

YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN BAZLI HİDROJELLERİN ENZİMATİK MODİFİKASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar AKAY

Kimya Ve Süreç Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Ve Süreç Mühendisliği Programı

ŞUBAT 2014

YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN BAZLI HİDROJELLERİN ENZİMATİK MODİFİKASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Pınar AKAY
(115107004)**

Kimya Ve Süreç Mühendisliği Anabilim Dalı

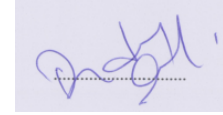
Kimya Ve Süreç Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Didem OMAV

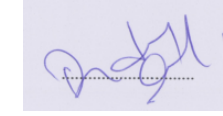
ŞUBAT 2014

YALOVA ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 115107004 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **PINAR AKAY**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**KİTOSAN BAZLI HİDROJELLERİN ENZİMATİK MODİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd.Doç.Dr.Didem OMA Y**
Yalova Üniversitesi



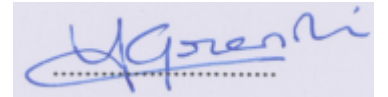
Jüri Üyeleri : **Yrd.Doç.Dr.Didem OMA Y**
Yalova Üniversitesi



Prof. Dr. Jülide Hızal YÜCESOY
Yalova Üniversitesi



Prof. Dr. Yüksel GÜVENİLİR
İstanbul Teknik Üniversitesi



Teslim Tarihi : 28 Ocak 2014
Savunma Tarihi : 6 Şubat 2014

Dedeme,

ÖNSÖZ

Kimya ve Süreç Mühendisliği yüksek Lisans programının sonuna gelirken, bitirmenin vermiş olduğu heyecan ve sevinç, ayrılmanın da yanında getirdiği hüznün duygularını aynı anda yaşadığım bu süreçte;

Mesleki kimliği ile bilgi ve tecrübesini, güleryüz ve hoşgörüsünü hiç eksik etmeyen, çok değerli hocam, Yrd.Doç.Dr.Didem OMAY'a,

Çalışmalarım sırasında, desteğini her daim hissettiğim sevgili arkadaşım Nazlı ÖZCAN'a, yardımlarını esirgemeyip bilgilerini aktaran değerli hocalarım Doç.Dr.Sinan Şen ve Doç.Dr.Gökhan Temel'e ,

Buraya adını yazamadığım ancak gönlümden isimleri tek tek geçen emeğini gördüğüm herkese teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca, maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen, canım aileme özellikle de ne olursa olsun her daim yanımda olacağını bildiğim bir tanecik anneme sonsuz teşekkür ederim.

Şubat 2014

Pınar AKAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Kitosan	3
2.1.1 Kitosanın yapısı.....	3
2.1.2 Kitosanın eldesi.....	4
2.1.2.1 Kitinin izolasyonu	4
2.1.2.1.1. Kabukların hazırlanması	5
2.1.2.1.2. Deproteinizasyon	5
2.1.2.1.3. Demineralizasyon.....	5
2.1.2.1.4. Dekolorasyon	6
2.1.2.2. Kitinin deasetilasyonu	6
2.1.3 Kitosanın özellikleri	7
2.1.3.1. Deasetilasyon derecesi	9
2.1.3.2. Molekül ağırlığı	10
2.1.3.3. Çözünürlük	10
2.1.3.4. Viskozite	11
2.1.3.5. Hacim yoğunluğu	11
2.1.3.6. Su tutma kapasitesi	12
2.1.3.7. Yağ tutma kapasitesi	12
2.1.4. Kitosanın modifikasyonu	13
2.1.5. Kitosanın uygulama alanları	13
2.2 Hidrojeller	17
2.2.1 Hidrojellerin yapısı	17
2.2.2. Hidrojellerin uygulama alanları	18
2.2.3. Kitosan bazlı hidrojeller	20
2.2.3.1. Kovalent bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri	21
2.2.3.2. İyonik bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri	21
2.3 Enzim ve Aminoasit İmmobilizasyonu	22
2.3.1 Enzimler	22
2.3.1.1. Lipaz	27
2.3.1.2. Penisilin asilaz	28
2.3.2 Aminoasitler	28
2.3.2.1. Alanin	29
2.3.2.2. Lösin	29

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	31
3.1. Kullanılan Malzemeler	31
3.2. Ekipmanlar	31
3.3. Kitosan Bazlı Hidrojellerin Hazırlanması	32
3.3.1. Saf kitosan hidrojellerinin sentezi	32
3.3.2. Kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojellerinin sentezi	32
3.3.3. Kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojellerinin sentezi	33
3.4 Kitosan Bazlı Hidrojellerin Karakterizasyonu	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Karakterizasyonu	37
4.1.1. Enzimle modifiye edilmiş hidrojellerin şişme dav. incelenmesi	37
4.1.1.1. Hidrojellerin şişme davranışlarına enzim miktarının etkisi	37
4.1.1.2. Enzimli hidrojellerin şişme davranışlarına pH'ın etkisi	39
4.1.2. Aminoasitle modifiye edilmiş hidrojellerin şişme dav. incelenmesi	43
4.1.2.1. Hidrojellerin şişme davranışlarına aminoasit miktarının etkisi	43
4.1.2.2. Aminoasitli hidrojellerin şişme davranışlarına pH'ın etkisi	45
4.2. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Yapısal Analizi ...	49
4.3. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Isıl Analizi	52
4.4. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Yapısal Morfolojisi	57
4.5. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Yüzey Morfolojisi	59
5. SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	77

KISALTMALAR

IPN	: İç içe geçmiş polimerik ağ
w/v	: Ağırlık/hacim
v/v	: Hacim/hacim
Da	: Dalton
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
ATP	: Adenozin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FT-IR	: Fourier transform kızıl ötesi spektrumu
TGA	: Isıl gravimetrik analiz
DSC	: Diferansiyel taramalı kolorimetre
XRD	: X ışınları kırınımı
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Tg	: Camı geçiş sıcaklığı

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Kitosanın yapısı.....	3
Şekil 2.2 : Kitinin yapısı.....	3
Şekil 2.3: Hidrojelin şematik gösterimi.....	17
Şekil 3.1: Kitosan hidrojel için reaksiyon mekanizması.....	32
Şekil 3.2: Kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojelleri için reaksiyon mekanizması.....	33
Şekil 3.3: Kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojelleri için reaksiyon mekanizması.....	34
Şekil 4.1: Saf kitosan hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.....	39
Şekil 4.2: 0,04 g lipaz içeren kitosan&lipaz hidrojellenin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.....	41
Şekil 4.3: 0,6 g penisilin asilaz içeren kitosan&penisilin asilaz hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.....	42
Şekil 4.4: 0,4 g alanin içeren kitosan&alanin hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.....	46
Şekil 4.5: 0,4 g lösün içeren kitosan&lösün hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.....	47
Şekil 4.6: Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin FT-IR spektrumları.....	49
Şekil 4.7: Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin FT-IR spektrumları.....	51
Şekil 4.8: Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin TGA termogramları.....	52
Şekil 4.9: Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin TGA termogramları.....	53
Şekil 4.10: Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin DSC eğrileri.....	55
Şekil 4.11: Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin DSC eğrileri.....	56
Şekil 4.12: Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin XRD spektrumları.....	57
Şekil 4.13: Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin XRD spektrumları.....	58
Şekil 4.14: Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin SEM görüntüleri.....	60
Şekil 4.15: Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin SEM görüntüleri.....	62

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1 : Saf kitosan hidrojeli ve enzimli hidrojellerin bir gün içindeki şişme oranları.....	37
Çizelge 4.2 : Saf kitosan hidrojeli ve enzimli hidrojellerin denge şişme yüzdeleri	43
Çizelge 4.3 : Aminoasitli hidrojellerin iki gün içindeki şişme oranları.....	44
Çizelge 4.4 : Saf kitosan hidrojeli ve aminoasitli hidrojellerin denge şişme yüzdeleri	48

KİTOSAN BAZLI HİDROJELLERİN ENZİMATİK MODİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında, kitosan doğal biyopolimerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması sonucunda elde edilen hidrojellerin karakterizasyonu ve bu hidrojellerin enzim ve aminoasitlerle olan modifikasyonu incelenmiştir. Hidrojellerin en önemli özelliklerinden biri olan su tutma kapasitesini arttırmak amacıyla lipaz ve penisilin asilaz enzimleri ile alanin ve lösin aminoasitleri kullanılarak sentezlenen hidrojeller modifiye edilmiştir.

Sunulan tezin ilk aşamasında, sentezlenen tüm hidrojellerin şişme davranışları incelenmiştir. Sonrasındaki karakterizasyon çalışmaları, enzim ve aminoasit miktarları optimize edilmiş olan hidrojeller için incelenmiştir. Saf ve modifiye edilmiş hidrojellerin yapısal, ısıl, morfolojik ve yüzey-kesit özelliklerinin belirlenmesi amacıyla FT-IR, TGA, DSC, XRD, SEM analizleri yapılmış, enzim ve aminoasit yapılarından kaynaklanan değişimler tespit edilmiştir.

Tüm hidrojel numuneleri için 25°C ve farklı pH çözeltilerinde yapılan şişme deneylerinde, tüm hidrojellerin düşük pH'ta en yüksek şişme oranına sahip olduğu görülmüş ve pH arttıkça şişme oranının azaldığı saptanmıştır. Düşük pH'ta enzim ve aminoasit katkılı kitosan hidrojelleri saf kitosan hidrojeline göre daha iyi bir şişme davranışı sergilemiştir. Bu hidrojel numuneleri arasında, 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan ve 0,04 g lipaz/1,0 g kitosan ve 0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren hidrojellerin en yüksek denge şişme oranına sahip olduğu görülmüştür. Bu analiz sonuçları, enzim ve aminoasit katkılı kitosan hidrojellerini saf kitosan hidrojeli ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Yapısal analizlerde; tüm hidrojellerin FT-IR spektrumları incelenmiş ve kitosan hidrojeline immobilize edilmiş enzim ve aminoasitlere, aynı zamanda çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehite ait karakteristik absorpsiyon pikleri görülmüştür. Hidrojellerin ısıl özelliklerinin belirlenmesi için yapılan analizlerdeki TGA termogramlarında; enzim ve aminoasit yüklü kitosan hidrojellerin saf kitosan hidrojeline göre daha düşük sıcaklıklarda ağırlık kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Hidrojellerin morfolojik özelliklerinin incelenmesine yönelik yapılan analizlerde; XRD desenlerinden enzim ve aminoasit katkılı kitosan hidrojellerinin karakteristik kırınım pikleri tespit edilmiştir. Ayrıca; tüm kitosan bazlı hidrojellerin yüzey özelliklerinin belirlenmesi için yapılan analizlerde; SEM görüntüleri çekilmiş ve bu görüntülerden enzim ve aminoasit yüklü kitosan hidrojellerinde saf kitosan hidrojeline göre por boyutlarında artma olduğu ve hidrojel yüzeylerinin değiştiği gözlenmiştir.

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde; kitosanın enzim ve aminoasitle ile iyi bir şekilde modifiye edildiği sonucu çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, hidrojel, enzim, aminoasit, modifikasyon.

ENZYMATIC MODIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-BASED HYDROGELS

SUMMARY

In the present thesis, a natural biopolymer chitosan was crosslinked with glutaraldehyde and chitosan hydrogels were synthesized. In order to increase the water holding capacity of the hydrogels, they were modified using lipase and penicillin acylase enzymes and also alanine and leucine aminoacids.

In the present thesis, the swelling behavior of the all synthesized hydrogels were investigated. FT-IR, TGA, DSC, XRD and SEM analysis were carried to determined the structural, thermal, morphological and surface-sectional properties of the pure and modified hydrogels and changes resulting from structures of enzyme and aminoacid were identified.

For all hydrogel samples, swelling experiments were investigated at 25°C and in solutions with different pH values, it was found that, the highest swelling ratio for all the hydrogels was obtained at low pH value. At low pH values, enzyme and aminoacid added chitosan hydrogels have higher swelling degree than pure chitosan hydrogel. The hydrogel samples containing 0.6 g of penicillin acylase, 0.04 g of lipase and 0.4 g alanine and leucine have the highest equilibrium swelling ratios. FT-IR spectra of all hydrogels was investigated and characteristic peaks of enzyme, aminoacid and glutaraldehyde were obtained. For analysis the thermal properties of all hydrogels, TGA thermograms were investigated and it was found that; modified hydrogels have a significant weight loss at lower temperatures than pure chitosan hydrogel. The morphology of the pure and modified chitosan hydrogels was investigated by X-Ray diffraction. XRD results showed that, characteristic diffraction peaks were obtained for modified hydrogels. Surface morphology of all hydrogels were obtained using scanning electron microscope and an increase in pore size in the surface of modified hydrogels was observed.

According to all results, chitosan hydrogel was modified with enzymes and aminoacids.

Key words: Chitosan, hydrogel, enzyme, aminoacid, modification.

1. GİRİŞ

Günümüzde, polimerler insan yaşamının hemen her aşamasında sıkça kullanılmakla birlikte kullanım alanları her geçen gün daha da artarak gerek üniversitelerde, gerekse endüstride araştırmacıların yoğun ilgileri ile karşı karşıya kalmaktadır. Gelişen polimer bilimi içinde son zamanlarda jeller; özellikle hidrojeller öne çıkmaktadır [1].

Polimer jeller, su veya uygun çözücüde şişmiş ağ yapılarıdır. Hidrojeller; yapılarında hidrofilik gruplar bulunduran, ancak ağ yapısı nedeniyle suda çözünmeyen, belli bir denge değerine kadar şişebilen polimerlerdir. Şişme miktarını kontrol eden iki faktör; polimer zincirlerinin hidrofilitesi ve çapraz bağ yoğunluğudur [2].

Çapraz bağlı iki ayrı sentetik veya doğal polimerin fiziksel olarak birleşerek içiçe geçmesiyle oluşan ağ yapılı polimerler IPN (Interpenetrating Polymer Network) tipi hidrojeller olarak tanımlanırlar. Bu yapılardan en az biri diğerinin varlığında sentezlenir ve/veya çapraz bağlanır [3]. Yarı-IPN tipi hidrojellerde ise polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri doğrusal yapıdadır [4-6]. Bu tür hidrojellerde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağısız olarak yer alabilirler.

Hidrojeller, su içeriklerinden, yüksek biyoyumluluklarından ve düşük yüzey gerilimlerinden dolayı insan dokusuna benzer yapıda olmaları sayesinde de tercih edilmektedirler. Hidrojeller, fiziksel özelliklerinden dolayı diğer sentetik biyomateryallerden daha fazla canlı dokuya benzerler [7-9]. Günümüzde biyoteknolojik alanda üzerinde en çok durulan konulardan biri hidrojellerin enzim ve hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanımına yönelik çalışmalardır [10,11].

Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan; kitinden elde edilen bir polisakkarit olup, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok endüstri dalı için uygun bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kitosan bu uygulama alanlarının yanı sıra, toksik olmaması ve proteine ilgisi nedeniyle lipaz immobilizasyonunda da kullanılır [12-14]. Kitosanın proteinlere yüksek afinitesi, enzim immobilize edilen biyosensörlerde kullanımını uygun hale getirmektedir [15].

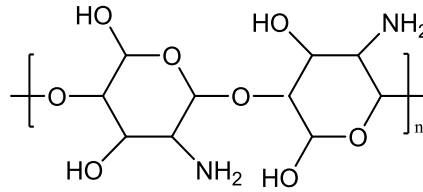
Sunulan bu tez çalışmasında, glutaraldehit ile çapraz bağlanmış saf kitosan hidrojeller sentezlenmiştir. Sonrasında, farklı türde ve miktarlarda enzim ve aminoasit içerikleriyle modifiye kitosan hidrojeller oluşturulmuş ve her bir hidrojelin şişme davranımları incelenmiştir. Enzim ve aminoasitlerle modifiye edilmiş hidrojel numunelerinin şişme karakterleri optimize edilerek, tüm hidrojellerin yapısal, ısıl ve morfolojik değişimleri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kitosan

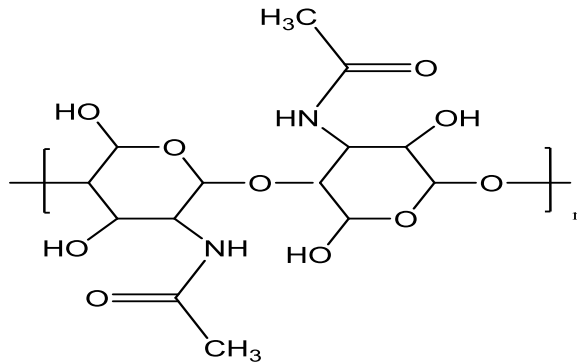
2.1.1. Kitosanın yapısı

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir [16,17]. Kitosanın molekül yapısı Şekil 2.1’de görülmektedir.



Şekil 2.1 :Kitosanın yapısı.

Kitin, selüloza benzeyen ve selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci biyopolimerdir [18]. Omurgasız hayvanların dış kabukları, kabuklu hayvanlar, böcekler, maya ve mantarların hücre duvarları kitinin temel kaynağıdır. Kitinin molekül yapısı Şekil 2.2’de görülmektedir.



Şekil 2.2 : Kitinin yapısı.

2.1.2. Kitosan eldesi

Doğal, toksik olmayan biyopolimerler olan kitin ve kitosan yengeç ve karides kabuk artıklarından üretilmektedir. Deniz kabuklularının kabuk artıklarının %30-40'ı protein, %30-50'si kalsiyum karbonat, %20-30'u kitinden oluşmaktadır. Ayrıca kabuklarda az miktarda Na, P, Mg, K gibi diğer mineraller ve kabuklara rengini veren pigmentler bulunmaktadır [19]. Bu oranlar türler ve mevsimlere bağlı olarak da değişim göstermektedir. Bu ürünlerin spesifik karakterleri; moleküler ağırlığı, asitlendirme derecesi ve işleme koşulları ile değişmektedir [20].

Kitosan, en bol kitin kaynakları olan yengeç (Dungeness yengeci), karides (Pasifik karidesi), ıstakoz ve kerevit kabuklarından kolayca elde edilir. Denizcilik sektöründe bu kaynaklara ait atıklar yıllık $1,2 \times 10^6$ tondan fazladır. Kabuklu deniz canlılarının yenilebilir kısımları ayrıldıktan sonra kalan bu atık miktarının sadece % 20'ye yakın bir kısmı değerlendirilebilmekte ve ürün olarak sunulabilmektedir. Ekstraksiyon ile atık kabuk kısımdan kitosanın geri kazanımı üzerine çalışmalar devam etse de ekstraksiyon prosesine ilişkin hala çok az bilgi edinilebilmiştir. Bilinen kitosan üretim prosesi, atık kabuklardan kitinin izolasyonu ve kitinden kitosan üretimi şeklindedir.

2.1.2.1. Kitinin izolasyonu

Kitin izolasyonu kabukta bulunan diğer maddelerin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için yapılan işlemler; kabukların hazırlanması, demineralizasyon (minerallerin uzaklaştırılması), deproteinizasyon (proteinlerin uzaklaştırılması) ve dekolorasyon (pigmentlerin uzaklaştırılması) şeklinde dört ana basamak altında toplanabilir.

Bu basamakların uygulanmasıyla kabukta bulunan diğer maddeler en etkili şekilde uzaklaştırılır. Bu işlemlerde kullanılan kimyasalların konsantrasyonu, sıcaklık ve zaman gibi parametrelerin kontrolü, arzu edilen yüksek moleküler ağırlıklı kitin/kitosan üretmek için gereklidir. Burada uygulanan demineralizasyon ve deproteinizasyon basamaklarının sırası değiştirilebilir. Ancak ticari üretimde genel olarak deproteinizasyon işlemi önce yapılmaktadır.

2.1.2.1.1. Kabukların hazırlanması

Yıkama, kabuklardaki çözüner organik maddelerin ve yapışmış proteinlerin uzaklaştırılması açısından önemlidir. Kabuklar iyice yıkandıktan sonra kurutulur ve daha etkili bir işlem sağlamak amacıyla küçük parçalara ayrılır.

2.1.2.1.2. Deproteinizasyon

Kabuklarda minerallerin yanı sıra çeşitli doku kalıntıları bulunmaktadır. Bunları uzaklaştırmak için uygulanan işleme de deproteinizasyon adı verilir. Bu işlemde genellikle seyreltik sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit solüsyonları kullanılır. Proteinlerin çözünmelerini sağlamak için işlem 65-100°C de gerçekleştirilir [21]. Kabuk artıkları, proteinleri çözmek için seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi (%1-10) ile muamele edilir. Hazırlama yöntemine bağlı olarak tepkime süresi 0,5-12 saat arasında değişmektedir. Deproteinizasyon işleminin optimum koşulları; kabukların katı(kabuk):çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde %3,5'lük sodyum hidroksit çözeltisi ile 65°C'de 2 saat boyunca sürekli karıştırılarak etkileştirildiği şartlardır. Burada, solüsyonun derişimi, reaksiyon süresi ve sıcaklığı kullanılan yöntemle göre değişiklik göstermektedir.

Deproteinizasyon basamağı sırasında köpük oluşumu görülebilmektedir. Ancak köpük oluşumu demineralizasyon sırasında oluşan kadar yoğun değildir. Protein ekstraksiyon veriminin artırılması için deproteinizasyon basamağı demineralizasyondan daha önce gerçekleştirilir.

2.1.2.1.3. Demineralizasyon

Demineralizasyon, kabuklardaki minerallerin uzaklaştırılması işlemidir. Demineralizasyon işlemi genellikle, kalsiyum karbonatı kalsiyum klorür olarak çözmek için oda sıcaklığında çalkalama ve seyreltik hidroklorik asitle ekstraksiyon yapılarak gerçekleştirilir. Seyreltik hidroklorik asit çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilen işlem sonucunda, kalsiyum karbonat, kalsiyum klorür dönüşerek çözülür. Optimum koşullar; kurutulmuş kabukların 30 dakika 1N HCl ile oda sıcaklığında ve katı:çözücü oranı 1:15 (w/v) olacak şekilde sürekli karıştırılarak gerçekleştirildiği işlemidir. Demineralizasyon sonucu elde edilen kül içeriği %31-36 kadardır. Bu da demineralizasyon basamağının etkisini çok iyi göstermektedir. Bunun yanında demineralizasyon işleminin yüksek konsantrasyon ya da %90 formik

asit kullanılması gibi çeşitli varyasyonları da bulunmaktadır [22]. Yukarıda da değinildiği gibi kullanılan solüsyonun konsantrasyonu, tepkime süresi ve tekrarlanması gibi parametreler kullanılan yöntemle göre değişiklik göstermektedir.

Demineralizasyon prosesi sırasında da CO₂ üretiminden dolayı istenmeyen köpük oluşumu ile karşılaşılır. Oluşan köpükten dolayı hacimde bir artış meydana gelir. Köpük oluşumunu önlemek için bazı araştırmacılar (No ve arkadaşları) ticari köpük önleyici kullanmışlardır. Bu sayede köpük oluşumunun önemli derecede azaldığı belirtilmektedir [23]. Köpüğün kontrol edilmesi veya azaltılması amacıyla herhangi bir emülsiyon oluşturucu içermeyen %10'luk aktif silikon polimer çözeltisi köpük giderici olarak kullanılır.

2.1.2.1.4. Dekolorasyon

Kabuklardaki mineral ve proteinlerden başka uzaklaştırılması gereken bir diğer madde de kabuklara rengini veren pigmentlerdir. Kitinin ticari olarak kabul edilebilir olması için dekolorasyon işleminin yapılması gerekmektedir. Dekolorasyon işlemi sırasında kullanılacak kimyasalın kitinin ve kitosanın fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini etkilemeyecek bir madde olmasına dikkat edilmelidir. Aseton ile ekstraksiyon yapılarak beyaz kitin tozları elde edilir ve %0,315 (v/v) sodyum hipoklorür çözeltisinde 5 dakika dekolorasyon işleminden sonra oda sıcaklığında 2 saat kurutulur (katı:çözücü oranı 1:10 (w/v)). Dekolorasyon işlemi bu sürede yetersiz olduğu takdirde, 1 saat daha bekletilerek beyaz renkli kitin tozları elde edilir.

2.1.2.2. Kitinin deasetilasyonu

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile meydana gelmektedir. Deasetilasyon işleminde, asetil gruplarının uzaklaştırılması ile kitosanın yapısında reaktif amino (NH₂) grupları ortaya çıkar. Bu serbest amino grupları kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin temelini oluşturmaktadır [24].

Deasetilasyonun amacı indirgenmemiş ve seyreltik asetik asit içerisinde en kısa sürede çözünebilen kitosan elde etmektir. Sıcaklık, deasetilasyon süresi, alkali konsantrasyonu, kitin izolasyon işlemleri, kitin-alkali solüsyon oranı ve partikül büyüklüğü gibi çok sayıda önemli etken kitosanın çözünürlüğünü etkilemektedir [25]. Kitinin deasetilasyonu genellikle yüksek konsantrasyonda (%40-50) NaOH kullanılarak yüksek sıcaklıklarda (100-150°C) gerçekleştirilir. Son olarak kitosan %

2'lik asetik asit çözeltisi ile ekstrakte edilip ardından filtre edilmekte, destile suda çöktürülüp kurutulmakta ve depolanmaktadır [26,27]. Diğer reaksiyon şartları gibi süre de seçilen yönteme göre değişiklik göstermektedir. Kullanılan yöntem ve reaksiyon şartları üretilmek istenen kitosanın deasetilasyon derecesine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin düşük deasetilasyon derecesine sahip kitosan üretmek için daha düşük konsantrasyon, sıcaklık ve süre yeterli olurken daha yüksek deasetilasyon dereceli kitosan için daha yüksek reaksiyon şartları gerekmektedir. Deasetilasyon işlemi için NaOH'in yanı sıra KOH ile de yapılabilmektedir. LiOH, Ca(OH)₂ ve Na₃(PO)₄ gibi kimyasalların da deasetilasyon işlemi için uygun olabileceği ileri sürülmüştür [28].

2.1.3. Kitosanın özellikleri

Kitosan ile kıyaslanınca kitinin uygulamaları oldukça sınırlıdır. Çünkü; yapı olarak selüloza benzese de kimyasal olarak inerttir [29]. Kitinin çözünürlüğü oldukça sınırlıdır. Lityum klorür, hegzaflooroaseton, hegzaflo-2-propanol ve dimetilasetamid gibi toksik özeliği yüksek çözücülerde çözünür. Bu kitinin endüstriyel uygulamalarda kullanımını kısıtlayan en önemli faktördür. Kitin ve kitosan arasındaki ayırım için kriter, kitosanın seyreltik asit içerisindeki çözünürlüğüdür [30].

Kitosan su, alkali ve organik solventlerde çözünmez ancak pH 6,0'dan düşük olduğunda organik asitlerin pek çok solüsyonlarında çözünür hale gelir. Asetik asit ve formik asit kitosanı çözmek için en çok kullanılan iki asittir. Ayrıca nitrik asit, hidroklorik asit, perklorik asit ve fosforik asit gibi bazı seyreltik anorganik asitler de ancak daha uzun karıştırma ve ısıtmanın ardından kitosan solüsyonları hazırlamak için kullanılabilir [31].

Kitinin azot içeriği deasetillenme derecesine bağlı olarak %5 ile %8 arasında değişmektedir. Doğal olarak kitinin tüm birimleri tamamen asetlenmiş halde değildir. Kitosandaki azot da çoğunlukla birincil alifatik amino grupları şeklinde bulunmaktadır. Bu yüzden kitosan aminlerin tipik reaksiyonlarına (schiff reaksiyonu) maruz kalırlar [15].

Kitosanın kitin ve selülozdan farklı olarak sahip olduğu amin grubu, çözünme sırasında protonlanır ve bundan dolayı da kitosan pozitif yüklenmiş olur [32]. Bu özellik, kitosanın katyonik bir polisakkarit olduğunu gösterir. Diğer polimerlerin aksine kitosan, pozitif yüklü hidrofilik bir polimerdir [33]. Sahip olduğu bu

özelliklerden dolayı, negatif yüklü polimerlerle, makromoleküllerle, polianyonlarla vs. etkileşme yeteneğine sahiptir.

Kitosan çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bu durum kitosanın polikasyonik yapısından kaynaklanmakta olup gıda, ziraat, tıp, eczacılık ve tekstil gibi hijyenin önemli olduğu birçok sektörde geniş çapta kullanılmaktadır. Katyonik özellikteki kitosan, bakterilerin hücre zarı bileşiminde bulunan negatif yüklü fosforil ve fosfolipidlere elektrostatik olarak bağlanmaktadır. Bu şekilde hücre zarı zarar görmekte, bakterilerin beslemesi için gerekli olan besinler hücre dışına sızmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir [34-36]. Sudarshan tarafından yapılan mikroskobik deneylerde kitosanın pH 5,8'de hücre aglütinasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [37].

Kitosanın antimikrobiyal etkisi; deasetilasyon ve polimerizasyon derecesi, substrat veya her ikisinin kimyasal ve besin bileşimi, çevre koşulları gibi iç faktörlerden etkilenmektedir. Bu anlamda, daha fazla yük yoğunluğu ve daha fazla çözünürlüğü nedeniyle, yüksek oranda deasetile edilmiş kitosanın daha yüksek antimikrobiyal özelliği saptanmıştır [38,39]. Deasetilasyon derecesi arttıkça, hücre membranına elektrostatik bağlanma ve geçirgenlik etkisi artarken; kitosanın molekül ağırlığı arttıkça, hücre çekirdeği içine nüfuz azalmaktadır [40].

Kitosan doğal antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır [41]. Örnek olarak kültür ortamı içerisinde % 0,02 kitosan bulunması *Escherichia coli*' nin gelişimini inhibe etmiştir. Aynı zamanda çeşitli bitki patojenlerinin gelişimi de kitosan varlığında durdurulmuştur.

Genel olarak bakıldığında kitosan aşağıda belirtilen özelliklerden dolayı birçok endüstriyel uygulamada kullanıma sahiptir;

- Yenilenebilir özelliktedir ve bol miktarda bulunmaktadır.
- Toksik değildir.
- Biyoyumludur ve biyobozunurdur.
- Asit giderici, antiülser, antitümör, antimikrobiyal, antioksidant, antibakteriyel ve antifungal etki gibi biyoetkileri vardır.
- Çözünmesi için organik çözücülere gerek duyulmaz.
- Katyonik polimer olup negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşir.

- Mikro ve nanoparçacıklarını hazırlamak oldukça kolaydır.

Kitosanın sahip olduğu bu özellikler araştırmacılar tarafından oldukça küçük kitosan parçacıkları hazırlanarak incelenmiştir. 1990'lı yıllara gelindiğinde kitosan üzerinde boyut küçültme çalışmaları sonucunda mikro ve nano boyutta kitosan elde edilmiştir. Elde edilen parçacıklar üzerinde yukarıda bahsedilen özellikler incelendiğinde parçacık boyutunun azalmasıyla özelliklerin daha da iyileştiği görülmüştür. Özellikle kitosanın antimikrobiyal, antifungal, antitümör ve antibakteriyel özelliklerinde artma gözlenmiştir [42].

Kitosan nano parçacıkların sahip oldukları yüzey alanı, deasetillenme sonucu oluşan kitosandan ve mikroboyutta üretilen kitosan parçacıklarından daha yüksektir. Böylece, kitosan nano parçacıklar daha fazla aktif yüzey alanına sahip olur. Yine, daha fazla yüzey alanına sahip olması kitosanın bağlama kapasitesinin artmasını sağlar. Kitosanın toksik olmaması, biyouyumlu ve biyobozunur olması özelliklerinin yanı sıra kitosan nano parçacıkların boyutlarından dolayı sahip olduğu bu özellik, kitosanın ilaç salım sistemlerinde kullanılması sonucunu ortaya çıkarmıştır. Kitosanın nano boyutta kullanılması ilaç yüklü kitosanın kılcallara bile girebilmesini sağlamaktadır. Böylelikle; hedeflenmiş ilaç salımı gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, kitosan boyutunun küçülmesi adsorpsiyon kapasitesini de arttırmaktadır.

2.1.3.1. Deasetilasyon derecesi

Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. “Deasetilasyon Derecesi” kitinin yapısında bulunan amino asetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesidir. Böylece yapısında sadece amin grubu kalmaktadır. Kitosanın deasetillenme derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Kitinin %60 ve üzeri derecelerde deasetillenmesi sonucunda kitosan elde edilmektedir [43]. Deasetillenme derecesi, deniz kabuklularının cinsine ve üretim yöntemine göre %56-99 arasında değişmektedir.

Kitosan muhtemelen en yaygın olarak kullanılan biyopolimerdir ve çevre mühendisliğinden biyomedikal alanlara kadar çeşitli sektörlerde uygulamalara sahiptir. Bu uygulamalar temel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu uygulamaların pek çoğunda polimerin çözünürlüğü gereklidir

ve bu da deasetilasyon derecesi tarafından belirlenmektedir. Konsantre asetik asit solüsyonları yüksek sıcaklıklarda kitosanın depolimerizasyonuna neden olabilir [44].

Deasetilasyon derecesi polimerin nasıl uygulanacağını belirlediğinden dolayı kitosanın önemli bir özelliği olmaktadır [45]. Kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri ile biyolojik aktivitelerini etkilediği bulunmuştur [46].

2.1.3.2. Molekül ağırlığı

Polisakkaritlerin ortalama molekül ağırlığının belirlenmesi ve onların fizikokimyasal davranışlarındaki sonuçların anlaşılması kimyadaki gerçek değişimleri göstermiştir. Kitin ve kitin türevleri hakkındaki bu tür bilgiler pek çok alanda araştırmaların ilerlemesi ve endüstriyel uygulamalar için önemli olmuştur.

Kitinin moleküler ağırlığı kaynağa ve kullanılan metoda göre değişiklik gösterir. Ticari kitosan ürünlerinin moleküler ağırlıkları 50.000 ile 1.200.000 Da arasında değişirken doğal kitininki genellikle 1.000.000 Da daha fazladır [31].

Kitin ve kitosanın molekül ağırlığı, elde edildiği kaynağa ve özellikle deasetilleme koşullarına bağlı olarak ta değişmektedir. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen, kitosanın parçalanmasına neden olmakta ve molekül ağırlığını düşürmektedir. Diğer yandan, çok yüksek sıcaklıklar da kitosanın molekül ağırlığına olumsuz etki etmektedir. Örneğin; 280°C ve üzerindeki sıcaklıklarda kitosan parçalanmaya başlamakta, polimer zinciri kopmakta ve böylece molekül ağırlığı düşmektedir.

2.1.3.3. Çözünürlük

Kitosan nötral ve alkali pH'da serbest amino grupları içerir ve suda çözünmez. Fakat glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi inorganik ve organik asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşür. Asidik ortamda ise, polimerin amino grupları (NH_2) protonlanır ($-\text{NH}_3^+$) ve molekül pozitif yüklenir. Her glukozamin ünitesinde bir yük olduğundan kitosan yüksek yük yoğunluğuna sahip olup, negatif yüzeylerle güçlü bir şekilde etkileşir. Protonlaşmış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstermekte, viskoz çözeltiler oluşturmakta ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. Kitosanın çözünürlüğü, kimyasal modifikasyonları, film veya lif oluşumu gibi kullanımları açısından da oldukça önemli bir parametredir.

Genel olarak, kitin ve kitosanın çözünürlüğü molekül ağırlığının artmasıyla azalmaktadır. Kitosanın pH 7,0'nin üzerindeki sulu çözeltilerde çözünmemesinin sebebi stabil kristal yapısından dolayıdır. Molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları boyunca esnemez bir kristal yapı ile karakterize olan kitinin deasetilasyon derecesi %0 ve %100 olduğunda en yüksek kristallik elde edilir [31,47].

Kitosanın çözünürlüğünü etkileyen birçok parametre bulunmaktadır. Bunlar sıcaklık, alkali konsantrasyonu ve partikül büyüklüğüdür. Yapılan araştırmalar kitosanın iyi bir çözünürlüğe sahip olabilmesi için en az %75-80 deasetillenme derecesinde olması gerektiğini göstermiştir. Sıcaklık ve pH'nın kitosanın çözünürlüğü üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada; nötral pH'da ve gliserol-2-fosfat varlığında elde edilen suda çözünebilir özellikteki kitosanın, pH 7,0-7,1'de ve oda sıcaklığında stabil olduğu, sıcaklık 40°C olduğunda ise çözeltinin jel formunu aldığı saptanmıştır [48].

2.1.3.4. Viskozite

Çözeltideki kitosanın viskozitesi; deasetilasyon derecesi, moleküler ağırlık, iyonik kuvvet, konsantrasyon, pH ve sıcaklık değerlerine bağlıdır [49]. Kitosanın asetik asitteki viskozitesi pH'ın azalması ile artar ancak HCl'de pH'ın azalması ile azalır. Kitosanın asıl viskozitesi iyonizasyon derecesinin bir fonksiyonudur. Kitosan konsantrasyonu arttıkça, ortam sıcaklığı azaldıkça veya kitosanın asetilasyon derecesi arttıkça kitosan çözeltisinin viskozitesi artar. Kitosan çözeltisinin hazırlandığı asit türüne bağlı olarak da viskozite değişmektedir [50].

Kitosanın viskozitesi bütün fizikokimyasal muamelelerden etkilenmektedir ve dondurma dışında, işlem zamanı ve sıcaklığındaki artış ile azalmaktadır. 4°C'de saklanan kitosan çözeltilerinin görel olarak viskozite açısından stabil olduğu bulunmuştur [51].

2.1.3.5. Hacim yoğunluğu

Karides ve yengeçten elde edilen kitinin hacim yoğunluğu 0,06 ve 0,17 g/cm³'tür [21]. Karides kitini yengeç kitinine göre daha porludur. Kril kitinin ise yengeç kitinine göre 2,6 defa daha porlu olduğu bulunmuştur [52]. Kerevit kitin, kitosan ve diğer ürünler arasında en yüksek hacim yoğunluğu 0,25 g/cm³ olarak gözlemlenmiştir. Yengeç ve kerevit kitinleri arasında yengeç kitini en yüksek hacim yoğunluğuna (0,18 g/cm³) sahiptir ancak belirgin bir fark yoktur. Kitin ve kitosan

için başlangıç materyali olarak kerevit kabuklarının en yüksek hacim yoğunluğuna ($0,39 \text{ g/cm}^3$) sahip olduğu bulunmuştur. Bu materyalin muameleden önceki porluluğundan kaynaklanabilir. Ancak bir kez kerevit kabukları deproteinize veya demineralize edilince üretilen kitin ve kitosanın hacim yoğunluğu arasında küçük farklılıklar bulunmuştur. Deasetilasyon derecesindeki artış ile hacim yoğunluğunda bir azalma görülmüştür. Kerevit ve ticari kitin ve kitosanın karşılaştırılması durumunda elde edilen ürünün türüne veya kaynağına ve kullanılan metotlara bağlı olarak bazı farklılıklar görülebilir [53].

2.1.3.6. Su tutma kapasitesi

Kitosan pek çok alanda kullanılan bir su tutma kapasitesine sahiptir. Örneğin kitosan fiberlerinden yapılmış olan spor kıyafetleri piyasada satılmaktadır [21]. Kitinin su tutma kapasitesi %423-648 arasında değişirken bu oran kitosanda %581-1150 arasında yer almaktadır. Bu oranlardan deasetilasyon işleminin su tutma kapasitesinin önemli miktarda arttırdığı açıkça görülebilmektedir. Ayrıca kitin üretimi esnasında deproteinizasyon işleminin demineralizasyondan önce yapılması da daha yüksek bir su tutma kapasitesine neden olmaktadır. Kabuklardaki pigmentleri uzaklaştırmak için yapılan dekolorasyon işlemi ise üretilen kitin ve kitosanın su tutma kapasitesini azaltmaktadır. Deasetilasyon işlemi sırasında kitindeki asetil gruplarının uzaklaştırılması NH_2 gruplarının oluşmasına neden olmaktadır. Su tutma kapasitesindeki artışın da polimerin yapısında meydana gelen bu değişiklikten kaynaklandığı söylenebilir. Bunun yanında Knorr (1982) kitin ile kitosan arasındaki bu farkın kristallikteki ve tuz oluşturan grupların miktarı ile üründeki artık protein içeriğindeki farklılıktan kaynaklanabileceğini belirtmiştir [54].

2.1.3.7. Yağ Tutma Kapasitesi

Kitosanın yüksek bir yağ tutma kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada kerevitten elde edilen kitosanın yağ tutma kapasitesi %706 iken selulozun %314 civarında olduğu tespit edilmiştir [55]. Kitosan üretimi esnasında dekolorasyon işleminin uygulanmasının su tutma kapasitesinde olduğu gibi yağ tutma kapasitesinde de azalmaya sebep olduğu görülmüştür [56].

2.1.4. Kitosanın modifikasyonu

Kitosanın en önemli özelliklerinden biri çok yönlü olarak kullanılabilmesidir. Kitosandaki hidroksil ve amin reaktif grupları kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte kitosanın mekanik ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir. Kitosan, çeşitli uygulamalara yönelik olarak, toz, nano patikül, jel boncuk, membran, sünger, petek fiber veya içi boş fiber gibi farklı şekilde şartlandırılmış polimer formları hazırlanarak kolayca modifiye edilebilmektedir.

Kitosan seyreltik organik asit solüsyonları içerisinde aldehit ve karboksilik asitlerle çeşitli jeller oluşturmak için reaksiyona girer [57]. Glutaraldehitte çaprazbağlı kitosan, diiminler yoluyla kitosan kimyasında bir anahtardır ve imin yoluyla farklı zincirlerdeki amin gruplarının birlikte bağlanmasıyla kitosan bileşiklerinin daha kararlı olmasına sebep olur [58]. Çapraz bağlama işleminde farklı kimyasal reaktifler kullanılarak kitosanın yapısının mekanik ve kimyasal olarak güçlendirilmesi sağlanır. Çapraz bağlanma reaksiyonları en çok kitosanın fonksiyonel grupları ve çapraz bağlama maddesinin tipi ve büyüklüğünden etkilenir. Çapraz bağlayıcının molekül kütlesi ne kadar küçükse daha kolay difüze olacağından çapraz bağlanma reaksiyonu o kadar hızlı olur. Çapraz bağlayıcının yapısına bağlı olarak, birbirleri ile etkileşim sonucu oluşan örgüler kovalent ya da iyonik bağla meydana gelmektedir [59].

2.1.5. Kitosanın uygulama alanları

Kitosan; biyouyumluluk, antibakteriyal, antifungal ve antitumoral etki, hemostatik özelliği, ağır metal, protein ve yağ absorpsiyonu, biyodegradasyon gibi özellikler nedeniyle birçok alanda yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu kullanım alanlarının başında kontrollü ilaç salımı, biyosensör uygulamaları, hücre kültürü, gıda ve su arıtım sistemleri yer almaktadır [15].

Kontrollü salım teknolojisinde kitosan kapsül, jel, film veya boncuklar şeklinde kullanılmaktadır. İlaçların kontrollü salımı, son derece önem taşımaktadır. Taşıyıcı tasarımında kullanılan kitosan; parçalanabilirliği, toksik özellikte olmaması ve biyolojik olarak uyumluluğu açısından avantaj sağlamaktadır. Kitosan, vücutta zararsız ürünlere (şekerler) dönüştüğü için herhangi bir olumsuzluk yaratmamaktadır. Bu bağlamda kitosan, çeşitli ilaç formülasyonlarında uygun bir matris olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli ilaçlar, kitosan matrisi içerisine (film, mikro kapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmektedir. Farklı şekillerde kitosan içerisine

hapsedilmiş ilaçlar da bulunmaktadır. Kitosanın serbest amin grubu kitosana katyonik özellik kazandırdığı için negatif yüklü ilaçlar, polimerler ve biyoaktif moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır [60].

Klasik salım dışında, kitosanın makrofaj aktive edici ve hemostatik özelliği nedeniyle yara iyileştirmede olumlu rol oynadığı gösterilmiştir. Kitosan, yara iyileşmesini hızlandırmada oldukça etkin rol oynamaktadır. Başta diyabet hastaları olmak üzere vücuttaki yaraların iyileşme hızı hastalar için büyük önem taşımaktadır. Kitin ve kitosan uzun süredir yara iyileştirme özellikleri bakımından araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Kitosan, heparin ile polielektrolit kompleks oluşturma özelliği sayesinde yara tedavisine etkin rol oynamaktadır. Heparin, kanın pıhtılaşmasını önleyen (antikoagülan) bir polisakkarit olduğundan, oluşan kompleks ve beraberinde hücre büyüme faktörünün de artmasıyla doku gelişimini desteklemektedir. Bu gibi kullanım alanlarında kitin ve kitosan numunelerinin sahip olduğu deasetilasyon derecesi ve polimer zincir uzunluğunun etkisi de incelenmiştir ve düşük deasetilasyon derecesindeki kitosanın daha düşük aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [61].

Hücre kültürü teknolojisinde yüzey kimyası çok önemli bir yere sahiptir. Kitosan doğal bir polimer olması nedeniyle birçok üstün özelliğe sahiptir. Memeli hücreleri üremek ve canlılıklarını devam ettirebilmek için tutunabildikleri inert, biyoyumlu bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Hücre kültüründe malzemenin yeterince sert ve rijit olması gerekmektedir ve kitosan genelde diğer doğal polimerlerden daha iyi bir mekanik özelliğe sahiptir. Hücrelerin bir yüzeye tutunabilmesi için yüzey üzerinde uygun tutunma bölgeleri ve reseptörler bulunması gerekmektedir. Kitosan kolay bir şekilde modifiye edilebilmekte ve protein afinitesi yüksek olduğundan uygun peptid veya proteinler kitosan yüzeyine kolaylıkla immobilize edilebilmektedir.

Gıda teknolojisinde kitosan, antibakteriyal etkisi, renk ve yapı stabilizatörü olarak sentetik kimyasallara alternatif olarak kullanılabilir. Kitosan membranların mekanik dayanıklılıkları ve antimikrobiyal etkileri, kaplama ve paketleme malzemeleri olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır [15]. Kaplama uygulamalarında yine film oluşturma özeliğinden faydalanılır. Oluşan filmler hücre dışı solunumu yavaşlatır ve besinlerin raf ömrünü uzatır.

Su arıtım sistemlerinde en çok kitosanın ağır metal bağlama özelliğinden yararlanılmaktadır. Kitosanın jel boncuklar, çözelti ve membran formunda bu

metalleri kendine bağladığı gözlemlenmiştir [15]. Kitosandaki amin ve hidroksil grupları metal iyonları ile güçlü bir şekilde etkileşim içerisindedir. Aslında, nitrojen atomları metal katyonları ile reaksiyon verebilen serbest elektron çiftlerine sahiptir. Bu sebepten amin grupları bağlama mekanizması ile metal katyonlarının tutulmasını sağlamaktadır. Diğer yandan amin grupları asidik solüsyonlar içerisinde kolayca protonlanabilir. Böylece, bu amin gruplarının protonlanması metal anyonları veya anyonik boyaları içeren anyonik bileşiklerin elektrostatik etkileşimine neden olabilir. Buna göre metal katyonları nötre yakın solüsyonlarda kitosandaki amin grupları tarafından bağlama ile adsorbe edilebilir. Metal anyonlarında ise emilim, asidik solüsyonlarda protonlanan amin grupları tarafından elektrostatik etkileşim yolu ile gerçekleşir.

Kitosanın bu özelliklerinden yararlanılarak atık sulardaki çeşitli metal iyonlarını tutma kapasitesi araştırılmıştır. Nair ve Madhavan civayı solüsyonlardan uzaklaştırılmak için kitosanı kullanmışlar [62]. Peniche-Covas ise cıva iyonlarının kitosan tarafından adsorpsiyon kinetiklerinin araştırmıştır. Sonuçlar cıva iyonlarının (Hg^{+2}) kitosan tarafından adsorpsiyonunun etkisinin muamele süresi, partikül büyüklüğü, civanın başlangıç konsantrasyonu ve kitosanın miktarına bağlı olduğunu göstermiştir [63]. Jha ve arkadaşları civanın uzaklaştırılmasındaki benzer bir prosedür kullanarak kitosan tozu ile kadmiyum (Cd^{+2}) adsorpsiyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır [64]. Mckey ve arkadaşları ise bakır (Cu^{+2}), cıva (Hg^{+2}), nikel (Ni^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) iyonlarını uzaklaştırmak için nötral pH ve 25-60°C sıcaklık aralığında kitosanı kullanmışlardır [65]. Yine metal bağlama özeliğinden yararlanarak besin işleme proseslerinden salınan atık sularda bulunan asılı haldeki boyar madde, aminoasit, protein, organik madde vs. gibi maddeler geri kazanılabilir. Kitosan kullanımı ile zaman tasarrufu ve yüksek geri kazanım sağlanabilmektedir. Kitosanın yapısında bulunan amino ve karboksilik grupları, atık nükleer sulardan uranyumun adsorplanması amacıyla da kullanılmaktadır. Kitosanın adsorplama kapasitesi parçacık boyutunun küçülmesi ile artmaktadır.

Hasar gören dokuların tamiri ve yenilenmesine yönelik doku mühendisliği yaklaşımları destekleyici, koruyucu ve bazı hallerde yenilenen dokuyu organize edici özellikler gösteren polimer yapı iskelelerinin kullanımına dayanmaktadır. Bu yapı iskelelerine aynı zamanda gerekli olan biyoaktif maddelerin kontrollü salınımı veya gelişen hücrelerin davranışlarını direkt olarak etkilemeleri için de ihtiyaç duyulabilir. Çeşitli doğal ve sentetik polimerler halen dokular için yapı iskeletleri olarak

kullanılmaktadır. Potansiyel doku mühendisliği sistemlerinin artmasıyla birlikte özellikle arzu edilen doku spesifik özelliklere sahip ve çeşitli doku sistemlerine uygulanabilir materyaller üzerinde sürekli çalışılmaktadır. Kitosan toksik olmayan, biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri ile doku mühendisliğinde yapı iskeleti olarak kullanılabilir. Özellikle porlu kitosan iskeletleri kullanılarak kemik ve kırıldak dokularında yapılan çalışmalar oldukça başarılı sonuçlar vermiş ve kitosanın yeni doku oluşumu üzerindeki olumlu etkisi gösterilmiştir [66,67].

Kuo-Huang et al (2004) tarafından yapılan çalışmada, kitosan ve kitosan/alginat filmlerinin doku iskeleti olarak kullanım olanakları incelenmiştir. Kitosanın deasetilasyon derecesindeki artışla birlikte hücre tutunması ve çoğalmasında artmıştır. Bu şekilde hücre çoğalması ve tutunması ile deasetilasyon derecesinin direkt ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer yandan, molekül ağırlığının önemli bir katkı sağlamadığı sonuçlardan açık bir şekilde görülmüştür. Kitosan/alginat filmlerde saf kitosana göre fibroplast tutunmasının belirgin şekilde artış meydana getirdiği ve burada esas rolü alginatın oynadığı belirtilmiştir. Alginat sayesinde kitosan filme tutunma gerçekleşmiştir. Kitosanın polikatyonik yapısında iki $-NH_3^+$ grupları hücrenin tutunmasına ek bir katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde kitosanın hidrofiliğe de olumlu etkisi olduğu, oluşan kompleksin temas açısının düşmesiyle homojen bir dağılım gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca, hücre tutunmasına kolaylık sağladığı ve böylece doku iskelesi olarak kullanımının son derece uygun olabileceği ifade edilmiştir [68].

Kitosan insan vücut ağırlığını azaltmak için diyet destekleyici olarak düşünülebilir. Bunun için endüstriyel olarak kitosan tabletleri [69] ve kitosan diyet lifleri üretilmiştir [70]. Hızlı bir şekilde çözünebilen kitosan kilo kaybına sebep olur ve vücut ağırlığını azaltır. Kitosan şeker emilimini yavaşlatarak ve yağı absorplayarak kilo kontrolünde kullanılabilen fiberler olarak düşünülür. Kitosanın yağ absorplama mekanizması Hughes tarafından denenmiştir. Kitosan pozitif yüklü amino grupları ($-NH_3^+$) ile yağ asitlerinin anyonik karboksil gruplarını çeker ve film oluşturan safra asitleri sindirilmeden sindirim sistemi içerisinden geçer [70,71].

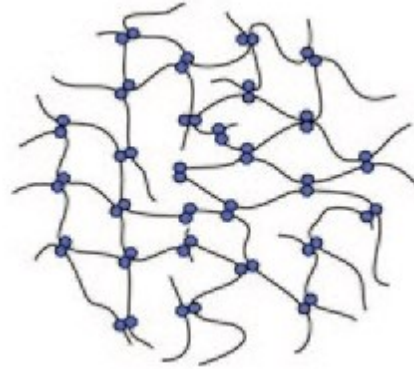
Enzimler büyük avantajlarının yanında yüksek izolasyon ve saflaştırma maliyeti, doğal ortamlarında izole edildikten sonra yapılarının stabil kalmaması, işlem şartlarına ve inhibitör olarak faaliyet gösteren maddelere olan hassasiyeti gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu sınırlayıcı faktörleri bertaraf etmek için çeşitli

yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en başarılı olanı ise enzim immobilizasyonudur. Immobilizasyon, enzimlerin katı bir destek ortamı üzerinde veya içinde tutulması ile gerçekleştirilir. Tüm enzimler için genel bir destek ortamı bulunmamakla birlikte, proteinlere yüksek afinite, enzimlerle direkt reaksiyon ve kimyasal modifikasyonlar için reaktif fonksiyonel gruplara sahip olması, hidrofilik olması, mekanik stabilite ve sertlik, yenilenebilirlik destek ortamları için arzu edilen bazı özelliklerdir. Kitosan da sahip olduğu eşsiz özellikleri ile enzim immobilizasyonu için uygun bir destek ortamı oluşturmaktadır. Hücre ve enzim tutuklanması işlemlerinde kitosan destek doku görevi görüp tutuklama matrisidir. Kitosan destek doku olarak kullanılarak enzim ve hücrelerin yüksek geri kazanımı ve daha fazla kullanımı sağlanır.

2.2. Hidrojeller

2.2.1. Hidrojellerin yapısı

Hidrojeller çok miktarda su ve biyolojik sıvıları absorplayabilen, polimerlerin kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmasıyla oluşan, üç-boyutlu, hidrofilik, ağ şeklindeki özel polimerlerdir. Hidrojellere ait genel bir şematik gösterim Şekil 2.3'te sunulmuştur. Su içeriği kendi kütlesinin %100'üden fazla olan hidrojellere de süper absorbant denilir [72,73].



Şekil 2.3 : Hidrojelin şematik gösterimi.

Polimer suda hızla şişer ve üç boyutlu yapı kazanır. Bu üç boyutlu yapı polimer zincirleri arasında oluşan çapraz bağlanmadan kaynaklanmaktadır [74]. Şişme, polimerik ağ yapılarının karakteristik bir özelliğidir. Çapraz bağlanma miktarına bağlı olarak polimerik ağlar çözünmeden çok yüksek miktarda sıvı absorplayabilirler

[75]. Bir polimerik jelin şişme yeteneğini, içerdiği fonksiyonel grupların birbiriyle ve çözücüyle etkileşimi belirlemektedir [76,77,78]. Zincirler arası itme ve çekme, kovalent olmayan elektrostatik, hidrofobik, Van Der Waals ve hidrojen bağından etkilenmektedir. Hidrofobik etkileşimler bu tür fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimlerdir ve bu da jelin şişme davranışını etkilemektedir [77,78,79].

Hidrojeller, yapılarında çok fazla miktarda su bulundurmaları, yumuşak ve esnek yapıları gibi taşıdıkları birçok fiziksel özellikler açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük bir benzerlik göstermektedirler [7-9].

Hidrojeller yapılarında sensor (algılayıcı) olarak tanımlanabilecek çeşitli gruplar taşıyabilirler. Böylece hidrojel, çevrede meydana gelen çeşitli değişikliklere hacimsel değişimlerle çok kısa sürelerde cevap verir. Bu özelliklerinden dolayı bu tür polimerlere “akıllı polimerler” denir [80].

Hidrojellerde hacimsel değişimleri meydana getiren uyarıcılar fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Fiziksel uyarıcılar; sıcaklık, elektrik alan, çözücü bileşimi, ışık, basınç, ses ve manyetik alandır. Kimyasal veya biyokimyasal uyarıcılar ise pH, iyonlar ve spesifik moleküler etkileşimlerdir [81].

2.2.2. Hidrojellerin uygulama alanları

Hidrojeller fizyolojik koşullarda, istenilen sürede belirlenen şekillerine hızla ulaşıp bu şekilleri korudukları için pek çok alanda kullanılabilirler. Ayrıca biyouyumlu oluşları, çözücü taşınımının kolaylığı ve biyobozunurluk özelliklerinden dolayı kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve tıbbi malzeme üretiminde kullanımları artmıştır. Hidrojeller, özellikle büyük ve karmaşık molekül yapısına sahip, yavaş salınan tedavi edici ajanların kontrollü salım çalışmaları, doku bariyerleri ve doku mühendisliği için uygundur [82].

Hidrojellerin biyomalzeme olarak ilk uygulaması kontak lensler olmuştur. Mekanik kararlılığının iyi oluşu, yüksek oksijen geçirgenliği ve uygun refraktif indise sahip oluşları, kontak lenslerde kullanımlarının temel nedenidir. Tedavi amaçlı göz damlaları da hidrojellerin bir başka kullanım alanıdır. Göz damlaları gözyaşı tarafından seyreltilerek kısa sürede akar. Bu alanda kullanılan hidrojel göze sıvı ürün olarak düşmesine rağmen, gözdeki sıcaklığa maruz kaldığında daha özlü (viskoz) bir hale gelir. Kaymaya karşı duyarlılığından dolayı da göz her kırılışında sıvı hale

gelir ve jelin bütün göze eşit miktarda yayılmasını sağlar. Bu yöntem benzer şekilde burun spreyleri için de kullanılabilir. Özellikle insülin gibi ilaçların bu tür bir sistemden burun yoluyla salımı konusunda çalışmalar yapılmakta ve böylece enjeksiyon yönteminin yerini alabileceği düşünülmektedir [83].

Hidrojellerin sensör olarak kullanımına dayalı çeşitli çalışmalar da vardır. Sheppard ve arkadaşları biyoaktif tabakası duyarlı bir hidrojel olan ve iletkenlik ölçümüne dayalı olarak çalışan bir biyosensör geliştirmiştir [84].

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde hidrojellerin en büyük yararı, ilacı vücut içerisinde karşılaşılabileceği inhibe edici enzimler, pH veya bakteriyel inhibisyonlar gibi ortam değişikliklerinden koruyabilmesidir [74]. Kontrollü salım sistemlerinde etken maddenin tek bir uygulama ile uzun süre etkin düzeyde kalması sağlanır. Bu sistemlerde hidrojellerin şişme-büzülme, mekanik, morfolojik, kimyasal vb. gibi pek çok özelliklerinden yararlanılmaktadır. Özellikle ortam pH'nın değişimlerine en azından belirli oranlarda cevap verebilen hidrojeller, çeşitli vücut bölgelerinde ilaç serbestleştirmek için önem arz etmektedir. Kitosan ve akrilamid bu tür sistemlerde sıklıkla başvurulan ve biyoyumlu olduğu belirlenmiş olan polimerlerdir [85].

Hidrojeller; iyonik şiddet, elektromagnetik ışınım, pH ve sıcaklık gibi dış çevre koşullarındaki değişimlere hacimlerini yüzlerce kat artırıp azaltarak kontrollü bir şekilde cevap verebilmeleri sayesinde biyomedikal, farmasötik, teknoloji ve tarımsal alanda geniş kullanım alanları bulmuştur [7,79,86]. Hidrojeller yüksek oranda su tutucu olmaları ile peçete, çocuk bezi gibi temizlik ürünlerinin yapımında [87], gübrelerin ve tarım ilaçlarının denetimli salımlarında [10,88], endüstride yağ ve petrol içerikli sulu atıklardan saflaştırma ve suyun uzaklaştırılması işlemlerinde [83] ve hastane atıklarından suda çözülebilen ya da hidrojele uyumlu olarak soğurulabileceği bazı fizyolojik (kan ve üre vb.) sıvıların soğurulmasında da kullanılırlar [89,90].

Hidrojeller, endüstriyel açıdan son derece önemli olan seyreltik sulu çözeltilerden büyük moleküllerin ayrılmasında da kullanılmaktadırlar. Ayrıca hidrojeller, jel elektroforezi ve jel kromatografisi gibi moleküler ayırma işlemlerinde “moleküler elek” görevini üstlenirler [91].

Bir başka kullanım alanı ise yanık tedavisidir. Hidrojeller, esnek olmaları, dayanıklılıkları, antimikrobiyal olmaları, su buharı ve metabolitleri

geçirebilmelerinden dolayı bu sahada kullanın alanı bulmuşlardır. O₂ ve su bazlı ilaç geçişine izin veren poliüretan membran destekli hidrojeller yapışkan olmayan yanık sargıları olarak kullanılmaktadırlar. Yanık tedavisinde kullanılan bir başka hidrojel sargı ise, şeffaf olup yaradan rahatlıkla temizlenebilen, yaraya yapışmayan alginat sargılardır [85].

Son yıllarda hidrojellerin, güç üretiminde kullanılması fikri üzerinde de ısrarla durmaktadırlar. Hidrojellerin bulunduğu asidik ortamın pH'ı değiştirilerek genişleme veya büzüşme olayı sağlanmış ve böylelikle ilk “kemo mekanik sistem” geliştirilmiştir ve bu sistemlerle, kimyasal enerjinin doğrudan mekanik işe çevrimi (kemo mekanik sistem) mümkün olmuştur. Bu tür sistemler güç elde etmek için kullanılan konvansiyonel cihazların kullanımının sınırlı veya zor olduğu yerlerde örneğin denizaltında, uzayda veya insan vücudunda kullanılabilir [91]. “Smart jel” adıyla piyasaya sürülen ticari jel, oda sıcaklığında yumuşak ve esnek olup, vücut ısısına maruz bırakıldığında katılaştıran bir yapıdır. Bu jel, ayakkabıların (özellikle patenlerin) içine yerleştirilerek, ayağa gerekli desteği ve konforu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır [83].

2.2.3. Kitosan bazlı hidrojeller

Günümüze kadar doğal biyopolimer jeller, genellikle gıda teknolojilerinde ve gıda yan ürün proseslerinde kullanılırken son yıllarda yapılan araştırmalar ışığında kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve doku mühendisliğinin pek çok alanında kullanılmaya başlanmıştır [92].

Doğal polimerlerin en önemli özellikleri, su içerisinde jelleşirken, organik çözücülerde jelleşmemeleridir. Pek çok doğal polimer çözelti formundan jel fazına düşük sıcaklıklarda geçmektedir. Ancak bazı selüloz türevleri ve kitosan doğal polimeri yüksek sıcaklıklarda jelleşirler [5].

Kitosan hidrojellerin oluşumunda sıklıkla kullanılan yöntem, değişik çapraz bağlayıcılar eklenerek oluşturulan kovalent ve iyonik olarak çapraz bağlama yöntemidir. Ancak yapılan in vivo çalışmalarda özellikle kovalent bağlanmada eklenen çapraz bağlayıcıların toksik etkileri olduğu saptanmıştır. Ayrıca çapraz bağlanmanın tam oluşabilmesi için ek maddelere veya katalizörlere ihtiyaç duyulmaktadır, bu da çapraz bağlanma sonrasında saflaştırma ve çeşitlendirme işlemlerini beraberinde getirmektedir. Bu olumsuz etkileri elimine etmek amacıyla

kitosana herhangi bir çapraz bağlayıcı eklenmeden, kitosan zincirleri arasındaki kompleksleşme ile oluşturulan polimerler üzerine çalışmalar başlamıştır [93].

Çapraz bağlanmış hidrojellerde; yapıdaki iç bağlanmalar bir çapraz bağlayıcı ile sağlanır. Çapraz bağlayıcılar, çapraz bağlama amacıyla eklendikleri polimere göre molekül ağırlığı düşük olan yapılardır. Hidrojelin özellikleri çapraz bağlanma yoğunluğuna ve çapraz bağlayıcı türüne göre değişir. Çapraz bağlanma yoğunluğu, çapraz bağlayıcı ajanın mol sayısının polimerin tekrarlanan gruplarının mol sayısına oranıdır. Çapraz bağlayıcı türüne göre bağlanma kovalent veya iyonik olarak sınıflandırılır.

2.2.3.1. Kovalent bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojenleri

Kovalent bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojenleri üç grupta toplanırlar. 1. grupta, kitosan zincirleri kendi içinde intermoleküler etkileşimlerle en basit oluşumlu hidrojenli oluşturmaktadır. 2. grupta, çapraz bağlanma reaksiyonu, kitosan yapısal birimleriyle başka bir polimerin yapısal birimleri arasında gerçekleşmektedir. 3. grupta ise, yarı-IPN (interpenetrating network) yapı oluşmaktadır. Bu oluşumda çapraz bağlanma öncesinde kitosan çözeltisine, kitosana reaksiyon vermeyen bir polimer eklenir ve polimer, kitosan zincirleri arasına düz zincir halinde hapsolür. Ortama kitosana birlikte çapraz bağlanan reaktif polimer eklenirse IPN yapı oluşur. Yarı-IPN tipi hidrojenlerde ise polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri doğrusal yapıdadır [4-6].

Çapraz bağlayıcılar polimer zincirleri arasında köprüler meydana getirecek en az iki reaktif fonksiyonel gruba sahip moleküllerdir. Günümüze kadar kitosan için kullanılan çapraz bağlayıcılar glutaraldehit gibi dialdehitlerdir. Kitosanın glutaraldehit ile çapraz bağlanması Schiff baz oluşumu ile gerçekleşmektedir. Schiff bazlar ise aril grubuna veya alkil grubuna bağlı azot ile karbon-azot çift bağı içeren kimyasal bileşik veya fonksiyonel gruplardır ($R_1R_2C=N-R_3$). Schiff bazlar, aminler ile aldehitler veya ketonlar arasındaki reaksiyon sonucunda gerçekleşmektedir.

2.2.3.2. İyonik bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojenleri

Polikationik bir polimer olan kitosan iyi bir şelat oluşturucu ajandır. Negatif iyonlar ve moleküllerle tepkime vererek iyonik köprüler oluşturmaktadır. Genel olarak

etkileşim çapraz bağlayıcının negatif yükü ile kitosanın pozitif yükü arasında meydana gelir.

İyonik çapraz bağlanmış kitosan hidrojeller oluşturmak için kitosanın bir çözücü içerisinde dağılması sağlanır ve yüklü bir çapraz bağlayıcı ajan kullanılır. Fe(III), Mo(VI), Pt(II) iyonları bu gruba örnek verilebilir. Oluşum prosesi oldukça basittir, katalizöre gerek duyulmaz. Çapraz bağlayıcı ajan kitosan çözeltisine doğrudan eklenerek çapraz bağlanma gerçekleştirilir. Bu tip çapraz bağlanma; çapraz bağlanma yoğunluğuna, molekül boyutuna, yük miktarına, kitosan için molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağlıdır.

İyonik çapraz bağlanmış kitosan hidrojellerin en önemli kullanım alanları pH duyarlı şişme ve ilaç salımıdır. Bu hidrojeller hem asidik, hem de bazik ortamda şişebilmektedirler. Bu da uygulama alanlarını arttırmaktadır. pH düştüğünde çapraz bağlayıcının yük yoğunluğu düşer ve şişme görülür. pH daha da fazla düşerse kitosan zincirlerinde açılma görülür ve hızlı bir ilaç salımı gerçekleşir.

2.3. Enzim ve Aminoasit İmmobilizasyonu

2.3.1. Enzimler

Enzimler kimyasal katalizörlerle aynı etkiyi gösteren biyolojik katalizörlerdir. Kimyasal reaksiyona uygun olmayan ortamlarda, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırırlar. Enzimlerin varlığıyla reaksiyon hızında 10^8 - 10^{20} oranında bir artış gözlenir. Birçok enzimin en önemli özelliği, üç boyutlu kompleks bir yapıya sahip olan polipeptit zincirleri olmalarıdır. Enzim aktivitesi konformasyonel yapıyla yakından ilişkilidir. Enzimlerin üç boyutlu yapısı, yüzeye yakın bölgelerde, spesifik aminoasit dizisine sahip olan ve aktif merkez olarak bilinen cep benzeri yapılar oluşturur. Aktif merkezde, enzimle substrat arasında, belirli bir ürün oluşturan kimyasal reaksiyon gerçekleşir. Optimum aktivite göstermek amacıyla, bazı enzimler, sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum ya da çinko gibi metal iyonu olabilen kofaktörlerle etkileşirler. Organik kofaktörler ise, koenzim olarak bilinir ve B vitamini (thiamin, biyotin), NAD^+ , $NADP^+$, FAD^+ , ATP gibi farklı yapılarda olabilir. Enzim ve kofaktörün birlikte oluşturdukları yapı, haloenzim olarak bilinirken, kofaktörü olmayan enzim ise apoenzim olarak adlandırılır [94]. Bütün enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından adlandırılır. Enzim isimleri, gerçekleştirdikleri kimyasal reaksiyon ve substratlarıyla ilgili bilgi verir. Enzimle

substrat arasında gerçekleşen ilk temas, aktif merkezde optimal bir konformasyona sebep olurken, enzim-substrat arasında maksimum bağ oluşabilmesine olanak verir [94].

Enzimler, canlı hücrelerde meydana gelen kimyasal tepkimeleri ılımlı koşullarda (fizyolojik pH ve sıcaklık) kendileri herhangi bir değişikliğe uğramaksızın katalizleyen veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla yürütülmektedir. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamları dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı sağlamaktadır [95,96].

Karmaşık canlı sistemlerinde çalışan enzimler, spesifikler, toksik etki göstermezler, suda çözünebilirler, çok düşük derişimlerde bile substrat reaksiyonlarını katalizleyebilirler ve yan ürün oluşumuna neden olmadan yüksek verim sağlarlar. Enzimlerin bu özellikleri, onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulanmalarına yol açmıştır [97].

Birçok avantaja sahip olmalarına karşın endüstriyel uygulamalarda enzim kullanımları sınırlıdır. Enzim kullanımlarını sınırlayan etkenleri şöyle sıralayabiliriz:

- Enzim izolasyonu ve saflaştırılması çok pahalıdır. Çünkü enzimlerin zarar görmeden hücrelerden ayrılması için özel ayırma yöntemleri gerekir.
- Enzimlerin pek çoğu canlı organizma dışında kararsızdırlar.
- Çoğu enzimlerin kaynağı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlı hücrelerdir. Fakat enzim izolasyonunda bakteriler, mantarlar ve küfler gibi mikrobiyal kaynaklar, bitkisel ve hayvansal kaynaklara tercih edilirler. Çünkü mikroorganizmalar mevsimlere bağlı olmaksızın gelişirler.
- Enzimlerin çoğunun çözelti şeklinde kullanılması proses sonunda enzimin geri kazanılmasını zorlaştırır. Bu da maliyeti artırır.
- Serbest enzimlerle gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalarda tepkimelerin durdurulması ortama spesifik inhibitör katılmasıyla olur. Bu da tepkime ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru katmış olur.

Bu nedenlerden dolayı enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrarlanabilir kullanımlara girmeleri ve termal kararlılıklarının sağlanması ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır [12,98]. Enzim immobilizasyonu, katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel ve kimyasal tutturulması olarak tanımlanabilir [99].

Enzim immobilizasyonunda genellikle sentetik kimyasal maddeler ve sentetik makro moleküller destek materyali olarak kullanılmaktadır. Destek materyalinde hidroksil, karboksil ve amino grupları gibi aktif gruplar bulunmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu sırasında bu gruplar korunmalı ve enzim aktifliğini yitirmemelidir. Bununla birlikte, destek için kullanılan kimyasallar, bazı durumlarda enzimleri kısmen veya tamamen çalışamaz hale getirebilir. Enzim immobilizasyonun da kullanılan malzemelere akrilamid ve akrilat esaslı polimerler, polipeptitler; doğal malzemelere ise agaroz, dekstran, selüloz, kollajen, cam verilebilir [100]. Tüm enzimler için genel bir destek ortamı bulunmamakla birlikte, proteinlere yüksek afinite, enzimlerle direkt reaksiyon ve kimyasal modifikasyonlar için reaktif fonksiyonel gruplara sahip olması, hidrofilik olması, mekanik stabilite ve sertlik, yenilenebilirlik destek ortamları için arzu edilen bazı özelliklerdir. Kitosan da sahip olduğu eşsiz özellikleri ile enzim immobilizasyonu için uygun bir destek ortamı oluşturmaktadır. Kitosanın toz, pul şeklinde küçük parça ve farklı geometrik konfigürasyonlarının jelleri enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır.

Enzimlerin immobilize edilmelerinin en önemli avantajları aşağıda özetlenmiştir [101-103]:

- Immobilize enzimin kararlılığı yüksektir. Sürekli ya da tekrarlanabilir kullanımı mümkündür. Enzim ürünlerden kolayca ayrılabilir.
- Immobilize enzimler ısı, pH ve organik reaktiflere karşı daha dayanıklıdır. Substrat ve ürünün inhibisyonuna karşı koyarlar ve enzimin aktifliğini uzun süre korumasını sağlarlar.
- Immobilize enzim sistemlerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri seçimli olarak değiştirilebilir. Çeşitli düzenek ve proseslere uygulanabilir.

- Membrana bağlı enzimler in vivo doğal sistemleri için model olarak seçilebilir. Tepkime suresi kısıılır ve çok basamaklı tepkimelere uygunluğu artar.
- İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanır.

Enzimlerin immobilizasyonunun bu avantajlara rağmen aşığıda sayılan bazı dezavantajları da mevcuttur [104]:

- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

Temel immobilizasyon yöntemleri tutuklama ve yüzey immobilizasyonu olarak iki ana gruba ayrılabilir. Bazı hallerde hapsedme ve yüzey immobilizasyonu birlikte kullanılır. En uygun immobilizasyon metodu ve destek materyalinin seçimi, enzime ve özel uygulamalara bağlı olarak değişir destek materyalin seçiminde en önemli kriter; destek materyalin bağlama kapasitesidir. Bu da onun yük yoğunluğuna, fonksiyonel grupların özelliğine, sudan etkilenmemesine bağlıdır [12].

Tutuklama immobilizasyonu enzimi küçük bir hacimde durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlarda da gerçekleştirilebilir.

Polimer matrikse enzim hapsedme işlemi için Ca-alginat, karrajen, poliakrilamid ve kollojen gibi polimerler matriks olarak kullanılırlar. Matriks tanecik membran veya ipliksi yapıda olabilir. Polimer matriks içinde immobilizasyon için, enzim çözeltisi polimer çözeltisi ile polimerleştirilmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri polimere bağlanmaz ama fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Sıvı polimer- enzim karışımı ya uygun kalıplar kullanılarak, ya da uygun çaptaki deliklerden akıtılarak şekilli tanecikler haline getirilir.

Membranda hapsedme işleminde ise, enzim membranda sarılmıştır. Enzim kimyasal bağlanma yapmadığı için (serbest olduğu için) aktif merkezin yapısı bozulmaz. Naylon, selüloz, polisülfon, poliakrilat yaygın olarak kullanılan membranlardır. Bütün yapılarda büyük molekül kütleli enzimi tutabilen, substratı veya ürünleri geçirebilen yarı geçirgen membran kullanılır. Membran tutuklamanın özel bir şekli

mikrokapsüllemidir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 mikron arasında değişmektedir.

Destek materyalinin yüzeyine enzim immobilizasyonu, “adsorpsiyon ve kovalent bağlama” olmak üzere iki grupta incelenebilir. Adsorpsiyon, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik adsorpsiyon olmak üzere iki türdür. Fiziksel adsorpsiyon, destek taneciklerinin yüzeyi üzerine, enzimlerin Van Der Waals, hidrojen bağı gibi zayıf fiziksel kuvvetlerle bağlanmasıdır. Adsorplanan enzimin aktif merkezi bu olaydan etkilenmez, enzim serbest haldeki aktifliğini korur. Ancak, enzim bağlanmada rol oynayan kuvvetlerin zayıf olması nedeniyle desorpsiyona uğrar. Bu nedenle yöntem dayanıksız bir yöntemdir. Adsorplanan enzimler glutaraldehitte çapraz bağlanma yoluyla kararlı hale getirilebilir. Enzim adsorpsiyonu için kullanılan destek materyaller alümina, silika, poröz cam, seramik, bentonit gibi inorganik maddeler ya da selüloz, nişasta, aktif karbon gibi organik maddeler olabilir. İyonik adsorpsiyon, destek taneciklerinin yüzeyi üzerine, enzimlerin elektrostatik etkileşimlerle bağlanmasıdır. Fiziksel adsorpsiyona göre daha etkin bir yöntemdir. Enzim immobilizasyonunu etkinleştirebilmek için, destek materyalin yüzeyine kimyasal ya da fiziksel ön işlemler uygulamak gerekebilir. Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir destek materyalinin enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır.

Kovalent bağlama yöntemi, destek materyal üzerine enzimin kovalent olarak bağlanmasıdır. Enzim molekülleri destek materyaline amino, karboksil, hidroksil, sülfidril gibi amino asit yan zincirlerinden bağlanır. Kovalent bağlanmayı sağlayan gruplar aktif merkezdeki gruplar olmamalıdır. Aktif merkezden kovalent bağlanmayı önlemek için yaygın olarak kullanılan işlem, aktif merkezi yarışmalı inhibitör ile doyurmaktır. Destek materyal üzerindeki fonksiyonel gruplar genellikle aktive edilir. Aktivasyon işlemi için siyanojen bromür, karbodiimit ve glutaraldehit gibi kimyasal reaktifler kullanılır. Enzim moleküllerinin birbirine glutaraldehit, heksametilen diamin, heksametilen diazosiyanat, bisdiazobenzidin-2,2-disülfonik asit gibi çapraz bağlayıcılarla bağlanması da kovalent bağlamanın bir başka türüdür. Bu işlem sonrası enzimler birbirine çapraz bağlanarak çözünmez hale gelirler.

2.3.1.1. Lipaz

Yağların hidrolizini sağlayan lipaz, karboksilik ester hidrolazlar sınıfından bir enzimdir. Yağ asitlerinin gliserol veya başka alkollerle yapmış olduğu ester bağlarını hidrolize ederler [105,106]. Lipazın etki şekli spesifiktir. Tri, di ve monoglisidleri hidrolizlerler.

Lipazlar; hayvansal, bitkisel ve mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilebilirler. Memelilerde lipaz pankreas tarafından sentezlenir. Bitkisel lipazlar; hint yağı, gene otu gibi bitkilerin yağlı tohumlarında bulunur. Mikroorganizma kaynaklı lipazlar ise bakteri, maya ve mantarlardan elde edilebilir.

Lipaz, suda eriyen bir enzim olup yağların ancak yüzeyine tesir eder. Emülsifiye olmuş uzun zincirli triglisidler üzerinde aktiflik gösterirler. Lipazın aktivitesi için pH önemlidir. Çok yüksek sıcaklık, pH değerlerine ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılığa sahiptir. pH 9,0'da kararlı, pH<4,0 olduğunda ise parçalanabilir. Optimumu pH 8,0 olarak belirtilmiştir. Lipazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı ise 30–40°C dir. Hayvanlar ve bitkilerden elde edilen lipazlar, genellikle mikrobiyal kaynaklı lipazlara göre daha az ısı kararlılık gösterir [107].

Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayinde, çevresel atıkların bertarafında, kozmetik ve parfüm sanayinde uygulama alanları bulmaktadır.

Lipaz ayrıca deri endüstrisinde çevresel olarak uygun olmayan ve yüzey aktif maddeler içeren çözücülere alternatif olarak kullanılır. Derinin su geçirmeme özelliğini azaltan gres yağının ayrılmasını sağlar. Derideki bu enzimatik iyileşme araba camlarının ve diğer iç yüzeylerin sislenmesini azaltır. Çünkü sislenmeye araba içindeki deriden yayılan ve buharlaşabilen organik bileşikler ve kimyasallar neden olmaktadır [108].

Lipazların deterjan endüstrisinde en önemli uygulama alanı ev, sanayide çamaşır ve bulaşık yıkama deterjanlarına katılmalarıdır. Her sene tahmini olarak üretilen yaklaşık 13.000.000 ton deterjana 1000 ton lipaz katılmaktadır. Deterjana suyun eklenmesi ile birlikte deterjandaki lipaz, amilaz, selülaz ve proteaz enzimleri deterjandaki kimyasal bağların parçalanmasına katalizörlük yaparlar [109-111].

Kâğıt endüstrisinde; üretilen kâğıt hamurundan, trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini ayırmak için de lipaz kullanılır [110]. Parfümlerin ana içeriğini oluşturan sürfaktanlar ve aroma üretimindeki aktiviteleri nedeniyle kozmetik ve parfüm endüstrisinde de kullanılmaktadırlar [109].

Lipazlar; sindirim bozukluklarına ilişkin ilaçlarda etken madde olarak, atık suların arıtılmasında ve kirli boruların temizlenmesinde de kullanılırlar [107]..

2.3.1.2. Penisilin asilaz

Çok sayıda yarı sentetik antibiyotiğin üretiminde penisilin asilaz (PA) kullanılır. PA, benzil-penisilin (Pen G) veya fenoksimetil-penisilin (Pen V)'i hidroliz ederek yarı sentetik β -laktam antibiyotiklerinin üretiminde öncül olarak kullanılan 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretir. Penisilin asilaz (E.C 3.5.1.11) enzimi, dünyada en yaygın kullanılan immobilize enzimdir. Peptid sentezi ve kiral bileşiklerin rasemik karışımlarının ayrılması gibi yararlı biyodönüşümlerde de kullanılabilen penisilin asilaz endüstriyel olarak önemli rollere sahiptir [112].

2.3.2. Aminoasitler

Aminoasitler, proteinleri oluşturan temel yapı taşlarıdır. Bir aminoasit hem amin hem de karboksil fonksiyonel gruplar içeren bir moleküldür. Aminoasitlerin peptid bağlarıyla uç uca eklenmesiyle oluşturdukları kısa polimer zincirler peptid, uzun polimer zincirler ise polipeptid veya protein olarak adlandırılırlar. Bir polipeptid zincirdeki aminoasitler bir dehidrasyon tepkimesi sonucu oluşan peptid bağı ile birbirlerine bağlanırlar.

Hücre içerisinde ribozomlar, mRNA moleküllerini kalıp olarak kullanarak aminoasitleri uç uca ekleyerek proteinleri sentezlerler. Her proteinin kendisine has özelliklerinin olmasını sağlayan özel aminoasit dizilimleri vardır. Proteinlerin işlevlerinin çoğu, kendisini oluşturan aminoasitlerin özelliklerinin tayin edilmesiyle anlaşılabilir. Yan zincirlerin farklı kimyasal özellikleri proteinlerin üç boyutlu yapısını belirler ve dolayısıyla protein işlevine etki eder.

Polisakkaritler, nükleik asitler ve yağlar gibi biyolojik makromoleküllere benzer şekilde, proteinler de canlı organizmaların temel bileşenlerindedir ve hücrelerin içindeki her süreçte yer alırlar. Çoğu protein, biyokimyasal tepkimelerde katalizör işlevi olan enzimlerdir ve metabolizma için yaşamsal bir role sahiptir. İnsandan

virüse proteinlerin oluşumunda en çok kullanılan 20 çeşit aminoasit vardır. Proteinlerin yapısını oluşturan 20 çeşit aminoasit arasında 10 tanesi temel aminoasitler olarak adlandırılır. Bu aminoasitler insan vücudu tarafından ihtiyacı karşılayacak düzeyde sentezlenemedikleri için dışarıdan beslenme yoluyla alımları zorunludur [113].

2.3.2.1. Alanin

Alanin 2-aminopropanoik asit olarak adlandırılır. En sık kullanılan aminoasittir. Proteinlerin yaklaşık olarak %7,8'i alanin yapıtaşlarından oluşmaktadır. Alanin, moleküler yapısı en basit olan alifatik amino asitlerden biridir. Alaninin yapısında bulunan α -karbon atomu yan zincir olarak bir metil ($-\text{CH}_3$) grubuna bağlanmıştır. Alanindeki metil grubu kimyasal olarak oldukça inaktif olması nedeniyle protein fonksiyonunda ancak dolaylı olarak katkıda bulunabilir. Buna rağmen, özellikle karbon gibi apolar atomlarla hidrofobik bağlar yapabilmesi sebebiyle, alanin substrat tanınmasında ve enzim-substrat ilişkisinin özgül olmasında rol oynayabilmektedir. Hemen hemen tüm proteinler alanin içermektedirler. Dolayısıyla protein içeren et, süt, yumurta gibi genel besinler aynı zamanda zengin birer alanin kaynağıdır [114].

2.3.2.2. Lösin

Lösin DNA tarafından kodlanan 20 aminoasitten biridir. İzo lösin ve lösin birbirlerinin izomeridirler. Beslenme açısından lösin dışarıdan alınması gerekli olan bir aminoasittir. Lösin proteinlerin yapısında bulunan en yaygın aminoasittir. Bebeklerin ve çocukların optimal gelişimi ve yetişkinlerde nitrojen (azot) dengesi için gerekli bir besindir. Kaslarda proteinlerin sentezi ve yıkımında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Lösin içeren ana besin kaynakları tahıllar, baklagiller ve süt ürünleridir [115].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamındaki hidrojellerin sentezinde ana polimer olarak kullanılan kitosan, Acros Organics firmasından temin edilmiştir. Asetik asit, Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup kitosan çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır ve %100 saflıktadır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehit, Merck firmasından temin edilmiş olup %50 saflıktadır. *Porcine pancreas* lipaz enzimi, AppliChem firmasından, penisilin asilaz enzimi Gebze İleri Yüksek Teknoloji'den, alanin ve lösin aminoasitleri Gürcistan Teknik Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Ayrıca deneyler süresince, laboratuvar şartlarında üretilen deiyonize su kullanılmıştır.

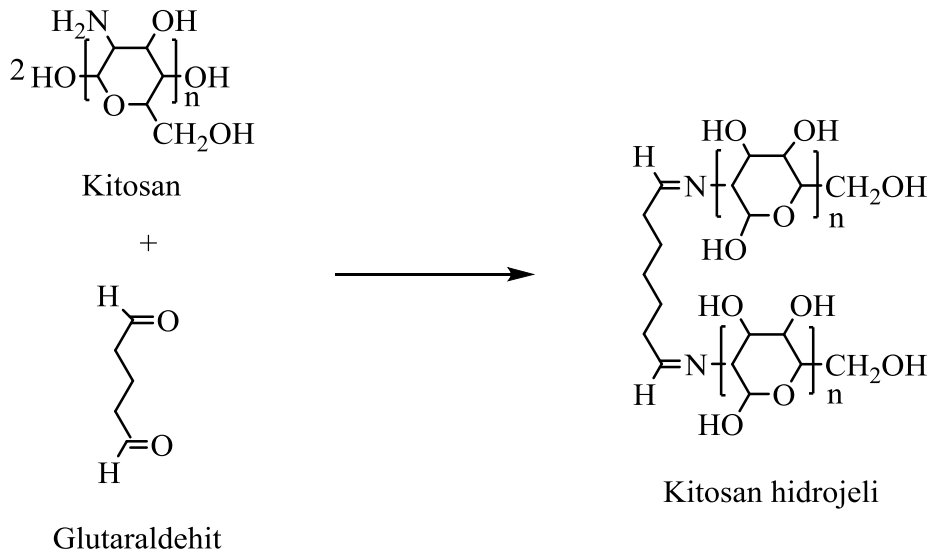
3.2. Ekipmanlar

- Hassas Terazı, Sartorius, ED224S
- Manyetik karıştırıcı, İKA *RCT classic
- Freeze-dryer, LABCONCO
- Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer
- Isıl gravimetrik analiz (TGA), EXSTAR SII TG/DTA 6300
- Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), EXSTAR SII DSC 7020
- X Işını Kırınımı (XRD), Rigaku D/MAX-Ultima+/PC
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM), XL30 ESEM-FEG/EDAX

3.3. Kitosan Bazlı Hidrojellerin Hazırlanması

3.3.1. Saf kitosan hidrojjellerinin sentezi

Kitosanın %5'lik çözeltisi, %2'lik seyreltik asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. Kitosan, glutaraldehit molar oranı 1:6 olacak şekilde %1'lik glutaraldehit çözeltisinin 8 mL'si kitosan çözeltisine ilave edilmiştir. Çözelti viskoz hale gelene kadar oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Çapraz bağlanmış kitosan hidrojjeli su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen aşırı reaktan sistemden uzaklaştırılmıştır. Hidrojel bir polistiren petri kabı içine dökülmüş ve gece boyunca oda sıcaklığında çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Yarı kuru haldeki hidrojjeller, freeze-dryer'da dondurularak kurutulmak suretiyle saf kitosan hidrojjel elde edilmiştir.

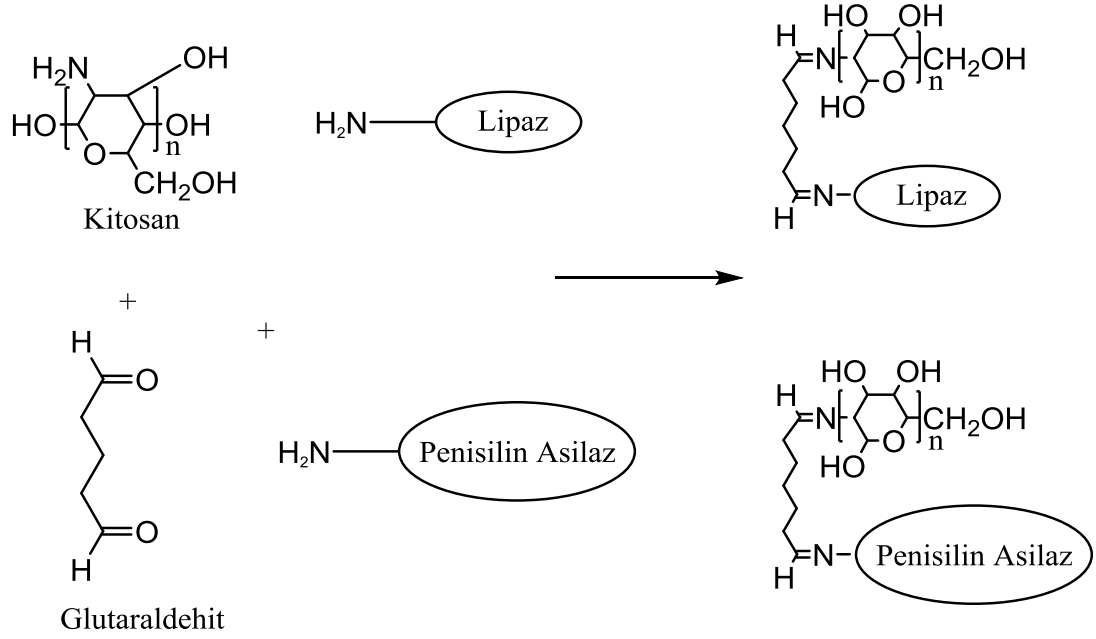


Şekil 3.1 : Kitosan hidrojjeli için reaksiyon mekanizması.

3.3.2. Kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojjellerinin sentezi

Aynı şekilde, kitosanın %5'lik çözeltisi %2'lik seyreltik asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. 0,02; 0,04 ve 0,1 gibi farklı miktarlarda lipaz ve 0,2; 0,6 ve 1,0 gibi farklı miktarlarda penisilin asilaz enzimleri kitosan çözeltisine ilave edilmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Kitosan glutaraldehit molar oranı 1:6 olacak şekilde, %1'lik glutaraldehit çözeltisi karışıma ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile 30 dakika boyunca karıştırılmıştır.

Çapraz bağlanmış kitosan&enzim hidrojelleri su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen aşırı reaktan sistemden uzaklaştırılmıştır. Hidrojeller bir polistiren petri kabına dökülmüş ve oda sıcaklığında gece boyunca çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Yarı kuru haldeki hidrojeller, freeze-dryer'da dondurularak kurutulmak suretiyle kitosan&enzim hidrojelleri elde edilmiştir. Reaksiyon mekanizmaları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



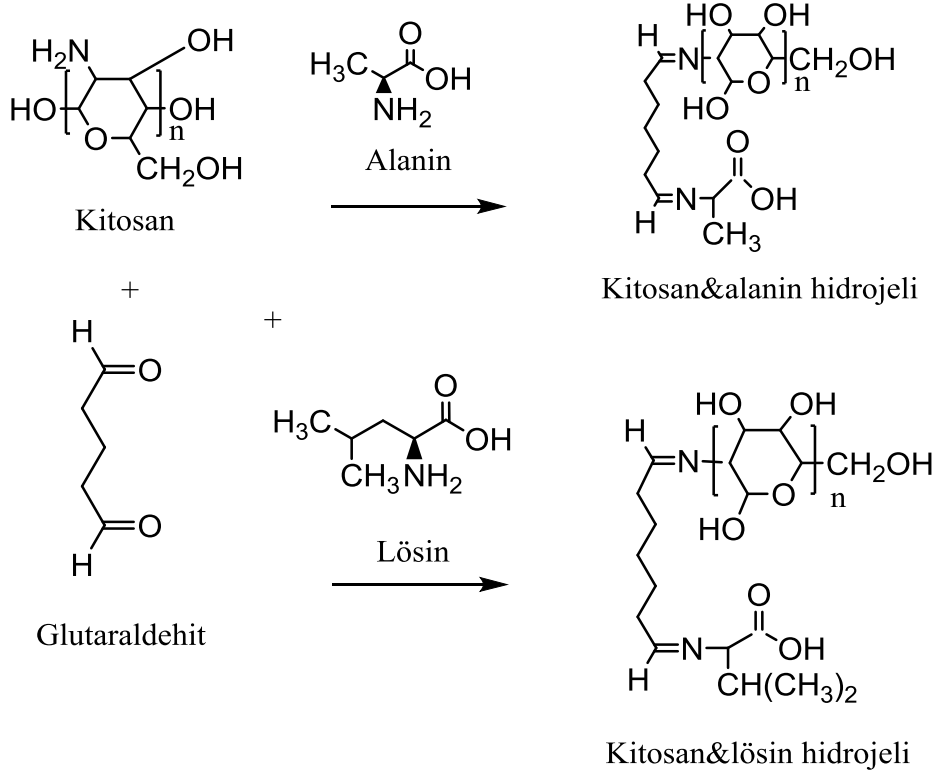
Şekil 3.2 : Kitosan&lipaz ve Kitosan&penisilin asilaz hidrojelleri için reaksiyon mekanizması.

Şekil 3.2'de gösterilen her iki mekanizmada, kitosan çözeltisine lipaz ve penisilin asilaz enzimleri ayrı ayrı eklenmiştir. Kitosan çözeltisi ile her iki enzim herhangi bir çapraz bağlanma olmadan sadece fiziksel adsorpsiyon ile birbirlerine zayıf bağlarla (Van Der Waals ve hidrojen bağları) bağlanmıştır. Sonrasında çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehit eklenerek çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehitin karboksil grupları kitosanın ve enzimlerin amin gruplarıyla schiff bazı reaksiyonuna göre etkileşmektedir.

3.3.3. Kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojellerinin sentezi

Aynı şekilde, kitosanın %5'lik çözeltisi %2'lik seyreltik asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. 0,2; 0,4 ve 1,0 gibi farklı miktarlarda alanin ve lösün aminoasitleri kitosan çözeltisine ilave edilmiş ve elde edilen karışım 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. %1'lik

glutaraldehit çözeltisi karışıma ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Kitosan&aminoasit hidrojenleri gerekli yıkama işlemlerinden sonra bir polistiren petri kabına dökülmüş ve oda sıcaklığında gece boyunca çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Sonrasında freeze-dryer'da dondurularak kurutulmuştur. Reaksiyon mekanizmaları Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 : Kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojenleri için reaksiyon mekanizması.

Şekil 3.3'teki mekanizmada, kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojenlerinde olduğu gibi kitosan çözeltisine alanin ve lösin aminoasitleri ayrı ayrı eklenerek kitosan ile aminoasitler arasında zayıf bağlar ile kurulmuştur. Sonrasında glutaraldehit eklenerek çapraz bağlanma gerçekleştirilmiş ve glutaraldehitin karboksil grupları ile kitosanın ve aminoasitlerin amin grupları arasında schiff bazı reaksiyonuna göre etkileşme sağlanmıştır.

3.4. Kitosan Bazlı Hidrojenlerin Karakterizasyonu

Hidrojenlerin kinetik şişme ölçümleri gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Öncelikle hidrojel numunelerinin hassas terazide kuru ağırlıkları alınmıştır. Her bir numune farklı pH ortamlarına (pH 2,0; pH 7,0 ve pH 11,0) bırakılmış ve 1 hafta boyunca şişme ortamlarından alınarak yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. Hidrojenler tarafından

absorplanan sıvı miktarı sabitleninceye kadar ölçümlere devam edilmiştir. Bu değerlerden yola çıkarak her bir numune için şişme %'si hidrojellerin kuru ağırlıkları temel alınarak Eş.3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şişme} = (m_t - m_0) : m_0 \times 100 \quad (3.1)$$

Eşitlikte; m_t , şişmiş hidrojel t anındaki ağırlığı, m_0 ise, hidrojel kuru ağırlığıdır.

Hidrojellerin kimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla FT-IR analizleri, kristal yapılarının belirlenmesi amacıyla da XRD analizleri yapılmıştır. Hidrojel numuneleri toz haline getirilerek disk üzerinde FT-IR spektrumları alınmıştır. Bütün FT-IR spektrumları $600-4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında incelenmiştir. XRD desenleri ise, $0-70^\circ$ aralığında izlenmiştir.

Hidrojellerin ısıl analizleri TGA ve DSC ile yapılmış ve hidrojel numunelerinin kütlelerinin, numunelerin sıcaklığına ve zamana göre değişimi kontrollü atmosfer altında ölçülmüştür. TGA analizleri $0-800^\circ\text{C}$, DSC analizleri ise $0-200^\circ\text{C}$ sıcaklık aralıklarında ve azot atmosferinde $10-20^\circ\text{C}/\text{da}$ ısıtma hızı ile gerçekleştirilmiştir.

Aynı zamanda yüzey/kesit özelliklerinin belirlenmesi amacıyla da SEM analizleri yapılmıştır. Bu analizlerle, hidrojellerin gözenek yapıları ve boyutları incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Karakterizasyonu

4.1.1. Enzimle modifiye edilmiş hidrojellerin şişme davranışlarının incelenmesi

4.1.1.1. Hidrojellerin şişme davranışlarına enzim miktarının etkisi

Lipaz ve penisilin asilaz enzimlerinin farklı miktarlarıyla hazırlanan kitosan&enzim hidrojellerinin şişme davranışı 25°C’de deiyonize su ve farklı pH’larda çözeltiler kullanılarak incelenmiş ve farklı enzim miktarlarının şişme oranına etkisi araştırılmıştır.

Saf ve enzimli hidrojellerin 7 gün boyunca yapılan şişme deneylerinde, ilk gün hidrojellerin şişme oranları dengeye gelmiş ve sonraki günlerde şişme oranlarında belli bir artış gözlenmemiştir. Tüm enzim yüklü hidrojellerin 1 gün içindeki denge şişme oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin bir gün içindeki şişme oranları.

Hidrojeller	Şişme Oranları (%)		
	pH 2,0	pH 7,0	pH 11,0
Saf kitosan hidrojel	2881	2724	613
0,02 g lipaz/1,0 g kitosan	3283	1815	1431
0,04 g lipaz/1,0 g kitosan	3600	2363	1865
0,1 g lipaz/1,0 g kitosan	3374	2668	1681
0,2 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan	1800	1917	1740
0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan	4883	3810	3091
1,0 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan	4100	3258	3500

Lipaz enziminin değişen miktarlarıyla hazırlanan kitosan&lipaz hidrojelleri incelendiğinde, pH 2,0'de 0,02 g lipaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin şişme oranı, %3238 iken, 0,04 g lipaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin şişme oranı, %3600 bulunmuştur. Böylelikle, enzim miktarı arttıkça şişme oranının da arttığı görülmüştür. Ancak enzim miktarı 0,1 g olan kitosan&lipaz hidrojelinin şişme oranı beklenene nazaran düşmüş ve %3374 olarak tespit edilmiştir. Bu durum, yüksek miktardaki enzim molekülleri ile polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonlarının yetersiz olduğu ve hidrojelin oluşum mekanizmasının tamamlanamaması şeklinde açıklanabilir. Ayrıca, çapraz bağlanma yüzdesinin yetersizliğinden dolayı, enzim molekülleri ile polimer zincirleri arasındaki zayıf etkileşimlerin de şişme oranının azalmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Lipaz enzimli hidrojeller için en yüksek şişme oranının 0,04 g lipaz/1,0 g kitosan hidrojeline ait olduğu ve pH 2,0'de en iyi sonucu verdiği saptanmıştır.

Aynı durum penisilin asilaz enziminin değişen miktarlarıyla hazırlanan kitosan hidrojelleri için de geçerlidir. Aynı pH değerinde; 0,2 g penisilin asilaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin şişme oranı, %1800 iken, 0,6 g penisilin asilaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin şişme oranı, %4883 olarak bulunmuştur. 1,0 g enzim miktarı ile çalışıldığında yine şişme oranında bir düşüş gözlenmiş ve bu değer %4100 olarak saptanmıştır. Bu durumun, yüksek miktardaki enzim molekülleri ile polimer zincirleri arasındaki yetersiz çapraz bağlanmaya ve enzim molekülleri ve polimer zincirleri arasındaki zayıf etkileşimlerden dolayı şişme oranında düşüşe neden olduğu düşünülmektedir.

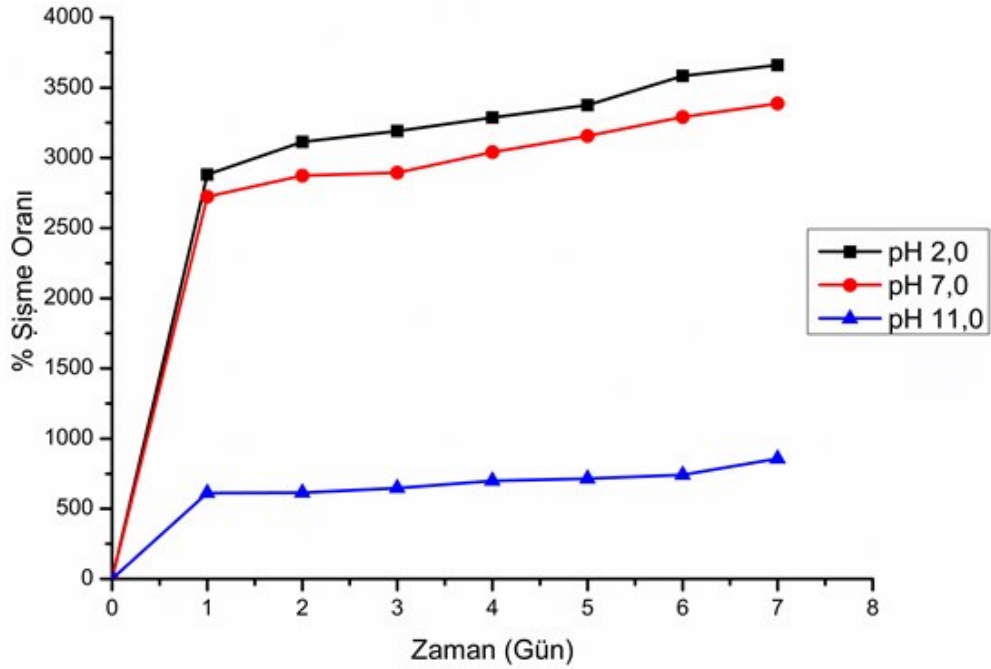
Penisilin asilaz enzimli hidrojeller için, pH 2,0'de en yüksek şişme oranının 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan hidrojeline ait olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1'e genel olarak bakıldığında, düşük pH değerlerinde, 0,6 g penisilaz asilaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojellerin, 0,04 g lipaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojellerden daha yüksek bir şişme oranı sergilediği görülmektedir.

Bundan sonraki karakterizasyon çalışmaları, enzim içeriği deneylerle optimize edilmiş olarak 0,04 g lipaz/1,0 g kitosan ve 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan hidrojelleri için incelenmiştir.

4.1.1.2. Enzimli hidrojellerin şişme davranışlarına pH'ın etkisi

Enzim ile modifiye edilmiş kitosan hidrojellerinin şişme davranışına pH'ın etkisi incelenirken, saf kitosan hidrojeli ile karşılaştırmalı bir çalışma uygulanmıştır. Bu anlamda saf kitosan hidrojelinin değişen pH çözeltilerindeki şişme davranışı incelenmiş ve 7 gün boyunca yapılan deney sonuçları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 : Saf kitosan hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.

Şekil 4.1'de, saf kitosan hidrojellerinin şişme oranlarının asidik ve nötr çözeltilerde yaklaşık aynı değerlere sahip olduğu ve düşük pH değerlerinde ise kitosanın amino gruplarının protonlanmasına bağlı olarak, şişme oranının bazik çözeltilerden daha yüksek olduğu görülmüştür. pH arttıkça, amino gruplarının deprotonasyonu ile yüksek pH değerinde kitosan hidrojelinin hidrofobik karakter kazanmasıyla şişme oranı azalmıştır. Düşük pH'ta kitosan hidrojelinin en yüksek şişme davranışı gösterdiği saptanmıştır. Düşük pH'ta kitosanın amino gruplarının protonlanması ve polimer zincirleri içinde bu grupların birbirini itmesi ile polimer zincirleri içindeki daralma meydana geldiği öngörülmüştür.

Saf kitosan hidrojellerinin 1. günde şişme oranları pH 2,0; pH 7,0 ve pH 11,0'de sırasıyla; 2881, 2724 ve 613 olarak; 2. günde ise, aynı pH değerleri için; 3115, 2874 ve 615 olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre, 1. günün sonrasında şişme oranlarının

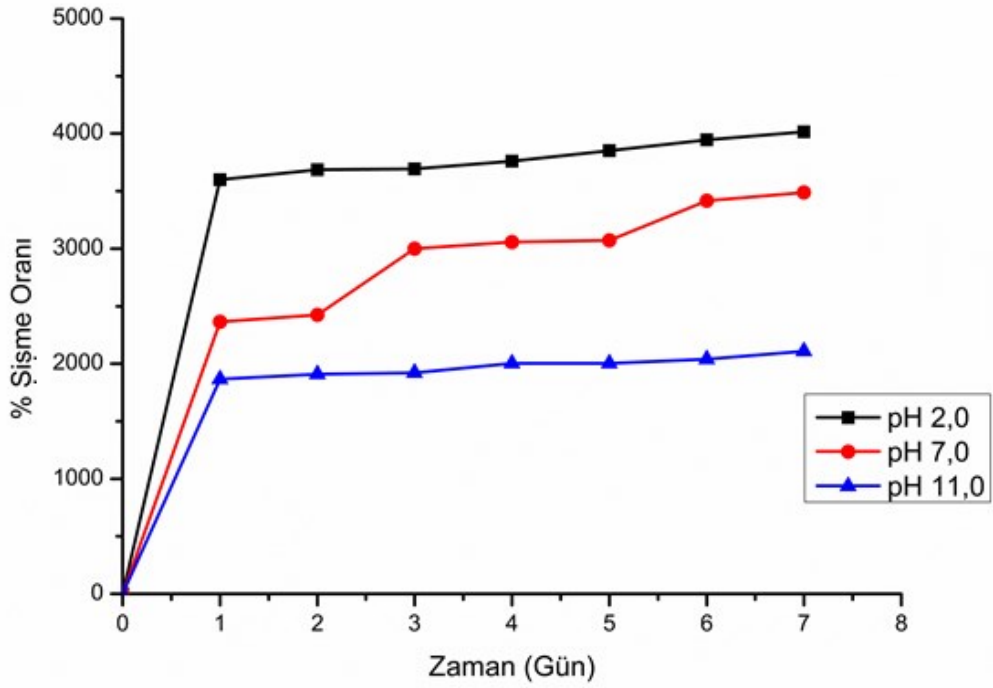
çok fazla değişmediği gözlenmiş ve denge değerinin sabitlendiği noktaya yaklaşıldığı sonucuna varılmıştır.

Literatürdeki diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, kitosan bazlı farklı hidrojenlerin şişme oranlarının değişen pH aralıklarında incelendiği görülmüştür. Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan hidrojenleri ile yapılan bir çalışmada, hidrojenlerin denge şişme oranları 25°C’de pH 2,0; pH 7,0 ve pH 11,0 değerlerindeki çözeltilerde sırasıyla; %125, %75 ve %50 olarak bulunmuş ve hidrojenlerin denge şişme oranları karşılaştırıldığında, asidik pH’teki şişme davranışlarınınun bazik pH’a göre daha iyi olduğu görülmüştür [116].

Yapılan diğer bir çalışmada kitosan-poliakrilamid hidrojenleri sentezlenmiş ve hidrojenlerin pH 2,0; pH 7,0 ve pH 9,0 değerlerindeki çözeltilerdeki denge şişme oranları sırasıyla; %350, %275 ve %200 olduğu saptanmıştır [117].

Literatüre kıyasla, kitosan bazlı hidrojenlerin tüm pH ortamlarında çok yüksek şişme oranlarına ulaştığı yapılan şişme deneylerinde görülmüştür.

0,04 g lipaz/1,0 g kitosan hidrojenine ait şişme davranışı Şekil 4.2’de gösterilmiştir. 7 gün boyunca sürdürülen şişme deneylerinde, 0,04 g lipaz miktarıyla hazırlanan kitosan hidrojenlerinin değişen pH’larda çözeltiler içindeki şişme oranları, ilk 24 saatlik periyotta yaklaşık olarak sabit kaldığı görülmüştür. Dolayısıyla, tüm lipaz yüklü hidrojenlerin 1 gün içinde dengeye geldiği söylenebilir.

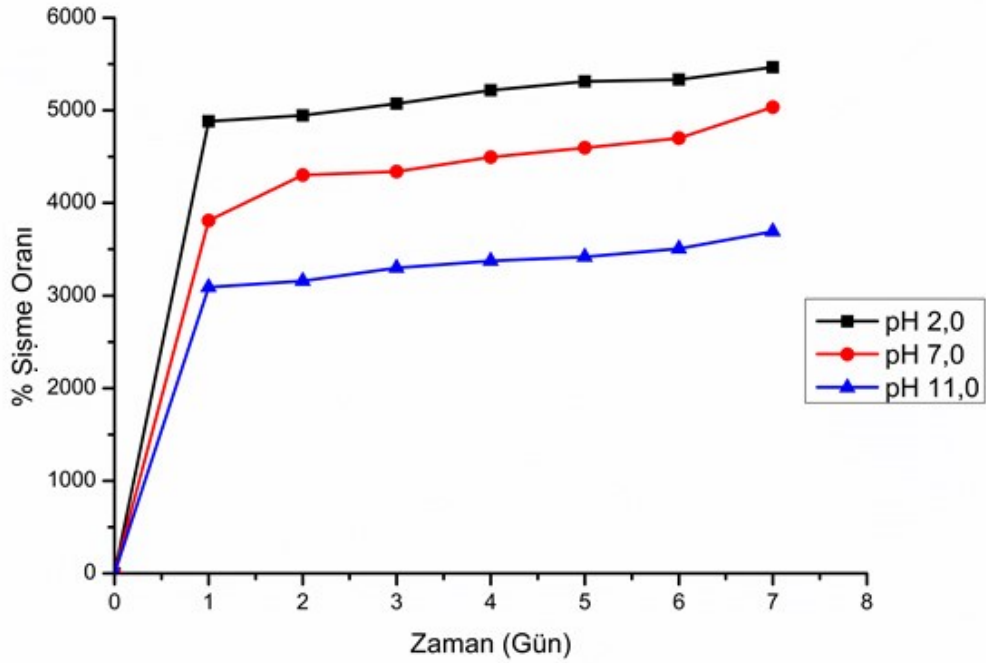


Şekil 4.2 : 0,04 g lipaz içeren kitosan&lipaz hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.

Şekil 4.2’de, 0,04 g lipaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin pH 2,0; pH 7,0 ve pH 11,0’deki şişme oranları sırasıyla, %3600, %2363 ve %1865 olarak bulunmuştur. Şişme deneylerinde, 0,04 g lipaz/1,0 g kitosan hidrojelinin düşük pH’ta maksimum şişme gösterdiği ve pH artıkça yüzde şişme oranlarının azaldığı saptanmıştır.

Lipaz enziminin pH’ın 4,0’dan daha düşük olduğu ortamlarda parçalanabilir olmasından ve enzimin parçalanması ile düşük pH değerlerindeki şişme çözeltisi içine geri difüze olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir. Hidrojelden ayrılan enzim ile hidrojel moleküler yapısında çoklu porların oluşması mümkündür. Meydana gelen bu çoklu por yapılar ile hidrojel su tutma kapasitesinde belirgin bir artış izlendiği öngörülmektedir.

0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan hidrojeline ait şişme davranışı ise, Şekil 4.3’te gösterilmiştir. Şişme deneyleri 7 gün boyunca sürdürülmüş ve 0,6 g penisilin asilaz ile hazırlanan kitosan hidrojelinin değişen pH değerlerindeki çözeltilerdeki yüzde şişme oranlarının 1 günlük şişme süresinden sonra yaklaşık olarak sabit kaldığı görülmüştür.



Şekil 4.3 : 0,6 g penisilin asilaz içeren kitosan&penisilin asilaz hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.

Şekil 4.3'te, 0,6 g penisilin asilaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin pH 2,0; pH 7,0 ve pH 11,0'deki şişme oranları sırasıyla; %4883, %3810 ve %3091 olarak bulunmuştur. Düşük pH'ta maksimum şişme gösteren 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan hidrojelinin pH arttıkça şişme oranının azaldığı görülmektedir.

0,04 g lipaz/1,0 g kitosan ve 0,6 penisilin asilaz/1,0 g kitosan hidrojellerinin denge şişme %'leri saf kitosan hidrojeli ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin denge şişme yüzdeleri.

Hidrojeller	Denge Şişme Yüzdesi (%S)		
	pH 2,0	pH 7,0	pH 11,0
Saf kitosan hidrojel	3661	3386	856
Kitosan&lipaz hidrojel (0,04 g lipaz/1,0g kitosan)	4014	3489	2109
Kitosan&penisilin asilaz hidrojel (0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan)	5466	5035	3691

Çizelge 4.2'ye göre, tüm enzimli hidrojeller için düşük pH değerlerinde maksimum şişme oranları gözlenmiş, pH arttıkça şişme %'lerinin azaldığı saptanmıştır. Tüm hidrojellerin düşük pH'ta en iyi şişme %'ne sahip olduğu görülmektedir. Tüm hidrojellerin pH 2,0'deki şişme %'leri sırasıyla; %3661, %4014 ve %5466 olarak saptanmıştır. Bu durumda, pH 2,0'de en iyi şişme %'nin 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan hidrojeline ait olduğu görülmekte 0,6 g penisilin asilaz enzimi ile hazırlanan kitosan hidrojelinin diğer pH çözeltilerinde de aynı yüksek orana sahip olduğu açıkça görülmüştür.

4.1.2. Aminoasitle modifiye edilmiş hidrojellerin şişme davranışlarının incelenmesi

4.1.2.1. Hidrojellerin şişme davranışlarına aminoasit miktarının etkisi

Alanin ve lösin aminoasitlerinin farklı miktarlarıyla hazırlanan kitosan hidrojellerinin şişme davranışı 25°C'de deiyonize su ve farklı pH'larda çözeltiler kullanılarak incelenmiştir. 0,2 aminoasit/1,0 g kitosan, 0,4 aminoasit/1,0 g kitosan ve 1,0 g aminoasit/1,0 g kitosan miktarlarıyla çalışılmış ve farklı aminoasit miktarlarının şişme oranına etkisi araştırılmıştır.

Tüm aminoasit yüklü hidrojellerin iki gün içindeki şişme oranları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3: Aminoasitli hidrojellerin iki gün içindeki denge şişme oranları.

	Şişme oranı (%)			Şişme oranı (%)			Şişme oranı (%)		
	0,2 g alanin/1,0 g			0,4 g alanin/1,0 g			1,0 g alanin/1,0 g		
	kitosan			kitosan			kitosan		
pH	2,0	7,0	11,0	2,0	7,0	11,0	2,0	7,0	11,0
1. gün	7188	1767	1370	4350	3870	356	13316	25940	985
2. gün	7683	1863	1468	8990	6844	993	13718	25960	1051

	Şişme oranı (%)			Şişme oranı (%)			Şişme oranı (%)		
	0,2 g lösin/1,0 g			0,4 g lösin/1,0 g			1,0 g lösin/1,0 g		
	kitosan			kitosan			kitosan		
pH	2,0	7,0	11,0	2,0	7,0	11,0	2,0	7,0	11,0
1. gün	206	1621	969	3470	2900	420	6153	4858	688
2. gün	3187	1853	1207	6232	5086	729	7846	6049	898

Çizelge 4.3'ten görüldüğü gibi, tüm hidrojellerin 2 gün boyunca izlenen şişme oranlarının pH arttıkça azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, hidrojellerin şişme süresi arttıkça, hidrojellerin şişme oranında da artış görülmüştür. Tüm hidrojeller, kitosan zincirleri içindeki amino grupları arasındaki hidrojen bağlarının birleşmesi ve ayrışmasına bağlı olarak zamana duyarlı bir şişme davranışı gösterdiği düşünülmektedir. Tüm hidrojeller düşük pH'ta maksimum şişme göstermiştir. pH 2,0'de 2 gün boyunca yapılan şişme deneylerinde, 1,0 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojelleri maksimum şişme özelliği gösterirken, 0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan ve 0,2 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren kitosan&alanin ve kitosan&lösin içeren hidrojellerin takip ettiği görülmüştür.

1,0 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren hidrojeller için iki gün içinde en yüksek şişme oranı bulunmasına rağmen, iki gün sonrasında hidrojellerin suda parçalara ayrılarak gevşek ve kararsız bir yapı oluşturdukları tespit edilmiştir. Bu durum yüksek miktardaki aminoasit molekülleri ile polimer zincirlerinin çapraz reaksiyonunun yetersiz olduğu fikri ile açıklanabilir. Ayrıca bu çapraz bağlanma miktarının düşük olması, kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojellerinin mekanik olarak çok zayıf hale gelmesinden ve polimer zincirleri arasındaki zayıf etkileşimlerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. 1,0 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren her iki kitosan&aminoasit hidrojellerin şişme oranlarında pH 7,0'a kadar önemli bir

değişiklik olmadığı ancak şişme oranlarının pH 7,0'nin üstünde büyük ölçüde azaldığı görülmüştür.

Bu durum, düşük pH'ta kitosan&aminoasit hidrojenlerinin amino gruplarının protonlanması ve polimer zincirleri içindeki bu protonlanmış grupların birbirini itmesi şeklinde açıklanmıştır. pH arttıkça, aynı amino grupları deprotone olmuş ve polimer zincirleri içindeki itme azalmıştır.

Aminoasitler gibi yüksek su tutma kapasitesili jel oluşumunu sağlayan yapıların hidrojel içersindeki bulunma miktarlarının artırılması ile şişme değerlerinin önce arttığı daha sonra düştüğü diğer çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun sebebi, aminoasit miktarının yüksek değerlere artmasının, iyonlaşmayı zorlaştırması ve giderek hidrofobik etkilerin baskın hale gelmesi olarak öngörülmüştür.

Kullanılan az miktarlardaki aminoasitin ise iyonlaşması kolay olduğundan yapı hidrofilik bir karakter alırken, yapıya yüksek miktardaki aminoasitten kaynaklı karboksilik asit gruplarının iyonlaşması, elektrostatik kuvvetlerin azalması dolayısıyla zorlaşmakta ve yapı hidrofobik bir karakter kazanmaktadır. Bu nedenle makromoleküler zincirde gevşemeler azalmakta böylelikle şişme değerlerinde azalma kaydedilmektedir .

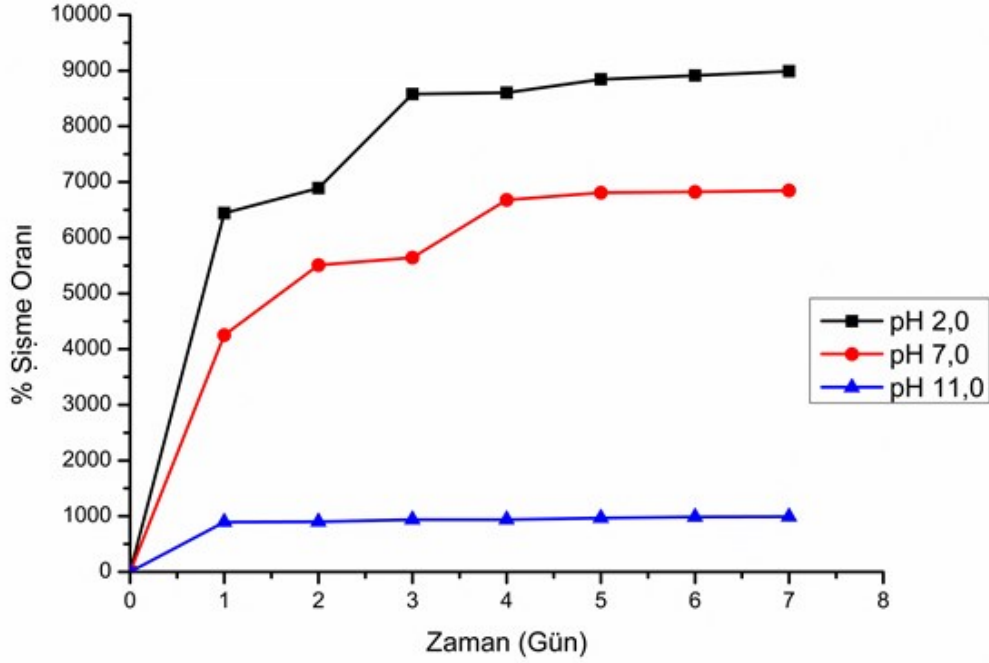
0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan ile hazırlanan kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojenlerinin 2 gün içinde denge şişme oranında belirgin bir artış göstermesine karşın, 0,2 g aminoasit ile hazırlanan hidrojenlerin şişme oranlarında belirgin bir artış saptanmamıştır. Jelleşme oranlarının düşmesi, yapıda beklenenden daha az aminoasitin yer almasından kaynaklıdır ve bu nedenle şişme değerlerinde de beklenen artışlar gözlenememiştir. Aminoasit miktarının düşük olması, yapının hidrofilik karakteri ile hidrofobik karakteri arasında bir denge oluşturmuş ve bu da hidrojenin beklenen şişme değerini göstermemesine neden olmuştur.

Bundan sonraki karakterizasyon çalışmaları, aminoasit içeriği deneylerle optimize edilmiş olarak 0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan hidrojenleri için incelenmiştir.

4.1.2.2. Aminoasitli hidrojenlerin şişme davranışlarına pH'ın etkisi

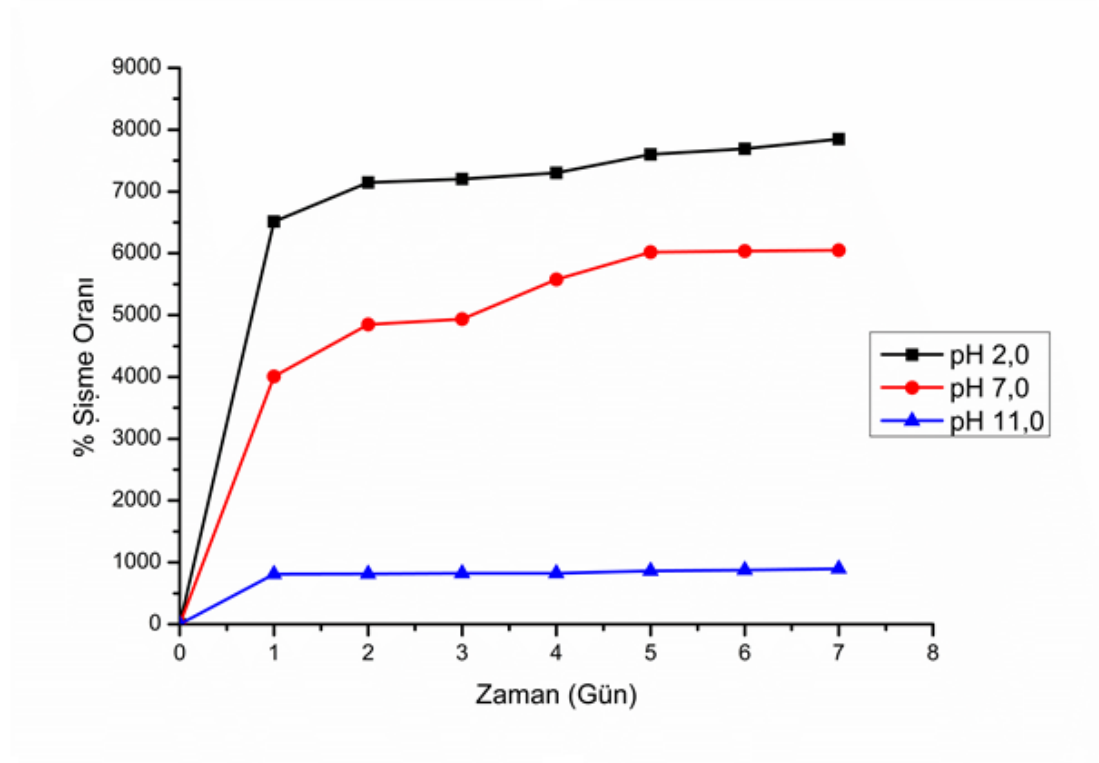
Kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojenlerinin şişme davranışına pH'ın etkisi incelenirken, saf kitosan hidrojenli ile karşılaştırmalı bir çalışma uygulanmıştır.

0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren aminoasitle hazırlanan kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojellerinin şişme davranışı Şekil 4.4'te ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 : 0,4 g alanin içeren kitosan&alanin hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.

Her iki şekilde, şişme belirli bir seviyeye kadar zamanla artmış, sonrasında şişme ve büzülme arasındaki denge seviyesinde stabil kaldığı izlenmiştir. Asidik ortam içinde kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojelleri daha yüksek şişme değerlerine sahiptir. Ağ yapılarının olası bozulması ile bu durumun ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan, alkali ve nötr pH'larda hidrojellerin şişme davranışının belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.5 : 0,4 g lösün içeren kitosan&lösine hidrojelinin farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışı.

Şekil 4.5'te, kitosan&lösine hidrojelinin, kitosan&alanin hidrojelinden daha az şişme davranışı gösterdiği görülmüştür. Bu durumun alanin ve lösünün kimyasal yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Lösün, yapısındaki alifatik izobutil yan zinciri nedeniyle hidrofobik bir amino asit olarak sınıflandırılır. Alanin ise yapısındaki α -karbon atomu ile reaktif olmayan bir metil grubuna sahiptir. Lösünün yapısındaki metil gruplarının varlığı nedeniyle, alaninden daha fazla sterik etki gösterir. Bu nedenle, sterik etkiden dolayı alanindeki metil gruplarının kolaylıkla hidrojel sistemine nüfus ettiği sonucuna varılmıştır.

0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan içeren kitosan&alanin ve kitosan&lösine hidrojellerinin değişen pH değerlerindeki çözeltiler içindeki denge şişme miktarları saf kitosan hidrojeli ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Hidrojeller pH 2,0; pH 7,0 ve pH 11,0 değerlerindeki çözeltilerinde 25°C'de maksimum şişme gösterecek şekilde şişme davranışlarının incelenmesi amacıyla 7 gün boyunca izlenmiş ve denge halindeki şişme değerleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4 : Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin denge şişme yüzdeleri.

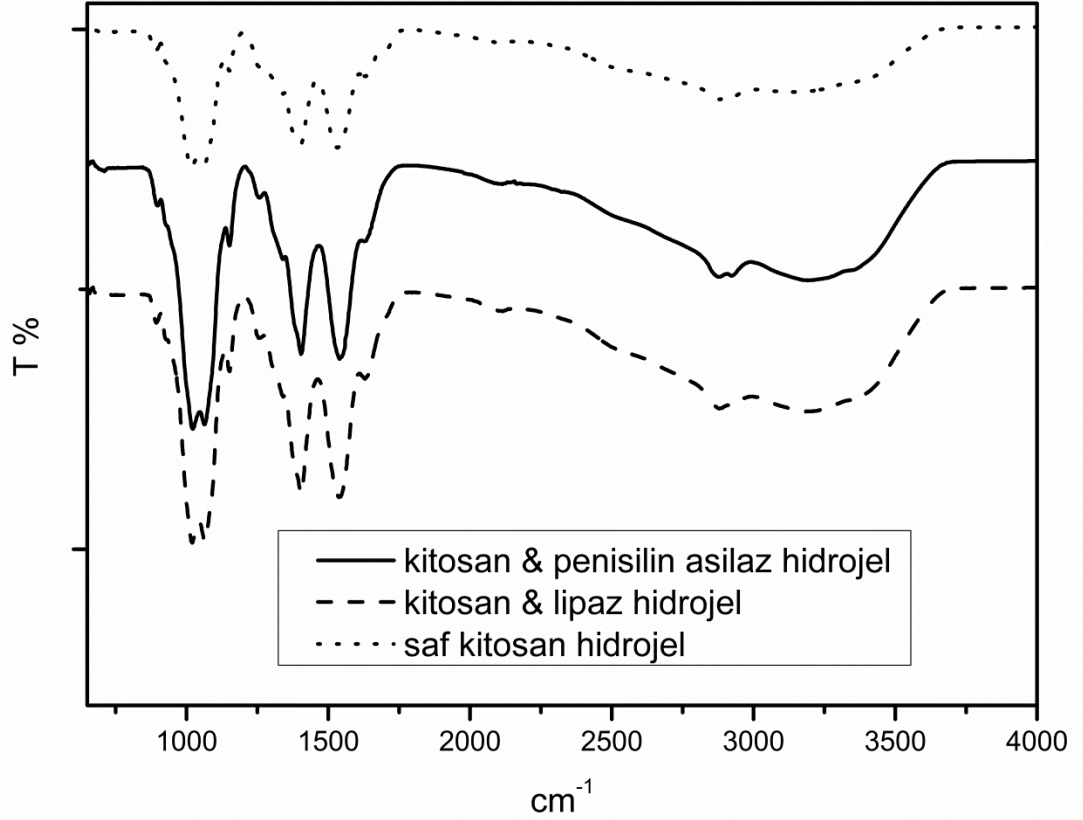
Hidrojeller	Denge Şişme Yüzdesi (%S)		
	pH 2,0	pH 7,0	pH 11,0
Saf kitosan hidrojel	3661	3386	856
Kitosan&alanin hidrojel (0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan)	8990	6844	993
Kitosan&lösün hidrojel (0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan)	7846	6049	898

Çizelge 4.4'ten görüldüğü gibi, tüm hidrojeller düşük pH'ta maksimum şişme göstermiş ve pH arttıkça denge şişme yüzdesinde belirgin bir azalma saptanmıştır. pH 2,0 değerindeki çözeltide, 0,4 g aminoasit içeren kitosan&alanin hidrojeli için elde edilebilir maksimum şişmenin %8990; 0,4 g aminoasit içeren kitosan&lösün hidrojeli için %7846 ve saf kitosan hidrojeli için ise %3661 olduğu tespit edilmiştir. 7 gün boyunca yapılan şişme davranışı deneylerinde, bütün pH değerleri için 0,4 g aminoasit ile hazırlanan kitosan&alanin hidrojeli, saf kitosan hidrojeline ve 0,4 g aminoasit ile hazırlanan kitosan&lösün hidrojeline göre daha fazla şişme göstermiştir. Bu durumun aminoasitlerin yapısal farklılıklarından kaynaklı olduğu öngörülmüştür.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, saf kitosan hidrojeline oranla enzim ve aminoasitlerle modifiye edilmiş olan hidrojellerin şişme oranlarında belirgin bir artış oluşturulduğu saptanmıştır. Bilindiği gibi, bir jelin hidrojel olabilmesi için yapısında -OH, -NH₂, -COOH, -COOR vb. gibi polar ve hidrofilik fonksiyonel grupları içermesi gerekmektedir [118,119]. Bu gruplar su ile etkileşerek hidrojen bağlarını oluşturmaktadır. Bağlı duruma geçen su ile çevrilen hidrofilik gruplardan dolayı jelin hacmi ve kütlesi artmakta ve jel şişmeye başlamaktadır. Bir jeldeki hidrofilik grupların fazlalığı şişmeyi daha da arttırmaktadır [120]. Dolayısıyla kitosan bazlı hidrojellerin içine enzim ve aminoasit molekülerinin katılması ile hidrojellerin yapısındaki -NH₂, -COOH gruplarının sayısı arttığından hidrojellerin şişme miktarları belirgin şekilde artmıştır.

4.2. Enzim Ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Yapısal Analizi

0,04 g lipaz/1,0 g kitosan içeren kitosan&lipaz ve 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan içeren kitosan&penisilin asilaz hidrojellerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 : Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin FT-IR spektrumları.

Saf kitosan hidrojelinin spektumunda, yaklaşık olarak 3400 cm⁻¹'de hidroksil gruplarının -OH gerilme titreşimlerine ait bir absorpsiyon piki ve 2800 cm⁻¹'de kitosanın C-H bağlarının asimetrik gerilmesine ait bir absorpsiyon piki görülmüştür. -C=O gerilme grubu ve glutaraldehit moleküllerinin deformasyon eğilmesi nedeniyle 1630 cm⁻¹ ve 1580 cm⁻¹'de iki absorpsiyon piki izlenmiştir. 1080 cm⁻¹'deki geniş pik C-O gerilme titreşimini ifade etmektedir.

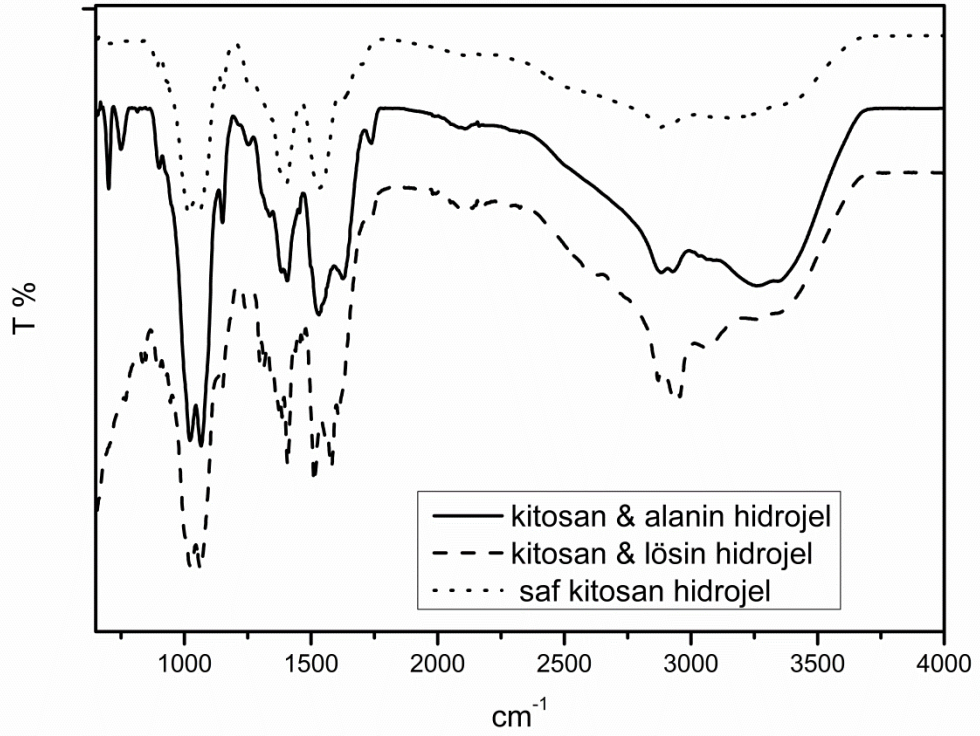
Enzim ile modifiye edilmiş hidrojellerin FT-IR analizi sonuçlarından elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde, her iki enzimle de modifiye edilen hidrojeller için en belirgin olarak 1000 cm⁻¹ piklerinin C-N bağlarına, 1400 cm⁻¹'deki pikin C-H

bağına, 1550 cm^{-1} ve yaklaşık olarak 1600 cm^{-1} 'deki piklerinin ise sırasıyla; enzimlerin N–H (amid II) ve –C=O (amid I) bağlarına ait olduğu görülmüştür. Spektrumda son olarak en belirgin şekilde ortaya çıkan 2900 cm^{-1} piki C–H grubunun asimetrik esnemesinden ileri gelmektedir.

Lipaz enzimi ile yapılan literatür çalışmasında; lipaz enziminin etilendiamin ve glutaraldehit ile fonksiyonlandırılmış gözenekli aktif karbona immobilizasyonunda, lipazın FT-IR spektrumunda, 629 cm^{-1} frekansında amid I bağı ve 3431 cm^{-1} frekansında ise ikincil amin bağı gözenekli aktif karbon FT-IR spektrumunda, 1628,57 cm^{-1} frekansında immobilize enzimin amid I bağı görülmüştür. Keton ve aldehit gruplarının 1700 cm^{-1} frekansındaki C–O gerilme titreşimlerine ait olan pikin fonksiyonlaştırmış gözenekli aktif karbonun aldehit grubuyla enzimin NH_2 grubunun bağlanmasından dolayı maskelendiği sonucuna varılmıştır. İkincil aminin N-H gerilme titreşimine ait pik 3382 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Düşük frekans bölgesine amid I ve ikincil amin bağının kayması aktif karbon üzerine lipazın fiziksel adsorpsiyon ve ardından kovalent bağlanma ile tutunmasının bir sonucu olarak açıklanmıştır [121].

Penisilin asilaz ile yapılan bir çalışmada ise; penisilin asilaz ile immobilize edilmiş polivinil klorür membranların FT-IR spektrumunda, enzim immobilizasyonu ile enzim içindeki NH_2 gruplarının artmasıyla 3392 cm^{-1} 'de geniş bir pik verdiği ve glutaraldehitin –C=O gruplarının NH_2 gruplarıyla reaksiyonundan ile 1720 cm^{-1} 'de yoğunluğun azaldığı görülmüştür. Bu durum immobilizasyonun başarı ile gerçekleştiği şeklinde açıklanmıştır [122].

Benzer şekilde, saf kitosanın, 0,4 g aminoasit içeren kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojellerinin FT-IR spektrumu Şekil 4.7'de verilmiştir.



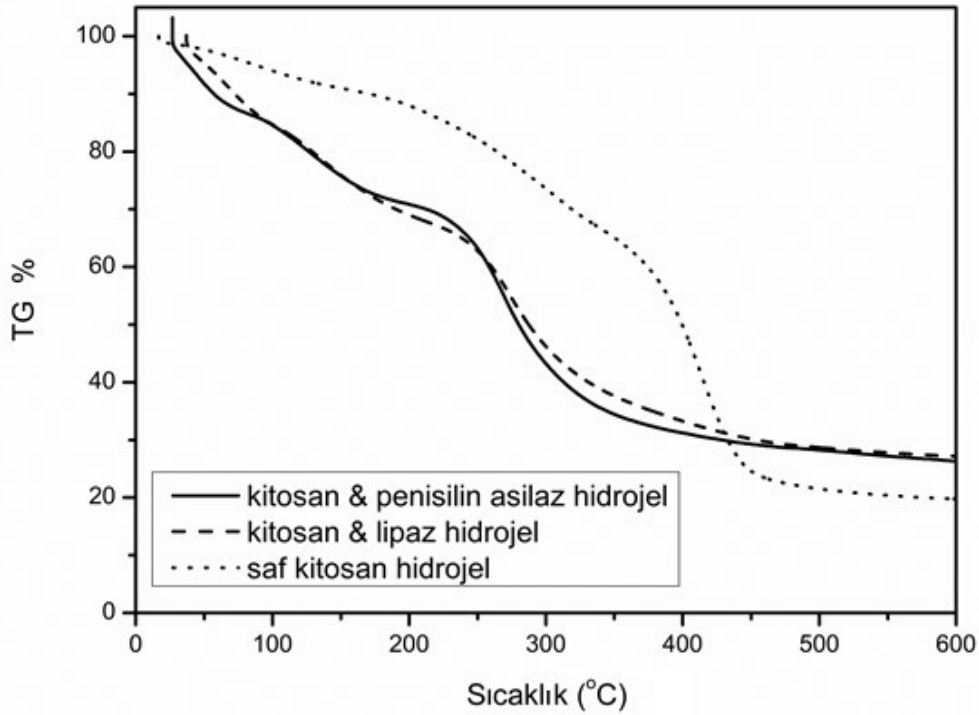
Şekil 4.7 : Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojelilerin FT-IR spektrumları.

Kitosan&alanin hidrojelinin spektrumunda, 2927 cm^{-1} 'de ve kitosan&lösin hidrojelinin spektrumunda ise, 2957 cm^{-1} 'de C-H grubunun asimetrik esnemesinden kaynaklanan geniş bir bant görülmüştür. Her iki aminoasit molekülü için 1630 cm^{-1} ve 1580 cm^{-1} 'de iki bant gözlenmiş ve tüm bu bantlar -C=O gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir. Alanin ve lösin moleküllerinde, 1300 cm^{-1} ve 1200 cm^{-1} frekans aralığında, 1164 cm^{-1} , 1247 cm^{-1} ve 1271 cm^{-1} ve 1288 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla C-O ve C-O-H eğilme titreşimlerini temsil etmektedir. Her iki aminoasit molekülünde, yaklaşık olarak 1124 cm^{-1} 'de C-N gruplarının esnemesinden kaynaklanan tek bir pik görülmüştür.

Alanin ile yapılan literatür çalışmasında; çinko tiyoüre sülfat kristaline alanin katıldığında, saf kristalde N-H, C=S ve N-C-N gerilme titreşimleri görülmüş, alanin katkılı çinko tiyo üre sülfat kristali ile karşılaştırıldığında, karakteristik titreşim frekanslarının kaydığı görülmüştür. Böylelikle, kristal içinde alanin katkısı teyit edilmiştir [123].

4.3. Enzim ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Isıl Analizi

0,04 g lipaz/1,0 g kitosan içeren kitosan&lipaz ve 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan içeren kitosan&penisilin asilaz hidrojellerine ait TGA termogramları Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: Saf kitosan hidrojeli ve enzimli hidrojellerin TGA termogramları.

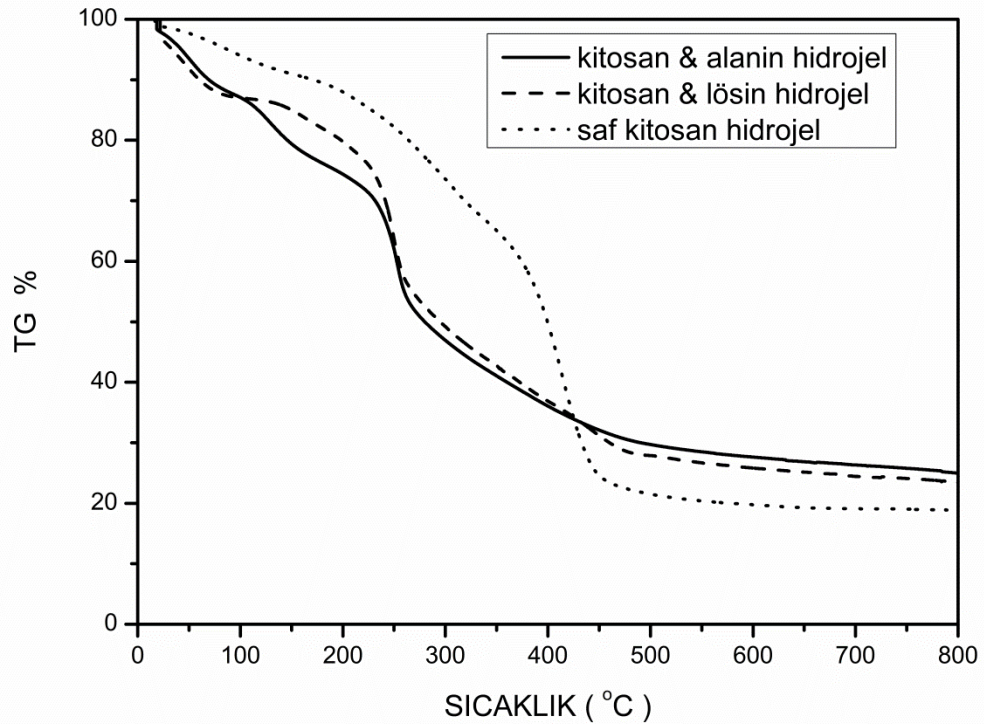
Şekil 4.8’deki TGA termogramlarına göre, her iki enzimin kullanılması ile elde edilen hidrojellerin başlangıç ısıl bozunma sıcaklıklarında ve ağırlıklarının %50’sini kaybettikleri sıcaklıklarında saf hidrojele göre belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Enzim ile modifiye edilen hidrojellerin ağırlıklarının %50’sini kaybettikleri sıcaklık değerleri her iki enzimli hidrojel için yaklaşık olarak 280°C iken, saf kitosan hidrojelinde bu değer yaklaşık 400°C’dir. Bu durum hidrojellere katılan enzimin protein yapısının ısıl işlemler esnasında denatüre olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla kullanılan enzimlerin kitosan polimerinin bozunma hızını arttırdığı söylenebilir. Enzimlerin bu etkisinden dolayı da, yaklaşık olarak 430°C’den sonra enzimli hidrojelerde herhangi bir ağırlık kaybının olmadığı ancak saf kitosan

hidrojelinin hala bozunmaya devam ettiği ve enzimli hidrojellerin kalıntı miktarının saf kitosan hidrojeline göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Lipaz enzimi ile yapılan literatür çalışmasında; lipaz immobilize edilmiş amorf zirkonyum fosfatın TGA termogramında, 30°C ve 100°C sıcaklık aralığında suyun ve lipazın organik yapısının ortadan kalkması nedeniyle maksimum ağırlık kaybının %22 olduğu bulunmuştur [124].

Penisilin asilaz enzimi ile yapılan bir çalışmada ise; polivinil klorür membranların TGA termogramlarında, 2 bozunma adımı bulunmuştur. İlk bozunmanın 374°C'de C-Cl bağının, ikinci bozunmanın ise; 591°C'de etilen bağının kopmasından kaynaklandığı görülmüştür. Penisilin asilaz immobilize edilmiş polivinil klorür membranların TGA termogramlarında; nem kaybının, enzim içindeki mevcut NH₂ gruplarından dolayı tekrar ortaya çıktığı görülmüştür. Öte yandan, C-Cl bağının kırılmasıyla meydana gelen bozunmanın 386°C'ye kaymasının nedeni olarak enzim ile immobilize edilen membranın daha kararlı bir yapıya gelmesi gösterilmiştir [122].

Saf kitosan, kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojellerinin TGA termogramları Şekil 4.9'da verilmiştir.



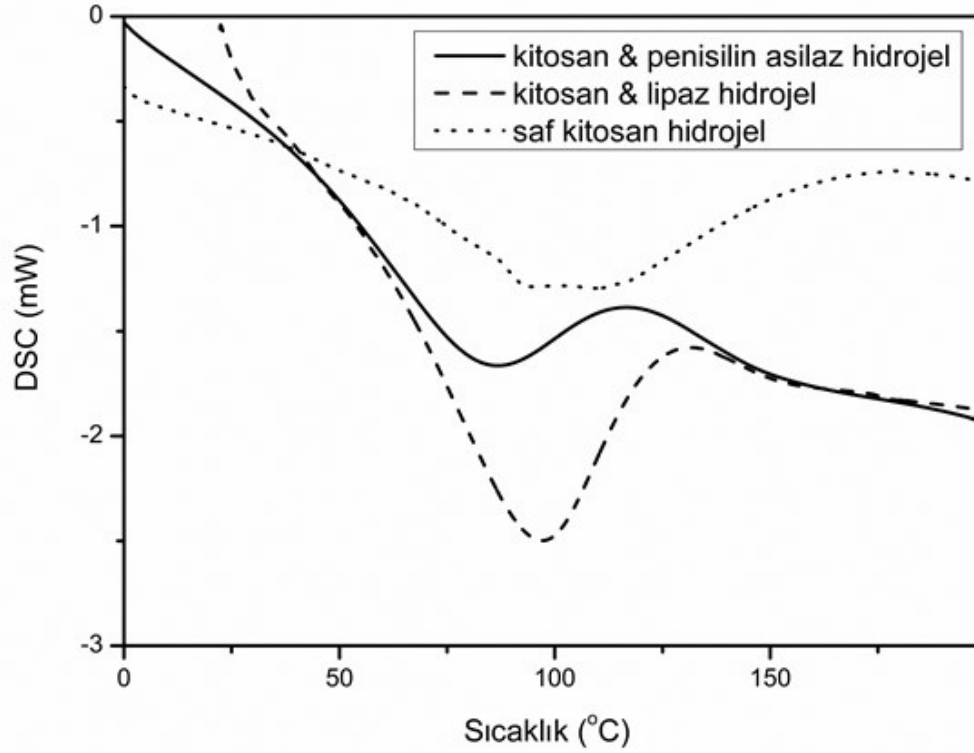
Şekil 4.9 : Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin TGA termogramları.

TGA termogramları ile aminoasit içeren hidrojellerin saf kitosan hidrojelini ile karşılaştırıldığında, aminoasitli hidrojellerin 30-420°C sıcaklık aralığında biraz daha hızlı bir oranda bozulduğu tespit edilmiştir. Bu hidrojeller için, belirtilen sıcaklık aralığındaki kütle kaybının, suyun çıkarılmasından ve bazı zayıf bağlı aminoasitlerin bozulmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Yaklaşık olarak 430°C'den sonra aminoasitli hidrojellerin ağırlık kaybında herhangi bir azalma görülmemiş ve bu hidrojellerin saf kitosan hidrojeline göre daha az kalıntı miktarı bıraktığı saptanmıştır.

Alanin ile yapılan literatür çalışmasında; saf potasyum dihidrojen fosfat kristalinin TGA termogramında, yaklaşık 230°C'den sonra uçucu maddelerin ortamdaki uzaklaşmasıyla ağırlık kaybının başladığı görülmüştür. Alanin katkılı dihidrojen fosfat kristalinin TGA termogramında ise, maksimum ağırlık kaybının 205-365°C aralığında gerçekleştiği saptanmıştır. Ayrıca termogramda kristalin 900°C'ye kadar ısıtılmasının herhangi bir ağırlık kaybına neden olmadığı sonucuna varılmıştır [125].

Lösün ile yapılan bir çalışmadaki TGA analizleri incelendiğinde ise, lösün katkılı amorf salbutamol sülfatın TGA termogramında, başlangıç bozunma sıcaklığının yaklaşık olarak 140°C'de olduğu ve 130-205°C sıcaklık aralığında salbutamolun bozulduğu görülmüştür. Lösün içeriği ile genel kütle kaybının arttığı ve 191-217°C sıcaklık aralığında kütle kaybının en yoğun olduğu saptanmıştır [126].

Saf kitosan, kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojellerinin DSC eğrileri Şekil 4.10'da verilmiştir.

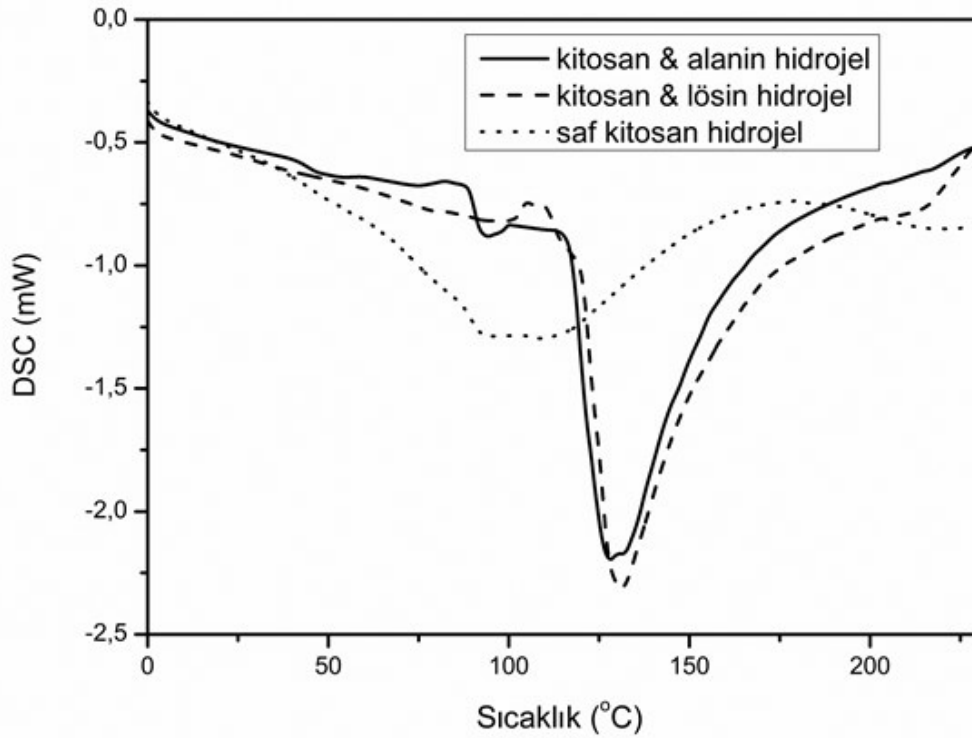


Şekil 4.10 : Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin DSC eğrileri.

Tüm hidrojellerin DSC analizleri inert N₂ atmosferinde 0°C ve 200°C sıcaklıkları arasında yapılmıştır. DSC analiz sonuçları değerlendirildiğinde, saf kitosan hidrojeline ait 150°C'den sonra görülen geniş endotermik pikin, saf kitosan hidrojelinin Tg değeri olduğu saptanmıştır. Kitosan&lipaz hidrojel için Tg değerinin yaklaşık olarak 100°C ve kitosan&penisilin asilaz hidrojel için ise Tg değerinin yaklaşık olarak 75°C olduğu görülmüştür.

Saf kitosana oranla enzimle modifiye edilmiş hidrojellerin Tg değerlerinde meydana gelen bu düşüş, enzim moleküllerinin kitosan ve gluteraldehit molekülleri ile güçlü bir bağ yapmasından kaynaklanmıştır. Endotermik piklerin, daha düşük sıcaklıklara doğru kayması, enzim ilavesi ile polimerik zincir hareketliliğinin artmasından ve polimer zincirlerinin yeniden düzenlenmesi ile hidrojellerin camı geçiş sıcaklığının azalması ile açıklanabilir.

Saf kitosan, kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojellerinin DSC eğrileri Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 : Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin DSC eğrileri.

Şekil 4.11'e göre, kitosan&aminoasit hidrojellerinin DSC eğrileri, saf kitosan hidrojel ile aynı eğilimi vermiştir. Kitosan&alanin ve kitosan&lösin hidrojelleri, yaklaşık olarak 98°C'de geniş bir endotermik pik göstermiştir ve bu pik kitosan&alanin hidrojel için Tg değeridir. Kitosan&lösin için ise, bu değer 110°C olduğu görülmüştür.

Endotermik piklerin, saf kitosan hidrojelinden oranla aminoasit içerenlerle daha düşük sıcaklıklara doğru kaydığı saptanmıştır. Bu durum, aminoasit içeriği ile saf kitosan hidrojelinin hareketliliğinin artmasından dolayı hidrojellerin camsı geçiş sıcaklığının azalması ile açıklanabilir.

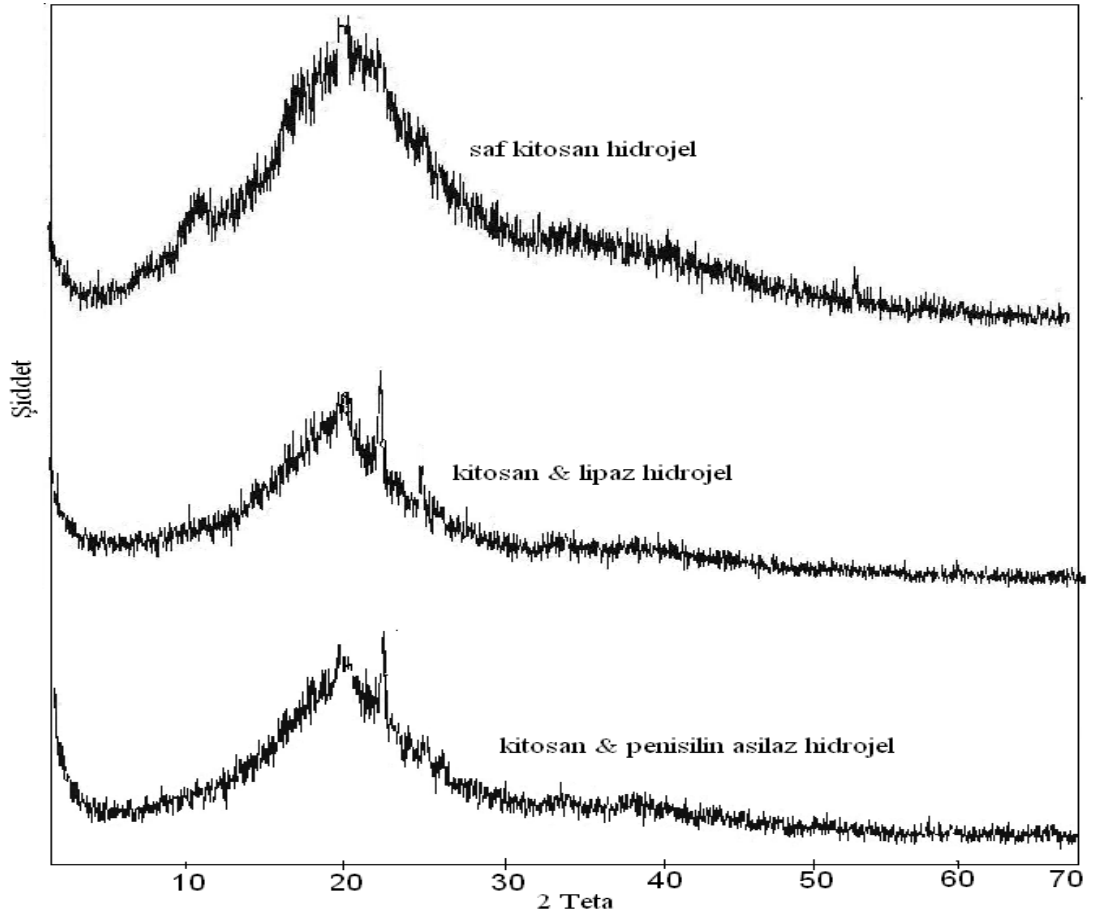
Her iki aminoasit molekülü için Tg değerleri farklı noktalarda ortaya çıkmıştır. Bu durum, alaninde bir α -karbon atomu ile sınırlandırılmış reaktif olmayan bir metil grubu ($-\text{CH}_3$) var olurken, lösinde eklenen metil grupları yüzünden zincirlerin çapraz bağlayıcı ile bağlandığında polimer zincirlerinin hareketlerinin sınırlanması ve böylelikle kitosan&lösin hidrojel için Tg değerinin artması şeklinde açıklanabilir.

Literatürde alanin ile yapılan bir çalışmada; alanin katkıli çinko tüyoüre sülfatın inert azot atmosferinde 40-220°C sıcaklık aralığında yapılan DSC analizinde 40-183,93°C sıcaklık aralığında malzeme için herhangi bir faz geçişinin olmadığı tespit edilmiştir [123].

Lösün ile yapılan çalışmalarda DSC analizleri incelendiğinde, lösün katkıli salbutamol sülfatın amino grupları ile lösünün karboksilik asidi arasındaki hidrojen bağlarının nispeten düşük sıcaklıklarda (210-230°C) kırıldığı gözlenmiştir. 50-115°C sıcaklık aralığında suyun buharlaştığı ve 200-235°C sıcaklık aralığında ise lösünün süblimleştiği görülmüştür [126].

4.4. Enzim Ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Yapısal Morfolojisi

Lipaz ve penisilin asilaz enzimlerinin eklenmesinin saf kitosan hidrojelinde meydana getirdiği yapısal morfolojik değişiklikler Şekil 4.12’de sunulmuştur.

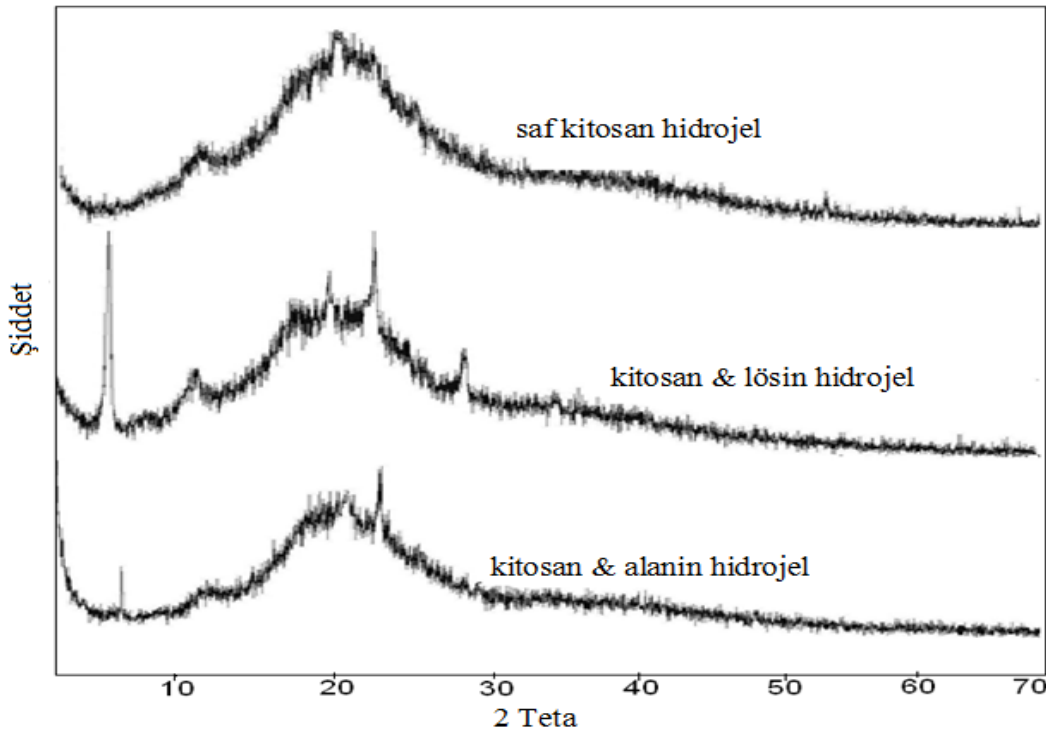


Şekil 4.12 : Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin XRD spektrumları.

Saf kitosan, kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojellerinin XRD desenleri incelendiğinde; saf kitosan hidrojelinin $2\theta=10-70^\circ$ arasında iki özel kristal pik verdiği görülmüştür. Daha önce belirtildiği gibi, saf kitosan hidrojeli, hidrojin polimorf yapısına ait piklerle çakışan $2\theta=10,4^\circ$ ve $20,4^\circ$ 'de karakteristik pikler gösterir. Kitosan&lipaz hidrojelinde, $2\theta=22^\circ$ ve kitosan&penisilin asilaz hidrojelinde ise, $2\theta=23^\circ$ 'de iki kırınım piki görülmüştür. Bu kristal piklerin lipaz ve penisilin asilaz enzimlerinin kompleks yapısını temsil ettiği sonucuna varılmıştır.

Literatürde lipaz enzimi ile yapılan XRD analizi çalışmasında; etilendiamin ve glutaraldehit ile fonksiyonlandırılmış gözenekli aktif karbonun XRD desenlerinde, etilendiamin ve glutaraldehyitten kaynaklanan $2\theta= 11,5; 12,7; 13,5; 18,89; 19,59; 26,48; 27,3$ ve $33,7^\circ$ değerlerinde yeni pikler gözlenmiş ve lipaz immobilize edilmiş fonksiyonla gözenekli aktif karbonun XRD desenlerinde ise; $2\theta= 32^\circ$ ve 35° arasındaki değerlerinde lipaz pikinin kristal yapısı görülmüştür. Bu sonuç fonksiyonla gözenekli aktif karbon üzerine lipazın immobilize edildiğini kanıtlamıştır [121].

Kitosan hidrojeline alanin ve lösin aminoasitlerinin eklenmesinin saf kitosan hidrojelinde meydana getirdiği yapısal morfolojik değişiklikler Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



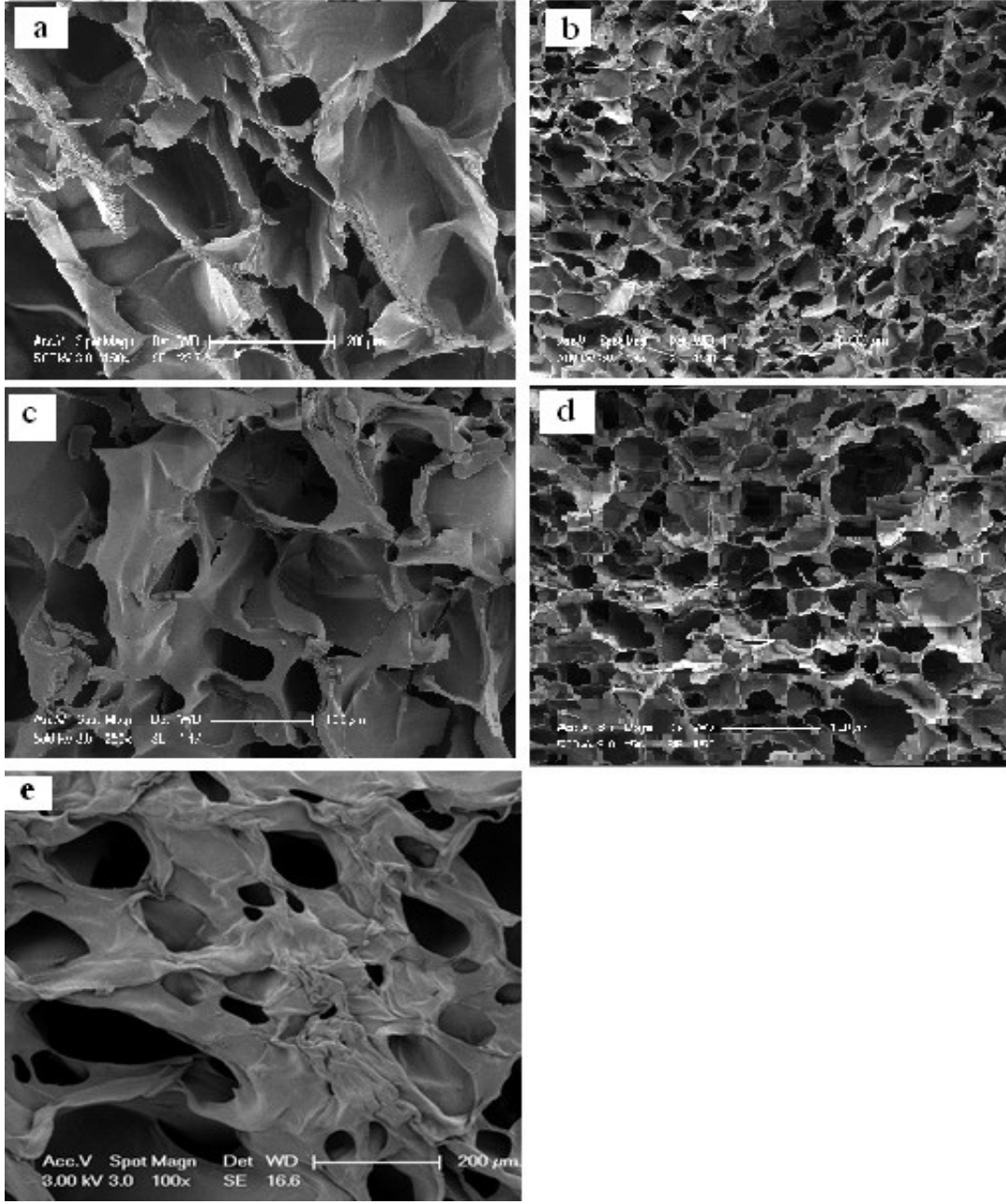
Şekil 4.13 : Saf kitosan hidrojeli ve aminoasitli hidrojellerin XRD spektrumları.

Saf kitosan, kitosan&alanin ve kitosan&lösün hidrojellerinin XRD desenleri incelendiğinde; sırasıyla, $2\theta = 5^\circ$, 20° ve 23° ve 28° ve $2\theta = 5^\circ$ ve 22° 'de çok önemli kırınım pikleri görülmüştür. Bu kristal pikler, aminoasitlerin kristal ve /veya üç boyutlu kompleks yapılarını temsil eder. Buradan, hidrojelin polimerik yapısı içinde aminoasitlerin bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Lösün enzimi ile yapılan bir çalışmada ise; saf salbutamol partiküllerinin XRD desenlerinde, partiküllerin amorf yapıda olduğu ama kristalliğini gösteren bir kırılma noktasının bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında lösün katkılı salbutamol partiküllerinin yapısının çoğunlukla amorf olduğu, partiküllerin XRD desenlerindeki düz spektrumundan anlaşılmıştır. XRD desenlerinde görülen bazı piklerin ise lösine proteininden kaynaklandığı belirtilmiştir [127].

4.5. Enzim Ve Aminoasitlerle Modifiye Edilmiş Hidrojellerin Yüzey Morfolojisi

Kitosanın enzimlerle modifikasyonu sonucunda elde edilen kitosan&lipaz ve kitosan&penisilin asilaz hidrojellerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14 : Saf kitosan hidrojel ve enzimli hidrojellerin SEM görüntüleri. (a) 0,04 g lipaz \times 200 (b) 0,6 g penisilin asilaz \times 200 (c) 0,04 g lipaz \times 10 (d) 0,6 g penisilin asilaz \times 10 (e) saf kitosan hidrojel.

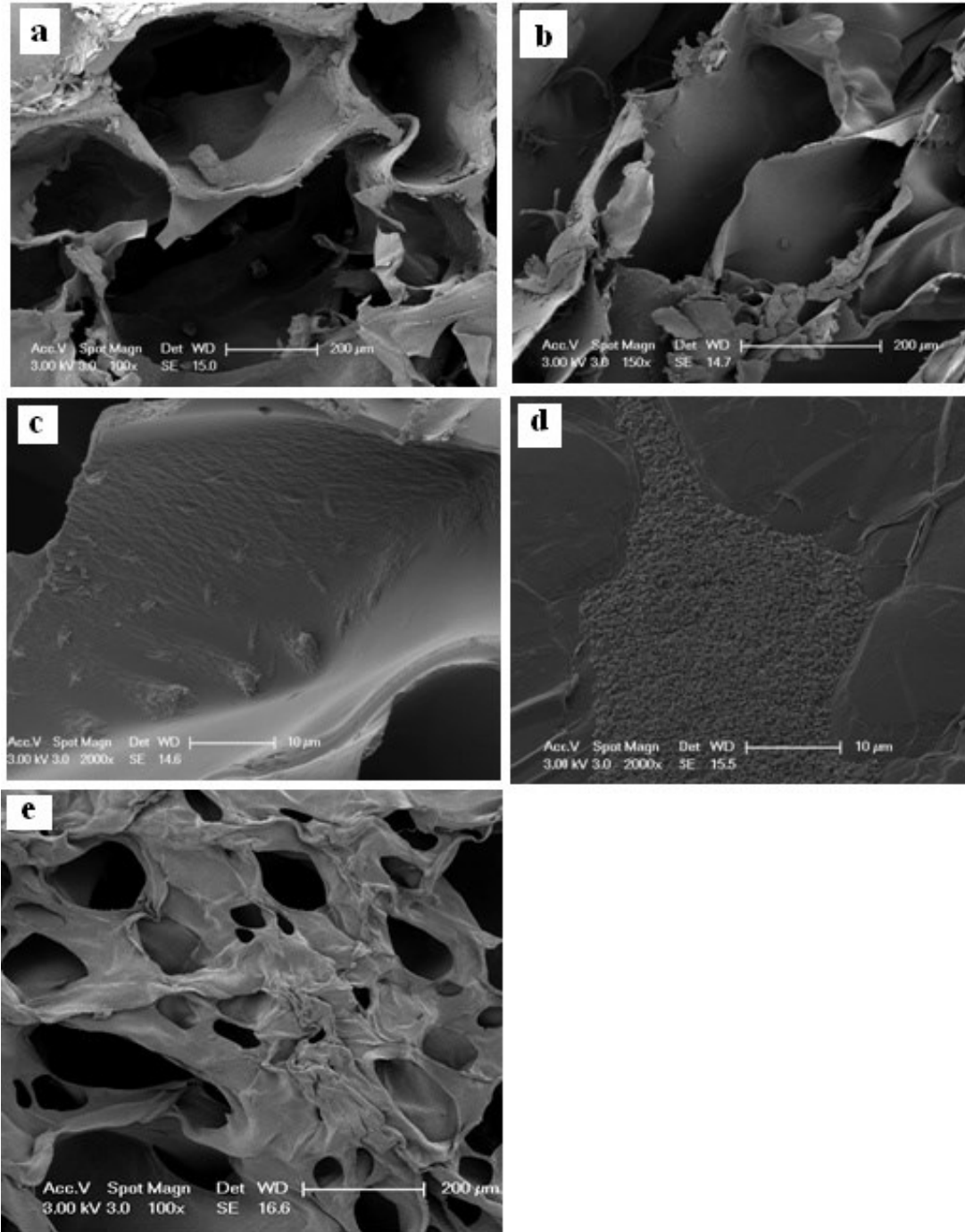
SEM görüntüleri incelendiğinde, saf kitosan hidrojelinin (Şekil e) biraz daha gözenekli yapı sergilediği ama çoğunlukla 10-200 mikrometre boyutlu birkaç serbest porlarla kapanmış hücrelere sahip olduğu görülmüştür. Kitosan&penisilin asilaz hidrojelinde (Şekil b ve d) küçük, sık ve son derece homojen porlu yapıların elde edildiği görülmektedir. Hidrojinin por çapları yaklaşık 10-50 mikrometre aralığında olduğu tespit edilmiştir. Lipaz enzimi ile modifiye edilmiş hidrojellerde ise por

aplarının daha düzensiz ve değişik büyüklüklerde olduğu kolaylıkla görülmektedir (Şekil a ve c). Kitosan&lipaz hidrojelini için 100-500 mikrometre aralığında stabil olmayan porlu yapıların meydana geldiği izlenmiştir. Genel olarak her iki enzimle modifiye edilmiş hidrojellerin yüzey/kesit özelliklerine ve yüzey morfolojilerine bakıldığında, düzgün yüzeysel katmanların oluştuğu söylenbilir. Şekil 4.14'ten de görülebildiği gibi saf kitosan hidrojeline oranla enzimle modifiye edilmiş hidrojellerin yüzey morfolojisi tamamen deęiŐmiŐtir

Literatürde lipaz enzimi ile yapılan SEM analizi çalışmasında; etilendiamin ve glutaraldehit ile fonksiyonlandırılmış gözenekli aktif karbonun SEM görüntüleri incelendiğinde, aktif karbonun gözenekli dış yüzey alanına amino-aldehit (Am-Al)'in düzgün bir kimyasal katman oluŐturduęu ve bu gözeneklerin amino-aldehit tarafından tıkanığı grlmŐtir. Fonksiyonlağı gözenekli aktif karbonun SEM görüntülerinde ise; Am-Al kimyasal katman üzerinde lipazın düzgün bir tabaka oluŐtuduęu saptanmıştır [121].

Penisilin asilaz enzimi ile yapılan bir çalışmada ise; polivinil klorür membranların glutaraldehit ile çapraz bağlanmasından oluşan kümelenmelerin enzim immobilizasyonu sonrasında sayılarında azalma olduğu ve bu durumun polivinil klorür membran yüzeyinde molekülerin tek tabaka oluŐturmasının sonucu olduğu belirtilmiştir [122].

Benzer Şekilde alanin ve lösin ile modifiye edilmiş olan hidrojellerin yüzey/kesit özelliklerinde meydana gelen değişiklikler, Şekil 4.15'teki SEM görüntüleri ile gösterilmiştir.



Şekil 4.15 : Saf kitosan hidrojel ve aminoasitli hidrojellerin SEM görüntüleri. (a) 0,4 g alanin \times 200 (b) 0,4 g lösin \times 200 (c) 0,4 g alanin \times 10 (d) 0,4 g lösin \times 10 (e) saf kitosan hidrojel.

Alanin ve lösin aminoasitlerinin ilavesi durumunda (Şekil a,b) serbest porların hakim olduğu yapılar görülmüştür. Ayrıca aminoasitlerin ilavesi ile hücre boyutunun 100-500 mikrometre arttığı da saptanmıştır. Her iki hidrojel için alanin ve lösin eklenmesiyle serbest por boyutlarının artması, bu aminoasitlerin geride çok büyük porlar bırakarak çapraz bağlı zincirlere sahip alt ağlar oluşturmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak, 0,4 g alanin ilavesinde, etkin bir şekilde

uygulanan basınç kuvvetlerinin yardımıyla ve suyun bulunması için en cazip boş yerlere sahip daha büyük serbest porlar görülmüştür. Diğer taraftan, Şekil c,d'de, alanin ve lösin ilave edilmiş hidrojel yüzeyine bakıldığında, uzunlamasına düzensiz çubuklar ve çubukların sonunda da yıldız şeklinde yapılar gözlenmiştir. Ayrıca, saf kitosan hidrojel yüzeyi ile karşılaştırıldığında arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Aminoasit ilavesinin sonucu olarak, saf kitosanın kristal yapısında bir değişiklik gözlenmiştir. Alanin ve lösin ilavesinden sonra, mikro boyuttaki çatlaklarda artış gözlenmiştir. Bütün yüzeyi kaplayan ve eşit bir alan sağlayan çatlakların, alt ağların oluşumundan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde alanin ile yapılan bir çalışmada; kitosan-alanin boncuklarının SEM görüntüleri incelendiğinde, boncuk gözeneklerinin damlacık şeklinde olduğu ve katlanmış yüzeyler meydana gelerek boncukların yüzey morfolojisinde değişiklik meydana geldiği belirtilmiştir [128].

Lösin ile yapılan bir SEM analizi çalışmada ise; lösin katkılı amorf salbutamol sülfat partiküllerinin SEM görüntüleri incelendiğinde, lösinin salbutamol partiküllerine ilavesiyle kürelerin kırıştığı ve yüzey morfolojisinin değiştiği gözlenmiştir [127].

5. SONUÇLAR

1) Kitosan bazlı hidrojeller, seyreltik asetik asit içerisinde hazırlanan kitosan çözeltisinin enzim (lipaz ve penisilaz) ve aminoasit (alanin ve lösin) içerikleriyle ve glutaraldehit varlığında çapraz bağlanarak sentezlenmiştir. Kitosanın farklı tür ve miktarlardaki enzim ve aminoasitlerle olan modifikasyonu, kitosan ile enzim ve aminoasitlerin fiziksel adsorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehit eklenerek çapraz bağlayıcının $-C=O$ reaktif gruplarıyla, kitosan ve enzim/aminoasitlerin $-NH_2$ reaktif gruplarının çapraz bağlanmasıyla modifikasyon tamamlanmıştır. Saf kitosan hidrojellerine enzim ve aminoasit etkisi şişme davranışları, yapısal, ısıl ve yüzey özellikleri açısından incelenmiştir.

2) Farklı tür ve miktarlarda enzim ve aminoasitlerle modifiye edilmiş hidrojellerde; 7 gün boyunca şişme davranışları incelenmiş ve en yüksek şişme oranını veren enzim ve aminoasit konsantrasyonu 0,04 g lipaz/1,0 g kitosan, 0,06 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan ve her iki aminoasit tipi için de 0,4 g aminoasit/1,0 g kitosan olarak tespit edilmiştir.

3) Saf kitosan hidrojeli, enzim ve aminoasit molekülleri ile modifiye edilmiş kitosan hidrojellerinin $25^{\circ}C$ 'de farklı pH çözeltilerindeki şişme davranışları incelendiğinde; pH azaldıkça tüm hidrojellerin şişme davranışlarının arttığı görülmüştür.

4) Tüm hidrojellerin pH 2,0'de en iyi bir şişme davranışı gösterdiği saptanmıştır.

5) 0,6 g penisilin asilaz/1,0 g kitosan içeren hidrojelin pH 2,0'de %5466 denge şişme oranı göstererek enzim ile modifiye edilmiş kitosan hidrojeller arasında en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür.

6) 1,0 g alanin/1,0 g kitosan içeren hidrojeli; pH 7,0'da %25960 şişme oranı göstermiştir.

7) Saf kitosan hidrojeli ile enzim katkılı kitosan hidrojellerinin karşılaştırmalı FT-IR analizleri incelendiğinde; saf kitosan hidrojelinin FT-IR spekturmunda glutaraldehitin $-C=O$ gruplarına ait 1630 cm^{-1} ve 1580 cm^{-1} 'de iki absorpsiyon piki görülmüş ve buradan saf kitosan hidrojelinde glutaraldehit moleküllerinin varlığı

saptanmıştır. Aynı şekilde enzim katkılı hidrojellerin spektrumlarında, enzimlerin amid I ve amid II bağlarına ait 1600 cm^{-1} ve 1550 cm^{-1} 'de iki pik görülmüş ve böylelikle kitosanın enzimlerle iyi bir şekilde modifiye edildiği ispatlanmıştır.

8) Aminoasitli kitosan hidrojellerin FT-IR spektrumlarında; her iki aminoasit molekülünün C-H üçlü bağlarına kitosan&alanin hidrojeli için 2927 cm^{-1} ve kitosan&lösin hidrojeli için ise, 2957 cm^{-1} 'de iki pik görülmüş ve kitosanın aminoasitlerle iyi bir şekilde modifiye edildiği sonucuna varılmıştır.

9) Saf kitosan, enzim ve aminoasitlerle modifiye edilmiş kitosan hidrojellerinin TGA analizleri incelenmiştir. TGA termogramlarında, enzim ve aminoasit ile modifiye edilen kitosan hidrojellerinin, saf kitosan hidrojeline göre daha düşük sıcaklıkta bozunduğu ve daha az miktarda kalıntı bıraktığı görülmüştür. Buradan da, enzim ve aminoasitin kitosanı hızlı bir şekilde bozundurduğu sonucuna varılmıştır.

10) Kitosan bazlı hidrojellerin XRD desenleri incelendiğinde; saf kitosan hidrojeline ait 2 özel kristal pikin, enzimli ve aminoasitli kitosan hidrojellerinde ise, enzim ve aminoasit moleküllerine ait karakteristik piklerin varlığı saptanmıştır. Bu piklerin saf kitosan hidrojelinin yapısal morfolojisinde değişiklik meydana getirdiği görülmüştür. Böylelikle, kitosanın enzim ve aminoasitlerle iyi bir şekilde modifiye edildiği sonucuna varılmıştır.

11) Tüm hidrojellerin SEM görüntüleri incelendiğinde; saf kitosan hidrojeline lipaz enzimi, alanin ve lösin aminoasitlerinin ilavesiyle hidrojellerin por boyutlarında artış gözlenmiştir. Bunun yanında; penisilin asilaz enzimi saf kitosan hidrojeline katıldığında, por boyutlarında azalama görülmüş, daha küçük ve sık yapıda porların oluştuğu saptanmıştır. Enzim ve aminoasitlerle modifiye edilmiş kitosan hidrojellerinin yüzey morfolojisinin değiştiği sonucu çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] **Küçük, İ.**, 2002: “İki Farklı Uyarıcıya Duyarlı Polimer Jellerin Sentezi ve Karakterizasyonu”, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- [2] **Taşdelen, B.D.**, 2002: “Preparation, Characterization and Drug Release Behaviour of Thermo- and pH- Responsive Hydrogels and Microspheres”, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.
- [3] **Zhang, J., Peppas, N.A.**, 2000: “Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylamide) interpenetrating polymeric Networks”, *Macromolecules*, 33: 102-107.
- [4] **Park, K., Shalably, S.W.W., Park, H.**, 1993: “Biodegradable hydrogels for drug delivery”, *Technomic Publishing Co. Inc.*, 1-12, 35-66.
- [5] **Peppas, N.A., Mikos, A.G.**, 1986: “Preparation methods and structure of hydrogels”, *Hydrogels Med. and Pharm.*, 1: 1-25.
- [6] **Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Dubovik, A.S., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Grinberg, V.Y.**, 2005: “Temperature-sensitive chitosan-poly(Nisopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties”, *J. Control. Release*, 102: 629-641.
- [7] **Taşdelen, B., Kayaman, N., Güven, O., Baysal, B.M.**, 2005: “Anticancer drug release poli(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels”, *Radiat. Phys. Chem.*, 73: 340-345.
- [8] **Elvira, C., Mano, J.F., Roman, J. S., Reis, R.L.**, 2002: “Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems”, *Biomaterials*, 23: 1955-1966.
- [9] **Karadağ, E., Saraydin, D., Çetinkaya, S., Güven, O.**, 1996: “In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels”, *Biomaterials*, 17: 67-70.
- [10] **Roseman, T.J., Carderelli, N.F.**, 2001: “Monolithic polymer devices”, *Control. Release Tech.*, 11: 46-49.
- [11] **Worsfold, P.J.**, 1995: “Classifications and chemical characteristics of immobilized enzymes”, *Pure. Appl. Chem.*, 67 (4): 597-600.

- [12] **Chiou, S., H., Wu, W., T.**, 2004: "Immobilization of candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups", *Biomaterials*, 25: 197- 204.
- [13] **Ye, P., Xu, Z., K., Che, A., F., Wu, J., Seta, P.**, 2005: "Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization", *Biomaterials*, 26: 6394-6403.
- [14] **Krajewska, B.**, 2004: "Application of chitin-and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: A Review", *Enzyme Microb. Tech.*, 35: 126-139.
- [15] **Majeti, N.V., Kumar, R.**, 2000: A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- [16] **Shepherd, R., Reader, S., Falshaw, A.**, 1997: Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*; 14: 535-542.
- [17] **Terbojevich, M., Muzarelli, R.A.A.**, 2000: Chitosan. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press.
- [18] **Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J.**, 1999: "Food Application of Chitin and Chitosan", *Trends in Food Sci. &Technology*, 10, 37-51.
- [19] **Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A.**, 2003: "Contribution to the Preparation of Chitins and Chitosans with Controlled Physico-Chemical Properties", *Polymer*, 44: 7939-7952.
- [20] **Cho, YW., Cho, Y. N., Chung, S.H., Yoo, G. and Ko, S.W.**, 1999: "Water Soluble Chitin as a Wound Healing Accelerator", *Biomaterials*, 20: 2139-2145.
- [21] **Shahidi, F., Synowiecki, J.**, 1991: "Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards", *J.Agric. Food Chem.* 39: 1527-1532.
- [22] **No, H.K., Meyers, S.P.**, 1989: "Crawfish Chitosan As A Coagulant in Recovery of Organic Compounds from Seafood Streams", *J.Agric. Food Chem.* 37: 580-583.
- [23] **No, H.K., Hur, E.Y.**, 1998: "Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin", *J.Agric. Food Chem.* 46: 3844-3846.
- [24] **Gagne, N.**, 1993 : "Production of Chitin and Chitosan from Crustacean Waste and Their Use as A Food Processing Aid", PhD Thesis, McGill University, Montreal, Canada 4,5.
- [25] **Bough, W.A., Salter, W.L., Wu, A.C.M., Perkins, B.E.**, 1978: "Influence of Manufacturing Variables on the Characteristics of Chitosan Products. I. Chemical Composition, Viscosity, and Molecular Weight Distribution of Chitosan Products", *Biotech. Bioeng.*, 20: 1931-1943.

- [26] **Lim, S.H.**, 2002: Synthesis Of A Fiber-Reactive Chitosan Derivative And its Application to Cotton Fabric as an Antimicrobial Finish and a Dyeing-Improving Agent.
- [27] **Fouda, M.M.**, 2005: Use of Natural Polysaccharides in Medical Textile Applications, Doktora Tezi, Essen University.
- [28] **Roberts, G.F.A.**, 2000: "Chitin Chemistry" The Macmilan Press Ltd, UK (1992) In Kamil, Y.V.A.J.: "Chitosan as an Edible Film for Production of Seafood Quality", Master Thesis, Memorial University of Newfoundland, Canada 22,23.
- [29] **Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M.**, 2004: Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, Journal of Controlled Release, 100: 5–28.
- [30] **Peter, M.G.**, 1995: "Application and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan", J.M.S.- Pure Appl. Chem. 32: 629-640.
- [31] **Li, Q., Dunn, E.T.**, 1992: Grandmaison, E.W.; Goosen, M.F.A.: "Application and Properties of Chitosan", J. Bioactive Compatible Poly. 7: 371-397.
- [32] **Lee, D.W., Powers, K., Baney, R.**, 2004: Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, Carbohydrate Polymers, 58: 371-377.
- [33] **Lopez-Leon, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-Gonzalez, D.**, 2005: Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior, Journal of Colloid and Interface Science, 283: 344-351.
- [34] **Liu, X.D., Nishi N., Tokura S., Sakairi N.**, 2001: Chitosan Coated Cotton Fiber: Preperation and Physical Properties, Carbohydrate Polymers, 44, p. 233-238.
- [35] **Helander, I.M., Nirmiaho, L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S.**, 2001: Chitosan Disrupts The Barrier Properties of The Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria, International Journal of Food Microbiology, 71, p. 235-244.
- [36] **Liu, H., Du, Y., Xiaohui, W., Sun, L.**, 2004: Chitosan kills bacteria through cell-membrane damage, Internatioanl Journal of Microbiology, 95, p. 147-155.
- [37] **Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D.**, 1992: "Antibacterial Action of Chitosan", Food Biotechnol., 6: 257-272.
- [38] **Hennink, W.E., Van Nostrum, C.F.**, 2002: "Novel crosslinking methods to design hydrogels", Adv. Drug Deliver. Rev., 54: 13-36.
- [39] **Moreira, MR, Roura, SI, Ponce, A.**, 2011: Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. LWT Food Sci Technol, 44: 2335-2341.

- [40] **Dutta, PK, Tripathi, S, Mehrotra, GK, Dutta, J.**, 2009: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem*, 114: 1173-1182.
- [41] **Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A.**, 2009: Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol.*, 3: 203-230.
- [42] **Tsugita, T.**, 1993: "Chitin/ Chitosan and Their Applications" In Gagne, N.: "Production of Chitin and Chitosan from Crustacean Waste and Their Use as A Food Processing Aid", PhD Thesis, McGill University, Montreal, Canada 4,5.
- [43] **Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou, X.**, 2004a: Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339: 2693-2700.
- [44] **Vilchez, S., Jovancic, P., Manich, A.M., JuliaM. R., Erra P.**, 2005: Chitosan Application on Wool Before Enzymatic Treatment, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 98, p. 1938-1946.
- [45] **Roberts, G.A.F., Domszy, J.G.**, 1982: "Determination of the Viscometric Constants for Chitosan", *Int. J. Biol. Macromol.*, 4: 374-377.
- [46] **Tan, S.C., Khor, E., Tan, T.K., Wong, S.M.**, 1998: "The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV-Spectrophotometry Method of Determination", *Talanata*, 45: 713-719.
- [47] **Illanes, A., Ruiz, A., Zuniga,M.E., Aguirre, C., O'Reilly, S., Curotto, E.**, 1990: "Immobilization of lactase for the Continuous Hydrolysis of Whey Permaete", *J. Biomed. Mat. Res.*, 5: 257-262.
- [48] **Illum, L.**, 1998: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.*, 15: 1326-1331.
- [49] **Singla, A.K., Chawla, M.**, 2001: Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update, *J. Pharm. Pharmacol.*, 53: 1047-1067.
- [50] **Rinaudo, M.**, 2006: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*, 31: 603-632.
- [51] **Samuels, R.J.**, 1981: "Solid-State Characterization of the Cstructure of Chitosan Films", *J. Pol Sci*. 19: 1081-1105.
- [52] **Singla, A.K., Chawla, M.**, 2001: Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update, *J. Pharm. Phamacol.*, 53: 1047-1067.
- [53] **No, H.K.; Meyers, S.P.**, 1999: "Method for Rapid and Accurate Measurements of Chitosan Viscosity", *J. Food. Sci. Nutr.*, 4: 85-87.
- [54] **Knorr, D.**, 1982: "Functional Properties of Chitin and Chitosan", *J. Food Science*, 47: 593-595.

- [55] **Rout, S.K.; Prinyawiwatkul, W.**, 2001: “Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitin and Chitosan As Affected by Process Modification”.
- [56] **Moorjani, M.N., Achutha, V., Khasim, D.I.**, 1975: “Parameters Affecting the Viscosity of Chitosan from Prawn Waste”, *J. Food Sci. Tech.*, 12: 187-189.
- [57] **Hirano, S., Inui, H., Mikami, T., Ishigami, Y., Hisamori, H.**, 1991: “An Alkaline Chitin Solution and Some O-alkylchitin Derivatives”, *Agric. Biol. Chem.*, 55: 2627-2628.
- [58] **Duncan, J.M., Jeff, J., Hardy, E.**, 2005: “Applications of Functionalized Chitosan in Catalysis”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44 (23): 8499 -8520.
- [59] **Gonçalves, L.V., Laranjeira, C.M.M., Fávere, T.V.**, 2005: “Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium Polimeros: *Ciência e Tecnologia*, 15: 6-12.
- [60] **Şahin, U.K., Gürsoy N.Ç.**, 2005: Tekstil endüstrisinde kitin ve kitosan uygulamaları, *Tekstil Teknik*, Ağustos, p.176, 245.
- [61] **Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M. And Wood, E.J.**, 2001: “The Effect of Chitin and Chitosan on the Proliferation of Human Skin Fibroblast and Keratinocytes in Vitro”, *Biomaterials*, 22: 2959-2966.
- [62] **Nair K.G.R.; Madhavan, P.**, 1984: “Chitosan for Removal of Mercury from Water”, *Fishery Tech.*, 21: 109.
- [63] **Peniche-Covas, C., Alvarez L.W., Arguelles-Monal, W.**, 1987: “The Adsorption of Mercuric Ions by Chitosan”, *J. Appl. Polym. Sci.*, 46: 1147.
- [64] **Jha, N., Leela I., Prabhakar Rao, A.V.S.**, 1988: “Removal of Cadmium Using Chitosan”, *J. Environ. Eng.*, 114: 962.
- [65] **McKay, G., Blair H.S., Gardner, J.R.**, 1989: “Adsorption of Dyes on Chitin. I. Equilibrium Studies”, *J. Appl. Polym. Sci.*, 27: 3043.
- [66] **Francis Suh J.K., Matthew W.T.**, 2000: “Application of Chitosan-Based Polysaccharide Biomaterials in Cartilage Tissue Engineering: A Review”, *Biomaterials*, 21: 2589-2598.
- [67] **Madihally, S.V., Matthew, H.W.T.**, 1999: “Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering”, *Biomaterials*, 20: 1133-1142.
- [68] **Hsu, S.H., Whu, S.W., Tsai, C.L., Wu, Y.H., Chen, H.W., Hsieh, K.H.**, 2004: Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation, *Journal of Polymer Research*, 11: p. 141–147.

- [69] **Muzzarelli, R.A.A., Frega, N., Miliani, M., Muzzarelli, C. and Cartolari, M.**, 2000: "Interactions of Chitin, Chitosan, N-Lauryl Chitosan and Dimethylaminopropyl Chitosan with olive Oil" *Carbohydr. Polym.*, 43: 263-268.
- [70] **Hughes, K.**, 2002: "Chitosan and Dietary Fibers" Prepared Foods NS11-NS14.
- [71] **Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P. and Lehtimäki, T.**, 2002: "Cholesterol-Lowering Properties and Safety of Chitosan", *Drug Res.*, 1: 1-7.
- [72] **Güven, O., Şen, M.**, 2001: "Preparation and characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels" , *Polymer*, 3: 7634-7652.
- [73] **Mahdavinia, G.R., Pourjavadi, A., Hosseinzadeh, H., Zohuriaan, M.J.**, 2004 : "Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties", *European Polymer Journal*, 40: 1399-1407.
- [74] **Yong, Q., Kinam, P.**, 2001: Environmentally-sensitive polymer hydrogels, *J. Adv. Drug Del. Rev.*, 53: 321-339.
- [75] **Tanaka, T.**, 1985: "Phase transition in polymer gels", *Sci. Am.*, 7: 110-112.
- [76] **Zhang, X.Z., Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ma, K.X.**, 2001: "Preparation and characterization of response macroporous poly(N-isopropyl acrylamide) hydrogels", *Langmuir*, 17: 6094-6099.
- [77] **Ayman, M., Arndt, K.F.**, 1994: "New crosslinkers to synthesize pH and temperature-sensitive ionic hydrogels", *Macromolecules*, 14: 671-674.
- [78] **Kim, J.J., Lee, M.Y., Kim, S.X.**, 2003: "Preparation and characterization of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)/poly(ethylene oxide) semi-interpenetrating polymer Networks", *J. Appl. Polym. Sci.*, 90: 3032-3036.
- [79] **Hoffman, A.S.**, 2002: "Hydrogels for biomedical applications", *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 54: 3-12.
- [80] **Park, K., Park, H.**, 1999: Smart hydrogels, *Poly. Mater. Ency.*, 1476-1478.
- [81] **Hoffman, A. S.**, 1997: Intelligent polymers, *Control. Drug Del. Challenge and Strate*, 485-497.
- [82] **Chenite, A., Chaput, C., Wang, D.**, 2000: Novel injectable neutral solutions from biodegradable gels in-situ, *Biomaterials*, 21: 2155-2161
- [83] **Gümüşderelioğlu, M., Kesgin, D.**, 2001: "Akıllı polimerler", *Bilim ve Teknik*, 52-55.
- [84] **Yılmaztürk, N.B.**, 1998: "Temperature and pH responsive hydrogels" *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 20-24.

- [85] **Canoğlu, S., Yükseloğlu, M.**, 1999: “Sağlık tekstilleri 1: Biyomedikal uygulamalarda kullanılan testiler”, Marmara Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 9-11.
- [86] **Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H.**, 2000: “Hydrogels in pharmaceutical formulations”, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50: 27-46.
- [87] **Wu, S.X., Hoffman, S.A., Yager, P.**, 1992: “Synthesis and characterization of thermally reversible macroporous poly(N-isopropyl acrylamide) hydrogels”, *J. Polym. Sci. Part A, Pol. Chem.*, 30: 2121-2129.
- [88] **Qui, Y., Park, K.**, 2001: “Environment-sensitive hydrogels for drug delivery”, *Adv. Drug Delive. Rev.*, 53: 321-339.
- [89] **Shibana, T., Ho, K., Toyama, S.**, 1987: “Highly water-absorbing polymer”, *Chemical Abstract*, 106: 33625t, 11.
- [90] **Chmelir, M., Dahmen, K., Hoffman, G., Werner, G.**, 1983: “Absorbents for blood and serous body fluids”, *Chemical Abstract*, 98: 11379r, 391.
- [91] **Ari, A.**, 1998: “Sıcaklık ve pH duyarlı poli(vinil eter) hidrojellerinin sentezi ve biyolojik karakterizasyonu” , Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-12, 19-22.
- [92] **Jeong, B., Kim, S.W., Bae, Y.H.**, 2002: Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, 37-51.
- [93] **Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Gurny, R., Peppas, N. A.**, 2004: Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications., *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 57, 19-34.
- [94] **Chandra, R., Rustgi, R.**, 1998: Biodegradable polymers, *Proses in Polymer Science*, 23: 1273-1335.
- [95] **Telefoncu, A.**, 1997: “Enzimoloji”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-243.
- [96] **Zaborsky, O.**, 1974: “Immobilized enzymes in food and microbial process”, A.C. Olson and C. L. Conney, Eds *Plenum Publ. Corp.*, New York, 28.
- [97] **Betigeri, S.S., Neau, S.H.**, 2002: “Immobilization of lipase using hydrophilic polymer in the form of hydrogel beads”, *Biomaterials*, 23: 3627-3636.
- [98] **Pencreac’h, G., Leullier, M., Baratti, J.C.**, 1997: “Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*”, *Biotechnol. Bioeng.*, 56: 181-9.
- [99] **Worsfold, P.J.**, 1995: “Classifications and chemical characteristics of immobilized enzymes”, *Pure. Appl. Chem.*, 67 (4): 597-600.

- [100] **Yahşı, A.**, 2005: “Aljinat jel boncukları ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojellerle tirozinaz enziminin binari yöntemi ile immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-25.
- [101] **Pitcher, W.H., Ford, Jr.**, 1978: “Immobilized lactase for whey hydrolysis; stability and operating strategy”, Enzyme Engineering, Ed. By Brown, G.B., Ganecke, Wingard, L.B., Jr., Plenum Press, New York, 4.
- [102] **Zaborsky, O.**, 1973: “Adsorption immobilized enzyme”, Ed by Weast, R.C., CRC Press, Ohio, 75.
- [103] **Mosbach, K.**, 1976: “Methods in enzymology”, Academic Press, New York, 44 .
- [104] **Trevan, M.D.**, 1980: “Techniques of immobilization”, Immobilized Enzyme, John Wiley and Sons, New York, 1-11.
- [105] **Vecchia, R.D., Sebrao, D., Nascimento, M.G., Soldi, V.**, 2005: “Carboxymethyl cellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization”, Process Biochem., 40: 2677-2682.
- [106] **Hung, T.C., Gridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T.**, 2003: “Binary immobilization of candida rugosa lipase on chitosan”, J. Mol. Catal.B-Enzym., 26: 69-78.
- [107] **Koç, L.**, 1994: “Katı yağların serbest ve immobilize lipazla hidrolizi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-19.
- [108] İnternet: Lipaz http://www.mapsenzymes.com/Enzymes_Leather.asp (2013).
- [109] **Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T.**, 1999 : “The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology”, Biotechnol. Appl. Bioc., 29: 119-131.
- [110] **Jeager, K.E., Reetz, M.T.**, 1998: “Microbial Lipases from Versatile Tools for Biotechnology”, Trends Biotechnol., 16(9): 396-403.
- [111] İnternet: Lipaz <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/detergent.html> (2013).
- [112] **Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parter, K.L., Bölüm Çeviren: Gelal, A.**, 2009: Tedavinin Farmakolojik Temeli, Goodman&Gilman, Nobel Matbaacılık, Hadımköy, İstanbul .
- [113] İnternet: Aminoasit <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aminoasit> (2013).
- [114] İnternet: Alanin <http://tr.wikipedia.org/wiki/Alanin> (2013).
- [115] İnternet: Lösün <http://tr.wikipedia.org/wiki/Lösün> (2013).

- [116] **Rohindra, R.D., Nand, V.A., Khurma, R.J.**, 2004: Swelling properties of chitosan hydrogels, *The South Pacific Journal of Natural Science*, 22(1): 32 - 35.
- [117] **Pourjavadi, A., Mahdavinia, G.R.**, 2006: Superabsorbency, pH-Sensitivity and Swelling Kinetics of Partially Hydrolyzed Chitosan-g-poly(Acrylamide) Hydrogels, *Turkish Journal of Chemistry*, 30: 595-608.
- [118] **Peppas, N.A., Khare, A.R.**, 1993: "Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release", *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 11: 1-35.
- [119] **Oğuz, O., Sayıl, Ç.**, 2001: "Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) network formation conditions", *Polymer*, 7639-7652.
- [120] **Basan, S.**, 2001: "Polimer kimyası", *Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları*, Sivas, 28-36.
- [121] **Ramani, K., Karthikeyan, S., Boopathy, R., John Kennedy, L., Mandal, A.B., Sekaran, G.**, 2012: Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies, *Process Biochemistry*, 47(3): 435-445.
- [122] **Mohy Eldin, M.S., El Enshasy, H.A., Hassan, M.E., Haroun, B., Hassan, E.A.**, 2012: Covalent Immobilization of Penicillin G Acylase onto Amine-Functionalized PVC Membranes for 6-APA Production from Penicillin Hydrolysis Process. II. Enzyme Immobilization and Characterization, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 125: 3820–3828.
- [123] **Dhumane, N.R., Hussaini, S.S., Datta, K., Ghosh, P., Shirsat, M.D.**, 2010: Effect of L-Alanine on the Optical Properties of Zinc (Tris) Thiourea Sulfate (ZTS) Single Crystal, *Recent Research in Science and Technology*, 2(10): 30-34.
- [124] **Castro, H.F., Silva, M.L.C.P., Silva, G.L.J.P.**, 2000: Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17: 4-7.
- [125] **Muley, G.G., Rode, M.N., Pawar, B.H.**, 2009: FT-IR, Thermal and NLO Studies on Amino Acid (L-Arginine and L-Alanine) Doped KDP Crystals, *Acta Physica Polonica A*, 116.
- [126] **Raula, J., Seppälä, J., Malm, J., Karppinen, M., Kauppinen, E.I.**, 2012: Structure and Dissolution of l-Leucine-Coated Salbutamol Sulphate Aerosol Particles, *AAPS PharmSciTech.*, 13(2): 707–712.
- [127] **Raula, J., Thielmann, F., Kansikas, J., Hietala, S., Annala, M., Seppälä, J., Lähde, A., Kauppinen, E.I.**, 2008: Investigations on the Humidity-Induced Transformations of Salbutamol Sulphate Particles Coated with L-Leucine, *Pharmaceutical Research*.

[128] **Kumari, K.**, 2010: Swelling properties of Cross linked chitosan & L-alanine semi-Interpenetrating Polymer Network (semi-IPN), Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2(4): 892-898.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Pinar Akay

Doğum Tarihi ve Yeri: 17.06.1978 Ardeşen/RİZE

Adres: Bahçelievler Mah. Ziyapaşa Sok. Akasya Apt. No:3/13 YALOVA

E-Posta: pakay78@hotmail.com

Yüksek Lisans: Yalova Üniversitesi Mühendislik Fak. Kimya ve Süreç Mühendisliği (Tezli)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Öğretmenliği (Tezsiz)

Lisans: Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fak. Kimya Mühendisliği

Uluslar arası dergilerdeki yayımlar:

1) Akay, P., Omay, D., Synthesis and Characterization of Chitosan&Aminoacid Suberabsorbent Hydrogels, International Polymer Processing, basımda.

Uluslararası bildiriler:

1) Kilic, B., Ozcan, N., Akay, P., Omay, D., ZnO Nanostructures onto Chitosan Hydrogels, EUROMAT 2013, European Congress and Exhibition on Advanced Materials and Processes, İspanya.

2) Akay, P., Ozcan, N., Omay, D., Immobilization of lipase onto photocrosslinked polymer network: Characterization and Polymerization applications, IUPAC 2013, İstanbul.

3) Akay, P., Omay, D., Swelling properties of chitosan&L-alanine and chitosan&L-leucine semi-IPNs, IUPAC 2013, İstanbul.

4) Akay, P., Ozcan, N., Omay, D., Lipaz İmmobilize Edilmiş Poliakrilamid Hidrojellerin Aktivite, Şişme ve Salım Davranışlarının İncelenmesi, UKMÖK 2013, İstanbul.

Projeler:

1) Didem Omay, Pinar Akay “Kitosan Bazlı Hidrojellerin Enzimatik Modifikasyonu Ve Karakterizasyonu”, Yalova Üniversitesi BAP YL 017 PROJESİ 2013, devam.

