



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMER-POLİMER HİBRİT NANOLİF YÜZEYLERE PROTEAZ ENZİMİ
İMMOBİLİZASYONU**

Haluk Çevik

Doç. Dr. Yakup Aykut

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEKSTİL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA-2016


TEZ ONAYI

Haluk ÇEVİK tarafından hazırlanan “POLİMER-POLİMER HİBRİT NANOLİF YÜZEYLERE PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Yakup Aykut

Başkan: Doç. Dr. Yakup Aykut İmza
Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı 

Üye: Prof. Dr. Elif Demirhan İmza
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı 

Üye: Doç. Dr. İdris Çerkez İmza
Bursa Teknik Üniversitesi
Doğa Bilimleri, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi
Lif ve Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı 

Yukarıdaki Sonucu Onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman Demir

Enstitü Müdürü

16/11/2016

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

16/11/2016

İmza

Haluk Çevik

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

POLİMER-POLİMER HİBRİT NANOLİF YÜZEYLERE PROTEAZ ENZİMİ İMMOBİLİZASYONU

Haluk Çevik

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yakup Aykut

Bu tez çalışmasının amacı yüksek spesifik yüzey alanına sahip olan polimerik hibrit nanoliflerden oluşmuş yüzeyler üretilip bu yüzeyler üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle proteaz enzimlerini immobilize ederek immobilizasyonun serbest enzimlere kıyasla aktivitesinde ve tekrarlı kullanımlarda stabilitelemlerindeki değişimleri gözlemlemektir.

Bu kapsamda; poliamit 6, polivinil alkol, selüloz monoasetat, ve polikaprolakton gibi farklı özelliklerdeki polimerlerden albümin, gümüş nanoparçacık, kitosan ve selüloz tri asetat gibi yardımcı kimyasalların da nanolif yapısına katılımıyla hibrit nanolifler üretilmiş, elde edilen nanoliflere proteaz enzimleri immobilize edilerek enzim aktiviteleri ve tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir.

Yapılan deneysel çalışmaların sonucunda, fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonunda selüloz asetat bazlı nanoliflerin yüzey olarak kullanımı en iyi sonuçları vermiştir. Nanolif yüzeyleri glüteraldehit ile aktifleştirildiğinde immobilizasyon verimliliği ve stabilitesi bir miktar artmıştır. Diğer taraftan polimer nanolif yapısına albümin, gümüş nanoparçacık, polianilin, kitosan ve selüloz tri asetat gibi kimyasalların katılımıyla elde edilen hibrit nanolif yapıların enzim immobilizasyonunda kullanımında belirgin verimlik ve stabilite artışı gözlemlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzim immobilizasyonu, elektro çekim, hibrit nanolif, nanoparçacık

2016, ix + 43 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

PROTEASE IMMOBILIZATION ON POLYMER-POLYMER HYBRID NANOFIBER SURFACES

Haluk Çevik

Uludağ Üniversitesi

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Textile Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yakup Aykut

The aim of this thesis study is to produce polymeric hybrid nanofibers which have extensively high specific surface area, and investigate enzyme stability and reusability via immobilization protease enzymes on these nanofibers via physical adsorption method.

For this purpose, hybrid nanofibers have been produced with addition of albumen, polyaniline, chitosan, silver nanoparticles and cellulose triacetate from various polymers such as polyamide 6, polyvinyl alcohol, cellulose monoacetate and polycaprolactone. Protease enzymes were immobilized on these nanofibers and enzyme stability and reusabilities were investigated.

After experimental studies, the results have revealed that cellulose monoacetate based nanofibers in all these nanofibers show the best results for enzyme immobilization via physical adsorption method. When nanofiber surfaces are activated with glutaraldehyde, immobilization stability and reusability are increased a little bit. On the other hand, addition of second phase like albumen, chitosan, silver nanoparticles and cellulose triacetate in the structure of polymer nanofibers to form hybrid structure has not increased the stability and reusability reasonably.

Key words: Enzyme immobilization, electrospinning, hybrid nanofiber, nanoparticles

2016, ix + 43 pages.

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen danışman hocam Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Tekstil Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Yakup Aykut'a saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Enzim aktivite tayinlerinde kıymetli bilgilerine başvurduğum Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Elif Demirkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Enzim aktivite testlerinde yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü doktora öğrencisi Tuba Avcı ve yüksek lisans öğrencisi Baran Enes Güler'e teşekkür ederim.

Elektron mikroskop analizlerinde SEM görüntülerini almada yardımcı olan Bahadır Karaduman'a teşekkür ederim.

Erasmus programı kapsamında İsveç'e değişim programıyla gitmemde desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Orhan'a teşekkür ederim.

Bir yıl boyunca laboratuvarlarında çalışma imkânı bulduğum İsveç Boras Üniversitesi çalışanları sayın Prof. Dr. Vincent Nierstrasz ve Post Doktorant Aysin Dural Erem'e teşekkür ediyorum.

OUAP(M)-2014/9 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haluk Çevik
Kasım, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Polimer Nanolifler ve Üretim Yöntemleri.....	3
2.1.1. Meltblowing yöntemi ile nanolif üretimi.....	3
2.1.2. Spunbond yöntemi ile nanolif üretimi.....	3
2.1.3. Bikomponent lifler yolu ile nanolif üretimi.....	3
2.1.4. Fibrilasyon ile nanolif üretimi.....	4
2.1.5. Elektro çekim ile nanolif üretimi.....	4
2.2. Elektro Çekimle Polimer Nanolif Üretimi.....	4
2.2.1. Elektro çekimde nanolif oluşumunda etkili olan parametreler.....	6
Solüsyon parametreleri.....	6
a) Molekül ağırlığı.....	6
b) Konsantrasyon ve Viskozite.....	6
c) Yüzey gerilimi.....	7
d) Elektrik iletkenliği.....	8
e) Çözücü.....	8
Proses parametreleri.....	8
a) Besleme hızı.....	8
b) Toplayıcı plaka ve düze arası mesafe.....	8
c) Düze iç çapı.....	9
d) Voltaj.....	9
e) Toplayıcı plaka cinsi.....	10
Ortam parametreleri.....	10
a) Sıcaklık.....	10
b) Nem ve atmosfer koşulları.....	10
c) Elektrik alanı.....	10
2.3. Enzim İmmobilizasyonu.....	11
2.3.1. Enzimler ve kullanıldığı endüstriyel alanlar.....	12
2.3.2. Enzim immobilizasyonunun önemi.....	12
a) Enzim immobilizasyonu.....	12
b) Enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları.....	13
2.3.3. Enzim immobilizasyon metodları.....	13
a) Adsorpsiyon.....	13
b) Tutuklama.....	14
c) Kovalent bağlama.....	14
d) Çapraz bağlama.....	15
2.4. Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu.....	16

2.5. Proteaz Enzimi ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımı	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. MATERYAL	20
3.1.1. Nanolif üretiminde kullanılan polimerler ve yardımcı kimyasallar	20
3.1.2. Elektro çekim solüsyonu hazırlamada kullanılan çözücüler ve diğer yardımcı kimyasallar	20
3.1.3. Kullanılan enzimler	20
3.1.4. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yardımcı kimyasallar	20
3.1.5. Enzim aktivite testinde kullanılan kimyasallar	20
3.2. YÖNTEM	20
3.2.1. Elektro çekim yöntemiyle polimer nanoliflerin üretimi.....	20
3.2.2. Enzimlerin nanoliflere immobilizasyonu	21
3.2.3. Nanoliflerin karakterizasyonu	22
3.2.4. Enzim aktivite ve tekrar kullanılabilirlik testleri.....	22
a) Enzim aktivite testi	22
b) İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlik testi	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. İyonik Tuz Yüklü Poliamid 6 Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu	25
4.2. Albümin (yumurta beyazı)/pva Kompozit Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu	28
4.3. Gümüş Nanoparçacık Yüklü Selüloz Monoasetat Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu	32
4.4. Selülozik (selüloz monoasetat/selüloz triasetat) Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu	34
4.5. Polikaprolakton (pcl)/kitosan Kompozit Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu	35
5. SONUÇLAR	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ml	Mililitre
cm	Santimetre
kV	kilovolt
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
%	Yüzde
fps	Saniyedeki görüntü sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
Ag	Gümüş
PVA	Polivinil alkol
PCL	Polikaprolakton
PA6	Poliamidit 6
CHI	Kitosan
CMA	Selüloz monoasetat
CTA	Selüloz triasetat
FA	Formik asit
DMF	N,N-Dimethylformamide
wt.	Ağırlık
Ca ⁺⁺	Kalsiyum iyonu
Mg ⁺⁺	Magnezyum iyonu
Sr ⁺⁺	Stronsiyum
Ba ⁺⁺	Baryum
Mn ⁺⁺	Manganez
GA	Gluteraldehid
AgNO ₄	Gümüş nitrat
Au-Pd	Altın-paladyum
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
a _{imm}	İmmobilize olan enzim aktivitesi
a _{free}	Serbest enzim aktivitesi
EDX	Enerji dispersiv X-Ray spektra

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Elektro çekim yöntemiyle nanolif üretiminin şematik gösterimi	4
Şekil 2.2. Polimer eriyiğinin elektrik alan tarafından çekilmeye başlamasından lif çekimine kadar olan görüntüsü (Cireli ve ark. 2006)	5
Şekil 2.3. Kılcal boru ucunda oluşan taylor konisinin şematik gösterimi	5
Şekil 2.4. Whipping olayının yüksek hızlı kamera görüntüleri, (a) 25 fps, (b) 4000 fps (Çınar 2013)	6
Şekil 2.5. Elektro çekimde konsantrasyon ve boncuklanma arasındaki ilişki (Huang ve ark. 2003).....	7
Şekil 2.6. Elektro çekimde konsantrasyonun nanoliflerin özelliklerine etkisi (Celep 2007).....	7
Şekil 2.7. Elektro çekimde iğne ucu ve toplayıcı plaka arası mesafenin nanolifler üzerine etkisi (Celep 2007).....	9
Şekil 2.8. Elektro çekimde gerilimin nanolifler üzerine etkisi (Celep 2007)	10
Şekil 2.9. Elektro çekimde farklı parametre-lif çapı ilişkisi, (Kolektör mesafesi, elektrik gerilimi, akış hızı, konsantrasyon) (Çınar 2013).....	11
Şekil 2.10. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgesi enzimin şematik olarak gösterimi.....	11
Şekil 2.11. Enzimlerin adsorpsiyonla yüzeye fiziksel bağlanması.....	13
Şekil 2.12. Enzimlerin mikrokapsülleme yoluyla immobilizasyonu (Etcı 2011).....	14
Şekil 2.13. Enzimlerin kovalent bağlama yoluyla immobilizasyonu (Sariboğa 2008).....	14
Şekil 2.14. Çapraz bağlı immobilize enzimler.....	15
Şekil 2.15. Çapraz bağlamada kullanılan bazı kimyasal maddelerin formülleri (Sariboğa 2008).....	15
Şekil 2.16. Glutaraldehidle çapraz bağlama yönteminin formülü (Sariboğa 2008).....	16
Şekil 3.1. Elektro çekim ile nanolif üretimi prosesinin şematik gösterimi.....	21
Şekil 4.1. Nanoliflerin SEM resimleri (a) kazein katkılı poliamit 6 nanolifler, (b) üzerine proteaz damlatılmış ve 1 saat labratuvar koşullarında bekletilmiş a'daki nanolifler, (c) 5 defa peş peşe enzim aktivite testi yapılmış b'deki nanolifler	24
Şekil 4.2. Elektro çekimle üretilmiş (a1) saf poliamit 6, (b1) CaCl ₂ , and (c1)MgCl ₂ yüklü PA6 nanolifler, ve aynı nanoliflerin 5 aktivite testi sonrası SEM resimleri (a2) saf PA6, (b2) CaCl ₂ , ve (c2)MgCl ₂ yüklü PA 6 nanolifler	26
Şekil 4.3. MgCl ₂ ve CaCl ₂ yüklü PA6 nanoliflerin Energy dispersive X-Ray spektra (EDX) grafikleri.....	27

Şekil 4.4. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş saf, Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , ve kazein yüklü PA6 nanoliflerin tekrar sayısına bağlı aktivite testi grafikleri	27
Şekil 4.5. Albumin katkılı PVA nanolifler: (A1, A2) Saf PVA, (B1, B2) PVA/az albumin, (C1, C2) PVA/orta albumin, (D1, D2) PVA/yüksek albumin	29
Şekil 4.6. Farklı oranlardaki PVA/albumen elektro çekim solüsyonlarının reolojik incelenmesi:Kayma gerilimi-kayma stresi (solda) ve kayma gerilimi-viskozite (sağda).....	30
Şekil 4.7. Tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri (A) Albumin ve albumin/GA, (B) PVA ve PVA/Albumin nanolifler, (C) Su ile seyreltilmiş GA ile aktive edilmiş PVA ve PVA/Albumin nanolifler, ve (D) Aseton ile seyreltilmiş GA ile aktive edilmiş	31
Şekil 4.8. Ultra incelikteki (A, B) CMA/Ag, ve (C, D) saf CMA nanoliflerin SEM resimleri	33
Şekil 4.9. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş CMA, CMA/Ag, CMA/GA, CMA/Ag/GA nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri	33
Şekil 4.10. Ultra incelikteki (A, a) CMA, ve (B, b) CMA/CTA nanoliflerin optik mikroskop resimleri, ve CMA nanoliflerin SEM resmi.....	34
Şekil 4.11. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş CMA, CMA/CTA, CMA/GA, CMA/CTA/GA nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri	35
Şekil 4.12. Ultra incelikteki PCL/CHI hibrit nanoliflerin SEM resimleri: (a-b) saf PCL lifler, (c-d) PCL/CHI (90/10), (e-f) PCL/CHI (50/50) nanolifler	36
Şekil 4.13. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş PCL, PCL/CHI, PCL/GA, ve PCL/GA/CHI nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri	37
Şekil 5.1. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş (A) PA6, PVA, CMA, ve PCL nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri, (A) daki nanoliflerin GA ile aktive edildikten sonra enzimler immobilize edilip testlerin yapılmış hali	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Enzimlerin kullanım alanları.....	12



1. GİRİŞ

Enzimlerin başta biyolojik uygulamalar olmak üzere son yıllarda tekstil ve çevre gibi endüstriyel alanlar olmak üzere kimya sektöründe de kullanımları mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalar immobilize enzimlerin serbest enzimlere kıyasla aktivitelerinde ve tekrarlı kullanımlarında verimlilik artışlarının olduğunu göstermiştir. Enzimler kendilerine has belirli substrat yüzeyleriyle çalışmaktadırlar. Çalışma prensibinde direkt temas edilen kısım yüzey olduğu için enzimlerin aktif oldukları reaksiyonlarda yüzey alanının büyüklüğü önem arz etmektedir. Standart bir yüzey ile kıyaslandığında temas edecek yüzeyin nano boyutlarda olması yüzey alanını büyük miktarda arttırmaktadır. Örneğin uygulanacak yüzey içerisinde nanoliflerin olması yüzey alanını arttıracaktır, çünkü yapıda temas edecek spesifik yüzey alanı kat kat artırılmış olacaktır. Literatürde nanoliflere enzim immobilizasyonu konusu yapılan birçok çalışma rapor edilmiştir.

Naylon nanolifler elektro çekim yöntemiyle üretildikten sonra glikoz oksidaz enzimi Gluteraldehit (GA) ve albumin serumuyla birlikte nanoliflerin yüzeyine immobilize edilmiştir. Naylon nanolif, membran çamsı karbon elektrot üzerine yerleştirilip elektrokimyasal olarak biyosensör özelliği test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre naylon nanolif membranın enzim immobilizasyonu ve biyosensör uygulamaları için mükemmel bir destek tabakası olduğu rapor edilmiştir (Scampicchio ve ark. 2003). Selüloz enzimi; Polivinil alkol (PVA) nanolifler içerisine, selülozların elektro çekim solüsyonuna eklenmesi suretiyle ve nanoliflerin üretiminden sonra GA buharıyla çapraz bağlandırılması sonucu immobilize edilmiştir. Serbest enzimlere kıyasla immobilize enzimlerle % 65 oranında aktivite verimliliğinde artış gözlemlenmiştir (Wu ve ark. 2005). Albüminin enzim immobilizasyonunda kullanımı ve enzim aktivite verimliliğine olan olumlu etkileri Hedström ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Hedström ve ark. 2008). Diğer taraftan yumurta albümini katkılı PVA nanolifler Rathna ve arkadaşları tarafından üretilmiştir (Rathna ve ark. 2011). Lipaz enzimi elektro çekimle elde edilmiş olan selüloz nanoliflere immobilize edilmiştir. Bu kapsamda önce selüloz asetat nanolifler üretilmiş daha sonra alkali ortamda nanolifler okside edilmek suretiyle asetat gruplar elimine edilerek selüloza dönüştürülmüştür. Enzim stabilitesi ve aktivite verimliliğindeki artış rapor edilmiştir (Huang ve ark. 2011).

Lipaz enzimleri kapsülleme yoluyla Polikaprolakton (PCL) nanolifler içerisinde immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonucunda hem su içerisinde hem de organik solventler içerisinde yapılan aktivite testlerinde enzim aktivitesinde ve stabilitesinde artış gözlemlenmiştir (Song ve ark. 2012). Kitosan (CHI) / PVA kompozit nanolifler elektro çekim yöntemiye üretilmiştir. Daha sonra kompozit nanolifler sulu NaOH çözeltisiyle muamele edilerek PVA maddesinin büyük bir kısmının nanoliflerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen kitosan nanoliflere lipaz enzimi immobilize edilerek enzim aktivitesi ve stabilitesi analiz edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda enzim aktivitesinde ve stabilitesinde artışlar gözlemlenmiştir (Huang ve ark. 2007).

Bu kapsamda yapılan bu tez çalışmasında elektro çekim yöntemiyle polimerik malzemelerden nanolifler elde edilmiş, üretilen nanoliflere proteaz enzimleri fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilerek enzim aktivitelerindeki değişimler tekrarlı kullanımlara göre grafiklendirilerek incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Yapılan tez çalışmasında polimer-polimer hibrit nanolif yapıları enzim immobilizasyonu konusu deneysel çalışmalarla incelenmiştir. Deneysel çalışmaya başlamadan önce kapsamlı bir literatür taraması yapılmıştır. Bu kapsamda literatürde mevcut polimer nanolif üretim yöntemleri, elektro çekimle nanolif üretimi ve elektro çekimde etkili olan proses ve materyal parametreleri üzerinde durulmuş, enzimler ve enzim immobilizasyon teknikleri araştırılmıştır. Spesifik olarak polimer nanoliflere enzim immobilizasyonu konusu kapsamlı bir şekilde literatürde taranarak yapılmış olan bazı çalışmalardan bu bölümde bahsedilmiştir.

2.1 Polimer Nanolifler ve Üretim Yöntemleri

Nanolifler basitçe, nanometre boyutlarında inceliğe sahip lifler olarak tanımlanmaktadır. Nanometre ise metrenin milyarda birini ifade eden bir uzunluk birimidir (Cireli ve ark. 2006). Nanolif üretim yöntemleri günümüzde meltblowing, spunbond, fibrilasyon, bikomponent ve elektro çekim yöntemleri olarak sınıflandırılmaktadır (Celep 2007).

2.1.1. Meltblowing yöntemi ile nanolif üretimi

Meltblowing, çapı küçük liflerin seri üretiminde kullanılan en yaygın tekniktir (Şafak 2012). Bu yöntemde, ekstruderde eritilen polimer filtrasyon işleminden sonra düzeden fişkırtılır ve hava üflemesiyle inceltir. Meltblowing yönteminin nanolif üretiminde kullanılması ile ilgili araştırmalar devam etmekte olup günümüzde daha çok mikrolif üretiminde kullanılmaktadır (Celep 2007).

2.1.2. Spunbond yöntemi ile nanolif üretimi

Meltblowing yöntemine çok benzer. Sıcaklık ve kullanılan hava hacmi temel farklılıklardır. Bu durum liflerin fiziksel özelliklerini etkiler. Bir diğer farklılık ise germe işleminin polimer soğuyup katılaştığında uygulanmasıdır. Bundan dolayı, spunbond yöntemi ile üretilen lifler meltblowing yöntemi ile üretilen liflerden daha kalındır (Celep 2007).

2.1.3. Bikomponent lifler yolu ile nanolif üretimi

Farklı özellikteki polimerlerin aynı düzeden geçerek oluşturduğu lif yapısına bikomponent lif denir (Şafak 2012). Bu yöntemde denizde adacık diye isimlendirilen iki

farklı polimerden lifler üretilir. Burada dıştaki polimer belirli bir çözücüde çözünebilen bir polimer olmalıdır. Daha sonra çözücü ile muameleye tabi tutulduğunda dıştaki polimer çözünerek içteki ince liflerin açığa çıkmasını sağlar. Bu yöntemle üretilen nanoliflerin yalnızca bir kısmı istenen özelliklere sahip olmaktadır (Celep 2007).

2.1.4. Fibrilasyon ile nanolif üretimi

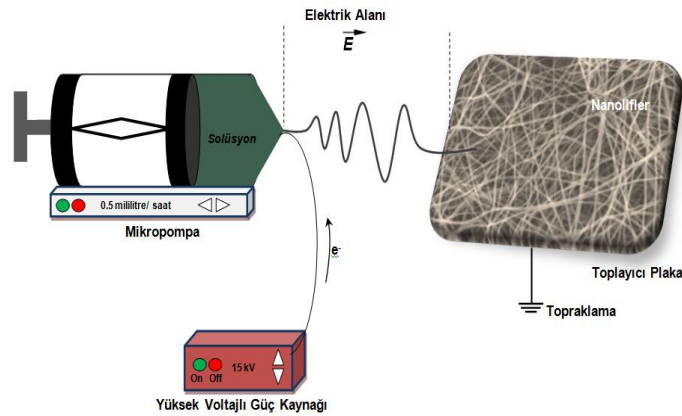
Bu yöntemde selülozik lif çok küçük çapta lifçiklere bölünmekte fakat nanolif tülbendi formunda elde edilmektedir. Lyocell liflerinin fibrile edilmesi kolay olmakla beraber; bu liflerin üretim koşulları oldukça kritiktir (Celep 2007).

2.1.5. Elektro çekim ile nanolif üretimi

Elektro çekim yöntemiyle başta polimerik malzemeler olmak üzere seramik, karbon, metal ve kompozit nanolifler üretilebilmektedir. Elektro çekimle polimer nanoliflerin üretimi ve etkili olan parametreler bir sonraki kısımda ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

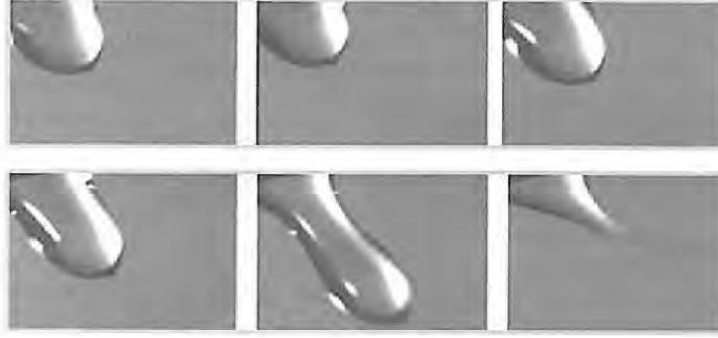
2.2. Elektro Çekimle Polimer Nanolif Üretimi

Belirli bir değer aralığındaki elektrik akımına maruz bırakılan polimer çözeltisinin yüzey gerilimi yok edilir. Bu durumdaki çözelti şırınga ucundan karşısında bulunan topraklanmış kolektöre doğru akar. Akma esnasında katılaşır ve kolektör üzerinde lif halini alarak toplanır (Andrady 2008). Paslanmaz çelikten yapılmış olan şırınga ucu elektrot görevini görür. Karşıt elektrot ise kolektördür (Celep 2007). Şekil 2.1’de elektro çekim yöntemiyle nanoliflerin oluşumu gösterilmektedir.



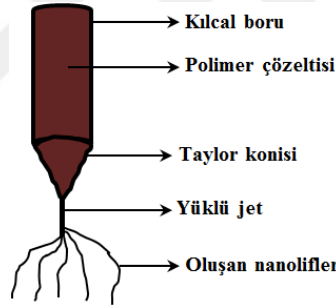
Şekil 2.1. Elektro çekim yöntemiyle nanolif üretiminin şematik gösterimi

Elektro çekimle nanolif üretimi yalnızca polimer çözeltisiyle değil polimer eriyiğinden de yapılabilmektedir. Şekil 2.2’de polimer eriyiğinin çekim esnasındaki görüntüsü verilmiştir (Cireli ve ark. 2006).



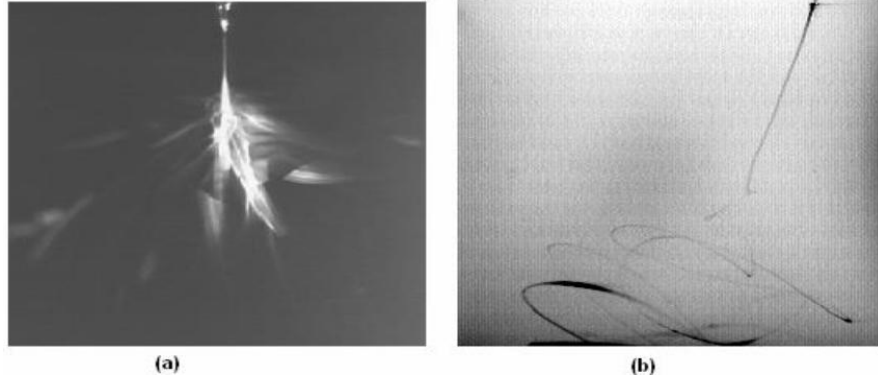
Şekil 2.2. Polimer eriyiğinin elektrik alan tarafından çekilmeye başlamasından lif çekimine kadar olan görüntüsü (Cireli ve ark. 2006)

Yüzey geriliminin aşıldığı eşik değerinden sonra sıvı damlacığı koni şeklini alır. Buna Taylor konisi denir. Şekil 2.3’de Taylor konisinin şematik gösterimi görülmektedir (Çınar 2013).



Şekil 2.3. Kılcal boru ucunda oluşan Taylor konisinin şematik gösterimi

Taylor konisinden çıkan jetin bir müddet sonra hareketinde kararsızlık görülür. Elektro çekim yönteminde en çok görülen kararsızlık haline Whipping kararsızlığı denir. Şekil 2.4’de Whipping olayının 25 fps ve 4000 fps’de çekilmiş fotoğrafları gösterilmiştir (Çınar 2013).



Şekil 2.4. Whipping olayının yüksek hızlı kamera görüntüleri, (a) 25 fps, (b) 4000 fps (Çınar 2013)

2.2.1. Elektro çekimde nanolif oluşumunda etkili olan parametreler

Elektro çekim yöntemine etki eden parametreler solüsyon, ortam ve proses parametreleri olarak gruplandırılabilir (Andrady 2008). Bu parametreler aşağıda anlatılmaktadır.

Solüsyon parametreleri

Polimer nanoliflerin elde edilebilmesi için kullanılan polimer akışkan bir forma getirilmelidir. Bunun için polimer ya uygun bir çözücüde çözdürülmeli veya sıcaklığın etkisiyle eritilmelidir. Polimer çözeltisinin içeriği ve özellikleri elektro çekimle elde edilecek nanolif özellikleri üzerinde değişimlere neden olabilmektedir.

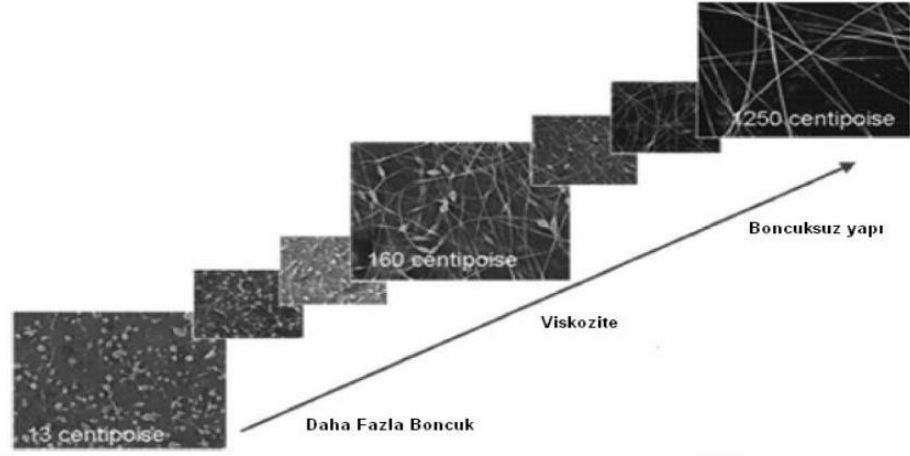
a) Molekül ağırlığı

Molekül ağırlığı diğer parametreler üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir. Polimerlerden nanolif elde edilebilmesi için makromoleküller arası etkileşim önem arz etmektedir, yani polimerin belirli bir molekül ağırlığının üzerinde olması gerekir. Düşük molekül ağırlığına sahip polimer çözeltilerinde boncuklanma (bead) görülür (Çınar 2013). Uygun molekül ağırlığında üniform nanolifler elde edilir.

b) Konsantrasyon ve viskozite

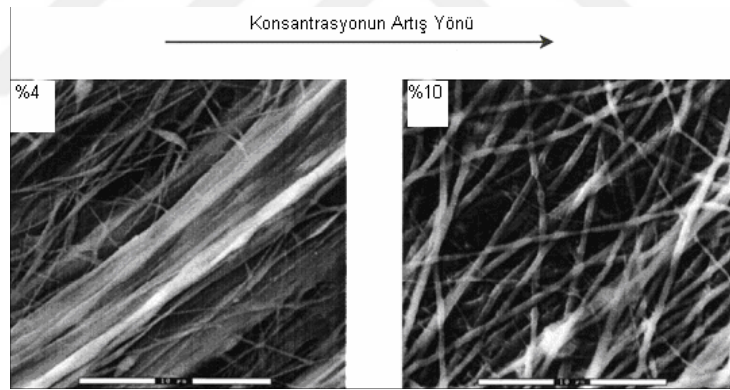
Çözelti viskozitesinin artması lif çapının artmasına da neden olur. Fakat çok düşük ve yüksek viskozite değerlerinde lif çapı incelik. Viskozitedeki artışın boncuk oluşumunu engellediğini söyleyebiliriz. Viskozite artışı boncuğun büyümesini ve düz bir hal almasını sağlar (Çınar 2013). Konsantrasyon ve viskozite birbirleriyle ilişkilidir. Düşük konsantrasyonlarda liflerde boncuklara rastlanır. Yüksek konsantrasyonlarda ise üniform bir yapı elde edilir. Boncuklanma da daha az gözlemlenir (Çınar 2013). Şekil

2.5’de konsantrasyon ve boncuklanma arasındaki ilişki gösterilmektedir (Huang ve ark. 2003).



Şekil 2.5. Elektro çekimde konsantrasyon ve boncuklanma arasındaki ilişki (Huang ve ark. 2003)

Deitzel ve ark. (2001) yaptıkları çalışmaya göre konsantrasyonun nanolifler üzerine etkisi Şekil 2.6’daki gibidir. Şekilden de görüldüğü gibi uygun konsantrasyonlarda daha üniform nanolifler elde edilmiştir.



Şekil 2.6. Elektro çekimde konsantrasyonun nanoliflerin özelliklerine etkisi (Celep 2007)

c) Yüzey gerilimi

Elektro çekim prosesinin bir diğer temel kuvveti de yüzey gerilimidir. Yüzey gerilim katsayısının düşürülmesiyle daha ince filamentler elde edilir (Celep 2007) . Yüzey gerilimi boncuklanmayı artırma özelliğine sahip olmakla beraber, yüzey geriliminin azalmasıyla beraber boncuk oluşumu engellenebilir (Çınar 2013).

Yüzey gerilimi; solüsyon konsantrasyonundan, elektrik alanından ve sıcaklıktan etkilenir (Andrady 2008).

d) Elektrik iletkenliği

Elektriksel yüklenmeye maruz kalmış polimer damlalarının sahip olduğu kuvvet elektro çekim prosesinin temel kuvvetlerinden biridir (Celep 2007). Elektro çekim prosesinde çözelti ile temas halinde olan elektrottan iğne ucuna elektrik yükü transferi olmaktadır. Bundan dolayı elektro çekim işleminin gerçekleşmesi için minimum bir çözelti iletkenliği gereklidir. Aksi takdirde elektro çekim yapılamaz (Andrady 2008). Çözelti iletkenliğinin artmasıyla beraber yük taşıma kapasitesi de artar. Ayrıca boncuklarda küçülme görülür. Lif çapı azalır (Çınar 2013).

e) Çözücü

Diğer tüm parametreleri sabitleyerek çözücünün elektro çekim prosesi üzerine etkisini gözlemlemek çok mümkün değildir. Çözücünün türünün birçok aşamada etkisi vardır. Çözücünün buharlaşması esnasında jetin katılma oranı, çözünmüş polimer zincirlerinin konformasyonu, büküme uğrayan jetin kolay yüklenebilmesi çözücünün türüyle ilgilidir (Andrady 2008).

Çözücünün sahip olduğu iletkenlik, yüzey gerilimi, uçuculuk ve dielektrik özellikleri elektro çekim prosesi için önemlidir (Andrady 2008) .

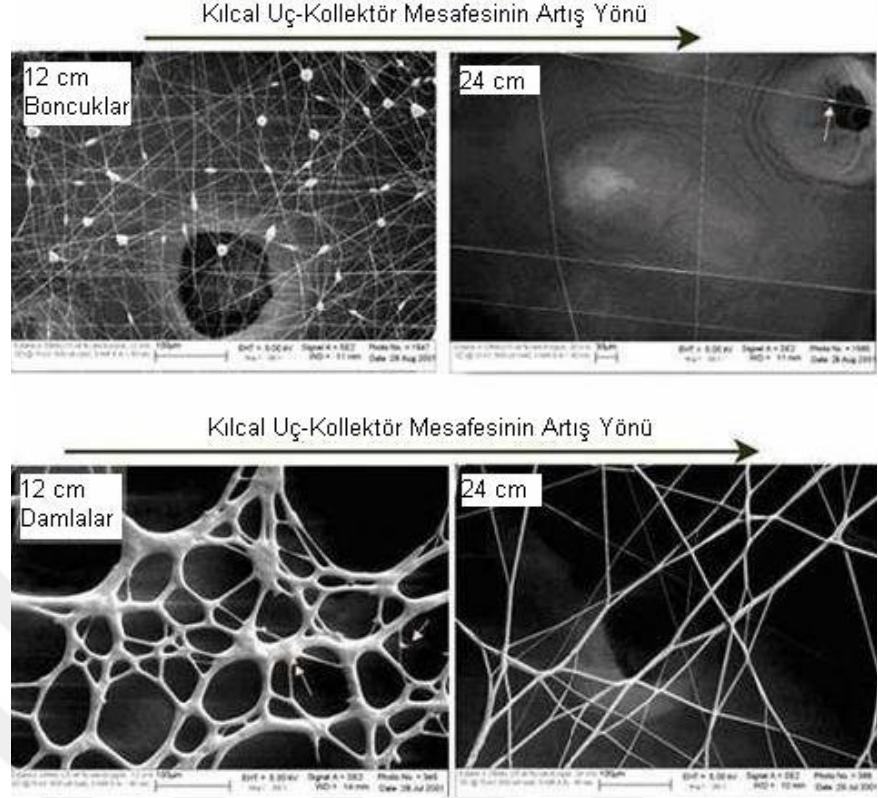
Proses parametreleri

a) Besleme hızı

Besleme debisinin artmasıyla beraber lif çapı ve boncuklanmada artış görülür. Lif düzgünlüğüne de yol açar. Düşük besleme debisi ise lif çapında varyasyon görülmesine sebep olur. Bundan dolayı üniform çapta ve aralıksız nanolif üretimi için optimum besleme hızı ayarlanmalıdır (Andrady 2008, Çınar 2013).

b) Toplayıcı plaka ve düze arası mesafe

İğne ucu ve toplayıcı plaka arası mesafenin artması lif çapında varyasyonun azalmasına sebep olur. Ayrıca boncuk büyüklüğünde de azalma olur (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Elektro çekimde iğne ucu ve toplayıcı plaka arası mesafenin nanolifler üzerine etkisi (Celep 2007)

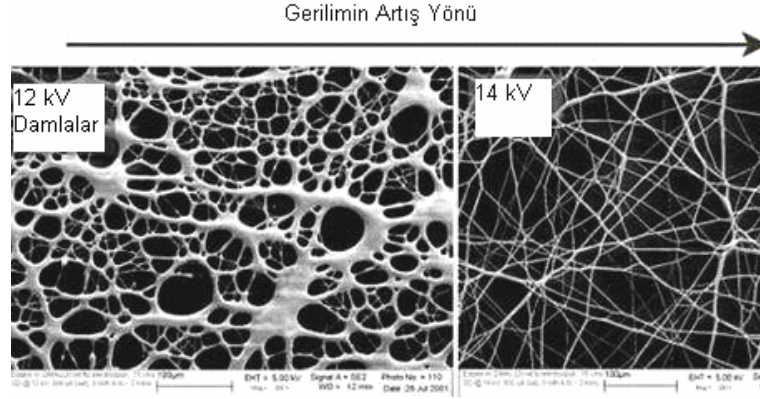
İğne ucu ve toplayıcı plaka arasındaki mesafenin çok kısa olması toplayıcı plaka üzerinde ıslak liflerin birikmesine sebep olur (Andrady 2008).

c) Düze iç çapı

İğne iç çapının küçük olması lif çapının da azalmasına yol açar fakat yüksek viskoziteli sıvıların geçişi için de pratik değildir. Farklı tiplerde ve özelliklerde iğne çeşitleri mevcuttur. Genelde iğneler sabit olmakla beraber hareketli olan türleri de mevcuttur (Andrady 2008).

d) Voltaj

Voltajın artmasıyla yüklenen gerilim artmış olur. Bu da lif çapını küçültür (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Elektro çekimde gerilimin nanolifler üzerine etkisi (Celep 2007)

Elektro çekim prosesinde genelde DC güç kaynağı kullanılır. AC güç kaynağı kullanılarak üretilen nanoliflerin çap ortalaması DC güç kaynağı ile üretilen nanolif çaplarından daha geniş olmaktadır (Andrady 2008).

e) Toplayıcı plaka cinsi

Toplayıcı plakanın hareketli olup olmaması, yapısı, şekli nanolif oluşumu üzerinde etkisi olan özelliklerdir. Silindir yapılı, hareketli toplayıcı plakalar üniform nanolifler elde edilmesini sağlar (Andrady 2008).

Ortam parametreleri

a) Sıcaklık

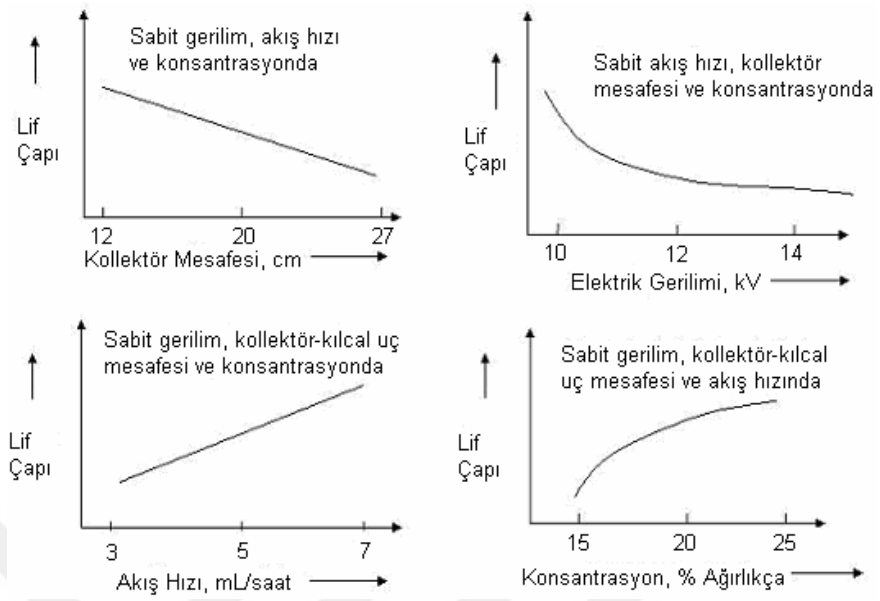
Yüksek sıcaklık çözücünün buharlaşmasını hızlandıracağından dolayı elektro çekim prosesi de hızlanır. Yüksek sıcaklık viskozitenin azalmasına ve çözünürlüğün artmasına sebep olur. Ayrıca daha üniform nanolif elde edilmesini sağlar (Celep 2007, Dinç 2013).

b) Nem ve atmosfer koşulları

Nemin fazla olduğu durumlarda nanolif üzerinde su yoğunlaşır ve gözenekler oluşur. Elektro çekim prosesinin atmosfer basıncı altında gerçekleştirildiği durumlarda jet oluşumunda kararsızlık görülebilir (Dinç 2013).

c) Elektrik alanı

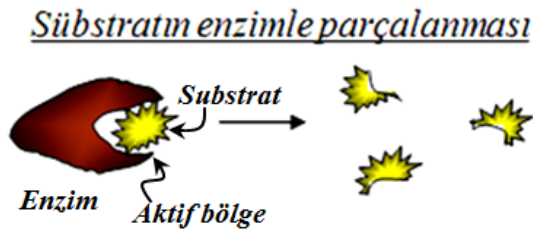
Elektrik alanı etkisine maruz kalan parçacığa etki eden beş farklı kuvvet vardır. Bunlar elektrik kuvveti, itme kuvveti, yüzey gerilimi kuvveti, viskoelastik kuvvet ve yerçekimi kuvvetidir (Çınar 2013). Şekil 2.9'da lif çapı üzerine etki eden bazı parametreleri görülmektedir.



Şekil 2.9. Elektro çekimde farklı parametre-lif çapı ilişkisi, (Kolektör mesafesi, elektrik gerilimi, akış hızı, konsantrasyon) (Çınar 2013)

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, protein yapılı spesifik biyokatalizörlerdir (Arslan 2004, Sarıboğa 2008). Enzim moleküllerinde bulunan aktif merkezin substratı bağlamasıyla bir enzim – substrat (ES) kompleksi meydana gelir. Şekil 2.10’da bu durum gösterilmektedir (Arslan 2004).



Şekil 2.10. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgeli enzimin şematik olarak gösterimi

Enzimatik bir reaksiyonun hızını sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu gibi faktörler etkilemektedir (Arslan 2004) .

2.3.1. Enzimler ve kullanıldığı endüstriyel alanlar

Enzimler; tıp, tarım, çevre, tekstil, eczacılık, hayvancılık, gıda, kağıt, deterjan vb. birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Çizelge 2.1’de sıklıkla kullanılan enzimler belirtilmiştir (Etcı 2011).

Çizelge 2.1. Enzimlerin Kullanım Alanları (Etcı 2011)

Enzim	Kullanım Alanı
Kolesterol oksidaz	Tıp'ta kolesterol tayininde
Proteazlar, lipaz, amilaz	Deterjan sanayiinde
Laktaz, mikrobiyal proteazlar	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Pektinaz, selüloz, limonaz	Meyve suyu sanayiinde
Proteaz, lipaz	Deri sanayiinde
Amilaz, glukoz izomeraz	Nişasta endüstrisinde
Katalaz, amilaz	Tekstil sanayiinde
Amilaz, amiloglikozidaz, pentosanaz	Ekmek sanayiinde
Redüktaz, amilaz, fosfataz, oksidazlar	Analitik amaçlı analizlerde
Termolizin	Aspartam üretiminde
Ksilenaz	Kağıt endüstrisinde
Papain, katalaz	Et sanayiinde
Penisilin amidaz, oksidaz	Eczacılıkta

Enzimlerin biosensörlerle kullanım alanlarına örnek olarak; toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde kullanılması, şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayininde kullanılması, ilaçların kötü amaçla kullanımını ve uyuşturucu ile mücadele örnek gösterilebilir (Arslan 2004).

2.3.2. Enzim immobilizasyonunun önemi

a) Enzim immobilizasyonu

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanma ile, suda çözünmeyen bir kopolimere enzim molekülünün monomer olarak katılması ile ve suda çözünmeyen bir mikrokapsülde tutuklanması yöntemleriyle immobilize edilirler

(Etcı 2011). İmmobilizasyon, bu işlemlerin tümünü kapsamakta olup her bir işlem ayrı bir immobilizasyon yöntemidir.

b) Enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları

İmmobilize edilmiş enzimlerin serbest enzimlere göre bir takım avantaj ve dezavantajları vardır (Arslan 2004):

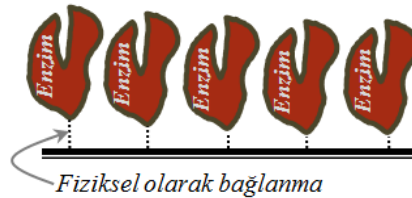
- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler ve enzimlerin ürünleri kirletmesi gibi bir problem görülmez.
- Birçok kez kullanılabilirler. Bundan dolayı maliyeti düşürmektedirler.
- Daha kararlı olduklarından dolayı çevre koşullarına (Sıcaklık, pH v.s.) karşı daha dayanıklıdırlar.
- Çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Mekanik çalışmalara yatkındırlar.
- Hazırlanması sırasında maliyet daha yüksek olur.
- Bazen serbest enzimlerden daha yüksek bir aktivite göstermekle beraber genelde daha düşük aktiviteye sahiptirler.

2.3.3. Enzim immobilizasyon metodları

Birçok immobilizasyon yöntemi olup bunlardan en yaygın olanları şunlardır: Adsorpsiyon, tutuklama, kovalent ve çapraz bağlama.

a) Adsorpsiyon

En eski ve basit yöntem olup, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra, enzimin fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması şeklinde gerçekleştirilir (Şekil 2.11). Kimyasal madde kullanılmadığı için hazırlanması basittir (Sarıboğa 2008).



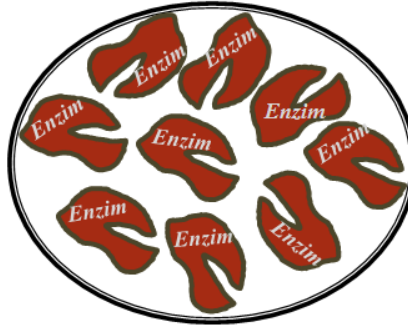
Şekil 2.11. Enzimlerin adsorpsiyonla yüzeye fiziksel bağlanması

Literatürde nanolif yüzeylere fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonu alanında fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu alanda Wang ve arkadaşları yaptıkları

çalışmada polysulfone nanolif yüzeye lipaz enzimlerini fiziksel adsorpsiyonla immobilize etmişlerdir (Wang ve ark. 2006).

b) Tutuklama

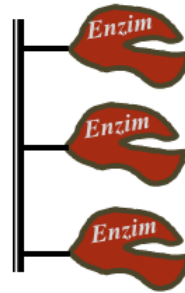
Bu yöntemde enzim molekülleri herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda tutulur. Bu özelliğiyle diğer immobilizasyon yöntemlerinden ayrılır. Tutuklama işlemi polimer matriksinde ve membranda (mikrokapsülleme) olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Şekil 2.12’de mikrokapsülleme yöntemi şematik olarak gösterilmiştir (Etcı 2011).



Şekil 2.12. Enzimlerin mikrokapsülleme yoluyla immobilizasyonu (Etcı 2011)

c) Kovalent bağlama

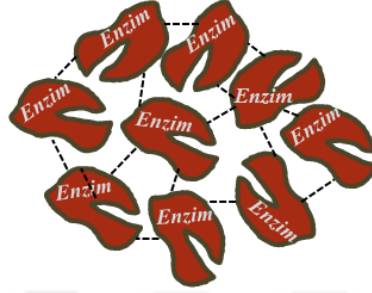
Yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Enzim ve matriks arasında bulunan fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağ meydana gelir. Enzimin aktif bölgesinin bağ oluşumuna katılmaması için çözeltiyeye inhibitör ilave edilir. Dezavantajı hazırlama işlemlerinin çok karmaşık olmasıdır. Şekil 2.13’de kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak gösterilmiştir (Sariboğa 2008).



Şekil 2.13. Enzimlerin kovalent bağlama yoluyla immobilizasyonu (Sariboğa 2008)

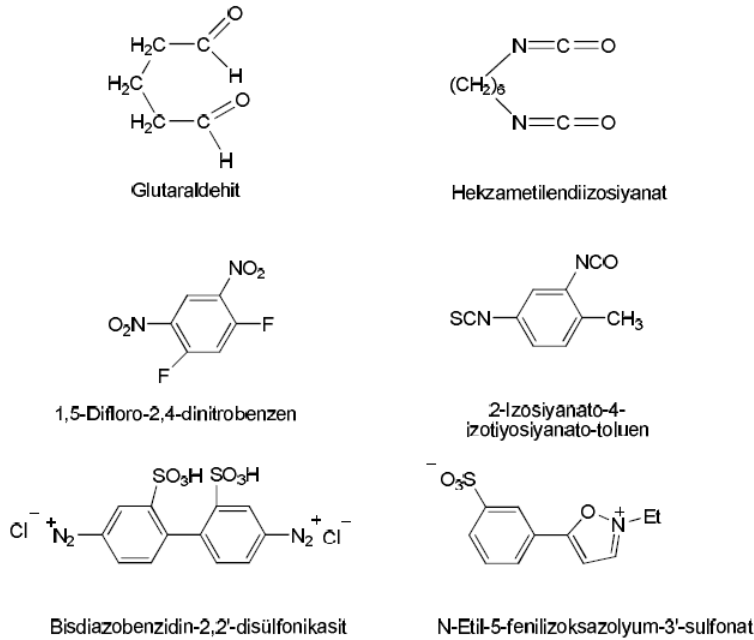
d) Çapraz bağlama

Küçük molekül bifonksiyonel gruba sahip yapıların enzim molekülleri arasında bağlar yapmasıyla gerçekleşir (Etcı 2011). Şekil 2.14’de çapraz bağlı immobilize enzimler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Çapraz bağlı immobilize enzimler

Çapraz bağlamada kullanılan kimyasalların bazılarının formülleri Şekil 2.15’de verilmiştir .



Şekil 2.15. Çapraz bağlamada kullanılan bazı kimyasal maddelerin formülleri (Sarıboğa 2008)

Şekil 2.16’da Glutaraldehid ile çapraz bağlama yönteminin kimyasal mekanizması gösterilmektedir.

üretileen sisteme göre nanolifli numunelerde %31'e kadar artan oranlarda enzim aktivitesi gözlemlenmiştir (Saallaha ve ark. 2016).

Nanolif çapı ortalama 80 – 150 nm aralığında olan Kitosan/PVA nanolifler elektro çekim prosesiyle üretilmiştir. Üretilen nanolifler 0.5 M Sodyum hidroksit (NaOH) ile muamele ettirilerek PVA'nın nanoliflerden uzaklaştırılması sağlanmıştır ve nanolif çapında azalmaya sebep olmuştur. Elde edilen yüksek biyo uyumluluk, yüzey alanı ve gözenekliliğe sahip kitosan nanoliflere GA bağlayıcı ajanı kullanılarak lipaz enzimi immobilize edilmiştir. Yapılan testler sonucunda kitosan nanolif yüzeylerin enzim stabilizasyonunu arttırdığı ve enzim immobilizasyonunda tekrarlı kullanımlar için uygun bir yüzey olduğu rapor edilmiştir (Huang ve ark. 2007).

PA 6,6 nanolif yüzeyler proteazla enzimatik yöntemlere göre modifiye edildikten sonra lakkaz enzimi immobilize edilerek immobilizasyon verimliliği test edilmiştir (Silva ve ark. 2007). Kolay bulunabilir ve ucuz olan PA 6,6'dan elde edilecek nanolifler enzim immobilizasyonu için uygun bir malzemedir.

Lipaz enzimleri kapsülleme yoluyla PCL nanolifler içerisinde immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonucunda hem su içerisinde hem de organik solventler içerisinde yapılan aktivite testlerinde enzim aktivitesinde ve stabilitesinde artış gözlemlenmiştir (Song ve ark. 2012).

Gözeneksiz Selüloz asetat (CA) nanolif, organik Montmorillonit katkıli ve gözenekli CA nanolif, gözenekli CA nanolif, organik Montmorillonite katkıli ve gözeneksiz CA nanolif olmak üzere dört farklı tipte Selüloz asetat nanolif mebranlar elektro çekim metoduyla üretilmiş ve bu mebranların enzim immobilizasyonunda kullanılabilirliği incelenmiştir. Organik Montmorillonite katılımının ve gözenekli oluşun CA nanoliflerde immobilize enzimlerin depolama ve kullanım stabilitesini arttırdığı rapor edilmiştir. Dört tipteki nanolifler içerisinde en iyi sonucu organik Montmorillonite katkıli ve gözenekli CA nanoliflerin verdiği gözlemlenmiştir (Zhang ve ark. 2016).

2.5. Proteaz Enziminin Tekstilde Kullanımları

Proteazlar, bir çok enzim gibi protein yapıli biyokatalizörlerdir. Proteazlar, proteinleri daha küçük moleküllere hidroliz eden bir enzim grubudur. Tüm yaşam formları (Bitki, hayvan, mantar gibi akla gelebilecek tüm canlılar) için gerekli bileşikler olup aynı

zamanda sayılı büyük endüstriyel enzim gruplarından da biridir. Bu oran, dünyadaki endüstriyel enzim marketinin yarısından fazlasını oluşturup her geçen yıl artmaktadır (Ahmetoğlu 2011).

Bitkilerden proteaz üretimi uzun süre gerektiren bir proses olup iklim koşullarından etkilenmektedir. Papain, keratinazlar, fisin ve bromelin en bilinen bitkisel kaynaklı proteazlardır. Hayvansal orijinli proteazlar yüksek oranda saflaştırılabilir. Kimotripsin, pepsin, pankreatik tripsin ve renin hayvansal orijinli proteazlardır (Tekin 2008).

Tarımsal politikaların sonucu olarak bitkisel ve hayvansal proteazların üretiminde kısıtlamalar görölmektedir. Bitkisel ve hayvansal proteazlarla ilgili bu durumdan ve biyoteknolojik yöntemlerle üretilebilmesinden dolayı tüm dünyada mikrobiyal proteazlara karşı ilgi artışı görölmektedir (Tekin 2008).

Proteazlar, gıda ve besin endüstrisi, deri endüstrisi, peptid sentezi, fotoğraf endüstrisi, endüstriyel atıkların giderilmesi, medikal kullanımlar, deterjan endüstrisi ve tekstil endüstrisi gibi bir çok endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Proteazlar deterjan endüstrisinde düşük sıcaklıklarda yıkama olanağı sağlamalarıyla bilinirler. X-ray filmlerinin kullanımında gümüşün geri alınmasında, tedavi edici uygulamalarda, etlerin yumuşatılmasında, kümes hayvanlarının tüy atıklarında ve hayvanların derilerini tüysüzleştirmede kullanılır (Turus 2011).

Tekstil endüstrisinde özellikle yün ve ipeğin işlenmesi sırasında kullanılırlar. Kimyasal yöntemlere kıyasla çok daha çevre dostu bir yöntemdir. Yünün işlenebilmesi için istenmeyen maddelerin giderilmesinde kullanılmaktadır. Enzimin müdahalesiyle daha beyaz, temiz ve esnek lifler elde edilir. İpekte ise lifin daha kaliteli ve uygun bir renkte işlenebilmesi için gereklidir. Ham ipekte bulunan ve kalitesini düşüren serisin maddesinin proteazlar ile giderilmesi neticesinde daha parlak ve kaygan bir görünüm elde edilir. Kimyasal maddelere kıyasla elde edilen sonuçlar çok daha iyi olmaktadır. İşlem sırasında ipeğin yapısında bulunan bir diğer madde fibroinin daha az zarar görmesi sağlanır. Ayrıca zamandan tasarruf da sağlanır (Ahmetoğlu 2011).

Yünün ağartma ve terbiye işlemlerinde proteaz enzimlerinin kullanımıyla oldukça olumlu sonuçlar elde edilebilmektedir. Yün lifleri proteazın bu aşamalardaki muamelesi

sonucu daha iyi bükülme, kesme, sıkıştırma ve çekme dirençlerine sahip olmaktadır (Senthilkumar ve ark. 2014).

Poliamit 6,6 (PA 6,6) lifinden elde edilen kumaşlara proteaz enzimi uygulanarak yüzey özelliklerinin artması sağlanmaktadır. PA 6,6'ın özellikleri oldukça iyi olmakla beraber su itici yapıda olması hazır giyim endüstrisinde kullanım oranını sınırlandırmaktadır. Bu oran artırılması amacıyla PA 6,6'a su emicilik özelliğinin kazandırılması gerekir. Bundan dolayı proteaz enzimi uygulanarak diğer su emici özellik kazandıran proseslere göre daha büyük verim elde edilmektedir. Kimyasal proseslerde ortaya çıkan yüksek enerji kaybı ve elyaf özelliğinde belirgin düşüş gibi sorunlar proteaz enziminin kullanılmasıyla büyük oranda ortadan kalkmaktadır (Begum ve ark. 2016).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Nanolif üretiminde kullanılan polimerler ve yardımcı kimyasallar

Polimer-polimer hibrit nanoliflerinin üretiminde kullanılan polimerler, polimerlerin özellikleri şöyledir: Poliamid 6 (PA 6), kazein, polikaprolakton (PCL), kitosan, polivinil alkol (PVA), albümin (yumurta beyazı), selüloz monoasetat, selüloz triasetat.

3.1.2. Elektro çekim solüsyonu hazırlamada kullanılan çözücüler ve diğer yardımcı kimyasallar

Polimer-polimer hibrit nanoliflerinin üretimi için kullanılan polimerlerin çözülmesinde kullanılan çözücüler şöyledir: Deiyonize su, Formik asit, aseton. Ayrıca kalsiyum, magnezyum ve gümüş nitrat tuzları da kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan enzimler

Enzim immobilizasyonunda ORBA Biyokimya (İstanbul) firmasından temin edilen ticari proteaz enzimi kullanılmıştır.

3.1.4. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yardımcı kimyasallar

Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonunun yanı sıra deiyonize su ile seyreltilmiş glutraldehit ile de nanolif yüzeyi aktifleştirilerek; üretilen nanolif üzerine enzim immobilizasyonu sağlanmıştır.

3.1.5. Enzim aktivite testinde kullanılan kimyasallar

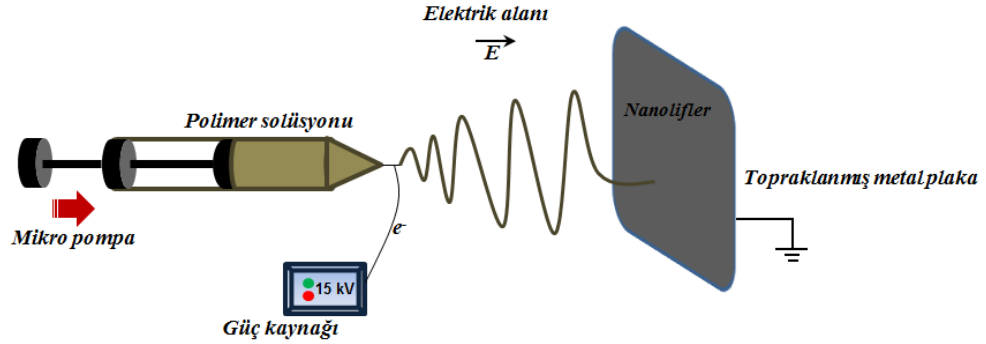
Enzim aktivite testlerinde substrat olarak kazein kullanılmıştır. Yardımcı kimyasal olarak tirozin, NaOH, triklor asetik asit, fosfat tamponu, NaCO₃ ve folin çözeltisi kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Elektro çekim yöntemiyle polimer nanoliflerin üretimi

Uygun moleküler ağırlığa sahip PVA ve PVA/albümin deiyonize su içerisinde, PA 6, PA6/Ca⁺⁺, PA6/Mg⁺⁺, PA/kazein formik asit içerisinde, PCL ve PCL/CHI aseton içerisinde, CMA, CMA/CTA ve CMA/AgNO₄ karışımı aseton içerisinde uygun konsantrasyonlarda laboratuvar koşullarında çözdürülerek solüsyon hazırlanmıştır. Hibrit yapı oluşumu için polimerlerin yanı sıra yapıya kullanılan polimere göre AgNO₃, albümin, polianilin, kitosan ve selüloz tri asetat elektro çekim solüsyonu hazırlama

esnasında eklenmiştir. Solüsyonun hazırlanması manyetik karıştırma yöntemine göre gerçekleştirildiği için solüsyona katılan AgNO_3 karıştırmanın da etkisiyle Ag nanoparçacık formuna dönüşmüştür.



Şekil 3.1. Elektro çekim ile nanolif üretimi prosesinin şematik gösterimi

Şekil 3.1'den de görüldüğü gibi hazırlanan elektro çekim solüsyonu iletken bir borudan kontrollü bir şekilde akıtılır ve bu iletken boruya yüksek miktarda elektrik akımı uygulanır. İletken borunun tam karşısına belirli bir mesafede topraklanmış bir iletken plaka yerleştirilir, iletken boruya yüksek voltaj uygulandığı için bu iletken borudan topraklanmış plakaya doğru bir elektrik alanı oluşturulacaktır. İletken borunun içerisinden akmakta olan solüsyon damlacığı bu elektrik alanı boyunca iletken borudan topraklanmış plakaya doğru fırlar ve plakaya ulaşınca kadar kat ettiği yol boyunca uzar ve topraklanmış plaka üzerinde nanolif formunda toplanır. Solüsyon içerisindeki komponentlere göre hibrit nanolif yapısı oluşmuştur. Diğer taraftan solüsyon içerisindeki solvent yol boyunca uzamadan dolayı buharlaşır ve uzayan polimer solüsyonundan uzaklaşır. Böylece sadece kuru polimer nanolif formunda plaka üzerinde toplanır. Aynı şekilde hibrit oluşturacak kimyasallar elektrosponning çözeltisi içerisine eklenerek polimer ile homojen bir çözelti hazırlanması sağlanacaktır. Böylece hibrit nanolif yapı elde edilmiş olacaktır. Elde edilen nanoliflerin taramalı elektron mikroskobu ile morfoloji analizleri yapılacaktır.

3.2.2. Enzimlerin nanoliflere immobilizasyonu

Enzimler nanolif yüzeyine iki farklı şekilde immobilize edilecektir. Birinci immobilizasyon şeklinde likit enzim solüsyonu nanolif yüzeyine direk damlatılarak fiziksel adsorpsiyon metoduyla enzimlerin nanolif yüzeyine immobilizasyonu sağlanacaktır. İkinci yöntemde ise nanolif yüzeylere ilk önce suyla seyreltilmiş

gluteraldehit aktive edilecek ardından enzim çözeltileri yüzeye damlatılacaktır. Her iki yöntemden sonra immobilize enzimler 12 saat laboratuvar koşullarında bekletildikten sonra enzim aktivite testlerine tabi tutulacaktır.

3.2.3. Nanoliflerin karakterizasyonu

Üretilen nanoliflerin morfoloji analizleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri, SEM – Zeiss evo 40 (Thermionic elektron tabancalı) marka elektron mikroskobunda yapılmıştır. Nanoliflere SEM analizinden önce Bal-Tec SCD005 cihazı ile yüzeyde iletkenlik sağlanması için altın-paladyum (Au-Pd) kaplaması yapılmıştır. Lif çapları büyük olan nanoliflerin morfolojik analizleri optik mikroskopla da yapılmıştır. Elektro çekim çözeltilerinin viskozite analizleri Anton Paar / MCR 302 cihazıyla yapılmıştır.

3.2.4. Enzim aktivite ve tekrar kullanılabilirlik testleri

a) Enzim aktivite testi

Enzim aktivite testi Anson metodu modifiye edilerek ve kazein substratı kullanılarak yapılmıştır (Keay ve ark. 1970). Standart eğri 0–60 µg/ml tirozin solüsyonu kullanılarak çizilmiştir. Bir ünite proteaz aktivitesi, 1 µg/mL tirozinin özgür bırakılması için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Aktivite verimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Immobilizasyon verimi (\%)} = \left(\frac{a_{imm}}{a_{free}} \right) \times 100$$

Denklemdaki a_{imm} immobilize enzim aktivitesi (U/ml) ve a_{free} ise immobilize olmadan ölçülen serbest enzimlerin aktivitesi (U/ml) olarak tanımlanmıştır (Schoemaker ve ark. 2003).

Toplam Proteaz Aktivitesinin Tayin Edilmesi

Toplam proteaz tayini Anson tarafından önerilen yöntemin bir modifikasyonu ile yapılmıştır (Keay ve Wildi 1970) (Tekin, N. 2008., Turus, N. 2011., Ahmetoğlu, N. 2011).

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak %2'lik kazein çözeltisi kullanılmıştır. 2 gram kazein 20 mL 0.1 M NaOH içerisinde tamamen çözülünceye

kadar sürekli karıştırılarak ısıtılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kazein çözeltisinin hacmi 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pH'sı 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile 7.0'ye ayarlanmıştır.

Deneyleerde 1 adet kör tüp ve her bir enzim örneği için 2 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Her iki örnek tüpüne 1'er mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 2 mL Triklor asetik asit (TCA) çözeltisi aktarılmış ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüplere 1'er gr enzim çözeltisi, kör tüpe ise 1 mL fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tepkime, örnek tüpler içerisine, 2 mL, 0.4 M TCA çözeltisi konarak durdurulmuş ve kör tüpüne ise 1 mL substrat eklenmiştir. Bu karışım, 37°C'de 20 dakika bekletildikten sonra oluşan pütürlü yapıyı gidermek için 6000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmından alınan 1 mL'lik örneklere, 5 mL 0.4 M NaCO₃ ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiş, karışım vortekslendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltinin optik yoğunluğu, enzim aktivitesinin belirlenmesi için 660 nm'de köre karşı okunmuştur.

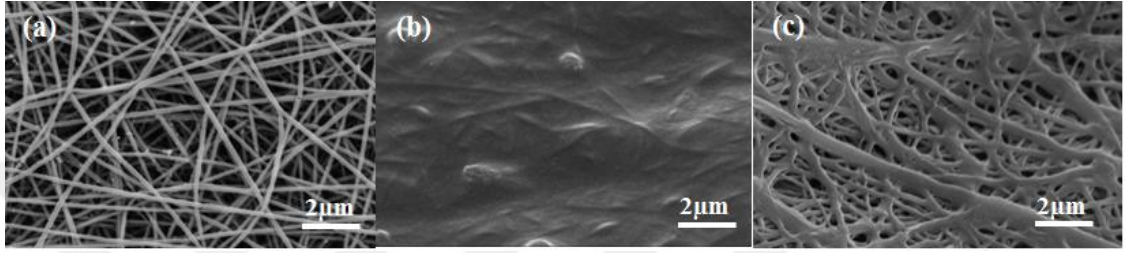
Proteaz aktivitesi ölçümlerinde, standart eğri 0-60 Ug/mL tirozin içeren çözeltiler ile hazırlanmıştır. Yönteme göre 1 Ug/mL tirozin, 2 U/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir (Keay ve Wildi 1970). Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1 Ug/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

b) İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlik testi

Nanolif yüzeyine immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini test etmek için enzim immobilize nanolifler tekrarlı hidroliz reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Her bir test 20 dakika sürmüştür ve her testin sonrasında nanolifler deiyonize su ile yıkanıp bir sonraki test başlayıncaya kadar 4 °C de muhafaza edilmiştir. Reaksiyon ortamı her tekrarda yenilenmiştir. İlk aktivite % 100 olarak tanımlanmıştır. Immobilize olmamış serbest proteaz enzimi aktivitesi 1495 (IU/ml) olarak ölçülmüştür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda genel olarak nanolifler elektro çekim metoduyla üretilmiş, üretilen nanoliflerin yüzeyine enzimler immobilize edilmiştir. Belirli bir süre uygun koşullarda bekletildikten sonra enzimlerin nanolif yüzeyine fiziksel adsorpsiyon metoduna göre iyice tutunması sağlanmıştır. Nanolif yüzeyine immobilize edilen enzimler tekrarlı bir şekilde kullanılarak kaç tekrarda kullanılabileceği ve her tekrarda enzim aktivitesindeki düşüşler incelenmiştir.



Şekil 4.1. Nanoliflerin SEM resimleri (a) kazein katkılı poliamit 6 nanolifler, (b) üzerine proteaz damlatılmış ve 1 saat laboratuvar koşullarında bekletilmiş a'daki nanolifler, (c) 5 defa peş peşe enzim aktivite testi yapılmış b'deki nanolifler

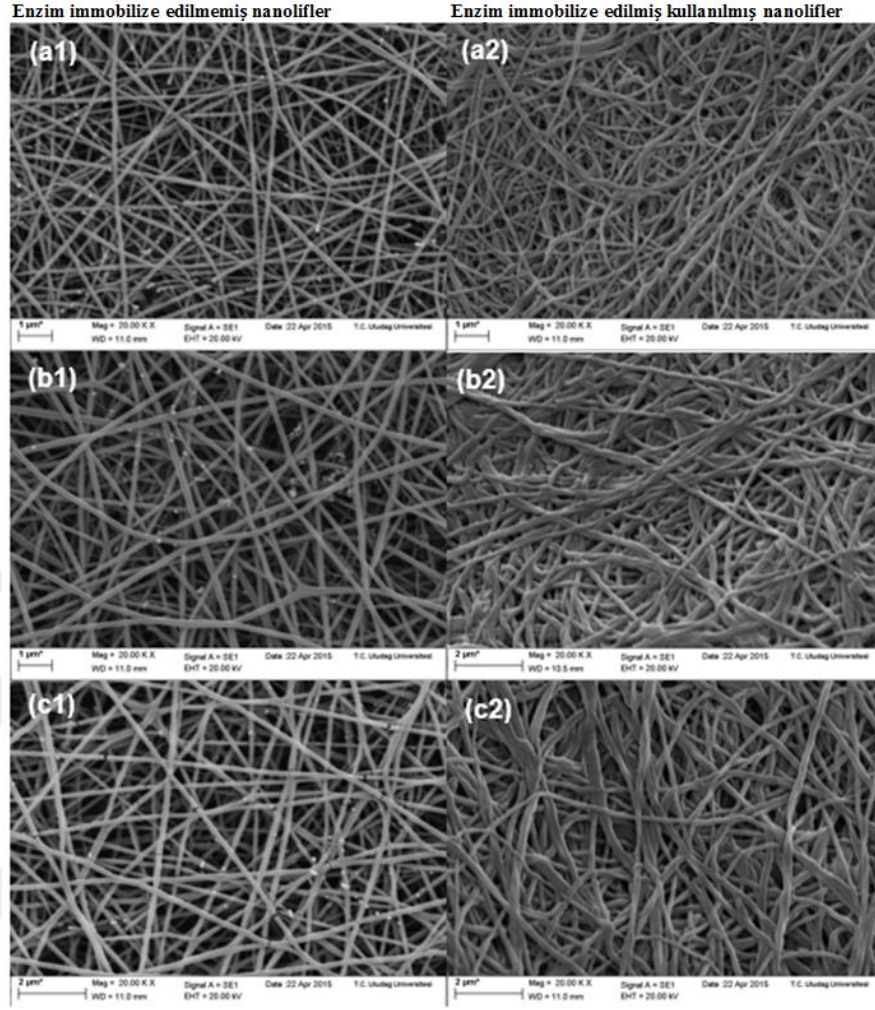
Şekil 4.1'de PA6/kazein nanoliflere proteaz enzimi immobilize edilip 5 defa peş peşe yapılan enzim aktivite testinden sonraki morfolojik görüntülerinin SEM analizleri verilmiştir. Şekil 4.1(a)'da görüldüğü gibi elektro çekim sonrası üretilen nanolifler uniform haldedir. Nanolifler üzerine damlatılan enzimler nanolif yüzeyini ve aralarını doldurmuştur (Şekil 4.1(b)). 5 tekrarlı kullanım sonrası enzimlerin büyük çoğunluğu yüzeyden gitmiş kalanların ise aktiviteleri ihmal edilecek derecelerde azalmıştır. Şekil 4.1(c)'den de görüldüğü gibi aktivite testleri sonrası nanolif üniformitesi bozulmuş nanolifler arası bağlantı noktaları oluşmuştur.

4.1. İyonik Tuz Yüklü Poliamid 6 Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu

Silva ve arkadaşları PA 6,6 nanolifleri enzimatik yöntemlerle aktive ederek lakkaz enzimlerini immobilize etmişlerdir (Silva ve ark. 2007). Naylon yüzeylerin içerdiği fonksiyonel gruplardan ve modifikasyonundaki kolaylıktan dolayı enzim immobilizasyonu için uygun olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışma naylon yüzeylerin enzimlerin kovalent bağlanmayla immobilizasyonunun yanı sıra fiziksel adsorpsiyon metoduyla da immobilize edilebileceğini göstermiştir.

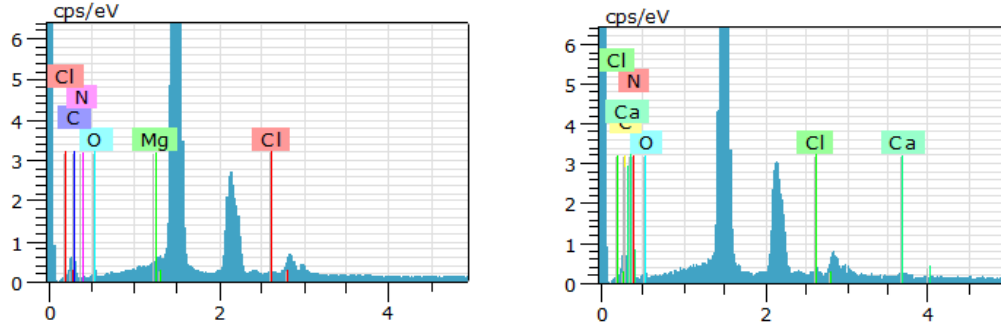
Metal iyonlarının enzim aktivitesinde değişikliğe neden olduğu Reynolds ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Reynolds ve ark. 1993) Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ve Mn^{2+} iyonları sitoplazmik enzimlerin tam performansla çalışmasına yardımcı olurken ağır metal iyonlarının yavaşlatıcı etkisinden bahsedilmiştir. Yapılan bu kısımdaki çalışmada PA 6 nanoliflere Ca^{2+} ve Mg^{2+} katılımının immobilize enzim aktivitelerine olan etkisi incelenmiştir. Ca^{++} , Mg^{++} ve kazein yüklü PA6 nanolifler elektro çekim prosesiyle üretilmiştir. Proteaz enzimlerinin fiziksel adsorpsiyon metoduyla üretilen nanolifler yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Enzimlerin tekrar kullanılabilirliği test edilerek yorumlanmıştır.

Saf PA6 nanolif üretimi için % 15 wt PA6 polimeri formik asit içerisinde laboratuvar koşullarında manyetik karıştırma yöntemiyle çözdürülerek elektro çekim solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon içerisine polimer miktarını referans alarak % 20 wt oranında $CaCl_2$, $MgCl_2$, ve kazein katılarak homojen solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar elektro çekim işlemine tabi tutularak nanolifler üretilmiştir.



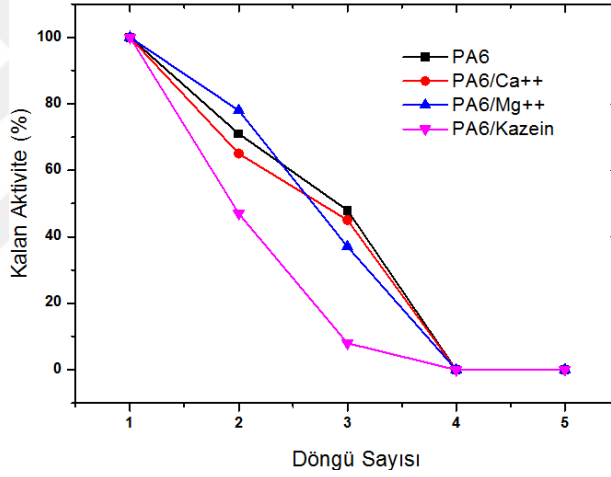
Şekil 4.2. Elektro çekimle üretilmiş (a1) saf poliamit 6, (b1) CaCl₂ ve (c1) MgCl₂ yüklü PA6 nanolifler, ve aynı nanoliflerin 5 aktivite testi sonrası SEM resimleri (a2) saf PA6, (b2) CaCl₂, ve (c2) MgCl₂ yüklü PA 6 nanolifler

Saf PA6, CaCl₂ ve MgCl₂ yüklü nanoliflerin morfolojik görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi uniform ve oval çaplı saf PA6, CaCl₂ ve MgCl₂ yüklü nanolifler elde edilmiştir (Şekil 4.2 a1, b1, ve c1). Diğer taraftan enzim aktivite testlerine tabi tutulduktan sonra enzim immobilize edilmiş nanoliflerde morfolojik değişiklikler meydana gelmiş, nanolif üniformitesi bozulmuş, nanoliflerin şişmesinden dolayı nanoyüzey içerisindeki gözeneklilik azalmıştır (Şekil 4.2 a2, b2, ve c2).



Şekil 4.3. MgCl₂ ve CaCl₂ yüklü PA6 nanoliflerin Energy dispersive X-Ray spektra (EDX) grafikleri

MgCl₂ ve CaCl₂ yüklü PA6 nanoliflerin elemental analizleri energy dispersive X-Ray spectra (EDX) yöntemiyle ölçülmüştür (Şekil 4.3.). Nanolifler içerisindeki elementlerin temsil ettiği pikler grafikte de görüldüğü gibi Şekil 4.4'deki gibi sunulmuştur.



Şekil 4.4. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş saf, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, ve kazein yüklü PA6 nanoliflerin tekrar sayısına bağlı aktivite testi grafikleri

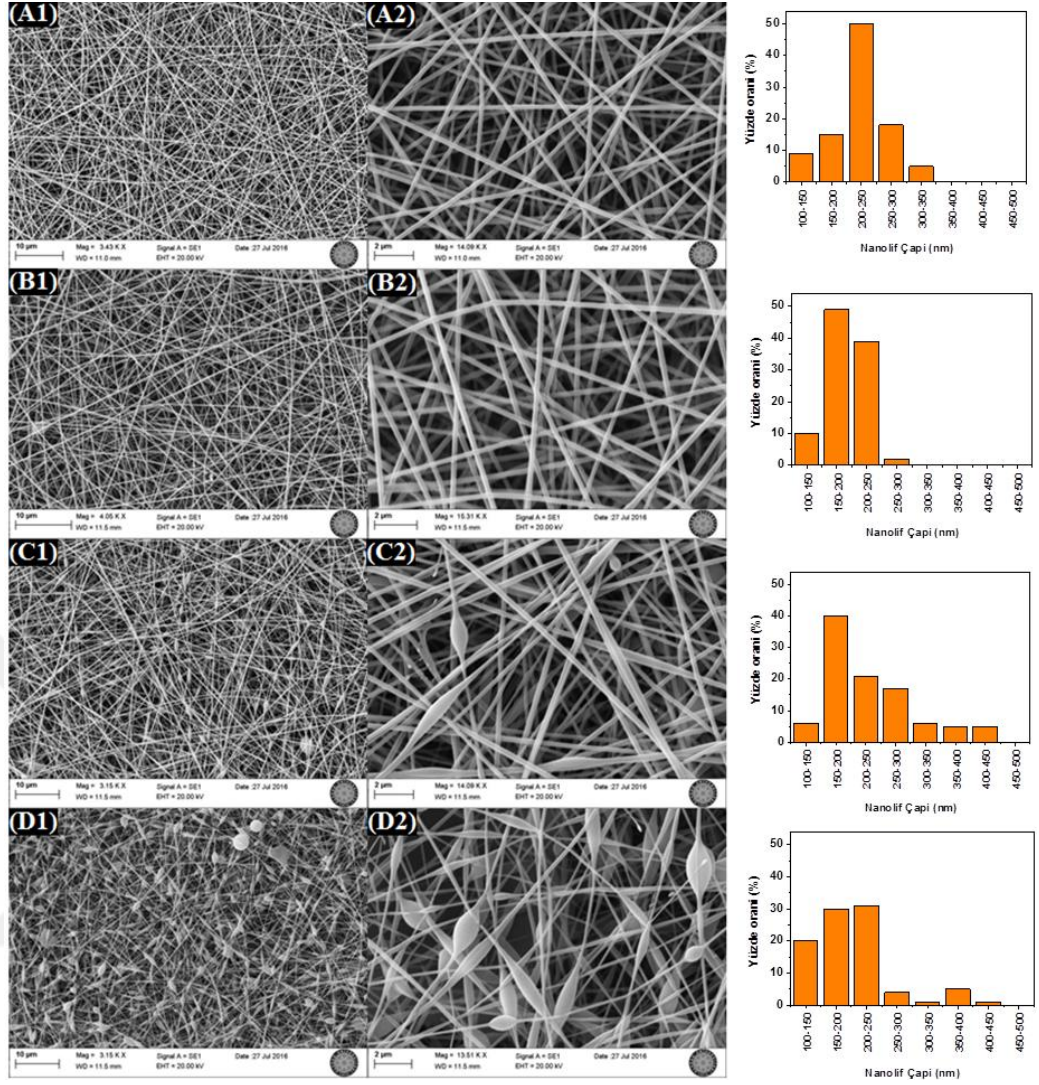
Tekrarlı kullanımlar sonucu immobilize enzim aktivitelerinde düşüş grafikleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Proteaz enziminin immobilizasyon verimliliği saf PA6 nanolifler için yaklaşık olarak % 60 iken; Ca⁺⁺ yüklü PA6 nanolifler için % 57, Mg⁺⁺ yüklü PA6 nanolifler için % 51 ve Kazein yüklü PA6 nanoliflerde ise % 80 olarak ölçülmüştür. Tekrar kullanım miktarı arttıkça enzim aktivitesi düşmüştür. Bu düşüş enzimlerin fiziksel olarak nanoliflerde uzaklaşması ve her kullanımda enzimlerin zamanla bozulmasından kaynaklanmaktadır. 3 tekrarlı test sonrası saf PA6 ile Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ yüklü PA6 nanoliflerde sırasıyla % 48, % 45 ve % 37 oranında bir enzim aktivite verimliliği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan kazein yüklü PA6 nanoliflerde bu oran %

8'e kadar düşmüştür. Bu düşüşün sebebi enzimlerin nanoliflerin bünyesindeki kazeini de sübstrat olarak kullanmasından kaynaklanmaktadır.

4.2. Albümin (Yumurta Beyazı) / PVA Kompozit Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu

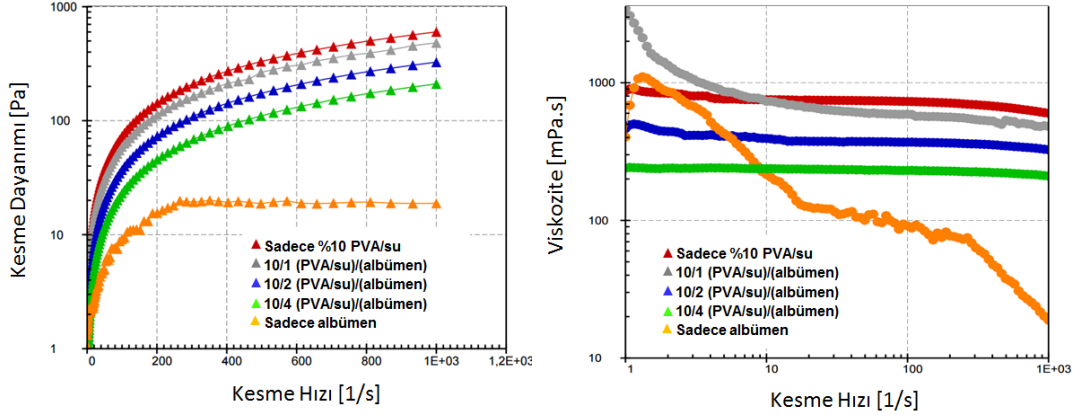
Bu çalışmada albümin içerikli yumurta beyazı, PVA/su çözeltisine farklı oranlarda katılarak elde edilen çözültiden nanoliflerin üretilebilirliği incelenmiş ve sonrasında nanoliflere ise proteaz enzimi immobilize edilerek enzimlerin tekrar kullanılabilirliği tekrarlı enzim aktivite testleriyle irdelenmiştir.

Hazırlanan %10'luk PVA/su çözeltisinde elektro çekim işlemiyle üniform PVA nanolifler elde edilmiştir (Şekil 4.5). Aynı çözelti içerisine azdan çoğa doğru üç farklı miktarda pişmemiş tavuk yumurtasının beyaz kısmı katılarak manyetik karıştırıcıyla karışımı sağlanmıştır. Elde edilen çözültüler elektro çekim işlemine tabi tutularak nanoliflerin üretimi sağlanmıştır.



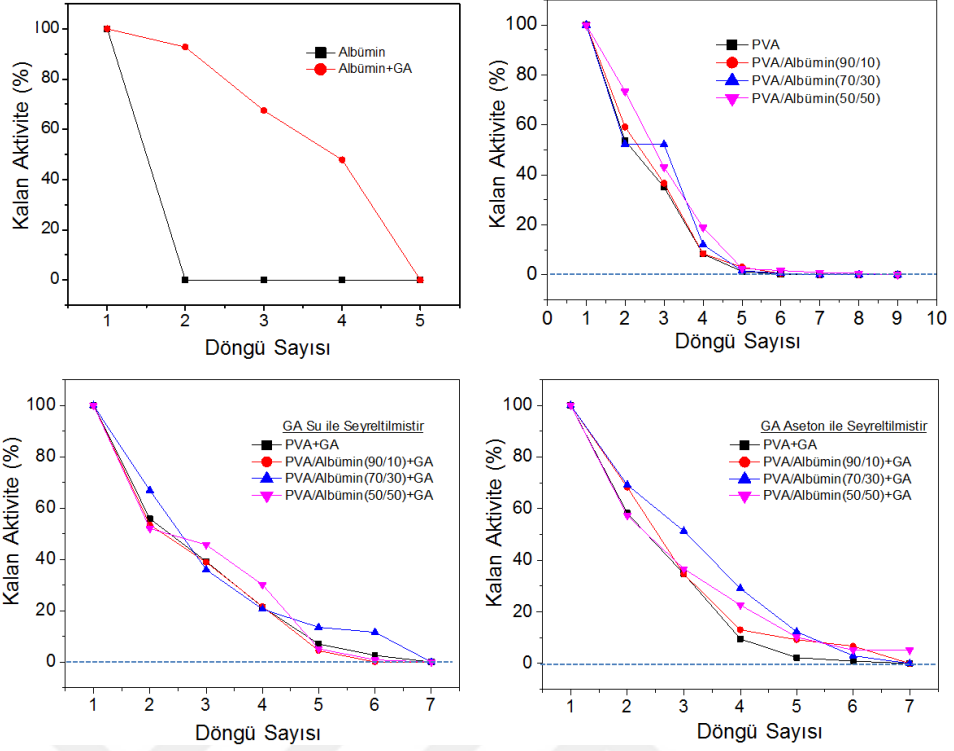
Şekil 4.5. Albumin katkılı PVA nanolifler: (A1, A2) Saf PVA, (B1, B2) PVA/Albümen (90/10), (C1, C2) PVA/Albümen (70/30), (D1, D2) PVA/Albümen (50/50).

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi PVA/Su çözeltisi içerisinde yumurta akı miktarı düşük konsantrasyonda olduğunda nanolif üniformitesi bozulmazken (Şekil 4.5) (B1, B2), yumurta akı arttıkça elde edilen nanolifler üzerindeki boncuklanma miktarı artmıştır (Şekil 4.5) (C1, C2 ve D1, D2). Diğer taraftan boncuklanma arttıkça ortalama nanolif çapında da büyük düşüş meydana gelmiştir.



Şekil 4.6. Farklı oranlardaki PVA/albumin elektro çekim solüsyonlarının reolojik incelenmesi: Kesme Hızı-Kesme Dayanımı (solda) ve Kesme Hızı-Viskozite (sağda).

Nanolif üniformitesindeki bu değişimden dolayı, albuminin PVA/su çözeltisine katılmasıyla elektro çekim solüsyonunun viskozitesinde farklılaşmaya sebep olduğu bilinmektedir. Bunun için farklı oranlarda PVA/su ve albumin çözeltileri hazırlanarak solüsyonların reolojik incelemeleri yapılmıştır. Bu kapsamda 2 derecelik koni açısına sahip koni-plaka tipi bir reometre ile solüsyonların artırılan Kesme Hızı-Kesme Dayanımı ve Kesme Hızı-Viskozite grafikleri çizdirilerek incelenmiştir (Şekil 4.6). Grafiklerden de gözlemlendiği gibi solüsyon içerisindeki albumin oranı arttıkça artan kesme hızında çözelti bünyesinde daha az stres tutmaktadır. Diğer taraftan solüsyon viskozitesi PVA-su-albumin solüsyonu içerisindeki albumin oranı arttıkça azalmaktadır. Nanolif morfolojisinde oluşan boncuklanmanın azalan viskoziteden kaynaklandığı görülmektedir. (Rathna ve arkadaşlarının yaptığı yumurta beyazı-PVA nanolif çalışmasında da benzer trend gözlemlenmektedir (Rathna ve ark. 2011).



Şekil 4.7. Tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri: (A) Albümin ve albümin/GA, (B) PVA ve PVA/Albümin nanolifler, (C) Su ile seyreltilmiş GA ile aktive edilmiş PVA ve PVA/Albümin nanolifler, ve (D) Aseton ile seyreltilmiş GA ile aktive edilmiştir

Tekrarlı kullanımlar sonucu immobilize enzim aktivitelerinde düşüş grafikleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Albümin ve GA katkılı albüminin enzim aktivitelerindeki değişim tekrar sayısına göre grafikleri Şekil 4.7 A’da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi GA katılımı olmadan önce albümin tek sefer kullanılabilmiş, GA katılımıyla albümin moleküllerinin birbirine çapraz bağlanarak stabilizasyonu sağlanmış ve enzimlerin bu moleküller içerisine tutuklanması sağlanmıştır. Böylece enzimler tekrarlı bir şekilde kullanılabilmiştir. Şekil 4.7 B’de, farklı oranlarda albümin katkılı PVA nanoliflere immobilize edilen proteaz enzimlerinin tekrarlı kullanımlarına bağlı enzim aktivite grafiği verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi enzimler fiziksel olarak nanolif yüzeyine tutturulduğu için enzim aktivite testi 5 tekrara kadar yapılabilmiştir ve tüm numunelerde tekrar sayısına bağlı olarak benzer aktivite azalışı gözlemlenmiştir. Şekil 4.7 C’de, PVA ve PVA/albümin nanoliflere önce su içerisinde seyreltilmiş GA damlatılarak nanolif yüzeyi aktif hale getirilmiş daha sonra enzimler yüzeye immobilize edilmeye çalışılmış ve enzim aktivite testine tabi tutulmuştur. GA aktive edilmiş numunelerde aktivite testi 7 tekrara kadar yapılabilmiştir. Aynı konsept GA’nın aseton içerisinde seyreltilmesiyle

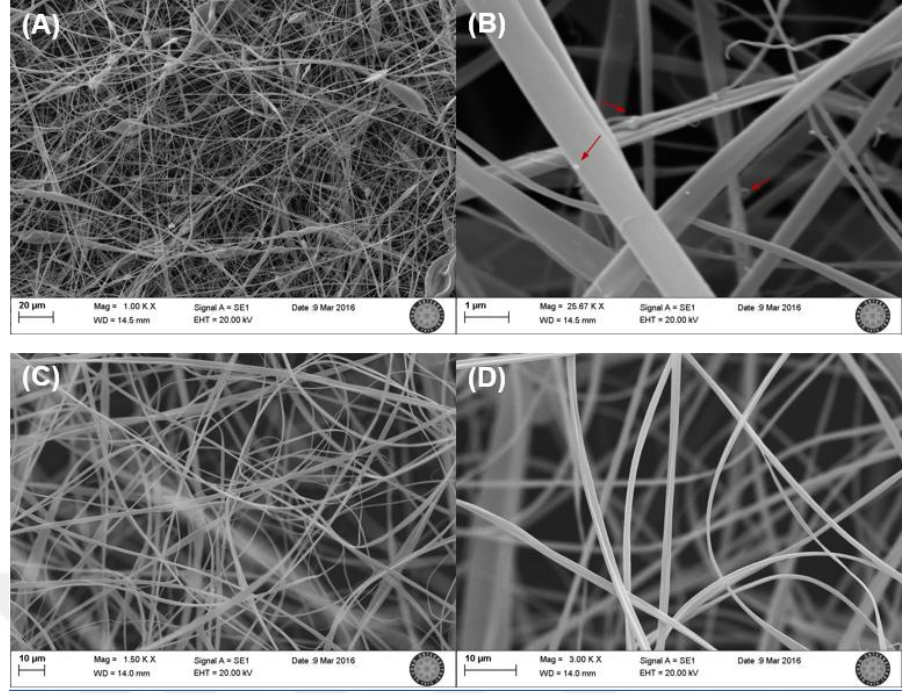
denenmiştir (Şekil 4.7 D). Şekilden de görüldüğü gibi yine enzim aktivite testi 7 tekrara kadar yapılabilmektedir. Diğer taraftan nanolif içerisindeki albümin oranının artması, enzim aktivitesinde az miktarda düşüşe sebep olmuştur. 7 tekrardan sonra bile 50/50 PVA/albümin numunesinde enzim aktivitesi gözlemlenmiştir.

Papain enzimi yüklenmiş PVA nanoliflere buhar fazındaki gluteraldehitin uygulanması sonucu nanolif içerisindeki polimer zincirlerin çapraz bağlanmasıyla enzimlerin lif içerisinde immobilizasyonunu Cortez ve arkadaşları çalışmış, enzimlerin katalitik aktivitelerinin 6 döngüye kadar devam ettiği rapor edilmiştir (Cortez ve ark. 2015). Bu tez çalışmasında ise üretilen PVA ve PVA/albümin nanoliflere su ve aseton ile seyreltilmiş GA damlatılmış ardından proteaz enzimleri yüzeye immobilize edilmiştir. Enzim aktivitesi altıncı döngüye kadar her numunede gözlemlenmiştir. GA ile aktifleştirilmiş albümin katkılı PVA nanoliflerde hem döngü sayısına bağlı olarak aktivite düşüşünün daha az olduğu hem de döngü sayısının 7'ye kadar çıktığı gözlemlenmiştir.

4.3. Gümüş Nanoparçacık Yüklü Selüloz Monoasetat Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu

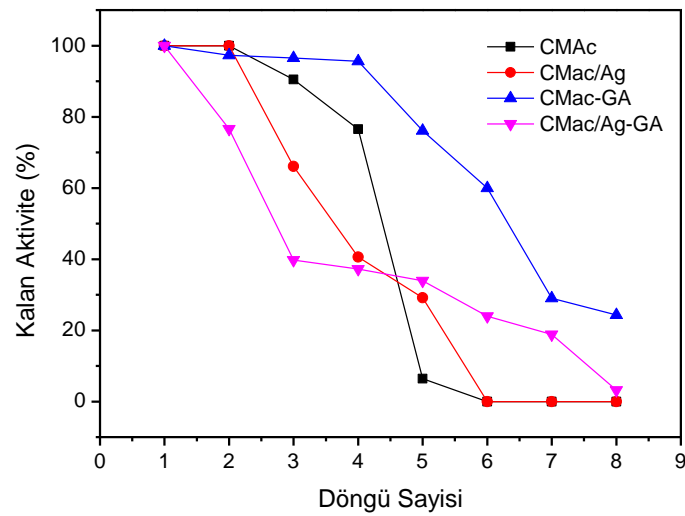
Selüloz esaslı nanoliflerin taşıdığı fonksiyonel gruplardan ve bu grupların kolaylıkla modifikasyonun sağlanabildiğinden dolayı enzim immobilizasyonunda potansiyel olarak kullanılabilen Sulaiman ve arkadaşları tarafından yapılan literatür çalışma makalesinde belirtilmiştir (Sulaiman ve ark. 2014). Bu kapsamda saf selüloz asetat ve gümüş katkılı selüloz asetat nanolifler üretilerek enzim immobilizasyonunda kullanılabilirliği incelenmiştir. Petkova ve arkadaşları gümüş nanoparçacıkların enzim immobilizasyonu için uygun materyaller olduğunu rapor etmişlerdir (Petkova ve ark. 2012).

Bu kapsamda % 15 lik selüloz monoasetat/aseton çözeltisi içerisine bir miktar gümüş nitrat ($AgNO_3$) katılarak, manyetik karıştırıcıyla çözdürülmesi sağlanmıştır. Çözelti içerisinde zamana ve manyetik karıştırmaya bağlı olarak gümüş nanoparçacıklar oluşmuştur. Elde edilen gümüş nanoparçacıklı selüloz asetat/aseton çözeltisi elektro çekim işlemine tabi tutularak gümüş nanoparçacık yüklü selüloz asetat nanolifler elde edilmiştir (Şekil 4.8 A,B).



Şekil 4.8. Ultra incelikteki (A, B) CMA/Ag, ve (C, D) saf CMA nanoliflerin SEM resimleri

Nanolif içerisinde ve yüzeyindeki gümüş nanoparçacıklar Şekil 4.8B’de ok işaretiyle gösterilmiştir. Karşılaştırma amacıyla aynı yöntemle elde edilmiş saf selüloz nanolifler Şekil 4.8 C ve D’de gösterilmiştir. Şekillerden de görüleceği gibi gümüş nanoparçacıklarının nanolif yapısına katılımla nanolif üniformitesi düşmüş ve *bead-on-the-string* yapı denilen lif üzerinde boncuklu yapı görüntüsü meydana gelmiştir.

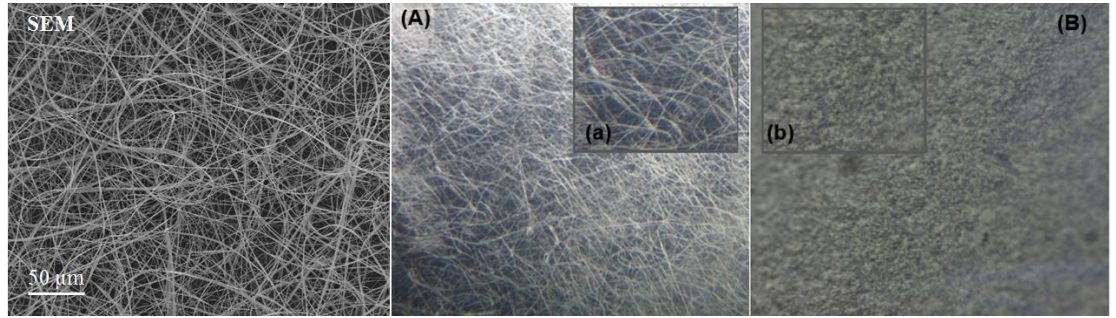


Şekil 4.9. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş CMA, CMA/Ag, CMA/GA, CMA/Ag/GA nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri

Tekrarlı kullanımlar sonucu immobilize enzim aktivitelerinde düşüş grafikleri Şekil 4.9'da verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi tekrarlı kullanımlarda en iyi sonucu GA ile modifiye edilmiş CMA nanolifler vermiştir. 4. kullanıma kadar GA modifiyeli CMA nanoliflerde immobilize edilmiş enzim aktivitelerinde ciddi bir azalış görülmemiş, devam eden tekraralarda enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Diğer taraftan 7. kullanım sonrasında bile enzimlerin halen aktif olduğu gözlemlenmiştir. CMA nanolif yapısına gümüş nanoparçacıkların katılımı GA ile modifiye edilmesine rağmen tekrarlı kullanım sayısını arttırmamıştır.

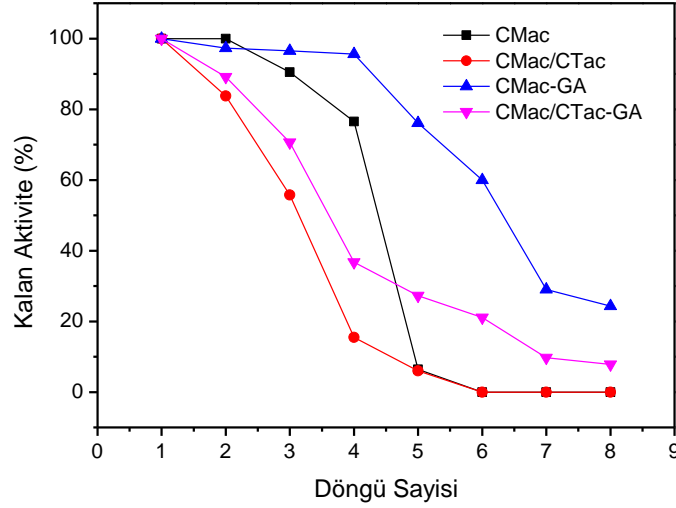
4.4. Selülozik (Selüloz Monoasetat/Selüloz Triasetat) Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu

Ortalama çapı 500 nm olan ultra incelikte selüloz lifleri elektro çekimle elde edilen selüloz asetat liflerin alkali ortamda hidrolize edilmesiyle Wang ve arkadaşları tarafından üretilmiştir (Wang ve ark. 2004). Selülozun yapısında bulunan asetil gruplarının miktarının immobilize edilen enzim miktarına etki ettiği rapor edilmiştir. Bu kapsamda immobilizasyon yüzeyinde asetil grup miktarını arttırmak için selüloz monoasetat nanoliflere selüloz triasetat katılarak sağlanması amaçlanmıştır.



Şekil 4.10. Ultra incelikteki (A, a) CMA, ve (B, b) CMA/CTA nanoliflerin optik mikroskop resimleri, ve CMA nanoliflerin SEM resmi

% 15 oranında olacak şekilde selüloz monoasetat, aseton içerisinde laboratuvar ortamında çözündürülerek elektro çekim solüsyonu hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiden saf CMO nanolifler üretilmiştir (Şekil 4.10a.). Aynı çözelti içerisinde bir miktar selüloz triasetat katılarak hibrit nanolif yapı elde edilmek istenmiştir. Fakat çözeltiye selüloz triasetat katıldıktan sonra üniform lif yapısı elde edilememiştir. Yapı partiküllerden oluşmuş bir yüzey görüntüsü vermiştir (Şekil 4.10b.).



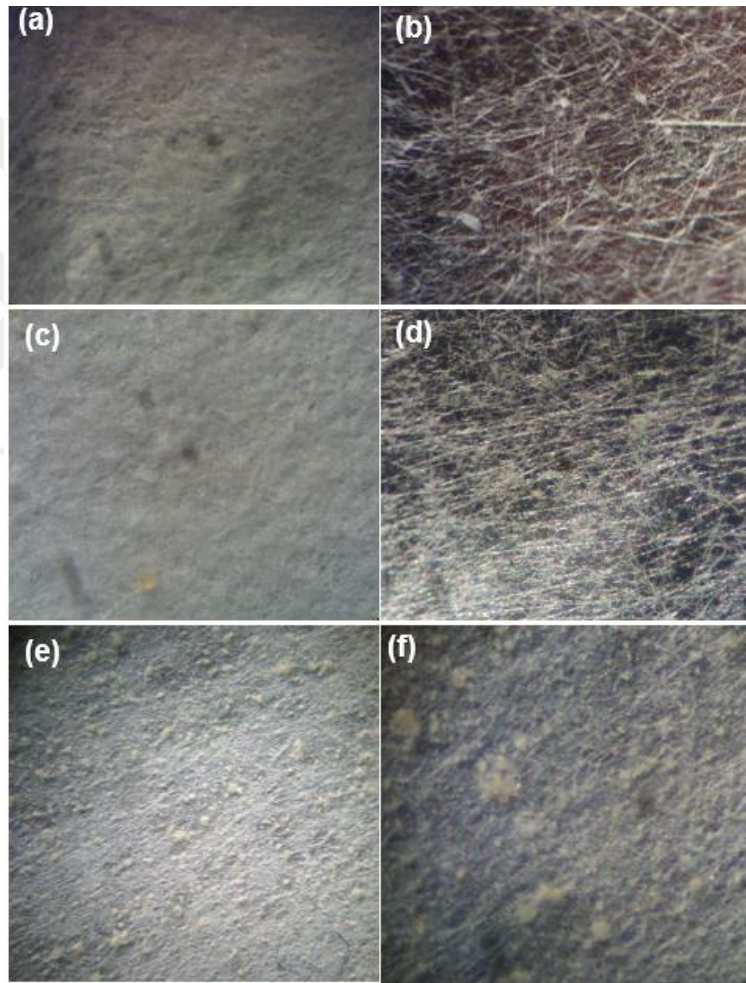
Şekil 4.11. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş CMA, CMA/CTA, CMA/GA, CMA/CTA/GA nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri

Tekrarlı kullanımlar sonucu immobilize enzim aktivitelerindeki düşüş grafikleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Saf CMA nanolifler ve CMA/CTA hibrit yapının aktivitesi 5. kullanım sonrası sonlanmıştır. CMA ve CMA/CTA nanoliflerin GA ile modifiye edilmesi immobilize enzimlerin kullanım sayısını arttırmıştır. Fakat elektro çekim solüsyonuna katılan CTA molekülleri üretilmek istenen CMA/CTA nanoliflerinde üniformiteyi bozmuş; nanolif yerine CMA/CTA hibrit yapısı oluşmuştur. Bu durum tekrarlı kullanımlar sonucu enzim aktivitesinde düşüşe sebebiyet vermiştir. CMA/CTA yapısının nanolif yerine partikül yapıda olması tekrarlı kullanımlar sonrası sistemden enzimlerin partiküllerle uzaklaşmasına sebep olmuştur. Bu da enzim aktivitesinin düşüşüne sebep olmuştur.

4.5. Polikaprolakton (PCL)/Kitosan Kompozit Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu

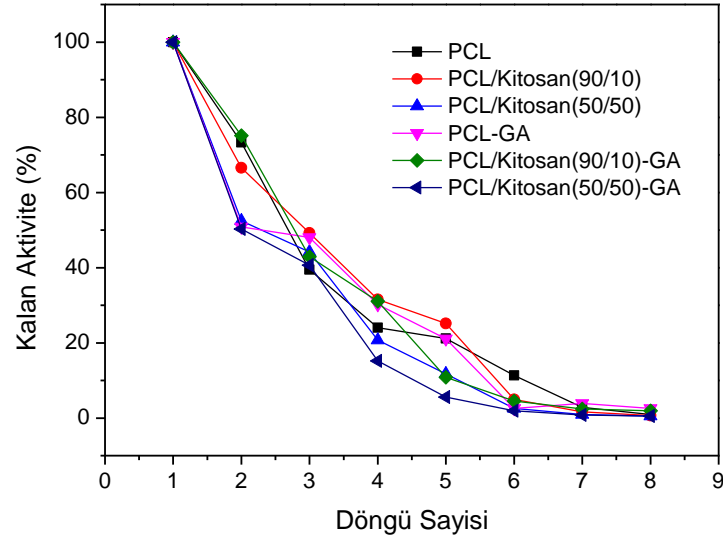
Poliamit 6/kitosan nanoliflerin enzim immobilizasyonunda kullanımını Maryskova ve arkadaşları, üretilen nanoliflere lakkaz immobilize edip aktivitedeki artışı gözlemleyerek rapor etmişlerdir (Maryskova ve ark. 2016). Lipaz enzimlerinin PCL içerisine enkapsüle edilmesiyle immobilizasyonu Song ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Song ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmada PCL/kitosan nanolifler üretilerek fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonunda kullanılabilirliği incelenmiştir.

Yapılan bu çalışmada ultra incelikte PCL ve PCL/kitosan nanolifleri elektro çekim yöntemiyle üretilmiştir. İlk önce % 15'lik PCL/aseton çözeltisi laboratuvar koşullarında hazırlanmış, PCL tamamen çözülüp şeffaf bir çözelti görüntüsü elde edildikten sonra üç farklı miktarda kitosan toz halinde, elde edilen çözeltiye eklenmiştir. Laboratuvar ortamında yaklaşık iki saat manyetik karıştırıcıyla karıştırıldıktan sonra elektro çekim işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen liflerin mikroskop görüntüleri Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Ultra incelikteki PCL/CHI hibrit nanoliflerin mikroskop resimleri: (a-b) saf PCL lifler, (c-d) PCL/CHI (90/10), (e-f) PCL/CHI (50/50) nanolifler

Şekilden de görüldüğü gibi yapı içerisindeki kitosan miktarı arttıkça kitosanın çözelti içerisindeki çözünmeyen kısmının artmasından dolayı kitosanlar parçacık halinde lif içerisinde ve yüzeylerinde toplanmıştır.



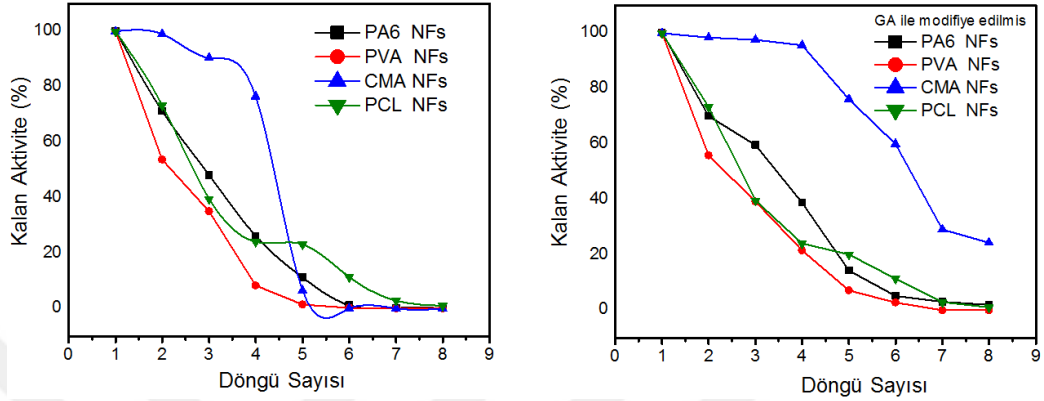
Şekil 4.13. Yüzeyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş PCL, PCL/CHI, PCL/GA, ve PCL/GA/CHI nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri

Tekrarlı kullanımlar sonucu immobilize enzim aktivitelerinde düşüş grafikleri Şekil 4.13'te verilmiştir. PCL nanolif yapısına kitosanın katılımı enzim aktivitesinde ve tekrarlı kullanım sonuçlarında ciddi değişikliklere sebep olmamıştır. Hatta üretilen tüm PCL/kitosan nanolif numuneleri GA ile modifiye edilmesine rağmen sonuçlarda ciddi farklılıklar gözlemlenmemiştir.

SEM ve optik mikroskop resimlerine bakıldığında üretilen nanoliflerde kitosan partikülleri PCL nanolifler içerisine gömülü haldedir ve PCL tarafından enkapsüle edilmiş vaziyettedir. Bu da PCL/kitosan hibrit nanoliflerde, kitosan yapıda olsa bile PCL tarafından kapsüllendiği için dış katmanın PCL'dan meydana geldiğini göstermiştir. Yani yapıya kitosan katılsa bile enzimlerin immobilizasyonda sadece PCL ile temas edeceği ve kitosanın immobilizasyonda herhangi bir fonksiyonunun olmadığı sonucuna varılmaktadır.

5. SONUÇLAR

PA 6, PVA, CMA ve PCL polimerlerinden elde edilmiş nanoliflerde fiziksel adsorpsiyonla proteaz enzimi immobilizasyonunun etkisi döngü sayısının kalan aktiviteyle olan ilişkisi karşılaştırmalı olarak Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Yüzyine proteaz enzimleri immobilize edilmiş (A) PA6, PVA, CMA, ve PCL nanoliflerin tekrar sayısına bağlı enzim aktivite testi grafikleri, (A) daki nanoliflerin GA ile aktive edildikten sonra enzimler immobilize edilip testlerin yapılmış hali

Fiziksel adsorpsiyonda yüzeyin yükü önem arz etmektedir. CMA’da görülen tekrar sayısına göre immobilize enzimlerdeki verimlilik düşüşündeki azlık CMA’nın yüzeyinin fiziksel adsorpsiyon için daha uygun bir yüzey olmasının sonucudur. GA ile modifiye edilmiş nanolif yapılarında yine en iyi sonucu CMA nanolifler vermiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda, fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonunda CMA bazlı nanoliflerin yüzey olarak kullanımının en iyi sonuçları verdiği gözlemlenmiştir. Nanolif yüzeyleri glutraldehit ile aktifleştirildiğinde immobilizasyon verimliliği ve stabilitesi bir miktar artmıştır. Diğer taraftan polimer nanolif yapısına Ca^{++} , Mg^{++} , kazein, albümin, gümüş nanoparçacık, kitosan ve selüloz tri asetat gibi kimyasalların katılımıyla elde edilen hibrit nanolif yapıların fiziksel adsorpsiyon yoluyla enzim immobilizasyonunda kullanımında belirgin stabilite artışı gözlemlenmemiştir. PA 6/kazein nanoliflerde immobilize enzim aktivitesindeki düşüş proteazın nanolif içerisinde bulunan kazeini de substrat olarak parçalamasından kaynaklanmıştır. Albüminin PVA nanolif yapısına katılımıyla immobilize enzim aktivitesi bir miktar artmıştır. Gümüş nanoparçacık ve CTA’nın CMA nanolif yapısına katılımı saf CMA nanoliflerle kıyaslandığında immobilize enzim aktivitesinde bir miktar düşüşe neden olmuştur.

KAYNAKLAR

Ahmetoğlu, N. 2011. Bacillus cereus KG5' in proteaz enzimi üzerine alışmalar. *Yüksek Lisans Tezi*, DÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

Andray, A., L. 2008. Science and technology of polymer nanofibers. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 403 pp.

Arslan, F. 2004. Ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

Aykut, Y. 2012. Enhanced Field Electron Emission from Electrospun Co-Loaded Activated Porous Carbon Nanofibers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(7): 3405-3415.

Begum, S., Wu, J., Takawira, C., M., Wang, J. 2016. Surface Modification of Polyamide 6,6 Fabrics with an Alkaline Protease – Subtilisin. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 11(1): 64-74.

Celep, ř. 2007. Nanoteknoloji ve tekstilde uygulama alanları. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.

Cireli, A., Kutlu, B., Onar, N., Erkan, G. 2006. Tekstilde İleri Teknolojiler. *Tekstil ve Mühendis*, 13(61): 7-20.

Çınar, E. 2013. Elektro-Eğirme Yöntemiyle Bor Katkılı Bi2M3CO2, (M= Sr, Ca, Ba) Termoelektrik Nanokompozit Üretimi ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.

Cortez, I., E., M., Garcia, J. R., Gonzales, V., G., Gutierrez, D., I., G., Navarro, M., A., G., Silva, R., C. 2015. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. *Materials Science and Engineering C*, 52: 306-314.

Demirkan, E., Dincbas, S., Sevinc, N., Ertan, F. 2011. “Immobilization of *B. amyloliquefaciens* α -amylase and comparison of some of its enzymatic properties with the free form.” *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6): 6690-6701.

Dinç, H. 2013. Polivinil borat sentezi ; Elektrospün yöntemiyle nanofiber hazırlanması ve karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.

- Etcı, K. 2011.** Sol- Jel tekniğine göre manyetik nanopartiküllere lipaz immobilizasyonu ve bazı enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya.
- Hedström, M., Plieva, F., Galaev, I., Y., Mattiasson, B. 2008.** Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3): 907-912.
- Huang, M., Zhang, Z., Kotaki, M., Ramakrishna. S. 2003.** A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2003(63): 2223–2253.
- Huang, X., J., Chen, P., C., Huang, F., Ou, Y., Chen, M., R., Xu, Z., K. 2011.** Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(3-4): 95-100.
- Huang, X.J., Dan, G., Xu, Z.K. 2007.** Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, 43(9): 3710-3718.
- Keay, L., Wildi, B.S. 1970.** Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral proteases. *Biotechnology and Bioengineering*, 12 (2): 179–212.
- Maryskova, M., Ardao, I., Garcia-Gonzalez, C.A., Martinova, L., Rotkava, J., Sevcu, A. 2016,** Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals, *Enzyme and Microbial Technology*, 89:31–38
- Petkova, G.A., Zaruba, K., Zvatora,P., Kral, V. 2012.** Gold and silver nanoparticles for biomolecule immobilization and enzymatic catalysis, *Nanoscale Research Letters*, 7:287-297.
- Rathna, G.V.N., Jog, J.P., Gaikwad, A.B. 2011.** Development of non-woven nanofibers of egg albumen-poly (vinyl alcohol) blends: influence of solution properties on morphology of nanofibers. *Polymer Journal*, 43, 654–661.
- Reynolds L.J.,Hughes , L.L., Louis, A.I., Kramer, R.M., Dennis, E. A. 1993.** Metal ion and salt effects on the phospholipase A₂, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A₂. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1167 (3): 272-280
- Saallah, S., Naim, M., N., Lenggoro, I., W., Mokhtar, M., N., Bakar, N., F., A., Gen, M. 2016.** Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning. *Biotechnology Reports*, 10: 44-48.
- Sarıboğa, B. 2008.** Fenilketonüri (PKU) teşhisinde potansiyometrik biyosensörler geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Samsun.

Scampicchio, M., Arecchi, A., Lawrence, N., S., Mannino, S. 2010. Nylon nanofibrous membrane for mediated glucose biosensing. *Sensors and Actuators B*, 145: 394-397.

Schoemaker, H.E., Mink, D., Wubbolts, M.G. 2003. Dispelling the mythsbiocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 299: 1694-7.

Senthilkumar, P., Vigneswaran, C., Kandhavadi, P. 2014. A Novel Approach in Single Stage Combined Bleaching and Protease Enzyme Treatments on Wool Fabrics. *Fibers and Polymers*, 16(2): 397-403.

Silva, C., Silva, C., J., Zille, A., Guebitz, G., M., Paulo, A., C. 2007. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 867-875.

Song, J., Kahveci, D., Chen, M., Guo, Z., Xie, E., Xu, X., Besenbacher, F., Dong, M. 2012. Enhanced Catalytic Activity of Lipase Encapsulated in PCL Nanofibers. *Langmuir*, 28: 6157-6162.

Sulaiman, S., Mokhtar, M.N., Naim, M.N., Baharuddin, A.S., Sulaiman, A. 2015, A Review: Potential Usage of Cellulose Nanofibers (CNF) for Enzyme Immobilization via Covalent Interactions, *Appl Biochem Biotechnol*, 175:1817–1842

Şafak, Ş. 2012. Tekstilde nanolifler, kullanım alanları ve nanolif üretim yöntemleri. Bursa.

Tekin, N. 2008. Türkiye kaynaklı bacillus spp.'lerin alkalen proteaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmen karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Turus, N. 2011. Alkali soğukta aktif proteaz üreticisi bacillus sp. Suşlarının izolasyonu, enzim üretimi, karakterizasyonu ve enzimin biyoteknolojik kullanım olanakları. *Yüksek Lisans Tezi*, ÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.

Wang, Y., Hsieh, Y.L. 2004. Enzyme Immobilization to Ultra-Fine Cellulose Fibers via Amphiphilic Polyethylene Glycol Spacers, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 42:4289 -4299.

Whang, Z., G., Wan, L., S., Liu, Z., M., Huang, X., J., Xu, Z., K. 2009. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4): 189-195.

Wu, L., Yuan, X., Sheng, J. 2005. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science*, 250(1-2): 167-173.

Zhang, J., Song, M., Wang, X., Wu, J., Yang, Z., Cao, J., Chen, Y., Wei, Q. 2016. Preparation of a cellulose acetate/organic montmorillonite composite porous ultrafine fiber membrane for enzyme immobilization. *J. APPL. POLYM. SCI.*, 133: 43818-43826.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Haluk Çevik
Doğum Yeri ve Tarihi	Gölcük, Kocaeli, 06.02.1984
Yabancı Dili	İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	Edirne Süleyman Demirel Fen Lisesi (1999-2002)
Lisans	Gaziantep Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü (2005-2013)
Yüksek Lisans	Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Ana Bilim Dalı (2014-2016)
İletişim (e-posta)	cevikhaluk41@gmail.com
Yayımları	<i>Evaluation of fine fiber structures as an affinity material for enzymes” Autex 2015 World Textile Conference, Bükreş, Romanya</i>