

**YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İÇİN  
İMMOBİLİZE ENZİM REAKTÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE  
KİNETİK KARAKTERİZASYONU**

**DEVELOPMENT AND KINETIC CHARACTERIZATION OF  
IMMOBILIZED ENZYME REACTORS FOR HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**BEKİR ÇELEBİ**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

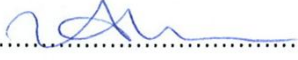
2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda**

**DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

: 

Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye (Danışman)

: 

Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

Üye

: 

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye

: 

Doç.Dr. Nihal AYDOĞAN

Üye

: 

Yard. Doç. Dr. İsmail Cengiz Koçum

ONAY

Bu tez ...../...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İÇİN İMMOBİLİZE ENZİM REAKTÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KİNETİK KARAKTERİZASYONU

**BEKİR ÇELEBİ**

## **ÖZ**

Tez kapsamında yüksek performanslı sıvı kromatografisi için immobilize enzim reaktörleri (Immobilized Enzyme Reactor, IMER) kolay bağlanma ve glutaraldehit aktivasyonu yöntemleri ile geliştirilmiş ve elde edilen kolonların kinetik karakterizasyonu yapılmıştır. IMER sentezleri partikül bazlı ve monolitik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilirken yüzey alanı ölçümleri BET sisteminde, morfolojik yapı taramalı elektron mikroskopunda (SEM), gözeneklilik civa porosimetrede incelenmiş; kromatografik çalışmalar partikül bazlı kolonlar için sırasıyla HPLC ve  $\mu$ HPLC sistemlerinde, monolitik kolonlar için yalnızca  $\mu$ HPLC sisteminde yapılmıştır. Kinetik verilerin Michaelis-Menten modeli ile uyumu incelenmiş ve kinetik parametreler model yardımı ile bulunmuştur.

Partikül bazlı immobilize enzim reaktörü (IMER), yüksek performanslı sıvı kromatografisi için  $\alpha$ -kemotripsin enziminin monodispers makrogözenekli poli(2,3-dihidroksi propil metakrilat etilen dimetakrilat), poli(DHPM-EDM) partiküllere kolay bağlanma yöntemi ile bağlanmasıyla elde edilmiştir.  $\alpha$ -kemotripsin immobilize partiküller daha sonra paslanmaz çelik HPLC kolonlarına (50x4.6 mm ID) yüksek basınç altında doldurulurarak IMER elde edilmiştir. Kolonun kinetik davranışı HPLC sisteminde mobil faz akış hızı, substrat beslenme konsantrasyonu ve sıcaklık değiştirilerek incelenmiş, bunun yanında tekrarlanabilirlik davranışı belirlenmiştir. Takip eden bölümde, monodispers-makrogözenekli formda poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(GMA-EDM) partiküllere glutaraldehit aktivasyonu ile  $\alpha$ -kemotripsin enzimi kovalent olarak bağlanmıştır.  $\alpha$ -kemotripsin immobilize partiküller paslanmaz çelik  $\mu$ HPLC kolonlarına (100x1.0 mm ID) yüksek basınç altında doldurulurak elde edilen IMER'in kinetik davranışı  $\mu$ HPLC sisteminde aynı değişkenler değiştirilerek incelenmiştir.

Kapiler monolitik formda immobilize enzim reaktörleri,  $\alpha$ -kemotripsin'in poli(GMA-EDM) monolite glutaraldehit aktivasyonu ile kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilmiştir. Bu amaçla epoksi grubu içeren monolitik kolon (200 mm, 530  $\mu$ m ID), amonyak çözeltisi ile etkleştirilerek, monolit yüzeyine primer amin grupları bağlanmıştır. Amin gruplu monolitik yapının glutaraldehit ile aktivasyonunun ardından  $\alpha$ -kemotripsin enziminin monolite kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Kapiler formda, monolitik immobilize enzim reaktörü ( $\mu$ HPLC-IMER), aynı zamanda  $\alpha$ -kemotripsin enziminin poliDHPM-EDM) monolite kolay bağlanma yöntemi ile bağlanması ile elde edilmiştir. Her iki formdaki IMER'ın kinetik davranışı  $\mu$ HPLC yardımı ile mobil faz akış hızı, substrat beslenme konsantrasyonu ve sıcaklık değiştirilerek incelenmiştir. Elde edilen partikül bazlı ve monolitik IMER'ların kinetik davranışları karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve kütle aktarım özellikleri tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Immobilize enzim reaktörleri (IMER), Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC,  $\mu$ HPLC), Kolay bağlanma (Click chemistry), Glutaraldehit aktivasyonu, BET, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Civa porosimetre, Michaelis-Menten modeli, Monolitik kolon, Partikül bazlı kolon

# DEVELOPMENT AND KINETIC CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED ENZYME REACTORS FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

BEKİR ÇELEBİ

## ABSTRACT

In the scope of thesis, immobilized enzyme reactors (IMER) were developed for high performance liquid chromatography by using the methods of click chemistry and glutaraldehyde activation. Moreover, obtained columns were characterized kinetically. IMER synthesis were made in two ways which based on particles and monolith. The surface areas were measured by using BET system, morphological structures were observed by using scanning electron microscope (SEM) and the porosity was determined by using mercury porosimeter. Furthermore, the chromatographic studies were conducted in both HPLC and  $\mu$ HPLC systems for the particle based columns and in only  $\mu$ HPLC for the monolithic columns. In addition, the consistency of kinetic data to Michaelis-Menten model was analyzed and the kinetic parameters were obtained by the help of this model.

Particle based immobilized enzyme reactor (IMER) was developed by the attachment of  $\alpha$ -chymotrypsin to monodisperse-macroporous poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate ethylene dimethacrylate), poly(DHPM-EDM) particles, using the method of click chemistry. Then, stainless-steel HPLC columns (50x4.6 mm ID) were packed with  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized particles under high pressure. The kinetic behavior of column was analyzed in HPLC system by changing the variables of mobile phase flow rate, substrate feed concentration and temperature. In addition to this, the reproducibility was tested. In the following part,  $\alpha$ -chymotrypsin was covalently attached to monodisperse-macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-dimethacrylate), poly(GMA-EDM) particles via glutaraldehyde activation. Then, stainless-steel  $\mu$ HPLC columns (100x1.0 mm ID) were packed with  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized particles under high pressure. The kinetic behavior was analyzed in  $\mu$ HPLC system by changing the same variables.

Immobilized enzyme reactor in the capillary monolithic form,  $\alpha$ -chymotrypsin was covalently attached onto the poly(GMA-EDM) based monolithic structure via

glutaraldehyde activation. For this purpose, monolithic column including epoxy group (200 mm, 530  $\mu\text{m}$  ID) was interacted with ammonia solution and the primary amine groups were attached to the monolithic surface. Following to glutaraldehyde activation of monolithic structure including amine groups,  $\alpha$ -chymotrypsin was covalently linked. The capillary monolithic immobilized enzyme reactor ( $\mu\text{HPLC}$ -IMER) was also obtained by the attachment of  $\alpha$ -chymotrypsin onto the poly (DHPEM-EDM) monolith via click chemistry. The kinetic behavior of IMER in both forms was determined in  $\mu\text{HPLC}$  by changing the variables of mobile phase flow rate, substrate feed concentration and temperature. The kinetic behaviors of the particle and monolith based IMERs were determined and their mass transfer properties were described.

**KEY WORDS:** Immobilized enzyme reactor (IMER), High Performance Liquid Chromatography ( $\mu\text{HPLC}$  -HPLC), Click chemistry, Glutaraldehyde activation, BET, Scanning Electron Microscopy (SEM), Mercury porosimeter, Michaelis-Menten model, Particle based column, Monolithic column

## TEŞEKKÜR

*Yurt içi doktora bursu sağlayarak akademik çalışmalarımı sürdürmeme imkan sağlayan TÜBİTAK BİLİM İNSANI DESTEKLEME DAİRESİ BAŞKANLIĞI'na,  
Tez konusunun seçilmesinde, yönlendirilmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde büyük desteğini gördüğüm, karşılaştığım her türlü zorlukta zekası, bilgisi, tecrübesi ve hoşgörüsü ile beni yalnız bırakmayan bana hem bilimsel hem de manevi açıdan destek olan değerli hocam Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e,  
Tez çalışmamın her aşamasında büyük yardımını gördüğüm anlayışı, uyumu ve mesai saatlerini aşan çalışma performansı ile bana uygun çalışma ortamı sağlayan değerli arkadaşım, kardeşim Araştırma Görevlisi Aslıhan Bayraktar'a,  
Disiplini ve çalışkanlığı ile bizleri de motive eden ve laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi arkadaşım Çiğdem Gölgelioğlu'na,  
Tez çalışmamda destek ve yardımlarını gördüğüm Dr. Berna Saraçoğlu ve Tuğba Arabacı'ya,  
Laboratuvarımızda sıcak bir hava tesis eden, tecrübelerinden istifade ettiğimiz hocalarımız Dr. Saba Samatya ve Dr. Selçuk Özcan'a,  
Aynı ortamda çalışma imkanı bulduğum laboratuvar arkadaşlarım Oğulcan Evirgen, Selin Sağlam ve Bilginur Maraş'a,  
Tez izleme komitelerinde katkıları ve yapıcı eleştirileri ile destek sağlayan Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu ve Doç. Dr. Nihal Aydoğan'a,  
Tezimi okuyup değerlendiren ve yapıcı eleştirileri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Zümriye Aksu, Prof. Dr. M. Ali Onur ve Yard. Doç. Dr. Cengiz Koçum'a,  
Bugüne kadar bana karşı desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme,  
Yıllardır yoğunluğuma sabreden, çalışmalarımdaya en büyük destekçim olan eşime ve oğluma,  
En içten teşekkürlerimi sunarım.*

**BEKİR ÇELEBİ**

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Partikül Sentezi.....	6
2.1.1 Dispersiyon polimerizasyonu .....	6
2.1.2 Monodispers gözenekli partiküllerin eldesi ve çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemleri .....	7
2.2 Monolitik Kolon Sentezi .....	10
2.2.1 Monolitik kolonların geliştirilme süreci .....	10
2.2.2 Monolitik kolonların partikül dolgulu kolonlarla kıyaslanması .....	11
2.2.3 Monolitik kolon türleri .....	12
2.2.3.1 Metakrilat bazlı monolitler .....	12
2.2.3.2 Polistiren bazlı monolitler .....	13
2.2.3.3 Poliakrilamid bazlı monolitler .....	13
2.2.4 Polimerik monolitlerin sentezi.....	14
2.2.4.1 Monolitik yapı ve polimerizasyon sıcaklığı .....	14
2.2.4.2 Gözenek yapıcı sistem .....	15
2.2.4.3 Yapının oluşumu.....	15
2.2.4.4 Gözenek özelliklerinin kontrolü .....	16
2.2.4.5 Fonksiyonel grupların bağlanması .....	16
2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	16
2.3.1 HPLC sistemleri .....	17
2.3.2 HPLC kullanım alanları .....	18
2.3.3 HPLC türleri .....	18
2.3.3.1 İyon değişim kromatografisi (Ion exchange chromatography, IEC) ..	19
2.3.3.2 Büyüklükçe ayırma kromatografisi (Size exclusion chromatography, SEC) .....	19



2.3.3.3	Normal faz kromatografisi (Normal phase chromatography, NPC) ....	19
2.3.3.4	Ters faz kromatografisi (Reversed phase chromatography, RPC).....	19
2.3.3.5	Afinite kromatografisi (Affinity chromatography, AC) .....	20
2.4	Mikro ve Nano-Sıvı Kromatografisi (Micro & Nano-Liquid Chromatography)	21
2.5	Enzim İmmobilizasyon Teknikleri.....	22
2.5.1	Fiziksel bağlanma yoluyla enzim immobilizasyonu .....	23
2.5.2	Fiziksel tutuklama yoluyla enzim immobilizasyonu .....	24
2.5.3	Kovalent bağlanma yolu ile enzim immobilizasyonu .....	25
2.5.3.1	Karbodiimid aktivasyonu.....	25
2.5.3.2	Siyonejen bromür aktivasyonu.....	26
2.5.3.3	Glutaraldehit aktivasyonu .....	26
2.5.3.4	Kolay bağlanma ile enzim immobilizasyonu .....	28
2.6	İmmobilize Enzim Reaktörleri .....	28
2.7	Kemotripsin Enzimi.....	31
2.7.1	$\alpha$ -kemotripsin yapısı ve protein hidrolizi .....	31
2.7.2	İmmobilize $\alpha$ -kemotripsin uygulama çalışmaları .....	33
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	34
3.1	Partikül Bazlı HPLC-İMER İçin Kolon Materyallerinin Üretimi.....	34
3.1.1	Partikül sentez yöntemi.....	34
3.1.1.1	Çıkış lateksinin üretimi.....	34
3.1.1.1.1	Materyal.....	34
3.1.1.1.2	Polimerizasyon yöntemi.....	34
3.1.1.1.3	Çıkış lateksinin karakterizasyonu .....	36
3.1.1.2	Poli(GMA-EDM) mikrokürelerin sentezi .....	36
3.1.1.2.1	Materyal.....	37
3.1.1.2.2	Poli(GMA-EDM) mikrokürelerin üretim yöntemi .....	37
3.1.1.2.3	Poli(GMA-EDM) partiküllerin yıkanması ve ekstraksiyonu.....	38

3.1.1.2.4 Poli(GMA-EDM) partiküllerin sülfürik asit ile hidrolizi .....	39
3.1.1.2.5 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin karakterizasyonu .....	40
3.1.2 Poli(DHPM-EDM) partiküllerine 'kolay bağlanma' yöntemi ile enzim immobilizasyonu .....	41
3.1.2.1 Poli(DHPM-EDM) partikül yüzeyinin klorlanması .....	41
3.1.2.2 Poli(DHPM-EDM) partiküllerine azid bağlanması .....	42
3.1.2.3 Diyaliz membranı aktifleştirme .....	42
3.1.2.4 $\alpha$ -Kemotripsin enzimine alkin fonksiyonel grubu bağlanması .....	43
3.1.2.5 Diyaliz işlemi .....	43
3.1.2.6 $\alpha$ -kemotripsin enziminin monodispers-gözenekli partiküllere "klik-bağlanma" ile bağlanması.....	44
3.1.3 Kromatografik çalışmalar .....	45
3.1.3.1 HPLC-IMER kolonlarının doldurulması .....	45
3.1.3.2 HPLC-IMER sistemi .....	46
3.1.3.3 Enzimatik reaksiyon analizleri.....	46
3.1.3.4 Kesikli reaktörde serbest enzim deneyleri .....	47
3.2 Monolitik $\mu$ HPLC-IMER için Kolon Materyallerinin Üretimi.....	48
3.2.1 Monolit Sentez Yöntemi .....	48
3.2.1.1 Materyal.....	48
3.2.1.2 Kapiler tüpün silanlanması.....	48
3.2.1.3 Monolit sentezi ve karakterizasyonu .....	49
3.2.2 Monolite glutaraldehit aktivasyonu ile enzim immobilizasyonu.....	49
3.2.2.1 Aminasyon İşlemi.....	49
3.2.2.2 Glutaraldehit aktivasyonu .....	50
3.2.2.3 Enzim immobilizasyonu .....	51
3.2.3 Monolite kolay bağlanma ile enzim immobilizasyonu.....	52
3.2.3.1 Monolitin sülfirik asit ile hidrolizi.....	52
3.2.3.2 Poli(DHPM-EDM) monolit yüzeyinde Cl grubu oluşturulması .....	52

3.2.3.3	Poli(DHPM-EDM) monolit yüzeyine azid bağlanması .....	53
3.2.3.4	Diyaliz membranı aktifleştirme .....	54
3.2.3.5	$\alpha$ -Kemotripsin enzimine alkin fonksiyonel grubu bağlanması .....	55
3.2.3.6	Kataliz işlemi.....	55
3.2.4	Kromatografik çalışmalar .....	56
3.2.4.1	$\mu$ HPLC-IMER sistemi.....	56
3.3	Partikül Bazlı $\mu$ HPLC-IMER için Kolon Materyallerinin Üretimi.....	57
3.3.1	Aminasyon reaksiyonu .....	57
3.3.2	Glutaraldehit aktivasyonu.....	57
3.3.3	Enzim immobilizasyonu .....	58
3.3.4	Kromatografik çalışmalar .....	59
3.3.4.1	$\mu$ HPLC-IMER kolonlarının doldurulması .....	59
3.3.4.2	$\mu$ HPLC-IMER sistemi.....	60
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	61
4.1.	Kolay bağlanma İle Partikül Bazlı HPLC-IMER Geliştirilmesi Ve Kinetik Karakterizasyonu.....	61
4.1.1	Poli(DHPM-EDM) partiküllerin karakterizasyonu.....	61
4.1.2	Kromatografik çalışmalar .....	64
4.1.2.1	Akış hızı etkisi.....	65
4.1.2.2	Substrat konsantrasyonu etkisi.....	68
4.1.2.3	Sıcaklık etkisi .....	73
4.1.2.4	HPLC-IMER tekrarlanabilirlik davranışı .....	75
4.1.2.5	HPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı .....	76
4.2	Glutaraldehit Aktivasyonu İle Monolitik $\mu$ HPLC-IMER Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu.....	77
4.2.1	Poli(GMA-EDM) monolitlerin karakterizasyonu .....	77
4.2.2	Kromatografik çalışmalar .....	78
4.2.2.1	Akış hızı etkisi.....	79

4.2.2.2	Substrat derişimi etkisi.....	84
4.2.2.3	Sıcaklık etkisi.....	87
4.2.2.4	$\mu$ HPLC-IMER tekrarlanabilirlik davranışı .....	90
4.2.2.5	$\mu$ HPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı .....	91
4.3	Kolay bağlanma Yöntemi İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu , Partikül Bazlı HPLC-IMER İle Kıyaslanması.....	93
4.3.1	Poli(DHPM-EDM) monolitlerinin karakterizasyonu.....	93
4.3.2	Kromatografik çalışmalar .....	94
4.3.2.1	Akış hızı etkisi.....	95
4.3.2.2	Substrat konsantrasyonu etkisi.....	99
4.3.2.3	Sıcaklık etkisi.....	103
4.3.2.4	$\mu$ HPLC-IMER stabilite davranışı ve tekrarlanabilirlik.....	106
4.3.2.5	$\mu$ HPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı .....	107
4.4	Glutaraldehit Aktivasyonu Yöntemi İle Partikül Bazlı $\mu$ HPLC-IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu, Monolitik $\mu$ HPLC-IMER İle Kıyaslanması .....	109
4.4.1	Poli(GMA-EDM) partiküllerinin karakterizasyonu .....	109
4.4.2	Kromatografik çalışmalar .....	110
4.4.2.1	Akış hızı etkisi.....	111
4.4.2.2	Subsrat konsantrasyonu etkisi.....	114
4.4.2.3	$\mu$ HPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı .....	118
4.5	İmmobilize Enzim Reaktörlerinin $\mu$ HPLC Ve HPLC Sistemlerinde İmmobilizasyon Türüne Göre Karşılaştırılması.....	120
4.5.1	Akış hızı .....	120
4.5.2	Substrat konsantrasyonu .....	121
4.5.3	Sıcaklık .....	124
4.5.4	Geri basınç - akış hızı davranışı .....	125
5.	SONUÇLAR.....	127

5.1	Kolay bağlanma (Kolay Bağlanma) İle Partikül Bazlı HPLC-IMER Geliştirilmesi Ve Kinetik Karakterizasyonu .....	127
5.2	Glutaraldehit Aktivasyonu İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu .....	128
5.3	Kolay bağlanma Yöntemi İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu, Partikül Bazlı HPLC-IMER İle Kıyaslanması .....	129
5.4	Glutaraldehit Aktivasyonu Yöntemi İle Partikül Bazlı $\mu$ HPLC-IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu, Monolitik $\mu$ HPLC-IMER İle Kıyaslanması .....	131
5.5	İmmobilize Enzim Reaktörlerinin $\mu$ HPLC Ve HPLC Sistemlerinde İmmobilizasyon Türüne Göre Karşılaştırılması.....	132

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Radikal oluşumu ve polimer zincirin büyümesi A: Terminal grup .....	12
Şekil 2.2 Stirenin polimerizasyonu (radical step-wise polymerization) (Quigley et al., 2003) .....	13
Şekil 2.3 Akrilamidin polimerizasyonu .....	14
Şekil 2.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminin şematik gösterimi (Guiochon et al., 2007).....	17
Şekil 2.5 Nano ve mikro-LC sisteminin şematik gösterimi (Bayraktar, 2009).....	21
Şekil 2.6. Glutaraldehit aktivasyon reaksiyonu .....	27
Şekil 2.7 Analitik kolon öncesi IMER uygulaması; 2. pompa ile enzimatik reaksiyon sonrası mobil fazın değiştirilmesi.....	29
Şekil 2.8 Analitik kolon sonrası IMER uygulaması.....	30
Şekil 2.9 HPLC-yabanturp peroksidaz immobilize cam karbon elektrodu ile asetil kolin analiz sistemi (kolon öncesi ve kolon sonrası uygulama beraber). .....	30
Şekil 2.10. $\alpha$ - kemotripsinin enziminin yapısında bulunan katalik üçlü yapı.....	32
Şekil 2.11. Kemotripsinin protein hidroliz basamakları (Mathews and Van Holde, Biochemistry, 2/e' den uyarlanmıştır.) .....	32
Şekil 3.1 Monodispers ve gözenekli partiküllerin sentezinin şematik gösterimi .....	36
Şekil 3.2 Monodispers gözenekli poli(GMA-EDM) partiküllerin asidik hidrolizi ile poli(2,3-dihidroksipropilmetakrilat-co-etilendimetakrilat), poli(DHPM-EDM) partiküllerin eldesi .....	40
Şekil 3.3 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin CPTMS ile reaksiyona girerek klorlanması 41	

Şekil 3.4 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin sodyum azid ile tepkimeye girip azidlenmesi .....	42
Şekil 3.5 $\alpha$ -Kemotripsin enzimine alkin bağlanması.....	43
Şekil 3.6 Diyaliz işlemi .....	44
Şekil 3.7 Enzim ve partikül arasında gerçekleşen klik reaksiyonu .....	45
Şekil 3.8. Poli (GMA-EDM) monolitinin aminasyon reaksiyonu.....	50
Şekil 3.9 Poli (GMA-EDM) monolitinin glutaraldehit aktivasyon reaksiyonu .....	50
Şekil 3.10 Enzimin Poli(GMA-EDM) monolitine glutaraldehit aktivasyonu ile immobilize edilmesi .....	51
Şekil 3.11 Poli(GMA-EDM) monolitinin sülfirik asit ile hidroliz reaksiyonu ve poli(DHPM-EDM) monolitinin elde edilmesi .....	52
Şekil 3.12 Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonunun kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS) ile reaksiyonu.....	53
Şekil 3.13 Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonun sodyum azid ile reaksiyonu .....	54
Şekil 3.14. Enzim - pentionik asit reaksiyonu.....	55
Şekil 3.15 Azid bağlı Poli(DHPM-EDM) monoliti ile alkin bağlı $\alpha$ -kemotripsin enzimi arasında gerçekleşen bakır katalizli klik reaksiyonu .....	56
Şekil 3.16 Poli(GMA-EDM) partiküllerin aminasyon reaksiyonu .....	57
Şekil 3.17 Poli(GMA-EDM) partiküllerin glutaraldehit aktivasyonu.....	58
Şekil 3.18 Partiküllere enzim immobilizasyonu .....	58
Şekil 4.1 Polistiren çıkış lateksinin boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafı.....	61
Şekil 4.2 Poli(DHPM-EDM) partiküllerinin morfolojisi ve boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafları, Büyütme: 891X .....	62

Şekil 4.3 Poli(DHPM-EDM) partiküllerinin morfolojisi yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları, Büyütme: 11300 X .....	62
Şekil 4.4 Civa porozimetre ile elde edilen poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait gözenek dağılım grafiği .....	63
Şekil 4.5 Serbest enzim için voltaj farkının BTEE başlangıç derişimi ile değişimi.....	64
Şekil 4.6. Poli(DHPM-EDM) partikülleri içeren kolonda farklı akış hızlarında dedektör voltaj değerinin zamanla değişimi. HPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 20 °C, Kolon boyutları: 50x4.6 mm ID. Akış hızı (mL/dakika) 1) 0.10, 2) 0.25, 3) 0.50, 4) 1.00 .....	65
Şekil 4.7 Poli (DHPM-EDM) partiküller için UV dedektördeki voltaj farkının akış hızı ile değişimi.....	66
Şekil 4.8 Poli (DHPM-EDM) partiküller için BTEE dönüşümünün akış hızı ile değişimi .....	67
Şekil 4.9 Poli(DHPM-EDM) partikülleri içeren kolonda farklı substrat besleme derişimlerinde elde edilen voltaj-zaman eğrileri. HPLC sistemi, Akış hızı 0,5 mL/dakika, Sıcaklık 20 °C, Kolon boyutları: 50x4.6 mm ID. BTEE derişimi (µM) : 1) 50, 2) 100, 3) 200, 4) 400, 5) 600.....	68
Şekil 4.10 Farklı BTEE besleme konsantrasyonlarına karşı elde edilen UV dedektör voltaj farkı değerleri. ....	69
Şekil 4.11 Farklı BTEE besleme derişimlerinde karşı elde edilen BTEE dönüşüm değerleri.....	70
Şekil 4.12 Kolay bağlanma yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi ( Michaelis-Menten grafiği). ....	71
Şekil 4.13 Kolay bağlanma yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat ile ilişkisinin Lineweaver-Burke grafiği.....	72



Şekil 4.14 Poli (DHPM-EDM) partikülleri içeren kolonda farklı sıcaklıklarda elde edilen voltaj-zaman eğrileri. HPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Akış hızı 0,5 mL/dakika, Kolon boyutları: 50x4.6 mm ID. Sıcaklık (°C): 1)15, 2) 20, 3) 25, 4) 30, 5) 35 .....	73
Şekil 4.15 Farklı sıcaklıklarda UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerlerinin değişimi .....	74
Şekil 4.16 BTEE dönüşümünün İMER sıcaklık değeri ile değişimi .....	74
Şekil 4.17 Ardışık kullanım ile BTEE dönüşümü.....	75
Şekil 4.18 HPLC-İMER reaktörü için geri basınç değerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. ....	76
Şekil 4.19 Poli(GMA-EDM) monolitlerin SEM fotoğrafı Büyütme 1) 450X 2) 2600X 3) 6000X 4) 12000X 5) 30000X 6) 50000X.....	77
Şekil 4.20 Civa porozimetresi ile elde edilen poli(GMA-EDM) monolitine ait gözenek dağılım grafiği .....	78
Şekil 4.21 Düşük akış hızlarında boş kolon ve monolitik M-GA kolonu için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Akış hızı (µL/dakika) A) 5, B) 10, C) 25, D) 40, E) 50, F) 70.....	79
Şekil 4.22 Yüksek akış hızlarında boş kolon ve monolitik M-GA kolonu için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Akış hızı (µL/dakika) A) 90,B) 100,C) 150, D) 200, E) 250. ....	80
Şekil 4.23 M-GA monolitik kolonunda elde edilen substrat dönüşüm eğrilerinin düşük akış hızları için karşılaştırmalı olarak gösterimi: µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Siyah: 5 µL/dakika, Turkuaz: 10 µL/dakika, Mavi:25 µL/dakika,Kırmızı: 40 µL/dakika, Kahverengi: 50 µL/dakika ,Yeşil : 70 µL/dakika.....	81

Şekil 4.24 M-GA monolitik kolonunda elde edilen substrat dönüşüm eğrilerinin yüksek akış hızları için karşılaştırmalı olarak gösterimi. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Mavi: 90 µL/dakika, Siyah:100 µL/dakika, Yeşil: 150 µL/dakika, Kahverengi: 200 µL/dakika , Kırmızı : 250 µL/dakika.....	82
Şekil 4.25 M-GA Monolitik kolon için UV dedektördeki voltaj farkının artan akış hızları ile değişimi.....	82
Şekil 4.26 M-GA monolitik kolon için yatışkın durum BTEE dönüşümünün akış hızı ile değişimi.....	83
Şekil 4.27 Farklı BTEE derişimlerinde boş kolon ve M-GA monolitik kolon için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. BTEE besleme derişimi (mM): A) 50, B) 100, C) 200, D) 400, E) 600.....	84
Şekil 4.28 M-GA monolitik kolon için farklı substrat besleme konsantrasyonlarında elde edilen substrat dönüşüm eğrilerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Kırmızı: 50 µM, Kahverengi: 100 µM, Yeşil: 200 µM, Mavi : 400 µM, Siyah: 600 µM Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID..	85
Şekil 4.29 Farklı BTEE besleme konsantrasyonlarına karşı elde edilen UV dedektör voltaj farkı değerleri .....	85
Şekil 4.30 Yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimi .....	86
Şekil 4.31 Glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi.....	87
Şekil 4.32 Farklı sıcaklık değerlerinde boş kolon ve dolu M-GA monolitik kolon için elde edilen sıvı kromatogramları. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. A) 15 °C, B) 20 °C, C) 25 °C, D) 30 °C, E) 35 °C.....	88

Şekil 4.33 M-GA monolitik kolon için farklı sıcaklıklarda elde edilen edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID .....	88
Şekil 4.34 Farklı sıcaklıklarda UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerlerinin değişimi .....	89
Şekil 4.35 Farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen BTEE dönüşümü değerleri.....	89
Şekil 4.36 Tekrar kullanım sonucu elde edilen kromatogramlar. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID .....	90
Şekil 4.37 Analizden analize farklı kullanımlar sonucu elde edilen BTEE dönüşümleri .....	91
Şekil 4.38 µHPLC-IMER reaktörü için geri basınç değerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi .....	92
Şekil 4.39 Poli(DHPM-EDM) partiküllerinin ve monolitinin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları A) Monolitik yapı, Büyütme: 6000X B) Partiküler yapı, Büyütme: 60000X.....	93
Şekil 4.40 Civa porozimetre ile elde gözenek dağılım grafiği A) Monolitik sistem B) Partikül bazlı sistem.....	94
Şekil 4.41 Farklı mobil faz akış hızlarında M-CC monolitik ve referans kolonlar için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Akış hızı (µL/dakika) A) 5, B) 10, C) 25, D) 40, E) 50 .....	95
Şekil 4.42 M-CC monolitik kolonunun akış hızı kromatogramları. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Mavi: 5 µL/dakika, Siyah: 10 µL/dakika, Yeşil: 25 µL/dakika, Kırmızı: 40 µL/dakika, Kahverengi: 50 µL/dakika .....	96

Şekil 4.43 A) M-CC monolitik kolon, B) P-CC partikül bazlı kolon için yatışkın durum voltaj farkının akış hızı ile değişimi. İmmobilizasyon : Kolay bağlanma .....	97
Şekil 4.44 A) M-CC monolitik kolonunda, B) P-CC partikül bazlı kolonda mobil faz akış hızı ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Kolay bağlanma.....	98
Şekil 4.45 Farklı BTEE konsantrasyonlarında boş kolon ve M-CC monolitik kolonu için elde edilen voltaj-zaman eğrileri. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. BTEE derişimi (µM): A) 50, B) 100, C) 200, D) 400, E) 600. ....	99
Şekil 4.46 M-CC monolitik kolonu için farklı substrat besleme derişimleri ile elde edilen voltaj-dönüşüm eğrilerinin kıyaslanması. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. BTEE derişimi: Mavi: 50 µM, Kırmızı: 100 µM, Kahverengi: 200 µM, Siyah : 400 µM, Yeşil: 600 µM .....	100
Şekil 4.47 A) M-CC kodlu monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda yatışkın durum voltaj farkının BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Kolay bağlanma .....	101
Şekil 4.48 A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Kolay bağlanma,.....	101
Şekil 4.49 A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi ( Michaelis-Menten grafiği) .....	102
Şekil 4.50 Farklı sıcaklık değerlerinde boş ve dolu M-CC monolitik kolon için elde edilen sıvı kromatogramları. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. A) 15 °C, B) 20 °C, C) 25 °C, D) 30 °C, E) 35 °C .....	103

Şekil 4.51 M-CC monolitik kolon için farklı sıcaklıklarda elde edilen edilen sıvı kromatogramları. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. ....	104
Şekil 4.52 Farklı sıcaklıklarda UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerlerinin değişimi. A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda .....	105
Şekil 4.53 Farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen BTEE dönüşümü değerleri. A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda.....	105
Şekil 4.54 Tekrarlanabilirlik kromatogramları. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID .....	106
Şekil 4.55 Analizden analize farklı kullanımlar sonucu elde edilen BTEE dönüşümleri .....	107
Şekil 4.56 Geri basınç değerlerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda .....	107
Şekil 4.57 Poli(GMA-EDM) partiküllerinin ve monolitinin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları A) Monolitik sistem, Büyütme, A1: 463X, A2: 30000X B) Partikül bazlı sistem, Büyütme, B1: 5000X, B2: 33214X.....	109
Şekil 4.58 Civa porozimetre ile elde gözenek dağılım grafiği, A ) Partikül bazlı sistem B) Monolitik sistem .....	110
Şekil 4.59 Farklı mobil faz akış hızlarında P-GA kolonu ve referans kolon için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. Akış hızı (µL/dak) A)25, B)50, C)100, D)150, E)200 .....	111
Şekil 4.60 P-GA partikül bazlı kolonunun akış hızı kromatogramları. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. Turkuaz: 25 µL/dak., Yeşil: 50 µL/dak., Kahverengi: 90 µL/dak., Kırmızı: 100 µL/dak., Mavi: 150 µL/dak., Siyah: 200 µL/dak., .....	112

Şekil 4.61 A) P-GA partikül bazlı, B) M-GA monolitik kolon için yatışkın durum voltaj farkının akış hızı ile değişimi. İmmobilizasyon : Glutaraldehit Aktivasyonu .....	113
Şekil 4.62 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA monolitik kolonunda mobil faz akış hızı ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Glutaraldehit Aktivasyonu .....	113
Şekil 4.63 Farklı BTEE konsantrasyonlarında boş kolon ve P-GA partikül bazlı kolon için elde edilen voltaj-zaman eğrileri. $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 100 $\mu$ L/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. BTEE derişimi ( $\mu$ M): A) 50, B) 100, C) 200, D) 400, E) 600.....	114
Şekil 4.64 P-GA partikül bazlı kolon için farklı substrat besleme derişimleri ile elde edilen voltaj-dönüşüm eğrilerinin kıyaslanması. $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 100 $\mu$ L/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. BTEE derişimi ( $\mu$ M): Siyah: 50 Mavi: 100 , Kırmızı: 200 , Kahverengi: 400, Yeşil: 600 .....	115
Şekil 4.65 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA kodlu monolitik kolonda yatışkın durum voltaj farkının BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Glutaraldehit Aktivasyonu .....	115
Şekil 4.66 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA monolitik kolonda yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Glutaraldehit Aktivasyonu, .....	116
Şekil 4.67 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA monolitik kolonda reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi ( Michaelis-Menten grafiği) .....	117
Şekil 4.68 Glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat ile ilişkisinin Lineweaver-Burke grafiği .....	118
Şekil 4.69 Geri basınç değerlerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. A) P-GA partikül bazlı kolonda B) M-GA monolitik kolonda.....	119
Şekil 4.70 A) $\mu$ HPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda	

mobil faz akış hızı ile BTEE dönüşümünün değişimi İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu ..... 120

Şekil 4.71 A) µHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda mobil faz akış hızı ile reaksiyon hızı değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu ..... 121

Şekil 4.72 A) µHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda BTEE besleme konsantrasyonu ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu ..... 122

Şekil 4.73 A) µHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda BTEE besleme konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu ..... 123

Şekil 4.74 A) BTEE besleme konsantrasyonuna B) Akış hızına karşı elde edilen reaksiyon reaksiyon hızları 1) P-CC partikül bazlı kolon 2) M-GA monolitik kolon 3) M-CC monolitik kolon 4) P-GA partikül bazlı kolon ..... 124

Şekil 4.75 A) µHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda sıcaklık ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2 glutaraldehit aktivasyonu ..... 125

Şekil 4.76 A) µHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda geri basınç değerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu ..... 126

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Polistiren çıkış lateks sentezi için dispersiyon polimerizasyon koşulları.	35
Çizelge 1.2 Poli(GMA-EDM) polimeri için polimerizasyon şartları.....	38
Çizelge 1.3 Monolit Polimerizasyon Koşulları.....	49



## KISALTMALAR

AIBN	: 2,2-azobisisobutironitril
BD	: 1,4-bütandiol
BET	: Brunauer-Emmet-Teller
BT	: Benzoil-L-Tirosin
BTEE	: N-Benzoil-L-Tirosin Etil Ester
CMC	: 1-sikloheksil (3-2 morfolin-etil) karbodiimid meta-p-toluen sulfonat
CNBr	: Siyonejen bromür
CPTMS	: Kloropropiltrimetoksisilan
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	: Bakır sülfat su
Cyc-OH	: Sikloheksanol
DBP	: Dibutilfitalat
DMF	: Dimetilformamit
DVB	: Divinil benzen
EDC	: (N-(3 dimetilaminopropil)-N-etil-karbodiimid hidroklorür)
EDM	: Etilen dimetakrilat
Et-OH	: Etanol
F <sub>s</sub>	: Substrat molar akış hızı,
GMA	: Glisidil metakrilat
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sülfirik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IEC	: İyon değişim kromatografisi
IMER	: İmmobilize enzim reaktörü
K <sub>m</sub>	: Michaelis sabiti
M-CC	: Click chemistry yöntemi ile sentezlenmiş monolitik imer
Met-OH	: Metanol
M-GA	: Glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile sentezlenmiş monolitik imer
NaN <sub>3</sub>	: Sodyum azid
NaOH	: Sodyum hidroksit
NPC	: Normal faz kromatografisi
P-CC	: Partikül bazlı click chemistry ile sentezlenmiş imer
P-GA	: Partikül bazlı glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenmiş imer
Poli (DHPM-EDM)	: Poli(2,3 dihidroksidroksi propil metakrilat etilen dimetakrilat)

Poli (GMA-EDM)	: Poli (glisidil metakrilat etilen dimetakrilat)
Pr-OH	: N-Propanol
PVA	: Polivinilalkol
PVP K-30	: Polivinilpirolidon K-30 (Mr: 40.000,
Q	: Hacimsel akış hızı
S	: Kolon içerisinde herhangi bir uzunlukta substrat derişimi
S <sub>0</sub>	: Başlangıç substrat derişimini
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEC	: Büyüklükçe ayırma kromatografisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TBAI	: Tetrabütülamonyumiodat
THF	: Tetrahidrofuran
TMSPM	: 3-trimetoksisilil propilmetakrilat
V	: Diferensiyel kütledeki substrat tüketim hızı
V <sub>m</sub>	: Maksimum reaksiyon hızı
X	: Substrat dönüşümü

## 1. GİRİŞ

İmmobilize enzim reaktörleri gün geçtikçe daha geniş kullanım alanları bulmakta olan, biyospesifik tanımlama, biyokataliz ve çeşitli biyolojik proseslerin uygulama alanı olarak göze çarptığı sistemlerdir. İmmobilize enzimler kesikli sistemlerde kullanılabilirdiği gibi kolona doldurularak sürekli sistemlerde immobilize enzim reaktörü (İmmobilized enzyme reactor-IMER) olarak da kullanılabilir. Bu tip sistemler aşırı saf enzim gerektirmediği gibi prensip olarak ısı, organik bileşikler ve pH'a karşı katalitik aktivitesini kaybetmeden enzimatik kararlılığını devam ettirebilir. Enzim reaktörü olarak kullanıldığında çok saf ve fazla miktarda enzim gerektirmemesi, katalitik aktivitesini devam ettirebildiği müddetçe defalarca kullanılabilmesi maliyeti ve analiz süresini kısaltmaktadır.

İmmobilize enzim reaktörü ile yüksek performanslı sıvı kromatografik metodun birleşmesi seçiciliğe, hıza kromatografik sistem vasıtasıyla enzimatik reaksiyonun spesifikliği ile hassasiyetinin birleşmesine imkan hazırlamıştır. Bu sayede analiz sisteminin hassasiyeti kayda değer biçimde artmış ve kompleks matrikslerin içinde çok az miktarda bulunan bileşiklerin bile tespitine imkan sağlanmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımının kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça hassas olan kromatografik bir yöntemdir. Mikro ve nano-sıvı kromatografisi ise, mikrolitre ve nanolitre mertebesinde mobil faz kullanımı ile kromatografik ayırım yapan ve son 5 yıl içerisinde geliştirilmiş ileri kromatografik tekniktir. Genellikle monolitik formda ayırma ortamlarının kullanıldığı bu sistemde, mekanik olarak oluşturulan basınç farkı ile elde edilen mobil faz akışı kapiler kolonlarda yüksek ayırma veriminin eldesini sağlar. Klasik HPLC sistemleri ile karşılaştırıldığında çalışma prensibi olarak hemen hemen aynı olmasına rağmen Nano-LC'de sistemin minyatür boyuta gelmesi bazı avantajları da beraberinde getirmiştir. Minimal mobil faz kullanımı ile tüketilen solvent miktarı ve oluşan zararlı atık ürün azdır. Dolayısıyla toksik çözücülerin çevreye olan etkisi azalmaktadır. Kolon iç çapının küçük olması duyarlılığı arttırmakta ve daha az miktarda örnek kullanımını gerektirmektedir. Kolon dolgu malzemelerinin boyutlarının küçülmesiyle pik genişliği azalmakta ve daha iyi ayırma verimi elde edilmektedir. Sistem basıncı diğer sistemlere oranla daha düşüktür. Mikro boyutta analiz

yapıldığından ölü hacim azdır ve band genişlemesi büyük oranda engellenmektedir. Ayrıca kısa sürede kromatografik ayırım gerçekleştirilmektedir.

Nano-sıvı kromatografisi için yeni ayırma ortamlarının eldesi amacıyla günümüzde yoğun bir araştırma sürdürülmektedir. Nano-LC kolon fabrikasyonu için partikül dolgulu kolonlar ve monolitik kolonlar olmak üzere iki farklı dolgu çeşidi vardır. Partikül dolgulu kolonlar, stabil ve tekrarlanabilirliğin sağlanması için gelişmiş deneysel vasıflara ve tecrübeye ihtiyaç duyar. En büyük zorluklarından biri mobil faz akışını engellemeyen ve partikülleri kolon içerisinde uygun şekilde tutabilecek fritlerin fabrikasyonudur. Buna karşın monolitik kolonlar kendi kendilerini silika kapiler kolon duvarına sabitlediğinden frite ihtiyaç duymazlar. Bu yüzden monolitik kolonlar kararlı, yeterli mobil faz geçirgenliğine sahip ve kabarcık oluşumunu engelleyen bir yapıya sahiptirler.

Günümüzde monolitik kolonlar partikül dolgulu kolonlara oranla daha fazla ilgi çekmektedir. Fabrikasyonlarının kolay olması ve istenen kimyasal özellikte elde edilebilmeleri, monolitik kolonların en önemli avantajlarındandır.  $\mu$ HPLC ve Nano-LC yeni ortaya çıkmakta olan bir tekniktir. Günümüzdeki uygulayıcıları bu alana HPLC'den girmiştir. Bu araştırmaların çoğu yeni kolon teknolojilerinin geliştirilmesi üzerinedir ve bu alanda da HPLC'den örnek alınmaktadır.

Tez çalışması kapsamında yüksek performanslı sıvı kromatografisi için immobilize enzim reaktörleri kolay bağlanma ve glutaraldehit aktivasyonu yöntemleri ile geliştirilmiş ve bunların kinetik karakterizasyonu yapılmıştır. Sentezler partikül bazlı ve monolitik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilirken kromatografik çalışmalar partikül bazlı kolonlar için HPLC ve  $\mu$ HPLC, monolitik kolonlar için  $\mu$ HPLC sistemlerinde yapılmıştır. Tez çalışması beş bölümden oluşmaktadır.

Tez çalışmasının birinci bölümünde, partikül bazlı immobilize enzim reaktörü (IMER), yüksek performanslı sıvı kromatografisi için  $\alpha$ -kemotripsin enziminin monodispers makro gözenekli poli(2,3-dihidroksipropil metakrilat etilen dimetakrilat), poli(DHPM-EDM) partiküllerine kovalent olarak bağlanması kolay bağlanma uygulaması ile gerçekleştirilip sentezlenmiştir. Sentezin ilk basamağında dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile monodispers polistiren lateksler üretilmiştir. Çıkış lateksi PVA ve SDS içeren sulu ortamda dispers edilen organik faz varlığında şişirilmiş ikinci aşamada da polimerizasyon meydana gelerek çok basamaklı mikrosüspansiyon

polimerizasyonu ile poli (glisidil metakrilat –etilen dimetakrilat), poli(GMA-EDM) partikülleri elde edilmiştir. Sonraki basamakta poli(DHPM-EDM) partikülleri, poli(GMA-EDM) partiküllerinin asidik hidrolizi ile elde edilmiştir. Oluşan parçacıkların diol grupları kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS) ile partikül yüzeyine klor grubu bağlamak üzere reaksiyona girerler. Yüzeyindeki klor grupları ile sodyum azidin tepkimeye girmesi ile partikül yüzeyine azid grupları bağlanmış olur. Diğer taraftan seçilen enzim  $\alpha$ -kemotripsin, alkin fonksiyonel gruplu ajan olan pentinoik asit ile suda çözünebilen karbodiimid varlığında tepkimeye girer. Daha sonra alkin fonksiyonel gruplu enzim ile azid fonksiyonel gruplu polimer partikülü ile klik şeklinde çiftleşir.  $\alpha$ -kemotripsin immobilize partiküller daha sonra paslanmaz çelikten üretilmiş HPLC kolonlarına (50x4.6 mm ID) yüksek basınç altında doldurulur. IMER kolonunun kinetik davranışı HPLC yardımı ile mobil faz akış hızı, substrat beslenme konsantrasyonu ve sıcaklık değiştirilerek incelenmiş, bunun yanında tekrarlanabilirlik ve stabilite performansı ortaya koyulmuştur.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, monolitik immobilize enzim reaktör ( $\mu$ HPLC-IMER) kolonu,  $\alpha$ -kemotripsin enziminin poli(GMA-EDM) monolitine kovalent olarak bağlanması glutaraldehit aktivasyonu metodu ile gerçekleştirilip sentezlenmiştir. Öncelikle NaOH kullanılarak silika tüpün (200 mm, 530  $\mu$ m ID) iç yüzeyinde hidroksil grupları oluşturulmaya çalışılmış ve oluşan bu gruplar ile 3-trimetoksisililpropilmetakrilatın (TMSPM) 3-trimetoksisilil grupları arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu silika yüzeyinde kimyasal bağlı ve polimerleşebilir metakrilat gruplarının yerleştirilmesine olanak sağlanmıştır. Sırasıyla polimer ve çapraz bağlayıcı olarak GMA, EDM mikro ve makro gözenek yapıcı bütandiol ve propanol ile birlikte başlatıcı içeren çözelti, kapiler kolona doldurularak termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu ile monolit oluşumu için polimerizasyon işlemine alınmıştır. Epoksi grubu içeren monolite, amonyak çözeltisi ile aminasyon işlemine tabi tutularak amin grupları bağlanmıştır. Poli(GMA-EDM) monolitinin glutaraldehit ile aktivasyonunun ardından  $\alpha$ -kemotripsin enziminin monolite kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır.  $\mu$ HPLC-IMER monolitik kolonunun kinetik davranışı  $\mu$ HPLC yardımı ile mobil faz akış hızı, substrat beslenme konsantrasyonu ve sıcaklık değiştirilerek incelenmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde, monolitik immobilize enzim reaktörü ( $\mu$ HPLC-IMER),  $\alpha$ -kemotripsin enziminin poli(DHPM-EDM) monolitine kovalent olarak bağlanması kolay bağlanma uygulaması ile gerçekleştirilip sentezlenmiştir. Sülfirik asit ile hidrolize edilip üzerinde hidroksil grupları oluşturulan poli(DHPM-EDM) monolitik kolonuna, kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS) hidroksil ve trimetoksisilan grupları arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanıp ve yüzeyde klor grupları oluşturulmuştur. Yüzeydeki klor grupları ile sodyum azidin tepkimeye girmesi ile partikül yüzeyine azid grupları bağlanmış olur. Diğer taraftan seçilen enzim  $\alpha$ -kemotripsin, alkin fonksiyonel gruplu ajan olan pentinoik asit ile suda çözünebilen karbodiimid varlığında tepkimeye girer. Daha sonra alkin fonksiyonel gruplu enzim ile azid fonksiyonel gruplu polimerik monolit ile birleşip  $\alpha$ -kemotripsin immobilize enzimini içeren poli(DHPM-EDM) monolitik kolonu elde edilmiştir. Yine IMER kolonunun kinetik davranışı  $\mu$ HPLC yardımı ile mobil faz akış hızı, substrat beslenme konsantrasyonu ve sıcaklık değiştirilerek incelenmiş, bunun yanında yapılan deneylerle tekrarlanabilirlik ve stabilite performansı belirlenmiştir. Sentezlenen ve kinetik çalışmaları  $\mu$ HPLC'de tamamlanan kolon, tez çalışmasının birinci bölümünde yine click chemistry (kolay bağlanma) yöntemi ile sentezlenen ve kinetik çalışmaları HPLC sisteminde yapılan partikül bazlı kolon ile mukayese edilmiş ve partiküler yapı ile monolitik yapı arasındaki farklar ortaya koyulmuştur.

Tez çalışmasının dördüncü bölümünde, polistiren çıkış lateksi PVA ve SDS içeren sulu ortamda dispers edilen organik faz varlığında şişirilmiş ikinci aşamada da polimerizasyon meydana gelerek çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile poli(GMA-EDM) partikülleri elde edilmiştir. Epoksi grubu içeren poli(GMA-EDM) partikülleri, amonyak çözeltisi ile aminasyon işlemine tabi tutularak amin grupları poli(GMA-EDM) partiküllerine bağlanmıştır. Partiküllerin glutaraldehit ile aktivasyonunun ardından  $\alpha$ -kemotripsin enziminin partiküllere kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır.  $\alpha$ -kemotripsin immobilize partiküller daha sonra paslanmaz çelikten üretilmiş  $\mu$ HPLC kolonlarına (100x1.0 mm ID) yüksek basınç altında doldurulur.  $\mu$ HPLC-IMER partikül bazlı kolonunun kinetik davranışı  $\mu$ HPLC yardımı ile mobil faz akış hızı ve substrat beslenme konsantrasyonu değiştirilerek incelenmiştir. Sentezlenen ve kinetik çalışmaları  $\mu$ HPLC'de tamamlanan partikül bazlı kolon, tez çalışmasının ikinci bölümünde yine glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile sentezlenen ve kinetik çalışmaları  $\mu$ HPLC sisteminde yapılan monolitik kolon ile

mukayese edilmiş ve partiküler yapı ile monolitik yapı ve enzim immobilizasyon yöntemi arasındaki ilişki ortaya koyulmuştur.

Tez çalışmasının son bölümünde kolay bağlanma yöntemi ile sentezlenen ve kromatografik çalışmaların HPLC sisteminde yürütüldüğü partikül bazlı IMER ile  $\mu$ HPLC'de kromatografik çalışmaları yürütülen glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile sentezlenen monolitik ve partikül bazlı IMER ve yine kolay bağlanma yöntemi ile sentezlenen monolitik IMER'lerin davranışları incelenmiştir. Akış hızı, substrat derişimi, reaksiyon hızları, sıcaklık ve geri basınç özellikleri itibarı ile mukayese edilmiş ve farklılıklar ortaya koyulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Partikül Sentezi

#### 2.1.1 Dispersiyon polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile 1-10 µm aralığında monodispers polimerik partiküller elde edilmektedir. Polimerizasyonda monomer fazı dağıtma ortamında çözünmekte ama polimerizasyon sonucu oluşan polimer dağıtma ortamında çözünmemektedir. Başlatıcı, monomer fazı içinde çözünebilme özelliğine sahiptir. Başlangıçta tek fazlı olan polimerizasyon sistemi, katı partiküllerin oluşumuyla birlikte polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı yapıya ulaşmaktadır. Günümüze kadar değişik başlatıcılar, monomer ve dağıtma sistemleri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle başlatıcı türü ve derişiminin, dağıtma ortamı türü ve derişiminin, stabilizör türü ve derişiminin monomer/dağıtma ortamı oranının, polimerizasyon sıcaklığının, karıştırma hızı ve türünün partikül boy ve boy dağılımı, molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda başlatıcı miktarının arttırılması ile partikül boy dağılımında ve reaksiyon hızında artış olduğu tespit edilmiştir (Ober and Hair, 1987). Reaksiyon hızındaki artışın sebebi daha fazla serbest başlatıcı radikalinin oluşumuyla açıklanmaktadır. Başlatıcı miktarının artmasıyla oluşan polimer molekül ağırlığında belirgin azalma gözlenmekte bunun sebebi olarak da daha fazla serbest radikalın oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısalması ile açıklanmaktadır (Ober and Hair, 1987;Tuncel at al.,1993). Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan stabilizörlerin dağıtma ortamında çözülebilmesi gerekmektedir. Çalışmalarda genellikle polimerik yapıdaki stabilizörler kullanılmakta ve stabilizör derişimi arttırıldıkça elde edilen polimerik partiküllerin boylarının azaldığı tespit edilmiştir (Paine et al., 1990 Cawse, 1997).

Dispersiyon polimerizasyonunda temel amaç dar bir boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Dağıtma ortamının polaritesi ve dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü elde edilen partikülün boy dağılımını önemli ölçüde etkiler.



İdeal bir sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek, ürün olarak elde edilen polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenir. Kullanılan monomer hacminin dağıtma ortamı hacmine oranı arttıkça ortalama partikül boyutu genelde artma gösterir. Ancak bu orandaki aşırı artış aynı zamanda sonuç partiküllerde belirgin boy dağılımına sebebiyet vermektedir (Lok and Ober, 1985).

Sıcaklık etkisi ile ilgili olarak Ober ve Hair 1985 yılında yaptığı çalışmada 55-80 °C aralığında polimerizasyon sıcaklığının artışı ile boy dağılımının ve ortalama partikül boyutunun arttığını tespit etmiştir. Polimerin molekül ağırlığının ise artan sıcaklık ile azaldığı tespit edilmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonunda karıştırma hızı önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Monodispers partikül eldesi için ortamda homojen bir ısı transfer rejimi gerekmekte ve karıştırma hızı buna göre ayarlanmaktadır. Genellikle yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek yüksek kayma gerilimi partiküllerde boy dağılımı oluşmasına neden olmaktadır.

### **2.1.2 Monodispers gözenekli partiküllerin eldesi ve çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemleri**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamalarında, kolonlarda dolgu materyali olarak silika veya polimerik mikropartiküller kullanılmaktadır. Önceki yıllarda silika bazlı partiküller ön planda iken son yıllarda özellikle polimerik formdaki HPLC kolon materyalleri üzerindeki çalışmalar artarak devam etmektedir. Polimerik partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle polimerik partiküllerin küresel, gözenekli ve monodispers formda sentezlenmesinin silika bazlı materyallere göre kolay olması, partikülün türevlendirme işleminin daha kolay yapılabilmesi, geniş pH aralığında kimyasal kararlılık göstermesi, iyon değişim kromatografisi, büyüklükçe ayırma kromatografisi ve afinite kromatografisi çalışmaları için daha uygun yapıya sahip olması yapılan çalışmaların son yıllarda polimerik materyaller üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur.

Ticari olarak üretilen HPLC kolonları genellikle belirli bir boy dağılımına sahip polidispers gözenekli partiküller içermektedir. Özellikle 1990'lı yıllardan itibaren

HPLC uygulamalarında monodispers yapıdaki partiküllerin kullanımı gündeme gelmiş ve çalışmalar bu ekseninde ilerlemeye başlamıştır. Kullanılan monodispers gözenekli partiküller varlığında, kolonda düzenli akış profili oluşmakta ve daha yüksek düzeyde kromatografik ayırma yetenekleri elde edilmektedir. Literatürde monodispers makrogözenekli partiküllerin sentezi için bir çok metod yer almaktadır (Elingsen et al., 1990; Wang et al., 1994; Galia et al., 1994; Svec et al., 1996; Hossaya et al., 2001). Bu üretim yöntemleri 'çok basamaklı polimerizasyon yöntemleri' adı altında toplanmaktadır. Bu çalışmalarda 4 ana basamak sözkonusudur.

1) Monodispers çıkış lateksinin sentezi:

Genellikle çıkış partiküllerinin hazırlanmasında dispersiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Bu yöntemle 2-8 µm boyutlarında çıkış partikülleri elde edilir. Çıkış lateksinin uniform özellik taşıması için dispersiyon polimerizasyon şartları çok önemlidir. Çıkış partikülleri emülsiyon yapıcı madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile de elde edilebilir. Bu yöntem ile sentezlene çıkış partiküllerinin boyutları polimerizasyon şartlarına bağlı olarak 0.12-0.60 µm arasında değişmektedir (Smigol et al., 1992).

2) Çıkış lateksinin organik ajanla şişirilmesi

Fonksiyonel gruplu monomerin ortama eklenmesi şişirme basamağında gerçekleşmektedir. Bu basamakta öncelikle monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, inert bir seyreltici, ve emülsifiyan içeren organik bir faz hazırlanır. Organik faz su emülsiyonunda redispers edilir. Organik faz lateks partiküllere transfer olur ve organik faz çıkış lateksi ile şişirilmiş olur.

3) Monomer karışımının şişmiş partiküllerde repolimerizasyonu

Dispers edilmiş organik fazın çıkış partiküllerine transferi sonrasında repolimerizasyon basamağı başlatılır. Şişirme işlemi tamamlandıktan sonra sürekli fazda monomer kalırsa genelde sonuç üründe geniş bir boy dağılımı oluşur. Ortamdaki tüm monomeri absorblayacak miktarda çıkış lateksi kullanılırsa eş boy dağılımı elde edilebilir. Organik faz/çıkış lateksi oranının yüksek tutulması yumuşak, yapışkan, topaklanmış, yığın karakterde partikül formuna sebebiyet verebilir. Makrogözenekli yapı repolimerizasyon

aşamasında oluşur (Cheng et al., 1992). Makrogözenekli partiküllerdeki bloklaşmanın engellenmesi için polimerizasyon öncesi ortama polimerik bir stabilizör eklenebilir (Galia et al., 1994). Yine Galia ve arkadaşlarının tespitlerine göre bu basamakta suda çözünebilen inhibitör kullanılarak şişme ortamının sürekli fazındaki fazla monomerin polimerleşerek oluşturduğu oligomerlerin çekirdekleşmesi ve daha küçük partikül oluşturması önlenir.

4) Ekstraksiyon prosesi ile seyrelticinin uzaklaştırılması ve stabil gözenek yapısının elde edilmesi

Repolimerizasyon basamağın sonucunda inert organik seyrelticiler ve lineer polimer içeren makrogözenekli üniform partiküller oluşturulur. Kararlı bir yapı elde etmek için sıvı organik seyrelticiler ve lineer polimerin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için uygun bir çözücü kullanılarak polimer ve organik seyrelticiler çapraz bağlı yapıdan ekstrakte edilir.

Yapılan çalışmalarda monomer tipi ve reaktivitesi, çapraz bağlanma derecesi ve seyreltici miktarının üniform partiküllerin gözenek yapısını kontrol eden en önemli parametreler olduğu bulunmuştur. Gözenek oluşumu ile ilgili bir mekanizma da Cheng ve arkadaşları (1992) tarafından ileri sürülmüştür. Cheng'e göre makro gözenekli polimerik partiküllerde gözenek oluşumu iki basamaklı bir prosesdir. Birinci basamak, partikül yapısındaki yüksek çapraz bağlılıktaki jel mikrokürelerin oluşumu ve bloklaşmasıdır. Bu basamağın başlangıcında çapraz bağlayıcı ile monomer arasındaki kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu pendant vinil grupları ile lineer kopolimer zincirler oluşur. Kopolimerizasyonun ilerlemesiyle lineer zincirler çapraz bağlı yapılara dönüşür ve şişmiş partiküllerde iki farklı faz gözlenir. Bu fazlar çapraz bağlı kopolimerce zengin faz ve diluentçe zengin fazdır. Çapraz bağlı kopolimer zincirler, çapraz bağ yoğunluğunun artmasıyla jel formunda mikroküreler halinde ayrılırlar. Gözenek oluşum prosesinin sonraki basamağı partiküller içinde jel mikrokürelerin bloklaşarak sabitlenmesidir. Mikroküreler ve yığınlar arasındaki boşluklar, lineer polimer ve nonsolvent içeren gözenek yapıcı çözelti ile doldurulur. Sonuçta makrogözenekli yapı diluentin ekstraksiyon prosesi ile uzaklaştırılması sonucu elde edilir.

## 2.2 Monolitik Kolon Sentezi

### 2.2.1 Monolitik kolonların geliştirilme süreci

Gözenekli malzemeler olarak bilinen monolitler partikül dolgulu kolonlara alternatif olarak geliştirilmiş gözenekli tek partikül olarak düşünülebilir. Monolite benzeyen ilk yapı 1950'lerde Nobel ödüllü Robert Syng'e tarafından önerilmiştir (Syng'e et al., 1954). Ardından 1967'de Kubin ve arkadaşları 2-hidroksietil metakrilat hidrojellerden oluşan çok düşük geçirgenlikte bir monolit üretmişler ve başarılı kromatografik ayrımlar gerçekleştirmişlerdir. Ama bu teknolojilerin hiç birisi uzun soluklu olmamıştır. Yine 1980 yılında Belenkii ve arkadaşları çeşitli kimyasal özellikte ve geometride kolonlar üretmişler ve çalışmalarında başarılı olarak kısa ayırım ortamları denebilecek bir kavramın tohumlarını atmışlardır. Böylece yeni bir tür dolgu malzemesi "monolit" doğmuştur. Yapılan ilk çalışmalarda monomer, serbest radikal başlatıcı ve gözenek yapıcı sistemden oluşan karışım, bir tüpe veya düz bir plaka üzerine dökülerek polimerizasyona sokulmuştur. Elde edilen gözenekli monolitik polimer kromatografik ayrımlarda kullanılmıştır.

Monolitlerin herhangi bir işleme gerek kalmayacak şekilde kolon içerisinde direkt polimerizasyon yoluyla eldesini Svec ve Frechet (1992) başarmıştır. Bu grup çalışmalarında monomer olarak glisidil metakrilat ve çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilatı kullanırken, sikloheksanolu makro-gözenek yapıcı dodekanolu ise mikro-gözenek yapıcı olarak kullanmıştır. Glisidil metakrilata ait epoksi grupları polimerizasyon sonrası fonksiyonel grup bağlanması için kullanılmıştır. Monolitik kolonlar özellikle 1990'ların başında, üretimlerinin kolay olması ve frite ihtiyaç duymamalarından dolayı popülerite kazanmıştır (Smith et.al., 2008).

Aynı tarihlerde Hjerten ve arkadaşları N,N'-metilen bisakrilamid ve akrilik asiti amonyum sülfat tuzu varlığında polimerleştirerek şişmiş, çapraz bağlı, jel yapılı bir monolit elde etmişlerdir (Hjerten, S. et al., 1989). Tanaka ve arkadaşları ise inorganik bazlı silika monolitleri elde etmişlerdir (Minakuchi, H. Et al., 1996).

Son olarak da Soga ve Nakanishi çapraz bağlı polimerlere paralel olarak gözenekli silika monolitlerin sentezi için çalışmalar yapmış ve mikro ve mezo gözenekli, bimodal monolitik yapıyı bulmuşlardır. Tanaka, Nakanishi monolitik kolon olarak kullanılan silika çubukların önemini fark etmiş ve bu çalışmalara öncülük etmişlerdir. Bu gelişmelerin ardından Merck firması 100 µm çapında silika bazlı monolitik kolonlar üretmiştir (Unger et al., 2008).

### **2.2.2 Monolitik kolonların partikül dolgulu kolonlarla kıyaslanması**

Yüksek basınçta iyi doldurulmuş bir partikül dolgulu kolonda bile % 30 civarında partiküller arası boşluk söz konusudur. Bu aynı zamanda kolonun % 30'luk hacminin kromatografik ayırma için kullanılmadığının ifadesidir. Partikül dolgulu kolonlarda başka problemler de söz konusudur. Örneğin mobil faz dolgulu kolon içerisinde akarken direncin minimum olduğu partiküller arası boşluktan akmayı tercih ederken gözenekler arasında kalan akışkan durgun olarak kalır. Mobil faza enjekte edilen herhangi bir örneğin molekülleri, mobil faz aracılığı ile gözeneklerin içerisine taşınır. Difüzyon, boşluklardan akan çözelti ile gözeneklerdeki durgun akışkan arasındaki derişim gradienti sayesinde olur. Bu gradient farkı ile örnek molekülleri gözeneklerin içerisine transfer olmuş olur. Konsantrasyon sinyali partikül üzerinden geçip gittiğinde ise gözenekler içerisindeki moleküller gözenekleri çevreleyen sıvı içerisine geri difüzlenirler. Dolayısıyla durgun faz gözenekler içerisinde eski halini alır ve bu da kütle transferinin kısıtlanmasına neden olur (Yurtsever, 2008).

Gözenekli partiküllerde kütle transferini hızlandırmanın yolu partiküllerin çapının küçültülmesi ve difüzyon yollarının kısaltılmasıdır. Partikül çapının küçülmesi de geri basıncın artmasına ve partiküller arası boşluğun azalmasına, dolayısıyla geçirgenlikte düşmeye neden olmaktadır. Monolitik dolgu malzemesi gözenekli partiküllerin bir araya gelmesiyle oluşmuş sürekli bir faza benzer ve difüzyon ile kütle aktarımının gerçekleştiği kanallar ve gözenek derinlikleri optimize edilmiş olur. Dolayısıyla kütle transferi ve kolon geçirgenliği maksimuma ulaşmış olur.

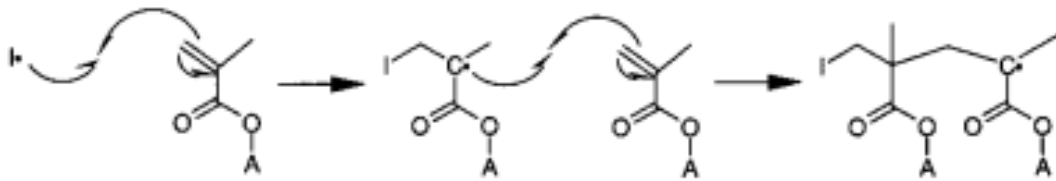
Monolitlerde % 80'e çıkabilen bir gözeneklilik söz konusudur. Bu kolonun % 20'si dolu demektir ve bu oran partikül dolgulu kolonda % 60 civarındadır. Monolitlerde mobil faz büyük çaplı gözeneklerden akmakta bu da geri basıncı büyük ölçüde

düşürmektedir. Partikül dolgulu kolonlarda küçük gözeneklerde gerçekleşen difüzyonla kütle aktarımı, monolitlerdeki büyük gözeneklerde konveksiyonla olmaktadır. Dolayısıyla monolitlerde analitler difüzyonla değil konveksiyonla transfer edilmektedir (Liapis et al., 1999).

## 2.2.3 Monolitik kolon türleri

### 2.2.3.1 Metakrilat bazlı monolitler

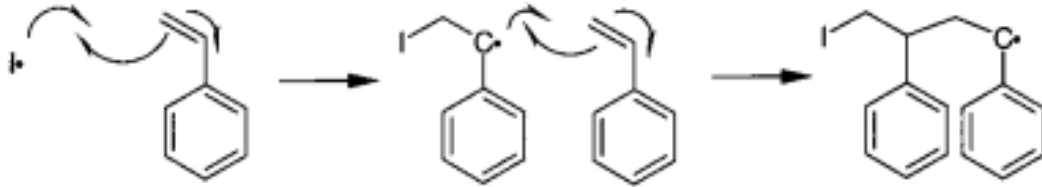
Metakrilat bazlı monolitler diğer monolitik kolon türlerine göre daha fazla gelişme olanağı bulmuşlardır. Metakrilat bazlı monolitlerin yapımı oldukça kolaydır. Silanizasyon işleminin ardından boş bir kolon polimerizasyon çözeltisi ile doldurulur ve belirli bir sıcaklıkta polimerizasyon gerçekleştirilir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra gözenek yapıcı sistemindeki çözücüler ve dönüşmeyen monomerler ortamdaki uzaklaştırılır. Monolitin yapışma özelliği çok olsun istenmiyorsa silanizasyon yapılmadan da polimerizasyon yapılabilir. Polimerizasyon karışımı genelde monomer olarak glisidil metakrilat (GMA) ve çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilattan (EDM) oluşur. Yapılan çalışmalar, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EDM miktarı arttıkça polimerin özgül yüzey alanının arttığını göstermektedir. Dolayısıyla EDM miktarı değiştirilerek birçok farklı türde polimerik monolit elde edilebilmektedir (Coufal et al., 2002). Metakrilat bazlı monolitlerin sentezinde gözenek yapıcı sistem olarak genellikle sikloheksanol, dodekanol, propanol, metanol veya asetonitril kullanılmaktadır. Radikal başlatıcı olarak ısı veya UV ışığı ile aktive olan 2,2 azobisisobütilonitril kullanılmaktadır (Quigley et al., 2003). Metakrilatın polimerizasyonu için reaksiyon mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Radikal oluşumu ve polimer zincirin büyümesi A: Terminal grup

### 2.2.3.2 Polistiren bazlı monolitler

Svec ve Frechet yaptıkları çalışmalar ile 1990'ların başında, ters faz sıvı kromatografisinde proteinlerin ayırımında kullanılmak üzere çok gözenekli stiren bazlı monolitik kolonları sentezlemişlerdir (Svec et. al., 1992). Stiren ve divinilbenzenin sırasıyla monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı bu çalışmalarda AIBN başlatıcı, toluen de gözenek yapıcı olarak kullanılmıştır. Poli(stiren-divinibenzen) polimerleri geniş pH (1-14) aralığında kararlılık gösterirken, küçük moleküllerin analizi için yüzeyleri kolaylıkla modifiye edilebilmektedir. Ters faz kromatografisinde sabit faz olarak türevlendirilmeden direk olarak kullanılabilirler. Alkil gruplarını polimer yüzeyine bağlamak için iki metot vardır. Birinci metotta, alkilstiren gibi gözenek yapıcı ortamda çözünebilen bir monomer polimerizasyon karışımına eklenir ve polimer oluştuğunda yapıya geçer. İkinci metotta ise polimer oluşuktan sonra yüzeye katalizör yardımıyla alkil bağlanmaktadır. Buna örnek olarak bu işlem Friedel Crafts katalizlemesi ile yapılabilmektedir. Şekil 2.2'de stirenin polimerizasyon reaksiyonu görülmektedir.



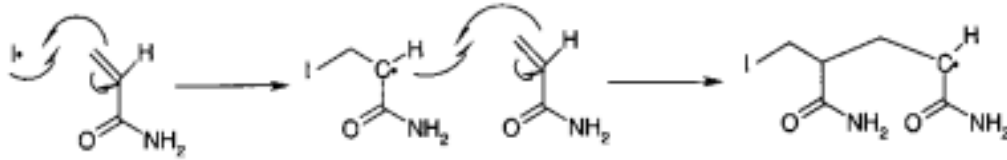
Şekil 2.2 Stirenin polimerizasyonu (radical step-wise polymerization) (Quigley et al., 2003)

### 2.2.3.3 Poliakrilamid bazlı monolitler

Poliakrilamid jeller yıllardır elektroforez için ayırma ortamı olarak kullanılabilirken, su geçirgenlikleri olmadığı için sıvı kromatografisi sistemlerinde kullanılamamışlardır (Jiang et al., 2001). 1980'lerin sonuna doğru poliakrilamid bazlı monolitik kolonlar kromatografide ilk defa Hjerten ve arkadaşları (Hjerten et. al., 1989) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Aynı grup 1996 yılında CEC için monolitik kolon sentezlemişlerdir (Quigley et al., 2003). Poliakrilamid kolonlar yüksek performanslarda üretilebilmektedir. Monolitin yüzey fonksiyonları kolaylıkla değiştirilebilmekte ve

ayrıca bu kolonlar iyon değişim, hidrofobik etkileşim, ters faz, normal faz ve kiral kromatografide geniş pH aralıklarında kararlılık göstermektedir.

Çapraz bağlı poli akrilamidin sentezi tek basamaklı bir prosestir. Kapiler kolon öncelikle 3-trimetoksisilil propilmetakrilat (TFEM) ile muamele edilerek ön işlemden geçirilir ve duvarda çift bağ oluşturulmuş olur. Serbest radikal zincir polimerizasyonu ile akrilamid monolit, katalizor-başlatıcı sistemi TEMED ve amonyum persülfat kullanılarak elde edilmektedir. Polimer karışımındaki monomerler akrilamid, piperazin diakrilamid, metakrilamid, çapraz bağlayıcı ise N,N metilenbisakrilamiddir (Quigley et al., 2003). Akrilamidin polimerizasyon reaksiyonu Şekil.2.3'de görülmektedir.



Şekil 2.3 Akrilamidin polimerizasyonu

## 2.2.4 Polimerik monolitlerin sentezi

Polimerik monolitler sıcaklık, UV ve gama-ışınma, polikondenzasyon (polycondensation), poliadişyon (polyaddition), ve canlı polimerizasyon teknikleri olmak üzere bir çok sentez yöntemi kullanılarak elde edilmektedir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılan sıcaklık ile yapılan yani termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonudur.

### 2.2.4.1 Monolitik yapı ve polimerizasyon sıcaklığı

Monolitik yapı belli bir ortalama çapa sahip, birbirine bağlı mikro-küreciklerden oluşur. Bu mikro-küreciklerin oluşumu ise monolit sentezi sırasında büyüyen çekirdekçiklerin kimyasal olarak birbirine bağlanması ile gerçekleşir. Çok sayıda ve küçük çekirdekçik ile daha dar gözenekler ve bu gözenekler arasında daha küçük gözenek hacimleri oluşur. Polimerizasyon kinetiği üzerindeki en önemli parametrelerden birisi polimerizasyon sıcaklığıdır. Özellikle yüksek sıcaklıkla orantılı olarak hızlı bir başlatıcı



dekompozisyonu daha fazla polimerik zincir oluşması sonucunu doğurmaktadır. Dolayısıyla daha fazla miktarda faz ayırım prosesi gerçekleşmekte bu da daha fazla büyüyen çekirdek oluşması demektir.

#### **2.2.4.2 Gözenek yapıcı sistem**

Gözenek yapıcı kompozisyonuna bağlı olarak, faz ayırımı polimerizasyonun erken ya da geç herhangi basamağında tetiklenebilir. Makro gözenek yapıcı ve çapraz bağlayıcının olmadığı durumlarda camsı, şeffaf yapılar meydana gelir. Gözenek yapıcının seçimi monomer ve çapraz bağlayıcının polaritelerine bağlıdır. Akrilamidden türetilmiş monolitler, dimetil sülfoksit (mikro-gözenek yapıcı) ve 2-heptanol (makro-gözenek yapıcı) ile hazırlanabilmektedir (Xie, S., 2000). Kalıp olarak çeşitli polietilen glikoller kullanılarak ortalama gözenek çapı arttırılabilir. Apolar bütül metakrilat, etilenglikol dimetakrilat bazlı monolitler, genelde sikloheksanol (mikro-gözenek yapıcı) ve dodekanol (makro-gözenek yapıcı ) ile hazırlanır (Lee, D., 2004). Ayrıca alkol miktarının artması da daha büyük gözenek oluşmasını sağlar.

#### **2.2.4.3 Yapının oluşumu**

Monolit sentezinde gerçekleşen polimerizasyon prosesinde, çöktürücü görevi yapan gözenek yapıcı varlığında polimerizasyon başlar. Ardından oluşan polimer karışımdan ayrılır ve karışımda çözünmeyen çekirdekçikleri oluştururlar. Bu çapraz bağlanma prosesinin ve polimerin gözenek yapıcı karışımda çözünürlüğünün olmamasının bir sonucudur. Bu proses dispersiyon polimerizasyonu olarak adlandırılır. Polimerizasyon esnasında (son safhalarında bile) dönüşmemiş monomerlerin polimer zincirine ilgisi gözenek yapıcıya olan ilgisinden daha yüksektir ve monomerler polimer çözücü ajan olarak görev yaparlar. Sonuç olarak polimerizasyon boyunca çekirdekçikler monomer ve çapraz bağlayıcı ile şişer. Karışım içerisinde belli bir yüksekliğe kadar olan dallanmış veya çapraz bağlanmış polimer zincirleri çekirdekçik tarafından daha da büyümek üzere tekrar alıkonurlar. Bütün polimerizasyon prosesi sonunda küçük agregatlar kimyasal olarak birbirine bağlı mikro-küreciklerden oluşan sürekli formda, birbirine bağlı bir faz oluşturmak için yeterli büyüklüğe sahip olurlar. Böylece geniş çaplı mikro-küreciklerden oluşan ve büyük boşluk hacmine sahip bir monolitik sistem oluşur. Sistemde elde edilen toplam

makro-gözenek ve boşluk hacim kesri, yaklaşık olarak gözenek yapıcının hacim kesrine eşittir. Gözeneklilik ve gözenek boyu dağılımı için kesin bir teori ortaya konulamamakta ve hala rastgele olduğu düşünülmektedir (Yurtsever, 2008).

#### **2.2.4.4 Gözenek özelliklerinin kontrolü**

Termal başaltıcı serbest radikal polimerizasyonu ile elde edilen monolitlerin gözenek özelliklerinin kontrol edilmesinde en önemli faktörlerden birisi sıcaklıktır. Genelde polimerizasyon sıcaklığının artması ile gözenekler küçülür. Sıcaklığın artması ile büyüyen polimerik zincirler artmakta ve sonuçta çözünmeyen çekirdekçikler oluşmaktadır. Çekirdekçik sayısındaki artış, çekirdekçik boyutlarının daha küçük olmasını ve böylelikle bu çekirdekçiklerden oluşan mikro-küreciklerdeki gözenek çaplarının daha küçük olmasını sağlar. Yine makro-gözenek yapıcı miktarının artması ile gözenek çapının arttığı görülmektedir (Yurtsever, 2008). Çapraz bağlayıcı miktarının artması da mikro-gözenek boyutunu arttıran bir diğer faktördür. Burada gerçekleşen mekanizmada da polimerizasyonun erken safhalarında çapraz bağlanma artmakta, faz ayrımı erken safhalarda görünmekte, küçük çekirdekçikler fazla oluşmakta ve oluşan çekirdekçiklerin monomerle şişme özelliği azalmakta ve sonuç olarak bu küçük çekirdekçikler birleşerek küçük gözenekli mikro-küreleri oluşturmaktadırlar.

#### **2.2.4.5 Fonksiyonel grupların bağlanması**

Fonksiyonel monolitleri sentezlemenin en basit yöntemi, monomerlerin sentez esnasında kopolimerizasyonudur. İkinci bir yol olarak da polimerizasyonun ardından fonksiyonel grup bağlanmaktadır. Yine kopolimerizasyona alternatif olarak kullanılan bir diğer yöntemde polimerizasyon esnasında monolitin polaritesinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermeyen aşılama (grafting) uygulamasıdır.

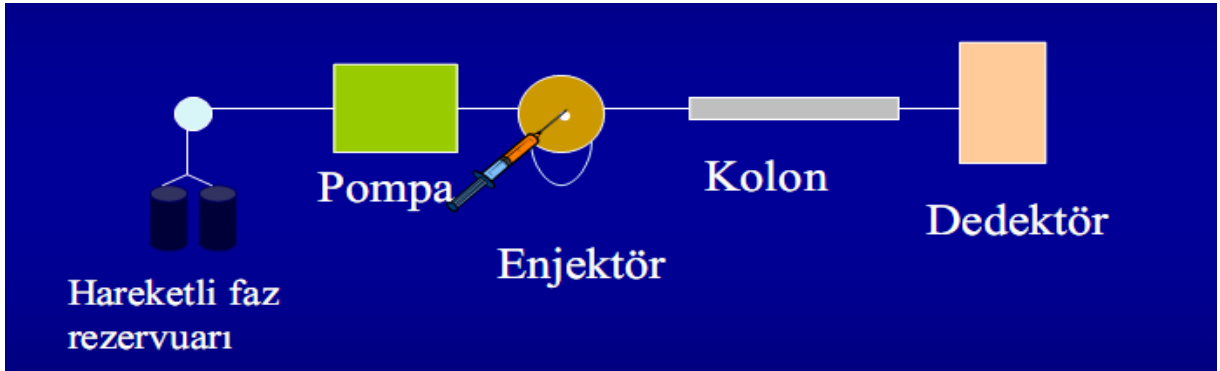
### **2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Bir karışımda bulunan iki ya da daha fazla maddenin, sabit faz ve hareketli faz arasında gerçekleşen kütle aktarımı ile birbirinden ayrılabilmesini sağlayan ayırma tekniklerine kromatografik yöntemler adı verilir. Yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilir bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir biçimde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça hassas bir kromatografik yöntemdir.

### 2.3.1 HPLC sistemleri

HPLC sistemi temel olarak; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz işlemi örnek enjektör yardımı ile sisteme gönderilir. Örnek hareketli faz ile kolon boyunca geçer ve kolon içerisinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Kolon çıkışında ayrılan bileşenlerin sinyallerini dedektör kaydeder. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir. Şekil.2.4'de HPLC sistemi şematik olarak sunulmaktadır.



Şekil 2.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminin şematik gösterimi (Guiochon et al., 2007).

Kolon içerisinde mobil fazın devamlı olarak içinde aktığı, geniş yüzey alanına sahip hareketsiz dolgu materyaline sabit faz adı verilmektedir. Örnek bileşenlerini kolon boyunca taşıyan sıvı faza da hareketli (mobil) faz adı verilmektedir. Her bir HPLC türünde kullanılan mobil fazların farklı özellikleri söz konusudur. İyon değişim, afinite ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde, farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltiler mobil faz olarak kullanılırken; normal faz sıvı kromatografisinde apolar, ters faz sıvı kromatografisinde su ve asetonytril gibi polar çözücü karışımları mobil faz olarak kullanılmaktadır. Kullanılan mobil fazın dedektör ile uyumlu, yüksek

derecede saf, düşük vizikoziteli, kimyasal açıdan inert ve örneği çözebilecek kimyasal yapıda olması gerekmektedir.

### **2.3.2 HPLC kullanım alanları**

HPLC sistemleri günümüzde birçok alanda kullanılırken başlıca kullanım alanları olarak ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayini sayılabilir.

Ayırma işleminde temel prensip, uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımının kolondan geçirilerek sabit faz ile etkileşimine dayalı olarak bileşenlerine ayrılmasıdır. Yapılan ayırma işleminin derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine göre değişiklik göstermektedir. Saflaştırma işlemi, saflaştırılmak istenen maddenin atıklardan veya diğer maddelerden ayrılmasıdır. Bu işlem yapılırken istenen madde kolon çıkışında toplanmakta ve diğer fraksiyonlar ortamdan izole edilmektedir. Saflaştırma yapabilmek için doğru mobil faz seçimi ve ayrılmak istenen maddenin kolondan çıkış süresinin istenmeyen maddelerin çıkış süresinden kısa olması gerekmektedir. HPLC sistemlerinde bilinmeyen maddelerin tanımlama işlemi de yapılabilmektedir. Bu işlem, tanımlanacak maddeye ait pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresi ile karşılaştırılması ile mümkün olabilmektedir. Doğru tanımlama için, tanımlamaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olması gerekmektedir. Tanımlı bir maddenin, HPLC kullanılarak derişim tayinini yapmak da mümkündür. Bu işlem için derişimi tespit edilmek istenen maddenin değişik derişimlerdeki çözeltileri sisteme enjekte edilmekte ve alınan seri piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilmektedir. Derişimi bilinmeyen maddenin verdiği pikin altında kalan alan hesaplanarak ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak derişimi tespit etmek mümkün olabilmektedir.

### **2.3.3 HPLC türleri**

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın pek çok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma ayırma prosesine ve sabit fazın yapısına göre olursa yüksek performanslı sıvı kromatografisini 5 farklı türde inceleyebiliriz:

### **2.3.3.1 İyon değişim kromatografisi (Ion exchange chromatography, IEC)**

Genellikle gıda, çevre, metal endüstrisi, ve biyolojik maddelerin saflaştırılmasında kullanılan analitik bir ayırma tekniğidir. Sabit fazın negatif yük taşıdığı katyon değişimi ve sabit fazın pozitif yük taşıdığı anyon değişimi olmak üzere 2 şekli söz konusudur. Elektrostatik çekime dayanan bu adsorpsiyon kromatografisinde örnekte bulunan bileşenler yüklü sabit faza olan afinitelerine göre ayrılırlar. İyon değiştirici ile mobil fazın varlığında zayıf bir etkileşime giren örnek iyonları kolonda zayıf bir şekilde tutunup, kolonda en hızlı elüsyona uğrarlar. Daha kuvvetli etkileşime giren örnek ise daha geç sürede kolondan çıkar. Mobil faz olarak ise sulu tampon çözeltileri kullanılmaktadır (Ünsal, 2006).

### **2.3.3.2 Büyüklükçe ayırma kromatografisi (Size exclusion chromatography, SEC)**

Bu yöntemde jel geçirgenlik kromatografisi de (Gel permeation chromatography, GPC) denir. Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen partiküller ile doldurulur. Büyük moleküller gözeneklerin içine giremediklerinden daha önce kolondan ayrılırken daha küçük moleküller partiküllerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Böylece değişik çaplardaki gözenekler birer elek gibi davranarak maddeleri büyüklüklerine göre alıkoymaktadır.

### **2.3.3.3 Normal faz kromatografisi (Normal phase chromatography, NPC)**

Polar sabit faz (örneğin silika jel) yüzeyi ile, n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar mobil faz türlerinin kullanıldığı kromatografik ayırma tekniğidir. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

### **2.3.3.4 Ters faz kromatografisi (Reversed phase chromatography, RPC)**

Apolar (hidrofobik) sabit faz yüzeyi ile metanol, su-asetonitril karışımı gibi polar mobil faz türlerinin kullanıldığı kromatografik ayırma tekniğidir. Burada en polar yapıdaki

örnek bileşenleri sabit faz ile en az etkileşime girerek kolonu en hızlı şekilde terk eder. Daha apolar olanlar ise sabit faz ile arasındaki etkileşim şiddetine göre kolonu daha geç terk ederler (Ünsal, 2006).

### **2.3.3.5 Afinite kromatografisi (Affinity chromatography, AC)**

Hedeflenen molekülü spesifik olarak tanıyan bir ligand ile tutuklanmış destek materyalinin sabit fazı oluşturduğu kromatografik yöntemlerden biridir. Genel olarak yöntem ligandlarla bir örnek içerisinde çözülmüş hedef madde arasındaki etkileşimleri içerir. Çok etkili bir teknik olması nedeniyle bir defada saflaştırmanın tamamlandığı tek yöntemdir. Yüksek seçiciliği fazla olması nedeniyle protein saflaştırma yöntemi olarak özellikle kullanılmaktadır (Durdu, 2004). Alıkonma mekanizması maddeye özgün olmakta ve anahtar-kilit modeline uygun biyolojik materyaller dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır.

Afinite Kromatografisi, enzim, antikor vb. gibi spesifik bağlanma özelliğine sahip bir maddenin polimerik partikül, monolit, dekstran, selüloz, agaroz veya cam küreler gibi bir destek matriksine kovalent bağla bağlandığı bir ayırma tekniğidir. Dolgulu kolon içerisinde kovalent bağla bağlı madde bir çözültiden veya süspansiyondan geçerek kendi hedef molekülü ile etkileşime girer. Afinite kromatografisi ligand ile ligandı tamamlayıcı bir makromolekül arasındaki özgün ve dönüştürülebilir etkileşimleri kullanmaktadır.

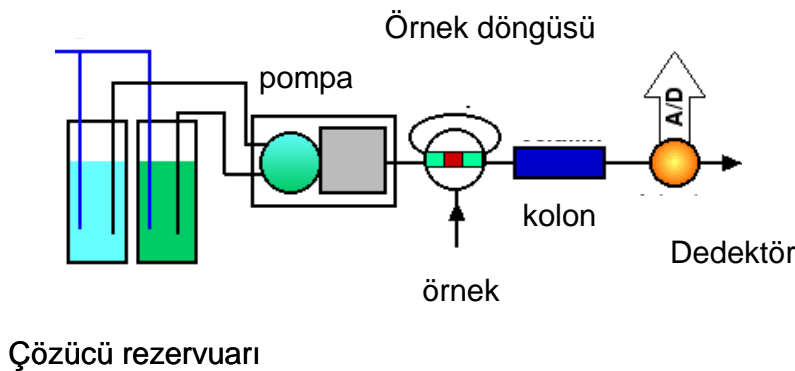
Afinite kromatografisinde İnert katı destek materyali ve bu destek materyale kovalent bağlarla bağlanmış ligand sabit fazı oluşturur. Hedef maddeyi içeren çözültiden istenen madde sabit faz tarafından seçimli olarak tutulur. Ligand ve hedef molekül arasında oluşan bağ dönüşümlü bir karaktere sahip olduğu için, bağlanmayan maddelerin kolondan uzaklaştırılmasından sonra sabit faz tarafından tutulan madde mobil fazın sıcaklığı, iyonik kuvveti veya pH'ı değiştirilerek kolondan tekrar geri alınabilir. Üre ve guanidin gibi ajanlar bu amaçla kullanılmaktadır (Durdu, 2004). Destek matriksine kovalent bağla bağlanmış enzim veya ligandın kolona bağlı kalabilme ve hedef molekül serbest bırakıldıktan sonra da biyolojik olarak aktif olabilme kabiliyeti özellikle istenen durumdur. Enzim, inhibitör, antijen ve antikor gibi moleküller için yüksek tanıma ve spesiflik özelliklerine sahip olan ligandlar bir

başka molekülü tanıyamadıkları için grup ligandları geliştirilmiştir (Kopperschlager et. al., 1982).

Afinite kromatografisi enzim, antikor gibi büyük moleküllerin saflaştırılmasında veya küçük bileşiklerin kullanım öncesi eliminasyonunda kullanılır. Ayrıca hücre ayırma işlemleri de afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

## 2.4 Mikro ve Nano-Sıvı Kromatografisi (Micro & Nano-Liquid Chromatography)

Mikro ve Nano-LC, nano veya mikrolitre mertebesinde mobil faz kullanımı ile çalışan ve genelde 500  $\mu\text{m}$  veya daha küçük iç çap değerine sahip monolitik kolonların kullanıldığı yeni geliştirilen bir sıvı kromatografi sistemidir (Coufal et al, 2002). Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ulaşılmayacak analiz hızlarına Nano veya  $\mu\text{HPLC}$  sistemleri ile ulaşılabilmektedir. Nano veya  $\mu\text{HPLC}$ , aynı HPLC de olduğu gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimleri bileşenlerinden oluşmaktadır. Çalışma prensibi olarak, hedef maddeler ilk önce bir çözücü içerisinde çözünür ve kolona enjekte edilirler ardından mobil faz vasıtasıyla yüksek basınç altında kromatografik kolondan akış sağlanır ve kolon içerisinde karışım bileşenlerine ayrılır. Kolon içerisindeki çözünme önemlidir ve çözünen madde ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır (Moore et al., 1998). Sabit faz kolon içerisindeki dolgu maddesi olarak tanımlanabilir. Farklı sabit faz ve çözelti kullanılarak çözünen madde ile sabit ve mobil faz arasındaki etkileşim, ayarlanabilir (Saz et al., 2007). Şekil 2.5'de Nano ve  $\mu\text{HPLC}$  sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.5 Nano ve mikro-LC sisteminin şematik gösterimi (Bayraktar, 2009)

Mobil faz örnek bileşenlerini, kolon boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözeltiler veya çözücü karışımlardır. Nano-LC sisteminde kullanılacak mobil faz seçilirken özellikle yüksek derecedeki saflık çok önemlidir. Klasik HPLC sistemleri ile karşılaştırıldığında çalışma prensibi olarak hemen hemen aynı olmasına rağmen Nano veya  $\mu$ HPLC'de sistemin minyatür boyuta gelmesi bazı avantajları da beraberinde getirir. Minimal mobil faz kullanımı ile tüketilen solvent miktarı ve oluşan zararlı atık ürün azalır (Premstaller et al., 2001). Dolayısıyla toksik çözücülerin çevreye olan etkisi azalmaktadır. Kolon iç çapının küçük olması duyarlılığı artırır ve daha az miktarda örnek kullanımını gerektirir. Ayrıca kolon çapının küçük olması daha hassas analizlerin yapılmasına olanak sağlar. Kolon dolgu malzemelerinin boyutlarının küçülmesiyle pik genişliği azalmakta ve daha iyi ayırma verimi elde edilmektedir (Grafnetter et al., 2004).

Sistem basıncı diğer sistemlere oranla daha düşüktür. Mikroboyutta analiz yapıldığından ölü hacim büyük oranda azalır ve band genişlemesi engellenmiş olur. Benzer işlevi gören aletlerle kıyaslandığında  $\mu$ HPLC sisteminin daha ucuz olduğu söylenebilir. Sistemin küçük ve parçalara ayrılabilir özelliğinden dolayı taşınması ve montajı kolaydır. Ayrıca kısa sürede kromatografik ayırım gerçekleştirilmektedir (Zou et al., 2002).

## **2.5 Enzim İmmobilizasyon Teknikleri**

İmmobilizasyon tekniklerinin enzimin kararlılığı, katalitik aktivitesi, deaktivasyonu, rejenerasyonu, yaşam süresi ve analitik uygulamaları üzerine çok ciddi etkileri söz konusudur. Fiziksel ve mekanik özellikleri birbirinden oldukça farklılık gösteren doğal ve sentetik destek materyallerindeki artış, doğru destek materyalini seçmeyi gitgide daha kompleks hale getirmiştir. Seçilen destek materyalinin ve immobilizasyon işleminin düşük maliyetli olması, toksik olmaması, maksimum aktiviteyi sağlaması, katalitik aktivitesini uzun bir süre devam ettirebilmesi, ve immobilizasyon işleminin kolaylığı gibi birden çok parametreyi sağlaması beklenmektedir. Özellikle 1980'li yıllardan itibaren enzim immobilizasyonu üzerinde en çok durulan araştırma konularındandır. Günümüzde de enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar devam etmekte olup, ticari olarak uygulama imkanı olanlar patenti alınıp ilgili sektörlerin kullanımına sunulmaktadır. İmmobilize enzim sistemleri bağlanma metoduna göre



fiziksel bağlanma yoluyla immobilize edilmiş enzimler, tutuklanma ile immobilize edilmiş enzimler ve kimyasal (kovalent) bağlanma yoluyla immobilize edilmiş enzimler olmak üzere 3 kısımda incelenebilir:

### **2.5.1 Fiziksel bağlanma yoluyla enzim immobilizasyonu**

Fiziksel adsorpsiyon metodunun temel mantığı enzimin zayıf çekim kuvvetleri ile inert taşıyıcıya bağlanmasıdır (Messing, 1975). Immobilizasyon Van der Waals, iyonik veya hidrojen bağlarının taşıyıcı ile enzim arasında kurulması ile gerçekleşir (Mosbach, 1976). Basit aynı zamanda ekonomik olan bu yöntemde enzim immobilizasyonu belirli sıcaklık, pH ve iyonik şiddete sahip çözelti ortamında enzim ve taşıyıcının etkileştirilmesi ile gerçekleşir. Yöntemde ön işlem olarak taşıyıcının tampon ile yıkanması yeterlidir.

Üzerinde apolar yapılar taşıyan özellikle de aromatik gruplar içeren taşıyıcılar enzim üzerinde yer alan tirozin, izolösin ve triptofan grupları ile etkileşerek enzimi bağlarlar. Immobilize edilmiş enzimin stabilitesinin hidrofilik taşıyıcılarda daha iyi olduğunu düşünen bazı araştırmacılar, hidrofobik taşıyıcıları kullanmamışlardır. Fakat zaman içinde yapılan başka çalışmalar bazı enzimlerin hidrofobik taşıyıcılara başarı ile bağlandığını göstermiştir. Üzerine hidrofobik gruplar takılarak hazırlanan taşıyıcı ile enzim arasında hidrofobik bağlar oluşarak immobilizasyon işlemi gerçekleşmektedir. Fiziksel adsorpsiyon ile bağlanma yöntemi için iyon değiştirici reçineler gibi daha başarılı taşıyıcılar kimyasal olarak üretilmektedir. Taşıyıcı materyal olarak polisakkaritlerin alifatik ve aromatik eter türevleri özellikle triferilmetil agoroz fiziksel adsorpsiyon yolu ile enzimlere çok kolay bağlanabilmektedir. Yine taşıyıcı olarak alüminyum, titan, cam, kum ve silika gibi farklı inorganik malzemeler kullanılmakta fakat bu taşıyıcılar genellikle düşük miktarda enzim adsorplamakta ve enzimin sürekli olarak kaybı söz konusu olmaktadır.

Fiziksel adsorpsiyon ile enzim bağlama metodu kullanılarak yapılan çalışmaların önemli kısmında taşıyıcılardan sürekli olarak enzim kaçağı olduğu gözlenmektedir. Bu kaçakları sıcaklık, pH, iyonik şiddet değerleri değiştirilerek azaltmak mümkündür. Bunun yanında kaçakları önlemek ve stabiliteyi artırmak için enzim adsorplanmış taşıyıcı glutaraldehit gibi çift fonksiyonlu bir çapraz bağlayıcı ile muamele edilebilir.

Taşıyıcı olarak inert bir malzeme kullanılmış ise çapraz bağlayıcı enzim moleküllerini kovalent olarak birbirine bağlar ve enzimin taşıyıcıdan ayrılması engellenmiş olur (Bilici, 2002).

Enzim rejenerasyonunun mümkün olması belki de fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyonun en önemli avantajıdır. Bu işlem taşıyıcıların taze enzim çözeltisi ile muamele edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Tramper, 1982). İmmobilize enzimin stabilitesi iyi ve taşıyıcıdan enzim kaçıışı kabul edilebilir düzeyde ise fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon endüstriyel uygulamalar için oldukça çekicidir.

### **2.5.2 Fiziksel tutuklama yoluyla enzim immobilizasyonu**

Tutuklama, enzimin fiziksel olarak çok küçük bir parçanın içine dışarıya çıkmayacak şekilde hapsedilmesidir. Matrisin içine tutuklama veya membran içine tutuklama temel tutuklama metotlarıdır. Tutuklama ile enzim immobilizasyonu için kullanılan matrisler genellikle ca-alginate, agar, k-carrageenin, poliakrilamid, ve kollajen gibi polimerik materyallerdir. Bunun yanında aktif karbon ve poroz seramiklerde katı matris olarak kullanılmaktadır. Tutuklamanın yapılacağı matris partikül olabildiği gibi membran veya fiber de olabilmektedir. Tutuklama özellikle son yıllarda hücre immobilizasyonunda tercih edilen bir teknik haline gelmiştir.

Hidrofilik jel oluşumu yolu ile enzimlerin immobilizasyonu fiziksel tutuklama yolu ile immobilizasyona iyi bir örnektir. Bu yöntemde akrilamid monomeri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda bir çok çalışmada hidrofobik jeller kadar iyi sonuç veren 2- hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomeri matris sentezi için önerilmektedir (Kumakura, 1983). Polivinil alkol, kitosan ve doğal kökenli jelatin de jel formu için kullanılan polimerler arasındadır.

Tutuklamanın getirdiği belli başlı dezavantajlarda söz konusudur. Enzimin tutuklandığı yerden çözeltiye sızması, difüzyon kısıtlamaları, enzimin aktivitesinin ve kararlılığının azalması ve mikro çevresel koşulların kontrol altında tutulamaması bu dezavantajlar arasında sayılabilir.

### **2.5.3 Kovalent bağlanma yolu ile enzim immobilizasyonu**

Kovalent bağlanma yolu ile enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar uzun yıllardan beri devam etmektedir. Ancak kovalent olmayan enzim immobilizasyon yöntemlerinin de son yıllarda özellikle endüstriyel uygulamalar için çok tercih edildiği bilinmektedir. Kovalent yöntemler enzim ile taşıyıcı matris arasında belirli reaktif gruplar aracılığıyla olan etkileşimler temel alınarak sınıflandırılabilir.

Kovalent bağlanmanın pek çok avantajı sözkonusudur. Bunlardan birincisi enzim ile taşıyıcı matris arasındaki bağ stabilitesinin sağlam olmasıdır. Bağ sağlam olunca enzim taşıyıcı matristen ürün akımına büyük ölçüde kaçmamaktadır. Bu yüzden bağ türünün tersinir ve kararsız yapıya sahip olmaması gerekir. Ayrıca taşıyıcı matrisin çözünmemesi ve parçalanmaması da ürün akımına enzim kaçağının oluşmaması için son derece önemlidir. Kovalent bağlanmadaki en önemli avantajlardan birisi de taşıyıcı materyal ve bağlanma yöntemi seçiminde çok alternatifin söz konusu olmasıdır. Alternatif çokluğu hidrofobik/hidrofilik grup oranı, yük dağılımı, bağlanma için uzantı kullanımı gibi fiziksel ve kimyasal bir kısım özellikleri göz önünde bulundurarak seçim yapmaya imkan tanımaktadır (Bilici, 2004).

Kovalent bağlanma yönteminde söylenebilecek en büyük dezavantajlar işlemlerin maliyeti ve yöntemlerin karmaşıklığıdır. Ayrıca immobilizasyon işlemi sırasında enzimin, toksik reaktifler ile ve sert kimyasal ortamlar ile karşılaşması immobilize enzim sisteminin aktivitesinin düşmesine neden olabilmektedir. Bahsedilen özelliklerin hemen hemen hepsi kullanılan enzim-taşıyıcı kompleksine göre farklılık gösterebilir (Bilici, 2004). Bu yüzden uygun enzim-taşıyıcı kombinasyonuna genellikle deneme yanılma yolu ile ulaşılmaktadır.

#### **2.5.3.1 Karbodiimid aktivasyonu**

Karbodiimidlerin hafif asidik (4,5-5) pH değerlerinde karboksil grupları içeren taşıyıcılar ile reaksiyona girerek oluşturdukları türevleri, aminler ile reaksiyona girerek kararlı amid bağları yaparlar. Bahsedilen işlem 4 °C sıcaklıkta pH 7'de 4-16 saat reaksiyon süresi ile gerçekleştirilir. Çok sık kullanılsa da bir diğer aktivasyon yöntemi daha vardır. Bu yöntemde, karbodiimid enzim ile karşılaştırılarak enzim

üzerindeki karboksil grupları ile etkileşir ve oluşan kompleks taşıyıcının amino grubuna bağlanır. En çok kullanılan suda çözünebilir karbodiimidler 1-sikloheksil (3-2 morfolin-etil) karbodiimid meta-p-toluen sulfonat (CMC) ile 1-etil-3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)' dir.

Enzim immobilizasyonunda iki yöntem sözkonusudur. Birinci yöntemde enzim, taşıyıcı ve karbodiimid ile birlikte reaksiyona sokularak reaksiyon gerçekleştirilir. İkinci yöntemde ise karbodiimid, taşıyıcı ile ön aktivasyon işlemine sokulur. Fazla olan reaktifin yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmasından sonra taşıyıcı enzim çözeltisi ile reaksiyona sokularak enzim immobilizasyonu kovalent olarak gerçekleştirilmiş olur (Bilici, 2002).

### **2.5.3.2 Siyonejen bromür aktivasyonu**

Siyonejen bromür (CNBr) aktivasyonu en yaygın olarak kullanılan kovalent immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Özellikle üzerinde hidroksil grupları bulunan polisakkarit matrislere enzim bağlanmasında tercih edilmektedir. CNBr aktivasyonunun gerçekleştirilebilmesi için kuvvetli bazik ortam gerekmektedir. Kuvvetli bazik ortam CNBr ve taşıyıcıya bağlanan aktif siyanat esterlerinin hidrolizine neden olur. Bu işlemin gerçekleşmesi için aynı zamanda toksik bir kimyasal olan CNBr'ün aşırı miktarda kullanılması gereklidir, bu durum taşıyıcının aktivasyon veriminin düşmesine sebep olmaktadır. CNBr'ün bazı organik çözücülerdeki çözeltileri belirli şartlarda patlayıcı özellik gösterdiğinden CNBr aktivasyon yöntemi kullanılırken çok dikkat edilmesi gerekmektedir.

CNBr aktivasyon yönteminin uygulanması iki şekilde olabilmektedir. Titrasyon tekniği olarak adlandırılan birinci yöntemde, ortam pH'ı sisteme sürekli baz eklenerek sabit tutulur. Tampon çözelti tekniği olarak adlandırılan ikinci yöntemde ise çok kuvvetli tamponlanmış ortam kullanılmasına ve tekniğin oldukça basit olmasına rağmen düşük bağlanma kapasitesi gösterdiği bilinmektedir (Wilhheck, 1984).

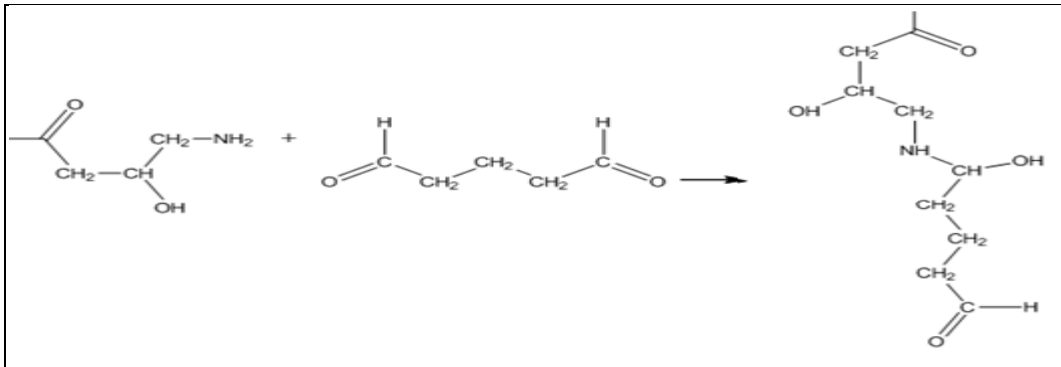
### **2.5.3.3 Glutaraldehit aktivasyonu**

Glutaraldehit aktivasyonu, amino grubu taşıyan taşıyıcılara enzimleri immobilize etmek, çözünen oligomerler veya çözünmez membranlara enzimleri çapraz

bağlamak, adsorpsiyon işleminden sonra enzimi çapraz bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda glutaraldehit derişimi, pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi arasında karmaşık bir ilişki söz konusudur.

Glutaraldehitin proteinlerle olan reaksiyonu ortam pH'ına bağlıdır ve pH'ın 4'ten 9'a doğru artışı ile reaksiyon hızı artış göstermektedir (Reichlin, 1980). Çapraz bağlama işlemi genelde nötral pH'larda gerçekleştirilir. Taşıyıcının ön aktivasyon işlemi genellikle oda sıcaklığında ve maksimum % 10 gibi yüksek glutaraldehit derişimlerinde yapılır ve ardından iyi bir şekilde yıkanır. Ortamda enzim bulunduğu durumlarda ise çok düşük glutaraldehit konsantrasyonlarında (% 0.01-1) çalışılması gerekmektedir. Glutaraldehitin derişimine bağlı olarak reaksiyon süresi 1-60 dakika arasında değişebilmektedir.

Glutaraldehit aktivasyonunda optimum koşullar her bir enzim-taşıyıcı çiftine özel olmak üzere deneysel olarak belirlenmelidir. Polimerik taşıyıcılar tarafından tutuklanmış veya adsorplanmış enzimler yüksek glutaraldehit derişimlerini tolere edebilirken, serbest formdaki enzimlerin yüksek derişimleri çok iyi tolere edebildiği söylenemez. İmmobilizasyon işleminden sonra enzim ve taşıyıcısı genellikle seyreltik lizin, glisin veya etanolamin ile etkileşerek, taşıyıcı üzerindeki serbest glutaraldehit gruplarının kapatılması sağlanır (Wasserman, 1980).



Şekil 2.6. Glutaraldehit aktivasyon reaksiyonu

### **2.5.3.4 Kolay bağlanma (Click chemistry) ile enzim immobilizasyonu**

Biyokimyada proteinler birbirini tekrar eden aminoasit ünitelerinden, şekerlerde birbirini tekrar eden monosakkarit birimlerinden oluşur. Üniteler karbon-karbon bağından ziyade karbon – hetero atom bağına dayalı olarak birleşmektedir. Ek olarak enzimler kimyasal proseslerin büyük enerji zorluklarının üstesinden gelmesini reaksiyonları küçük enerji adımları içeren reaksiyon serilerine bölerek sağlar. Kolay bağlanma çok basamaklı sentezleri hızlı, etkili ve tahmin edilebilir olarak gerçekleştirmesini sağlamaktadır. Kolay bağlanma reaksiyonlarının özellikleri şunlardır ve şu avantajlar elde edilebilir:

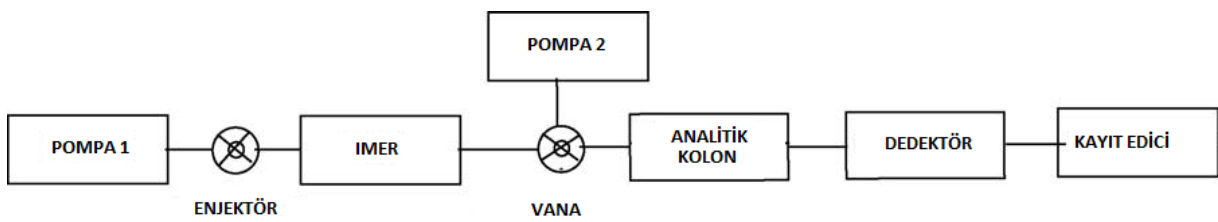
- ✓ Geniş değişebilen uygulama alanı
- ✓ Yüksek verim eldesi
- ✓ Yan ürünün zararlı veya hiç olmaması (Kromatografik olmayan metotlarla uzaklaştırılabilir olması)
- ✓ Kolay reaksiyon koşullarının söz konusu olması (İdeal olarak prosesin su ve oksijene duyarlı olması)
- ✓ Stereospesifiklik (enantioselektif olması şart değil)
- ✓ Solvent içermemesi veya su gibi solventler kullanılması
- ✓ Distilasyon veya kristalizasyon ile kolay ürün izolasyonu veya saflaştırması (kromatografik ayırma gerektirmemesi) söz konusudur.

## **2.6 İmmobilize Enzim Reaktörleri**

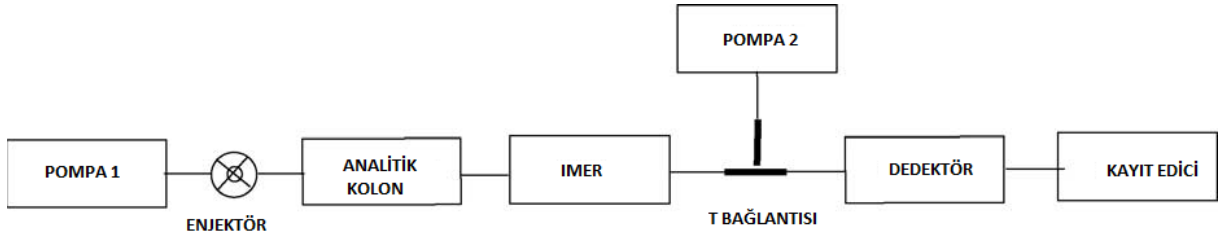
İmmobilize enzim reaktörleri gün geçtikçe daha geniş kullanım alanları bulmakta olan, biyospesifik tanımlama, biyokataliz ve çeşitli biyolojik prosesler uygulama alanı olarak göze çarpan sistemlerdir. İmmobilize enzimler kesikli sistemlerde kullanılabilir gibi kolona doldurularak sürekli sistemlerde immobilize enzim reaktörü (İmmobilized enzyme reactor-IMER) olarak da kullanılabilir. Bu tip sistemler aşırı saf enzim gerektirmediği gibi prensip olarak ısı, organik bileşikler ve pH'a karşı katalitik aktivitesini kaybetmeden enzimatik kararlılığını devam ettirebilir. Enzim reaktörü olarak kullanıldığında çok saf ve fazla miktarda enzim gerektirmemesi, katalitik aktivitesini devam ettirebildiği müddetçe defalarca kullanılabilmesi maliyeti ve analiz süresini kısaltmaktadır.

İmmobilize enzim reaktörü ile yüksek performanslı sıvı kromatografik metodun birleşmesi seçiciliğe, hıza, kromatografik sistem vasıtasıyla enzimatik reaksiyonun spesifikliği ile hassasiyetinin birleşmesine imkan hazırlamıştır. Bu sayede analiz sisteminin hassasiyeti kayda değer biçimde artmış ve kompleks matrislerin içinde çok az miktarda bulunan bileşiklerin bile tespitine imkan sağlanmıştır. Fakat enzimin spesifik olmayan bağlanmasından kaynaklanan bant genişlemesi, spesifik kütle transfer rejiminde akış hızının substrat dönüşümüne etkisi gibi bazı güçlükler immobilize enzim reaktörlerinin HPLC uygulamalarını kısıtlamıştır. Aslında mikro-partikül destek materyalleri kullanıldığında substratın katalitik kısımlara enzimatik ürün oluşum hızından daha yavaş ulaşmasından dolayı sistem difüzyon kısıtlamalı koşullarda çalışmaktadır (Belyaeva, 2004). Yapılan bazı çalışmalarda monolitik destek materyali kullanılmasıyla difüzyon kısıtlaması aşılmış ve enzimatik kinetik parametrelerin akıştan etkilenmemesi sağlanmıştır.

İmmobilize enzim reaktörleri sıvı kromatografi sisteminde analitik kolonun öncesinde veya sonrasında yerleştirilip kullanılabilir. Analitik kolondan sonra yerleştirildiği durumlara post-column (kolon sonrası uygulama) analitik kolondan önce yerleştirildiği durumlara pre-column (kolon öncesi uygulama) adı verilir (Şekil 2.7 ve şekil 2.8). Analitik kolon sonrası olan uygulamalarda da genellikle spesifik bir tanımlama söz konusu iken kolon öncesi uygulama çalışmalarında genellikle temizlik, enzimatik ön işlem veya makromoleküllerin parçalanması söz konusudur (Girelli, 2005).

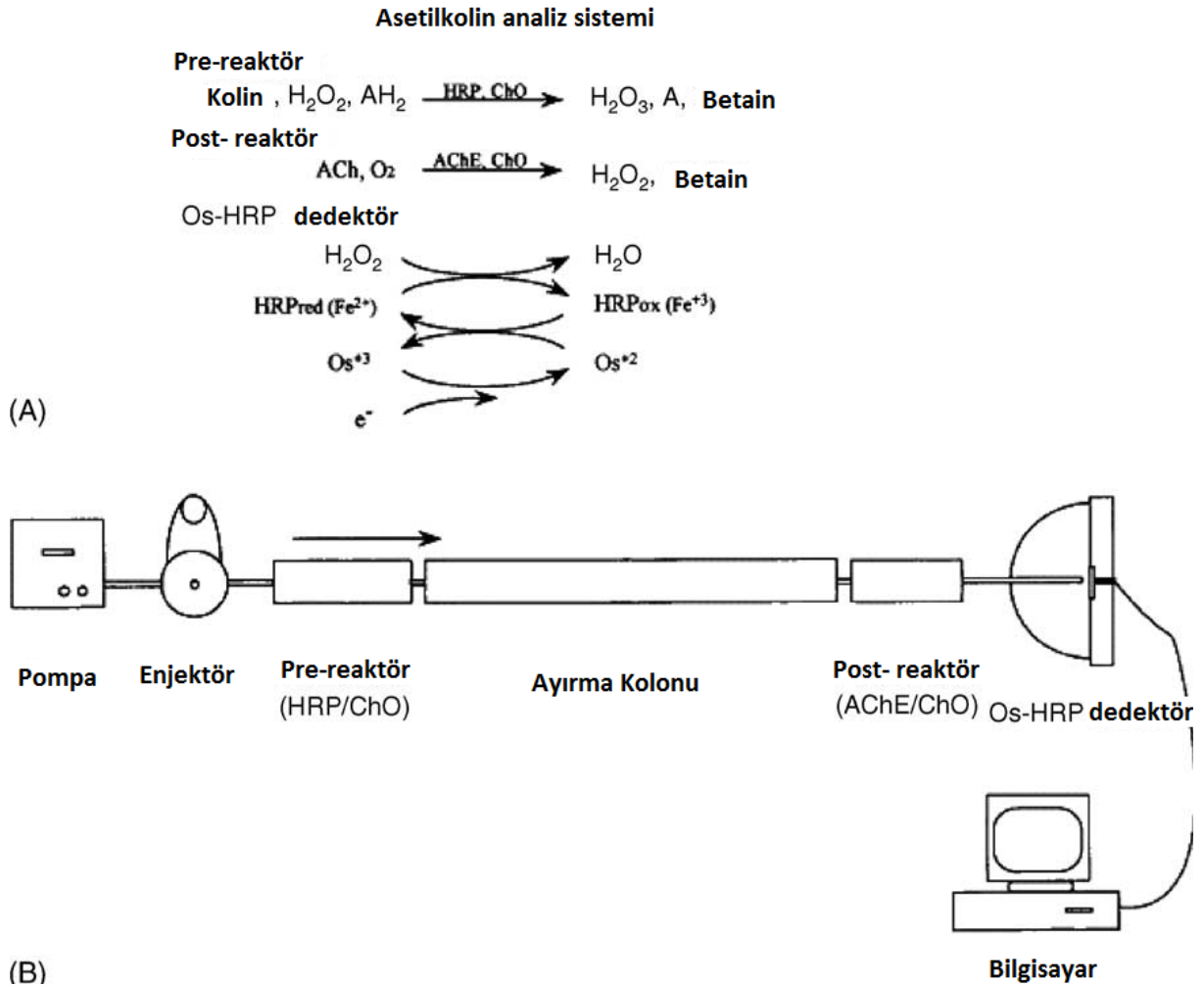


Şekil 2.7 Analitik kolon öncesi IMER uygulaması; 2. pompa ile enzimatik reaksiyon sonrası mobil fazın değiştirilmesi.



Şekil 2.8 Analitik kolon sonrası İMER uygulaması.

Kolon öncesi uygulama çalışmalarında imer ünitesi bir vana vasıtasıyla herhangi bir kromatografik sisteme rahatlıkla bağlanabilir. Böylece ikinci kromatografik sistemde söz konusu olan ayırım için gerekli olan pH ve organik çözücünün enzim denaturasyonuna yol açmasına engel olunmuş olur.



Şekil 2.9 HPLC-yabanturp peroksidaz immobilize cam karbon elektrodu ile asetil kolin analiz sistemi (Kolon öncesi ve kolon sonrası uygulama beraber).

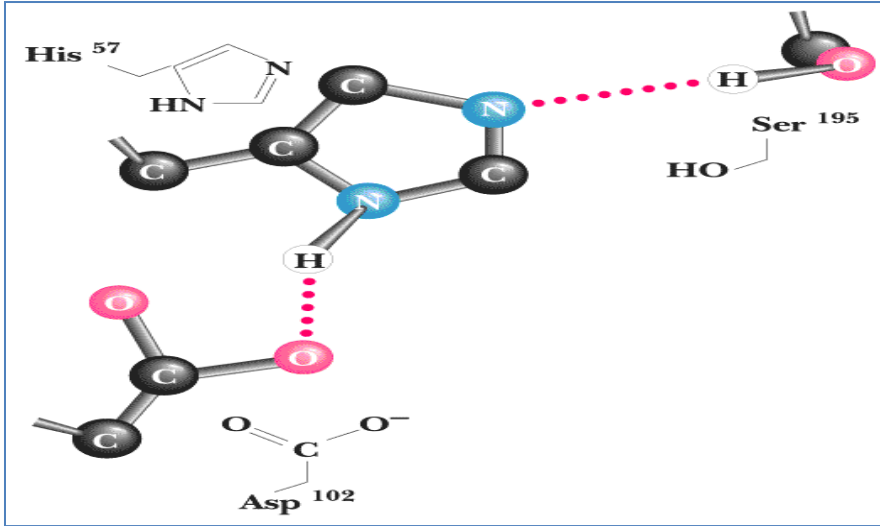


İmmobilize enzim reaktörleri ile idrar analizinde veya bazı biyolojik dokuların analizinde analitlerin hızlı dönüşümünün daha doğru ve kolay bir şekilde yapılabilmesi kromatografik kolonunun da yardımıyla mümkün olabilmektedir. Örnek olarak, analitin direk enjeksiyonuyla beraber immobilize  $\beta$ -glucuronidase reaktörü ile ekstraksiyon veya buhar distilasyonu gibi herhangi ekstra bir basamağa ihtiyaç duyulmadan idrardaki benzen metabolitlerinin belirlenmesi mümkün olabilmektedir (Tsai, 1996). Yine örnek olarak hidrolitik enzimatik reaksiyonlardan gelen serbest fenolün idrar ile ilgili diğer bileşenlerle hiç bir girişimi söz konusu olmadan imer sayesinde başarılı bir şekilde kolayca ayrılması mümkündür (Jen, 1994). Yine şekil 2.9'da asetil kolon analiz sisteminde kolon öncesi ve kolon sonrası uygulama beraber görülmektedir.

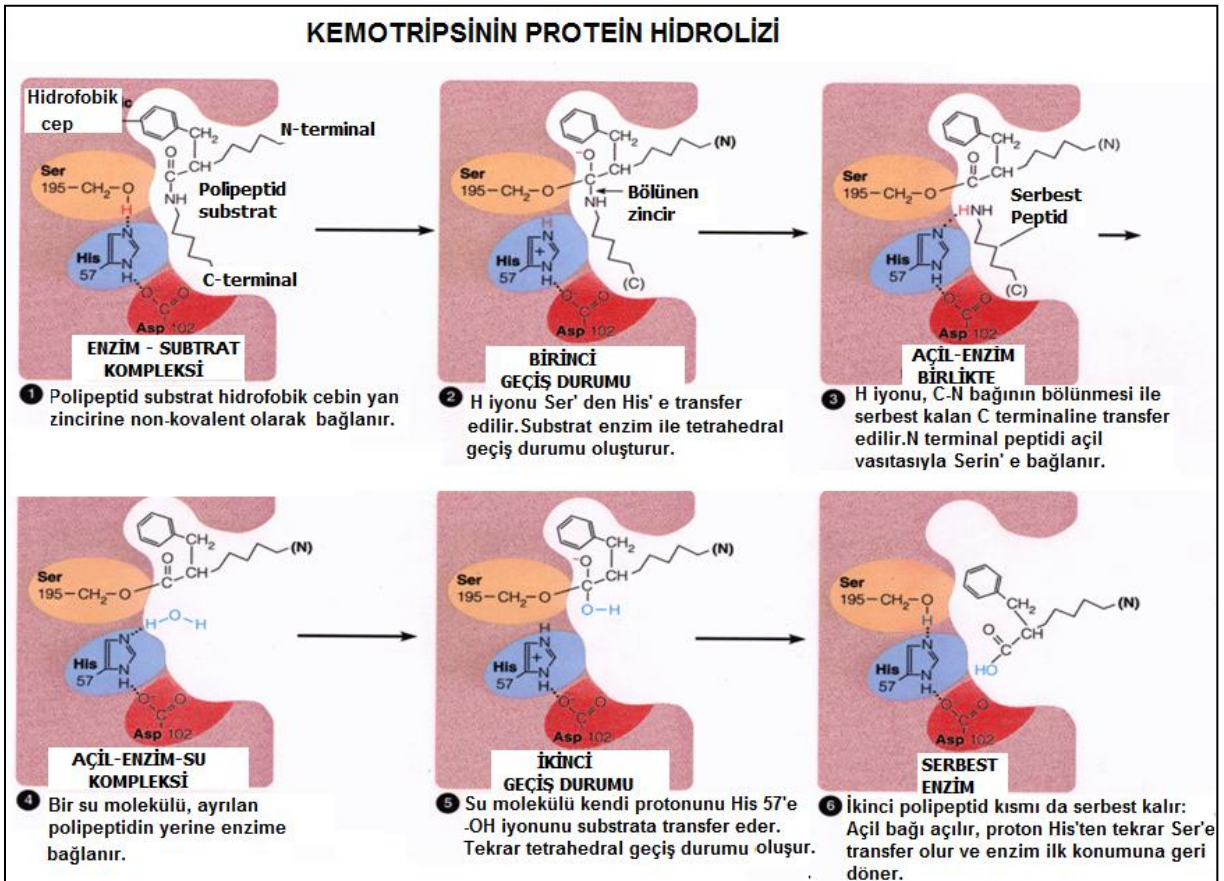
## **2.7 Kemotripsin Enzimi**

### **2.7.1 $\alpha$ -kemotripsin yapısı ve protein hidrolizi**

Kemotripsin peptid bağlarını hidrolize eden beş ana pankreas proteazından bir tanesidir. Bu enzimlerin her birisi hassas peptid bağlarına bitişik olan amino asit R gruplarına karşı farklı özgünlüğe sahiptir. Polipeptidler, bu proteaz enzimlerinin etkisiyle oligopeptid ve amino asit haline dönüşürler. Kemotripsin, triptofan (Trp), tyrosin (Tyr), fenilalanin (Phe), metyonin (Met) ve lösin (Leu) gibi aromatik veya geniş hidrofobik yan zinciri olan peptid bağlarına karşı seçicidir. Kemotripsin enzimi ayrıca ester (easter) bağlarının hidrolizini da katalizleyebilmektedir. Kemotripsin enzimidaki ana sürücü güç, bütün serin proteaz ailesinde ortak olarak bulunan ve katalitik triad olarak bilinen üçlü amino asit yapısıdır. Bu amino asitler 195 pozisyonundaki serin (Ser), 102 pozisyonundaki aspartik asit (Asp) ve 57 pozisyonundaki histidin (his) dir.



Şekil 2.10.  $\alpha$ -kemotripsinin enziminin yapısında bulunan katalik üçlü yapı



Şekil 2.11. Kemotripsinin protein hidroliz basamakları (Mathews and Van Holde, Biochemistry, 2/e' den uyarlanmıştır.)

## 2.7.2 İmmobilize $\alpha$ -kemotripsin uygulama çalışmaları

$\alpha$ -Kemotripsin immobilizasyonu ile ilgili ilk çalışmalar Clark ve Bailey tarafından yapılmıştır (Clark and Bailey, 1984). Çalışmalarında 1 ile 10  $\mu\text{m}$  boyutunda poliakrolein graft edilmiş polistiren ve polimetilmetakrilat mikroküreleri destek materyali olarak kullanmışlardır. Çalışmalarında Sepharose-4B ve eşboyutlu-gözenekli ve magnetik özellikler kazandırılmış polistiren mikrokürelerde alternatif materyal olarak kullanılmıştır. İmmobilize kemotripsinin kinetik davranışı ve partikül içi difüzyon etkileri diferansiyel dolgulu kolon reaktör ve ona bağlı UV spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir. Yine 100-1000  $\mu\text{m}$  boyutundaki büyük polidispers küreler destek materyali olarak kullanılıp süspansiyon polimerizasyonu ile kemotripsin immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu ve benzeri çalışmalarda yeni destek materyallerinin geliştirilmesi, immobilize kemotripsinin kinetik davranışı ve immobilize kemotripsin ile substrat arasındaki etkileşimin özellikle üzerine durulmuştur (Da Silva,1990, Alcantara, 1995).

Kovalent bağlı kemotripsin veya tripsin taşıyan agoroz bazlı kolonlar, (Çoğunlukla Sepharose-4B gibi) afinite kromatografisi uygulamalarında farklı ortamlardan proteaz inhibitörlerinin izolasyonunu amaçlayan çalışmalarda sabit faz olarak kullanılmıştır. Yine anti-CT antikollarının afinite kromatografisi ile izolasyonu, hidrolize edilmiş peptit veya pepsinlerin ters faz HPLC uygulamaları Turkova ve arkadaşlarının kemotripsin ile ilgili uygulama çalışmaları olarak dikkat çekmektedir (Bilkova, 1997-1999). Günümüzde 'afinite- HPLC' nispeten yeni ve geleneksel afinite kromatografisine alternatif bir kromatografik teknik olarak göze çarpmaktadır. Literatür taramalarında, kemotripsin immobilize kolonların geleneksel afinite kromatografisinde kullanıldığı gözükürken, 'afinite-HPLC' uygulamalarına uygun kemotripsin immobilize kolon üretimi ile ilgili bir çalışma bulunamamıştır. Kemotripsinin silika bazlı dolgu materyallerine kovalent immobilizasyonu ile elde edilen ayırma ortamında enantiyomerik ve stereoizomerik dipeptidlerin HPLC sisteminde ayrımı sağlanmıştır. Ayrıca HPLC ile yapılan çalışmalarda, kemotripsin immobilize kolonların aktif kısımları ve davranış biçimlerinin kiral ayırmda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Haginaka, 2001).

### **3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR**

#### **3.1 Partikül Bazlı HPLC-IMER İçin Kolon Materyallerinin Üretimi**

##### **3.1.1 Partikül sentez yöntemi**

Partikül bazlı HPLC-IMER kolonu için partiküller çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Sentezin ilk basamağı olan polistiren çıkış lateksi dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile üretilmiştir. Monodispersitesi korunan polistiren çıkış lateksi monomer ve çapraz bağlayıcının da içinde bulunduğu organik bir fazda şişirme işlemine tabi tutulmuştur. Monomer fazın polimerizasyonu şişirilen polistiren lateks partiküller içerisinde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra ekstraksiyon yapılmış ve gözenekli monodispers partiküller elde edilmiştir.

##### **3.1.1.1 Çıkış lateksinin üretimi**

###### **3.1.1.1.1 Materyal**

Çalışmada kullanılan stiren monomeri (S, Yarpet, Kocaeli, Türkiye) vakumda distile edilmiş ve polimerizasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar buzdolabında saklanmıştır. Çıkış lateksinin dispersiyon polimerizasyonu ile üretiminde dağıtma ortamı olarak mutlak etil alkol (Et-OH, Merck A.G., Almanya) kullanılmıştır. Sentezde sterik stabilizör olarak seçilen polivinilpirolidon K-30 (Mr: 40.000, PVP K-30, Sigma Chemical Co., ABD) alındığı şekliyle polimerizasyonlarda kullanılmıştır. Başlatıcı olarak etilalkolden kristalize edilen 2-2'-azobisizobütironitril de (AIBN, BDH Chemicals LTD., İngiltere) herhangi bir işleme tabi tutulmadan alındığı gibi kullanılmıştır.

###### **3.1.1.1.2 Polimerizasyon yöntemi**

Polistiren çıkış lateksi dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Sentez koşulları Çizelge 3.1'de görülmektedir. Bu amaçla ilk önce dağıtma ortamı hazırlanmıştır. Polimerizasyon reaktörü olarak 260 mL hacme sahip ağzı

sızdırmaz şekilde kapatılan cam rodajlı erlen kullanılmaktadır. İlk olarak dağıtma ortamı 1 g PVP K-30, 100 mL Et-OH içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen dağıtma ortamına 10 mL stiren monomeri ve 0.14 g AIBN eklenmiştir. Çözeltinin homojen hale gelmesi ve AIBN'nin tam çözünmesini sağlayabilmek için ortam 5 dakika süreyle 200 W gücünde bir sonikatörde (Bransonic 200, İngiltere), oda sıcaklığında tutulmuştur. Homojen polimerizasyon ortamını içeren sızdırmaz cam reaktör çalkalamalı su banyosuna (Gallenkamp, ABD) konulmuş ve polimerizasyon sıcaklığı olan 70 °C değerine ısıtılmıştır. Polimerizasyon işlemi 100 cpm çalkalama hızında 24 saat süre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Polistiren çıkış lateks sentezi için dispersiyon polimerizasyon koşulları

<b>Fonksiyon</b>	<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Monomer	Stiren	10 mL
Dağıtma Ortamı	Etanol	100 mL
Sterik Stabilizör	PVP K-30	1 g
Başlatıcı	AIBN	0,14 g
Sıcaklık	70 °C	
Polimerizasyon Süresi	24 saat	
Çalkalama Hızı	100 cpm	

Polimerizasyon sonrasında, elde edilen ürün oda sıcaklığına soğuduktan sonra, 5000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılmış ve 10 mL'lik santrifüj tüplerinde çöken partiküllerin üzerine ilk olarak etanol eklenerek, partiküller bir baget yardımıyla ortamda dispers edilmiştir. Elde edilen yeni dispersiyonla santrifüjleme-dekantasyon işlemi 3 kez yinelenmiş ve aynı işlem distile-diyonize su ile 3 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra çöken partiküller yaklaşık 100 mL su içerisinde 1-2 dakika süreyle sonikasyon ile dağıtılmıştır. Bu

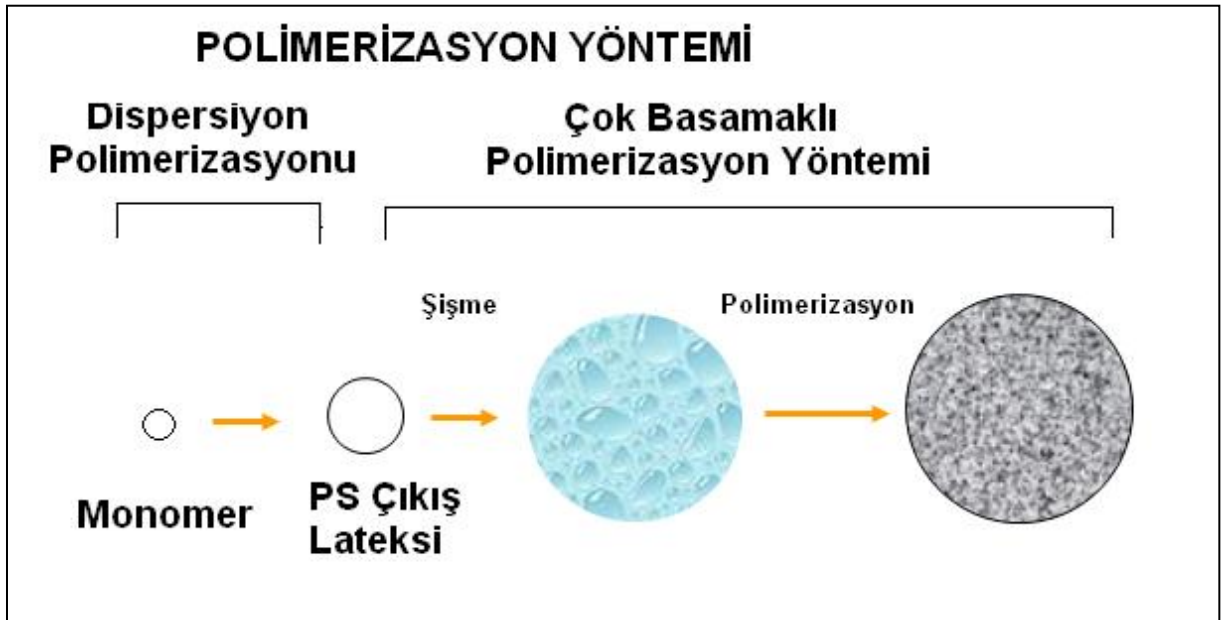
işlem ile ortalama partikül boyutu yaklaşık 2.4 µm olan monodispers polistiren çıkış lateks partikülleri elde edilmiştir.

### 3.1.1.1.3 Çıkış lateksinin karakterizasyonu

Çıkış lateksinin ortalama boy ve boy dağılım özelliklerinin hesaplanabilmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Jeol JEM 1200EX, Tokyo, Japonya) ile elde edilen fotoğraflar kullanılmıştır. Çıkış lateks dispersiyonunun polimerik partikül içeriği ise gravimetrik analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla belirli hacimde alınan lateks içeren sulu faz 70 °C de 24 saat süre ile etüvde kurutulmuş ve tartım yapılarak katı içeriği belirlenmiştir.

### 3.1.1.2 Poli(GMA-EDM) mikrokürelerin sentezi

Monodispers gözenekli GMA-EDM partikülleri “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” yöntemi ile sentezlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Monodispers ve gözenekli partiküllerin sentezinin şematik gösterimi

### **3.1.1.2.1 Materyal**

Sentezde şişirme ajanı olarak kullanılan organik ajan dibutilfitalat (DBP, Aldrich Chemical Co.,ABD) organik ajan olarak siklohekzanol (Cyc-OH, Aldrich Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Monomer olarak glisidilmetakrilat (GMA, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılırken, çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat (EDM, Aldrich Chemicals Co., ABD) tercih edilmiş ve alındığı gibi kullanılmıştır. Anyonik emülsiyon yapıcı madde olarak sodyum dodesil sülfat , SDS, Sigma Chemicals. Co., başlatıcı olarak etil alkolden kristalize edilen 2-2'-azobisisobütironitril, AIBN, Aldrich Chemicals Co., stabilizör olarak da polivinilalkol PVA ( MA: 87000-146000, % 87 hidrolize) Aldrich Chemicals Co., kullanılmıştır. Ayrıca yapılan bütün deneylerde distile su kullanılmıştır.

### **3.1.1.2.2 Poli(GMA-EDM) mikrokürelerin üretim yöntemi**

Monodispers-gözenekli partiküllerin sentezinde önce şişme işlemi, ardından da şişen partiküller içerisinde polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2.'de polimerizasyon koşulları görülmektedir. Şişme işlemi için 7 mL Cyc-OH, 2.7 mL DBP, 3.2 mL GMA, 2.1 mL EDM ve 0.16 g AIBN karıştırılarak, homojen organik faz elde edilmiştir. Bu organik faz, 0.3 g lauril sülfat ve 1.4 g PVA içeren toplam 180 mL sulu hacim içerisinde 30 dakika süreyle sonikasyon işlemine maruz bırakılıp dispers edilmiştir. Elde edilen emülsiyona, 2.4 µm boyutundaki monodispers polistiren lateks partiküllerden 0.35 g eklenmiştir. Monomer ve diluent içeren organik fazın lateks partiküllere transferi amacıyla, oluşan dispersiyon oda sıcaklığında, 24 saat süreyle, manyetik olarak 250 rpm hızda karıştırılmıştır. Şişme işlemi bittikten sonra şişmiş partiküller içerisinde polimerizasyon, çalkalamalı su banyosunda, 70 °C' de 24 saat süreyle, 120 cpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonunda çalkalamalı su banyosundan alınan reaktör oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Çizelge 3.2 Poli(GMA-EDM) polimeri için polimerizasyon şartları

<b>Fonksiyon</b>	<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Organik Ajan	Sikloheksanol	7 mL
Şişirme Ajanı	DBP	2.7 mL
Monomer	GMA	3.2 mL
Çapraz Bağlayıcı	EDM	2.1 mL
Başlatıcı	AIBN	0.16 g
Emülsiyon Yapıcı	SDS	0.3 g
Stabilizör	PVA	1.4 g
Lateks	PS Lateks	0.35 g
<b>Şişme Koşulları</b>		
Sıcaklık	25 °C	
Şişme Süresi	24 saat	
Manyetik Karıştırma Hızı	250 rpm	
<b>Polimerizasyon Koşulları</b>		
Sıcaklık	70 °C	
Polimerizasyon Süresi	24 saat	
Çalkalama Hızı	120 cpm	

### **3.1.1.2.3 Poli(GMA-EDM) partiküllerin yıkanması ve ekstraksiyonu**

Polimerizasyon işlemi sonrasında, uniform makro gözenekli monodispers partiküller ana ürün olarak elde edilmektedir. Bunun yanında yan ürün olarak sürekli fazda kalan monomerin polimerleşmesi ile oluşan küçük partikül fraksiyonunun monodispers gözenekli partiküllerden ayrılması gerekmektedir. Bu partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması için santrifüjleme ve dekantasyon işlemi yapılmalıdır. Elde edilen dispersiyon, reaktörden bu amaçla 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve 2000 rpm hızla 1 dakika boyunca santrifüjlenerek, monodispers makropartiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Çökme işlemi sonucu elde edilen süpernatant dekantasyon



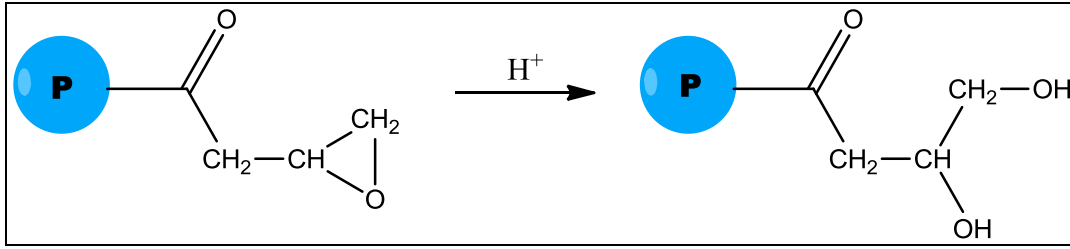
yoluyla atılarak, ortamdan bu fazda asılı halde bulunan küçük boyutlu partiküllerin uzaklaşması sağlanmıştır. Aynı işlem her bir santrifüj tüpü tekrar distile su ile doldurulup bir baget yardımı ile karıştırılmak suretiyle 3 kez uygulanmış ve distile su ile yapılan santrifüjleme-dekantasyon işlemi sona erdirilmiştir. Ortamda bulunan küçük fraksiyonlu partiküllerin uzaklaştırıldığı optik mikroskop ile kontrol edilmiştir.

Monodispers, makro gözenekli partikül dispersiyonunun suyla yıkama işleminin ardından etanol ile yıkama işlemi başlamıştır. Partiküller etanol içerisine dispers edildikten sonra 5000 rpm hızda 2 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş, süpernatantta bulunan etanol dekantasyon yolu ile alınmış ve yeni işlemler taze etanol kullanımıyla 3 kez tekrarlanmıştır.

Etanol ekstraksiyonu ardından, partiküller yaklaşık 150 mL tetrahidrofuran (THF, Aldrich Chemicals Co., ABD) içerisinde dispers edilmiş ve 5000 rpm karıştırma hızında 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Böylece süpernatant ortamdan uzaklaştırılmak suretiyle aynı işlem 2 kez tekrar edilmiştir. THF ile yıkama işleminin ardından THF ile ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. THF ile ekstraksiyonun amacı partiküller içerisinde kalan organik ajanın ve lineer polistirenin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bunun için partiküller yaklaşık 50 mL THF içerisine alınmış ve su banyosunda 60 °C' de 2 saat süreyle iki kez ekstrakte edilmiştir. Ardından partiküller oda sıcaklığına soğutulmuştur.

#### **3.1.1.2.4 Poli(GMA-EDM) partiküllerin sülfürik asit ile hidrolizi**

Monodispers gözenekli poli(GMA-EDM) partikülleri, üzerinde –OH grupları elde edebilmek için sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck A.G., Almanya) ile hidroliz edilmiştir. Dispersiyon çözeltisi 50 mL 0.5 M % 95'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 500 mL' lik pyrex bir erlen içinde hazırlandıktan sonra, poli(GMA-EDM) partikülleri çözeltinin içine dispers edilmiştir. Hidroliz işlemi, 60 °C' de 8 saat süreyle çalkalamalı bir su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işlemi ile partiküllerdeki GMA üzerinde bulunan epoksi halkaları açılarak diol grupları elde edilmiştir. Böylece GMA bazlı yapı poli(2,3-dihidroksipropilmetakrilat-co-etilendimetakrilat), poli(DHPM-EDM)) formuna dönüştürülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Monodispers gözenekli poli(GMA-EDM) partiküllerin asidik hidrolizi ile poli(2,3-dihidroksipropilmetakrilat-co-etilendimetakrilat), poli(DHPM-EDM) partiküllerin eldesi

### 3.1.1.2.5 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin karakterizasyonu

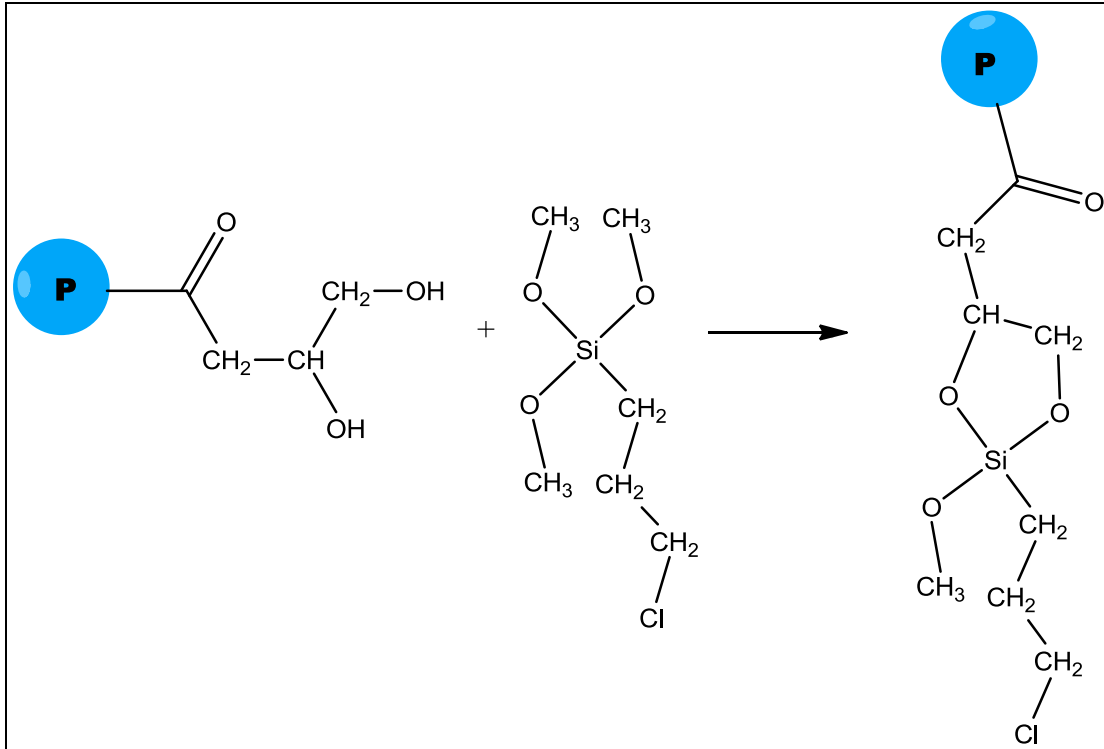
Monodispers ve gözenekli poli(DHPM-EDM) partiküllerin ortalama partikül boyu ve boy dağılımı taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (JEOL, JEM 1200EX, Japan) ile tayin edilmiştir. Bu işlem için 50° C’de vakum ortamında 0.1 mL partikül dispersiyonu hazırlanarak disk üzerine kurutulmuştur. Yaklaşık 150 Angstrom kalınlığında altın ile kaplanan partiküllerin fotoğrafları vakum ortamında 2000-8000X büyütme ile çekilmiştir. Bu fotoğraflar değerlendirilerek boy dağılımı için bağıl standart sapma ve ortalama partikül boyu belirlenmiştir.

Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, İngiltere) kullanılarak yüzey alanı ve ortalama gözenek boyutu ve dağılımını tespit etmek için çeşitli ölçümler yapılmıştır. Bunun için partiküller 90 °C’ de 10 saat süre ile vakum altında etüvde kurutulmaktadır. Partiküller cihaz hücresine yerleştirilerek, BET sisteminde 90° C’ de 3 saat süre ile vakumlanmaktadır. Her bir analizde yaklaşık 0.1 g kuru partikül kullanılmıştır. Ölçümler sıvı azot içerisine yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleştirilmektedir. Yapılan analizlerde temel prensip, partiküllerin üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azot gaz basıncı kullanılarak hesaplanmasıdır. Yüzey alanı ölçümlerinde BET adsorpsiyon izoterm yöntemi kullanılmıştır.

### 3.1.2 Poli(DHPM-EDM) partiküllerine kolay bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu

#### 3.1.2.1 Poli(DHPM-EDM) partikül yüzeyinin klorlanması

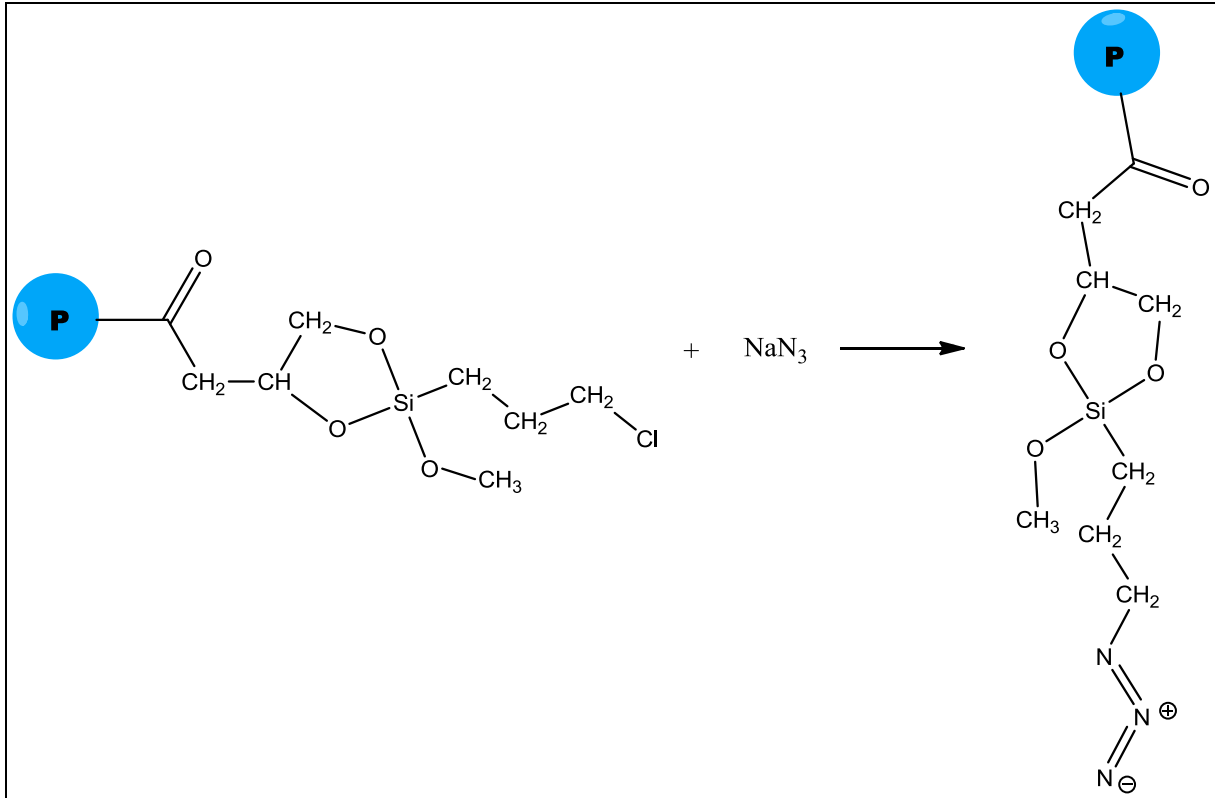
Kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS), poli(DHPM-EDM) partiküllerinin yüzeyine, hidroksil ve trimetoksisilan grupları arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanmıştır. CPTMS' nin partiküllere bağlanma reaksiyonu ve sonuçta elde edilen yapı Şekil 3.3' de görülmektedir. Reaksiyon öncesi partiküller toluen ile 3 defa yıkanmıştır. Ardından bahsedilen reaksiyon için 0,25 mL CPTMS ve 10 mL toluen içeren homojen bir çözelti hazırlanmıştır. Poli(DHPM-EDM) partikülleri (1 g) hazırlanan bu çözeltinin içinde dispers edilmiş ardından, 24 saat süre ile 25 °C' de çalkalayıcı su banyosunda 250 rpm hızda karıştırılmıştır. Reaksiyonun ardından poli(DHPM-EDM) partiküller 3 defa dimetilformamid (DMF) ile yıkanmış böylece partikül yüzeyinin klorlanması işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin CPTMS ile reaksiyona girerek klorlanması

### 3.1.2.2 Poli(DHPM-EDM) partiküllerine azid bağlanması

Poli(DHPM-EDM) partiküllerin yüzeyine azid bağlama işlemi yer değiştirme reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon için 0,5 g sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ), 5 mg tetrabütülamonyumiodat (TBAI), 10 mL dimetilformamid (DMF) içerisinde çözülmüştür. Klorlanmış poli(DHPM-EDM) partikülleri (1 g) hazırlanan çözelti içerisinde dispers edilir. Reaksiyon 80 °C sıcaklıkta 16 saat süre ile 250 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilir. Reaksiyonun ardından partiküller 3 defa DMF çözeltisi ile yıkanmıştır. Yer değiştirme reaksiyonu ve elde edilen yapı Şekil 3.4' de görülmektedir.



Şekil 3.4 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin sodyum azid ile tepkimeye girip azidlenmesi

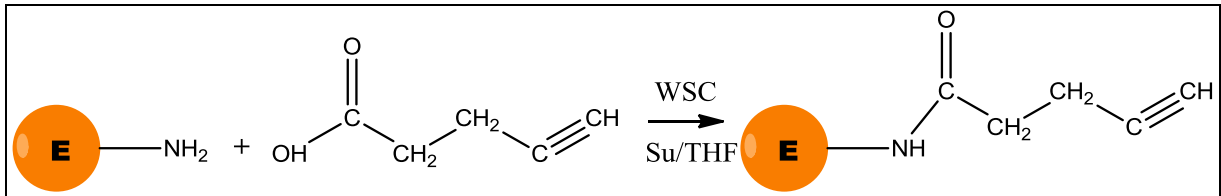
### 3.1.2.3 Diyaliz membranı aktifleştirme

Aktifleştirme işleminde ilk olarak diyaliz membranı 15 dakika süreyle saf suyun içine bırakılmaktadır. 80 °C' de 100 mL saf suda 0.3 g sodyum sülfid çözülmemektedir. Hazırlanan bu çözelti membran içerisinde çözeltinin tamamı bitene kadar geçirilmiştir. Daha sonra 60 °C' de 100 mL sıcak su geçirilir. 0.2 mL sülfirik asit 100

mL suda çözünür ve hazırlanan çözelti bitene kadar membrandan geçirilmektedir. 60 °C' de 100 mL sıcak su membrandan geçirilerek tekrar sıcak su ile yıkama işlemi yapılmaktadır. Bu işlemler bittikten sonra membranın içinde kalan asidin uzaklaşması için membran bir gün süreyle saf suda bekletilmiş ve içinde kalan asidin tamamı difüzyon yolu ile membranın içinden uzaklaştırılmıştır.

### 3.1.2.4 $\alpha$ -Kemotripsin enzimine alkin fonksiyonel grubu bağlanması

Enzim immobilizasyonunun kolay bağlanma yöntemi ile gerçekleştirmek için partiküldeki azid grubu ile tepkimeye girecek alkin grubunun enzim üzerinde oluşturulması gerekmektedir. Bunun için 24 mg suda çözünebilir karbodiimid (N-(3 dimetilaminopropil)-N-etil-karbodiimid hidroklorür), (EDC), 50 mg  $\alpha$ -kemotripsin enzimi ve 25 mg pentionik asit karıştırılmıştır. Çözünme problemi olduğu için 0.15 ml THF ortama eklenmiş ve karışımın çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminden sonra ortamdaki THF' in uzaklaşması için 12 saat süre ile beklenmiş ve böylelikle THF ortamdan uçurulmuştur. Reaksiyon 24 saat süre ile +4 °C'de 200 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcıda yürütülmüştür.

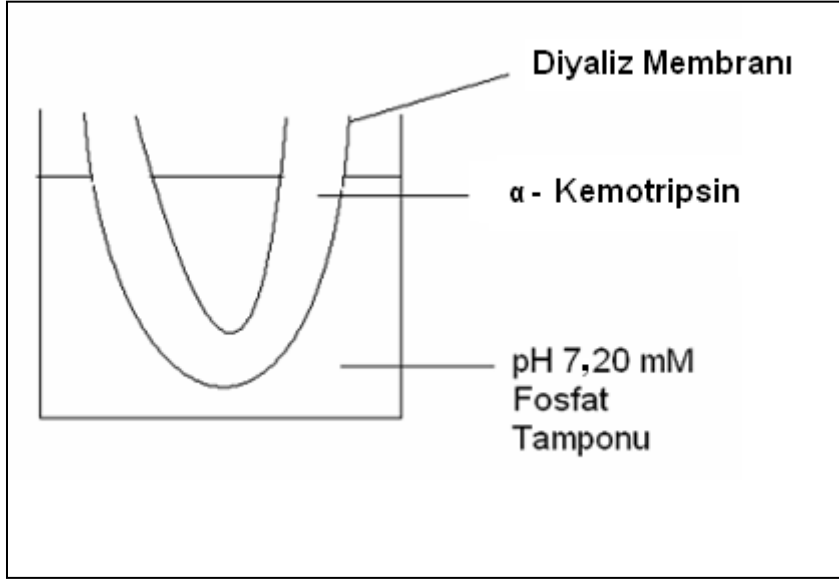


Şekil 3.5  $\alpha$ -Kemotripsin enzimine alkin bağlanması

### 3.1.2.5 Diyaliz işlemi

Daha önce aktifleştirme işlemlerine başlanan membran bir gün içerisinde hazır duruma gelmiştir. Alkin fonksiyonel grubu bağladığımız  $\alpha$ -kemotripsin enzimi (1.35 mL) bulunduğu ortamdan alınıp diyaliz membranının içine yerleştirilmiştir. Diyaliz membranı Şekil 3.6' da görüldüğü şekliyle iki ucu beherin kenarlarına sabitlenerek 20 mM pH 7 fosfat tamponu içeren beherin içine yerleştirilmiştir. Kemotripsin içeren diyaliz membranında 20 saat süre ile fosfat tamponunun içinde manyetik karıştırıcı

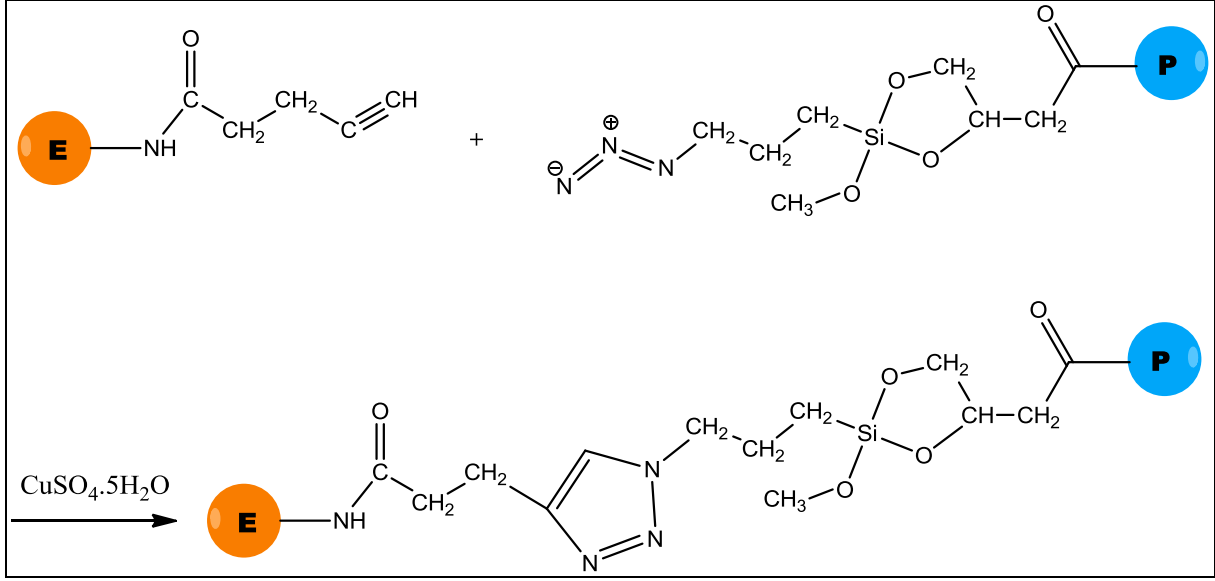
ile karıştırılarak diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece enzime bağlanmamış pentinoik asit diyalizle ortamdan uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.6 Diyaliz işlemi

### **3.1.2.6 α-kemotripsin enziminin monodispers-gözenekli partiküllere “klik-bağlanma” ile bağlanması**

Bu işlemler ile poli(DHPM-EDM) partiküllerde azid fonksiyonel grubu , α-kemotripsin enzimine de alkin fonksiyonel grubu oluşturulmuş yani iki bileşen kolay bağlanma yöntemi ile reaksiyona girmek için uygun forma getirilmiştir. Öncelikle 10 mL, 20 mM fosfat tamponu (pH 7) içerisinde, 10 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mM askorbik asit çözünmüştür. Ortama diyaliz membranından alınan enzim çözeltisi ile azid bağlanmış poli(DHPM-EDM) partiküller eklenmiştir. Bağlanma reaksiyonu 48 saat süre ile oda sıcaklığında manyetik bir karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7 Enzim ve partikül arasında gerçekleşen klik reaksiyonu

### 3.1.3 Kromatografik çalışmalar

Partikül bazlı geliştirilen P-CC immobilize enzim reaktörü için kromatografik çalışmalar yüksek performanslı sıvı kromatografisinde yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan monodispers-makro gözenekli mikroküreler, HPLC kolonlarına (50x4.6 mm ID) yüksek basınç altında doldurulmuş ve HPLC sisteminde izokratik moda, substrat içeren uygun mobil faz varlığında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle enzim-substrat reaksiyonu değişkin ve yatışkın durumda sürekli olarak izlenmiştir. Kromatografik çalışmalarda akış hızı, substrat derişimi, sıcaklığın substrat dönüşümüne etkisi incelenmiştir.

#### 3.1.3.1 HPLC-IMER kolonlarının doldurulması

Sentezlenen enzim immobilize poli(DHPM-EDM) mikroküreleri pH 7.8 borat tamponunda dispers edilip +4 °C' de saklanmıştır. Mikroküreleri doldurma işlemi için standart paslanmaz çelikten 50x4.6 mm GPC kolonları (Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Dolum işlemi HPLC siteminde 120 atm basınç altında gerçekleştirilmiştir. Dolum esnasında kolonun bir ucu frit ile kapatılıp sıkılmış, açık olan ucundan tamponda dispers edilmiş partiküller pipet yardımı ile kolona doldurulmuştur. Bu işlemin ardından HPLC kolonunun diğer ucu da frit ile kapatılıp HPLC sistemine bağlanmıştır. Sistemden mobil faz olarak pH 7.8 borat tamponu

geçirilmiştir. Basınç 120 atm oluncaya kadar akış hızı arttırılmış ve istenilen basınca ulaşıldığı andan itibaren 20 dakika süreyle deney sürdürülmüştür. Böylece kolon içindeki partiküllerin kolon içerisine yerleşmesi ve sıkışması sağlanmıştır. Bu işlemler sayesinde kolonun üst kısmında meydana gelen boşluk, kolonun üst kısmı açılıp yeni partikül ilavesi ile doldurulmuştur. Bu işlem hiç boşluk kalmayınca kadar tekrarlanmıştır. Son basamakta kolon HPLC cihazına ters yönden bağlanarak akış ters yönde uygulanmış ve her iki yönden yüksek basınca maruz bırakılan partiküllerin kolon içinde tamamen yerleşmeleri sağlanmıştır.

### **3.1.3.2 HPLC-IMER sistemi**

Bu çalışmada kullanılan HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya), bir manuel enjeksiyon ünitesi (Rheodyne, Shimadzu, Japonya), bir gradient pompa (FCV-10AL, Shimadzu, Japonya), bir dörtlü gradient mikser (LC-10AD, Shimadzu, Japonya), gaz uzaklaştırma ünitesi (DGU-14A, Shimadzu, Japonya) ve bir UV dedektörden (SPD-10AV, Shimadzu, Japonya ) oluşmaktadır.

### **3.1.3.3 Enzimatik reaksiyon analizleri**

Kromatografik analiz aşamasında ilk önce akış hızı deneyleri yapılmıştır. HPLC sistemi izokratik mod ile UV-Vis dedektör varlığında çalıştırılmıştır. Mobil faz olarak 400 µM BTEE içeren pH 7.8, % 5 etil alkol içeren % 95 borat tamponu kullanılmıştır. Analizler oda sıcaklığında yapılmış ve kolon substrat içermeyen tampon ile şartlandırıldıktan sonra deneylere başlanmıştır. Şartlanma işlemi kolonunun durumuna göre 30-100 dakika arasında sürdürülmüştür. Kolon tamamen şartlandıktan sonra 1 mL/dakika akış hızında substrat içeren mobil faz geçirilmeye başlanmış ve çıkış akımının voltaj değeri UV dedektör ile 258 nm dalga boyunda sürekli olarak kaydedilmiştir. Kromatografik analiz çıkış akımı voltaj değeri platoya ulaştıktan itibaren belli bir süre daha gözlemlendikten sonra sona erdirilmiştir. Akış hızı olarak 1, 0.5, 0.25 ve 0.1 değerlerinde deneyler yapılmıştır. Her analiz bitiminde kolon substrat içermeyen mobil faz ile tekrar şartlandırılmıştır. Substrat dönüşümünü hesaplayabilmek için aynı şartlarda boş bir kolondan substrat geçirilmiş ve elde edilen voltaj değeri dedektör yardımı ile kaydedilmiştir.



Kullanılan  $\alpha$ -kemotripsin enziminin aktivitesi sentetik bir substrat olan N-Benzoil-L-Tirosin Etil Ester'i (BTEE), Benzoil-L-Tirosin'e (BT) dönüştürmesi ile incelenmiştir. İmmobilize enzim aktivitesi Clark ve Bailey (Clark, 1983) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür. Bu yöntemde göre reaksiyon ortamında artan Benzoil-L-Tirosin (BT) derişimi ile orantılı şekilde reaksiyon ortamının voltaj değeri artmaktadır. Boş kolonla kıyaslandığında BT derişiminden kaynaklı elde edilen bu voltaj artışı kesikli sistemde her bir derişim değeri için elde edilen voltaj artışlarına bölünerek enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

$$X = \frac{(Ar - Ao)_{HPLC}}{(Ar - Ao)_{KR}} \times 100$$

Bu ifadede X: BTEE dönüşümü (% mol),  $(Ar - Ao)_{HPLC}$ , HPLC sisteminde enzim immobilize kolon varken gözlenen plato voltaj değeri ile boş kolondan substrat çözeltisi geçirildiğinde okunan voltaj değeri arasındaki fark olarak tanımlanmıştır.  $(Ar - Ao)_{KR}$  ise kolonda immobilize edilen miktara kıyasla oldukça yüksek miktarda serbest enzim içeren kesikli reaktör sisteminde, sonsuz reaksiyon süresi (2 saat) ile elde edilen voltaj değeri ile başlangıç substrat çözeltisinin voltaj değeri farkıdır.

#### **3.1.3.4 Kesikli reaktörde serbest enzim deneyleri**

Kesikli reaktörde serbest enzim deneyleri her bir substrat derişimi için, substratın tam dönüşümü sağladığı durumda elde edilen voltaj değeri ile başlangıç substrat çözeltisinin voltaj değeri arasındaki farkın belirlenmesine yönelik önceden yapılmıştır (Bilici, 2002). Serbest enzim reaksiyon ortamının hacmi 40 mL olup hacimce % 95 borat tamponu ve % 5 etil alkol içermektedir. Bu deneyler 25 °C sıcaklıkta ve 200 rpm çalkalama hızında yapılmıştır. Serbest enzim derişimi 0,025 mg/mL olarak seçilmiştir. Serbest enzim içeren kesikli reaktör ortamında enzim-substrat reaksiyonu 50, 100, 200, 400, 600  $\mu$ M derişimindeki BTEE çözeltileri ile yapılmıştır. Reaksiyon başlangıç ortamı ve reaksiyonun sonunda elde edilen ortam, HPLC sistemine 25 °C 'de 1 mL/dakika akış hızıyla ayrı ayrı beslenerek, her iki ortamın voltajları UV

dedektörde 258 nm'de okunmuştur. Elde edilen sonuçlar her bir substrat derişimi için  $(A_r - A_0)_{KR}$  değerinin tayininde kullanılmıştır.

## **3.2 Monolitik $\mu$ HPLC-IMER için Kolon Materyallerinin Üretimi**

### **3.2.1 Monolit Sentez Yöntemi**

#### **3.2.1.1 Materyal**

Bu gruptaki kolonların sentezinde monomer olarak glisidil metakrilat (GMA) (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.) ve çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat (EDM) (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.) alındığı şekliyle kullanılmıştır. GMA bazlı monolitlerin sentezinde makro-gözenek yapıcı olarak n-propanol ve mikro-gözenek yapıcı olarak 1-4 bütandiol kullanılmıştır. Bu sistemlerin bileşenleri Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.'den temin edilmiştir. Monolit sentezinde başlatıcı olarak 2,2,-azobisizobutironitril kullanılmıştır. Monolitlerin sentez sonrası yıkanması amacıyla mobil faz olarak mutlak etanol (Riedel de Haen, Almanya) kullanılmıştır. Bütün çalışmalarda distile-deiyonize su kullanılmıştır. Monolitlerin hazırlanmasında iç çapı 530  $\mu$ m olan silika kapiler kolonlar (Polymicrotechnologies Inc. A.B.D.) kullanılmıştır.

#### **3.2.1.2 Kapiler tüpün silanlanması**

Öncelikle silika tüpün iç yüzeyinde hidroksil grupları oluşturulmaya çalışılmış ve bunun için 20 cm uzunluğundaki 530  $\mu$ m iç çapındaki silika tüp, 1 M NaOH çözeltisi ile şırınga pompası kullanılmak suretiyle 4 saat süreyle yıkanmıştır. Bağlanmamış moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile silika kapiler kolon, distile deiyonize su ile aynı yöntem kullanılarak 1 saat süre ile yıkanmıştır. Daha sonra kolondan 2-3 dakika süre ile 0.225 g asetik asit, 1.25 mL metanol ve 0.5 mL TMSPM (3-trimetoksisilil propilmetakrilat) içeren silanizasyon çözeltisi geçirilmiştir. Kolonun her iki ucu septum ile kapatılarak 60 °C' de su banyosuna beher içinde yerleştirilmiş ve 20 saat süreyle burada bekletilmiştir. TMSPM'nin 3-trimetoksisilil grupları ile daha önce kapilerin yüzeyinde oluşturulan hidroksil grupları arasında gerçekteşen reaksiyon sonucu silika yüzeyinde kimyasal bağlı ve polimerleşebilir metakrilat gruplarının yerleştirilmesine olanak sağlanmıştır.

### 3.2.1.3 Monolit sentezi ve karakterizasyonu

Monolit sentezinin yapılabilmesi amacıyla şırınga pompası kullanılmıştır. Monomer, çapraz bağlayıcı, gözenek yapıcı bileşenler ve başlatıcıyı içeren çözelti, şırınga pompası yardımı ile kapiler kolondan 5 dakika süreyle geçirilerek kapiler kolon doldurulmuş ve iki ucu GC septumları ile kapatılarak, monolit oluşumu için polimerizasyon işlemine alınmıştır. Termal başaltıcı serbest radikal polimerizasyonu sıcaklık kontrollü bir su banyosu içerisinde 50 °C sıcaklıkta, 24 saat süre ile yapılmıştır. Sentez sonrasında monolitten porojen karışımının ve dönüşmeyen monomerlerin uzaklaştırılması için hızı ayarlanabilir bir şırınga pompası kullanılarak monolitik kolon etanol ile 5 µL/dak akış hızında 6 saat süreyle yıkanmıştır.

Çizelge 3.3 Monolit Polimerizasyon Koşulları

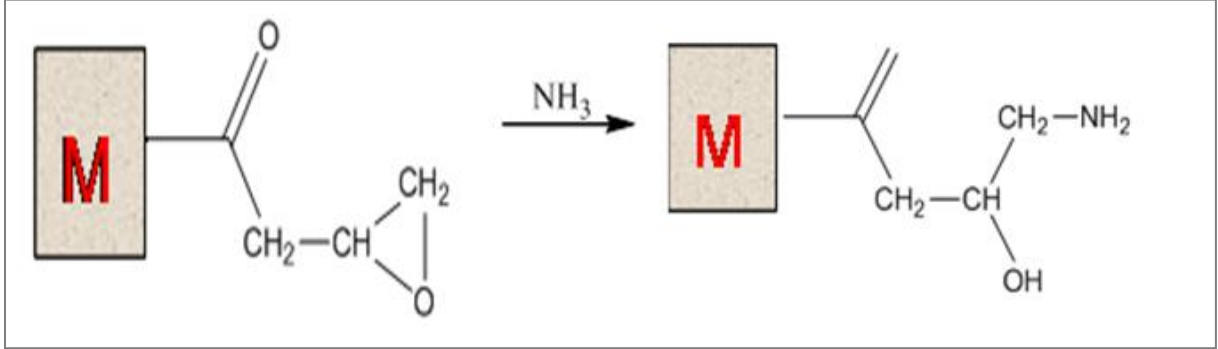
Fonksiyon	Bileşen	Miktar
Monomer	GMA	0.75 mL
Çapraz Bağlayıcı	EDM	0.25 mL
Mikro-gözenek yapıcı	Bütan Diol	1.2 mL
Makro- gözenek yapıcı	Propanol	1.5 mL
	Tampon	0.3 mL
Başlatıcı	AIBN	0.01 g
<b>Polimerizasyon Koşulları</b>		
Sıcaklık	50 ° C	
Polimerizasyon Süresi	24 saat	
Çalkalama Hızı	Yok	

### 3.2.2 Monolite glutaraldehit aktivasyonu ile enzim immobilizasyonu

#### 3.2.2.1 Aminasyon İşlemi

Poli(GMA-EDM) monolitinin aminasyon işlemi için önce % 25'lik amonyak çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan amonyak çözeltisi şırınga pompası vasıtasıyla kolondan 1 saat süre ile geçirilmiş ardından kolon sıcak su banyosuna alınmıştır. Sıcak su

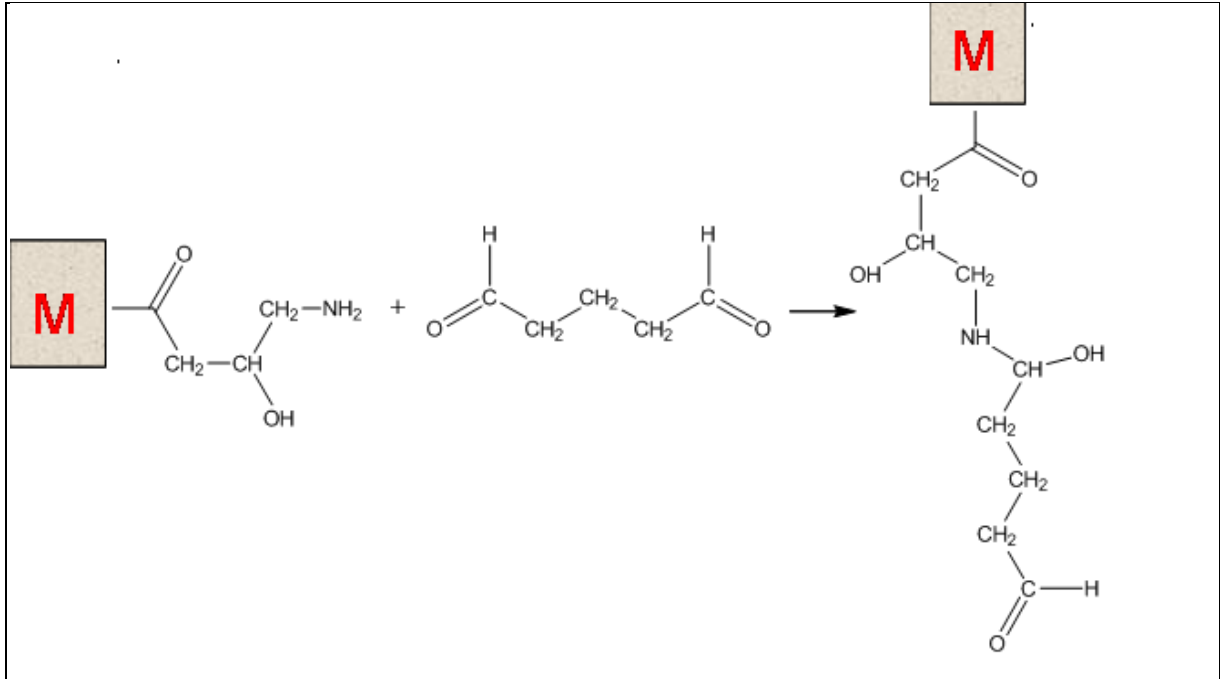
banyosunda kolon 50 °C'de 6 saat süre ile bekletilmiştir. Aminasyon sonrası kolon oda sıcaklığına soğutulmuş ardından distile deiyonize su ile 2 saat süre ile yıkanmıştır.



Şekil 3.8. Poli (GMA-EDM) monolitinin aminasyon reaksiyonu

### 3.2.2.2 Glutaraldehit aktivasyonu

Aminasyon sonrası kolon 0.05 M pH 7.8 borat tamponu ile yıkanmıştır. Ardından 1 mL 0.05 M pH 8.0 borat tamponu hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltinin içerisine 0.25 mL mL ağırlıkça % 50 glutaraldehit eklenmiştir.

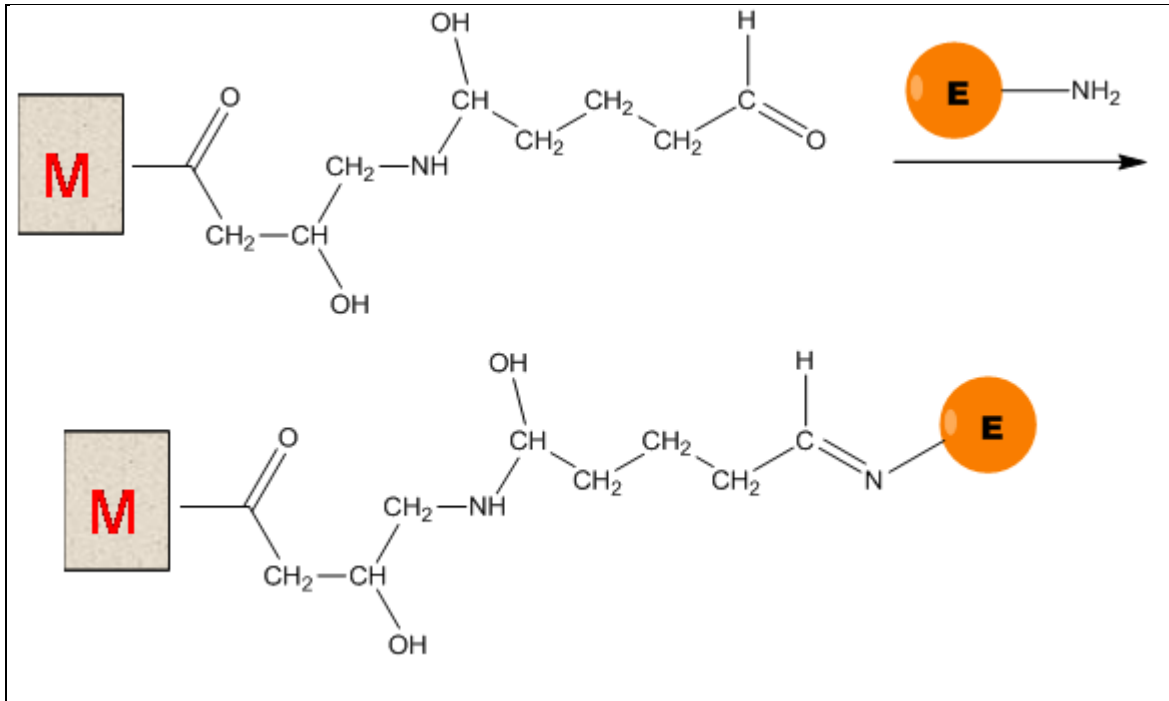


Şekil 3.9 Poli (GMA-EDM) monolitinin glutaraldehit aktivasyon reaksiyonu

Glutaraldehit aktivasyonu için hazırlanan bu karışım şırınga pompası vasıtasıyla 2 saat süre ile kolondan geçirilir. Ardından monolitik kolon a 24 saat 25 °C su banyosunda bekletilir. Aktivasyon sonrası monolitik kolon borat tamponu ile tekrar yıkanmıştır.

### 3.2.2.3 Enzim immobilizasyonu

5 mg  $\alpha$ -kemotripsin ve 2 mL borat tamponu karıştırılmıştır. Karışım +4 °C' de poli(GMA-EDM) monolitik kolonundan 2 saat süre ile geçirilmiş ve ardından son olarak kolon borat tamponu ile yıkanmıştır.

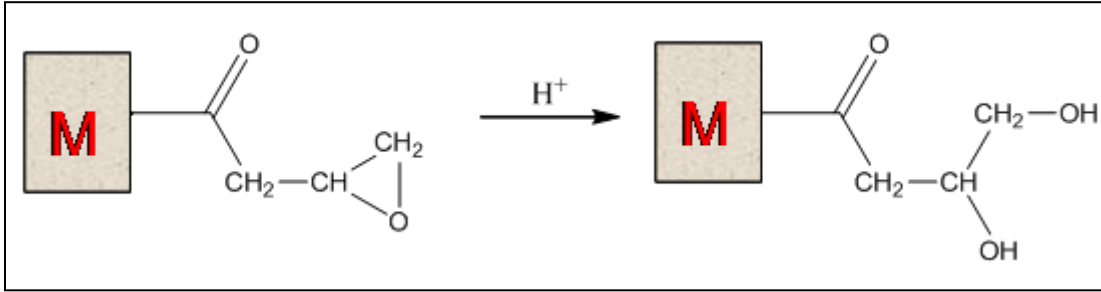


Şekil 3.10 Enzimin Poli(GMA-EDM) monolitine glutaraldehit aktivasyonu ile immobilize edilmesi

### 3.2.3 Monolite kolay bağlanma ile enzim immobilizasyonu

#### 3.2.3.1 Monolitin sülfirik asit ile hidrolizi

Hidroliz öncesi poli(GMA-EDM) monolitik kolonu 2 saat etanol ardında 1 saat su ile şartlandırılmıştır. Daha sonra 0.1 M sülfirik asit ve 5 mL saf su karıştırılarak homojen bir çözelti oluşturulur. Hazırlanan asitli çözelti kolondan en az 1 saat süre ile geçirilmiştir (En az kolon içinden 1 mL çözelti geçecek şekilde). Kolonun ucu septumlarla kapatılır ve 60 °C, 6 saat sıcak çalkalama olmadan su banyosunda bekletilir. Hidroliz aşamasından sonra kolon 1 saat saf su ile yıkanmıştır.

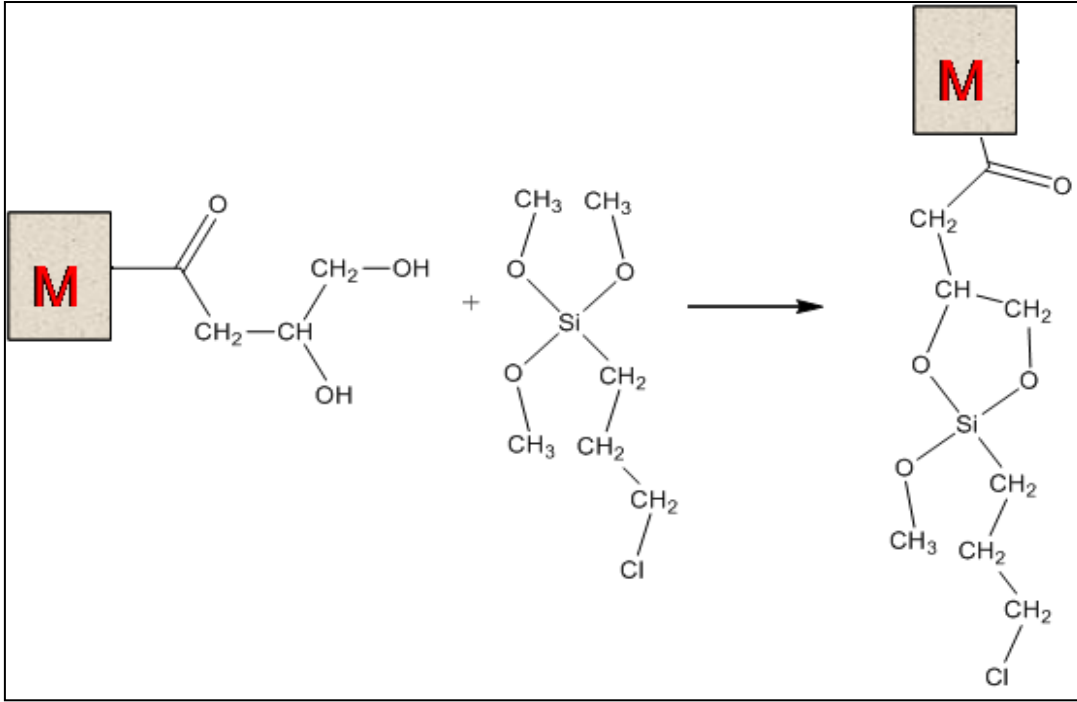


Şekil 3.11 Poli(GMA-EDM) monolitinin sülfirik asit ile hidroliz reaksiyonu ve poli(DHPM-EDM) monolitinin elde edilmesi

#### 3.2.3.2 Poli(DHPM-EDM) monolit yüzeyinde Cl grubu oluşturulması

Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonunun yüzeyine, kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS) hidroksil ve trimetoksisilan grupları arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanmıştır. CPTMS' nin partiküllere bağlanma reaksiyonu ve sonuçta elde edilen yapı da Şekil 3.12'de görülmektedir.

Bu işlem için kolon öncelikle 30 dakika etanol ardından 30 dakika toluen ile yıkanarak şartlandırılmıştır. Daha sonra kolon 0.4 mL CPTMS (kloropropil trimetoksi silan) 2 mL toluen içeren homojen çözelti ile 2 saat yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından kolon septumlarla kapatılmış ve 24 saat süre ile 25 °C sıcaklıkta su banyosunda bekletilmiştir. Böylece monolit yüzeyi klorlama işlemi gerçekleşmiş olmaktadır.

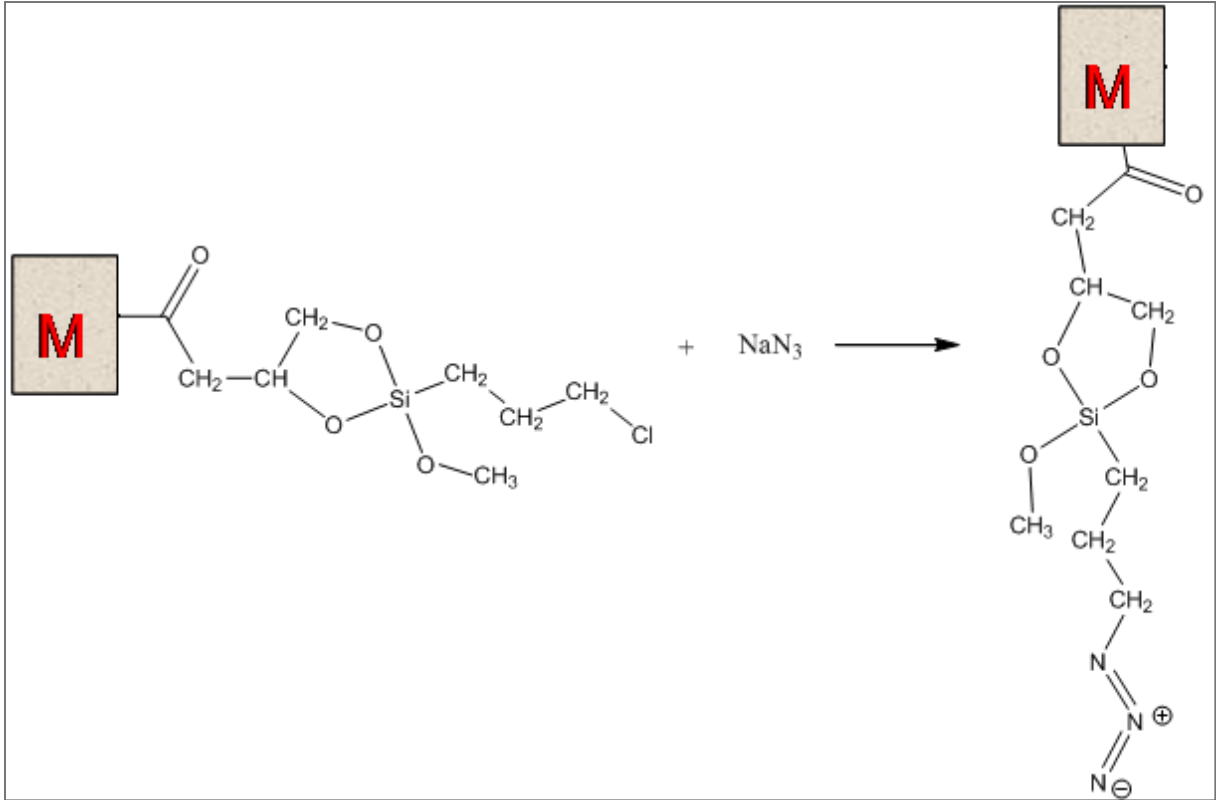


Şekil 3.12 Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonunun kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS) ile reaksiyonu

### 3.2.3.3 Poli(DHPM-EDM) monolit yüzeyine azid bağlanması

Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonunun yüzeyine azid bağlama işlemi yerdeğiştirme reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla monolitik kolon DMF ile 30 dakika süre yıkılarak şartlandırılmıştır.

Bu işlem için 0.125 g sodyum azid, 2.5 mL DMF, 1.25 mg TBAI (tetrabutyl amonyum iodad) 1.5 mL su içeren azid çözeltisi hazırlanmış ve poli(DHPM-EDM) kolonundan azidli çözelti 2 saat süre ile geçirilmiştir. Yıkama işleminin ardından kolon septumlarla kapatılmış ve 24 saat süre ile 80 °C sıcaklıkta su banyosunda bekletilmiştir. Böylece monolit yüzeyi azidleme işlemi gerçekleşmiş olmaktadır (Şekil 3.13). Ertesi gün işlemin bitiminde ortamda bulunan bağlanmamış azidlerin ortamdaki uzaklaştırılması için kolon 30 dakika süre ile DMF ile yıkanmıştır.



Şekil 3.13 Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonun sodyum azid ile reaksiyonu

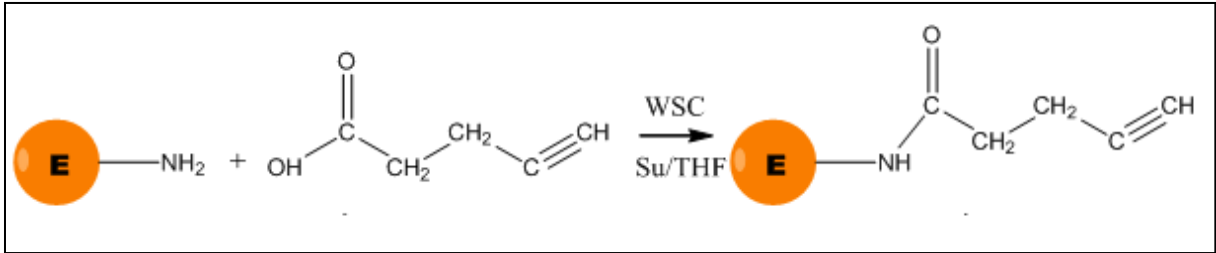
### 3.2.3.4 Diyaliz membranı aktifleştirme

Diyaliz işlemini yapabilmek için önce diyaliz membranının aktifleştirilmesi gerekmektedir. Bunun için öncelikle diyaliz membranı 15 dakika süreyle saf suyun içine bırakılır. 80 °C' de 100 mL saf suda 0.3 g sodyum sülfat çözülür. Hazırlanan bu çözelti membran içerisinde çözeltinin tamamı bitene kadar geçirilmiştir. Daha sonra 60 °C' de 100 mL sıcak su geçirilir. 0.2 mL sülfirik asit 100 mL suda çözünür ve hazırlanan çözelti bitene kadar membrandan geçirilir. Son olarak 60 °C' de 100 mL sıcak su membrandan geçirilerek tekrar sıcak su ile yıkama işlemi yapılmış olur. Bu işlemler sonunda membran içinde kalan asidin uzaklaşması için membran bir gün süreyle içinde saf suda bekletilmiş ve içinde kalan asidin tamamı difüzyon yolu ile uzaklaştırılmıştır.



### 3.2.3.5 $\alpha$ -Kemotripsin enzimine alkin fonksiyonel grubu bağlanması

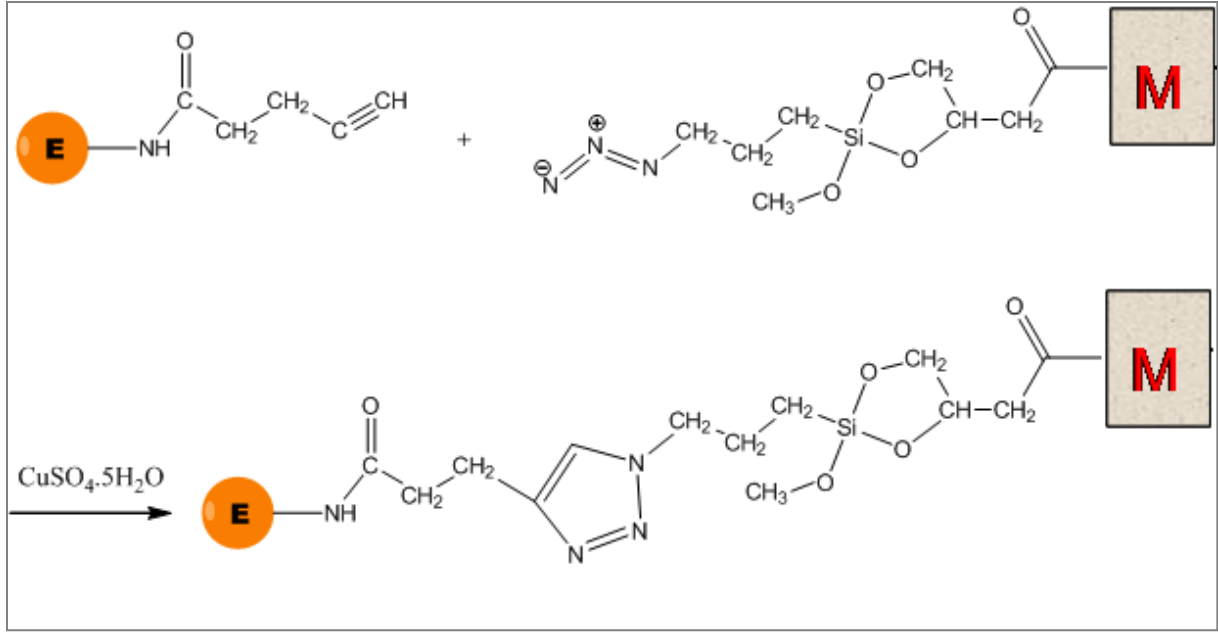
16 mg WSC (EDC), 8mL 10 mM pH 7 fosfat tamponu, 40 mg kemotripsin, 8 mg pentionik asit sırasıyla çözülmüştür. Daha sonra ortam pH 7'ye ayarlanıp buzdolabında (+4 °C sıcaklıkta) 6 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra önceden aktive edilmiş membranın içine yerleştirilir ve 20 saat süre ile alkin bağlı kemotripsin membranın içinde tutulur. Enzime bağlanmamış alkin grupları ortamdan uzaklaştırılmış olur.



Şekil 3.14. Enzim - pentionik asit reaksiyonu

### 3.2.3.6 Kataliz işlemi

Kataliz reaksiyonu, azid bağlı poli(DHPM-EDM) monoliti ile alkin bağlı  $\alpha$ -kemotripsin enzimini birbirine bağlayan ve literatürde kolay bağlanma olarak bilinen reaksiyondur. Bakır katalizli olarak gerçekleşir. Öncelikle 10 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 50 mM askorbik asit, 5 mL, 20 mM fosfat tamponu (pH 7) içerisinde çözümlenerek kataliz çözeltisi hazırlanır. Ardından 2 mL enzim içeren çözelti ile 0.2 mL kataliz çözeltisi olmak üzere kataliz çözeltisi ile membrandan çıkan  $\alpha$ -kemotripsin çözeltisi karıştırılır. Poli(DHPM-EDM) monolitik kolonun içerisinde 6 saat süre ile geçirilmek suretiyle reaksiyona sokulur. Böylece enzim immobilize edilmiş poli(DHPM-EDM) monolitik kolonu elde edilmiş olur.



Şekil 3.15 Azid bağlı Poli(DHPM-EDM) monoliti ile alkin bağlı  $\alpha$ -kemotripsin enzimi arasında gerçekleşen bakır katalizli klik reaksiyonu

### 3.2.4 Kromatografik çalışmalar

Glutaraldehit aktivasyonu ve kolay bağlanma metodu ile sentezlenen M-GA ve M-CC monolitik kolonlarının kromatografik çalışmaları  $\mu$ HPLC'de (mikro-yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan monolitik kolonlar (200mmx530  $\mu$ m ID)  $\mu$ HPLC sisteminde izokratik moda, substrat içeren uygun mobil faz varlığında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle enzim-substrat reaksiyonu değişkin ve yatışkın durumda sürekli olarak izlenmiştir. Kromatografik çalışmalarda akış hızı, substrat derişimi, sıcaklığın substrat dönüşümüne etkisi incelenmiştir

#### 3.2.4.1 $\mu$ HPLC-IMER sistemi

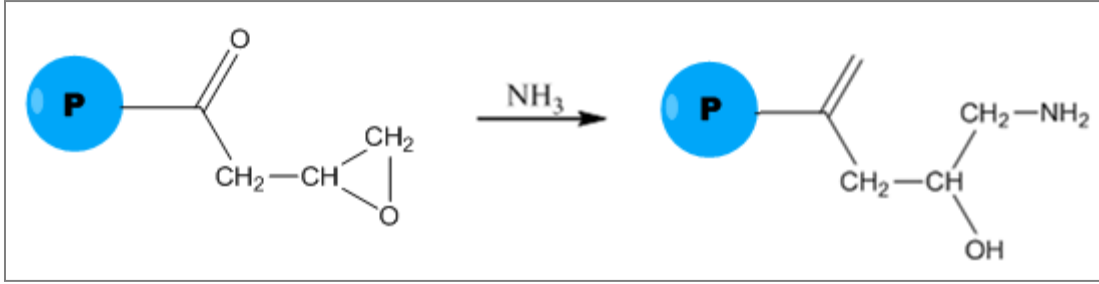
Bu çalışmada kullanılan sistem Dionex Ultimate 3000 (Dionex, A.B.D.)  $\mu$ HPLC ve Nano-LC sistemidir. Bu sistem enjeksiyon ünitesi olarak kullanılan Ultimate 3000 Autosampler (Dionex, A.B.D.), pompa olarak kullanılan Ultimate 3000 Pump (Dionex, A.B.D.), sıcaklık kontrolü için kullanılan Ultimate 300 Flow Manager

(Dionex, A.B.D.) ve UV dedektör olarak kullanılan Ultimate 3000 Variable Wavelength Detector (Dionex, A.B.D.) oluşmaktadır.

### 3.3 Partikül Bazlı $\mu$ HPLC-IMER için Kolon Materyallerinin Üretimi

#### 3.3.1 Aminasyon reaksiyonu

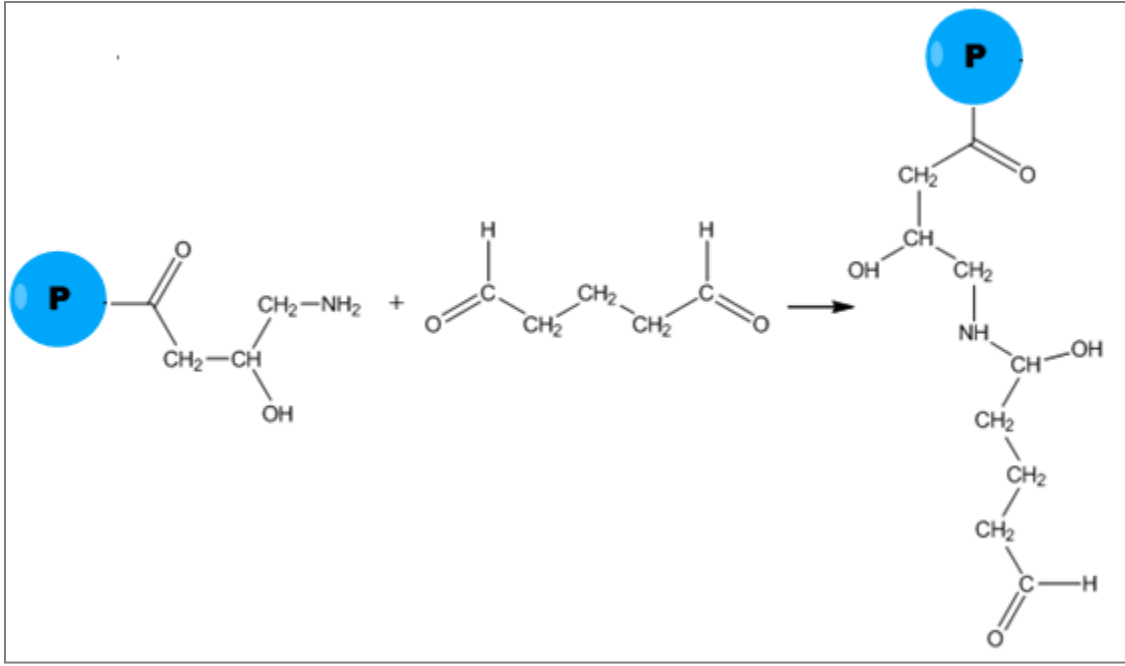
Tez çalışmasının ilk bölümünde sentezlenmiş olan epoksi fonksiyonel grubu taşıyan makro gözenekli partiküller poli(GMA-EDM) (1.5 g) 20 mL % 25 lik amonyak çözeltisine alınmıştır. Hazırlanan karışım sızdırmaz kapaklı pyrex reaktöre alınıp oda sıcaklığında bulunan çalkalamalı su banyosuna koyulmuştur. Çalkalama hızı 100 cpm hıza ayarlanıp reaksiyon sıcaklığı da 50 °C ye ayarlanmıştır. Aminasyon işlemi bu sıcaklıkta 24 saat sürdürülmüştür. Reaksiyon sonunda reaktör oda sıcaklığına soğutulup PH değeri 7 oluncaya kadar distile deiyonize su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.16 Poli(GMA-EDM) partiküllerin aminasyon reaksiyonu

#### 3.3.2 Glutaraldehit aktivasyonu

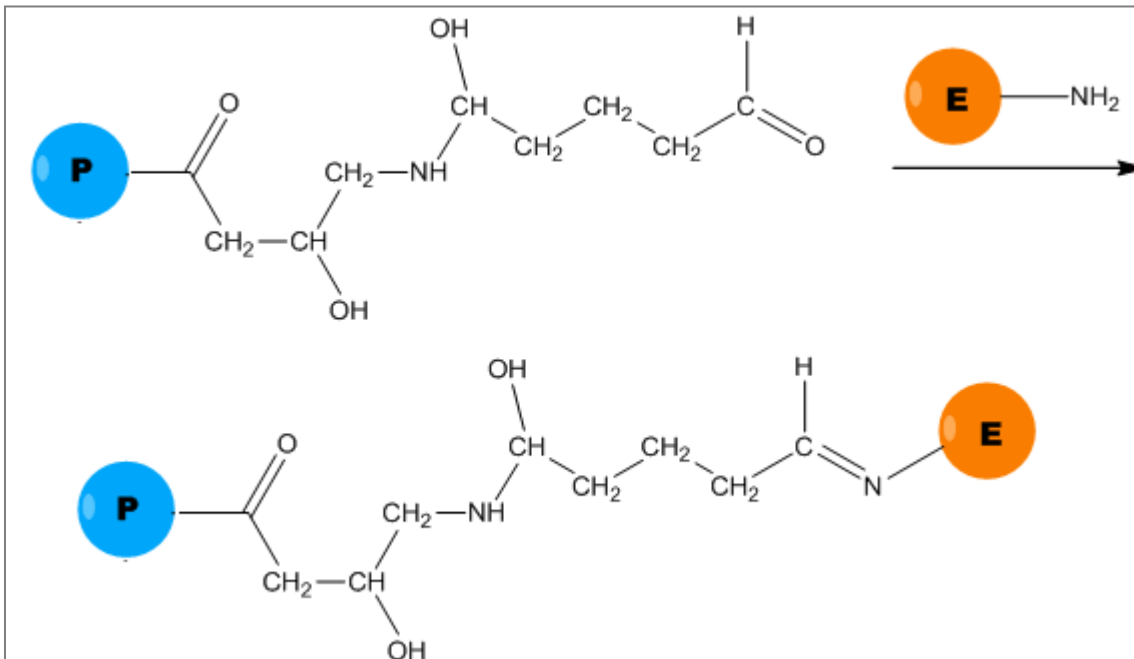
Aminasyon sonrası partiküller (1.5 g) 5 kez 0.05 M pH 7.8 borat tamponu ile yıkanmıştır. Ardından yıkanan partiküller yine 50 mL pH 7.8, 0.05 M borat tamponu içerisinde dispers edilmiştir. Hazırlanan bu karışımın içine 3 mL glutaraldehit çözeltisi (ağırlıkça % 50) glutaraldehit eklenmiştir. Glutaraldehit aktivasyonu oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı 30 dakika süre ile yürütülmüştür. Aktivasyon reaksiyonundan sonra partiküller borat tamponu ile 5-6 kez yıkanmıştır.



Şekil 3.17 Poli(GMA-EDM) partiküllerin glutaraldehit aktivasyonu

### 3.3.3 Enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon işlemi için pH 7.8 borat tamponunda olan 1.5 g partikül 50 mL tamponda dispers edildikten sonra üzerine 3 mg  $\alpha$ -kemotripsin eklenmiştir.



Şekil 3.18 Partiküllere enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon işlemi +4 °C de 300 rpm de 24 saat süre ile yürütülmüştür. İmmobilizasyon işleminin ardından serbest kalan enzimin tamamını uzaklaştırmak için 5 kez pH 7.8 borat tamponu ile yıkanmıştır. Son olarak yine borat tamponunda dispers edilerek buzdolabında saklanmıştır.

### **3.3.4 Kromatografik çalışmalar**

Glutaraldehit aktivasyonu ile partikül bazlı geliştirilen P-GA immobilize enzim reaktörü için kromatografik çalışmalar mikro-yüksek performanslı sıvı kromatografisinde yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan monodispers-makro gözenekli mikroküreler, µHPLC kolonlarına (100x1.0 mm ID) yüksek basınç altında doldurulmuş ve µHPLC sisteminde izokratik moda, substrat içeren uygun mobil faz varlığında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle enzim-substrat reaksiyonu değişkin ve yatışkın durumda sürekli olarak izlenmiştir. Kromatografik çalışmalarda akış hızı ve substrat derişiminin substrat dönüşümüne etkisi incelenmiştir.

#### **3.3.4.1 µHPLC-IMER kolonlarının doldurulması**

Sentezlenen enzim immobilize poli(GMA-EDM) mikroküreleri pH 7.8 borat tamponunda dispers edilip +4 °C' de saklanmıştır. Tez kapsamında mikroküreleri doldurma işlemi için standart paslanmaz çelikten 100x1.0 mm GPC µHPLC kolonu kendi imkanlarımızla üretilmiştir. Dolum işlemi normal HPLC sisteminde 220 atm basınç altında gerçekleştirilmiştir. Dolum esnasında kolonun bir ucu frit ile kapatılıp sıkılmış, açık olan ucundan tamponda dispers edilmiş partiküller şırınga yardımı ile kolona doldurulmuştur. Bu işlemin ardından HPLC kolonunun diğer ucu da frit ile kapatılıp HPLC sistemine bağlanmıştır. Sistemden mobil faz olarak pH 7.8 borat tamponu geçirilmiştir. Basınç 220 atm oluncaya kadar akış hızı artırılmış ve istenilen basınca ulaşıldığı andan itibaren 20 dakika süreyle deney sürdürülmüştür. Böylece kolon içindeki partiküllerin kolon içerisine yerleşmesi ve sıkışması sağlanmıştır. Bu işlemler sayesinde kolonun üst kısmında meydana gelen boşluk, kolonun üst kısmı açılıp yeni partikül ilavesi ile doldurulmuştur. Bu işlem hiç boşluk kalmayınca kadar tekrarlanmıştır. Son basamakta kolon HPLC cihazına ters yönden bağlanarak akış

ters yönde uygulanmış ve her iki yönden yüksek basınca maruz bırakılan partiküllerin kolon içinde tamamen yerleşmeleri sağlanmıştır.

#### **3.3.4.2 µHPLC-IMER sistemi**

Bu çalışmada kullanılan sistem Dionex Ultimate 3000 (Dionex, A.B.D.) µHPLC ve Nano-LC sistemidir. Bu sistem enjeksiyon ünitesi olarak kullanılan Ultimate 3000 Autosampler (Dionex, A.B.D.), pompa olarak kullanılan Ultimate 3000 Pump (Dionex, A.B.D.), sıcaklık kontrolü için kullanılan Ultimate 300 Flow Manager (Dionex, A.B.D.) ve UV dedektör olarak kullanılan Ultimate 3000 Variable Wavelength Detector (Dionex, A.B.D.) oluşmaktadır.

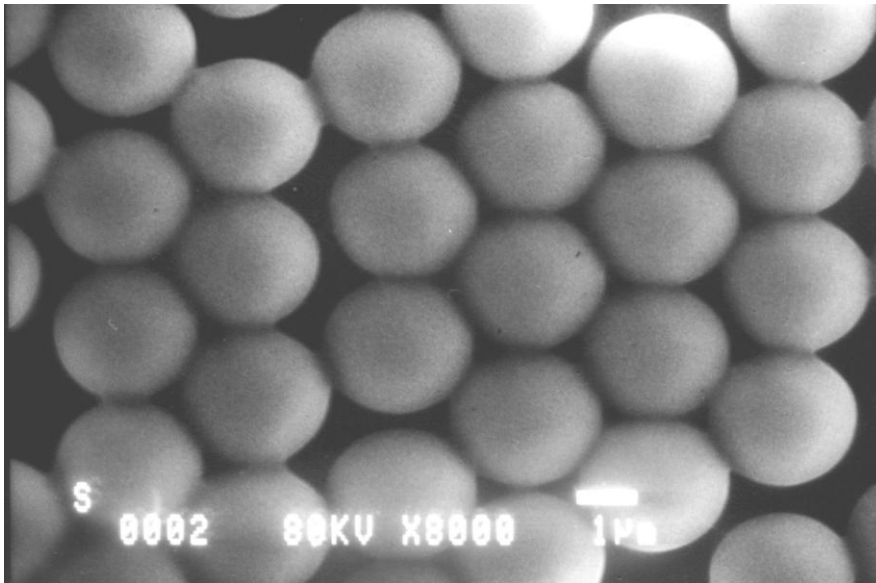
## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında kolay bağlanma ve glutaraldehit aktivasyon yöntemleri ile monodispers-gözenekli partikül bazlı ve monolitik immobilize enzim reaktörleri (Immobilized Enzyme Reactor, IMER) geliştirilmiş bu reaktörlerin HPLC ve  $\mu$ HPLC sistemlerinde kinetik davranışı tanımlanmıştır.

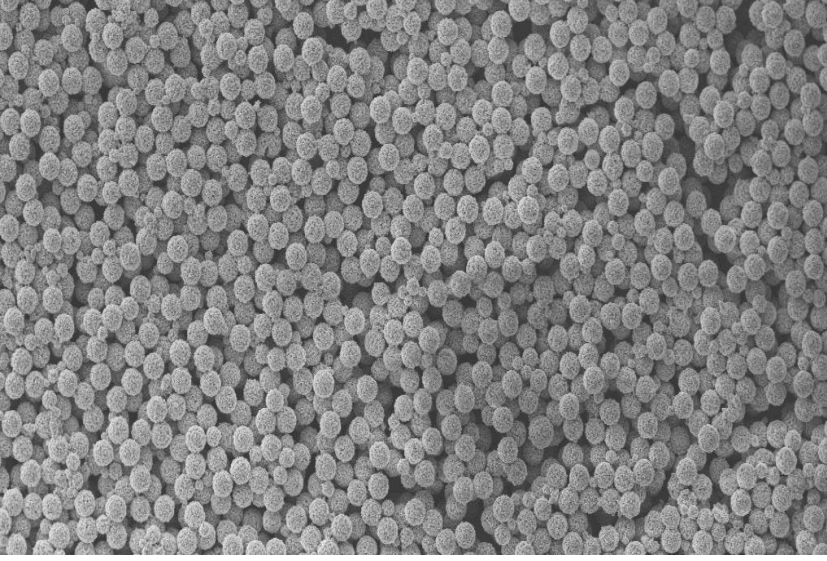
### 4.1. Kolay bağlanma İle Partikül Bazlı HPLC-IMER Geliştirilmesi Ve Kinetik Karakterizasyonu

#### 4.1.1 Poli(DHPM-EDM) partiküllerin karakterizasyonu

Monodispers-gözenekli partiküllerin sentezinde çıkış lateksi olarak dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile elde edilen polistiren lateks kullanılmıştır. Polistiren lateksin boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafı Şekil 4.1'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi IMER sentezinde kullanılan çıkış partikülleri monodispers formdadır. SEM fotoğrafı kullanılarak, lateksin boy dağılımı için değişim katsayısı % 2.4 ortalama partikül çapıda 2.4  $\mu$ m olarak tayin edilmiştir. IMER sentezinde kullanılacak partiküllerin monodispers olması için kullanılacak çıkış partiküllerinin de monodispers olması gerekmektedir.

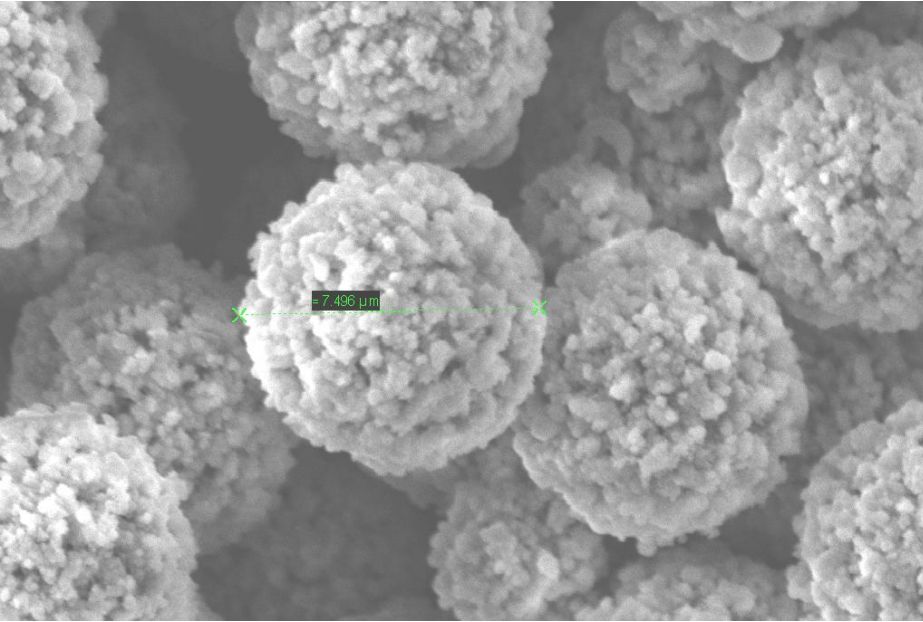


Şekil 4.1 Polistiren çıkış lateksinin boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafı



Şekil 4.2 Poli(DHPM-EDM) partiküllerinin morfolojisi ve boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafları, Büyütme: 891X

IMER için sentezlenen poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait boy dağılımını gösteren taramalı elektron mikroskop fotoğrafı Şekil 4.2'de verilmektedir.

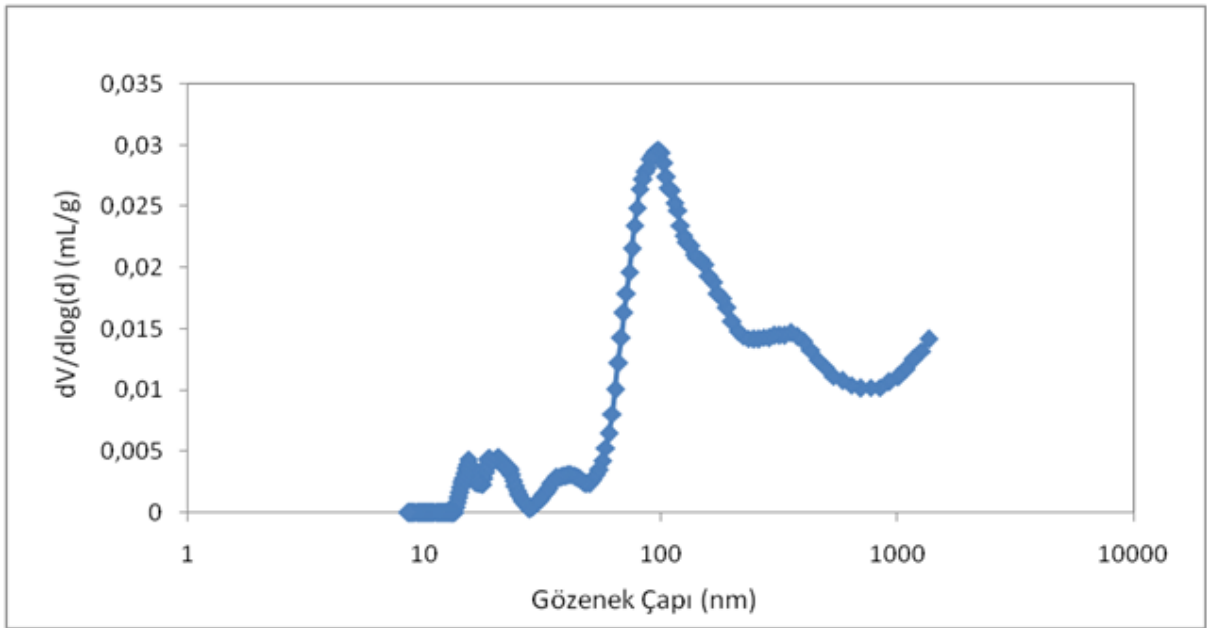


Şekil 4.3 Poli(DHPM-EDM) partiküllerinin morfolojisi yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları, Büyütme: 11300 X



Partiküllerin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafı da Şekil 4.3'de verilmiştir. Partiküllerin yüksek büyütme oranı ile alınan SEM fotoğrafından yüzeylerinin makrogözenekli yapıda olduğu açıkça görülmektedir. Bu fotoğraf kullanılarak ortalama partikül çapı 7.5 µm hesaplanmıştır.

Partiküllerin gözenek özelliklerinin bulunması için çeşitli ölçümler yapılmıştır. Bu ölçümlerde gözenek boyutu civa porozimetresi ile özgül yüzey alanı BET yöntemi ile bulunmuştur. Partiküllerin özgül yüzey alanı değerine en büyük katkıyı küçük boyutlu gözenekler sağlamaktadır. BET yönteminde de düşük molekül ağırlıklı bir ölçüm aracı (azot gazı) kullanılmakta ve mikro-gözenek fraksiyonuna duyarlı olması sebebiyle tüm gözeneklerin özgül yüzey alanına katkısı sağlıklı bir şekilde tespit edilebilmektedir. Yapılan BET analizinde özgül yüzey alanı 28.54 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur.

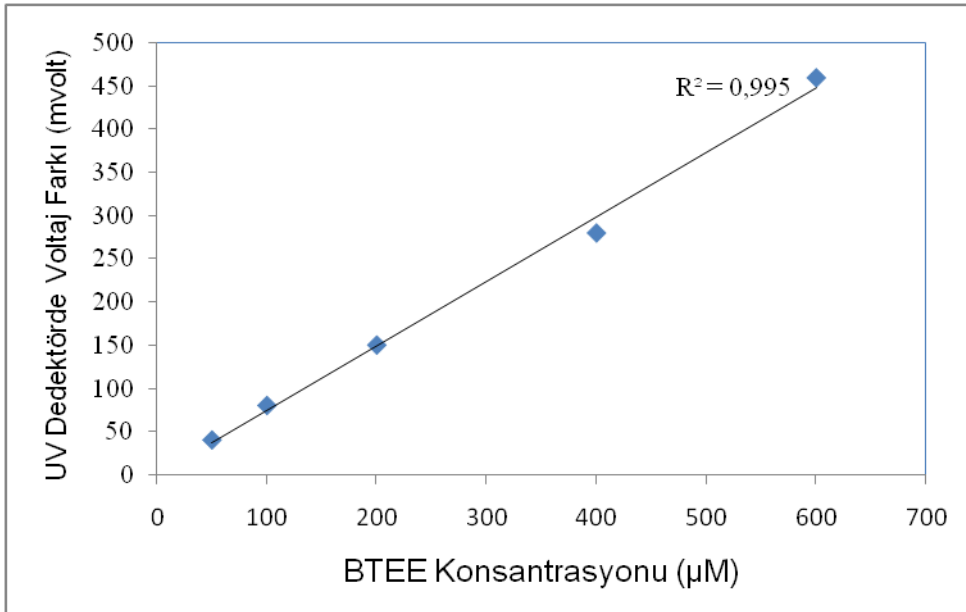


Şekil 4.4 Civa porozimetre ile elde edilen poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait gözenek dağılım grafiği.

Civa porozimetresi kullanılarak elde edilen gözenek dağılım grafiği şekil 4.4'de görülmektedir. Gözeneklerin çoğu 60-220 nm aralığında toplanırken ortalama gözenek boyutu 95 nm olarak bulunmuştur.

#### 4.1.2 Kromatografik çalışmalar

Öncelikle kesikli sistemde serbest enzim deneyleri yapılmıştır. Serbest enzim deneyleri her bir substrat derişimi için kesikli reaktörde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde 0.025 mg/mL derişime sahip serbest enzim kullanılmıştır. Serbest enzim deneylerinde reaksiyon hacmi 40 mL olup, % 95 borat tamponu ve % 5 etanol içermektedir. Burada amaç BTEE'nin tamamı  $\alpha$ -kemotripsin tarafından BT'e dönüştürüldüğünde UV dedektörden okunacak voltaj değeri ile sadece BTEE'nin oluşturduğu voltaj değeri arasındaki farkın belirlenmesidir. Bu fark daha sonra immobilize enzim ile BTEE dönüşümünün belirlenmesi için referans olarak kullanılmıştır. Bu nedenle serbest kemotripsin ile farklı BTEE başlangıç derişimleri kullanılarak, her bir BTEE derişimi için deney öncesinde ve sonrasında HPLC'nin UV-dedektörü ile 258 nm' de voltaj değeri belirlenmiştir. Bu amaçla reaksiyon ortamının kendisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Enzim-substrat reaksiyonu 50, 100, 200, 400 ve 600  $\mu$ M substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş ve BTEE başlangıç derişimi ile tam substrat dönüşümünde elde edilen voltaj farkının değışimi şekil 4.5'de verilmiştir. Grafiğe göre UV dedektörde okunan voltaj farkı BTEE başlangıç derişimi ile doğrusal bir şekilde artmaktadır.

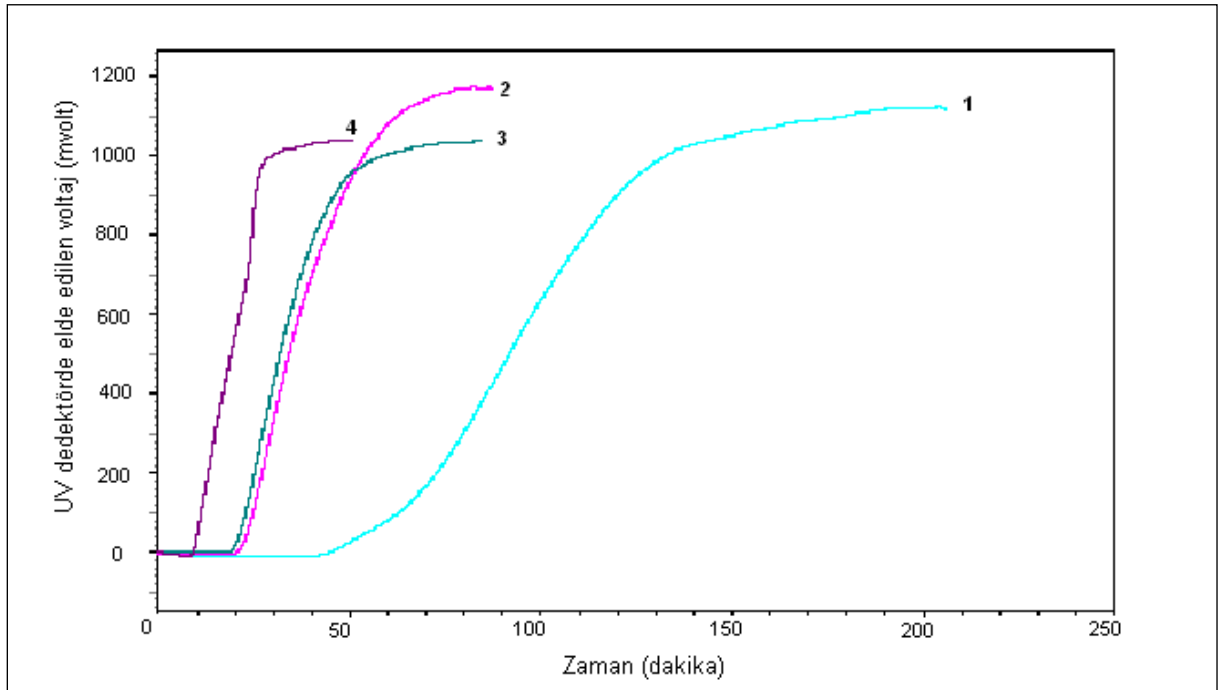


Şekil 4.5 Serbest enzim için voltaj farkının BTEE başlangıç derişimi ile değışimi

Tez kapsamında ilk olarak kolay bağlanma metodu ile sentezlenen partikül bazlı immobilize enzim reaktörü P-CC kodu ile tanımlanmıştır. P-CC kodlu partikül bazlı kolonda, immobilize enzimin performansının belirlenebilmesi amacıyla mobil faz akış hızı, substrat besleme derişimi ve sıcaklığın substrat dönüşümüne etkisi incelenmiş, ve P-CC kolonunun kullanım kararlılığı ve geçirgenlik davranışı tanımlanmıştır.

#### 4.1.2.1 Akış hızı etkisi

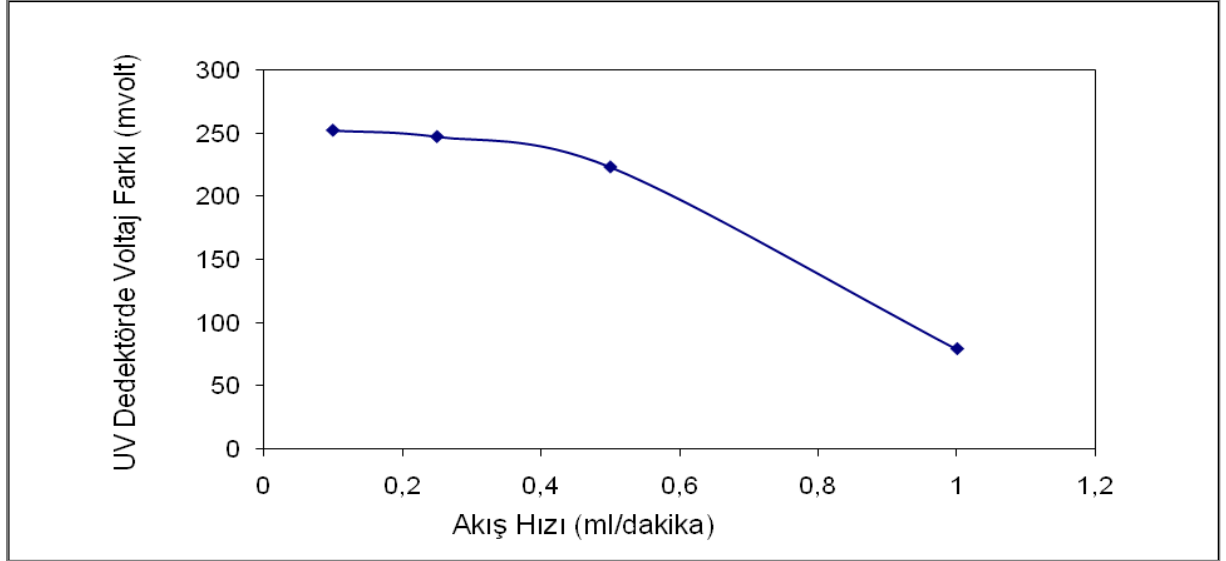
Kolay bağlanma yöntemi ile enzim immobilize edilmiş partiküller kolonlara doldurulmuş ve öncelikle reaktörün kinetik davranışına mobil faz akış hızının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla HPLC sisteminde 20 °C sıcaklıkta, 400 µM BTEE başlangıç derişimi kullanılarak akış hızı 0.1- 1.0 mL/dakika aralığında değiştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. Poli(DHPM-EDM) partikülleri içeren kolonda farklı akış hızlarında dedektör voltaj değerinin zamanla değişimi. HPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 20 °C, Kolon boyutları: 50x4.6 mm ID. Akış hızı (mL/dakika) 1) 0.10, 2) 0.25, 3) 0.50, 4) 1.00

Şekil 4.6'da verilen voltaj-zaman eğrilerinde iki ayrı faz görülmektedir. Görülen birinci faz voltaj değerinin zamanla sürekli artış gösterdiği değişkin durum periyodudur. Bu

fazda çıkış akımının voltaj değeri ve bu değerin orantılı olduğu substrat dönüşümü sürekli artmaktadır. İkinci fazda çıkış akımının voltaj değeri ve dolayısıyla substrat dönüşümü zamanla sabit kalmaktadır. Bu faz immobilize enzim reaktörü için yatışkın durum periyodunu ifade etmekte ve yatışkın durumla sabit bir dönüşüm ile elde edilen sabit voltaj değeri çıkış akımı için okunmaktadır. Akış hızı arttıkça ikinci faza yani substrat dönüşümünün sabit kaldığı faza daha kısa sürede ulaşılmaktadır.

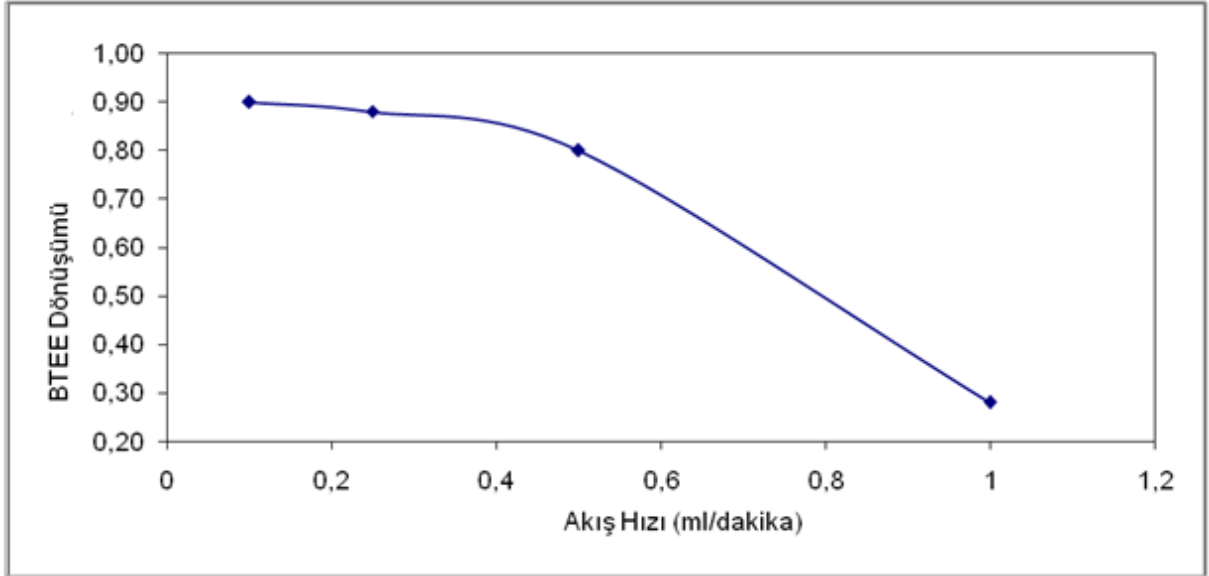


Şekil 4.7 Poli (DHPM-EDM) partiküller için UV dedektördeki voltaj farkının akış hızı ile değişimi.

Şekil 4.7'de çıkış akımı voltaj değeri ile dönüşmemiş substrat çözeltisinin voltaj değeri arasındaki fark akış hızına karşı grafiğe alınmıştır. Bu fark değeri HPLC-IMER reaktöründe oluşan dönüşümle orantılıdır. Herbir BTEE başlangıç derişimi için elde edilen voltaj farkı serbest enzim ile tam dönüşüme karşı gelen voltaj farkına oranlanarak karşı gelen BTEE dönüşümü hesaplanmıştır. 400  $\mu$ m BTEE besleme derişimi için BTEE dönüşümünün akış hızı ile değişimi Şekil 4.8'de verilmektedir.

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 incelendiğinde akış hızı değeri arttıkça daha düşük voltaj farkı ve dolayısıyla daha düşük BTEE dönüşümünün elde edildiği görülmektedir. Bunun nedeni akış hızının artmasıyla substratın kolon içerisindeki alıkonma süresinin azalmasıdır. Alıkonma süresinin azalmasıyla BTEE'nin immobilize enzimle etkileşim

süresi azalmakta, enzim-BTEE etkileşimi zorlaşmakta ve BTEE dönüşümü düşmektedir.



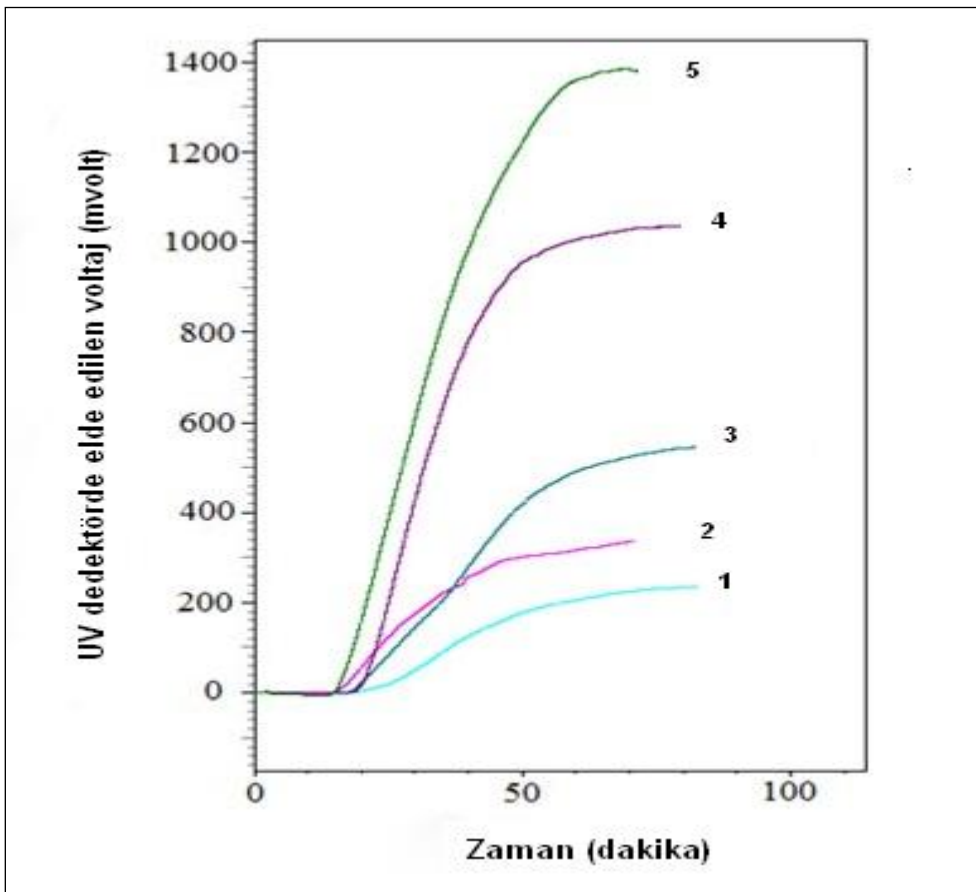
Şekil 4.8 Poli (DHPM-EDM) partiküller için BTEE dönüşümünün akış hızı ile değişimi

En yüksek BTEE dönüşümüne en düşük mobil faz akış hızı olan 0.1 mL/dakika değerinde ulaşılrken elde edilen dönüşüm % 90 olarak tespit edilmiştir. Akış hızı 1 mL/dakika değerine kadar arttırıldığında dönüşümün % 28 değerine kadar düştüğü görülmektedir. Yatışkın duruma ulaşma süresinin artan substrat besleme hızıyla azaldığı görülmektedir. HPLC-IMER reaktörünün çalışma prensibinin büyük olasılıkla aşağıda tanımlandığı gibi olduğu düşünülmektedir. Proses başlangıcında kolon materyali üzerine substrat adsorbe olmakta ve immobilize enzim ile etkileşim başlamaktadır. Destek materyali beslemenin yapıldığı alt uçtan başlayarak, substrat ile doymaya devam etmekte ve substrat ile doymuş kolon fraksiyonu zamanla artmaktadır. Kolon materyali substrat ile tamamen doyduktan sonra destek materyali üzerinde oluşan ürün, kolondan desorbe olmaya başlamaktadır. Bu nokta voltajın artış göstermeye başladığı zaman değeridir. Kolon içerisinde ürün oluşum hızının artmasıyla birlikte çıkış akımının voltaj değeri artış göstermektedir. Yatışkın durum periyodunda substratın dolgu materyali üzerine mobil fazdan adsorpsiyon hızı, kolon materyali üzerindeki substrat dönüşüm hızıyla dengelenmiş durumdadır. Bu nedenle

çıkış akımındaki ürün (BT) ve substrat (BTEE) derişimleri ve dolayısıyla çıkış akımının voltaj değeri sabit kalmaktadır.

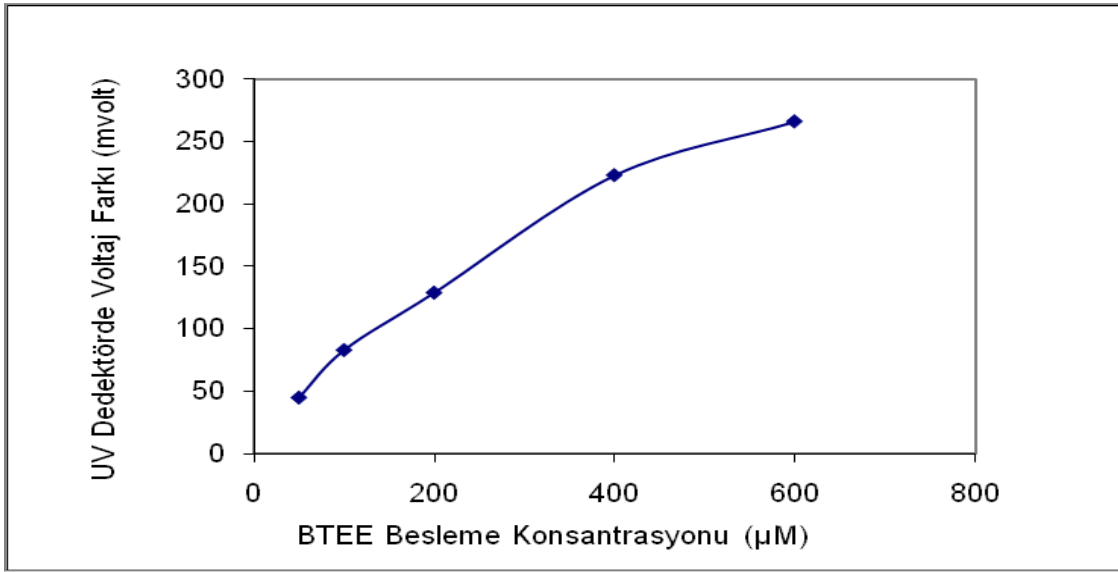
#### 4.1.2.2 Substrat konsantrasyonu etkisi

Partikül bazlı P-CC kolonunda, substrat olarak kullanılan Benzoil-L-tirosinetil ester (BTEE) başlangıç derişiminin dönüşüme etkisi, 0.5 mL/dakika mobil faz akış hızı kullanılarak 20 °C sıcaklıkta incelenmiştir. Deneylerde % 95 borat tamponu, % 5 etanol içeren pH 7.8 değerine sahip BTEE çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır.



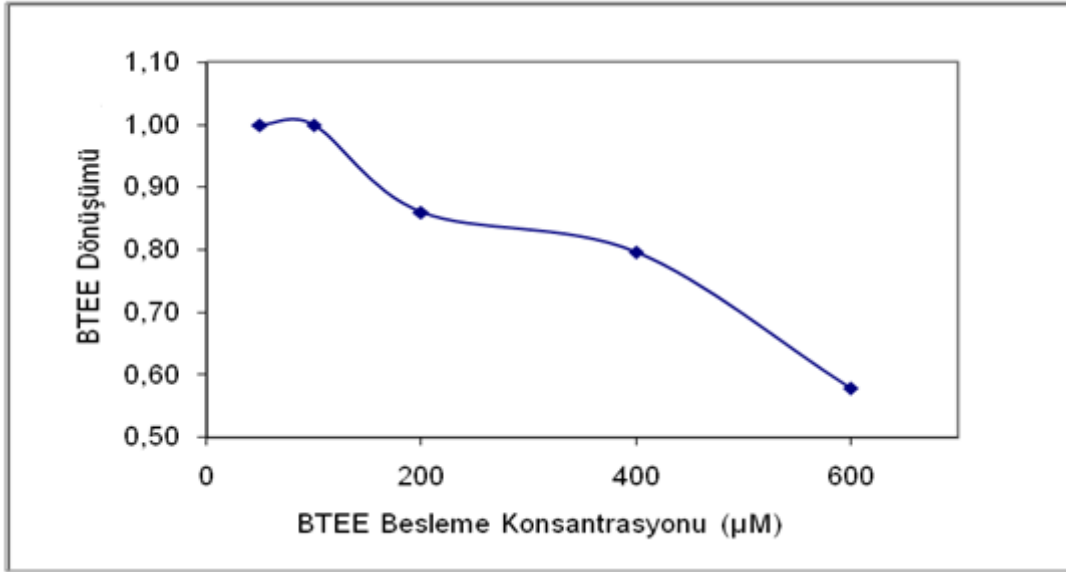
Şekil 4.9 Poli(DHPM-EDM) partikülleri içeren kolonda farklı substrat besleme derişimlerinde elde edilen voltaj-zaman eğrileri. HPLC sistemi, Akış hızı 0,5 mL/dakika, Sıcaklık 20 °C, Kolon boyutları: 50x4.6 mm ID. BTEE derişimi (µM) : 1) 50, 2) 100, 3) 200, 4) 400, 5) 600.

BTEE derişiminin dönüşüme etkisini incelemek amacıyla 50, 100, 200, 400 ve 600  $\mu\text{M}$  BTEE çözeltileri kullanılmıştır. Şekil 4.9 da görüldüğü üzere BTEE derişimi arttıkça UV dedektörde elde edilen yatışkın durum voltaj sinyali de artış göstermiştir. Akış hızı her bir konsantrasyon değerinde aynı olduğu için voltaj değeri her bir konsantrasyon değeri için yaklaşık olarak aynı sürede artış eğilimine başlamıştır. Fakat her eğri için kullanılan BTEE başlangıç derişimi ile doğru orantılı olarak artan farklı bir voltaj değerinde yatışkın duruma ulaşılmıştır.



Şekil 4.10 Farklı BTEE besleme konsantrasyonlarına karşı elde edilen UV dedektör voltaj farkı değerleri.

Her bir BTEE besleme konsantrasyonu için kolon içermeyen, kapalı devre HPLC sistemine yine 0.5 mL/dakika akış hızı ile substrat çözeltisi gönderilerek dönüşmeyen substrat çözeltileri için ulaşılan voltaj plato değerleri kaydedilmiş ve Şekil 4.9 daki yatışkın durum voltaj plato değerlerinden çıkarılarak BTEE besleme derişimine karşı grafiğe alınmış ve Şekil 4.10 elde edilmiştir. Şekil 4.10'da BTEE başlangıç derişiminin artmasıyla UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerinin arttığı gözlemlenmektedir. Voltaj farkı değerleri kullanılarak hesaplanan BTEE dönüşümleri Şekil 4.11'de verilmektedir.



Şekil 4.11 Farklı BTEE besleme derişimlerinde karşı elde edilen BTEE dönüşüm değerleri

Şekil 4.11 incelendiğinde düşük BTEE besleme derişimlerinde dönüşümün tam olarak gerçekleştiği görülmektedir. BTEE besleme derişimi arttıkça dönüşüm azalmakta ve 600 µM değerinde % 58'e kadar düşmektedir. Yüksek BTEE derişimlerinde tam dönüşümün elde edilememesinin nedeni BTEE'nin kolon içerisindeki alıkonma süresinin BTEE'nin partikül içi difüzyon tarafından kontrol edilen prosesle tamamiyle dönüştürülmesi için yeterli olmamasıdır.

Gerçekleşen enzim substrat reaksiyonunun  $V_m$  ve  $K_m$  değerlerinin bulunması için Michaelis- Menten eşitliğinden faydalanılmıştır.

Yatışkın durumda, kemotripsin immobilize edilmiş HPLC kolonunda  $\Delta W$  diferansiyel kütlede BTEE için kütle denklığı şu şekilde yazılabilir:

$$F_S|_W - F_S|_{W+\Delta W} - \Delta W(-V) = 0 \quad (1)$$

Denklemlerde  $F_S$  substrat molar akış hızı,  $(V)$  ( $\mu\text{M} / \text{g.partikül.dakika}$ ) diferansiyel kütledeki substrat tüketim hızı olarak ifade edilmiştir.

$$F_S = QS \quad (2)$$

$$S = S_0(1-X) \quad (3)$$



Bu denklikte S kolon içerisinde herhangi bir uzunlukta substrat konsantrasyonunu,  $S_0$  başlangıç substrat derişimini ifade ederken Q hacimsel akış hızını ifade etmektedir. Eşitlik 2 ve 3 eşitlik 1 içerisinde çözümlü diferansiyel kütle boyunca integral alınır

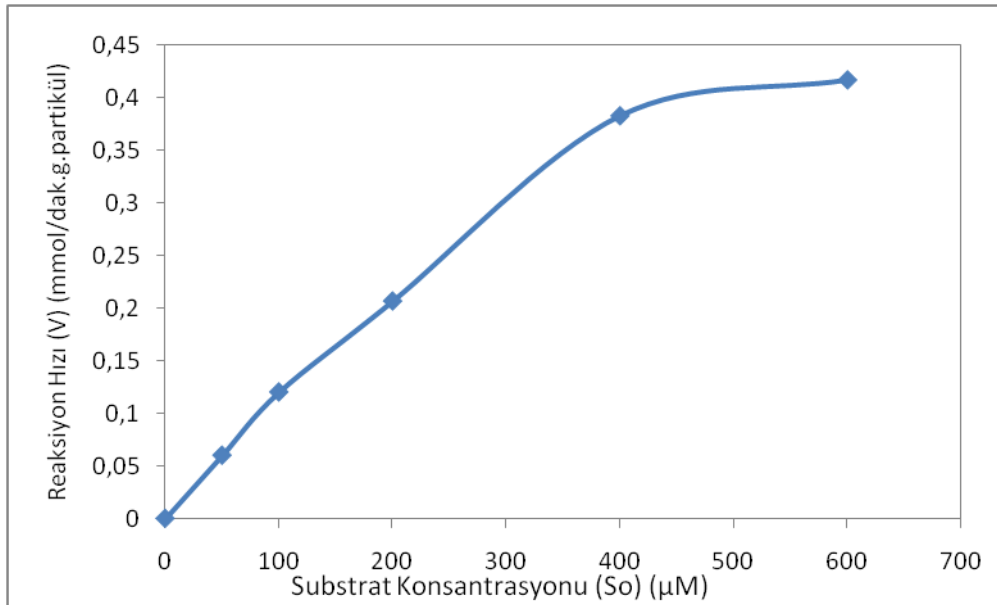
$$V = \frac{QSoX}{W} \quad (4)$$

reaksiyon hızını veren denklem elde edilmiş olur.

$$V = \frac{VmS}{Km+S} \quad (5)$$

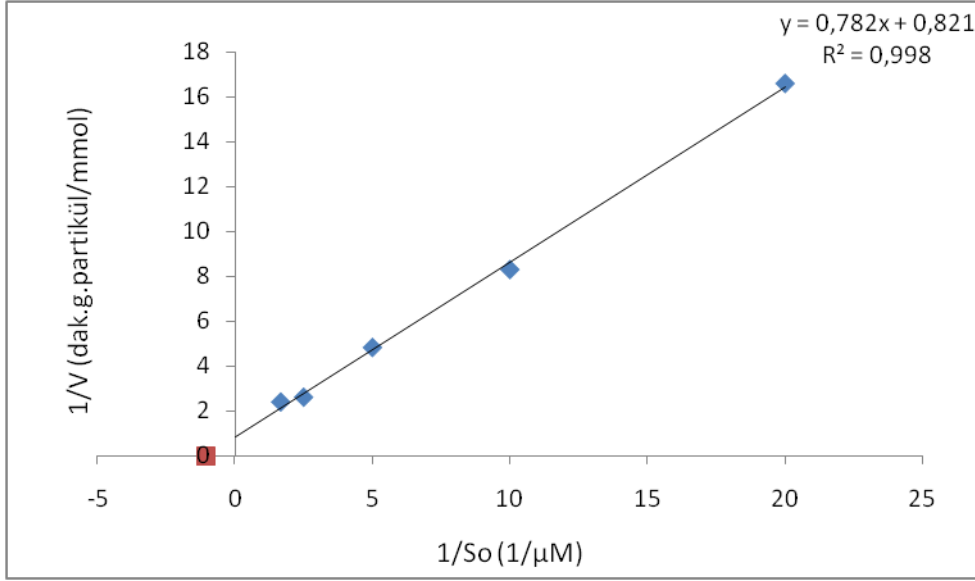
Yatışkın durum için Michaelis-Menten ifadesi eşitlik 5' de verilmektedir Michaelis-Menten eşitliği bir hiperbolik eğrinin denklemidir. Buna göre  $1/V$ ,  $1/S$ 'ye karşı çizilecek olursa doğrusal bir değişim elde edilir. Bu şekilde elde edilen Lineweaver-Burke grafiği ile  $Km$  ve  $Vm$  değerleri bulunabilir.

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{Km}{Vm}\right)\left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{Vm}\right) \quad (6)$$



Şekil 4.12 Kolay bağlanma yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi ( Michaelis-Menten grafiği).

Şekil 4.12'de immobilize enzimi karakterize etmek amacıyla 50- 600  $\mu\text{M}$  aralığında BTEE derişimi içeren substrat çözeltileri kullanılarak reaksiyon hızları bulunmuş ve bu derişim değerlerine karşılık gelen reaksiyon hız değerleri grafiğe geçirilmiştir.

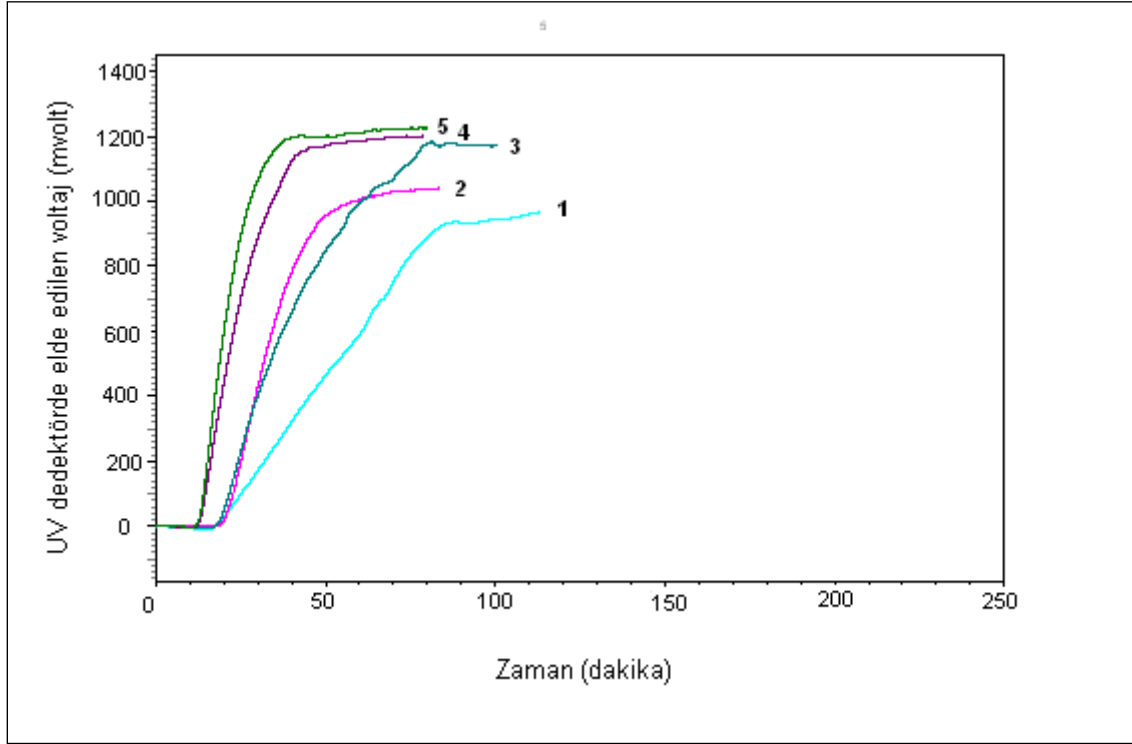


Şekil 4.13 Kolay bağlanma yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat ile ilişkisinin Lineweaver-Burke grafiği

Elde edilen hiperbolik eğrinin Michaelis-Menten grafiği ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu grafikteki veriler kullanılarak 1/S'e karşı 1/V grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.13'de Lineweaver-Burke grafiği elde edilmiştir. Bu grafiğin y eksenini kestiği nokta 1/V<sub>m</sub> değerini vermektedir. Yapılan hesaplamalarda maksimum reaksiyon hızı (V<sub>m</sub>) 1,2 mmol/dak.g.partikül olarak bulunmuştur. Grafiğin eğimi yardımıyla K<sub>m</sub> değeri 953 μM olarak hesaplanmıştır. Serbest enzim ile yapılan çalışmalarda K<sub>m</sub> değeri 63,1 μM bulunmuştur. Kolay bağlanma ile immobilize edilen enzim içeren IMER'de serbest enzime kıyasla yaklaşık 15 kat daha yüksek bir K<sub>m</sub> değeri elde edilmiştir.

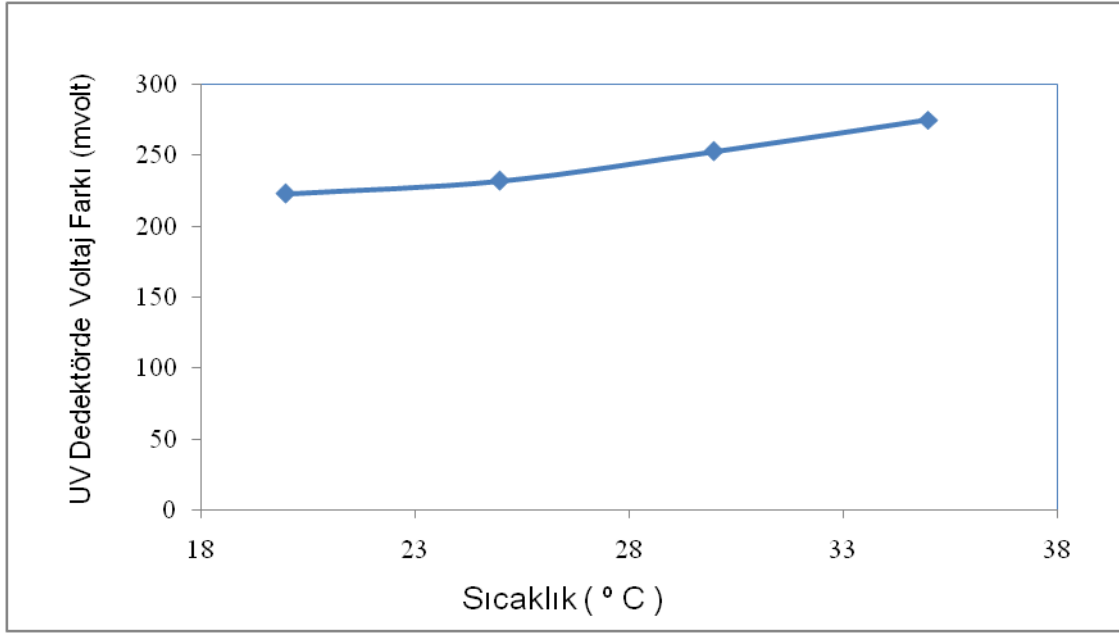
#### 4.1.2.3 Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın substrat dönüşümüne etkisini incelemek amacıyla ortam sıcaklığı 15, 20, 25, 30 ve 35 °C değerinde tutularak immobilize enzimin davranışı incelenmiştir.



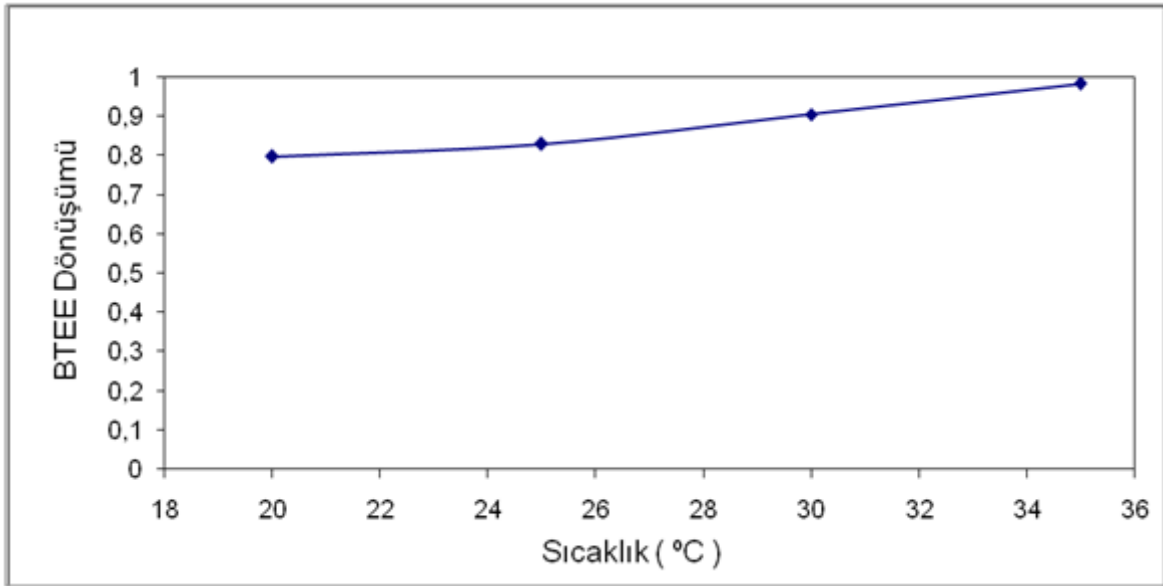
Şekil 4.14 Poli (DHPM-EDM) partikülleri içeren kolonda farklı sıcaklıklarda elde edilen voltaj-zaman eğrileri. HPLC sistemi, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Akış hızı 0,5 mL/dakika, Kolon boyutları: 50x4.6 mm ID. Sıcaklık (°C): 1)15, 2) 20, 3) 25, 4) 30, 5) 35

Deneylerde akış hızı 0.5 mL/dakika, substrat besleme derişimi 400  $\mu$ M değerinde sabit tutulmuştur. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi ortam sıcaklığının artmasıyla birlikte reaksiyonun yatışkın duruma ulaştığı voltaj plato değerlerinin arttığı saptanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için dönüşmemiş BTEE çözeltisi kullanılarak HPLC kapalı devre sistemi ile elde edilen voltaj plato değerlerinin, Şekil 4.14'de verilen plato voltaj değerlerinden çıkarılması ile voltaj farkları elde edilmiş ve Şekil 4.15'de gösterildiği gibi sıcaklığa karşı grafiğe alınmıştır. Buradan görüldüğü gibi voltaj farkı değerleri artan sıcaklık ile artış göstermektedir.



Şekil 4.15 Farklı sıcaklıklarda UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerlerinin değişimi

Voltaj farkları kullanılarak elde edilen dönüşüm-sıcaklık grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir. Sıcaklığın 20-35 °C aralığında artmasıyla BTEE dönüşümü % 80'den % 98 değerine kadar artmaktadır.

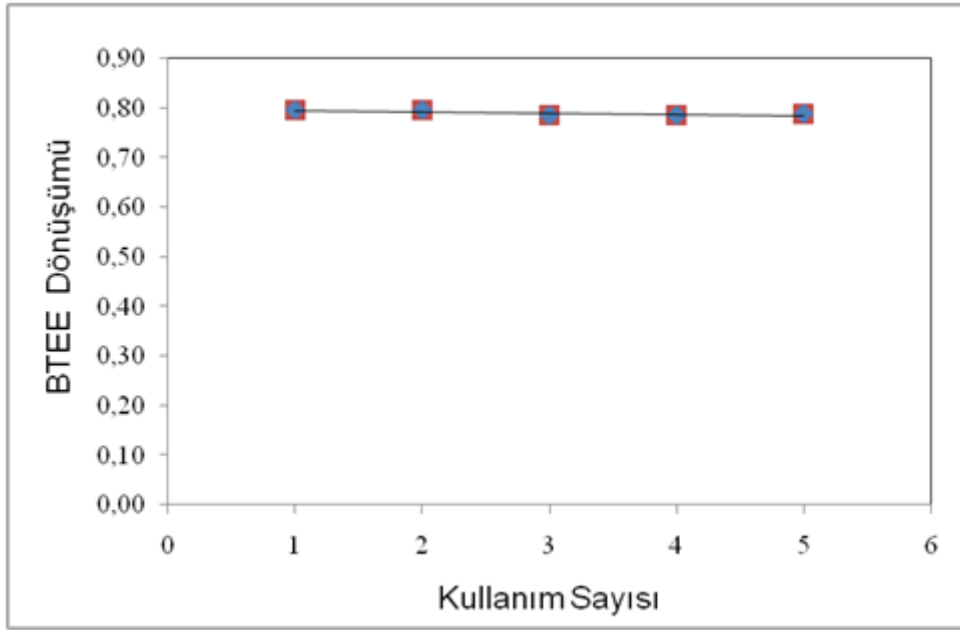


Şekil 4.16 BTEE dönüşümünün IMER sıcaklık değeri ile değişimi

İmmobilize enzim kullanılarak dönüşüm değerinde sıcaklıkla elde edilen artışın serbest enzime kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Bu davranış İMER'in kinetik davranışının partikül içi difüzyon tarafından kontrol edildiğinin bir başka göstergesidir.

#### 4.1.2.4 HPLC-İMER tekrarlanabilirlik davranışı

Tekrarlanabilirlik davranışını görebilmek için P-CC partikül bazlı immobilize enzim reaktörü test edilmiştir. Deneyler farklı zamanlarda yapılmış ve 5 ayrı ardışık kullanım için sonuçlar elde edilmiştir. Deneylerde akış hızı 0.5 mL/dakika, BTEE konsantrasyonu 400  $\mu$ M, pH 7.8 ve sıcaklık 20°C olarak ayarlanmıştır.

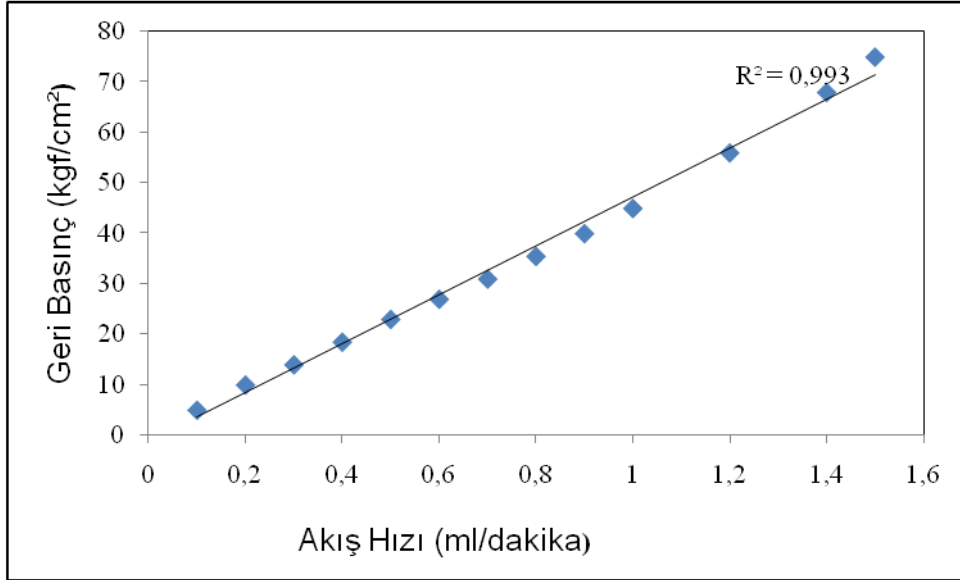


Şekil 4.17 Ardışık kullanım ile BTEE dönüşümü

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de görülmektedir. Buradan görüldüğü gibi ardışık kullanım ile BTEE dönüşüm değerinde herhangi bir düşüş söz konusu değildir. Bu davranış sentezlenen immobilize enzim sisteminin kararlı ve tekrarlanabilir bir kinetik davranışa sahip olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.2.5 HPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı

HPLC sisteminde kullanılan kolonlarda, geri basıncın akış hızıyla değişiminin doğrusal olması ve kolon materyalinin düşük geri basınç üretecek özelliklere sahip olması istenir.



Şekil 4.18 HPLC-IMER reaktörü için geri basınç değerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi.

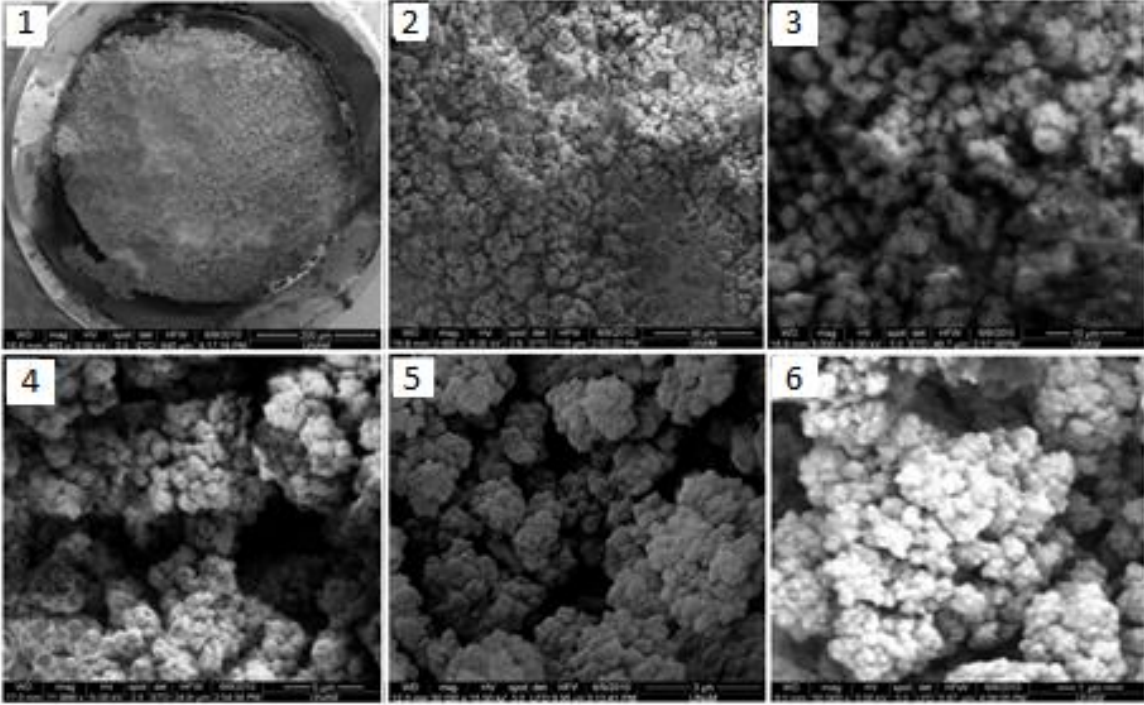
P-CC partikül bazlı HPLC-IMER reaktörü için geri basınç değerinin 400 µM BTEE içeren mobil faz (%95 borat tamponu, %5 etanol, pH:7,8 ) akış hızı ile değişimi Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Buradan görüldüğü gibi geri basıncın akış hızıyla değişimi tamamen doğrusal özellik göstermektedir. Korelasyon katsayısı 0.993 olarak bulunmuştur.

## 4.2 Glutaraldehit Aktivasyonu İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu

Tez çalışmasının bu bölümünde glutatraldehit aktivasyonu metodu ile monolitik immobilize enzim reaktörü sentezlenmiş ve deneysel çalışmalar  $\mu$ HPLC sisteminde yürütülmüştür.

### 4.2.1 Poli(GMA-EDM) monolitlerin karakterizasyonu

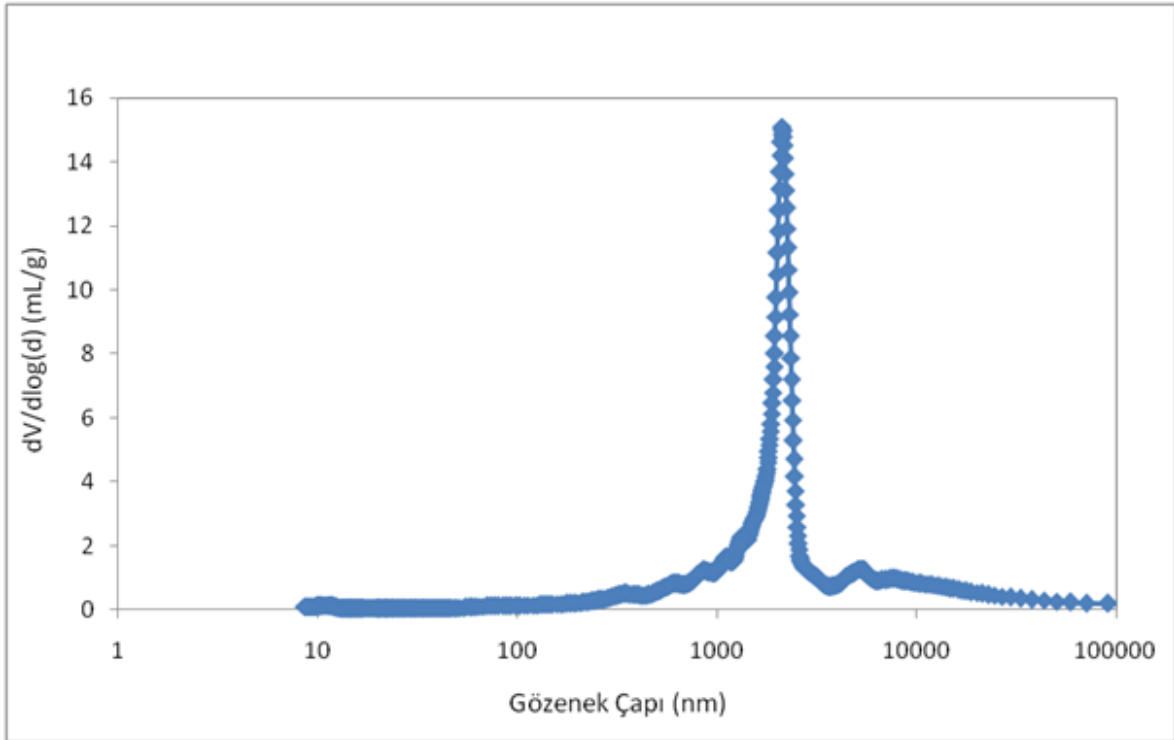
Çalışmaların bu bölümünde poli(GMA-EDM) monolitlerin öncelikle gözeneklilik özelliklerinin belirlenmesi yoluna gidilmiştir. Poli(GMA-EDM) monolitlerinin gözenek yapısını gösteren SEM fotoğrafı Şekil 4.19'da sunulmaktadır. Buradan görüldüğü gibi monolitik yapı boyutları yaklaşık 5-20  $\mu$ m aralığında değişen agregatlardan oluşmaktadır.



Şekil 4.19 Poli(GMA-EDM) monolitlerin SEM fotoğrafı Büyütme 1) 450X 2) 2600X 3) 6000X 4) 12000X 5) 30000X 6) 50000X

Monolitin BET sistemi ile elde edilen azot adsorpsiyon eğrisi yardımıyla özgül yüzey alanı 9.33  $m^2/g$  olarak bulunmuştur. Bu değer poli(GMA-EDM) monolitin özgül yüzey

alanının kromatografik ayırma amaçlı sentezlenen akrilat bazlı monolitler ile yaklaşık aynı büyüklükte olduğunu ortaya koymaktadır. Şekil 4.20’de poli(GMA-EDM) monolitine ait civa porozimetre ile elde edilen gözenek dağılım grafiği görülmektedir. Grafik incelendiğinde gözenek çapının 1500-2500 nm aralığında değiştiği görülürken 2000 nm ortalama gözenek boyutu olarak tespit edilmiştir. Bu değer monolitik yapıyı oluşturan agregatlar arasında çok geniş çaplara sahip gözenekler olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.20 Civa porozimetresi ile elde edilen poli(GMA-EDM) monolitine ait gözenek dağılım grafiği

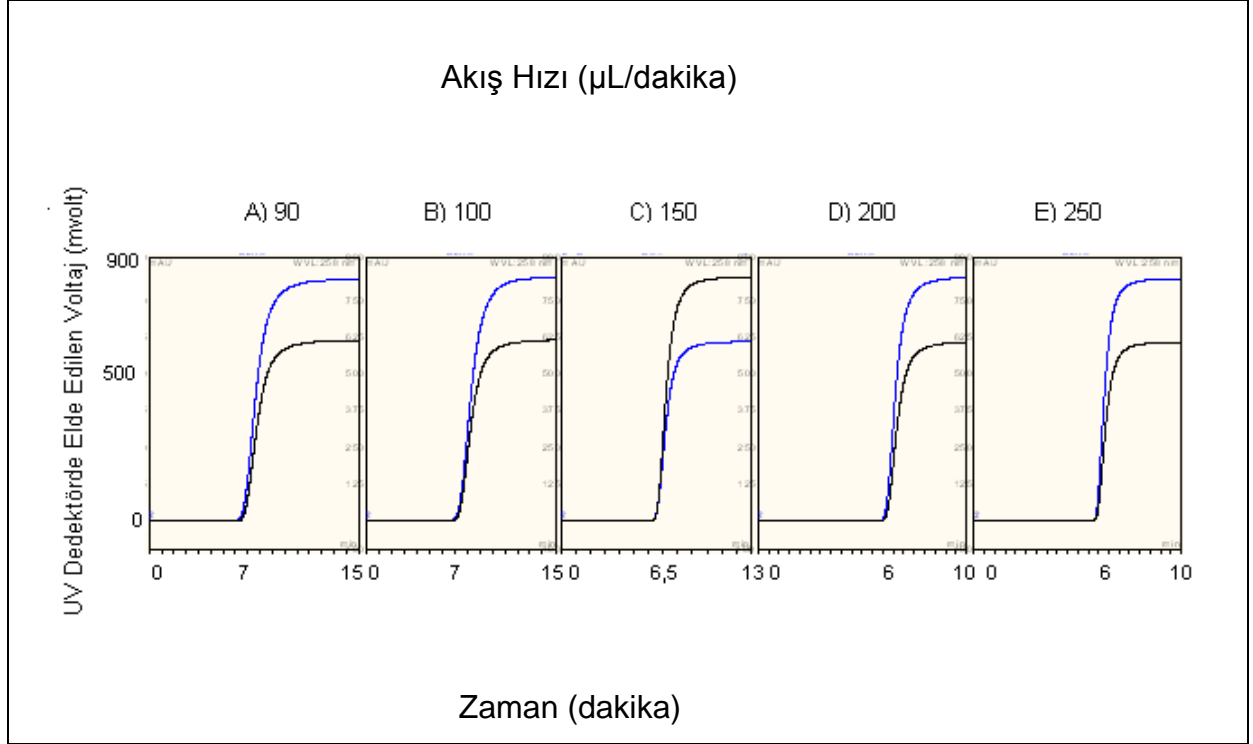
#### 4.2.2 Kromatografik çalışmalar

Tez kapsamında glutaraldehit aktivasyonu metodu ile sentezlenen monolitik formdaki immobilize enzim reaktörü M-GA kodu ile tanımlanmıştır. M-GA kodlu monolitik kolonda, immobilize enzim reaktörünün performansının belirlenebilmesi amacıyla mobil faz akış hızı, substrat besleme derişimi ve sıcaklığın substrat dönüşümüne etkisi incelenmiş, ve monolitin kullanım kararlılığı ve geçirgenlik davranışı tanımlanmıştır.





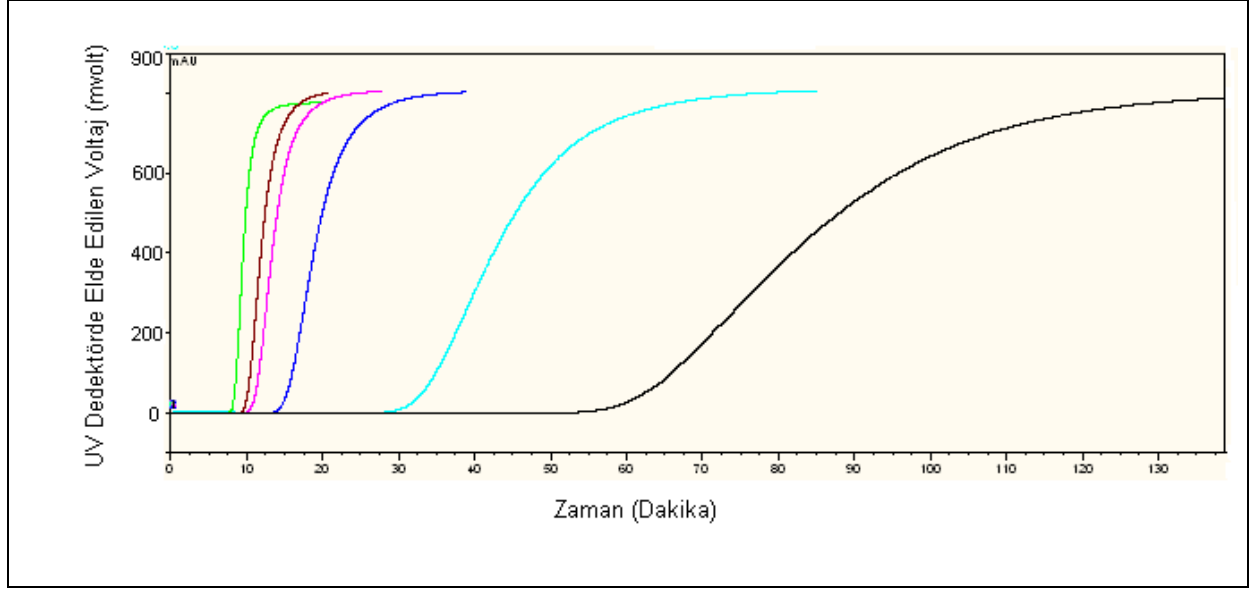
yatışkın durumda çalışmaya başlaması ile immobilize enzim reaktöründe sabit BTEE dönüşümü gözlenmekte ve her bir akış hızı için belirli bir voltaj değerinde platoya ulaşmaktadır.



Şekil 4.22 Yüksek akış hızlarında boş kolon ve monolitik M-GA kolonu için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri.  $\mu\text{HPLC}$  sistemi, Substrat derişimi  $400 \mu\text{M}$ , Sıcaklık  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , Kolon boyutları:  $200\text{mm} \times 530 \mu\text{m}$  ID. Akış hızı ( $\mu\text{L}/\text{dakika}$ ) A) 90, B) 100, C) 150, D) 200, E) 250.

Buradan görüldüğü gibi Şekil 4.21'de düşük akış hızları için akış hızının artışı ile plato voltaj değerinde bir artışın oluştuğu görülmektedir. Yüksek akış hızları için oluşturulan Şekil 4.22'ye bakıldığında ise yüksek akış hızlarına ulaşıldığında plato voltaj değerinin akış hızı ile önemli bir değişim göstermediği görülmektedir.

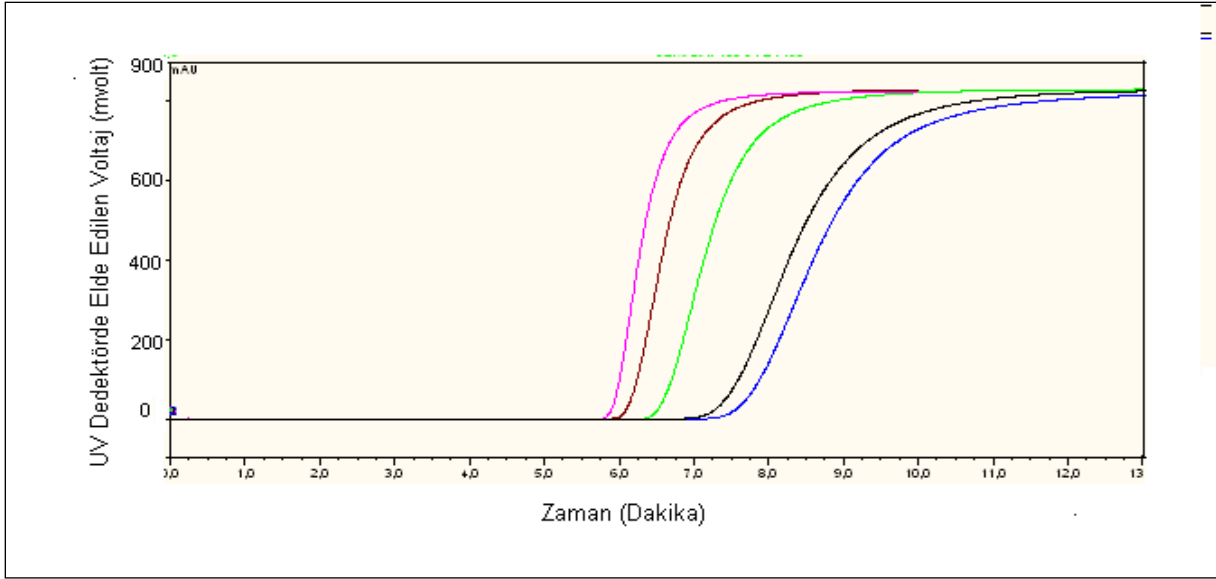
Şekil 4.23 ve 4.24'de akış hızı arttıkça BTEE substratının BT ye dönüşme zamanı kısalmaktadır. Akış hızı  $5 \mu\text{L}/\text{dakika}$  iken reaksiyonun tamamlanması 150 dakika sürerken akış hızı  $250 \mu\text{L}/\text{dakika}$  ulaştığında reaksiyonun tamamlanması 8 dakika sürmektedir.



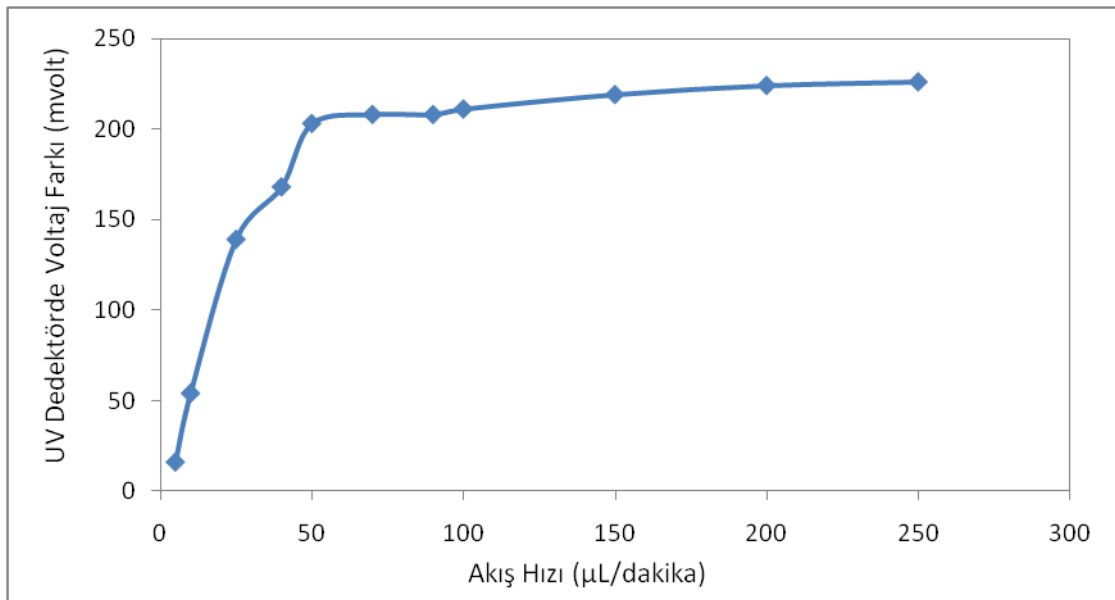
Şekil 4.23 M-GA monolitik kolonunda elde edilen substrat dönüşüm eğrilerinin düşük akış hızları için karşılaştırmalı olarak gösterimi:  $\mu$ HPLC sistemi, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Sıcaklık 25  $^{\circ}$ C, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID. Siyah: 5  $\mu$ L/dakika, Turkuaz: 10  $\mu$ L/dakika, Mavi:25  $\mu$ L/dakika,Kırmızı: 40  $\mu$ L/dakika, Kahverengi: 50  $\mu$ L/dakika ,Yeşil : 70  $\mu$ L/dakika.

Şekil 4.21 ve şekil 4.22' deki her bir akış hızında referans kolon için elde edilen plato voltaj değerleri kullanılarak, her bir akış hızı için yatışkın durum voltaj farkları hesaplanmış ve Şekil 4.25 'de akış hızına karşı grafiğe alınmıştır. Bu grafik yardımı ile bulunan değerler kesikli sistemde tam dönüşüm için elde edilen voltaj farklarına bölünerek her bir akış hızı için yatışkın durum substrat dönüşümü hesaplanmış ve Şekil 4.26'da M-GA monolitik kolonu için yatışkın durum substrat dönüşümünün akış hızı ile değişimi verilmiştir.

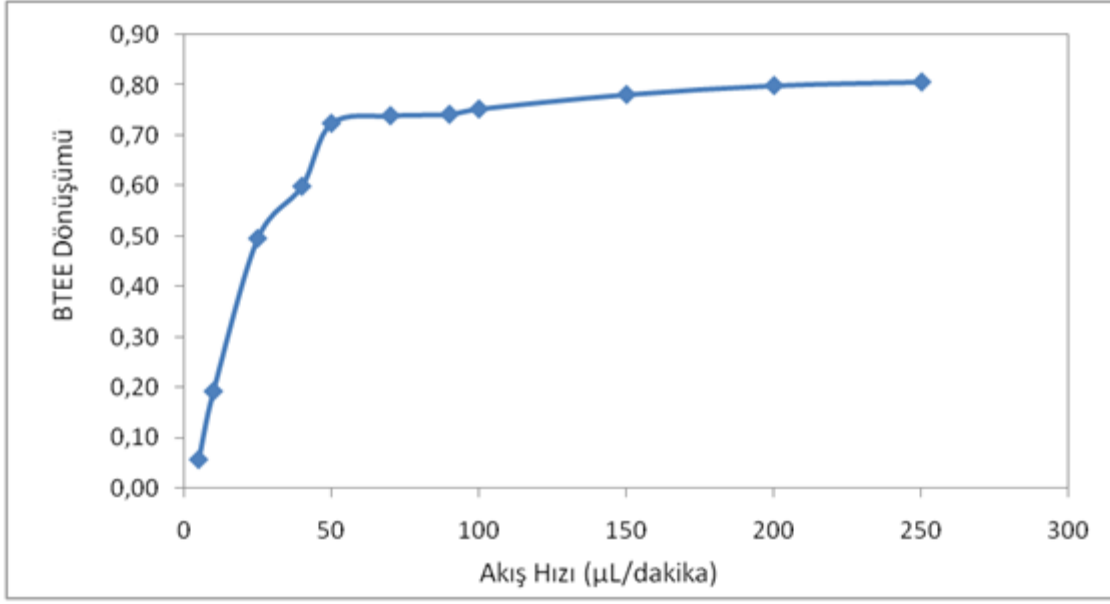
Buradan görüldüğü gibi BTEE dönüşümü düşük akış hızlarında hızlı bir şekilde artmakta ve daha sonra akış hızı ile çok hafif bir artış göstermekte ve bir platoya ulaşmaktadır.



Şekil 4.24 M-GA monolitik kolonunda elde edilen substrat dönüşüm eğrilerinin yüksek akış hızları için karşılaştırmalı olarak gösterimi.  $\mu$ HPLC sistemi, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Sıcaklık 25  $^{\circ}$ C, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID. Mavi: 90  $\mu$ L/dakika, Siyah:100  $\mu$ L/dakika, Yeşil: 150  $\mu$ L/dakika, Kahverengi: 200  $\mu$ L/dakika , Kırmızı : 250  $\mu$ L/dakika



Şekil 4.25 M-GA Monolitik kolon için UV dedektördeki voltaj farkının artan akış hızları ile değişimi.

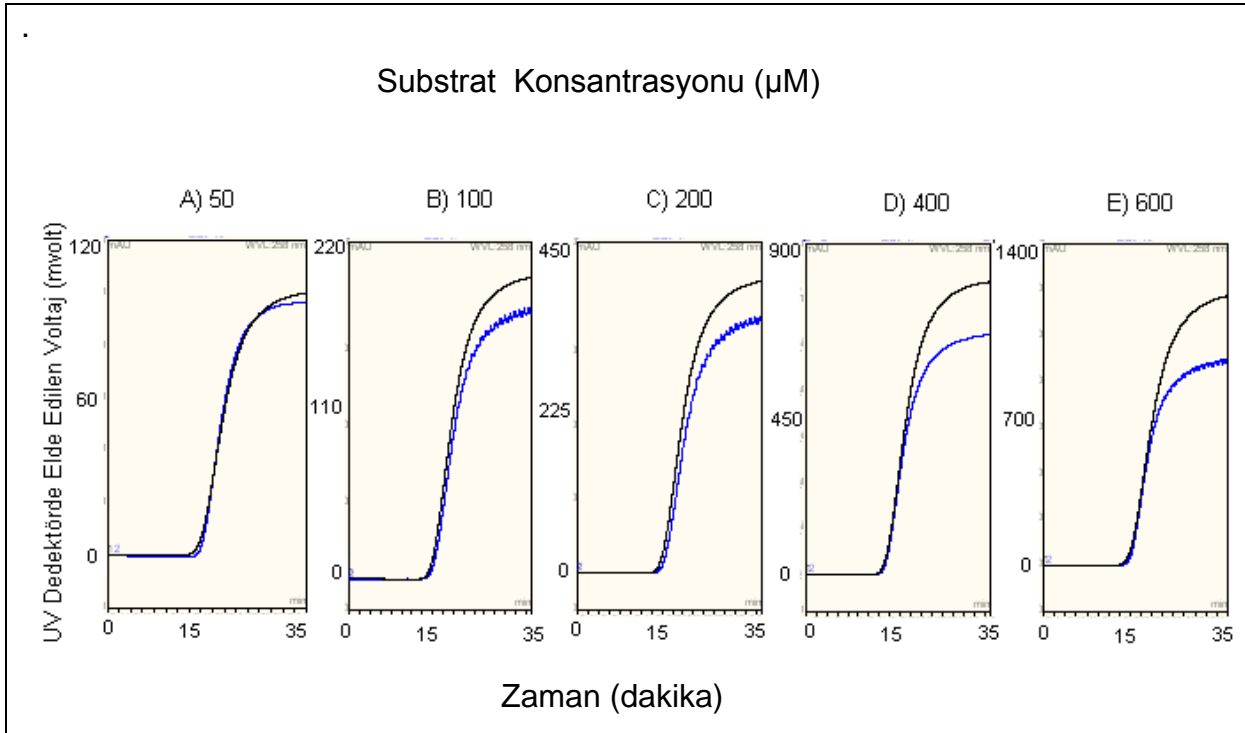


Şekil 4.26 M-GA monolitik kolon için yatışkın durum BTEE dönüşümünün akış hızı ile değişimi

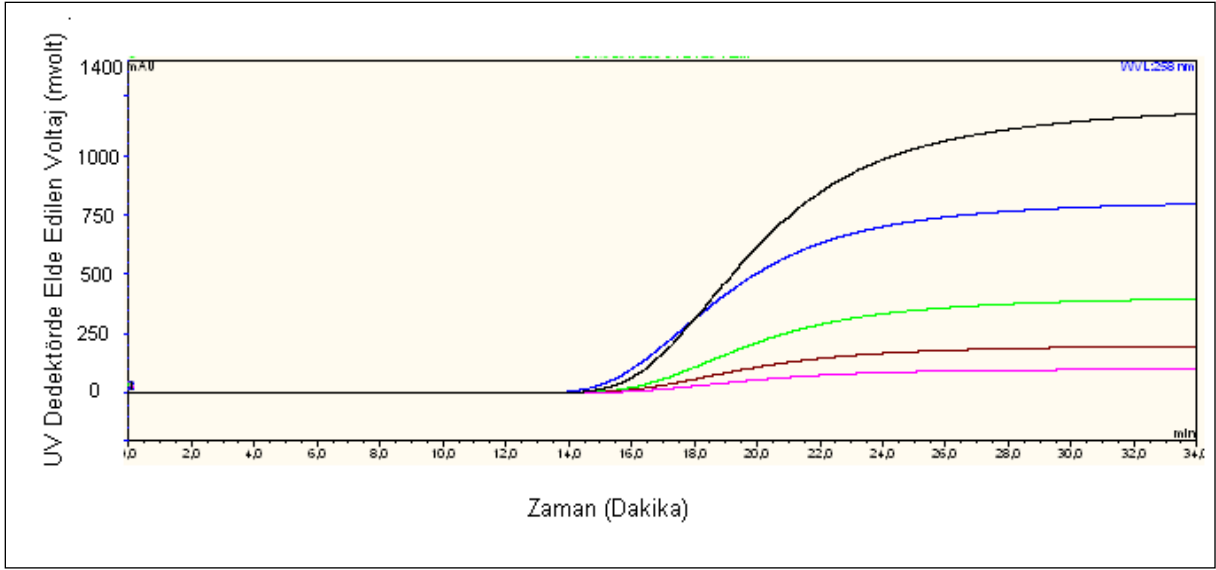
Bu sonuç, akış hızının artışına bağlı olarak oluşan konvektif taşınım ile kolon içerisinde BTEE ve BT için daha iyi bir kütle aktarımının oluşması ile BTEE dönüşümünün artması, ancak akış hızının aşırı artışı ile BTEE'nin kolondaki ortalama alıkonma süresinin düşmesi sonucu bu artışın frenlenerek, BTEE dönüşümünün platoya ulaşması şeklinde açıklanabilir. Bu davranış M-GA kolonuna immobilize edilen enzimin çok iyi çalıştığını ve akış hızının yüksek tutulması durumunda dahi yüksek substrat dönüşümlerinin elde edilebildiğini göstermektedir.

#### 4.2.2.2 Substrat derişimi etkisi

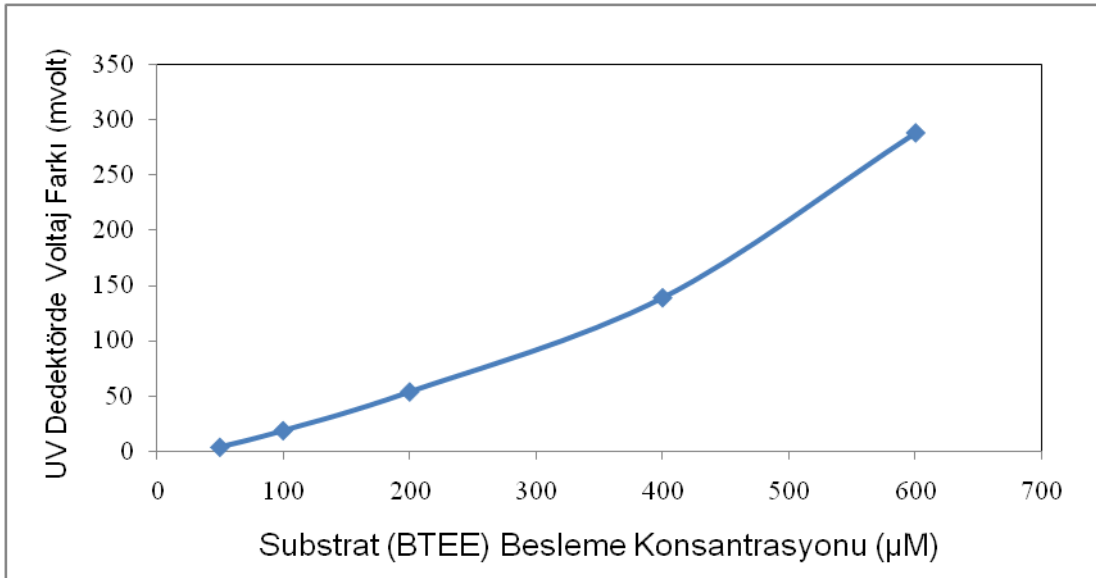
BTEE besleme derişiminin yatışkın durum dönüşümüne etkisi, 25 µL/dakika mobil faz akış hızı kullanılarak, 25 °C sıcaklıkta incelenmiştir. Deneylerde % 95 borat tamponu, % 5 etanol içeren pH 7.8 değerine sahip BTEE çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Farklı BTEE derişimlerinde boş kolon ve M-GA monolitik kolon için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri Şekil 4.27’de verilmektedir. Farklı BTEE derişimlerinde elde edilen eğriler karşılaştırmalı olarak ise Şekil 4.28’de verilmektedir. Yatışkın durumda M-GA kolonu plato voltaj değeri ile boş kolon plato voltaj değeri arasındaki farkın BTEE derişimi ile değışimi ise Şekil 4.29’da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi BTEE besleme derişiminin artmasıyla bu fark değeri artmaktadır.



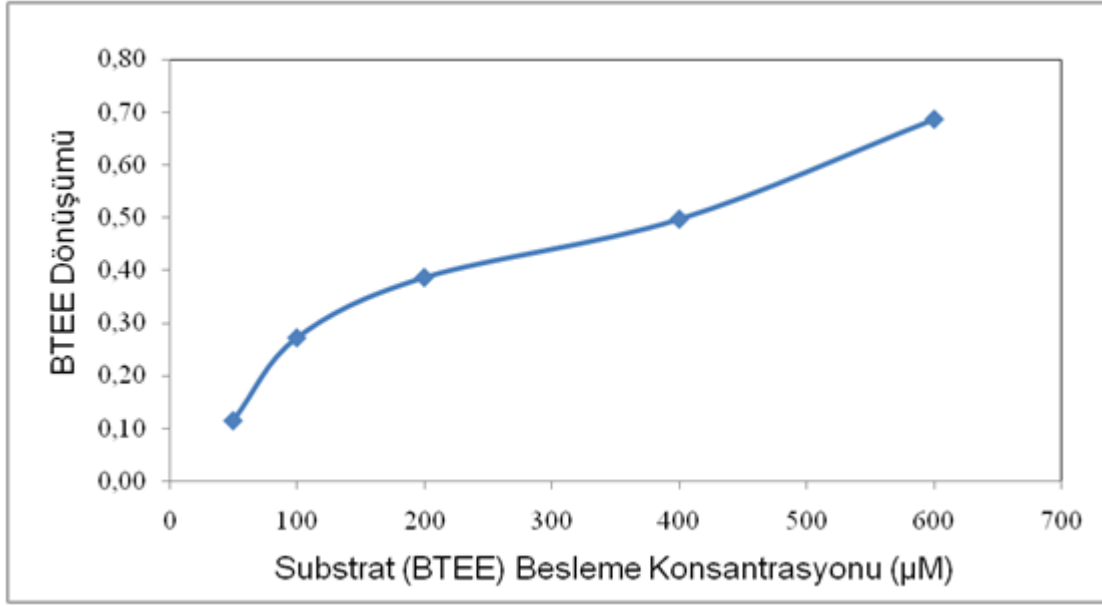
Şekil 4.27 Farklı BTEE derişimlerinde boş kolon ve M-GA monolitik kolon için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. BTEE besleme derişimi (mM): A) 50, B) 100, C) 200, D) 400, E) 600.



Şekil 4.28 M-GA monolitik kolon için farklı substrat besleme konsantrasyonlarında elde edilen substrat dönüşüm eğrilerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi.  $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 25  $\mu$ L/dakika, Sıcaklık 25  $^{\circ}$ C, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID. Kırmızı: 50  $\mu$ M, Kahverengi: 100  $\mu$ M, Yeşil: 200  $\mu$ M, Mavi : 400  $\mu$ M, Siyah: 600  $\mu$ M Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID.



Şekil 4.29 Farklı BTEE besleme konsantrasyonlarına karşı elde edilen UV dedektör voltaj farkı değerleri

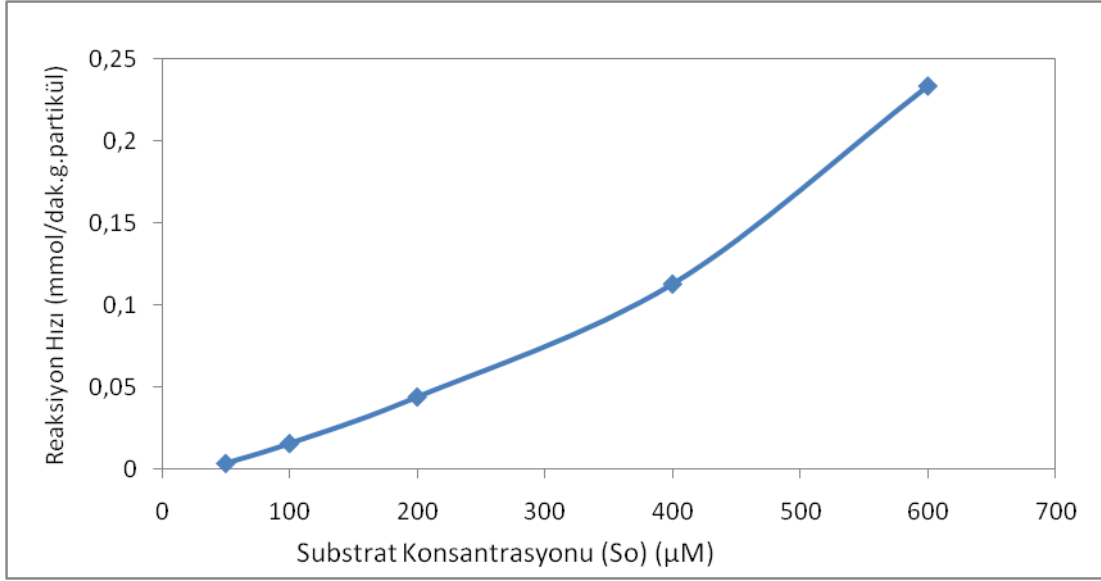


Şekil 4.30 Yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimi

Şekil 4.11' de partikül bazlı immobilize enzim kolonunda substrat besleme konsantrasyonunun artmasıyla BTEE dönüşümünün azaldığı tespit edildiği göz önünde bulundurulduğunda, Şekil 4.30'da farklı bir davranış gözlenmektedir. Artan BTEE derişimi ile kolondaki yatışkın durum BTEE dönüşümünün artış gösterdiği görülmektedir. Bu sonuç artan BTEE derişimi ile substrat harcanma hızının ve/veya BTEE substratının monolitik yapının gözeneklerine difüzyonu için sürücü gücün ve dolayısıyla difüzyon hızının artması ile açıklanabilir. Monolitik yapının bağıl olarak büyük boyutlu gözeneklerden oluşması büyük olasılıkla bu yapı içerisinde difüzyon kısıtlamasının önemli olmadığını düşündürmektedir. Dolayısıyla genel hız enzim substrat reaksiyonu tarafından kontrol edilmekte ve reaksiyon hızındaki artış direkt yatışkın durum substrat dönüşüm değerine yansımaktadır.

Şekil 4.31'de 50, 100, 200, 400 ve 600 µM aralığında BTEE derişimi içeren substrat çözeltileri kullanılarak reaksiyon hızları bulunmuş ve bu derişim değerlerine karşılık gelen reaksiyon hız değerleri grafiğe geçirilmiştir. BTEE substrat derişimi artmasıyla reaksiyon hızınının substrat derişiminin karesi ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. BTEE substrat derişimi artışıyla dönüşüm artışından dolayı hiperbolik değil de parabolik bir grafik elde edilmiş, dolayısıyla Michaelis-Mentene'e uygunluk tespit edilememiştir.

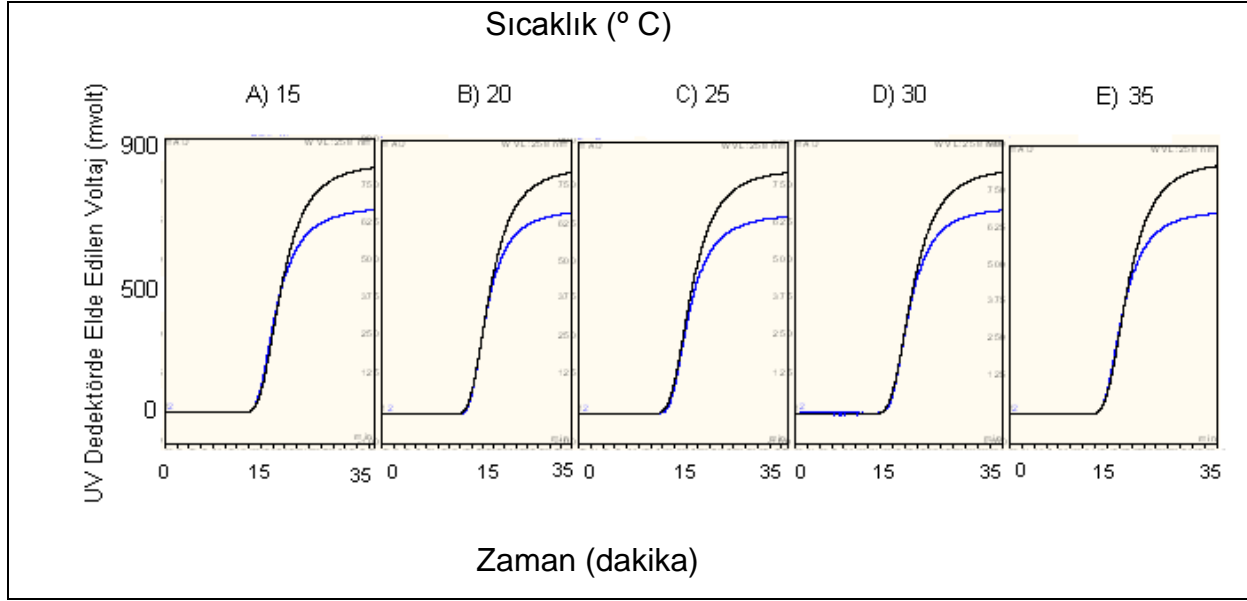




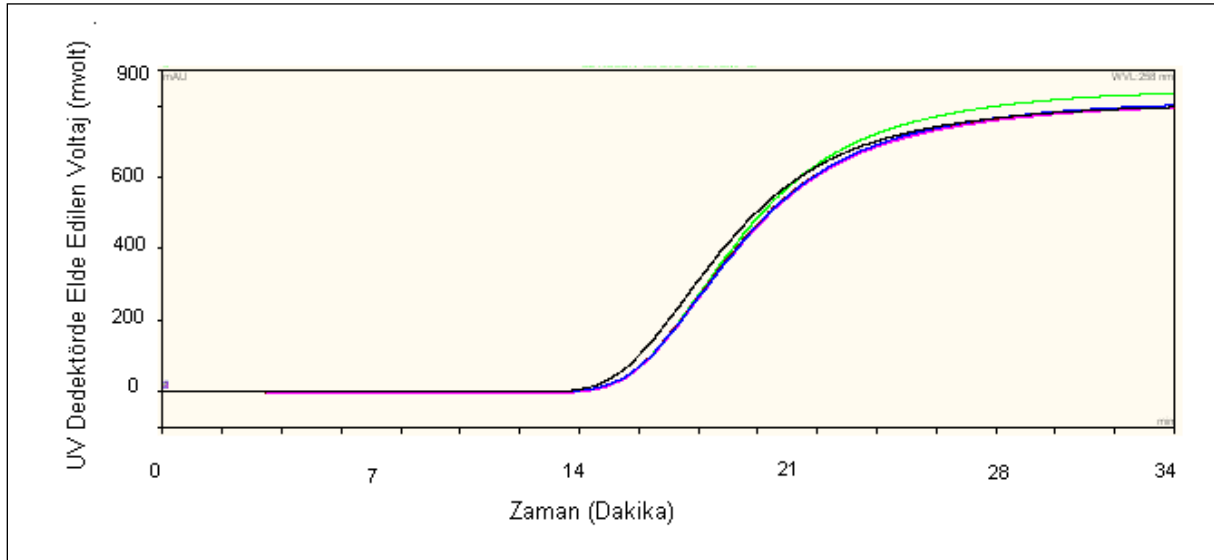
Şekil 4.31 Glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi

#### 4.2.2.3 Sıcaklık etkisi

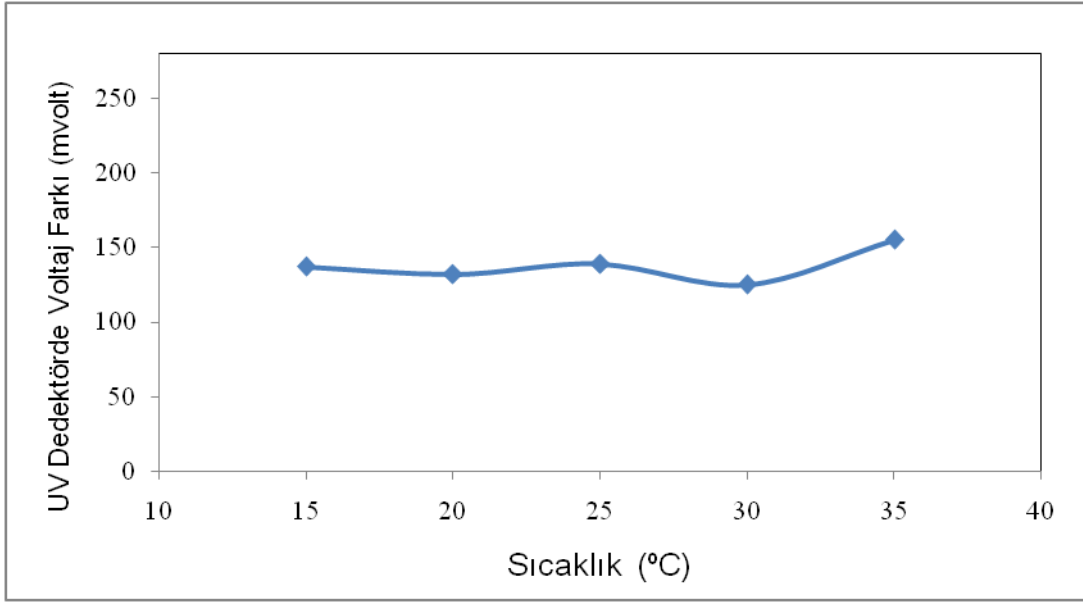
M-GA monolitik kolonunda sıcaklığın dönüşüme etkisi 400 µM substrat konsantrasyonunda 25 µL/dakika akış hızında 15, 20, 25, 30 ve 35 °C sıcaklık değerlerinde incelenmiştir. Deneylede % 95 borat tamponu, % 5 etanol içeren pH 7.8 değerine sahip BTEE çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Farklı sıcaklık değerlerinde boş kolon ve M-GA monolitik kolon için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri Şekil 4.32’de verilmektedir. Farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen eğriler karşılaştırmalı olarak ise Şekil 4.33’de gösterilmektedir. Yatışkın durumda M-GA kolonu plato voltaj değeri ile boş kolon plato voltaj değeri arasındaki farkın sıcaklık ile değişimi ise Şekil 4.34’de verilmektedir. Bu grafikler yardımıyla BTEE dönüşümleri bulunmuş ve sıcaklığa karşı BTEE dönüşümünü ifade eden şekil 4.35 elde edilmiştir. Buradan görüldüğü gibi 35 °C değerine kadar BTEE dönüşümünde sıcaklıkla önemli bir değişim olmamaktadır. Bu sıcaklık değerinden sonra ise yatışkın durum dönüşümünde hafif bir artış meydana gelmektedir. Ancak elde edilen davranış immobilize enzim reaktörünün kinetik davranışında sıcaklığın çok etkili bir değişken olmadığını ortaya koymaktadır.



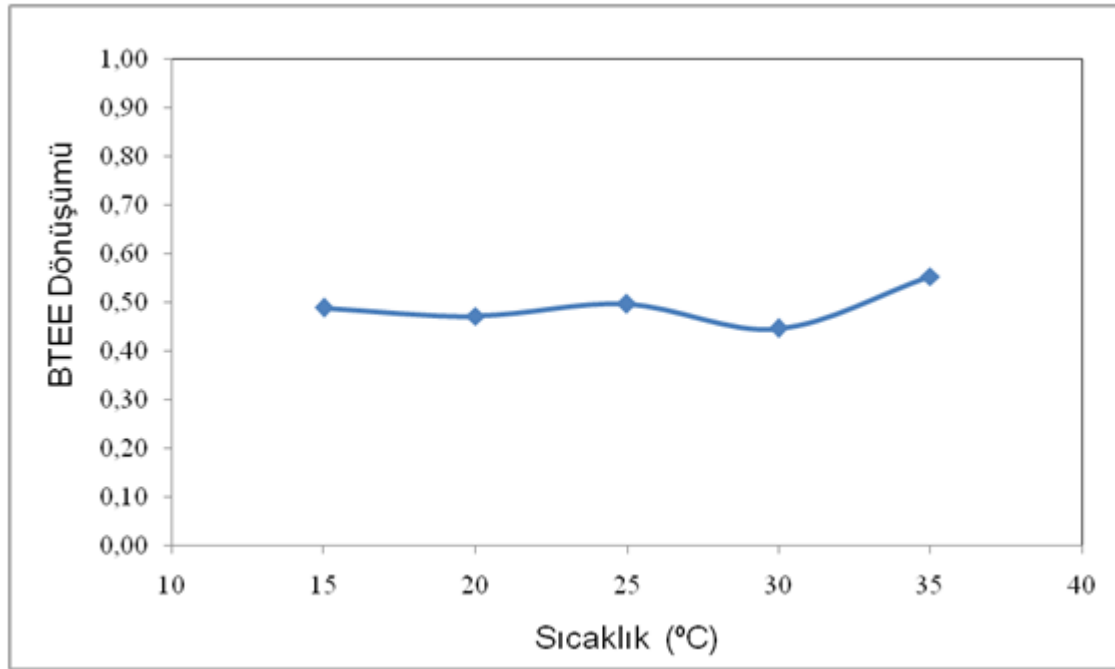
Şekil 4.32 Farklı sıcaklık değerlerinde boş kolon ve dolu M-GA monolitik kolon için elde edilen sıvı kromatogramları.  $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 25  $\mu$ L/dakika, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID. A) 15 °C, B) 20 °C, C) 25 °C, D) 30 °C, E) 35 °C



Şekil 4.33 M-GA monolitik kolon için farklı sıcaklıklarda elde edilen edilen substrat dönüşüm eğrileri.  $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 25  $\mu$ L/dakika, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID



Şekil 4.34 Farklı sıcaklıklarda UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerlerinin değişimi



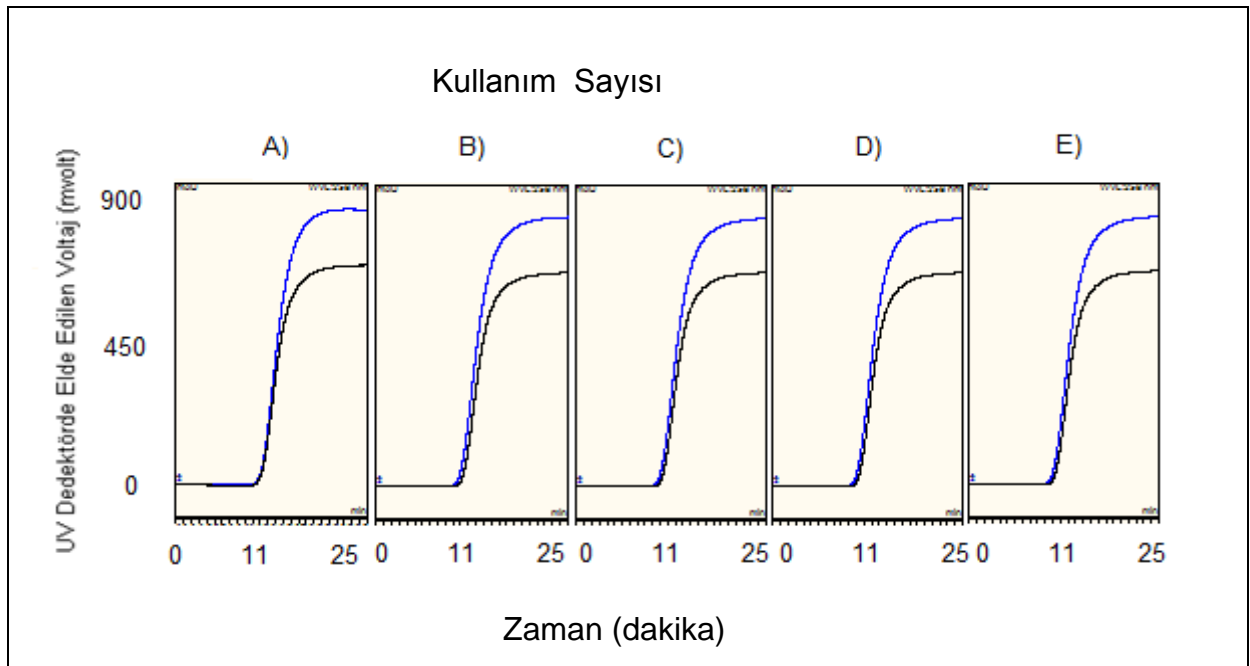
Şekil 4.35 Farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen BTEE dönüşümü değerleri

Kemotripsin enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değeri 37 °C dir. Bu sıcaklık değerine yaklaştıkça BTEE substratı dönüşümünde artma beklenmektedir. Deneysel sonuçlarda bunu destekler niteliktedir. Sıcaklık artışıyla birlikte elde edilen

dönüşüm miktarı önce sabit kalmış 30 °C sıcaklık değerinin üstünden itibaren de azda olsa dönüşüm artmıştır.

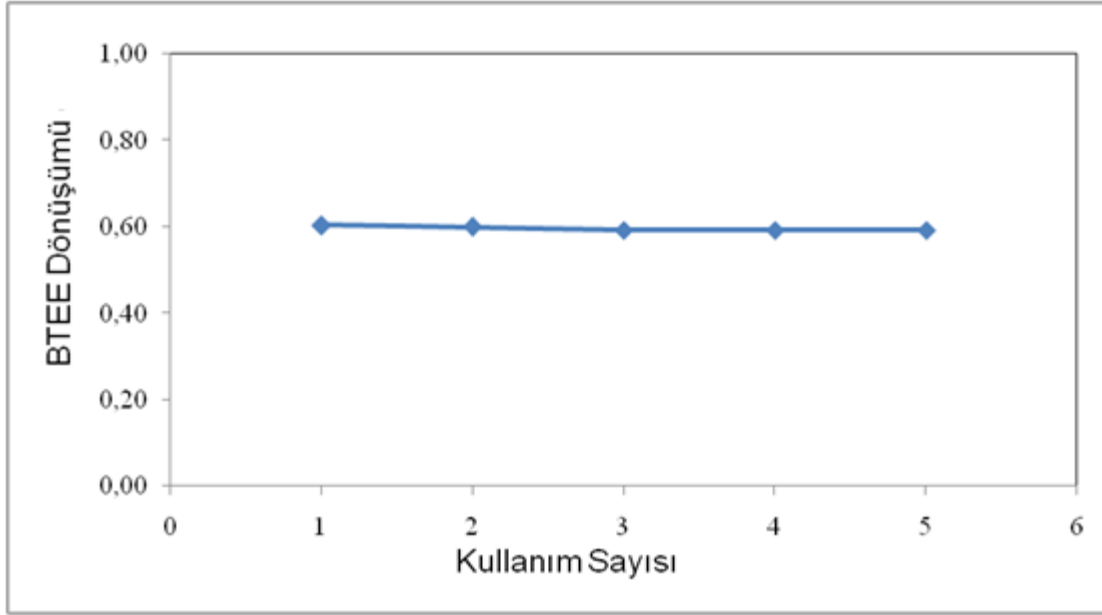
#### 4.2.2.4 µHPLC-IMER tekrarlanabilirlik davranışı

İmmobilize enzim reaktörünün tekrarlanabilirlik durumunu tespit etmek için aynı gün içinde analizden analize tekrarlanabilirlik deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla arka arkaya 5 substrat enjeksiyonu yapılarak, BTEE yatışkın durum dönüşümünün değişimi izlenmiştir.



Şekil 4.36 Tekrar kullanım sonucu elde edilen kromatogramlar. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID

Tekrarlanabilirlik deneylerinde mobil faz akış hızı 40 mL/dakika, BTEE besleme derişimi 400 µM, sıcaklık 25 °C değerinde sabit tutulmuştur. Bu deneylerde elde edilen substrat dönüşüm eğrileri Şekil 4.36, bu eğriler yardımıyla hesaplanan yatışkın durum BTEE dönüşüm değerleri ise Şekil 4.37'de verilmektedir.

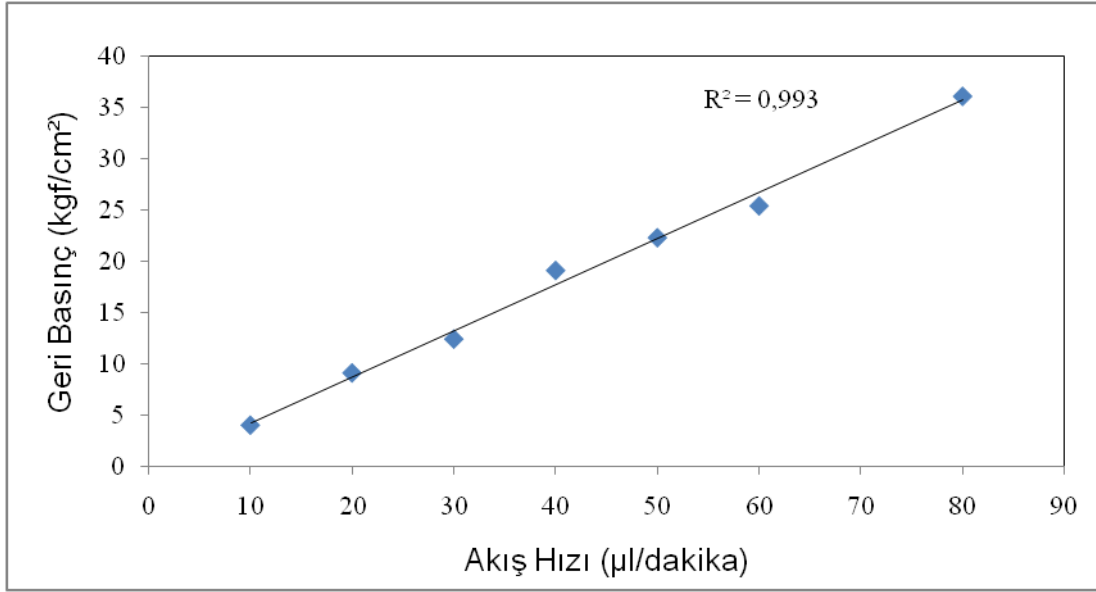


Şekil 4.37 Analizden analize farklı kullanımlar sonucu elde edilen BTEE dönüşümleri

Buradan görüldüğü gibi ardışık enjeksiyonlarda, yatışkın durum BTEE dönüşüm değeri bütün enjeksiyonlar için yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Bu durum M-GA kodlu immobilize enzim reaktörünün kararlı bir BTEE dönüşüm davranışı sergilediğini göstermektedir

#### **4.2.2.5 $\mu$ HPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı**

M-GA kodlu reaktör için mobil faz olarak % 95 borat tamponu, % 5 etanol içeren çözelti kullanılarak,  $\mu$ HPLC sisteminde farklı akış hızları için oda sıcaklığındaki geri basınç değerleri saptanmıştır. Geri-basınç değerinin mobil faz akış hızı ile değişimi Şekil 4.38'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi değişim doğrusaldır. Bu davranış M-GA kodlu reaktörün çalışılan akış hızı aralığında herhangi morfolojik deformasyon olmaksızın güvenle kullanılabilceğini göstermektedir.



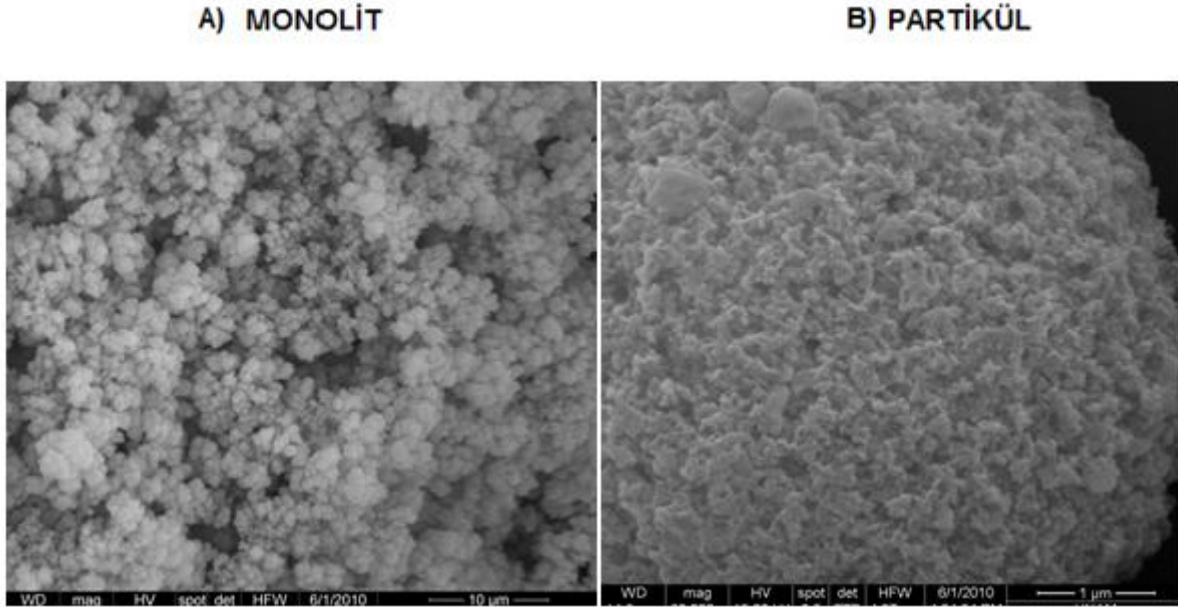
Şekil 4.38  $\mu$ HPLC-IMER reaktörü için geri basınç değerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi

### 4.3 Kolay bağlanma Yöntemi İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu , Partikül Bazlı HPLC-IMER İle Kıyaslanması

Tez çalışmasının bu bölümünde kolay bağlanma yöntemi ile monolitik immobilize enzim reaktörü sentezlenmiş ve sistem  $\mu$ HPLC ile kullanılmıştır. Burada tez çalışmasının birinci bölümünde yine kolay bağlanma ile sentezlenen ve HPLC sisteminde kullanılmış olan P-CC partikül bazlı kolon ile kıyaslamalar yapılmış, partikül bazlı kolon ile monolitik kolonun performansları karşılaştırılmıştır.

#### 4.3.1 Poli(DHPM-EDM) monolitlerinin karakterizasyonu

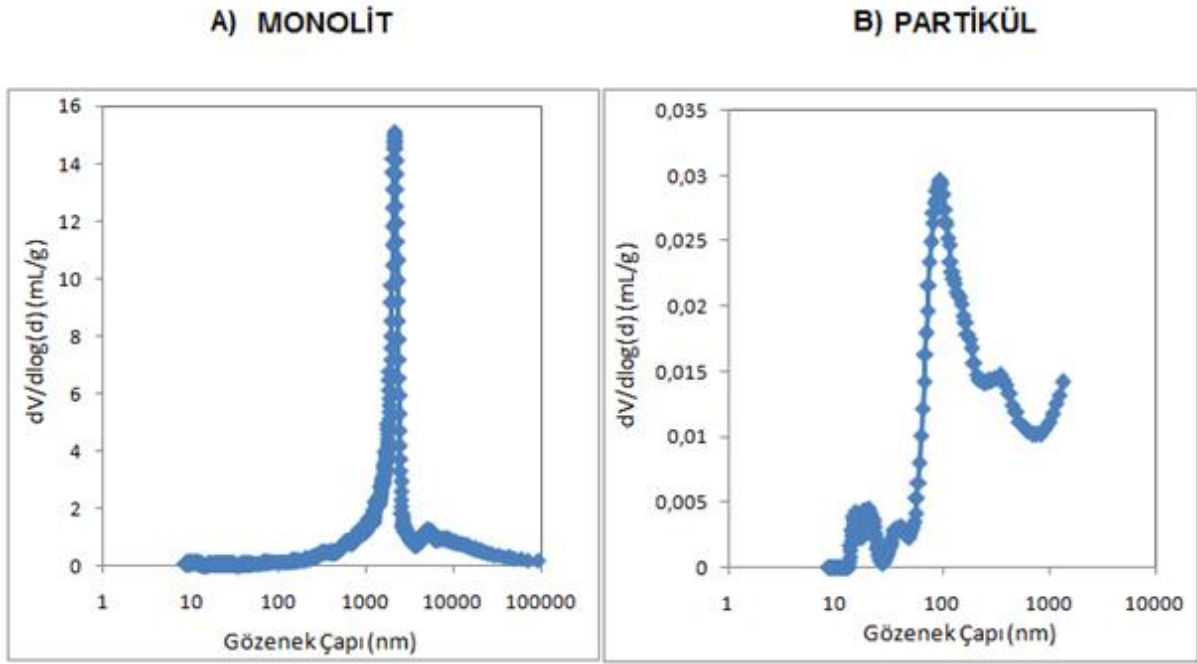
Poli(DHPM-EDM) monolitinin yüzey morfolojisi görmek amacıyla SEM fotoğrafları çekilmiş ve poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait SEM fotoğrafları Şekil 4.39'da kıyaslamalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.39 Poli(DHPM-EDM) partiküllerinin ve monolitinin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları A) Monolitik yapı, Büyütme: 6000X B) Partiküler yapı, Büyütme: 60000X

Şekilde monolitın gözenekli formda agregatlardan oluştuğu görülürken, mikrokürenin içerisindeki yapı incelendiğinde çok daha küçük boyutlu gözenekler içerdiği

görülmektedir. Bu durum monolitteki ortalama gözenek boyutunun partiküle göre çok daha büyük olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.40 Civa porozimetre ile elde gözenek dağılım grafiği A) Monolitik sistem B) Partikül bazlı sistem

Poli(DHPM-EDM) monolitine ve partiküllerine ait civa porozimetre ile elde edilen gözenek dağılım grafiği şekil 4.40'da görülmektedir. Şekil 4.40-A'daki monolitik yapının gözenek çapının 1500-2500 nm aralığında değiştiği görülürken 2000 nm ortalama gözenek boyutu olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.40-B'de ifade edilen poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait gözenek çaplarının çoğu 60-220 nm aralığında toplanırken ortalama gözenek boyutu 95 nm olarak bulunmuştur. Buna göre monolitik yapının ortalama gözenek çapı partikül bazlı yapının ortalama gözenek çapının yaklaşık 20 katı büyüklüğe ulaşmaktadır.

#### 4.3.2 Kromatografik çalışmalar

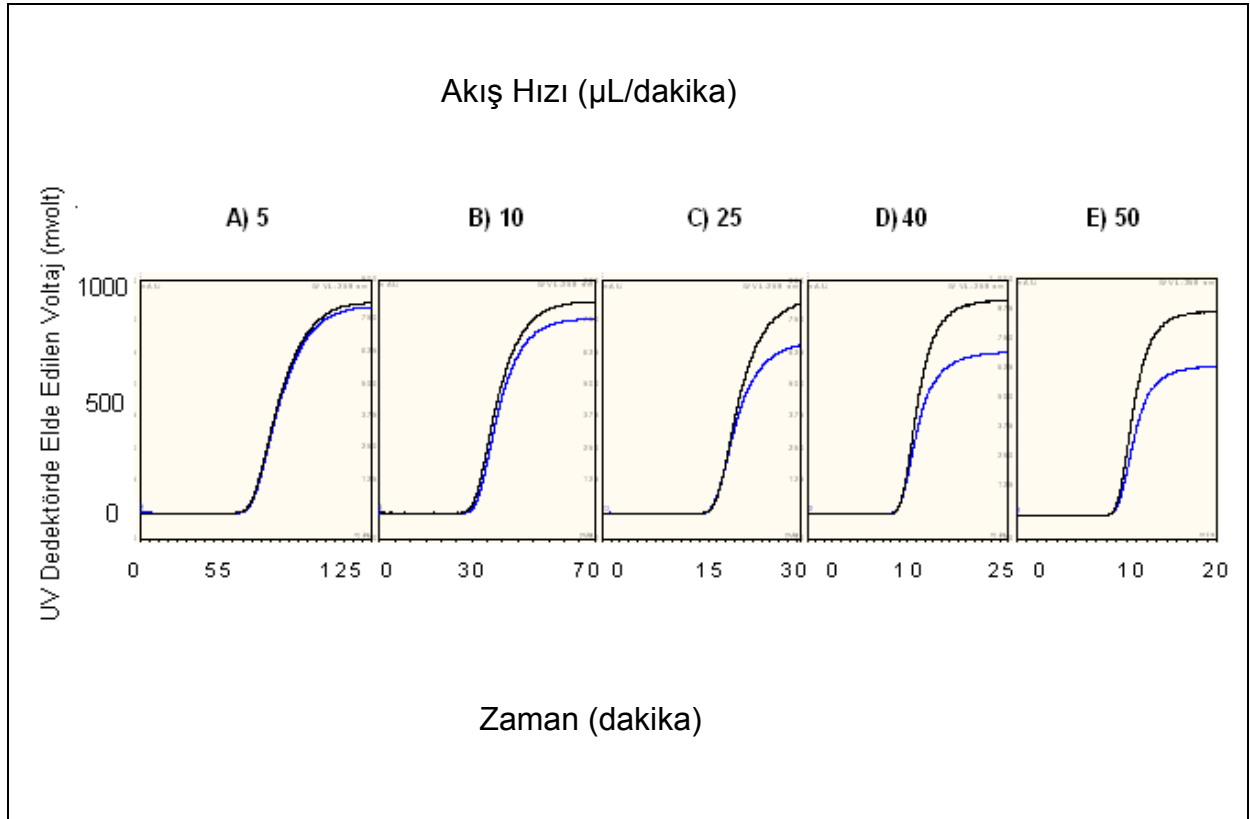
Tez kapsamında kolay bağlanma yöntemi ile sentezlenen immobilize enzim reaktörüne M-CC kodu verilmiştir. Bu kolon için mobil faz akış hızı, substrat besleme



derişimi ve sıcaklığın substrat dönüşümüne etkileri incelenmiş ve tekrarlanabilirlik deneyleri yapılmıştır.

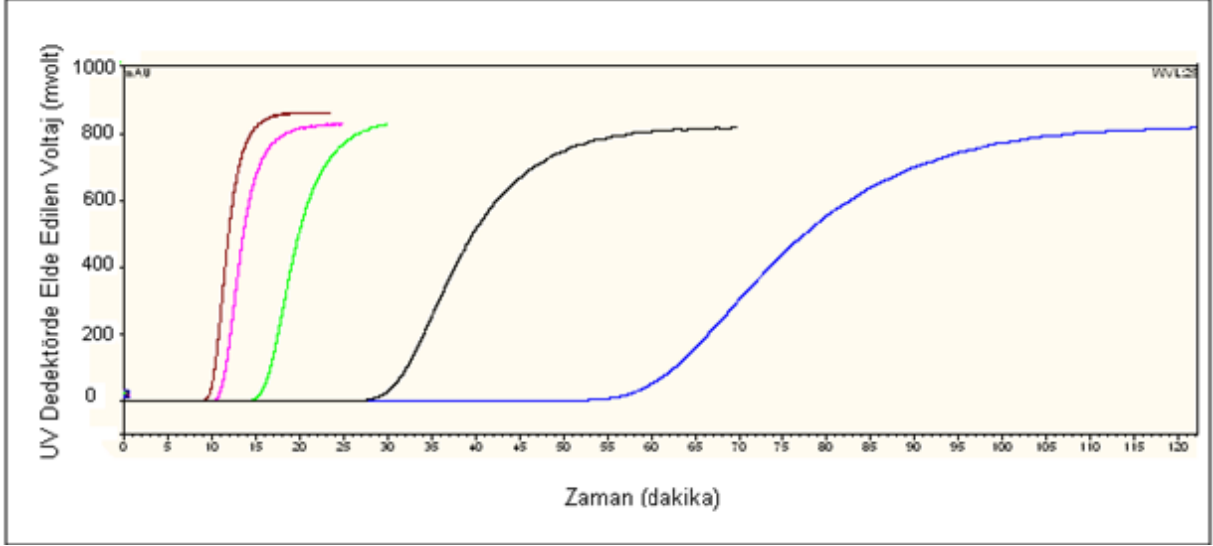
#### 4.3.2.1 Akış hızı etkisi

Sentezlenen monolitik kolonda ilk olarak olarak mobil faz akış hızının substrat dönüşümüne etkisi incelenmiştir. Deneyler 25 °C sıcaklıkta, 400 µM substrat çözeltisiyle 5, 10, 25, 40 ve 50 µL/dakika akış hızlarında yapılmıştır. Elde edilen substrat dönüşüm eğrileri her bir akış hızı için referans kolon ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.41' de verilmektedir.



Şekil 4.41 Farklı mobil faz akış hızlarında M-CC monolitik ve referans kolonlar için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Akış hızı (µL/dakika) A) 5, B) 10, C) 25, D) 40, E) 50 .

Substrat derişimi ile korele olan absorbandsdaki yükselme UV dedektörde voltaj sinyali olarak görölmektedir. Bütün grafiklerde absorbandsın zamanla değişiminin “S” şeklinde olduğu görölmektedir. Akış hızındaki artışa bağlı olarak yatışkın durumda M-CC ve referans kolon arasındaki absorbands farkının arttığı gözlenmektedir.

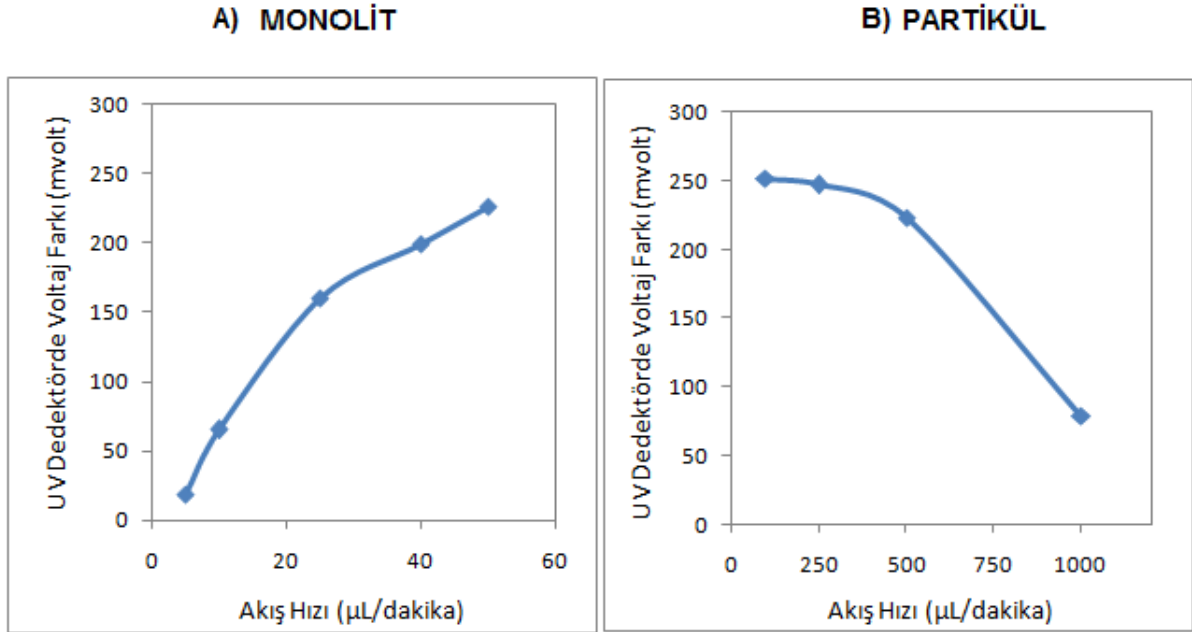


Şekil 4.42 M-CC monolitik kolonunun akış hızı kromatogramları. µHPLC sistemi, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. Mavi: 5 µL/dakika, Siyah: 10 µL/dakika, Yeşil: 25 µL/dakika, Kırmızı: 40 µL/dakika, Kahverengi: 50 µL/dakika

Şekil 4.42’de akış hızının artmasıyla eğrinin yükselişe geçtiği sürenin giderek kısaldığı yani BTEE ve BT’nin kolon içerisinde daha az kaldığı gözlenmektedir. Glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenen M-GA monolitik kolonu ile kolay bağlanma metodu ile sentezlenen M-CC monolitik kolonu benzer bir BTEE dönüşüm davranışı sergilemiştir. Kolon boyutları (530 µm x 200 mm) aynıdır ve her iki tür kolonda artan akış hızıyla yatışkın durum bölgesindeki BTEE dönüşümü artış göstermektedir (Şekil 4.21 ve 4.41).

Şekil 4.43-A ve Şekil 4.43-B’de monolitik ve partikül bazlı kolon için UV dedektörde elde edilen voltaj farkı akış hızına karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde monolitik kolon için artan akış hızı ile yatışkın durumda elde edilen

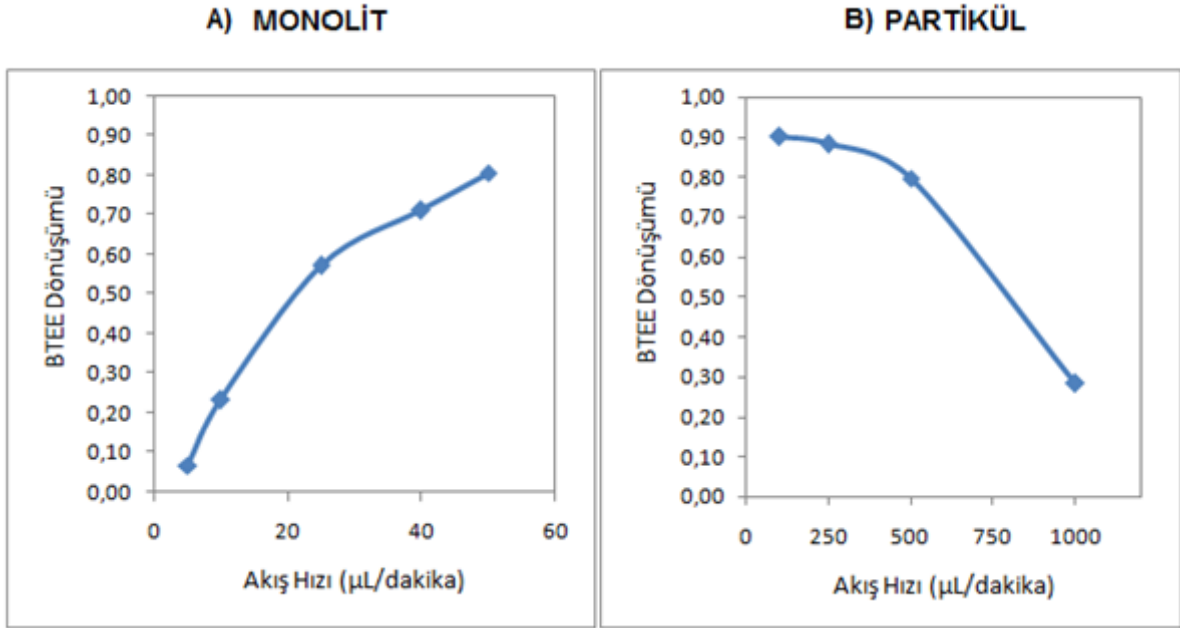
voltaj farkı değerleri artarken, partikül bazlı kolonda artan akış hızı ile yatışkın durum voltaj farkı değerlerinde azalma görülmektedir.



Şekil 4.43 A) M-CC monolitik kolon, B) P-CC partikül bazlı kolon için yatışkın durum voltaj farkının akış hızı ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi : Kolay bağlanma

UV dedektörde elde edilen yatışkın durum voltaj farkları kullanılarak her bir akış hızı için BTEE dönüşümü hesaplanmış ve akış hızına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.44).

Şekil 4.44-A ve Şekil 4.44-B' de her ikisi de kolay bağlanma ile sentezlenen monolitik ve partikül bazlı kolonlar için artan akış hızı ile elde edilen BTEE substrat dönüşümleri incelenmiştir. Monolitik kolonda artan akış hızı ile BTEE dönüşümü artış gösterirken, partikül bazlı kolonda artan akış hızı ile BTEE dönüşümünün azaldığı görülmektedir. Monolitik kolondaki bu davranış büyük olasılıkla artan akış hızı ile monolitik kolon içerisinde konvektif difüzyon etkisi ile daha etkin bir kütle aktarımının oluşumundan kaynaklanmaktadır.

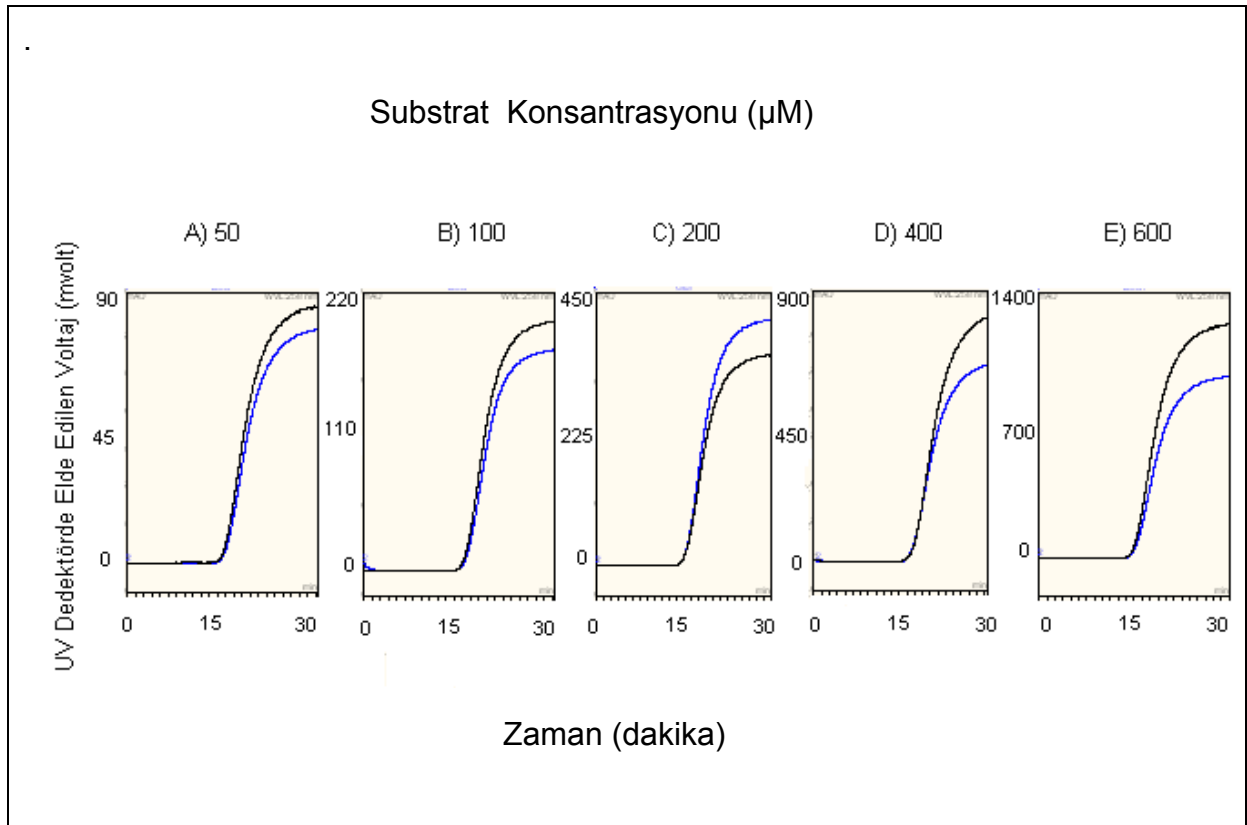


Şekil 4.44 A) M-CC monolitik kolonunda, B) P-CC partikül bazlı kolonda mobil faz akış hızı ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Kolay bağlanma,

Partikül bazlı kolonda ise artan akış hızı ile substratın kolon içerisinde kalış süresinin azalması ve partikül içi difüzyon kısıtlaması nedeniyle aktarımın yeterli olmaması sonucunda, dönüşüm artan akış hızıyla düşüş göstermektedir. Monolitik reaktörde var olan konvektif difüzyon etkisi nedeniyle artan akış hızı substrat dönüşümünde bariz bir artışa neden olmaktadır. Bu bulgu monolitik bazlı immobilize enzim reaktörlerinin partikül bazlı kolonlara üstünlüğünü oluşturmaktadır ve literatürde ilk kez bu çalışmada elde edilmiştir.

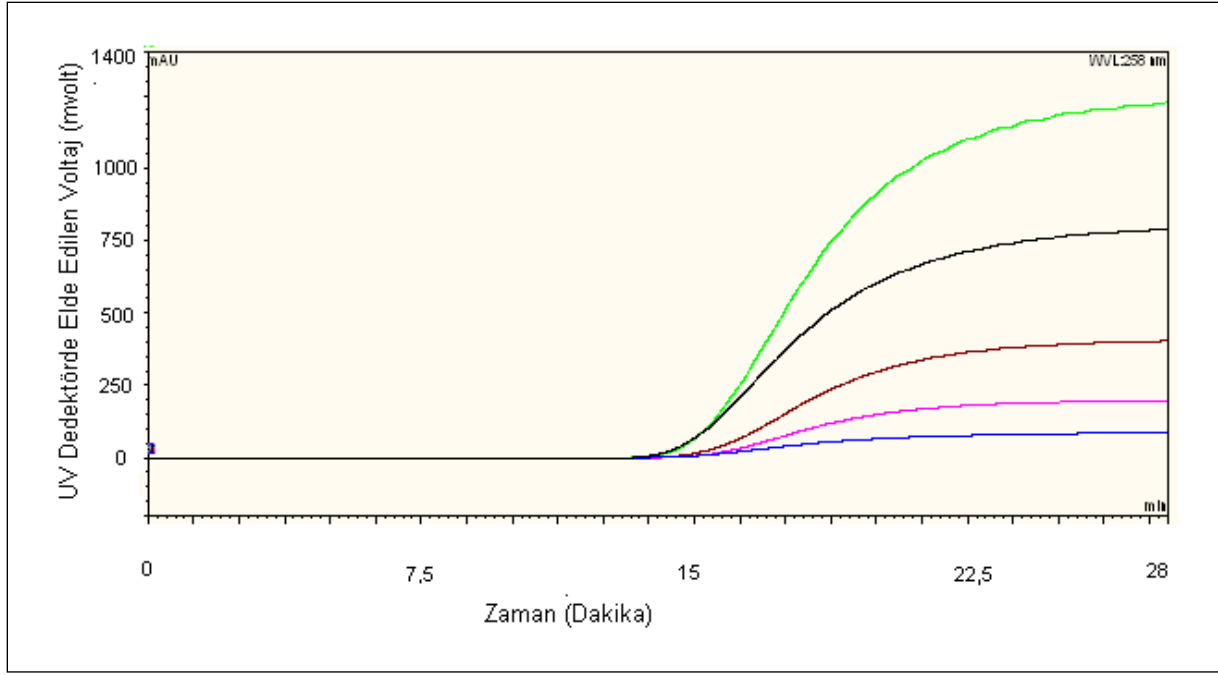
#### 4.3.2.2 Substrat konsantrasyonu etkisi

BTEE derişiminin dönüşüme etkisi, 25 µL/dak mobil faz akış hızı kullanılarak, 25 °C sıcaklıkta incelenmiştir. Deneylerde % 95 borat tamponu, % 5 etanol içeren pH 7.8 değerine sahip BTEE çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Farklı BTEE derişimleri için voltaj farkının zaman ile değişimi Şekil 4.45'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi yatışkın durum voltaj farkı artan BTEE derişimi ile artış göstermektedir.



Şekil 4.45 Farklı BTEE konsantrasyonlarında boş kolon ve M-CC monolitik kolonu için elde edilen voltaj-zaman eğrileri. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID. BTEE derişimi (µM): A) 50, B) 100, C) 200, D) 400, E) 600.

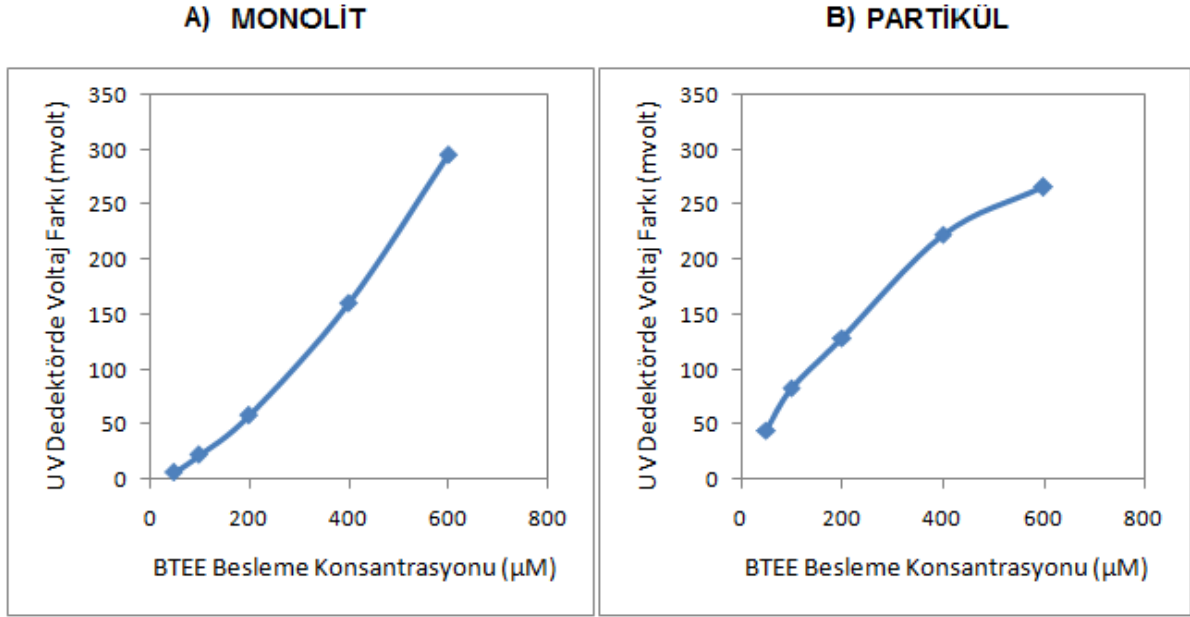
M-CC monolitik kolonu için farklı substrat besleme derişimleri ile elde edilen voltaj-dönüşüm eğrileri Şekil 4.46'da kıyaslanmaktadır.



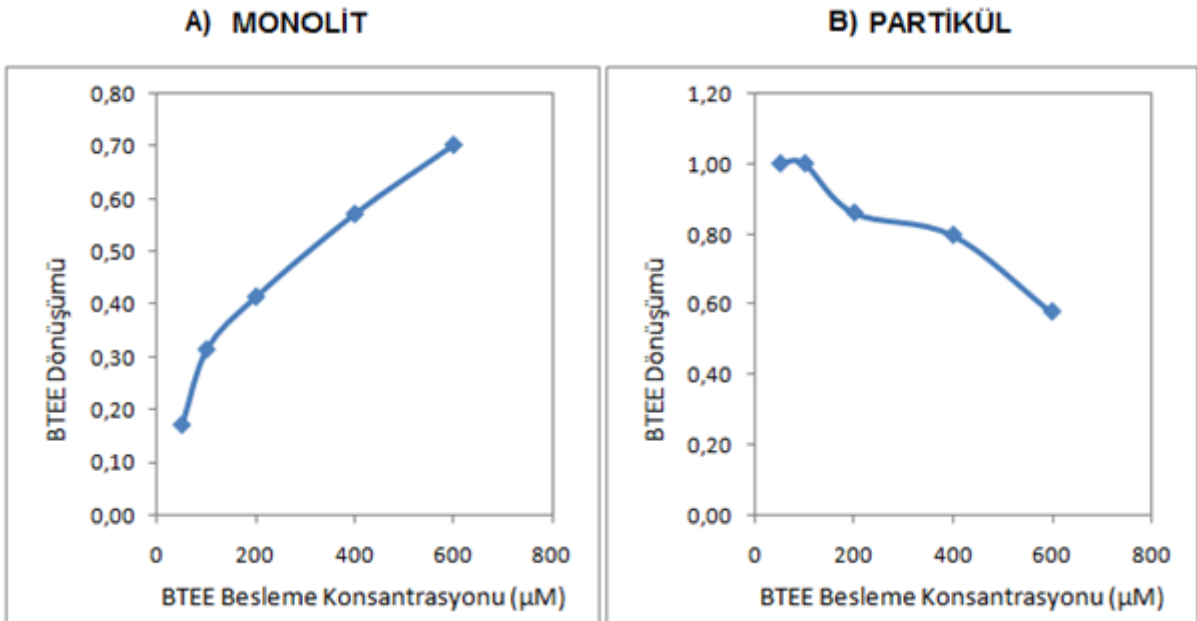
Şekil 4.46 M-CC monolitik kolonu için farklı substrat besleme derişimleri ile elde edilen voltaj-dönüşüm eğrilerinin kıyaslanması.  $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 25  $\mu$ L/dakika, Sıcaklık 25  $^{\circ}$ C, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID. BTEE derişimi: Mavi: 50  $\mu$ M, Kırmızı: 100  $\mu$ M, Kahverengi: 200  $\mu$ M, Siyah : 400  $\mu$ M, Yeşil: 600  $\mu$ M

Yatışkın durum voltaj farkı eğrileri yardımıyla hesaplanan ve yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimini gösteren grafikler şekil 4.48-A ve şekil 4.48-B'de gösterilmektedir. Bu grafiklerde her ikisi de kolay bağlanma ile sentezlenen monolitik kolon ile partikül bazlı kolon kıyaslanmaktadır.

Grafikler incelendiğinde her iki reaktörde birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Substrat besleme konsantrasyonun artışı Şekil 4.48-A'da yer alan monolitik reaktörde elde edilen BTEE dönüşümü artarken Şekil 4.48-B'de yer alan partikül bazlı reaktörde elde edilen BTEE dönüşümü azalmaktadır. Gözlenen bu davranış monolitik immobilize enzim reaktöründe genel hızın kimyasal reaksiyon basamağı tarafından kontrol edildiğini ve gözenek içi difüzyon kısıtlamalarının monolitik kolonlarda etkili olmadığını açık olarak göstermektedir.



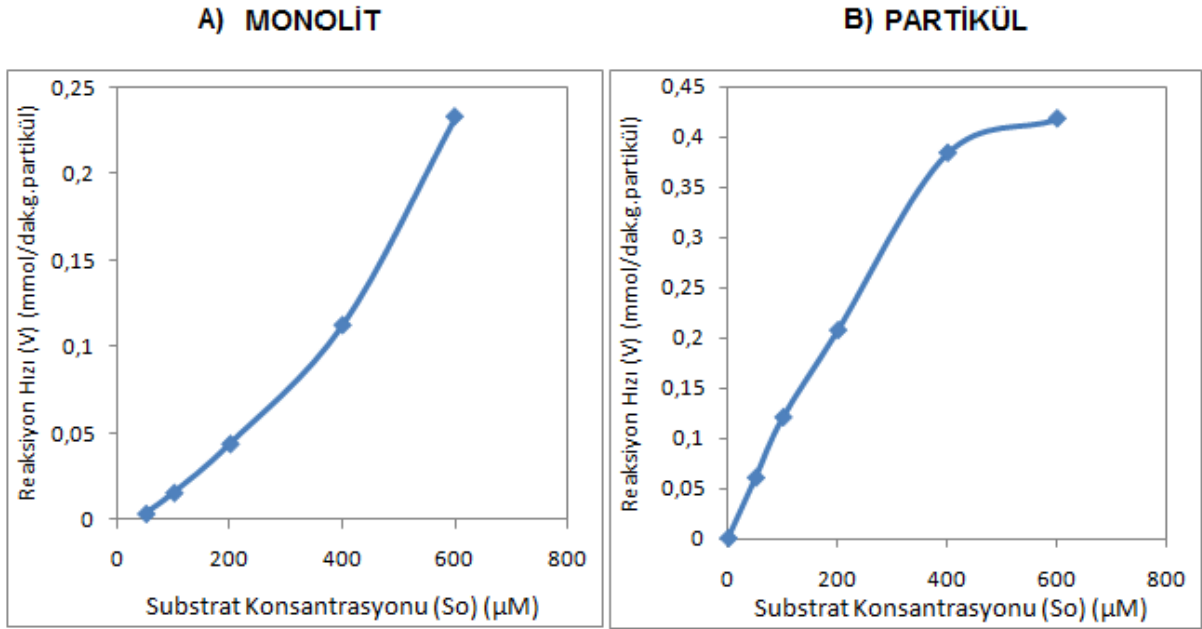
Şekil 4.47 A) M-CC kodlu monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda yatışkın durum voltaj farkının BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Kolay bağlanma.



Şekil 4.48 A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Kolay bağlanma.

Ancak, partikül bazlı kolonda genel hız büyük olasılıkla partikül içi difüzyon basamağı tarafından kontrol edilmekte, bu nedenle artan substrat derişimi ile yatışkın durum substrat dönüşümünde bariz bir düşme gözlenmektedir. Literatürde ilk kez gözlenen bu davranış farkı monolitik IMER'ın, partikül bazlı IMER'a bir diğer net üstünlüğünü ortaya koymaktadır.

Şekil 4.49-A ve şekil 4.49-B'de monolitik ve partikül bazlı reaktörler için 50, 100, 200, 400 ve 600  $\mu\text{M}$  aralığında BTEE derişimi içeren substrat çözeltileri kullanılarak reaksiyon hızları bulunmuş ve bu derişim değerlerine karşılık gelen reaksiyon hız değerleri grafiğe geçirilmiştir.



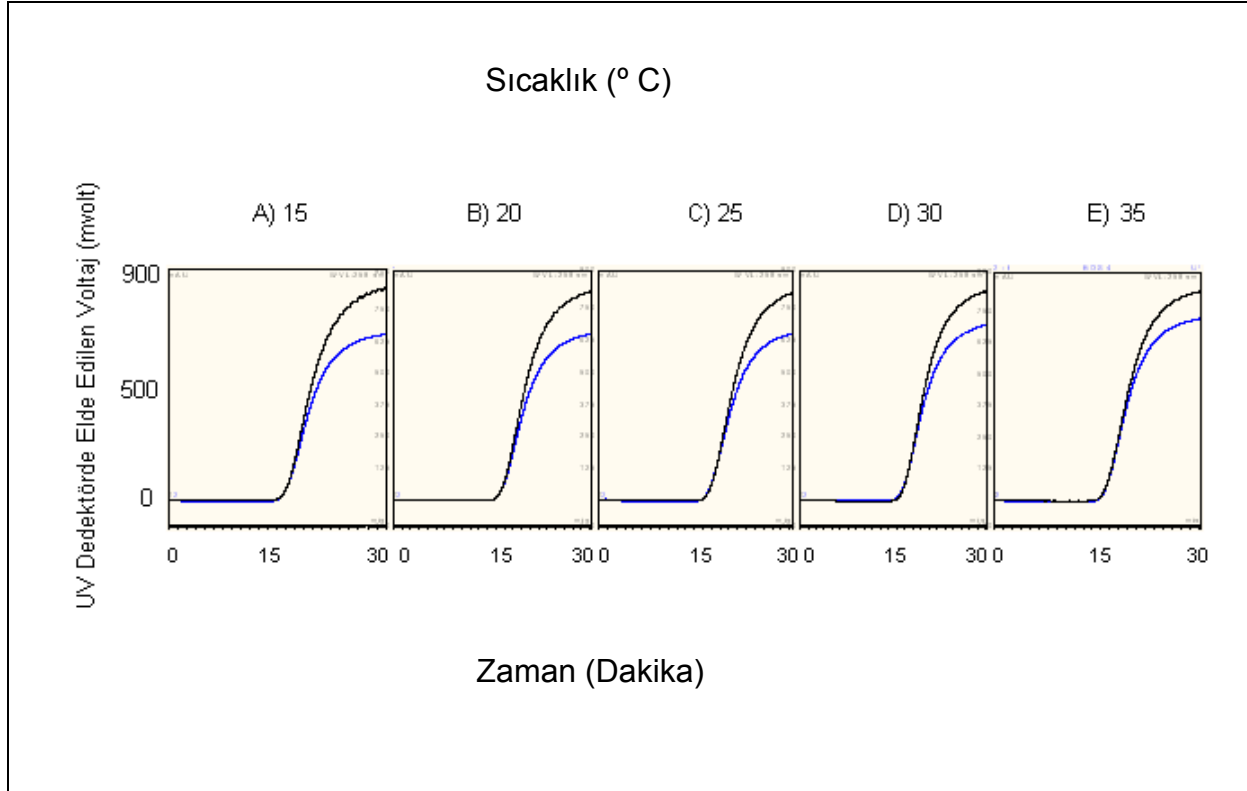
Şekil 4.49 A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi ( Michaelis-Menten grafiği).

Partikül bazlı sistem hiperbolik bir davranış ile Michaelis-Menten eğrisine tam bir uyum gösterirken, monolitik sistemde artan substrat derişimi ile reaksiyon hızı artış göstermiş fakat parabolik bir artış gösterdiği için yani hiperbolik bir artış olmadığı için bu davranış Michaelis-Menten'e uyumlu bulunmamıştır. Monolitik sistemde reaksiyon hızındaki artış substrat derişimi ile parabolik orantılı olarak gerçekleşmektedir.



#### 4.3.2.3 Sıcaklık etkisi

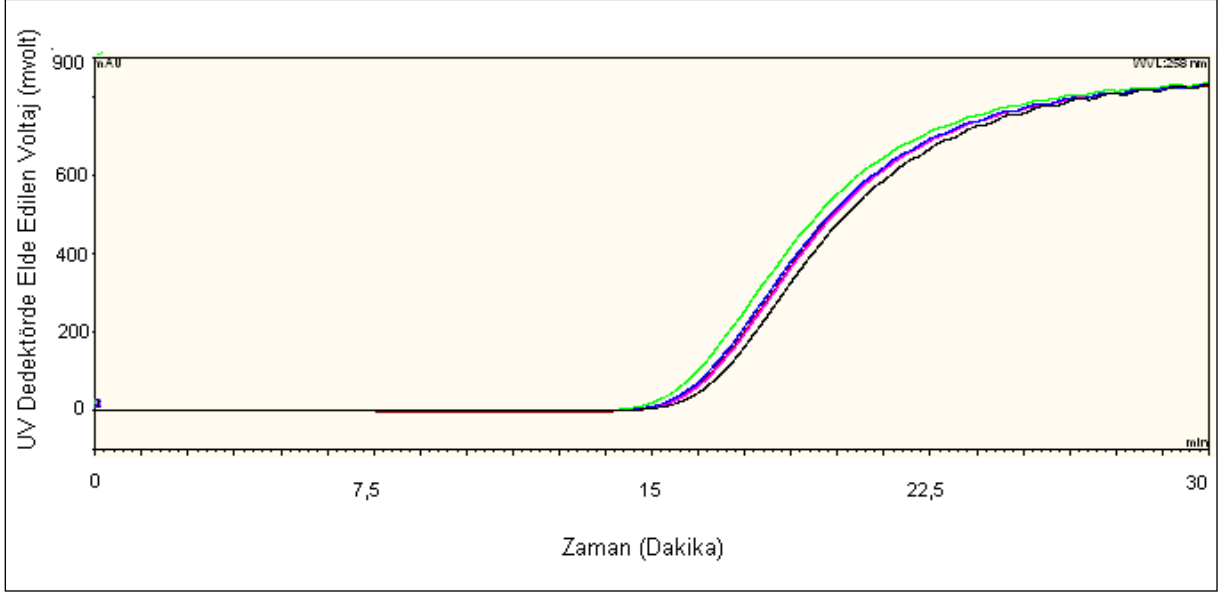
M-CC monolitik kolonunda sıcaklığın dönüşüme etkisi 400  $\mu$ M substrat konsantrasyonunda 25  $\mu$ L/dakika substrat akış hızında 15, 20, 25, 30 ve 35  $^{\circ}$ C sıcaklık değerlerinde incelenmiştir.



Şekil 4.50 Farklı sıcaklık değerlerinde boş ve dolu M-CC monolitik kolon için elde edilen sıvı kromatogramları.  $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 25  $\mu$ L/dakika, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID. A) 15  $^{\circ}$ C, B) 20  $^{\circ}$ C, C) 25  $^{\circ}$ C, D) 30  $^{\circ}$ C, E) 35  $^{\circ}$ C

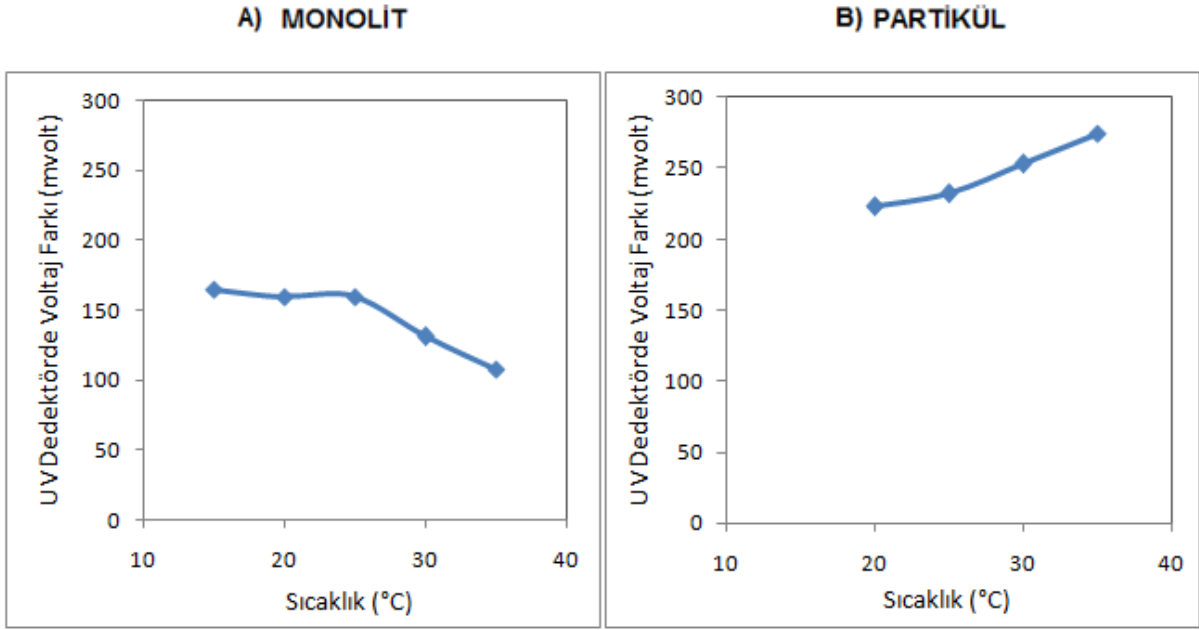
Şekil 4.50'de farklı sıcaklık değerlerinde alınmış kromatogram değerleri görülmektedir. Grafikler incelendiği zaman boş kolon ve monolitik kolon üst plato değerleri arasındaki farkın ilk sıcaklık değerlerinde hemen hemen aynı, sıcaklık artmasıyla beraber de plato değeri arasındaki farkın azda olsa azaldığı gözlenmektedir.

Şekil 4.51 monolitik kolon için elde edilen farklı sıcaklıklardaki voltaj değerlerini göstermektedir. Substrat konsantrasyonu ve akış hızı tüm sıcaklık değerlerinde aynı olduğu için absorbanstaki ilk yükselme ve ulaştıkları plato değeri hemen hemen aynı değerdedir.

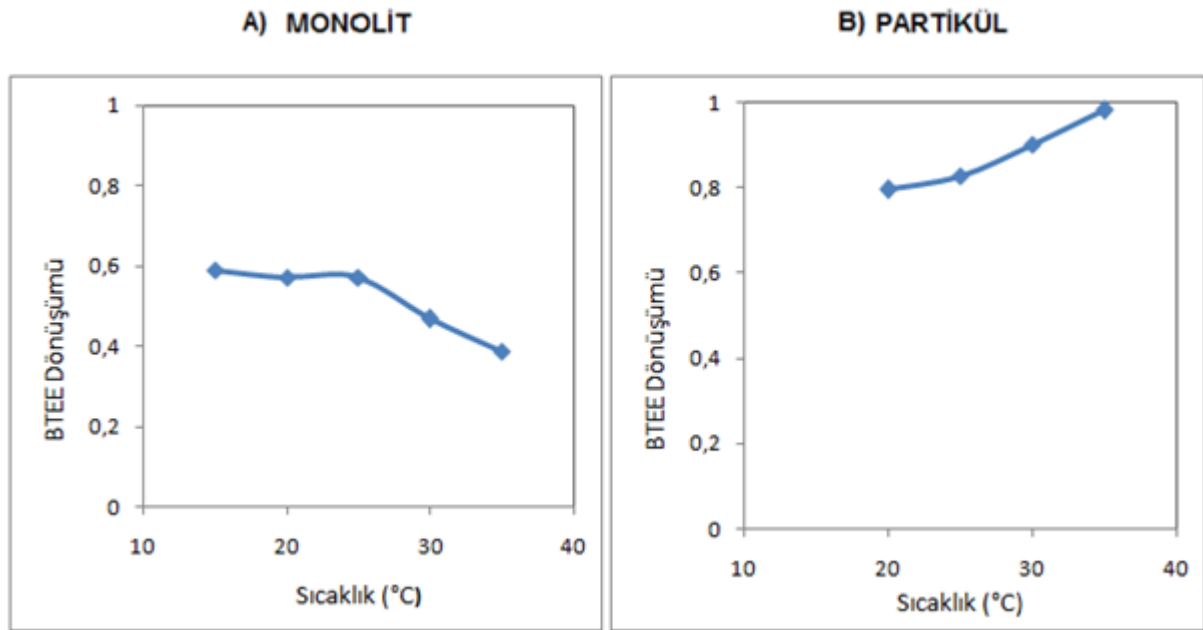


Şekil 4.51 M-CC monolitik kolon için farklı sıcaklıklarda elde edilen edilen sıvı kromatogramları.  $\mu$ HPLC sistemi, Akış hızı 25  $\mu$ L/dakika, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Kolon boyutları: 200mmx530  $\mu$ m ID.

Monolitik kolon ve boş kolon değerleri hesaplanarak UV dedektörde okunan voltaj farkı değerleri grafiğe geçirilmiş, şekil 4.52-A'da monolitik kolon için ve şekil 4.52-B'de partikül bazlı kolon için sıcaklığa karşı UV dedektörde elde edilen voltaj farkı grafiği elde edilmiştir. Monolitik kolonda artan sıcaklıkla UV dedektörde okunan voltaj farkı değerlerinde hafif bir düşme meydana gelirken partikül bazlı kolonda sıcaklık artışıyla voltaj farkı değerlerinde artış görülmektedir. Bu sonuç kolay bağlanma yöntemi ile elde edilen monolitik bazlı sistemde immobilize edilen enzimin termal deaktivasyona daha yatkın olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.52 Farklı sıcaklıklarda UV dedektörde elde edilen voltaj farkı değerlerinin değişimi. A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda



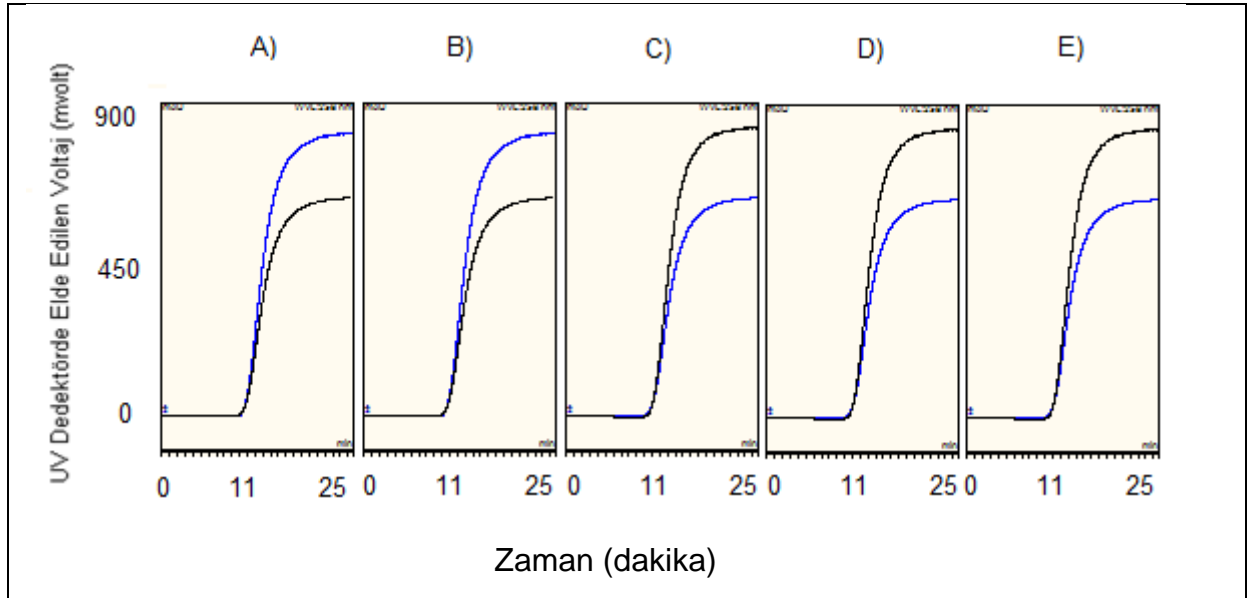
Şekil 4.53 Farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen BTEE dönüşümü değerleri. A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda

Kolay bağlanma yöntemleri ile elde edilen monolitik reaktör ve partikül bazlı reaktör için sıcaklığın yatışkın durum substrat dönüşümüne etkisi Şekil 4.53'de verilmektedir.

Normal şartlarda enzim aktivitesinin artan sıcaklıkla arttığı bilinmektedir. Fakat M-CC monolitik kolonunda 25 °C'den sonra enzim aktivitesi azalmaya başlamış ve dönüşüm azalmıştır. İmmobilize enzimin artan sıcaklıkla deaktive olması bu düşüşün nedeni olabilir. Öte yandan partikül bazlı reaktörde sıcaklık artışı ile BTEE substrat dönüşümünde artış tespit edilmiştir (şekil 4.53-B).

#### 4.3.2.4 µHPLC-IMER stabilite davranışı ve tekrarlanabilirlik

İmmobilize M-CC enzim reaktörünün stabilite davranışını ve tekrarlanabilirlik durumunu tespit etmek için aynı gün içinde analizden analize tekrarlanabilirlik deneyleri yapılmıştır.

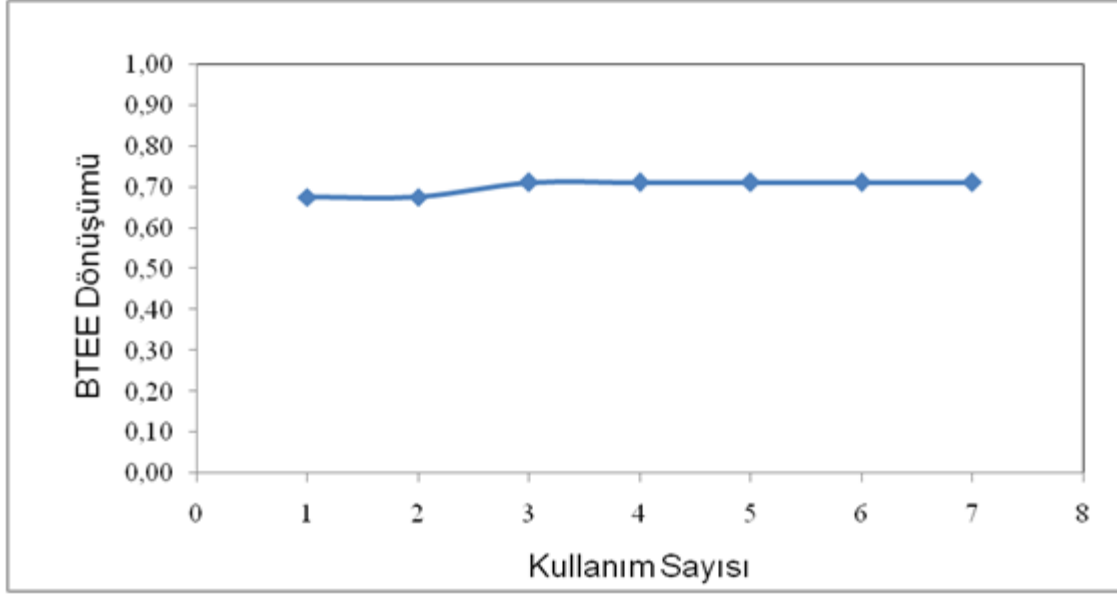


Şekil 4.54 Tekrarlanabilirlik kromatogramları. µHPLC sistemi, Akış hızı 25 µL/dakika, Substrat derişimi 400 µM, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 200mmx530 µm ID

Bu deneylerde akış hızı 40 µL/dakika, substrat besleme derişimi 400 µM, sıcaklık 25°C değerinde sabit tutulmuştur

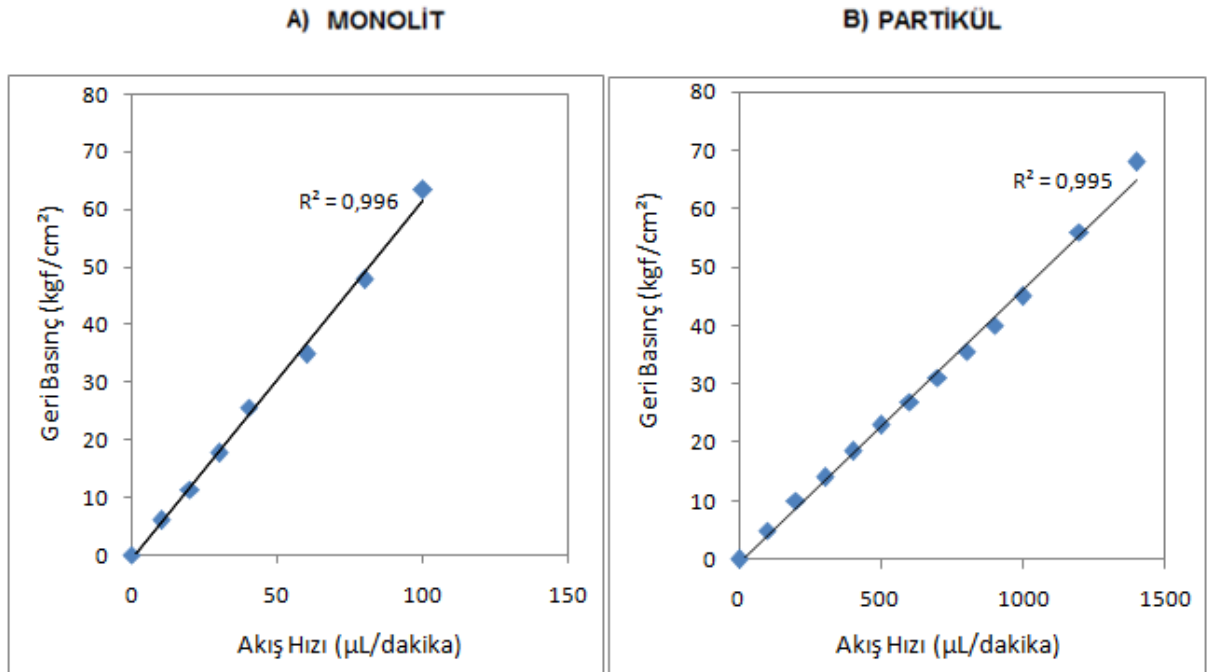
Ardışık tekrar deneyleri ile elde edilen kromatogramlar ve substrat dönüşümünün deney sayısı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.54 ve 4.55'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi kolay bağlanma yöntemi ile sentezlenen monolitik reaktör kararlı bir

kinetik davranış göstermekte ve yatışkın durum substrat dönüşümünde artan kullanım ile önemli bir değişiklik olmamaktadır.



Şekil 4.55 Analizden analize farklı kullanımlar sonucu elde edilen BTEE dönüşümleri

#### 4.3.2.5 µHPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı

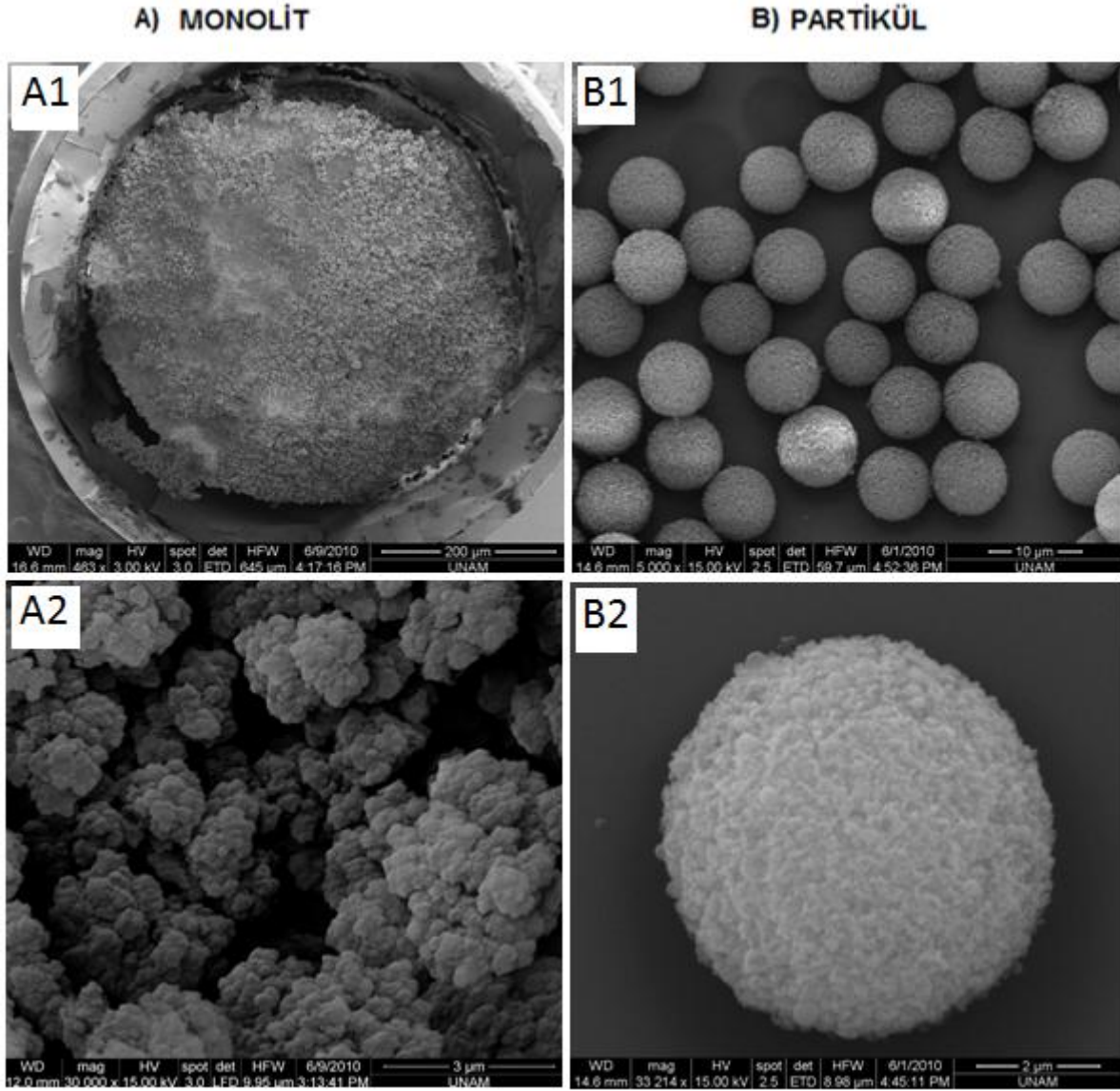


Şekil 4.56 Geri basınç değerlerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. A) M-CC monolitik kolonda, B) P-CC partikül bazlı kolonda

M-CC monolitik immobilize enzim reaktörünün geri basınç akış hız davranışı P-CC partikül bazlı kolonu ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.56). Basınç iki kolonda da akış hızı ile doğrusal olarak artış göstermektedir. Geri basınç değerleri iki kolon içinde kabul edilebilir düzeydedir.

#### 4.4 Glutaraldehit Aktivasyonu Yöntemi İle Partikül Bazlı $\mu$ HPLC-IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu, Monolitik $\mu$ HPLC-IMER İle Kıyaslanması

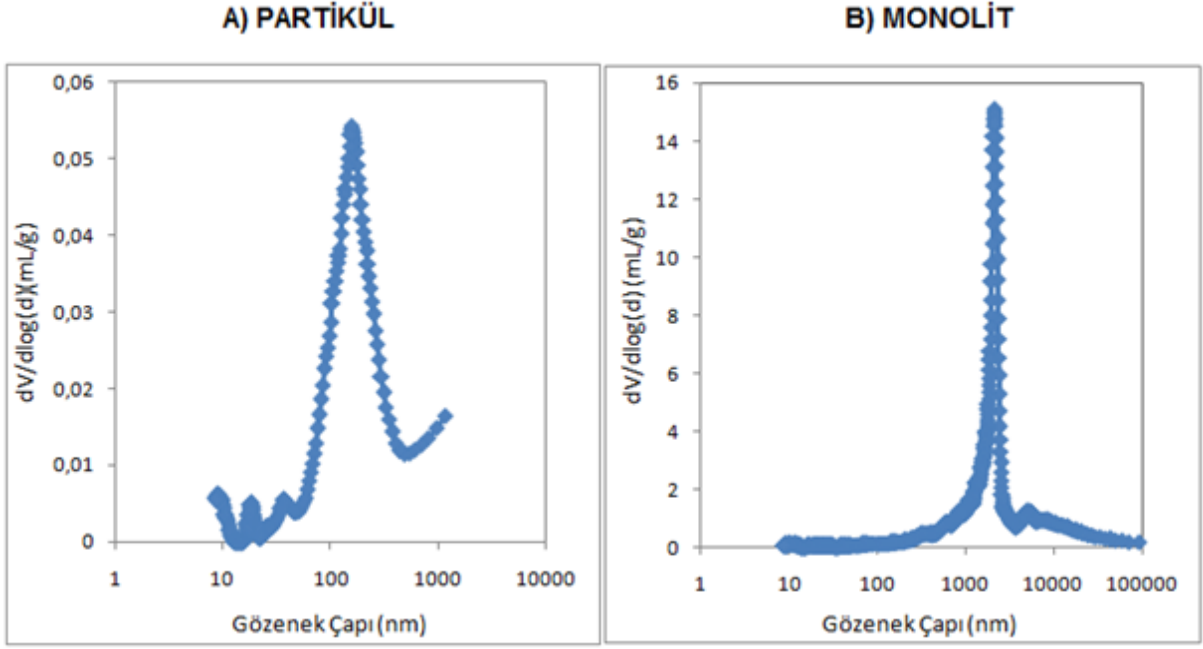
##### 4.4.1 Poli(GMA-EDM) partiküllerinin karakterizasyonu



Şekil 4.57 Poli(GMA-EDM) partiküllerinin ve monolitinin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları A) Monolitik sistem, Büyütme, A1: 463X, A2: 30000X B) Partikül bazlı sistem, Büyütme, B1: 5000X, B2: 33214X

Partikül bazlı  $\mu$ HPLC-IMER için sentezlenen Poli(GMA-EDM) partiküllerinin yüzey morfolojisi görmek amacıyla SEM fotoğrafları çekilmiş ve poli(GMA-EDM) monolitlerine ait SEM fotoğrafları ile şekil 4.57’de kıyaslamalı olarak verilmiştir.

Şekilde partiküllerin monolite kıyasla daha küçük boyutlu gözenekler içerdiği görülmektedir.



Şekil 4.58 Civa porozimetre ile elde gözenek dağılım grafiği, A ) Partikül bazlı sistem B) Monolitik sistem

Poli(DHPM-EDM) partiküllerine ve monolitine ait civa porozimetre ile elde edilen gözenek dağılım grafiği şekil 4.58’de görülmektedir. Şekil 4.58-A’da poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait gözenek boyutunun 75-350 nm aralığında değiştiği ve ortalama gözenek boyutunun 150 nm olduğu bulunmuştur. Şekil 4.58-B’deki monolitik yapının gözenek boyutu ise 1500-2500 nm aralığında değişmekte ve ortalama gözenek boyutu 2000 nm olarak görünmektedir.

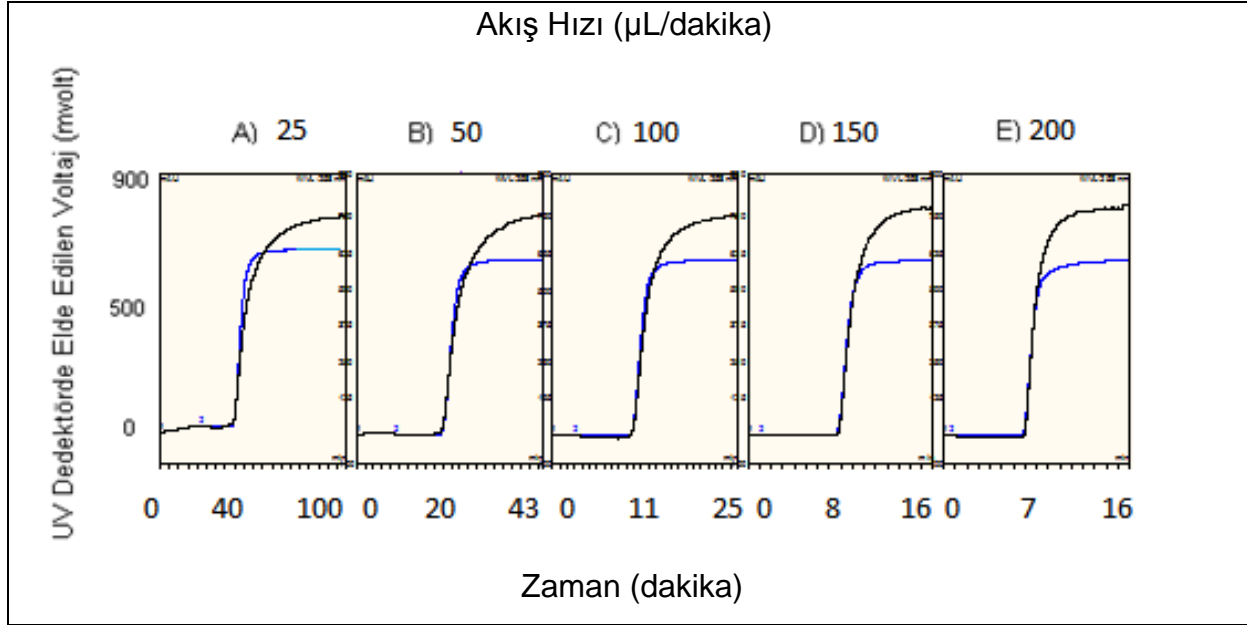
#### 4.4.2 Kromatografik çalışmalar

Tez kapsamında glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile sentezlenen partikül bazlı immobilize enzim reaktörüne P-GA kodu verilmiştir. Bu kolon yine glutaraldehit



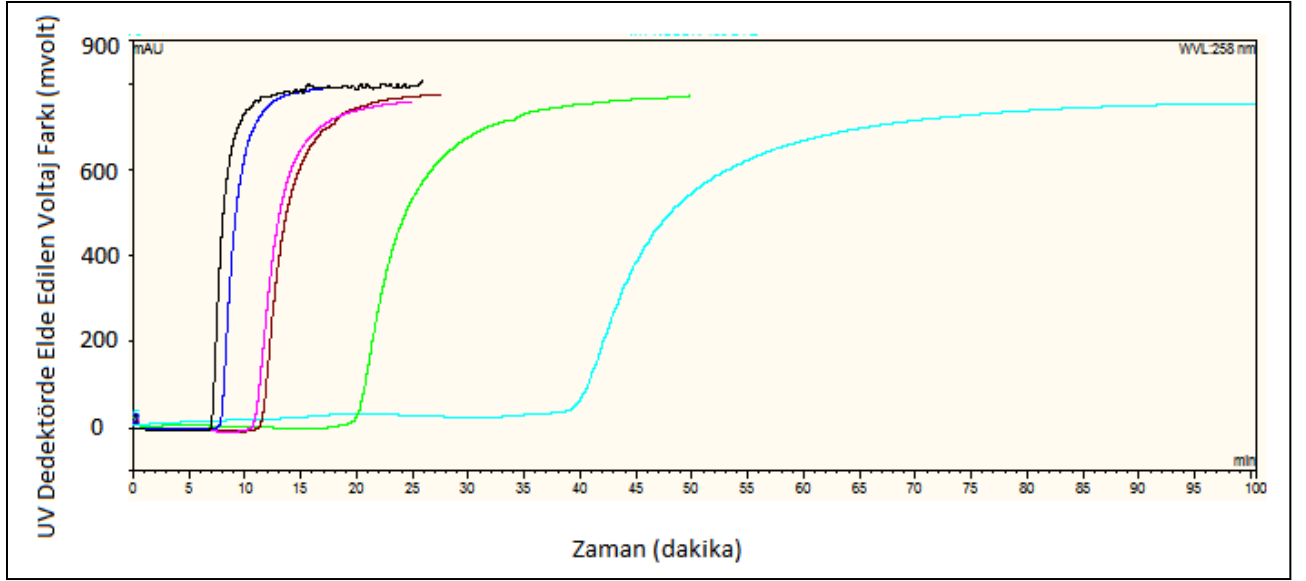
aktivasyonu yöntemi ile sentezlenmiş M-GA kodlu monolitik immobilize enzim reaktörü ile kıyaslanmıştır.

#### 4.4.2.1 Akış hızı etkisi



Şekil 4.59 Farklı mobil faz akış hızlarında P-GA kolonu ve referans kolon için elde edilen substrat dönüşüm eğrileri.  $\mu\text{HPLC}$  sistemi, Substrat derişimi  $400 \mu\text{M}$ , Sıcaklık  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , Kolon boyutları:  $100 \times 1.0 \text{ mm ID}$ . Akış hızı ( $\mu\text{L}/\text{dak}$ ) A)25, B)50, C)100, D)150, E)200

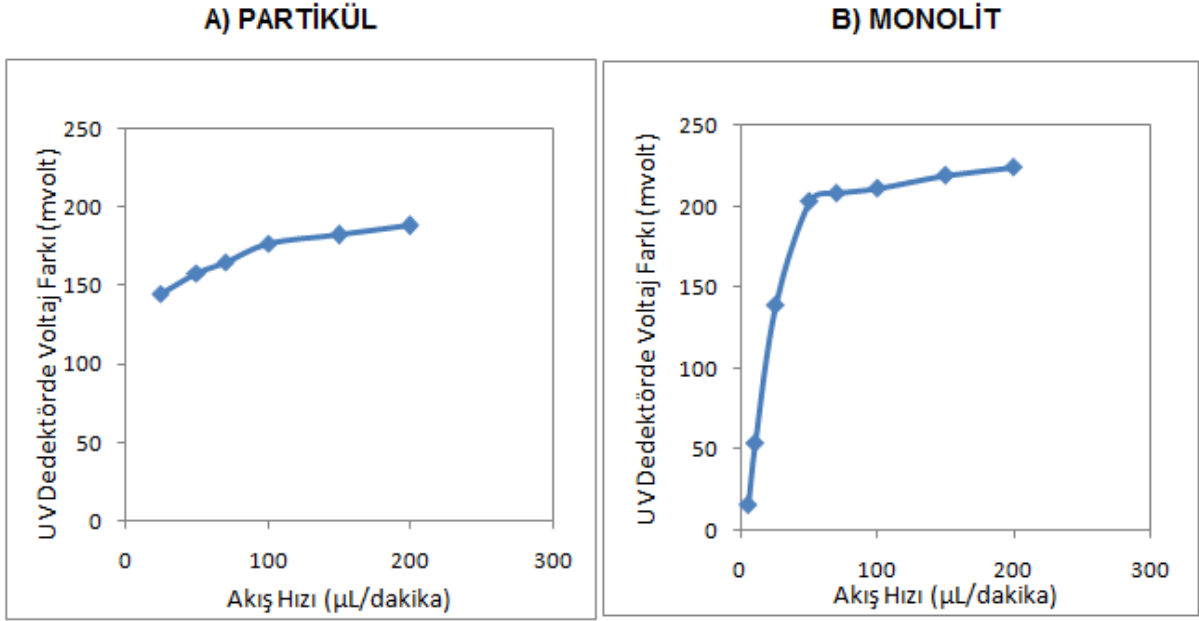
Sentezlenen partikül bazlı kolonda ilk olarak olarak mobil faz akış hızının substrat dönüşümüne etkisi incelenmiştir. Deneyler  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta,  $400 \mu\text{M}$  substrat çözeltisiyle 25, 50, 100, 150 ve 200  $\mu\text{L}/\text{dakika}$  akış hızlarında yapılmıştır. Elde edilen substrat dönüşüm eğrileri her bir akış hızı için referans kolon ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.59'da verilmektedir. Bütün grafiklerde absorbansın zamanla değişiminin "S" şeklinde olduğu görülmektedir. Akış hızındaki artışa bağlı olarak yatışkın durumda P-GA ve referans kolon arasındaki absorbans farkının arttığı gözlemlenmektedir. Absorbans farkında belli miktarda artış gözlemlenmesine rağmen bu artışın çok yüksek olmadığı görülmektedir.



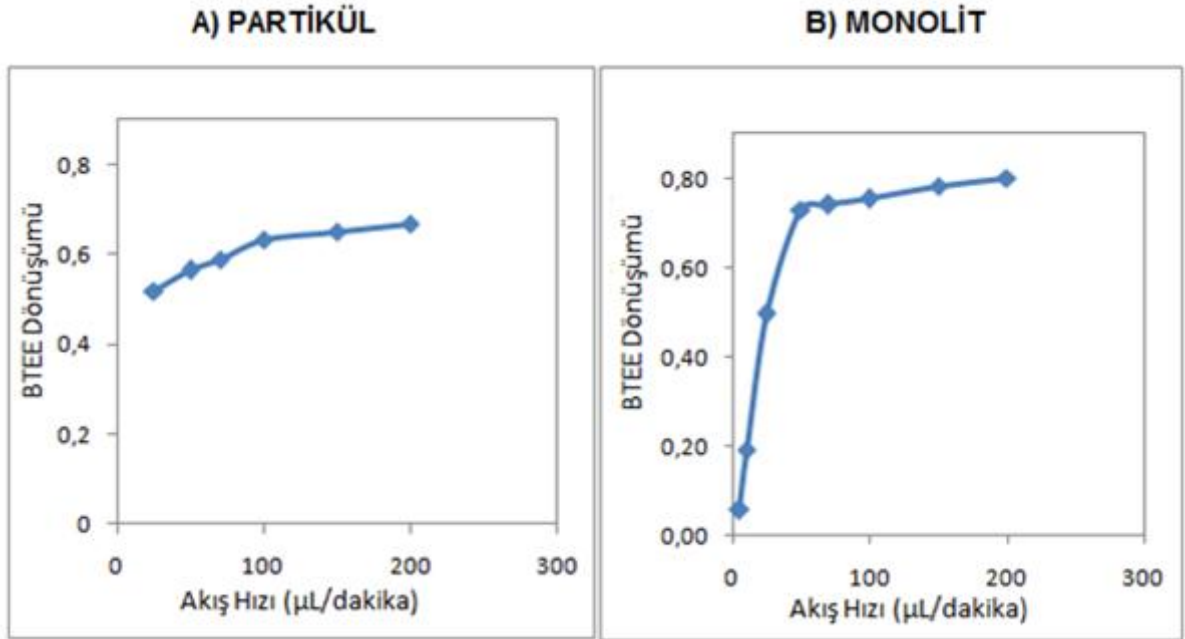
Şekil 4.60 P-GA partikül bazlı kolonunun akış hızı kromatogramları.  $\mu$ HPLC sistemi, Substrat derişimi 400  $\mu$ M, Sıcaklık 25  $^{\circ}$ C, Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. Turkuaz: 25  $\mu$ L/dak., Yeşil: 50  $\mu$ L/dak., Kahverengi: 90  $\mu$ L/dak., Kırmızı: 100  $\mu$ L/dak., Mavi: 150  $\mu$ L/dak., Siyah: 200  $\mu$ L/dak.,

Şekil 4.60' da akış hızının artmasıyla UV dedektörde elde edilen voltaj farkı eğrilerinin yükselişe geçtiği sürenin giderek kısaldığı yani BTEE ve BT'nin kolon içerisinde daha az kaldığı gözlenmektedir. Yani beklendiği gibi alıkonma süresi artan akış hızıyla azalmaktadır.

Şekil 4.61-A ve Şekil 4.61-B'de partikül bazlı ve monolitik kolon için UV dedektörde elde edilen voltaj farkı akış hızına karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenen partikül bazlı kolonda artan akış hızı ile yatışkın durum voltaj farkı değerlerinde hafif bir artma gözlenirken, yine aynı yöntemle sentezlenen monolitik kolon için artan akış hızı ile yatışkın durumda elde edilen voltaj farkı değerlerinde belirgin bir artış görülmektedir.



Şekil 4.61 A) P-GA partikül bazlı, B) M-GA monolitik kolon için yatışkın durum voltaj farkının akış hızı ile değişimi (İmmobilizasyon : Glutaraldehit Aktivasyonu)

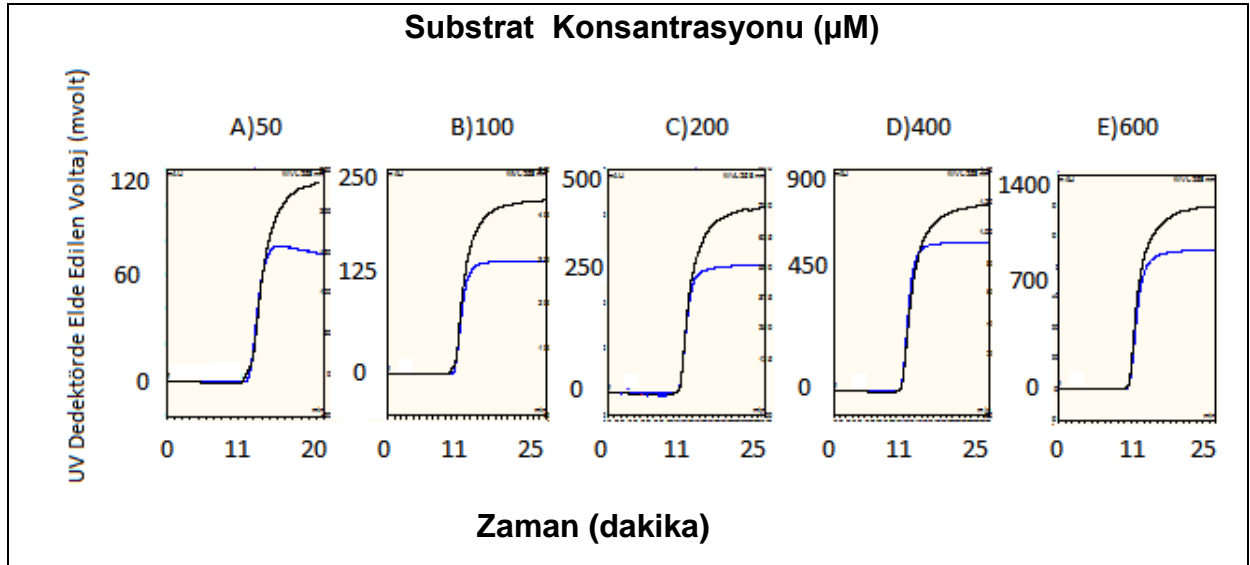


Şekil 4.62 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA monolitik kolonunda mobil faz akış hızı ile BTEE dönüşümünün değişimi. (İmmobilizasyon yöntemi: Glutaraldehit Aktivasyonu)

Şekil 4.62-A ve Şekil 4.62-B' de her ikisi de glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenen partikül bazlı ve monolitik kolonlar için artan akış hızı ile elde edilen BTEE substrat dönüşümleri gösterilmektedir. Voltaj fakındaki davranış aynı zamanda dönüşüme de yansımakta, dönüşüm için yapılan karşılaştırma da da benzer davranış elde edilmektedir. Bu durum monolitik reaktörde konvektif difüzyon etkisinin varlığını net olarak göstermektedir.

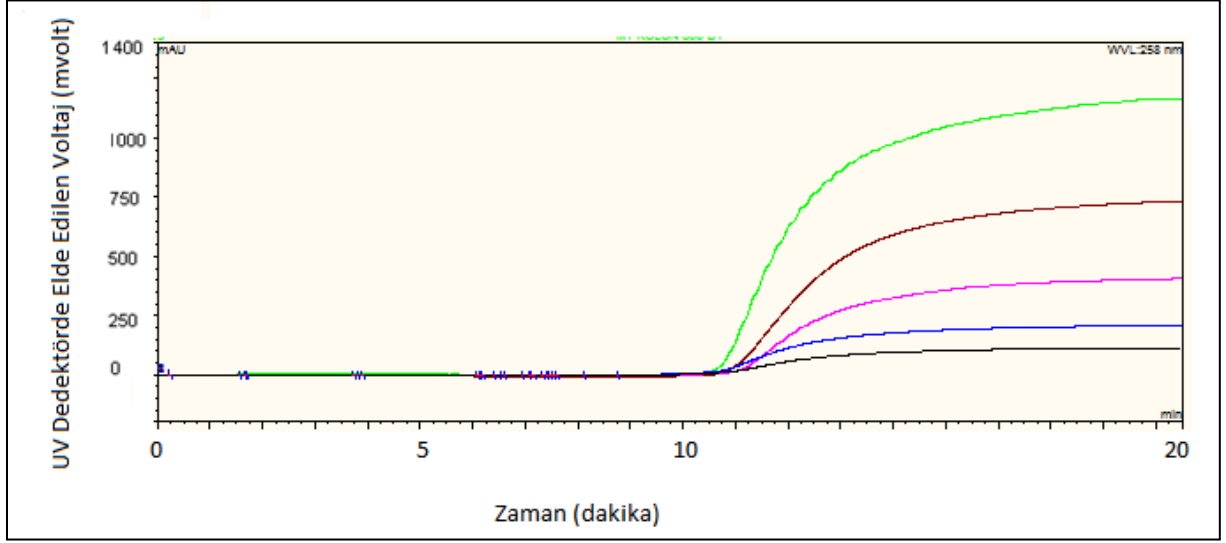
#### 4.4.2.2 Subsrat konsantrasyonu etkisi

BTEE derişiminin dönüşüme etkisi, 100 µL/dakika mobil faz akış hızı kullanılarak, 25 °C sıcaklıkta incelenmiştir. Deneylede % 95 borat tamponu, % 5 etanol içeren pH 7.8 değerine sahip BTEE çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Farklı BTEE derişimleri için voltaj farkının zaman ile değişimi Şekil 4.63'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi yatışkın durum voltaj farkı artan BTEE derişimi ile azalma göstermektedir. P-GA partikül bazlı kolon için farklı substrat besleme derişimleri için elde edilen voltaj-dönüşüm eğrileri Şekil 4.64'te kıyaslanmaktadır.

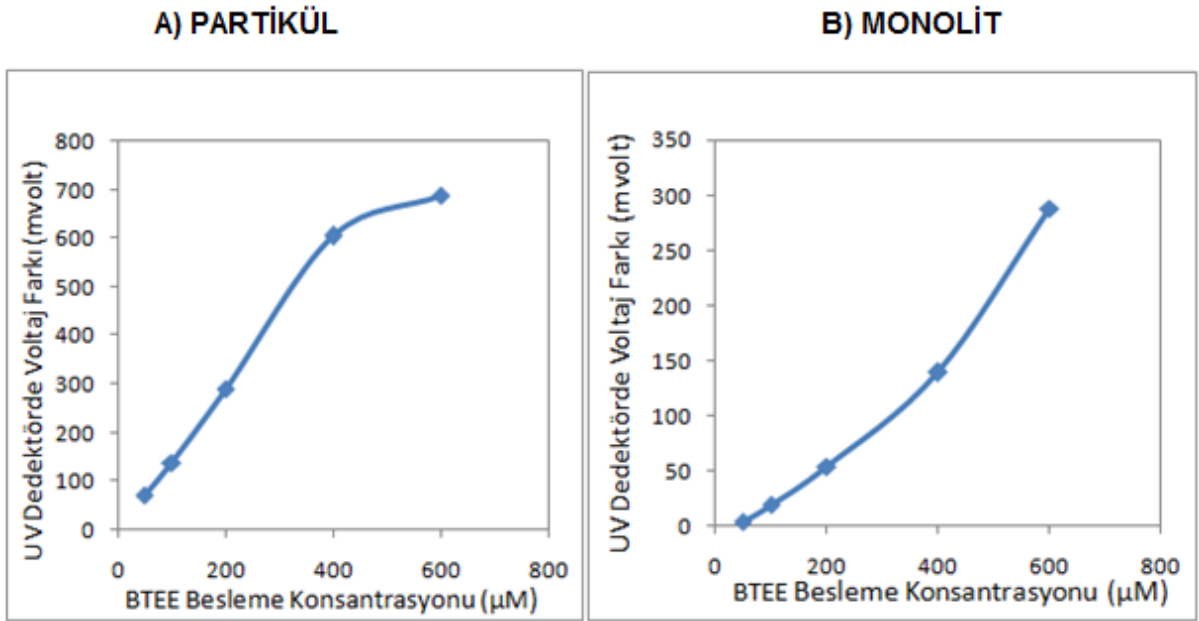


Şekil 4.63 Farklı BTEE konsantrasyonlarında boş kolon ve P-GA partikül bazlı kolon için elde edilen voltaj-zaman eğrileri. µHPLC sistemi, Akış hızı 100 µL/dakika, Sıcaklık 25 °C, Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. BTEE derişimi (µM): A) 50, B) 100, C) 200, D) 400, E) 600.

Daha yüksek derişimlere çıkıldıkça UV dedektörde okunan absornbans değerlerine artış görülmektedir.



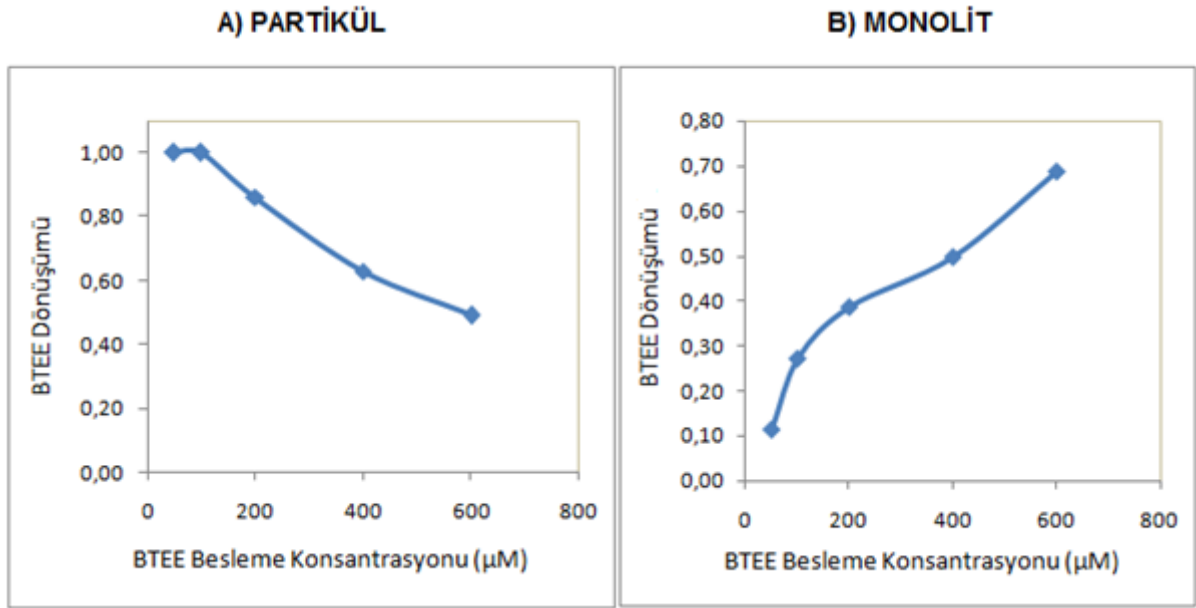
Şekil 4.64 P-GA partikül bazlı kolon için farklı substrat besleme derişimleri ile elde edilen voltaj-dönüşüm eğrilerinin kıyaslanması.  $\mu\text{HPLC}$  sistemi, Akış hızı 100  $\mu\text{L}/\text{dakika}$ , Sıcaklık 25  $^{\circ}\text{C}$ , Kolon boyutları: 100x1.0mm ID. BTEE derişimi ( $\mu\text{M}$ ): Siyah: 50 Mavi: 100 , Kırmızı: 200 , Kahverengi: 400, Yeşil: 600



Şekil 4.65 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA kodlu monolitik kolonda yatışkın durum voltaj farkının BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Glutaraldehit Aktivasyonu

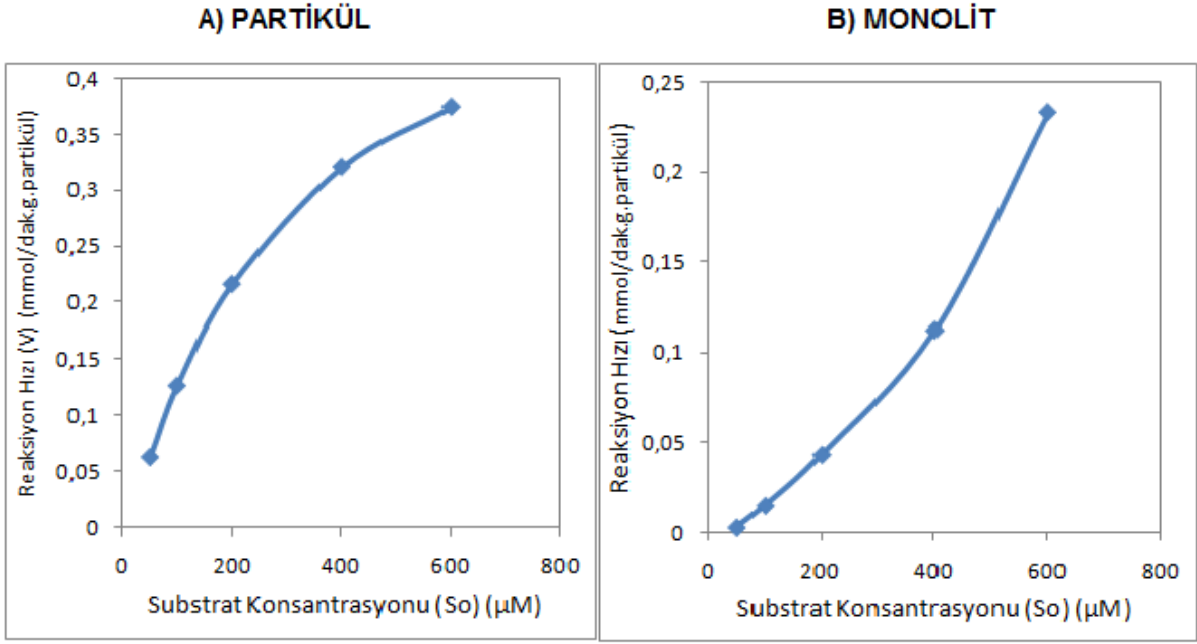
Yatışkın durumdaki voltaj farkının substrat besleme derişimi ile değişimi glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile sentezlenen partikül bazlı ve monolitik kolonlar için Şekil 4.65-A ve şekil 4.65-B' de gösterilmektedir. Buradan görüldüğü gibi artan BTEE besleme konsantrasyonu ile yatışkın durum voltaj farkı doğru orantılı olarak artmaktadır.

Yatışkın durum voltaj farkı eğrileri yardımıyla hesaplanan ve yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimini gösteren grafikler şekil 4.66-A ve şekil 4.66-B'de gösterilmektedir. Bu grafiklerde her ikisi de  $\mu$ HPLC'de glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenen partikül bazlı kolon ile monolitik kolon kıyaslanmaktadır.



Şekil 4.66 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA monolitik kolonda yatışkın durum BTEE dönüşümünün BTEE besleme derişimi ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: Glutaraldehit Aktivasyonu.

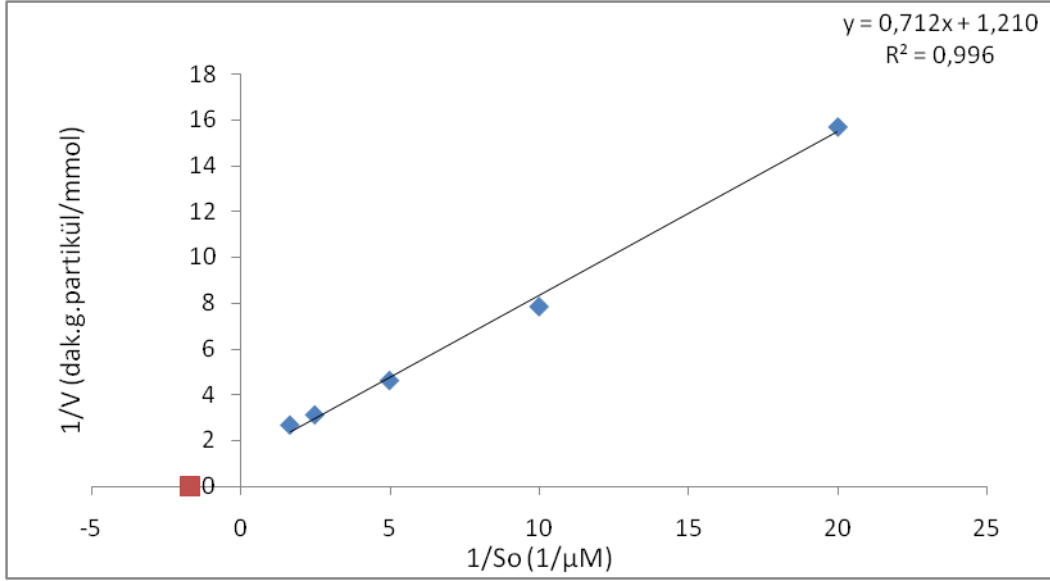
Grafikler incelendiğinde her iki reaktörde birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Substrat besleme konsantrasyonun artışı ile Şekil 4.66-A'da yer alan partikül bazlı reaktörde elde edilen BTEE dönüşümü azalırken, şekil 4.66-B'de yer alan monolitik reaktörde elde edilen BTEE dönüşümü artmaktadır.



Şekil 4.67 A) P-GA partikül bazlı kolonda, B) M-GA monolitik kolonda reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi ( Michaelis-Menten grafiği).

Şekil 4.67-A ve şekil 4.67-B'de partikül bazlı reaktör ve monolitik reaktör için 50, 100, 200, 400 ve 600 µM aralığında BTEE derişimi içeren substrat çözeltileri kullanılarak reaksiyon hızları bulunmuş ve bu derişim değerlerine karşılık gelen reaksiyon hız değerleri grafiğe geçirilmiştir.

Elde edilen grafiklerde partiküle ait şekil 4.67-A hiperbolik eğrisinin Michaelis-Menten grafiği ile uyumlu olduğu görülürken, şekil 4.67-B'de yine reaksiyon hızı substrat derişimi ile artış göstermiş fakat burada Michaelis-Menten'nin gerektirdiği hiperbolik bir artış değil de substrat derişimi ile orantılı parabolik bir artış gözlemlenmiştir. Partikül için şekil 4.67-A grafiğindeki veriler kullanılarak 1/S'e karşı 1/V grafiğe geçirilmiş şekil 4.68'de Lineweaver-Burke grafiği elde edilmiştir. Buradan maksimum reaksiyon hızı  $V_m$  0,83 mmol/dak.g.partikül olarak bulunmuştur. Grafiğin eğimi ile  $K_m$  değeri 588 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.68 Glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile immobilize edilen enzimin substrat ile ilişkisinin Lineweaver-Burke grafiği

Serbest enzim ile yapılan çalışmalarda  $K_m$  değeri  $63,1 \mu\text{M}$  bulunmuştur. Glutaraldehit aktivasyonu ile immobilize edilen enzim içeren IMER'de serbest enzime kıyasla yaklaşık 9 kat daha yüksek  $K_m$  değeri elde edilmiştir.

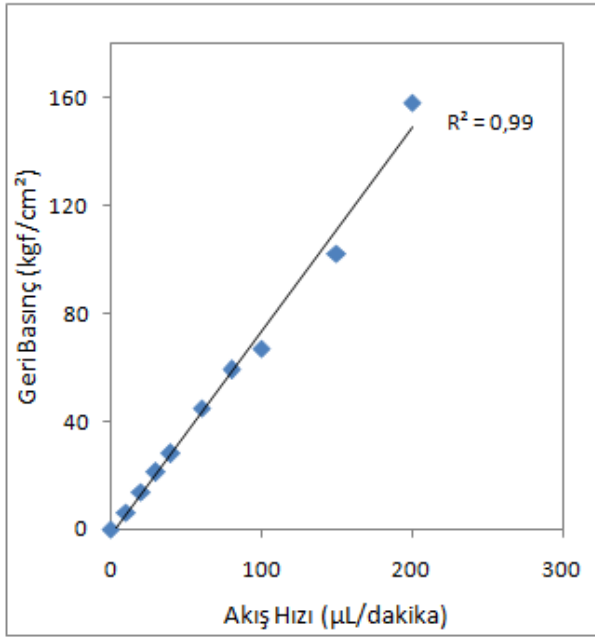
#### 4.4.2.3 μHPLC-IMER geri - basınç akış hızı davranışı

P-GA partikül bazlı immobilize enzim reaktörünün geri basınç akış hızı davranışı M-GA monolitik kolonu ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.69). Basınç iki kolonda da akış hızı ile doğrusal olarak artış göstermektedir. Geri basınç değerleri iki kolon içinde kabul edilebilir düzeydedir.

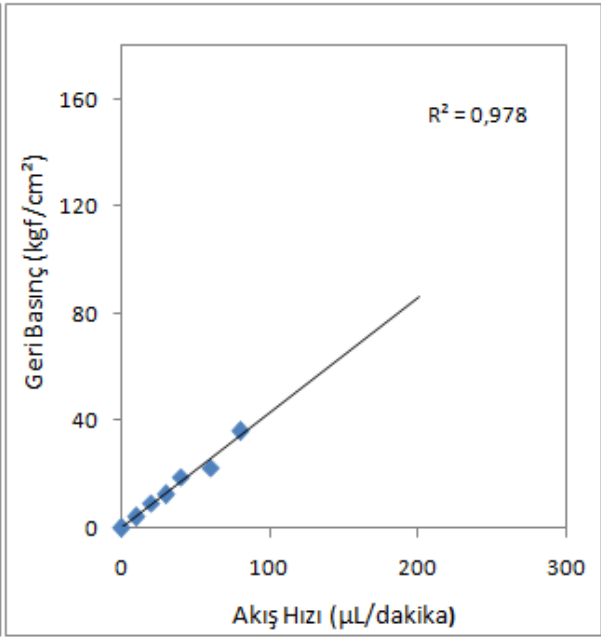
μHPLC sisteminde partikül bazlı ve monolitik kolonda elde edilen geri basınç değerleri kıyaslandığında partikül bazlı kolonda daha yüksek geri basınç değerlerinin söz konusu olduğu görülmektedir. Bunun sebebi monolitik yapının gözenekliliğinin ve gözenek çapının partiküler yapıya göre çok daha fazla olmasıdır. Monolitik yapılarda gözenekler geçirgenliği arttırmakta ve daha düşük basınç farkları oluşmaktadır.



A) PARTİKÜL



B) MONOLİT



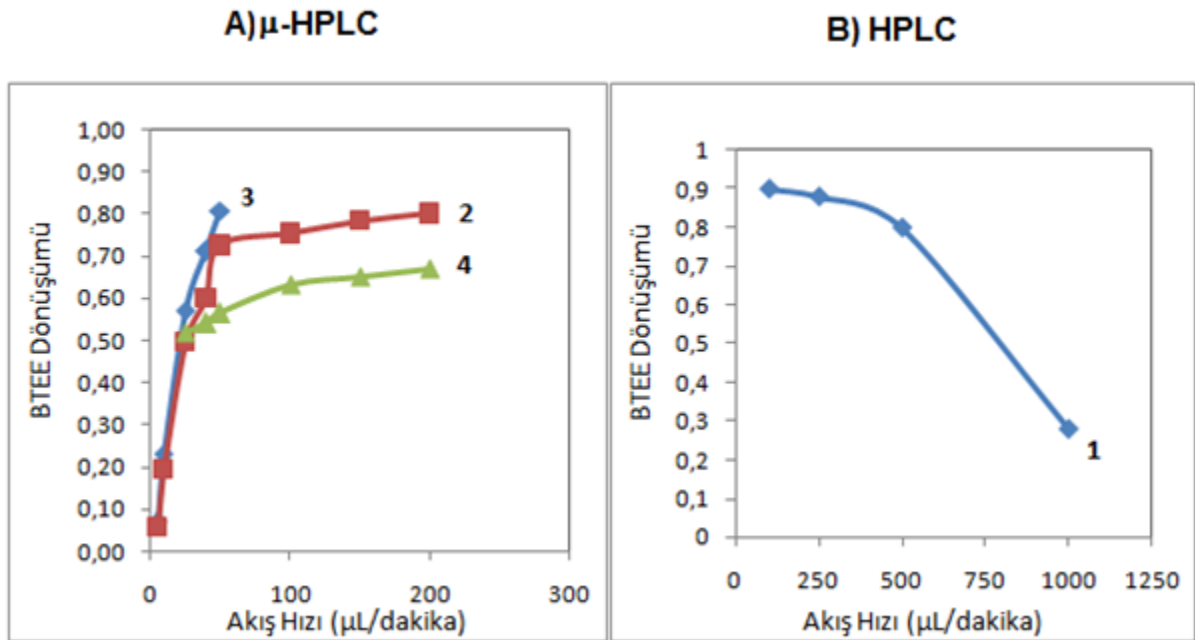
Şekil 4.69 Geri basınç değerlerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. A) P-GA partikül bazlı kolonda B) M-GA monolitik kolonda

#### 4.5 İmmobilize Enzim Reaktörlerinin $\mu$ HPLC Ve HPLC Sistemlerinde İmmobilizasyon Türüne Göre Karşılaştırılması

Tez çalışması boyunca 4 adet immobilize enzim reaktörü sentezlenmiştir. Bu reaktörlerden immobilizasyon işlemi kolay bağlanma yöntemi ile yapılan P-CC kodlu partikül bazlı reaktörün analizleri HPLC’de yürütülürken, immobilizasyon işlemi glutaraldehit aktivasyonu yöntemi ile yapılan M-GA kodlu monolitik reaktör, P-GA kodlu partikül bazlı reaktör ve yine kolay bağlanma yöntemi ile sentezlenen M-CC kodlu monolitik reaktörün analizleri  $\mu$ HPLC’de gerçekleştirilmiştir.

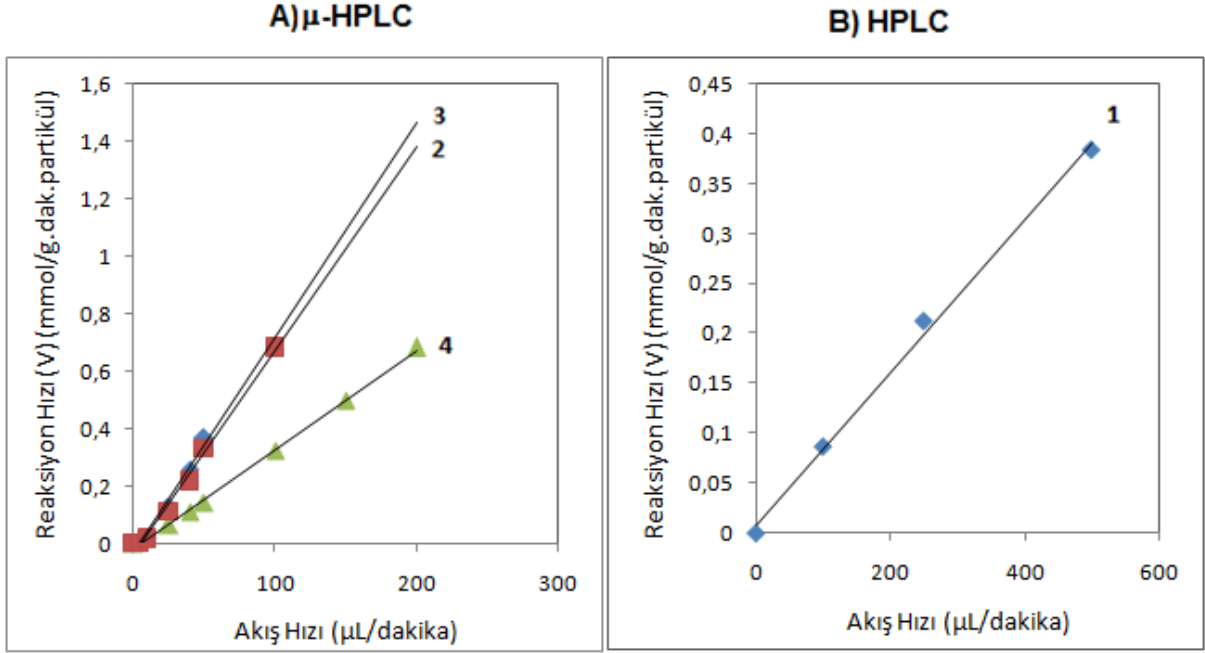
##### 4.5.1 Akış hızı

Akış hızı çalışmaları, 25 °C sıcaklıkta 400  $\mu$ M BTEE çözeltisi substrat olarak kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.70 A)  $\mu$ HPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda mobil faz akış hızı ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu.

Şekil 4.70-A incelendiğinde  $\mu$ HPLC’de monolitik kolonlarda artan akış hızı ile dönüşümün bariz bir artış gösterdiği, partikül bazlı kolonda ise değişmediği görülmektedir. Ancak HPLC’de partikül bazlı kolonda, artan akış hızı ile dönüşüm bariz şekilde azalmaktadır.

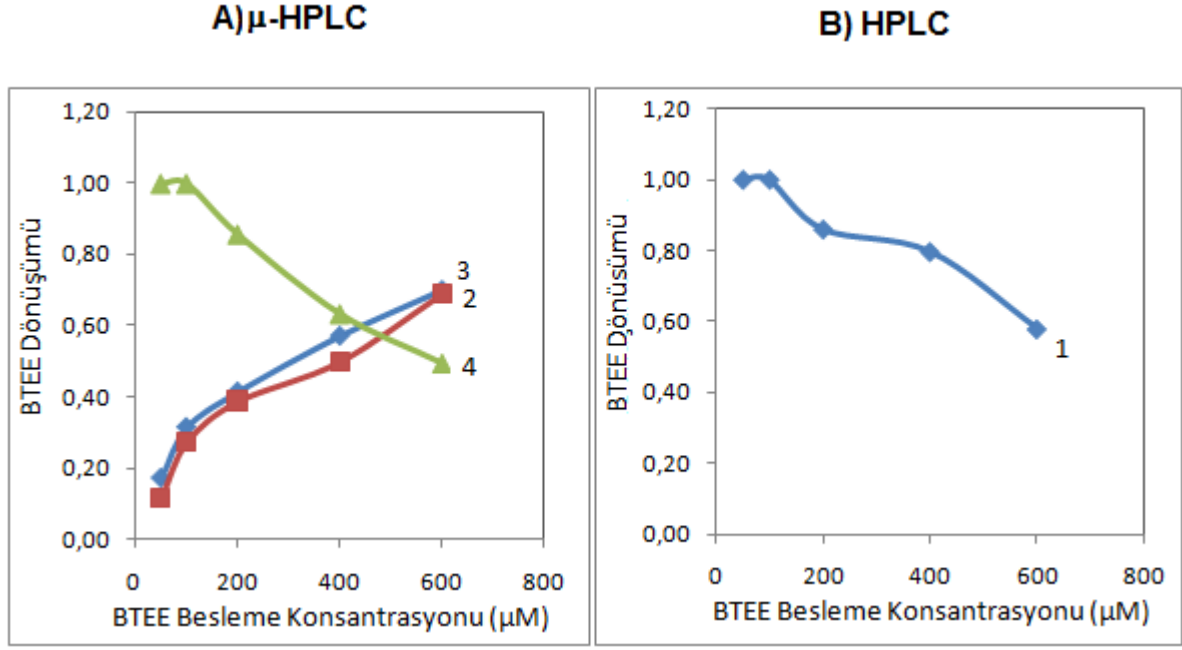


Şekil 4.71 A)  $\mu$ HPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda mobil faz akış hızı ile reaksiyon hızı değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu.

Şekil 4.71’de akış hızına karşı elde edilen reaksiyon hızları grafiğe geçirilmiştir. Buradan görüldüğü gibi hem partikül hemde monolit bazlı sistemlerde reaksiyon hızı artan akış hızı ile doğrusal artış göstermiştir.

#### 4.5.2 Substrat konsantrasyonu

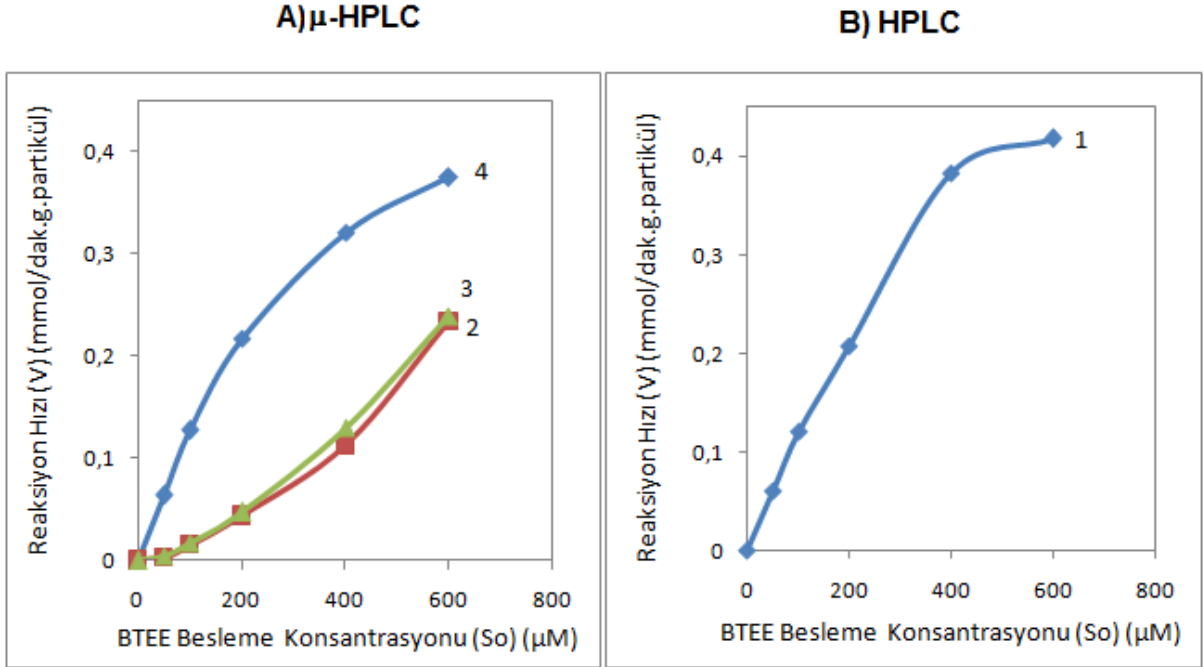
Substrat derişimi deneyleri 25 °C sıcaklıkta, P-CC kolonunda 500  $\mu$ L/dakika, M-GA ve M-CC monolitik kolonlarında 25  $\mu$ L/dakika, P-GA partikül bazlı kolonda ise 100  $\mu$ L/dakika akış hızlarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.72 A) μHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda BTEE besleme konsantrasyonu ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu.

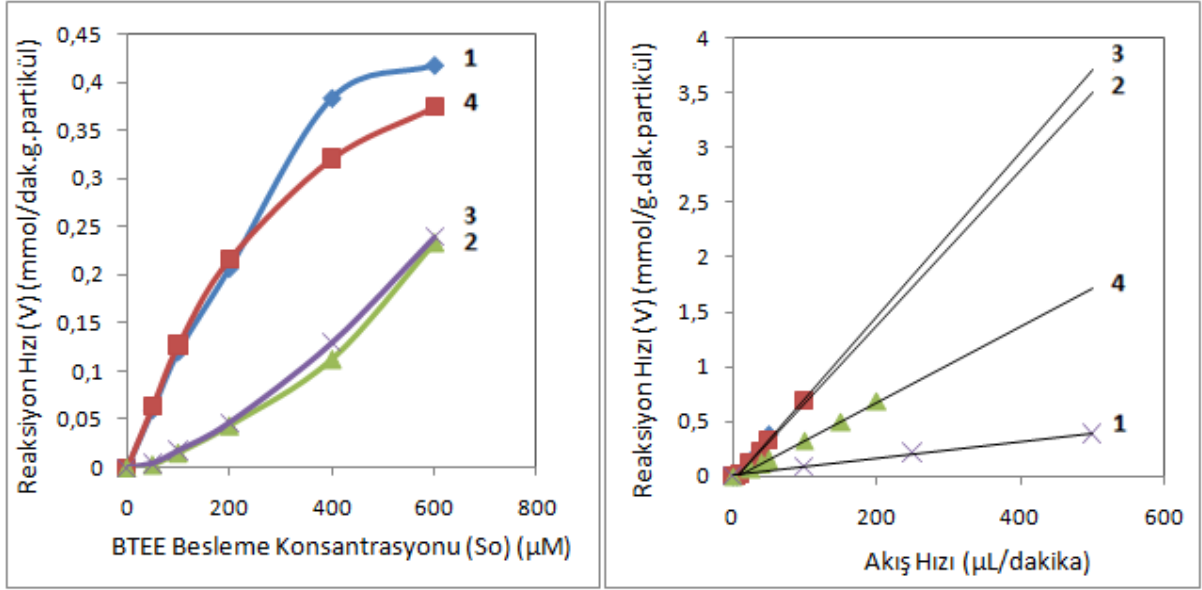
Şekil 4.72-A'da μHPLC'de monolitik kolonlar incelendiğinde, kolay bağlanma ile sentezlenen M-CC kolonunda ve glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenen M-GA kolonunda özdeş davranışlar görülmektedir. Her iki kolonda da substrat konsantrasyonu artışıyla elde edilen dönüşüm artarken, M-CC monolitik kolonunda M-GA monolitik kolonuna göre biraz daha yüksek dönüşümler elde edilmiştir. Gözlenen bu davranış monolitik immobilize enzim reaktöründe genel hızın kimyasal reaksiyon basamağı tarafından kontrol edildiğini ve gözenek içi difüzyon kısıtlamalarının her iki bağlanma yöntemi ile elde edilen monolitik kolonlarda etkili olmadığını açık olarak göstermektedir. Monolitik kolonların aksine μHPLC'de partikül bazlı P-GA kolonunda substrat derişimi artışı ile elde edilen dönüşüm değerleri azalma göstermektedir. Şekil 4.72-B'de HPLC'de partikül bazlı P-CC kolonunda da μHPLC'deki P-GA partikül bazlı kolonunda görülen davranışın aynısı görülmekte yani substrat derişimi artışı ile BTEE dönüşümü azalmaktadır. Ancak, partikül bazlı kolonda genel hız büyük olasılıkla partikül içi difüzyon basamağı tarafından kontrol edilmekte, bu nedenle artan substrat derişimi ile yatışkın durum

substrat dönüşümünde bariz bir düşme gözlenmektedir. Literatürde ilk kez gözlenen bu davranış monolitik IMER'ın, partikül bazlı IMER'a bir diğer net üstünlüğünü ortaya koymaktadır.



Şekil 4.73 A)  $\mu$ HPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda BTEE besleme konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu.

BTEE besleme konsantrasyonuna karşı elde edilen reaksiyon hızları şekil 4.73'de grafiğe geçirilmiştir. Her iki monolitik kolonda, hız substrat derişimi ile parabolik, her iki partikül bazlı kolonda ise hiperbolik artış göstermektedir. Bunu göstermek için  $V=kS^n$  modeline göre eğri uygulama yapılarak, P-CC partikül bazlı kolon için n değeri 0,80 bulunurken P-GA partikül bazlı kolon için n değeri 0,71 olarak bulunmuştur. Öteki taraftan aynı işlemler monolitik kolonlara uygulandığında M-CC monolitik kolonu için n değeri 1,54 bulunurken M-GA monolitik kolonu için n değeri 1,66 olarak hesaplanmıştır. Monolitik kolonlar için 1'den büyük olarak bulunan n değerleri bu eğrilerin parabolik olduğunu, partikül bazlı kolonlar için 1'den küçük olarak bulunan n değerleri bu eğrilerin hiperbolik olduğunu göstermektedir.



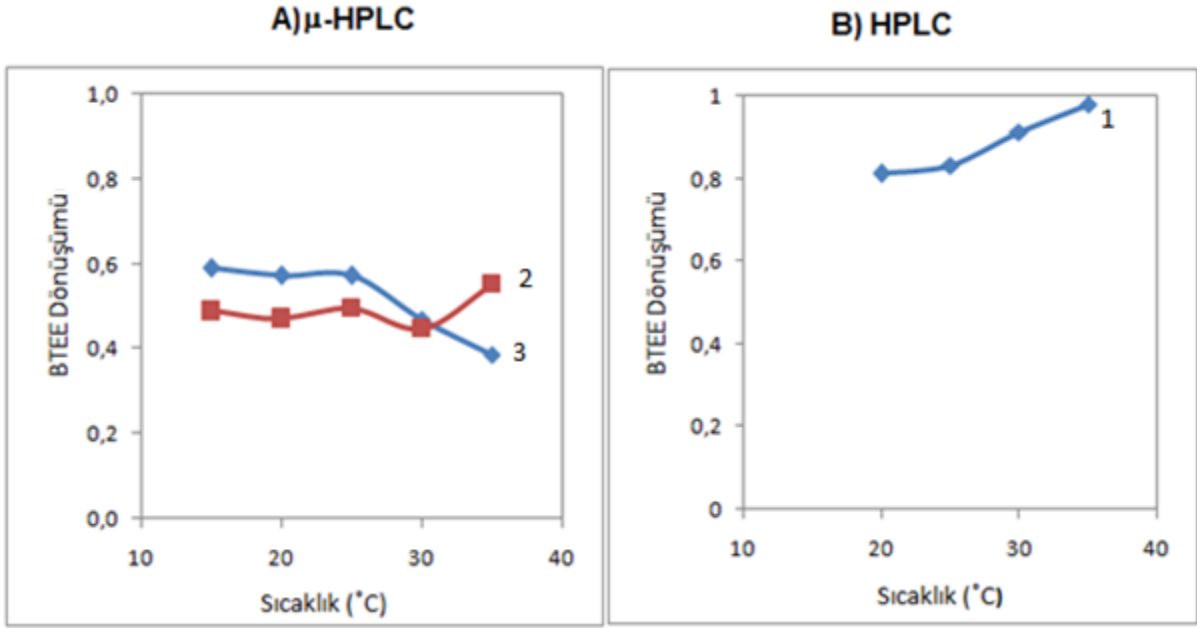
Şekil 4.74 A) BTEE besleme konsantrasyonuna B) Akış hızına karşı elde edilen reaksiyon hızları 1) P-CC partikül bazlı kolon 2) M-GA monolitik kolon 3) M-CC monolitik kolon 4) P-GA partikül bazlı kolon

BTEE besleme konsantrasyon artışı ve akış hızı artışına karşı elde edilen reaksiyon hız eğrilerini kıyaslayan grafik şekil 4.74'de verilmiştir. Hem BTEE besleme konsantrasyon artışı hem de akış hızı artışı ile reaksiyon hızlarında artma görülürken elde edilen eğriler substart derişimi artışında hiperbolik veya parabolik, akış hızı artışında ise doğrusal bir davranış göstermişlerdir.

#### 4.5.3 Sıcaklık

Sıcaklık deneyleri 400 µM BTEE substratı kullanılarak, P-CC kolonunda 500 µL/dakika, M-GA ve M-CC monolitik kolonlarında 25 µL/dakika akış hızlarında 15, 20, 25, 30 ve 35 °C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir.

µHPLC ve HPLC sisteminde sıcaklığa karşı elde edilen BTEE dönüşümleri şekil 4.75'de verilmiştir.

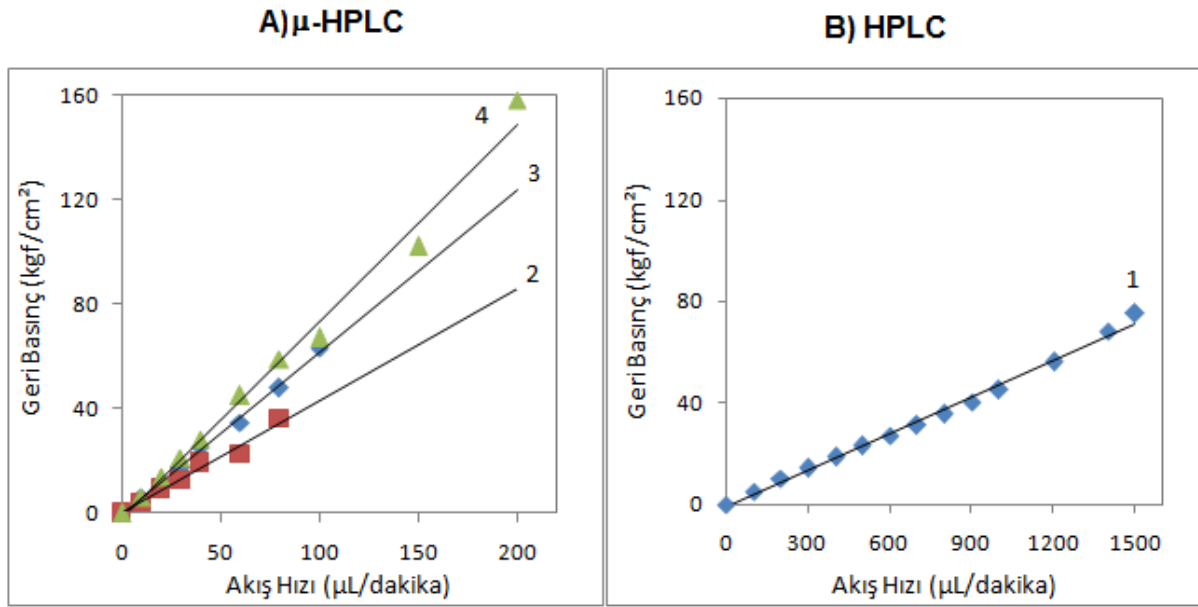


Şekil 4.75 A)  $\mu$ HPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda sıcaklık ile BTEE dönüşümünün değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2 glutaraldehit aktivasyonu.

Normal şartlarda enzim aktivitesinin artan sıcaklıkla arttığı bilinmektedir. Fakat 4.75-A'da kolay bağlanma metodu ile enzim immobilize ettiğimiz M-CC monolitik kolonunda 25 °C den sonra immobilize enzimin artan sıcaklıkla deaktive olması sebebiyle enzim aktivitesi azalmaya başlamış ve dönüşüm azalmıştır. Glutaraldehit aktivasyonu ile elde edilen M-GA monolitik kolonda sıcaklıkla dönüşüm hafif artış gösterirken,  $\mu$ HPLC'de kolay bağlanma yöntemi ile elde edilen P-CC partikül bazlı kolonda dönüşüm artan sıcaklıkla yine hafif bir artış göstermektedir.

#### 4.5.4 Geri basınç - akış hızı davranışı

Tez çalışması boyunca sentezlenen dört farklı kolonun  $\mu$ HPLC ve HPLC sistemlerinde, geri basınç değerinin 400  $\mu$ M BTEE içeren mobil faz (%95 borat tamponu, %5 etanol, pH:7,8 ) akış hızı ile değişimi Şekil 4.76'da gösterilmiştir.  $\mu$ HPLC ve HPLC sisteminde kullanılan kolonlarda, geri basıncın akış hızıyla değişiminin doğrusal olması ve kolon materyalinin düşük geri basınç üretecek özelliklere sahip olması istenir. Buradan görüldüğü gibi bütün reaktör tiplerinde geri basıncın akış hızıyla değişimi tamamen doğrusal özellik göstermektedir.



Şekil 4.76 A) µHPLC sisteminde M-GA (2) ve M-CC (3) monolitik kolonlarında, P-GA (4) partikül bazlı kolonda B) HPLC sisteminde P-CC (1) partikül bazlı kolonda geri basınç değerinin mobil fazı akış hızı ile değişimi. İmmobilizasyon yöntemi: 1 - 3 kolay bağlanma, 2-4 glutaraldehit aktivasyonu.

Sentezlenen reaktör türleri kıyaslandığında en düşük geri basınç değerleri HPLC sisteminde P-CC partikül bazlı kolonunda elde edilmiştir. µHPLC sisteminde glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenen M-GA monolitik kolonunda en düşük geri basınç değeri elde edilirken, click chemistry ile sentezlenen M-CC monolitik kolonunda diğer monolitik kolona göre biraz daha yüksek geri basınç değerleri elde edilmiştir. En yüksek geri basınç değerleri ise µHPLC'de partikül bazlı P-GA kolonunda elde edilmiştir. Partiküler yapılarda gözenek boyutunun monolitik yapılara göre çok daha düşük olması geçirgenliği azaltmakta ve daha yüksek geribasinca sebep olmaktadır. Bundan dolayı monolitik kolonlarda daha düşük geri basınç değerleri elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bununla birlikte µHPLC'de partikül bazlı P-GA kolonunda elde edilen geri basınç değerlerinin monolitik kolon değerlerine oldukça yakın ve yeterince düşük değerde olduğu söylemek mümkündür.



## 5. SONUÇLAR

### 5.1 Kolay bağlanma (Kolay Bağlanma) İle Partikül Bazlı HPLC-IMER Geliştirilmesi Ve Kinetik Karakterizasyonu

- Sentezlenen polimerik poli(DHPM-EDM) partiküllerinin (P-CC kolonu) SEM fotoğraflarından çok dar bir boy dağılımına sahip olduğu yani monodispers yapıda oldukları gözlemlenmiştir.
- SEM fotoğraflarından ortalama partikül çapı 7.5  $\mu\text{m}$ , BET analizinden özgül yüzey alanı 28.54  $\text{m}^2/\text{g}$ , civa porosimetre ile ortalama gözenek boyutu 95 nm olarak bulunmuştur.
- Partiküle enzim immobilizasyon işleminde kolay bağlanma metodu kullanılmış ve elde edilen kinetik sonuçlar immobilize enzim taşıyan durgun faz HPLC kolonlarının sentezinde kolay bağlanma'nin yeni ve uygun bir yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur.
- P-CC partikül bazlı kolonu için akış hızının dönüşüme etkisi incelenmiş ve artan akış hızı ile dönüşümün azaldığı tespit edilmiştir.
- Substrat besleme konsantrasyonunun dönüşüme etkisi incelenmiş artan substrat besleme konsantrasyonu ile dönüşümün azaldığı tespit edilmiştir.
- Enzim-substrat ilişkisinde partikül içi difüzyon kısıtlamasının etkin olduğu görülmüştür.
- P-CC kolonunda  $\alpha$ -kemotripsin enzimi - BTEE substratı ilişkisinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk gösterdiği tespit edilmiş,  $V_m$  değeri 1,2 mmol/dak.g.partikül,  $K_m$  değeri 953  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır.
- Sıcaklığın dönüşüme etkisi incelenmiş artan sıcaklık ile azda olsa dönüşümün arttığı tespit edilmiştir. Çalışılabilecek maksimum sıcaklık değeri için 35°C tespit edilmiştir.
- Sentezlenen HPLC-IMER kolonu için farklı zamanlarda tekrar kullanım deneyleri yapılmış dönüşüm değerlerinde önemli bir kayıp olmadığı tespit edilmiştir.
- Sentezlenen P-CC partikül bazlı HPLC-IMER kolonu için geri basıç değerleri hesaplanmış ve geri basıncın akış hızıyla değişiminin doğrusal özellik

gösterdiği ve oldukça düşük geri basınç değerlerinin söz konusu olduğu görülmüştür.

## 5.2 Glutaraldehit Aktivasyonu İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu

- Sentezlenen poli(GMA-EDM) monolitlerin (M-GA kolonu) taramalı elektron mikroskopu ile çekilen fotoğraflarında, aralarında geniş gözenekler olan boyutu değişen agregatlardan oluştuğu görülmüştür.
- SEM fotoğraflarından agregatların boyutunun 5-20  $\mu$ m aralığında değiştiği, BET analizinden özgül yüzey alanı 9.33 m<sup>2</sup>/g, civa porosimetre ile ortalama gözenek boyutu 2000 nm olarak bulunmuştur.
- Monolite enzim immobilizasyon işleminde glutaraldehit aktivasyonu yöntemi kullanılmış ve elde edilen kinetik sonuçlar immobilize enzim taşıyan durgun faz HPLC kolonlarının sentezinde, glutaraldehit aktivasyonu yönteminin uygun olduğunu ortaya koymuştur.
- M-GA monolitik kolonunda akış hızının artışı ile BTEE dönüşümünün düşük akış hızlarında arttığı ve yüksek akış hızlarında ise çok az arttığı veya değişmediği görülmüştür. Bu sonuç, akış hızının artışına bağlı olarak oluşan konvektif taşınım ile kolon içerisinde BTEE ve BT için daha iyi bir kütle aktarımının oluşmasına bağlanmaktadır. Bu davranış M-GA kolonuna immobilize edilen enzimin çok iyi çalıştığını ve akış hızının çok artırılması halinde dahi dönüştürme fonksiyonunu yerine getirebildiğini göstermektedir.
- M-GA kolonunda, BTEE substrat besleme derişiminin artışı ile kolondaki yatışkın durum BTEE dönüşümünün artış gösterdiği görülmüştür. Bunun sebebi olarak da büyük olasılıkla monolitik yapının bağıl olarak büyük boyutlu gözeneklerden oluşması sebebi ile yapı içerisinde difüzyon kısıtlamasının önemli olmadığı düşünülmektedir.
- Çok etkin kütle aktarımı dolayısıyla enzim-substrat ilişkisinde, genel hızın enzim substrat reaksiyonu tarafından kontrol edildiği tespit edilmiştir.
- M-GA kolonunda  $\alpha$ -kematripsin enzimi - BTEE substratı ilişkisinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk göstermediği, bunun yanında reaksiyon hızının substrat derişimi ile orantılı olarak, parabolik şekilde arttığı tespit edilmiştir.

- M-GA kolonunda, sıcaklık artışı ile BTEE dönüşümünde önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Sıcaklık artışıyla birlikte elde edilen dönüşüm miktarı önce sabit kalmış 30 °C sıcaklık değerinin üstünden itibaren de azda olsa dönüşüm artmıştır.
- M-GA  $\mu$ HPLC-IMER monolitik kolonu için farklı zamanlarda tekrar kullanım deneyleri yapılmış dönüşüm değerlerinde önemli bir kayıp olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum immobilize enzimin stabilitesini gerek kullanım, gerekse depolamada koruduğunu ortaya koymaktadır
- M-GA monolitik kolonu için geri-basınç değerinin mobil faz akış hızı ile değişimi doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Bu davranış M-GA kodlu reaktörün çalışılan akış hızı aralığında herhangi morfolojik deformasyon olmaksızın güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

### **5.3 Kolay bağlanma Yöntemi İle Monolitik $\mu$ HPLC- IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu, Partikül Bazlı HPLC-IMER İle Kıyaslanması**

- Sentezlenen poli(DHPM-EDM) monolitlerin (M-CC kolonu) taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğraflarında, aralarında geniş gözenekler olan boyutu değişen agregatlardan oluştuğu görülmüştür. Bununla beraber özgül yüzey alan ve gözenek boyutunun daha önce sentezlenen M-GA monoliti ile yaklaşık aynı değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir.
- SEM fotoğrafları ve civa porosimetre sonuçları monolitik yapının partiküler yapıya göre çok daha geniş gözeneklerden oluştuğunu göstermektedir.
- Monolite enzim immobilizasyon işleminde kolay bağlanma yöntemi kullanılmış ve elde edilen kinetik sonuçlar bu yöntemin başarılı olduğunu ortaya koymuştur.
- $\mu$ HPLC'de M-CC monolitik kolonu için artan akış hızıyla BTEE dönüşümü artış göstermektedir. HPLC'de partikül bazlı P-CC kolonunda ise artan akış hızı ile substrat dönüşümü azaldığı saptanmıştır. Bu davranış büyük olasılıkla ile monolitik kolon içerisinde konvektif difüzyon etkisi ile daha etkin bir kütle aktarımının oluşumundan kaynaklanırken partikül bazlı kolonlarda ise kütle transfer kısıtlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

- $\mu$ HPLC'de M-CC monolitik kolonu için artan substrat besleme derişimi ile BTEE dönüşümü artış göstermektedir. HPLC'de partikül bazlı P-CC kolonunda ise artan substrat derişimi ile BTEE dönüşümünün azaldığı tespit edilmiştir. Bunun sebebinin monolitik reaktörlerde genel hızın kimyasal reaksiyon basamağı tarafından kontrol edilirken, partikül bazlı kolonda genel hızın partikül içi difüzyon basamağı tarafından kontrol edilmesi olarak düşünülmüştür. Literatürde ilk kez gözlenen bu davranış monolitik IMER'in, partikül bazlı IMER'a bir diğer net üstünlüğünü ortaya koymaktadır.
- M-CC monolitik kolunu ve P-CC partikül bazlı kolon her ikisinde de reaksiyon hızı BTEE besleme derişimi ile artış göstermektedir.
- M-CC monolitik kolonunda  $\alpha$ -kemotripsin enzimi - BTEE substratı ilişkisinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk göstermediği, bunun yanında reaksiyon hızının substrat derişimi ile orantılı olarak, parabolik şekilde arttığı tespit edilmiştir. P-CC partikül bazlı kolonda ise Michaelis-Menten'e tam bir uyum söz konusudur.
- M-CC monolitik kolonunda artan sıcaklık ile BTEE dönüşümü önce sabit kalmış 25 °C den sonra enzim aktivitesi azalmaya başlamış ve dönüşüm azalmıştır. İmmobilize enzimin artan sıcaklıkla deaktive olması bu düşüşün nedeni olarak düşünülmektedir. Öte yandan partikül bazlı reaktörde sıcaklık artışı ile BTEE substrat dönüşümünde artış tespit edilmiştir.
- Tekrarlanabilirlik ve stabilite testinde M-CC monolitik reaktörü kararlı bir kinetik davranış göstermiş ve yatışkın durum substrat dönüşümünde artan kullanım ile önemli bir düşüş olmadığı tespit edilmiştir.
- Geri basınç değerleri iki kolon içinde kabul edilebilir düzeyde bulunurken P-CC partikül bazlı kolonunda M-CC monolitik kolonuna göre daha düşük basınç değerleri göze çarpmaktadır.

#### 5.4 Glutaraldehit Aktivasyonu Yöntemi İle Partikül Bazlı $\mu$ HPLC-IMER Geliştirilmesi, Kinetik Karakterizasyonu, Monolitik $\mu$ HPLC-IMER İle Kıyaslanması

- Sentezlenen polimerik poli(GMA-EDM) partiküllerinin (P-GA kolonu) SEM fotoğraflarından çok dar bir boy dağılımına sahip olduğu yani monodispers yapıda oldukları gözlemlenmiştir.
- SEM fotoğraflarından ortalama partikül çapı 7.5  $\mu$ m, BET analizinden özgül yüzey alanı 28.54 m<sup>2</sup>/g, civa porosimetre ile ortalama gözenek boyutu 150 nm olarak bulunmuştur.
- Partiküle enzim immobilizasyonu işleminde glutaraldehit aktivasyonu metodu kullanılmış ve elde edilen kinetik sonuçlar bu yöntemin başarılı olduğunu ortaya koymuştur.
- Glutaraldehit aktivasyonu ile sentezlenmiş P-GA partikül bazlı kolon ve M-GA monolitik kolon her ikisinde de artan akış hızı ile BTEE dönüşümünde artış görülmektedir.
- $\mu$ HPLC'de partikül bazlı P-GA kolonunda artan substrat derişimi ile BTEE dönüşümü azalmaktadır. Yine M-GA monolitik kolonu için artan substrat besleme derişimi ile BTEE dönüşümünün arttığı tespit edilmiştir.
- P-GA partikül bazlı kolonda  $\alpha$ -kemotripsin enzimi - BTEE substratı ilişkisinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk gösterdiği tespit edilmiş ve  $V_m$  değeri 0,83 mmol/dak.g. partikül olarak bulunmuştur.  $K_m$  değeri 588  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır. M-GA monolitik kolonun Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk göstermediği, bunun yanında reaksiyon hızının substrat derişiminin karesi ile orantılı olarak yani parabolik şekilde arttığı tespit edilmiştir.
- Geri basınç değerleri iki kolon içinde kabul edilebilir düzeyde bulunurken M-CC monolitik kolonunda monolitin gözenek özelliklerinden dolayı P-CC partikül bazlı kolona göre daha düşük basınç değerleri elde edilmiştir.

## 5.5 İmmobilize Enzim Reaktörlerinin $\mu$ HPLC Ve HPLC Sistemlerinde İmmobilizasyon Türüne Göre Karşılaştırılması

- Sentezlenen kolonlarda akış hızı etkisi incelendiğinde,  $\mu$ HPLC'de partikül bazlı kolonda ve monolitik kolonlarda artan akış hızı ile BTEE dönüşümü artış gösterirken, HPLC'de partikül bazlı kolonda düşüş görülmüştür.
- Sentezlenen kolonlarda substrat derişimi etkisi incelendiğinde, partikül bazlı kolonlarda kromatografik analizlerin HPLC veya  $\mu$ HPLC'de yapıldığı farketmeksizin artan BTEE başlangıç substrat derişimi ile BTEE dönüşümü azalma gösterirken;  $\mu$ HPLC'deki monolitik kolonlarda artan BTEE başlangıç substrat derişimi ile BTEE dönüşümü artış göstermiştir.
- Sentezlenen kolonların hepsinde başlangıç substrat derişimi artışıyla reaksiyon hızında artış görülürken bu artış partikül bazlı reaktörlerde hiperbolik, monolitik reaktörlerde parabolik olarak gerçekleşmektedir.
- Sentezlenen kolonların hepsinde akış hızı artışıyla reaksiyon hızında doğrusal bir artış görülmüştür.
- Sentezlenen kolonlarda sıcaklık etkisi incelendiğinde enzim deaktivasyonu da gözönünde bulundurulduğunda tüm reaktörlerde artan sıcaklık ile BTEE dönüşümünün arttığı görülmüştür.
- Sentezlenen kolonlarda akış hızına karşı elde edilen geri basınç değerleri incelendiğinde HPLC sisteminde nispeten daha düşük geri basınç değerleri elde edilirken,  $\mu$ HPLC'de monolitik İMER'lerde daha düşük geri basınç değerleri elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Alcantara A.R., Gil M.H., Guiomar A.J., Belmonte M.T.L., Sobral M.C.M., Torres C., Sinisterra J.V., *J. Mol. Catal. A: Chem.* 101 (1995) 255.
- Arabacı T., 2008, Hidrofilik etkileşim kromatografisi için moleküler zincir içeren kolon materyallerinin sentezi ve nükleotid ayırımında kullanımı, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Bayraktar A. A., 2009, Ters faz nano-sıvı kromatografisi için nano-kolon sentezi Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Belenkii B.G., Podkladenko A.M., Kurenbin O.I., Maltser V.G., Nasledor D.G., Trushin S.A., 1993, Peculiarities of zone migration and band broadening in gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins with respect to membrane chromatography, *Journal of Chromatography*, Vol. 45 Is.1,1-15.
- Bilici Z., Çamlı S.T., Ünsal E., Tuncel A., 2004, Activity behavior of a HPLC column including  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized monosized-porous particles, *Analytica Chimica Acta* , 516, 125–133
- Bilkova Z., Churacek J., Kucerova Z., Turkova J., 1997, Purification of anti-chymotrypsin antibodies for preparation of a bioaffinity matrix with oriented chymotrypsin as immobilized ligand, *J. Chromatography B*, 689, 273-279
- Bilkova Z., Mazurova J., Churacek J., Horak D., Turkova J., 1999, Oriented immobilization of chymotrypsin by use of suitable antibodies coupled to a nonporous support, *J. Chromatography. A* 852, 141-149
- Buchmeiser M.R., 2007, Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications, *Polymer*, 48, 2187-2198.

- Camlı S. T., Senel S., Tuncel A., 1999, Cibacron Blue F3G-A Attached uniform and Macroporous Poly (styrene-divinylbenzene) Particles For Specific Albumin Adsorption, J. Biomer. Sci Polym., 875-889.
- Cawse J.L., Lovell P. A., El-Aasser M. S., 1997, Dispersion Polymerization, Emulsion Polymerization & Emulsion Polymers, Chichester, Wiley pp:743-761.
- Cheng C. M., Micale J., Vonderhoff W., El-Asser M.S., 1992a, Monodisperse Porous Particles: Formation of the Porous Structure, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed.,30, 235-244.
- Clark D.S., Bailey J.E., Yen, R., Rembaum A., 1984, Enzyme Microbial Technology 6 317-325
- Coufal, P., Cihak, M., Suchankova, J., Tesarova, E., Bosakova, Z., Stulik, K., 2002, Methacrylate monolithic columns of 320  $\mu\text{m}$  I.D. for capillary liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 946 , 99–106.
- Çicek H., Tuncel A., 1998, J. Polym. Sci. A: Polym. Chem. Ed. 36 543.
- Da Silva M.A., Gil M.H. Guiomar J., Lapa E., Machado E., Moreira M., Guthrie J.T., Kotov S.,1990, Radiat. Phys. Chem. 36, 589-598
- Durdu A., 2004, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için afinite sorbenti tasarımı ve kromatografik karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Belyaeva, E., Valle D.D., Poncelet D., 2004, Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin in  $\kappa$ -carrageenan beads prepared with static mixer, Enzyme Microbial Technology 34, 108-113
- Ellingsten T., Aune, O., Ugelstad, J., Hagen, S., 1990, Monosized stationary phases for chromatography, journal of Chromatography, 535, 147-161



- Galia M., Svec F., Frechet J. M., 1994, Monodispers polymer beads as packing materials for high performance chromatography, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 32 2169-2175
- Girelli A. M., Mattei E., 2005, Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review, *Journal of Chromatography B*, 819, 3–16
- Grafnetter, J., Coufal, P., Tesorova, E., Suchankova, J., Bosakova, Z., Sevcik, J., 2004, Optimization of binary porogen solvent composition for preparation of butyl methacrylate monoliths in capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1049 , 43–49.
- Guiochon, G., 2007, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1168 , 101–168.
- Haginaka, J., *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 253.
- Hjerten S., Liao J.L., Zhang R., 1989, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *Journal of Chromatography*, 473, 273-275.
- Hosoya K., Teremachi M., Tanaka N., Kobayashi A., Kanda T., Ohtsu Y., 2001, Preparation Strategy for Uniformly Sized, Polymer-Beads HPLC Packing Materials Having Practically Acceptable Column Efficiency. 1. Copolymerization Technique, *Anal. Chem.*, 73, 5852.
- Jiang T., Jiskra J., Claessens H.A., Cramers, C.A., 2001, Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 923 , 215–227.
- Kopperschlager G., Bohem H. J., Hofmann E., 1982, Cibacron Blue F3G-A and related dyes as ligands in affinity chromatography, *Adv. Biochem. Eng.*, 25, 102-138

- Krenkova J., Svec F., 2009, Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology, *J. Sep. Sci.*, 32, 706 – 718
- Kubin M., Spacek P., Chomecek R., 1967, Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate), *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, 32, 3881–3887.
- Lee D., Svec F., Frechet J.M.J., 2004, Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid micro high-performance liquid chromatographic separation of proteins, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1051 Is. 1-2, 53-60.
- Liapis A.I., Meyers J.J., Crosser O.K., 1999, Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths. Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *Journal of Chromatography A*, 865(1-2), 13-25.
- Lok K. P., Ober C.K., 1985, Particle size control in dispersion polymerization of styrene, *Canadian journal of Chemical Engineering*, 63, 209-216
- Minakuchi H., 1996, Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 68, 3498-3501.
- Mould D.L., Synge R.L., 1954, Separations of polysaccharides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes, *Biochemistry Journal*, 58 (4) 571-585.
- Ober C.K., Hair M.L., 1985 Monodispersed, Micron-Sized Polystyrene Particles By Dispersion Polymerization, *Journal of polymer science Part A: polymer Chemistry*, 23, 103-108.
- Okuba M., Ikegami K., Yamamoto Y., 1989, *Colloids and Polymer Science*, 270, 733.

- Okuba M., Takahashi M., 1994, *Colloids and Polymer Science*, 272, 422
- Paine A.J., Luymes W., McNulty J., 1990, Dispersion Polymerization of Styrene In Polar Solvents: Influence of Reaction Parameters On Particle Size and Molecular Weight in Poly(N-Vinylpyrrolidone) Stabilized Reactions, *Macromolecules*, 23, 3104-3108.
- Premstaller, A., Oberacher, H., Huber, C.G., 2000, High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of single- and double-stranded nucleic acids using monolithic capillary columns, *Analytical Chemistry*, 72, 4386-93
- Quigley C.L., Marlin N.D., Melin V., Manz A., Smith N.W., 2003, Advances in capillary electrochromatography and micro high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science, *Electrophoresis*, 24, 917-944
- Saz J.M., Luisa M., 2007, Application of micro and nano-HPLC the determination and characterization of bioactive and biomarker peptides, *Journal of Separation Science*, 31, 446-458
- Smigol V., Svec F., Hosoya, K., Wang, Q., Frechet, J.M.J., 1992, *Die Angewandte Macromol. Chem.*, 195,151.
- Smith N.W., Jiang Z., 2007, Developments in the use and fabrication of organic monolithic phases for use with high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008), 416-440
- Svec F., Frechet J., M. J., 1996, New Design of Macroporous Polymers and Supports: From Separation to Biocatalysis, *Science*, 273, 205-211.

- Svec F., Frechet J.M.J., 1992, Continuous rods of macroporous polymer as highperformanceliquid chromatography separation media, *Analytical Chemistry*, 54, 820-822.
- Svec F., Frechet J.M.J., 1994, Fine Control of the Porous Structure and Chromatographic Properties of Monodispers Macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared Using Polymer Porogens, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 32, 2577-2588.
- Tanaka N., Nagayama H., Kobayashi H., Ikegami T., Hosoya K., 1999, Monolithic Silica Columns for HPLC, Micro-HPLC, and CEC, *Journal of High Resolution Chromatography*, 6, 965-970
- Tuncel A., Kahraman, R., Piskin, E.,1993, Monosize Polystyrene Microbeads bydispersion Polymerization, *Journal of Applied Polymer Science*, 50,303-319.
- Unsal E., Elmas B ., Çağlayan B., Tuncal M., Patır S., Tuncel A., 2006b, Preparation of An Ion Exchange Chromatographic Support By A New “Grafting From” Strategy Based on Atom Transfer Radical Polymerization, *Analytical Chemistry*, 78, 5868-5875.
- Unsal E., Irmak T., Durusoy E., Tuncel M., Tuncel A., 2006a, Monodisperse porous particles with polyionic ligands for ion exchange separation of proteins, *Analytical Chemistry Acta*.570,240-248.
- Ünsal E., 2006, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için farklı polaritelere sahip, fonksiyonel grulu kolon dolgu materyallerinin sentezi ve kromatografik karakterizasyonu, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Xie S., Svec F., Frechet J.M.J., 2000, Preparation of porous hydrophilic monoliths: Effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly (acrylamide-co-N,N-methylenebisacrylamide) monolithic rods, *Journal of Polymer Science Part A, Vol. 35 Is. 6*, 1013-1021.

Yurtsever A., 2008, Kapiler elektrokromatografi için nanokromatografik ölçekli monolit tasarımı, sentezi ve kromatografik uygulamaları, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Zou H., Huang X., Luo Q., 2002, Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography, Journal of Chromatography A, 954, 5–32.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel Bilgiler**

Adı, Soyadı : Bekir ÇELEBİ  
Doğum Tarihi : 01/12/1978  
Doğum Yeri : M.Kemalpaşa/BURSA  
Medeni hali : Evli  
e-posta : bekircelebi@yahoo.com

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise : Bursa Anadolu Öğretmen Lisesi (1993-1996)  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (1997-2002)  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2002-2005)  
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2005-2010)

### **Yabancı Dil**

İngilizce

### **İş Tecrübesi**

**Araştırma Görevlisi:** Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2002-2005)