

TARİFNAME

Akrilamid Türevli Gall Kompozit Polimerlerinin Üretimi

5 Teknik Alan

Buluş, invertaz enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere; biyobozunur özelliğe sahip akrilamid türevli gall kompozit polimer üretimi ile ilgilidir.

Tekniğin Bilinen Durumu

10 Enzimler canlı hücrelerdeki biyokimyasal tepkimeleri hızlandıran protein moleküllerdir. Bütün katalizörler gibi enzimlerde tepkimenin etkinleşme enerjisini düşürerek tepkimeyi hızlandırırlar. Enzimler son derece özgüdürler bu yüzden bütün kimyasal tepkimelere katılmazlar, tepkime boyunca değiştirilemezler ve hızlı çalışırlar. Hücre içinde gösterdikleri aktiviteyi hücre dışında da gösterebilmeleri nedeniyle enzimlerin birçoğu hücreden ayrılabilir

15 ve değişik ortamlarda kullanılabilirler. Enzimlerin bu özellikleri onların pek çok kimyasal ve endüstriyel işlemlerde kullanılmasına olanak sağlarlar. Biyolojik deterjanlar, bira endüstrisi, süt endüstrisi, nişasta endüstrisi, deri endüstrisi, tıp ve eczacılık alanları enzimlerin kullanıldığı alanlardır.

20 İvertaz (β -D-fruktofuranozidaz E.C. 3.2.1.26) β -fruktofuranozitlerin indirgenmemiş β -D-fruktofuranozit ucundan hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfı bir enzimdir. İvertaz, hafif krem renkli, suda çözünebilir, zengin karboksilik gruplu asidik bir enzimdir. İvertazın mol kütlesi elde edilmiş kaynağına göre değişmektedir. İvertaz sukroz hidrolizi sonucu oluşan früktoz sukroza göre daha tatlı olması ve kolay kristallenmemesi nedeni ile gıda endüstrisinde tercih

25 edilmektedir [1-2]. İmmobilizasyon enzim, hücre ve diğerlerinin tamamen ya da kısmen hareketlerinin sınırlandırılması yöntemi olarak tanımlanabilir. Biyokatalizörler olarak enzimler, kirlilik, inhibisyon, çözücüler, tuzlar, sıcaklık, pH gibi çevresel etkilere korunmak için bir desteğe ihtiyaç duyarlar ve immobilize edilirler. İmmobilizasyon enzimin bulunduğu ortamdan geri kazanımını sağlar. Immobilize enzim çalışmalarında en önemli araştırma alanı uygun

30 destek materyalinin bulunmasıdır [3-4]. Bu nedenle endüstriyel alanda değişik desteklere immobilizasyonu üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Galler bitkilerin; bakteri, mantar, kene ve böcek gibi değişik organizmaların saldırısına karşı koyma yönünde gösterilen çabanın sonucudur. Gal oluşumuna neden olan asalaklar, çeşitli

35 kimyasallar salgılayarak, üzerinde yaşadıkları bitkinin büyüme hormonu salgılamasına ve hızlı hücre bölünmeleriyle o bölgede lokal hücre sayısının artmasına neden olurlar. Bunun sonucunda ortaya çıkan anormal bitkisel yapılara da gal denir. Gal oluşumları genellikle bitki

büyümesinin arttığı ilkbahar dönemlerinde yeni yaprak, tomurcuk ve çiçeklerde meydana gelir.

5 Yüksek manyetik özelliğinin yanı sıra düşük toksitesi yüzünden demir ve oksitleri gerek ilaç endüstrisinde gerekse biyoteknoloji de çok sık kullanılan bir metaldir. Klinik olarak da bu tür manyetik nanoparçacık malzemeler ilaç salınımında [5], tıbbi teşhis ve tanıda [6], hipetermiya [7] ve hücre ayırımında [8] kullanıldı. Bu uygulamaların hepsi teknoloji de yeni gelişmelere neden oldu. Bu çalışmaların hepsinde ki ana mantık nanoparçacıkların yığınlar halinde kümelenmelerini önlemek için etraflarının bir polimer tarafından sarılması ve hedefe 10 yönelmesini sağlamaktır. Aynı zamanda araştırmacılar yaptıkları bu çalışmalarda bu tür nanoparçacıkların enzimin aktivitesini de arttırdığını tespit etmişlerdir.

Ancak, polimerler maliyeti ve kırılabilirliği fazla iken dayanıklılığı az malzemelerdir. Ayrıca polimerlerin toksitesi fazla olduğu için gıda sanayinde kullanımını kısıtlar. Bu özelliklerinden 15 dolayı polimerler yerine maliyetini daha aza çekecek, dayanıklılığını artıracak kompozit malzemeler tercih edilmektedir.

Sonuç olarak yukarıda anlatılan olumsuzluklardan dolayı ve mevcut çözümlerin konu hakkındaki yetersizliği nedeniyle, kompozit polimer ile ilgili teknik alanda bir geliştirme 20 yapılması gerekli kılınmıştır.

Buluşun Amacı

Mevcut buluş, yukarıda bahsedilen gereksinimleri karşılayan, tüm dezavantajları ortadan kaldıran ve ilave bazı avantajlar getiren akrilamid türevli gall kompozit polimer üretimi ile 25 ilgilidir.

Buluşun amacı, kompozit malzemelere, gall biyobozunur malzemesini katarak; hem elde edilen kompozit polimerin toksisitesinin azaltılması, hem de kompozit polimere biyobozunur özellik kazandırılmasıdır. 30

Buluşun bir amacı, bazı böceklerin Quercus türlerinin büyüyen gövdesi üzerine yumurtalarını bırakması sonucu oluşan gallerin, kompozit polimere, hem biyobozunur özellik kazandırması, hem de polimerin maliyetini azaltmasıdır.

35 Buluşun bir benzer amacı, sentez sırasında hidrofilik özellikte akrilamid kullanılmasıdır. Akrilamidin hidrofilik özellikte olması, su ve polar çözücüde kolay çözünmesini

sağlamaktadır. Bu sayede, sentez için herhangi bir yapay organik çözücüye ihtiyaç duyulmamaktadır.

5 Buluşun bir başka amacı, yeni bir polimer sentezi ve bu sentezlenen polimerin, sanayide yeni bir kullanım maddesi olarak yer almasıdır.

Buluşun bir diğer amacı, sentezlenen polimere, invertaz enziminin tutunması sağlanarak, enzimin defalarca kullanılabilmesidir. Bu durum, sanayi kuruluşunun maliyetinin düşmesine neden olmaktadır.

10

Buluşun bir benzer amacı, biyoyumlu olmasıdır.

15 Yukarıda anlatılan amaçların yerine getirilmesi için, Bir kompozit polimer olup, özelliği; akrilamid, su, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, gall ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin ihtiva etmektedir.

20 Buluşun yapısal ve karakteristik özellikleri ve tüm avantajları aşağıda verilen şekiller ve bu şekillere atıflar yapılmak suretiyle yazılan detaylı açıklama sayesinde daha net olarak anlaşılacaktır ve bu nedenle değerlendirmenin de bu şekiller ve detaylı açıklama göz önüne alınarak yapılması gerekmektedir.

Buluşun Anlaşılmasına Yardımcı Olacak Şekiller

Şekil 1: Buluş konusu poliakrilamid ve Fe nanopartikülleri ile birlikte Gall hidrojelinin görünümüdür.

25 **Şekil 2:** 25°C deki hidrojellerin şişme davranışının pH ile değişim grafiğidir.

Şekil 3: FeNP ile birlikte polimerin şişme özelliklerinin görünümüdür.

Şekil 4: Sukroz hidrolizinde pH ya göre invertazın % aktivite değeri grafiğidir.

Şekil 5: Sukroz hidrolizinde optimum sıcaklık grafiğidir.

30 Çizimlerin mutlaka ölçeklendirilmesi gerekmemektedir ve mevcut buluşu anlamak için gerekli olmayan detaylar ihmal edilmiş olabilmektedir. Bundan başka, en azından büyük ölçüde özdeş olan veya en azından büyük ölçüde özdeş işlevleri olan elemanlar, aynı numara ile gösterilmektedir.

35

Buluşun Detaylı Açıklaması

Bu detaylı açıklamada, buluş konusu akrilamid türevli gall kompozit polimer üretiminin tercih edilen yapılanmaları, sadece konunun daha iyi anlaşılmasına yönelik olarak ve hiçbir sınırlayıcı etki oluşturmayacak şekilde açıklanmaktadır.

5

Buluş, invertaz enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere; biyobozunur özelliğe sahip akrilamid türevli gall kompozit polimer üretimidir.

Buluş konusu kompozit polimerin üretim metodu:

10 Şekil 1 de görüldüğü gibi, invertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere; akrilamid-0,1 g gall (AG1) **hidrojeli**, akrilamid-0,3 g gall (AG3) **hidrojeli**, akrilamid-Fe nanopartikülü (FeNP) - 0,3 g Gall (AG3F) **kompozit hidrojeli** hazırlanmaktadır. Buluşun tercih edilen uygulamasında, hidrofilik özellikte akrilamid seçilmiştir. Akrilamidin hidrofilik özellikte olması, su ve polar çözücüde kolay çözünebilmesini sağlamaktadır. Bu sayede, sentez için herhangi

15 bir yapay organik çözücüye ihtiyaç duyulmamaktadır.

- **AG1 hazırlanışı:**

0,1 mol AAm (akrilamid) 10 mL suda çözüldü. Suda çözülmüş, monomer karışımının %5'i

20 kadar çapraz bağlayıcı (N,N'-metilenbisakrilamid (NNMBA), % 0.1'i kadar başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) eklendi. Bu karışıma 0,1g gall ekleyerek, hızlı bir şekilde 1.68 mmol N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ekleyerek, 3-4 mm çapında pipetlere doldurulup oda sıcaklığında (22°C) bekletilmiştir. Uzun silindirik yapıda elde edilen kompozit hidrojeller, pipetlerden çıkarılarak 3-4 mm boyutlarında kesilmiş, çift damıtık suda yıkanıp

25 havada ve vakum etüvde kurutulmuştur.

- **AG3 hazırlanışı:**

0,1 mol AAm (akrilamid) 10 mL suda çözüldü. Suda çözülmüş, monomer karışımının %5'i

30 kadar çapraz bağlayıcı (N,N'-metilenbisakrilamid (NNMBA), % 0.1'i kadar başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) eklendi. Bu karışıma 0,3g gall ekleyerek hızlı bir şekilde 1.68 mmol N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ekleyerek 3-4 mm çapında pipetlere doldurulup oda sıcaklığında (22°C'ta) bekletilmiştir. Uzun silindirik yapıda elde edilen kompozit hidrojeller pipetlerden çıkarılarak 3-4 mm boyutlarında kesilmiş, çift damıtık suda

35 yıkanıp havada ve vakum etüvde kurutulmuştur.

- **AG3F hazırlanışı:**

0,1 mol AAm (akrilamid) 10 mL suda çözüldü. Suda çözülmüş, monomer karışımının %5'i kadar çapraz bağlayıcı (N,N'-metilenbisakrilamid (NNMBA), % 0.1'i kadar başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) eklendi. Bu karışıma 0,3 g gall ve 0,1 g nano Fe ekleyerek hızlı bir şekilde 1.68 mmol N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED) ekleyerek 3-4 mm çapında pipetlere doldurulup oda sıcaklığında (22°C'ta) bekletilmiştir. Uzun silindirik yapıda elde edilen kompozit hidrojel pipetlerden çıkarılarak 3-4 mm boyutlarında kesilmiş, çift damıtık suda yıkanıp havada ve vakum etüvde kurutulmuştur.

İnvertazın, elde edilen NAI hidrojellerine immobilizasyonu:

İnvertazın immobilizasyonu için; yaklaşık 1 g AG1, AG3 ve AG3F kompozit polimerleri, 50 mL 1 mg ml⁻¹'lik invertaz çözeltisine eklenir. Çalkalamalı karıştırıcıda 32 °C'ta 150 rpm karıştırma ile 3 saat bekletilir. Böylece AG1 hidrojeline immobilize olmuş invertaz, AG1I; AG3 hidrojeline immobilize olmuş invertaz, AG3I; ve AG3F hidrojeline immobilize olmuş invertaz, AG3FI oluşturulur. Immobilize invertazlar; damıtık su ve 50 mM CH₃COOH-CH₃COONa (pH;4.8) tamponunda yıkanır. Denemelerde kullanılan dek +4 °C sıcaklıkta saklanır.

Buluş konusu kompozit hidrojellerin karakterizasyonu:

İnvertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere hazırlanan AG1, AG3 ve AG3F kompozit hidrojellerin karakterizasyonu için; şişme denemeleri, FT-IR/ATR spektroskopik analizi yapıldı ve SEM görüntüleri alındı.

- ***Şişme Deneyleri:***

Bir hidrojelın şişme özelliği immobilize edilecek enzim ve onun substratla etkileşimi açısından da önemlidir. Hidrojellerin çözücü ortamında şişebilmeleri, çözücü ve hidrojellerin doğası ile yakından ilgilidir. Hazırlanan kompozit hidrojellerin kinetik şişme denemeleri kütle ölçüm yöntemiyle yapıldı. % şişme (%S) değerleri Eşitlik 1'den hesaplandı.

$$\% S = \frac{m_t - m_o}{m_o} \times 100 \quad (1)$$

Burada m_o: hidrojelın başlangıç kütlesi; m_t: hidrojelın dengedeki kütlesidir.

- pH Duyarlı Denge Şişme Deneyleri

Hazırlanan kompozitlerin şişme davranışlarının pH duyarlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla pH 3-11'e ayarlanmış asetat ve fosfat tamponları içinde 25 °C sıcaklığında denge şişme denemeleri yapılmıştır. Bunun için; değişik pH'taki (pH 3-9) denge şişme denemeleri için 50 mM CH₃COOH-CH₃COONa ve 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ tamponları kullanıldı. Kuru kütlesi tartılan AG1, AG3 ve AG3F kompozit hidrojelleri tampon çözeltilere konarak 25°C'ta dengeye gelmeleri beklendi. Dengede şişen hidrojeller çözeltilerden alınarak kurulanıp tartıldı. pH'ya karşı çizilen % S değerlerinin oluşturduğu şişme davranışının pH ile değişimi grafikleri Şekil-2'de gösterilmiştir.

Şekil 2 hidrojelin şişme davranışının ortamın pH sına duyarlı olduğunu göstermiştir. AG1 in şişme değerleri genelde % 150 civarlarındayken AG3 ün % 50-100 arasında seyrettiği tespit edilmiştir. Fakat Fe nanoparçacıklar ilave edildiğinde pH: 8 den sonra % 100 ve üzerinde olduğu görülmüştür. AG1 in şişme değerlerinin bu kadar yüksek olmasının nedeni; düşük miktarda Gall in, akril amidin fonksiyonel gruplarını tam olarak kapatmamasından dolayı karboksilli grupların iyonlaşmasından kaynaklanır. Gall miktarının artması ve birde Fe nanoparçacıklarının da tutunmasıyla % şişme değeri düşmüştür. Bununla birlikte Fe nanopartiküller yüksek pH da daha stabil oldukları için, gall daki fonksiyonel grupların suda iyonlaşmasıyla şişme değerinde artış görülmüştür. İnsan kanın pH değeri 7.4 olduğundan, bu değerden sonra yapıdaki şişme değerinin artması da immobilasyon için çok uygun olduğunun göstergesidir. Aynı zamanda Takafuji ve arkadaşları da polimerlerin nanoparçacıklar ile farklı pH larda şişme özelliklerinin değişebileceğini göstermişlerdir [9]. Genel olarak düşük pH larda nanoparçacıkla şişme özelliğinin değişimi Şekil 3 de görülmektedir. Şekil 3 deki şişme özelliği; bir kompozit polimerin ilacı ne kadar tutacağını göstergesidir.

25

2.4. SERBEST VE İMMOBİLİZE İNVERTAZ DENEYLERİ

2.4.1. Aktivite Analizi

Serbest ve immobilize invertaz aktivitesinin saptanması için enzimler sukroz çözeltisi ile etkileştirildi. Sukroz hidrolizi gerçekleştirildikten sonra oluşan glukoz miktarı glukoz analiz kiti yardımıyla spektrofotometrik olarak saptandı.

30

2.4.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Serbest ve immobilize invertazın optimum pH'sının belirlenmesi için 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi farklı pH'lardaki tampon çözelti (pH: 3-9) içinde hazırlandı. Örnekler 37 °C'ta 5 dakika bekletildikten sonra her birine 100 µL 1 mg mL⁻¹ 'lik serbest invertaz eklenip aktivite analizi gerçekleştirildi. Aynı denemeler yaklaşık 0.6 g şişmiş AG1I, AG3I ve AG3FI eklendikten sonra yapılarak immobilize invertazlar ile aktivite analizi gerçekleştirildi.

Sukroz hidrolizinde kullanılarak aktiviteleri saptanan invertazların değişen pH değerine karşın gelen % aktivite değerleri Şekil 4 deki grafikte görülmektedir.

AG1 in aktivitesi en yüksek olmasına rağmen, Gall miktar arttığında invertazın aktivitesinin düştüğü görülmüştür (Şekil 4). Fakat FeNP sayesinde pH: 5 den sonra invertazın aktivitesi nanoparçacıksız haline göre 2 kat artmıştır. Uzun ve arkadaşları da polyvinylimidazole ü demir oksit nanopartikülleriyle immobilize etmiş, fakat 300mM sukroz varlığında invertaz enziminin aktivitesini arttıramamışlardır [10]. Benzer bir şekilde yine Uzun ve arkadaşları polyamidoamine polimeriyle aynı denemeleri yapmış ve yine aynı şekilde invertaz enziminin aktivitesini arttıramamıştır [11]. Literatürün genelinde FeNP ile enzimlerin aktivitesinde çok iyi bir artışa rastlanmamıştır. Ancak, buluş konusu çalışmayla, invertaz enziminin bu tür polimerler ve FeNP ile aktivitesinde kesin bir artış olduğu ispatlanmıştır.

2.4.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Serbest ve immobilize invertazın optimum sıcaklığının belirlenmesi için 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi 50 mM asetat (pH; 5) tamponunda hazırlandı. Örnekler değişik sıcaklıklarda (20-70 °C) 5 dakika bekletildi. Bu çözeltilere serbest invertaz aktivitesinin saptanması için 100 µL (1mg mL⁻¹) invertaz, immobilize invertaz aktivitesinin eklenmesi için 0.6 g şişmiş AG1I, AG3I ve AG3FI eklenerek aktivite analizi gerçekleştirildi.

Sukroz hidrolizinde kullanılarak aktiviteleri saptanan invertazların değişen sıcaklık değerine karşın gelen aktivite değerine gösteren grafik Şekil 5 de yer almaktadır.

Şekil 5'dan görüleceği gibi AG1, AG3 ve AG3F 'nin optimum sıcaklık değerleri değişkenlik göstermiştir. AG3 sıcaklıkla parabolik bir düşüş gösterirken, AG1 40-60 °C de ve AG3F ise sıcaklıkla artarak 55 °C de % 100 ün üzerine çıkmıştır. İnsan vücudu sıcaklığı civarında AG3 ve AG3F, AG1 e göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Uzun ve arkadaşlarının yaptığı her iki çalışmada aktivite 37 °C civarlarında % 70-75 iken, yapılan çalışmalar sonucunda bu değerlerin % 80 nin üzerinde olduğu görülmüştür. [10-11]. Kaldı ki literatürdeki diğer örneklerde % 80 aktivitenin üzerine çok fazla çıkamamışlardır [2-3].

KAYNAKLAR

- [1] D. Combes, P. Monsan, Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition, *Carbohydrate Research*, 117 (1983) 215-228.
5
- [2] Keith F. Tipton, Henry B.F. Dixon, Effects of pH on enzymes, *Methods in Enzymology*, 63 (1979) 183-234.
- [3] C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential
10 of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353 (2011) 2885–2904.
- [4] L. Gomez, H.L. Ramirez, G. Cabrera, B.K. Simpson, R. Villalonga, Immobilization of
15 invertase-chitosan conjugate on hyaluronic-acid-modified chitin, *Journal of Food Biochemistry*, 32 (2008), 264–277.
- [5] V.P. Torchilin, Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 11 (2000) 81–91
- [6] L. Juillerat-Jeanneret, F. Schmitt, Chemical modification of therapeutic drugs or drug
20 vector systems to achieve targeted therapy: looking for the grail. *Res Rev* 27 (2007) 574–590
- [7] G. Hongwei, X. Keming, Y. Zhimou, CK. Chang, B. Xu, Synthesis and cellular uptake of porphyrin decorated iron oxide nanoparticles—a potential candidate for bimodal anticancer therapy. *Chem Commun* 34 (2005) 4270–4271
25
- [8] CV Mura, MI Becker, A Orellana, D Wolff, Immunopurification of Golgi vesicles by magnetic sorting. *J Immunol Methods* 260 (2002) 263–271
- [9] M. Takafuji, S. Yamada, H. Ihara, Strategy for preparation of hybrid polymer hydrogels
30 using silica nanoparticles as multifunctional crosslinking points, *Chem. Commun*, 47 (2011) 1024-1026.
- [10] K. Uzun, E. Çevik, M. Şenel, A. Baykal, Reversible immobilization of invertase on Cu-chelated polyvinylimidazole-grafted iron oxide nanoparticles, *Bioprocess Biosyst Eng* 36
35 (2013) 1807–1816.

[11] K. Uzun, E. Çevik, M. Şenel, H. Sözeri, A. Baykal, M. F. Abasıyanık, M. S. Toprak, Covalent immobilization of invertase on PAMAMdendrimer modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *J Nanopart Res* 12 (2010) 3057–3067

İSTEMLER

1. Bir kompozit polimer olup, özelliği; akrilamid, su, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, gall ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin içermesidir.

5

2. İstem 1'e uygun kompozit polimer olup, özelliği; Fe içermesidir.

3. İstem 1'e uygun kompozit polimer olup, özelliği; bahsedilen çapraz bağlayıcı, N,N'-metilenbisakrilamid dir.

10

4. İstem 1'e uygun kompozit polimer olup, özelliği; bahsedilen başlatıcı, amonyum persülfattır.

5. Bir kompozit polimer üretim metodu olup, özelliği;

15

a) akrilamidin, suda çözülmesi,

b) suda çözülmüş monomer karışımına, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenmesi,

c) elde edilen karışıma gall ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin eklenmesi,

20

işlem adımlarını içermesidir.

6. İstem 5'e uygun üretim metodu olup, özelliği; b işlem adımında bahsedilen çapraz bağlayıcı, N,N'-metilenbisakrilamid dir.

25

7. İstem 5'e uygun üretim metodu olup, özelliği; b işlem adımında bahsedilen başlatıcı, amonyum persülfattır.

8. İstem 5'e uygun üretim metodu olup, özelliği; c işlem adımında elde edilen karışıma, Fe eklenmesidir.

30

35

ÖZET**Akrilamid Türevli Gall Kompozit Polimerlerinin Üretimi**

- 5 Akrilamid, su, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, gall ve N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin içeren bir kompozit polimer ve bu polimerin üretim metodu ile ilgilidir.

Şekil 1