



**T.C.**

**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİ (2-METİL PROPİYOLAKTON) SENTEZİ,  
KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNURLUĞUNUN  
İNCELENMESİ**

**ANIL UZUNLAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**ORDU 2019**

**T.C.**  
**ORDU ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**POLİ (2-METİL PROPİYOLAKTON) SENTEZİ,  
KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNURLUĞUNUN  
İNCELENMESİ**

**ANIL UZUNLAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ORDU 2019**

## TEZ ONAY

Anıl UZUNLAR tarafından hazırlanan “POLİ (2-METİL PROPIYOLAKTON) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNURLUĞUNUN İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20.02.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman  
Dr. Öğretim Üyesi Efan ÇATIKER


Jüri Üyeleri

İmza


Danışman  
Dr. Öğretim Üyesi Efan ÇATIKER

.....  


Üye  
Doç. Dr. Saim TOPÇU  
Kimya Bölümü  
Giresun Üniversitesi

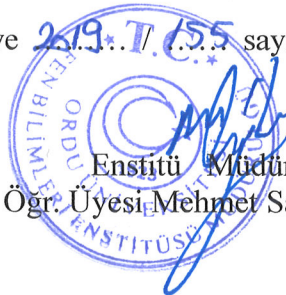
.....  


Üye  
Dr. Öğretim Üyesi Mutlu SÖNMEZ ÇELEBİ  
Kimya Bölümü  
Ordu Üniversitesi

.....  


13 / 03 / 2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 14 / 03 / 2019 tarih ve 2019.T.C.155 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

  
ANIL UZUNLAR

**Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün AR-1411 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### POLİ (2-METİL PROPİYOLAKTON) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNURLUĞUNUN İNCELENMESİ

ANIL UZUNLAR

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ 70 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞRETİM ÜYESİ EFKAN ÇATIKER)

Metakrilik asitten çıkılarak üç basamakta elde edilerek yapısal ve termal karakterizasyonu yapılan poli(2-metil propiyolakton) (PmPL)'den cam lamellere çözelti dökme tekniği ile hazırlanan örneklerin PBS (phosphate buffer saline) tamponunda ve ayrıca hem trypsin hem de pankreatik lipaz (porcine pancrease lipase) varlığında biyobozunurluğu 5 hafta süresince incelenmiştir.

PmPL örneklerinin bozunma ortamlarındaki kütlelerinin değişimi belirlenerek bozunma kinetiği hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Her üç ortamdaki bozunma çalışmasında da polimerin yarı-kristal özelliğine bağlı olarak kütle kaybı hızının ilk aşamalarda yüksek olduğu daha sonra bu hızda azalma olduğu belirlenmiştir. Bu davranış, amorf bölgelere enzim ve iyon difüzyonunun daha hızlı olmasına ve öncelikli bozunmanın bu bölgelerde olduğuna yorulmuştur. 5 haftalık bozunma testlerinde göze çarpan bir başka sonuç %70'e varan kütle kaybının gözlemlendiği, trypsin ve lipaz enzimlerinin bozunmayı hızlandırdığıdır.

Suda çözünür hale geçen polimer fragmanlarının tespiti için yapılan kütle spektrometrisi çalışması beklendiği üzere hidroksi asitlerin oluşumunu göstermiştir. Monomer ve dimer düzeyindeki hidroksi asitlerin varlığı her üç ortamdaki bozunmanın da ester hidrolizi mekanizması ile yürüdüğünü göstermektedir.

Sentezlenen ve karakterize edilen PmPL örneklerinin hidrolitik ve iki farklı enzim varlığında biyodegradasyonunun incelenmesi tez çalışmanın yenilikçi yönüdür. Bu kapsamda, PmPL'nin hidrolitik ve enzimatik olarak biyobozunurluğunun saptanması, lipaz ve trypsin enzimlerinin bozunurluğu katalizlediği, bozunma ürünlerinin monomerik ve dimerik hidroksi asitler olduğu, bozunmanın ester bağının hidrolizi üzerinden yürüdüğü tez çalışmasının en önemli sonuçlarıdır.

Her ne kadar çıkış maddesinin ucuzluğu ve nispeten az basamakta sentezlense de PmPL günlük hayatta kullanım için maliyeti yüksek bir malzeme olacaktır. Biyomedikal uygulamalarda yer bulabilmesi için ise, gelecekte PmPL'un sitotoksikite, genotoksikite testleri, hücre tutma (adsorpsiyon) özellikleri vb. birçok biyolojik testleri yapılarak biyomalzeme olarak kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapılabilir. Bu testlerden de olumlu sonuçlar alınması durumunda, PmPL mevcut polimerlere alternatif olacak yeni bir polimerik malzeme olarak tanımlanabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Poliesterler, Biyobozunma, Halka Açılması Polimerizasyonu.

## **ABSTRACT**

### **SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIODEGRADATION OF POLY (2-METHYL PROPIOLACTONE)**

**ANIL UZUNLAR**

**ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED  
SCIENCES**

**CHEMISTRY**

**MASTER OF SCIENCE, 70 PAGES**

**(SUPERVISOR: DR. INSTRUCTOR EFKAN ÇATIKER)**

At the first stage of the thesis study, poly(2-methyl propiolactone) (PmPL) was obtained from methacrylic acid by three steps and performed structural and thermal characterization. Then, biodegradation of the samples prepared by solution-cast technique were investigated in PBS (phosphate buffer saline) buffer and also in the presence of both trypsin and pancreatic lipase (porcine pancreatic lipase) during 5 weeks.

The changes in the masses of the PmPL samples in the degrading media were determined and their degradation kinetics were evaluated. Depending upon the semi-crystalline properties of the polymer, mass loss rates in the first stage of the degradation were determined as higher than those in latter stages for the three media. This behavior was attributed to faster diffusion of enzymes and ions into the amorphous region and it is concluded that degradation occurs primarily in the amorphous regions. Another important result is observation of mass loss up to 70% in the 5-weeks biodegradation tests and catalytic effects of trypsin and lipase enzymes.

Mass spectrometry study performed for determination of polymeric fragments that become water-soluble exhibited that hydroxy acids occur at the end of biodegradation process. Existence of the monomeric and dimeric hydroxy acids in the mass spectra show that biodegradation undergoes by a mechanism through ester hydrolysis.

Innovative aspect of the thesis study is to examine the hydrolytic degradability of the PmPL samples in buffer and biodegradability in the existence of two different types of enzymes. Within this context, determination of hydrolytic and enzymatic degradation of PmPL, catalytic effect of trypsin and lipase enzymes, degradation products being monomeric and dimeric hydroxy acids and degradation undergoing ester bond hydrolysis are critical results of the thesis study.

Although synthesis of PmPL require cheap raw material and relatively few steps, it seems to be costly to use it in daily life. For biomedical applications, it requires to be performed many biological tests and studies such as sitotoxicity, genotoxicity and

cell adhesion properties. PmPL might be defined as a novel alternative biodegradable material to current polymers if the tests give positive results.

**Keywords:** Polyesters, Biodegradation, Ring Opening Polymerization.



## TEŞEKKÜR

Tez konunun belirlenmesi, alıőmanın yrtlmesi ve yazımı esnasında başta danışman hocam Sayın Efkan ÇATIKER'e katkılarından ve yardımlarından dolayı teőekkrlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince emeiği geçen tüm hocalarıma ve arkadaőlarıma sonsuz saygı ve Őükranlarımı sunarım.

Aynı zamanda, desteklerini her an üzerimde hissettiğim aileme teőekkürü bir borç bilirim.





## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	V
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	VI
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VIII
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	IX
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	X
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Biyobozunur Polimerler .....	3
2.2. Alifatik Poliesterler .....	4
2.3. Polihidroksialkanoatlar (PHA) ve Poli(3-hidroksi bütirat) (PHB) .....	5
2.3.1 Poli(R-3-hidroksibütirat) (PHB)'nin Genel Özellikleri .....	7
2.3.2 Mikrobiyal Sentezi .....	9
2.3.3 Biyobozunurluğu.....	11
2.4 Poli(laktik asit) ve Özellikleri .....	13
2.4.1 PLA Sentez Yöntemleri .....	13
2.4.2 PLA Özellikleri .....	14
2.4.3 İşlenebilme Özellikleri .....	15
2.4.4 Hidrolitik ve Enzimatik Degradasyonu.....	15
2.4.5 Enzimatik Bozunma .....	16
2.4.6 Medikal uygulamaları .....	17
2.4.7 Ambalaj ve Diğer Ticari Uygulamaları.....	17
2.5 Halka Açılması Polimerizasyonu.....	18
2.5.1 Laktonların Anyonik Halka Açılması Polimerizasyonu .....	19
2.6 Biyobozunma .....	23
2.6.1 Biyobozunma Testleri .....	24
2.6.2 Biyobozunmayı Etkileyen Faktörler .....	25
2.6.2.1 Polimer Kimyasal Yapısı .....	25
2.6.2.2 Polimer morfolojisi .....	25
2.6.2.3 Molekül Ağırlığı .....	26
2.6.3 Biyobozunma Takip Yöntemleri.....	27
2.6.3.1 Görsel gözlemler .....	27
2.6.3.2 Kütle Kaybı Ölçümleri: Artık polimerin belirlenmesi.....	28
2.6.3.3 Mekanik özelliklerde ve molar kütlede değişiklikler.....	28
2.6.3.4 CO <sub>2</sub> yayılımı / O <sub>2</sub> tüketimi .....	29
2.6.3.5 Radyo-etiketleme .....	29
2.6.3.6 Net bölge oluşumu .....	30
2.6.3.7 Enzimatik bozunma.....	30
2.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Yöntemler ve Temel Prensipleri.....	30
2.7.1 FTIR Spektroskopisi .....	30
2.7.2 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi .....	34
2.7.3 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC).....	36
2.7.4 Termogravimetrik Analiz (TGA).....	40

2.7.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Spektrometri.....	41
2.7.6 Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometri (LCMS) .....	42
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>44</b>
3.1 Materyal .....	44
3.2 Yöntemler.....	44
3.2.1 Sentez ve Ölçümler .....	44
3.2.2. Biyobozunma Çalışması .....	46
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>47</b>
4.1 3-Brom-2-metil-propanoik asit Sentezi ve Karakterizasyonu.....	47
4.2. 2-Metil Propiyolakton Sentezi ve Karakterizasyonu .....	49
4.3 Poli(2-metil propiolakton) Sentezi ve Karakterizasyonu.....	51
4.4 Poli(2-metil Propiolakton)’in Hidrolitik ve Enzimatik Biyobozunması.....	56
4.4.1 Kütle Kaybı Ölçümleri.....	56
4.4.2 LC-MS Analizi.....	57
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>62</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>64</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>70</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1 Poli(2-metil propiyolakton) (PmPL), poli(3-hidroksi bütirat) (PHB) ve poli (laktik asit) (PLA)'in kimyasal yapıları .....	5
Şekil 2. 2 Polihidroksialkanoatların genel kimyasal formülü.....	6
Şekil 2. 3 Yüksek mol kütleli PLA sentez yöntemleri.....	13
Şekil 2. 4 Laktonların hacimli bazlarla reaksiyonları .....	19
Şekil 2. 5 Açıl-oksijen bağı bölünmesine dayanan anyonik halka açılması polimerizasyonunun başlama mekanizması.....	20
Şekil 2. 6 Alkil-oksijen bağı kırılmasına dayanan halka açılması polimerizasyonu mekanizması.....	21
Şekil 2. 7 Moleküllü transesterleşme reaksiyonları .....	22
Şekil 2. 8 Moleküller arası transesterleşme reaksiyonları .....	22
Şekil 2. 9 $\beta$ -laktonların polimerizasyonunda monomere zincir transferi reaksiyonu	23
Şekil 2. 10 Farklı moleküller titreşim türlerinin şematik gösterimi.....	32
Şekil 2. 11 Yaygın fonksiyonel grupların absorpsiyon dalgaboyu aralığı.....	33
Şekil 2. 12 Güç dengeli (A) ve ısı akış DSC'nin şematik gösterimi.....	37
Şekil 2. 13 Tipik bir DSC termogramı.....	38
Şekil 2. 14 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'ın bozunma termogramı.....	40
Şekil 3. 1 Biyobozunma çalışmalarındaki çalkalama düzeneği.....	46
Şekil 4. 1 PmPL'nin sentez reaksiyonları .....	47
Şekil 4. 2 3-brom-2-metil propionik asitin FTIR spektrumu.....	48
Şekil 4. 3 3-brom-2-metil propionik asitin $^1\text{H-NMR}$ spectrum .....	49
Şekil 4. 4 2-metil propiyolakton'un FTIR spektrumu .....	50
Şekil 4. 5 2-metil propiyolaktonun $^1\text{H-NMR}$ spectrum.....	51
Şekil 4. 6 Poli(2-metil propiyolakton)'un FTIR spektrumu. ....	52
Şekil 4. 7 Poli(2-metil propiyolakton)'un $^1\text{H-NMR}$ spektrum .....	52
Şekil 4. 8 Poli (2-metil propiolakton)'un MALDI kütle spektrumu (PmPL) .....	53
Şekil 4. 9 Poli (2-metil propiolakton)'un genişletilmiş MALDI kütle spektrumu ....	54
Şekil 4. 10 PmPL'nin farklı son gruplarla kimyasal yapıları .....	55
Şekil 4. 11 PmPL'nin DSC ve TG eğrileri.....	56
Şekil 4. 12 Tampon, tripsin ve lipazda örneklerin kütle kaybının zamana bağlılığı. 57	
Şekil 4. 13 PBS tamponu ortamından alınan kalıntıların LC-MS spektrumları .....	58
Şekil 4. 14 PBS tamponu+tripsin ortamındaki kalıntıların LC-MS spektrumları. ....	59
Şekil 4. 15 PBS tamponu+lipaz ortamındaki kalıntıların LC-MS spektrumları.....	59
Şekil 4. 16 PmPL'un hidrolitik bozunmasında birincil reaksiyonun mekanizması... 61	

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2. 1</b> Endüstriyel olarak üretilen bazı biyobozunur plastikler.....	4
<b>Çizelge 2. 2</b> Bazı mikroorganizmaların PHA içeriği ve kullandıkları substratlar. ....	7
<b>Çizelge 2. 3</b> Polipropilen (PP) ve polihidroksibütirat (PHB)'nin fiziksel özellikleri..	9
<b>Çizelge 2. 4</b> Bazı fiziksel ve kimyasal değişimler ve verdikleri piklerin özellikleri..	39
<b>Çizelge 4. 1</b> LC-MS analizi dikkate alınarak önerilen yapılar.....	60

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>3-HB</b>	:	3-hidroksi bütirat
<b>ACN</b>	:	Aseto nitril
<b>AFM</b>	:	Atomik Kuvvet Mikroskobu
<b>ASTM</b>	:	Amerikan Malzeme Test Derneği
<b>ATR</b>	:	Attenuated Total Reflectance
<b>BOD</b>	:	Biyokimyasal oksijen talebi
<b>Br-PA</b>	:	2-metil bromo propionik asit
<b>Da</b>	:	Dalton
<b>DHB</b>	:	2,5-dihidroksibenzoik asit
<b>DLLA</b>	:	D, L-laktik asit
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo nükleik asit
<b>DSC</b>	:	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi
<b>DXO</b>	:	1,5-dioksepan-2-on
<b>ESI</b>	:	Elektrosprey İyonizasyon
<b>FT</b>	:	Fourier dönüşümü
<b>FTIR</b>	:	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>GA</b>	:	Glikolit
<b>GPC</b>	:	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
<b>HPLC</b>	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>IR</b>	:	Kızılötesi Spektroskopisi
<b>LC</b>	:	Sıvı kromatografisi
<b>LCMS</b>	:	Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometri
<b>LDPE</b>	:	Düşük yoğunluklu polietilen
<b>LiTFA</b>	:	Lityum trifloro asetik asit
<b>LLA</b>	:	L-laktik asit
<b>MALDI</b>	:	Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
<b>MALDI-MS</b>	:	Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Kütle Spektroskopisi
<b>MALDI-TOF</b>	:	Uçuş Zamanlı Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
<b>mPL</b>	:	2-metil propiolakton
<b>MS</b>	:	Kütle Spektrometresi
<b>NIPAAm</b>	:	N-izopropilakrilamid
<b>NMR</b>	:	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>PBAT</b>	:	Poli(bütilen adipat tereftalat)
<b>PBS</b>	:	Fosfat tamponlu salin
<b>PBSA</b>	:	Poli(bütilen süksinat adipat)
<b>PCL</b>	:	Poli (ε-kaprolakton)
<b>PDLA</b>	:	Poli D laktik asit
<b>PDLLA</b>	:	Poli D, L-laktik asit
<b>PDS</b>	:	Poli(dioksanon)

<b>PE</b>	:	Poli(etilen)
<b>PEG</b>	:	Poli(etilen glikol)
<b>PEO</b>	:	Poli(etileneoksit)
<b>PGA</b>	:	Poli(glikolik)
<b>PHA</b>	:	Poli(hidroksi alkanoatlar)
<b>PHB</b>	:	Poli(3-hidroksi bütirat)
<b>PHBV</b>	:	Poli(hidroksibütirat-ko-valerat)
<b>PHC</b>	:	Poli(3-hidroksikaproat)
<b>PHV</b>	:	Poli(3-hidroksivalerat)
<b>PLA</b>	:	Poli(laktikasit)
<b>PLLA</b>	:	Poli L-laktik asit
<b>PmPL</b>	:	Poli(2-metil propiolakton)
<b>PP</b>	:	Poli(propilen)
<b>PPO</b>	:	Poli(propilen oksit)
<b>PTFE</b>	:	Poli(tetrafluoro etilenin)
<b>ROP</b>	:	Halka Açma Polimerizasyonu
<b>SEM</b>	:	Taramalı Elektron Mikroskopisi
<b>t-BuOK</b>	:	Potasyum tersiyer bütoksit
<b>Tg</b>	:	Camsı Geçiş Sıcaklığı
<b>TG</b>	:	Termogravimetri
<b>TGA</b>	:	Termogravimetrik Analiz
<b>THF</b>	:	Tetrahidrofur
<b>Tm</b>	:	Erime Sıcaklığı
<b>TMC</b>	:	Trimetilen karbonat
<b>UV</b>	:	Mor ötesi
<b>XPS</b>	:	X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
<b>XRD</b>	:	X-ışını Kırınımı

---

## 1. GİRİŞ

Günlük hayatta kullandığımız plastikler petrol türevi olan ve kimyasal süreçlerden geçerek nihai hallerini alan genellikle birkaç katkı maddesi de içeren sentetik polimerlerden oluşurlar. En yaygın kullanılan ve bilinen petrol esaslı polimerlerden polietilen, polipropilen, polistiren, polivinil klorür, polimetilmetakrilat ve poliüretanlar her yıl milyonlarca ton üretilmektedir. Birçok sentetik polimer kullanım alanına bağlı olarak eninde sonunda çevreye atık olarak bırakılmaktadır ve doğada tamamen yok olmaları kimyasal yapılarına ve bırakıldıkları ortamın koşullarına bağlı olarak yüzlerce yıl alabilmektedir. Ekolojik dengeye etkileri bir yana yenilenebilir olmayan kaynaklardan hâsıl olmaları nedeniyle de süreklilik arz etmemektedirler. Bütün bunların yanı sıra petrol esaslı plastiklerin üretim süreçleri çok aşamalı olup bu aşamalarda da enerji harcanması ve üretim esnasında da çevre kirliliği oluşması da diğer olumsuz yönleri olarak sayılabilir.

Bütün bu olumsuzluklara rağmen bilimsel araştırmalar paralelinde ortaya çıkan yeni çevre dostu teknolojiler ve bazı hukuki yaptırımlar yukarıda bahsedilen olumsuz etkilerin azaltılmasını ivmelendirebilecek niteliktedirler. Petrole bağımlılığın azaltılması için doğada çürüyen ve doğadan tekrar üretilen hammaddelere dayalı plastik malzemelerin üretilmesi hem çevre dostu olması hem de sürdürülebilir olması nedeniyle en gözde teknolojik yaklaşımdır. Bununla birlikte, petrol esaslı olmasına rağmen biyobozunur olan polimerlerin kullanımlarının yaygınlaştırılması da ekolojik açıdan önemlidir. Saf halde iken doğada kararlı olup özel katkı maddeleri ile daha kısa sürede parçalanabilen (fotobozunur) petrol esaslı plastiklerin ortaya çıkarılması bir başka çevreci yaklaşımdır. Biyobozunur olmamasına rağmen tekrar kullanılabilir (geri dönüşümlü) plastiklerin geri kazanılma çabalarının artması ve geri dönüşümü mümkün olmayan plastik atıkların değerlendirilerek çevre kirliliği yaratmayacak şekilde nihai ürüne dönüştürülmesi de önemli çevreci teknolojik uygulamalardır. Bütün bunlara ek olarak Batı Avrupa ülkeleri başta olmak üzere birçok gelişmiş ülke yasal düzenlemelerle biyobozunur plastiklerin kullanımını zorunlu hale getirmekte ve/veya özendirici faaliyetler düzenlemektedir.

Batı Avrupa, biyobozunur polimerlerin üretimi ve tüketiminde ilk sırada yer almaktadır. Yasal mevzuatlardaki zorunluluklara ek olarak tüketici farkındalığı ve

sera gazlarının yayılımının azaltılması için birçok ülkenin hassasiyeti sonucunda biyobozunur plastik üretimi pazarı hızla büyümektedir. Pazarın çok büyük bir bölümünü ise polilaktik asit ve nişasta türevleri kaplamaktadır (Anonim, 2018).

Polimer yapısı ve biyobozunma mekanizmaları ile ilgili araştırmaların neticesinde artık yeni biyobozunur polimerlerin sentezi ve plastik malzeme olarak kullanımı artmaktadır. Biyobozunur malzemeler, paketlenme, tıp ve tarım başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır ve bu malzemelere olan ilgi hızla artmaktadır. Çok genel olarak biyobozunur plastikler, sentetik (petrol esaslı) ve doğal (biyolojik esaslı) biyobozunur polimerler olarak iki ana sınıfa ayrılırlar.

Ticarileşmiş olarak üretilen ve tüketimi hızla artan biyobozunur polimerin başlıcaları; polilaktik asit (PLA), nişasta türevleri, polihidroksialkanoatlar (polihidroksibütirat ve kopolimerleri, PHA), poli(bütillen adipat tereftalat) (PBAT), poli(bütillen süksinat adipat) (PBSA), polikaprolakton (PCL) ve poliglikolik asit (PGA) olarak sayılabilir. Bu polimerlerin büyük bir kısmı paketlenme ve tarım alanında kullanılmak üzere üretilmesine rağmen bir kısmı da tıbbi uygulamalar için medikal saflıkta (medical grade) üretilmektedir.

Tez çalışması kapsamında metakrilik asitten çıkılarak üç basamakta poli(2-metil propiolakton) (PmPL) sentezlenmiştir. Polimerin sentez aşamalarında elde edilen ara ürünler ve polimerin, yapısal ve termal karakterizasyonu için FTIR spektroskopisi, <sup>1</sup>H-NMR spektroskopisi, MALDI kütle spektrometri, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve termogravimetri (TG) teknikleri kullanılmıştır. PmPL, kimyasal yapısı itibarıyla hem PLA ve hem de poli(3-hidroksi bütirat) (PHB)'ye benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikten dolayı biyobozunur olması öngörülerek sentezlenmiş ve farklı ortamlardaki (iki farklı enzim ve fosfat tamponu) bozunma kinetiği ve mekanizması incelenmiştir. Biyobozunma kinetiği, bozunma ortamından belli zaman aralıklarında alınan polimer örneğin tartılmasıyla kütle kaybının belirlenmesi şeklinde yürütülmüştür. Ayrıca, bozunma ortamından alınan çözeltinin sıvı kromatografisi-kütle spektrometri (LC-MS) analizi yapılarak polimer örneğinden salınan yapıların belirlenmesi sağlanmıştır. Bu analiz sonuçlarından da polimerin bozunma mekanizması tahmin edilmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyobozunur Polimerler

Biyobozunur polimerler, bir mikrobiyal etki sonucu tamamen parçalanarak su, karbon dioksit, metan vb. küçük moleküllere dönüşebilen polimerlerdir. Mikrobiyal parçalanmaya duyarlı polimerler varlığında mikroorganizmalar, polimer yüzeyine tutunabilen ve bir dizi basamakla gerçekleşen süreç sonunda makromoleküler yapıyı daha küçük parçalara ayırabilen enzimleri salgılar. Bu yeteneğe sahip olan enzimlerin ortak özelliği ise -COOH, -OH, -SH ve -NH<sub>2</sub> gibi hidrofilik fonksiyonel grupları içermeleri ve yüksek molekül ağırlıklı proteinler olmalarıdır. Enzimler polimer yüzeyine adsorplandıktan sonra polimerin kimyasal yapısında değişimlere sebep olan hidrolitik ve yükseltgeyici reaksiyonlar gerçekleşir. Polimerleri oluşturan büyük zincir yapıları parçalanma sonucu daha küçük parçalara (oligomerik yapılar) dönüşür. Polimer zinciri 500 Da dan daha küçük bir molekül ağırlığına parçalanınca, mikroorganizmalar tarafından metabolizma içerisine alınabilecek hale gelmiş olur. Bu türden bir biyobozunma süreci oksijen varlığı, ortamın nem oranı ve mineral içeriği, organizmanın türü, 20-60 °C arasında ortam sıcaklığı, 5-8 arasındaki pH değerleri gibi şartlara bağlı olarak yavaş veya hızlı olarak gerçekleşebilir.

Biyobozunma sürecinde mikroorganizmaların polimer yüzeyinde kolonize olmaları diğer bir ifade ile çoğalmaları söz konusudur. Dolayısıyla mikroorganizmaların bu yüzeylere tutunması ve kolonize olması; polimerik malzemenin yüzey kimyası, morfolojisi ve topolojisine doğrudan bağlıdır.

Biyobozunur plastikler aşağıdaki alanlarda kullanılmak üzere sentezlenmektedirler; (1) tarımsal ve balıkçılık malzemeleri, inşaat mühendisliği ve inşaat malzemeleri gibi doğal ortamlarda kullanılabilen yerler, (2) geri kazanmanın ve yeniden kullanımın zor olduğu gıda ambalajları, hijyenik ürünler ve benzeri organik atıkların kompostlanmasının etkili olabileceği yerler, (3) tıbbi kullanım, düşük oksijen geçirgenliği ve düşük erime sıcaklığı gibi spesifik özelliklerin gerekli olduğu yerler. (4) mikroorganizmaların parçalayabileceği polimer tipleri çok genel olarak polisakkaritler, polikarbonatlar, polifosfazenler, poliortoesterler, alifatik poliesterler, polianhidritler, poliamitler, alifatik polieterler ve bu polimerlerin kopolimerleridir. Mikroorganizmalar tarafından pek çok sayıda polimer parçalanabilir olmasına

rağmen bazıları endüstriyel ölçekte üretilebilmektedir. Ticarileşmiş biyobozunur polimerlere bazı örnekler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2. 1** Endüstriyel olarak üretilen bazı biyobozunur plastikler  
(**PP:** polipropilen, **PE:** polietilen)

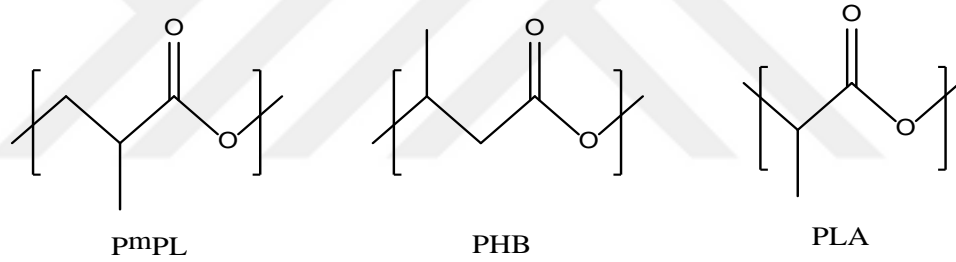
<b>Ticari adı</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Kimyasal Bileşim</b>	<b>Özellik</b>
<b>Biopol</b>	ICI	Polihidroksibütirat	Kristalin, PP benzeri özellik
	Cargil	Polilaktik asit	Kristalin, rijit, biyoyumlu
	Ecochem	Polilaktik asit	Toprakta bozunur, geri kazanılabilir
<b>Tone Polymers</b>	Union	Polikaprolakton	Kristalin, PE’e benzer özellik
	Carbide		
<b>Vinex</b>	Air Product and Chem.	Polivinil alkol	Suda çözünür ve toprakta bozunur
<b>Enviroplastic</b>	Planet Packaging Techn.	Polietilen oksit	Geri kazanılabilir.
<b>Biomer®304,</b> <b>Biomer®226,</b> <b>Biomer®209,</b>	Biomer	Polihidroksibütirat	Tamamen biyobozunur ve farklı mekanik özelliklerde ürünler

Çizelge 2.1’den de görülebildiği gibi biyobozunur polimerler içerisinde üzerinde en çok durulan ve en çok üretilen polimer türü alifatik poliesterlerdir.

## 2.2. Alifatik Poliesterler

Biyobozunurluğu kanıtlanmış birçok alifatik poliester türü literatürde yerini almıştır. Poli(laktik asit), poli (glidikolik asit), poli(3-hidroksi bütirat) ve poli( $\epsilon$ -kaprolakton) başta olmak üzere, poli(3-hidroksi propiyonat), poli( $\delta$ -valerolakton), poli(etilen süksinat), poli(bütülen tereftalat) ve poli(ester karbonat) diğer poliesterlerdir (İkada ve Tsuji, 2000).

Yüksek Lisans tez çalışması kapsamında sentezi, karakterizasyonu ve biyobozunma davranışı incelenen poli(2-metil propiyolakton) (PmPL) kimyasal yapısı nedeniyle yukarıda bahsi geçen poli(3-hidroksi bütirat) (PHB) ve poli(laktik asit) (PLA) ile benzerlik taşımaktadır (Şekil 2.1). PmPL, 2-metil propiyonat tekrarlayan birimlerine sahip iken PHB 3-metil propiyonat tekrarlayan birimlerine sahiptir. Yani, asılı metil grubunun pozisyonu farklıdır. PmPL ve PLA arasındaki benzerlik ise sırasıyla 2-metil propiyonat ve 2-metil etanolat birimlerinden oluşmalarıdır. PHB, polihidroksialkanoatlar (PHA) olarak bilinen mikrobiyal olarak sentezlenen ticarileşmiş bir biyobozunur polimer sınıfının en bilinen üyesidir. Birçok PHA mikrobiyal yöntemlerle sentezlenirken içeriği büyük oranda 3-metil propiyonat birimlerinden oluşmaktadır. Dolayısıyla PHA'lardan bahsetmeden PHB'den bahsetmek mümkün değildir. PLA ise bu sınıfın dışında olmakla beraber en yaygın biyobozunur polimerlerden birisidir. Bu bakımdan bu iki önemli polimerin özellikleri ve önemine değinmek gerekmektedir.



**Şekil 2. 1** Poli(2-metil propiyolakton) (PmPL), poli(3-hidroksi bütirat) (PHB) ve poli (laktik asit) (PLA)'in kimyasal yapıları

### 2.3.Polihidroksialkanoatlar (PHA) ve Poli(3-hidroksi bütirat) (PHB)

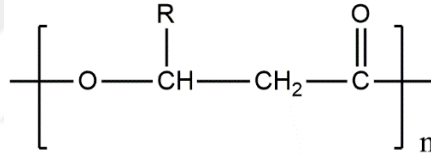
Mikrobiyal polimerler, organizmalarda genellikle stok malzemesi olarak ve daha sonra enerjiye ihtiyaç olduğunda kullanılmak üzere organizmanın belirli bölgelerinde depolanırlar. Bu polimerler üretildikleri organizma türüne de bağlı olarak içerdikleri bileşenlerin kimyasal yapısına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Bir mikrobiyal polimer ailesi olan polihidroksialkanoatlar, N, P, S, O veya Mg gibi besi elementlerinin sınırlı olduğu ve aşırı karbon kaynağının mevcut olduğu şartlarda birçok mikrobiyal tür tarafından depolama bileşiği veya enerji kaynağı olarak biriktirilen hidroksialkanoat poliesterleridir.

PHA'lar, biyolojik olarak parçalanabilme özelliğine sahip olduğundan, mevcut ticari petrol türevi polimerlerin yerine kullanılması yönünde artan bir ilgi bulunmaktadır.

Ancak, PHA'ların en önemli dezavantajı üretim maliyetinin yüksek oluşudur. Bu maliyetin azaltılması için, daha iyi bakteri zincirleri, daha etkili fermantasyon ve elde etme prosesleri geliştirme yönünde büyük çabalar sarf edilmektedir. Bu poliesterlerin petrol gibi gittikçe tükenen bir hammadde yerine yenilenebilir kaynaklardan elde edilen kimyasalların kullanılması ile üretilmesi ayrı bir stratejik önem de taşımaktadır.

Aşağıda kimyasal yapısı verilen (Şekil 2.2) PHA'lar ilk defa Lemoigne tarafından *Bacillus megaterium* adlı mikroorganizmanın bünyesinde belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (Gilmore ve ark., 1990). Kimyasal formülünde verilen R grubu n-alkil grubudur ve bu grubun türüne göre polimerin ismi belirlenir. Örneğin; R: metil ise, poli(3-hidroksibütirat (PHB), etil ise, poli(3-hidroksivalerat) (PHV), n-propil ise, poli(3-hidroksikaproat) (PHC) ismini alır.

PHA'ların hücre içi karbon ve enerji stoğu olarak çok çeşitli mikroorganizmada varlığı belirlenmiştir (Çizelge 2.2) (Brandl ve ark., 1995).



**Şekil 2. 2** Polihidroksialkanoatların genel kimyasal formula

**Çizelge 2 2** Bazı mikroorganizmaların PHA içeriği ve kullandıkları substratlar.

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Maks. PHA İçeriği</b>	<b>PHA Üretilen Substrat</b>
<i>Alcaligenes</i>	96	Fruktoz
<i>Azopirillum</i>	75	Malat
<i>Azotobacter</i>	73	Glukoz
<i>Beggiatoa</i>	57	Asetat
<i>Beijerinckia</i>	38	Glukoz
<i>Methylocystis</i>	70	Metan
<i>Pseudomonas</i>	67	Metanol
<i>Rhizobium</i>	57	Mannitol
<i>Nocardia</i>	14	Bütan

PHA'lar içerisinde üzerinde en çok çalışılan dolayısıyla en çok bilgi sahibi olunan üyesi olan PHB, D(-)-3-hidroksibutirik asidin alifatik lineer poliesteri olup termoplastik bir polimerdir. Termoplastik özelliği nedeniyle film ya da fiber haline getirilebileceği gibi değişik polimer işleme teknikleri ile de şekillendirilebilir ve dolayısıyla PHB hem sentetik hem de doğal polimerlerin avantajlarını içerir. PHB'nin en büyük dezavantajı, bugünkü teknoloji ile endüstriyel anlamda üretim maliyetinin sentetik polimerlerinkinden daha yüksek olmasıdır. PHA'ların endüstriyel üretim teknolojilerinin geliştirilmesi ve daha ekonomik yenilenebilir kaynaklardan üretilmesi amacıyla çok çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Çolak, 2001).

### **2.3.1 Poli(R-3-hidroksibutirat) (PHB)'nin Genel Özellikleri**

Poli(R-3-hidroksibutirat) (PHB), ilk olarak 1925 yılında, *Bacillus megaterium* bakterisine lipit eklenmesi olarak nitelendiren Lemoigne tarafından keşfedilmiştir (Gilmore ve ark., 1990). Daha sonra, PHB'nin çeşitli mikroorganizmalar tarafından

karbon ve enerji depolanmasında rol oynayan yüksek moleküler ağırlıklı bir polimer olduğu bulunmuştur (Luzier, 1992). Bakteriler PHB'yi hem sentezlediği hem de bozdukları için yenilenemeyen kaynak tüketen ve kalıcı atık oluşturan petrokimyasal plastiklere göre çevre dostu oluşu nedeniyle daha caziptir. PHA'lar, fiziksel özellikleri endüstriyel plastiklerinkiyle karşılaştırılabilir olmasından dolayı son yıllarda tüm dünyada en çok üzerinde araştırma yapılan polimer olmasını sağlamıştır. Bir PHA olan, poli(hidroksibütirat-ko-valerat) (PHBV), Biopol ticari ismi altında üretilmektedir (Çizelge 2.1). PHB'nin en çekici özelliği aerobik olarak karbondioksit ve suya tamamen bozunabilmesidir.

Termoplastik malzeme olarak tüketici ürünlerinde kullanım amacıyla eritilebilir ve kalıplanabilirler (Gilmore ve ark., 1990). Sadece 3-HB monomerleri içeren polimerik PHB, ilk keşfedilen ve doğada en yaygın olan PHA türüdür. Tablo 2.3' de verildiği gibi PHB, moleküler ağırlık, erime noktası, kristallik ve gerilme mukavemeti açısından polipropilenle ile neredeyse aynıdır (Evans ve Sikdar, 1990). PHB'nin oksijen ve su buharı bariyer özellikleri polipropilen (PP)'den daha iyidir. Ayrıca, yağ ve koku bariyeri ambalaj malzemesi olarak kullanım için yeterlidir (Williams ve Peoples, 1996). Ek olarak, UV ışığına karşı polipropilenden daha iyi bir dirence sahiptir ve 180 °C 'ye kadar ısıya dayanıklıdır. Tüm üstün özelliklerine rağmen, PHB düşük darbe mukavemeti ve polipropilen için verilen % 400'e kıyasla sadece % 6 olan kopmada uzama değeri gibi dezavantajlara da sahiptir (Evans ve Sikdar, 1990). Saf PHB'nin bir başka dezavantajı, erime noktasının yaklaşık 10 °C üzerinde termal bozunmaya başlaması ve bu nedenle de işlenmesinin zorlaşmasıdır (Luzier, 1992). Hidroksivalerat gibi daha uzun asılı grubu olan hidroksi asit monomer birimlerinin PHB omurgasına dâhil edilmesi polimere çok daha fazla mukavemet ve esneklik kazandırır (Galvin, 1990).

**Çizelge 2. 3** Polipropilen (PP) ve polihidroksibütirat (PHB)'nin fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması

Özellik	PHB	PP
Erime noktası, °C	175	176
Kristal Derecesi, %	80	70
Mol Kütle, Da	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
Camsı Geçiş Sıcaklığı, °C	15	-10
Yoğunluk, g/cm <sup>3</sup>	1.25	0.905
Genç modülüs GPa	3.5	1.7
Gerilme direnci, MPa	40	38
Kopmada uzatma, %	8	400
UV direnci	İyi	Zayıf

*Kaynak: Evans ve Sikdar'dan uyarlanmıştır (1990)*

### 2.3.2 Mikrobiyal Sentezi

Mikroorganizmalar tarafından sentezlendiğinde, polihidroksialkananoatlar, R(-) konfigürasyonundaki tüm kiral karbon atomları ile % 100 stereospesifiktir (Gilmore ve ark., 1990). Bu nedenle, doğal PHB %100 (R) 3-hidroksi bütirat birimlerinden oluşmaktadır. Buna karşılık, PHB kimyasal yöntemlerle sentezlendiğinde rasemik poli[(R,S) 3-hidroksi bütirat] elde edilir. S (+) bileşenleri biyobozunmaya dirençlidir ancak mikroorganizmalar sadece R formunu tanır ve kullanır. Doi ve ark., (1992) sadece S konfigürasyonuna sahip PHB'nin mikrobiyal olarak bozunmamasına rağmen mikrobiyal R formundan oluşan PHB'ye oranla ataktik R ve S konfigürasyona sahip polimerin daha yavaş bozunduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle, PHB'nin % 100 biyobozunur olması için saf poli[(R) 3-hidroksi bütirat] olması gerekir.

PHA'larının biyosentezi, insanlarda yağ depolanmasına benzer. Çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından hücre içi karbon ve enerji rezervleri olarak üretilir. Bakteriyel PHB sentezi, oksijenin veya azot, fosfat, sülfat, magnezyum ve potasyum gibi temel bir besleyicilerin sınırlandırılmasıyla tetiklenebilir (Lee, 1996). Bu temel besin maddelerinin yokluğunda, mikroorganizmalar amino asitler veya proteinler üretemezler, bunun yerine PHB'yi fazla karbon varlığında ayrı granüller olarak sentezler ve biriktirirler (Luzier, 1992). Sınırlamalar ortadan kalkana kadar karbon depolarlar; ancak bu esnada bozabilir ve metabolize de edebilirler (Lee, 1996a). Her ne kadar yaklaşık 300 farklı mikroorganizmanın PHA'ları sentezlediği bildirilmiş olsa da (Lee, 1996a), yalnızca birkaç mikrobiyal türün PHA'ları anlamlı şekilde biriktirme yeteneği olduğunu belirtilmiştir; bunlar *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, rekombinant *Escherichia coli* ve birkaç metilotrof'dur (Lee ve Chang, 1996). Mevcut endüstriyel ölçekli PHB üretiminde, birkaç avantajı nedeniyle *Alcaligenes eutrophus* kullanılmaktadır; (1) kuru ağırlığının % 80'ine kadar PHB biriktirebilir; (2) karbon kaynağı olarak glukoz çok verimlidir, (3) büyük miktarlarda güvenle kullanılır ve (4) glukoz besleme stoğuna propiyonik asit ilave edildiğinde endüstriyel olarak önemli PHBV kopolimerini sentezleyebilir (Lee, 1996).

Mikrobiyal sentez esnasında polimer zinciri büyümeye ve daha hidrofobik hale gelmeye başladığında, hücre içinde granüler bir yapı oluşturur. Zincirler uzadıkça, granüller daha yoğun bir şekilde paketlenir ve sonunda hücreyi doldururken istiflenirler (Gerngross ve ark., 1993). *A.eutrophus* hücreleri tipik olarak her biri 0.2-0.5 µm çapında 8-13 granül içerir (Lee, 1996a). PHB granülleri, mikrobiyal hücrelerden ekstrakte edilirken monomerlerin mükemmel stereo düzenliliği nedeniyle kristal hale tersinir olmayan bir dönüşüm gerçekleşir.

ZENECA, günümüzde sırasıyla *A. eutrophus* H16 mutant suşu ve besleme-harmanlama (fed-batch) kültürü tekniği kullanılarak, hem PHB hem de PHBV'yi glukoz ve glukoz/propiyonik asitten üretmektedir. Fermantasyondan sonra, PHB içeren hücreler santrifüjlenir ve filtre edilir (Lee, 1996b). ZENECA yılda 300 ton PHBV üretebilmektedir. Hem PHB hem de PHBV ticari olarak pazarlanmasına rağmen, üretim maliyetleri yaygın kullanımlarını engellemiştir. Üretim maliyetlerini azaltmak için, çoğu karbon kaynaklarını kullanan bakteri suşlarının izolasyonunu



glukozdan daha ucuza getiren birçok strateji geliştirilmiştir. *Alcaligenes eutrophus*'un karbondioksit, hidrojen ve oksijenden PHB ürettiği gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 1995). Metanol de mevcut en ucuz karbon substratlardan bir tanesidir. Metanole valerik asit eklendiğinde PHBV kopolimeri üretimi mümkündür. Chemie Linz AG adlı firma, yeni izole edilmiş bir *Alcaligenes latus* suşu kullanarak PHB'nin endüstriyel üretimine çalıştı ve stratejileri hakkında birkaç patent yayınladı (Lee ve Chang, 1995). *A. latus*'un *A. eutrophus*'a göre daha hızlı büyüme, karbon kaynağı olarak daha ucuz olan sukroz şekerinin kullanılması ve büyüme sırasında PHB biriktirilmesi gibi bir dizi avantajı vardır. PHA'lar hakkındaki mevcut araştırmaların çoğu, hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmaların genetik mühendisliğine odaklanmıştır. Bu türlerin büyük miktarlarda yüksek kalitede PHA polimerleri üretebileceklerine ve böylece petrokimyasal plastiklerle rekabet edebilecek seviyeye ulaşılacağı umulmaktadır (Hankermeyer ve Tjerdema, 1999).

### **2.3.3 Biyobozunurluğu**

PHA'ları ilgi çekici hale getiren biyobozunabilirlik ve biyoyuumluluk özellikleridir. Sınırlı besin varlığında PHA üreten ve depolayan mikroorganizmalar, sınırlama ortadan kalktığında PHA'yı bozabilir ve metabolize edebilir. Polimer zincirleri doğrudan bakteri hücre duvarı boyunca taşınamayacak kadar büyüktür. Bu nedenle bakterinin, polimerleri karşılık gelen hidroksi asit monomerlerine dönüştürebilen hücre dışı hidrolazlar geliştirmiş olması gerekmektedir. PHB hidrolizinin ürünü R-3-hidroksibutirik asit (Doi ve ark., 1992) iken, PHBV'nin hücre dışı bozunması, hem 3-hidroksibutirat hem de 3-hidroksivalerat (Luzier, 1992) verir. Monomerler suda çözünürdür ve pasif olarak hücre duvarı boyunca difüze olacak kadar da küçüktürler. Burada p-oksidasyon ve aerobik koşullar altında karbon dioksit ve su üretmek için trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ile metabolize edilirler (Scott, 1990). Anaerobik koşullar altında metan da üretilir (Luzier, 1992). Genel olarak, PHB bozunması sırasında hiçbir zararlı ara ürün veya yan ürün üretilmez. Aslında, 3-hidroksibutirat, bütün büyükbaş hayvanlarda, bir ara metabolit olarak bulunur ve insan kan plazmasında nispeten büyük miktarlarda bulunur (Lee, 1996b). PHA'lar uzun süreli kontrollü ilaç salımı için taşıyıcı, cerrahi iğneler, ameliyat dikiş ipliği, kemik ve kan damarı yerine ikame malzeme gibi tıbbi uygulamalar için uygun bir malzeme olarak düşünülmektedir (Hankermeyer ve Tjerdema, 1999).

PHA bozabilen bakteri ve mantar gibi birçok aerobik ve anaerobik mikroorganizma farklı çevre ortamlarından izole edilebilmiştir (Lee, 1996b). *Acidovorax facilis*, *Aspergillus jumigatus*, *Comamonas sp.*, *Pseudomonas lemoignei* ve *Variovorax paradoxus*, toprakta bulunanlar arasındadır ve aktif çamurdan *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas* izole edilmiştir. *Comamonas testosteroni* deniz suyunda bulunur ve *Ilyobacter delafieldii* anaerobik çamurda bulunur.

Biyobozunma için mikrobiyal bir ortam gerektiğinden, PHA sadece nem varlığında bozunmaya uğramaz ve bu nedenle de açık havada son derece karardır. PHB biyolojik bozunma hızı, radyo-etiketli PHB'den  $^{14}\text{C}$  veya  $^{14}\text{CO}_2$  üretimi veya polimerin ağırlık kaybıyla ölçülebilir (Luzier, 1992). Bozunma hızı, polimer yüzey alanı, ortamının mikrobiyal etkinliği, pH, sıcaklık, nem seviyesi ve besin kaynağı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bozunma hızı incelemelerinin çoğu kristal derecesi ile ilişkilidir. Amorf yapıdaki PHB, kristallin PHB'den daha kolay hidrolize edildiğinden, polimer erozyonu, filmin kristalliğini azaltarak hızlı bir şekilde artar (Doi ve ark., 1992). Hidroksiverarat monomerleri polimere dâhil edildiğinde, artan 3-HV içeriği ile kristal derecesi azalır. Örneğin, aerobik kanalizasyonda %18'lik 3-HV'den oluşan bir PHBV filmi 14 gün sonunda tamamen bozunurken homopolimer (PHB) %36 kütle kaybına uğramaktadır (Guillet ve ark., 1992). PHA'lar çok çeşitli ortamlarda bozunmaya uğrayabilmektedir. En yüksek PHBV degradasyonu hızı anaerobik atık su, ardından nehir ağızı çökeltisi, aerobik atık su, toprak ve son olarak deniz suyunda görülür (Luzier, 1992).

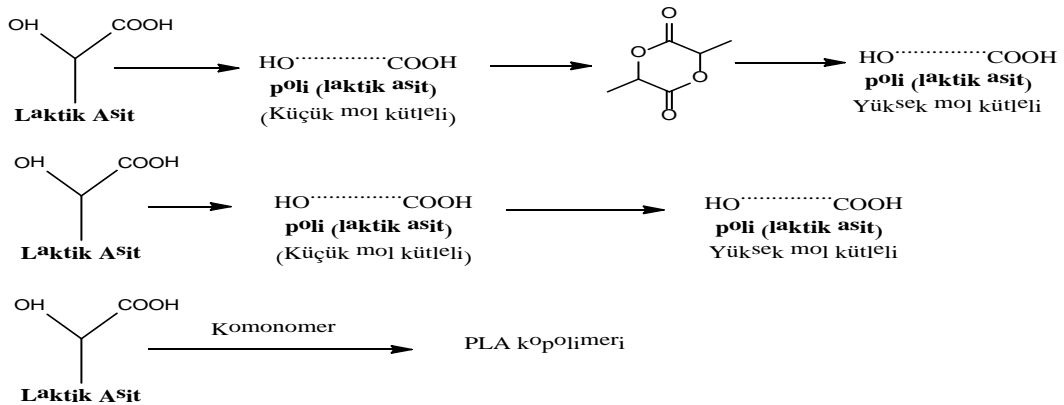
Polihidroksibütirat (PHB), geleneksel petrokimyasal olarak türetilmiş plastiklere kıyasla birçok avantaj sunar. Biyobozunurluğa ek olarak, PHB yenilenebilir kaynaklardan oluşmaktadır. Gıda paketlenme uygulamaları için polipropilenden daha iyi fiziksel özelliklere sahiptir ve toksik değildir. PHB'nin düşük darbe direnci, ticari olarak Biopol<sup>®</sup> ticari ismi altında pazarlanan poli(hidroksibütirat-ko-valerat) (PHBV) üretmek için hidroksi valerat monomerlerin polimere katılmasıyla çözülür. PHB gibi, PHBV aerobik koşullar altında tamamen karbondioksit ve suya dönüşür. PHB'nin mikrobiyal sentezi, endüstriyel üretim için en iyi yöntemdir çünkü biyodegradasyon için uygun stereokimiyayı sağlar. Mevcut üretimde *Alcaligenese utrophus* kullanılmaktadır, çünkü karbon kaynağı olarak glukoz üzerinde verimli bir şekilde büyür, ağırlığının % 80'ine kadar PHB biriktirir ve hammaddesine propiyonik asit

eklendiğinde PHBV sentezleyebilir. Transgenik PHA üreten organizmaların geliştirilmesinin PHA üretim maliyetini büyük ölçüde azaltması beklenmektedir. Transgenik sistem kullanmanın faydaları arasında bir depolimeraz sistemi eksikliği, daha hızlı büyüyen organizmaları kullanma yeteneği, yüksek oranda saflaştırılmış polimerlerin üretilmesi ve ucuz karbon kaynaklarını kullanma yeteneği sayılabilir. Transgenik bitkiler bir gün PHA'nın fiyatını rekabetçi bir seviyeye düşürebilecek plastik mahsullerin gelişmesine neden olabileceğinden, gelecekteki araştırmalar kesinlikle bu tür kombine DNA tekniklerine odaklanacaktır (Hankermeyer ve Tjerdema, 1999).

## 2.4 Poli(laktik asit) ve Özellikleri

### 2.4.1 PLA Sentez Yöntemleri

Laktik asit bazlı polimerler, yenilenebilir kaynaklardan üretilen en umut verici polimer kategorisidir. Sadece biyobozunur ve biyouyumlu değil, aynı zamanda çoğu polimer işleme yöntemiyle de işlenebilirler. Laktik asit bazlı polimerlerin özellikleri, iki stereoizomer (D ve L) veya diğer komonomerler (glikolik asit gibi) arasındaki orana ve dağılımına bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir (Södergard ve Stolt, 2002). Polimerler, aşağıda şematik olarak açıklanan farklı polimerizasyon yolları ile üretilebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Yüksek mol kütleli PLA sentez yöntemleri

Yüksek mol kütleli PLA, en yaygın olarak halka dimer olan dilaktidin halka açma polimerizasyonu (ROP) ile yapılır. Bu yöntemde ilk önce laktik asitin kondenzasyon polimerizasyonu ile düşük mol kütleli PLA elde edilir. Düşük mol kütleli PLA'nın katalizör varlığında depolimerizasyonu ile laktid dimerleri elde edilir. Elde edilen dimerin halka açılması polimerizasyonu ile de yüksek mol kütleli PLA elde

edilebilir. Solvent destekli polikondensasyon, laktik asitin direkt kondenzasyonu ile düşük mol kütleli PLA elde edilebilmesi probleminin üstesinden gelmenin bir yoludur (Ajioka ve ark., 1995). Eriyik polikondensasyonu ve bunu takiben katı hal polikondensasyonu başka bir alternatif yöntemdir (Moon ve ark., 2001). Yüksek moleküler ağırlıklı PLA bazlı polimerler elde etmek için üçüncü yaklaşım, öncelikle telekhelik PLA elde etmek ve sonra da bir bağlayıcı ajanın (diizosiyanat gibi) kullanılarak telekhelik PLA zincirlerini birbirlerine bağlamaktır (Hiltunen ve ark., 1996).

PLA kadar önem taşıyan birçok PLA kopolimeri sentezi hem ticari olarak hem de bilimsel araştırmalarda yerini almıştır. Laktik asit veya laktit kopolimerizasyonu için kullanılan tipik komonomerler, glikolik asit veya glikolit (GA), poli (etilen glikol) (PEG) veya poli (etileneoksit) (PEO), poli (propilen oksit) (PPO), (R) - $\beta$ -bütirolakton (BL),  $\delta$ -valerolakton (VL),  $\epsilon$ -kaprolakton (CL), 1,5-dioksepan-2-on (DXO), trimetilen karbonat (TMC) ve N-izopropilakrilamit (NIPAAm) en önemlileridir. Kopolimerlerde bulunan monomer dağılımı (rastgele veya blok), monomer çiftlerine, katalizörlerin doğasına ve polimerizasyon koşullarına bağlıdır (Albertsson ve ark., 2010)

#### **2.4.2 PLA Özellikleri**

Ticari PLA, sırasıyla LLA ve DLLA'nın polimerizasyonu ile elde edilen PLLA ve PDLA veya kopolimer PDLLA'nın bir karışımıdır. PLA'nın birçok önemli özelliği, kullanılan D-L-enantiyomerlerin oranı ve polimerlerde enantiyomerlerin diziliş dizileri ile kontrol edilir. PALLA, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen PLA'nın büyük kısmını oluşturur bunun nedeni biyolojik kaynaklarda laktik asitin sadece L konfigürasyonunun bulunmasıdır. PLLA içeriği % 90'dan daha yüksek olan PLA kristal olma eğilimindedir, düşük optik saflıkta ise şekilsizdir. Erime sıcaklığı ( $T_m$ ), cam geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) ve PLA'nın kristallliği, azalan PLLA miktarları ile düşer (Dorgan ve ark., 2005).

PLA'nın ısı kararlılık ve darbe direnci gibi özellikleri, termoplastik uygulamalar için kullanılan geleneksel polimerlerinkinden daha düşüktür. Bu nedenle, PLA geleneksel ticari polimerlere karşı rekabet etmek için uygun değildir. PLA'nın özelliklerini geliştirmek ve potansiyel uygulamalarını arttırmak için laktik asit kopolimerleri ve

stiren, akrilat ve poli (etilen oksit) (PEO) türevleri gibi diğer monomerler kopolimerleri geliştirilmiştir. PLA'nın modifikasyonu, diğer monomerlerle kopolimerizasyon ve PLA kompozitleri, sertlik, geçirgenlik, kristallik ve termal stabilite gibi PLA özelliklerini geliştirmek için kullanılan bazı yaklaşımlardır. PLA'in zincir yapısı, konfigürasyon, taktisite, konformasyon ve kıvrımlı zincir yapısı tüm özelliklerini yöneten önemli parametrelerdir (Jiang ve ark., 2010).

### 2.4.3 İşlenebilme Özellikleri

Ambalaj ve diğer tüketici ürünlerinde poli (laktik asit) (PLA) polimerlerinin kullanımı, yenilenebilir olmaları, parçalanabilmeleri ve mevcut termoplastiklerle benzer işleme karakteristikleri nedeniyle son birkaç yılda önemli ölçüde artmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı PLA polimerinin ekonomik üretimine izin veren polimerizasyon yönteminin geliştirilmesi aynı zamanda ambalaj, elektronik, otomobil ve diğer tüketici uygulamalarında kullanım alanlarını genişleten başlıca faktörlerden biridir. Eriyik işleme, PLA reçinelerini çeşitli nihai ürünlere dönüştürmek için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Eritilerek işlenmiş PLA örnekleri arasında enjeksiyonla kalıplanmış tek kullanımlık çatal bıçak takımı, ısıl şekillendirilmiş kaplar, enjeksiyonla şişirilmiş şişeler, kalıptan çekilmiş döküm, yönlendirilmiş filmler ve tekstil amaçlı eriterek eğirilmiş elyaflar bulunmaktadır (Weber ve ark., 2002).

### 2.4.4 Hidrolitik ve Enzimatik Degradasyonu

Alifatik polyesterlerden biri olan PLA, hidrolitik bozunmaya karşı hassastır. Hidrolitik bozunma davranışı, hızı ve mekanizması, moleküler yapı ve düzenlenmesi gibi malzeme faktörlerine ve sıcaklık, pH ve katalitik türler (alkali, enzim, vs.) gibi orta faktörlere bağlıdır. Bu nedenle, hidrolitik bozunma davranışı, hızı ve mekanizması bu faktörleri değiştirerek kontrol edilebilir. PLA'nın hidrolitik bozunma hızı, PLA bazlı malzemelerin biyomedikal ve farmasötik uygulamaları için kullanıldığında manipüle edilmelidir. PLA'nın *in vivo* hidrolitik yıkımının, *in vitro* hidrolitik yıkım oranı ile karşılaştırılabilir olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, *in vivo* bozulma davranışı ve hızı, *in vitro* bozulma davranışı ve oranından belli bir dereceye kadar tahmin edilebilir. Ayrıca, PLA'nın laktik aside geri dönüşümü için hidrolitik bozunma kullanıldığında, en yüksek reaksiyon hızına, verime ve optik saflığa ulaşmak için en uygun koşullar seçilmelidir. Öte yandan, PLA bazlı malzemelerin

petrol bazlı polimerik malzemelere alternatif olarak kullanıldığı ticari ve endüstriyel uygulamalar için, hidrolitik bozunma düşük mekanik performanstan dolayı elverişli değildir (Tsuji, 2010)

#### 2.4.5 Enzimatik Bozunma

Biyobozunur polimerlerin ana bileşenleri, sırasıyla glikosil hidrolazlar, ester hidrolazlar ve peptid hidrolazlar gibi spesifik enzimler tarafından hidroliz edilebilen polisakaritler, poliesterler ve poliamitlerdir. Çözünmeyen biyobozunur plastikler, mikroorganizmalardan salgılanan enzimlerin (enzimatik bozunma veya birincil bozunma) etkisiyle suda çözünür malzemelere (organik asitler veya oligomerler) ayrışır. Suda çözünen bu maddeler, mikroorganizmalarda CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ve biyokütle (tam bozunma veya mikrobiyal metabolizma) olarak metabolize edilir. Biyolojik olarak parçalanabilen poliesterler için, özellikle organik asitlerden ve mikroorganizmalar tarafından glikozdan üretilen biyolojik olarak parçalanabilen bir poliester olan polihidroksialkanatlar için birçok enzim türü izole edilmiş ve saflaştırılmıştır bununla birlikte, şimdiye kadar, poli (laktik asit) (PLA) 'nın biyobozunması için spesifik enzimler konusunda herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. Williams (1981) pronaz, proteinaz K ve bromelain gibi enzimlerin varlığında poli (Laktik Asit) (PLLA) 'nın enzimatik hidrolizini bildirdi. Bununla birlikte, bu enzimler PLLA depolimerazları değildir ve proteazlardır (Williams, 1981). PLA stereokopolimerleri ile ilgili olarak, Fukuzaki ve ark. (1989) PLA'nın hidrolizinin spesifik enzimlerin varlığında hızlandırıldığını ve %50 L-laktik asit (LLA) içeren poli (DL-laktik asit) (PDLLA) numunesinde stereokopolimerlerin en hızlı enzimatik bozunumunun gözlemlendiğini bildirmiştir (Fukuzaki ve ark., 1989). Reeve ve arkadaşları, *Tritirachium album*'dan elde edilen proteaz K ile PLA filmlerin enzimatik bozunmasına stereokimyasal bileşimin etkisini ortaya koymuştur (Reeve ve ark., 1994).

Enzimatik bozunma esas olarak (1) polimerik malzemelerin ağırlık kaybı, (2) polimer süspansiyonlarının optik yoğunluğu, (3) suda çözünür malzemelerin titrasyonu, (4) moleküler ağırlık ölçümü, (5) fiziksel özellik değişiklikleri ve (6) yüzey morfolojik değişimleri gibi yöntemlerle incelenir. PLA gibi biyobozunur termoplastikler çeşitli malzeme şekillerine, üç boyutlu yapılara ve kristal morfolojilerine sahiptir. Eriyik-kristalize ve çözücü-döküm filmler esasen lamel

büküm de dahil olmak üzere küresel formlardan oluşur. Lifler, yüksek kristallik, yüksek kristal oryantasyonu ve kalın lamel kristalleri ile lif eksenine boyunca iyi düzenlenmiş, yönlendirilmiş lamel kristallerine sahiptir. Polimerik malzemenin temel kristal morfolojisi 5-10 nm'lik bir periyotta zincir katlanması olan bir lamel kristaldir. Biyomalzemelerin kimyasal veya enzimatik hidrolizinde, kristal bölgelerin dağılımı, tabaka kristal kalınlığı ve büyüklüğü, kristal morfolojisi ve yapısının hidroliz hızında belirleyici rol oynar (Iwata ve ark., 2010).

#### **2.4.6 Medikal uygulamaları**

Biyobozunur malzemeler ile son 40 yılda tıbbi uygulamalar için yoğun olarak çalışılmıştır. Parçalanamayan biyomalzemelere göre avantajları implantları çıkarma ihtiyacını ortadan kaldırmayı ve uzun vadeli biyoyoumluluk sağlamayı içerir. Tıbbi uygulamalarda en yaygın sentetik biyobozunur polimerler, poli(glikolik asit) (PGA), poli (laktik asit) (PLA) ve polidioksanon (PDS) dahil olmak üzere poli ( $\alpha$ -hidroksi asitleri) 'dir. Bu polimerler arasında PLA, göreceli olarak güçlü mekanik özelliklerinden dolayı en umut verici olduğunu göstermiştir. PLA birçok tıbbi implant için başarıyla kullanılmıştır ve birçok ülkede düzenleyici kurumlar tarafından onaylanmıştır. Tıpta PLA'nın geçmişi, Kulkarni ve ark., (1966), poli (laktik asit)'in (PLLA) tıbbi uygulamasını bildirmişlerdir. PLLA tozunun parçalanmasının gine domuzu ve farelere implante edilmesinin toksik olmayan doku tepkisi verdiğini buldular. Bunu PLA'nın ameliyat ipliği ve ortopedik fiksasyonda kullanılabilirliği (Cutright ve ark., 1971) takip etti. Bununla birlikte, PLA'nın yavaş bozunma hızı nedeniyle, tıbbi uygulamaları temel olarak kemik fiksasyonu ile sınırlı kalmıştır. PGA veya poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) içeren kopolimerler, kristalleşme oranlarını düşürerek bozunma hızını artırmak amacıyla sentezlenmiştir (Suzuki ve Ikeda, 2010)

#### **2.4.7 Ambalaj ve Diğer Ticari Uygulamaları**

Poli (laktik asit) (PLA), ekstrüzyon kalıplama, enjeksiyon kalıplama, üfleli kalıplama, ekstrüzyon köpürtme, elyaf ve dokuma olmayan kumaş, monofilament iplik ve benzeri şekillendirme işlemleriyle birçok malzemeye dönüştürülebilmektedir. PLA ilk olarak, tarım, mühendislik, gübrelenebilir (compostable) ürünler ve paketleme malzemeleri gibi biyolojik olarak parçalanabilme fırsatı olabilecek ürün uygulamalarında düşünülmüştür. O zamandan

beri PLA, çevre kirliliğini ve katı atık bertaraf sorunlarını azaltmak için umut verici bir materyal olarak kabul edilmiştir. PLA, şimdi tekstillerde ve kum torbaları, yabancı ot önleme ağları, bitki örtüsü, ip, bağlama bandı, otomotiv malzemeleri ve elektrikli ev aletleri gibi çeşitli dayanıklı ürünlerde kullanılan önemli bir polimer durumundadır (Obuchi ve Ogawa, 2010).

## **2.5 Halka Açılması Polimerizasyonu**

Halkalı monomerlerin fonksiyonel grup içeriğindeki çeşitliliğine ve halka büyüklüğüne bağlı olarak halka açılması polimerizasyonu ile çok farklı tipte polimerik yapıların (poliester, poliamit, polieter ve bunların kopolimerleri) sentezi söz konusudur. Halkalı monomerlerin birçoğunun heteroatomlar içermesi nedeniyle polarize olmuş yapıda bulunurlar. Bu nedenle, birçok elektrofilik ve nükleofilik moleküller ile kolayca etkileşerek iyonik bir mekanizma ile açılırlar ve iyonik polimerizasyon gerçekleşir. Ayrıca, serbest radikaller ile etkileşerek açılabilen halkalı yapılarda vardır. Böylece, vinil monomerleri ile birlikte polimerleştirilerek birçok kopolimer de sentezlenebilir. Yapısında doymamış alifatik yapılar içeren halkalı moleküller de halka açılması metatez polimerizasyonu olarak adlandırılan polimerizasyon yöntemi ile amorf yapıda polimerlerin eldesi için yaygın olarak kullanılır. Literatürde tanımlanan birçok katalizör sistemi ile koordinasyon polimerizasyonu veya uygun enzimler katalizörlüğünde bazı laktonlardan karşılık gelen poliesterlerin sentezlenebildiği de bilinmektedir.

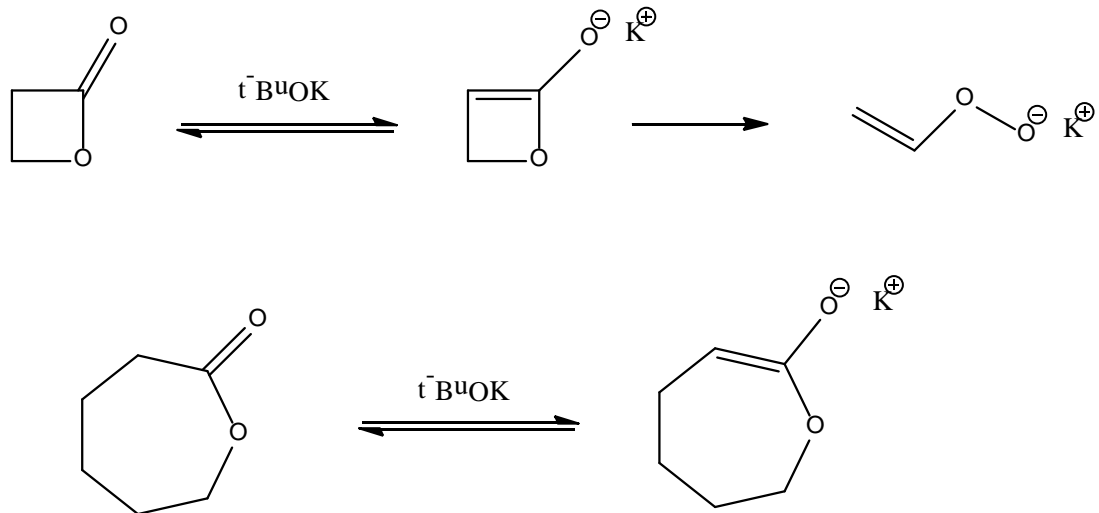
Laktonların polimerizasyonu genellikle kütle polimerizasyonu, çözelti polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu ve süspansiyon polimerizasyonu ile gerçekleştirilir. Kütle polimerizasyonu 100-150 °C arasında gerçekleştirilmesine rağmen yan reaksiyonları (moleküliçi ve moleküllerarası transesterleşme gibi) azaltmak için çözelti polimerizasyonları düşük sıcaklıkta (0-25 °C) gerçekleştirilir. Halka gerginliği çok fazla olan birkaç lakton sadece ısıtılarak polimerleşmesine rağmen çoğu bir başlatıcı veya katalizör varlığında polimerleşebilir. Oksitler, alkoksitler ve karboksilatlar gibi birçok organometalik bileşik kontrollü halka açılması polimerizasyonunda etkin şekilde görev alır (Mecerreyes ve ark., 1999). Başlatıcı türü polimerizasyon mekanizmasında belirleyici olabilir. Yüksek mol kütleli poliesterler anyonik veya koordinasyon halka açılması polimerizasyonu ile elde edilebilir.



Tez çalışması kapsamında dörtlü halka olarak nitelendirilen 2-metil propiyolakton ( $\alpha$ -metil  $\beta$ -propiyolakton)'un anyonik halka açılması polimerizasyonu yöntemi kullanıldığından bu yöntemi detaylandırmak daha anlamlı olacaktır.

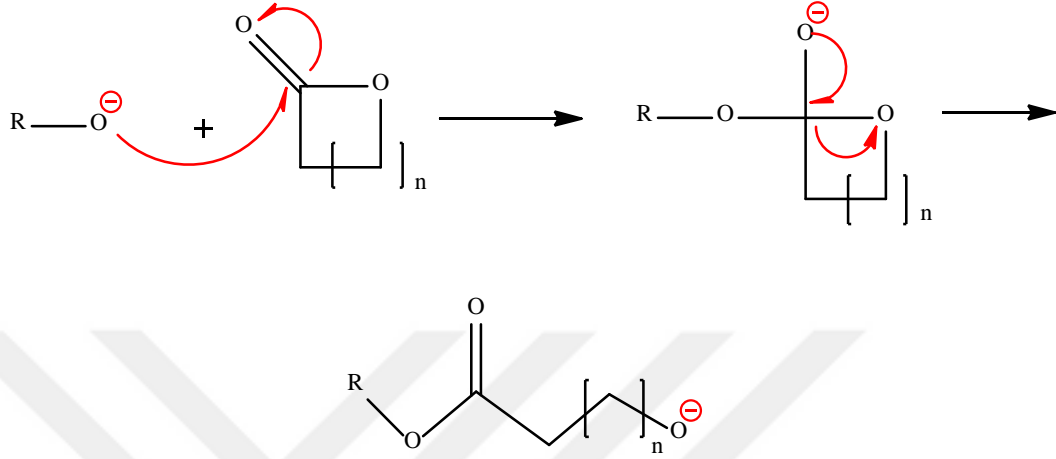
### 2.5.1 Laktonların Anyonik Halka Açılması Polimerizasyonu

Laktonların anyonik halka açılması polimerizasyonunda başlatıcı olarak alkali metaller, metal oksitler, alkoksitler ve alkali metal naftalinitler çok tercih edilir. Başlatıcının ve monomerin türüne ve reaksiyon şartlarına bağlı olarak polimerizasyon canlı veya canlı olmayan mekanizma üzerinden yürüyebilir. Laktonların anyonik halka açılması polimerizasyonu nükleofilik metal alkoksitler tarafından başlatılabilir. Hacimli alkoksitlerin yeterince nükleofilik olmadığını ve baz olarak tepki verdiklerini belirtmek gerekir. Örneğin, potasyum tert-butoksit,  $\beta$ -propiolakton ve  $\epsilon$ -kaprolaktonu ile etkileşerek proton koparır ve oluşan anyonik türler polimerizasyonun başlamasını sağlar (Şekil. 2.4). Karboksilik asit tuzları, karşılık gelen alkoksitlerden daha az nükleofiliktir ve genel olarak laktonların polimerizasyonu için etkili başlatıcılar değildir. Bununla birlikte,  $\beta$ -laktonlar istisnadır çünkü polimerizasyonları karboksilik tuzlarla da başlatılabilir (Penczek ve ark., 2007).



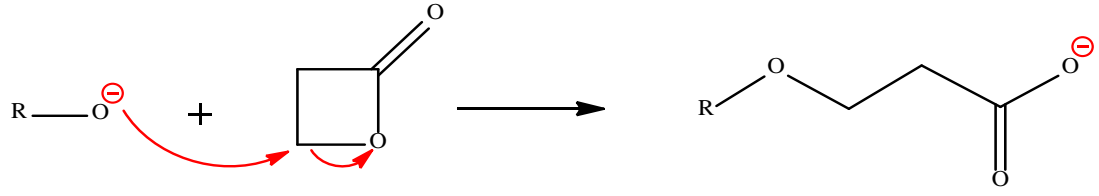
Şekil 2. 4 Laktonların hacimli bazlarla reaksiyonları

Laktonların anyonik halka açılması polimerizasyonunun başlama basamağının daha genel mekanizması, ester grubuna alkoksitlerin bağlanması ve ardından açil-oksijen bağının ayrılması üzerinden yürür (Şekil 2.5). Böylece büyüyen zincir ucu alkoksi grubu olmaktadır.



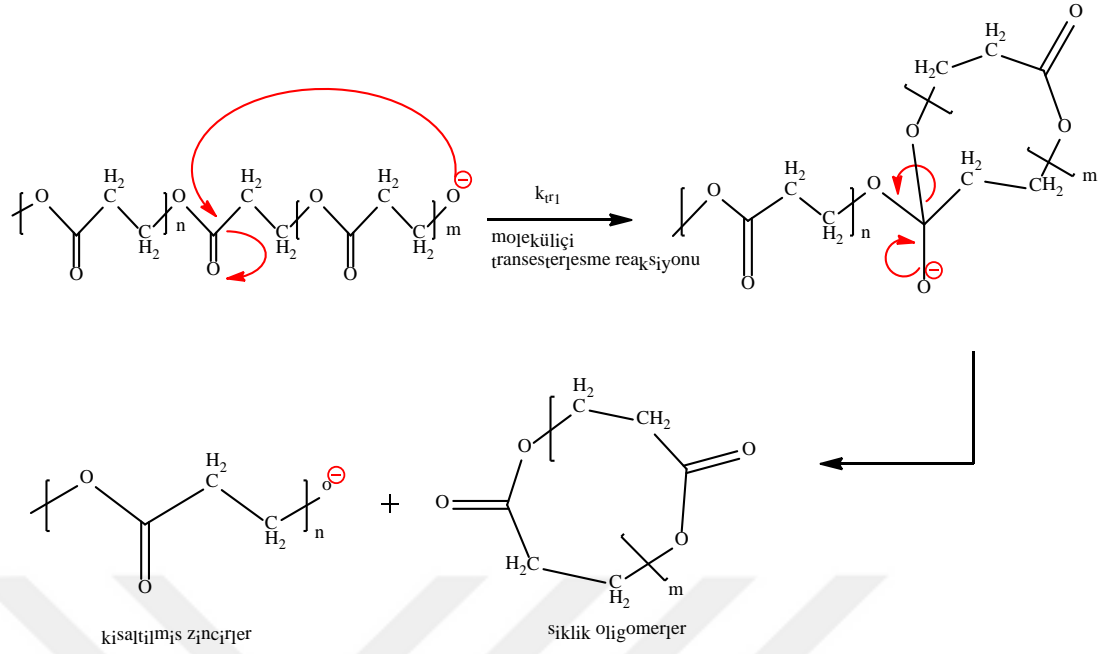
**Şekil 2. 5** Açil-oksijen bağı bölünmesine dayanan anyonik halka açılması polimerizasyonunun başlama mekanizması

Yine de,  $\beta$ -laktonların halka açılması polimerizasyonunda bazı durumlarda ikinci bir mekanizmanın da gözlemlendiğine dikkat çekmek gerekir. Bu mekanizma, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi alkil-oksijen bağının kırılması ve bir karboksilat grubunun oluşması ile gerçekleşir. Aslında, açil-oksijen bağının bölünmesine dayanan ilk mekanizma ile  $\beta$ -laktonların polimerizasyonu beklenen bir reaksiyon olmamasına rağmen gerçekleşebilmektedir ve bu durum stereo-elektronik etkilerle açıklanmıştır (Coulembier ve ark., 2006). Bir polimerizasyonun canlı olarak nitelendirilebilmesi için, herhangi bir zincir transferi ve sonlanma reaksiyonu olmadan gerçekleşmesi gerekir (Szwarc, 1956). Bu, tüm zincirlerin monomerlerin tamamı tükeninceye kadar aktif kalmaları anlamına gelmektedir. Bu koşullar altında, başlama basamağı ile birlikte aktif türlerin konsantrasyonu sabit kalır ve monomerde birinci derece kinetik gözlemlenir. Ayrıca, polimerizasyon başında belirlenen monomer ve başlatıcı miktarının oranı polimerizasyon derecesine eşit olur.

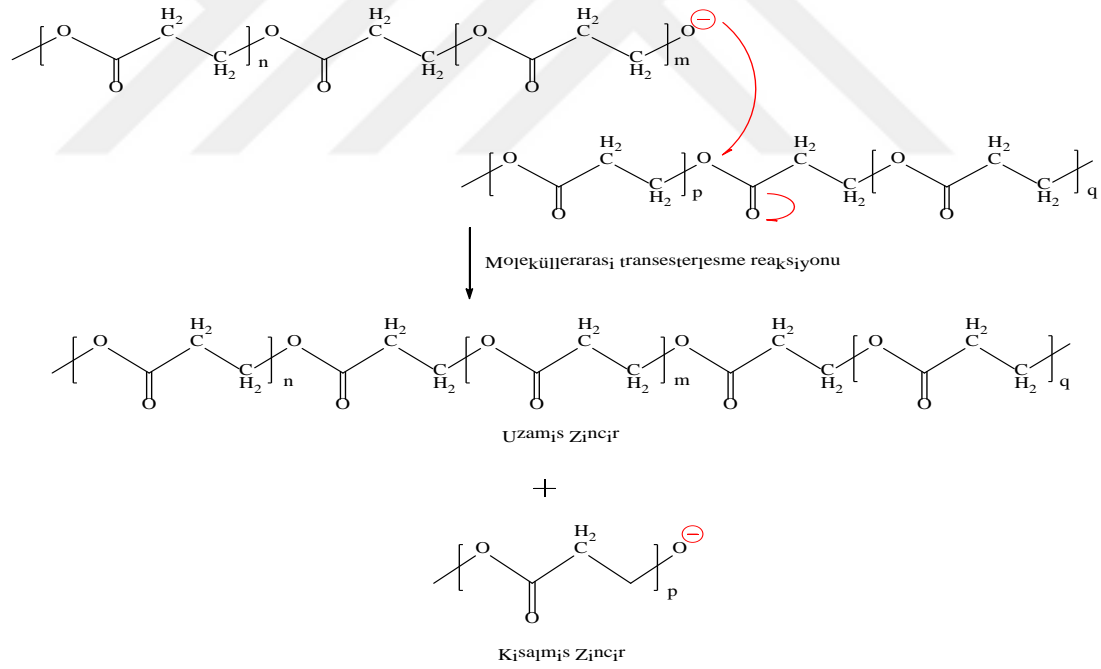


**Şekil 2. 6** Alkil-oksijen bağı kırılmasına dayanan halka açılması polimerizasyonu mekanizması

Monomer tamamen tükendikten sonra, yeni bir monomer eklenmesi ile polimerizasyon kaldığı yerden devam eder. Anyonik halka açılması polimerizasyonu, protik türlerin yokluğunda gerçekleştirildiği sürece sonlanma reaksiyonları istisnai reaksiyonlarla gerçekleşir. Polimerizasyon kontrolünün kaybı esas olarak zincir transferi reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Aslında, alkoksitler sadece siklik monomerin ester fonksiyonu ile değil, aynı zamanda polyester zincirleri boyunca bulunan ester fonksiyonları ile de reaksiyona girmeye eğilimlidirler ve bu da transesterifikasyon reaksiyonları ile sonuçlanır (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8). Bir yandan, moleküleri transesterifikasyon reaksiyonları molar kütlenin azalmasına neden olur ve siklik oligomerlerin oluşumuyla sonuçlanır (Şekil 2.7). Polimerizasyon kontrolü kaybının derecesi, büyüme basamağı hız sabiti ve intramoleküler (moleküleri) transesterleşme reaksiyonları hız sabiti arasındaki oran olan seçicilik faktörü  $\beta$  ile ölçülür ( $\beta = k_p/k_{tr1}$ ). Diğer taraftan, moleküller arası transesterifikasyon reaksiyonları, polidispersite indisi (heterojenlik indeksi)'nin değerinin 2'ye ulaşmasına kadar polyester zincirlerinin uzunluğunu yeniden düzenler (Şekil 2.8). Polimerizasyon kontrolünün kaybının derecesi, ikinci bir seçicilik faktörü  $\gamma$  ile ölçülür, ki bu da büyüme basamağı hız sabitinin ve moleküller arası transesterleşme reaksiyonları hız sabitine oranıdır ( $\gamma = k_p/k_{tr1}$ ).



**Şekil 2. 7** Moleküler transesterleşme reaksiyonları

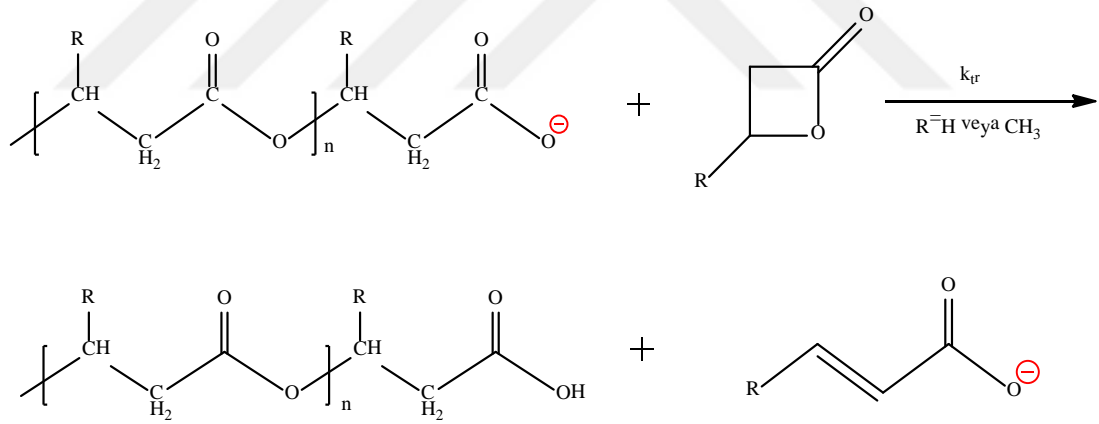


**Şekil 2. 8** Moleküller arası transesterleşme reaksiyonları

Polimer mol kütlesinin kontrolü transesterleşme reaksiyonlarının bertaraf edilmesi ile sağlanabilir. Bu da, başlatıcı reaktivliğini azaltarak, başlatıcının zincirler içerisindeki daha az reaktif ester gruplarıyla değil, halkalı monomerin daha reaktif ester gruplarıyla daha seçici bir şekilde reaksiyona girmesini sağlamakla

gerçekleştirilebilir. Başlatıcı olarak kullanılacak alkoksitin reaktivitesindeki azaltma hem sterik hem de elektronik etkiler kullanılarak sağlanabilir. Gerçekten de, engellenmiş ligandların kullanımı, düşük reaktiviteye, daha iyi seçiciliğe ve dolayısıyla elde edilecek polimerizasyonun daha iyi kontrolüne izin veren bir araçtır. Başka bir olasılık daha az elektropozitif metallerin kullanımına dayanır. Bu açıdan, polimerizasyonun iyi bir kontrol şekli, uygun enerjiye sahip d-orbitalleri olan metallerin alkoksitleri kullanmaktır.

Şekil 2.9'da gösterildiği gibi,  $\beta$ -laktonların anyonik polimerizasyonunda, monomere zincir transferi reaksiyonu bir başka polimerizasyon kontrolü kaybı sebebidir. Bu transfer reaksiyonu, karboksilatlar tarafından başlatılan  $\beta$ -propionolaktonun polimerizasyonu sırasında gerçekleşir. Buna rağmen, oda sıcaklığında bile 10,000'e kadar olan molar kütlelere ulaşılabilir (Scott, 1990). Bu durum,  $\beta$ -bütirolaktonun polimerizasyonunda daha kritik hal alır. Çünkü  $k_p/k_{tr}$  oranı yaklaşık 100 olarak ölçülmüştür ki bu da bu koşullar altında ulaşılacak maksimum ortalama polimerizasyon derecesinin 100 olabileceğini göstermiştir (Scott, 1990).



**Şekil 2. 9**  $\beta$ -laktonların polimerizasyonu sırasında monomere zincir transferi reaksiyonu

## 2.6 Biyobozunma

American Society for Testing Materials (ASTM) biyobozunur polimerleri, doğada bulunan bakteri, mantar, alg, maya ve diğer mikroorganizmaların etkisi ile parçalanabilen polimerlere denir şeklinde tanımlamıştır. Biyobozunur polimerler doğal olarak canlı organizma (hayvan, bitki, bakteri gibi) tarafından üretilen selüloz, nişasta, deri, çitin, çitosan, bakteriyel polyesterlere ek olarak biyobozunurluğu

kanıtlanmış poli (laktik asit) (PLA), poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), poli (glikolik asit) (PGA) gibi sentetik olarak üretilen bazı polimerlerdir. Biyobozunmanın gerçekleşmesi için temel olarak üç ana koşulun sağlanması gerekir. Bu koşullar organizma, substrat ve çevre etkisidir. Bunlardan herhangi biri sağlanmadığı zaman biyobozunma gerçekleşemez.

Polimerlerde biyobozunma süreci hücre dışı ve hücre içi olmak üzere iki temel işleyiş üzerinden yürümektedir. Hücre dışı parçalanmada polimer, aerobik ya da anaerobik koşullarda mikroorganizmaların ürettiği endo ve ekzoenzimlerce katalizlenen biyokimyasal tepkimeler ile bozunmaya uğrar. Endoenzimler, polimer zincirinin iç kısımlarındaki tekrarlayan birimlerden başlayarak parçalar, bu polimerin molekül ağırlığında ani düşmeler gözlenir. Ekzoenzimler ise, polimer molekülünü uç gruplardan başlayarak küçültür dolayısı ile bu tür bozunma daha yavaş ilerler. Enzimler, karboksil (-COOH), hidroksil (-OH) ve amin (-NH<sub>2</sub>) gibi hidrofilik gruplar taşıyan yüksek molekül ağırlığına proteinlerdir. Bu nedenle, enzimatik polimer bozunmaları hidroliz veya yükseltgenme mekanizması üzerinden yürür. Bu tür bozunma için mikroorganizmaların, oksijen, nem ve minerallere ihtiyacı vardır. Ayrıca, organizmaya tipine göre ortam sıcaklığının 20–60 °C arasında, ortam pH değerinin 5–8 arasında olması gerekmektedir. Biyobozunmanın ikinci aşamasında ise, hücre içine girebilecek kadar küçülmüş oligomerler mineralize edilir. Mineralizasyon ile organizma enerji kazanırken CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, tuzlar ve mineraller açığa çıkar (Hazer, 2011).

### **2.6.1 Biyobozunma Testleri**

Biyobozunurluğun belirlenmesi amacı ile üç temel inceleme tekniği vardır; (1) çevresel bozunma, (2) mikrobiyal bozunma ve (3) enzimatik bozunma. Çevresel bozunma, incelenen malzemenin toprak, nehir suyu ve deniz suyu gibi farklı çevre ortamlarında kütle, gerilme direnci ve yüzey morfolojisi gibi özelliklerindeki değişimin değerlendirilmesine dayanır. Dolayısıyla, bu teknikte yapılan test sonucuna toprak veya suyun özellikleri, sıcaklık, güneş ışığı, nem gibi birçok parametre etki eder. Mikrobiyal bozunma tekniğinde biyokimyasal oksijen talebi (BOD) ve kütle kaybı ölçümleri yapılır. Bu tekniğin uygulanması sonucu biyobozunurluğa etki eden önemli parametreler olan mikroorganizma türü ve miktarı değerlendirilir. Enzimatik bozunma testi ise, laboratuvarında sadece belli tür enzim

varlığında, uygun pH değerlerinde ve belli sıcaklık aralığında malzemenin bozunurluğunun kütle kaybı, yüzey morfolojisi değişimi ve bozunma ürünlerinin tesbiti vb. birçok yöntem yardımı ile takip edilir.

### **2.6.2 Biyobozunmayı Etkileyen Faktörler**

Polimer biyobozunma derecesini etkileyen birkaç faktörden en önemlileri polimer kimyasal yapısı, polimer morfolojisi ve polimer mol kütesidir.

#### **2.6.2.1 Polimer Kimyasal Yapısı**

Protein, selüloz ve nişasta gibi doğal makromoleküller, mikroorganizmaların bulunduğu koşullarda hidroliz ve ardından oksidasyon yoluyla bozunur. Benzer şekilde, sentetik biyobozunur polimerlerin çoğunun polimer zinciri boyunca hidroliz edilebilir bağlar içermesi şaşırtıcı değildir. Örneğin, amit enamin, ester, üre ve üretan bağları, mikroorganizmalar ve hidrolitik enzimler tarafından biyolojik bozunmaya karşı hassastır. Pek çok proteolitik enzim, proteinlerdeki süstitüentlere bitişik peptit bağlantılarının hidrolizini spesifik olarak kataliz ettiği için, benzil, hidroksi, karboksi, metil ve fenil grupları gibi süstitüentler içeren polimerler, bu süstitüentlerin yapıya girişinin biyobozunabilirliği artırabileceği umuduyla hazırlanmıştır (Savenkova ve ark., 2000).

Enzim katalizli reaksiyonların çoğu sulu ortamda meydana geldiğinden, sentetik polimerlerin hidrofilik-hidrofobik karakteri biyolojik bozunabilirliklerini büyük ölçüde etkiler. Hem hidrofobik hem de hidrofilik segmentler içeren bir polimer, yalnızca hidrofobik veya hidrofilik yapılar içeren polimerlerden daha yüksek bir biyobozunabilirliğe sahiptirler. Sentetik bir polimerin enzim kataliziyle parçalanabilmesi için, polimer zincirinin enzimin aktif bölgesine sığacak kadar esnek olması gerekir. Örneğin, esnek alifatik polyesterlerin biyolojik sistemler tarafından kolayca parçalanmasına rağmen, daha sert aromatik poli (etilen tereftalatın) genel olarak bioinert olduğu kabul edilir (Chandra ve Rustgi, 1998).

#### **2.6.2.2 Polimer morfolojisi**

Proteinler ve sentetik polimerler arasındaki başlıca farklılıklardan biri, proteinlerin polipeptit zincirleri boyunca düzenli olarak tekrar eden birimlere sahip olmamasıdır. Bu düzensizlik, protein zincirlerinin kristalleşme olasılığının azalmasına neden olur. Bu özelliğin proteinlerin biyobozunurluğuna katkıda bulunması oldukça

muhtemeldir. Diğer taraftan, sentetik polimerler genellikle kısa tekrar eden birimlere sahiptir ve bu düzenlilik, hidrolize edilebilir grupları enzimlere erişilemez hale getirerek kristalleşmeyi arttırır. Uzun tekrarlayan birimlere sahip olan sentetik polimerlerin kristalleşmesinin daha az muhtemel olacağı ve bu nedenle biyolojik olarak parçalanabilir olabileceği düşünülmüştür. Gerçekten de bir dizi poli (amid-üretan) subtilisin enzimi tarafından kolayca bozunmuştur (Ghanbarzadeh ve Almasi 2013).

Yarı kristalin polimer numunelerinin seçici kimyasal bozunması bazı karakteristik değişiklikleri göstermektedir. Bozunma sırasında, numunenin kristallenmesi ilk başta hızlı bir şekilde artar, ardından kristal derecesi % 100'e yaklaştığından çok daha yavaş bozunmaya başlar. Bu, bozunmanın ilk aşamalarında amorf kısımların öncelikli olarak bozunduğu anlamına gelmektedir. Morfolojinin, çeşitli potansiyel uygulamalara sahip, biyobozunur bir polimer olan PCL'nin mikrobiyal ve enzimatik bozunması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM), kısmen kristalli bir PCL filminin filamentli mantarlar tarafından parçalanmasının, amorf bölgenin kristalin bölgeden önce bozunmasıyla seçici bir şekilde ilerlediğini göstermiştir. Mikroorganizmalar, bozunmadan sorumlu hücre dışı enzimler üretir. Enzimler, polimer zincirlerine daha kolay erişmeye olanak sağlayan amorf bölgelere daha kolay bağlanabilir. Kristalitlerin büyüklüğü, şekli ve sayısı, amorf bölgelerin zincir hareketliliği üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir ve bu yüzden degradasyon oranını etkiler (Chandra ve Rustgi, 1998). Bir PCL filminin bozunma hızı, toplam polimere göre sıfırıncı derecedir, ancak kristalin malzemenin derişimine göre sıfırıncı derece değildir. PCL filmlerin çizilmesi bozunma hızında bir artışa neden olurken PCL'nin tavlanması, bozunma hızında bir azalmaya neden olur. Polimerlerin, özellikle polyesterlerin *in vitro* kimyasal ve enzimatik bozunmaları, kimyasal bileşim ve fiziksel özellikler açısından analiz edilmiştir. En düşük erime noktasını veren bir kopolimer bileşiminin bozunmaya en duyarlı olduğu oldukça sık bulunmuştur (Vert, 2005).

### **2.6.2.3 Molekül Ağırlığı**

Mikroorganizmalar hem ekzoenzimleri (terminal gruplarından içe doğru polimerleri indirgeyen enzimler) hem de endoenzimleri (zincir boyunca rasgele şekilde parçalayan enzimler) üretir. Eksoenzimler bozunma hızı üzerinde büyük bir etki



gösterirken endoenzimlere göre molekül ağırlık azalmasına etkileri daha azdır. Plastikler, moleküler ağırlıkları yüksek olduğu sürece mikrobiyal saldırıya karşı dirençli kalırlar. Polietilen, polipropilen ve polistiren gibi birçok plastik mikrobiyal büyümeyi desteklemez (Ghanbarzadeh ve Almasi 2013). Bununla birlikte, düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonlar, mikroplar tarafından bozunabilir. Mikrobiyal hücreler tarafından alınır, koenzim-A'ya bağlanarak "aktive olur" ve mikrobiyal hücre içindeki hücresel metabolitlere dönüştürülürler. Bununla birlikte, plastik moleküller hücreye giremeyecek kadar büyük olduğundan bu işlemler hücre dışı ortamda gerçekleşmez. Bu problem, nişasta ve selüloz gibi doğal moleküller ile ortaya çıkmaz, çünkü enzim reaksiyonlarıyla düşük molekül ağırlıklı bileşenlere dönüşüm, mikrobiyal hücrenin dışında meydana gelir. Bununla birlikte, fotobozunma veya kimyasal bozunma, moleküler ağırlığı mikrobiyal saldırının ilerleyebileceği noktaya kadar düşürebilir (Chandra ve Rustgi, 1998).

Alkan türevli tüm malzemeler için, alım ve hücre içi bozulmanın oluşmadığı molekül ağırlığı üst sınırları oluşturulmamıştır. Parafinlerin, PEG'lerin ve doğrusal alkil benzen sülfonatların çok yavaş bozunması, polimer zincirinin uzunluğu 24-30 karbon atomunu aştığında meydana gelir. Bu, molekül ağırlıkları 400-500 daltonu aşan (yani 30 karbon atomundan daha büyük) alkan bazlı plastiklerin, biyolojik bozulmadan önce foto parçalanma, kimyasal veya diğer biyolojik yollarla daha küçük moleküllere indirgenmesi gerektiği sonucuna varılabilir (Santerre ve ark., 2005).

### **2.6.3 Biyobozunma Takip Yöntemleri**

#### **2.6.3.1 Görsel gözlemler**

Plastiklerde gözle görülür değişikliklerin değerlendirilmesi hemen hemen tüm testlerde yapılabilir. Bozunmayı tanımlamak için, yüzeyin pürüzlenmesi, deliklerin veya çatlakların oluşumu, parçalanma, renk değişimi veya yüzeyde biyo-filmlerin oluşumu gibi gözlemler kullanılır. Bu değişiklikler metabolizma açısından bir biyobozunurluk sürecinin varlığını kanıtlamaz, ancak görsel değişikliklerin parametresi herhangi bir mikrobiyal saldırının ilk göstergesi olarak kullanılabilir. Bozunma mekanizması hakkında bilgi edinmek için, taramalı elektron mikroskobu (SEM) veya atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak daha karmaşık gözlemler yapılabilir (Ikada, 1999). Bozunmanın ilk aşamalarında, yüzeyde kristalli sferositler belirir; bu, daha yavaş bozunan kristalin kısımların malzemede kaldığını

amorf bölgelerinin tercihli bir şekilde öncelikli bozunmasıyla açıklanabilir. Kikkawa ve ark., (2002), yüzey erozyonu mekanizmasını araştırmak için enzimatik olarak bozunmuş PHB filmlerin AFM mikrograflarını kullanmıştır. Polimerik malzemenin biyobozunurluğunu değerlendirmek için bir dizi başka teknik de kullanılabilir. Bunlar arasında Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), X-ışını kırınımı (XRD) ve temas açısı ölçümleri bulunmaktadır.

### **2.6.3.2 Kütle Kaybı Ölçümleri: Artık polimerin belirlenmesi**

Filmler veya test çubukları gibi test numunelerinin kütle kaybı, bozunma testlerinde (özellikle saha ve simülasyon testlerinde) yaygın olarak uygulanır. Ancak, tartılacak numunenin doğru şekilde ve/veya tam olarak temizlenememesi ve numunenin aşırı derecede dağılması gibi problemler ortaya çıkabilir. Dağılmayı zorlaştırmak için örnekler küçük birimlere yerleştirilebilir. İnce dağıtılmış polimer numuneleri (örneğin tozlar) için, uygun bir ayırma veya ekstraksiyon tekniği kullanılarak biyokütleden ayrılmış polimer, topraktan veya komposttan ekstrakte edilen polimer miktarı belirlenebilir. Tanımlı bir sentetik test ortamı kullanılıyorsa, kalıntı malzemenin ve düşük molekül ağırlıklı ara maddelerin yapı analizini birleştirerek bozunma işlemine ilişkin ayrıntılı bilgi elde edilebilir (Witt ve ark., 2001).

### **2.6.3.3 Mekanik özelliklerde ve molar kütlede değişiklikler**

Mekanik özelliklerde değişiklikler, test numunesinin mol kütlelerinde sadece küçük değişiklikler gözlemlendiğinde kullanılır. Çekme mukavemeti gibi özellikler, çoğu zaman doğrudan bir bozunma göstergesi olarak da kabul edilen mol polimer kütlelerindeki değişikliklere karşı çok hassastır (Erlandsson ve ark., 1997). Enzim kaynaklı bir biyobozunma testinde, malzemedeki önemli bir kütle kaybı gözlenirse malzeme mekanik özellikleri değişir. Çünkü örnek yüzey erozyonu işlemi nedeniyle incilir; malzemenin iç kısmı, parçalanma işleminden etkilenmez. Abiyotik parçalanma işlemlerinde ise malzemenin tamamı (sadece yüzeyi değil) etkilenir ve hemen hemen hiç bir kütle kaybı olmamasına rağmen, mekanik özellikleri önemli ölçüde değişmesi söz konusudur (Breslin, 1993; Tsuji ve Suzuyoshi, 2002).

#### 2.6.3.4 CO<sub>2</sub> yayılımı / O<sub>2</sub> tüketimi

Aerobik koşullar altında, mikroplar karbonu okside etmek ve en önemli metabolik son ürünlerden biri olarak karbondioksit oluşturmak için oksijen kullanır. Sonuç olarak, oksijen tüketimi (respirometric test) Hoffmann ve ark., (1997) veya karbondioksit oluşumu (Sturm testi) polimer yıkımı için iyi göstergelerdir ve biyobozunmayı ölçmek için en sık kullanılan kullanılan yöntemlerdir. Yakın zamanda, CO<sub>2</sub> tayini için analitik yöntemlerin tipi değişmeye başladı. Ba(OH)<sub>2</sub> çözeltilisinde geleneksel CO<sub>2</sub> tutulması ve elle titrasyonunun ardından, hava akımındaki O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarını izlemek için kızılötesi ve paramanyetik O<sub>2</sub> dedektörleri de kullanılmaktadır. Otomatik ve sürekli ölçümlerin avantajları olmasına rağmen, dezavantajları da vardır. Örneğin, tam hava akışı ölçülmeli, dedektörlerin sinyalleri uzun süre kararlı kalmalı ve eğer yavaş ilerleyen bozunma söz konusuysa yayılan CO<sub>2</sub> veya harcanan O<sub>2</sub> miktarı da küçük olacak ve sistematik hata olasılığı artacaktır. Böyle durumlarda, diğer yöntemler (bazik çözeltide CO<sub>2</sub>'in tuzaklanması veya çözünmüş inorganik karbonun tayin edilmesi) daha faydalı olabilir. Süreksiz bir titrasyon yöntemiyle bir başka kapalı sistem, tarif edilmiştir (Solaro ve ark., 1998). Bozunma reaktörleri olarak küçük kapalı şişeler kullanan ve üst boşluktaki CO<sub>2</sub>'yi Itavaara ve Vikman, (1995) ya da çözünmüş oksijenin azalmasıyla (kapalı şişe testi) analiz eden testler Richterich ve ark., (1998) basit ve nispeten hassasiyeti düşük testlerdir.

Topraktaki polimer bozunması için, CO<sub>2</sub> tespiti kompost bozunmasındakinden çok daha karmaşıktır. Bunun nedeni, sadece uzun test sürelerine (2 yıla kadar) ihtiyaç duyulması değil, aynı zamanda toprakta bulunan karbona kıyasla polimerlerde birim zamanda çok düşük oranda CO<sub>2</sub> oluşumuna neden olan çok düşük bozunma hızlarının söz konusu olmasıdır.

#### 2.6.3.5 Radyo-etiketleme

Kalıntı analizinin aksine, net CO<sub>2</sub> ve <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> yayılımı ölçümleri basit, tahribatsız ve nihai biyolojik bozunmayı ölçüyor. Uygun şekilde <sup>14</sup>C etiketli test materyali mevcutsa, ölçümler ve bunların yorumları nispeten kolaydır. Rastgele dağıtılmış bir <sup>14</sup>C işaretleyici içeren malzemeler seçilen mikrobik ortamlara maruz bırakılabilir. Salınan <sup>14</sup>C etiketli karbon dioksit miktarı bir sintilasyon sayacı vasıtasıyla hesaplanır. Bu yöntem, polimerde biyolojik olarak çözünebilir safsızlıklar veya katkı

maddeleri ile etkileşime girmez. Farklı mikrobiyal ortamlardaki polimerik malzemeler için bu tekniği kullanan biyobozunurluk araştırmaları yüksek derecede hassasiyet ve tutarlılık göstermektedir (Sharabi ve Bartha, 1993). Bununla birlikte, etiketli malzemeler pahalıdır ve her zaman mevcut değildir.

#### **2.6.3.6 Net bölge oluşumu**

Çok basit bir yarı kantitatif yöntem, “net bölge” (clear zone) denilen testtir. Bu, polimerin sentetik orta agar içinde çok ince tanecikler halinde dağıldığı bir agar plaka testidir; bu, agarın mat bir görünüme sahip olmasına yol açar. Mikroorganizmalar ile inkübasyondan sonra, koloninin etrafındaki saydam bir halo oluşumu, organizmaların en azından, biyolojik bozunmanın ilk basamağı olan polimeri depolimerize edebildiklerini göstermektedir. Bu yöntem genellikle belirli bir polimeri parçalayabilen seçici organizmalara uygulanır (Nishida ve Tokiwa, 1993; Abou-Zeid, 2001) ancak, açık bölgelerin büyümesini analiz ederek yarı kantitatif sonuçlar elde etmek için de kullanılabilir (Augusta ve ark., 1993).

#### **2.6.3.7 Enzimatik bozunma**

Polimerlerin hidroliz yoluyla enzimatik bozunması iki aşamalı bir işlemdir: İlk olarak, enzim polimer substratına bağlanır, daha sonra bir hidrolitik bölünmeyi katalize eder. PHB, PHB-degrade eden bakteri ve mantarlarda hücre içi ve hücre dışı depolimerazların etkisiyle deforme olabilir. Hücre içi degradasyon, mikroorganizmaların kendileri tarafından biriktirilen bir endojen karbon rezervinin hidrolizi iken, hücre dışı degradasyon mikroorganizmaların (kendi ürettikleri olması şart değil) bir eksojen karbon kaynağını kullanmasıdır (Tokiwa ve Calabia, 2004). Bozunma sırasında, mikroorganizmaların hücre dışı enzimleri; yarı geçirgen bakteri membranlarını geçecek kadar küçük olan oligomerler, dimer ve monomerler gibi kısa zincirler veya daha küçük moleküller veren polimerleri parçalamaktadır. İşlem, depolimerizasyon olarak adlandırılır. Bu kısa zincir uzunluklu moleküller, mineralizasyon adı verilen parçalanma reaksiyonları ile CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, ve CH<sub>4</sub> gibi son ürünlere dönüşerek mineralize olurlar.

### **2.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Yöntemler ve Temel Prensipleri**

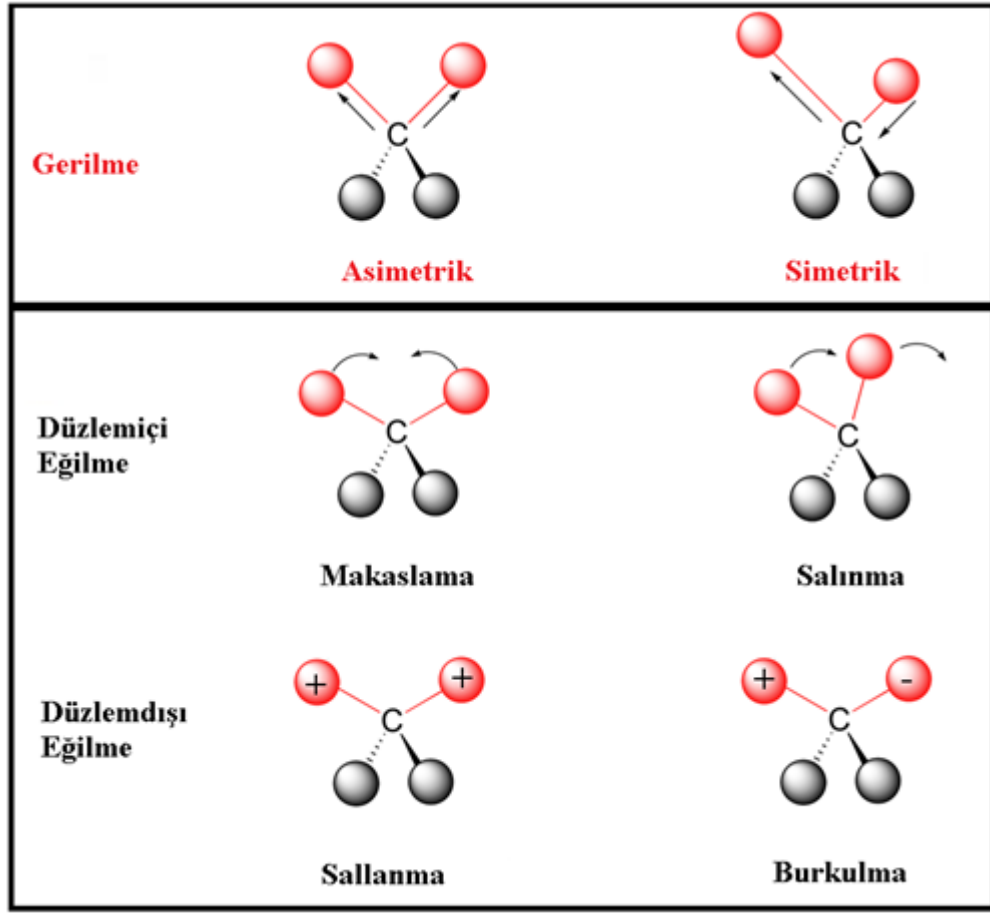
#### **2.7.1 FTIR Spektroskopisi**

Bir moleküldeki atomların birbirine göre konumları tam olarak sabit olmayıp, atomların moleküldeki bağlar etrafında çeşitli titreşim ve dönme hareketleri

neticesinde konumları sürekli değişir. Basit iki veya üç atomlu bir molekül için, böyle titreşimlerin sayısını, özelliğini ve bu titreşimlerle absorplanan enerji arasındaki ilişkiyi açıklamak nispeten kolaydır. Böyle bir analiz, çok atomlu moleküller için çok daha zor olur. Büyük moleküllerde sadece çok sayıda titreşim merkezi bulunmaz, ayrıca bazı titreşim merkezleri arasında etkileşim de söz konusudur ve bu etkileşimlerin de göz önüne alınması gerekir.

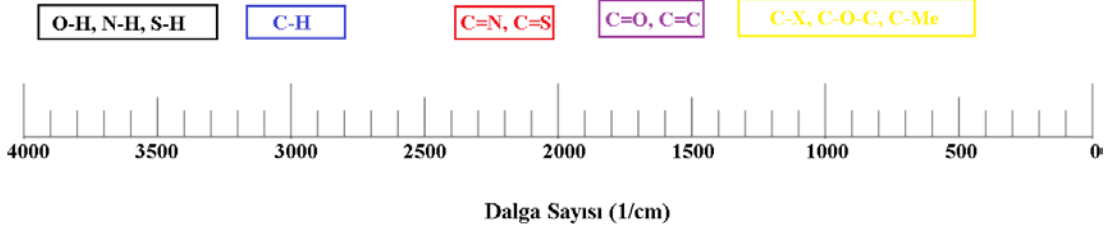
Titreşimler gerilme ve eğilme diye tanımlanan iki ana grupta toplanabilir. Gerilme titreşiminde iki atom arasındaki bağ ekseni boyunca atomlar arasındaki uzaklığın sürekli olarak değişmesi söz konusudur ve iki türü vardır; asimetric ve simetric. Eğilme titreşimlerinde ise bağlar arasındaki açının değişmesi ile tanımlanır ve dört türü vardır; Makaslama, sallanma, salınma ve burkulma. Bu altı tür titreşim tipi Şekil 2.10 'da şematik olarak verilmiştir.

İkiden fazla atom içeren her molekül şekilde verilen titreşim türlerinin hepsini yapabilir. Ayrıca, bu titreşimler bir merkez atomunun bağlarıyla ilgili ise, titreşimlerin etkileşimi veya örtüşmesi meydana gelebilir. Etkileşme sonucu, mevcut titreşimlerin özelliklerinde de bir değişme meydana gelir (Ersöz, 2010).



**Şekil 2. 10** Farklı moleküler titreşim türlerinin şematik gösterimi

Moleküllerin titreşim enerji seviyelerinin elektromanyetik dalgalar vasıtasıyla uyarılması prensipine dayanan infrared (kızılötesi) spektroskopisi yönteminde 0.75-300  $\mu\text{m}$  arasında dalga boylarına sahip elektromanyetik dalgalar (ışınlar) kullanılır. 0.75-2,5  $\mu\text{m}$  dalga boyu aralığı yakın infrared; 25-300  $\mu\text{m}$  dalga boyu aralığı uzak infrared bölgesi olarak adlandırılır. Infrared spektroskopisinde en yaygın olarak kullanılan bölge ise bu iki bölgenin arasındaki 2.5-25  $\mu\text{m}$  ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) dalga boyu arasındadır. Moleküllerin titreşim geçişleri  $14000-20\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığına düşer. Uygulama bölgesi ise genel olarak  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  arasındaki bölge olup infrared (IR) spektroskopisi ile incelenir. Şekil 2.11 en çok karşılaşılan fonksiyonel gruplara ait absorpsiyon bantlarının dalga boyu aralığını şematik olarak göstermektedir.



**Şekil 2. 11** Yaygın fonksiyonel grupların absorpsiyon bantlarının dalgaboyu aralığı. Bir molekülün infrared spektroskopisi ile karakterize edilebilmesi için o moleküldeki atomların titreşim veya dönme hareketi yapmaları esnasında molekülün dipol momentinde net bir değişme meydana gelmelidir. Titreşim veya dönme hareketi esnasında molekülün dipol momentinde net bir değişim olması durumunda infrared bölge ışının değişen elektrik alanı ile molekül etkileşebilir (rezonansa girebilir) ve moleküldeki titreşim hareketlerinden bir tanesinin genliğinde bir değişmeye neden olur. Bu durum sağlandığında gelen ışının absorplandığı (soğurulduğu) ve şiddetinin azaldığı söylenebilir. İnfrared ışığının enerjisi moleküldeki bağları bozmaya yetmez, elektronik enerji geçişi için de yeterli değildir; fakat atomların kütlelerine, bağların gücüne ve molekül geometrisine bağlı olarak bağların titreşim genliklerini artırır. Başka bir deyişle, ışığın soğurulması molekülün titreşim veya dönme enerji düzeylerinde geçişler olmasına neden olur. Yani, molekül infrared spektrumu verir.

IR Spektroskopisi hem araştırma laboratuvarlarında hem endüstriyel üretimlerin yapıldığı işletmelerden ar-ge faaliyetlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalitatif analiz amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. IR spektrumu pek çok fonksiyonel grup için karakteristik bantlar verir. Böylece spektrumunu aldığımız maddede hangi fonksiyonel grupların olduğunu saptamamız ve dolayısıyla maddenin yapısını aydınlatmakta yardımcı olan, en hızlı, ucuz ve en kolay yöntemdir. Ayrıca molekül yapısında bir değişikliğe sebep olan süreç sağlandığında fonksiyonel grup sayısı, türü ve bunlara bağlı olarak da bantların şiddetinde ve yerlerinde değişiklik meydana gelir. Dolayısıyla moleküler yapıdaki değişim de incelenebilir. Maddelerin içerdiği safsızlıklar bazen IR spektroskopisi yardımı ile tespit edilebilir. Safsızlık bulunması durumunda alınan spektrum maddenin saf haldeki alınan spektrumu ile karşılaştırılarak safsızlığın varlığı, türü ve miktarı hakkında bilgi sahibi olunabilir. Nadir kantitatif analiz uygulamaları da olmasına rağmen IR spektroskopisi kantitatif analiz için çok hassas bir yöntem değildir.

### 2.7.2 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

NMR spektroskopisi organik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında en çok bilgi sağlayan ve en sık kullanılan analitik yöntemdir. NMR spektroskopisi ile tüm element atomlarının analizi mümkün değildir. Manyetik alanda tutulan ve spini olan (dönme hareketi olan) bir çekirdeğin uygun frekanstaki bir radyo dalgası fotonu ile rezonansa girmesi ilkesine dayanır. Spin kuantum sayısı sıfırdan büyük ( $I > 0$ ) olan çekirdekler NMR aktif çekirdekler olarak nitelendirilir ve NMR spektroskopinde sinyal verebilir ve dolayısıyla da analizleri yapılabilir. Yöntem, genellikle hidrojen ( $^1\text{H}$ ) ve karbon ( $^{13}\text{C}$ ) başta olmak üzere azot ( $^{15}\text{N}$ ), flor ( $^{19}\text{F}$ ) ve fosfor ( $^{31}\text{P}$ ) gibi nükleer spine sahip çekirdeklerin bulunduğu moleküllerin kalitatif ve kantitatif analiz çalışmalarında kullanılmaktadır.

Kendi etrafında dönen (spin hareketi yapan) ve elektrik yüküne sahip çekirdekler ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  vb.) kendi manyetik alanını yaratır. Dönen bu çekirdekler bir dış manyetik alan içine konulduklarında çubuk mıknatıslar gibi davranırlar. Bu çekirdekler kendi manyetik alanları dış alanla ya aynı doğrultuya, ya da dış alana ters doğrultuya yönelirler. Çekirdek doğru miktarda enerji içeren bir fotonu absorplayarak manyetik alanının doğrultusunu değiştirir. İki hal arasındaki enerji farkı dış manyetik alanın gücüyle (mıknatısın gücü) doğru orantılıdır.

$$\Delta E = h\nu = \gamma h B_0 / 2\pi$$

Eşitlikteki  $\gamma$ , jromanyetik orandır ve her atom için farklı değeri olan bir sabittir (H, için  $26753 \text{ s}^{-1}\text{gaus}^{-1}$ ). Örneğin, 14092 gaussluk bir alan içinde, proton manyetik alanının doğrultusunu tersine çevirmek için 60 MHz frekansa sahip bir fotonun absorblanması gerekir.

Bir molekülde bulunan bütün çekirdekler aynı manyetik alan içinde aynı miktarda enerji absorplayarak manyetik alanlarının yönünü değiştirselerdi (rezonansa girselerdi) NMR spektroskopisi yöntemi ile çok fazla bilgi sağlanamazdı. Çekirdekler, onları dış manyetik alanın etkisinden koruyan elektronlarca sarılmışlardır. Elektronlar, dış manyetik alana zıt yönde bir uyarılmış manyetik alan yaratarak dış alanın ekisini azaltırlar. Yani, kimyasal çevrelerine bağlı olarak moleküllerdeki çekirdekler değişik miktarlarda perdelenirler. Elektronların bu etkisine *Perdeleme Etkisi* denir. Farklı kimyasal çevreye sahip çekirdeklerin farklı



manyetik alanlarda rezonansa girmesine *Kimyasal Kayma* denir. Örneğin, perdelenmemiş bir çekirdeğe oranla elektronlarla sarılmış (perdelenmiş) bir çekirdeği rezonansa getirmek için (absorblanan fotonun frekansı sabit kalma şartıyla) manyetik alanın şiddetini arttırmak gerekir. Bu nedenle, NMR spektroskopisi yöntemi ile bir molekülün spektrumu kaydedilirken fotonun enerjisi sabit tutularak dış manyetik alan taraması yapılarak analizi yapılan çekirdeğin tüm çeşitlerinin rezonansa getirilmesi sağlanır. Ya da, dış manyetik alan sabit tutulur ve fotonun enerjisi değiştirilerek spektrum kaydedilir. Kalitatif analiz amaçlı olarak elde edilen NMR spektrumu irdelenirken genel olarak dört farklı açıdan değerlendirme yapılır:

-Birbirinden bağımsız sinyallerin sayısı manyetik olarak birbirinden farklı kaç çeşit çekirdek olduğunu gösterir.

-Sinyallerin pozisyonu (kimyasal kayma değerleri) çekirdeğin ne miktarda perdelenmiş olduğunu gösterir.

-Her bağımsız sinyalin şiddeti o tip çekirdeğin numunede bulunurluğu hakkında bilgi verir.

-Birbirinden bağımsız her sinyalin şekli (tekli, ikili, üçlü, çoklu vs.) komşu atomların neler ve ne kadar oldukları hakkında bilgiler verebilir.

Örneğin, bir proton NMR ( $^1\text{H}$ -NMR) spektrumu; i) molekülde kaç çeşit proton (hidrojen atomu) olduğu, ii) bu protonların türü (aromatik, alifatik, olefinik vb.), iii) her tür protonun bağlı olduğu atomun komşu gruplarındaki proton sayısı, iv) her proton türünün bağıl oranları hakkında bilgiler verir.

NMR analizi ile bir bileşiğin kimyasal yapısı, stereokimyası ve saflığı hakkında bilgi sahibi olunabilir. Ayrıca, bir karışımın bileşimi, bir polimerin bileşimi, düzeni (taktisitesi) ve ortalama mol kütlesi de tayin edilebilir. Bütün bunlara ek olarak çok geniş sıcaklık aralığında çalışılabilen bir yöntem olduğundan sıcaklığa bağlı olarak moleküllerde meydana gelen yapısal değişikliklerinde takip edilmesi mümkündür.

CW tekniği (değişken dalga) ile çalışan NMR cihazlarında 10-50 mg madde, FT tekniği (Fourier Transform) ile çalışan cihazlar için ise 1 mg madde analiz için yeterlidir. Numune uygun bir çözücüde tamamen çözünerek hazırlanır ve yaklaşık

0.5 mL çözelti çapı 5 mm uzunluğu 18 cm olan NMR tüplerine koyulur. Genellikle döteryumlanmış çözücüler ( $D_2O$ ,  $CDCl_3$ ,  $d_6$ -DMSO gibi) tercih edilir.

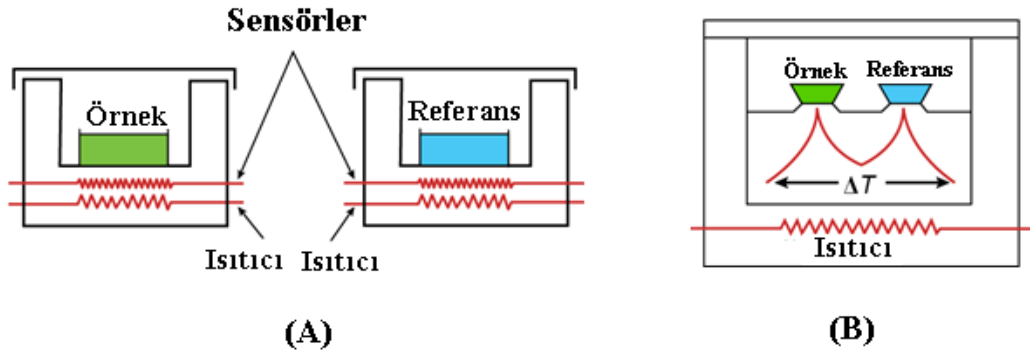
NMR spektrofotometresi dört ana bölümden oluşur; i) Kutup uçları arasında yüksek derecede homojen manyetik alan içeren mıknatıs, ii) Radyo frekans vericisi, iii) Radyo frekans alıcısı ve iv) Kaydedici

Numune (NMR aktif çekirdek içeren herhangi bir bileşik) homojen manyetik alan içerisine koyulur. Daha homojen bir alan elde etmek için numune döndürülür. Manyetik alanda çekirdeğin dönme enerji düzeylerinde yarıma (Zeeman etkisi) meydana gelir. Radyo frekans vericisi farklı frekanslarda (enerjilerde) radyo dalgasını numune üzerine gönderilir. Radyo frekans vericisinin gönderdiği dalganın enerjisi rezonans koşulunu sağladığı zaman enerji absorplanır. Böylece kaybolan enerji radyo frekans alıcısı tarafından ölçülerek kaydedici tarafından sinyal olarak kaydedilir (Ender Erdik, 2010).

### **2.7.3 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)**

DSC, örnek ve referansın kontrollü bir sıcaklık programına tabi tutulurken sıcaklığının fonksiyonu olarak örnek ve referansa olan ısı akışı farkını ölçer. DSC, reaktivite ve faz geçişleri gibi bilgileri elde etmek için gerekli doğru termodinamik verilere ulaşım sağlayan en karmaşık ve ileri termal yöntemdir. İki türü vardır: Güç dengeli DSC ve Isı-akış DSC.

Güç dengeli DSC de, örnek ve referans belli bir hızda ısıtılırken örnekte meydana gelecek bir olay nedeniyle ısı alması veya salması durumuna göre ikisi arasındaki sıcaklık farkı sıfır ( $\Delta T=0$ ) olacak şekilde ısıtma programı uygular. Böylece ısıtma esnasında örnekte hangi sıcaklıkta ne tür olayların gerçekleştiğini veren eğriler elde edilmiş olur. Başka bir deyişle, cihaz enerji aktarımındaki değişimi örneğin veya referansın sıcaklığına karşı grafiğe geçirir. Basit olarak bir güç dengeli DSC şematik olarak Şekil 2.12 (A) de verilmiştir.

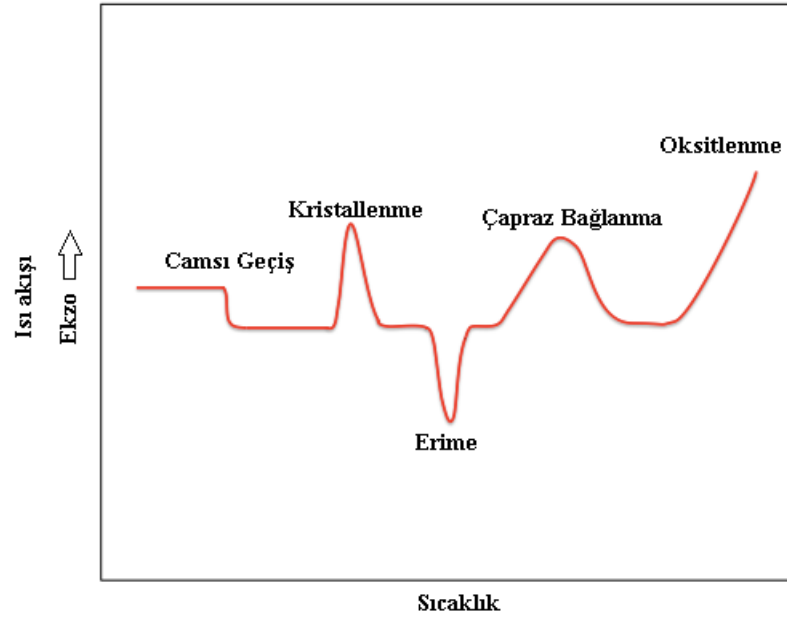


**Şekil 2.12** Güç dengeli (A) ve ısı akış DSC'nin şematik gösterimi

Isı Akış DSC'de ise, tek bir ısıtıcı tarafından örnek ve referans ısıtılır. Örnek ve referansa olan diferansiyel ısı akışı bir sıcaklık sensörü (termocouple) ile izlenir. Örnek ve referansa olan diferansiyel ısı akışı sıcaklık sensörünün bağlantı noktaları arasındaki fark ile orantılıdır. Isı akış DSC'nin basit şematik gösterimi Şekil 2.12 (B) de verilmiştir.

Sürükleyici gaz olarak genellikle hava veya azot kullanılır. İsteğe bağlı olarak helyum veya argon tercih edilebilir. Örnek kabı seçimi (alüminyum, bakır, altın, platin, alümina, safır) çok önemlidir. Örnek kabının termal özellikleri, örneğe karşı reaktivitesi ve katalitik davranışı göz önüne alınarak seçilmelidir.

Örnek sıcaklığına karşı ısı akışı grafiğine DSC termogramı veya DSC eğrisi adı verilir. Çıkış noktasına göre termogramın yukarısı veya aşağısının endo veya ekzo olarak belirtilmesi gerekir. Tipik bir DSC termogramı Şekil 2.13 de örnek olarak verilmiştir.



**Şekil 2. 13** Tipik bir DSC termogramı

DSC eğrileri ekzotermik ve endotermik geçişlere ait pikler vermektedir. Herhangi bir geçişe ait pikin altında kalan alan ilgili geçişin entalpi değişimi ile orantılıdır. Pikler üç farklı bakış açısı ile karakterize edilebilirler. Öncelikle, pikin pozisyonuna bakılır. Hangi sıcaklıkta başlamış ve bitmiş. Pik maksimumu hangi sıcaklığa denk gelmektedir. Daha sonra, pikin alanına bakılır. Pikin alanı o geçişin entalpi değişimi ve madde miktarı ile ilişkilidir. Son olarak, pikin şekline bakılır. Simetrik veya asimetric olması, gerçekleşen olayın kinetiği hakkında bilgi verir. Bazı önemli fiziksel ve kimyasal değişimler ve verdiği piklerin özellikleri Çizelge 2.4'te özetlenmiştir.

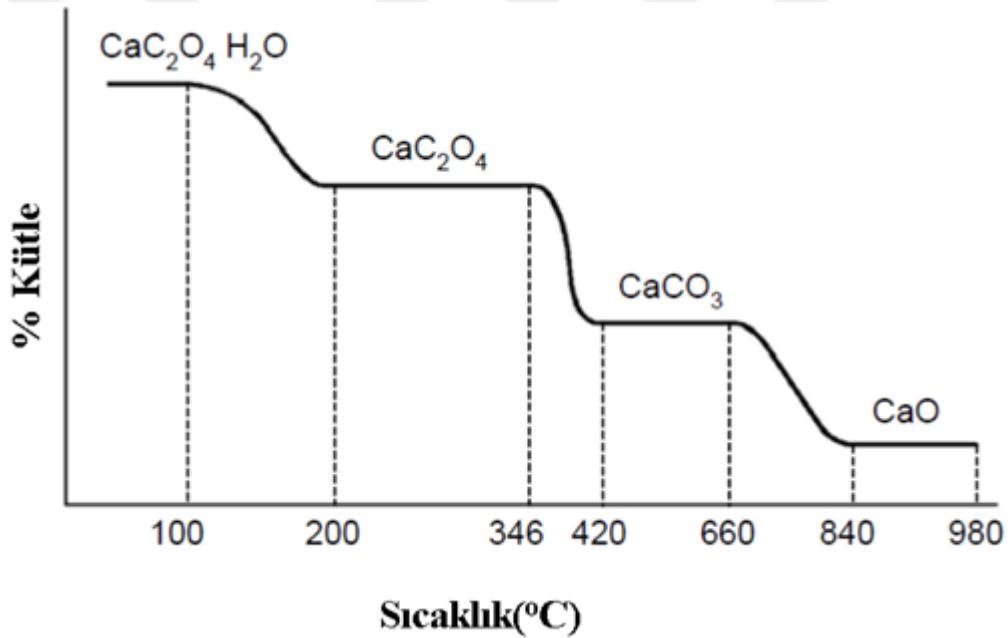
**Çizelge 2. 4** Bazı fiziksel ve kimyasal değişimler ve verdikleri piklerin özellikleri

<b>Olay</b>	<b>Ekzoterm</b>	<b>Endoterm</b>
<b>Katı-katı geçiş</b>	*	*
<b>Kristalleşme</b>	*	
<b>Erime</b>		*
<b>Vaporizasyonu</b>		*
<b>Süblimleşme</b>		*
<b>Adsorbsiyon</b>	*	
<b>Desorpsiyon</b>		*
<b>Çözücü buharlaşması</b>		*
<b>Bozunma</b>	*	*
<b>Katı-katı reaksiyon</b>	*	*
<b>Katı-sıvı reaksiyon</b>	*	*
<b>Katı gaz reaksiyonu</b>	*	*
<b>Kürlenme</b>	*	
<b>Polimerizasyon</b>	*	
<b>Katalitik reaksiyonlar</b>	*	

DSC malzeme karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Polimer karakterizasyonu, ham madde saflığı tayini, patlayıcıların analizi, besinlerin kalori değerlerinin saptanması, inorganik (silikat, oksit, seramik, kil ve cam gibi) ve organik maddelerin termal geçişlerinin belirlenmesi gibi birçok kullanım alanı vardır (Skoog ve ark., 2007)

#### 2.7.4 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz, 0.5-25 °C/dk. ısıtma hızıyla oda sıcaklığından başlayarak 1200 °C 'ye kadar uzanabilen örneğin ısıtılırken kütlesinin nasıl değiştiğinin sürekli olarak ölçülmesidir. Bu süreç aslında örnek kütlesinin sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmesidir. Elde edilen grafik termogram adını alırken eğrinin irdelenmesi ile hem kalitatif hem de kantitatif sonuçlar elde edilebilir. TGA ile örneğin saflığı, termal bozunma davranışı ve bozunma kinetiği incelenebilir. Örnek olarak, Şekil 2.14'te, kalsiyum okzalit monohidrat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) bileşiğinin TGA termogramını gözönüne alalım. Yatay bölgeler, üzerlerinde belirtilen kalsiyum bileşiklerinin kararlı olduğu sıcaklık aralıklarını göstermektedir. % Kütle değerindeki değişim ise, verilen kimyasal formüllerin stokiyometrilere uygun olarak azalmaktadır.



Şekil 2. 14  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  'ın bozunma termogramı

Tipik bir termogravimetrik analiz cihazı çok hassas bir terazi, fırın, fırın sıcaklığını ölçen bir termometre, kaydedici ve programlayıcı bulunmaktadır. Günümüzdeki modern cihazların birçoğunda bozunma eğrisinin türevini ve termogramı çizebilecek devreler bulunmaktadır ve türev eğrisinden normal termogramda saptanamayan bilgileri de öğrenebiliriz.

Termogravimetrik yöntemlerin en önemli uygulamaları polimer ve kompozitleridir. Bazı polimerik maddelerin bozunma mekanizmalarını termogramlardan aldığımız bilgilerle açıklayabiliriz. Her tip polimer için karakteristik olan bozunma

davranışından polimerlerin kalitatif analizi de yapılabilmektedir (Skoog ve ark., 2007).

### **2.7.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Spektrometri**

Genel olarak, kütle spektrometri teknikleri analiz edilecek örneğin oluşturulan iyonlarını manyetik veya elektrik alanda kütle/yük oranlarına göre ayırarak tayin etmeye dayanır. Yakın zamana kadar iyonlaşma işlemi buhar halindeki örneğin elektronlarla bombardımanı yoluyla sağlanıyordu. Polimerler uçucu bileşikler olmaması nedeniyle ve bu yöntemle parçalanmış polimer zincirleri elde edildiğinden polimerin mol kütlesi dağılımı elde edilemiyordu.

Yakın zamanda, polimer zincirini parçalamadan iyonlaştırarak buhar haline getirebilen ve böylece de mol kütlesi dağılımını elde etmeye olanak sağlayan matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaşma (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) ve elektrosprey iyonlaşma (ESI) teknikleri geliştirildi.

Kütle spektrometresinin temel bileşenleri iyonlaştırıcı kaynak, analizör, detektör, veri işlemcisi ve vakum pompasıdır. Etkili bir ayırma için iyonların hava molekülleriyle çarpışması engellenmeli, yani analizör ve dedektör vakumlu ortamda bulunmalıdır. İyon üretimi ise iyonlaştırma kaynağının türüne göre atmosferik basınç ya da vakum altında gerçekleştirilebilir

Elektromanyetik alanlarda ayırmanın sağlanabilmesi için nötral moleküllerin iyonlara dönüştürülmesi ve ihtiyaç halinde gaz faz haline geçmeleri gerekmektedir. Peptid ve proteinlerin yüksek moleküler ağırlıkları ve polar yapıları göz önüne alındığında, iyonlaştırıcı kaynak protein ya da peptidleri hem iyon haline hem de gaz faza geçirmelidir. Çeşitli iyonlaştırıcı kaynaklar arasında sadece ESI ve MALDI proteinlerle çalışmaya uygundur. ESI ile iyonlar atmosferik basınç altında oluşturulurken, MALDI'de atmosferik basınç veya vakum altında oluşturulabilir.

Makromolekül çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan MALDI'nin prensibi, ultraviyole ışınları absorblama özelliğine sahip bir matriksin kullanılmasına dayalıdır. Makromolekül ve matriks uygun bir bir çözücüde çözülerek karıştırılır ve örnek yükleme plakalarına aktarılır. Daha sonra çözücünün buharlaşmasına izin verilir ve böylece kristalleşmiş matriks molekülleri arasına gömülü makromoleküller elde edilmiş olur. Örnek plakası cihaza yerleştirilir ve vakum altında, genellikle

nitrojen kaynaklı UV lazeri ile uyarılar yapılır. Matriks molekülleri lazerin enerjisini absorblar ve makromolekülleri de beraberinde taşıyarak gaz fazda iyon haline geçerler.

Sinapinik asit ve  $\alpha$ -siyano-4-hidroksinamik asit sırasıyla, protein ve peptid analizi için en çok kullanılan matrikslerdir. 2,5-Dihidroksi benzoik asit de peptid haritalandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Oktil-beta-glukosit gibi birkaç nötral deterjan, peptid iyonlaşması ile uyumludur. MALDI-TOF kütle spektrometre, 400 ile 350000 Da molekül ağırlığındaki proteinler, peptitler, oligosakkaritler ve oligonikleotitler gibi biyomoleküllerin tayini ve tanımlanmasında kullanılabilir.

TOF analizi, aynı miktarda enerjinin verildiği farklı iyonların bir dedektöre doğru hızlandırılarak çarptırılmasına dayanmaktadır. İyonlar aynı kinetik enerjiye sahip olmalarına rağmen farklı kütlelerde olduklarından dedektöre ulaşma zamanları farklıdır. En önce en küçük iyonlar hızlarının fazla olmasından dolayı dedektöre ulaşırken daha büyük olan iyonlar daha büyük olan kütleleri yüzünden dedektöre daha geç ulaşmaktadırlar. Bu sayede kütle/yük değerleri uçuş zamanlarından yola çıkarak hesaplanmakta ve spektrumda yerlerini almaktadır (Staal, 2005).

#### **2.7.6 Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometri (LCMS)**

LC/MS; HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve MS (Kütle Spektrometresi) ünitelerinin birlikte çalıştırılarak yapı aydınlatması ve miktar tayininde kullanılan bir analitik yöntemdir. Ayrıca HPLC ve MS üniteleri birbirinden bağımsız olarak da çalışabilmektedir.

HPLC ünitesi, pompa, oto örnekleyici (autosampler) ve dedektör olmak üzere başlıca üç kısımdan oluşmaktadır. MS ünitesi, iyon kaynağı, kütle analizörü ve iyon dedektör sistemi olmak üzere başlıca üç kısımdan oluşur. İyon kaynağı olarak ESI (Electrospray Ionization) iyonizasyon tekniği uygulanır. Kütle analizörü, iyon kaynağından gelen iyonları değişen elektrik alana tabi tutularak m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayırır. Cihaz içerisinde ayrıca iyon tutucu (Ion-Trap) kütle analizörü mevcuttur. İyon dedektörü, yüksek duyarlılığa sahip, pozitif ve negatif iyon modlarında çalışabilen bir dedektör sistemidir.



LC-MS yöntemi, karışımdaki eser miktardaki analitlerin yapı çözümlemesini ve hassasiyetle miktar tayinlerini yapabilmektedir. Sıvı kromatografisi, karışımdaki bileşenleri ayırırken kütle spektroskopisi, her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasında yardımcı olur (Yıldız ve ark., 1997)

Küçük farmasötik bileşiklerden büyük proteinlerin tayinine kadar, polar iyonik, termal olarak kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri yapılabilir. Farmakoloji, ilaç kimyası, gıda ve çevre analizlerinde, özellikle pestisit, hormon ve antibiyotik kalıntı analizleri yaygın olarak yapılan analizlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Metakrilik asit (Sigma 99%), asetik asit içinde hidrojen bromür çözeltisi (Sigma-Aldrich 33 % w/w), susuz sodyum karbonat (Sigma-Aldrich 99.9), susuz sodyum sülfat (Sigma, 99.9), kloroform (Sigma-Aldrich 99.5%), tetra bütül amonyum bromür (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>NBr (Sigma-Aldrich 98%), dibenzo-18-taç-6-eter (Aldrich 98%), potasyum asetat (Sigma 99%), fosfat tampon tuzu PBS tableti (Sigma), sodyum azit (Sigma-Aldrich 99.5%), Sığır pankreasından tripsin (Sigma, 100-200 BAEE units/mg katı) ve Domuz pankreasından lipaz (Sigma type II, 100-500 units/mg protein) ticari olarak elde edildi ve saflaştırılmadan kullanıldı. Tetrahidrofuran (Sigma-Aldrich 99.9%) sodyum üzerinde kurutuldu ve kullanımdan önce destile edildi.

#### 3.2 Yöntemler

##### 3.2.1 Sentez ve Ölçümler

**2-metil propiyolakton (mPL) sentezi:** 100 mL metakrilik asit (Sigma %99) 1 L lik dibi yuvarlak balon içerisine alındı ve buz banyosuna yerleştirilerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu esnada 250 mL HBr nin asetik asitteki çözeltisi (%33 lük, Sigma-Aldrich) (yaklaşık 0 °C de) damlatma hunisi yardımı ile içerisinde metakrilik asit bulunan 1L lik balona takıldı ve yarım saat içerisinde damla damla eklendi. Bir gece 0 °C de ve karanlıkta manyetik karıştırıcı ile karıştırılan karışım daha sonra oda sıcaklığına getirildi. Su trompu vasıtasıyla reaksiyona girmeden kalan HBr uzaklaştırıldı. Reaksiyona girmeyen metakrilik asit ve ortamda bulunan asetik asit döner buharlaştırıcı ile 60 °C de uzaklaştırıldı. Kalan kısım 1 mm Hg vakumda 85 °C de vakum damıtması ile damıtılarak karışımında bulunan 3-brom-2-metil propanoik asit izole edildi. FTIR ve <sup>1</sup>H-NMR (çözücü olarak d<sub>6</sub>-DMSO) spektrumları ile yapı teyit edildi. Elde edilen berrak-yoğun sıvının miktarının belirlenmesi ile %85-90 verimle bromlanmanın sağlandığı tesbit edildi. Bromlanmış ürünün 50 mL lik kısmı alınarak üzerine 50 mL distile su eklendi. Karışım buz banyosu ve manyetik karıştırıcı ile 5 °C ye soğutuldu. Hazırlanan doygun Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi bir büret yardımı ile soğutulan çözeltiliye damla damla eklendi. Bu esnada pH metre yardımı ile çözeltilinin pH'ı takip edildi. Çözelti pH değeri 7.50 olana dek titrasyon devam ettirildi. Bu aşamada halka kapanması sağlanmış yani 2-metil propiyolakton (mPL) oluşumu sağlandı. Karışıma 200 mL kloroform ve faz

değiştirme ajanı olarak 3-4 g (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>NBr eklenerek bir gece şiddetli şekilde karıştırıldı. Ayırma hunisine alınan karışımdan kloroform fazı alınarak iki kez saf su ile yıkandı ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Döner buharlaştırıcı yardımı ile kloroform uzaklaştırıldı. Kalan kısım vakum destilasyonu (1 mmHg ve 120 °C) ile saflaştırıldı ve mPL % 15 verimle elde edildi. Elde edilen berrak sıvının kırılma indisi ölçülerek FTIR ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumları (çözücü olarak CDCl<sub>3</sub>) kaydedildi.

**Poli(2-metil propiyolakton) (PmPL) sentezi:** 5 mL mPL bir Schlenk tübüne alındı. 40 mL yeni destile edilmiş THF çözücü olarak eklendi. Üzerine monomer mol miktarının %1'i kadar başlatıcı olarak CH<sub>3</sub>COOK ve %1'i kadar kokatalizör olarak dibenzo-18-taç-6-eter eklendi. Oda sıcaklığında anyonik halka açılması polimerizasyonu ile PmPL polimeri eldesi için 24 saat boyunca karıştırıldı. Bu süre sonunda reaksiyon karışımı aşırı metanol içerisine yavaş yavaş eklenerek oluşan beyaz peltemsi yapıdaki polimer çöktürüldü. Vakum süzme sistemi ile düşük gözenekli Gooch krozesi yardımıyla süzüldü, oda sıcaklığında kabaca kurutulduktan sonra vakumda oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Tartım sonucunda başlangıç monomer kütlesi bazında % 85 verimle polimer elde edildiği saptandı.

**Poli(2-metil-propiyolakton) (PmPL)'un Karakterizasyonu:** Elde edilen poli(2-metil-propiyolakton)un kimyasal yapısı, <sup>1</sup>H-NMR spektrumları Bruker AVANCE III 400 MHz NMR Spektrometresi ile 0-10 ppm aralığında ve FTIR spektrumları Shimadzu IRaffinity 1 spektrometre ile 500-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında 32 tarama ile ATR tekniği kullanılarak kaydedilmiştir. NMR çözücüsü olarak CDCl<sub>3</sub> kullanıldı. Ortalama mol kütlesi ve dağılımı MALDI-MS TOF tekniği ile belirlendi. MALDI kütle spektrumları, 337 nm de çalışan bir azot UV-lazeri bağlanmış Voyager-DE<sup>TM</sup> PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems, USA) ile kaydedildi. Spektrumlar doğrusal ve pozitif iyon modu ile ortalama 500 atım yapılarak elde edildi. MALDI matrisi olarak 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) kullanıldı. Matris, THF:ACN karışımında (1:1, v/v) 20 mg/mL derşiminde hazırlandı. Katyonlaştırma ajanını (LiTFA, 10mg/mL THF) matris çözeltisine toplam çözeltinin 1.0 % (v/v) olacak şekilde eklendi. Tüm örnekler THF de çözüldü ve 1.0 µL örnek MALDI hedefine damlatıldı. Hava ile kurutulan örneğin analizi gerçekleştirildi. Termal analiz, TA Instruments Q2000 ve Q600 kullanılarak nitrojen atmosferinde 10°C / dk ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. Biyobozunma Çalışması

Sentezlenen PmPL kloroformda çözünerek (%20 w/v) polimerin film halinde örnekleri çözelti dökme (solution casting) tekniğiyle hazırlanmıştır. Bunun için 1cm x 1cm boyutundaki lamel camlar üzerine damlatılan çözeltiler buharlaştırılmıştır. Lamellerin vakum etüvünde oda sıcaklığında 0.1 mm Hg basınçta bir gece bekletilmesi ile lamel üzerinde ince polimer tabakası elde edilmiştir. Bu örnekler (Fosfat Buffer Saline) PBS ve  $\text{NaN}_3$  (antimikrobiyal ajan) varlığında (pH=7.4) ve 37 °C de hidrolitik degradasyona maruz bırakılmıştır. Aynı şekilde hazırlanan iki set örneğin de trypsin ve lipaz (Porcine Pancreatic Lipase) varlığında enzimatik bozunurluğu incelenmiştir. Degradasyon Şekil 3.1. de verilen sabit sıcaklıklı çalkalayıcıda 90 rpm çalkalama hızında 5 hafta sürdürülmüştür. Belirlenen zaman aralıklarında degradasyon ortamından uzaklaştırılan örnekler kutularak tartılmış ve kütle kaybı belirlenmiştir. Bozunarak çözünür hale geçen polimer fragmanlarının tesbiti LCMS (The Thermo Scientific™ TSQ Quantum™ Access MAX LC-MS) analizi ile sağlanmıştır. Böylece, bozunma mekanizması hakkında bilgi edinilmiştir. LCMS analizinde, biyobozunma ortamından alınan numune MS grade metanol içerisinde yaklaşık 1 ppm konsantrasyonda çözünerek hazırlandı. Mobil faz olarak MS grade metanol kullanılarak 0,3 ml/dak akış hızının çalışıldı. Numune manuel enjeksiyon yöntemiyle cihaza yüklendi ve kalitatif olarak sonuç kaydedildi.

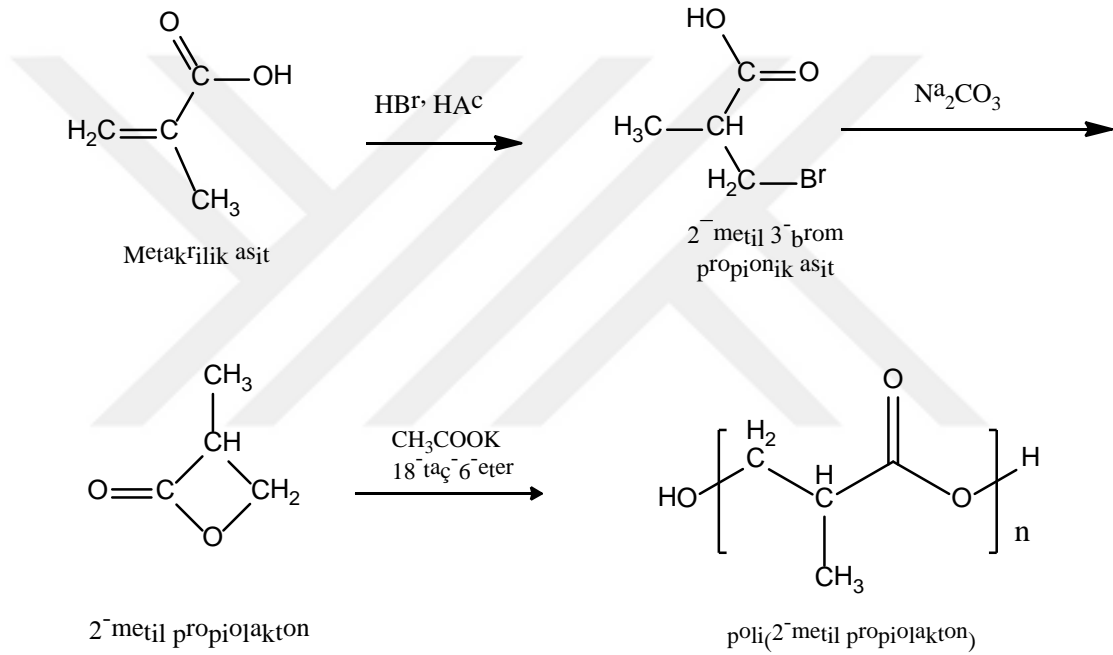


Şekil 3. 1 Biyobozunma çalışmalarında kullanılan çalkalama düzeneği.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

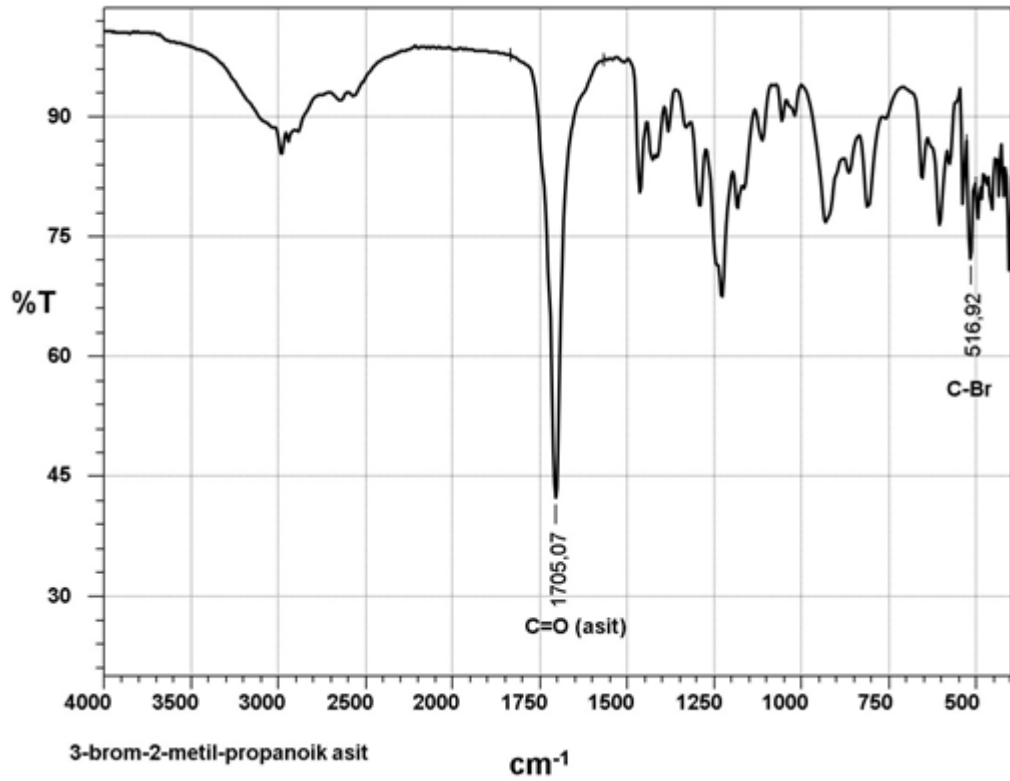
##### 4.1 3-Brom-2-metil-propanoik asit Sentezi ve Karakterizasyonu

PmPL, literatürde verilen iki sentez yönteminden (Hmamouchi ve Prud'homme, 1988; Xu ve Gross, 1996) de faydalanılarak gerçekleştirildi. Sentez basamaklarının özeti Şekil 4.1'de verilmiştir. Metakrilik asitin mono bromlanması hidrojen bromür (HBr %33 w/v asetik asit) ile gerçekleştirildi. Bromlamanın %85-90 verimle gerçekleştiği saptandı. Elde edilen yoğun, berrak sıvı 3-brom-2-metil propanoik asitin kırılma indisi 1.488 olarak ölçüldü. Teorik değeri olan  $n=1.493$ 'a çok yakın bir değer olması yüksek saflıkta elde edildiğini göstermektedir.



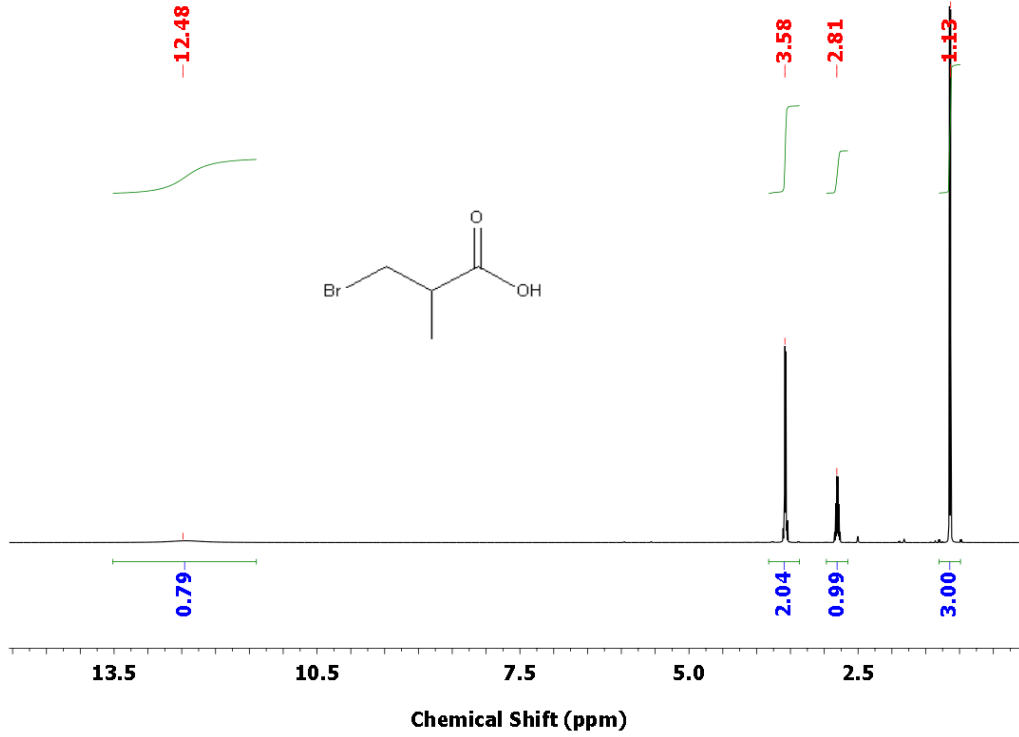
Şekil 4. 1 PmPL'nin sentez reaksiyonları

3-brom-2-metil propanoik asitin FTIR spektrumu Şekil 4.2. de verilmektedir. Yaklaşık  $517\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen C-Br asimetrik titreşim bandı bromlamayı  $1705\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen karboksilik asit karboniline ait asimetrik titreşim bandı ve çıkış maddesinde (metakrilik asit) bulunan çift bağa C=C ait  $1625\text{ cm}^{-1}$  civarında gözlenen şiddetli bandın gözlenmeyişi bromlamanın çok yüksek oranda gerçekleştiği savını güçlendirmektedir.



Şekil 4. 2 3-brom-2-metil propionik asitin FTIR spektrumu

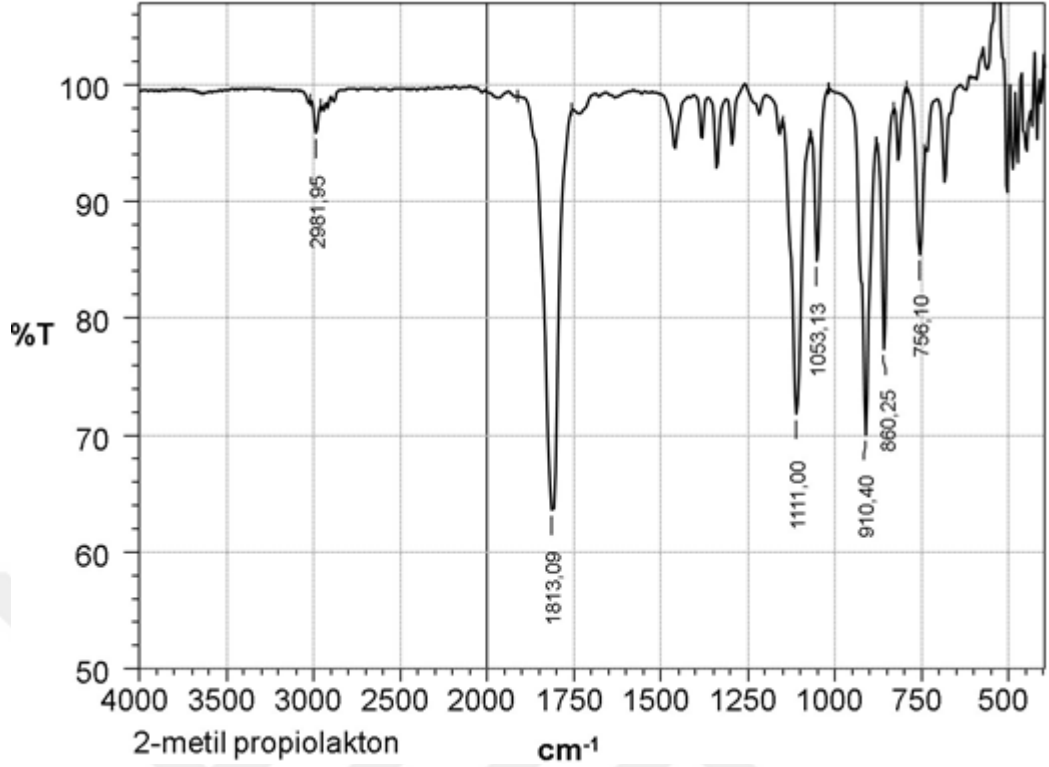
Daha kesin bilgi elde etmek ve olası eser miktardaki safsızlığın ne olabileceğini belirlemek için 3-brom-2-metil propanoik asitin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu kaydedildi. Şekil 4.3 de verilen spektrum incelendiğinde 1.13, 2.81 ve 3.58 ppm de gözlenen ve sırasıyla 3:1:2 şiddetindeki sinyaller molekülde bulunan metil ( $\text{CH}_3$ ), meti ( $\text{CH}$ ) ve metilen ( $\text{CH}_2$ ) protonlarına aittir. Ayrıca, 12.48 ppm de gözlenen yayvan tekli sinyal karboksilik asit protonuna aittir. Spektrum, elde edilen Br-PA'nın son derece temiz olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 3 3-brom2-metil proiyonik asitin <sup>1</sup>H-NMR spectrum

#### 4.2. 2-Metil Propiyolakton Sentezi ve Karakterizasyonu

Yeterince saf ve yüksek verimde elde edildiği belirlenen 3Br-PA'nın baz varlığında halka kapanması reaksiyonu ile 2-metil propiyolaktona dönüşme reaksiyonu bilinmektedir (Hmamouchi ve Prud'homme, 1988; Xu ve Gross, 1996). Halka kapanma reaksiyonu %15 verimle mPL elde edildi. Elde edilen berrak sıvının kırılma indisi 1.428 olarak ölçüldü. Bilinen kırılma indisi değeri  $n=1.43$  olduğu düşünülürse yüksek saflıkta olduğu varsayılabilir. mPL'ye ait FTIR spektrumu Şekil 4.4 de verilmiştir.

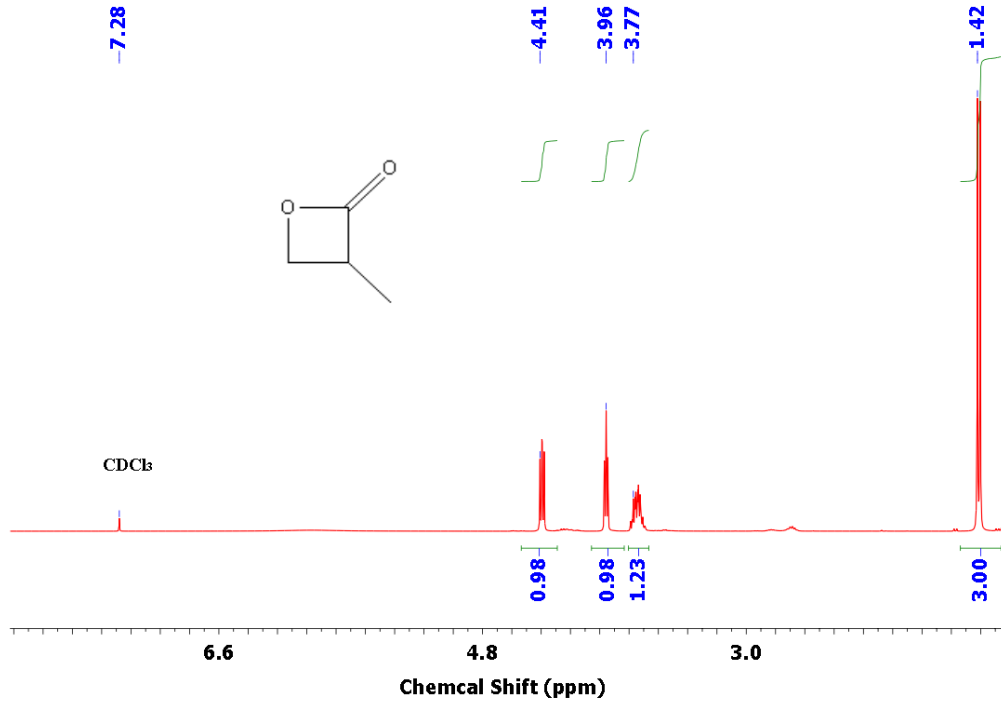


**Şekil 4. 4** 2-metil propiyolaktone'un FTIR spektrumu

Laktone halkalarında spesifik olarak karbonil titreşimleri halka gerginliğinden kaynaklı olarak  $1800\text{ cm}^{-1}$  üzerlerine çıkabilir.  $1813\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen şiddetli bant laktone karbonilinin gerilme bandı olarak halka kapanma reaksiyonunun sağlandığını göstermektedir. Ayrıca, Şekil 4.3'de Br-PA için verilen spektrumdaki  $3000\text{ cm}^{-1}$  üzerindeki OH gerilme bandı da görünmemektedir.

mPL'nin karakterizasyonunun tamamlanması ve olası safsızlıkların gözlenebilmesi için  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu kaydedilmiştir. Şekil 4.5. de verilen spektrum incelendiğinde 4 farklı sinyal görünmektedir. 1.42 ve 3.77 ppm de gözlenen ve bağlı şiddetleri yaklaşık 3:1 olan sinyaller sırasıyla metil ( $\text{CH}_3$ ) ve metin ( $\text{CH}$ ) protonlarına aittir. CH protonları komşu metil ve metilen karbonları nedeniyle çoklu (multiplet) verirken  $\text{CH}_3$  protonlarının da komşu CH protonu nedeniyle ikili (dublet) vermesi beklenen sonuçtur. 3.96 ve 4.41 ppm de gözlenen eşit şiddetli üçlü (triplet) sinyaller kimyasal olarak eşdeğer fakat manyetik olarak farklı olan metilen ( $\text{CH}_2$ ) protonlarına aittir. Bu sonuçlar, mPL sentezinin gerçekleştirildiğini göstermektedir.



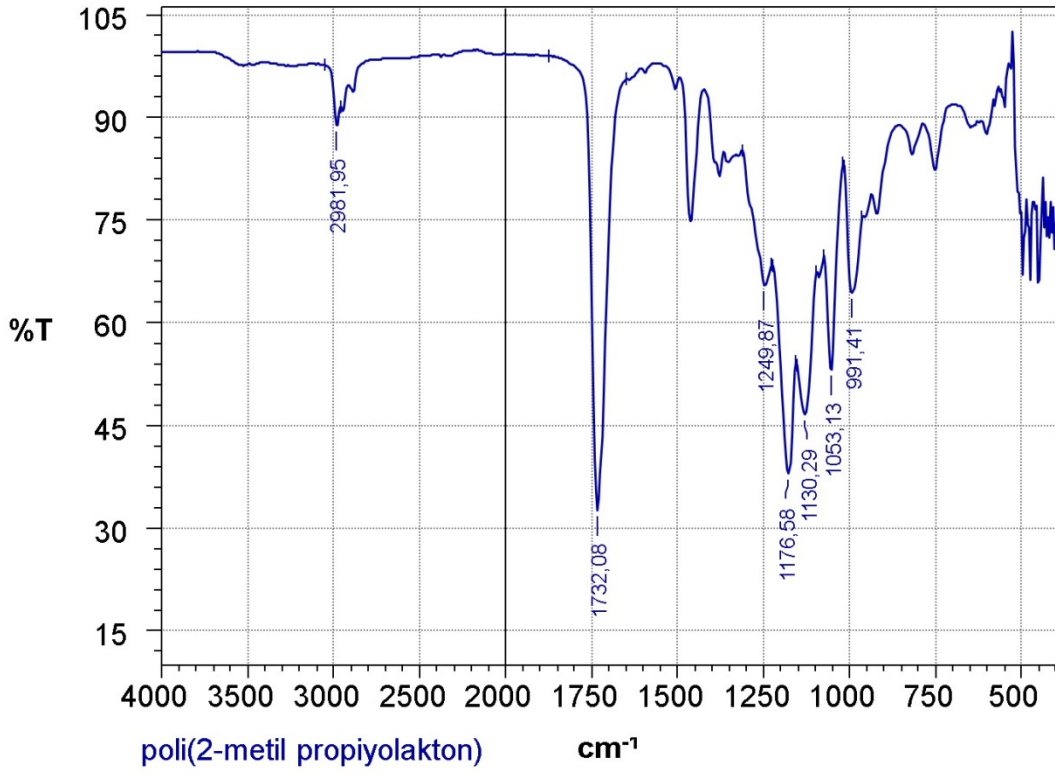


Şekil 4. 5 2-metil propiyolaktonun <sup>1</sup>H-NMR spectrum

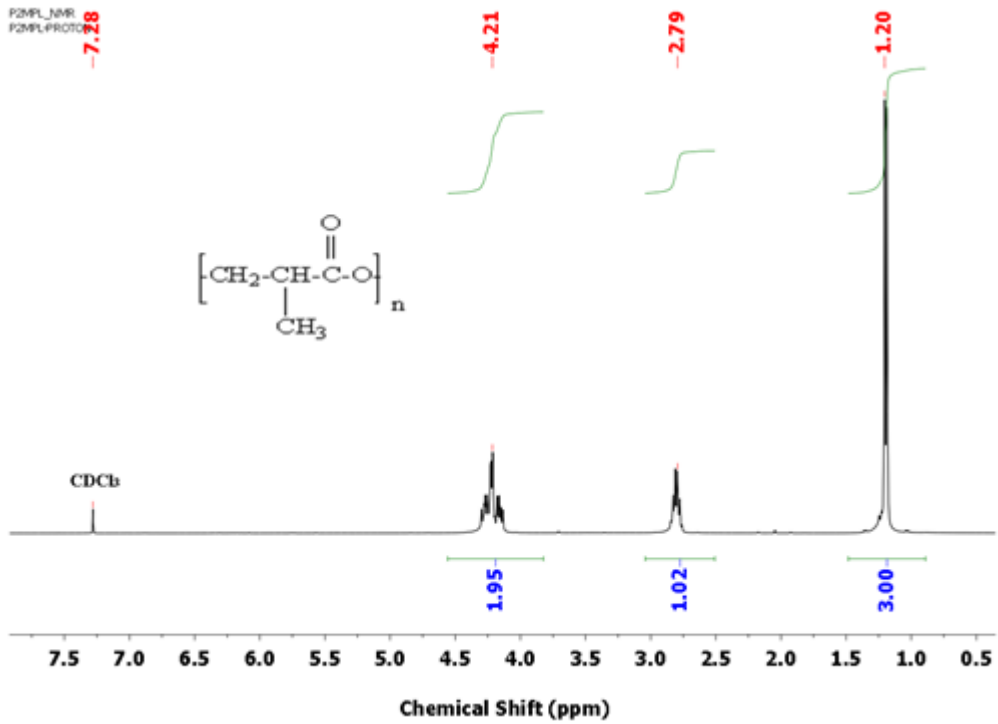
### 4.3 Poli(2-metil propiyolakton) Sentezi ve Karakterizasyonu

mPL'nin anyonik halka açılması polimerizasyonu CH<sub>3</sub>COOK ve dibenzo-18-taç-6-eter katalizör sistemi varlığında gerçekleştirildi. Elde edilen metanol-çözünmez kısmın (polimer) kullanılan monomere oranı göze alındığında polimerizasyonun % 85 verimle gerçekleştiği sonucu ortaya çıkmıştır. Elde edilen peltemsi ürünün karakterizasyonu spektroskopik yöntemler (FTIR, <sup>1</sup>H-NMR ve MALDİ) kullanarak sağlanmıştır.

Poli(2-metil-propiyolakton) karakterizasyonu öncelikle FTIR spektrumunun kaydedilmesi ile sağlandı. Şekil 4.6 da verilen spektrum incelendiğinde monomerde bulunan lakton karbonili titreşimine ait 1817 cm<sup>-1</sup> deki bandın kaybolduğu yerine alifatik ester karboniline ait 1732 cm<sup>-1</sup> de şiddetli bant gözlenmiştir. Böylece, polimerizasyon sonrası izole edilen peltemsi yapının poliester olduğu söylenebilir.



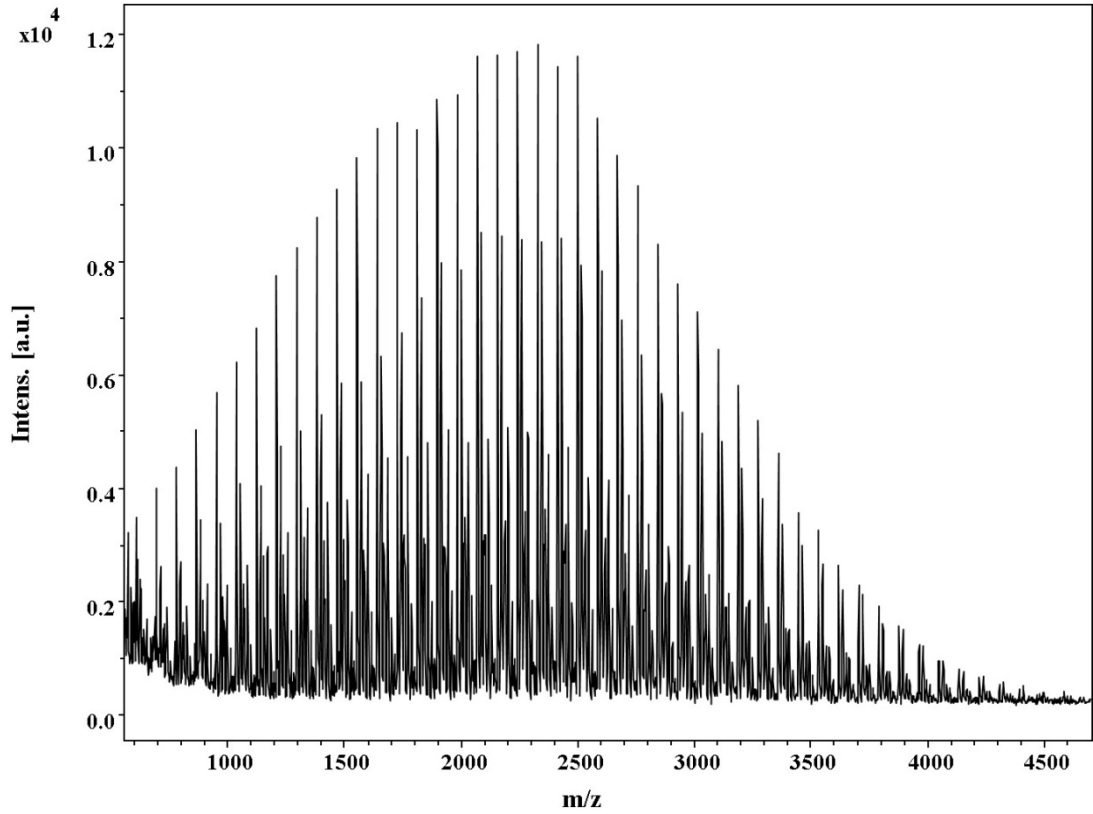
Şekil 4. 6 Poli(2-metil propiyolakton)'un FTIR spektrumu.



Şekil 4. 7 Poli(2-metil propiyolakton)'un  $^1\text{H}$ -NMR spektrum

7.28 ppm de gözlenen tekli sinyal çözücünden kaynaklanmaktadır. 1.20, 2.79 ve 4.21 ppm de şiddetleri sırasıyla 3:1:2 olan üç farklı sinyal poli(2-metil propiyolakton) tekrarlayan biriminde bulunan sırasıyla metil (CH<sub>3</sub>), metin (CH) ve metilen (CH<sub>2</sub>) protonlarına aittir.

Yapısal analizlerle planlanan polimerin elde edildiğinin anlaşılmasından sonra ortalama mol kütlesi tayini için MALDİ MS analizi yapılmıştır. Analizde katyonlaştırma ajanı olarak tri-floro asetik asit lityum tuzu (LiTFA) kullanılmıştır. Bu nedenle her sinyalde lityum katkı (adduct) bulunmaktadır. MALDİ MS spektrumu Şekil 4.8 de verilmiştir.

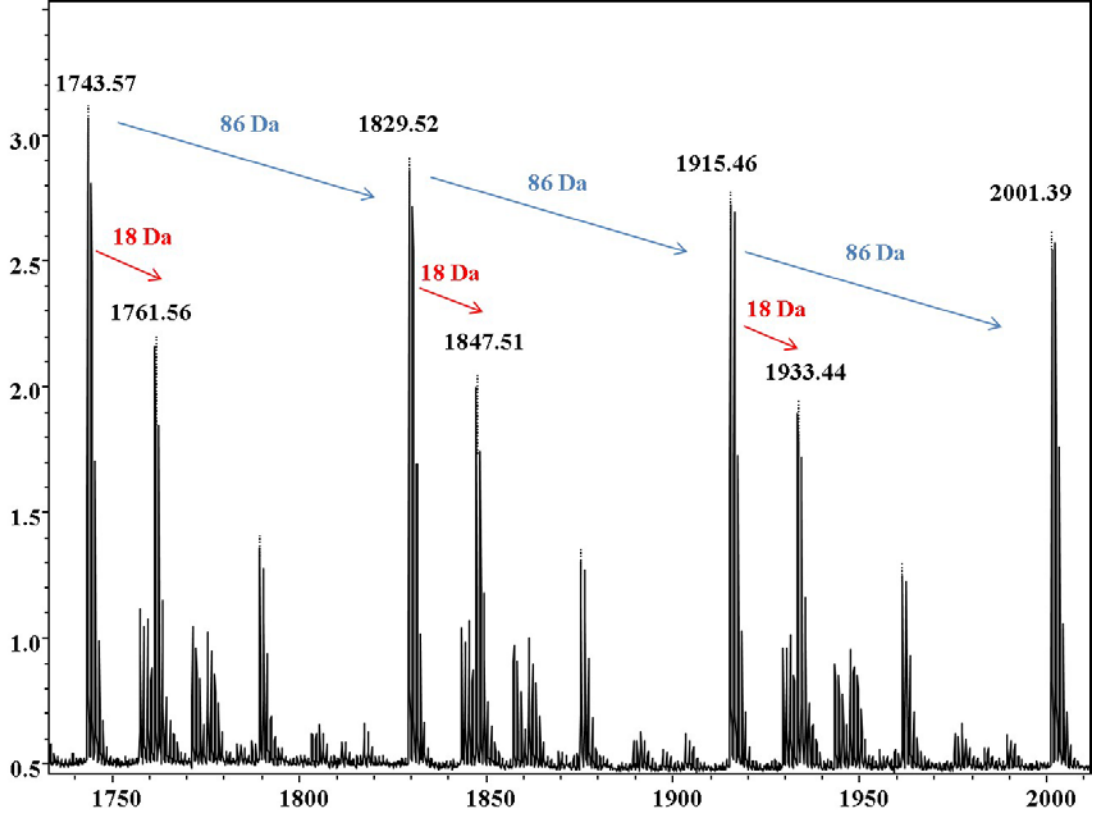


**Şekil 4. 8** Poli (2-metil propiolakton)'un MALDI kütle spektrumu (PmPL)

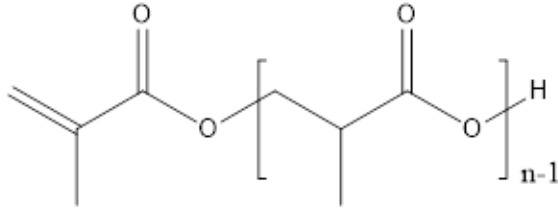
Tek dağılımlı spektrum tek tip polimer elde edildiğini göstermektedir. Dağılım incelendiğinde, ortalama 30-35 polimerizasyon derecesinden söz edilebilir. Yani, ortalama mol kütlesi  $M_n=2500-3000 \text{ g mol}^{-1}$  aralığındadır. Şekil 4.9. da verilen genişletilmiş MALDİ spektrumu incelendiğinde hem uç grubu farklı zincirler hem de sinyaller arasındaki yaklaşık 86 Da luk fark net olarak görünmektedir ve tekrarlayan birim yapısı ile tutarlıdır. Temel olarak 18 Da farkıyla iki tip sinyal gözlenmiştir.

1743.57, 1829.52, 1915.46 ve 2001.39 sinyalleri, Şekil 4.10'daki yapı I'e atfedilmiştir. Sinyaller  $M_n = (86 * n) + 7$  denklemine uymaktadır. n tekrarlanan ünite sayısıdır.

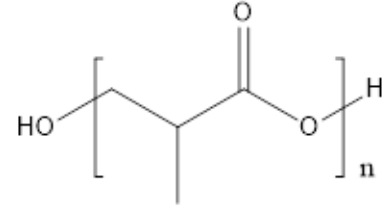
1761.56, 1847.51 ve 1933.44 Da sinyalleri, Şekil 4.10 'daki yapı II'ye atfedilmiştir. Sinyaller  $M_n = (86 * n) + 7 + 18$  denklemine uymaktadır. I ve II yapıları, Lecomte ve Jerome (2012) tarafından önerilen başlama mekanizmaları ile tutarlıdır.



Şekil 4. 9 Poli (2-metil propiolakton)'un genişletilmiş MALDI kütle spektrumu



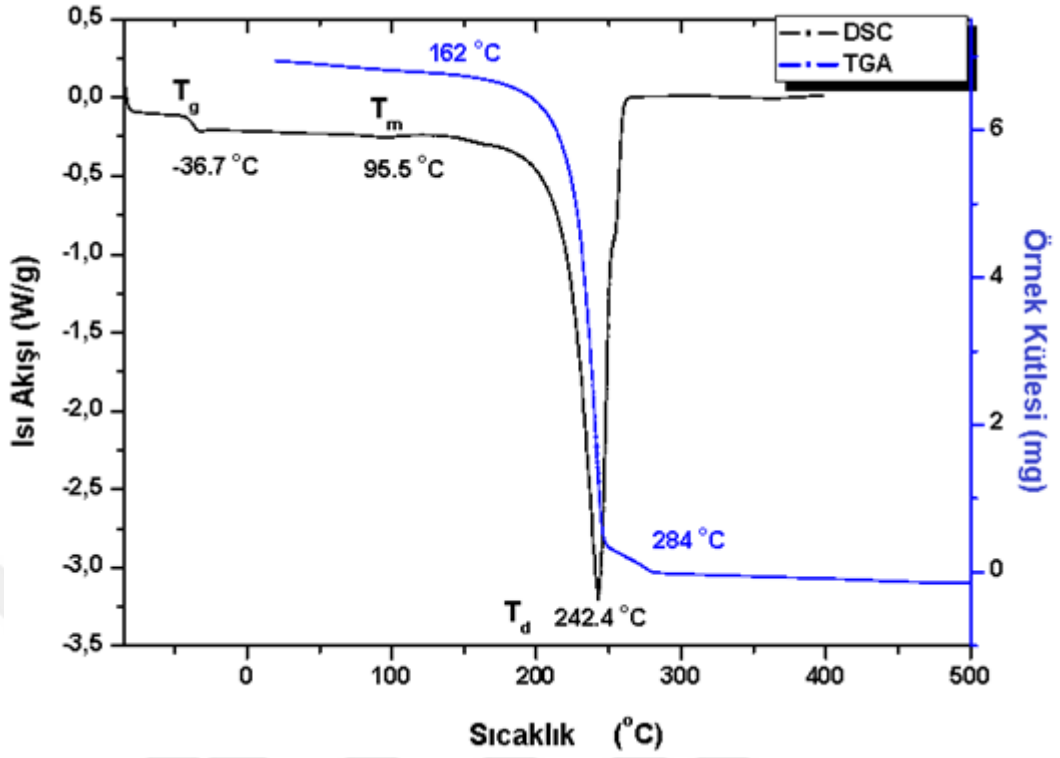
**Kimyasal Yapı I**



**Kimyasal Yapı II**

**Şekil 4. 10** PmPL'nin farklı son gruplarla kimyasal yapıları

Spektroskopik yöntemlerle yapısı, ortalama kütlesi ve zincir uçları belirlenen PmPL için termal özelliklerinin belirlenmesi için Şekil 4.11'de verilen differansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ve termogravimetri (TG) eğrileri kaydedilmiştir. İki analiz, termal geçişleri karşılaştırmalı olarak yorumlamak için aynı deney koşulları altında (azot atmosferi ve 10 °C/dk ısıtma hızı) kaydedilmiştir. Karakteristik camsı geçiş sıcaklığı -36,7 °C'de meydana geldi ve yaklaşık 95.5 °C'de zayıf endotermik bant erime olayına yorulmuştur. 242.4 °C merkezli kuvvetli endotermik bant, TG eğrisindeki sonuçlarla tutarlı olan termal bozunmaya aittir. TG eğrisindeki termal bozunma başlangıç sıcaklığı 162 °C olarak belirlenmiştir. Termal bozunmanın 284 °C'de tamamlandığı görünmektedir.



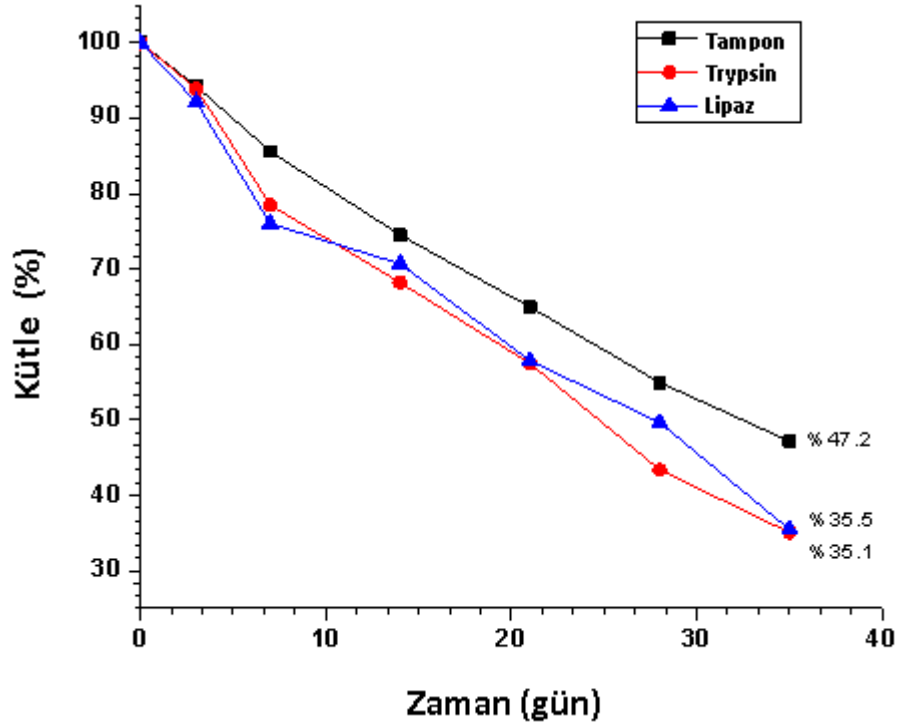
Şekil 4. 11 PmPL'nin DSC ve TG eğrileri

#### 4.4 Poli(2-metil Propiolakton)'in Hidrolitik ve Enzimatik Biyobozunması

Poli(2-metil propiolakton)'un hem hidrolitik bozunurluğu iki tekrarlı örneklerle PBS tamponu (Phosphate Buffer Saline) ve  $\text{NaN}_3$  (antimikrobiyal ajan) varlığında, hem de biyobozunurluğu iki tekrarlı örneklerle iki farklı enzim (trypsin ve domuz pankreası lipazı) varlığında 5 hafta boyunca yürütülmüştür.

##### 4.4.1 Kütle Kaybı Ölçümleri

Çözelti-dökme filmlerin hidrolitik bozunması PBS çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Enzimatik bozunma çalışması, PBS çözeltisinde, pankreatik tripsin veya pankreatik lipazın varlığında gerçekleştirilmiştir. Çözeltilere batırılan filmler 5 hafta boyunca 37 °C sabit sıcaklıkta 90 rpm de çalkalanmıştır. Filmler daha sonra belirli zaman aralıklarında çözeltilerden çıkarıldı, kurutuldu ve tartıldı. Şekil 4.12, üç farklı ortamdaki örnek ağırlık yüzdesinin zamana bağlı değişimlerini göstermektedir.



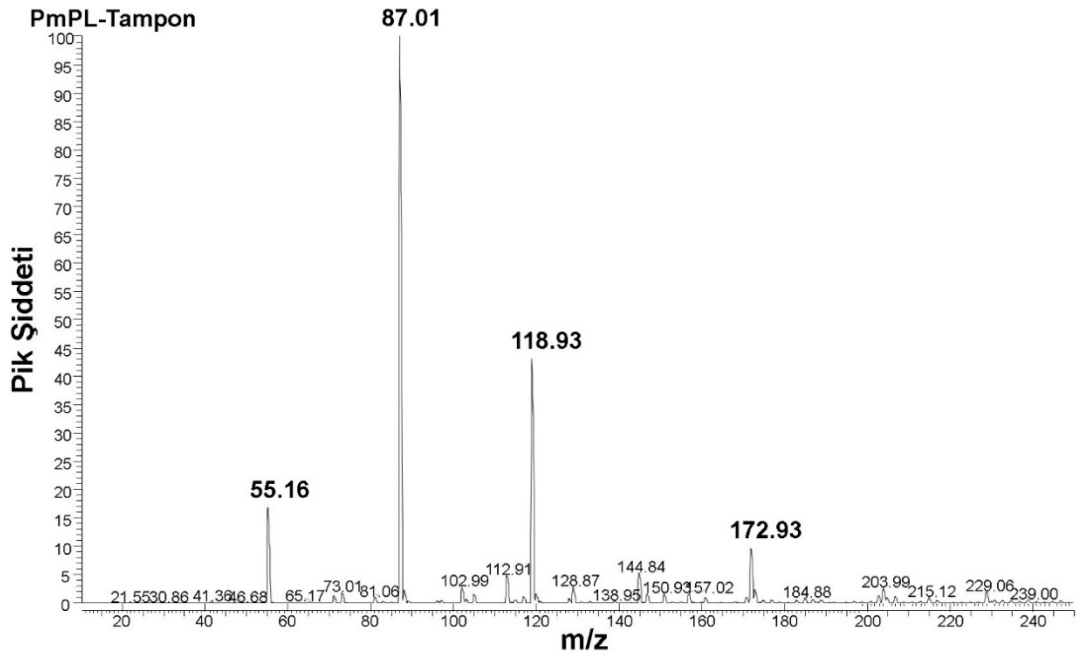
**Şekil 4. 12** Tampon, tripsin ve domuz pankreatik lipazda PmPL örnekleri için kütle kaybının zamana bağlılığı.

PBS çözeltisi içindeki numuneler için, kütle kaybı hızı zamanla azalmaktadır. Örneğin, beşinci gün sonunda kütle kaybı yüzdesi yaklaşık % 15 iken, % 30'a ulaşmak 2-3 hafta sürer. Bu davranış, PmPL'nin yarı kristalli yapısı ile açıklanabilir. Biyodegradasyonun ilk evresinin amorf bölgelerde gerçekleştiği iyi bilinmektedir (Doi ve ark., 1992; Guillet ve ark., 1992). Beşinci haftanın sonunda, PBS çözeltisindeki numunelerin neredeyse yarısı ortamda çözünür hale geldi. Benzer bozunma kinetikleri, tripsin ve lipaz içeren PBS çözeltilerindeki numuneler tarafından sergilenmiştir. Enzimler ile muamele edilen numunelerde kütle kayıplarının büyüklükleri, PBS' dekinden % 10-15 daha yüksektir. Fark, ester bağının hidrolizinde tripsin ve lipazın katalitik aktivitesine bağlanabilir.

#### 4.4.2 LC-MS Analizi

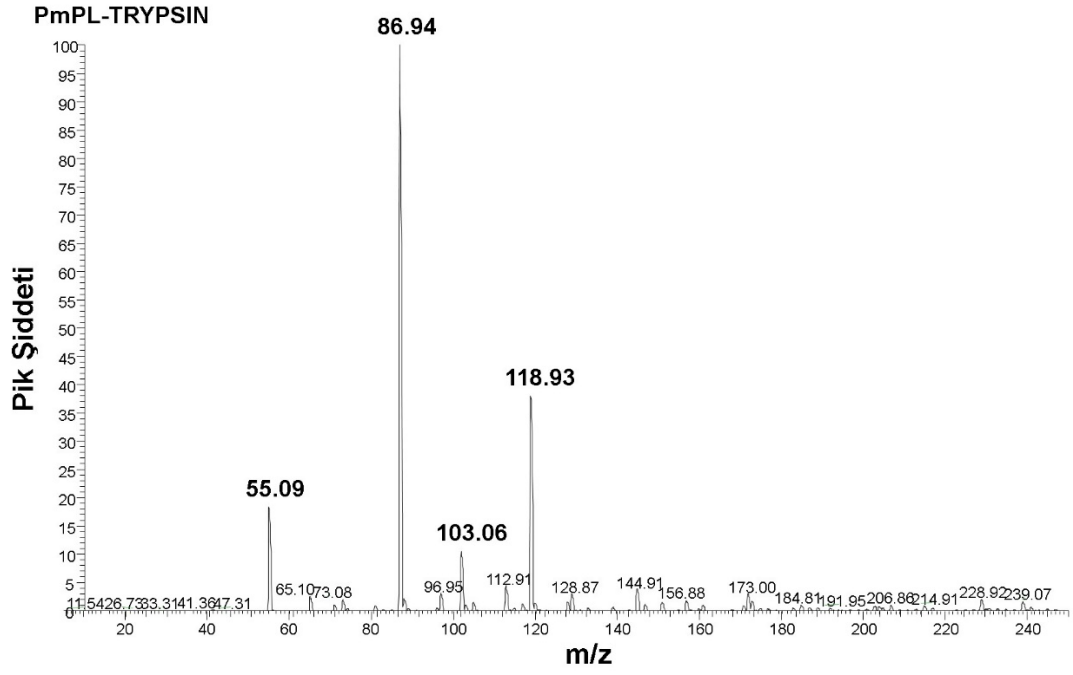
Bozunma sürecinde polimer yapısından uzaklaşarak çözeltiliye karışan polimer bazlı fragmanların (monomerik, dimerik vs.) yapısının belirlenmesi bozunma mekanizması hakkında bilgi verebilir. Bu amaçla, bozunma ortamından alınan çözeltilerin LC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.13, tampon varlığında yürütülen bozunma ortamından alınan örneğin LC-MS analizini göstermektedir. İrili ufaklı birçok sinyal

gözlenmesine rağmen en şiddetli 4 sinyalin yorumlanması bile bozunma mekanizmasına ışık tutması açısından önemlidir. Elde edilen kütle spektrumları negatif iyon modunda alındığından her sinyal mevcut molekülün bir hidrojen kaybetmiş halini,  $[M-H]^-$  yansıtmaktadır. Hatırlanacağı gibi, poli(2-metil propiyolakton)'un tekrarlayan biriminin kütlesi 86 Da dur. 55.16 Da luk sinyal monomerik biriminde parçalanması ile oluşmuş ikincil hatta üçüncül bir moleküle aittir. 87.01 Da da ortaya çıkan sinyal monomerik birim diyebileceğimiz molekül kütlesi 88 Da olan 2-metil propanoik asite yorulmuştur. Bulunurluğu en fazla olan bu sinyal biyobozunmanın monomerik birime kadar ilerlemesinin en önemli kanıtıdır. 118.93 Da gözlenen sinyal molekül kütlesi 120 Da olan 2, 3-dihidroksi-2-metil propanoik asit molekülüne karşılık gelmektedir. 172.93 Da da gözlenen sinyal dimer yapısındaki anyon moleküle yorulmuştur. Bu sinyaller her üç biyobozunma ortamı için kaydedilen kütle spektrumlarında (Şekil 4.13, 4.14, 4.15) da gözlenmiştir.

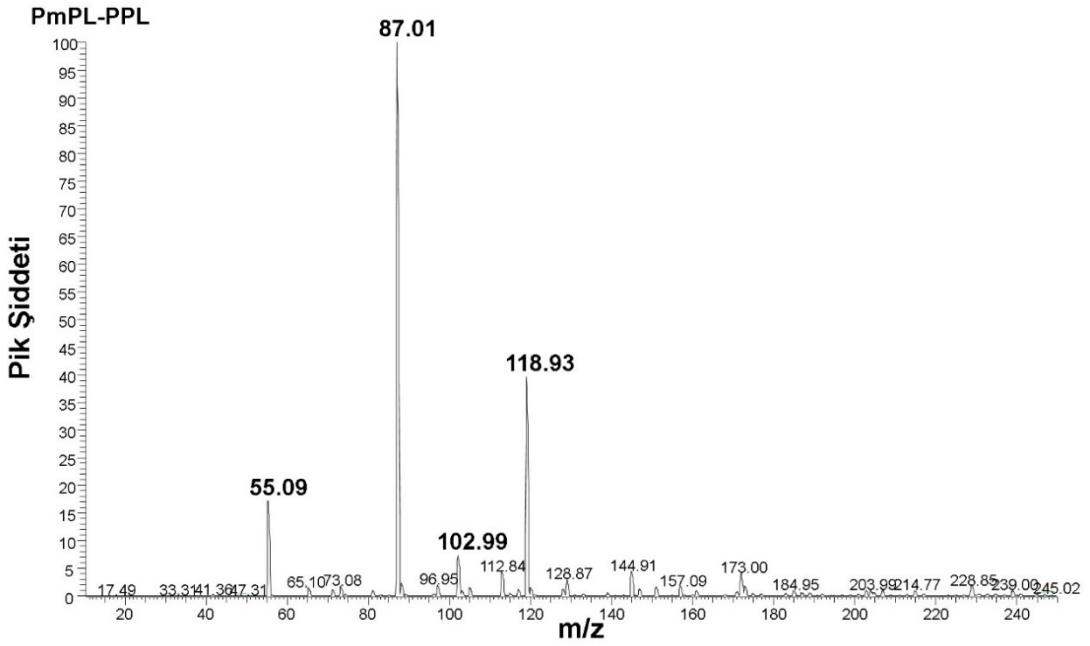


Şekil 4. 13 PBS tamponu ortamından alınan kalıntıların LC-MS spektrumları





**Şekil 4. 14** PBS tamponu+tripsin ortamından alınan kalıntıların LC-MS spektrumları

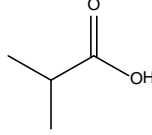
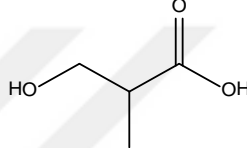
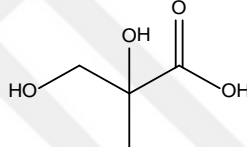
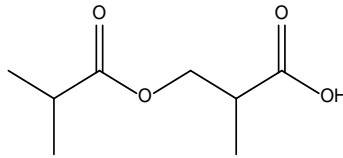


**Şekil 4. 15** PBS tamponu+pankreatik lipaz ortamından alınan kalıntıların LC-MS spektrumları

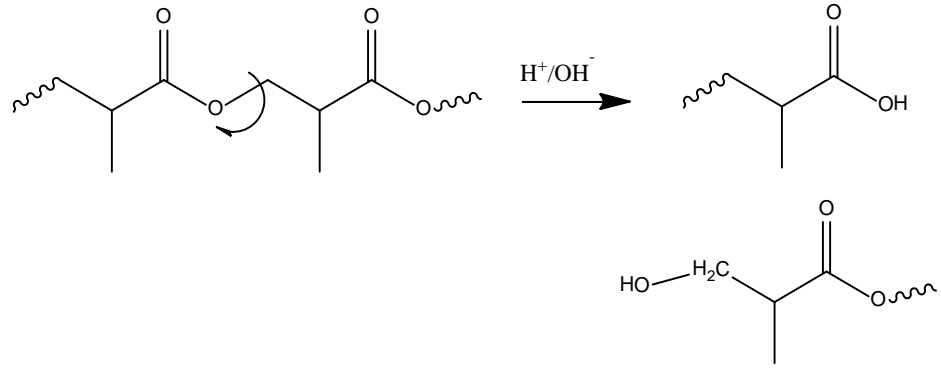
Bahsi geçen yapılar Tablo. 4.1 de verilmiştir. Enzimatik biyobozunma ortamından alınan örneklerde yapılan kütle spektrometrisi incelemelerinde yukarıda bahsi geçen sinyaller dışında yaklaşık 103 Da da ortaya çıkan sinyal ise 3-hidroksi-2-metil

propanoik asite yorulmuştur. . Kısaca, LC-MS analizi, tüm ortamlardaki PmPL filmlerinin, 2-metil propiyonik aside, bunun dimer ve türevlerine bozulduğunu ortaya çıkarmıştır.

**Çizelge 4. 1** LC-MS analizi dikkate alınarak önerilen yapılar

Ortam	Sinyal (Da)	Kimyasal yapı
Tampon, tripsin ve pankreas lipazı	87	
Tripsin ve pankreas lipazı	103	
Tampon, tripsin ve pankreas lipaz	119	
Tampon	173	

Önerilen yapılara göz atıldığında karboksilik asit fonksiyonel grubu her molekülde mevcuttur. Moleküllerin diğer ucunda ise alkol yapıları mevcuttur. Poliesterlerin biyobozunma ürünü olarak hidroksi karboksilik asitlerin ortaya çıktığı literatürde pek çok örneği olan Kasuya ve ark., (1994) Kasuya ve ark., (1995) Hoshino ve Isono, (2002) Abe ve ark., (1995) Höglund ve ark., (2007) Tomasi ve ark., (1996) bir durumdur. Bu çalışmaların bazılarında Kasuya ve ark., (1994) Kasuya ve ark., (1995), bozunma mekanizması olarak da ester bağının hidrolitik olarak parçalanması (hidrolizi) ve monomerik ve dimerik hidroksi karboksilik asitlerin oluşumu ortaya atılmıştır. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular da bu mekanizmayı doğrular niteliktedir. Şekil 4.16 da en temel hali ile önerilen mekanizma verilmiştir.



**Şekil 4. 16** Poli(2-metil propiyolaktón)’un hidrolitik bozunması esnasında birincil olarak meydana gelen reaksiyonun mekanizması

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışmasının amacı, metakrilik asitin başlangıç maddesi olarak kullanılmasıyla poli(2-metil propiyolakton) polimerinin sentezlenmesi, yapısal ve termal olarak karakterize edilmesi ve son olarak da tampon ortamında ve farklı enzimler varlığında bozunurluğunun incelenmesiydi.

İlk aşamada, metakrilik asitin bromlanması yüksek verimle gerçekleştirildi. Oluşan ürün olan 3-brom-2-metil propiyonik asitin kırılma indisi ölçümü, FTIR spektrumu ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumu ürünün son derece yüksek saflıkta olduğu yönündeydi. 3-brom-2-metil propiyonik asitin halka kapanması reaksiyonu ile 2-metil propiyolakton eldesi ikinci sentez basamağı olarak gerçekleştirildi. %15 verimle elde edilen ürünün kırılma indisi ölçümü, FTIR ve <sup>1</sup>H-NMR analizi yapıyı tamamen doğrulamaktadır. poli(2-metil propiyolakton) sentezi ise, 2-metil propiyolaktonun anyonik halka açılması polimerizasyonu ile literatürdeki mevcut sentez yöntemleri (Hmamouchi ve Prud'homme, 1988; Jin ve Gross, 1996) temel alınarak sağlandı. Kullanılan monomer miktarı baz alındığında yüksek verimde PmPL elde edilmesine rağmen ortalama mol kütesinin 2500-3000 g/mol aralığında olduğu tesbit edilmiştir. Sentez parametreleri değiştirilerek birkaç deneme yapılmasına rağmen daha yüksek mol kütesine ulaşılamamıştır. Bunun nedeni veya nedenleri olarak monomerde kalabilecek eser miktardaki safsızlık, polimerizasyonun anyonik olmasından kaynaklı son derece inert atmosfer gerektirmesi ve polimerizasyon esnasındaki istenmeyen yan reaksiyonlar (moleküliçi transesterleşme ve monomere zincir transferi) görülmektedir. Birçok uygulama için elde edilen polimerin mol kütlesi yeterli değildir. Ancak, biyobozunurluk çalışması için sorun teşkil etmemektedir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasını oluşturan biyobozunma testi PBS (pH 7.4) ortamında, trypsin varlığında ve pankreatik lipaz varlığında olmak üzere üç farklı ortamda 37 °C de ikili tekrar şeklinde 5 hafta sürdürülmüştür. Bozunma kinetiği hakkında bilgi almak için belli aralıklarla ortamdaki uzaklaştırılıp yıkanan örnekler kurutularak kütle kaybı incelenmiştir. Her üç ortamda da polimer örneklerinin kütleleri ilk aşamada hızlı daha sonra yavaşlayarak azalmaya devam etmiş ve 5 hafta sonunda %70'e varan kütle kaybı belirlenmiştir. İlk aşamalarda yüksek hızda kütle kaybı polimerin yarı kristal özelliği (Doi ve ark., 1992) ile ilişkilendirilmiştir. Kütle

kaybının enzim içeren örneklerde kütle kaybının tampon ortamındaki örneklerle göre fazla olması enzimlerin bozunmaya katalitik etkisini ortaya koymaktadır.

Biyobozunma sonucunda oluşan ürünlerin belirlenmesi ve dolayısıyla bozunma mekanizması hakkında bilgi sahibi olmak için bozunma ortamından alınan örneklerin LC-MS analizi yürütülmüştür. Her üç ortam için elde edilen LC-MS spektrumları büyük ölçüde örtüşmektedir. Monomer ve dimer düzeyindeki hidroksi asitlerin varlığı (87, 119, 173 Da) her üç ortamdaki bozunmanın da ester hidrolizi mekanizması ile yürüdüğünü göstermektedir.

Sentezlenen ve karakterize edilen PmPL örneklerinin hidrolitik ve iki farklı enzim varlığında biyodegradasyonunun incelenmesi tez çalışmanın yenilikçi yönüdür. Bu kapsamda, PmPL'nin hidrolitik ve enzimatik olarak biyobozunurluğunun saptanması, lipaz ve tripsin enzimlerinin bozunurluğu katalizlediği, bozunma ürünlerinin monomerik ve dimerik hidroksi asitler olduğu, bozunmanın ester bağının hidrolizi üzerinden yürüdüğü tez çalışmasının en önemli sonuçlarıdır.

Her ne kadar çıkış maddesinin ucuzluğu ve nispeten az basamakta sentezlense de PmPL günlük hayatta kullanım için maliyeti yüksek bir malzeme olacaktır. Biyomedikal uygulamalarda yer bulabilmesi için ise, gelecekte PmPL'un sitotoksosite, genotoksosite testleri, hücre tutma (adsorpsiyon) özellikleri vb. birçok biyolojik testleri yapılarak biyomalzeme olarak kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapılabilir. Bu testlerden de olumlu sonuçlar alınması durumunda, PmPL mevcut polimerlere alternatif olacak yeni bir polimerik malzeme olarak tanımlanabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abe, H., Doi, Y., Aoki, H., Akehata, T., Hori, Y., & Yamaguchi, A. (1995). Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric and 6-hydroxyhexanoic acids. *Macromolecules*, 28, 7630-7637.
- Abou-Zeid, D. M., Müller, R. J., & Deckwer, W. D. (2001). Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *Journal of Biotechnology*, 86, 113-126.
- Ajioka, I., Enomoto, K., Suzuki, K., & Yamaguchi, A. (1995). The basic properties of poly(lactic acid) produced by the direct condensation polymerization of lactic acid. *Journal of environmental polymer degradation*, 3, 225–234.
- Albertsson, A. C., Varma, I. K., Lochab, B., Wistrand, A. F., & Kumar, K. (2010). Design and synthesis of different types of poly(lactic acid): Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications, Editörler: Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. E. M., Tsuji H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 43.
- Anonim, (2018). Biyobozunur Polimerler. IHS Markit Kimya Ekonomisi El Kitabı. <https://ihsmarkit.com/products/biodegradable-polymers-chemical-economics-handbook.html> (Erişim tarihi: 12.01.2019)
- Augusta, J., Müller, R.J., & Widdecke, H. (1993). A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 673-638.
- Brandl, H., Bachofen, R., Mayer, J., & Wintermantel, E. (1995). Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:143-153.
- Breslin, V.T. (1993). Degradation of starch–plastic composites in a municipal solid waste landfill. *Journal Of Environmental Polymer Degradation*, 1, 127–41.
- Chandra, R. & Rustgi, R. (1998). Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science*, 7, 1273-1335.
- Coulembier, O., Degée, Ph., Hedrick, J. L., & Dubois, Ph. (2006). From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(b-malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science*, 31, 723–747.
- Cutright, D. E., Hunsuck, E. E., Beasley, J. D., & Oral, J. (1971). Fracture reduction using a biodegradable material, polylactic acid. *Surgery*, 29, 393–397.
- Çolak, A. (2001). Pseudomonas izolatlarının çeşitli polihidroksialkanoatları biyoparçalama yeteneklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
- Doi, Y., Kumagai, Y., Tanahashi, N., & Mukai, K. (1992) Biodegradable polymers and plastics: Structural effects on biodegradation of microbial and synthetic poly(hydroxyalkanoates), Editörler: Vert, M., Feijen, J., Albertsson, A., Scott, G., Chiellini, E., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (139-148).

- Dorgan, J. R., Jansen, J., & Clayton, M. P. (2005). Melt *rheology* of variable L-content poly(lactic acid). *Journal Of Rheology*, 49, 607–619.
- Ender Erdik, (2010). Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Kitabevi, Ankara.
- Erlandsson, B., Karlsson, S., & Albertsson, A. C. (1997). The mode of action of corn starch and aprooxidant systemin LDPE: influence of thermooxidation and UV-irradiation on the molecular weight changes. *Polymer Degradation and Stability*, 55, 237–45.
- Ersöz, A. (2010). Aletli Analiz Kitabı. <http://kitap.okur-yazar.net/e-kitap/aof/KIM201U-aletli-analiz.pdf> (Erişim tarihi: 18.12.2018)
- Evans, J.D., & Sikdar, S.K., (1990). Biodegradable plastics: an idea whose time has come?. *Chemical Technology*, 20, 38-42.
- Fukuzaki, H., Yoshida, M., & Asano, & M., Kumakura M. (1989). Synthesis of copoly(D,L- lactic acid) with relatively low molecular weight and in vitro degradation. *European Polymer Journal*, 25, 1019–1026.
- Galvin, T.J. (1990). Degradable materials: Perspectives, issues and opportunities: PHBV biodegradable polyester, Editörler: Barenberg, S.A., Brash, J.L., Narayan, R., Redpath, A.E., CRC Press, Boca Raton, FL, (39-55).
- Gerngross, T.U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A. I., & Peoples, O. P. (1993). Immunocytochemical analysis of poly-P-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenese Ulrophus* H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *Journal of Bacteriology*, 176(16), 5289-5293.
- Ghanbarzadeh, B., & Almasi, H., (2013). Biodegradable Polymers. *IntechOpen*, doi: 10.5772/56230.
- Gilmore, D., Fuller, R. C., & Lenz, R. (1990). Degradable materials: Perspectives, issues and opportunities: Biodegradation of poly(beta-hydroxyalkanoates), Editörler: Barenberg, S. A., Brash, J. L., Narayan, R., Redpath, A. E., CRC Press, Boca Raton, FL., (481-515).
- Guillet, J.E., Huber, H.X., & Scott, J. (1992). Biodegradable polymers and plastics: Studies of the biodegradation of synthetic plastics, Editörler: Vert, M., Feijen, J., Albertsson, A., Scott, G., Chiellini, E., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (55-70).
- Hankermeyer, C. R., & Tjeerdema, R. S. (1999) Polyhydroxybutyrate: Plastic made and degraded by microorganisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 159, 1-24.
- Hazer, B. (2011) Biyobozunur Plastik Ambalaj Malzemeleri. <http://bioplastr.com/BIOPLASTICS.pdf> (Erişim tarihi: 02.01.2019)
- Hiltunen, K., Härkönen, M., Seppälä, J. V., & Väänänen, T. (1996). *Macromolecules*, 29, 8677–8682.
- Hmamouchi, M., & Prudhomme, R. .E. (1988). Synthesis and polymerization of racemic and optically active substituted  $\beta$ -propiolactones V.  $\alpha$ - methyl- $\beta$ -

- propiolactone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 26, 1593-1607.
- Hoffmann, J., Reznicekova I., Vanokova, S., & Kupec, J. (1997). Manometric determination of biological degradability of substances poorly soluble in aqueous environments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39, 327–32.
- Hoshino, A., & Isono, Y. (2002). Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. *Biodegradation*, 13(2), 141-147.
- Höglund, A., Hakkarainen, M., & Albertsson, A. (2007). Degradation profile of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-the Influence of macroscopic and macromolecular biomaterial design. *Journal of Macromolecular Science*, 44, 1041-1046.
- Itavaara, M., & Vikman, M. (1995). A simple screening test for studying the biodegradability of insoluble polymers. *Chemosphere*, 31, 4359–73.
- Ikada, Y., & Tsuji, H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and ecological Applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 117-132.
- Itavaara, M., & Vikman, M. (1995). A simple screening test for studying the biodegradability of insoluble polymers. *Chemosphere*, 31, 4359–73.
- Iwata, T., Abe, H., & Kikkawa, Y. (2010). Enzymatic degradation: Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications, Editörler: Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. E. M., Tsuji, H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 383.
- Jiang, Xue., Luo, Y., Tian, X., Huang, D., Reddy, N., & Yang, Y. (2010). Chemical structure of poly(lactic acid): Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications, Editörler: Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. E. M., Tsuji, H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 69.
- Jin, X., & Gross, R.A. 1996). Chemoenzymatic synthesis and study of poly( $\alpha$ -methyl- $\beta$ -propiolactone) stereocopolymers. *Macromolecules*, 29(13), 4582-4590.
- Kasuya, K., Doi, Y., & Yao, T. (1994). Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *comamonas testosteroni* ATSU of soil bacterium. *Polymer Degradation and Stability*, 45, 379-386.
- Kasuya, K., Inoue, Y., Yamada, K., & Doi, Y. (1995). Kinetics of surface hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHB depolymerase from *alcaligenes faecalis* T1. *Polymer Degradation and Stability*, 48, 167-174.
- Kikkawa, Y., Abe, H., Iwata, T., Inoue, Y., & Doi, Y. (2002). Crystal morphologies and enzymatic degradation of melt-crystallized thin films of random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids. *Polymer Degradation and Stability*, 76, 467–78.




- Kumagai, Y., & Doi, Y. (1992). Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly(3-hydroxybutyrate) with enzymatically active polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 37, 253-256.
- Kulkarni, R. K., Pani, K. C., Neuman, C., & Leonard, F. (1966). Polylactic acid for surgical implants. *Archives of Surgery*, 93, 839–843.
- Lecomte, P., & Jerome, C. (2012). Recent Developments in Ring-Opening Polymerization of Lactones. *Advanced Computer Simulation Approaches For Soft Matter Sciences I*, 245, 173–218.
- Lee, S.Y., (1996a). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 45, 431-438.
- Lee, S. Y. (1996b). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 1-14.
- Lee, S.Y., & Chang, H.N. (1996). Characteristics of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 782,133-142.
- Lim, L. & T., Auras, R., & Rubino, M. (2008). *Progress in Polymer Science*, 33, 820–852.
- Luzier, WD. (1992). Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 839-842.
- Mecerreyes, D., Jerome, R., & Dubois, P. (1999). Novel Macromolecular Architectures Based on Aliphatic Polyesters: Relevance of the "Coordination-Insertion" Ring-Opening Polymerization. *Advances in Polymer Science*, 147, 1-59.
- Mohammed, H., & Prudhomme, R.E. (1988). Synthesis and polymerization of racemic and optically active substituted  $\beta$ -propiolactones V.  $\alpha$ -methyl- $\beta$ -propiolactone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 26(9), 1593-1607.
- Moon, S. I., Lee, C.W., Taniguchi, I., Miyamoto, M., & Kimura, Y. (2001). Melt/solid polycondensation of l-lactic acid: an alternative route to poly(l-lactic acid) with high molecular weight. *Polymer –London-*, 42(11), 5059–5062.
- Nishida, H., & Tokiwa, Y. (1993). Effects of higher-order structure of poly(3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(1), 65-80.
- Obuchi, S., & Ogawa, S. (2010). Packaging and other commercial applications: Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications, Editörler: Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. E. M., Tsuji, H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 457.

- Penczek, S., Cypryk, M., Duda, A., Kubisa, P., & Slomkowski, S. (2007). Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Progress in Polymer Science*, 32, 247–282.
- Reeve, M. S., McCarthy, S. P., Downey M. J., & Gross R. A. (1994). Polylactide stereochemistry: effect on enzymic degradability. *Macromolecules*, 27, 825–831.
- Richterich, K., Berger, H., & Steber, J. (1998). The 'twophase closed bottle test' a suitable method for the determination of 'ready biodegradability' of poorly soluble compounds. *Chemosphere*, 37, 319–26.
- Santerre, J. P., Woodhouse, K., Laroche, G., & Labow, R. S. (2005). Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26, 7457-7470.
- Savenkova, L., Gerberga Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I., & Kalnin, M. (2000). Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry*, 35, 573–579.
- Scott, G. (1990). Degradable Materials: Perspectives, issues and opportunities: Photo-biodegradation of plastics, Editörler: Barenberg, S.A., Brash, J.L., Narayan, R., Redpath, A.E., CRC Press, Boca Raton, FL., (143-178).
- Sharabi, N. E., & von Bartha, R. (1993). Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1201–5.
- Skoog, D.A., Holler, F. J. & Crouch S.R. (2007). Principles of Instrumental Analysis. Thomson, Brooks/Cole, 6th edition, Belmont CA, 894-900.
- Södergard, A., & Stolt, M. (2002) Properties of Lactic acid polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 27, 1123–1163.
- Suzuki, S., & Ikada, Y. (2010). Medical applications: Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications, Editörler: Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. E. M., Tsuji, H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 445.
- Staal, B. (2005). Characterization of (co)polymers by MALDI-MS-TOF. PhD thesis, Technische Universiteit Eindhoven, Polymer Analysis, Eindhoven, Chapter 1, Page (15-31).
- Szwarc, M. (1956). Living polymers. *Nature*, 178, 1168–1169.
- Tanaka, K., Ishizaki, A., Kanamaru, T., & Kawano, T. (1995). Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes e utrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 268-275.
- Tokiwa, Y., & Calabria, B. P. (2004). Degradation of microbial polyesters. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*, 26, 1181-1189.
- Tomasi, G., Scandola, M., Briese, B., H., & Jendrossek, D. (1996). Enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) by a depolymerase from *pseudomonas lemoignei*. *Macromolecules*, 29, 507-513.

- Tsuji, H., & Suzuyoshi, K. (2002). Environmental degradation of biodegradable polyesters Poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(l-lactide) films in controlled static seawater. *Polymer Degradation and Stability*, 75(2), 347–55.
- Tsuji, H., (2010). Hydrolytic degradation: Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications, Editörler: Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. E. M., Tsuji, H., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 345.
- Vert, M. (2005). Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. *Biomacromolecules*, 6, 538-546.
- Yıldız, A., Genç, Ö. & Bektaş, S. (1997). Enstrümantal analiz yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayını, Ankara, 480 s.
- Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., & Bertelsen, G. (2002). Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Additives And Contaminants*, 19, 172–177.
- Williams, D. F. (1981). Enzymic Hydrolysis of Polylactic Acid. *Engineering in Medicine*, 10, 5–7.
- Williams, S.F., & Peoples, O.P. (1996). Biodegradable plastics from plants. *Chemtech*, 38, 38-44.
- Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W. D., & Muller, R. J. (2001). Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*, 44, 289–99.
- Xu, J., & Gross, R. A. (1996). Chemoenzymatic synthesis and study of poly( $\alpha$ -methyl- $\beta$ -propiolactone) stereocopolymers, *Macromolecules*, 29(13), 4582-4590.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Anıl UZUNLAR
Doğum Yeri	Merkez/ORDU
Doğum Tarihi	16.04.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05377605229
E-Posta Adresi	aniluzunlarordu@gmail.com
	
<b>Lisans</b>	
Üniversite	Kocaeli Üniversitesi
Fakülte	Eğitim Fakültesi
Bölümü	Fen Bilgisi
Mezuniyet Yılı	29.08.2012
<b>Yüksek Lisans</b>	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	
Mezuniyet Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
<b>Doktora</b>	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı
Programı	Program Adı
Mezuniyet Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
<b>Yayınlar</b>	
Çatiker, Efsan. Ve Uzunlar, Anıl., "Synthesis, Characterization And Biodegradation Of Poly(a-Methyl b-Propiolactone), Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 46 (3) 435-443, (2018).	