekletilen hidrojel örnekler bulundukları ortamdan alındı ve yüzeyleri hafif bir şekilde kâğıtla kurulandıktan sonra tartıldı. Şişme değerleri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplandı [82].

3.4.3. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişiminin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişimi 37°C'de 48 saat süreyle incelendi. Etüvde kurutulup sabit tartıma getirilmiş olan disk şeklindeki hidrojeller, 50,0 şer mL pH=2,0; pH=4,0; pH=5,0; pH=6,0; pH=7,4; pH=8,0; pH=10,0 ve pH=12,0 BR tamponu (bkz. Ek:2) içerisine konuldu. 37°C sıcaklıkta 48 saat bekletildikten sonra hidrojeller ortamdan çıkarıldı, kurulandı ve tartıldı. Hidrojellerin şişme değerleri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplandı [82].

3.5. Jelatin Hidrojellerinin Bozunma Davranışlarının Tayini

Hidrojellerin bozunma deneyleri 37°C'de, 50,0 mL'lik fosfat tamponu (pH=7,4) içerisinde yürütüldü. Hidrojeller belli zaman aralıklarında tartıldıktan sonra 50,0 mL'lik taze fosfat tampon ortamına yerleştirilerek, 37°C'deki etüve konuldu. Bu işlem hidrojeller tamamen bozunana kadar devam edildi. Böylece hidrojellerin kütle kayıpları takip edilerek, bozunma günleri saptanmış oldu. Bozunma davranışları Eşitlik 3.3 kullanılarak belirlendi [83].

Bu deney her bir hidrojel için üçer örnek üzerinden yürütülerek gerçekleştirildi.

$$\text{Bozunma (\%)} = \frac{k_i - k_s}{k_i} \times 100 \quad (3.3)$$

k_i : Hidrojellerin 48 saat sonunda en çok şişmiş halinin kütlesi

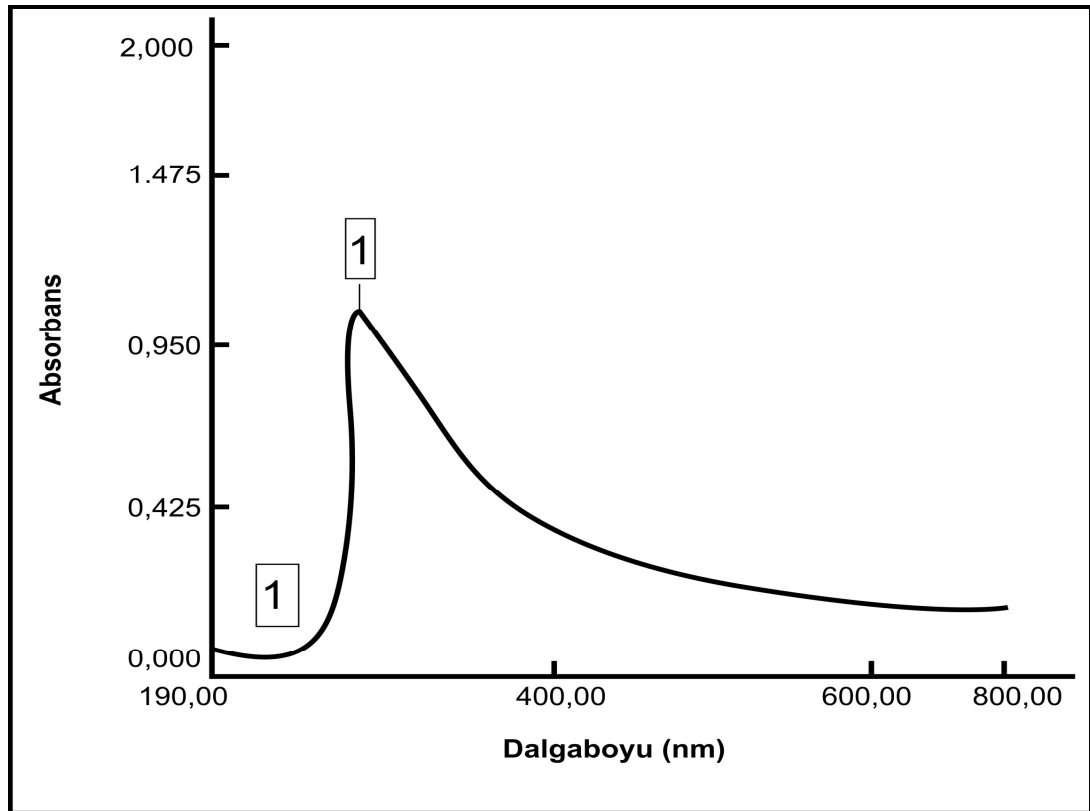
k_s : Bozunmakta olan hidrojellerin t anındaki kütlesi

3.6. Lipaz İmmobilize Edilmiş Hidrojel Üretimi

Hazırlanan hidrojellerden immobilizasyon çalışmaları için, jelleşme ve şişme/bozunma deneylerinden elde edilen sonuçlar değerlendirilerek G-2 hidrojel seçildi. Bu seçimin açıklamaları ayrıntılı olarak Bölüm 4.5’de verildi. Her biri 0,05 g olan G-2 hidrojel örnekler 25,0 mL pH=6,9 fosfat tamponunda (bkz. Ek:3) 24 saat şişirildi ve 20,0 mL CDI çözeltisine (1,0 g CDI/100,0 mL pH=6,9 fosfat tampon çözeltisi) bırakıldı. 25°C’de 4 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda daha sonra ise bir gece boyunca oda şartlarında bekletildikten sonra CDI çözeltisinden alınan her bir hidrojel örnek 2 kez pH=6,9 fosfat tamponunda yıkandı. Böylece tepkimeye girmeyen karboksiller uzaklaşması sağlandı. En verimli lipaz immobilizasyon koşullarını belirlemek amacıyla, hidrojel örnekler immobilizasyon işleminin farklı derişimlerdeki lipaz çözeltilerinde yürütülmesine karar verildi. Bu nedenle aktifleştirilmiş olan hidrojel örnekler, pH=6,9 fosfat tampon çözeltisi içinde farklı derişimlerde hazırlanan 25 mL’lik lipaz çözeltilerine (10,0 mg/mL, 4,0 mg/mL, 2,0 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,04 mg/mL) konuldu. Hidrojel örnekler önce 2 saat oda koşullarında sonra 4°C’de 24 saat bekletildi. Daha sonra lipaz çözeltisinden çıkarılan örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı [78,79,84].

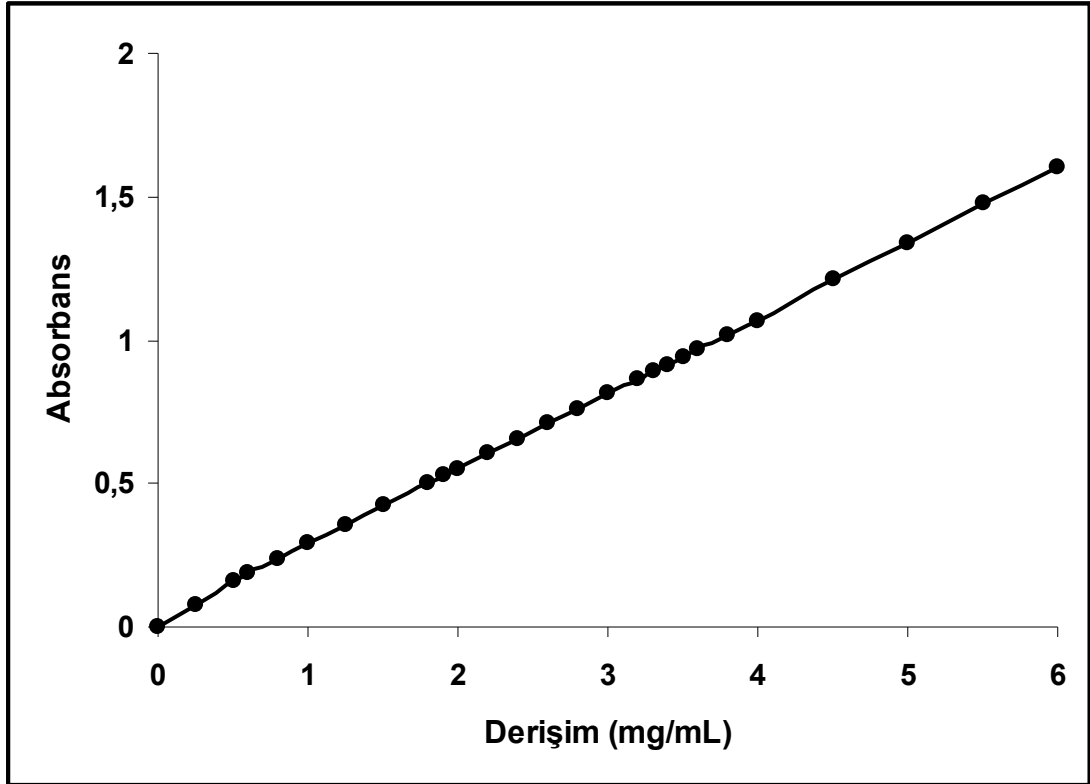
3.7. Jelatin Hidrojele İmmobilize Olan Lipaz Enziminin Miktarının Tayini

Hidrojel örneklere immobilize olan lipaz miktarlarını tayin etmek için önce lipazın fosfat tamponundaki çözeltisinin (pH=7,4; 4,00 mg/mL) 190-800 nm arasında UV-spektrofotometresi ile tam spektrumu alındı ve Şekil 3.1'de sunuldu. Maksimum absorbans $\lambda = 300$ nm'de gözlemlendi.



Şekil 3.1. 4,00 mg/mL (pH=7,4) lipaz çözeltisinin 190-800 nm arasındaki tam spektrumu

Lipazın tam spektrumu alındıktan sonra farklı derişimlerde hazırlanan lipaz çözeltilerinin $\lambda = 300$ nm'deki absorbansları ölçülerek bir kalibrasyon doğrusu elde edildi (Şekil 3.2). Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi hidrojel örneklere lipaz immobilize edildikten sonra örnekler ortamdan alındı ve geride kalan lipaz çözeltisinin derişimi Şekil 3.2'de verilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak belirlendi. Böylece her bir jelatin hidrojel örneğe immobilize olan lipaz miktarının net değeri hesaplandı.



Şekil 3.2. Lipazın kalibrasyon grafiğı ($\lambda_{\text{mak}} = 300 \text{ nm}$ 'de, $\text{pH}=7,4$)

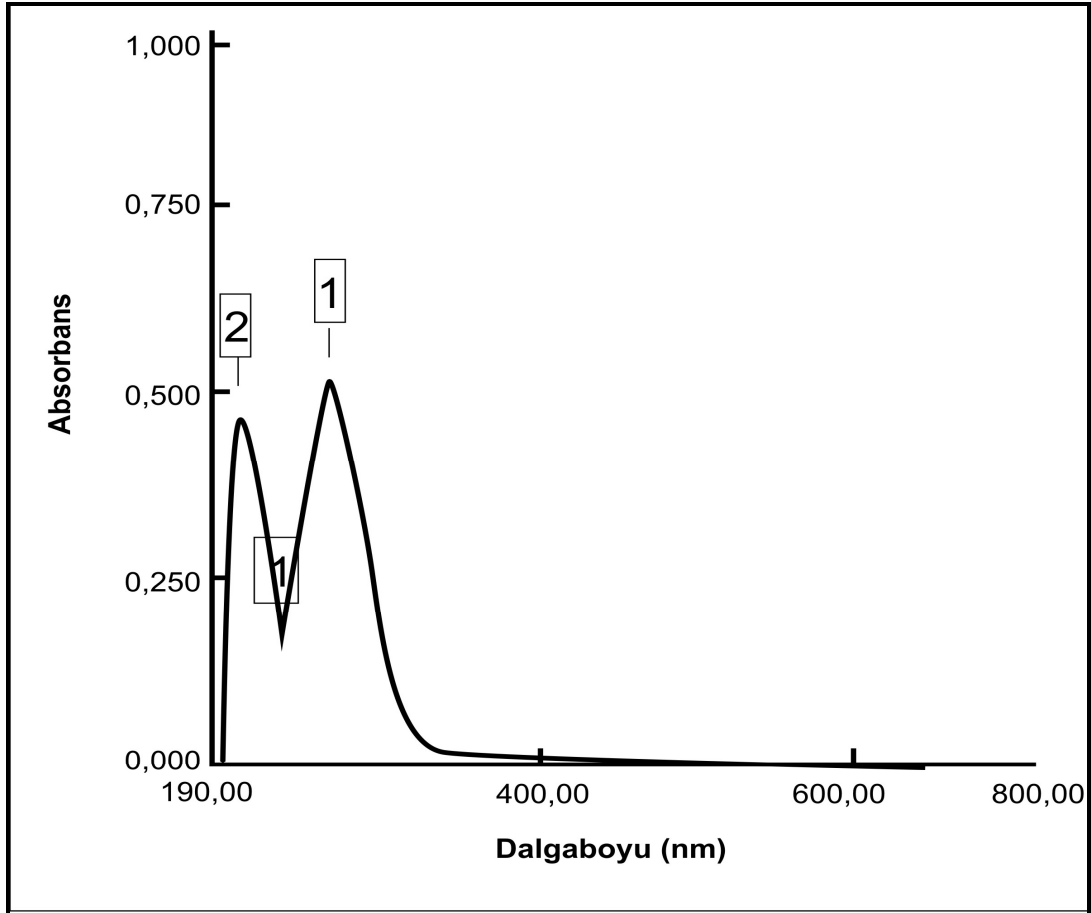
3.8. FTIR

İmmobilizasyonun gerçekleştiğini belirlemek amacıyla saf jelatinin, CDI ile aktifleştirilmiş jelatin hidrojelinin, saf lipazın ve ve lipaz immobilize edilmiş jelatin hidrojelinin mukayeseli kimyasal yapı analizleri FTIR spektrumları alınarak gerçekleştirildi. Bu amaçla bir gece etüvde kurutulan örnekler havanda dövülerek toz haline getirildi ve KBr ile karıştırılarak numune diskleri hazırlandı. Disklerin spektrumları $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında alınarak yorumlandı.

3.9. p-NPP'ın UV-spektrofotometrik Analizi

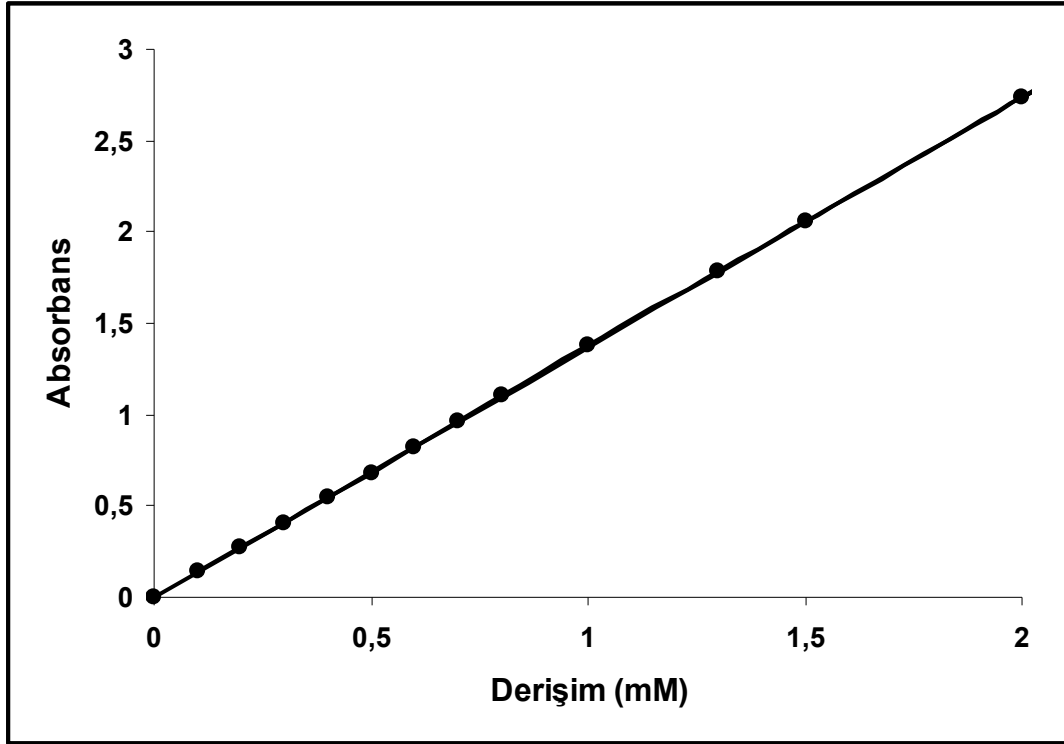
Enzimatik tepkime sonucu harcanan p-NPP miktarının belirlenmesi amacıyla ilk olarak 0,50 mM p-NPP çözeltisinin UV-spektrofotometresinde 190–800 nm

dalga boyları arasında spektrumu alındı ve p-NPP'in maksimum absorbands verdiği dalga boyu $\lambda_{\text{mak}} = 275 \text{ nm}$ olarak belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 0,50 mM p-NPP çözeltisinin 190-800 nm arasındaki tam spektrumu

Tam spektrum aldıktan sonra farklı derişimlerdeki (2,0-0,1 mM) p-NPP çözeltilerinin $\lambda_{\text{mak}} = 275 \text{ nm}$ 'deki absorbandsları ölçülerek p-NPP için kalibrasyon doğrusu elde edildi. Bu kalibrasyon doğrusu Şekil 3.4'de sunuldu.



Şekil 3.4. p-NPP'in kalibrasyon grafiğı

3.10. Serbest Lipazın Aktivite Tayini

Serbest lipazın aktiflik tayini için ağzı kapalı bir şişeye 5,0 mL fosfat tamponu (pH=7,4), 5,0 mL p-NPP (1,3 mM) ve 1,0 mL lipaz çözeltisi (0,4 mg/mL) eklenerek tepkime başlatıldı. Karışım çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 5 dakika bekletildi. Tepkime sonunda çözeltinin, UV-spektrofotometresi ile 275 nm'deki absorbans değeri ölçüldü. Tepkime hızı; p-NPP'in kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak ve Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplandı. Serbest lipazın aktivite tayini üç kez tekrarlanarak yapıldı.

Lipazın aktivitesi şöyle tanımlanır: 1 ünite (U) lipaz; 1 dakikada 1 μ mol p-NPP ile tepkimeye giren enzim miktarıdır. Lipazın katalizlediğı tepkimenin şematik gösterimi Şekil 3.5'de verilmiştir. Substrat (p-NPP) ile lipazın etkileşmesi sonucunda ürün olarak p-nitrofenol oluşur [85].

$$\text{Hız (V)} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{275}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{275}} \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte;

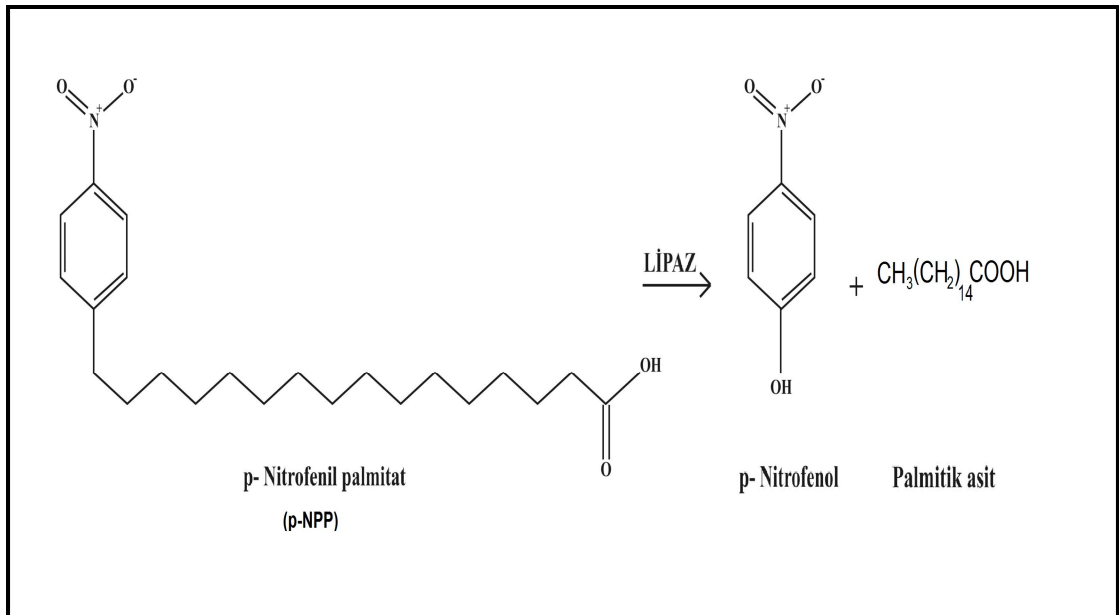
Δc : p-NPP derişimindeki değişim,

A_0 : Başlangıçtaki p-NPP'in absorbansı

A_t : t zamandaki p-NPP'in absorbansı

ΔA_{275} : ($A_0 - A_t$) ,Absorbansdaki değişimi

Δt : Zamandaki değişimi gösterir.



Şekil 3.5. Lipazın katalizlediği tepkimenin şematik gösterimi

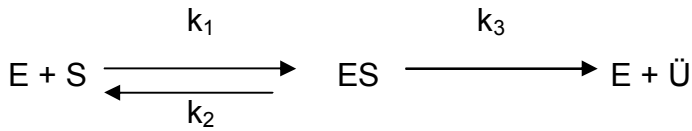
3.11. İmmobilize Lipazların Aktivitelerinin Tayini

Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi, farklı derişimdeki lipaz çözeltileri kullanılarak yapılan immobilizasyon işleminden sonra immobilize lipaz örneklerin her birinin aktivitelerine bakıldı. Bunu için yaklaşık 0,05 g olan her bir hidrojel örneğinin üzerine 5,0 mL fosfat tamponu (pH=7,4) ve 5,0 mL p-NPP

(1,3 mM) çözeltisi eklendi. Karışımlar çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 5 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra hidrojel örnekler ortamdan çıkarıldı ve çözeltilerin UV-spektrofotometresi ile 275 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Tepkime hızına bağlı olarak aktiviteler Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplandı. İmmobilize lipazların aktivite tayinleri üç kez tekrarlanarak yapıldı.

3.12. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

Enzim-substrat tepkimesi aşağıda verildiği gibi gösterilir.



Bu eşitlikte; E enzimi, S substratı, ES enzim-substrat kompleksini, Ü ürünü belirtir. Enzim tepkime hızı Michaelis- Menten Eşitliği ile verilir.

$$V_0 = \frac{V_{\text{mak}} \times S}{K_m + S} \quad (3.5)$$

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabiti aşağıda verilmiştir.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3.6)$$

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilir.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad (3.7)$$

V_0 : Başlangıç Hızı

V_{mak} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

S: Substrat derişimi

Fiziksel olarak K_m katsayısı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur. Lineweaver-Burk eşitliğinden yararlanılarak, $1/V$ değerlerine karşı $1/S$ grafiğı çizilir. Böylece enzimin V_{mak} ve K_m değerleri saptanır [47,85].

3.12.1. Serbest lipazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi

Serbest lipazın aktivitesine substrat derişimine etkisini incelemek amacıyla 5 farklı derişimde (0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,3 mM, 2,0 mM) p-NPP çözeltileri hazırlanarak, enzimin aktivite tayini Bölüm 3.10'da anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime boyunca pH (7,4), lipaz derişimi (0,4 mg/mL) ve sıcaklık (37°C) sabit tutuldu. Deney üç kez tekrarlandı.

3.12.2. İmmobilize lipazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize lipazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile G-2 jelatin hidrojellerine immobilize lipazlar ve 5 farklı derişimdeki (0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,3 mM, 2,0 mM) p-NPP çözeltileri hazırlandı. İmmobilize lipazın aktivite tayini Bölüm 3.11'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime boyunca pH (7,4) ve sıcaklık (37°C) sabit tutuldu. Deney üç kez tekrarlandı.

3.13. Serbest Lipazın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lipazın aktivitesine depolama süresinin etkisini incelemek için pH=7,4 fosfat tamponunda, 0,4 mg/mL derişiminde lipaz çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti buzdolabında 4°C’de buzdolabına bekletildi ve bu çözeltiden belirli aralıklarda (0., 4., 8., 12., 16., 21., 25., 29., 32., 36., 40., 44., 48. gün) 1,0 mL örnek alınarak Bölüm 3.10’da anlatılan yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. Tepkime boyunca pH (7,4), p-NPP derişimi (1,3 mM) ve sıcaklık (37°C) sabit tutuldu.

3.14. İmmobilize Lipazın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi

İmmobilize lipazın aktivitesine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla hazırlanan G-2 jelatin hidrojellerine immobilize lipazlar buzdolabında 4°C’de bekletildi. Bu hidrojeller belirli aralıklarda (0., 4., 8., 12., 16., 21., 25., 29., 32., 36., 40., 44., 48. gün) alınarak Bölüm 3.11’de anlatılan yöntemle göre aktivite tayini yapıldı. Tepkime boyunca pH (7,4), p-NPP derişimi (1,3 mM) ve sıcaklık (37°C) sabit tutuldu.

3.15. İmmobilize Lipazın Aktivitesinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

İmmobilize lipazın aktivitesine kullanım sayısı ile değişimini belirlemek amacıyla immobilize lipazın aktivite tayini Bölüm 3.11’de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Bu yöntem 1 gün içinde 10 kez tekrarlandı. Tepkime boyunca pH (7,4), p-NPP derişimi (1,3 mM) ve sıcaklık (37°C) sabit tutuldu.

4. DENEYSEL BULGULAR VE YORUM

Bu bölümde deneysel kısımda açıklanan yöntemlerin uygulamalarından elde edilen sonuçlar, yorumları ile beraber alt başlıklar halinde sunulmuştur.

4.1. Jelatin Hidrojel Oluşum Mekanizması ve Jelleşme Yüzdeleri

Jelatin hidrojel oluşumunda çapraz bağlayıcı miktarının etkisini incelemek üzere Çizelge 3.1’de verilen oranlarda GA çapraz bağlayıcısı kullanılmıştır. Elde edilen tüm hidrojellerin kullanıma uygun sağlamlıkta olduğu ancak GA miktarları fazla olan G-3 ve G-4 hidrojellerinin, diğer iki hidrojele göre biraz daha sert bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum çapraz bağlayıcı miktarının artmasıyla polimer zincirlerinin birbirlerine daha fazla noktadan bağlanması ve böylece yapının daha da sıkılaşarak esnekliğinin azalması şeklinde açıklanabilir [5].

Çapraz bağlı hidrojel oluşumunda, jelatin zincirlerinde bulunan $-NH_2$ gruplarıyla GA’nin yapısındaki aldehit gruplarının tepkimeye girmesiyle Schiff baz bağ oluşumu gerçekleşir. Jelatin ile GA’nin etkileşmesi sonucu olası tepkime mekanizması Şekil 4.1’de sunulmuştur. Bu mekanizmada gösterildiği gibi Schiff baz bağ oluşumu ile meydana gelen çapraz bağlanmanın dışında farklı ürünler de ortaya çıkabilir. Bunlar sadece tek Schiff baz bağının oluşmasıyla ve GA ile gerçekleşen yan tepkimeler sonucunda meydana gelebilir [86].

Hidrojellerin jelleşme yüzdeleri Bölüm 3.3’de anlatıldığı şekilde incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. En yüksek jelleşme yüzdesinin G-4 hidrojelinde, en düşük jelleşme yüzdesinin ise G-1 hidrojelinde olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça, jelleşme yüzdeleri de artmıştır. Bu durum çapraz bağlayıcı miktarının artmasıyla polimer zincirlerinde daha fazla noktanın birbirine bağlanması ve böylece daha çok zincirin hidrojel yapısında yer alması şeklinde açıklanabilir.

Çizelge 4.1. Hidrojellerin jelleşme yüzdeleri

Hidrojel	Jelleşme Yüzdesi (%)	% 25’lik GA çözeltisi (g)
G-1	87,41	0,2
G-2	91,24	0,4
G-3	94,18	1,2
G-4	95,10	2,0

4.2. Jelatin Hidrojellerinin Şişme Deneylerinin Sonuçları

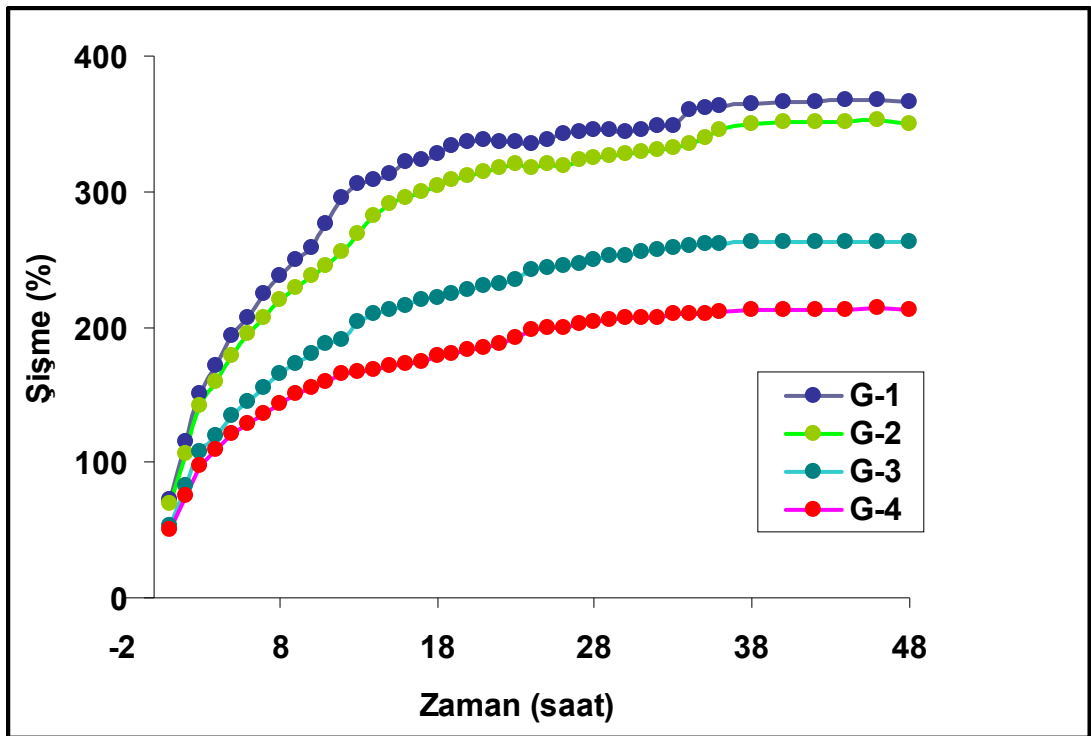
Üretilen hidrojellerin şişme deneyleri Bölüm 3.4’de anlatıldığı şekilde yürütülmüş ve sonuçlar alt başlıklar halinde sunulmuştur.

4.2.1. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi

Jelatin hidrojellerin şişme davranışları 37°C’de ve pH = 7,4’de zamana karşı değişimi Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Hidrojellerin ortalama şişme değerlerinin zamanla değişim sonuçları Ek-4’de verilmiş ve sonuçlar Şekil 4.2’deki grafikte sunulmuştur.

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, tüm hidrojellerin şişme değerleri zamanla artmış ve yaklaşık 48 saat civarında dengeye ulaşmıştır. Sabit kaldığı bu şişme

değeri daha sonra yapılan deneylerde denge şişme süresi olarak kullanılmıştır. Jelatin hidrojel örneklerinin su içerisinde şişme değerlerinin zamanla artmasının nedeni, suyun jelatin hidrojelleri için iyi bir çözücü olmasıyla açıklanabilir. Hızla polimer zincirlerinin arasına giren çözücü molekülleri ile polimer zincirleri arasında bir etkileşim meydana gelir ve bu etkileşim sonucunda molekül gruplarının birbirini iter ve moleküller birbirinden uzaklaşır böylece şişme değerleri artar.

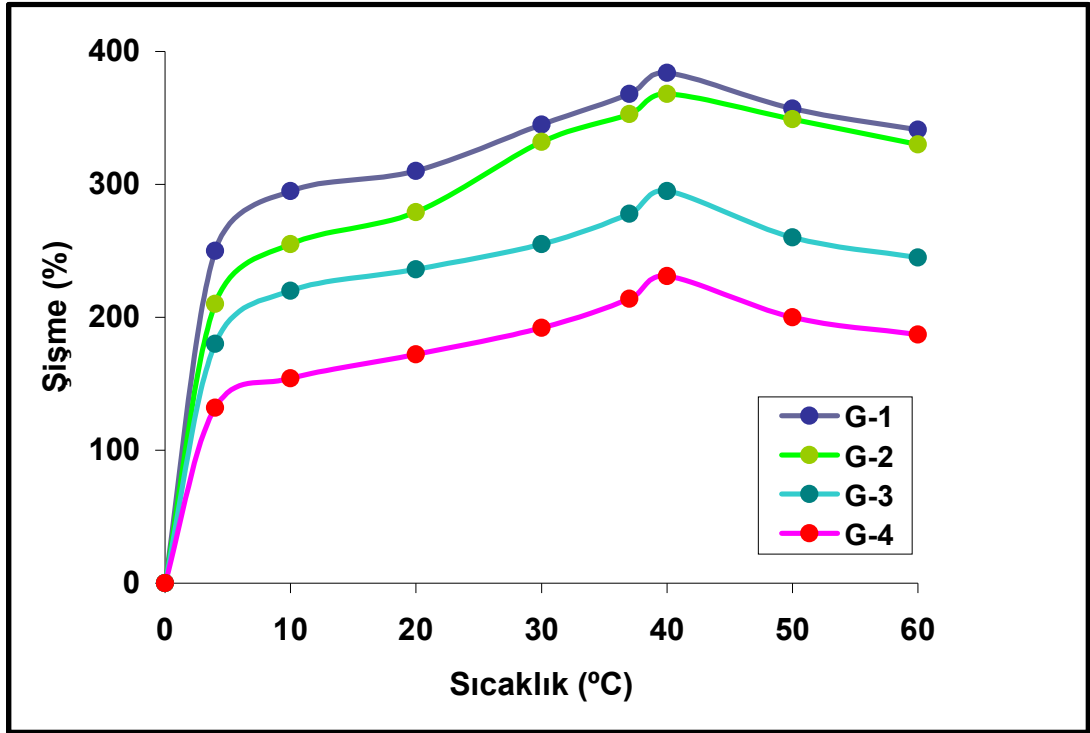


Şekil 4.2. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin zamanla değişim grafiği (37°C, pH=7,4)

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, GA miktarının artması ile şişme değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. En yüksek şişme değerinin G-1 hidrojelinde, en düşük şişme değerinin ise G-4 hidrojelinde olduğu belirlenmiştir. Çapraz bağlanma miktarının artmasıyla polimerik yapının daha da sıkılaştığı söylenebilir. Bu sıkılık arttıkça su moleküllerinin hidrojel içine girmesi ve polimer zincirlerinin birbirinden uzaklaşması zorlaşır, bu sebepten dolayı şişme değerleri daha da azalır [5].

4.2.2. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi

Hidrojellerin ortalama şişme değerlerinin sıcaklıkla değişim sonuçları Ek-5’de verilmiş, ayrıca sonuçlar grafiğe alınarak Şekil 4.3’de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi grafiği (pH=7,4 , 48 saat)

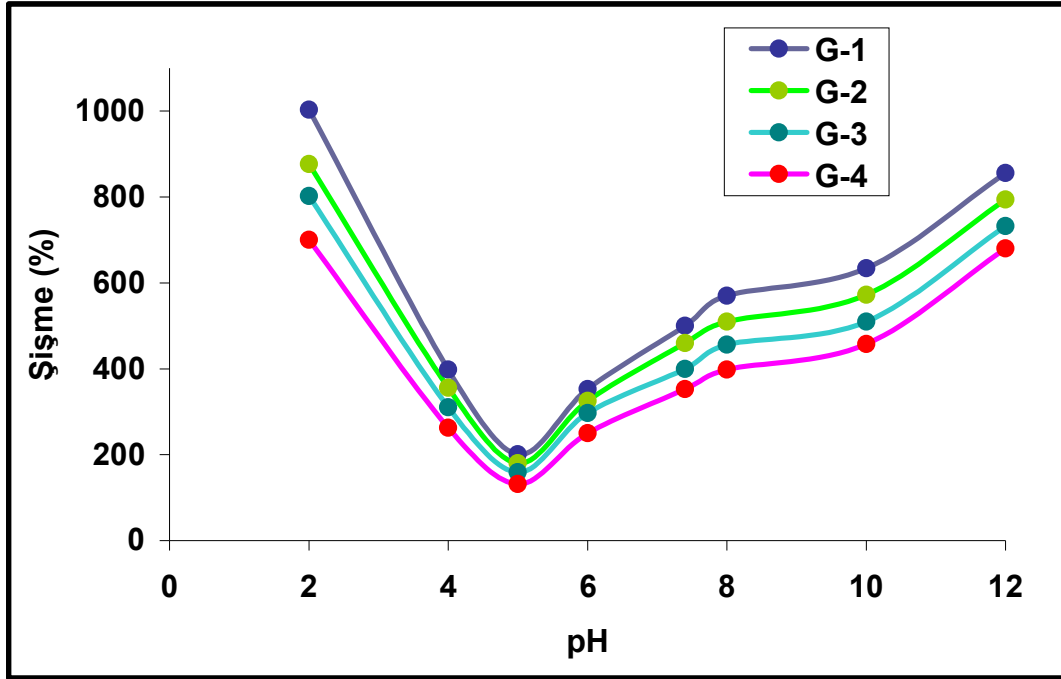
Şekil 4.3’de görüldüğü gibi, sıcaklıkla tüm hidrojeller şişme değerleri önce artmış ve bütün hidrojeller 40°C’de en yüksek şişmeye değerlerine ulaşmıştır. Şişme değerlerinin sıcaklıkla yükselmesi, polimer moleküllerinin termal hareketliliklerinin artışından dolayı olabilir [87]. Sıcaklık 40°C’nin üzerine çıkarıldığında hidrojellerin şişme değerlerinde az bir miktar düşme gözlenmiştir. Hidrojellerin hem kimyasal çapraz bağlardan hem de fiziksel bağlardan oluştuğu bilinmektedir [29]. Jelatin hidrojelindeki fiziksel bağların sıcaklık arttıkça kırılması sonucunda su tutabilecek odacık sayısında bir miktar azalma olabilir ve bu da şişme değerlerinde hafif bir düşmeye yol

açabilir. Bütün hidrojellerin şişme davranışları Şekil 4.2’de sunulan sıralamaya uymuş, GA miktarı arttıkça şişme değeri azalmıştır.

4.2.3. Jelatin hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişimi

Tüm hidrojellerin ortalama şişme değerlerinin pH ile değişim sonuçları Ek-6’da verilmiş, ayrıca sonuçlar grafiğe alınarak Şekil 4.4’de sunulmuştur.

Sonuçlardan görüleceği gibi, hidrojeller düşük pH değerlerinde yüksek şişme değerlerine ulaşmış; pH’nın artması ile şişme değerleri önce azalmış, pH=5’den sonra ise şişme değerleri yeniden yükselmiştir. Bu durum kullandığımız jelatinin izoelektrik noktasına bağlı olarak açıklanabilir. Jelatin, kollajenin asidik veya alkali hidrolizi ile elde edilen, polipeptitlerden oluşan doğal bir polimerdir. Doğal polipeptitlerin hem pozitif hem negatif yük içeren poliamfolitik makromoleküller oldukları ve bu yüzden izoelektrik pH’larının bulunduğu bilinmektedir. Bu pH’da yapıdaki pozitif ve negatif yüklerin birbirine eşit olduğu, yani net yükünün sıfır olduğu bilinmektedir. İzoelektrik pH’ya sahip poliamfolitik moleküller, pH değerlerine ve zincirdeki iyonik kuvvetlere bağlı olarak farklı yapılarda bulunabilirler [29]. Hidrojeller bu pH’da büzülerek küçülür. İzoelektrik pH’nın altındaki pH’da yapıdaki amino grupları daha çok (+) yükle yüklenmeye, izoelektrik pH’nın üstündeki pH’da ise karboksil gruplarının hidrojenlerini kaybetmesiyle yapı daha çok (-) yükle yüklenmeye başlar. Pozitif ya da negatif yüklerin çokluğunda benzer yükler birbirini daha çok iteceğinden şişme kolaylaşır. Böylece hidrojelde oluşan iyonlaşmış haldeki gruplar birbirlerini iterek yapının gevşemesini artırır ve böylece şişme değerleri artar. Bütün hidrojellerin şişme değerleri Şekil 4.2’de sunulan sıralamaya uymaktadır.



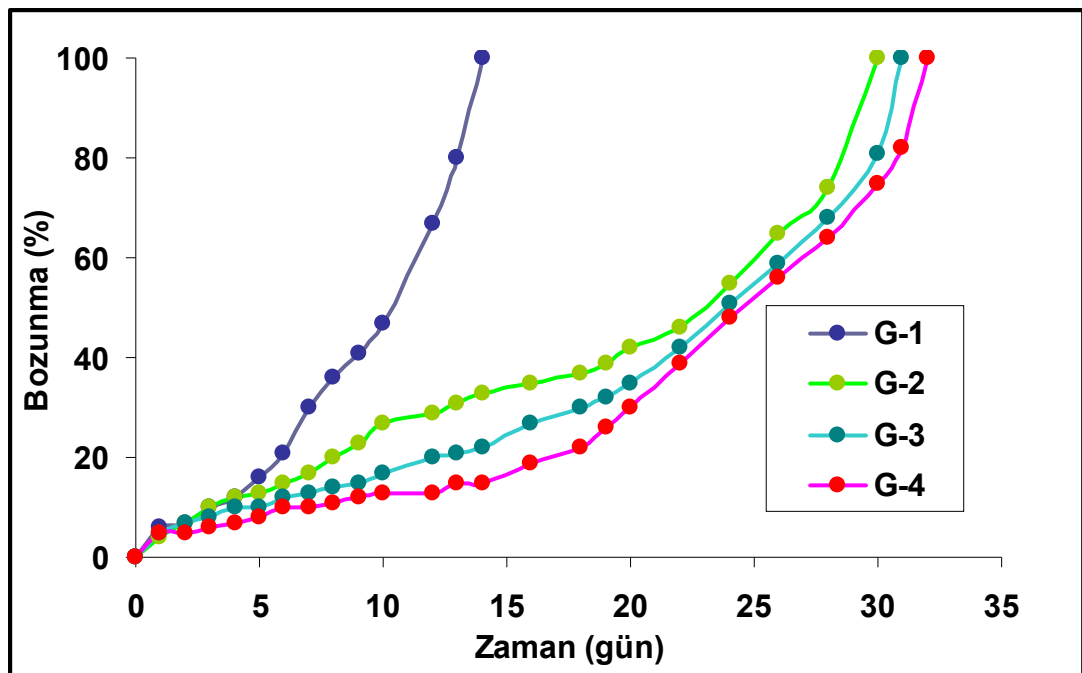
Şekil 4.4. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin pH ile değişimi grafiği (37°C,48 saat)

4.3. Jelatin Hidrojellerinin Bozunma Davranışları

Jelatin doğal ve biyobozunur bir polimerdir. Diğer doğal polimerlere nazaran daha az toksik ve biyouyumlu olmasından dolayı daha çok ön plana çıkmaktadır. Ayrıca çok sayıda yan grupta sahip olması nedeniyle kolayca çapraz bağlanabilir ve modifiye edilebilir [88]. Çalışmamızın ileri aşamalarında lipaz içeren jelatin hidrojellerin vücut ortamında kullanılmasının incelenmesi de düşünülmektedir. Bu hidrojellerin vücutta bir yandan lipaz aktivasyonunu sürdürmesi ve bir yandan da bozunarak vücuttan atılması istenilmektedir. Bu nedenle hazırlanan hidrojellerin bozunma davranışları da önemlidir. Çapraz bağlayıcı miktarlarının değiştirilmesiyle hidrojellerin bozunma süreçlerinin değişimi belirlenmek istenmiştir. İleriki çalışmalarda bu hedefe yönelik hidrojinin seçilmesi mümkündür.

Tüm hidrojellerin bozunma davranışları 37°C'de ve pH=7,4'de, Bölüm 3.5'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Bu hidrojellerin ortalama sonuçları Ek-7'de

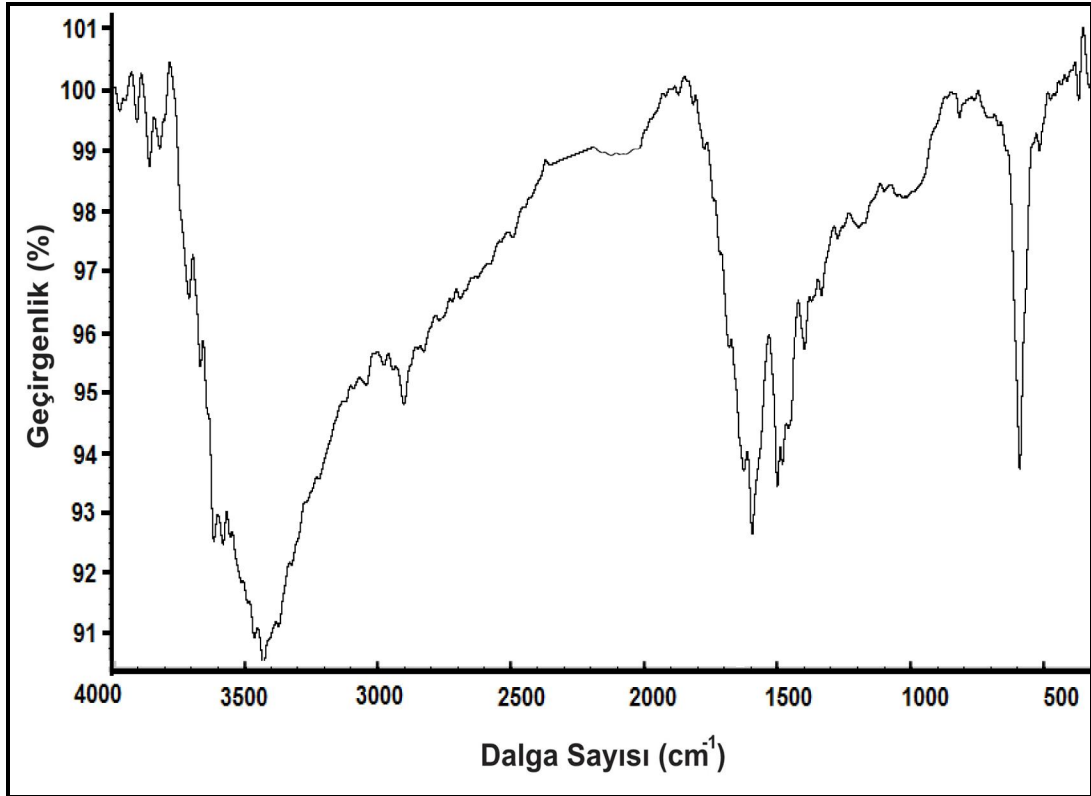
verilmiş ve grafiğe alınarak Şekil 4.5'de sunulmuştur. Sonuçlardan da görüleceği gibi, çapraz bağlayıcı miktarının en az olduğu G-1 hidrojelinin, diğer hidrojellere göre daha hızlı bozunduğu ve 14. günde tamamen yok olduğu saptanmıştır. G-2, G-3 ve G-4 hidrojellerinin ise bozunma süreçleri yaklaşık 30-32 gün sonunda tamamlanmıştır. G-4 hidrojelinde içerdiği çapraz bağlayıcı oranının en fazla olmasından dolayı en çok dayanan hidrojel olmuştur.



Şekil 4.5. Hidrojellerin ortalama % bozunma değerlerinin zamanla değişim grafiği (37°C, pH=7,4)

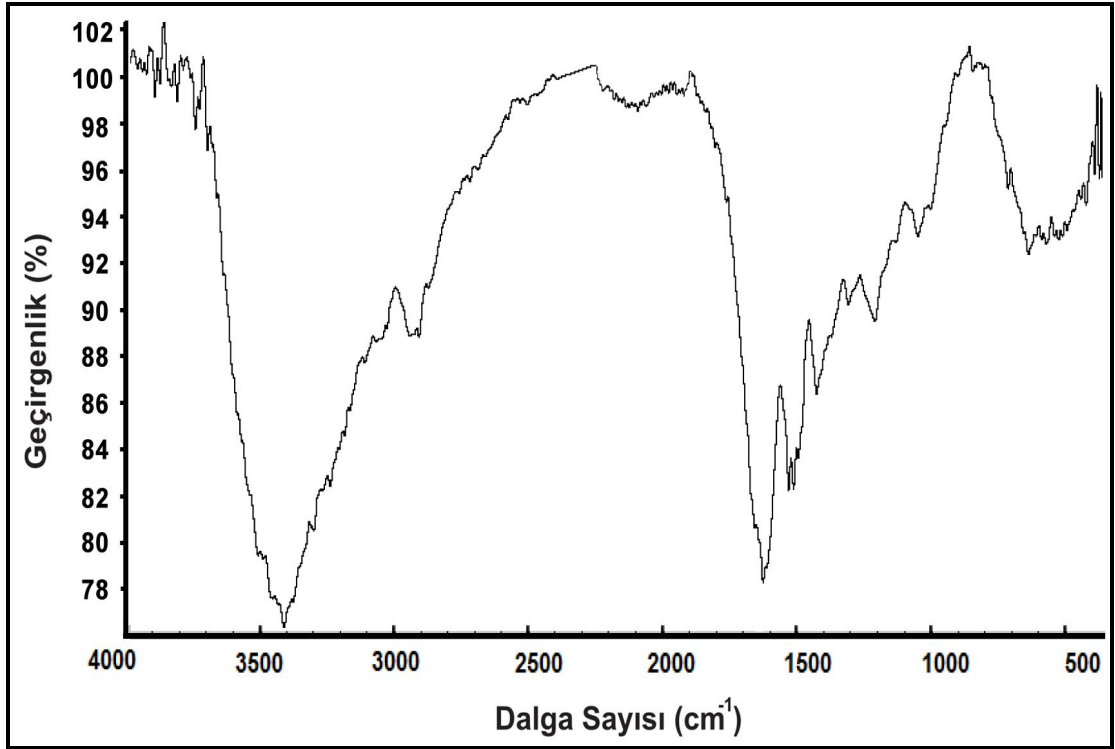
4.4. FTIR Analizleri

Saf jelatin, CDI ile aktifleştirilmiş jelatin hidrojel, saf lipaz ve lipaz immobilize edilmiş jelatin hidrojel numunelerinin yapı analizleri FTIR spektrometresi ile yapılmış, sonuçlar aşağıda irdelenmiştir. FTIR spektrumları Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



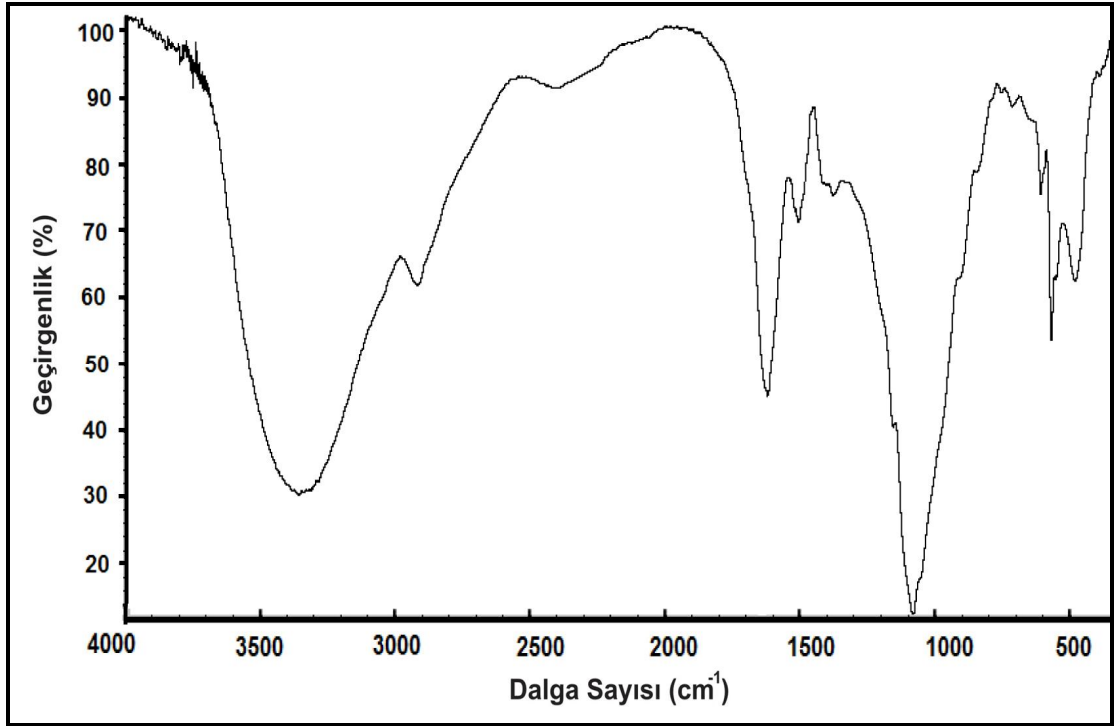
Şekil 4.6. Saf jelatinin FTIR spekturumu

Şekil 4.6'da verilen, saf jelatinin FTIR spekturumu sunulmuştur. Bu spektrumda jelatine ait $3450\text{--}3310\text{ cm}^{-1}$ 'de orta şiddetli pik N-H gerilme bandını, $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen geniş pik O-H gerilme bandını, $2850\text{--}2750\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik H-C=O için C-H gerilme bandını, 1700 cm^{-1} 'deki pik $\text{R}_2\text{C=O}$ için C=O gerilme bandını, 1450 cm^{-1} 'de orta şiddetli pik $\text{CH}_2\text{-C=O}$ için alifatik C-H düzlem içi eğilme bandını, 1380 cm^{-1} 'de orta şiddetli pik -CH_3 için alifatik C-H düzlem içi eğilme bandını, 1005 cm^{-1} 'deki yayvan pik C-O, C-N, C-C gerilme bantlarını ve 720 cm^{-1} 'deki pik $\text{-(CH}_2)_3\text{-}$ için C-H düzlem dışı eğilme bantlarını göstermektedir [89].



Şekil 4.7. CDI ile aktifleştirilmiş jelatin hidrojelinin FTIR spektrumu

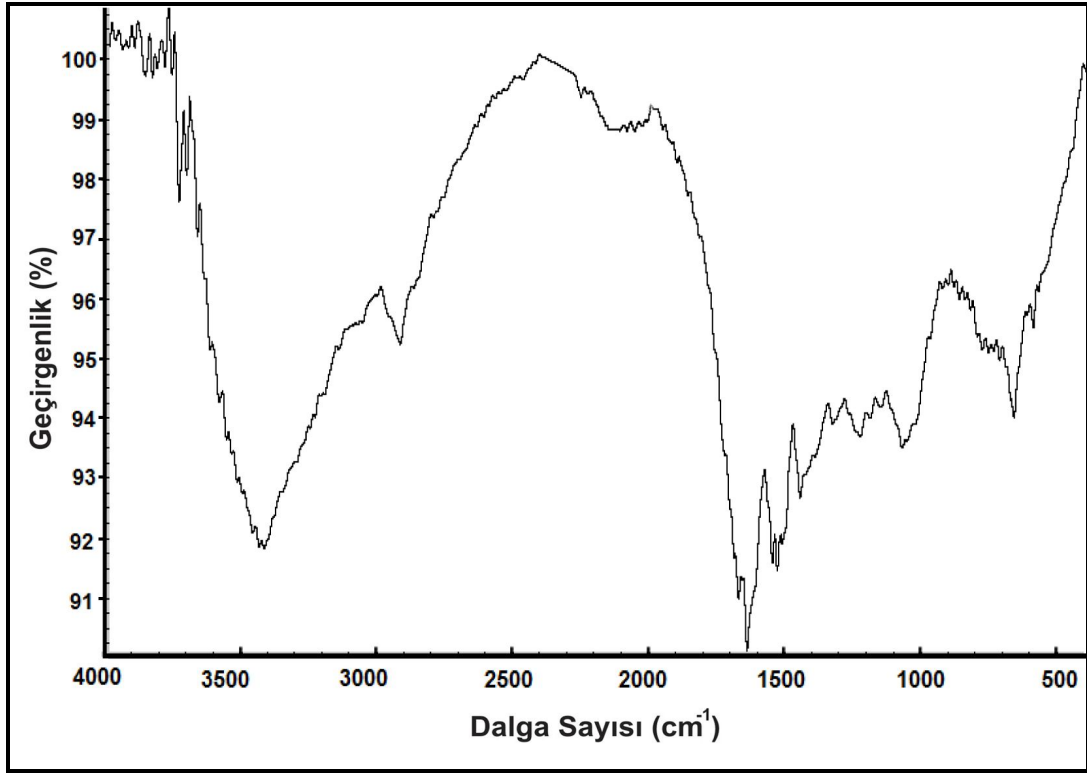
Şekil 4.7’de CDI ile aktifleştirilmiş jelatin hidrojelinin FTIR spektrumu sunulmuştur. Bu spektrumda da saf jelatine ait bantlar da mevcuttur. 3450–3310 cm^{-1} ’deki geniş ve orta şiddetteki pikin jelatinin amino gruplarının çapraz bağlanması sonucunda oluşan N-H ve O-H gerilme bantlarına ait olduğunu düşünebiliriz. Ayrıca Şekil 4.1’de gösterilen Ürün-1’e ait Schiff baz bağlanmanın oluşumu ile ortaya çıkan C=N gerilme bandını 1642-1450 cm^{-1} ’deki keskin piklerle ilişkilendirebiliriz. Saf CDI’e ait 2100-2200 cm^{-1} ’deki orta şiddetli N=C=N gerilme bandı literatürde özgün bant olarak verilmektedir. Şekil 4.7’de söz konusu bant daha yayvan olarak görülmektedir. Bunun sebebi CDI’in jelatine –N-C=N- bağ yapısı şeklinde bağlanması olabilir. Böylece jelatin hidrojelinin CDI ile aktifleştirilmesinin gerçekleştirildiği söylenebilir. Sonuçlar literatür ile uyum içindedir [86].



Şekil 4.8. Saf lipazın FTIR spektrumu

Şekil 4.8’de kullandığımız saf lipazın FTIR spektrumu sunulmuştur. Bu spektrumda genel olarak proteinlere ait pikler mevcuttur. Farklı olarak 1100 cm^{-1} ’de belirgin ve şiddetli alifatik C-N-C bandı görülmektedir. Bu da kullandığımız lipazda bu gruplarının yoğun bir şekilde var olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.7’deki FTIR spektrumunda gözlenen titreşim bandları, Şekil 4.9’da verilen lipaz immobilize edilmiş jelatin hidrojelinin FTIR spektrumunda da görülmektedir. Bu spektrumda, jelatin ve lipazın her ikisinin de protein yapısında olmasından dolayı gözlenen titreşim bantlarında özel bir farklılık gözlenmemektedir. Ancak kullandığımız lipaza ait belirlemiş olduğumuz 1100 cm^{-1} ’deki pik alifatik -C-N-C bandı bu spektrumda da mevcuttur. Böylece lipaz immobilizasyonunun gerçekleşmiş olduğu kanaatine FTIR spektrumları aracılığıyla da varılmıştır.



Şekil 4.9. Lipaz immobilize edilmiş jelatin hidrojelinin FTIR spektrumu

4.5. Farklı Lipaz Derişimlerinin İmmobilize Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi ve Serbest Lipaz Aktivitesi ile Karşılaştırılması

İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılacak hidrojelın seçiminde, jelleşme ve şişme/bozunma deneylerinden elde edilen sonuçlardan yararlanılmıştır. En çok şişen G-1 hidrojelı, diğer hidrojellere nazaran çok çabuk bozunduğu ve ayrıca en düşük jelleşme yüzdesine sahip olduğu için immobilizasyon işleminde tercih edilmemiştir. Jelleşme yüzdeleri ve şişme değerleri birbirine yakın olan G-2, G-3 ve G-4 hidrojelleri, farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içermelerine rağmen üçü de yaklaşık bir ayda bozunmuştur. Aralarından immobilizasyon çalışmaları için G-2 hidrojelı seçilmiştir.

İmmobilizasyon işlemi, Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi farklı derişimdeki lipaz çözeltilerinde yürütölmüştür. Her bir jelatin hidrojel örneğe immobilize olan lipaz miktarının net değeri Şekil 3.2'de verilen kalibrasyon doğrusundan

yararlanılarak tayin edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Bu çizelge incelendiğinde, en yüksek derişimli (10,0 mg/mL) lipaz çözeltisi kullanılarak yapılan immobilizasyonda, immobilize olan lipaz miktarının saptanamadığı görülmektedir. Bunun sebebi yüksek derişimli çözeltide azalan lipaz miktarının Şekil 3.2’de verilen kalibrasyon doğrusundan gözlenememiş olmasıdır. 4,0 mg/mL ve 2,0 mg/mL lipaz derişimlerinde gerçekleşen immobilizasyonlarda çözeltilerdeki azalan lipaz miktarları aynı kalibrasyon doğrusundan gözlenmiş ve her ikisi için de immobilize olan miktar 40,0 mg olarak bulunmuştur. 0,4 mg/mL ve 0,04 mg/mL lipaz derişimlerindeki immobilizasyonlarda, immobilize olan miktarlar sırasıyla 4,8 mg ve 1,0 mg olarak hesaplanmıştır. Bu durum beklenen bir sonuçtur. Boyutları aynı olan hidrojel örneklerinin her birinin yüzeyinde aklifleştirilebilen uçlarının sayısının sabit kaldığı düşünülürse, immobilizasyon lipaz derişimine doğrudan bağlı olmaktadır. İmmobilizasyon işleminde yüksek derişimli enzim kullanılsa bile belli boyutlardaki hidrojel örneğe en fazla immobilize olabilecek enzim miktarı değişemez.

Farklı lipaz derişimlerinde yapılan immobilizasyonlarda, immobilize lipazların her biri için enzimatik tepkime boyunca dakikada 1 μ mol p-NPP ile etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarları belirlenmiş ve aktivite tayinleri Bölüm 3.11’de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi immobilize lipaz miktarı arttıkça, tepkime boyunca dakikada 1 μ mol p-NPP ile etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarları da göreceli olarak artmaktadır. Bu da fazla miktarda lipazın, p-NPP ile etkileşmesi demektir. Verilen sonuçlara göre en düşük lipaz immobilize edilmiş olan hidrojel örnek de aktif olarak tepkime vermektedir. Tepkime hızlarına bakıldığında, immobilize lipaz miktarları farklı olan hidrojel örneklerinde birim zamanda yaklaşık aynı hızlarda tepkimenin yürüdüğü saptanmıştır.

İmmobilize lipazlar ile serbest lipazın aktivitelerini karşılaştırabilmek için serbest lipazın da Bölüm 3.10’da anlatılan yöntemle göre aktivitesi tayin

edilmiştir. Ayrıca serbest lipaz için dakikada 1 μmol p-NPP ile etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarı da belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında serbest lipazda, dakikada 1 μmol p-NPP ile çok az miktarda lipazın tepkimeye girdiği ve serbest lipazın p-NPP’ı harcama hızının daha büyük olduğu belirlenmiştir. Böylece serbest lipazın immobilize lipazlara göre daha aktif olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.2. İmmobilize ve serbest lipazların aktiviteleri

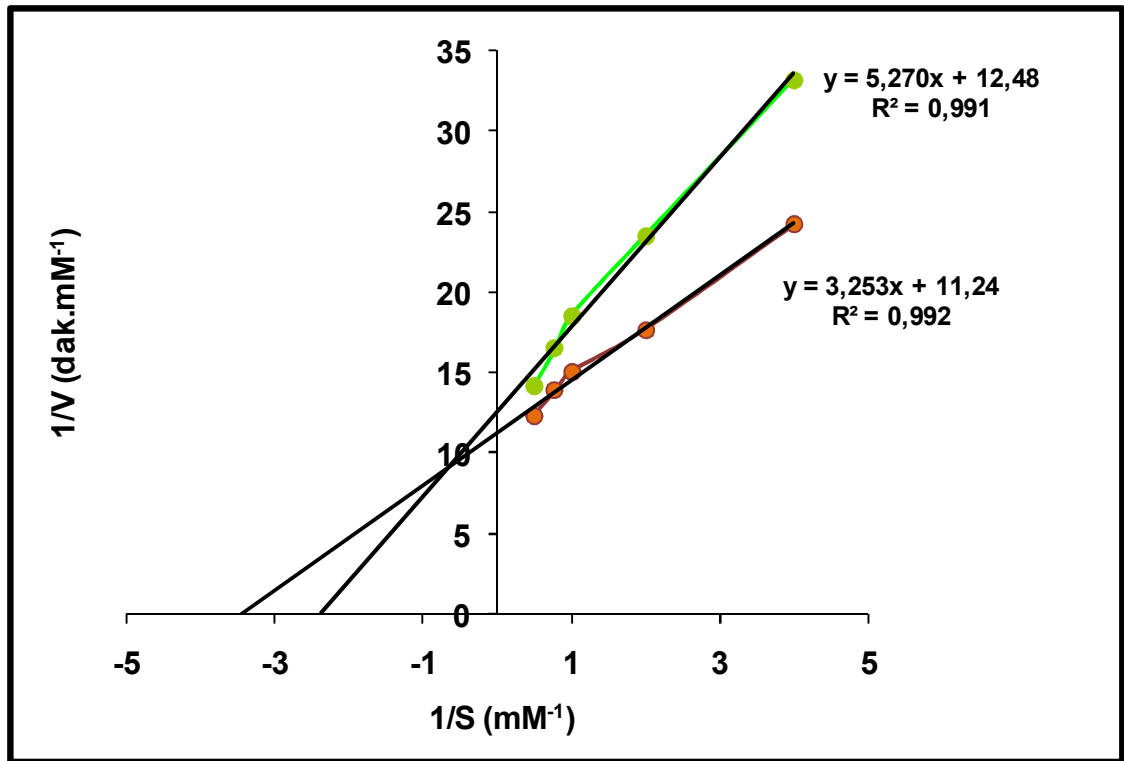
Lipaz çözeltisi derişimi (mg/mL)	Hidrojel başına immobilize olan lipaz miktarı (mg)	Etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarı (mg)	Aktivite (V) $\times 10^2$ (mM.dak ⁻¹)
10,0	-	-	-
4,0	40,0	71,4	5,8
2,0	40,0	69,0	5,5
0,4	4,8	8,8	5,3
0,04	1,0	1,8	5,4
0,4 (Serbest lipaz)	-	1,2	6,8

Gerek immobilize lipazın aktifliğine substrat derişimlerinin etkisi deneyinde gerekse aktifliğe depolama süresinin ve kullanım sayısının etkisi deneylerinde 2,0 mg/mL derişimli lipaz çözeltisi kullanılarak yapılan immobilizasyondan elde edilen hidrojel örnekler kullanılmıştır.

4.6. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

Lipazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla 5 farklı derişimde (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,3 mM, 2 mM) p-NPP çözeltileri hazırlanarak, serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri Bölüm 3.10 ve 3.11’de anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir.

Serbest lipaz için Ek-8’de, immobilize lipaz için Ek-9’da verilen ortalama sonuçlara göre $1/S$ ve $1/V$ değerleri grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.10). Bu Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla, serbest ve immobilize lipazların K_m ve V_{mak} değerleri bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.10. Serbest (—●—) ve immobilize lipazlar (—●—) için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lipazların K_m ve V_{mak} değerleri

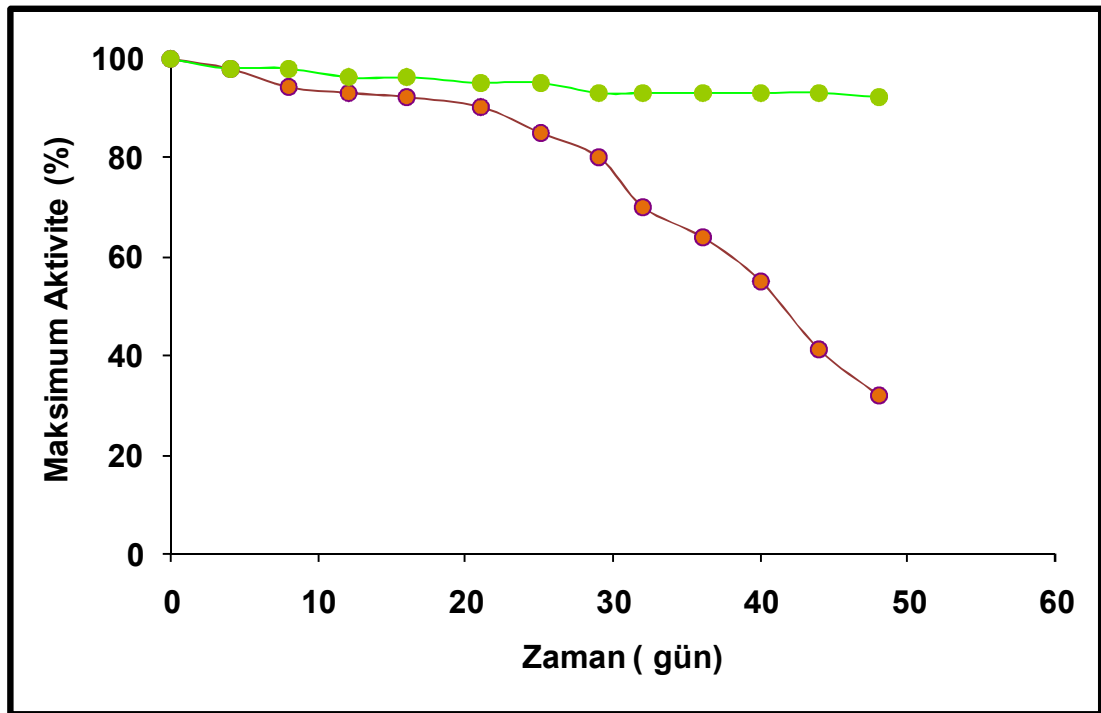
Örnek	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)	K_m (mM)
Serbest Lipaz	0,089	0,290
İmmobilize Lipaz	0,080	0,422

Lineweaver-Burk grafiklerine bakılarak serbest ve immobilize enzim için aktivite mukayesesi yapılabilir. İmmobilize lipazın K_m değerleri serbest lipaza göre daha yüksek bulunmuştur. K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Bu değer ne kadar küçük olursa enzimin substrata ilgisi o kadar fazla demektir. Diğer bir ifadeyle K_m değerindeki artış, enzim ve substrat arasındaki etkileşiminin daha az olduğunu ve enzimin yarı doyumluğa ulaşması için daha fazla substrat gerektiğini açıklar [90]. K_m değerleri karşılaştırıldığında serbest lipazın, immobilize lipaza göre daha aktif olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada bulunan K_m ve V_{mak} değerleri literatürle uyumludur. Örneğin, *Homicola lanuginosa* lipazının poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) desteğine immobilize edildiği bir çalışmada, serbest lipaz için K_m değeri 3,58 mM ve V_{mak} değeri 10,72 mM.dak⁻¹, immobilize lipaz için K_m değeri 7,36 mM ve V_{mak} değeri 7,13 mM.dak⁻¹ olarak bulunmuştur [90]. *Candida Rugosa* lipazının kitosanla modifiye edilmiş membran yüzeyine immobilize edildiği diğer bir çalışmada ise, serbest lipaz için K_m değeri 0,45 mM ve V_{mak} değeri 46,4 U/mg-protein, immobilize lipaz için K_m değeri 1,43 mM ve V_{mak} değeri 21,2 U/mg-protein olarak bulunmuştur [91].

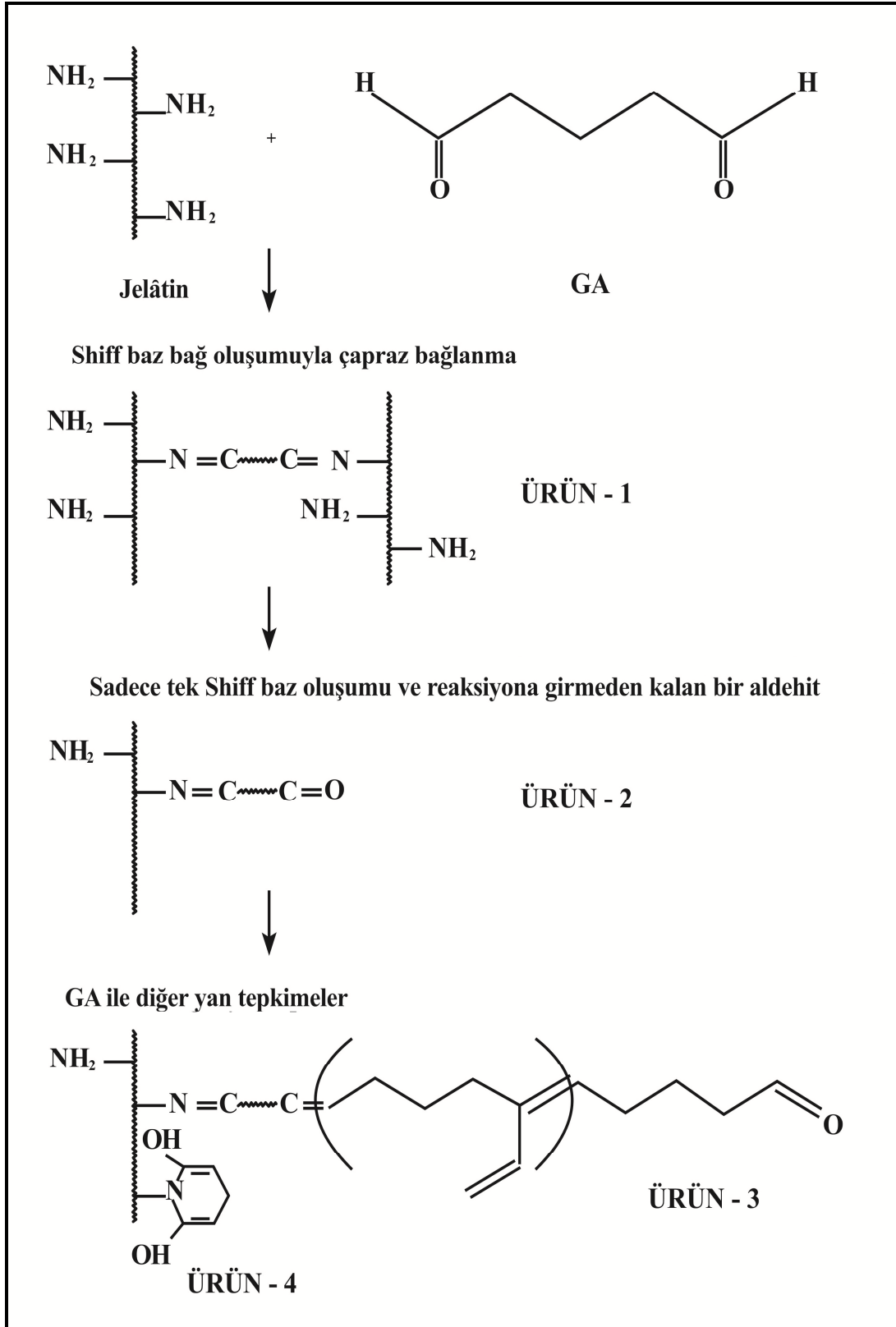
4.7. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lipaz aktivitesine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla 4°C'de saklanan lipaz çözeltisinin belirli aralıklarla 48 gün boyunca Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi aktivitesi tayin edilmiştir. Benzer çalışma Bölüm 3.11'de anlatıldığı şekilde immobilize lipaz için de yapılmıştır. Serbest ve immobilize lipazların maksimum aktivitesinin depolama süresiyle değişiminin ortalama deneysel verileri Ek-10 ve Ek-11'de sunulmuştur. Bu veriler grafiğe geçirilerek Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre 4°C'de depolamada 48. günde serbest lipazın başlangıç aktivitesinin %32'sini ve immobilize lipazın ise başlangıç aktivitesinin %92'sini koruduğu saptanmıştır.



Şekil 4.11. Serbest (-●-) ve immobilize lipazların (-●-) maksimum aktivitesinin depolama süresi ile değişiminin grafiği

Elde edilen sonuçlar literatürle kıyaslandığında başarılı bir immobilizasyon işlemi gerçekleştirildiği söylenebilir. *Candida Rugosa* lipazının kitosan/polivinil alkol karışımından oluşan nanofiber membrana GA çapraz bağlayıcısı ile

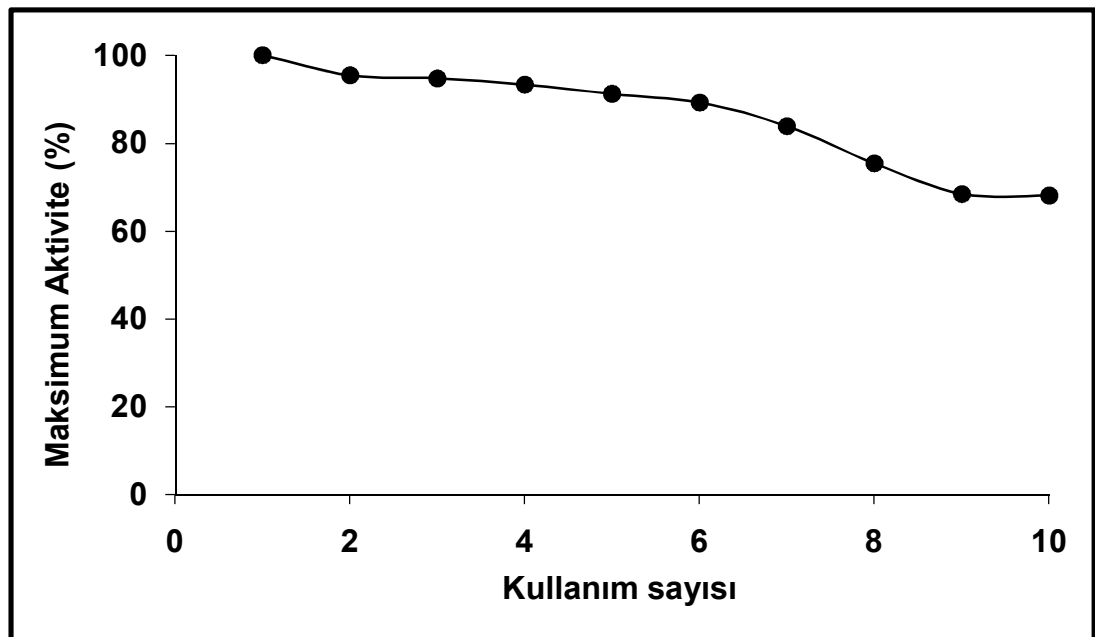


Şekil 4.1. Çapraz bağlı jelatin hidrojel oluşumunun tepkime mekanizması

immobilize edildiği bir çalışmada, 4°C'de saklanan immobilize lipazın 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %56'sını koruduğu, serbest lipazın ise başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir [92]. *Candida Rugosa* lipazının kitosan üzerine hidroksil gruplarının aktivasyonu ile immobilize edildiği diğer bir çalışmada 30 gün sonunda immobilize lipazın başlangıç aktivitesinin %54'ünü koruduğu, serbest lipazın ise başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiği bulunmuştur [78].

4.8. İmmobilize Lipaz Aktivitesinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

G-2 jelatin hidrojeline immobilize edilmiş lipaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılmış, immobilize lipazın aktivitesi Bölüm 3.11'de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. İmmobilize lipazın maksimum aktivitesinin kullanım sayısı ile değişiminin ortalama sonuçları Ek-12'da verilmiştir. Sonuçlar grafiğe geçirilerek Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Bu şekilde görüldüğü gibi, immobilize lipazın 10 kez kullanımı sonunda başlangıç aktivitesinin %68'ini koruduğu saptanmıştır.



Şekil 4.12. İmmobilize lipazın maksimum aktivitesinin kullanım sayısı ile değişiminin grafiği

Elde edilen bu değer literatürle kıyaslandığında oldukça başarılı bir immobilizasyon gerçekleştirildiği söylenebilir. Örneğin, *Candida Rugosa* lipazının kitosan/polivinil alkol karışımından oluşan nanofiber membrana GA çapraz bağlayıcısı ile immobilize edildiği bir çalışmada, immobilize lipazın 10 kez kullanımı sonucunda başlangıç aktivitesinin %46'sını koruduğu belirtilmiştir [92]. *Candida Rugosa* lipazının, jelatin ve kitosan ile modifiye edilmiş nanofiber poli(akrilonitril-ko-maleik asit) membranlara immobilize edildiği diğer bir çalışmada, jelatin modifiye nanofiber membranlar için immobilize lipazın 10 kez kullanımı sonucunda başlangıç aktivitesinin %55'ini, kitosan modifiye nanofiber membranlar için ise başlangıç aktivitesinin %60'ını koruduğu bulunmuştur [93].

5. SONUÇLAR

- ❖ Sunulan çalışmada lipaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere farklı oranlarda GA çapraz bağlayıcısı içeren dört tür jelatin hidrojel hazırlandı. Hazırlanan hidrojellerin jelleşme yüzdeleri, gravimetrik yöntem kullanılarak hesaplandı. GA miktarının artmasıyla yüzde jelleşme değerlerinin arttığı belirlendi.
- ❖ Hidrojellere zamana karşı şişme testleri uygulandı. Tüm hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla arttığı ve yaklaşık 48 saat civarında sabit değere ulaştığı gözlemlendi. GA miktarının artmasıyla şişme değerlerinin azaldığı saptandı. En yüksek şişme değeri G-1 hidrojel için yaklaşık olarak %368, en düşük şişme değeri ise G-4 hidrojel için yaklaşık olarak %213 olarak elde edildi.
- ❖ Hazırlanan hidrojellere sıcaklığa karşı şişme testleri uygulandı. Sıcaklık arttıkça tüm hidrojellerin şişme değerlerinin arttığı ve 40°C civarında en yüksek şişme değerlerine ulaşıldığı saptandı. Sıcaklık 40°C'nin üzerine çıkarıldığında hidrojellerin şişme değerlerinde bir miktar azalma belirlendi. En yüksek şişme değeri G-1 hidrojel için yaklaşık olarak %384, en düşük şişme değeri ise G-4 hidrojel için yaklaşık olarak %231 olarak bulundu.
- ❖ Hazırlanan hidrojellere pH'ya karşı şişme testleri uygulandı ve tüm hidrojeller düşük pH değerlerinde yüksek şişme değerlerine ulaştı, pH'nın artması ile şişme değerleri önce azaldı ve pH=5'den sonra ise yeniden arttığı belirlendi. En yüksek şişme değeri pH= 2'de G-1 hidrojel için yaklaşık olarak %1003, en düşük şişme değeri ise G-4 hidrojel için yaklaşık olarak %700 olarak bulundu.

- ❖ Hidrojellerin bozunma deneyleri kütle kayıpları takip edilerek yapıldı. En az GA içeren G-1 hidrojelinin, diğer hidrojellere göre daha hızlı bozunduğu ve 14. günde tamamen yok olduğu saptandı. G-2, G-3 ve G-4 hidrojellerinin ise bozunma süreçlerinin yaklaşık 30-32 gün sonunda tamamlandığı belirlendi. G-4 hidrojel, içerdiği çapraz bağlayıcı oranının en fazla olmasından dolayı en çok dayanan hidrojel olduğu saptandı.
- ❖ Jelleşme ve bozunma/şişme testleri sonuçları değerlendirilerek hazırlanan hidrojellerden immobilizasyon çalışmaları için G-2 hidrojel seçildi ve bu hidrojele kovalent bağlanma yöntemiyle lipaz immobilize edildi. En verimli lipaz immobilizasyon koşullarını belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki lipaz çözeltileri kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirildi ve her bir jelatin hidrojel örneğine immobilize olan lipaz miktarının net değeri hesaplandı. Immobilizasyon işleminde yüksek derişimli lipaz kullanılsa bile belli boyutlardaki hidrojel örneğe immobilize olabilecek lipaz miktarının değişmediği saptandı.
- ❖ Immobilize lipazların her biri için enzimatik tepkime boyunca dakikada 1 μmol p-NPP ile etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarları belirlendi ve tepkime hızları hesaplanarak aktivitelere bakıldı. Tepkime hızları karşılaştırıldığında, immobilize lipaz miktarları farklı olan hidrojel örneklerinde birim zamanda yaklaşık aynı hızlarda tepkimenin yürüdüğü saptandı. Hidrojelle immobilize olan lipaz miktarı arttıkça, tepkime boyunca dakikada 1 μmol p-NPP ile etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarlarının da göreceli olarak arttığı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre en düşük lipaz immobilize edilmiş olan hidrojel örneğinin de aktif olarak tepkime verdiği saptandı.
- ❖ Immobilize lipazlar ile serbest lipazın aktivitelerini karşılaştırabilmek için serbest lipazın da aktivitesi tayin edildi. Ayrıca serbest lipaz için dakikada 1 μmol p-NPP ile etkin olarak tepkimeye giren lipaz miktarı belirlendi. Serbest lipazda, dakikada 1 μmol p-NPP ile çok az miktarda

lipaz tepkimeye girdiği ve serbest lipazın p-NPP'ı harcama hızının daha büyük olduğu belirlendi. Böylece serbest lipazın immobilize lipazlara göre daha aktif olduğu saptandı.

- ❖ FTIR analizlerinden elde edilen spektrumlardan, CDI ve lipazın, jelatin desteğine bağlandığına dair özđün pikler gözlemlendi ve lipaz immobilizasyonunun gerçekteştiği kanaatine FTIR aracılığıyla da varıldı.
- ❖ Immobilize lipazın aktifliğine substrat derişimlerinin etkisi deneyinde, serbest lipaz için K_m değeri 0,290 mM ve V_{mak} değeri 0,089 mM.dak⁻¹, immobilize lipaz için ise K_m değeri 0,422 mM ve V_{mak} değeri 0,080 mM.dak⁻¹ olarak bulundu. K_m değerleri karşılaştırıldığında serbest lipazın, immobilize lipaza göre daha aktif olduğu belirlendi.
- ❖ Immobilize lipazın 10 kez kullanımı sonunda başlangıç aktivitesinin %68'ini koruduğu saptandı.
- ❖ 4°C'de depolamada 48. günde serbest lipazın başlangıç aktivitesinin %32'sini, immobilize lipazın ise başlangıç aktivitesinin %92'ini koruduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

1. Know, Y., Song, M., Hwang, Y. G., Chang, S. H., Hong, W. J., "Effect of materials structure and composition on properties of siloxane-containing hydrogels", **Current Applied Physics**, 8: 486-489 (2008).
2. Duran, S., Şolpan, D., Güven, O., "Synthesis and characterization of acrylamide acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes", A Thesis of Master of Science, **The Institute for Graduated Studies in Pure and Applied Sciences of Hacettepe University**, Ankara, 6-8 (2000).
3. Karadağ, E., Saraydin, D., Çetinkaya, S., Güven, O., "In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels", **Biomaterials**, 17: 67-70 (1996).
4. Peppas, N.A., Wright, S.L., "Drug dissolution and binding in ionizable interpenetrating networks from poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid).", **European Journal Pharmacology & Biopharmacy**, 46: 15-29 (1998).
5. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K., "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin.", **Biomaterials**, 24: 4827-4832 (2002).
6. Gümüşderelioğlu, M., "Biyomalzemeler", **Bilim ve Teknik Dergisi, TÜBİTAK**, Temmuz özel sayısı, 2-22 (2002).
7. Wiseman, A., "Handbook of Enzymes Biotechnology", (2.baskı), London, **Ellis Horwood Ltd.** (1987).
8. Uludağ, Y., "İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi", Yüksek Lisans Tezi, **Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kocaeli, 5-15 (2000).
9. Krajewska, B., "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review", **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 126-139 (2004).
10. Peng, Y., Zhi-Kang, X., Jian, W., Christophe, I., Patrick, S., "Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization", **Biomaterials**, 27: 4169-4176 (2006).

11. Nasratun, M., Said, H.A., Noraziah, A., Abd Alla, A.N., "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on chitosan beads for transesterification reaction", ***American Journal of Applied Sciences***, 6 (9): 1653-1657 (2009).
12. Yong, Q., Kinam, P., "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery", ***Advanced Drug Delivery***, 53: 321–339 (2001).
13. Gupta, P., Vermani, K., Garg, S., "Hydrogels from controlled release to pH-responsive drug delivery", ***Drug Discovery Today***, 7: 569-578 (2002).
14. Güven, O., Şen, M., "Preparation and characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels", ***Polymer***, 42: 7634-7652 (2001).
15. Mahdavinia, G.R., Pourjavadi, A., Hosseinzadeh, H., Zohuriaan, M.J., "Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties", ***European Polymer Journal***, 40: 1399-1407 (2004).
16. Akçakaya, İ., "İyonik poli(N,N dimetilakrilamid-ko-akrilamid) hidrojellerinin sentezi ve şişme davranışları", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 3-5, 13-17 (2005).
17. Huglin, M.B., Zakarai, M.B., "Swelling properties of copolymeric hydrogels prepared by gamma irradiation", ***Journal of Applied Polymer Science***, 31: 457-475 (1986).
18. Taşdelen, B., Kayaman, N., Güven, O., Baysal, B.M., "Anticancer drug release poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels", ***Radiation Physics and Chemistry***, 73: 340-345 (2005).
19. Karadağ, E., Saraydin, D., Çetinkaya, S., Güven, O., "Cationic dye adsorption by Acrylamide/Itaconic acid Hydrogels in Aqueous Solutions", ***Polymer for Advanced Technologies***, 8: 574- 578 (2004).
20. Nursevin, H., Saraydin, D., Karadağ, E., Çaldıran, Y., Güven, O., "Influence of some aromatic amino acid on the swelling behavior of acrylamide/maleic acid hydrogel", ***Polymer Bulletin***, 40: 575-581 (1998).
21. Duran, S., Şolpan, D., Güven, O., "Synthesis and characterization of acrylamide-acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes", ***Nuclear Instruments and Methods in Physics Research***, B: 151: 196-199 (1999).

22. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., "Hydrogels in pharmaceutical formulations", ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 50: 27-46 (2000).
23. Park, K., Shalaby, S.W.W., Park, H., "Biodegradable hydrogels for drug delivery", ***Technomic Publishing Company***, 1-12, 35-66 (1993).
24. Orlov, Y., Xu, X., Maurer, G., "Swelling of nonionic N-isopropyl acrylamide hydrogels in aqueous solutions of (acetic acid or pyridine), ***Fluid Phase Equilibria***, 238: 87-94 (2005).
25. Yoshihito, O., Khokhlov, A., "Polymer gels and networks", ***Marcel Dekker Inc.*** New York, (2001).
26. Hennink, W.E., Nostrum, C.F., "Novel crosslinking methods to design hydrogels", ***Advanced Drug Delivery***, 54: 13-36 (2002).
27. Karadağ, E., SARAYDIN, D., "Swelling studies of super water retainer acrylamide/crotonic acid hydrogels crosslinked by trimethylolpropane triacrylate and 1,4-butanediol dimethacrylate", ***Polymer Bulletin***, 48: 299-307 (2002).
28. Hoarea, T., Daniel, S., "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges", ***Polymer***, 49: 1993-2007 (2008).
29. Esposito, E., Cortesi, R., Nastruzzi, C., "Gelatin microspheres: Influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties", ***Biomaterials***, 17: 2009-2020, (1996).
30. Peppas, N. A., Khare, A. R., "Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release", ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 11: 1-35 (1993).
31. Oğuz, O., Sayıl, Ç., "Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) network: formation conditions", ***Polymer***, 42 (18): 7639-7652 (2001).
32. Basan, S., "Polimer kimyası", ***Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları***, Sivas, 60-128 (2001).
33. Ayman, M., Atta and K. F. Arndt., "New crosslinkers to synthesize pH and temperature-sensitive ionic hydrogels", ***Macromolecules***, 14: 671-674 (1994).
34. Tanaka, T., "Phase transition in polymer gels", ***Science American***, 7: 110-112 (1985).

35. Uysal, İ., “Poli(vinil eter) bazlı ampifilik hidrojenlerin sentezi ve kontrollü ilaç salım uygulamaları”, Yüksek Mühendislik Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 5-7 (2001).
36. Saraydın, D., KARADAĞ, E., GÜVEN, O., “Relationship between the swelling process and the releases of water soluble agrochemicals from radiation crosslinked acrylamide/itaconic acid copolymers”, **Polymer Bulletin**, 45: 287-294 (2000)
37. Moradi, O., Modarress, H., Noroozi, M., “Experimental study of albumin and lysozyme adsorption onto acrylic acid (AA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) surfaces”, **Journal of Colloid and Interface Science**, 271: 16–19 (2004).
38. İnternet: Biyobozunur polimerler, uygulamaları ve avantajları : <http://www.slideshare.net/guestd5c119/polimeros-biodegradables-una-revisin> (2000).
39. Krzan, A., Hemjinda, S., Miertus, S., Corti, A., Chiellini, E., “Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics”, **Polymer Degradation and Stability**, 91: 2819-2833 (2006).
40. Ioyd A.W., “Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility”, **Medical Device Technology**, 13: 18-21 (2002).
41. Lakshmi S. N., Laurencin, C., “Biodegradable polymers as biomaterials”, **Polymer Science**, 32: 762–798 (2007).
42. Mohantya, A. K., Misraa, M., Hinrichsen, G., “Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview”, **Macromolecular Materials and Engineering**, 1-24: 276–277 (2000).
43. Tüzün, C., “Enzimler” , Biyokimya, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 81 – 82 (2002).
44. Park, T.G., Hoffman, A.S., “Thermal Cycling Effects on the Bioreactor Performances of Immobilized b-Galactosidase in Temperature Sensitive Hydrogel Beads”, **Enzyme Microbial Technology**, 15: 476-556 (1993).
45. Keha, E., Küfrevioğlu, İ., “Enzimler” , Biyokimya, **Aktif Yayıncılık**, Ankara, 89-93 (2009).
46. Onat ,T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., “İnsan Biyokimyası”, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).

47. Whiteley C.G., Lee, D.J., "Enzyme technology and biological remediation", **Enzyme & Microbial Technology** , 38: 291–316 (2006).
48. Öztan, D., "Trisinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 11-14 (2007).
49. Aksoy, C., Yanardağ, R., "Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-2, 1-10 (2003).
50. Aehle, W., "Enzymes in Industry Production and Applications", **Wiley-Vch**, Weinheim, 70-74, (2004).
51. Worsfold, P.J., "Classifications and chemical characteristic of immobilized enzymes", **Pure & Application Chemistry**, 67 (4): 597-600 (1995).
52. Bickerstaff, G.F., "Immobilization of enzymes and cells", **Humana Press**, Totowa, New Jersey, 33 : 5-9, 199-205 (1997).
53. Pitcher, W.H., Ford, Jr., "Immobilized lactase for whey hydrolysis; stability and operating strategy" , Enzyme Engineering, Ed. By Brown, G.B., Ganecke, Wingard, L.B., Jr., **Plenium Press**, New York, 4 (1978).
54. Mosbach, K., "Methods in enzymology" , **Academic Press**, New York, 44 (1976).
55. Trevan, M.D., "Techniques of immobilization" , Immobilized Enzyme, **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1980).
56. Uhlig, H., "Industrial Enzymes and Their Applications," **John Wiley & Sons**, Canada, 147-179, 202-222, (1998).
57. İnternet: İmmobilizasyon yöntemleri: <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immobil.htm> (1997)
58. Cabral, J.M., Kennedy, J.F., "Covalent and coordination immobilization of proteins in immobilized proteins", **Plenum Press**, New York, 30, (1991).
59. Özkaya, A., "Monodispers poli(akrilamid) jel mikrokürelere α -kemotripsin immobilizasyonu ve immobilize enzim sisteminin kesikli ve sürekli sistem performansı" , Yüksek Mühendislik Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 10-22 (1999).

60. Dumitriu, S., Popa, M., Dumitriu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers", ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, 3: 243-312 (1988).
61. Arica, Y.M., Hasirci, V.N., "Immobilization for the production of membranes", ***Biomaterials***, 439-445 (1987).
62. Kadler, K., Hill, A., Laird E., "Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators", ***Current Opinion in Cell Biology***, 20: 495-501(2008).
63. Singh, S., Rama Rao, K.V., Venugopal, K., Manikandan, R., "Alteration in Dissolution Characteristics of Gelatin-Containing Formulations", ***Pharmaceutical Technology***, 36-58 (2002).
64. Usta, M., Piech, D.L., MacCrone, R.K., Hillig, W.B., "Behavior and properties of neat and filled gelatins", ***Biomaterials***, 24: 165–172 (2003).
65. Karim, A.A., Bhata, R., "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins", ***Food Hydrocolloids***, 23: 563–576 (2009).
66. Bigi, A., Panzavolta, S., Rubini, K., "Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films", ***Biomaterials***, 25: 5675–5680 (2004).
67. Curcio, M., Spizzirri, U. G., Iemma, F., Puoci, F., Cirillo, G., Parisi, O. I., Picci, N., "Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release", ***European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics***, 76: 48–55 (2010).
68. Gilsenan, P. M., Ross-Murphy, S.B., "Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens", ***International Journal of Biological Macromolecules***, 29: 53-61 (2001).
69. Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M., Waldron, K., "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins and application to enzyme crosslinking", ***Biotechniques***, 37: 790-802 (2004).
70. Vecchia, R.D., Sebrao, D., Nascimento, M.G., Soldi, V., "Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization", ***Process Biochemistry***, 40: 2677-2682 (2005).

71. Hung, T.C., Gridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., "Binary immobilization of candida rugosa lipase on chitosan", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 26: 69-78 (2003).
72. Koç, L., "Katı yağların serbest ve immobilize lipazla hidrolizi" , Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 17-19 (1994).
73. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C., "Production, purification, characterization, and applications of lipases", **Biotechnology Advances**, 19: 627-662 (2001).
74. Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., "Industrial applications of microbial lipases", **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 235–251 (2006).
75. İnternet: Lipaz <http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.htm> (2006).
76. İnternet : Lipaz http://www.mapsenzymes.com/Enzymes_Leather.asp (2006).
77. İnternet : Lipaz <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/detergent.html> (2006).
78. Chiou S..H., Wu W.T.; "Immobilization of candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups", **Biomaterials**, 25:197-204 (2004).
79. Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y., "Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix", **Journal of Food Engineering**, 52: 367-374 (2002).
80. Abd El-Rehim, H. A., "Swelling of radiation crosslinked acrylamide-based microgels and their potential applications", **Radiation Physics and Chemistry**, 74: 111-117 (2005).
81. Chen, K. S., Ku, Y. A., Lin, H. R., Yan, T. R., Sheu, D. C., Chen , T. M., Lin, F. H., „Preparation and characterization of sensitive poly(N-vinly-2-pyrrolidone /itaconic acid) copolymer hydrogels", **Materials Chemistry and Physics**, 91 (1-2): 484-489 (2005).
82. Kim, S. J., Park, S. J., Kim, S. I., "Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan", **Reactive and Functional Polymer**, 55: 53-59 (2003).

83. Elvira, C., Mano, J.F., Roman, J.S., Reis, R.L., "Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems", **Biomaterials**, 23: 1955-1966 (2002).
84. Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasırcı, N., "Stability of α -amylase immobilized on poly(methylmethacrylate-acrylic acid) microspheres", **Journal of Biotechnology**, 60: 37-46 (1998).
85. Ye, P., Xu, Z.K., Wu, J., Seta, P., "Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization", **Biomaterials**, 26 (32): 6394-6403 (2005).
86. Stancu, I.C., "Gelatin hydrogels with PAMAM nanostructured surface and high density surface-localized amino groups", **Polymers**, 70 (5): 314-324, (2010).
87. Xiao, X.C., Chu, L.Y., Chen, W.M., Zhu, J.H., "Monodispersed thermoresponsive hydrogel microspheres with a volume phase transition driven by hydrogen bonding", **Polymer**, 46: 3199-3209 (2005).
88. Okino, H., Nakayama, Y., Tanaka M., Matsuda, T., "In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release," **Journal of Biomedical Materials**, 59: 233-245 (2002).
89. Erdik, E., "Organik kimyada spektroskopik yöntemler", **Gazi Kitabevi**, Ankara, 82-133 (2007).
90. Tümtürk, H., Karaca, N., "Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve poli (N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/k-Karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu", **Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 47-48 (2006).
91. Peng Ye, Jun Jiang, Zhi-Kang Xu, "Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface", **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 60: 62-67 (2007).
92. Xiao-Jun Huang, Dan Ge, Zhi-Kang Xu "Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization", **European Polymer Journal**, 43: 3710-3718 (2007).
93. Peng Ye, Jun Jiang, Zhi-Kang Xu, "Nanofibrous poly (acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization", **Biomaterials**, 27: 4169-4176 (2006).

EKLER

EK-1. pH=7,4 fosfat tamponunun hazırlanması

15,60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 61 mL 1M NaOH çözeltisi karıştırılıp saf su ile 1L ye tamamlandı. Bu işlem ile pH yaklaşık 7,0 olan tampon çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltinin pH=7,4 oluncaya kadar ayarlama 1M NaOH çözeltisi ile yapıldı.

Tüm ayarlamalar pH metre eşliğinde yürütüldü.

EK-2. pH=2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,4; 8,0; 10,0; 12,0; Britton–Robinson tampon (BRT) çözeltilerinin hazırlanması

2,3 mL asetik asit, 2,7 mL %85 lik fosforik asit ve 2,5 g Borik asit karıştırılıp saf su ile 1L ye tamamlandı. Bu işlem ile pH yaklaşık 2,5 olan tampon çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltinin pH=2,0 oluncaya kadar ayarlama derişik HCl ile yapıldı.

pH=2,0 çözeltisinden yeterli miktarlarda alınarak ve ayarlama için 2,0 M NaOH çözeltisi kullanılarak pH=4,0, pH=5,0, pH=6,0, pH=7,4, pH=8,0, pH=10,0 ve pH=12,0 tampon çözeltileri hazırlandı.

Tüm ayarlamalar pH metre eşliğinde yürütüldü.

EK-3. pH=6,9 fosfat tamponunun hazırlanması

7,80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30,5 mL 1M NaOH çözeltisi karıştırılıp saf su ile 1L ye tamamlandı. Bu işlem ile pH yaklaşık 7,0 olan tampon çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltide pH=6,9 olabilmesi için ayarlama 1M NaOH çözeltisi ile yapıldı.

Tüm ayarlamalar pH metre eşliğinde yürütüldü.

EK-4. Hidrojellerin zamana karşı ortalama % şişme değerleri

Hidrojel Zaman (saat)	G-1	G-2	G-3	G-4
1	72	69	53	50
2	115	107	82	76
3	150	142	108	98
4	171	159	120	109
5	193	178	135	121
6	207	195	144	128
7	225	207	155	136
8	237	220	165	143
9	250	229	173	151
10	259	237	180	155
11	276	245	187	159
12	295	256	190	165
13	305	268	204	167
14	308	282	209	169
15	313	291	212	171
16	322	295	215	172
17	323	300	220	174
18	327	304	221	178
19	333	308	225	180
20	336	312	228	183
21	338	314	230	185
22	337	317	231	187
23	336	320	235	192
24	335	318	242	198
24	338	321	244	200
25	342	319	245	200
26	344	323	246	202
27	345	325	250	203
28	345	326	252	205
29	344	328	253	206
30	345	329	255	207
31	348	330	257	207
32	349	332	258	209
33	360	335	260	209
34	362	340	261	210
35	363	346	261	211
36	365	350	262	212
38	366	351	263	213
40	366	351	262	212
42	367	352	263	213
44	367	352	263	213
46	368	353	262	212
48	366	350	263	213

EK-5. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin sıcaklıkla değişim sonuçları

Hidrojel Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	G-1	G-2	G-3	G-4
4	250	210	180	132
10	295	255	220	154
20	310	279	236	172
30	345	332	255	192
37	368	353	278	214
40	384	368	295	231
50	357	349	260	200
60	341	330	245	187

EK-6. Hidrojellerin ortalama % şişme değerlerinin pH ile değişim sonuçları

Hidrojel pH	G-1	G-2	G-3	G-4
2,0	1003	877	802	700
4,0	398	356	310	263
5,0	201	180	159	132
6,0	353	325	297	250
7,4	500	460	400	353
8,0	570	510	456	398
10,0	634	572	510	458
12,0	856	794	732	680

EK-7. Hidrojellerin zamana karşı ortalama % bozunma (% kütle kaybı) değerlerinin sonuçları

Zaman (Gün)	G-1	G-2	G-3	G-4
1	6	4	5	5
2	7	7	7	5
3	10	10	8	6
4	12	12	10	7
5	16	13	10	8
6	21	15	12	10
7	30	17	13	10
8	36	20	14	11
9	41	23	15	12
10	47	27	17	13
12	67	29	20	13
13	80	31	21	15
14	100	33	22	15
16	-	35	27	19
18	-	37	30	22
19	-	39	32	26
20	-	42	35	30
22	-	46	42	39
24	-	55	51	48
26	-	65	59	56
28	-	74	68	64
30	-	100	81	75
31	-	-	100	82
32	-	-	-	100

EK-8. Serbest lipazın aktifliğine substrat derişimin etkisinin sonuçları

S (mM)	1/S (mM ⁻¹)	Absorbans Değişimi (ΔA_{275})	Aktivite (V) x10 ² (mM.dak ⁻¹)	1/V (dak.mM ⁻¹)
2,00	0,50	0,556	8,11	12,33
1,33	0,75	0,493	7,20	13,88
1,00	1,00	0,455	6,64	15,06
0,50	2,00	0,387	5,65	17,69
0,25	4,00	0,282	4,12	24,27

EK-9. İmmobilize lipazın aktifliğine substrat derişimin etkisinin sonuçları

S (mM)	1/S (mM ⁻¹)	Absorbans Değişimi (ΔA_{275})	Aktivite (V) x10 ² (mM.dak ⁻¹)	1/V (dak.mM ⁻¹)
2,00	0,50	0,478	7,00	14,28
1,33	0,75	0,383	5,60	17,85
1,00	1,00	0,368	5,38	18,58
0,50	2,00	0,290	4,24	23,56
0,25	4,00	0,205	3,00	33,23

EK-10. Serbest lipazın aktifliğine depolama süresinin etkisinin sonuçları

Zaman (Gün)	Absorbans Değişimi (ΔA_{275})	Aktivite (V) $\times 10^2$ (mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktivite (%)
0	0,480	7,02	100
4	0,470	6,88	98
8	0,451	6,59	94
12	0,446	6,52	93
16	0,441	6,45	92
21	0,432	6,32	90
25	0,408	5,97	85
29	0,384	5,61	80
32	0,336	4,92	70
36	0,308	4,50	64
40	0,265	3,87	55
44	0,197	2,88	41
48	0,154	2,25	32

EK-11. İmmobilize lipazın aktifliğine depolama süresinin etkisinin sonuçları

Zaman (Gün)	Absorbans Değişimi (ΔA_{275})	Aktivite (V) $\times 10^2$ (mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktivite (%)
0	0,390	5,70	100
4	0,381	5,58	98
8	0,381	5,58	98
12	0,374	5,47	96
16	0,374	5,47	96
21	0,370	5,41	95
25	0,370	5,41	95
29	0,362	5,30	93
32	0,362	5,30	93
36	0,362	5,30	93
40	0,362	5,30	93
44	0,362	5,30	93
48	0,358	5,24	92

EK-12. İmmobilize lipazın aktifliğine kullanım sayısının etkisinin sonuçları

Kullanım sayısı	Absorbans Değişimi (ΔA_{275})	Aktivite (V) $\times 10^2$ (mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktivite (%)
1	0,411	6,02	100
2	0,391	5,72	95
3	0,391	5,72	95
4	0,382	5,59	93
5	0,374	5,48	91
6	0,365	5,35	89
7	0,344	5,04	84
8	0,307	4,50	75
9	0,279	4.08	68
10	0,279	4.08	68

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AKALIN, Gülen Oytun
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 28.07.1985 Karataş
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (312) 215 99 93
e-mail : gulenoymunakalin@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2011
Lisans	Çukurova Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2007
Lise	Danışmet Gazi Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005	Efes Pilsen Biracılık A.Ş.	Stajyer

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Hobiler

Sinema, Tiyatro, Fotoğraf çekmek, Resim.