

# Enzimatik polimerizasyon yöntemi ile polilaktik asit sentezi ve biyobozundurulması

**Didem OMA Y\*, Yüksel GÜVENİLİR**

*İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul*

## Özet

*Bu çalışmada, enzimatik halka açılımı polimerizasyon yöntemi kullanılarak polilaktik asit sentezi gerçekleştirilmiş ve elde edilen polimerin proteaz enzimi ile biyobozundurulması incelenmiştir. Candida cylindracea lipaz katalizörlüğünde laktitten halka açılımı reaksiyonunun optimize edilmesi amacıyla, reaksiyon şartları değiştirilerek farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen polimerizasyon işlemlerinde, reaksiyona giren Candida cylindracea lipaz konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan polilaktik asitin molekül ağırlığı, polidispersitesi ve dönüşüm verimi değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen polilaktik asit, proteaz DSM enzimi ile biyobozundurma işlemine tabii tutulmuş ve polimerin yapısındaki ester grupları ile biyobozundurma mekanizması takip edilmiştir. Biyobozunma süresince molekül ağırlığı kaybı izlenmiş ve orjinal polimerin morfolojik ve termal geçiş özelliklerinin değişimi incelenmiştir. Candida cylindracea lipaz kullanılarak laktitin halka açılımı polimerizasyonunda, yüksek molekül ağırlıklı polimer sentezinde, en uygun reaksiyon şartı, sıcaklığın 80°C ve lipaz konsantrasyonunun ağırlıkça %4 olduğu durum olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerinde, sabit enzim konsantrasyonunda, sürenin artmasıyla birlikte molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü belirgin bir şekilde artış göstermiş, polidispersite değerleri yaklaşık 1.5 civarında olan polimerler sentezlenmiştir. Proteaz DSM ile yapılan biyobozundurma işlemi sonucunda ise, ilk 15 günlük süre içerisinde, polimerin bozunmasına ilişkin molekül ağırlığı kaybı son derece düşük seviyede olduğu, bu süreden sonra molekül ağırlığı kaybunda belirgin bir artış gözlenerek 90 günlük süre sonunda %23'lük bir kayıp meydana geldiği saptanmıştır. Biyobozundurma işlemine tabii tutulan polimerin çeşitli özellikleri incelenerek orjinal polimer ile arasındaki farklar tespit edilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Lipaz, halka açılımı polimerizasyonu, biyobozunma.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Didem OMA Y. omayd@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 68 78.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Programında tamamlanmış olan "Yemekhane atıklardan poli(L+) laktik asit'in enzimatik polimerizasyonu ve sentezlenen polimerin karakterizasyonu ve biyobozundurulması" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 19.02.2010 tarihinde dergiye ulaşmış, 18.03.2010 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.08.2011 tarihine kadar dergiye gönderilmiştir.

Bu makaleye "Omay, D., Güvenilir, Y., (2011) 'Enzimatik polimerizasyon yöntemi ile polilaktik asit sentezi ve biyobozundurulması', İTÜ Dergisi/D Mühendislik, 10: 2, 81-90" şeklinde atıf yapabilirsiniz.

## Enzymatic polymerization and biodegradation of polylactic acid

### Extended abstract

Because of its biocompatibility and degradability to non-toxic products, polylactic acid (PLA) based polymers and copolymers have been employed in novel applications, such as absorbable bone plates, artificial skin, tissue scaffolds, and carriers of drugs for controlled release systems.

Enzymatic polymerization using lipase has been receiving much attention as one of the new methodologies that provide biodegradable polymer synthesis without toxic catalysts. Lipases are the most versatile biocatalysts because they can be applied to the synthesis of a wide range of substrates with a high stereospecificity and enantioselectivity.

In general lipases used in polyester synthesis are of mammalian (Porcine pancreatic lipase (PPL)), fungal (*Candida antarctica* lipase B (CAL)), or bacterial origin (*Pseudomonas cepacia* (PCL)).

The hydrolytic degradation of PLA polymers has been extensively investigated. It is now well known that degradation of macroscale PLA devices is heterogeneous: it is faster inside than at the surface. This phenomenon has been assigned to an internal autocatalytic effect of carboxyl end groups.

Biodegradation of PLA polymers in soil under natural conditions has also been examined. It was reported that degradation by-products resulting from the hydrolytic degradation can be totally assimilated by microorganisms such as fungi, bacteria, or earthworms, thus indicating that PLA polymers are environmentally benign materials. Hydrolysis reactions may be catalyzed by enzymes known as hydrolases, which include proteases, esterases, glycosidases, and phosphatases, among others. This class of enzymes comprises cell-derived proteins that are responsible for the catalysis of several reactions in the human body. The degradation of PLA in the presence of enzymes has been investigated by many groups. Early in 1981, it was found that proteases showed strong effects on PLLA degradation.

In this work, polylactic acid was prepared by lipase catalyzed ring opening polymerization of lactide. Enzymatic polymerization was performed with *Candida cylindracea* lipase, enzyme and the effect of

enzyme concentration, temperature and time parameters on polymerization mechanisms were investigated in detail. A typical procedure for the polymerization of lactide using *Candida cylindracea* lipase is described as follows. To a mixture of lactide (2.50 mmol) and toluene (0.72 mL) at 80 and 100°C was added *Candida cylindracea* (2 and 4 wt.-%) under nitrogen atmosphere at different times (1-7 days). After the reaction, the enzyme was removed by filtration and the polymer was isolated by precipitation in chloroform. Then degradation mechanisms were examined. PLLA films were prepared using a solvent casting method. One gram of PLLA was dissolved in 20 mL of chloroform while mixing vigorously at room temperature. The dissolved solution was poured onto a leveled Teflon film coated glass plate, spread evenly with a bent glass rod and then allowed to dry for about 24 h at room temperature. The resultant film was peeled from the casting surface. Each of polymeric films were placed in test tubes and dipped in 5 mL of DSM protease solution (50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6). The test tube was sealed and kept constant at 37°C for a predetermined period and enzyme solutions were added every 48 h so that enzyme activity remained at a desired level throughout the experiment. The time course of the weight loss and enzymatic degradation were evaluated and the appearance of the samples was examined. It was found that the L-lactide was polymerized in bulk by *Candida cylindracea* lipase between 3 and 7 days, in a temperature range 80-100°C to yield the polylactide with an  $M_w$  of up to 69800 g.mol<sup>-1</sup>. Both the conversion and  $M_w$  of the resultant polymeric fraction increased with increasing reaction time 3 days to 7 days respectively at constant lipase concentrations. The chemical structures of the degraded polymer samples were characterized using DSC, FTIR and XRD. The molecular weight of the polymer samples after enzymatic degradation process with protease DSM, decreased 25% after 2 months degradation period. PLA polymers investigated in this study showed degradation as illustrated by the decrease in molecular weight, disappearance of amorphous phase and formation of micro fractures and acicular structures. After detailed evaluation of biocompatibility and toxicity of PLAs, it is expected that they will take the petroleum-based plastics' place in future.

**Keywords:** Lipase, ring opening polymerization, biodegradation.

## Giriş

Polilaktik asit laktik asit türevi olan biyobozunabilen bir polimerdir. Mısır, şeker ve un gibi nişasta içeriği fazla kaynaklardan elde edilebilir. Polilaktik asit petrol kaynaklı plastiklerden daha iyi özelliklere sahip olduğu için günümüzde çok tercih edilen bir biyopolimer halini almıştır.

Organik çözücüler içersinde enzim katalizli reaksiyonlar son birkaç yıldır sentez çalışmaları içersinde önemli bir yere sahip olmuş ve enzim katalizli polimerizasyon yöntemleri, polimer sentezi konusunda yeni bir metot halini almıştır. Hidrolazlar sınıfına ait olan enzimler doğal ve/veya sentetik polisakkaritlerin sentezi için uygundur. Bunun yanı sıra, uygun kaynaklardan izole edilmiş lipaz kullanılarak biyosentetik olmayan proseslerin sentez uygulamaları geniş araştırmalar kapsamındadır. Lipaz yağ asitlerini canlı sistemlerde hidrolize eden ve esterleşme ve trans-esterleşme reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Lipazın katalitik özellikleri nedeniyle poliester sentezi, çeşitli polimerizasyon modelleriyle gerçekleştirilebilir: oksikarbosiklik asit türevlerinin polikondenzasyonu ve dikarboksilik asit türevlerinin kombinasyonu (Namekawa vd.,1999).

Biyobozunma, polimerlerin karbon dioksit, metan, su, inorganik bileşikler ya da mikroorganizmalarla meydana getirdikleri enzimatik reaksiyonları sonucunda oluşan biyolojik kütlelere ayrışabilme yeteneği olarak tanımlanabilir. Biyobozunma, genellikle mikroorganizmalar ve enzimlerin varlığında gerçekleşen katabolizma reaksiyonlarıyla organik maddelerin bozunmaya uğraması olayıdır. Doğada meydana gelen bozunma ise, termal aktivasyon, hidroliz, biyolojik aktivite, oksidasyon, fotoliz ve radyoliz yollarıyla meydana gelir. Bozunma olayları, maddenin kimyasal yapısında önemli değişikliklere sebep olur. Bozunma sonucu oluşan son ürünler, aerobik ortamda karbon dioksit, yeni biyokütle ve su; anaerobik ortamda ise metandır. Bozunma analizinde aktiviteyi etkileyen sıcaklık, pH, nem gibi koşulların kontrol altında tutulması önemli bir faktördür. Biyobozunma, polimerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine de bağlıdır. Bu özellikler, difüzyon, porozite, morfoloji, saflık, çapraz bağlanma, kimyasal reaktivite, mekanik

dayanım, ısı tolerans ve elektromanyetik radyasyona olan dayanımdır. Ayrıca, hidrofobik karakter, makromoleküler ağırlık, kristalinite gibi parametrelerdeki artış, biyobozunma oranını düşürürken, bozunma ortamında polisakkaritlerin varlığı, biyobozunmayı kolaylaştırır (Shimao, 2001).

Bu çalışmada *Candida cylindracea* lipaz enzimi katalizörlüğünde laktitin halka açılımı polimerizasyon mekanizması incelenmiştir. Polimerizasyon reaksiyonunun optimum şartları tespit edilmiş ve oluşan polimerlere ait molekül ağırlığı, dönüşüm verimi ve polidispersite değerleri tespit edilmiştir. Sentezlenen polimer proteaz DSM enzimi ile bozundurulmuş ve oluşan bozunma ürününün termal ve morfolojik özellikleri analiz edilmiştir.

## Materyal ve yöntem

Proteaz DSM Cognis Kim. A.Ş. firmasından, *Candida cylindracea* lipaz Novozyme firmasından tedarik edilmiştir. Sentez işlemlerinde kullanılan toluen Merck firmasından temin edilmiştir.

İlk adımda, polilaktik asit sentezinin gerçekleştirilmesi amacıyla, 2.5 mmol laktit dimeri ve 0.72 ml toluenle karıştırılmış ve ağırlıkça monomer miktarlarına bağlı olarak farklı konsantrasyonlardaki (%2-4) *Candida cylindracea* lipaz ile değişik sıcaklık (80-100°C) ve sürelerde (1-7 gün arasında) azot atmosferinde muamele edilmiştir. Reaksiyon süresi tamamlandığında reaksiyona girmeyen enzimin alınması için bir miktar kloroform ilave edilmiş ve bundan sonra çözelti bir süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Kalan çözeltideki kloroform tamamen uçurulduktan sonra elde edilen polimer gerekli analizlere tabi tutularak karakterize edilmiştir.

İkinci adımda biyobozundurma prosesine tabii tutulan polimer filmlerinin hazırlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Polilaktik asit filmleri 'solvent casting' yöntemi ile hazırlanmıştır. 1.0 g polimer 20 mL kloroform içersinde oda sıcaklığında (yaklaşık 23°C) karıştırılarak çözülmüştür. Bu karışım 24 x 30 cm büyüklüğünde üzeri teflonla kaplanmış cam yüzeye yayılmış ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bira-

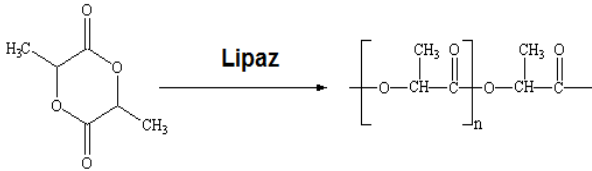
kılmıştır. Oluşan polimer filmi yüzeyden kazınmıştır.

Üçüncü adımda ise, hazırlanan polilaktik asit filmleri belirli büyüklüklerde kesildikten sonra proteaz DSM enzim çözeltisi içerisinde bekletilerek enzimatik bozundurma sağlanmıştır. Kullanılan proteaz DSM enziminin aktivitesi, Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.6) kullanılarak 40 unit/ml değerine ayarlanmıştır. Enzim çözeltisi 48 saatte bir yenilenerek enzim aktivitesi sabitlenmiştir. 37°C'de çalkalamalı su banyosunda PLLA filmi, enzim çözeltisiyle muamele edilmiştir. Polimer filmler analiz edilmeleri amacıyla, 4°C'de distile su ile yıkanarak bozundurma işlemi durdurulmuştur ve etüvde 70°C'de 2 saat kurutulduktan sonra gerekli analizler yapılmıştır.

## Deneysel çalışma sonuçları

### Polilaktik asitin enzimatik polimerizasyonu

Laktit dimeri kullanılarak *Candida cylindracea* lipaz enzimi katalizörlüğünde halka açılımı reaksiyonu Şekil 1'deki mekanizma ile meydana gelmiştir.

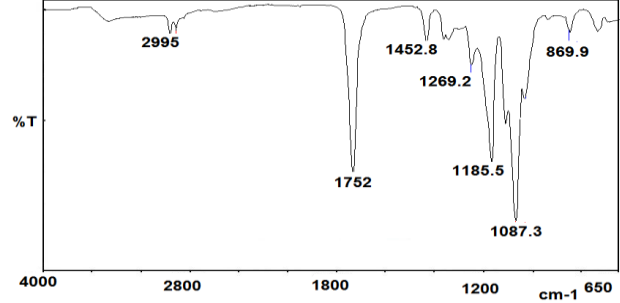


Şekil 1. Halka açılımı polimerizasyon yöntemi ile polilaktik asit sentez adımı

*Candida cylindracea* lipaz katalizli halka açılımı reaksiyonu, 80°C'de ve toplam monomerin (360 mg laktit) ağırlıkça %2'si (7.2 mg) oranında *Candida cylindracea* lipaz eşliğinde herhangi bir başlatıcı kullanılmadan, toluen varlığında, 72 saat boyunca karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu sonucunda ele geçen ürünün karakterizasyonu FTIR, <sup>1</sup>H NMR ile analiz edilmiştir.

Elde edilen PLLA'nın karakterizasyonu için FTIR spektrumları kullanılmıştır. Şekil 2'de verilen infrared spektrumları incelendiğinde, en belirgin pikler, 2900-2800 cm<sup>-1</sup>'deki C-H gerilimi, 1750 cm<sup>-1</sup>'deki C=O gerilimi, ve 1300-

1000 cm<sup>-1</sup>'deki C-O gerilimi olup polilaktik asit yapısına ait belirgin pikler açıkça görülmektedir. Bu durum oluşan ürünün polilaktik asit olduğunu ispatlamaktadır.

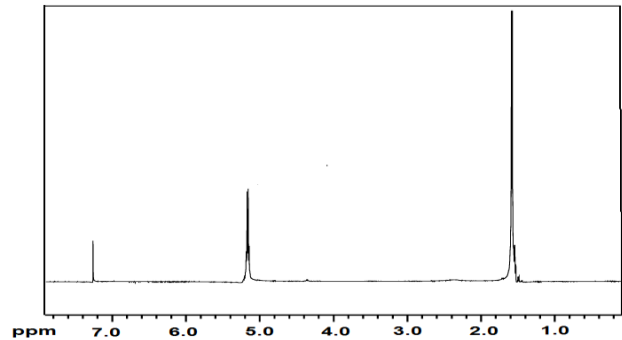


Şekil 2. Yüksek molekül ağırlıklı PLLA'ya ait FTIR spektrumları

Literatür çalışmaları incelendiğinde, 1745 cm<sup>-1</sup>'deki C=O geriliminin belirgin olarak PLA'yı sembolize ettiği belirtilmektedir (Xu vd., 2005).

Elde edilen polimerin karakterizasyonu için <sup>1</sup>H NMR spektrumları incelenmiştir. Şekil 3 incelendiğinde, 5.1 ve 5.3 ppm'de elde edilen sinyal tekrarlayan laktik asit ünitelerindeki CH<sub>3</sub> protonlarını, 4.4 ppm'deki sinyal polimerin uç grup -CH protonlarını ve 1.6 ppm'deki sinyal ise, metil protonlarını ifade etmektedir.

Enzim katalizli halka açılımı polimerizasyonunun optimize edilmesi amacıyla, reaksiyon şartları değiştirilerek deneyler tekrarlanmıştır. Reaksiyonlar 80, 90 ve 100°C'de gerçekleştirilmiş ve reaksiyona giren *Candida cylindracea* lipaz konsantrasyonu değiştirilerek oluşan PLLA'nın molekül ağırlığı, polidispersitesi ve dönüşüm verimi üzerine etkisi incelenmiştir.



Şekil 3. PLLA'ya ait <sup>1</sup>H NMR spektrumları

Enzim konsantrasyonu monomer miktarının ağırlıkça %2'si olarak kullanılarak 80 ve 100°C'de farklı sürelerde polimerizasyon deneyleri yapılmış ve bu deneysel çalışmalar sonucunda, 80°C'de 48 saatte 7700 g.mol<sup>-1</sup> molekül ağırlıklı polimer elde edilirken, 72 saat sonunda %52.9 dönüşüm verimi ile 17980 g.mol<sup>-1</sup> molekül ağırlıklı polimer sentezlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Polilaktik asitin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%2 *Candida cylindracea* lipaz, 80°C)

Süre (saat)	Dönüşüm (%)	Molekül ağırlığı (M <sub>n</sub> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
24	--	--	--
36	--	--	--
48	36.7	7700	1.34
72	52.9	17980	1.48

Aynı enzim konsantrasyonunda sıcaklık 100°C'ye çıkarılarak deneyler tekrarlanmış ve elde edilen polimerlerin karakterizasyonu FTIR ile tespit edilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi, 100°C'de gerçekleştirilen siklik dimerin halka açılımı reaksiyonunda, molekül ağırlığı 4640 ve 14944 g.mol<sup>-1</sup> olan polimerler sırasıyla, 48 ve 72 saat sonunda, %27.6 ve %44.8 dönüşüm verimleri ile elde edilmiştir. Tablo 2'den izlenebileceği gibi, laktitin enzim katalizli halka açılımı polimerizasyonunda, sürenin etkisiyle polimerin molekül ağırlığında ve polimerin dönüşüm yüzdesinde artış gözlenmiştir. Ancak iki sıcaklık değeri için, sabit sürelerde izlenen dönüşüm verimi değerlerinde, sıcaklık arttıkça azalan bir eğilim saptanmıştır.

Tablo 2. Polilaktik asitin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%2 *Candida cylindracea* lipaz, 100°C)

Süre (saat)	Dönüşüm (%)	Molekül ağırlığı (M <sub>n</sub> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
24	--	--	--
36	--	--	--
48	27.6	4640	1.61
72	44.8	14944	1.52

Enzim katalizli polimerizasyon reaksiyonlarında sıkça karşılaşılan bu durum, reaksiyonlarda sürenin ve sıcaklığın eş konumda çok yükselmesiyle, reaksiyonun ilerleyen safhalarında, enzimin yapısında bulunan aktif bölgelerin bir kısmının denatürasyona uğramasından ve enzimatik reaksiyon sıcaklığının artmasıyla da, enzimin karalılığını devam ettirme yeteneğinin azalmasından, dolayısıyla, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen çok uzun reaksiyon koşullarında, verimli bir şekilde substratı dönüştürememesinden ileri gelmektedir.

*Candida cylindracea* lipaz konsantrasyonu %4'e çıkartılıp, polimerizasyon işlemleri tekrarlanmış ve 80°C'deki polimerizasyon reaksiyonunda, 72 saat sonunda 23100 g.mol<sup>-1</sup> molekül ağırlıklı polimer %62.9, 144 saatte 56200 g.mol<sup>-1</sup> molekül ağırlıklı polimer %78.1 ve 168 saat sonunda 69800 g.mol<sup>-1</sup> molekül ağırlıklı polimer %72.4 dönüşüm verimleri ile elde edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Polilaktik asitin ortalama molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%4 *Candida cylindracea* lipaz, 80°C)

Süre (saat)	Dönüşüm (%)	Molekül ağırlığı (M <sub>n</sub> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
36	34.6	7450	1.56
72	62.9	23100	1.44
96	64.3	38540	1.67
144	78.1	56200	1.26
168	72.4	69800	1.35

*Candida cylindracea* lipaz kullanılarak laktitin halka açılımı polimerizasyonu ile yüksek molekül ağırlıklı polimer sentezinde, en uygun reaksiyon şartı, sıcaklığın 80°C ve lipaz konsantrasyonunun ağırlıkça %4 olduğu durum olarak tespit edilmiştir. Bu sıcaklık değerinde, sabit enzim konsantrasyonunda, sürenin artmasıyla birlikte molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Ayrıca polidisperseite değerleri yaklaşık 1.5 civarında olan polimerler sentezlenmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, Novozym 435 ile %25 enzim konsantrasyonunda çalışıldı-

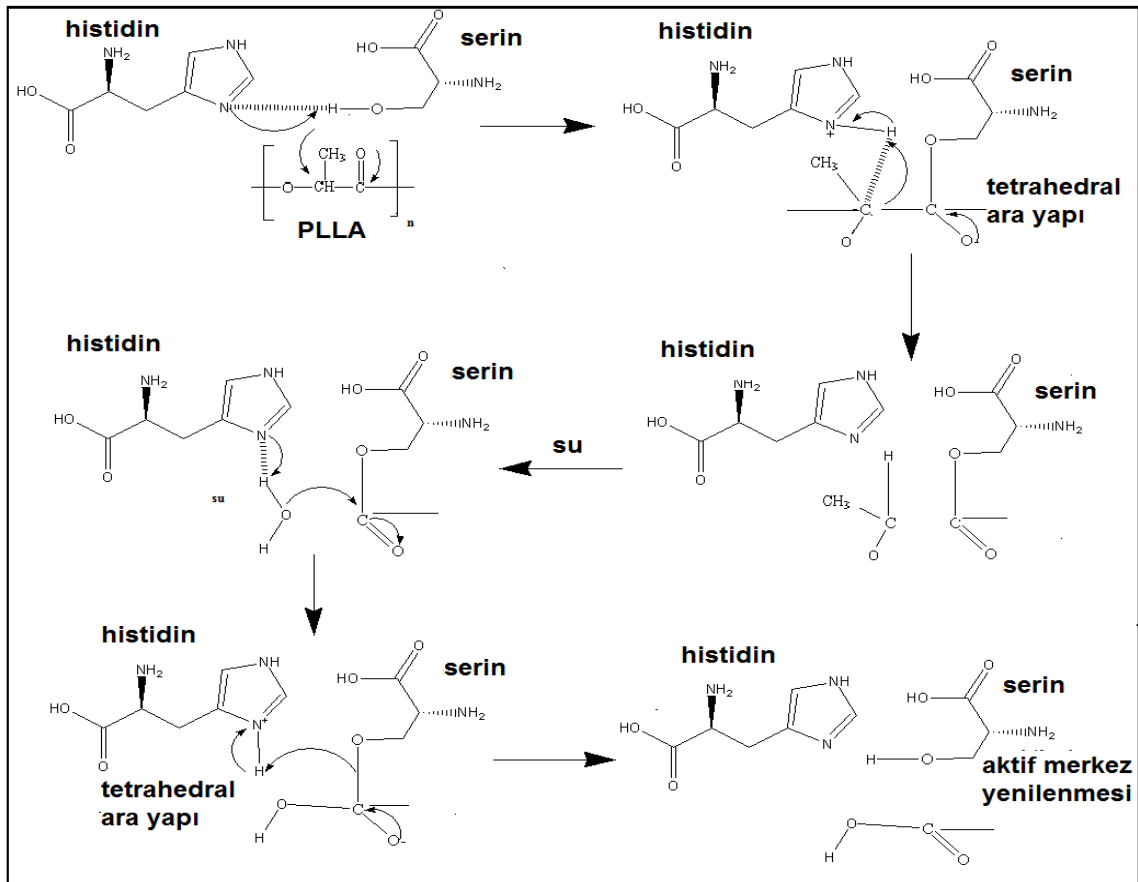
ğında %100 monomer dönüşümü ile poli (d,l-laktik asit) elde edilebileceği bildirilmiştir (Hans vd., 2009). Matsumara vd. (1999), LLA, DLA ve DLLA kullanarak trimetilen karbonat ile bulk sistemde, *Porcine pancreatic* lipaz kullanarak 80-100°C aralığında molekül ağırlığı 12000-21000 g.mol<sup>-1</sup> olan polimerler sentezlemişlerdir. Son yıllarda PS lipaz katalizörlüğünde, 140°C'de dallanmış polilaktit sentezi gerçekleştirilmiştir (Numata vd., 2007).

### Polilaktik asitin proteaz DSM enzimi ile biyobozundurulması

Proteaz DSM serin proteaz grubunun bir alt sınıfı olan alkalın proteaz grubunda bir enzimdir. Alkalın proteaz enzimleri, protein yapısındaki peptid bağlarını parçalamaktadır. Bir alkalın proteazın katalitik mekanizmasını inceleyecek olursak, enzimin aktif merkezinde histidin (His 57), serin (Ser 195) ve aspartik asit (Asp 102) olmak üzere üç ana amino asit bulunmaktadır. Bu amino asitler enzimin aktif merkezinde bir-

birine çok yakın olarak bulunmaktadırlar. Bu yapılardan serin, bir -OH grubu içermektedir ve bir nükleofil gibi davranarak substrat üzerindeki karbonil karbona etki etmektedir. Şekil 4'ten takip edilebileceği gibi, serin üzerindeki bu -OH grubunda bulunan H bağı, histidin üzerindeki azot tarafından kabul edilerek bir bağ meydana getirir, öte yandan karbonil oksijenin sahip olduğu çift bağ üzerindeki iki elektron, oksijen üzerine taşınarak tetrahedral bir ara yapı meydana getirir (Bone vd., 1984; Hedstrom, 2002).

Azot ve karbon üzerinden oluşan tetrahedral yapı sistemden ayrılır. Daha önce karbonil oksijen çift bağından ayrılan elektronlar geri hareket ederek bağı yeniden meydana getirirler (açıl-enzim ara yapısı). Sistemde bulunan su grubu, histidinin yapısında bulunan N-terminali üzerine tutunarak, karbonil karbona bir atak yapar. Son reaksiyon adımında, serin ve karbonil grubu histidin üzerindeki hidrojene atakta bulunarak, karbonil karbondaki çift bağ yeniden oluşturur.

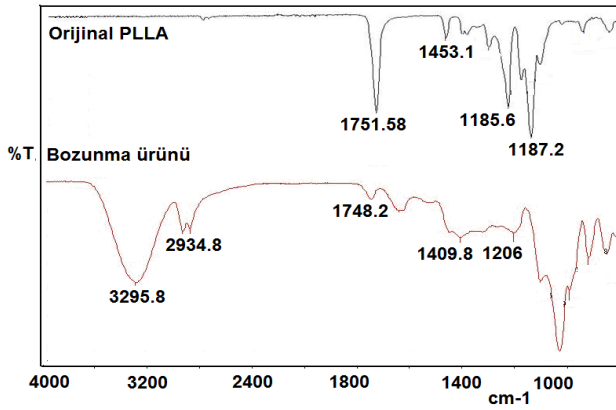


Şekil 4. Proteaz DSM- polilaktik asit bozunma mekanizması



Bu mekanizma ile bozunduran polilaktik asit numunelerinin analiz sonuçları aşağıda yorumlanmıştır.

Şekil 5'te Proteaz DSM enzimi ile gerçekleştirilen bozundurma işlemi sonucunda elde edilen numuneye ve orijinal polimere ait FTIR sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 5. PLLA ile Proteaz DSM ile bozunma ürününe ait FTIR analiz sonucu

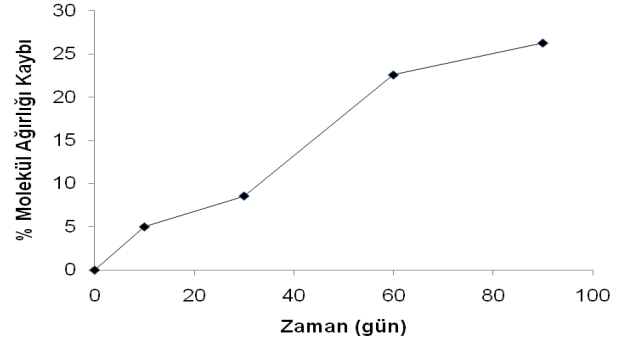
1750  $\text{cm}^{-1}$  frekans değerinde pik veren ester karbonil bağ grubunun geçirgenlik değerinde, büyük bir değişim olduğu görülmüştür. Ayrıca 1450  $\text{cm}^{-1}$  frekans değerinde pik veren simetrik  $\text{CH}_3$  bağının geçirgenliğinde bir değişim gözlenmiştir. 1087  $\text{cm}^{-1}$  frekans değerinde pik veren  $-\text{CO}-\text{O}-$  grubu bağının da geçirgenlik değeri düşüş göstermiştir. % geçirgenlik değerlerinde gözlenen bu büyük değişimler enzimatik bozunma ortamından alınan numunede bozunmanın gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Wang vd. (2005)'nin, yaptıkları çalışmada, solvent casting metodu yardımı ile hazırlanan poli(L-laktit) - blok - poli(2-etit-2-okzazolin) - blok - poli(L-laktit), (PLLA-PEOz-PLLA) triblok kopolimer filmlerinin, proteinaz K ile gerçekleştirilen degradasyonunda, kopolimer ilk 2 saat sonunda belirgin bir molekül ağırlığı kaybına uğramış ve FTIR ile takip edilen proseste bağlar arasındaki geçirgenlik değerlerinde azalmalar ve değişimler izlendiği belirtilmiştir.

Proteinaz K, subtilisin carlsberg, subtilisin BPN gibi enzimlerin farklı konsantrasyonlarında

PLA'yı bozundurduğu literatür çalışmalarında görülmektedir. (Morrison ve Boyd, 1994).

Proteaz DSM ile yapılan bozundurma işleminin PLA'nın molekül ağırlığı üzerindeki etkisi farklı sürelerde alınan numunelerin GPC analizleri ile saptanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Proteaz DSM ile gerçekleştirilen biyobozunma işleminde molekül ağırlığı kaybı

Şekil 6'dan görüldüğü gibi, ilk 15 günlük süre içerisinde, polimerin bozunmasına ilişkin molekül ağırlığı kaybı son derece düşük seviyede gerçekleşmiştir. Bu süreden sonra molekül ağırlığı kaybında belirgin bir artış gözlenmiş 90 günlük süre sonunda %23'lük bir kayıp söz konusu olmuştur. Proteaz DSM enzimi kullanılarak 2 aylık bozundurma işleminde yaklaşık %20'lik molekül ağırlığı kaybı tespit edilmiş olup bu proses için optimum sürenin 2 ay olduğu ön görülmüştür.

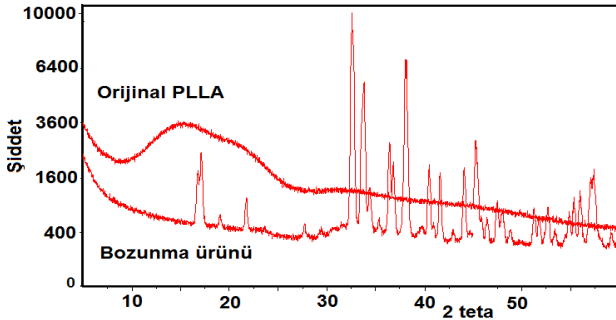
Masaki vd. (2005), yaptıkları çalışmada, yüksek molekül ağırlıklı polilaktik asidi en çok bozunduran enzimlerden biri olan proteinaz K ile gerçekleştirilen 100 saatlik bozundurma işleminin sonucunda %20'lik bir molekül ağırlığı kaybı saptamışlardır. Aynı çalışmada CLE'nin (*Tritirachium album*'dan izole edilen proteinaz K) PLA bozundurulmasında diğer proteaz çeşitlerine göre 500 kat daha etkili olduğu saptanmış ve 80 saat sonunda polimeri tamamen bozundurduğu belirtilmiştir.

Chen vd. (2002), proteinaz K enzimiyle 48 saat boyunca PLGA'yı bozundurarak, %62.5 değerinde molekül ağırlığı değişimini tespit etmişlerdir. Shirahama vd. (2000), alifatik poliesterle-

rin farklı enzimlerle bozundurulmasını esterazlipaz enzimleriyle gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada kolestrol esteraz enziminin poliesteri 100 saatte tamamen bozundurduğu, lipazın ise ilk 50 saatte polimerleri hızlıca bozundurduğu ancak bu süreden sonra bozundurma hızının düştüğü saptanmıştır. Aynı çalışmada, poliesterlerin biyobozundurulması PHB depolimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada uygulanan 5 saatlik bozundurma süresi sonunda yaklaşık %2'lik bir molekül ağırlığı kaybı görülmüştür.

Şekil 7'de proteaz DSM ile yapılan degradasyon işleminin PLA'nın morfolojik yapısında meydana getirdiği değişiklikler görülmektedir. Orijinal PLA'nın XRD desenleri incelendiğinde,  $2\theta=10-30^\circ$  arasında amorf faza sahip olduğu, degradasyona uğramış olan ürünün XRD desenleri incelendiğinde ise,  $2\theta=32.5^\circ, 34^\circ$  ve  $38.5^\circ$  de diffraksiyon pikleri verdiği izlenmiştir.

Bu pikler, kristalin ve/veya sterokompleks kristalleri temsil etmektedir. Bu durum enzimin yapısında bulunan aminoasitlerin, Şekil 4'te açıklanmış olan mekanizma gereğince, polimerin yapısı içerisindeki bağlara tutunarak orijinal polimerin amorf yapısındaki grupları hidroliz etmesinden ileri gelmiştir.



Şekil 7. PLA ile Proteaz DSM bozundurma ürününe ait karşılaştırmalı XRD desenleri

Orijinal polimerin amorf bölgelerinin enzimatik bozunma sonucunda hidrolize uğradığı ve kristalin fazların oluştuğu tespit edilmiştir.

Enzimatik hidroliz iki adımda meydana gelmektedir. İlk adımda enzimatik ortamda bulunan su molekülleri amorf faza difüze olmakta ve bura-

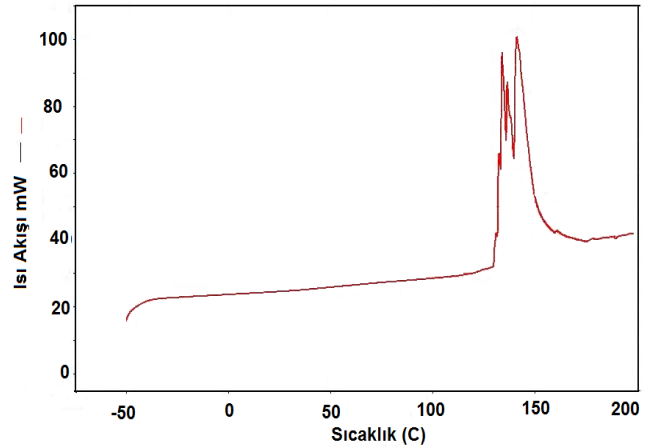
daki ester bağlarını hidroliz ederek yoğun kristalin fazın oluşmasına imkân sağlamaktadır.

Hidrolize olarak bozunmaya uğrayan biyopolimerlerde, amorf fazların hidrolizinin yanı sıra, uç grupların parçalanması da degradasyon işleminin ileri kademesini oluşturmaktadır.

Wang vd. (2005), PLLA-PEOz-PLLA kopolimerinin proteinaz K ile yapılan enzimatik bozundurulması sonucunda, 34 saatlik süre sonunda, amorf fazın tükendiği kristalin yapıların oluştuğunu saptamıştır.

Polimerin biyobozundurulmasından sonra oluşan ürünün ısıl geçişlerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amacıyla DSC analizi yapılmıştır.

Şekil 8'de görüldüğü gibi, polimerin bozundurulması ile ele geçen ürünlerde belirgin bir camısı geçiş sıcaklığı (Tg) değeri saptanamamış ve  $133.17^\circ\text{C}$ 'den itibaren bir bozunmanın gerçekleştiği izlenmiştir.



Şekil 8. Proteaz DSM ile gerçekleştirilen bozunma işleminde DSC desenleri

Bozunma ürünlerinin termal geçişlerinin karakterizasyon eğrisi incelendiğinde,  $127.47$  ile  $165.21^\circ\text{C}$  sıcaklık aralığında polimerin bozunma ürünlerinin dekompozisyonu gözlemlenmiştir. Polimerin bozundurulmasından sonra meydana gelen bozunma ürünleri  $\Delta H=332.05 \text{ J.g}^{-1}$  değerindeki ısının etkisiyle farklı maddelere dönüşmüştür. Bu durum polimerin bozundurulması

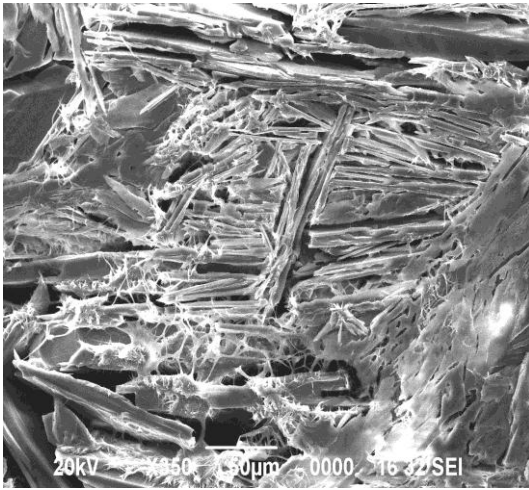


sonucunda polimerin kompozisyonunda değişiklik olduğunu göstermektedir.

PLLA'nın proteaz DSM ile gerçekleştirilen bozunması sonrasında, bozunmuş ürüne ait SEM görüntüleri incelendiğinde, camsı kristallerin ve parlak yıldız şeklinde yapıların meydana geldiği gözlenmiştir. Bu sert ve camsı yapıdan alınan numunenin yüzey morfolojisi incelendiğinde, polimerin düz ve homojen yüzeyinin tamamen değiştiği ve polimerin yüzeyinde mikro kırıklar ve düzensiz çubuksu yapıların meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 9).

Bozunma ürününün yüzeyine yoğunlaştığında uzunlamasına düzensiz çubukların, bu çubukların uç kısımlarında oluşan yıldızimsı yapıların ve aralarda meydana gelen boşlukların, orijinal polimer yüzeyinden belirgin bir şekilde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Orijinal polimerin bozunma sonrasındaki yüzey morfolojisinde meydana gelen bu değişiklikler, poliester yapısındaki polimerdeki zayıf Van der Waals bağlarının ve çapraz (transversal direction) hidrojen bağlarının enzim ile kırılmasından ileri gelmektedir.



Şekil 9. Bozunma ürününe ait SEM analizi sonucu (350 kat büyütme)

## Sonuçlar

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- *Candida cylindracea* lipaz enzimi katalizör-lüğünde laktitin halka açılımı reaksiyonu ile

farklı sıcaklıklar ve farklı sürelerde gerçekleştirilen polimerizasyon işlemleri ile yüksek molekül ağırlıklı polilaktik asit sentezi yapılmıştır.

- En yüksek molekül ağırlığına sahip polimer %4 lipaz konsantrasyonunda, 80°C sıcaklıkta 168 saatlik reaksiyon sunucunda elde edilmiştir. Yapılan tüm reaksiyon koşullarında polidisperse-site değeri 1.5 civarında olan ve dönüşüm verimi zamanla artış gösteren polimerler sentezlenmiştir.
- Sentezlenen yüksek molekül ağırlıklı polilaktik asit proteaz enzimi ile biyobozundurulmuş ve 3 aylık süre zarfında polimerin molekül ağırlığında %23'lük bir kayıp tespit edilmiştir.
- Degradasyon işlemi sonucunda polimerin termal geçişlerinde, amorf fazında ve yüzey morfolojisinde belirgin değişiklikler kaydedilmiştir.

## Kaynaklar

- Bone, M., Shenvis, B.A., Kettner, C.A., ve Agard, D.A., (1987). Serine protease mechanism: Structure of an inhibitory complex of a lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid, *Biochemistry*, **26**, 7609-7614.
- Chen, H., Jiang, X., He, L., Zhang, T., Xu, M. ve Yu, X., (2002). Novel biocompatible waterborne polyurethane using l-lysine as an extender, *Journal of Applied Polymer Science*, **84**, 2474-2479.
- Hans, M., Keul, H. ve Moeller, M., (2009). Ring-opening polymerization of DD-Lactide catalyzed by Novozyme 435, *Macromolecular Bioscience*, **9**, 239-247.
- Hedstrom, L., (2002). Serine protease mechanism and specificity, *Chemical Reviews*, **102**, 4501-4524.
- Masaki, K., Kamini, N.R., Ikeda, H. ve Lefuji, H. (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics, *Applied Environmental Microbiology*, **71**, 7548-7550.
- Matsumura, S., Tsukada, K. ve Toshima, K., (1999). Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)s, *In-*

- ternational Journal of Biological Macromolecules*, **25**, 161-167.
- Morrison, R.T. ve Boyd, R.N., (1994). Organic Chemistry, Polish edition, PWN, Warsaw.
- Namekawa, S., Suda, S., Uyama, H. ve Kobayashi, S., (1999). Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones to polyesters and its mechanistic aspects, *International Journal of Biological Macromolecules*, **25**, 145–151.
- Numata, K., Srivastava, R. K., Finne-Wistrand, A., Albertsson, A. C., Doi, Y. ve Abe, H., (2007). Branched poly(lactide) synthesized by enzymatic polymerization: Effects of molecular branches and stereochemistry on enzymatic degradation and alkaline hydrolysis, *Biomacromolecules*, **8**, 3115-3122.
- Shimao, M., (2001). Biodegradation of plastics, *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 242-247.
- Shirahama, H., Umemoto, K. ve Yasuda, H., (2000). Synthesis and enzymatic degradation of optically active depsipeptide copolymers, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, **10**, 621-639.
- Wang, C., Fan, K. ve Hsiue, G., (2005). Enzymatic degradation of PLLA-PEOZ-PLLA triblock copolymers, *Biomaterials*, **26**, 2803-2811.
- Xu, Q., Pang, M., Peng, Q., Jian Y., Li, J., Wang, H. ve Zhu, M., (2005). Effect of different experimental conditions on biodegradable polylactide membranes, *Journal of Applied Polymer Science*, **98**, 831–837.