

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ARGİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE
UYGULAMALARINA YÖNELİK NANOFİBER
MEMBRAN PLATFORMLARININ HAZIRLANMASI

DOKTORA TEZİ

CEYHUN IŞIK

ARALIK 2019

MUĞLA

C. IŞIK

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MUĞLA 2019

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ARGİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE
UYGULAMALARINA YÖNELİK NANOFİBER
MEMBRAN PLATFORMLARININ HAZIRLANMASI

DOKTORA TEZİ

CEYHUN IŞIK

ARALIK 2019

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

CEYHUN IŞIK tarafından hazırlanan ARGİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARINA YÖNELİK NANOFİBER MEMBRAN PLATFORMLARININ HAZIRLANMASI başlıklı tezinin, 27/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Mustafa TEKE * (Danışman) İmza: 
Kimya Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK (Üye) İmza: 
Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale

Prof. Dr. Selçuk AKTÜRK (Üye) İmza: 
Fizik Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Ayşe DİNÇER (Üye) İmza: 
Kimya Anabilim Dalı, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin İSPİRLİ DOĞAÇ (Üye) İmza: 
Kimya Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Mehmet Emin DURU İmza: 
Kimya Ana Bilim Dalı Başkan V.,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Mustafa TEKE İmza: 
Danışman, Kimya Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 27/12/2019

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığımı da beyan ederim.

Ceyhun Işık

27/12/2019

ÖZET
ARGİNAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARINA
YÖNELİK NANOFİBER MEMBRAN PLATFORMLARININ
HAZIRLANMASI

Ceyhun IŞIK

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TEKE

Aralık 2019, 238 sayfa

Elektroegirme yöntemi, elektrostatik kuvvetler kullanılarak nanometre ile mikrometre arasında değişen çaplarda polimer fiberlerin üretimi için en etkin, kolay uygulanabilen, ekonomik, hızlı ve çok yönlü bir fiber üretim tekniğidir. Bu yöntem homojen çap, yüksek yüzey/hacim oranına sahip, ayarlanabilir gözeneklilik ve tercih edilen özelliklere ulaşmak için nanofiber boyutunu ve morfolojisini kontrol etme kabiliyeti gibi sayısız avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlarından dolayı elektroegirme yöntemi ile üretilmiş nanofiberler özellikle enzim immobilizasyonu uygulamalarında yüksek kullanım potansiyeline sahiptirler.

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde enzim immobilizasyonu başta gıda, eczacılık, deterjan ve tekstil olmak üzere pek çok endüstriyel alanda geniş uygulama alanına sahiptir. İmmobilize enzimler tekrar tekrar kullanımları, enzimin reaksiyon ortamından kolayca uzaklaşması, sıcaklık ve pH gibi dış etkenlere karşı dayanıklı olmaları ve enzimatik reaksiyonu herhangi bir zamanda başlatmak, devam ettirmek ve istenildiği anda durdurmak gibi özellikleri ile serbest enzimlere göre pek çok avantaj sunarlar.

Bu doktora tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar üç aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada elektroegirme yöntemi ile selüloz asetat (CA)/poli vinil prolidon (PVP), CA/PVP/Mn⁺², poli vinil alkol (PVA)/kitosan (CH), PVA/CH/Mn⁺², poli kaprolakton (PCL)/CH, PCL/CH/Mn⁺², PVA/β-siklo dekstirin (β-CD) ve PVA/β-CD/Mn⁺² olmak üzere sekiz farklı nanofiber membran platformun sentezi, sentez

parametrelerinin optimizasyonu ve hazırlanan nanofiberlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kısımda her bir nanofiber membran için sentez optimizasyonu sırasında, % polimer derişimleri, % Mn^{+2} derişimi, uygulanan voltaj, iğne-toplayıcı arası uzaklık ve polimer çözeltisinin enjeksiyon hızı parametreleri belirlendi. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında ise SEM, FTIR, TGA ve XRD analizleri yapıldı. İkinci aşamada optimum koşullarda sentezlenen ve en uygun nanofiber oluşumu gözlenen sekiz nanofiber membranada arginaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Arginaz immobilizasyonunun optimizasyonu için arginaz miktarı, taşıyıcı miktarı, adsorpsiyon süresi ve glutaraldehit miktarı gibi temel parametreler araştırıldı. Optimum koşullarda hazırlanan arginaz immobilize nanofiberlerin karakterizasyon çalışmalarında ise optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri araştırıldı. Üçüncü aşamada ise aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar ile hazırlanan geri döngülü kolon sistemiyle protein biyosentezinde rol alan, poliaminlerin biyosentezi için öncül olan L-ornitin oluşturma performansı incelendi.

Elektroegirme yöntemi ile sentezlenen sekiz farklı nanofiber membran aktivite ve kararlılık açısından değerlendirildiğinde en iyi sonuçları arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar göstermiştir. Serbest arginaz enzimi için optimum sıcaklık $35^{\circ}C$ iken arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar için bu değer $45-55^{\circ}C$ aralığındadır. Serbest arginaz enzimi için optimum pH değeri 10 iken bu değer arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar için azalarak 8 olarak bulunmuştur. pH kararlılık ve termal kararlılık açısından arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar serbest enzime göre çok daha geniş aralıklarda daha yüksek aktivite göstermiştir. Ayrıca yapılan tekrar kullanılabilirlik deneylerinde 20 kullanım sonucunda arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranların aktivitelerinin %50'nin altına düştüğü bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Elektroegirme, Nanofiber, Arginaz, Immobilizasyon, L-ornitin

ABSTRACT

PREPARATION OF NANOFIBER MEMBRANE PLATFORMS FOR IMMOBILIZATION AND APPLICATIONS OF ARGINASE ENZYME

Ceyhun ISIK

Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TEKE

December 2019, 238 pages

Electrospinning is the most efficient, easy to apply, economical, fast and versatile fiber production technique for the production of polymer fibers with diameters ranging from nanometers to micrometers using electrostatic forces. This method offers numerous advantages such as homogeneous diameter, high surface/volume ratio, adjustable porosity and the ability to control nanofiber size and morphology to achieve preferred properties. Due to these advantages, nanofibers produced by electrospinning method have high potential for use especially in enzyme immobilization applications.

Thanks to advances in biotechnology in recent years, enzyme immobilization has a wide range of applications in many industrial fields, particularly in food, pharmaceutical, detergent and textile industries. Immobilized enzymes offer many advantages over free enzymes because of their repeated use, easy removal of the enzyme from the reaction medium, resistance to external factors such as temperature and pH, and initiating, continuing and stopping the enzymatic reaction at any time.

This doctoral thesis which is presented consists of three parts. The first part is the synthesis of CA/PVP, CA/PVP/Mn²⁺, PVA/CH, PVA/CH/Mn²⁺, PCL/CH, PCL/CH/Mn²⁺, PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber structures by electrospinning method, optimization of synthesis parameters and characterization of prepared nanofibres.

In this part, polymer concentrations %, Mn²⁺ concentration %, applied voltage, needle-collector distance and polymer injection rate were determined during the synthesis optimization for each nanofibers. For the characterization of the nanofibers, SEM,

FTIR, TGA and XRD analyzes were performed. In the second part, arginase immobilization was carried out eight nanofibers membranes which were synthesized under optimum conditions and optimal nanofiber formation was observed. For the optimization of arginase immobilization, the amount of arginase, the amount of nanofibers, the adsorption time and the amount of glutaraldehyde were investigated as basic parameters. The optimum temperature, optimum pH, pH stability, thermal stability, kinetic parameters and reusability parameters were investigated in the characterization of arginase immobilized nanofibers prepared under optimum conditions. In the third part, L-ornithine formation performance, which is the precursor for the biosynthesis of polyamines and involved in protein biosynthesis, was investigated with the recycled column system of arginase immobilized PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofibers, which is suitable for activity and stability.

Among the eight different nanofiber membranes synthesized by electrospinning, arginase immobilized PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofiber membranes showed the best results when evaluated in terms of activity and stability. The optimum temperature for the free arginase enzyme was 35°C, while for arginase immobilized PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofiber membranes, this value was in the range of 45 to 55°C. The optimum pH value for free arginase enzyme was 10 while this value was found to be 8 for arginase immobilized PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofiber membranes. In terms of pH stability and thermal stability, arginase immobilized PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofiber membranes showed higher activity in a much wider range than the free enzyme. In addition, in the reusability experiments, it was found that the activity of arginase immobilized PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofiber membranes decreased below 50% after 20 reuse.

Keywords: Electrospinning, Nanofiber, Arginase, Immobilization, L-ornithine

ÖNSÖZ

Verdiği destek ile tekrar ayağa kalkmamı sağlayan, en dara düştüğüm zamanlarda hayat görüşü ve fikirleri ile beni yönlendiren, tez çalışmam boyunca benimle sabırla ilgilenen, anlayış ve hoşgörüsüyle bana destek olan ve en önemlisi bir haksızlık karşısında ne olursa olsun bunun karşısında durmayı öğreten hem ağabeyim hem de değerli hocam Prof. Dr. Mustafa TEKE'ye,

Tez çalışmam boyunca bilgilerini benimle paylaşan hocamlarım Dr. Öğr. Üyesi Yasemin İSPIRLİ DOĞAÇ ve Öğr. Gör. Dr. İlyas DEVECİ'ye,

Zor zamanlarımda bıkmadan usanmadan bana destek olan, her zaman yanımda olan, her konuda değerli bilgilerini benimle paylaşan ve Muğla'nın bana kattığı en önemli insanlardan biri olan değerli hocam Prof. Dr. Selçuk AKTÜRK'e,

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim, her konuda yanımda olan, bugünlere gelmemde büyük payı olan ve bana güven veren aileme,

Bu tez çalışması 218Z092 no'lu TÜBİTAK projesi ile finanse edilmiş olup, bu desteğinden dolayı TÜBİTAK'a,

MUBAP19/076/04/1 no'lu proje kapsamında bu tezi destekleyen Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Ve emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Genel Bilgiler ve Kaynak Özetleri	3
1.2.1. Biyoteknoloji	3
1.2.2. Biyoteknolojinin tarihi.....	4
1.2.3. Renkli biyoteknoloji	6
1.2.3.1. Beyaz biyoteknoloji (Endüstriyel)	6
1.2.3.2. Mavi biyoteknoloji (Deniz)	6
1.2.3.3. Kırmızı biyoteknoloji (Tıbbi).....	6
1.2.3.4. Yeşil biyoteknoloji (Tarım)	7
1.3. Nanoteknoloji	7
1.3.1. Nanoteknolojinin günlük yaşamdaki kullanımları.....	10
1.3.1.1. Hayvan biliminde nanoteknoloji	11
1.3.1.2. Tarımda nanoteknoloji.....	11
1.3.1.3. Gıda alanında nanoteknoloji	12
1.3.1.4. Su arıtımında nanoteknoloji.....	13
1.3.1.5. İlaç ve tıp alanında nanoteknoloji	14
1.3.1.6. Kataliz alanında nanoteknoloji.....	15
1.3.1.6. Enerji alanında nanoteknoloji	16
1.4. Nanofiber	18
1.4.1. Nanofiber üretim yöntemleri	19
1.4.1.1. Çekme yöntemi	19
1.4.1.2. Kalıp sentez yöntemi	20

1.4.1.3. Faz ayırma yöntemi.....	20
1.4.1.4. Kimyasal buhar biriktirme yöntemi (CVD).....	21
1.4.1.5. Kendiliğinden birleşme yöntemi	22
1.4.1.6. Eriyik püskürtme yöntemi	22
1.4.2. Elektroegirme yöntemi	23
1.4.4. Elektroegirme yöntemini etkileyen parametreler	24
1.5. Enzimler	33
1.5.1. Enzimlerin sınıflandırılması	38
1.5.2. Enzimlerin yapısı	42
1.5.3. Enzimlerin etki mekanizması	42
1.5.3.1. Anahtar kilit modeli	43
1.5.3.2. İndüklenmiş uyum modeli	43
1.5.4. Enzim kinetiği.....	44
1.5.5. Enzim inhibisyonu	47
1.5.6. Enzimlerin reaksiyon hızını etkileyen faktörler	49
1.5.6.1. Sıcaklığın etkisi	49
1.5.6.2. pH'ın etkisi.....	49
1.5.6.3. Enzim derişimi	50
1.5.6.4. Substrat derişimi	50
1.5.6.5. Reaksiyon süresinin etkisi	51
1.5.6.6. Aktivatör ve inhibitörlerin enzimatik reaksiyon hızına etkisi	51
1.5.7. Enzimlerin kullanım alanları	52
1.6. Enzim İmmobilizasyonu.....	53
1.6.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	54
1.6.1.1. İnorganik taşıyıcılar.....	54
1.6.1.2. Organik taşıyıcılar	55
1.6.1.3. Sentetik taşıyıcılar.....	55
1.6.2. Taşıyıcıların özellikleri.....	56
1.6.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	57
1.6.3.1. Çapraz bağlama yöntemi	58
1.6.3.2. Adsorpsiyon yöntemi.....	59
1.6.3.3. İyonik bağlama yöntemi.....	59
1.6.3.4. Kovalent bağlanma	60
1.6.3.5. Tutuklama ve kapsülleme.....	61
1.7. Arginaz Enzimi.....	62

1.8. Literatürde Yer Alan Çalışmalar	65
1.8.1. Arginaz immobilizasyon çalışmaları	65
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	71
2.1. Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Çözeltiler	71
2.1.1. Kimyasal maddeler	71
2.1.2. Cihazlar	71
2.1.3. Çözeltilerin hazırlanması	72
2.1.3.1. Bradford çözeltisinin hazırlanması.....	72
2.1.3.2. Arginaz aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler	72
2.1.3.3. pH çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler	73
2.2. Deneysel Yöntem	73
2.2.1. Bradford protein tayini	73
2.2.2. Arginaz enzimi için aktivite tayini	74
2.2.3. Elektroegirme yöntemi ile nanofiberlerin sentezi.....	75
2.2.3.1. CA/PVP nanofiberlerin sentezi.....	76
2.2.3.2. CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerin sentezi	77
2.2.3.3. PVA/CH nanofiberlerin sentezi.....	77
2.2.3.4. PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin sentezi.....	78
2.2.3.5. PCL/CH nanofiberlerin sentezi.....	78
2.2.3.6. PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin sentezi.....	79
2.2.3.7. PVA/β-CD nanofiberlerin sentezi	79
2.2.3.8. PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerin sentezi.....	80
2.3.4. Nanofiberlerin karakterizasyonu	81
2.3.4.1. Taramalı elektron mikroskopu.....	81
2.3.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	81
2.3.4.3. Termogravimetrik analiz	81
2.3.4.4. X-Işını kırınım yöntemi (XRD).....	81
2.3.5. Nanofiberlere arginaz immobilizasyonunun optimizasyonu	81
2.3.5.1. Arginaz miktarının belirlenmesi	82
2.3.5.2. Nanofiber miktarının belirlenmesi.....	82
2.3.5.3. Adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	82
2.3.5.4. Glutaraldehit (GA) derişimin belirlenmesi.....	83
2.3.6. Nanofiberlere immobilize arginazın karakterizasyonu.....	83
2.3.6.1. Optimum sıcaklık	83
2.3.6.2. Optimum pH.....	83

2.3.6.3. <i>pH kararlılığı</i>	84
2.3.6.4. <i>Termal kararlılık</i>	84
2.3.6.5. <i>Kinetik sabitlerin belirlenmesi</i>	84
2.3.6.6. <i>Tekrar kullanılabilirlik</i>	85
2.3.7. Geri döngülü kolon sistemi ile L-ornitin üretimi.....	85
3. BULGULAR VE İRDELEME	86
3.1. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	86
3.1.1. Sem analizi.....	88
3.1.2. ATR-FTIR analizi.....	89
3.1.3. TGA analizi	91
3.1.4. XRD analizi	95
3.2. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	97
3.2.1. Sem analizi.....	98
3.2.2. ATR-FTIR analizi.....	102
3.2.3. TGA analizi	103
3.2.4. XRD analizi	108
3.3. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	109
3.3.1. Sem analizi.....	110
3.3.2. ATR-FTIR analizi.....	112
3.3.3. TGA analizi	114
3.3.4. XRD analizi	118
3.4. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	119
3.4.1. Sem analizi.....	121
3.4.2. ATR-FTIR analizi.....	124
3.4.3. TGA analizi	125
3.4.4. XRD analizi	130
3.5. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	131
3.5.1. Arginaz miktarı	131
3.5.2. Nanofiber miktarı.....	132
3.5.3. Adsorpsiyon süresi	133
3.5.4. Çapraz bağlayıcı miktarı.....	134

3.5.5. Optimum sıcaklık.....	136
3.5.6. Optimum pH	137
3.5.7. pH kararlılığı.....	139
3.5.8. Termal kararlılık	141
3.5.9. Kinetik parametreler	143
3.5.10. Tekrar kullanılabilirlik.....	145
3.6. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ²⁺ Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	150
3.6.1. Arginaz miktarı	150
3.6.2. Nanofiber miktarı.....	151
3.6.3. Adsorpsiyon süresi	152
3.6.4. Çapraz bağlayıcı miktarı.....	153
3.6.5. Optimum sıcaklık.....	154
3.6.6. Optimum pH	156
3.6.7. pH kararlılığı.....	159
3.6.8. Termal kararlılık	160
3.6.9. Kinetik parametreler	162
3.6.10. Tekrar kullanılabilirlik.....	164
3.7. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ²⁺ Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu ve Karakterizasyonu Çalışmaları.....	169
3.7.1. Arginaz miktarı	169
3.7.2. Nanofiber miktarı.....	170
3.7.3. Adsorpsiyon süresi	171
3.7.4. Çapraz bağlayıcı miktarı.....	172
3.7.5. Optimum sıcaklık.....	173
3.7.6. Optimum pH	175
3.7.7. pH kararlılığı.....	178
3.7.8. Termal kararlılık	179
3.7.9. Kinetik parametreler	182
3.7.10. Tekrar kullanılabilirlik.....	184
3.8. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ²⁺ Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu ve Karakterizasyonu Çalışmaları.....	188
3.8.1. Arginaz miktarı	188
3.8.2. Nanofiber miktarı.....	189
3.8.3. Adsorpsiyon süresi	190
3.8.4. Çapraz bağlayıcı miktarı.....	191

3.8.5. Optimum sıcaklık.....	192
3.8.6. Optimum pH	194
3.8.7. pH kararlılığı.....	197
3.8.8. Termal kararlılık	198
3.8.9. Kinetik parametreler	200
3.8.10. Tekrar kullanılabilirlik.....	202
3.9. Geri Döngülü Kolon Sistemi ile L-Ornitin Üretimi	207
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	209
KAYNAKLAR	212
ÖZGEÇMİŞ.....	234



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim çalışmalarının kronolojisi	34
Çizelge 1.2. Spesifik atomların veya fonksiyonel grupların transferinde kullanılan çeşitli koenzimler	37
Çizelge 1.3. Bazı enzimler ve kofaktörleri.....	37
Çizelge 1.4. Enzim katalizinin endüstriyel uygulamaları	52
Çizelge 2.1. Bradford protein tayini yöntemi.....	74
Çizelge 3.1. CA/PVP nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler	86
Çizelge 3.2. CA/PVP/Mn ⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler	87
Çizelge 3.2. PVA/CH/Mn ⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler	98
Çizelge 3.5. PCL/CH nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler	109
Çizelge 3.6. PCL/CH/Mn ⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler	110
Çizelge 3.8. PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler	120
Çizelge 3.9. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri	144
Çizelge 3.10. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri	163
Çizelge 3.11. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri	182
Çizelge 3.12. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri	201

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çekme yönteminin şematik gösterimi	19
Şekil 1.2. Kalıp sentez yönteminin şematik gösterimi	20
Şekil 1.3. Faz ayırma yönteminin şematik gösterimi	21
Şekil 1.4. Çeşitli peptit malzelerin kendiliğinden birleşme ile üretimi	22
Şekil 1.5. Eriyik püskürtme yönteminin şematik gösterimi	23
Şekil 1.6. Elektroegirme cihazının şematik gösterimi	24
Şekil 1.7. Elektroegirme yöntemini etkileyen parametreler	25
Şekil 1.8. Polimer derişiminin ortalama fiber çapına etkisi	25
Şekil 1.9. Vizkozitenin nanofiberler üzerine etkisini gösteren SEM görüntüleri	26
Şekil 1.10. İletkenliğin ortalama fiber çapına etkisi	27
Şekil 1.11. Molekül ağırlığının fiber morfolojisi üzerine etkisi	28
Şekil 1.12. Dielektrik sabitinin ortamala fiber çapına etkisi	28
Şekil 1.13. Fiber çapına çözücünün kaynama noktasının etkisi	29
Şekil 1.14. Fiber çapına jet çapının etkisi	29
Şekil 1.15. Elektroegirme işlemi ve nanofiber çapına artan gerilimin etkisi	30
Şekil 1.16. Farklı akış hızlarında elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü	31
Şekil 1.17. Nanofiber yarıçapına iğne çapının etkisi	32
Şekil 1.18. Fiber çapına nemin etkisi	32
Şekil 1.19. Fiber morfolojisine nemin etkisi	33
Şekil 1.20. Laktat dehidrojenazın katalizlediği reaksiyon	39
Şekil 1.21. Aspartat aminotransferazın katalizlediği reaksiyon	40
Şekil 1.22. Arginazın katalizlediği reaksiyon	40
Şekil 1.23. Aldolazın katalizlediği reaksiyon	41
Şekil 1.24. Triozfosfat izomerazın katalizlediği reaksiyon	41
Şekil 1.25. Glutamin sentetazın katalizlediği reaksiyon	41
Şekil 1.26. Anahtar- kilit modelini şematik gösterimi	43
Şekil 1.27. İndüklenmiş uyum modelinin şematik gösterimi	44
Şekil 1.28. Enzim katalizli bir reaksiyonun hızına substrat derişiminin etkisi	44
Şekil 1.29. Lineweaver-Burk grafiği	47
Şekil 1.30. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi	49

Şekil 1.31. pH'ın reaksiyon hızına etkisi	50
Şekil 1.32. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	50
Şekil 1.33. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	51
Şekil 1.34. Çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri	58
Şekil 1.35. Argininden ornitin ve üre oluşumu	62
Şekil 1.36. Arginaz enziminin üç boyutlu yapısı	63
Şekil 1.37. Arginin Metabolizmasına ve katabolizmasına katılan enzimlerin şematik gösterimi.....	65
Şekil 2.1. Protein tayini kalibrasyon grafiği.....	74
Şekil 2.2. Standart üre kalibrasyon grafiği.....	75
Şekil 2.3. Çalışmalarda kullanılan elektroğirme cihazı.....	76
Şekil 2.4. Geri döngülü kolon sistemi.....	85
Şekil 3.1. CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	88
Şekil 3.2. CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri	89
Şekil 3.3. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları	90
Şekil 3.4. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları	91
Şekil 3.5. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri..	93
Şekil 3.6. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri	95
Şekil 3.7. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerine ait XRD spektrumları	96
Şekil 3.8. PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri	99
Şekil 3.9. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri	100
Şekil 3.10. PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	101
Şekil 3.11. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri	101
Şekil 3.12. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları.....	102
Şekil 3.13. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları.....	103

Şekil 3.14. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri	105
Şekil 3.15. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri	107
Şekil 3.16. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine ait XRD spektrumları	108
Şekil 3.17. PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	111
Şekil 3.18. PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri:	112
Şekil 3.19. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları	113
Şekil 3.20. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları	114
Şekil 3.21. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri	116
Şekil 3.22. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri.....	117
Şekil 3.23. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine ait XRD spektrumları	118
Şekil 3.24. PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	121
Şekil 3.25. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri	122
Şekil 3.26. PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri	123
Şekil 3.27. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri	123
Şekil 3.28. Ham PVA, ham β-CD ve PVA/β-CD nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları	124
Şekil 3.29. Ham PVA, ham β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları	125
Şekil 3.30. Ham PVA, ham β-CD ve PVA/β-CD nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri.....	127
Şekil 3.31. Ham PVA, ham β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri.....	129
Şekil 3.32. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerine ait XRD spektrumları	131
Şekil 3.33. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi.....	132

Şekil 3.34. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi	133
Şekil 3.35. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	134
Şekil 3.36. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi..	135
Şekil 3.37. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri.....	136
Şekil 3.38. CA/PVP ve CA/PVP/ Mn ⁺² nanofiberlere üreaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri	138
Şekil 3.39. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri	140
Şekil 3.40. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği.....	141
Şekil 3.41. Arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği	144
Şekil 3.42. CA/PVP ve CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği.....	146
Şekil 3.43. Arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	147
Şekil 3.44. 9 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri	148
Şekil 3.45. Arginaz immobilize CA/PVP/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ...	149
Şekil 3.46. 12 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri:	150
Şekil 3.47. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi.....	151
Şekil 3.48. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi	152
Şekil 3.49. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	153
Şekil 3.50. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi..	154

Şekil 3.51. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri.....	155
Şekil 3.52. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri	157
Şekil 3.53. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri	159
Şekil 3.54. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği.....	160
Şekil 3.55. Arginaz immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği	163
Şekil 3.60. PVA/CH ve PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği.....	165
Şekil 3.57. Arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri	166
Şekil 3.58. 13 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri	167
Şekil 3.59. Arginaz immobilize PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri...	168
Şekil 3.60. 17 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	169
Şekil 3.61. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi.....	170
Şekil 3.62. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi	171
Şekil 3.63. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	172
Şekil 3.64. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi..	173
Şekil 3.65. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri.....	174
Şekil 3.66. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri	176
Şekil 3.67. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri	178

Şekil 3.68. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği.....	179
Şekil 3.69. Arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği	182
Şekil 3.70. PCL/CH ve PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği.....	184
Şekil 3.71. Arginaz immobilize PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	185
Şekil 3.72. 6 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri	186
Şekil 3.73. Arginaz immobilize PCL/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ...	187
Şekil 3.74. 8 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH/Mn ⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	188
Şekil 3.75. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi	189
Şekil 3.76. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi	190
Şekil 3.77. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	191
Şekil 3.78. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi..	192
Şekil 3.79. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri.....	193
Şekil 3.80. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri	195
Şekil 3.81. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri	197
Şekil 3.82. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği.....	198
Şekil 3.83. Arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği	201
Şekil 3.84. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn ⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği.....	202
Şekil 3.85. Arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	204

Şekil 3.86. 15 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/ β -CD nanofiberlerin SEM görüntüleri	205
Şekil 3.87. Arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerin SEM görüntüleri	206
Şekil 3.88. 20 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	207
Şekil 3.89. Geri döngülü kolon sistemi ile üretilen L-ornitin miktarı grafiği	208



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PVA	Polivinil alkol
CA	Selüloz asetat
PVP	Polivinil prolidon
cm	Santimetre
kV	Kilovolt
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
CH	Kitosan
sa	Saat
dk	Dakika
mL	Mililitre
PCL	Poli kaprolakton
β -CD	β -Siklo dekstrin
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi
TGA	Termal gravimetrik analiz
XRD	X-ışını kırınım yöntemi
GA	Glutaraldehit
U	Unit
nm	Nanometre
TG	Termogravimetri
dTG	Diferansiyel Termogravimetri
TBS	Tris buffer saline
IU	International Unit
g	Gram
L	Litre
°C	Santigrat derece

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Çapı 1 µm'ye eşit veya daha küçük bir çapa sahip lifsi ya da ipliksi fiberler nanofiber veya nanolif olarak tanımlanmaktadır. Nanofiberler sahip oldukları eşsiz özellikleri nedeniyle pek çok alanda farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar. Bu eşsiz özelliklerinden dolayı, nanofiberler hem bilim insanları için hem de modern endüstri için en çok çalışılan ve ilgi çeken materyallerden biri olmuştur. Günümüzde pek çok çeşitli yöntem kullanılarak nanofiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan elektroğirme yöntemi, elektrostatik kuvvetler yardımıyla nanometre ile mikrometre arasında değişen çaplarda polimer fiberlerin üretimi için en etkin, kolay uygulanabilen, ekonomik, hızlı ve çok yönlü olması dolayısıyla diğer üretim yöntemlerinin önüne geçmektedir. Bu yöntem homojen çap, yüksek yüzey/hacim oranına sahip, ayarlanabilir gözeneklilik ve tercih edilen özelliklere ulaşmak için nanofiber boyutunu ve morfolojisini kontrol etme kabiliyeti gibi sayısız avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlarından dolayı elektroğirme yöntemi ile üretilmiş nanofiberler ilaç salınımı, doku mühendisliği, enerji depolama ve dönüşümü, savunma sanayi ve enzim immobilizasyonu olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır.

Enzim immobilizasyonu, çözültüde serbest halde hareket edebilen ve suda çözünen enzim moleküllerinin, suda çözünmeyen katı bir taşıyıcıya bağlanarak taşıyıcı üzerinde hareketlerinin kısıtlanması olarak tanımlanabilir. Enzim immobilizasyonunun amacı, uzun ömürlü ve ılımlı operasyonel koşullar altında çalışabilen sağlam bir biyokatalizör geliştirmektir. İmmobilize enzimler sayesinde reaksiyonlar istenilen anda başlatılabilir ve durdurulabilir. Reaksiyon sonucunda ortamdaki kolaylıkla uzaklaştırılarak ürünlerin kirlenmesi önlenir. Tekrar tekrar kullanılabilirler. İmmobilizasyon sonrası sıcaklık ve pH gibi çevresel koşullara dayanıklılık kazanırlar. Serbest enzimlere göre daha kararlıdır ve genellikle daha yüksek aktivite göstermektedirler. Bu avantajlarından dolayı, son zamanlarda immobilize enzimlerin endüstride kullanımları giderek artmıştır.

L-ornitin üre siklusünde bir ara metabolit olarak işlev gören protein yapısında olmayan bir amino asittir. Karaciğer hastalıklarının tedavisinde, kalp fonksiyonlarının güçlendirilmesinde, kilo kaybetmede ve bağışıklığı artırıcı olarak kullanıldığı için metabolizmada önemli bir rol oynamaktadır. Bu çok yönlü avantajlara dayanarak, L-ornitin özellikle sağlık ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, L-ornitin üretimi son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. L-Ornitinin endüstriyel üretimi için kimyasal sentez, fermantasyon ve enzimatik sentez (arginaz yöntemi) olmak üzere 3 temel yöntem vardır. Kimyasal sentez ve fermantasyon yöntemleri birçok dezavantaja sahip oldukları için tercih edilmemektedirler. Arginaz kullanılan yöntem, kimyasal sentez ve fermantatif üretime kıyasla, seçilen reaksiyonlar için spesifikliğı, basit cihazlar ve prosedürleri kullanması ve suda çözünürlüğü düşük olan substratları çözündürmek için kullanılan yardımcı çözücülere toleransı sayesinde avantajlıdır.

Bu tez kapsamında elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiberler ve enzim immobilizasyonu çalışmaları bir araya getirildi ve hem kullanım açısından hem de performans açısından çok büyük avantaj sağlanması hedeflendi. Sunulan tez çalışmasının öncelikli amacı, immobilize arginaz enzimleriyle oluşturulmuş yeni nanofiber membranlarla sağlık ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan protein yapısında olmayan bir amino asit olan L-ornitini yüksek kaliteli üretmek için verimli, kolay, alternatif, ekonomik ve tekrarlanabilir bir yöntem geliştirmektir.

Bu amaca ulaşabilmek için öncelikle elektroğirme yöntemi ile CA/PVP, CA/PVP/Mn⁺², PVA/CH, PVA/CH/Mn⁺², PCL/CH, PCL/CH/Mn⁺², PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² olmak üzere sekiz farklı nanofiber membran platformunun sentezi gerçekleştirildi. Daha sonra optimum koşullarda sentezlenen ve en uygun nanofiber oluşumu gözlenen sekiz nanofiber membrana da arginaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bu kısımda yapılan çalışmalarda immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyonu yapıldı. Son kısımda ise aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranlar ile hazırlanan geri döngülü kolon sistemiyle protein biyosentezinde rol alan, poliaminlerin biyosentezi için öncül olan L-ornitin oluşturma performansı araştırıldı.

1.2. Genel Bilgiler ve Kaynak Özetleri

1.2.1. Biyoteknoloji

“Biyoteknoloji” terimi ilk kez 1919 yılında Macar mühendis Karl Erkey tarafından kullanılmıştır. O zamanlar, biyoteknoloji, biyolojik kökenli hammaddelerden yeni ürünlerin üretilmesi için canlı organizmaların kullanımını kapsamaktaydı. Bu nedenle biyoteknoloji kelimesi Yunanca ‘bios’, ‘techno’ ve ‘logos’ kelimelerinden türemiştir. ‘bios’ yaşam anlamına gelirken, ‘techno’ ve ‘logos’ kelimeleri ise sırasıyla teknik ve çalışma anlamına gelmektedir.. O zamandan beri biyoteknolojinin tanımı birçok kez yeniden geliştirilmiştir (Kennedy, 1992). Ancak en çok kabul gören biyoteknoloji tanımı 1981’de Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından yapılmıştır. Bu tanıma göre, biyoteknoloji bilimsel ve mühendislik uygulamaları kullanarak biyolojik ajanlar ile malzemelerin işlenmesi olarak tanımlanmıştır (Bull vd., 1982).

20. yüzyılın büyük bir bölümünde, “biyoteknoloji” terimi, ürünlerin fermentasyonundan bitkilerin seçici ıslahına kadar uzanan teknolojilere atıfta bulunmak için yaygın olarak kullanılmıştır. Son yıllarda ise bilimde meydana gelen ilerlemeler dolayısıyla modern “biyoteknoloji” terimi ortaya çıkmıştır ve genetik modifikasyon ve moleküler biyoloji yöntemlerinin hedeflenmiş kullanımı ile neredeyse eşanlamlı hale gelmiştir. Modern biyoteknolojideki “modern”, mevcut genetik mühendisliği ve hücre füzyonu uygulamaları ile fermentasyon ve seçici üreme gibi eski geleneksel biyoteknoloji yöntemlerinden farklıdır. Avrupa Biyoteknoloji Federasyonu modern biyoteknoloji için bir tanım geliştirmiştir. Bu tanıma göre modern biyoteknoloji “mühendislik, biyokimya ve mikrobiyoloji bilimlerinin bir araya getirilerek kültüre edilmiş doku hücreleri ve mikroorganizmaların özelliklerinin teknolojiye (endüstriye) uygulanması” olarak tanımlanmıştır (Bull vd., 1982). 2003 yılında OECD daha önce yapmış olduğu biyoteknoloji tanımını güncelleyerek modern biyoteknolojiyi, “problemleri çözmek veya ürün yapmak için hücresel ve moleküler işlemlerin kullanılması” olarak tanımlanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki Teknoloji Değerlendirme Bürosu ise modern biyoteknolojiyi “rekombinant deoksiribonükleik asidin (rDNA) ve canlı organizmaların yeni biyolojik işleme teknikleri yardımıyla endüstriyel amaçlı kullanımı” olarak tanımlanmıştır.

Biyoteknoloji bu nedenlerden dolayı yaşam bilimlerinde çeşitli süreçlere ve ürünlere yol açan multidisipliner bir alan olarak ifade edilebilir. Biyoteknoloji, yeni ilaçların, gelişmiş mahsul bitkilerinin ve hayvanların geliştirilmesinin yanı sıra günlük ürünlerin daha verimli üretilmesi gibi pek çok alanda uygulanmaktadır (Chaudhuri, 2013).

1.2.2. Biyoteknolojinin tarihi

Yüzyıllar önce başlayan ve halen devam etmekte olan sürecin bir parçası olarak kabul edilen biyoteknoloji için tarihsel açıdan; eski biyoteknoloji, klasik biyoteknoloji ve modern biyoteknoloji olmak üzere üç ana aşama tanımlanmıştır (Verma vd., 2011).

Biyoteknolojinin kökleri, M.Ö. 5000 ile 10.000 yılları arasındaki tarih öncesi uygarlıklara kadar uzanır. Mısır ve İndus Vadisi Medeniyetleri daha iyi tat, yüksek verim ve hastalık direnci yüksek bitki yetiştirmeye ve hayvanların evcilleştirilmesine başlamıştır (Diamond, 2002). Bu bitkileri üretmek için, çeşitli eşeyli ve vejetatif üreme yöntemleri kullanılmıştır (Buchholz ve Collins, 2013). Hastalıkların ve yaraların tedavisinde bitkilerin kullanılması, şarap, peynir, ekmek ve bira üretiminde mikroorganizmaların kullanılmasını da içine alan bu dönem eski biyoteknoloji olarak tanımlanmaktadır. O dönemde yaşayan toplumlar, bilimsel temeller yerine deneme yanılma yöntemleri ile geleneksel biyoteknolojinin gelişimine katkı da bulundular. Faaliyetlerine tipik doğa gözlemlerinden ziyade keşifler yön vermiştir.

Klasik biyoteknoloji, biyoteknoloji tarihinde ikinci aşamadır ve 19. yüzyılın ortaları ile 1970'lerin arasındaki fermantasyon teknolojisinin gelişimi ile birlikte hızla gelişmiştir. Bu dönemde fermentasyon, enzimler, antibiyotikler, sirke, sitrik asit, amino asitler ve vitaminler gibi çeşitli organik asitlerin endüstriyel üretimine yönelik çalışmalar ağırlık kazanmıştır (Nair, 2008; Smith, 2012). 19. yüzyılın sonunda, Mendel'in kalıtımın temel prensipleri üzerine çalışmaları genetik biliminin ortaya çıkmasına ve kontrollü bitki ıslahı deneylerinin başlangıcına yol açmıştır (Bud, 1993). 1950'lerde DNA'nın yapısının keşfi ile üçüncü ve son aşama olan modern biyoteknoloji dönemine geçilmiştir. Modern biyoteknolojiye en önemli katkısı hibridom veya monoklonal ve rDNA teknolojileri vermiştir. Moleküler biyolojinin alt bir dalı olan rDNA teknoloji, iki ya da daha fazla kaynaktan alınan DNA moleküllerinin kullanılarak yeni sentetik DNA moleküllerinin oluşturulmasıdır. Hücreli miyelom hücrelerinin antikor üreten hücrelerine hibridom denilmektedir. Bir

türün DNA'sının başka bir türün DNA'sına aktarılması sayesinde geleneksel ıslah yöntemleri ile elde edilen hayvanların ve gıda mahsullerinden farklı özelliklere sahip yeni türlerin üretilmesi rDNA teknolojisi ile sağlanmıştır (Chaudhuri, 2013). Diğer yandan hibridoma teknolojisi, herhangi bir antijene karşı sınırsız miktarda monospesifik antikör üretilmesini sağlamıştır (Zhang, 2012). Her iki teknoloji de endüstriyel uygulamaları hızlandırmış ve parazitoloji, viroloji, kanser ve biyofarmasötik (örneğin, rekombinant *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*'de insülin üretimi) alanlarında teşhis prosedürlerinin hızla gelişmesine yol açmıştır (Ling, 1983; Walsh, 2005). Son zamanlarda geliştirilen, hızlı ve büyük dizileme teknolojileri, yüzlerce organizma ve virüsün genomunu deşifre etmek için kullanılmıştır (Zimin vd., 2009). Sıralama, genlerin ve onların kodladıkları proteinlerin görevleri üzerinde devam eden çalışmalar gelişmiş hesaplama yöntemleri sayesinde hız kazanmıştır. Antibiyotik direncinin geliştirilmesi de dahil olmak üzere birçok hastalığın genetik temelini anlaşılması, insan ve mikrobiyal genomların sıralanması ve evrimi, yeni tanı prosedürlerinin, aşuların, tedavilerin ve birçok hastalığın tedavisinin geliştirilmesine yol açmıştır (Fauci, 2001). Ek olarak, bu veriler kaçınılmaz olarak genetik ve evcilleştirme tarihinin daha iyi anlaşılması için fırsatlar sağlayacak, mahsul ve hayvan gelişimini hızlandıracaktır (Dekkers, 2012; Morrell vd., 2012). Üçüncü biyoteknoloji nesli olan modern biyoteknoloji, açıkça temeldeki bilimsel ilerlemeye dayanmaktadır; oysa birinci ve ikinci nesiller (eski ve klasik biyoteknoloji), temeldeki bilimsel prensiplerin sağlam bir anlayışına sahip olmayan daha teknolojik uygulamalara dayanmaktadır.

Her ne kadar DNA ve rDNA teknolojisinin yapısının keşfedilmesi modern biyoteknolojideki son gelişmeler için büyük bir itici güç olarak görülsede, fosil kaynaklarını değiştirme ve yenilenebilir hammaddelere geçme ihtiyacı ile üretim sırasında enerjinin verimli kullanılmasının sağlandığı yeşil veya temiz süreçlere olan gereklilikte biyoteknolojinin büyümesine ve gelişmesine katkıda bulunmaya devam etmektedirler (Woodley vd., 2013). Bu yüzden biyoteknoloji tarihi yazılmaya devam etmektedir ve yeni yaklaşımların geliştirilmesi ile yazılmaya da devam edecektir.

1.2.3. Renkli biyoteknoloji

Küresel toplum sağlık, enerji ve gıda üretiminde artan ihtiyaçların sonucu ortaya çıkan zorluklarla karşı karşıyadır. Bu nedenle dünya, çeşitli şifalı bitkilerde keşfedilen biyoaktif molekülleri geliştiren biyoteknolojideki gelişmeler sayesinde bu zorluklarla yüzleşmek için çeşitli çözümler geliştirmiştir (Abdin, 2007). Biyoteknolojinin bugüne dek araştırıldığı dört ana konu vardır. Bunlar sırasıyla beyaz biyoteknoloji, mavi biyoteknoloji, kırmızı biyoteknoloji ve yeşil biyoteknoloji olarak sayılabilir. Bu dört biyoteknolojik alanda, molekülleri ve biyolojik sistemleri kullanarak çevre ve insanlık için iyileştirici çözümlerin geliştirilmesine odaklanmıştır.

1.2.3.1. Beyaz biyoteknoloji (Endüstriyel)

Beyaz biyoteknoloji, endüstriyel uygulamalarda son ürünlerin ve ara ürünlerin işlenmesi ve üretilmesinde yenilenebilir kaynakların kullanıldığı biyoteknoloji uygulamasıdır. Sürdürülebilir kaynak yönetimi ve korunmasına yönelik bu yeni yaklaşım ile daha az ve daha temiz enerji kullanır, böylece çevresel ayak izlerimizi azaltır ve üretim maliyetlerinde genel bir düşüşe yol açar. Bu uygulama alanlarında, endüstriyel olarak faydalı ürünler üretmek için mikroorganizmalar ve enzimler kullanılmaktadır (Amarakoon vd., 2017).

1.2.3.2. Mavi biyoteknoloji (Deniz)

Mavi biyoteknoloji, deniz ve tatlı su kaynaklarından topluma faydalı ürünler elde edebilmek amacıyla biyomoleküler proseslerden yararlanarak biyoteknolojik araçların kullanıldığı bir uygulamadır. Mavi biyoteknolojiden elde edilen ürünler, tıp, kozmetik, sağlık ve hastalıkların tedavisinde yararı bulunan gıda takviyeleri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra biyolojik ıslah ve biyoyakıt sistemleri gibi endüstriyel ve çevresel uygulamalarda da kullanım alanına sahiptir (Kim, 2013).

1.2.3.3. Kırmızı biyoteknoloji (Tıbbi)

Tıbbi biyoteknoloji, uzun yıllardır organizmaların genetik yapısını kullanarak ve mevcut en büyük doğal kaynaklarını kullanarak hastalık oranlarıyla ve diğer hayati tehlike koşullarıyla mücadele, teşhis ve azaltmaya katkıda bulunmuştur. Mikroorganizmaları kullanarak hastalıklarla mücadele edebilmek için biyolojik

süreçlerden faydalanan teknolojileri içerir. Biyoteknolojinin bir sonucu olarak daha önce tedavi edilemeyen hastalıklar için 250'den fazla sağlık ürünü ve aşısı geliştirilmiştir. İnsan genomunun ortaya çıkarılması ile birlikte, araştırmacıların ailevi meme kanseri ve aileden kaynaklanan diğer hastalıkları belirlemede genetik ilişki kurmalarına yardımcı etmiştir. İnsan DNA'sındaki 20.000'den fazla genin belirlenmesi ve sıralanması konusunda 1990 yılında başlayan İnsan Genom Projesi ile önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu sayede hastalıkların ve nesilden nesile geçen hastalıkların tanısında ve tedavisinde kullanılabilecek araçların ve ilaçların geliştirilmesine yol açmıştır. Ayrıca, insanların özel genetik mutasyonları sonucu ortaya çıkan yumurtalık ve meme kanserleri gibi bazı kanser türleri için, insanın DNA'sının incelenebilmesine ve ardından tedavi edilebilmesine olanak sunmuştur (Amarakoon vd., 2017). Bilim adamları, yalnızca yeni yöntemlerle tanı koymayı ve bu hastalıklara genetik yatkınlıkları tespit etmeyi başarmakla kalmamış, aynı zamanda hastalıkların erken tespit ve teşhisi için tedaviye daha doğru bir şekilde yaklaşabilmişlerdir.

1.2.3.4. Yeşil biyoteknoloji (Tarım)

Tarım biyoteknolojisi açlık sorunları ile mücadele edebilmek için yeşil devrimin bir sonraki kademesi olarak kabul edilir. Çevre dostu biyopestisitler ve gübreler kullanılarak daha dirençli ve verimli bitkilerin üretimini amaçlayan teknolojiler kullanır. Bu teknoloji elit çeşitlerin (kriyo koruma, mikro çoğaltma ve somatik embriyogenez) çoğaltılması ve korunması ve sekonder metabolitlerin elde edilmesi için çeşitli doku kültürü tekniklerini kullanır. Ayrıca bu teknoloji istenilen özelliklere sahip çiftlik hayvanlarının ve mahsullerin seçimi için genetik mühendisliği uygulamalarını da kullanır (Kafarski, 2012).

1.3. Nanoteknoloji

“Nano” ön eki, Yunanca “cüce” kelimesinden türetilmiştir ve mikrondan 1000 kat daha küçük olan 10^{-9} büyüklüğünde bir küçültme anlamına gelir. Nanometre (nm) 10^{-9} m'ye eşdeğer genişlikte üç ila beş atomun milyarda biri veya metrenin milyarda biri olarak tanımlanır. Ayrıca insan saçı çapından 10.000 kat daha az olan 1 nm, 10^{-9} m'ye

eşittir. Nanomalzemelerin nano boyutlu morfolojik özelliklere sahip olmaları nedeniyle, olağanüstü özelliklere sahip bu malzemelere uygulanan bilim temelli bir yaklaşım ortaya çıkmıştır ve bu yaklaşım nanoteknoloji olarak isimlendirilmiştir (Mirsasaani vd., 2013).

Nanoteknoloji ilk insan yeryüzünde yaşamaya başladığından beri vardır. Lipitler, karbohidratlar, proteinler ve enzimler gibi hücrel yapıların bileşenlerini oluşturan vücuttaki moleküler yapıları sentezleyebilmek için doğa, canlılığın başlangıcından beri rutin olarak nanoteknolojiyi kullanmıştır (Subramani vd., 2019).

Bununla birlikte, nanoteknolojinin resmi olarak keşfedilmesi, 29 Aralık 1959'da California Teknoloji Enstitüsü'nde Amerikan Fizik Derneği'nin yıllık toplantısında "there is plenty of room at the bottom" (aşağıda daha çok yer var) başlıklı bir konuşma sunan Amerikalı Fizikçi ve Nobel Ödüllü Dr. Richard Phillips Feynman'a atfedilmiştir (Feynman, 1959). Feynman çok küçük bir ölçekte bilginin depolanması, atomlarda yazma ve okuma, bilgisayarın minyatürleştirilmesi, minik makineler, minik fabrikalar ve atomlu elektronik devreler hakkında konuşmuştur. Ancak, özellikle nanoteknoloji terimini kullanmamıştır. 1974 yılında bir Japon Mühendis Norio Taniguchi "nanoteknoloji" terimini ilk kez kullanılmıştır (Taniguchi, 1974).

Nanoteknoloji, atomik ya da moleküler düzeyde mühendisliktir. Maddelerin en küçük boyutta işlenmesini içeren çok çeşitli işleme teknikleri, ölçümler, modelleme ve teknolojiler için kullanılan ortak terimdir. Ulusal Bilim Vakfı ve Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'ne göre, nanoteknoloji, küçük yapılarından dolayı temelde yeni özellik ve fonksiyonlara sahip malzemeler, sistemler ve cihazlar oluşturmak için, atom ve molekül düzeyinde ve ayrıca molekül kümelerini içeren "supramoleküler" seviyede kontrol etme ve yönlendirme yeteneğidir. Nanoteknoloji nano ölçekli boyutlarda fiberlerin, parçacıkların ve malzemelerin oluşturulması ile ilgilidir. Boyutlarından dolayı nano ölçekli malzemeler en az bir üstün veya yeni özellik gösterirler (Roco, 2007). Nanomalzemeler yüksek yüzey/kütle oranına, geniş yüzey alanına ve yüksek en boy oranına sahiptir. Nanomalzemelerin bu sıra dışı özellikleri maddelerin mekanik, termal, elektriksel, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilir (Stander ve Theodore, 2011).

Bir malzemenin boyutları büyük boyuttan 100 nm altına düşürüldüğünde, özelliklerinde çarpıcı bir değişiklik meydana gelebilir (Poole ve Owens, 2003). Nano

ölçekte, en çok istenen özellikler, boyut sınırlaması, dağılım, morfoloji, ara yüzey olayları ve kuantum etkilerinin baskınlığına dayanarak elde edilebilir. Ayrıca, nano ölçekte malzemelerin davranışı makro ölçekte ayırt edilebilecek hususlar açısından tamamen öngörülemez değildir (Bhushan, 2010, Baker ve Satish, 2012). Nano yapıları kontrol etme ve yönlendirme yeteneği sonunda, ara büyüklükteki sistemlerin, yani moleküllerin, atomların ve ham malzemelerin yeni kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinden yararlanılmasını mümkün kılacaktır (Mirsasaani vd., 2013). Yeni özellikler oluşturmak ve gelişmiş performans sağlamak için malzemeler nano yapılabılır. Nano ölçeğin bu kadar önemli hale gelmesinin ve bu alanın bilim ve teknolojide yeni fırsatlar yaratmasının birçok özel nedeni vardır (Ghorbanpour vd., 2017) Bu nedenlerden bazıları aşağıda belirtilmiştir:

1. Nanoteknolojinin önemli bir yönü, nano ölçekli bileşenlerin çoğunda bulunan yüzey/hacim oranının artmasıdır (Dabbs ve Aksay, 2000).
2. Bu skaladaki kimyasal özellikler, büyük yüzey/hacim oranları nedeniyle kataliz ve birçok uygulama için önemli olan ara yüzey ve yüzey kimyası için bir avantaj sağlar (Iijima vd., 1996).
3. Biyolojik varlıkların ve vücutta bulunan moleküllerin en önemli özelliklerinden bir tanesi nano ölçekte sistematik şekilde düzenlenmesidir. Nanoteknoloji alanındaki araştırma ve geliştirme çalışmaları, sentetik nano ölçekli objelerin canlı hücrelerde kullanılmasına olanak sağlamıştır (Ebrahimi ve Mansoori, 2014).
4. Nano yapılardan oluşan makroskopik sistemler, nanomalzemelerin ve hafif nanokompozitlerin geliştirilmiş mukavemeti ve sertliği, geliştirilmiş sıkıştırma özellikleri ve geliştirilmiş dövülebilirlik gibi bir dizi iyileştirilmiş mekanik özelliğe sahiptir (Wang vd., 2006). Ayrıca, nanosistemler, nano yapı etkileşimlerini ve karmaşıklığını kontrol ederek daha gelişmiş fonksiyonlara, daha küçük ve daha hızlı devrelere ve eşzamanlı olarak önemli ölçüde azalan güç tüketimine neden olan yeni elektronik cihazların üretimini tetikleyebilecek bir şey olan mikro iletkenlerden ve elektrik iletkenlerinin iyileştirilmesinden daha yüksek yoğunluklara sahip olabilir (Li vd., 2004).

Nanoteknoloji, kimya, biyoloji, moleküler fizik, malzeme ve bilgisayar bilimi, makine ve elektrik mühendisliğini içeren multi disiplinli bir alandır (Ratner ve Ratner, 2002). Özellikle son yıllarda bu çok disiplinli alan araştırmacıların ve çeşitli endüstri

alanlarında faaliyet gösteren pek çok üreticinin ilgisini çekmiştir. Önümüzdeki yıllarda nanoteknolojideki araştırmaların dünya çapında büyüme devam etmesi ile birlikte nanoteknoloji ve ürünlerinin dünya ekonomisi üzerinde yaklaşık 1 trilyon dolardan fazla bir etkisi olabileceği düşünölmektedir (Stander ve Theodore, 2011).

1.3.1. Nanoteknolojinin günlük yaşamdaki kullanımları

Nanoteknolojinin tarihi ve doğadaki uygulamaları yaşamın başlangıcıyla başlamıştır. İlk yaşam formlarını temsil eden tek hücreli canlılar, bir organizmanın yaşamı için bütün temel bilgileri içeren RNA, DNA ve genleri içeriyordu. Kendilerine benzer sistemler üretebilmek için gerekli tüm kodlanmış bilgileri bu genetik yapı taşları içerirler. İnsanlar pek çok alanda kullanmak için nanomalzemelere özel ilgi göstermişlerdir. Bu ilginin sonucu olarak nano yapılı malzemeler üzerine araştırmacılar tarafından pek çok çalışma yapılmaya başlanmış ve bu alanda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Rajput, 2015). Nano malzemelerin önemli özelliklerinden biri, yüksek yüzey/hacim oranıdır. Bu özelliği kullanarak, nano ölçekli boyutlarda güçlü katalizörler üretilebilir. Nanokatalizörler sayesinde reaksiyon sonucu oluşan atık maddelerin oluşumunun önüne geçilir ve kimyasal reaksiyonların verimini büyük ölçüde artırılır. Malzemelerin üretiminde nano boyutlu maddelerin kullanılması, malzemenin ağırlığını azaltabilir, mukavemetini arttırabilir ve termokimyasal özelliklerini iyileştirebilir (Ehrman vd., 1999).

Malzemelerin boyutları nano boyuta düşüröldüğünde etkilenen özellikler elektromanyetik dalgalara ve ışığa verdikleri tepkilerdir. Bu durumun ortaya çıkması ile elektronik endüstrisinde ve optoelektriklerde kullanılmak üzere nanolog üretimine yol açmıştır. Nanoparçacıkların boyalara veya inşaat malzemelerine girmesi, uçaklardaki yakıt tüketiminde azalma gibi sonuçlara neden olmuştur. Nanomalzemelerin tıp alanındaki uygulamaları, titanyum nanoparçacıkları kullanılarak anti-UV radyasyon kremlerinin üretiminden insan kalbinin işlevini izlemeye kadar uzanmaktadır. Günümüzde birçok şirket; otomobil endüstrisinde, tenis raketi üretiminde, ışık önleyici gözlüklerde, kirlenme önleyici camlarda, kendi kendini temizleyen pencerelerde ve elektrikli uçaklarda toz haline getirilmiş nanopartikülleri kullanmaktadır (Adachi, 2000; Jain vd., 2009).

Nanoteknoloji bu uygulamaların haricinde, ilaç salınım sistemleri gibi ilaç endüstrisinin pek çok alanında uygulamaya sahiptir. Petrol, gaz ve petrokimya endüstrisinde nanokatalizörlerin üretiminde rezervuarlardan çekilme katsayısının artırılması için, enerji verimliliğini arttırmak amacıyla, ısıya, korozyona, tutulmaya, aşınmaya ve sürtünmeye karşı dayanıklı, nanolubrikan olarak nano kaplamaların üretimi için, nanosensörlerin ve nanobiyosensörlerin üretiminde kirleticileri azaltmak ve yeşil teknolojiler geliştirmek içinde kullanılmaktadır (Jolivet vd., 2004; Jiang vd., 2007).

1.3.1.1. Hayvan biliminde nanoteknoloji

Hayvan biliminde nanoteknolojideki uygulamalar arasında hayvan aşılarının geliştirilmesi, nükleik asit salınım sistemlerinin geliştirilmesi, hızlı tedavi süreçlerinin sağlanması, besin ve ilaçların salınım sistemlerinin geliştirilmesi ve hastalık semptomlarının tanınması sayılabilir. Günümüzde, gümüş nanoparçacıklar etkili antibakteriyel ve antimikrobiyal ajanlar oldukları için hayvancılık ve kanatlı hayvan yetiştirme alanlarının temizliğinde kullanılmaktadır (Walser vd., 2011; Cushen vd., 2012). Nanofiltreler ise süt ürünlerini işlemek için verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Aslında, nanofiltreler parçacıkların, parçacık yükü ve büyüklüğü gibi çeşitli faktörlere bağlı seçici bir şekilde geçişine imkan sağlar. Nanoteknolojinin başka bir uygulama alanı hayvansal ilaçlar ve oral enzimler için kaplama maddesidir. Bazı proteinler ve enzimler, bazı dokulardaki etkiyi ve işlevi arttırmak için hayvan ve kümes hayvanı diyetlerinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, bunlar normal olarak sindirim sisteminde absorbe edilemezler, bu nedenle etkili bir yol olarak nanokapsüller, besin maddelerinin hedef dokuya ulaşması için kaplanması ve korunmasında kullanılır (Zhang vd., 2012). Ayrıca uygun çiftleşme zamanlarının seçimi süt çiftçisinin karşılaştığı problemler arasındadır. Son yıllarda, östrojen hormonunun gerektiğinde serbest bırakma ve aşılama işlemlerini başlatmak için cilde yerleştirilen spesifik nanotüpler kullanılmıştır (Archana vd., 2015).

1.3.1.2. Tarımda nanoteknoloji

Nanomalzemelerin tarım bilimlerindeki önemli rolü, gübre bileşiklerine uygulanmaları ve yetişen bitkilere gerekli beslenmenin sağlanmasının bir aracı olarak kullanılmalarıdır. Ayrıca, bu modern teknoloji, üreme bilimi ve teknolojisi, tarımsal

ve gıda atıklarının enerjiye dönüştürülmesi, enzimatik nano biyo prosesleme yoluyla hastalıkların önlenmesi ve yeni özelliklere sahip çeşitli nano ölçekli cihazlar kullanarak bitkilerin işlenmesi gibi diğer tarımsal alanlarda da ilerleme kaydetmiştir. Son zamanlarda akıllı tarım dağıtım sistemleri birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Bu dağıtım sistemleri bir dokuyu spesifik olarak hedefleyebilir, yüksek oranda kontrol edilebilir, uzaktan düzenlenebilir, önceden programlanabilir ve başarılı hedeflemenin önündeki biyolojik engellerden kaçınmalarını sağlayan kendi kendini düzenleyen ve çok işlevli özelliklere sahiptir (Rai ve Ingle, 2010).

Nanomalzemeler arasında, özel olarak belirlenmiş boyutlara, morfolojilere, manyetik, fluoresans ve fotokatalitik bozunma etkilerine sahip olma gibi fizikokimyasal özelliklere sahip metal ve metal oksit nanopartiküller; sensör gelişimi, agrokimyasal bozunma ve toprağın iyileştirilmesinde özel uygulamalar sunmaktadır. Sertlik, geçirgenlik, kristallik, ısıl kararlılık, çözünürlük ve biyobozunurluk gibi bazı nanomateryal spesifikasyonlar, nanopestisitlerin hem formülasyonunu hem de etkisini, tarımsal formülasyonların dağılımını ve organik çözücü kullanımını azaltmıştır (Sharon vd., 2010; Mukhopadhyay, 2014). Nanomalzemelerin tarımdaki diğer uygulamaları özellikle bitki koruma ürünlerinin uygulanmasını azaltmayı, gübre besin kayıplarını en aza indirmeyi ve optimize edilmiş besin yönetimi programları aracılığıyla verimi arttırmayı amaçlar. Nanoteknoloji tarım makineleri alanında da önemli bir uygulama alanına sahiptir. Bu uygulama alanı, ultraviyole radyasyona ve korozyona karşı kararlılığı artırmak için nanomalzemeler ile makine gövdelerinin kaplanması, tarım makinelerine ve aletlerine uygulanmasını içerir. Ek olarak, nanoteknoloji, nano örtüler kullanan daha sağlam mekanik bileşenlerin üretimi için, çiftçilerin kullandıkları pestisit miktarını azaltmalarını, özel olarak yabancı otları hedeflemelerini sağlayacak şekilde kimyasal ve mekanik olarak yabancı otları tespit etmek için akıllı makineler ve püskürtme ekipmanlarında kullanılmaktadır (Prasad vd., 2011; Prasad vd., 2012).

1.3.1.3. Gıda alanında nanoteknoloji

Nanoteknoloji, çevrenin korunması, moleküler ve hücre biyoloji için yeni araçlar, hastalık tedavisi uygulama yöntemleri, patojen tespiti için yeni malzemeler ve gıda güvenliği gibi gıda ve tarımsal sistemlerin hemen hemen tüm alanlarını etkilemektedir. Bu modern teknoloji özellikle kirleticileri ve patojenleri tespit edebilmek için tasarlanmış sensörler ile gıda malzemelerinin işlenmesi ve nakliyesi vasıtasıyla gıda

üretim endüstrisinin güvenliğini artırmak için kullanılır. Buna ek olarak, gıda endüstrisinde nanoteknolojinin ana uygulamalarından biride fonksiyonel gıda bileşenlerini belirli etki alanlarına taşıyan, koruyan ve sunan kapsülleme ve dağıtım sistemleridir (Abbas vd., 2009; Jafarali vd., 2013).

Gıda nanoteknolojisi, yeni ortaya çıkan bir ilgi alanı haline gelmiştir ve gıda teknolojilerinin, üretilen gıdaların kalitesini ve miktarını iyileştirirken, aynı zamanda özellikle gıda katkı maddeleri (gıda malzemeleri içinde nanoteknoloji) ve paketleme (gıda malzemelerini sarmak ve korumak için kullanılan nanoteknoloji) açısından gıda güvenliğinin değerlendirilmesini de kolaylaştırdı. Nano ölçekli gıda katkı maddeleri bir ürünün raf ömrünü uzatma, dokusunu, lezzetini ve besin kompozisyonunu geliştirme potansiyeline sahiptir. Nano ölçekli gıda katkı maddeleri, gıda kalitesi göstergeleri ve gıda patojenlerini saptamak gibi işlevler sağlamak için de kullanılabilir (Alfadul ve Elneshwy, 2010). Ayrıca nanomalzemeler gıda kalitesini korumak, paketlenmiş gıdalarda patojen ve toksin oluşumunu önlemek için gümüş, titanyum oksit, çinko oksit ve diğer biyonanopartiküller kullanılır (Chaudhry vd., 2008).

1.3.1.4. Su arıtımında nanoteknoloji

Araştırmacılar ve uzmanlar, nüfusun temiz suya erişimini artırmanın zorluğuyla mücadelede etmede nanoteknolojiyi kullanmışlardır. Nanoteknoloji, atık suların kullanılabilir hale getirilmesinde ucuz ve verimli yeni sistemlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Qu vd., 2013).

Toksik metal iyonları, organik ve inorganik çözünen maddeler ve mikroorganizmalar ile kirlenmiş yüzey suyu, yeraltı suyu ve atık su gibi farklı türdeki kirli su kaynakları nanoteknoloji kullanılarak verimli bir şekilde arıtılmış ve saflaştırılmıştır (Karn vd., 2009). Son zamanlarda, araştırmacılar, farklı nanomalzemelerin ve ilgili yapıların potansiyelinin suyun arıtılması konusundaki potansiyelini verimli ve daha güvenli bir şekilde değerlendirmeye odaklanmıştır. Su arıtma işlemleri sırasında, suyun arıtılma oranı ve kapsamı nanoteknoloji kullanılarak kısmen çözülebilen başlıca problemlerdir. Bu modern teknoloji arıtma kapasitesini artırmış, geleneksel olmayan su kaynaklarının ekonomik kullanımını kolaylaştırmış ve böylece kullanılan su kaynaklarını genişletmiştir (Hildebrand vd., 2009).

1.3.1.5. İlaç ve tıp alanında nanoteknoloji

Nanoteknolojinin faydalı yönleri arasında, nanoboyutlu sistemlerin oluşumu özel bir öneme sahiptir. Çünkü çözünürlük, biyoyararlanım, azalan toksisite ve bazı etkili ilaç sistemlerinin üretilmesine yol açabilecek ilaç salınım kabiliyeti gibi bazı farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri etkiler. Aslında, nanoboyutlu ilaçlar diğer ilaç dozaj sistemleri ile karşılaştırıldığında, geniş yüzey alanlarından dolayı, gelişmiş çözünürlük, çözünme hızı, oral biyo yararlanım, hızlı terapötik etki, düşük dozaj ve daha düşük hastadan hastaya değişkenlik gibi üstün yetenekler ve performanslar göstermektedir. Güvenlik ve etkinliğin artmasının yanında geniş kapsamlı formüle edilmiş ve hasta uyumunun artması sonucunda hedefli ilaç salınım sistemlerinin üretimi geliştirilmiştir (Silva vd., 2011). Bu modern teknoloji, mikroorganizmaların neden olduğu iltihapları ve ayrıca moleküler düzeyde insan vücudunda güçlü bir terapötik etkiye sahip olan minimal yan etkileri olan ekonomik ilaçların üretilmesini tespit ederek teşhis yöntemlerini geliştirmeye odaklanmıştır. Nano ilaç sistemleri yaygın hastalıkların tedavisinin yanı sıra kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi spesifik hastalıkları teşhis etme ve tedavi etme yeteneğini de ortaya koymaktadır (Ebert vd., 2004). Nanoteknoloji, yeni ilaç dozajı ve formülasyon sistemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, nanomateryal sistemlerin canlı hücrelerle sahip olduğu özel biyoyuymululuk nedeniyle doku mühendisliği ürünleri gibi bazı diğer farmasötik dalların geliştirilmesinde de önemli bir rol oynamıştır (Kesharwani vd., 2014). Nanomalzemelerin bu alanlardaki diğer uygulamaları ilaç kapsüllemesi, kemik değişimleri, protezler ve implantlardır. Son zamanlarda, nano cihazların oluşumundaki ilerlemenin, bilim ve teknolojinin birçok alanında, özellikle tıp ve farmakolojide, biyosensörlerin, patojenik bakterilerin ve respiratörler gibi akıllı makinelerin üretiminde kullanımının yanı sıra hastalık belirtilerinin eser miktarlarını saptamak için kullanılan dedektörlerin, biyolojik tehlikelerin geliştirilmesindeki uygulamaları açısından devrim niteliğinde olduğu düşünülmektedir (Choudhury vd., 2014).

Nanoteknoloji uygulamaları arasında, kanser hücrelerinin (metastaz süreci) gelişimini önleme ve onlarla mücadele etme belki de en önemlisidir. Kanser tedavisinin karşılaştığı en büyük zorluk olan metastaz, kanser hücrelerinin primer kütleden vücudun diğer bölgelerinde sekonder tümörlerin oluşumu yoluyla gelişimi olarak tanımlanır (Zhang ve Lua, 2014). Bu süreç kanserlerin çoğunda ortaya çıkar.

Metastazları tedavi etmenin zorlukları arasında küçük boyutları, yüksek çeşitliliği ve çeşitli organ ortamlarına dağılması sayılabilir. Sadece birkaç tedavi belirli kanser bölgelerine ulaşabildiği için metastatik kanseri tedavi etme girişimleri bugüne kadar çok başarılı olmamıştır. Belirli dokuları hedef alan ve belirli alt hücre bölmelerine erişilebilirliği kolaylaştıran ve birden fazla terapötik işlevi tek bir platformda birleştiren akıllı nanomalzemeler bu sorunu giderebilmek için çok önemli fırsat sunmuştur. Nanoterapötikler, kanser bölgesinde yarı ömrünü bir kez artırmak için ilacın farmakokinetik profilini değiştirirken, ilaçların nanoparçacıklara yüklenmesine veya ilaçların nano yüzeylere adsorpsiyonuna odaklanır. Bu nedenle, bu mekanizma ilaç dışı hedefleme etkilerinin sorunlarını ortadan kaldırmaktadır (Nguyen ve Massague, 2007; Schroeder vd., 2012).

1.3.1.6. Kataliz alanında nanoteknoloji

1950'lerde toplu katalitik sistemlerin sorunlarını azaltabilmek için nano kataliz kavramı ortaya çıkmıştır. Bir katalizörü reaksiyon ortamından ayırmanın, geri dönüştürmenin ve tekrar kullanmanın zorlukları araştırmacılar için önemli bir sorun teşkil eder. Bu sorunun neden olduğu ekonomik yükü azaltabilmek için nanoteknoloji umut olmuştur (Tsai vd., 2004).

Nano kataliz (kompozitler nano yapılar, yarı iletkenler, metaller, metal oksitler,), nanomalzemelerin çeşitli uygulamalarda katalizör olarak kullanıldığı ve hızla büyüyen bir alan olarak tanımlanabilir. Son zamanlarda nanoteknoloji, yüksek aktivite, düşük enerji tüketimi ve uzun ömürler sergileyen ve %100 seçicilik göstere katalizörler geliştirmeye odaklandı. Bu, ancak tek tek bileşenlerin şekil, boyut, elektronik yapı yüzey bileşimi, mekansal dağılımı ile termal ve kimyasal kararlılığının tam olarak kontrol edilmesiyle başarılabilir (Pan vd., 2007; Park ve Song, 2011).

Katalizör teknolojisini nanoteknoloji çok önemli ölçüde etkilemiştir. Tüm dönüşümler ve kimyasal reaksiyonlar katalizörlerin yüzeyinde meydana geldiği için bir katalizörün boyutu nanoteknoloji açısından özel bir öneme sahiptir. Bunun için bir katalizörün boyutunun düşürülmesi, yüzey alanının artmasına neden olur. Nanoteknoloji alanı, geniş yüzey alanına sahip nano yapıları sistemleri ve hacim oranlarını dikkate almaktadır. Yüksek verimlere, gelişmiş maliyet etkinliğine, hızlı reaksiyonlara ve sinerjik etkilere yol açan geniş bir yüzey alanına ulaşabilmek, kataliz teknolojisindeki

ana nanoteknolojik devrim olmuştur. Katalitik aktivite, nanometre ölçeğindeki katalizörlerin gelişimi ile artar. Malzemelerin boyutlarındaki küçülmeler sadece yüzey/hacim oranını arttırmakla kalmayıp aynı zamanda mikroskobik ölçeklerde malzemelerin morfolojisini ve yüzey özelliklerini de değiştirmektedir (Lak vd., 2008; Machado ve Serp, 2012). Örneğin, altın nanoparçacıklar, nano ölçekte katalitik olarak aktiftir ancak makroskopik durumlarında neredeyse atılırlar. Ayrıca, nano ölçekte katalizörlerin özel morfolojik ve boyut özellikleri, enerji tasarrufu sağlamalar, tekrar kullanılabilirlikleri, ortamdan ayrılabilirlikleri ve daha uzun süre kullanımları gibi avantajları vardır. Bundan dolayı nanokatalizörler yeşil kimyada anahtar bir unsur olarak kullanılırlar. Nanokatalizörler geri kazanılabilirlik, seçicilik, aktivite ve dayanıklılık açısından mükemmel performans göstermektedir (Guo vd., 2014).

1.3.1.6. Enerji alanında nanoteknoloji

Günümüzde insan faaliyetlerini ve gereksinimlerini yerine getirmek için kullanılan ana enerji kaynakları hidroelektrik, fosil ve mineral yakıtlar ve nükleer kaynaklardır. Çoğu durumda bu kaynaklar hem ekosisteme zarar verir hem de insan hayatı için çok tehlikelidir. Ayrıca ekolojik olarak önemli alanlara zarar verirler, pahalıdır, ozon tabakasının incelmeye, küresel ısınmaya, ekolojik tahribata ve biyosfer ve jeosfer tahribatına neden olurlar. Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, enerji üretimini daha tasarruflu ve verimli bir hale getirmiştir (Dillon vd., 1997; Dresselhaus vd., 2007).

Küresel güç temini uzun vadede güvence altına almak ve üretim verimliliğini çevre dostu bir şekilde artırarak enerji kayıplarını önlemek için, nanoteknoloji, nano ölçekte sorunları göz önünde bulundurarak, enerji verimini ve kapasitesini geliştiren metotların belirlenmesine olanak sağlamıştır (Epstein ve Malloy, 2009). Çoğu durumda, birincil enerji kaynakları, verimliliği artırmak, üretim maliyetini ve dolayısıyla tüketim maliyetini azaltmak için elektrik, ısı ve kinetik enerji gibi diğer enerji türlerine dönüştürülür. Geleneksel yakıtlardan elde edilen enerjinin verimliliğini arttırmak hem önemli miktarda karbondioksit emisyonunu azaltır hem de çevrenin korunmasına yardımcı olur. Ayrıca, optimize edilmiş sınır tabakalı tasarımlara sahip nano yapıları yarı iletkenler, atık ısı kullanımında geniş uygulamalarının önünü açmış verimlilik artışına katkıda bulunmuştur. Bunun en iyi örneği, otomobillerden veya

insan vücudundan gelen ısının tekstillerde taşınabilir elektronik sürücü olarak kullanılmasıdır (Azais vd., 2007; Obreja, 2008).

Günümüzde, nanomalzemeler bazı olağanüstü özellikler sergiledikleri için, konvansiyonel (fosil ve nükleer yakıtlar) ve yenilenebilir enerji kaynakları (güneş, rüzgar, su, gelgit veya biyokütle) için ucuz ve çevreci enerji kaynaklarını verimli üretim ve geliştirilmesinde yeni potansiyeller olarak kullanılmaktadır. Bu gelişmeler enerji sektöründeki katma değer zincirinin hemen hemen her bölümünü etkilemiştir. Bundan dolayı nanoteknoloji, tüm endüstri alanlarında optimize edilmiş üretim teknolojileriyle yenilenebilir enerji üretiminden ekonomik olarak faydalanma potansiyeli, yeni teknolojik çözümler ve enerji verimliliğini artırma gibi imkanlar sunmaktadır. Nanoteknolojinin enerji sektöründeki uygulamaları, enerji üreten, ileten, dağıtan, yöneten ve depolayan bölümlere ayrılabilir. Örneğin, petrol teknolojisinde nano kaplamalı, aşınmaya dayanıklı matkap problemlerinin kullanılması daha fazla kullanım ömrü, verimlilik ve maliyet tasarrufu sağlayacaktır. Ayrıca, nanomalzemelerin ortaya çıkışı, rüzgar ve gelgit enerji santralleri için daha hafif ve daha sağlam rotor kanatlarının üretimi, mekanik olarak gerilmiş bileşenler için aşınma ve korozyona dayanıklı koruyucu tabakaların imalatı, bileşen yapılarında katman tasarımlarının optimizasyonu ve organik yarı iletken karışımların morfolojisi ve güneş pili verimliliğini artırmak için kuantum noktalarının ve tellerin kullanılması gibi birçok enerji sektöründe önemli ilerleme kaydedilmesi için fırsat sunmuştur (Simon ve Gogotsi, 2008).

Nano ölçekte malzemelerin elektriksel iletkenliklerinde olağanüstü gelişme nedeniyle, elektrik kablolarında ve güç hatlarında, pillerde ve süper kapasitörlerde, nano sensör cihazlarında ve güç şebekelerinin son derece karmaşık kontrolü ve izlenmesi ile baş edebilecek güç elektroniği bileşenleri gibi birçok alanda kullanılırlar. Bu gelişmiş elektriksel iletkenlik, nanomalzemelerin sahip olduğu geniş yüzey alanlarından kaynaklanır, elektronların daha verimli hareketini ve elektrik iletkenliğinin kayda değer bir şekilde artırılmasını kolaylaştırır. Önceki literatür çalışmaları, bir dizi nano gözenekli metal organik bileşiğin, taşınabilir elektronik cihazlarda yakıt hücreleri olarak çalışma açısından ekonomik olarak gerçekleşmesi için yeterli potansiyeli sunduğunu göstermiştir. Nanomalzemelerin, enerji tasarrufu ile bağlantılı bir diğer uygulaması, tuğlaya, tahtaya, plastiklere, metallere, betona, veya başka herhangi bir yapı malzemesine uygulanan kaplama malzemeleridir. Bu tür nano kaplamalar dona

karşı mükemmel koruma sağlamak, yüzey yoğuşmasının oluşumunu önlemek, malzeme tamir kolaylığını arttırmak, alev ve yanma geciktiriciliği sunmak, finansal ve enerji harcamalarını azaltmak, boru hatlarının işletme ömrünü uzatmak ve ekolojik güvenliği artırmak gibi birçok avantaj sunar (García-Martínez vd., 2008).

1.4. Nanofiber

Çapı 1 µm'ye eşit veya daha küçük bir çapa sahip lifsi ya da ipliksi fiberler nanofiber veya nanolif olarak tanımlanmaktadır (Ramarkrishra vd., 2005). Nanometre boyutundaki fiber materyaller, canlı sistemlerinin temel yapı taşlarıdır. Örneğin, 30 nm çapında hücre iskeleti filamentleri ve DNA molekülleri 1,5 nm çapında çift sarmallı fiberlerdir. Hatta nanofiberlerle oluşturulmuş saç hücreleri ve gözlerin çubuk hücreleri gibi hücre dışı matrislere sahip doku hücreleri veya dokular ve organlar için çok işlevli bir yapısal omurga da örnek olarak verilebilir. Doğanın bu eşsiz tasarımına benzer şekilde, polimerlerden elde edilen nanofiberler ve bunların kompozitleri, insanların hayatını kolaylaştıran benzersiz işlevler gerçekleştiren yapıların ve cihazların üretilmesi için temel yapı taşları sağlayabilir (Frank ve Yuqin, 2014).

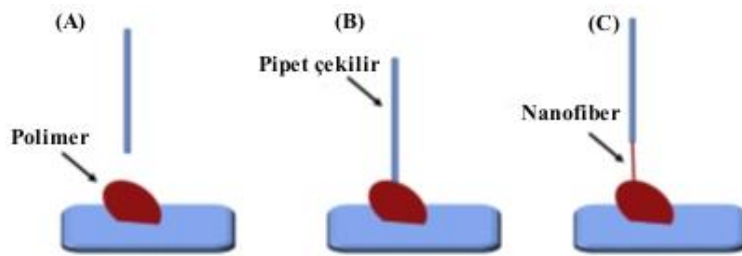
Nanofiberler, özel 3 boyutlu ağ yapısı, esneklik, yüksek en/boy oranı, çok yüksek gözeneklilik ve ayarlanabilir gözenek boyutu gibi benzersiz özelliklerle tanınan tek boyutlu nanomalzemelerdir (Pai vd., 2009). Nanofiberler farklı polimerlerden üretilebilir ve üretim sürecinde veya sonrasında çeşitli fiziksel ve kimyasal modifikasyonlardan dolayı farklı özellikler kazanırlar. Fiber çapları 5 nm ila 500 nm arasında olan fiberler için, birim kütle başına yüzey alanı yaklaşık 10.000-1.000.000 m²/kg seviyesine kadar büyük bir artış mümkündür. Boyuttaki azalma ve yüzey alanındaki artış, nanofiberlerin yüksek yüzey alanı, fonksiyonel grupların, absorbe edilmiş moleküllerin, iyonların, katalitik kısımların ve birçok türde nanometre ölçekli parçacıkların eklenmesi veya bırakılması için dikkate değer bir kapasite sağlar. Büyük ölçekte üretilebilecek, en umut verici nanomalzemelerden en önemlisi nanofiberlerdir. Bu nedenle nanofiberler sağlık ve enerji alanlarından otomotiv ve havacılık alanlarına kadar geniş bir uygulama yelpazesinde hayatımızdaki temel sorunlar için umut verici çözümler getirmektedir (Huang vd., 2003; Ko, 2004; Barhoum vd., 2019).

1.4.1. Nanofiber üretim yöntemleri

Nanofiberler sahip oldukları eşsiz özellikleri nedeniyle pek çok alanda farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar. Bu eşsiz özelliklerinden dolayı nanofiberler hem bilim insanları hem de modern endüstri için en çok çalışılan ve ilgi çeken materyallerden biri olmuştur. Son yıllarda araştırmacılar laboratuvar ölçeğinde ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmak için farklı nanofiber üretim tekniklerinin geliştirilmesine yönelmiştir.

1.4.1.1. Çekme yöntemi

Çekme yöntemi uzun ve sürekli nanofiber üretme kabiliyetine sahip kuru eğirme tekniğine benzer bir işlemdir. Bu teknik üç basit adımdan oluşur: (i) substrat üzerine hacimce yaklaşık 1 mL bir damla polimer çözeltisi koyulur, (ii) damlanın kenarına bir mikropipet ile dokunulur ve (iii) geri çekilir; mikropipetin bu geriye hareketi, nanofiber haline gelinceye kadar polimer çözeltisi çekmeye devam edilir. Şekil 1.1.'de çekme yönteminin şematik gösterimi gösterilmiştir (Barhoum vd., 2019). Mikropipetin standart akış hızı yaklaşık 10^{-4} m/s'dir ve çekilen fiberin çapı genellikle 100 nm'nin üzerindedir. Çekme hızı, çözücü buharlaşması ve polimer yapısı elde edilen fiberlerin kalitesini belirleyen parametrelerdir. Tekniğin kontrolü ekonomiktir, ayrıca uzman personel denetimi gerektirmez ve kolaydır. Bununla birlikte, düşük üretim hızı, fiber çapının kontrol edilmemesi ve tüm polimerler için kullanılmaması nedeniyle, çok fazla tercih edilmemektedir (Wang ve Nain, 2014; Stojanovska vd., 2016).

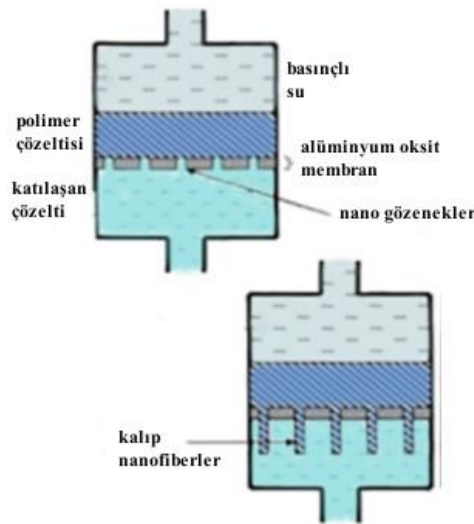


Şekil 1.1. Çekme yönteminin şematik gösterimi (A) substrat üzerine bir damla polimer çözeltisi konur, (B) damlalara bir mikropipet dokunulur ve (C) mikropipet geri çekilir

1.4.1.2. Kalıp sentez yöntemi

Kalıp sentez yöntemi, çeşitli malzemelerden nanofiber üretimi için en etkili yöntemlerden biridir.

Kalıp sentez yöntemi, çeşitli malzemelerden kontrol edilebilir uzunluk ve çapa sahip bir dizi hizalanmış mikro/nano fiber, nanotüp ve nanotel üretimi için etkili bir yöntemdir. Kalıp sentez yöntemi ile nanofiber üretiminde homojen çaplı gözenekler içeren nano gözenekli bir zar kalıp kullanır. İşlem normal olarak üç adımdan oluşur: (i) öncüllerin emdirme yoluyla kalıplarla birleşmesi, (ii) reaksiyon, çekirdeklenme ve büyüme sırasında katı türler oluşması ve (iii) oluşan fiberin kalıptan çıkarılması. Fiberi sentezden sonra kalıptan çıkarmak için, kullanılan kalıbın özelliğine göre kalsinasyon ve dağlama gibi kimyasal yöntemler ve çözülmeyi içeren fiziksel yöntemler kullanılır. Bu yöntem düzgün gözenekli nanofiberlerin boyutlarının kontrolüne izin verir. Ancak sentez sonrası kalıbı çıkarmak için çeşitli işlemler gerektirmesi dezavantaj olarak görülür (Zhang vd., 2006; Khan, 2010; Li vd., 2016). Şekil 1.2.'de polimer çözeltisinden su basıncı altında nano ölçekli çaplı gözeneklerden geçirilerek nanofiber üretiminin yapıldığı kalıp sentez yönteminin şematik gösterimi görülmektedir (Barhoum vd., 2019).



Şekil 1.2. Kalıp sentez yönteminin şematik gösterimi

1.4.1.3. Faz ayırma yöntemi

Faz ayırma yöntemi uygun çözücü kullanarak çözülme, jelleşme, özütleme ardından dondurma ve kurutma tekniklerinden oluşur. Bir teflon oluktaki bir polimer çözeltisi,

ısıtıl işlem yardımı ile bir jele dönüştürülür ve elde edilen jel, dondurularak kurutma işlemi yoluyla kurutulur. Şekil 1.3.'de faz ayırma yönteminin şematik gösterimi gösterilmiştir. Polimer derişimi ve jelleşme sıcaklığı çoğunlukla jel oluşma süresini etkiler. Yüksek ve düşük jelasyon sıcaklıkları, nano ölçekli trombosit benzeri yapıların ve fiber ağların oluşumuna yol açar. Üretilen nanofiberler sonsuz fiberlerden oluşan bir ağa sahip gözenekli bir yapıya sahiptir ve 50-500 nm çapındadır. Isıtıl işlem, solvent tipi, polimer tipi, jelleşme süresi ve sıcaklığı nanofiberlerin morfolojisini etkiler. Bu teknik, sürekli nanofiber üretimine olanak sağlamasının yanında basit ve ucuz olduğu için nanofiberlerin seri üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, zaman alıcı bir işlem olması, laboratuvar ölçeğinde üretimde sıkıntılar, yapısal stabilite eksikliği ve gözenekliliği sağlamada zorluk ve tüm polimerler için uygulanamaması gibi bazı önemli sınırlamaları vardır (He vd., 2014).



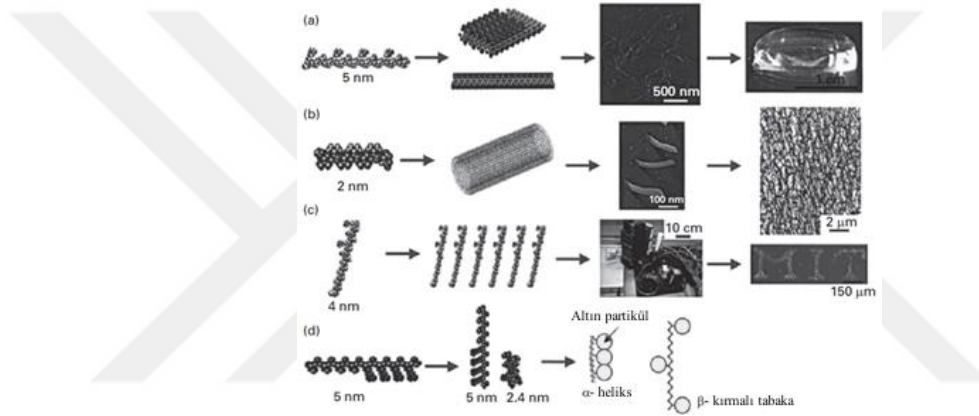
Şekil 1.3. Faz ayırma yönteminin şematik gösterimi

1.4.1.4. Kimyasal buhar biriktirme yöntemi (CVD)

CVD, yüksek sıcaklıkta gerçekleşen katalitik reaksiyonlar vasıtasıyla buhar fazından metal oksit ve karbon nanofiberlerin oluşumu için genellikle kullanılan bir yöntemdir. CDV ile karbon ve metal oksit fiberlerin yanı sıra silikon, filamentler ve karbon nanotüp de üretilmektedir. CVD yönteminde substrat, ayrışan veya reaksiyona giren bir veya daha fazla uçucu öncü madde ile substrat yüzeyinde muamele edilir. Böylece üretilmek istenen fiber substrat yüzeyinde sentezlenir. Reaksiyon odasındaki gaz akışı sayesinde işlem sırasında oluşan uçucu yan ürünler giderilir. Bu yöntem tamamen gaz fazında gerçekleştiği için seri üretim için kullanımı uygundur. Fakat üretilen fiberlerin kalitesi iyi olmadığı için nanofiber üretimde çok fazla kullanılmayıp daha çok karbon nanotüp üretiminde kullanılmaktadır (Creighton ve Ho, 2001; Patil vd., 2012).

1.4.1.5. Kendiliğinden birleşme yöntemi

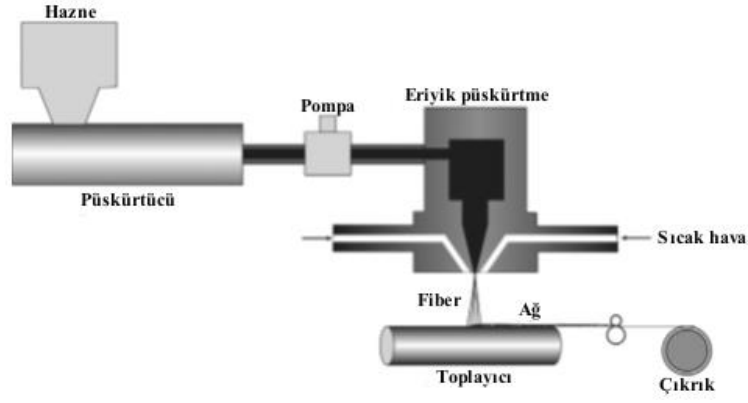
Kendiliğinden birleşme yöntemi, önceden var olan bileşenlerin kendilerini istenen işlevlere ve kalıplara göre organize edildiği bir yöntemdir. Bu yöntem ile çok çeşitli peptitlerin ve proteinlerin çok kararlı nanofiber yapılar ürettiği gösterilmiştir. Bu nanofiberler olağanüstü düzenlilik, bazı durumlarda sarmal periyodikliğine sahiptir ve çok iyi sıralanmışlardır. Moleküler yapıların kontrol edilmesi sonucu nanofiberlerin yüzey yapısı ve çapı değiştirilebilir. Fakat üretim veriminin düşük olması ve yöntemin karmaşıklığı gibi dezavantajlarından dolayı çok fazla tercih edilmemektedir. Şekil 1.4'de çeşitli peptitler ile kendiliğinden birleşme yöntemi ile üretilen nanomalzemeler gösterilmiştir (Zhang, 2003).



Şekil 1.4. Çeşitli peptit malzelerin kendiliğinden birleşme ile üretimi: (a) iyonik kendi tamamlayıcı peptid, (b) bir çeşit sürfaktan benzeri peptid, (c) yüzey nano kaplama peptidi ve (d) moleküler anahtar peptidi

1.4.1.6. Eriyik püskürtme yöntemi

Eriyik püskürtme yönteminde ilk olarak polimerik yapı eriyik haline getirilir ve daha sonra filtreden geçirilerek pompa yardımıyla bir delikten püskürtülür. Bu delikten çıkan erimiş polimer sıcak havaya maruz bırakılırken diğer taraftan ise soğuk havaya maruz bırakılır. Böylece erimiş polimer katlaşır ve nanofiber elde edilir. Bu yöntemde polimerleri çözmek için çözücü gerekmediği için diğer üretim yöntemlerine göre daha ekonomiktir. Şekil 1.5. eriyik püskürtme yönteminin şematik gösterimini göstermektedir (Hassan vd., 2013; Zhang ve Lua, 2014; Ko ve Wan, 2014).



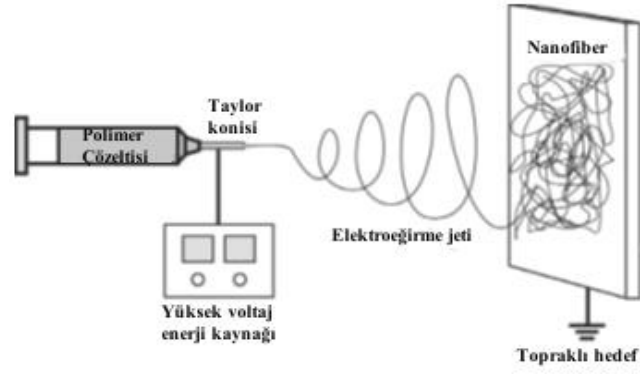
Şekil 1.5. Eriyik püskürtme yönteminin şematik gösterimi

1.4.2. Elektroğirme yöntemi

Elektroğirme yöntemi, elektrostatik kuvvetler kullanarak nanometre ile mikrometre arasında değişen çaplarda polimer fiberlerin üretimi için en etkin, kolay uygulanabilen, ekonomik, hızlı ve çok yönlü bir fiber üretim tekniğidir. Bu yöntem homojen çap, yüksek yüzey/hacim oranına sahip, ayarlanabilir gözeneklilik ve tercih edilen özelliklere ulaşmak için nanofiber boyutunu ve morfolojisini kontrol etme kabiliyeti gibi sayısız avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlarından dolayı elektroğirme yöntemi ile üretilmiş nanofiberlerin ilaç salınımı, doku mühendisliği, enerji depolama ve dönüşümü, kataliz ve savunma sanayi olmak üzere birçok alanda kullanımları vardır (Verrect vd., 2003; Matthew vd., 2007; Bhardwaj ve Kundu, 2010).

Günümüzde çeşitli yöntemlerle nanofiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Fakat elektroğirme yöntemi, elektrostatik fiberlerin üretiminde kullanılan sürekliliği olan ve en basit yöntemlerden bir tanesidir. Bu işlemde elektrik kuvveti hem doğal hem de sentetik polimerlerden nanometre ya da mikrometre aralığında değişen ortalama boyutta nanofiberler oluşturmak için kullanılır (Bhardwaj ve Kundu, 2010).

Elektroğirme cihazı genel olarak; (i) yüksek voltajlı güç kaynağı, (ii) polimer çözeltisinin akış hızını kontrol etmek için kullanılan besleme ünitesi ve (iii) nanofiberlerin biriktirildiği toprak bağlantılı toplayıcı olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. Bu işlemde, çözeltiyi (partikül süspansiyonu, polimerik veya erimiş çözelti) içeren bir şırınganın iğne ucundan çıkarmak için sabit hızda bir şırınga pompası kullanılır. Şekil 1.6.'da elektroğirme cihazının şematik gösterimi verilmiştir (Barhoum vd., 2019).

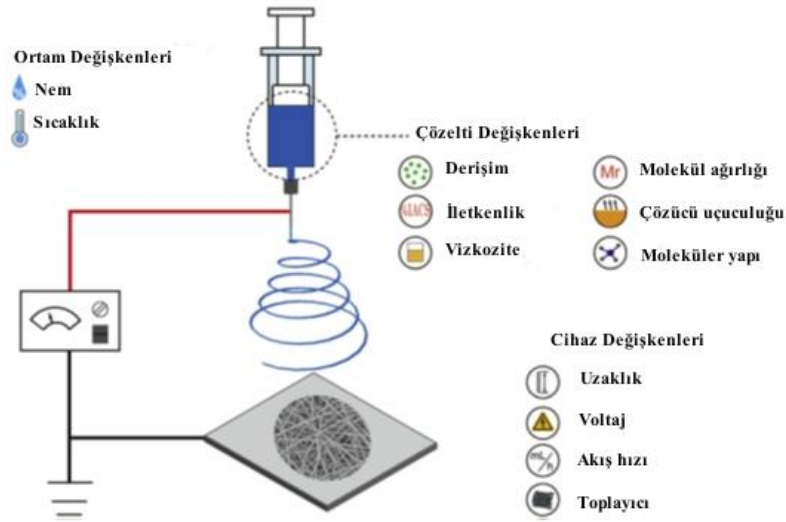


Şekil 1.6. Elektroçizme cihazının şematik gösterimi

Elektroçizme yönteminde öncelikle çalışılacak polimer uygun çözücüde çözülerek polimer çözeltisi hazırlanır. Polimer çözeltisi şırınga yardımıyla besleme ünitesine yerleştirilir. Şırınga ile tam karşısında bulunan toplayıcı plaka arasına güç kaynağı vasıtasıyla yüksek gerilim uygulamak suretiyle elektriksel alana maruz bırakılır. Besleme ünitesinin çalıştırılması ile birlikte şırınganın uç kısmında bir damla polimer çözeltisi oluşur. Bu sırada iğnenin ucundaki damlacık, yüzey gerilimi ve elektrostatik itme olmak üzere iki zıt kuvvete maruz kalır. Elektrostatik itme kuvveti, damlacıkların yüzey gerilimini aşmaya başladığı anda iğnenin ucundaki damla deforme olur. Bu deforme damlacığa Taylor konisi denilmektedir. Elektrostatik kuvvet yüzey gerilimini aştığında çözeltinin ince yüklü polimerik jeti iğne ucundan dışarı atılır. Yüzey gerilimi ve elektrostatik kuvvet arasındaki etkileşim jet akımını gerer ve çözücünün buharlaşmasına neden olan bir fırlatma hareketine maruz bırakır. Bu jet akımı uzun ve ince bir lif olarak sürekli uzamasına neden olur. Oluşan fiber katılarak topraklanmış toplayıcı plakada biriktirilir ve böylece homojen fiberler oluşur (Greiner ve Wendorff, 2007; Liang vd., 2007; Elahi vd., 2013).

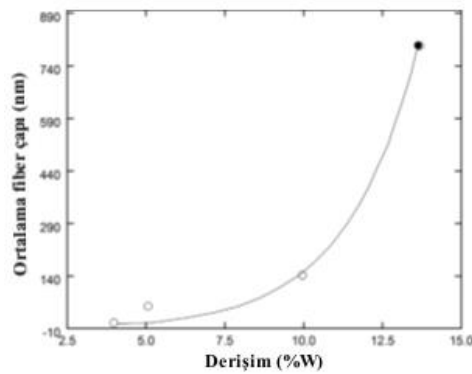
1.4.4. Elektroçizme yöntemini etkileyen parametreler

Birçok araştırmacı, nanofiberlerin üretim işlemini açıklamaya ve elektroçizme parametrelerinin fiber morfolojisi üzerindeki etkisini belirlemeye çalışmıştır. Elektroçizme yönteminde nanofiberlerin morfolojisi ve homojenliği (i) polimer çözeltisi parametreleri, (ii) işlem parametreleri ve (iii) ortam parametreleri olmak üzere üç ana başlık göz önüne alınarak belirlenir (Ramakrishna vd., 2005; Li ve Wang, 2013). Şekil 1.7.'de bu parametreler özetlenmiştir (Ding vd., 2019).



Şekil 1.7. Elektroğırme yöntemini etkileyen parametreler

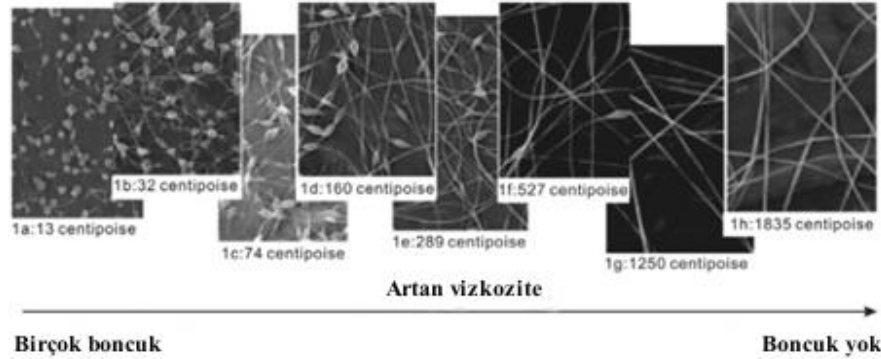
Derişim ve viskozite: Çözelti viskozitesi fiber çapını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Daha yüksek viskoziteye sahip çözeltiler kullanıldığında daha büyük çaplı fiberler oluşur (Fong vd., 1999). Polimer çözeltisinin viskozitesinin, polimer derişimiyle doğrudan orantılı olduğu tespit edilmiştir. Bunun için, polimer derişiminde meydana gelen artış olduğunda, fiber çapıda artacaktır. Deitzel vd (2001) güç yasası ilişkisine göre fiber çapının, artan polimer derişimi ile arttığını göstermiştir. Demir vd (2002) ise fiber çapının polimer derişiminin küpüyle orantılı olarak arttığını göstermiştir. Şekil 1.8.'de ortalama fiber çapının, polimer derişiminin küpüyle orantılı olarak arttığını göstermektedir (Zhao vd., 2016).



Şekil 1.8. Polimer derişiminin ortalama fiber çapına etkisi

Fong vd. (1999) fiber morfolojisinin hem polimer çözeltisinin viskozitesinden hem de derişiminden etkilendiğini göstermiştir. Çok sayıda boncuğun düşük viskozitede oluştuğu ve bunun sonucunda “fiberdeki boncuklar” morfolojisi ile sonuçlandığı

görülmüştür. Yüksek viskozitede boncuksuz fiberler elde edilmiştir. Şekil 1.9. düşük ve yüksek viskoziteye sahip olan çözeltilerden elektroğirme yöntemiyle elde edilen PEO fiberlerin SEM görüntülerini göstermektedir (Fong vd., 1999).

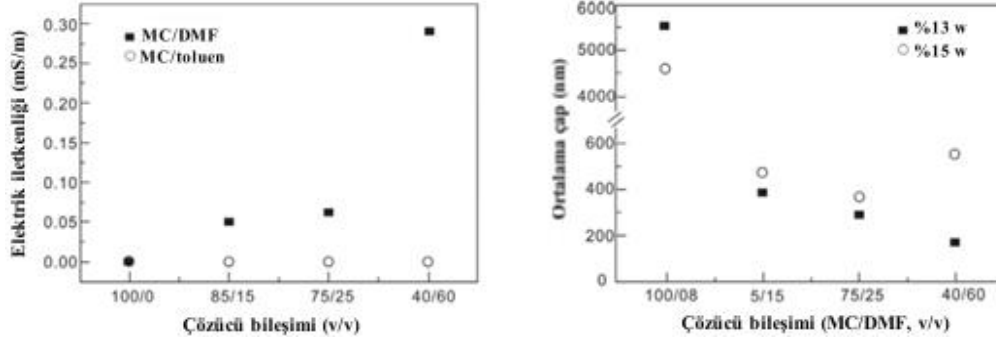


Şekil 1.9. Viskozitenin nanofiberler üzerine etkisini gösteren SEM görüntüleri

Yüze gerilimi: Elektroğirme yöntemiyle nanofiber elde edebilmek için uygulanan elektrostatik kuvvetin, şırınga ucundaki damla polimer çözeltisinin yüze geriliminden daha yüksek olması gerekir. Bu nedenle polimer çözeltisinin sahip olduğu yüze gerilimi nanofiber oluşum parametrelerinden bir diğeridir. Doshi ve Reneker (1995) tarafından, bir polimer çözeltisinin yüze gerilimi azaltılarak boncuksuz fiberlerin elde edilebileceği görülmüştür. Fakat, bu genelleme, Liu ve Hsieh (2002) tarafından, selüloz asetatın aseton ve dimetilasetamid (DMAc) karışımı içinde çözülerek elektroğirilmesi sonucunda oluşan fiber üretim çalışmalarında olduğu gibi her zaman doğru değildir. DMAc'ın yüze gerilimi 32,4 dyn/cm iken bu değer aseton için 23,7 dyn/cm'dir. Çözücü olarak tek başına aseton veya DMAc kullanıldığı zaman ise, boncuklu fiberler elde edilmiştir. DMAc ve aseton birlikte çözücü olarak kullanıldığında, yüze gerilimi 23.7 ile 32.4 dyn/cm arasında değişir ve bu durumda boncuksuz fiberler gözlenmiştir.

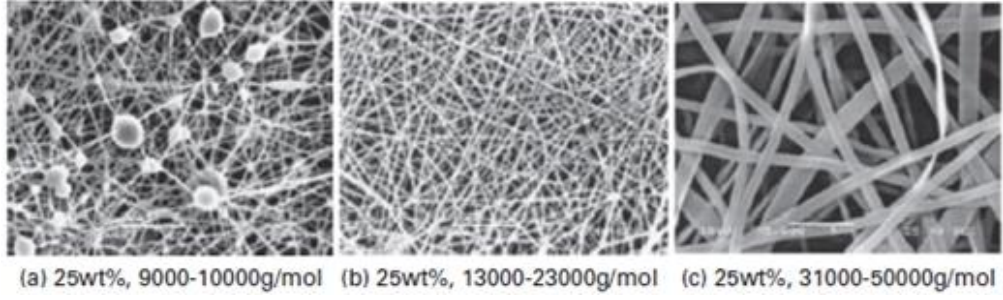
İletkenlik: Çözeltinin iletkenliği çözeltinin elektrik akımını taşıma kabiliyeti olarak da tanımlanabilir. Bir polimer çözeltisine tuz veya iyon ilave edilmesi iletkenliği artırır ve bu durumda jet yüzeyinde daha yüksek bir şarj yoğunluğunun elde edilmesi ile jete daha fazla elektrik yükünün gelmesine neden olur. Jet tarafından taşınan yükün artması sonucu olarak, elektrik alanı altındaki jet üzerinde daha yüksek uzama kuvvetleri oluşur. Bu da az boncuk ve daha ince fiberlerin oluşumuna neden olabilir. Zong vd (2002) polimer çözeltisi içindeki tuz derişiminin artmasıyla, daha ince ve daha az boncuk oluşumunun gözlendiğini bildirmiştir. Lee vd. (2003) ise daha yüksek

elektriksel iletkenliğe sahip bir çözücü kullanılması durumunda, daha küçük çaplara sahip PCL fiberlerin üretilebileceği sonucuna varmıştır. Şekil 1.10.'da iletkenliğin ortalama fiber çapına etkisi gösterilmiştir. (Lee vd., 2003).



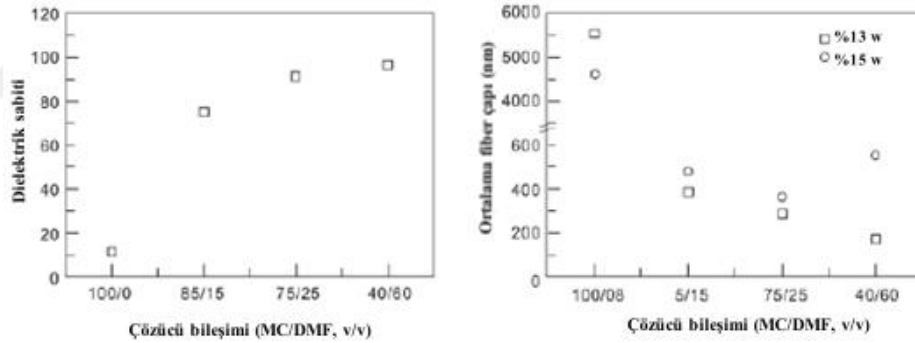
Şekil 1.10. İletkenliğin ortalama fiber çapına etkisi

Molekül ağırlığı: Moleküler ağırlık, çözeltinin viskozitesini belirleyen en önemli parametrelerden biridir. Aynı polimere ait yüksek molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı iki örnek aynı çözücüde çözüldüklerinde genellikle yüksek molekül ağırlıklı örneğin oluşturduğu çözeltinin viskozitesi daha yüksek olmaktadır. Yüksek molekül ağırlığı yüksek derecede polimer zincir dolanmasına neden olduğu için, molekül ağırlığı ile polimer zincir uzunluğu doğru orantılıdır. Polimer derişiminin ve viskozitesinin bir sonucu olan Berry sayısı polimer zincir dolaşma derecesinin bir göstergesidir. Yüksek derecede polimer zincir dolaşmasının göstergesi yüksek Berry sayısıdır. Berry sayısının, fiber morfolojisi ve çapı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu da daha yüksek molekül ağırlıklı polimer kullanıldığında oluşan fiberlerin çaplarının daha büyük olduğunu ve daha az boncuklu fiber oluştuğunu gösterdi. Koski vd (2004) farklı molekül ağırlıklı PVA kullanılarak yapılan bir çalışmada fiber çapının ağırlığı ve Berry sayısı ile arttığı bildirilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı PVA kullanıldığında (bu durumda Berry sayısı <9 dur), boncuklu fiberler, yüksek molekül ağırlıklı PVA kullanıldığında (bu durumda Berry sayısında > 9 dur) büyük çaplı yassı fiberler elde edilmiştir. Bu çalışmaya ait SEM görüntüleri Şekil 1.11.'de verilmiştir (Koski vd., 2004).



Şekil 1.11. Molekül ağırlığının fiber morfolojisi üzerine etkisi

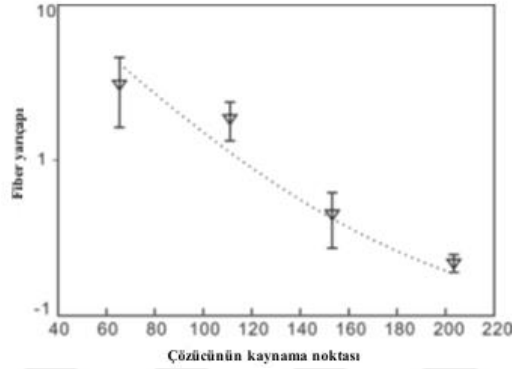
Dielektrik sabiti: Dielektrik sabiti, bir malzemenin kapasitör dielektrik maddesi olarak kullanıldığında şarj etme yeteneğini tanımlayan bir malzeme özelliğidir. Dielektrik sabitinin artması sonucu malzemenin yük depolama kapasitesinde de bir artış meydana gelir. Metilen klorür (MC) 9,1 dielektrik sabitine sahipken, dimetil formamidin (DMF) dielektrik sabiti 36,7'dir. Polimer çözeltisi içindeki DMF oranının artırılması sonucunda çözücünün dielektrik sabiti de artar. Şekil 1.12.'de görüldüğü gibi çözücünün dielektrik sabiti arttıkça elektroğirme yöntemiyle üretilen PCL nanofiberlerin çapının azaldığı bulunmuştur (Lee vd., 2003).



Şekil 1.12. Dielektrik sabitinin ortamala fiber çapına etkisi

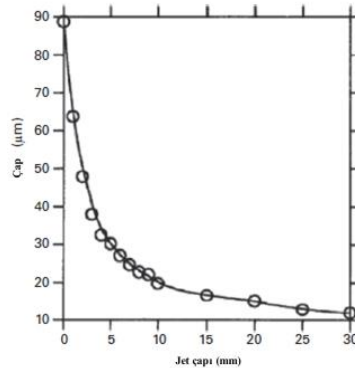
Çözünün kaynama noktası: Düşük kaynama noktası, çözücünün atmosferik koşullar altında buharlaşmasını kolaylaştırmasından dolayı elektroğirme uygulamalarında istenen bir özelliktir. Bu özellik, polimer fiberlerinin kuru halde birikmesini teşvik eder (Matthews vd., 2002). Bununla birlikte, aşırı düşük kaynama noktasına sahip bir çözücü, çözücünün hızlı bir şekilde buharlaşması nedeniyle, şırınganın ucundaki iğnenin sık sık tıkanmasına neden olmaktadır. Wannatong vd. (2004) polistiren fiber çapının, çözücünün kaynama noktasının artması ile azaldığını bildirmiştir. Şırınga ucundan topraklanmış toplayıcı plakaya püskürtülmesi sırasında atılan yüklü bir jet çok daha düşük bir çapa gerilir. Çözücünün yavaş yavaş buharlaşması nedeniyle jetin

viskoelastik özellikleri değişir. Viskoelastik kuvvet elektrostatik kuvveti aştığında, jet daha fazla gerilemez. Bunun sonucu olarak, polistrenin hem THF hem de toluendeki çözeltileri (sırasıyla 65-66°C ve 111°C düşük kaynama noktalarına sahip olan), DMF ve *m*-kresol çözeltilerindekinden daha büyük çaplara sahip fiberler verir. Şekil 1.13.'de fiber çapına çözücünün kaynama noktasının etkisi grafiği gösterilmiştir (Wannatong vd., 2004).



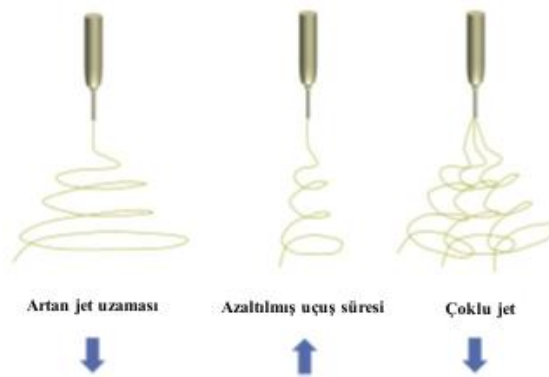
Şekil 1.13. Fiber çapına çözücünün kaynama noktasının etkisi

İğne ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklık: İğne ucu ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe ne kadar fazlaysa, fiberler kendilerini kararsız bölgede uzatmak için daha uzun süre kalacakları ve daha uzun mesafe almaları gerektiği için fiber çapı o kadar ince olacaktır. Doshi ve Reneker (1995), jet çapının Taylor konisinin tepesine olan mesafe arttıkça azalacağını yani iğne ucuna olan uzaklığın artması ile fiber çapının azalacağını bildirmişlerdir. Şekil 1.14. ağırlıkça %4'lük PEO çözeltisi için voltajın 10 kV olduğu koşulda Taylor konisinin tepesine olan mesafenin bir fonksiyonu olarak jet çapının grafiğini göstermektedir (Doshi ve Reneker, 1995).



Şekil 1.14. Fiber çapına jet çapının etkisi

Voltaj: Elektroğirme yönteminde uygulanan voltaj değıştiğinde çözeltiliye uygulanan yüklerin miktarı değışir. Artan voltaj, elektroğirme jetini hızlandırır ve bunun sonucu iğnenin ucunda hacimsel olarak daha fazla çözeltili oluşur. Çözeltinin akış hızı sabit tutulursa, daha az kararlı ve daha küçük bir Taylor konisi oluşur. Bu durum sonucunda, Taylor konisi iğneye doğru çekilir. Bunun da boncuk oluşumunda artış gözlenebilir (Deitzel vd., 2001; Zhong vd., 2002). Uygulama voltajının fiber morfolojisi üzerine etkisi ile ilgili birbirinden farklı birçok rapor vardır. Bazı çalışmalarda uygulanan yüksek voltajın, çözeltinin daha fazla gerilmesine yol açtığı ve bunun da daha ince fiberler oluşturduğunu göstermiştir (Lee vd., 2004; Buchko vd., 1999). Düşük viskoziteli bir çözeltinin yüksek voltajda elektroğirilmesi ayrıca ikinci bir jet oluşumunu destekler ve bu da daha küçük fiber çapı ile sonuçlanacaktır. Zhao vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada ise uygulanan voltajın azalması ile elektrostatik alanın yüklü çözeltili jeti üzerindeki etkisinin azalmasıyla sonuçlanacağı ve jetin anottan toplayıcıya gitme süresinin uzayacağını bildirmişlerdir. Bu durumun yüklü jetin ayrılması ve uzaması için daha elverişli şartlar sağlandığı için dar çap dağılımlı ince fiberlerin kolayca oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, fiber oluşumu için uygulanan elektrostatik kuvvetin polimer çözeltisinin yüzey geriliminden daha yüksek bir değerde olması gerekir. Bu değere kritik değere denilmektedir. Sonuç olarak, elektrostatik alanın gerilimi, elektroğirme işleminde kritik değere yakın olduğunda, küçük çaplı ve dar çap dağılımlı fiberler kolayca oluşturulabilir. Şekil 1.15.'de gerilim artması ile elektroğirme işlemine ve nanofiber çapına etkisi şematik olarak gösterilmiştir (Zhao vd., 2004).



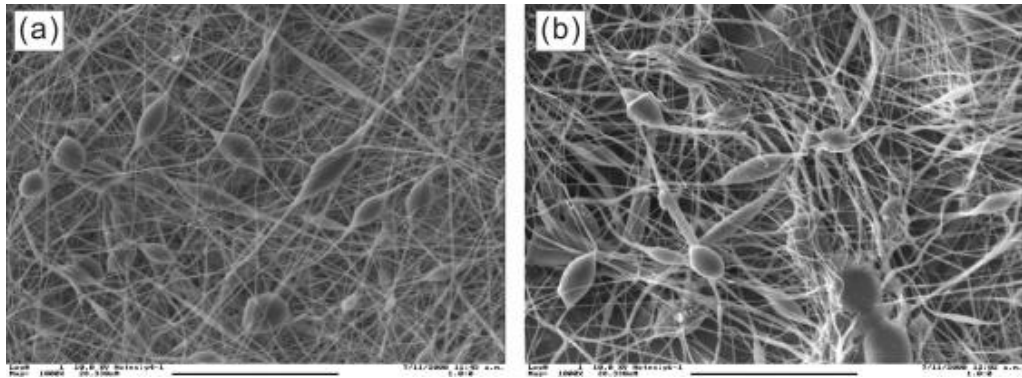
Şekil 1.15. Elektroğirme işlemi ve nanofiber çapına artan gerilimin etkisi

Wu vd. (2012) gerilimin daha da artmasıyla eğilim tersine dönmeye başlamadan önce fiber çaplarının voltaj yükselmesiyle minimum seviyeye düştüğünü göstermiştir. Bunun tam

tersi, başlangıçta fiber çapının daha yüksek voltajla arttığını, fakat belirli bir uygulama voltajının üzerinde, oluşan fiber çapının azalmaya başladığını gösteren çalışmalarda mevcuttur (Mazoochi vd., 2012). Çözelti damlacıklarının gerilmesi, daha yüksek voltajla artabilirken, yüksek voltaj, artan potansiyel farklılığından dolayı kollektöre karşı daha hızlı ivmelenmeye yol açabilir, bu da jetin anottan toplayıcıya gitme süresini azaltır. Bu durumda ise daha büyük çaplı fiber oluşumu gözlenir.

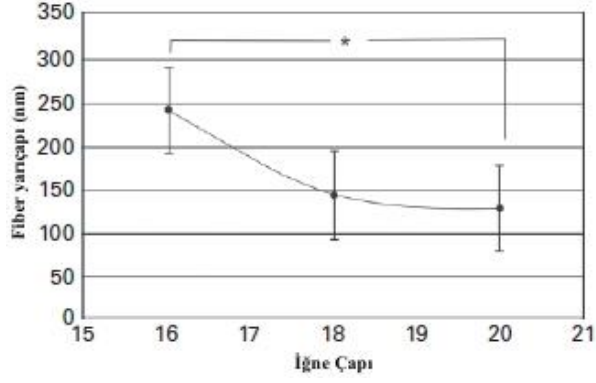
Sonuç olarak yapılan literatür çalışmaları göz önüne alındığında uygulanan voltajın değiştirilmesinin fiber çapını etkilediği ama uygulanan voltaj arttığında fiber çapı artar ya da azalır gibi bir genelleme yapılabileceğinin mümkün olmadığı görülmektedir.

Akış hızı: Zong vd. (2002) daha düşük çözelti akış hızı uygulandığında küre benzeri boncuklara ve daha küçük çapa sahip fiberler oluştuğunu bildirdi. Daha yüksek çözelti akış hızı uygulandığında ise daha büyük çapa sahip lifler ve boncuklar gözlemlenildi. Daha yüksek akış hızında düzeneğin ucunda asılı olan damlacık daha büyük olacağından jet, akışkanı daha yüksek bir hızda taşır. Bunun sonucu olarak fiberlerin toplayıcıya ulaşmadan kurumaması mümkün olmaz ve daha büyük çapa sahip fiber oluşmasına neden olur. Şekil 1.16. 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 75 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında üretilen fiberleri SEM görüntüleri incelendiğinde daha düşük akış hızında daha küçük boncuklar ve daha ince fiberlerin oluştuğu, daha yüksek akış hızında ise daha büyük boncuklar ve daha büyük fiberlerin oluştuğu gözlemlenir (Zong vd., 2002).



Şekil 1.16. Farklı akış hızlarında elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü (a) 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve (b) 18 $\mu\text{L}/\text{dk}$

İğne çapı: İğne çapı ne kadar küçük olursa, fiberlerde o kadar küçük olur. Katti vd. (2004), daha küçük çaplı iğne kullanıldığında, daha küçük çaplı PLAGA nanofiberler elde edildiğini göstermiştir. Şekil 1.17. PLAGA fiber çapının, iğne çapı azaldıkça azaldığını göstermektedir (Katti vd., 2004).

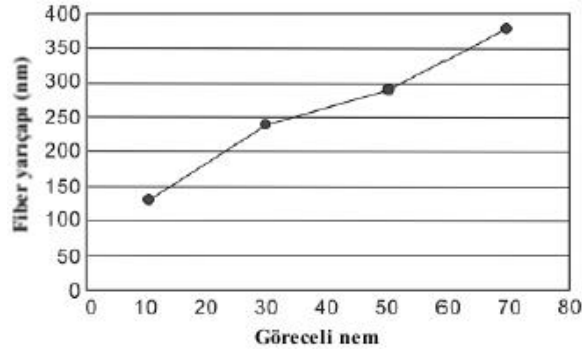


Şekil 1.17. Nanofiber yarıçapına iğne çapının etkisi

Sıcaklık: Demir vd. (2002) elektroğirme işleminin oda sıcaklığına kıyasla yüksek bir sıcaklıkta (70°C) yapıldığında poliüretan fiber çaplarının daha homojen olduğunu bildirmiştir. Fiber eğirme sıcaklığının artırılması ile daha homojen fiberlerin elde edilmesi arasındaki ilişki tam olarak anlaşılmamıştır. Ayrıca, fiber eğirme sıcaklığının artmasıyla birlikte fiberlerin elektoreğirme özelliğinin arttığı da kaydedilmiştir. Oda sıcaklığında elektroğirilebilen poliüretan polimer çözeltisi için en yüksek derişim, ağırlıkça %12,8 iken, 70°C'lik sıcaklıkta ağırlıkça %21,2'dir. Polimer çözeltisinin viskozitesinin azalması ile elektroğirme özelliği artar.

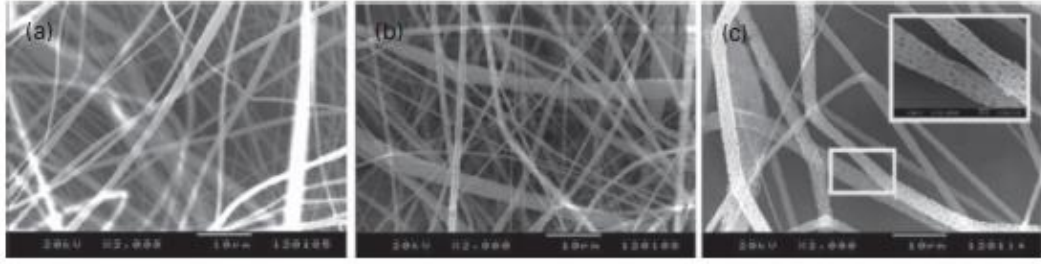
Sonuç olarak elektroğirme işleminde ortam sıcaklığı arttıkça çözücünün buharlaşma hızının artması ile viskozite azalırken çözünürlük artar. Bu durum polimer jetinin uzamasına ve jet uzadıkça daha homojen dağılımlı fiber yapılar oluşmasına neden olur.

Nem: Kim vd. (2004) ortalama polistiren fiber çapının, elektroğirme işleminin yapıldığı ortamdaki havanın bağıl nemin artmasıyla arttığını bulmuştur. Daha yüksek bağıl nem fiber yüzeyindeki elektrostatik yük yoğunluğunu arttıracığı için daha kalın fiberlerin oluşmasına neden olur. Nemin fiber çapına etkisi Şekil 1.18.'de gösterilmiştir (Kim vd., 2004).



Şekil 1.18. Fiber çapına nemin etkisi

Yüksek nem, jet içindeki çözücünün buharlaşma oranını etkiler. Böylece bir fiber toplayıcıya ulaştığında, içinde bir miktar çözücü kalır. Çözücü daha sonra buharlaşır fakat fiberin gözenekli bir yapıda olmasına neden olur. Jeun vd. (2007) nemin, elektroğirme yöntemi ile elde edilmiş poli (L-laktit-co-D, laktit) (PLDLA) fiberinin morfolojisi üzerindeki etkisi, Şekil 1.19.'da gösterilmiştir. Nem miktarı arttıkça yüzeydeki gözenek çapında, büyüklüğünde ve sayısında bir artışa neden olduğu görülmüştür (Jeun vd., 2007).



Şekil 1.19. Fiber morfolojisine nemin etkisi (a) %30 (b) %50 (c) %70

1.5. Enzimler

Hücre, yaşam sistemlerinin temel yapı taşı olan yapısal ve işlevsel yaşam birimidir. Hücreler, üstün katalitik verime ve hem substrat hem de reaksiyon spesifikliğine sahip olan ve enzimler olarak bilinen biyokatalizörleri etkin bir şekilde kullanma kabiliyetine sahiptir. Enzimler substratları için yüksek özgüllüğe ve yüksek katalitik güce sahip olmaları nedeniyle enzimler hücresel metabolizmadaki biyolojik reaksiyonlar için çok önemlidirler. Hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda meydana gelen tüm kimyasal reaksiyon, enzimatik kataliz sayesinde ölçülebilir bir oranda ilerler (Bhatia, 2018).

Biyokimya tarihinin çoğu, doğrudan veya dolaylı olarak enzimler üzerine yapılan araştırma tarihiyle ilgilidir. Biyolojik sistemlerdeki kataliz ilk olarak etin sindirimi üzerine yapılan araştırmalara dayanarak 1800'lerin başında yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. 1837'de Berzelius, diastazın nişastayı "*in vivo*" olarak sülfüruk asitten daha yüksek verimle parçaladığını göstermiştir. Bu çalışma belirli bir enzim üzerine yapılan ilk çalışma olmakla birlikte fermantasyonun katalitik niteliğini belgelemiştir. 1850'lerde Louis Pasteur, fermantasyonun canlı organizmalar

tarafından başlatılan bir işlem olduğunu, şekerin mayayla alkole fermantasyonunun, fermentler tarafından katalize edildiği bildirmiştir. 1897’de Edward Buchner’ın şekerin alkole fermantasyonunu katalize eden enzimler kümesinin çözümlü aktif formunu maya hücrelerinden izole etmesi enzim tarihindeki ana buluş olarak kabul edilmektedir. Emul Fischer, yirminci yüzyılın başlarında enzim özgüllüğü ile ilgili ilk sistematik çalışmaları yapmıştır (Franzén ve Tois, 2003). Daha sonra, 1926’da James Sumner, Jack Bean bitkisinden üreaz enzimini saf kristal formda elde etti ve üreazın protein yapısında olduğunu belirtti (Simoni vd., 2002). 1930’da John Northrop ve arkadaşları pepsini ve tripsini kristallize ettiler ve enzimlerin protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya çıkardılar (Northrop, 1930). Daha sonraki yıllarda enzimoloji hızla gelişmiştir. Çizelge 1.1.’de yapılan enzim çalışmaları kronolojik olarak verilmiştir (Bhatia, 2018).

Çizelge 1.1. Enzim çalışmalarının kronolojisi

Referans	Çalışma
Payen ve Persoz (1833)	Diazotaz ile malttan alkol çöktürülmesi
Berzelius (1835)	Kataliz kavramı
Berzelius (1837)	Biyolojik katalizin keşfi
Pasteur (1850)	Şekerin mayayla alkole fermantasyonu
Wilhelmy (1850)	Sakaroz dönüşüm oranlarının kantitatif değerlendirilmesi
Kuhne (1878)	Tripsin katalizli reaksiyonların keşfi, "enzim" kelimesinin tanıtılması
Fischer (1894-1895)	Anahtar kilit hipotezi
Bertrand (1896-1897)	Koenzim ve kofaktör
Buchner (1897)	Çözünebilen aktif enzim formunun maya hücrelerinden izolasyonu
Henri (1898)	İsimlendirme: substrat artı "az" eki
Harden ve Young (1901-1903)	Kinetik hız yasalarının türetilmesi, enzim-substrat kompleksi ilkesi
Michaelis ve Menten (1913)	Enzim katalizinin kinetik teorisinin genişletilmesi
Briggs ve Haldane (1925)	Kararlı hal yaklaşımı ile enzim hız denklemlerinin çıkarılması
Sumner (1926)	Üreazın kristalleştirilmesi
Northrop ve Kunitz (1930-1933)	Proteolitik enzimlerin kristalleştirilmesi
Cori ve Cori (1937-1939)	Kas fosforilazı
Beatle ve Tatum (1940)	Bir gen bir enzim hipotezi
Chances (1943)	Enzimlerin incelenmesi için spektroskopik tekniklerin uygulanması
Koshland (1953)	İndüklenmiş uyum hipotezi
Sutherland (1956)	Siklik AMP adenil siklaz
Umbarger vd. (1956)	Enzim aktivitesinin geri besleme inhibisyonu ile düzenlenmesi
Anfinsen (1956-1958)	Aminoasit dizisi, ribonükleazın düzenini ve aktivitesini belirler
Jacob vd. (1961)	Allosterizm
Phillips vd. (1965)	1,5°A çözünürlükte elde edilen üç boyutlu lizozim yapısı

Enzim katalizli reaksiyonlar ve hücre metabolizmasında yer alan enzimler hakkında kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Bugüne kadar, her biri farklı bir kimyasal reaksiyonu katalize eden yaklaşık 2000’den fazla farklı enzim tespit edilmiştir. Günümüzde, enzimlerin endüstriyel uygulanmalarına daha fazla odaklanılmaktadır.

Enzimlerin yüksek verimi, onları ticari olarak değerli kılar ve özgülükleri klinik tıp, eczacılık ve gıda endüstrileri başta olmak üzere pek çok alanda çeşitli avantajlar sunar. Enzimler, genellikle canlı hücreler tarafından üretilen, biyokatalizörler adı verilen kompleks protein molekülleridir. Hem katalize ettikleri reaksiyonlarda hem de substratlar olarak bilinen reaktiflerin seçiminde oldukça spesifiktirler. Bir enzim tipik olarak tek bir kimyasal reaksiyonu veya yakın ilişkili reaksiyonların bir setini katalize eder. Enzim katalizli reaksiyonlarda ürün oluşumunu etkileyen yani verimi düşüren yan ürün oluşumları gözlenmez ve bu reaksiyonlar %100 verimle gerçekleşir. Enzimler ayrıca canlı hücreler tarafından üretilen, ancak hücrelerden bağımsız olarak etki yapabilen çözünür, kolloidal ve organik katalizörler olarak da tanımlanabilir (Berg vd., 2002). Enzimler hali hazırda gıda, yem, kağıt, deri, tarım ve tekstil endüstrisindeki çeşitli alanlarda kullanılmaktadır ve bu da üretimde büyük maliyet düşüşlerine imkan sağlamaktadır. Aynı zamanda bilimsel çalışmaların hızla ilerlemesi enerji, hammadde, sağlık ve çevre ile ilgili sorunların çözümü için kimya ve farmakolojik endüstrilerini enzim teknolojisi kullanımı konusunda teşvik etmektedir.

Enzimlerin en yaygın avantajlarından bir diğeri ise hücrelerden çıkarılmasından veya ayrılmasından sonra bile sürekli olarak çalışabilmeleridir. Bu, enzimlerin *in vivo* ortamlardan ayrılmasından sonra bile, *in vitro* koşullar altında verimli bir şekilde çalışmaya devam ettikleri anlamına gelir. Bu biyokatalizörlerin, izolasyonlarından sonra bile aktif bir durumda kaldıkları sonucuna varabiliriz. Prensipte olarak, enzimler toksik değildir, biyolojik olarak parçalanabilir ve endüstriyel uygulamalar için bol miktarda mikroorganizmalar tarafından üretilir. Rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği daha verimli ve faydalı enzimler üretmek için sıklıkla kullanılır. Endüstriyel üretim ve enzimlerin kullanımı endüstrinin önemli bir parçasıdır. Kimya, proses mühendisliği, mikrobiyoloji ve biyokimya gibi alanlar arasındaki disiplinler arası iş birliği, mümkün olan en iyi enzim teknolojisini geliştirmek ve nihayetinde daha fazla ürün elde etmek ve enzimin *in vitro* ortamlarda fizikokimyasal özelliklerini korumak için gereklidir (Bhatia, 2018).

Katalitik etki için, küçük miktarlarda bir enzim yeterlidir; bu miktardaki enzim, substratlara kıyasla çok daha küçüktür. Enzim kütlesi başına dönüştürülen toplam substrat derişimi genellikle çok büyüktür. İstisnasız bütün enzimler protein yapısındadır ve bir proteinin tüm özelliklerini sergiler. Enzimlerin aşırı sıcaklık, aşırı pH veya diğere denatüre edici ajanlarla muamele edilmesi, tamamen katalitik aktivite

kaybıyla sonuçlanır. Enzim proteinlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve kuaterner yapıları gibi yapısal konfigürasyonlar, katalitik etkinlikleri için esastır. Katalitik aktivitenin derecesi temel olarak enzimin yapısının bir protein olarak bütünlüğüne bağlıdır. Yapılan çalışmalara göre, enzimler yaklaşık 12.000 ila 1 milyon Da arasında değişen molekül ağırlıklarına sahiptir. Bazı enzimler sadece polipeptitlerden oluşur ve amino asit kalıntıları dışında kimyasal gruplar içermezler. Çok sayıda enzim, bir koenzim olarak bilinen spesifik, ısıya dayanıklı, düşük moleküler ağırlıklı bir organik molekül gerektirir. Ayrıca, bir dizi enzim, aktivite için hem koenzim hem de bir veya daha fazla metal iyon gerektirir. Biyokimyasal olarak tam bir aktif bileşik, katalitik olarak aktif bir enzimin (protein kısmı olarak da adlandırılır) bir koenzim veya bir metal iyonu ile birleştirilmesiyle oluşturulur, buna holoenzim denir. Bir holoenzimin protein kısmına apoenzim denir. Bu düzenlemede, bir koenzim kovalent veya kovalent olmayan bir şekilde apoenzime bağlanabilir. Bazı enzimlerde koenzim veya metal iyonu yalnızca gevşek ve geçici olarak proteine bağlanır. Bununla birlikte sıkı ve kalıcı bir şekilde bağlandığında prostetik grup olarak adlandırılır. Bir prostetik grup, kovalent olarak bağlı bir koenzimi belirtir. Koenzimler ve metal iyonları ısıtma altında kararlıdır, bir enzimin protein kısmı ise (apoenzim) ısı ile denatüre olabilmektedir (Voet ve Voet, 2011; Nelson ve Cox, 2012).

$$\text{Holoenzim} = \text{Apoenzim} + \text{Prostetik grup}$$

$$(\text{Toplam enzim}) (\text{Protein}) (\text{Protein olmayan})$$

Protetik gruplar, işlevsel olarak koenzimler ve kofaktörler olarak iki ana sınıfa ayrılabilir. Koenzimlerin vitaminlerle biyosentetik olarak ilgili olduğu düşünülebilir. Örneğin; koenzim nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) hücrel enerji metabolizması için hayati önem taşır ve vitamin B₃'ün kimyasal yapısını tamamlar. Ayrıca bir koenzim, enzim reaksiyonu boyunca kimyasal dönüşümü yaşayan, belki de farklı bir hücrel bölgeden ayrı bir enzim gerektiren bir kosubstrat olarak düşünülebilir. Koenzimler böylece hücrel olarak apoenzimler arasında ilerleyebilir ve kimyasal gruplar transfer edilerek çeşitli metabolik süreçler birleştirebilir (Percudani ve Peracchi, 2003). Çizelge 1.2. yaygın koenzimlerin ve fonksiyonlarının bir listesini göstermektedir (Bhatia, 2018).

Çizelge 1.2. Spesifik atomların veya fonksiyonel grupların transferinde kullanılan çeşitli koenzimler

Koenzim	Transfer edilen grup
Tiamin pirofosfat	Aldehitler
Tetrahidrofolat	Diğer bir karbon grubu
Piridoksal fosfat	Amino grupları
Nikotinamid adenin dinükleotid	Hidrojen atomları (elektronlar)
Flavin adenin dinükleotid	Hidrojen atomları (elektronlar)
Koenzim A	Açıl grupları
Biyositin	CO ₂
Koenzim B12	H atomları ve alkil grupları

Karboksipeptidaz gibi diğer enzimler kofaktörler olarak metal iyonları gerektirir, iki değerli katyonlar Mg⁺², Zn⁺² ve Mn⁺² en yaygın olanlarıdır; bunlara genellikle enzim aktivatörleri denir (Fischer vd., 2010). Çizelge 1.3.'te çeşitli enzimler ve bunların kofaktörleri listelenmiştir (Bhatia, 2018).

Çizelge 1.3. Bazı enzimler ve kofaktörleri

Enzim	Kofaktör
Piruvat kinaz	K ⁺ ve Mg ⁺
Üreaz	Ni ⁺²
Peroksidaz	Fe ⁺² veya Fe ⁺³
Karbonik anhidraz	Zn ⁺²
Arginaz	Mn ⁺²
Alkol dehidrojenaz	Zn ⁺²
Katalaz	Fe ⁺² veya Fe ⁺³

Bir katalizörün rolü, kimyasal bir reaksiyonun hızını arttırmaktır. Bir kimyasal reaksiyonun hızı, kimyasal reaksiyonun hızının daha da artmasına neden olabilecek bir çözünür katalizör tarafından yönetildiğinde, buna homojen kataliz denir. Bu durumda, kataliz bir çözelti halinde gerçekleşir. Katalizör, reaktanlardan ayrı bir fazda olduğunda veya bir çözünmeyen yüzeyde veya immobilize edilmiş bir matris üzerinde kataliz meydana geldiğinde, heterojen kataliz olarak bilinir. Enzimler ayrıca biyolojik katalizörler olarak da adlandırılır. Bu biyolojik katalizörler genel olarak homojen katalizörlerin özelliklerine sahiptir, ancak membranlarda mevcut olan birkaç enzim çözünmez ve bu nedenle heterojen katalizörler olarak adlandırılır. Enzim özgülüğü, yalnızca bir veya birkaç molekülü tanımlamak ve bağlamak için protein katalizörlerinin mutlak özgülüğüdür. Enzim aktif bölgesinde, substrat ile bağlanacak şekilde tanımlanmış bir atom dizisi taşır. Enzimdeki bu aktif bölge, substratlarla doğru şekilde eşleşen bir şekle sahip olmalıdır. Böylece, aktif bölge bir enzim, aktif bölgelerindeki kimyasal reaktiflerle (substratlar) zayıf bağ etkileşimleri vasıtasıyla

bağlandığında spesifikklik elde edilir. Kimyasal bir tepkimeye girmek için, bu aktif bölge, kimyasal tepkenler ile geçici bir bağ oluşturan belirli kalıntıları, bağlayıcı bölge olarak adlandırılan bazı katalizörleri taşıırken, katalitik bölge, katalizden sorumlu olan kalıntıları taşır. Bir enzim, her zaman kovalent bağların oluşumunu ve parçalanmasını içeren tek tip bir kimyasal reaksiyonu katalize eder. Belirli bir reaksiyona spesifikk olduklarından, enzimlerin bu özelliğine mutlak reaksiyon spesifikkliğı olarak da bilinen reaksiyon spesifikkliğı denir, yani yan ürünler oluşmaz (Tekman ve Ömer, 1981; Altan, 2000; Keha ve Kührevioğlu, 2012).

Enzimlerin aktivitelerini belirtmek için IU (International Unit) ifadesi kullanılmaktadır. Bir ünite enzim (EU); optimum koşullarda, 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren veya 1 µmol ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır (Denklem 1.1.). Aynı zamanda enzim aktivitesinin ölçülmesinde spesifikk aktivite de kullanılmaktadır. Spesifikk aktivite 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır ve birimi U/mg ile ifade edilir (Denklem 1.2.) (Cernia vd., 2002).

$$\text{Enzim Ünitesi (EU)} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{L.dk}} \quad (1.1.)$$

$$\text{Spesifikk Aktivite} \left(\frac{U}{\text{mg}} \right) = \frac{EU}{\text{mg protein}} \quad (1.2.)$$

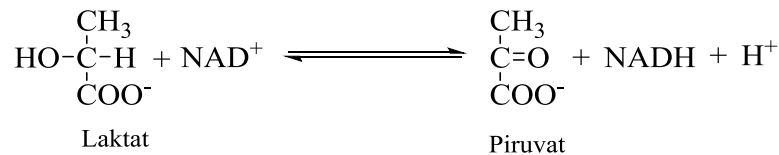
1.5.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler genellikle katalizledikleri reaksiyonda kullanılan substratın adına -az son eki getirilerek adlandırılır. Örneğin, üreyi CO₂ ve NH₃'a parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz denilmiştir. Enzimler ayrıca, farklı substratlardan hidrojen ve karboksil uzaklaştırılmasını katalize eden reaksiyon tipine göre sırasıyla dehidrojenazlar ve dekarboksilazlar olarak da adlandırılırlar. Kullanılan bu adlandırma en azından substratları hakkında bilgi verirlerken, biyokimyacılar tarafından substrat hakkında hiçbir bilgi ifade etmeyen bazı enzim adları da kullanılmaktadır. Örneğin, katalaz, tripsin, kimotripsin ve pepsin gibi. İsimlerin farklı kriterlere göre kullanılması sonucu ortaya çıkan karışıklık Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'ni (IUBMB) bir sınıflandırma sistemi önermeye yöneltmiştir. Bu sınıflandırmada, katalizlenen reaksiyon tipine göre altı ana enzim sınıfı göz önünde bulundurulmuştur. Her sınıf alt sınıflara ve alt alt sınıflara ayrılır. Enzimi tanımlamak için kullanılan sayısal kod dört bileşenden oluşur: ilk sayı ana

enzim sınıfına karşılık gelir, ikincisi alt sınıfı belirtir, üçüncü sayı alt alt sınıfı gösterir (bu sayılar, reaksiyona katılan atom gruplarının doğası dikkate alınarak verilir) ve dördüncüsü, alt alt sınıftaki enzimin sıra numarasını temsil eder. Bir enzimi doğru bir şekilde tanımlamak için kod numarasının belirtilmesi gerekir. IUBMB enzimleri katalizleme özelliklerine göre 6 ana gruba ayırmıştır (Blanco ve Blanco, 2017).

1. Oksidoredüktazlar: Bu enzimler redoks reaksiyonlarını katalize eder. Koenzimlerle ilişkilidir ve dehidrojenazları, oksidazları, peroksidazları ve oksijenazları içerir.

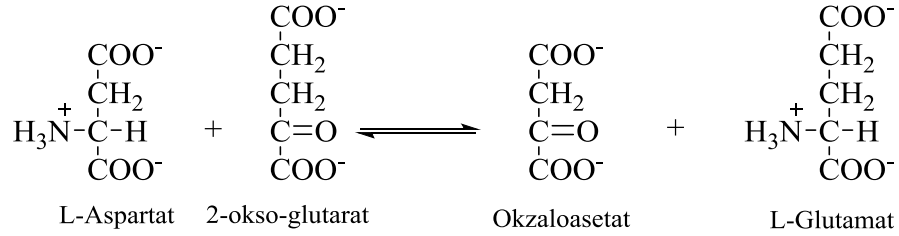
Dehidrojenazlar substratlar olarak hidrojen donörleri ve akseptör olarak bir koenzim kullanır. Değiştirdikleri substratın adı ve ardından dehidrojenaz kelimesi ile belirtilirler. Ters reaksiyon göz önüne alındığında bunlara redüktaz denir. Oksidazlar, hidrojen akseptörlerinin moleküler oksijen (O₂) olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir; oksijen atomları okside olmuş üründe görünmez. Peroksidazlar, bir substratı oksitlemek için H₂O₂ kullanan enzimlerdir, H₂O₂'i H₂O'ya dönüştürürler. Oksijenazlar, substrata oksijen katarlar. Dioksijenazlar ve monooksijenazlar olarak ayırt edilebilirler. Dioksijenazlar, her iki O₂ atomunun da substrata yerleştirildiği reaksiyonları katalize eder. Monooksijenazlar substratta sadece bir O₂ içerir, diğer O₂ ise H₂O oluşturur. Hidrojen atomu sağlayan bir kosubstrat gerektirirler. Genellikle substratta bir hidroksil grubu oluşturulur ve bu onlara alternatif hidroksilaz adı verilir. Bu gruptaki diğer enzimler, iki substratı aynı anda oksitleyen karma fonksiyon oksidazlarıdır. Bir oksidoredüktaz örneği, laktat dehidrojenazdır. Sistematik ismi L-laktat: NAD oksidoredüktaz; geleneksel adı laktat dehidrojenaz ve kod numarası 1.1.1.27'dir. Bu enzim, laktatın piruvata oksidasyonunun yanı sıra ters reaksiyonunu da (piruvatın laktata indirgenmesi) katalize eder. Enzim, koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) kullanır. Katalizlenen reaksiyon Şekil 1.20.'de gösterilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.20. Laktat dehidrojenazın katalizlediği reaksiyon

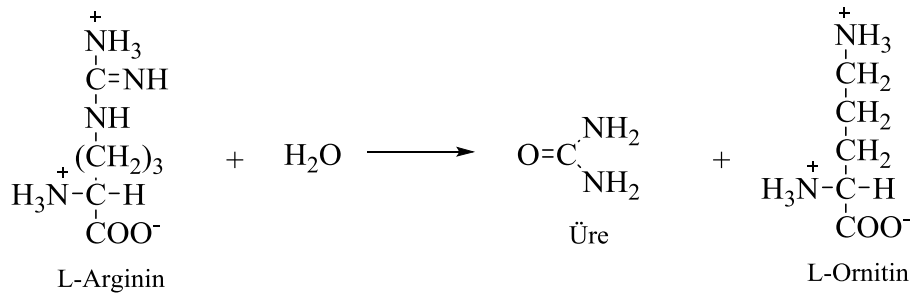
2. Transferazlar: Bir amin, karboksil, karbonil, metil, açil, glikozil ve fosforil gibi bir atom grubunun bir donör substrattan bir akseptör bileşiğe transferini katalize eden

enzimlerdir. Örnek olarak L-aspartat: 2-okso-glutarat aminotransferaz veya aspartat aminotransferaz verilebilir (kod numarası, 2.6.1.1). Bu enzim, Şekil 1.21.'de görüldüğü gibi bir amin grubunun bir bileşikten diğerine transferini katalize eden bir aminotransferaz veya transaminazdır (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.21. Aspartat aminotransferazın katalizlediği reaksiyon

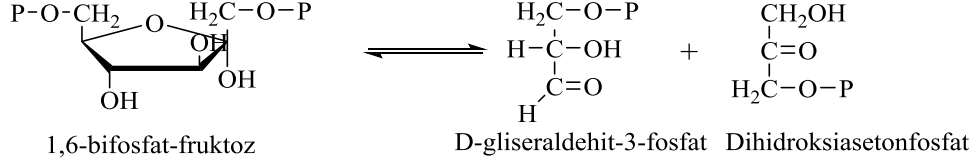
3. Hidrolazlar: Su ilavesiyle C-O, C-N, C-S ve O-P bağlarının ayrılmasını katalize eden enzimlerdir. Örneğin, asetilkolinesteraz ve ribonükleaz bu gruba aittir; asetilkolin, asetat ve kolin arasındaki ester bağını ve ribonükleaz ise, ribonükleik asit (RNA) içindeki nükleotitler arasındaki bağları hidrolize ederler. Şekil 1.22.'de üre oluşturmak için arginin hidrolizini katalize eden arginaz veya L-arginin amidino hidrolazın katalizlediği reaksiyon verilmiştir (kod numarası, 3.5.3.1) (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.22. Arginazın katalizlediği reaksiyon

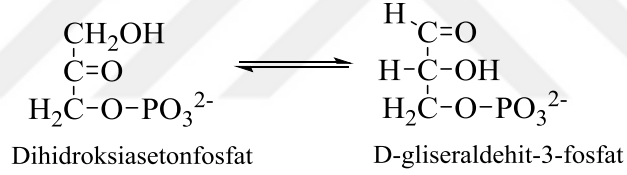
4. Liyazlar: Bir substrattaki C-C, C-S ve C-N bağlarının (peptid bağları hariç) hidrolizden farklı bir işlemle bölünmesini katalize eder. Bazıları substrattaki grupları çıkarır ve çift bağ oluşturur, diğerleri çift bağlara grupları bağlayarak çift bağı ortadan kaldırır. Örnek olarak dekarboksilazlar, dehidratazlar, aldolazlar verilebilir, bunlar sırasıyla CO₂, su veya aldehit gruplarını çıkarırlar. Ters reaksiyon (bir grubun eklenmesi) yapıldığında, bu enzimlerin sentez fonksiyonunu vurgulamak için sentaz adı verilir. Sentazlar enerji tedarikçileri olarak nükleosit trifosfat (ATP, GTP vb.) gerektirmez. Şekil 1.23.'de aldolazın fruktoz-1,6-bisfosfatı iki trioz fosfatına

parçalayan reaksiyon gösterilmiştir. Aldolazın sistematik adı fruktoz-1,6-bisfosfat: D-gliseraldehit-3-fosfat liyaz; geleneksel adı fruktoz-bifosfat aldolaz; ve kod numarası 4.1.2.13'tür (Blanco ve Blanco, 2017).



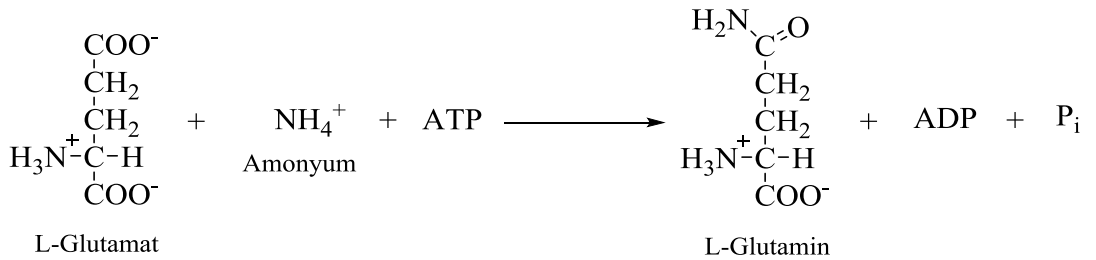
Şekil 1.23. Aldolazın katalizlediği reaksiyon

5. İzomerazlar: Geometrik, optik ve yapısal izomerlerin birbirlerine dönüştüğü reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Bazılarının epimeraz, rasemaz, cis-trans izomerazlar, sikloizomeraz ve tautomeraz gibi geleneksel isimleri vardır. Bu enzim grubu içinde, glukoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümünü katalize eden fosfoglukoizomeraz vardır. Şekil 1.24.'de kod numarası, 5.3.1.1 olan triozfosfat izomeraz veya D-gliseraldehit-3-fosfat ketol izomerazın katalizlediği reaksiyon gösterilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.24. Triozfosfat izomerazın katalizlediği reaksiyon

6. Ligazlar: Bir nükleosit trifosfatın yüksek enerjili bir bağının hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanarak iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler. Oluşan reaksiyonlar C-C, C-S, C-O veya C-N bağları oluşturur. Şekil 1.25.'de glutamin oluşturmak için glutamin sentetazın katalizlediği reaksiyon gösterilmiştir. Sentez için gereken enerji ATP'nin hidrolizi ile sağlanır (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.25. Glutamin sentetazın katalizlediği reaksiyon

1.5.2. Enzimlerin yapısı

Enzimler her zaman katalizör görevi görür ve kimyasal reaksiyonların hızını önemli ölçüde arttırmak için substratlarına kıyasla küçük miktarlarda olması yeterlidir ve reaksiyon sonucunda herhangi bir değişikliğe uğramazlar. Tüm gerçek katalizörlerin aksine, bir enzim, termodinamik olarak belirlenen bir reaksiyonun nihai denge pozisyonunu değiştirmez, bu nedenle sadece uygulanabilir bir reaksiyonun denge tamamlanma oranı arttırılır. Katalitik özelliklere ek olarak, enzimler proteinlerin çözünürlükleri, elektroforetik özellikleri, elektrolitik davranışları ve kimyasal reaktiviteleri gibi fizikokimyasal davranışlarını gösterirler (Agarwal, 2006; Lee, 2006). Enzimlerin birincil yapısal konfigürasyonu ve katalitik etkisi, bir protein molekülünü oluşturan peptid bağları ile bağlanan doğrusal amino asit kalıntılarının zinciriyle belirlenir. Birincil yapının lokalize katlanmasına ikincil yapı denir, molekülün tam katlanmasına ise üçüncül yapı denir. Bu yapısal konfigürasyonların aksine, dördüncül yapı, birkaç katlanmış zincirin topaklaşmasıdır. Organik iyonlarda, çok yüksek sıcaklıklarda veya aşırı pH değerlerinde etkin olan hidrojen iyonları, ağır metaller veya metal oksitler gibi geleneksel kimyasal katalizörlerin aksine, enzimler çok hafif koşullar altında en verimli şekilde çalışırlar.

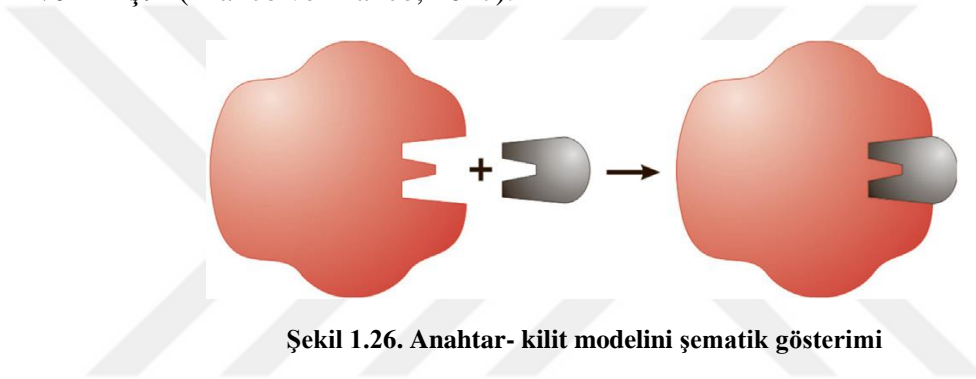
1.5.3. Enzimlerin etki mekanizması

Enzimlerin etki mekanizması, enzimin substrata bağlandığı ve son olarak bir enzim substrat kompleksi oluşturduğu kimyasal bir reaksiyona dayanır. Bu reaksiyon, aktif veya katalitik bölge olarak adlandırılan enzimin nispeten küçük bir alanında gerçekleşir. Başka bir deyişle, enzim etki mekanizması, biyolojik katalizörlerin tepkime özelliklerini açıklayan enzim substrat etkileşiminin doğasına dayanmaktadır. Bir enzimin aktif veya katalitik bölgesi, peptid zincirinde birbirinden biraz uzakta bulunan çeşitli amino asitlerden oluşur. Bu amino asitler, enzimlerin ikincil ve üçüncül yapısından kaynaklanan katlanma ile bir araya getirilir. Katalitik bölgedeki amino asit kalıntılarının yan zincirleri, substratın spesifik gruplarıyla bağlanması için gruplar sağlar. Kofaktörler katalize yardımcı olur. Substrat, aktif bölgenin substrat bağlama alanındaki amino asit kalıntıları ile bağlar oluşturur. Bağlanma, aktif bölgede bir konformasyonel reaksiyona neden olur. Reaksiyon sırasında, enzim bir geçiş hali kompleksi oluşturur. Reaksiyonun ürünleri ayrıldıkça, enzim orijinal durumuna geri

döner. Enzim etki mekanizması için önerilen iki farklı model aşağıda verilmiştir (Voget vd., 2006; Nelson ve Cox, 2012).

1.5.3.1. Anahtar kilit modeli

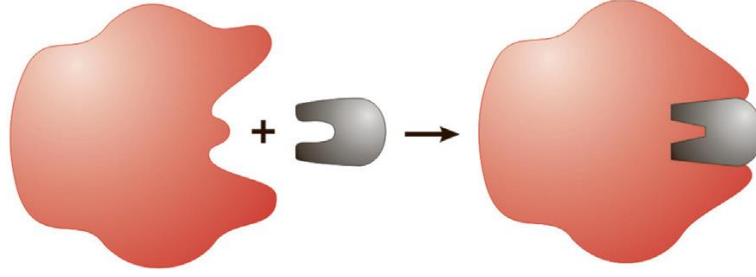
1894 yılında Emil Fischer tarafından önerilen, katalitik bölgenin esnek olmadığı bir modeldir. Model, substrat ve enzim arasındaki etkileşimi anahtar ve kilit analojisi açısından açıklar. Bu modelde, katalitik bölgenin önceden şekillendirildiği varsayılmaktadır. Bu modelin dezavantajı, katalitik bölgenin sertliğidir. Model, allosterik modülatörlerin varlığında enzim yapısındaki değişiklikleri açıklayamaz (Lemieux ve Spohr, 1994). Anahtar kilit modelinin şematik gösterimi Şekil 1.26.'da verilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.26. Anahtar- kilit modelini şematik gösterimi

1.5.3.2. İndüklenmiş uyum modeli

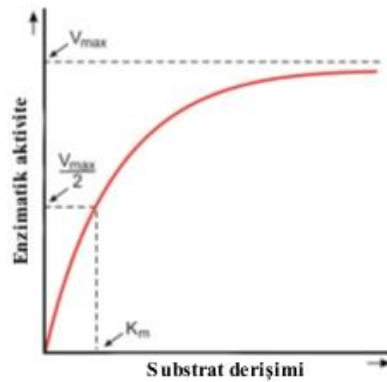
Anahtar kilit modeline zıt olarak, bu model katalitik bölge için esnek bir model önerir. Esnek olmayan katalitik bölge nedeniyle anahtar kilit modelinin sorunlarını aşmak için Koshland, 1963'te indüklenmiş uyum modeli önerdi. Bu modelin en önemli özelliği aktif bölgenin esnekliğidir ve substrat enzimin aktif bölgesinde bir konformasyonel değişime neden olur, böylece substrat aktif bölgeye kimyasal reaksiyonu teşvik etmek için en uygun şekilde uyar (Koshland, 1995; Boehr vd., 2009; Csermely vd., 2010;). İndüklenmiş uyum modelinin şematik gösterimi Şekil 1.27.'de verilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.27. İndüklenmiş uyum modelinin şematik gösterimi

1.5.4. Enzim kinetiği

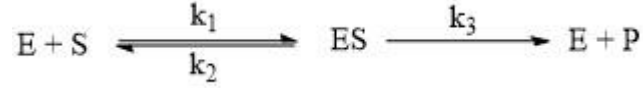
Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonların hızlarının incelenmesidir. Enzim katalizli reaksiyonların tepkime hızını belirleyen en önemli parametre ise substrat derişimidir $[S]$. Şekil 1.28.'de enzim katalizli bir reaksiyonun hızının $[S]$ ile değişimi gösterilmektedir (Blanco ve Blanco, 2017). Substrat derişimi arttıkça, aktivitedeki artış giderek azalır ve doyunluğa yaklaşır. Düşük substrat derişiminde, reaksiyon hızı substrat derişimi ile orantılı olarak artar yani reaksiyon substrata göre birinci derecedendir. Substrat derişimi arttırıldığında reaksiyon hızının artışında azalma gözlenir yani reaksiyon derecesi sıfırncı ile birinci dereceler arasındadır. Çok yüksek substrat derişiminde ise hız sabitleşir ve substrat derişimi ile değişmez. Bu esnada reaksiyon sıfırncı derecedendir ve enzim moleküllerinin tümü substrat ile birleşmiştir yani doymuş haldedir. Tüm enzimler bu doyunluk özelliğini gösterir fakat her bir enzimin doyunluğa ulaşması için gerekli olan substrat derişimi farklıdır (Nelson ve Cox, 2012).



Şekil 1.28. Enzim katalizli bir reaksiyonun hızına substrat derişiminin etkisi

1913 yılında Leonar Michaelis ve Maud Menten enzimlerin doyunluk özelliğinden ve substratları ile oluşturdukları kompleksten (ES) yola çıkarak, enzimatik bir reaksiyon için başlangıç hızını (V_0) substrat derişiminin bir fonksiyonu kabul ederek

çizilen hiperbolik eğrinin matematiksel olarak ifade edilmesi ile Şekil 1.28.'deki eğriyi verecek bir model geliştirdiler. Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu şu şekilde göstermiştir:



Bu reaksiyona göre; E enzimi S substratı ile reaksiyona girerek k_1 hız sabiti ile ES enzim substrat kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan ES kompleksi ise k_2 hız sabiti ile ya E ve S'ye ayrışacak ya da k_3 hız sabiti ile ürüne (P) dönüştürülecektir. Bu modelde ürünün tekrar ES kompleksine dönüşmediği varsayılmaktadır.

ES kompleksinin oluşum hızı denklem 1.3.'de verilmiştir.

$$ES_{\text{oluşum hızı}} = k_1[E][S] \quad (1.3.)$$

ES kompleksinin yıkılım hızı denklem 1.4.'te verilmiştir.

$$ES_{\text{yıkılım hızı}} = (k_2 + k_3)[ES] \quad (1.4.)$$

Denge anında ES kompleksinin oluşum ve yıkılım hızları birbirine eşittir ve bu eşitlik denklem 1.5.'de verilmiştir.

$$ES_{\text{oluşum hızı}} = ES_{\text{yıkılım hızı}} \quad (1.5.)$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (1.6.)$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{(k_2+k_3)} \quad (1.7.)$$

$$K_m = \frac{k_2+k_3}{k_1} \quad (1.8.)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (1.9.)$$

Ortamda bulunan toplam enzim derişimi $[E]_T$, serbest enzim ($[E]$) ve enzim substrat kompleksinin derişimlerinin ($[ES]$) toplamına eşittir. Yani;

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (1.10.)$$

Bu eşitlik denklem 1.9.'da yerine koyulursa;

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{K_m} \quad (1.11.)$$

Bu denklem $[ES]$ için çözümlerse;

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{[S] + K_m} \quad (1.12.)$$

Elde edilen bu eşitlik ürünler açısından yazılabilen hız eşitliğinde yerine koyulursa;

$$V = k_2[ES] \quad (1.13.)$$

$$V = \frac{k_2[E]_T[S]}{[S] + K_m} \quad (1.14.)$$

Enzimin tamamı substrata bağlanırsa, reaksiyon hızı maksimuma ulaşır. Bu durumda $[E]_T = [ES]$ olacağından tepkimenin maksimum hızı;

$$V_{\max} = k_2[E]_T \quad (1.15.)$$

Bu eşitlik tepkime hız denkleminde yerine yazılırsa;

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.16.)$$

şeklinde ifade edilen Michaelis-Menten eşitliği elde edilir.

Bu eşitlikteki K_m Michaelis-Menten sabitidir ve maksimum hızın yarısına erişildiği substrat derişimi olarak ifade edilebilir. Birimi mol/L'dir. Enzimlerin K_m değerleri birbirinden farklıdır. Çoğu enzim için bu değer 10^{-1} - 10^{-6} M arasındadır. K_m değeri enzim derişimine bağlı olmayıp substrat yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde her bir substrat için farklı K_m değeri vardır.

K_m sabitinin iki anlamı vardır. İlki K_m enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat derişimidir. İkincisi K_m değerinin katalizleme basamaklarının hız sabitleriyle ilişkisi vardır. Denklem 1.6.'da yer alan ifade göz önüne alındığında k_2 'nin k_3 'ten çok büyük olduğu durumda ES'nin E ve S vermek üzere ayrışması ürünün oluşmasından daha hızlı olacaktır. Bu durumda;

$$K_m = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.17.)$$

olur ve ES'nin ayrışma sabiti;

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.18.)$$

şeklinde ifade edilir. $k_2 \gg k_3$ olduğunda K_m ES'nin ayrışma sabitine eşit olur. Bu durumda K_m , ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_m zayıf bağlanmayı,

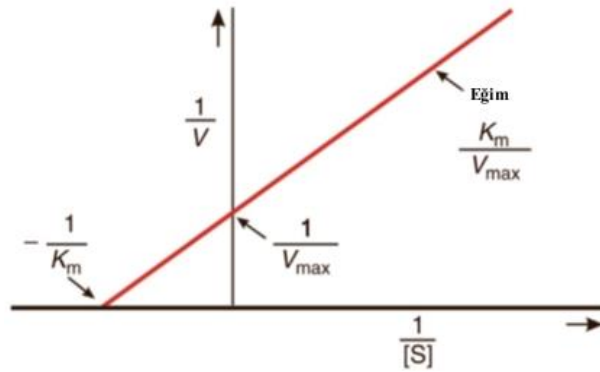
düşük K_m ise kuvvetli bağlanmayı ifade eder. Özetle $k_2 \gg k_3$ olduğunda K_m enzimin substrata olan ilgisinin derecesini gösterir.

Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır ve substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişir. $V_{max} = k_3[E]_T$ ifadesinde maksimum hıza belirli derişimlerdeki enzimin substratı ile doyunluk durumunda erişildiği için V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin ifadesidir. Doyunluğun çok üzerindeki substrat derişimlerinde hız, enzimin miktarıyla orantılıdır. Yani enzim miktarı iki katına çıkarıldığında hız da iki katına çıkar.

Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak ekstrapolasyon ile V_{max} ve K_m değerleri tam olarak elde edilemez. Aynı zamanda her bir enzimin doyun olduğu substrat derişimi hazırlanamayabilir. Bu nedenle Michaelis-Menten denklemi ters çevrilip düzenlenirse bir doğru denklemi olan Lineweaver-Burk denklemi elde edilir:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.19.)$$

$1/[S]$ 'ye karşılık $1/V$ grafiği çizildiğinde y eksenini $1/V_{max}$ 'tan, x eksenini ise $-1/K_m$ 'den keser. Bu şekilde V_{max} ve K_m değerleri rahatlıkla bulunabilir (Keha ve Kühverioğlu, 2012; Nelson ve Cox, 2012). Şekil 1.29.'da Lineweaver-Burk grafiği verilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.29. Lineweaver-Burk grafiği

1.5.5. Enzim inhibisyonu

İnhibitor, enzim katalizli reaksiyonların hızlarını yavaşlatan veya reaksiyonları tamamen durduran bileşikler veya iyonlardır. Dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere

iki tane enzim inhibisyonu çeşidi vardır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzim ile zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur ya da kovalent olarak bağlanır. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalırken, K_m 'de herhangi bir değişim söz konusu değildir (Altan, 2000).

Dönüşümlü inhibisyonda ise inhibitör ile enzimin etkileşimi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve karışık tip inhibisyon olmak üzere dört farklı çeşit dönüşümlü inhibisyon çeşidi vardır.

Yarışmalı inhibisyon, substrat ile inhibitörün enzime bağlanmak için bir yarış içinde olduğu inhibisyon çeşididir. İnhibitör, substrat ile benzer yapıya sahiptir ve substratın enzim üzerinde bağlanabildiği bölgelere bağlanır. İnhibitör ile substrat enzime bağlanmak için yarış halinde oldukları için aynı anda enzime bağlanamazlar. Yarışmalı inhibisyonda V_{max} değişmezken, V_{max} 'a ulaşmak için substrat derişiminin artırılması K_m 'nin artmasını sağlar. Ortamdaki substrat derişimi arttırılırsa inhibisyon engellenebilir (Price, 1979).

Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzime aynı anda bağlanabilir, ancak inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmaz. İnhibitörün bağlanması ile oluşan hem EI hem de EIS kompleksleri enzimatik yönden aktif değildirler. Substrat derişimi arttırılırsa bile inhibitör enzime ayrılmaz ve V_{max} azalırken, K_m değeri değişmeden kalır (Gürdöl ve Ademoğlu, 2010).

Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör direk olarak enzime bağlanmazken enzimin substrat ile oluşturduğu ES kompleksine bağlanır. İnhibitörün bağlanması ile oluşan ESI kompleksi enzimatik yönden aktif değildir. Bu inhibisyon çeşidine çok fazla rastlanmaz fakat multimerik enzimlerde görülebilir. ESI kompleksi reaksiyon ortamında devamlı olarak bulunduğu için V_{max} 'ın düşmesine neden olur. ES kompleksinin azalması da K_m 'nin düşmesine yol açar (Onat vd., 2006; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

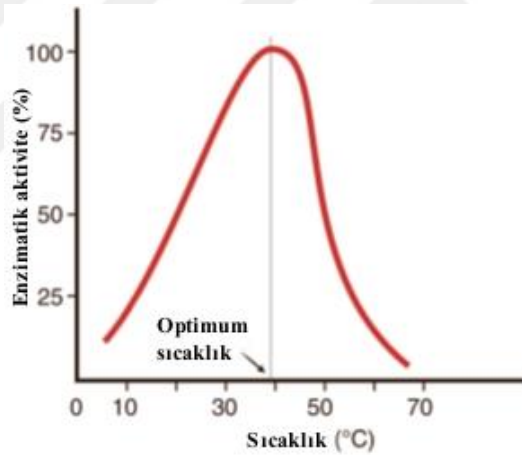
Karışık inhibisyon ise yarışmasız inhibisyona benzer, fakat EIS kompleksi az da olsa enzimatik yönden aktiftir. Karışık inhibisyon Michaelis-Menten eşitliğine uymaz.

1.5.6. Enzimlerin reaksiyon hızını etkileyen faktörler

Enzim katalizli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörleri; sıcaklık, pH, enzim derişimi, substrat derişimi, reaksiyon süresi, ortamda bulunan aktivatör ve inhibitörler olarak sıralayabiliriz.

1.5.6.1. Sıcaklığın etkisi

Enzimatik reaksiyonlarda sıcaklığın artması ile birlikte belirli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızı da artmaktadır. Enzimler protein yapılı oldukları için belirli bir sıcaklıktan sonra yapıları bozulmaya başlar ve belirli bir sıcaklıktan sonra tamamen denatüre olarak aktivitelerini kaybederler. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerine optimum sıcaklık denir (Holme ve Peck, 2005). Genel olarak optimum sıcaklık grafiğı Şekil 1.30.'da gösterildiğı gibidir (Blanco ve Blanco, 2017).

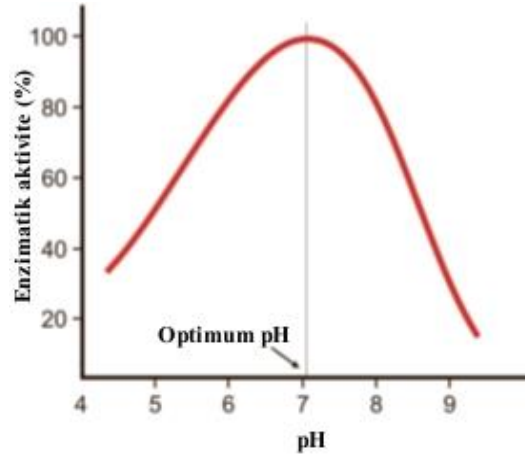


Şekil 1.30. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi

1.5.6.2. pH'ın etkisi

Enzimlerin aktiviteleri buldukları ortamın pH'sından etkilenmektedir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH değerine optimum pH denir. Optimum pH değerinden uzaklaştıkça enzim aktivitesi düşer ve çok uç pH'larda ise enzim aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Ortam pH'sı değıştikçe enzimlerin yapılarında bulunan aminoasit zincirlerinin iyonik özellikleri ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların değışmesi ile enzim substrat etkileşimi değıştiğı için aktivite azalır. Bu nedenle enzim çalışmalarında ortamın pH'sını optimum pH değerinde tutabilmek için

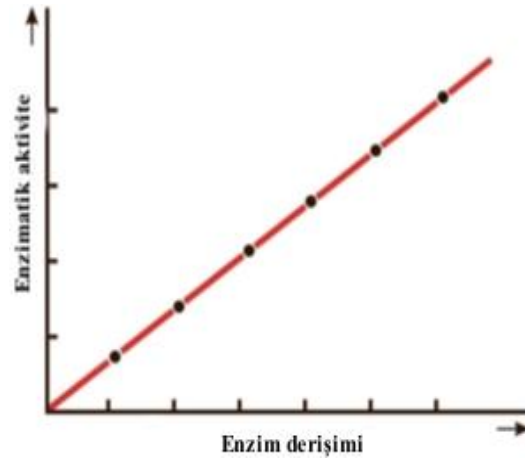
tampon çözeltiler kullanılır (Murray vd., 2003). Şekil 1.31.'de pH'nın reaksiyon hızına etkisi grafiği verilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.31. pH'nın reaksiyon hızına etkisi

1.5.6.3. Enzim derişimi

Enzimatik reaksiyonlarda ortamda yeteri kadar substrat bulunması durumunda enzim derişimi ile reaksiyon hızı doğru orantılı olarak artar (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Şekil 1.32.'de enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi grafiği gösterilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).

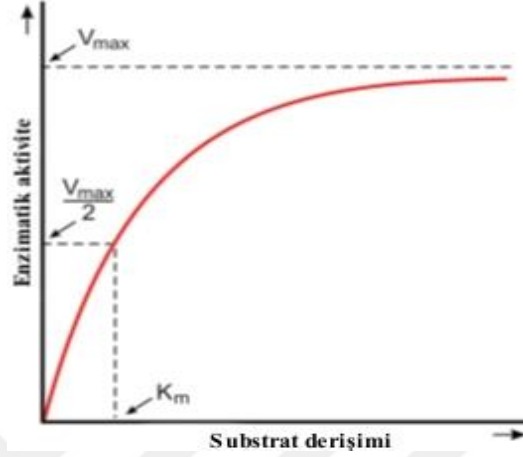


Şekil 1.32. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi

1.5.6.4. Substrat derişimi

Enzim derişimi ve diğer bütün şartların sabit tutulduğu bir ortamda substrat derişimi arttıkça reaksiyon hızı öncelikle doğrusal bir artış gösterir. Reaksiyon ortamına substrat ilave edildikçe hız giderek daha yavaş artar ve belirli bir süre sonra sabit kalır.

Bu değerden (V_{max}) sonra substrat derişimi ne kadar artarsa artsın oramda bulunan enzim miktarı sabit olduğu için enzim üzerinde substratın bağlanacağı yer kalmadığından dolayı enzimatik tepkimenin hızı değişmez (Champe vd., 2011). Şekil 1.33.'de substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi grafiği verilmiştir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 1.33. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

1.5.6.5. Reaksiyon süresinin etkisi

Enzimatik reaksiyonlar da zamanla ürünün fazla oluşması sonucu dengenin sola kayması ve üründen tekrar substrat oluşması, enzimin inaktive olması ve substratın tükenmesi gibi nedenlerden dolayı, enzimatik reaksiyonların hızı zamanla düşer (Ası, 1999).

1.5.6.6. Aktivatör ve inhibitörlerin enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Bir enzimin aktivitesini arttıran maddelere aktivatör denilmektedir. Aktivatörler organik gruplar ya da inorganik iyonlardır. Reaksiyon ortamında aktivatörlerin varlığı reaksiyon hızını artırır. Enzimatik tepkimelerde enzimlerin aktivitesini düşüren ya da tamamen yok eden moleküllere inhibitör denir. Bazı inhibitörler enzimlerin aktif merkezlerine bağlanarak substratın bağlanmasını engeller ve enzim aktivitesini kaybeder. Diğer inhibitörler ise enzimle bir ara kompleks oluşturarak aktiviteyi azaltıcı yönde etkide bulunabilirler. Sonuç olarak reaksiyon ortamında inhibitör varlığı enzimatik reaksiyon hızını azaltır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.5.7. Enzimlerin kullanım alanları

Enzimler *in vivo* şartlarda çalışmalarının yanı sıra *in vitro* şartlarda da aktivite göstermektedirler. Bunun yanı sıra yüksek verimli biyokatalizörler olan enzimler hafif reaksiyon koşullarında çalışmaları, yüksek substrat seçiciliği, düşük çevresel ve fizyolojik toksisiteleri, üretim maliyetlerini azaltmaları, düşük enerji gereksinimleri ve yan ürün (atık) oluşumunu azaltmaları gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlarından dolayı gıda, tarım, hayvancılık, eczacılık ve tıp, çevre, deterjan, tekstil gibi pek çok endüstriyel alanda enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır (Chapman vd., 2018).

Enzimlerin endüstride kullanımının pek çok avantajı olmasına rağmen endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için üretim maliyetlerinde ciddi bir azalma sağlanması gerekmektedir (Di Cosimo, 2013). Business Communication Company (BCC) Research tarafından yapılan araştırmaya göre, 2016 yılında 5,01 milyar dolar olan küresel enzim pazarı, 2021’de 6,32 milyar dolara çıkması beklenmektedir. Ayrıca son yıllarda çıkarılan çevreci yasalar sayesinde özellikle üretim sırasında çok fazla atık oluşumu meydana gelen kağıt, deri ve biyodizel endüstrilerinde de enzim kullanımının giderek artması beklenmektedir (Dewan, 2017). Çizelge 1.4.’de endüstride kullanılan bazı enzimler verilmiştir (Chapman vd., 2018).

Çizelge 1.4. Enzim katalizinin endüstriyel uygulamaları

Sektör	Enzim	Uygulama
İlaç	Nitril hidrataz, transaminaz, monoamin oksidaz, lipaz, penisilin asilazı	Aktif farmasötik bileşenlerin üretimi için ara maddelerin sentezi
Gıda işleme	Tripsin, amilaz, glukoz izomeraz, papain, pektinaz	Nişasta glikoza dönüşümü, yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi, prebiyotik üretimi, meyve suyundan acılık giderme
Deterjan	Proteaz, lipaz, amilaz, selülaz	Leke çıkarma, yağların giderilmesi, renk koruma
Biyoyakıtlar	Lipaz, selülaz, ksilanaz	Yağ asidi metil esterlerinin üretimi, lignoselülotik maddenin ayrışması, biyoetanol üretimi için
Kağıt	Lipaz, selülaz, ksilanaz	Gelişmiş ağartma için ligninin çıkarılması, lif özelliklerinde iyileşme

1.6. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim endüstrisi, endüstriyel proseslerin ve enzimlere dayalı ürünlerin geliştirilmesinde öncü rol oynamıştır. Biyoteknolojik gelişmeler, mevcut teknolojik uygulamalar ve yeni enzimlerin üretimi için enzim özelliklerinin geliştirilmesinde itici güç olmuştur (Araújo vd., 2008). Bu gelişmeler sayesinde son yıllarda tekstil, biyoyakıt üretimi, gıda, kağıt, temizlik ürünleri, eczacılık, saf kimyasallar, hayvan yemi ve benzeri alanlarda endüstriyel düzeyde biyokatalizörlerin rolü giderek artmıştır. Enzimlerin endüstriyel ölçekte kullanımının ana avantajları, biyolojik ve kimyasal reaksiyonların yüksek reaksiyon hızları, stereo ve enantiyo seçiciliği, yüksek ürün saflığı ve çevre dostu olmalarıdır. En olumsuz tarafı ise enzim üretimi ve saflaştırmasının genellikle pahalı olmasıdır. Ek olarak, serbest enzimler, doğal olmayan veya sert ortam koşullarında düşük stabilite ve aktivite, yüksek substrat ve/veya ürün derişimlerinde inhibisyon gibi endüstriyel seviyede kullanım için uygun olmayan özelliklere sahiptir. Özellikle endüstriyel üretimlerde kullanılan makineler, pH, sıcaklık ve basınç gibi endüstriyel ortamlardaki reaksiyon şartları gibi özel operasyonel gereksinimler, endüstriyel düzeyde enzim uygulamasının başarısı için zor bir yol oluşturur. Bu durumda, spesifik enzimlerin seçimi ve üretimi, iyileştirmeler ve enzim mühendisliği, enzim üretim yöntemlerinin optimizasyonu, enzim formülasyonlarının geliştirilmesi ve enzim uygulama yöntemleri gibi özel endüstriyel taleplerin geliştirilmesine yol açmıştır. Endüstriyel uygulamalarda yaşanan bu zorlukların üstesinden gelebilmek için enzim immobilizasyonu çalışmalarına odaklanılmış ve önemli derecede başarı elde edilmiştir (Illanes 2008; Illanes vd., 2012; Pera vd., 2015; Bilal vd., 2017).

Enzim immobilizasyonu, çözültide serbest halde hareket edebilen ve suda çözünen enzim moleküllerinin, substratın veya ürünlerin bulunmadığı ve suda çözünmeyen katı bir taşıyıcı ile birleştirilmesi olarak tanımlanabilir (Sirisha vd., 2016). Enzim immobilizasyonunun amacı, uzun ömürlü ve zor olmayan operasyonel koşullar altında çalışabilen sağlam bir biyokatalizör geliştirmektir (Tran ve Balkus, 2011). İmmobilize edilmiş enzim, taşıyıcıya bağlı olduğu için ve substratlar ve ürünler ile arasındaki faz farkından dolayı hareket edemez. Bu nedenle enzim immobilizasyonu enzim molekülünün belirli bölgelerinde fiziksel sınırlandırma olarak tanımlanabilir.

İmmobilize enzimleri kullanmanın pek çok avantajı vardır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir: (Ansari ve Husain, 2012; Di Cosimo vd., 2013; Jesionowski vd., 2014; Kawachi vd., 2014; Zucca vd., 2016)

- İmmobilize enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler.
- Oluşan ürün ve enzim birbirinden kolayca ayrılabilir.
- Enzim reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırabilir.
- Enzimatik reaksiyonu herhangi bir zamanda başlatmak, devam ettirmek ve istenildiği anda durdurmak mümkündür.
- Oluşan ürün enzim ile kontamine değildir.
- Yüksek kalitede ürünler elde edilir.
- İmmobilizasyon enzimin stabilitesini artırır, özelliklerini geliştirir ve denatüre olma olasılığını azaltır.
- Kimyasal katalizörlerin aksine daha düşük sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleşebilir ve böylece enerji tasarrufu sağlanır.
- Reaktif kullanımına gerek olmadığından, analitik amaç için uygundur.
- Enzimler genellikle uzun bir yarı ömre sahiptir ve enzimin aktivitesindeki bozulmayı tahmin etmek mümkündür.
- Reaksiyon ekonomisini ve üretim maliyetlerini iyileştirir.
- Bazı durumlarda, immobilize enzimin katalitik verimi daha iyidir.
- Sürekli işlem katalizleri için uygundur.
- Ekonomiktir ve kullanımı basittir.
- Nihai ürün enzim içermez ve böylece saflaştırmaya gerek duyulmaz.

1.6.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

Enzimlerin immobilize edilmesi için birçok malzeme taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Genel olarak, taşıyıcı malzemeler inorganik, organik ve sentetik taşıyıcılar olarak sınıflandırılır.

1.6.1.1. İnorganik taşıyıcılar

İnert polimerler veya inorganik taşıyıcılar en yaygın şekilde kullanılan taşıyıcılardır (Datta vd., 2013). İnorganik taşıyıcılara örnek olarak; hidroksiapatit, zirkonya,

bentonit, titanya, alüminyum oksit veya alümina, nikel veya nikel oksit, silika jel, aktif karbon, kaolinit, cam (katı ve gözenekli) ve seramik verilebilir (Tischer ve Wedekind, 1999). İnorganik destekler genellikle organik olanlardan daha az reaktiftir. Fakat aynı zamanda çok kararlıdır, difüzyon ve akma özellikleri iyidir. Termal kararlılık, uygun mekanik kalite ve organik reaktiflere ve mikrobiyal kontaminasyon saldırılarına karşı direnç gösterme inorganik taşıyıcıların yararları arasındadır. Metaller ve oksitleri, gözeneksiz özelliklerinden dolayı çok az bağlanma yüzeyine sahiptir. Bu taşıyıcılar genellikle uygun fiyatlıdır (Ronda vd., 2015).

1.6.1.2. Organik taşıyıcılar

Organik taşıyıcılara, selüloz, kitosan, kitin, dekstran, karragenan, jelatin, aljinat ve nişasta gibi karbohidratlar örnek olarak verilebilir. Proteinler, albümin, kolajen ve seratin de organik taşıyıcılar olarak kullanılabilir. Organik destekler sınırlı difüzyon ve akış özellikleri gösterir. Mikrobiyal kontaminasyon ve pH gibi faktörlerden etkilenme eğilimindedirler (Bayındırlı, 1995). Bununla birlikte, organik destekler düşük fiyatlıdır ve yüksek miktarlarda elde edilebilir. Karbohidrat türleri tutuklama veya kapsülasyon yöntemleri için uygundur. Çoğu enzim için uygun koşullar sunan güçlü hidrofilitiklik gösterirler (Chakraborty vd., 2016).

1.6.1.3. Sentetik taşıyıcılar

Taşıyıcı olarak kullanılan sentetik polimerlere örnek olarak; etilen ve maleik anhidrid veya polipeptitler, polialdehidler ve stiren kombinasyonlarından polipropilen, poliamid, polivinil, poliakrilat, polistiren ve naylon verilebilir (Çetinus ve Öztıp, 2003; Costa vd., 2005). Sentetik taşıyıcılar, çok çeşitli enzimatik prosedürlerde kullanım için çok uygundur, çünkü istenen fizikokimyasal özelliklerde üretilebilirler. Ek olarak mikrobiyal kontaminasyondan zarar görmezler. Piyasada, basit reçineler, iyon değişim reçinesi gibi farklı özellik ve sunumlarla veya çeşitli asidik ve bazik grup seçeneklerine sahip polimerler olarak ve önceden aktifleştirilmiş taşıyıcı olarak bulunmaktadır. Sentetik polimerlere enzimatik bağlanma, daha düşük derişimlerde elde edilir. Bağlanma sırasında, taşıyıcı desteğin hidrofobikliği veya su itici özelliği, genellikle kendi doğal formunda bir miktar enzim kaybına neden olur ve böylece enzim aktivitesini azaltabilir (Tischer ve Wedekind, 1999).

1.6.2. Taşıyıcıların özellikleri

İmmobilize edilmiş enzimin karakteristikleri, taşıyıcı ve enzimin özellikleri ile belirlenir. Bu etkileşim iyi tanımlanmış özelliklere sahip, hareketsiz bir enzim ortamı oluşturur. Bu özellikler arasında kinetik, mekanik, fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikler bulunur. Sonuç olarak, taşıyıcının özellikleri etkili bir sisteme sahip olmak için iyi seçilmelidir. Dikkate alınması gereken önemli özellikler şunlardır:

Çözünürlük: İmmobilize enzimler için istenen taşıyıcı, çözünmeyen ve katı nitelikler gerektirir. Çözünmeyen bir matris son derece önemlidir ve ürün kontaminasyonunu ve enzimin kaybını önlemesi beklenir (Tischer ve Wedekind, 1999).

Fonksiyonel gruplar: Fonksiyonel grupların varlığı, yeri, bolluğu ve aktivasyonu taşıyıcının önemli özellikleridir. Bu özellikler, immobilize enzimin aktivitesini ve kararlılığını belirler. Genellikle immobilizasyon işlemi, enzim ve taşıyıcı fonksiyonel grupları arasındaki nükleofilik reaksiyon yoluyla gerçekleştirilir. Bu, bağlanma işlemi için uygun bir yoldur, çünkü enzim diğer organik reaktiflerle reaksiyona girmez. Bağlanma işlemi için hafif reaksiyon koşulları istenir (Tischer ve Wedekind, 1999).

Yüzey alanı ve gözeneklilik/geçirgenlik: Genel olarak kütle başına, taşıyıcı yüzey alanı büyüdükçe, enzim ve substratın temas etme olasılığı da artar. Geçirgenlik veya gözeneklilik bakımından gözeneklilik ne kadar yüksek olursa, enzim ve substrat arasındaki moleküllerin nüfuzu o kadar iyidir. 30 nm'den daha büyük olan taşıyıcı gözenekleri, taşıyıcının iç alanına enzim erişilebilirliğini kolaylaştırarak enzim immobilizasyonunu destekler (Tischer ve Wedekind, 1999).

Mekanik dayanım: Bu özellik, reaktöre veya kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği endüstriyel kaba bağlı olarak daha fazla önem kazanır. Bir karıştırma tankında immobilize enzimler kullanılırken, taşıyıcının aşınmayı önleyecek kadar güçlü olması istenir. 50-100 µm altındaki parçacık boyutları filtrelerin tıkanmasına neden olabilir (Tischer ve Wedekind, 1999).

Mikrobiyal kirlenmeye karşı direnç: Destek malzemesi olarak kullanılan taşıyıcı dayanıklı olmalı ve mikrobiyal saldırılardan etkilenmemelidir. Mikrobiyal kirlenmeye karşı uzun süre kararlı ve etkisiz olmalıdır.

Tekrar kullanılabilirlik: İmmobilize enzimlerin en önemli avantajlarından biri ve dolayısıyla en çok istenilen özelliklerinden bir tanesi, tekrar kullanım kabiliyetleridir.

Bu özellik immobilize enzimleri serbest enzimlere göre daha düşük maliyetli hale getirir. İmmobilize enzimlerin doğru yönlendirilmesi ve çapraz bağlama ajanlarından destek kullanılması tekrar kullanılabilirliği artırır (Datta vd., 2013).

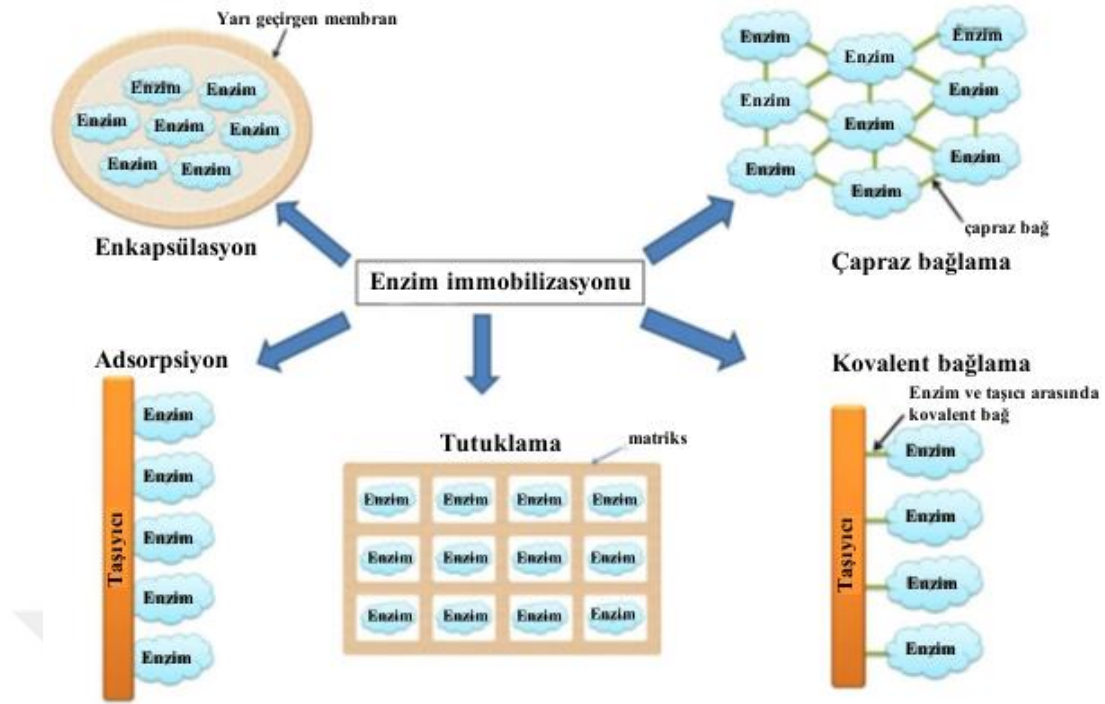
Hidrofobiklik ve/veya hidrofiliklik: Taşıyıcının hidrofobikliği ve/veya hidrofilikliği önemlidir, çünkü bu özellikler enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimlerin, özellikle kovalent olmayan etkileşimlerin kuvvetini ve afinitesini etkiler (Datta vd., 2013). Bu özellik aynı zamanda yüzey asimilasyonunu, yayılmasını ve ürünün ve substratın elde edilebilirliğini de etkileyebilir (Tischer ve Wedekind, 1999).

Taşıyıcının boyutu ve şekli: Bu özellikler özellikle çalışma süreleri için önemlidir. Genel olarak, taşıyıcının boyutu ve şekli immobilize enzimin kullanılacağı uygulamalara bağlıdır. Ticari olarak, taşıyıcı ebadı 150-700 µm partikül ebadı aralığında olabilir. Karıştırıcı tankların kullanıldığı seri üretimlerde partikül ebadı 150-300 µm olan küresel şekilli taşıyıcılar tercih edilir (Tischer ve Wedekind, 1999).

1.6.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemi, immobilize enzim aktivitesini etkileyecek önemli bir faktördür. Bir immobilizasyon metodu seçerken, enzimin hasar görmeden etkili bir şekilde etki etmesini sağlayacak uygun bir yöntem seçilmesi çok önemlidir. Kullanılacak olan immobilizasyon tekniği, kullanılacak substrat(lar) ve kullanılacak enzim(ler) ve oluşacak ürün(ler) dikkate alınarak seçilir.

Literatürde birçok immobilizasyon tekniği geliştirilmiştir ve rapor edilmiştir. Literatürde, geliştirilen enzim immobilizasyon tekniklerini belirlemek için farklı yazarlar tarafından farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Örneğin, Chibata ve Tosa (1981) enzim immobilizasyon tekniklerini tutuklama, çapraz bağlama ve taşıyıcıya bağlama olarak üç sınıfta incelemişlerdir. Brena ve Batista-Viera (2006), enzim immobilizasyonunu geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz yöntemler olarak iki ayırmış ve farklı bir sınıflandırma yapmışlardır. Şekil 1.34.'te çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri gösterilmiştir (Sirisha vd., 2016).



Şekil 1.34. Çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri

1.6.3.1. Çapraz bağlama yöntemi

Bu yöntemin moleküller arası bağlantılarla, kovalent enzim bağları, özellikle de protein-protein etkileşimleri veya taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara bağlanan geri dönüşümsüz bir enzimatik immobilizasyon yöntemi olduğu düşünülmektedir. Amino (NH_2), sülfidril (SH), imidazol ve fenolik (OH) grupları çapraz bağlanmaya dahil olabilir (Talekar vd., 2012). Enzimlerin kendilerine çapraz bağlanması etkili değildir, pahalıdır ve düşük aktivite ile sonuçlanır. Glutaraldehit, bu yöntemle kullanılan en yaygın reaktiftir. Nispeten şiddetli koşullar kullanıldığından enzimin aktif bölge konformasyonundaki değişiklikler, önemli ölçüde yüksek aktivite kaybına neden olur (Costa vd., 2005; Brena ve Batista-Viera, 2006). Çapraz bağlama işlemi bazen immobilize enzim kompleksini geliştirmek için bazı aktif olmayan moleküllerin dahil edilmesini içerir. Polar organik çözücüler veya iyonik olmayan polimerler gibi inaktif moleküllerin enzimin bulunduğu çözeltiye eklenmesi, denatürasyon olmadan kovalent olmayan bağlanma ve katalitik aktiviteyi gerçekleştirme yoluyla fiziksel agregatların oluşumuna yol açar; bu immobilizasyona çapraz bağlı enzim agregat tekniği denir (Sheldon ve van Pelt, 2013). Çapraz bağlamada kullanılacak taşıyıcı seçilirken immobilize enzimin işlevselliği göz önünde bulundurulmalıdır. İdeal bir taşıyıcı seçerken karmaşık taşıyıcılardan ziyade basit olanları tercih edilmelidir.

Bununla birlikte, sadece basit enzimin (moleküler kütlede onlarca kilodaltonluk tek bir zincir üzerinde sadece bir alandan oluşan) seçilmesinin bir dezavantajı, immobilize enzimin difüzyonu ile ilgili kısıtlamaların ortaya çıkmasıdır. Ayrıca, immobilizasyon sonrası enzim ve taşıyıcı arasında oluşan bağların kuvvetinde azalma ya da kırılabilirlik gözlemlenebilir. Bununla birlikte, çapraz bağlanmadaki güçlü kovalent bağlar, enzimin taşıyıcıdan salınmasını ve çözelti içinde etkileşime girmesini önleyebilir.

1.6.3.2. Adsorpsiyon yöntemi

Adsorpsiyon yöntemi, van der Waals etkileşimlerinden, hidrofobik etkileşimler gibi diğer kovalent olmayan etkileşimlerden ve taşıyıcı ile enzim arasındaki hidrojen bağlayıcı elektrostatik bağlardan kaynaklanır (Costa vd., 2005; Datta vd., 2013). Taşıyıcı, fiziksel adsorpsiyon (protein-ligand etkileşim prensiplerine dayanarak) için aşırı enzimde yıkanır veya enzim bir elektrot yüzeyinde kurutulur (Datta vd., 2013; Mohamad vd., 2015). Adsorpsiyon immobilizasyon yöntemi kolay, basit, ucuz ve geri dönüşümlü bir enzim immobilizasyon yöntemi olarak kabul edilir. Kolay, basit ve ucuz olmanın yanı sıra, bu yöntemin diğer avantajları şunlardır: minimum aktivasyonu destekler veya herhangi bir ön aktivasyon gerekmez. (Costa vd., 2005; Datta vd., 2013). Bu yöntemin dezavantajı, enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma veya bağlanma kuvvetlerinin, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik ve van der Waals bağlanma kuvvetleri gibi zayıf etkileşimlerden oluşturulmuş olmasıdır (Nisha vd., 2012). Dolayısıyla, taşıyıcıdan enzim salımı, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerdeki küçük bir değişikliklerle bile herhangi bir zamanda olabilir.

Adsorpsiyon yönteminde, taşıyıcı materyali enzimle bir süre boyunca sulu çözeltide bekletilerek yapılır. Taşıyıcı ve enzim yüklerindeki değişkenlik nedeniyle adsorpsiyon sınırlamalarını önlemek için pH'ı dikkatlice izleyerek ve kontrol ederek kolayca başarılır (Costa vd., 2005). pH'daki küçük değişiklikler iyonik gücün ve enzim ile desteğin etkileşimini değiştirebilir ve hatta enzimin salınmasına neden olabilir.

1.6.3.3. İyonik bağlama yöntemi

İyonik bağlanma yöntemi, enzimin taşıyıcıya elektrostatik etkileşimler gibi iyonik bağlanma veya tuz bağları ile bağlandığı ve geri dönüşümlü bir yöntemdir (Datta vd., 2013; Mohamad vd., 2015). Bu yöntemde, taşıyıcı özellikleri immobilize enzim

bağlantısı ve aktivite açısından önemlidir. Buradaki etkileşim gücü, adsorpsiyon immobilizasyonundan daha güçlüdür, ancak kovalent bağlanmadan daha zayıftır. İyonik bağlanma immobilizasyon yöntemi, adsorpsiyon prosedürüne benzer, ancak taşıyıcı özelliklerinde ve dolayısıyla enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma niteliğinde farklılık gösterir. Bu yöntemin en büyük avantajı, immobilize enzimin yüksek aktivitesidir, çünkü enzimde immobilizasyon işleminden dolayı minik konformasyonel enzimatik değişiklikler meydana gelir. En büyük dezavantajı ise, enzim taşıyıcı etkileşimlerine katılanlar dışındaki iyonların ortamda bulunmasıdır. Bu, immobilize enzim ortamı içinde bazı pH veya iyonik kuvvet değişikliklerine neden olabilir, bu nedenle taşıyıcıdan enzim ayrılmasına yol açar (Hartmeier, 1988; Solas vd., 1994; Torres vd., 2002).

1.6.3.4. Kovalent bağlanma

Bu yöntem, taşıyıcıya kovalent olarak bağlanan enzimlerden kaynaklanır. Kovalent bağlanma yöntemi, enzimlerin taşıyıcıya kovalent bağlarla bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Kovalent bağlar, enzimlerin amino asit kalıntıları ve taşıyıcının yüzey fonksiyonel grupları tarafından oluşturulur. Etkileşimde yer alan amino asit fonksiyonel grupları: sülfidril (SH), hidroksil (OH), amino (NH₂) ve karboksil (COOH) gruplarıdır (Chae vd., 1998; Quirk vd., 2001; Yang vd., 2003; Bickerstaff, 2009).

Alkilasyon, amidasyon, Schiff bazı oluşumu ve diazotasyon reaksiyonları gibi kovalent bağ yoluyla enzimlerin taşıyıcılara birleştirilmesi için farklı prosedürler bildirilmiştir (Costa vd., 2005; Di Cosimo vd., 2013). Costa vd. (2005) kovalent bağlamanın, enzimi doğrudan taşıyıcıya bağlayarak veya aralarında bir aralayıcı kullanarak başarılabilirliğini bildirmiştir. Çapraz bağlı enzim agregatları gibi en güncel teknikler daha fazla enzim esnekliği sağlar ve böylece aktivite arttırılabilir.

Kovalent bağlanma, siyanojen bromür gibi reaktif bir bileşik ekleyerek taşıyıcı malzemenin aktivasyonu ve aktive etmek için taşıyıcı omurgasında modifikasyon olmak üzere iki ana adımda gerçekleşir (Nisha vd., 2012). Bu, taşıyıcı aktif hale getirildiğinde elektrofilik gruplar ürettiği ve daha sonra enzimlerin protein kalıntıları üzerindeki nükleofilik gruplar ile reaksiyona girdiği anlamına gelir. Bu kovalent

bağlanma yöntemi, son üründe enzime ihtiyaç duyulmadığında veya istenmediğinde kullanılır (Datta vd., 2013).

Enzim aktif bölgesine zarar gelmemesi için dikkatli olunmalıdır. Bu, enzimin aktivite kaybetmesini önleyecektir. Bu bağlama yöntemi için çeşitli taşıyıcı materyaller vardır ve uygun olanı seçmek için taşıyıcıların spesifik özelliklerine önem verilmelidir. Kovalent bağlanma yöntemi, diğer bağlanma yöntemlerine kıyasla sıcaklık ve çözücü gibi çevresel değişikliklere karşı daha stabil ve dirençlidir (Bickerstaff, 2009). Bu yöntemin dezavantajı, enzimin konformasyonel değişikliklerine ve bazı katalitik aktivite kaybına neden olan streştir (Rosevear vd., 1987; Harold, 1991).

1.6.3.5. Tutuklama ve kapsülleme

Tutuklama ve kapsülleme, enzimi doğal veya sentetik polimerik taşıyıcının jelinde veya fiberinde kaplamak, hapsetmek veya kafeslemek suretiyle elde edilir (Datta vd., 2013; DiCosimo vd., 2013). Enzimi sıkıştırılmış halde tutan, fakat substratların ve ürünlerin geçmesine izin veren bir zar vardır. Enzimler seçici olarak geçirgen, küre şeklinde bir zarın içine sarıldığında ya da içine alındığında kapsülleme olarak adlandırılır. Bu yöntem, enzim ve polimerik destekler için büyük temas alanına izin verir. Dezavantajı, enzimin kapsülleme sırasında etkisizleştirilebilmesidir ve fonksiyonel kullanımı, substratın enzim aktif bölgesine kütle transferinin azaltılmasıyla sınırlı kalmaktadır (Nisha vd., 2012; Mohamad vd., 2015).

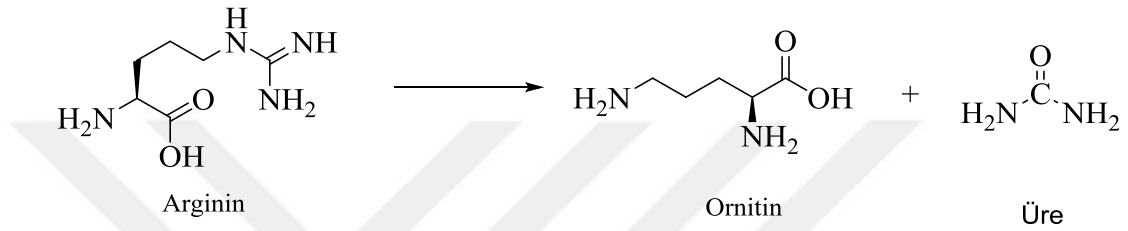
Bu yöntemlerin avantajları düşük maliyetli, uygun işlem koşulları, enzimler ve substrat arasında yüksek temas alanı ve hızlı olmasıdır. Dezavantajları, taşıyıcının gözenek boyutunun küçük olması nedeniyle enzim salınımının önlenmesi, ihtiyaç duyulan büyük miktarda enzim nedeniyle enzimin aktivite kaybına uğramasıdır (Rosevear vd., 1987).

Sonuç olarak immobilizasyon yöntemleri içinde enzim ve taşıyıcı arasında en güçlü kimyasal bağlar çapraz bağlama ve kovalent bağlama yöntemlerinde oluşur. Dolayısıyla, bu iki yöntem enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltabilir. Ayrıca, diğer yöntemlere kıyasla daha maliyetli ve daha fazla emek harcanması gerekir. Öte yandan, tutuklama ve adsorpsiyon gibi immobilizasyon yöntemlerinde, destekleyici materyal ile enzimler arasında kuvvetli bir şekilde bağlanmanın olmadığı belirtilmektedir. Bu yöntemler etkili ve uygulaması kolaydır, ancak enzimler sıklıkla taşıyıcıdan ürüne akar

veya damlar. Bu problem genellikle enzimlerin glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile çözülür (Bayındırlı, 1995; Di Cosimo vd., 2013).

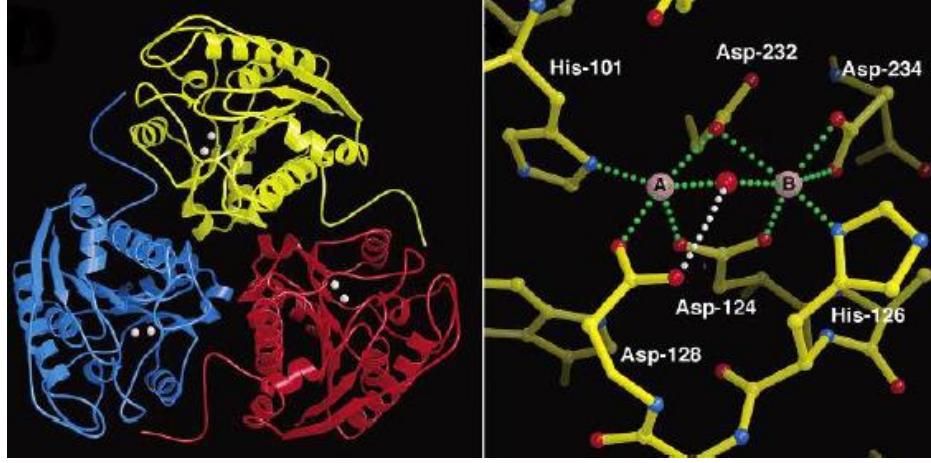
1.7. Arginaz Enzimi

Üre döngüsünün son enzimi olan arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) ornitin ve üre oluşturmak üzere argininin hidrolizini katalize eder. Şekil 1.35.'de argininden ornitin ve üre oluşum reaksiyonu verilmiştir (Özdemir ve Özçelik, 2001).



Şekil 1.35. Argininden ornitin ve üre oluşumu

Arginaz molekül ağırlığı 105 kDa olan üç eşdeğer alt birimden oluşan ve her bir alt birimde binükleer manganez kümesi içeren trimerik bir enzimdir (Wu ve Morris, 1998; Ash vd., 1999). Şekil 1.36.'da arginaz enziminin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir (Kanyo vd., 1996). Binükleer manganez kümesi, her monomerde 15°A derinliğinde aktif bölgenin tabanında bulunur. Aktif bölge yarığında daha derinde bulunan metal iyonu (Mn_A^{2+}), dört amino asit ve bir çözücü molekül içeren üçgen bipiramit molekül geometrisine sahiptir. İkinci metal iyonu (Mn_B^{2+}) ise dört amino asit ve köprüleyici çözücü molekülü içeren çarpık oktahedral geometriye sahiptir. Mn_A^{2+} ile Mn_B^{2+} arasındaki uzaklık 3,3°A'dur. Her iki metal ligand, Aspartat 128 (Asp 128) dışındaki diğer protein kalıntıları ile hidrojen bağı etkileşimleri yapar ve bu etkileşimler metal bağlama bölgesinin stabilitesine katkıda bulunur (Christianson ve Alexander, 1989; Rardin vd., 1991; Reczkowski ve Ash, 1992; Kanyo vd., 1992).



Şekil 1.36. Arginaz enziminin üç boyutlu yapısı

Arginazın memelilerde Arginaz I (A I) ve Arginaz II (A II) olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. A I sitoplazmik kökenli olup ağırlıklı olarak karaciğerde bulunur. Karaciğerde gerçekleşen üre döngüsünün son sitozolik aşamasını katalize eder ve ortalama bir yetişkin tarafından yılda yaklaşık 10 kg üre üretiminden sorumludur. A II ise, üre döngüsünde işlev görmeyen ve böbrek, beyin, iskelet kası ve karaciğer gibi birçok dokuda daha yaygın olarak dağılmış ornitin, prolin, glutamat gibi biyosentetik fonksiyonlarla ilgili olan bir mitokondriyal enzimdir (Krebs ve Henseleit, 1932; Herzfeld ve Raper, 1976; Morris vd., 1997; Morris, 2002;).

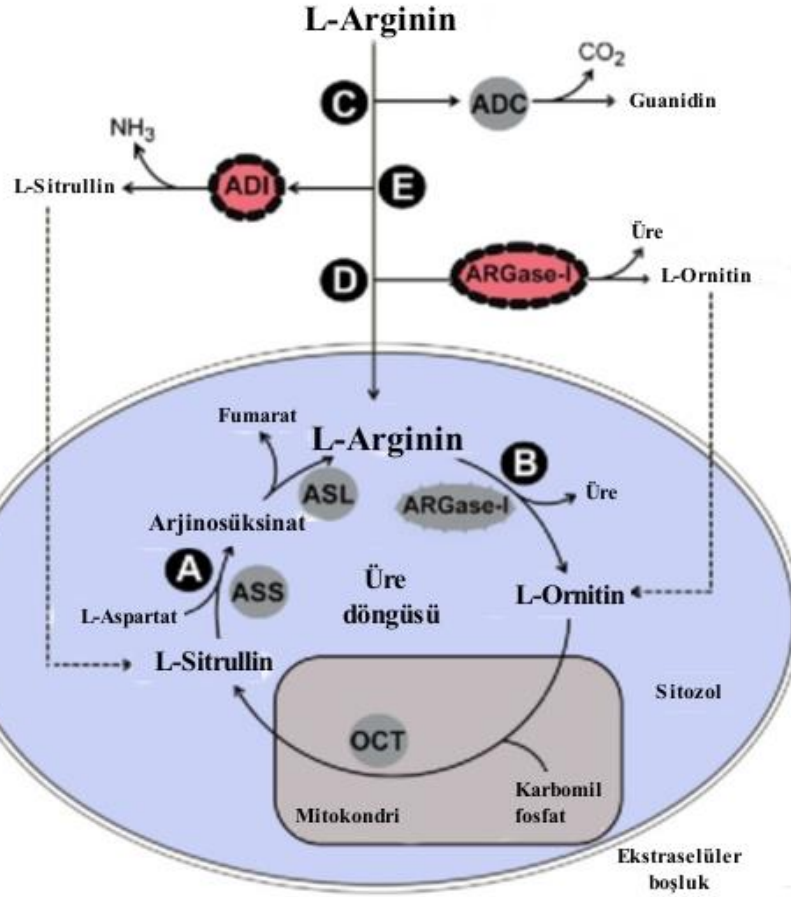
Argininin, arginaz tarafından katalizlenmesi sonucunda üre ve ornitin oluşur. (Erbaş vd., 2006). Üre, insanlardaki non protein azot katabolizmasının en önemli azotlu metabolik ürünlerinden biridir. Üre biyosentezi, üre döngüsünün hepatik enzimleri tarafından yürütülen ve amino azotundan elde edilen amonyaktan oluşan reaksiyonlar sonucu gerçekleşir. Karaciğerde ki Krebs-Henseliet üre döngüsü amonyağın toksik etkisini ortadan kaldırır. Oluşan ürenin %90'dan fazlası böbreklerden atılırken geri kalan kısmı ciltten terleme ile atılır (Nader vd., 2018). Ornitin ise ornitin aminotransferaz (OAT) tarafından prolin ve glutamat oluşturmak üzere veya ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi ile poliaminlere dönüştürülmek üzere kullanılır (Barış vd., 2004). Prolin, kollajen ve kazein gibi önemli proteinlerin oluşmaları sırasında yapılarına katılırken, glutamat ise enerji metabolizması ve aminoasitlerin birbirine çevrilmesinde önemli rol oynayan ara metabolitlerden biridir (Kandemir ve Özdemir, 2008).

Arginazın katalizlediği reaksiyonun substratı olan arginin azot metabolizması, kreatin, agmatin ve poliamin sentezi gibi önemli hücrese fonksiyonlarda yer alan bir dizi biyolojik yolun öncüsü/aracıdır. Arginin aynı zamanda nitrik oksit üretimi için ana substrattır. Ayrıca anabolik hormon salınımını uyarır ve immünostimülatördür (Barbul vd., 1977; Klein ve Morris, 1978; Barbul vd., 1983; Rogers ve Visek, 1985; Billiar, 1995).

Argininosüksinat sentetaz (ASS) enzimi L-sitrullin ve L-aspartik asitten argininosüksinat oluşturduğu reaksiyonu katalizler. Oluşan argininosüksinat argininosüksinat liyaz (ASL) tarafından katalizlenen reaksiyon ile arginin ve fumarik asit oluşur (Şekil 1.37.) (Haines vd., 2011).

Sağlıklı yetişkin bireylerde endojen sentez seviyesi, metabolizmanın arginin ihtiyacını karşılamak için yeterlidir (Castillo vd., 1993). Bununla birlikte, katabolik stres altında (örneğin, iltihaplanma, enfeksiyon, vb.) endojen sentez seviyeleri metabolik talepleri karşılamak için yeterli olmayabilir ve arginin esansiyel bir amino asit haline gelir. Bu nedenle, bu amino asit genellikle esansiyel değil yarı esansiyel bir amino asit olarak ifade edilir (Reeds, 2000).

Metastatik melanoma, prostat karsinomları, hepatoselüler karsinomlar, non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoması, pankreas karsinomu, osteosarkom ve malign plevral mezotelyoma gibi bazı tümör hücreleri ve bazı meme tümörleri, ASS'nin eksik ekspresyonundan dolayı arginin için yüksek bir gereksinime sahiptir (Dillon vd., 2004; Qui vd., 2015). Bu, argininin ototrofisine (özbeslenim) neden olur ve bu nedenle bu tümörler, büyüme ve çoğalma için sadece eksojen arginin kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle argininin ortamda yeterince bulunmamasını kanser tedavisi için yeni bir strateji olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda arginin oksotropik tümörlerine karşı ümit verici bir etki göstermiştir (Shen vd., 2003; Wheatley ve Campbell, 2003; Feun vd., 2015).



Şekil 1.37. Arginin Metabolizmasına ve katabolizmasına katılan enzimlerin şematik gösterimi

Arginin, hücre içinde bulunan arginaz (Şekil 1.37.) veya arginin dekarboksilaz (ADC) gibi enzimler kullanılarak, insan karaciğerinde bulunan arginaz I kullanılarak veya arginin deiminaz gibi bir bakteri kaynağından elde edilen parazit enzimleri kullanılarak, çeşitli mekanizmalar tarafından bozulabilir. Bu enzimlerden, arginaz I ve ADI terapötik potansiyele sahip oldukları için en umut verici olanlardır. ADC normal hücreler için toksiktir ve bu nedenle terapötik amaçlar için kullanılamaz (Ficai ve Grumezescu, 2017).

1.8. Literatürde Yer Alan Çalışmalar

1.8.1. Arginaz immobilizasyon çalışmaları

Yaptığımız kapsamlı literatür taraması sonucunda bugüne kadar arginaz immobilizasyonu üzerine toplam 12 adet çalışma olduğu görülmüştür. Ayrıca bugüne

kadar arginaz immobilizasyonu çalışmalarının hiçbirinde taşıyıcı olarak elektroegirme yöntemi ile elde edilen nanofiberler kullanılmamakla birlikte herhangi bir nanomalzeme de kullanılmamıştır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar arginaz immobilizasyonu için taşıyıcı olarak nanomalzeme kullanılan ilk çalışma olması özelliği ile öne çıkmaktadır ve literatürde büyük bir boşluğu dolduracağı öngörülmektedir.

Literatürde yapılan ilk çalışma O'Grady ve Joyce tarafından 1980 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada sığır karaciğer arginaz enzimi, arayüzey polimerizasyonu işlemi ile üretilen naylon membran mikrokapsüllerin içine enkapsüle edilmiştir. Mikro kapsüllemenin arginazın özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 37°C'de serbest arginaza göre enkapsüle arginazın K_m , optimum pH ve sıcaklık stabilitesinde önemli ölçüde bir değişim gözlenmemiştir. Yapılan termal kararlılık deneylerinde naylona enkapsüle arginaz enzimi 4-80°C aralığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından termal kararlılık profilleri çıkarılmıştır. Serbest enzim maksimum aktivitesini 37°C'de immobilize enzim ise 45°C'de yapılan inkübasyon işlemi sonrasında göstermişlerdir. Serbest enzim sadece 4°C'de ve 20°C'de immobilize enzime göre daha yüksek aktivite gösterirken çalışılan diğer tüm sıcaklıklarda ise immobilize enzim daha yüksek aktivite göstermiştir. Hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum pH değeri 10,0 olarak bulunmuştur. Kinetik çalışmalarda ise immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre 10×10^{-3} M'dan $18,5 \times 10^{-3}$ M'a arttığı gözlenmiştir. Serbest arginaz, proteolitik enzimlere maruz bırakıldığında aktivite kaybederken, mikro kapsüllenmiş arginaz proteolize karşı çok daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mikro kapsüllenmiş enzimin in vivo L1210 murin lösemisine karşı etkinliğinin ön incelemesi yapılmıştır. Farklı dozlarda mikrokapsüllenmiş arginaz (43,0-600 U/kg), farklı dozlarda enjeksiyondan sonra tümör taşıyan farelerin hayatta kalma sürelerinde önemli bir artış gözlenmemiştir (O'Grady ve Joyce, 1980).

Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada ise arginaz enzimi poli hidrosietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiştir. Yapılan çalışmalarda serbest enzim için pH kararlılığı deneylerinde optimum değer 8,0 iken immobilize enzim için bu değer 5-9 aralığında olduğu bulunmuştur. Hem serbest enzim hem de immobilize enzim 30 dakika boyunca 20-100°C aralığında tutularak termal kararlılık profilleri incelenmiştir. Serbest enzim 20-45°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken bu 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivite kaybetmeye başlamıştır ve 65°C'de

aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 25-75°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla aktivitesini kaybetmiştir. Kinetik çalışmalarda ise immobilize enzimin $4,4 \times 10^{-3}$ M'dan $3,8 \times 10^{-3}$ M'a azaldığı görülmüştür. Ayrıca boncuk biçiminde immobilize edilmiş arginaz, kolona (0,5x4 cm) doldurulmuş ve kolondan 37°C'de 15 ve 2 mL/sa akış hızında 100 mM arginin çözeltisi geçirilmiştir. Belirtilen akış hızlarında sırasıyla %45 ve %98'lik dönüşüm elde edildiği rapor edilmiştir.

Veronese vd. (1989) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise sığır karaciğeri arginazı içeren enzim çözeltisi ile karıştırılmış bir cam oluşturuucu monomerin radyasyonu ile indüklenen düşük sıcaklıktaki polimerizasyona dayanan bir fiziksel tutkuma yöntemi ile polihidroksietil akrilat üzerine immobilize edilmiştir. Yapılan pH çalışmalarında serbest enzim için optimum pH değeri 10,0 immobilize enzim için ise 9,5-10,5 aralığında bulunmuştur. Kinetik çalışmalarda ise immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre $3,8 \times 10^{-3}$ M'dan $4,4 \times 10^{-3}$ M'a arttığı gözlenmiştir. Ayrıca içinde immobilize arginaz tanecikleri olan kolondan oluşan reaktör kullanılarak argininin ornitine sürekli biyokatalitik dönüşümün performansı incelenmiştir. Bu çalışmada 1 g taşıyıcıya 40 U aktiviteye sahip enzim yüklenmiş ve 37°C'de saatte 15 mL akış hızında arginin çözeltisi ile beslenmiş ve %45'lik substrat dönüşümü bulunmuştur.

Bir başka çalışmada sığır karaciğerinden izole edilen arginaz, suda çözünür bir karbodiimit tarafından aktive edilen karboksilik grupları taşıyan bir poliakrilamid boncuk desteğine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Optimum sıcaklık çalışmalarında serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40°C ve 60°C olarak bulunmuştur. Serbest arginaz için optimum pH 11 iken, immobilize arginaz enzimi için ise 9,5 olarak bulunmuştur. pH kararlılığı deneyleri sonucunda serbest enzim için optimum değer 7,5 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 8,0 olarak tespit edilmiştir. 40, 60 ve 70°C'de immobilize enzim için termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. 40°C'de immobilize enzim 120 dakika sonunda aktivitesini korumayı başarırken, 60°C'de 60 dakika sonunda aktivitesinin %80'ini kaybederken, 70°C ise 30 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybetmiştir. Ayrıca immobilize arginazın L-ornitin ve D-arginin üretimi için kullanılabilirliği araştırılmıştır (Dala ve Szajani, 1994).

Stasyuk (2011) tarafından yapılan çalışmada ise rekombinant insan arginaz-1 enzimi altın ve gümüş nanopartiküllere immobilize edilmiştir. Rekombinant arginaz-1,

karbodiimid-pentafluorofenol yöntemi kullanılarak, ω -merkaptohexadekanoyik asit ile fonksiyonelleştirilmiş nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiştir. Rekombinant insan arginaz-1 enzimi, AgNP'ler için %85 ve AuNP'ler için %86,7 bağlanma verimi (eklenen enzim konsantrasyonu 0,15-0,5 mg / mL aralığında) ile, her iki nanopartiküle bağlanmıştır. Nanopartiküllere immobilize edilmiş enzim geniş bir pH aralığından termostabilite göstermiştir. Bundan dolayı arginaz immobilize edilmiş nanopartiküller biyoanalitik amaçlar için, yani farmasötiklerde, gıda ürünlerinde ve kanda arginin izlenmesi için pratik bir araç haline gelebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Li vd. (2014) tarafından yapılan başka bir immobilizasyon çalışmasında selüloz mikrokürelere hazırladıktan üzerine arginaz-1 geni klonlanmış ve hazırlanan selüloz mikrokürelere immobilize edilmiştir. Oluşturulan selüloz bağlı arginaz füzyon proteini vasıtasıyla L-ornitin üretimi üzerine uygulama yapılmıştır. Immobilize enzim için termal stabilite ve tekrar kullanılabilirlik üzerine çalışmalar yapılmıştır. Termal stabilite çalışmalarında serbest enzim immobilize enzime göre daha fazla kararlılık göstermiştir. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında ise immobilize enzim 7 kullanım sonunda aktivitesini %83,4 korumuştur. Bu çalışma ile immobilize enzim kullanılarak endüstriyel olarak L-ornitin üretiminde kullanılacak önemli bir çevre dostu yöntem geliştirilmiştir.

El-Sayed vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada termofilik bir fungi olan *Penicillium chrysogenum* kullanılarak arginaz enzimi üretilmiştir. Saflaştırılan arginaz enzimi hem polietilen glikol hem de kitosana immobilize edilmiştir. Çalışmada serbest enzim, kitosana immobilize edilmiş enzim ve polietilen glikole immobilize edilmiş enzim için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Serbest enzim ve PEG'e immobilize edilmiş arginaz kullanılarak HEPG-2 (insan karaciğer kanser hücresi) ve A549 (insan akciğer kanser hücresi) tümör hücreleri üzerinde in vitro anti kanser aktiviteleri incelenmiştir.

Unissa vd. (2015) tarafından 2015 yılında yapılan bir başka çalışmada ise halofilik bir bakteri olan *Idiomarina sediminum* arginaz kaynağı olarak kullanılmıştır. PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerini çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve enzim karakterize edilmiştir. Saflaştırılan arginaz enzimi kullanılarak Hela hücreleri (rahim ağzı kanseri) üzerine in vitro kanser aktivitesi çalışması yapılmıştır. Ve çalışma

sonunda arginaz enziminin antikanser ajanı olarak potansiyel aday olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Zhang vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise rekombinant insan arginaz-1 enzimi elde edilmiş ve elde edilen enzim kitosan parçacıklarına glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Hem serbest enzim hem de kitosana çapraz bağlanmış immobilize enzim için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca immobilize enzimin L-ornitin üretimi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çalışma sonunda immobilize arginaz enziminin gelecekte endüstriyel olarak L-ornitin üretilmesi için umut verici alternatif bir yöntem olacağı belirtilmiştir.

Diğer bir çalışma da *E.coli* bakteri hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiştir. Immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C'de ve optimum pH değeri ise 10,0 olarak bulunmuştur. 40°C ve 60°C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. 40°C'de 5 kullanım sonrasında aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği, 60°C'de ise 3 kullanım sonrası aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği görülmüştür. Ayrıca 40°C, pH 10 ve 1 mM Mn⁺² varlığında ortamda bulunan argininin (200 g/L) yaklaşık %95'ini 16 saat sonunda L-ornitine dönüştürüldüğü rapor edilmiştir (Zhang vd., 2016).

Unissa vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *Idiomarina sediminium* H1695'ten saflaştırılmış arginaz enzimi kullanılmıştır. Enzim immobilizasyonu, farklı PEG ve arginaz derişimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum arginaz: PEG oranı (molar) ve reaksiyon süresi, enzimin etkili pegilasyonu için sırasıyla 1:50 ve 3 saat olarak bulunmuştur. Hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Optimum pH değerleri serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 7 ve 7,5 olarak bulunmuştur. Enzim immobilize (pegilasyon) edildikten sonra fizyolojik pH'da aktivite göstermeye devam etmiştir. Immobilize enzim pH'daki değişimler karşısında etkinliğini ve stabilitesini sürdürmeye devam etmiştir. Sıcaklık etkisi üzerine yapılan çalışmalarda serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 37°C iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 38°C olmuştur. Immobilizasyon işlemi sonrasında enzimin termal stabilitesi artmıştır. Immobilize enzim 37°C'de aktivitesinin %92,74'ünü korumuştur. Bunların haricinde serbest enzim ve immobilize enzim için yarılanma sürelerinin belirlenmesi üzerine çalışmalarda yapılmıştır. Serbest enzimin yarılanma süresi 1,5

gün iken immobilize enzim için 2,5 gün olarak belirlenmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar sonucu immobilize enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,44 mM ve 169,49 U/mL olarak bulunmuştur. K_m değerinin immobilizasyon sonrası az da olsa arttığı belirtilmiştir. Fakat V_{max} değeri ile ilgili herhangi bir yorumda bulunulmamıştır. Uygulama için yapılan çalışmalarda ise A375-C6 ve HCT-113 kanser hücrelerine karşı MTT testi yapılmıştır ve IC_{50} değerleri sırasıyla $4,24 \pm 0,11$ mg/mL ve $5,12 \pm 0,21$ mg/mL olarak bulunmuştur.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, elektroğirme yöntemiyle sentezlenen sekiz farklı nanofiberin sentezi, karakterizasyonu ve bu nanofiberlerin arginaz immobilizasyonu için kullanılabilirliği araştırılmıştır. Ayrıca aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan arginaz immobilize nanofiber sistemi için L-ornitin oluşturma performansı incelenmiştir.

2.1. Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Çözeltiler

2.1.1. Kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasallar; selüloz asetat (Mn~50,000), polivinil prolidon (Mw~1,300,000), polivinil alkol (Mw 130,000, 99+% hydrolyzed), kitosan (from shrimp shells, $\geq 75\%$ deacetylated), poli kaprolakton (Mn: 45,000), β -siklo dekstrin (Mw 1,134,98 g/mol), mangan (II) klorür, mangan (II) asetat tetrahidrat, L-arginaz (from bovine liver, 2,5 KU), L-ornitin, glutaraldehit, üre, α -izonitrosopropiyoferon, sodyum klorür, sülfürik asit, fosforik asit, asetik asit, etanol, sodyum sitrat dihidrat, asetik asit, sodyum asetat trihidrat, sodyum disodyum hidrojen fosfat, dihidrojen fosfat, tris, glisin, sığır serum albumin, Sigma Chemical firmasından; sodyum hidroksit, sodyumnitroprussid, fosforik asit, sodyum hipoklorit, amonyum sülfat, amonyak, Coomassie Brilliant Blue G-250, sitrik asit monohidrat, potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum klorür, D(+)-glukoz Merck Chemical firmasından satın alınarak temin edildi.

2.1.2. Cihazlar

Kullanılan cihazlar ise şunlardır: Ultraviyole-görünür ışık absorpsiyon spektrofotometresi (UV-VIS) (PG Instruments T60), elektroğirme cihazı (Inovenso), taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL JSM-7600 F model), fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR) (Thermo Nicolet iS10), termogravimetrik analiz cihazı (TGA) (Perkin Elmer), X-Işını kırınım yöntemi cihazı (XRD) (Rigaku

SmartLab), su banyosu (Nüve BM402), santrifüj (Nüve NF800), inkübatör (Nüve EN500), çalkalamalı karıştırıcı (Nüve SL350), hassas terazi (Shimadzu), manyetik karıştırıcı (Wisestir MSH-20A), pH metre (Thermo Orion 4star).

2.1.3. Çözeltilerin hazırlanması

2.1.3.1. Bradford çözeltilisinin hazırlanması

100 mg coomassie brilliant blue G-250 alınarak 50 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü ve üzerine 100 mL %85'lik H₃PO₄ ilave edildi. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı ve bir gece boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra süzme işlemi yapıldı ve buzdolabında saklandı.

2.1.3.2. Arginaz aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler

- 50 mM tris-HCl: 1,514 g tris alınarak 200 mL saf suda çözüldü. 0,1 M HCl ile pH 7,5'e ayarlandı ve daha sonra toplam 250 mL'ye tamamlandı.
- TBS tamponu: 1,514 g Tris, 2,194 g NaCl ve 0,25 g BSA alınarak 200 mL saf suda sırayla çözüldü. 0,1 M HCl ile pH 7,5'e ayarlandı ve daha sonra toplam 250 mL'ye tamamlandı.
- 10 mM MnCl₂: 0,126 g MnCl₂ alınarak 100 mL'lik balon jöjeye konuldu. Üzerine bir miktar 50 mM Tris-HCl eklenerek çözüldü ve daha sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM L-arginin: 0,871 g L-arginin alınarak 80 mL saf suda çözüldü. 0,1 M HCl ile pH 9,7'ye ayarlandı ve daha sonra toplam 100 mL'ye tamamlandı.
- Asit çözeltisi: 21 mL H₂SO₄, 63 mL H₃PO₄ ve 147 mL H₂O alınarak bir balon jöjede karıştırıldı ve asit çözeltisi elde edildi.
- %5'lik ISPF: 0,5 g α -izonitrosopropiofenon alınarak 10 mL'lik balon jöjeye konuldu. Üzerine bir miktar etanol eklenerek çözüldü ve daha sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.3. pH çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler

- pH=3,0 tamponu hazırlanması: Sitrata tamponu için 1,4705 g sodyum sitrat hepta hidrat alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'ı ayarlandı ve daha sonra toplam 100 mL'ye tamamlandı.
- pH=4,0 ve pH=5,0 tamponu hazırlanması: Asetat tamponu için 0,6804 g sodyum asetat trihidrat alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'ı ayarlandı ve daha sonra toplam 100 mL'ye tamamlandı.
- pH=6,0, pH=7,0 ve pH=8,0 tamponu hazırlanması: Fosfat tamponu için 1,340 g sodyum fosfat dibazik hepta hidrat alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'ı ayarlandı ve daha sonra toplam 100 mL'ye tamamlandı.
- pH=9,0 ve pH=10,0 tamponu hazırlanması: Tris-HCl tamponu için 0,6057 g Trisma alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'ı ayarlandı ve daha sonra toplam 100 mL'ye tamamlandı.
- pH=11,0 ve pH=12,0 tamponu hazırlanması: Glisin tamponu için 0,3754 g glisin alınarak 80 mL saf suda çözüldü. pH'ı ayarlandı ve daha sonra toplam 100 mL'ye tamamlandı.

2.2. Deneysel Yöntem

2.2.1. Bradford protein tayini

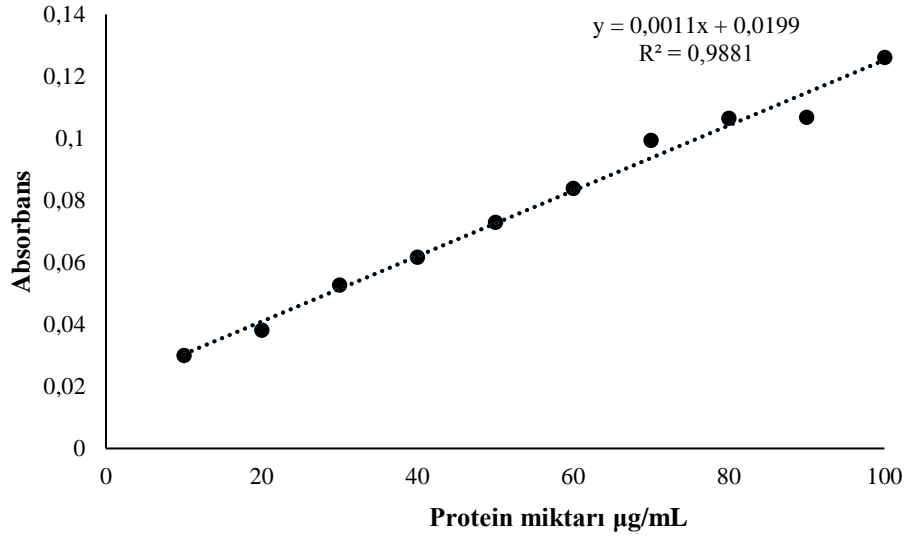
Enzimin nanofiberlere immobilizasyonu ve sonrasında ortamda bulunan protein miktarı tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu yöntem Bradford reaktifinin farklı derişimlerdeki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından faydalanılarak geliştirilmiştir. Bu reaktif proteinlerin yapısındaki, aromatik halka içeren amino asitler ve arginin gibi bazik aminoasitlere bağlanır ve bunun sonucunda oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığında değişmektedir (Bradford, 1976).

Standart kalibrasyon grafiğini oluşturmak için, 10-100 µg/mL aralığında sığır serum albüminin (BSA) çözeltileri kullanıldı. Yöntemin uygulama detayları Çizelge 2.1.'de ve 10-100 µg/mL aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bradford protein tayini yöntemi

	Kör	Standart	Örnek
Destile su	0,01 mL	-	-
Standart çözelti	-	0,01 mL	-
Örnek çözelti	-	-	0,01 mL
Bradford reaktifi	3 mL	3 mL	3 mL

Tüpler 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
595 nm'de UV-VIS cihazında absorbanlar okundu.



Şekil 2.1. Protein tayini kalibrasyon grafiği

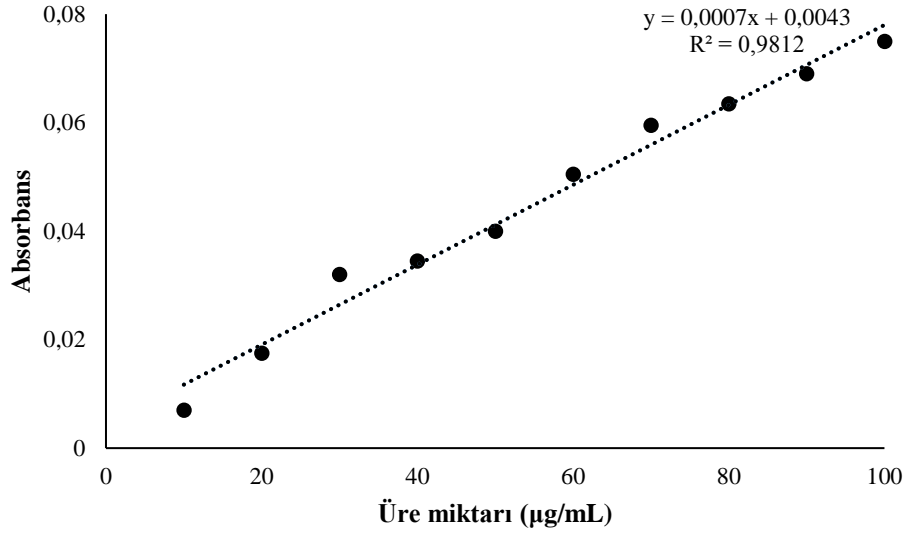
2.2.2. Arginaz enzimi için aktivite tayini

Bu aktivite tayin yöntemi L-argininin arginaz tarafından hidrolizi ile üretilen ürenin derişiminin ölçülmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir (Corraliza vd., 1994; Bordage vd., 2017). Aktivite yöntemi Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Arginaz aktivite tayin yöntemi

	Kör	Örnek
Enzim	-	100 µL
TBS (tampon)	100 µL	-
MnCl₂	300 µL	300 µL
Arginin	200 µL	200 µL
37°C'de 60 dk. inkübasyon		
Asit Çözeltisi	1200 µL	1200 µL
ISPF	100 µL	100 µL
100°C'de 45 dk inkübasyon		
10 dk karanlıkta soğumaya bırakıldı ve 540 nm'de UV-VIS cihazında absorbanlar okundu.		

Aktivite tayin metodu ile elde edilen absorbans değerleri ile oluşan üre miktarının hesaplanması için Şekil 2.2.'de verilen standart üre kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Hesaplamalarda kullanılan denklemler (2.1.) ve (2.2.)'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Standart üre kalibrasyon grafiği

$$Aktivite (U) = \frac{\mu mol \text{ üre} \times Toplam \text{ hacim}}{t (dak) \times \text{örnek hacmi}} \quad (2.1.)$$

$$Spesifik \ Aktivite \left(\frac{U}{mg \text{ protein}} \right) = \frac{Aktivite(U)}{mg \text{ protein}} \quad (2.2.)$$

2.2.3. Elektroğirme yöntemi ile nanofiberlerin sentezi

Günümüzde nanofiber üretimi için pek çok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında elektrostatik kuvvetler kullanarak nanometre ile mikrometre arasında değişen çaplarda polimer fiberlerin üretimi için en etkin, kolay uygulanabilen, ekonomik, hızlı, sürekli üretim için uygun ve çok yönlü bir fiber üretim tekniği olan elektroğirme yöntemi kullanılmıştır.

Öncelikle, üretilmek istenen nanofiberlerde bulunan polimerler uygun çözücüler kullanılarak polimer çözeltileri hazırlandı. Polimer çözeltisi şırınga içine alındı ve şırınga besleme ünitesinin içine yerleştirildi. Şırınganın bağlı bulunduğu iğne ucu ile tam karşısında bulunan toplayıcı plaka arasına güç kaynağı vasıtasıyla yüksek gerilim

uygulanarak elektriksel alana maruz bırakıldı. Sabit akış hızında gönderilen polimer çözeltisi ile toplayıcı plaka arasında uygulanan yüksek gerilim sayesinde homojen fiberler oluşur. Şekil 2.3.'de tez çalışması boyunca kullanılan elektroegirme cihazı gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Çalışmalarda kullanılan elektroegirme cihazı

2.2.3.1. CA/PVP nanofiberlerin sentezi

Farklı derişimlerde CA (%7,5, 10, 12,5) ve PVP (%2,5 ve 5) polimer çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı. CA asetik asit içerisinde PVP ise etanol içerisinde oda sıcaklığında tamamen çözüne kadar sürekli olarak karıştırıldı. CA/PVP nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler %CA derişimi, %PVP derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Tüm kombinasyonlarda, CA ve PVP çözeltileri eşit hacimde karıştırıldı. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL'lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,3-0,5 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (15-20 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (13-17 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Değişik koşullarda hazırlanan nanofiberler SEM cihazında analiz edildi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.2. CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin sentezi

CA derişimi (%12,5) ve PVP derişimi (%5) sabit tutularak farklı derişimlerde Mn⁺² (%0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5) olacak şekilde polimer çözeltileri hazırlandı. Tüm kombinasyonlarda, Mn⁺² kaynağı olarak mangan (II) asetat tetrahidrat kullanıldı. CA asetik asit içerisinde, PVP etanol içerisinde çözüldü. Mn⁺² ise hazırlanan her iki çözelti karıştırılmadan hemen önce PVP çözeltisinin içerisine ilave edilerek çözüldü. CA/PVP/Mn⁺² nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler %Mn⁺² derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Hazırlanan çözeltiler eşit hacimde karıştırıldı. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL'lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,3-0,6 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (13-20 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (15-19 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Farklı Mn⁺² derişimlerinde hazırlanan ham nanofiberler SEM cihazında analiz edildi. En uygun fiber morfolojisine sahip nanofiberler belirlendi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.3. PVA/CH nanofiberlerin sentezi

PVA derişimi %6 ve CH derişimi ise %1 olacak şekilde polimer çözeltileri hazırlandı. PVA polimer çözeltisi saf su ile 60°C'de 4 saat boyunca karıştırıldı ve homojen çözelti elde edildi. CH polimer çözeltisi ise %1'lik asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında tamamen çözüne kadar karıştırıldı. PVA/CH nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Hazırlanan çözeltiler eşit hacimlerde karıştırıldı. Tamamen karışan polimer çözeltilere %1 oranında Triton X-100 ilave edildi. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL'lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,2-0,5 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (13-19 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (13-16 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Elektroğirme yöntemi ile elde edilen nanofiberlerin suda çözünmemesi için glutaraldehitin asetonunda hazırlanmış susuz çözeltisi ile çapraz bağlama işlemi

gerçekleştirildi. Elde edilen hem ham hem de çapraz bağlı nanofiberlerin morfolojileri SEM cihazında belirlendi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.4. PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin sentezi

PVA derişimi (%6) ve CH derişimi (%1) sabit tutularak farklı derişimlerde Mn⁺² (%0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5) olacak şekilde polimer çözeltileri hazırlandı. Tüm kombinasyonlarda, Mn⁺² kaynağı olarak mangan (II) asetat tetrahidrat kullanıldı. PVA 60°C’de saf suda, CH ise %1’lik asetik asit içerisinde çözüldü. Mn⁺² ise hazırlanan her iki çözelti karıştırılmadan hemen önce oda sıcaklığındaki PVA çözeltisinin içerisine ilave edilerek çözüldü. PVA/CH/Mn⁺² nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler %Mn⁺² derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Hazırlanan çözeltiler eşit hacimde karıştırıldı. Tamamen karışan polimer çözeltilere %1 oranında Triton X-100 ilave edildi. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL’lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,3-0,6 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (13-18 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (14-19 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Elektrodeğirme yöntemi ile elde edilen nanofiberlerin suda çözünmemesi için glutaraldehitin asetonunda hazırlanmış susuz çözeltisi ile çapraz bağlama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen hem ham hem de çapraz bağlı nanofiberlerin morfolojileri SEM cihazında belirlendi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.5. PCL/CH nanofiberlerin sentezi

Farklı derişimlerde PCL (%15, 20, 25) ve CH (%1 ve 2) polimer çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı. PCL diklorometan içerisinde CH ise formik asit içerisinde oda sıcaklığında tamamen çözünene kadar sürekli olarak karıştırıldı. PCL/CH nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler %PCL derişimi, %CH derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Tüm kombinasyonlarda, PCL ve CH çözeltileri eşit hacimde karıştırıldı. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL’lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi,

uygun bir enjeksiyon hızı (0,2-0,5 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (12-17 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (14-24 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Değişik koşullarda hazırlanan nanofiberler SEM cihazında analiz edildi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.6.PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerin sentezi

PCL derişimi (%20) ve CH derişimi (%2) sabit tutularak farklı derişimlerde Mn⁺² (%0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5) olacak şekilde polimer çözeltileri hazırlandı. Tüm kombinasyonlarda, Mn⁺² kaynağı olarak mangan (II) asetat tetrahidrat kullanıldı. PCL oda sıcaklığında diklorometan içerisinde çözüldü. Formik asit içerisinde önce mangan (II) asetat tetrahidrat tamamen çözüldükten sonra CH bu çözeltiliye ilave edildi ve oda sıcaklığında çözüne kadar sürekli karıştırıldı. PCL/CH/Mn⁺² nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler %Mn⁺² derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Hazırlanan çözeltiler eşit hacimde karıştırıldı. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL'lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,3-0,5 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (14-20 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (18-26 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Farklı Mn⁺² derişimlerinde hazırlanan ham nanofiberler SEM cihazında analiz edildi. En uygun fiber morfolojisine sahip nanofiberler belirlendi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.7.PVA/β-CD nanofiberlerin sentezi

Farklı derişimlerde PVA (%6 ve 7) ve β-CD (%1, 2, 3 ve 4) polimer çözeltileri birlikte hazırlandı. Öncelikle 60°C'de PVA tamamen çözüne kadar karıştırıldı. Daha sonra bu çözeltiliye β-CD ilave edildi ve 50°C'de homojen karışım elde edilene kadar karıştırıldı. Tamamen karışan polimer çözeltilere %1 oranında Triton X-100 ilave edildi. PVA/β-CD nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler %PVA derişimi, %β-CD derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası

uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL'lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,3-0,6 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (12-20 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (10-18 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Elektroğirme yöntemi ile elde edilen nanofiberlerin suda çözünmemesi için glutaraldehitin asetonda hazırlanmış susuz çözeltisi ile çapraz bağlama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen hem ham hem de çapraz bağlı nanofiberlerin morfolojileri SEM cihazında belirlendi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.2.3.8.PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerin sentezi

PVA derişimi (%6) ve β -CD derişimi (%3) sabit tutularak farklı derişimlerde Mn^{+2} (%0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5) olacak şekilde polimer çözeltileri hazırlandı. Tüm kombinasyonlarda, Mn^{+2} kaynağı olarak mangan (II) asetat tetrahidrat kullanıldı. Öncelikle PVA 60°C'de tamamen çözüldü, ardından bu çözeltiliye β -CD ilave edildi ve 50°C'de homojen karışım elde edilene kadar karıştırıldı. Elde edilen çözelti soğutuldu ve mangan (II) asetat tetrahidrat tamamen çözüne kadar sürekli karıştırıldı. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberleri hazırlamak için kullanılacak değişken parametreler % Mn^{+2} derişimi, uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı plaka arası uzaklık ve besleme ünitesi akış hızıdır. Hazırlanan polimer karışımları, 10 mL'lik şırıngaya dolduruldu. Şırınga, besleme ünitesine yerleştirildi, uygun bir enjeksiyon hızı (0,4-0,6 mL/sa) belirlendi ve polimer çözeltisi ile pozitif elektrot arasındaki bağlantı kuruldu. Oluşan nanofiberlerin toplanacağı plaka uygun bir uzaklığa (12-20 cm) yerleştirildi. Uygun elektrik alan oluşturabilmek için cihazın voltajı (12-18 kV) ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Elektroğirme yöntemi ile elde edilen nanofiberlerin suda çözünmemesi için glutaraldehitin asetonda hazırlanmış susuz çözeltisi ile çapraz bağlama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen hem ham hem de çapraz bağlı nanofiberlerin morfolojileri SEM cihazında belirlendi ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak nanofiberler için uygun koşullar belirlendi.

2.3.4. Nanofiberlerin karakterizasyonu

2.3.4.1. Taramalı elektron mikroskobu

Farklı koşullarda üretilen nanofiberleri, morfolojik olarak değerlendirebilmek için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezi'nde bulunan JEOL JSM-7600F model SEM cihazı kullanılarak yapıların SEM görüntüleri alındı.

2.3.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Nanofiberlerin kimyasal yapısı ve yüzey gruplarının belirlenmesi için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezi'nde bulunan Thermo Nicolet iS10 model FTIR cihazı kullanılarak IR analizleri yapıldı.

2.3.4.3. Termogravimetrik analiz

Nanofiberlerin termal davranışlarını belirlemek için, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezi'nde bulunan Perkin Elmer TGA 4000 kullanılarak, N₂ gazı koşulunda, 50-650°C sıcaklık aralığında termogravimetrik analizleri yapıldı.

2.3.4.4. X-Işını kırınım yöntemi (XRD)

Nanofiberlerin yapısal analizlerini belirlemek için, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezi'nde bulunan Rigaku SmartLab marka X-ışını difraktometresi kullanılmıştır.

2.3.5. Nanofiberlere arginaz immobilizasyonunun optimizasyonu

Arginaz enziminin nanofiberlere immobilizasyonu için adsorpsiyon ve ardından glutaraldehit (GA) çapraz bağlama yöntemleri kullanıldı. Arginaz immobilizasyon koşullarını optimize etmek amacıyla arginaz miktarı (0,1-4 U/mL); nanofiber miktarı (2,5-15 mg); adsorpsiyon süresi (5-30 dk) ve GA derişimi (%1-5) parametreleri belirlendi.

2.3.5.1. Arginaz miktarının belirlenmesi

Derişimleri 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 ve 4 U/mL olan pH 7,5 TBS tamponunda hazırlanan arginaz enzim çözeltileri, 20 dk boyunca 10 mg nanofiberler ile muamele edilerek, arginaz enziminin nanofiberlere adsorpsiyonu sağlandı. Daha sonra ortama, derişimi %2 olacak şekilde GA ilave edilerek, 20 dk süreyle çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Süpernatantlar, ayrıldıktan sonra, fazla GA'nın ortamdan uzaklaştırılması için üç kez pH 7,5 TBS tamponu ile arginaz immobilize nanofiberler yıkandı. Süpernatantta kalan protein, Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin aktivitesi, arginaz enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak tespit edildi.

2.3.5.2. Nanofiber miktarının belirlenmesi

pH 7,5 TBS tamponunda optimize edilen derişimde arginaz enzimi hazırlandı. 20 dakika boyunca 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 ve 20 mg nanofiberler ile muamele edildi ve arginaz enziminin nanofiberlere adsorpsiyonu sağlandı. Daha sonra ortama, derişimi %2 olacak şekilde GA ilave edilerek, 20 dk süreyle çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Süpernatantlar, ayrıldıktan sonra, fazla GA'nın ortamdan uzaklaştırılması için üç kez pH 7,5 TBS tamponu ile arginaz immobilize nanofiberler yıkandı. Süpernatantta kalan protein, Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin aktivitesi, arginaz enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak tespit edildi.

2.3.5.3. Adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

pH 7,5 TBS tamponunda optimize edilen derişimde arginaz enzimi hazırlandı. 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk sürelerde optimize edilen miktardaki nanofiber ile muamele edilerek, arginaz enziminin nanofiberlere adsorpsiyonu sağlandı. Daha sonra ortama, derişimi %2 olacak şekilde GA ilave edilerek, hangi adsorpsiyon süresinde çalışılıyorsa o süre kadar çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi Süpernatantlar, ayrıldıktan sonra, fazla GA'nın ortamdan uzaklaştırılması için üç kez pH 7,5 TBS tamponu ile arginaz immobilize nanofiberler yıkandı. Süpernatantta kalan protein, Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Serbest arginaz ve arginaz immobilize

nanofiberlerin aktivitesi, arginaz enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak tespit edildi.

2.3.5.4. Glutaraldehit (GA) derişimin belirlenmesi

pH 7,5 TBS tamponunda optimize edilen derişimde arginaz enzimi hazırlandı. Optimize edilen süre boyunca optimize edilen miktardaki nanofiber ile muamele edilerek, arginaz enziminin nanofiberlere adsorpsiyonu sağlandı. Daha sonra ortama, derişimi, %1, 2, 3, 4 ve 5 olacak şekilde GA ilave edilerek, optimize edilen süre kadar çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Süpernatantlar, ayrıldıktan sonra, fazla GA'nın ortamdaki uzaklaştırılması için üç kez pH 7,5 TBS tamponu ile arginaz immobilize nanofiberler yıkandı. Süpernatantta kalan protein, Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin aktivitesi, arginaz enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak tespit edildi.

2.3.6. Nanofiberlere immobilize arginazın karakterizasyonu

Optimum koşullarda hazırlanan arginaz immobilize nanofiberlerin karakterizasyonu için; optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik incelendi.

2.3.6.1. Optimum sıcaklık

Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin optimum sıcaklıklarını belirlemek amacıyla, pH 7,5 TBS tamponunda, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'de aktivite tayinleri yapıldı. Aynı koşullarda serbest arginaz enzimi için yapılan analizler ile belirlenen sonuçlar kıyaslandı. %Bağıl aktivite ise denklem 2.3 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{Bağıl Aktivite} = \frac{\text{Çalışılan sıcaklıktaki aktivite}}{\text{Optimum sıcaklıktaki aktivite}} \times 100 \quad (2.3.)$$

2.3.6.2. Optimum pH

Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin optimum pH'larını belirlemek amacıyla; her birinin derişimi 50 mM olan pH 3,0 sitrat tamponunda, pH 4,0 ve 5,0 asetat tamponunda, pH 6,0; 7,0 ve 8,0 fosfat tamponunda, pH 9,0 ve 10,0 Tris-HCl

tamponunda, pH 11,0 ve 12,0 glisin tamponunda aktivite tayinleri yapıldı. Aynı koşullarda serbest arginaz enzimi için yapılan analizler ile belirlenen sonuçlar kıyaslandı. %Bağıl aktivite ise denklem 2.4 kullanılarak hesaplandı.

$$\%Bağıl\ Aktivite = \frac{\text{Çalışılan pH'daki aktivite}}{\text{Optimum pH'daki aktivite}} \times 100 \quad (2.4.)$$

2.3.6.3. pH kararlılığı

Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin pH kararlılıklarını incelemek amacıyla; hazırlanan immobilize arginaz sistemleri her birinin derişim 50 mM olan, pH 3,0 sitrat tamponunda, pH 4,0 ve 5,0 asetat tamponunda, pH 6,0; 7,0 ve 8,0 fosfat tamponunda, pH 9,0 ve 10,0 Tris-HCl tamponunda, pH 11,0 glisin tamponunda 1 saat bekletildi ve hemen ardından aktivite tayinleri yapıldı. Aynı koşullarda serbest arginaz enzimi içinde pH kararlılık denemeleri yapıldı ve immobilize enzim sonuçları ile kıyaslandı. %Bağıl aktivite ise, denklem 2.5. kullanılarak hesaplandı.

$$\%Bağıl\ Aktivite = \frac{\text{Çalışılan pH'da inkübasyon sonrası kalan aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (2.5.)$$

2.3.6.4. Termal kararlılık

Serbest arginaz ve arginaz immobilize nanofiberlerin termal kararlılıklarını incelemek amacıyla; sıcaklıkları 4, 30, 37, 40, 45, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'de sabit olan su banyolarında 1 saat inkübe edildi ve hemen ardından aktivite tayinleri yapıldı. %Bağıl aktivite ise, denklem 2.6. kullanılarak hesaplandı.

$$\%Bağıl\ Aktivite = \frac{\text{Çalışılan sıcaklıkta inkübasyon sonrası kalan aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (2.6.)$$

2.3.6.5. Kinetik sabitlerin belirlenmesi

5-50 mM derişim aralığında L-arginin kullanılarak arginaz immobilize nanofiberlerin ve serbest arginaz aktiviteleri standart aktivite koşullarında tayin edildi. Lineweaver-Burk diyagramında K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

2.3.6.6. Tekrar kullanılabilirlik

Arginaz immobilize nanofiberlerin aktivite tayinleri ardışık olarak standart aktivite tayin koşullarında tayin edildi. %Bağıl aktivite ise, denklem 2.7. kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{Bağıl Aktivite} = \frac{\text{Tekrar kullanım sonrası kalan aktivite}}{\text{Başlangıç aktivitesi}} \times 100 \quad (2.7.)$$

2.3.7. Geri döngülü kolon sistemi ile L-ornitin üretimi

Aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan arginaz immobilize PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiber membranlar ile Şekil 2.4.'de verilen geri döngülü kolon sistemi kuruldu. Bu sistem çift çeperli kolon, rezervuar, peristaltik pompa ve su banyosundan oluşturuldu. Kolon, arginaz immobilize PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiber membranlar ile dolduruldu ve kolonun dış çeperinden 45°C'de sabit sıcaklıkta su sirkülasyonu sağlandı. 100 mL 50 mM pH'ı 8,0 olan L-arginin çözeltisi rezervuara koyuldu ve bu substrat çözeltisi sürekli manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Akış hızı ise 1 mL/dk olarak ayarlandı ve pompa çalıştırıldı. Başlangıçta ve reaksiyon boyunca belirli zaman aralıklarında rezervuar içinden örnekler alındı. Her döngü sonunda substrat çözeltisi yenilendi ve ölçümler tekrar alındı.



Şekil 2.4. Geri döngülü kolon sistemi

3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Elektroeğirme yönteminde nanofiberlerin morfolojisi ve homojenliği; polimer çözeltisi parametreleri, işlem parametreleri ve ortam parametreleri olmak üzere üç ana başlık göz önüne alınarak belirlenir (Ramakrishna vd., 2005; Li ve Wang, 2013). Bu tez çalışmasında ise homojen fiberler elde edebilmek için optimizasyon parametreleri olarak; uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı arasındaki uzaklık, polimer derişimi ve polimer karışımının akış hızı araştırıldı. CA/PVP için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.'de verildi. Elektroeğirilmiş CA/PVP nanofiberler için, optimum koşullar olarak %12,5 CA derişimi, %5 PVP derişimi, 15 kV uygulama voltajı, 15 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,4 mL/sa polimer akış hızı belirlendi.

Çizelge 3.1. CA/PVP nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

CA derişimi (%)	PVP derişimi (%)	CA/PVP oranı (v/v)	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
7,5	2,5	50:50	13	17	0,3	-
7,5	2,5	50:50	15	18	0,4	-
7,5	2,5	50:50	17	15	0,5	-
10	2,5	50:50	13	15	0,3	-
10	2,5	50:50	15	16	0,3	-
10	2,5	50:50	16	18	0,4	+
10	2,5	50:50	17	20	0,5	-
10	5	50:50	13	15	0,3	-
10	5	50:50	15	15	0,3	+
10	5	50:50	16	17	0,4	+
10	5	50:50	17	18	0,4	-
12,5	2,5	50:50	13	15	0,3	-
12,5	2,5	50:50	15	17	0,4	-
12,5	2,5	50:50	16	20	0,3	+
12,5	2,5	50:50	17	18	0,4	++
12,5	5	50:50	13	15	0,3	+
12,5	5	50:50	15	17	0,4	+
12,5	5	50:50	15	15	0,3	+++
12,5	5	50:50	16	18	0,4	++
12,5	5	50:50	17	20	0,4	-

*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroeğirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

Elektroçirilmiş CA/PVP/Mn⁺² için ise CA/PVP nanofiberler için belirlenen optimum polimer derişimleri sabit tutularak Mn⁺² derişimi, uygulanan voltaj, iğne-kollektör uzaklığı ve polimer akış hızı parametreleri için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. CA/PVP/Mn⁺² için ise elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.'de verildi. Elektroçirilmiş CA/PVP/Mn⁺² nanofiberler için optimum koşullar olarak % 12,5 CA derişimi, %5 PVP derişimi, %0,1 Mn⁺², 17 kV uygulama voltajı, 15 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,6 mL/sa polimer akış hızı belirlendi.

Çizelge 3.2. CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

CA derişimi (%)	PVP derişimi (%)	Mn ⁺² derişimi (%)	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
12,5	5	0,1	15	15	0,3	-
12,5	5	0,1	17	15	0,4	+
12,5	5	0,1	17	15	0,5	++
12,5	5	0,1	17	15	0,6	+++
12,5	5	0,2	17	15	0,6	-
12,5	5	0,2	19	15	0,4	+
12,5	5	0,2	19	17	0,5	++
12,5	5	0,2	19	20	0,6	+
12,5	5	0,3	17	15	0,5	+
12,5	5	0,3	17	15	0,6	+
12,5	5	0,3	19	13	0,5	++
12,5	5	0,3	19	15	0,6	+
12,5	5	0,4	17	15	0,5	+
12,5	5	0,4	19	15	0,6	++
12,5	5	0,4	19	17	0,5	+
12,5	5	0,4	19	20	0,6	+

*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroçirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

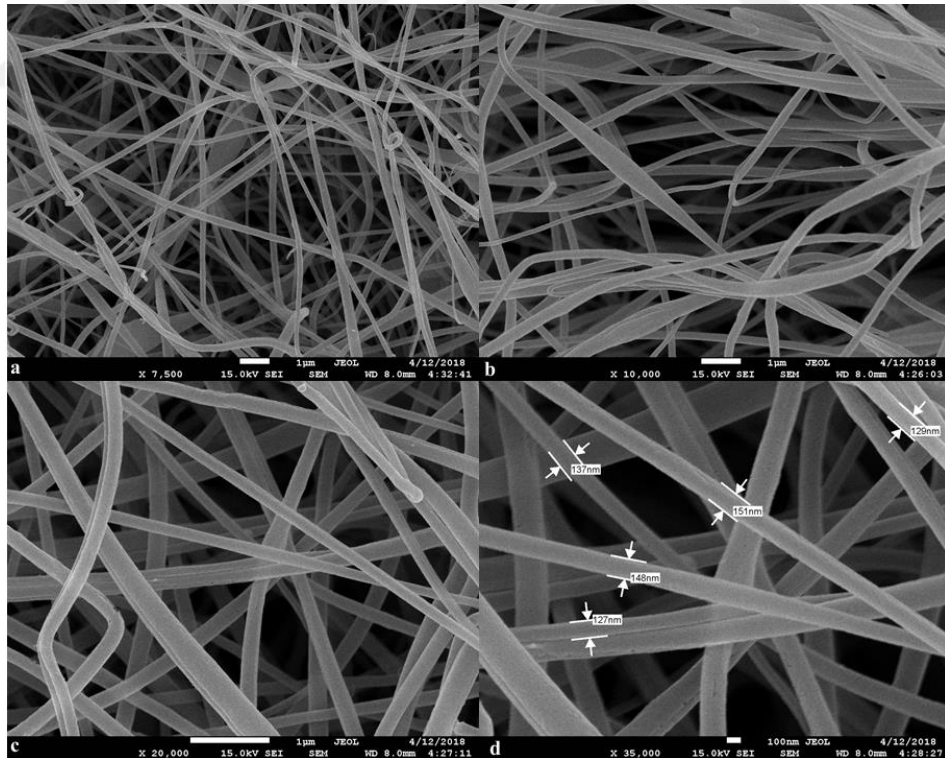
CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların optimizasyon parametreleri karşılaştırıldığında CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların üretimi için daha yüksek voltaj ve daha yüksek akış hızı kullanıldı. Her iki nanofiber membran üretiminde polimer derişimleri aynı derişimde olmasına rağmen CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlere %0,1 Mn⁺² metali ilave edildi. Bunun sonucunda polimer çözeltisinin viskozitesinde artış gözlemlendi ve bu nedenle CA/PVP/Mn⁺² nanofiberi üretmek için daha yüksek voltaj ve akış hızı uygulandı. CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerini üretmek için farklı derişimlerde Mn⁺² (%0,1-0,4) kullanıldı ve çalışılan tüm derişimlerde nanofiber oluştuğu gözlemlendi. Bu nedenle en iyi fiber oluşumunun gözlemlendiği dört fiberinde SEM görüntüsü alındı. Sem görüntüleri incelendiğinde polimer çözelti içindeki Mn⁺² derişimi arttıkça yapıda

bozulmalar meydana geldiği ve boncuk oluşumunun arttığı görüldü. Bu nedenle optimum Mn^{+2} derişimi %0,1 olarak belirlendi.

Bu aşamanın ardından en uygun parametrelerle hazırlanmış nanofiberlerin SEM, FTIR, TGA ve XRD karakterizasyonu gerçekleştirildi.

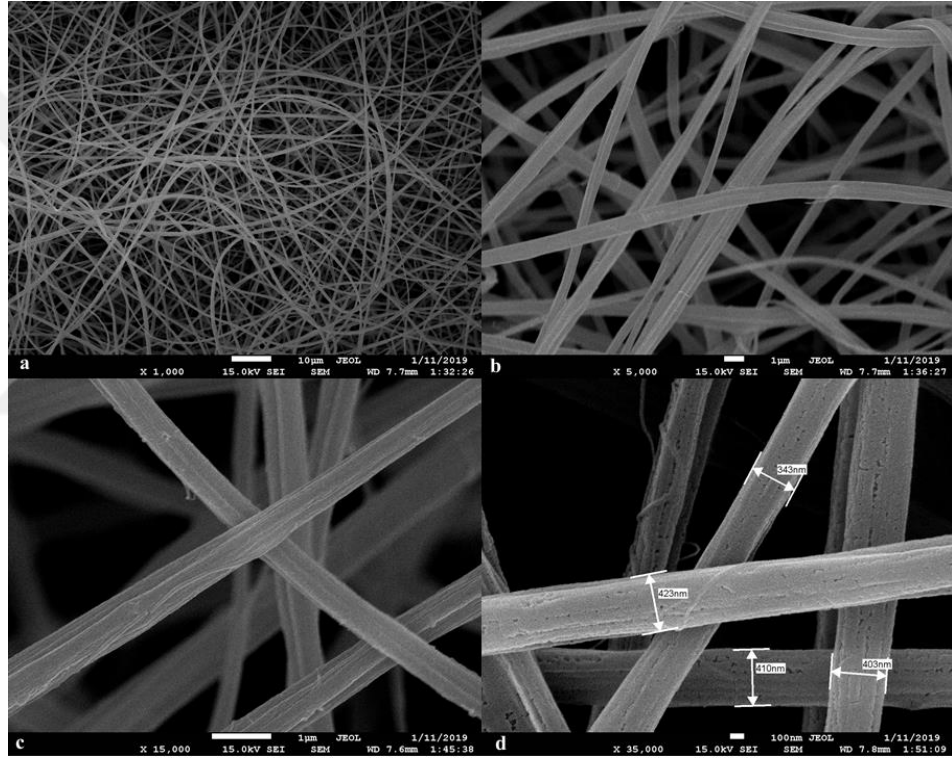
3.1.1. Sem analizi

Elektroeğirme yöntemiyle üretilmiş nanofiberlerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılır. Optimizasyon parametreleri belirlenen CA/PVP ve CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranların SEM görüntüleri Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verildi. CA/PVP nanofiberlerine ait SEM görüntüleri Şekil 3.1.'de farklı büyütme oranlarında gösterildi. Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi, fiberlerin neredeyse aynı çapa sahip oldukları, gelişigüzel konumlandığı, yuvarlak hatlı oldukları, pürüzsüz, boncuksuz olduğu ve ortalama çaplarının 121-151 nm civarında olduğu görüldü. CA/PVP nanofiberler yüzeylerinin gözeneksiz olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.1. CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x7,500 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlerine ait SEM görüntüleri ise Şekil 3.2.'de farklı büyütme oranlarında gösterildi. Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi, fiberlerin rastgele konumlandığı, hafif pürüzlü, yuvarlak hatlı, boncuk oluşumunun gözlenmediği ve ortalama çaplarının 343-423 nm civarında olduğu görüldü. CA/PVP/Mn²⁺ nanofiber yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü. CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlerin yarıçapı CA/PVP nanofiberlerin çapına göre arttığı gözlemlendi. Mn²⁺ ilavesi sonucu polimer çözeltisinin viskozitesinde artış gözlemlendi. Bunun sonucu olarak elde edilen nanofiberlerin çaplarının arttığı görüldü. Literatürde polimer çözeltisinin viskozitesinin artması sonucu daha büyük fiber çapına sahip nanofiberlerin oluştuğu çalışmalar mevcuttur (Fong vd., 1999).

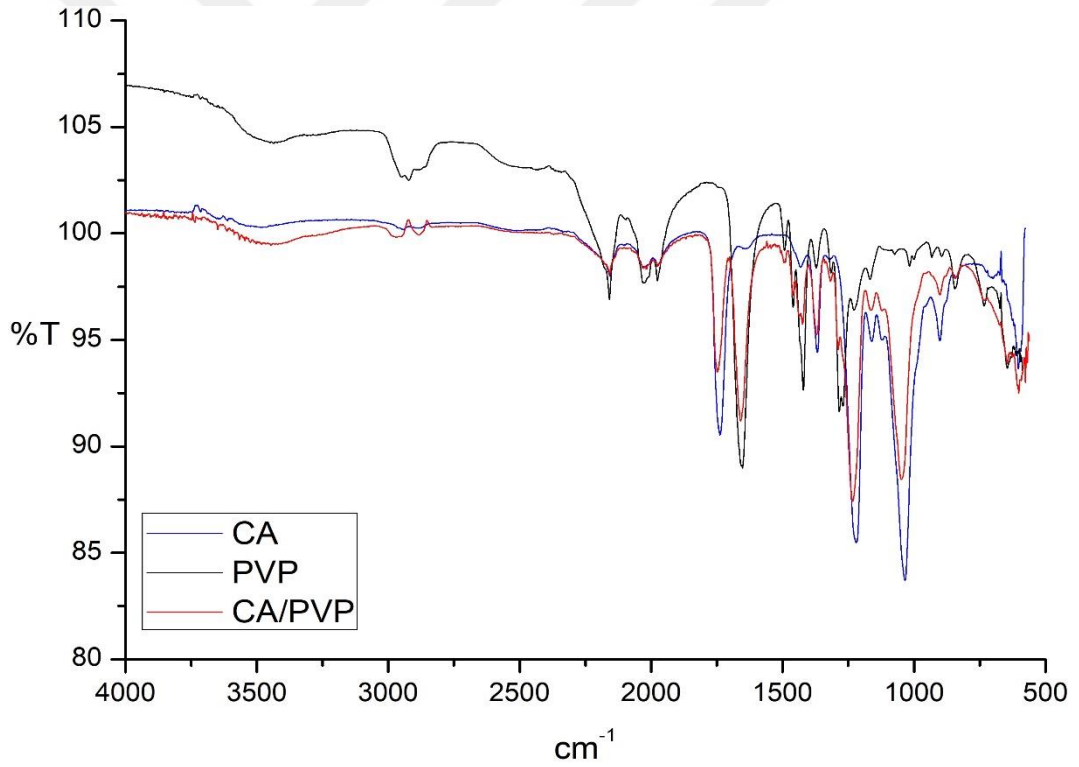


Şekil 3.2. CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x5,000 (c) x15,000 (d) x35,000 büyütme oranlarıyla

3.1.2. ATR-FTIR analizi

Bu tez çalışmasında elektroçirme yöntemiyle sentezlenen nanofiber membran yapılarının içerisinde bulunan polimerlerin etkileşimlerini incelemek için yapıların IR spektrumlarında bulunan piklerdeki kaymayı gözlemlemek amacıyla ATR eklentili FTIR cihazı kullanıldı.

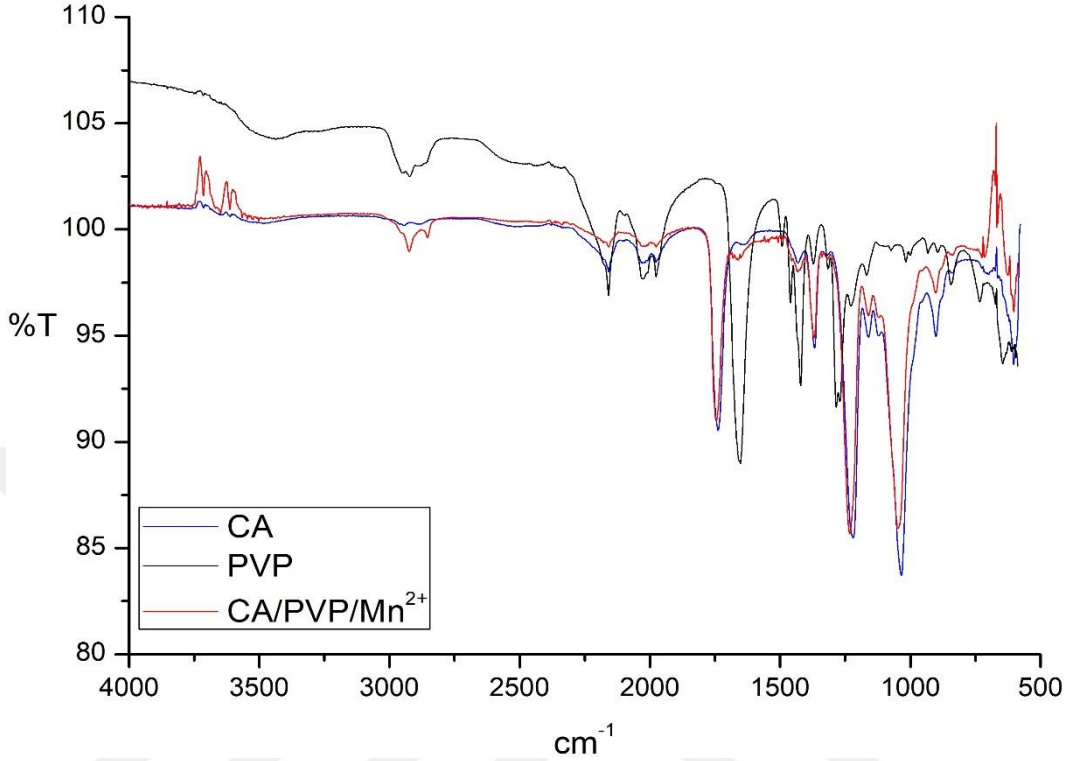
Ham CA, ham PVP ve CA/PVP nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları Şekil 3.3.'de verildi. CA'ya ait spektrumlarında 3486 cm^{-1} 'de -OH gerilme piki, 1740 cm^{-1} 'de C=O, 1368 cm^{-1} 'de asetat süstitüent gruplarında bulunan CH_3 deformasyonu sonucu oluşan bükülme titreşimleri, 1220 cm^{-1} ve 1035 cm^{-1} 'de ise C-O gerilimine bağlı iki pik gözlemlendi. PVP'ye ait spektrumlarında ise 3445 cm^{-1} 'de N-H gerilme pikleri, 2920 cm^{-1} 'de C-H gerilme pikleri, 1655 cm^{-1} 'de C=O gerilme piki, 1420 cm^{-1} 'de C-N gerilme pikleri ve 1285 cm^{-1} 'de ise $-\text{CH}_2$ gerilmesinden kaynaklanan pikler gözlemlendi. CA/PVP nanofiber membranları yapısına ait ATR-FTIR spektrumlarına bakıldığında ham CA ve ham PVP'ye ait piklerde çok az miktarda kaymalar olsa da korunduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatürde daha önce yapılan bir çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Buna göre, PVP'nin karbonil grubunun (proton alıcı olarak görev yapan) ve CA'daki hidroksil grubunun (proton donör olarak görev yapan) hidrojen bağları oluşturma eğiliminde olduğunu göstermiştir (Hou vd, 2018).



Şekil 3.3. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

Ham CA, ham PVP ve CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları ise Şekil 3.4.'de verildi. CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranların yapısına ait ATR-FTIR spektrumlarına bakıldığında 3486 cm^{-1} 'de -OH gerilme pikleri, 3445 cm^{-1} 'de N-H gerilme pikleri ve 1655 cm^{-1} 'de C=O piklerinin genişlediği ve zayıfladığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar Mn^{+2} iyonlarının CA ve PVP molekülleri arasında

bazı etkileşimlerin olduğunu gösterdi. Bu etkileşimlerin de Mn^{2+} iyonları ile CA'nın -OH grupları ve PVP'nin C=O grupları arasında koordinasyon yoluyla oluştuğu söylenebilir.



Şekil 3.4. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP/ Mn^{2+} nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

3.1.3. TGA analizi

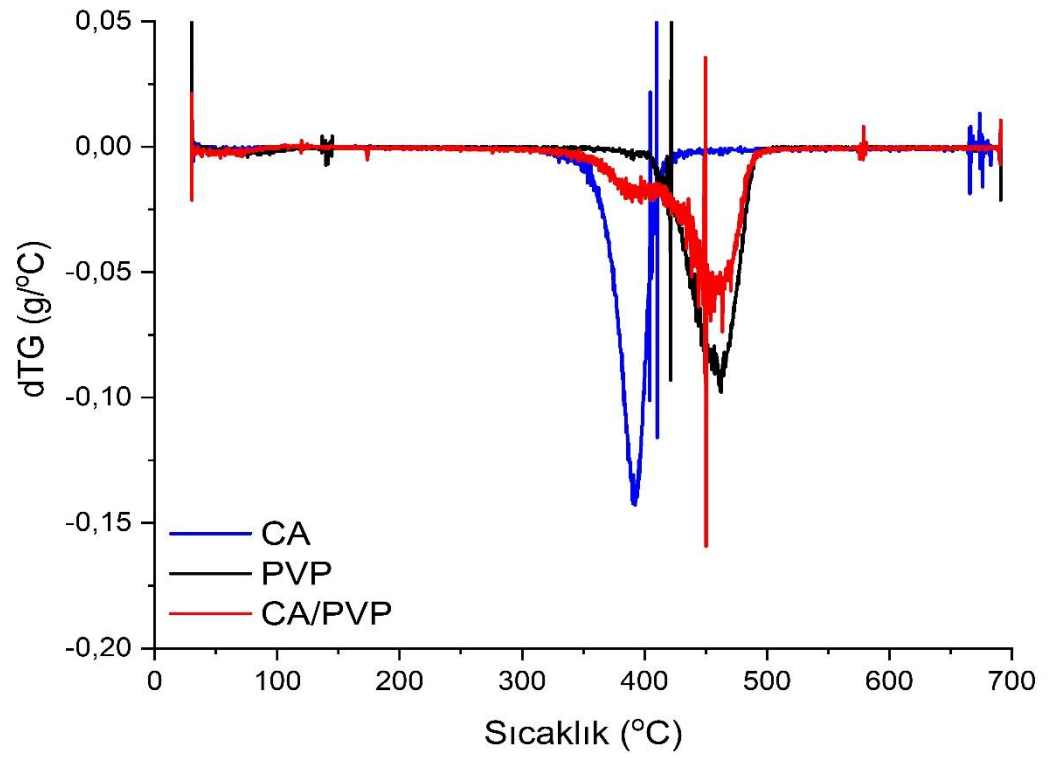
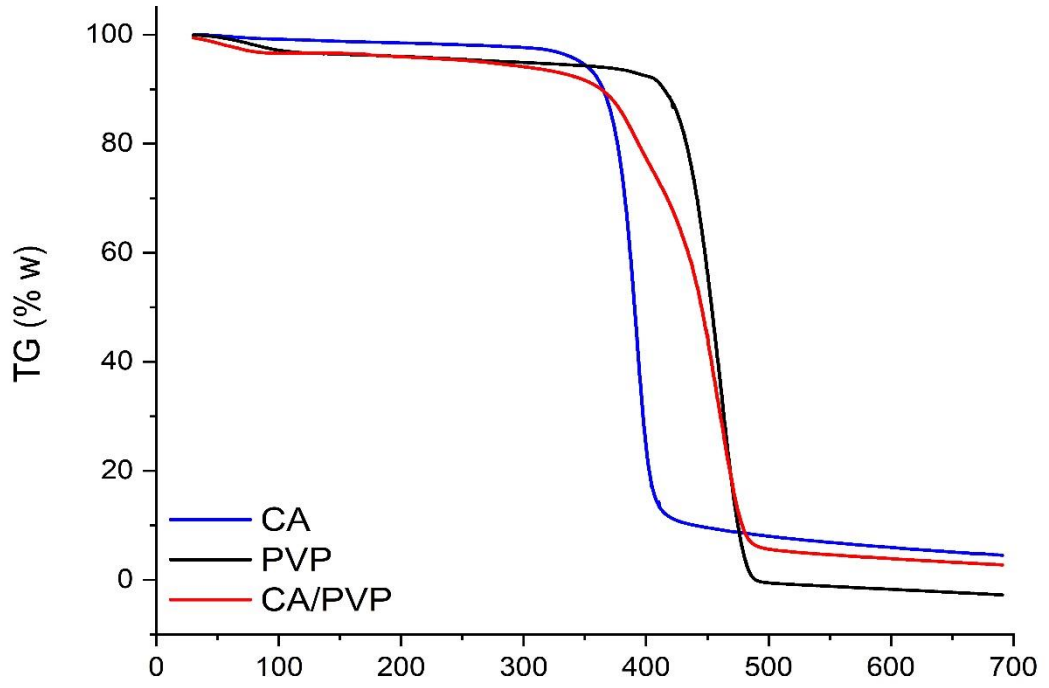
CA, PVP ve CA/PVP nanofiber yapılarına ait TG ve dTG eğrileri Şekil 3.5.'de verildi. Analizler 20°C/dk sabit ısıtma hızında, 50-700°C arasında Perkin Elmer TGA 4000 marka termo-gravimetrik analiz cihazı ile yapıldı. Termal analiz yöntemleri ile fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerin yanı sıra polimerin içerdiği kül miktarı ve varsa modifikasyonlar hakkında önemli bilgilere ulaşılabilir.

Ham CA'nın yapısı için TG eğrisi incelendiğinde üç adımlı bir bozunma eğrisi görüldü. İlk adımda ham CA yapısı için 330°C sıcaklığın altındaki kütlede %4'lük bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın nedeni yapıda bulunan uçucu maddelerin ve/veya absorplanan nemin uzaklaşmasından kaynaklanıyor olabilir. 2. aşamada 330-430°C sıcaklıkları arasında ilk kütlede yaklaşık %90'ı yapıdan uzaklaştı. Bu aşamada sıcaklıktan dolayı selüloz asetat zincirlerinin ana termal bozunma reaksiyonlarının gerçekleştiği literatürde belirtilmektedir (Arthanareeswaran vd., 2004). 3. aşamada 430-700°C sıcaklıkları arasında gerçekleşti ve ilk kütlede %96'sı yapıdan uzaklaştığı

görüldü. Deney bittikten sonra yapının kül kalıntı miktarı ise %4 olarak bulundu. CA için bulunan bu üç adımlı bozunma eğrisi Chatterjee (1968) tarafından selüloz bazlı malzemelerin termal bozunması için önerilen adımlara karşılık gelmektedir. dTG eğrisinde ise CA'nın maksimum degradasyon sıcaklığı 390°C olarak tespit edildi.

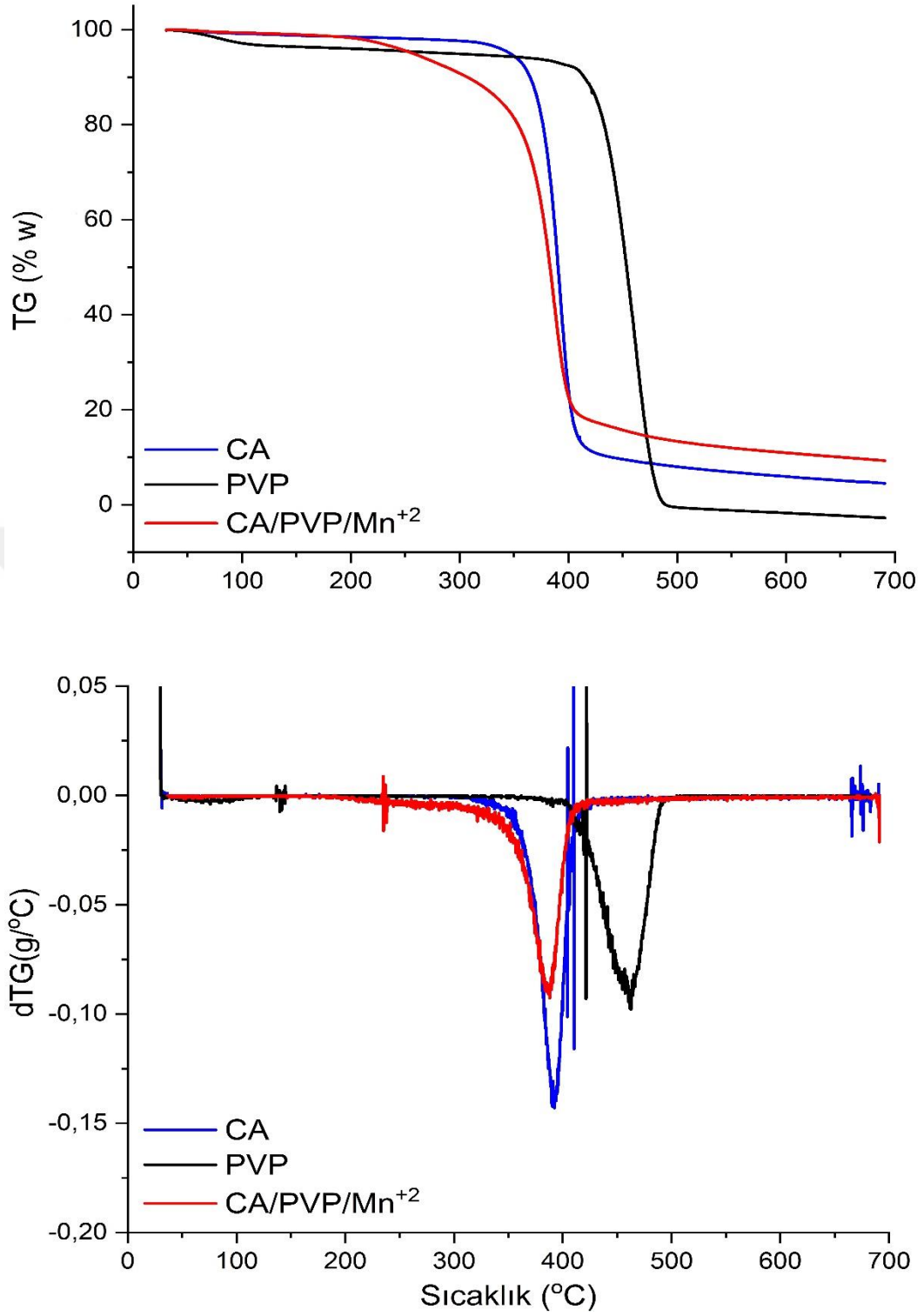
Ham PVP'nin yapısı için TG eğrisi incelendiğinde üç adımlı bir bozunma eğrisi görüldü. İlk adımda ham PVP yapısı için 95°C sıcaklığın altında kütlede %3'lük bir azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma yapıda bulunan nem içeriğinden kaynaklanmış olabilir. 2. aşamada 95-390°C sıcaklıkları arasında ilk kütlede yaklaşık %8'i yapıdan uzaklaştı. Bu aşamada sıcaklık artışıyla yapıda bulunan oligomerlerin, düşük molekül ağırlıklı maddelerin, nemin ve artık çözücünün yapıdan ulaşmasından dolayı kütle kaybının gerçekleştiği literatürde belirtilmektedir (Gasaymeh vd., 2010). 3. aşama 390-488°C sıcaklıkları arasında gerçekleşti ve ilk kütlede tamamı uzaklaştı ve yapısal polimer tamamen bozundu. dTG eğrisinde ise PVP'nin maksimum degradasyon sıcaklığı 460°C olarak tespit edildi.

CA/PVP nanofiber membran yapısına ait olan eğrilere bakıldığında polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapıdaki farklılıklardan ve polimerler arasındaki etkileşimlerden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 83°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %3'lük bir kütle azalması görüldü. 95-340°C arasında ilk kütlede %7,5'i yapıdan uzaklatıldığı görüldü. Bu azalma, yapıda bulunan düşük ağırlıklı maddelerin ve oligomerlerin, nem ve çözücünün yapıdan uzaklaşmasından kaynaklanmış olabilir. 340-485°C arasında kütle sabit bir oranda azalma göstermiş ve diğer polimerlere oranla daha yumuşak gerçekleşmiştir. İlk kütlede göre %93'lük bir bozunma gözlemlendi. Bu durum -OH, C=O ve -NH grupları arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanmış olabilir. 700°C'de yapının kül kalıntı miktarı ise %3 olarak bulundu. dTG eğrisinde CA/PVP nanofiber membran yapısı için 390°C ve 455°C olmak üzere iki tepe noktası görülmektedir. Maksimum degradasyon sıcaklığı ise 455°C olarak tespit edildi. CA/PVP nanofiber membran yapısı ham CA ve ham PVP'ye göre daha yüksek termal kararlılığa sahiptir bu durum nanofiberlerin yapısında bulunan CA ve PVP arasındaki muhtemel çoklu nonkovalent etkileşimlerle açıklanabilir.



Şekil 3.5. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

CA, PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber yapılara ait TG ve dTG eğrileri ise Şekil 3.6.'da verildi. CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların yapısına ait olan eğrilere bakıldığında ise polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapılarıdaki farklılıklardan, polimerler arasındaki etkileşimlerden ve Mn⁺² iyonlarının polimerlerle yaptığı muhtemel çoklu nonkovalent etkileşimlerden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 200°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %2'lik bir kütle azalımı görüldü. 200-410°C arasında kütle sabit bir oranda azalma gösterdi ve CA, PVP ve CA/PVP nanofiber membran yapılara oranla daha yumuşak gerçekleştiği görüldü. İlk kütleyle göre %81'lik bir azalma gözlemlendi. Bu durum hem -OH, C=O ve -NH grupları arasında oluşan hidrojen bağından hem de Mn⁺² iyonlarının CA ve PVP ile koordinasyonundan kaynaklanmış olabilir. 410-700°C arasında ise kayda değer bir kütle kaybı gözlemlenmedi. Bunun nedeni yapıdaki PVP'nin 488°C'de tamamen bozulmasından ve yapıda sadece metal kalıntılarının kalmasından dolayı olabilir. 700°C'nin sonunda yapının kül kalıntı miktarı ise %9 olarak bulundu. dTG eğrisinde CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membran yapısı için maksimum degradasyon sıcaklığı ise 390°C olarak tespit edildi. CA/PVP nanofiber yapısının bozunma sıcaklığı CA/PVP/Mn⁺² nanofiber yapısına göre daha yüksek bulundu. Bunun nedeni yapıda bulunan Mn⁺² iyonlarının yapının bozunmasında katalizör görevi görmüş olmasından kaynaklanıyor olabilir.

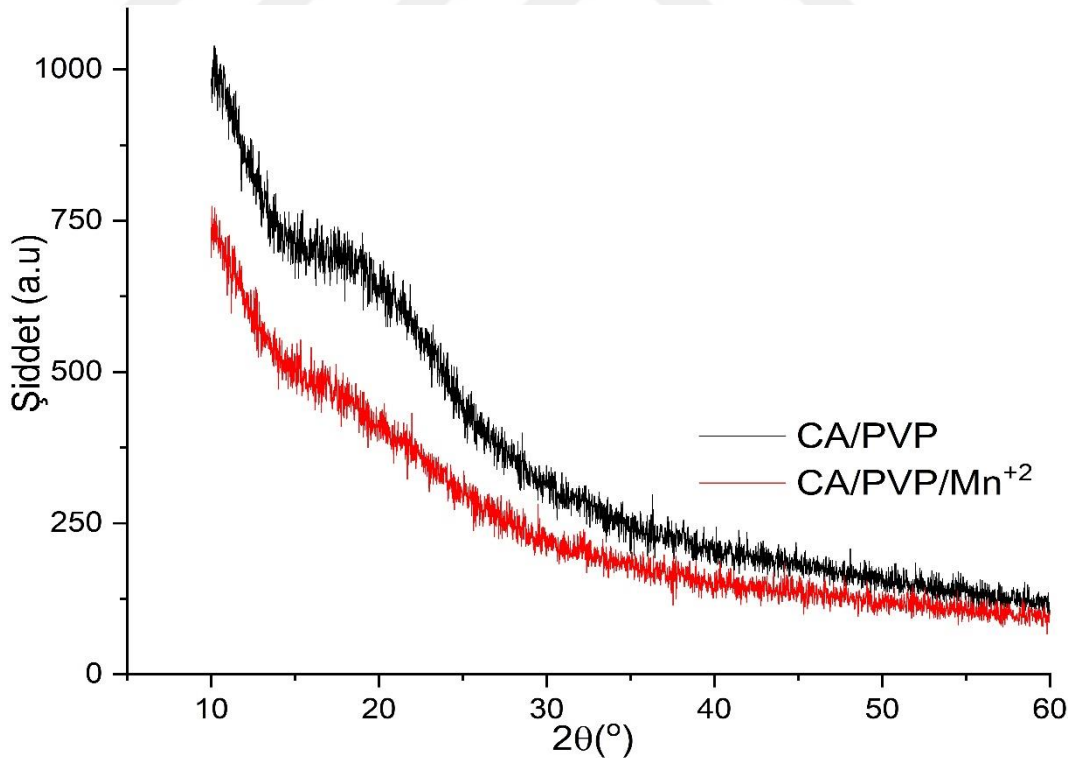


Şekil 3.6. Ham CA, ham PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

3.1.4. XRD analizi

CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiber membranlarına ait XRD spektrumları Şekil 3.7.'de verildi. CA/PVP nanofiber membranına ait spektrumun incelendiğinde keskin

olmayan ve $2\theta=19,6^\circ$ 'de bir omuz verdiği görüldü. Elde edilen spektruma bakarak CA/PVP nanofiberinin amorf bir yapıya sahip olduğu ve düzenli bir moleküler yapıya sahip olmadığı söylenebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada benzer bir sonuç elde edilmiştir (Syamsu vd., 2016). Yapıya Mn^{+2} ilavesi ile elde edilen CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranlara ait spektrum incelendiğinde $2\theta=19,6^\circ$ 'de görülen omuzun şiddetinin azaldığı gözlemlendi. Mn^{+2} iyonlarının dahil edilmesinden dolayı polimer çözeltisinin iletkenliği ve nanofiber yapısı değiştiği için, elde edilen CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiberinin kristal yapısı değiştiği şeklinde yorumlanabilir. CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber yapısına ait olan spektruma göre nanofiber yapının amorf yapıda olduğu ve düzenli bir moleküler yapıya sahip olmadığı şeklinde yorum yapılabilir. Ayrıca Mn^{+2} ilavesiyle sonucunda CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranına ait spektrum CA/PVP nanofiber membranı ile karşılaştırıldığında şiddette azalmalar görülmektedir. Bu durumun nedeni Mn^{+2} 'nin hem CA hem de PVP ile moleküler seviyede harmanlanmasından kaynaklandığı söylenebilir. Literatürde yapıya başka bir polimer ya da metal ilavesi ile pik şiddetinde azalma meydana gelen çalışmalar mevcuttur (Hassan vd., 2017; Hao vd., 2018).



Şekil 3.7. CA/PVP ve CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiberlerine ait XRD spektrumları

3.2. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında homojen fiberler elde edebilmek için optimizasyon parametreleri olarak; uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı arasındaki uzaklık, polimer derişimi ve polimer karışımının akış hızı araştırıldı. PVA/CH için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3.'de verildi. Elektroğirilmiş PVA/CH nanofiberler için, optimum koşullar olarak %6 PVA derişimi, %1 CH derişimi, 14 kV uygulama voltajı, 18 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,3 mL/sa polimer akış hızı belirlendi. PVA ve CH derişimi daha önce yapılan bir çalışmada belirlenen optimizasyon çalışmaları sonuçları dikkate alınarak %6 ve %1 olarak çalışıldı (Kutlu, 2017).

Çizelge 3.3. PVA/CH nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

PVA derişimi (%)	CH derişimi (%)	PVA/CH oranı (v/v)**	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
6	1	50:50	13	13	0.3	-
6	1	50:50	13	15	0.4	+
6	1	50:50	13	17	0.5	+
6	1	50:50	14	17	0.2	++
6	1	50:50	14	18	0.3	+++
6	1	50:50	14	19	0.4	+
6	1	50:50	15	15	0.2	+
6	1	50:50	15	17	0.3	++
6	1	50:50	15	19	0.4	+
6	1	50:50	16	15	0.3	+
6	1	50:50	16	17	0.4	++
6	1	50:50	16	19	0.5	+

*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroğirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

** Tüm çözeltilere %1 oranında Triton X-100 eklendi.

Elektroğirilmiş PVA/CH/Mn⁺² için ise PVA/CH nanofiberler için belirlenen optimum polimer derişimleri sabit tutularak Mn⁺² derişimi, uygulanan voltaj, iğne-toplayıcı uzaklığı ve polimer akış hızı parametreleri için optimizasyon çalışmaları yapıldı. PVA/CH/Mn⁺² için ise elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4.'de verildi. Elektroğirilmiş PVA/CH/Mn⁺² nanofiberler için optimum koşullar olarak %6 PVA derişimi, %1 CH derişimi, %0,2 Mn⁺², 17 kV uygulama voltajı, 14 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,5 mL/sa polimer akış hızı belirlendi. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların optimizasyon parametreleri karşılaştırıldığında PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların üretimi için daha yüksek voltaj, daha yüksek akış hızı ve daha

düşük iğne-toplayıcı uzaklığı kullanıldı. Her iki nanofiber membran üretiminde polimer derişimleri aynı derişimde olmasına rağmen PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere %0,2 Mn⁺² metali ilave edildi. Bunun sonucunda polimer çözeltisinin viskozitesinde artış gözlemlendi ve bu nedenle PVA/CH/Mn⁺² nanofiberi üretmek için daha yüksek voltaj ve akış hızı uygulandı. PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerini üretmek için farklı derişimlerde Mn⁺² (%0,1-0,4) kullanıldı ve çalışılan tüm derişimlerde nanofiber oluştuğu gözlemlendi. Bu nedenle en iyi fiber oluşumunun gözlemlendiği dört fiberinde SEM görüntüsü alındı. Sem görüntüleri incelendiğinde en iyi fiber yapısının Mn⁺² derişiminin %0,2 olduğu membranlarda gözlemlendi. Bu nedenle optimum Mn⁺² derişimi %0,2 olarak belirlendi. Bu aşamanın ardından en uygun parametrelerle hazırlanmış nanofiberlerin SEM, FTIR, TGA ve XRD karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2. PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

PVA derişimi (%)	CH derişimi (%)	Mn ⁺² derişimi (%)**	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (ml/sa)	*Gözlemler
6	1	0,1	14	18	0,3	-
6	1	0,1	15	15	0,4	-
6	1	0,1	16	15	0,5	++
6	1	0,1	17	17	0,6	+
6	1	0,2	15	15	0,3	-
6	1	0,2	17	14	0,5	+++
6	1	0,2	19	15	0,4	++
6	1	0,2	19	17	0,6	+
6	1	0,3	17	15	0,3	+
6	1	0,3	17	15	0,4	+
6	1	0,3	19	13	0,5	+
6	1	0,3	19	17	0,6	++
6	1	0,4	15	17	0,5	+
6	1	0,4	17	15	0,4	+
6	1	0,4	19	15	0,6	++
6	1	0,4	19	15	0,5	+

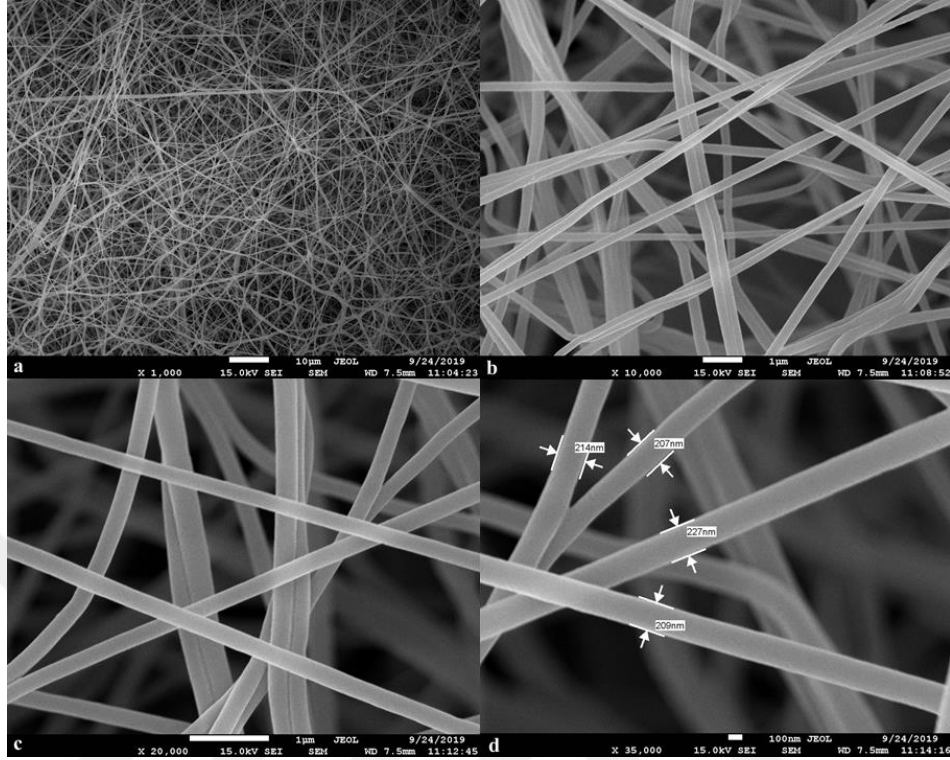
*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroçürme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

** Tüm çözeltilere %1 oranında Triton X-100 eklendi.

3.2.1. Sem analizi

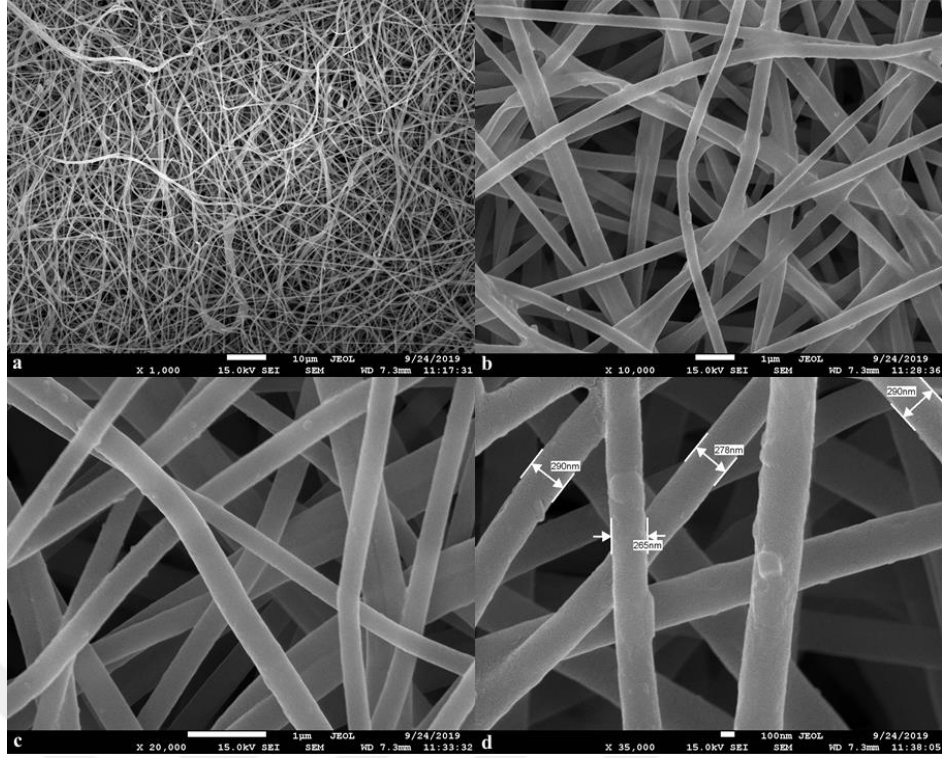
Optimizasyon parametreleri belirlenen PVA/CH nanofiber membranların SEM görüntüleri Şekil 3.8.'de farklı büyütme oranlarında verildi. Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi, fiberlerin neredeyse aynı çapa sahip oldukları, gelişigüzel konumlandığı, yuvarlak hatlı oldukları, pürüzsüz, boncuksuz olduğu ve ortalama çaplarının 207-227

nm civarında olduğu görüldü. PVA/CH nanofiber yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü.



Şekil 3.8. PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

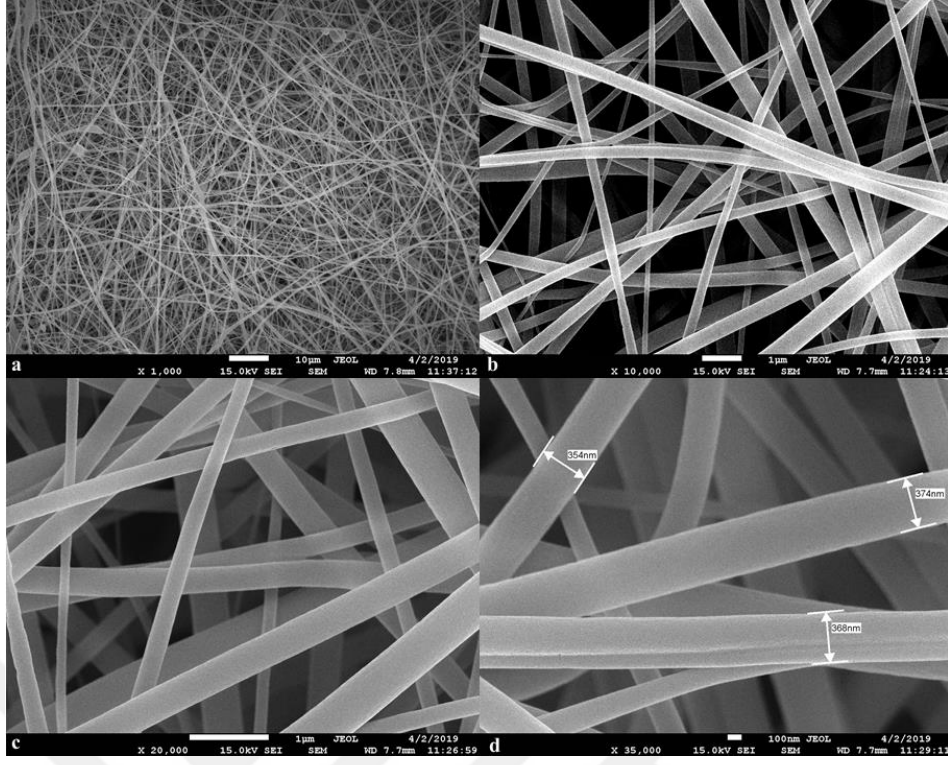
PVA/CH nanofiberleri suda çözündüğü için çapraz bağlama işlemi uygulanarak suda çözünürlüğü engellendi. Şekil 3.9.'da ise çapraz bağlama işlemi sonucu PVA/CH nanofiberlere ait SEM görüntüleri verildi. Çapraz bağlama işlemi sonrası, Şekil 3.9.'da görüldüğü gibi, nanofiberlerin rasgele konumlandığı, yuvarlak hatlı oldukları, pürüzsüz, boncuksuz olduğu, ortalama çaplarının büyüdüğü ve 265-290 nm civarında olduğu görüldü.



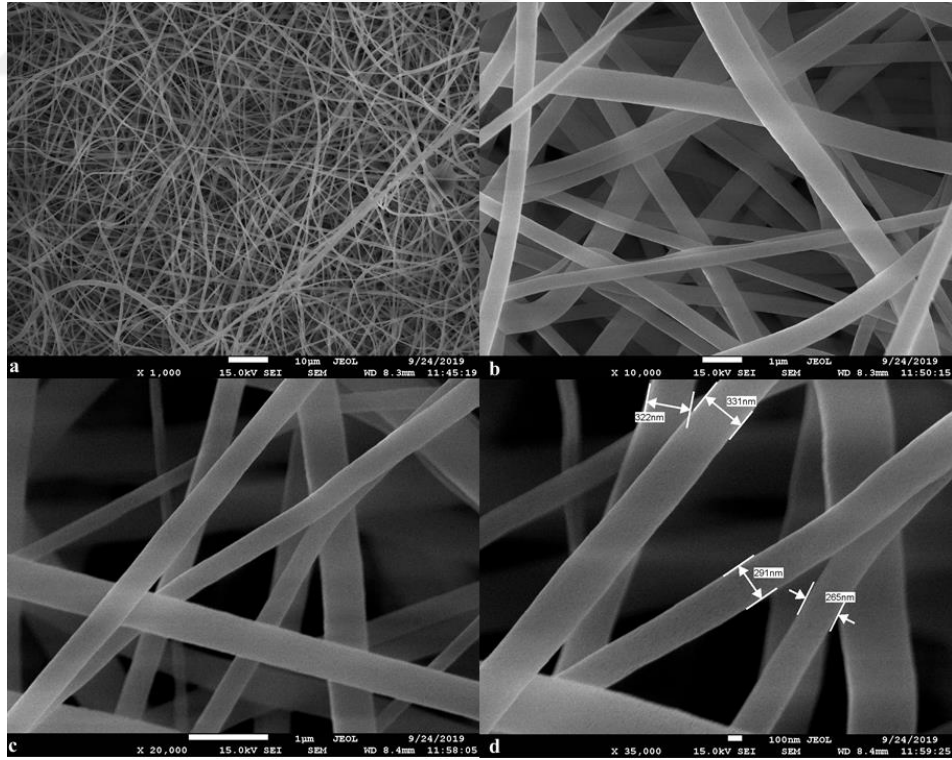
Şekil 3.9. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000(b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerine ait SEM görüntüleri ise Şekil 3.10.'da farklı büyütme oranlarında verildi. Şekil 3.10.'da görüldüğü gibi, fiberlerin rasgele konumlandığı, pürüzlü, yuvarlak hatlı, boncuk oluşumunun gözlenmediği ve ortalama çaplarının 354-374 nm civarında olduğu görüldü. PVA/CH/Mn⁺² nanofiber yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü. PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin çapı PVA/CH nanofiberlerin çapına göre arttığı görüldü. Mn⁺² ilavesi sonucu polimer çözeltisinin viskozitesi artması nedeniyle elde edilen nanofiberlerin yarıçaplarının arttığı gözlemlendi. Literatürde polimer çözeltisinin viskozitesinin artması sonucu daha büyük fiber çapına sahip nanofiberlerin oluştuğu çalışmalar mevcuttur (Fong vd., 1999).

PVA/CH/Mn⁺² nanofiberleri suda çözündüğü için çapraz bağlama işlemi uygulanarak suda çözünürlüğü engellendi. Şekil 3.11.'de ise çapraz bağlama işlemi sonucu PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere ait SEM görüntüleri verildi. Çapraz bağlama işlemi sonrası, Şekil 3.11.'de görüldüğü gibi, nanofiberlerin homojen yapılarını, yuvarlak hatlarını korudukları ve çapraz bağlama işleminden önce pürüzlü olan yapılarının çapraz bağlama işlemi sonrası pürüzsüzleştiği görüldü. Ayrıca ortalama çaplarının küçülerek 265-322 nm civarında olduğu gözlemlendi.



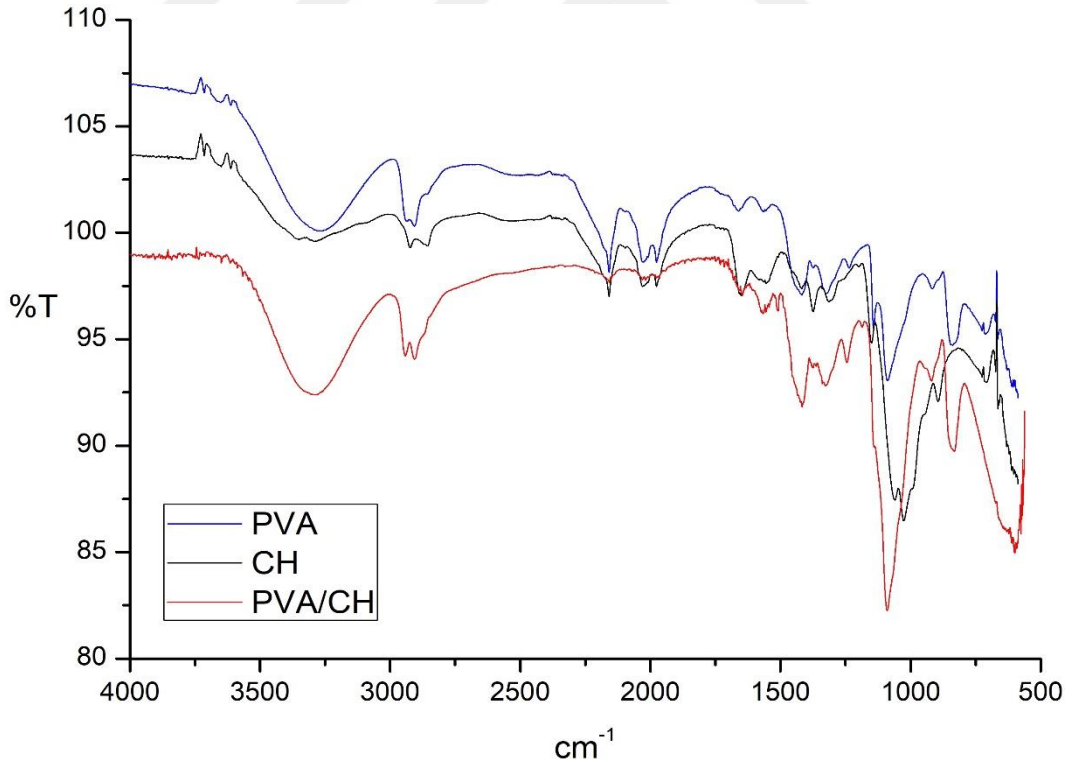
Şekil 3.10. PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelele



Şekil 3.11. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelele

3.2.2. ATR-FTIR analizi

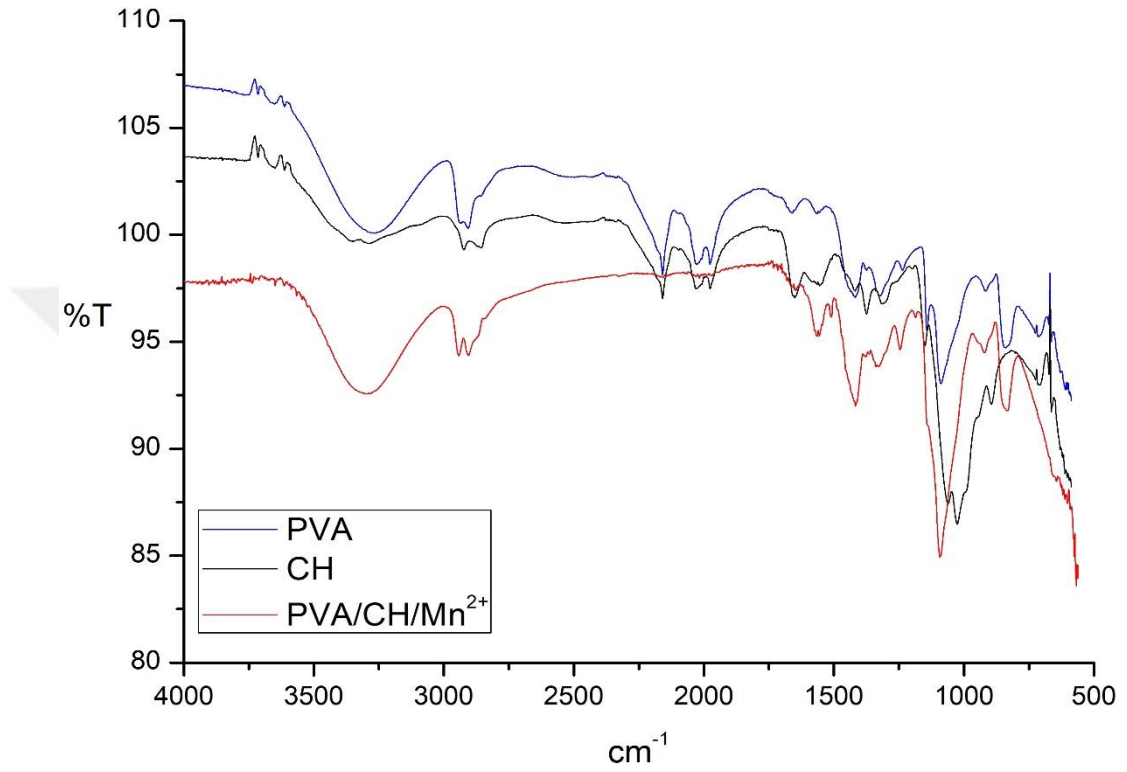
Ham PVA, ham CH ve PVA/CH nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları Şekil 3.12.'de verildi. PVA'ya ait spektrumlarında 3000-3600 cm^{-1} arasında alkol gruplarındaki -OH titreşim bandına, 2936 cm^{-1} ve 2906 cm^{-1} 'de ise sırasıyla CH_2 'nin asimetrik ve simetrik gerilme pikleri gözlemlendi. CH'ye ait spektrumlarında ise 3355 cm^{-1} 'de -OH gerilme pikleri ve 3355 cm^{-1} 'de N-H gerilme pikleri gözlemlendi ve bu aralıkta -OH gerilme pikleri N-H gerilme piklerini örtülemektedir. 2920 cm^{-1} ve 2869 cm^{-1} 'de ise sırasıyla C-H'nin simetrik ve asimetrik gerilme pikleri gözlemlendi. CH yapısına özgü olarak 1652 cm^{-1} 'de görülen pik amit (CONHR) grubuna bağlı karbonil bağlarının (C=O) titreşimlerinden, 1582 cm^{-1} 'deki pik protonlanmış amin gruplarından, 1552 cm^{-1} 'de amit grubuna bağlı N-H titreşimlerinden ve 1313 cm^{-1} ise amit gruplarına bağlı C-N titreşimlerinden kaynaklandığı literatürde yer almaktadır (Pereira vd., 2015). PVA/CH nanofiber membranların yapısına ait ATR-FTIR spektrumlarına bakıldığında ham PVA ve ham CH'ye ait piklerde çok az miktarda kaymalar olsa da korunduğu görülmektedir.



Şekil 3.12. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

Ham PVA, ham CH ve PVA/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları ise Şekil 3.13.'de verildi. PVA/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranları yapısına

ait ATR-FTIR spektrumları PVA/CH nanofiber membranları ile karşılaştırıldığında özellikle -OH gerilme ve N-H gerilme piklerinin genişlediği ve zayıfladığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre Mn^{+2} iyonlarının PVA ve CH molekülleri arasında bazı etkileşimlerin olduğunu şeklinde yorumlanabilir. Bu etkileşimlerin Mn^{+2} iyonları ile PVA'nın -OH grupları ve CH'nin -OH ve NH_2 grupları arasında koordinasyon yoluyla oluştuğu söylenebilir.



Şekil 3.13. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH/ Mn^{+2} nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

3.2.3. TGA analizi

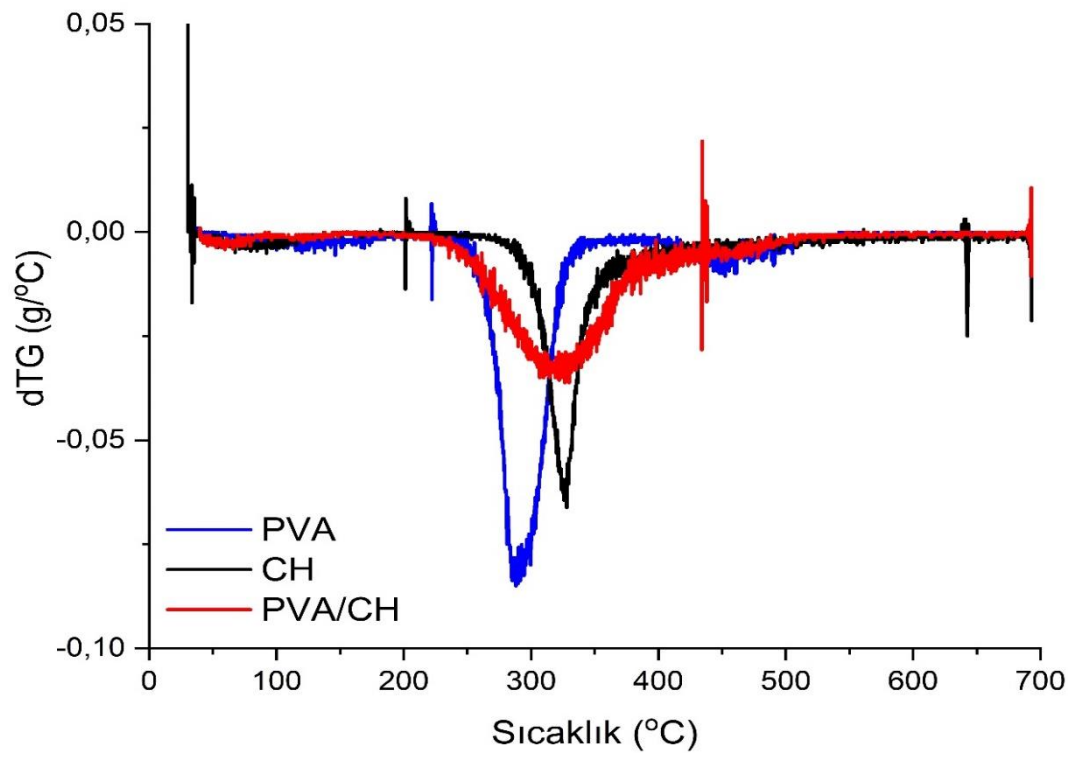
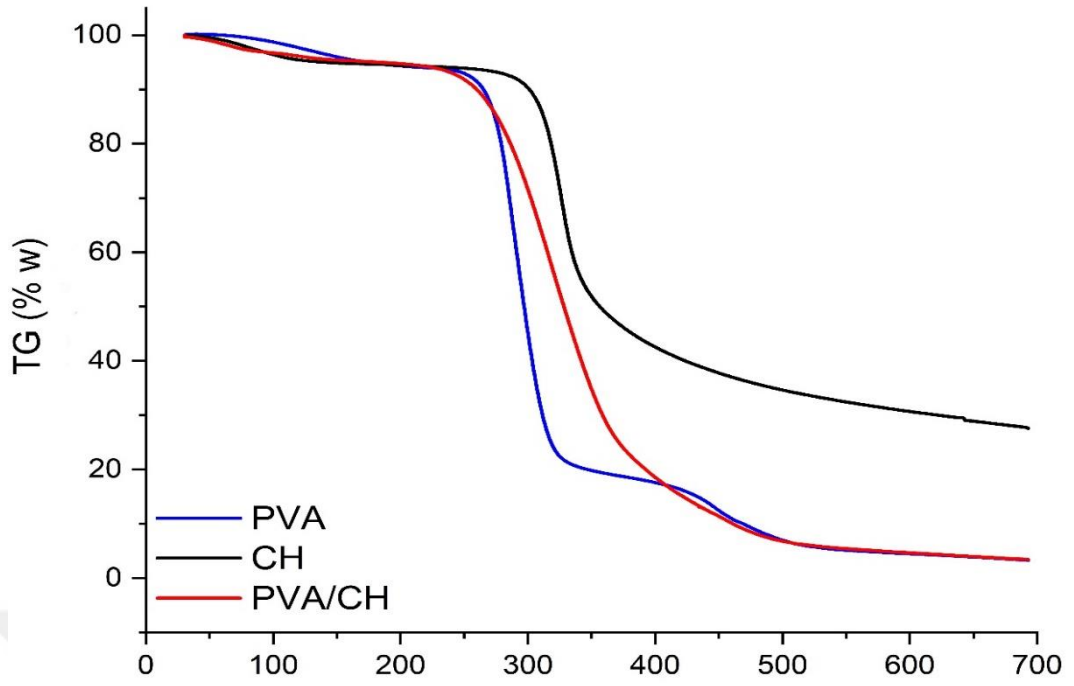
PVA, CH ve PVA/CH nanofiber yapılarına ait TG ve dTG eğrileri şekil 3.14.'de verildi. Termal analiz yöntemleri ile fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerin yanı sıra polimerin içerdiği kül miktarı ve varsa modifikasyon hakkında önemli bilgilere ulaşılabilir.

Ham PVA yapısı için TG eğrisi incelendiğinde üç adımlı bir bozunma eğrisi görüldü. İlk adımda ham PVA yapısı için 190°C sıcaklığın altında kütlede %6'lık bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın nedeni yapıda bulunan suyun uzaklaşmasından kaynaklanıyor olabilir. 2. aşamada 250-330°C sıcaklıkları arasında ilk kütlenin yaklaşık %80'i yapıdan uzaklaştığı görüldü. Bu aşamada sıcaklıktan dolayı H_2O eleme ve zincir sıyırma (chain stripping) reaksiyonlarının gerçekleştiği literatürde

belirtilmektedir (Gilmanl, 1995). 3. aşamada ise 410-500°C sıcaklıkları arasında gerçekleşmiş ve ilk kütlenin %93'ü yapıdan uzaklaştığı görüldü. Bu aşamada kütle azalmasının sebebi H₂ eliminasyon reaksiyonlarından kaynaklandığı literatürde belirtilmektedir (Gilmanl, 1995; Tümüşan ve Simon, 2012). Deney bittikten sonra yapının kül kalıntı miktarı ise %3,5 olarak bulundu. dTG eğrisinde PVA'nın ham hali için ilki 289°C ve ikinci de 452°C'de olmak üzere iki tepe noktasına sahip olduğu görüldü. Bu tepeler sırasıyla 2. ve 3. aşamalarda maksimum bozunmanın gerçekleştiği sıcaklıkları belirtmektedir.

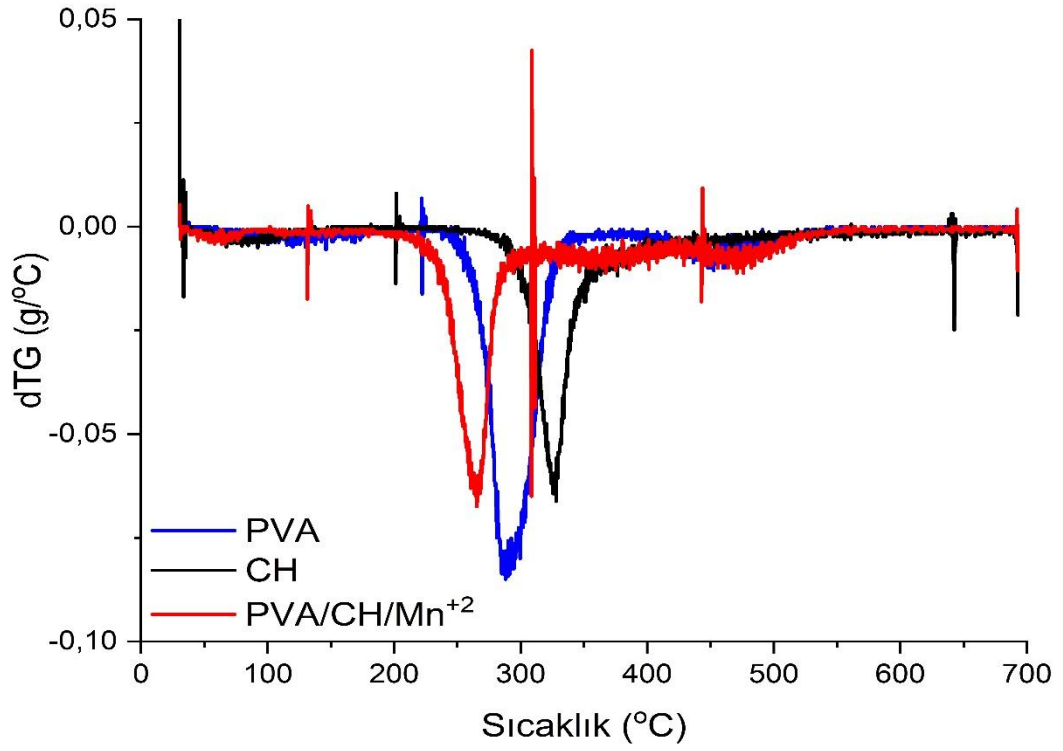
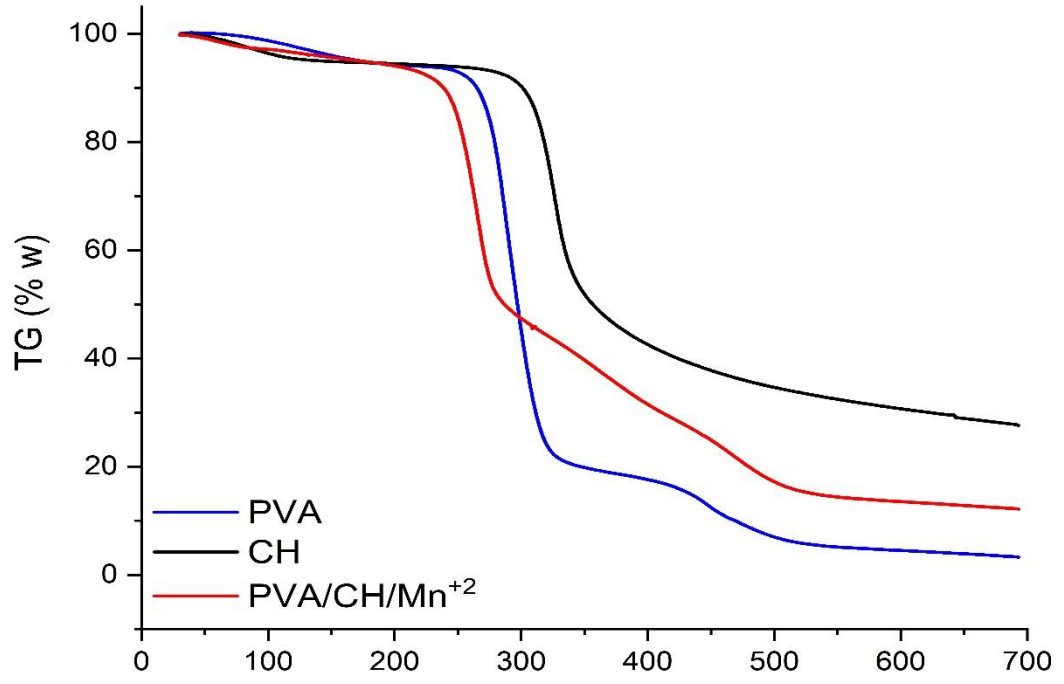
Ham CH'ye ait bozunma eğrileri 3 aşamada gerçekleşmektedir. TG eğrilerinden 180°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %6'lık bir kütle kaybının olduğu görüldü. 270-350°C arasında %42'lik bir azalma görüldü. Bu azalmanın glukozaminin yapısındaki termal bozunmadan kaynaklandığı düşünüldü. 360-700°C sıcaklık arasında ise H₂O eleme ve zincir sıyırma reaksiyonlarının gerçekleştiği görülmektedir. 700°C'de degradasyon sonunda CH için kalıntı miktarı %27,5 olarak belirlendi. Maksimum degradasyon sıcaklığı 326°C olarak tespit edildi.

PVA/CH nanofiber membranların yapısına ait olan eğrilere bakıldığında polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görüldü. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapılarıdaki farklılıklardan ve etkileşimlerden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 185°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %5 lik bir kütle azalımı görüldü. 230-500°C arasında kütle sabit bir oranda azalma gözlemlendi ve diğer polimerlere oranla daha yumuşak gerçekleşti. 230-500°C arasında ilk kütleyle oranla %95,1'lik bir bozunma gözlemlendi. Bu durum -NH₂ ve -OH grupları arasında oluşan hidrojen bağından ve çapraz bağlama (glutaraldehit) işleminden kaynaklanıyor olabilir. PVA ve CH polimerlerinin maksimum bozunma sıcaklıkları sırası ile 289°C ve 326°C'dir. PVA/CH nanofiber membran yapısının maksimum bozunma sıcaklığı ise her iki polimerin bozunma sıcaklıklarının arasında bir değer olan 321°C olarak bulundu. Analiz sonunda PVA/CH için kül kalıntı miktarı %3,4 olarak belirlendi.



Şekil 3.14. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

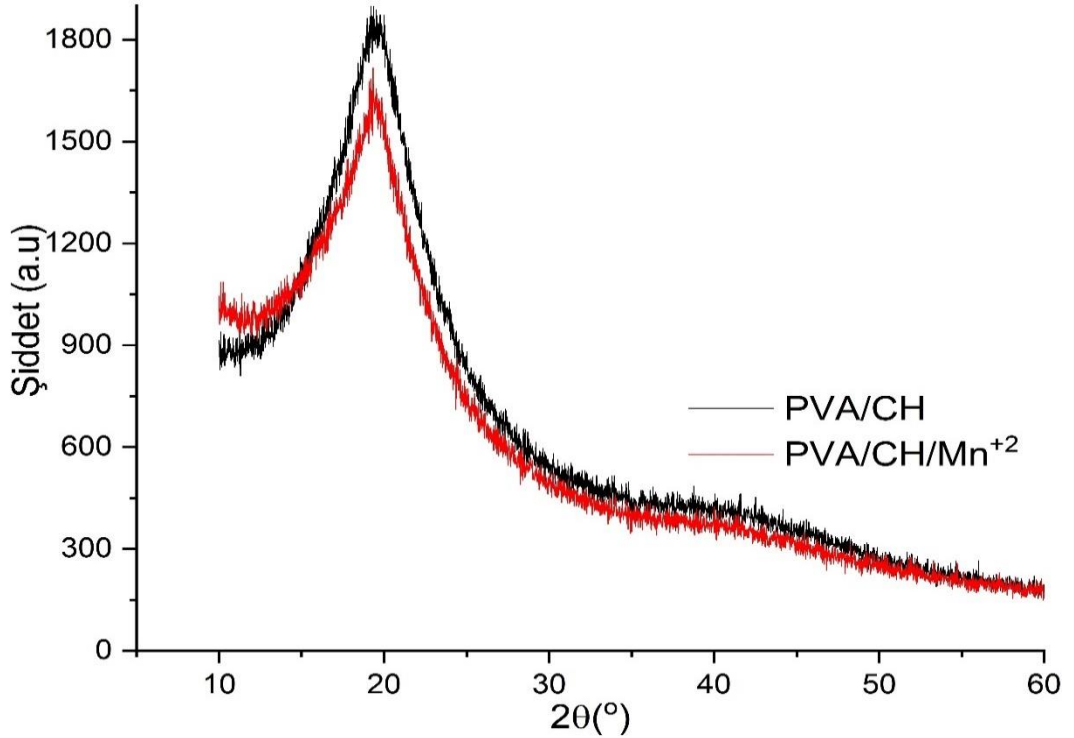
PVA, CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber yapılarına ait TG ve dTG eğrileri ise Şekil 3.15.'de verildi. PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların yapısına ait olan eğrilere bakıldığında ise polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görüldü. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapılarıdaki farklılıklardan, polimerler arasındaki etkileşmeden ve Mn⁺² iyonlarının polimerle yaptığı etkileşimlerden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 180°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %5'lik bir kütle azalımı görüldü. PVA/CH nanofiber yapısından farklı olarak, 255°C'de TG eğrilerinde keskin bir düşüş gözlemlendi. 235-290°C arasında, başlangıçtaki kütleyle oranla yaklaşık %50'lik bir azalma gözlemlenmiştir. 495°C'de ise ilk kütlenin %83'ünün kaybedildiği görüldü. 700°C'de degradasyon sonunda PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar için kalıntı miktarı %12 olarak belirlendi. PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların yapısına ait dTG eğrisinde görüldüğü gibi 265°C, 365°C ve 475°C olmak üzere üç tepe gözlemlendi.



Şekil 3.15. Ham PVA, ham CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

3.2.4. XRD analizi

PVA/CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlarına ait XRD spektrumları Şekil 3.16.'da verildi. PVA/CH nanofiber membranına ait spektrumun incelendiğinde keskin ve yaklaşık $2\theta=19,9^\circ$ 'de bir pik ve $2\theta=41,5^\circ$ 'de çok küçükte olsa bir sırt verdiği görüldü. Yapıya Mn²⁺ ilavesi ile elde edilen PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlara ait spektrum incelendiğinde $2\theta=19,3^\circ$ 'de keskin bir pik ve $2\theta=41,1^\circ$ 'de ise çok küçük bir sırt gözlemlendi. Mn²⁺ iyonlarının dahil edilmesinden sonra 2θ değerlerinde azalma ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranına ait spektrum PVA/CH nanofiber membranı ile karşılaştırıldığında şiddette azalmalar görülmektedir. Bu durumun nedeni Mn²⁺'nin hem PVA hem de CH ile moleküler seviyede harmanlanmasından kaynaklandığı söylenebilir. Literatürde yapıya başka bir polimer ya da metal ilavesi ile pik şiddetinde azalma meydana gelen çalışmalar mevcuttur (Hassan vd., 2017; Hao vd., 2018). Ayrıca piklerin şiddetlerinden azalma yapının kristal derecesi hakkında bilgi verir. Kısa ve daha düz pikler malzemelerin daha düşük kristal derecesine sahip olduğunu, keskin ve uzun pikler ise malzemelerin daha yüksek kristal derecesine sahip olduğunu gösterir (Ay vd., 2018). PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranına ait spektrum PVA/CH nanofiber membranına ait spektrumu göre daha kısa pikler vermiştir. PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranının kristal derecesi daha düşüktür.



Şekil 3.16. PVA/CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlerine ait XRD spektrumları

3.3. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında homojen fiberler elde edebilmek için optimizasyon parametreleri olarak; uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı arasındaki uzaklık, polimer derişimi ve polimer karışımının akış hızı araştırıldı. PCL/CH için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5.'de verildi. Elektroğirilmiş PCL/CH nanofiberler için, optimum koşullar olarak %20 PCL derişimi, %2 CH derişimi, 18 kV uygulama voltajı, 14 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,4 mL/sa polimer akış hızı belirlendi.

Çizelge 3.5. PCL/CH nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

PCL derişimi (%)	CH derişimi (%)	PCL/CH oranı (v/v)	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
15	1	50:50	14	12	0,2	-
15	1	50:50	16	14	0,3	-
15	1	50:50	18	16	0,4	+
15	1	50:50	20	15	0,5	+
20	1	50:50	16	14	0,3	-
20	1	50:50	18	16	0,4	+
20	1	50:50	20	17	0,3	+
20	1	50:50	22	15	0,4	+
20	2	50:50	16	12	0,3	+
20	2	50:50	18	14	0,4	+++
20	2	50:50	20	16	0,5	++
20	2	50:50	22	15	0,4	+
25	2	50:50	18	13	0,3	-
25	2	50:50	20	15	0,4	-
25	2	50:50	22	15	0,4	++
25	2	50:50	24	17	0,3	+

*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroğirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

Elektroğirilmiş PCL/CH/Mn⁺² için ise PCL/CH nanofiberler için belirlenen optimum polimer derişimleri sabit tutularak Mn⁺² derişimi, uygulanan voltaj, iğne-toplayıcı uzaklığı ve polimer akış hızı parametreleri için optimizasyon çalışmaları yapıldı. PCL/CH/Mn⁺² için ise elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6.'da verildi. Elektroğirilmiş PCL/CH/Mn⁺² nanofiberler için optimum koşullar olarak %20 PCL derişimi, %2 CH derişimi, %0,1 Mn⁺², 22 kV uygulama voltajı, 16,5 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,4 mL/sa polimer akış hızı belirlendi. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların optimizasyon parametreleri karşılaştırıldığında PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların üretimi için daha yüksek voltaj ve daha yüksek iğne-toplayıcı

uzaklığı kullanıldığı görüldü. Her iki nanofiber membran üretiminde polimer derişimleri aynı derişimde olmasına rağmen PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlere %0,1 Mn⁺² metali ilave edildiği için polimer çözeltisinin viskozitesinde artış gözlemlendi ve bu nedenle PCL/CH/Mn⁺² nanofiberi üretmek için daha yüksek voltaj uygulandı. PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerini üretmek için farklı derişimlerde Mn⁺² (%0,1-0,4) kullanıldı ve çalışılan tüm derişimlerde nanofiber oluştuğu gözlemlendi. Bu nedenle en iyi fiber oluşumunun gözlemlendiği dört fiberinde SEM görüntüsü alındı. Sem görüntüleri incelendiğinde polimer çözelti içindeki Mn⁺² derişimi arttıkça yapıda bozulmalar meydana geldiği ve boncuk oluşumunun arttığı görüldü. Bu nedenle optimum Mn⁺² derişimi %0,1 olarak belirlendi.

Bu aşamanın ardından en uygun parametrelerle hazırlanmış nanofiberlerin SEM, FTIR, TGA ve XRD karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6. PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

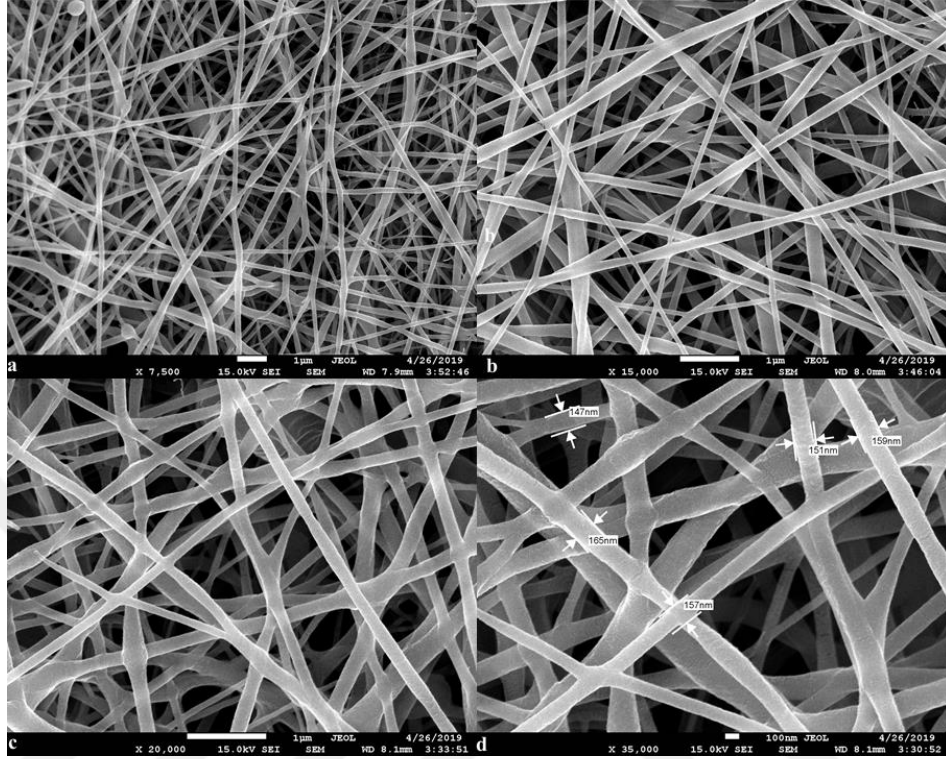
PCL derişimi (%)	CH derişimi (%)	Mn ⁺² derişimi (%)	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
20	2	0,1	18	14	0,4	-
20	2	0,1	20	16	0,5	+
20	2	0,1	22	16,5	0,4	+++
20	2	0,1	24	18	0,3	++
20	2	0,2	20	16,5	0,4	+
20	2	0,2	22	16,5	0,4	++
20	2	0,2	24	18	0,3	+
20	2	0,2	24	20	0,4	-
20	2	0,3	20	14	0,3	+
20	2	0,3	22	16,5	0,4	+
20	2	0,3	24	18	0,4	++
20	2	0,3	26	18	0,5	+
20	2	0,4	22	16,5	0,4	+
20	2	0,4	24	18	0,4	++
20	2	0,4	26	18	0,5	+
20	2	0,4	26	18	0,5	+

*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroegirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

3.3.1. Sem analizi

Optimizasyon parametreleri belirlenen PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların SEM görüntüleri Şekil 3.17. ve Şekil 3.18.'de verildi. PCL/CH nanofiberlerine ait SEM görüntüleri Şekil 3.17.'de farklı büyütme oranlarında gösterildi. Şekil 3.17.'de görüldüğü gibi, gelişigüzel konumlandığı, yuvarlak hatlı

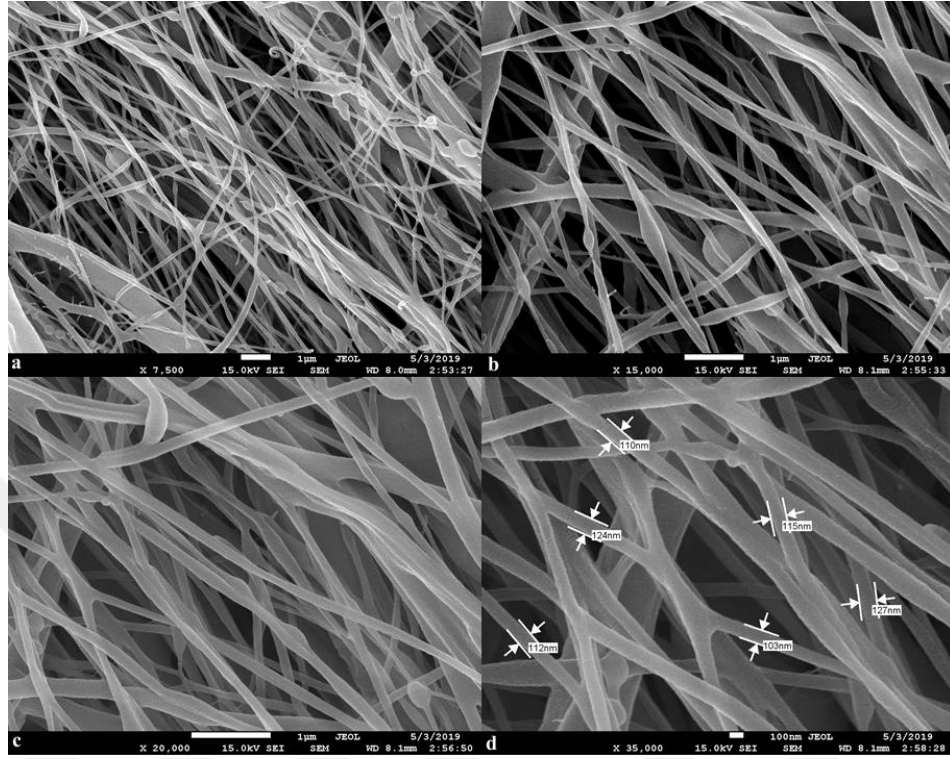
oldukları, pürüzsüz, boncuksuz olduğu ve ortalama çaplarının 147-165 nm civarında olduğu görüldü. PCL/CH nanofiberler yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü.



Şekil 3.17. PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x7,500 (b) x15,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerine ait SEM görüntüleri ise Şekil 3.18.'de farklı büyütme oranlarında gösterildi. Şekil 3.18.'de görüldüğü gibi, fiberlerin rasgele konumlandığı, pürüzsüz, yuvarlak hatlı, boncuk oluşumunun gözlenmediği ve ortalama çaplarının 103-127 nm civarında olduğu görüldü. PCL/CH/Mn⁺² nanofiber yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü. PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerin çapı PCL/CH nanofiberlerin çapına göre azaldığı gözlemlendi. Mn⁺² ilavesi sonucu polimer çözeltisinin viskozitesi arttığı için elde edilen nanofiberlerin çaplarında bir artış beklense de iğne-toplayıcı arası mesafenin artması sonucunda fiberler kendilerini kararsız bölgede uzatmak için daha uzun süre kaldıkları görüldü. Daha uzun mesafe almaları gerektiği için fiber çapında azalma meydana geldi. Literatürde iğne ile toplayıcı arasındaki mesafenin artması ile daha ince fiberlerin olduğu çalışmalar mevcuttur (Doshi ve Reneker, 1995). Ayrıca yapılan literatür çalışmalarında uygulanan voltajın değiştirilmesinin fiber çapını etkilediği görülmüştür. Ancak uygulanan voltaj arttığında fiber çapı artar ya da azalır gibi bir genelleme

yapabilmemiz mümkün değildir. Bazı çalışmalarda uygulanan voltaj arttığında fiber çapı artarken bazılarında azalmaktadır. Bu kısımda yapılan çalışmalarda uygulanan voltajın artması ile fiber çapının azaldığı söylenebilir.

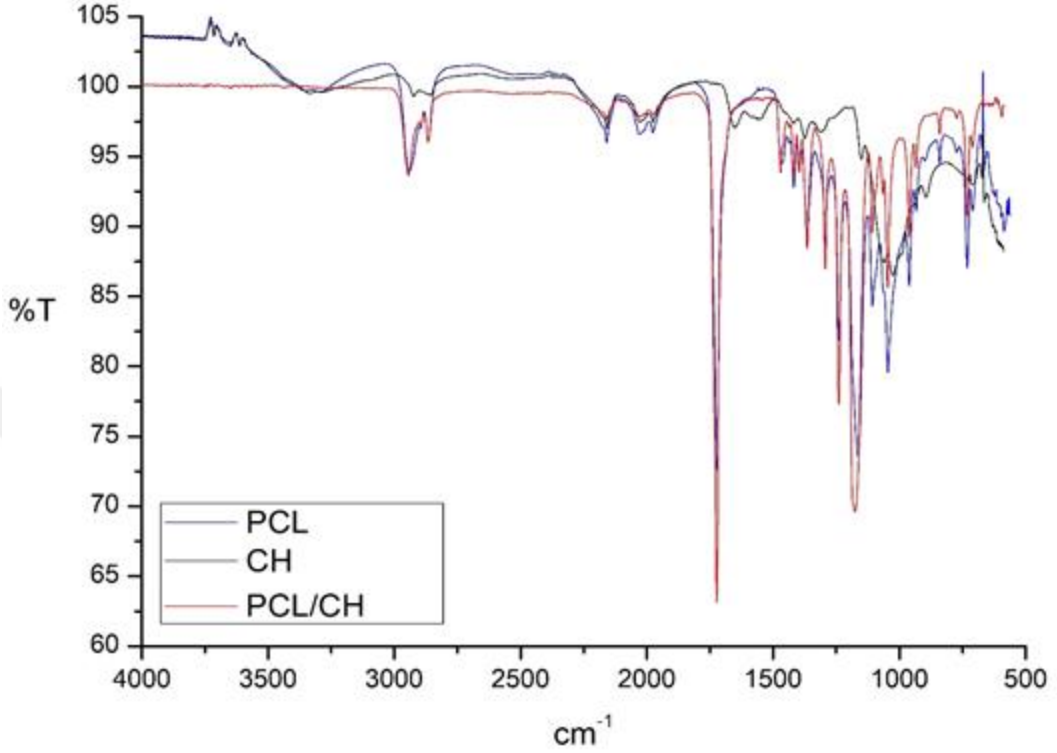


Şekil 3.18. PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x7,500 (b) x15,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

3.3.2. ATR-FTIR analizi

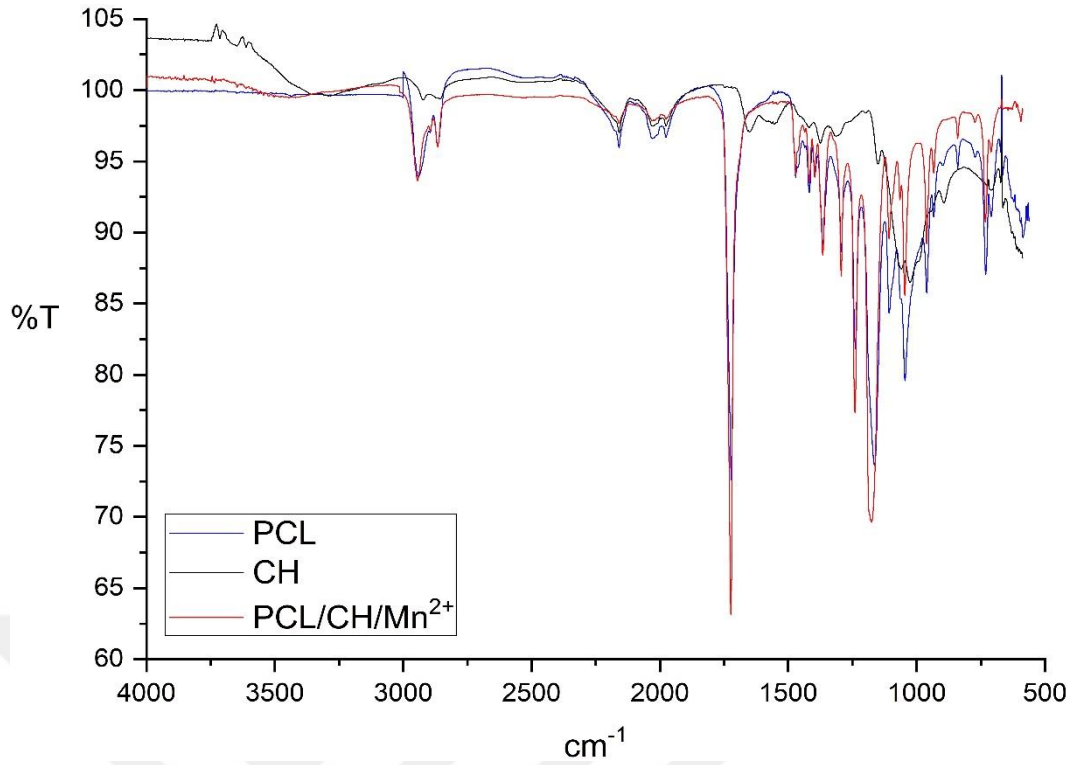
Ham PCL, ham CH ve PCL/CH nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları Şekil 3.19.'da verildi. PCL'ye ait spektrumlarında 2942 cm⁻¹ ve 2865 cm⁻¹'de sırasıyla CH₂'nin asimetrik ve simetrik gerilme pikleri gözlemlendi. 1724 cm⁻¹'de C=O titreşim pikleri, 1294 cm⁻¹'de C-C gerilmesine karşılık pikler, 1238 cm⁻¹ ve 1163 cm⁻¹'de ise -C-O-C-'nin asimetrik ve simetrik gerilme pikleri yer almaktadır. CH'ye ait spektrumlarında ise 3355 cm⁻¹'de -OH gerilme pikleri ve 3355 cm⁻¹'de N-H gerilme pikleri gözlemlendi ve bu aralıkta -OH gerilme pikleri N-H gerilme piklerini örtülemektedir. 2920 cm⁻¹ ve 2869 cm⁻¹'de ise sırasıyla C-H'nin simetrik ve asimetrik gerilme pikleri gözlemlendi. CH yapısına özgü olarak 1652 cm⁻¹'de görülen pik amit (CONHR) grubuna bağlı karbonil bağlarının (C=O) titreşimlerinden, 1582 cm⁻¹'deki pik protonlanmış amin gruplarından, 1552 cm⁻¹'de amit grubuna bağlı N-H titreşimlerinden ve 1313 cm⁻¹'de ise amit gruplarına bağlı C-N titreşimlerinden

kaynaklandığı literatürde yer almaktadır (Queiroz vd, 2015). PCL/CH nanofiber membranların yapısına ait ATR-FTIR spektrumlarına bakıldığında ham PCL ve ham CH'ye ait piklerde çok az miktarda kaymalar olsa da korunduğu görülmektedir.



Şekil 3.19. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

Ham PCL, ham CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları ise Şekil 3.20.'de verildi. PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranları yapısına ait ATR-FTIR spektrumları PCL/CH nanofiber membranları ile karşılaştırıldığında özellikle CH'den kaynaklanan O-H gerilme ve N-H gerilme piklerinin genişlediği ve zayıfladığı görüldü. Ayrıca PCL'den kaynaklanan C=O gerilme ve -C-O-C- gerilme piklerinin zayıfladığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre Mn⁺² iyonlarının PCL ve CH molekülleri arasında bazı etkileşimlerin olduğunu gösterdi. Bu etkileşimlerin Mn⁺² iyonları ile PCL'nin yapısında bulunan karbonil oksijeni ve -C-O-C- grubunun oksijeni ve CH'nin O-H ve NH₂ grupları arasında koordinasyon yoluyla oluştuğunu gösterdi.



Şekil 3.20. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

3.3.3. TGA analizi

PCL, CH ve PCL/CH nanofiber yapılarına ait TG ve dTG eğrileri Şekil 3.21.'de verildi. Analizler 20°C/dk sabit ısıtma hızında, 50-700°C arasında Perkin Elmer TGA 4000 marka termo-gravimetrik analiz cihazı ile yapıldı. Termal analiz yöntemleri ile fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerin yanı sıra polimerin içerdiği kül miktarı ve varsa modifikasyon hakkında önemli bilgilere ulaşılabilir.

Ham PCL'nin yapısı için TG eğrisi incelendiğinde literatür ile benzer şekilde iki adımlı bir bozunma eğrisi görülmüştür (Persenaire vd., 2001). İlk adımda ham PCL yapısı için 380°C sıcaklığın altında kütlede %3,4'lük bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın nedeni yapıda bulunan nem içeriğinden kaynaklanmış olabilir. 2. aşamada 380-463°C sıcaklıkları arasında gerçekleşmiş ve yapısal polimer tamamen bozunduğu görüldü. dTG eğrisinde ise PCL'nin maksimum degradasyon sıcaklığı 435°C olarak tespit edildi.

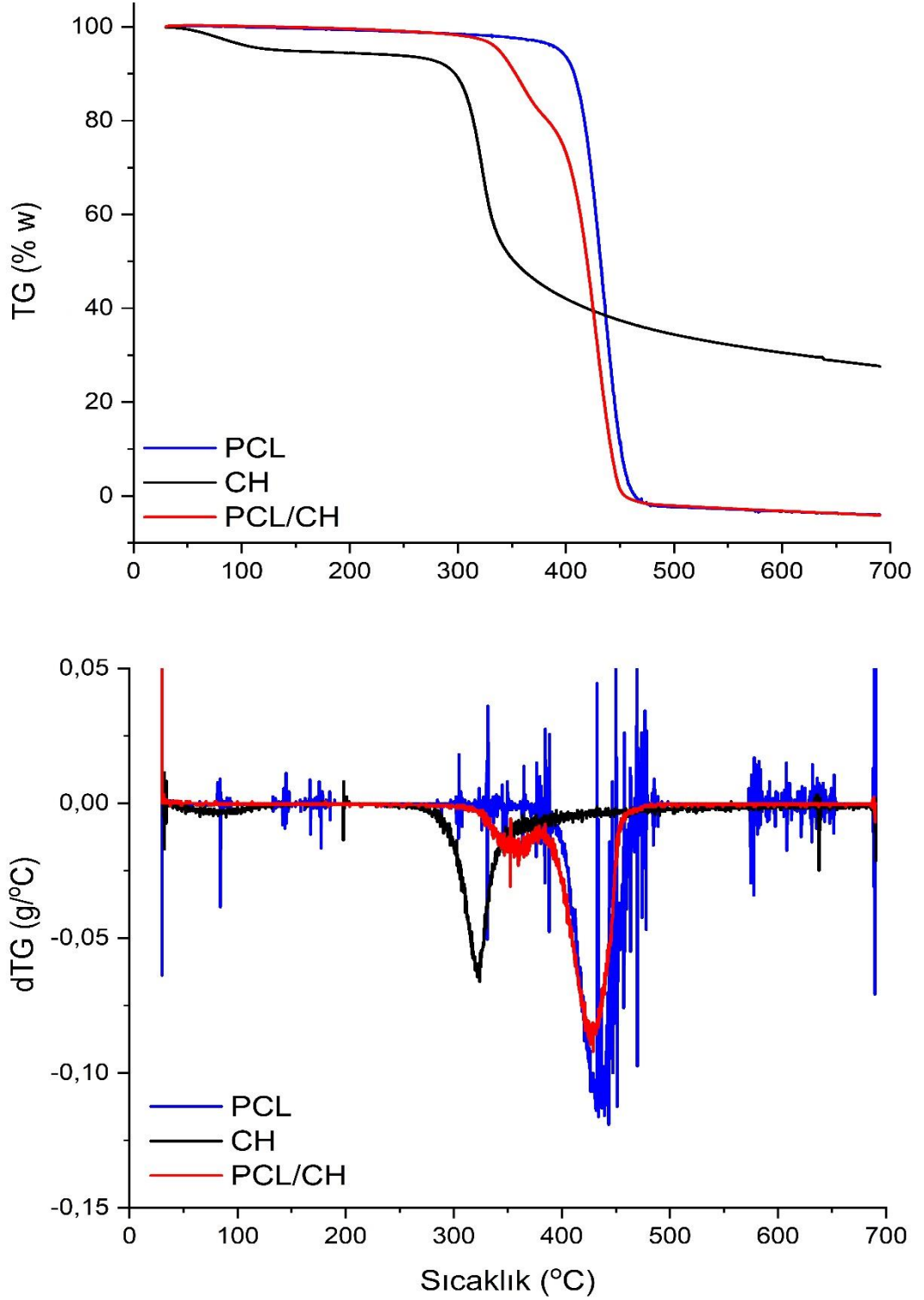
Ham CH'ye ait bozunma eğrileri 3 aşamada gerçekleşmektedir. TG eğrilerinden 180°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %6'lık bir kütle kaybının olduğu görüldü. 270-350°C arasında ise %42'lik bir azalma görüldü. Bu azalmanın sebebi glukozamin yapısındaki termal bozunumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

360-700°C sıcaklık arasında ise H₂O eleme ve zincir sıyırma reaksiyonlarının gerçekleştiği görüldü. 700°C'de degradasyon sonunda CH için kalıntı miktarı %27,5 olarak belirlendi. Maksimum degradasyon sıcaklığı 326°C olarak tespit edildi.

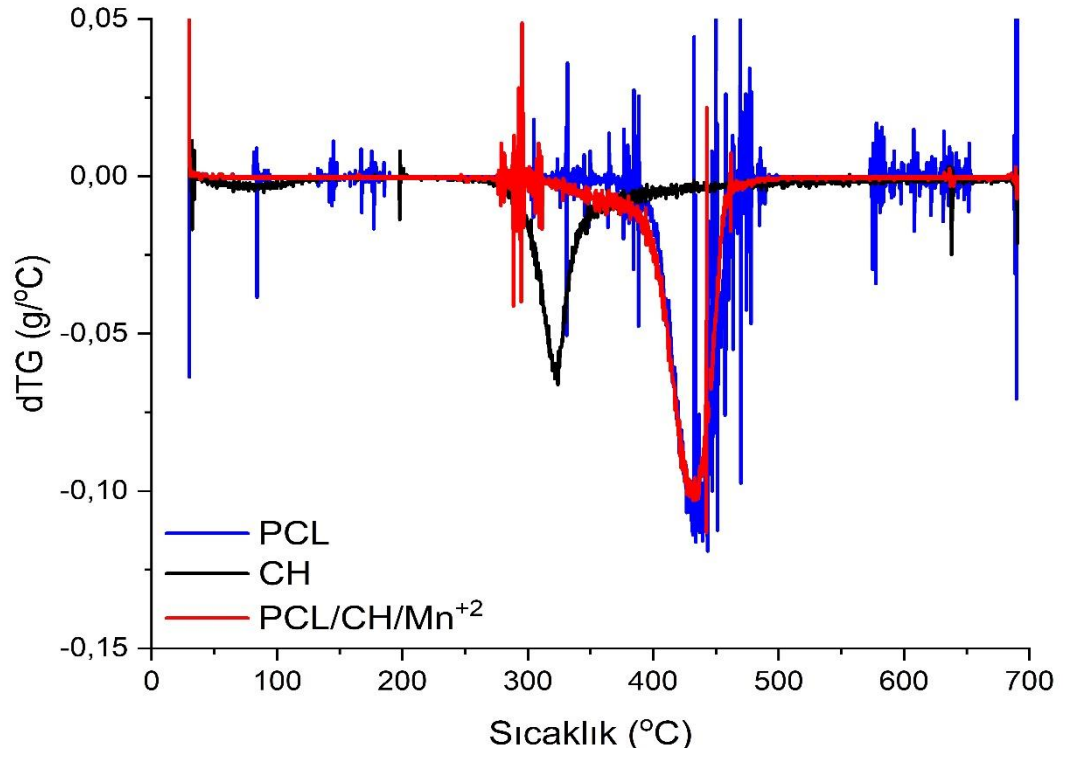
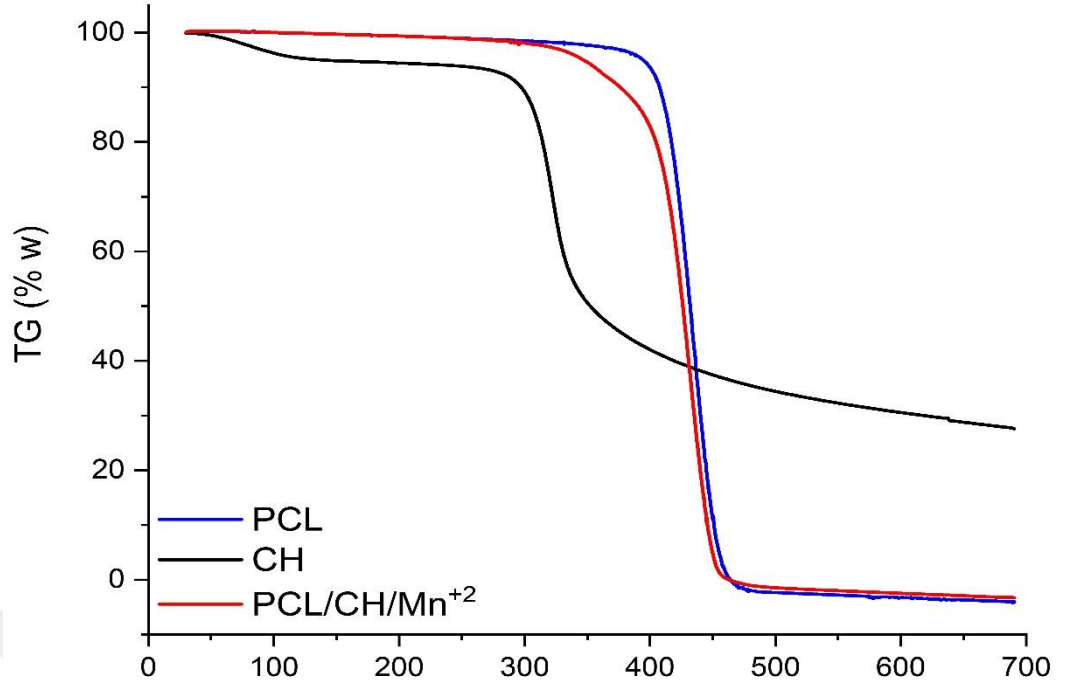
PCL/CH nanofiber membran yapısına ait olan eğrilere bakıldığında 3 aşamada gerçekleştiği ve polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapılarıdaki farklılıklardan ve polimerler arasındaki etkileşmeden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 320°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %3'lük bir kütle azalması görüldü. 2. aşamada 320-390°C arasında gerçekleştirilmiş ve ilk kütle kaybının %22'si kadarının yapıdan uzaklaştığı görüldü. Bu azalmanın sebebi yapıda bulunan CH'nin glukozamin yapısındaki termal bozunmasından kaynaklanıyor olabilir. 3. aşamada 390-450°C ve ilk kütle kaybının tamamı uzaklaştı ve PCL/CH nanofiber yapısı tamamen bozundu. Bu durum -OH, C=O ve -NH grupları arasında oluşan hidrojen bağından kaynaklanmış olabilir. dTG eğrisinde PCL/CH nanofiber membran yapısı için 355°C ve 427°C olmak üzere iki tepe noktası görülmektedir. Maksimum degradasyon sıcaklığı ise 427°C olarak tespit edildi. PCL/CH nanofiber membran yapısı ham PCL ve ham CH'ye göre daha yüksek termal kararlılığa sahiptir bu durum nanofiberlerin yapısında bulunan PCL ve CH arasındaki etkileşim ile açıklanabilir. Ayrıca nanofiber yapısındaki CH'nin PCL'ye kıyasla yapıya daha iyi termal kararlılık özelliği kattığı söylenebilir.

PCL, CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber yapılara ait TG ve dTG eğrileri ise şekil 3.22.'de verildi. PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların yapısına ait olan eğrilere bakıldığında ise polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapılarıdaki farklılıklardan, polimerler arasındaki etkileşmeden ve Mn⁺² iyonlarının polimerlerle yaptığı etkileşimlerden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 320°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %3'lük bir kütle azalması görüldü. 320-464°C arasında kütle sabit bir oranda azalma göstermiş ve PCL, CH ve PCL/CH nanofiber membran yapılara oranla daha yumuşak gerçekleştiği görüldü. İlk kütle kaybının tamamı bu aşamada yapıdan uzaklaştı. dTG eğrisinde PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membran yapısı için maksimum degradasyon sıcaklığı ise 432°C olarak tespit edildi. TGA sonuçlarına göre yapıdaki Mn⁺² iyonlarının varlığı PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membran yapılarının PCL/CH nanofiber membran yapılarına göre daha iyi termal kararlılık gösterdiği görüldü.

Bunun nedeni Mn^{+2} iyonlarının hem PCL hem de CH ile etkileşimleri nedeniyle nanofiberlerin termal kararlılığını arttırmasından kaynaklanmış olabilir.



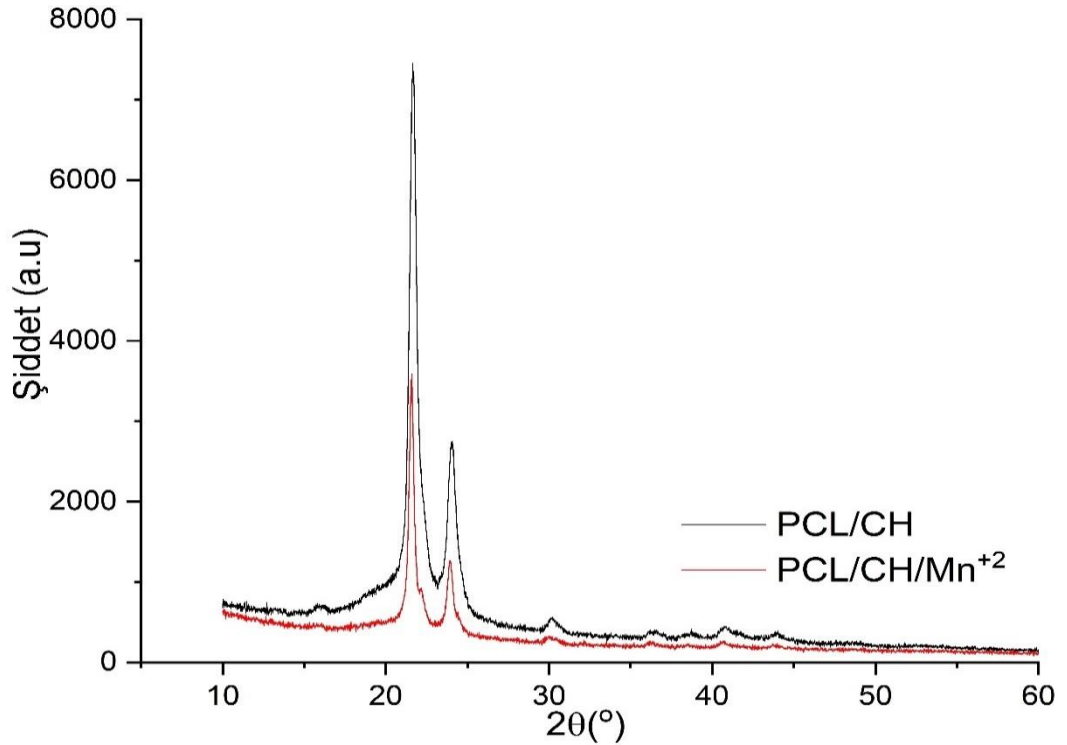
Şekil 3.21. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri



Şekil 3.22. Ham PCL, ham CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

3.3.4. XRD analizi

PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlarına ait XRD spektrumları Şekil 3.23.'de verildi. PCL/CH nanofiber membranına ait spektrumun incelendiğinde $2\theta=21,7^\circ$ 'de keskin ve şiddetli bir pik ve $2\theta=23,9^\circ$ 'de ise keskin ama şiddeti ilkinine göre daha düşük başka bir pik verdiği görüldü. Yapıya Mn⁺² ilavesi ile elde edilen PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlara ait spektrum incelendiğinde ise çok daha zayıf bir kırınım göstererek aynı piklerin sola kaydığı ve sırasıyla $2\theta=21,3$ ve $2\theta=22,1^\circ$ 'de pik verdiği görüldü. PCL/CH nanofiber tepe noktalarının sola kayması, kristal kafes içinde farklı aralığa sahip farklı türde bir kristal formun oluşmasından kaynaklanmaktadır (Borjigin vd., 2013). Bu sonuçlar her iki nanofiber membranın kristal formlarının ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerdeki yönlerdirmenin PCL/CH nanofiber membranlarda bulunanlardan farklı olduğunu göstermektedir. Bunlara ek olarak Mn⁺² ilavesiyle sonucunda PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranına ait spektrum PCL/CH nanofiber membranı ile karşılaştırıldığında şiddette azalmalar görülmektedir. Bu durumun nedeni Mn⁺²'nin hem PCL hem de CH ile moleküler seviyede harmanlanmasından kaynaklandığı söylenebilir. Literatürde yapıya başka bir polimer ya da metal ilavesi ile pik şiddetinde azalma meydana gelen çalışmalar mevcuttur (Hassan vd., 2017; Hao vd., 2018).



Şekil 3.23. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerine ait XRD spektrumları

3.4. PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} Nanofiberlerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında homojen fiberler elde edebilmek için optimizasyon parametreleri olarak; uygulanan voltaj, iğne ve toplayıcı arasındaki uzaklık, polimer derişimi ve polimer karışımının akış hızı araştırıldı. PVA/ β -CD için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7.'de verildi. Elektroeğirilmiş PVA/ β -CD nanofiberler için, optimum koşullar olarak %6 PVA derişimi, %3 β -CD derişimi, 12 kV uygulama voltajı, 16 cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 0,6 mL/sa polimer akış hızı belirlendi.

Çizelge 3.7. PVA/ β -CD nanofiber membranlar için işlemsel parametreler ve gözlemler

PVA derişimi (%)	β -CD derişimi (%)	PVA/ β -CD oranı (%) (v/v)**	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
6	1	50:50	10	12	0,3	-
6	1	50:50	12	14	0,4	+
6	1	50:50	14	16	0,5	+
6	1	50:50	16	18	0,6	+
6	2	50:50	12	14	0,4	-
6	2	50:50	14	16	0,5	+
6	2	50:50	16	18	0,6	+
6	2	50:50	18	20	0,6	-
7	2	50:50	10	12	0,3	-
7	2	50:50	12	14	0,5	-
7	2	50:50	14	16	0,6	+
7	2	50:50	16	18	0,5	+
6	3	50:50	10	14	0,5	+
6	3	50:50	12	16	0,6	+++
6	3	50:50	14	18	0,4	++
6	3	50:50	16	20	0,5	+
7	3	50:50	12	14	0,3	-
7	3	50:50	14	16	0,4	+
7	3	50:50	16	18	0,5	+
7	3	50:50	18	20	0,6	-
6	4	50:50	14	18	0,4	+
6	4	50:50	16	18	0,6	-

*Gözlemler: Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroeğirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

** Tüm çözeltilere %1 oranında Triton X-100 eklendi.

Elektroeğirilmiş PVA/ β -CD/ Mn^{+2} için ise PVA/ β -CD nanofiberler için belirlenen optimum polimer derişimleri sabit tutularak Mn^{+2} derişimi, uygulanan voltaj, iğne-toplayıcı uzaklığı ve polimer akış hızı parametreleri için optimizasyon çalışmaları yapıldı. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} için ise elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8.'de verildi. Elektroeğirilmiş PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberler için optimum koşullar olarak %6 PVA

derişimi, %3 β -CD derişimi, %0,2 Mn^{+2} , 14 kV uygulama voltajı, 16 cm iğne- toplayıcı uzaklığı, 0,6 mL/sa polimer akış hızı belirlendi. PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranların optimizasyon parametreleri karşılaştırıldığında PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranların üretimi için daha yüksek voltaj kullanıldı. Her iki nanofiber membran üretiminde polimer derişimleri aynı derişimde olmasına rağmen PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlere %0,2 Mn^{+2} metali ilave edildi. Bunun sonucunda polimer çözeltisinin viskozitesinde artış gözlemlendi ve bu nedenle PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberi üretmek için daha yüksek voltaj uygulandı. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerini üretmek için farklı derişimlerde Mn^{+2} (%0,1-0,4) kullanıldı ve çalışılan tüm derişimlerde nanofiber oluştuğu gözlemlendi. Bu nedenle en iyi fiber oluşumunun gözlemlendiği dört fiberinde SEM görüntüsü alındı. Sem görüntüleri incelendiğinde en iyi fiber yapısının Mn^{+2} derişiminin %0,2 olduğu membranlarda gözlemlendi. Bu nedenle optimum Mn^{+2} derişimi %0,2 olarak belirlendi.

Bu aşamanın ardından en uygun parametrelerle hazırlanmış nanofiberlerin SEM, FTIR, TGA ve XRD karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.8. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar için işlemel parametreler ve gözlemler

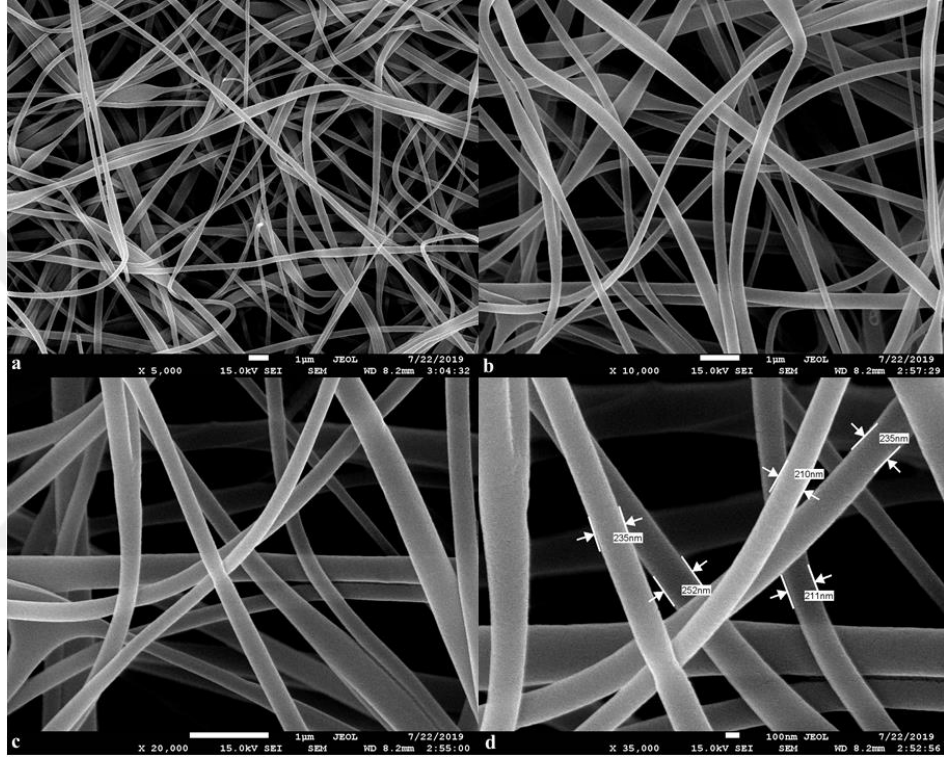
PVA derişimi (%)	β -CD derişimi (%)	Mn^{+2} derişimi (%)**	Uygulanan voltaj (kV)	İğne ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Polimer enjeksiyon hızı (mL/sa)	*Gözlemler
6	3	0,1	12	16	0,6	-
6	3	0,1	12	17	0,5	++
6	3	0,1	14	18	0,6	+
6	3	0,1	16	20	0,4	+
6	3	0,2	12	16	0,4	+
6	3	0,2	14	16	0,6	+++
6	3	0,2	16	18	0,5	++
6	3	0,2	18	20	0,6	+
6	3	0,3	12	14	0,4	+
6	3	0,3	14	17	0,6	++
6	3	0,3	16	18	0,5	+
6	3	0,3	18	18	0,6	+
6	3	0,4	12	12	0,5	+
6	3	0,4	14	16	0,6	++
6	3	0,4	16	14	0,5	+
6	3	0,4	18	18	0,6	+

***Gözlemler:** Parametreler incelenirken polimer karışımının elektroğirme sırasında düzgün şekilde taylor konisi oluşup oluşmadığı, iğne ucunda polimer damlacığının oluşup oluşmadığı, sistemin stabil olup olmadığı, oluşan fiberlerin kolektörden kolay ayrılıp ayrılmaması, fiberlerin mekanik dayanımı ve kolektör üzerinde polimer karışımının damlacık şeklinde gelip gelmemesine göre + ya da - olarak değerlendirme yapıldı.

** Tüm çözeltilere %1 oranında Triton X-100 eklendi.

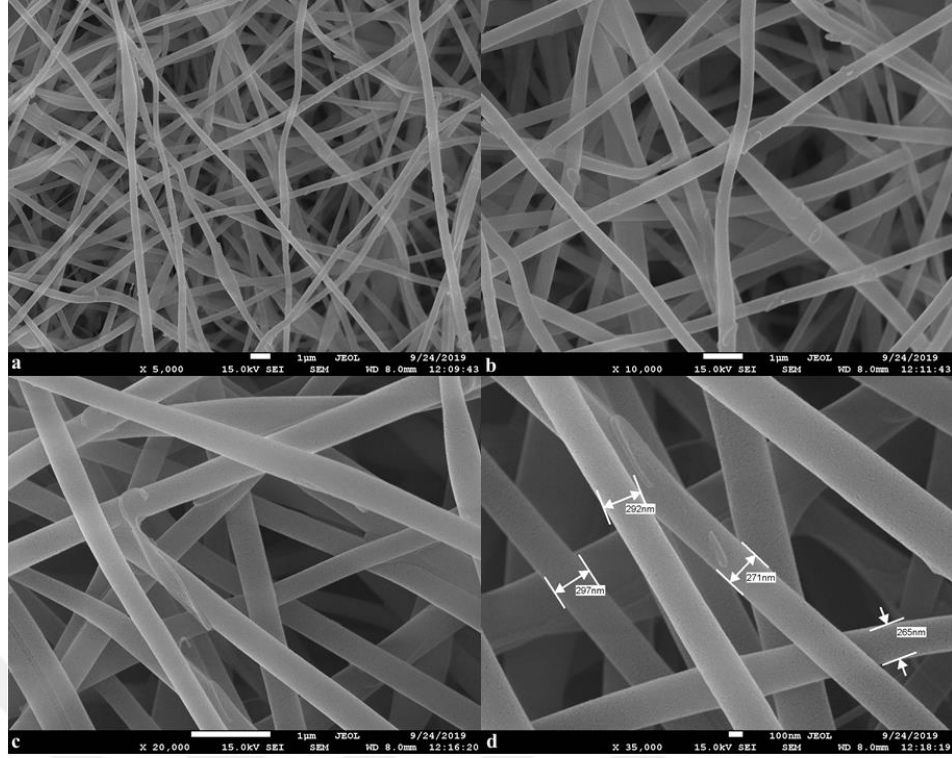
3.4.1. Sem analizi

Optimizasyon parametreleri belirlenen PVA/ β -CD nanofiber membranların SEM görüntüleri Şekil 3.24.'de farklı büyütme oranlarında verildi. Şekil 3.24.'de görüldüğü gibi, fiberlerin neredeyse aynı çapa sahip oldukları, gelişigüzel konumlandığı, yuvarlak hatlı oldukları, pürüzsüz, boncuksuz olduğu ve ortalama çaplarının 207-227 nm civarında olduğu görüldü. PVA/ β -CD nanofiber yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü.



Şekil 3.24. PVA/ β -CD nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x5000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

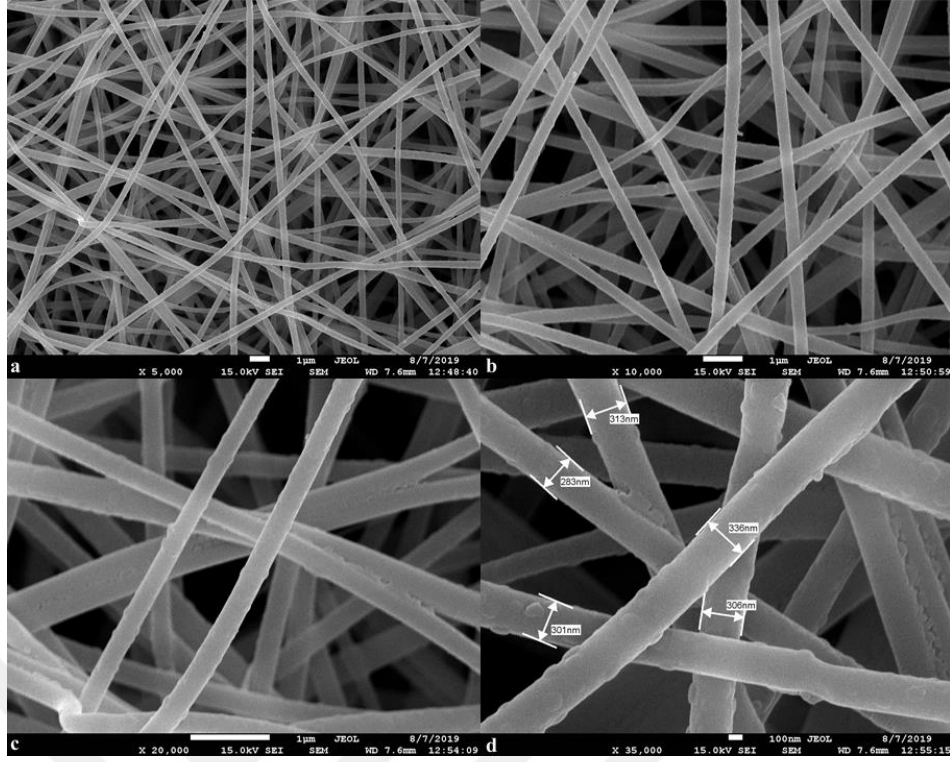
PVA/ β -CD nanofiberleri suda çözündüğü için çapraz bağlama işlemi uygulanarak suda çözünürlüğü engellendi. Şekil 3.25.'de ise çapraz bağlama işlemi sonucu PVA/ β -CD nanofiberlere ait SEM görüntüleri verildi. Çapraz bağlama işlemi sonrası, Şekil 3.25.'de görüldüğü gibi, nanofiberlerin rasgele konumlandığı, yuvarlak hatlı oldukları, hafif pürüzlü, boncuksuz olduğu, ortalama çaplarının büyüdüğü ve 265-297 nm civarında olduğu görüldü.



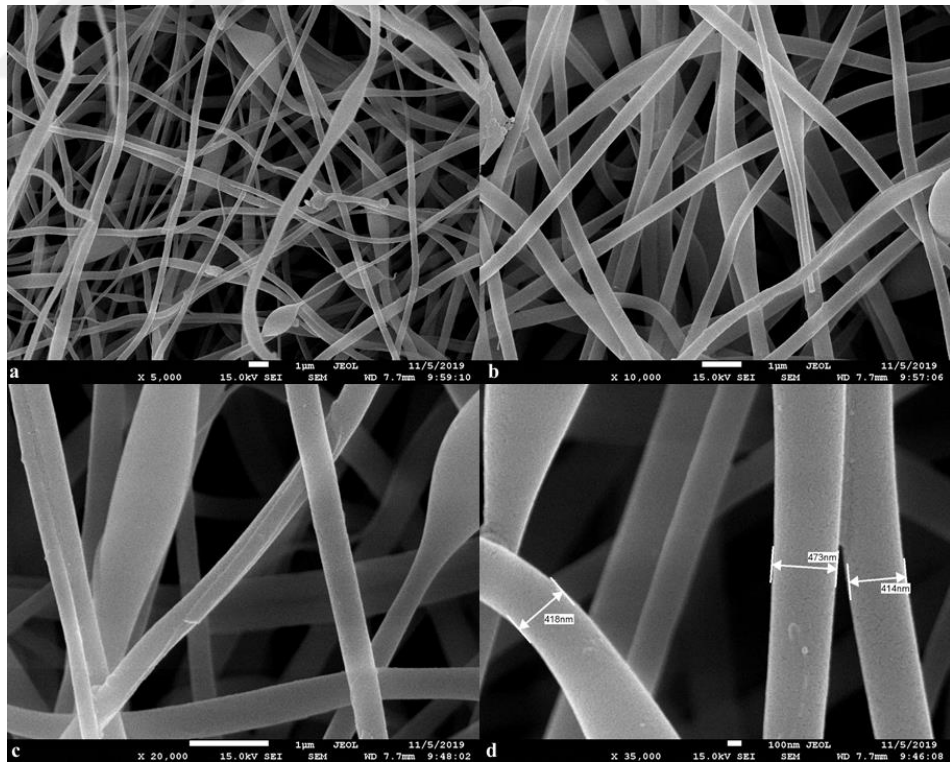
Şekil 3.25. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x5000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelele

PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerine ait SEM görüntüleri ise Şekil 3.26.'da farklı büyütme oranlarında görülmektedir. Şekil 3.26.'da görüldüğü gibi, fiberlerin rasgele konumlandığı, hafif pürüzlü hale geldikleri, yuvarlak hatlı, boncuk oluşumunun gözlenmediği ve ortalama çaplarının 283-336 nm civarında olduğu görüldü. PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber yüzeylerinin düzgün olduğu ve yüzeyde herhangi bir kusur olmadığı görüldü. PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerin çapı PVA/β-CD nanofiberlerin çapına göre arttığı gözlemlendi. Mn²⁺ ilavesi sonucu polimer çözeltisinin viskozitesi artması sonucu elde edilen nanofiberlerin çapları da arttı. Literatürde polimer çözeltisinin viskozitesinin artması sonucu daha büyük fiber çapına sahip nanofiberlerin oluştuğu çalışmalar mevcuttur (Fong vd., 1999).

PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberleri suda çözündüğü için çapraz bağlama işlemi uygulanarak suda çözünürlüğü engellendi. Şekil 3.27.'de ise çapraz bağlama işlemi sonucu PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlere ait SEM görüntüleri verildi. Çapraz bağlama işlemi sonrası, Şekil 3.27.'de görüldüğü gibi, nanofiberlerin homojen yapıları, yuvarlak hatlarını, hafif pürüzlülüklerini korudukları, ortalama çaplarının büyüdüğü ve 414-473 nm civarında olduğu görüldü.



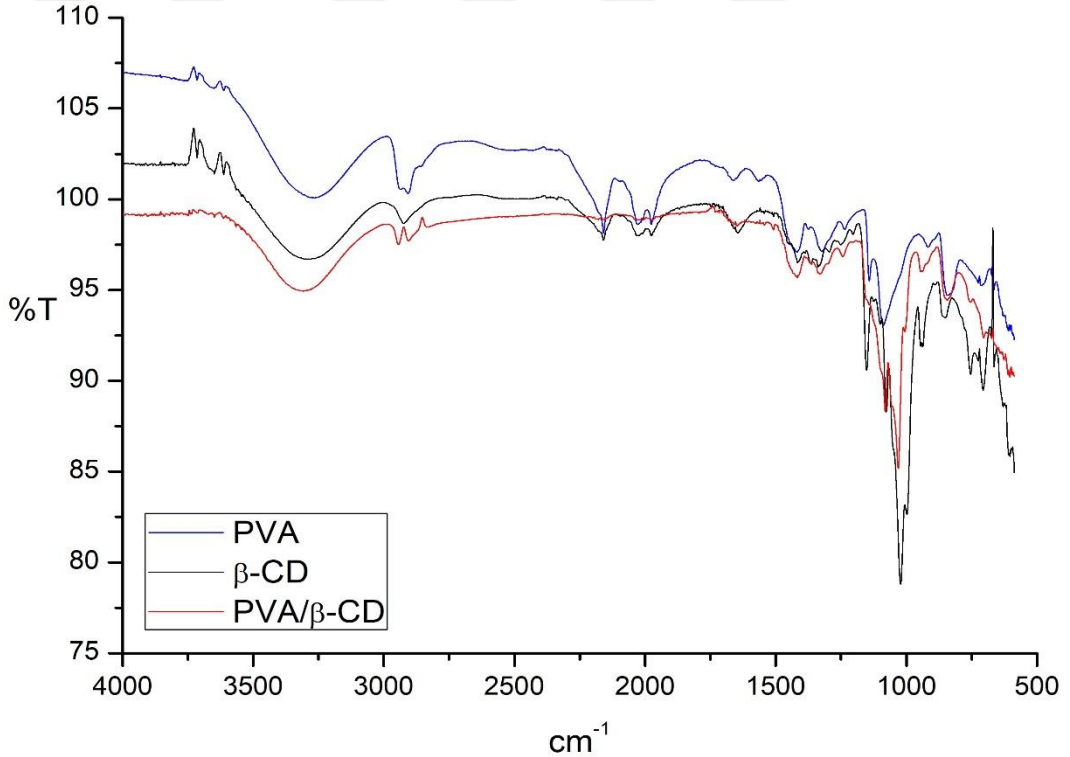
Şekil 3.26. PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelele



Şekil 3.27. Çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelele

3.4.2. ATR-FTIR analizi

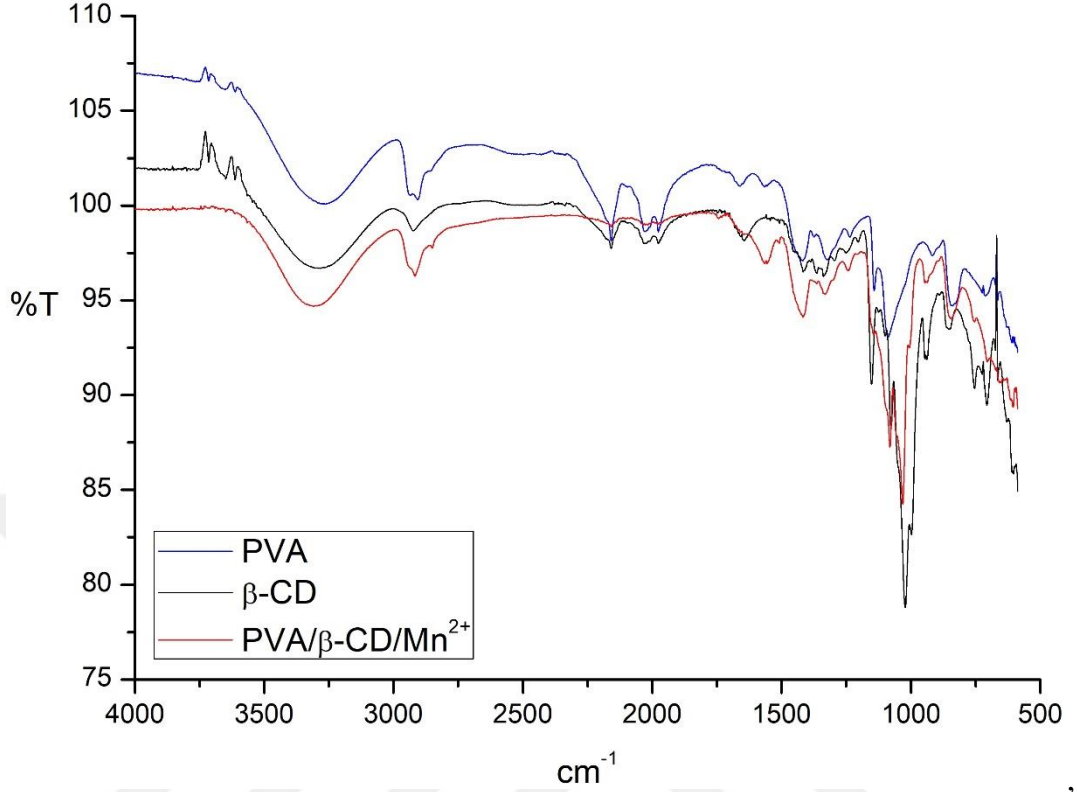
Ham PVA, ham β -CD ve PVA/ β -CD nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları Şekil 3.28.'de verildi. PVA'ya ait spektrumlarında 3000-3600 cm^{-1} arasında alkol gruplarındaki -OH titreşim bandına, 2936 cm^{-1} ve 2906 cm^{-1} 'de ise sırasıyla CH_2 'nin asimetrik ve simetrik gerilme pikleri gözlemlendi. β -CD'ye ait spektrumlarında ise 3300 cm^{-1} 'de -OH gerilme pikleri, 2923 cm^{-1} 'de C-H'nin asimetrik ve simetrik gerilme pikleri gözlemlendi. Bunlara ek olarak 1650 cm^{-1} 'de β -CD yapısında bulunan su moleküllerinin deformasyonu sonucu oluşan H-O-H gerilmelerine aittir. 1153 cm^{-1} 'de C-O-C titreşim pikleri ve 1023 cm^{-1} 'de ise C-H ve C-O gerilmelerine ait pikler görülmektedir. PVA/ β -CD nanofiber membranların yapısına ait ATR-FTIR spektrumlarına bakıldığında ham PVA ve ham β -CD'ye ait piklerde çok az miktarda kaymalar olsa da korunduğu görülmektedir.



Şekil 3.28. Ham PVA, ham β -CD ve PVA/ β -CD nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

Ham PVA, ham β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranların ATR-FTIR spektrumları ise Şekil 3.29.'da verildi. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranları yapısına ait ATR-FTIR spektrumları PVA/ β -CD nanofiber membranları ile karşılaştırıldığında O-H gerilme piklerinin genişlediği görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre Mn^{+2} iyonlarının PVA ve β -CD molekülleri arasında bazı etkileşimlerin

olduğunu gösterdi. Bu etkileşimlerin Mn^{2+} iyonları ile hem PVA'nın hem de β -CD'nin O-H grupları arasında koordinasyon yoluyla oluştuğu söylenebilir.



Şekil 3.29. Ham PVA, ham β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{2+} nanofiberlere ait ATR-FTIR spektrumları

3.4.3. TGA analizi

PVA, β -CD ve PVA/ β -CD nanofiber yapılarına ait TG ve dTG eğrileri Şekil 3.30.'da verildi. Analizler $20^{\circ}C/dk$ sabit ısıtma hızında, $50-700^{\circ}C$ arasında Perkin Elmer TGA 4000 marka termo-gravimetrik analiz cihazı ile yapıldı. Termal analiz yöntemleri ile fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerin yanı sıra polimerin içerdiği kül miktarı ve varsa modifikasyon hakkında önemli bilgilere ulaşılabilir.

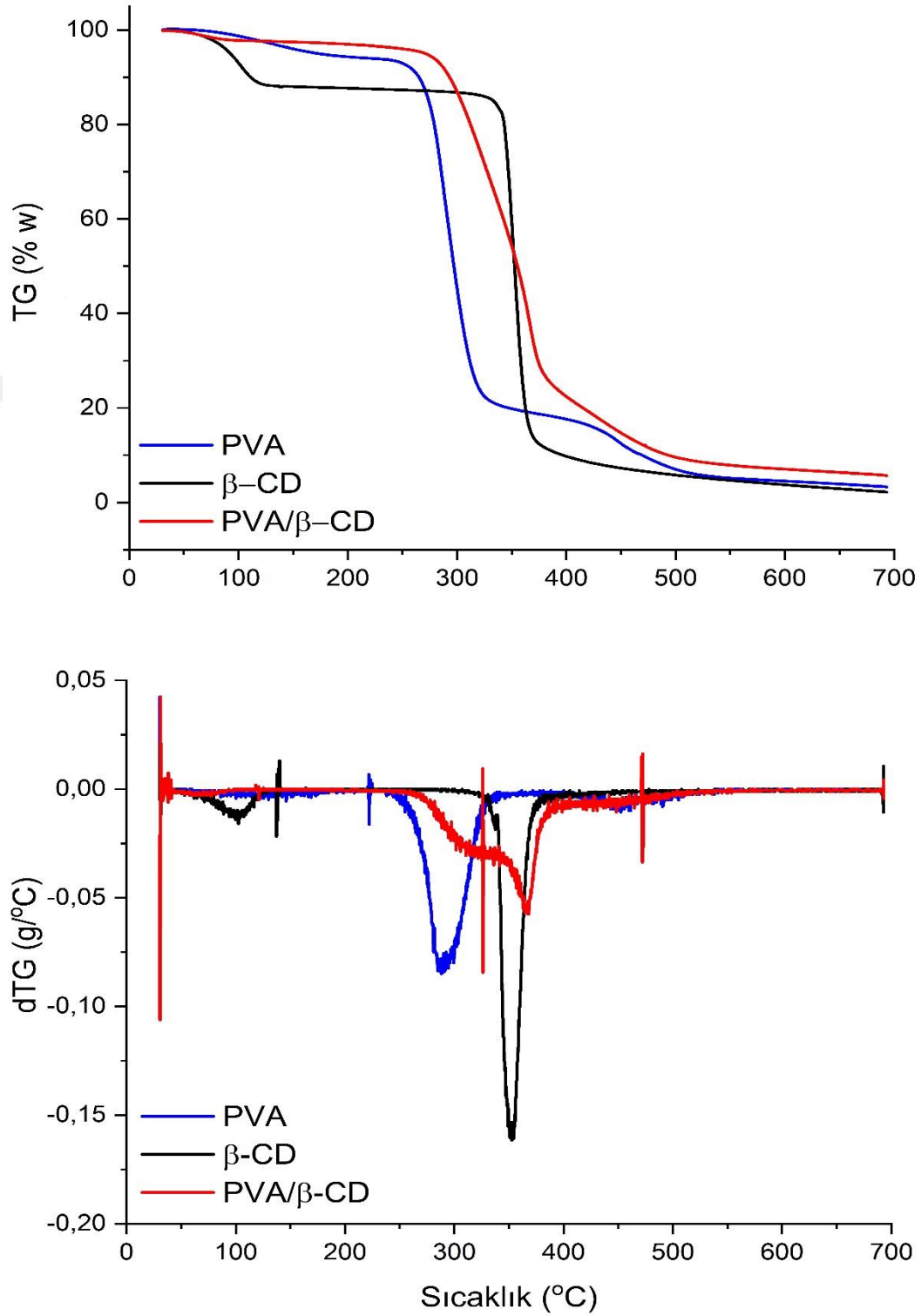
Ham PVA yapısı için TG eğrisi incelendiğinde üç adımlı bir bozunma eğrisi görüldü. İlk adımda ham PVA yapısı için $190^{\circ}C$ ısının altında kütlede %6'lık bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın nedeni yapıda bulunan suyun uzaklaşmasından kaynaklanıyor olabilir. 2. aşamada $250-330^{\circ}C$ sıcaklıkları arasında ilk kütlenin yaklaşık %80'inin yapıdan uzaklaştığı görüldü. Bu aşamada sıcaklıktan dolayı H_2O eleme ve zincir sıyırma (chain stripping) reaksiyonlarının gerçekleştiği literatürde belirtilmektedir (Gilmanl, 1995). 3. aşamada $410-500^{\circ}C$ sıcaklıkları arasında gerçekleşmiş ve ilk kütlenin %93'ünün yapıdan uzaklaştığı gözlemlendi. Bu aşamada

kütle azalmasının sebebi H₂ eliminasyon reaksiyonlarından kaynaklandığı literatürde belirtilmektedir (Gilmanl, 1995; Tămășan ve Simon, 2012). Deney bittikten sonra yapının kül kalıntı miktarı ise %3,5 olarak bulundu. dTG eğrisinde PVA'nın ham hali için ilki 289°C ve ikinci de 452°C'de olmak üzere iki tepe noktası görülmektedir. Bu tepeler sırasıyla 2. ve 3. aşamalardaki maksimum bozunmanın gerçekleştiği sıcaklıkları belirtmektedir.

Ham β-CD yapısı için TG eğrisi incelendiğinde üç adımlı bir bozunma eğrisi görüldü. İlk adımda ham β-CD yapısı için 120°C sıcaklığın altında kütlede %12'lik bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın nedeni β-CD yapısında bulunan yüzeysel suyun uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. 2. aşamada 120-325°C sıcaklıkları arasında ilk kütlede yaklaşık %13'ünün yapıdan uzaklaştığı görüldü. Bu aşamada sıcaklıktan dolayı yapının iç kısmında bulunan su moleküllerinin uzaklaştığı literatürde belirtilmektedir (Giordano vd., 2001). 3. aşamada 352-390°C sıcaklıkları arasında gerçekleşti ve ilk kütlede %90'ı yapıdan uzaklaştı. Bu aşamada kütle azalmasının sebebi yapıda bulunan glikoz moleküllerinin uzaklaşmasından kaynaklandığı literatürde belirtilmektedir (Shown vd., 2010). 700°C sonunda yapının kül kalıntı miktarı ise %2 olarak bulundu. dTG eğrisinde β-CD'nin ham hali için ilki 103°C ve ikinci de 353°C'de olmak üzere iki tepe noktası görüldü. Bu tepeler sırasıyla 2. ve 3. aşamalardaki maksimum bozunmanın gerçekleştiği sıcaklıkları belirtmektedir.

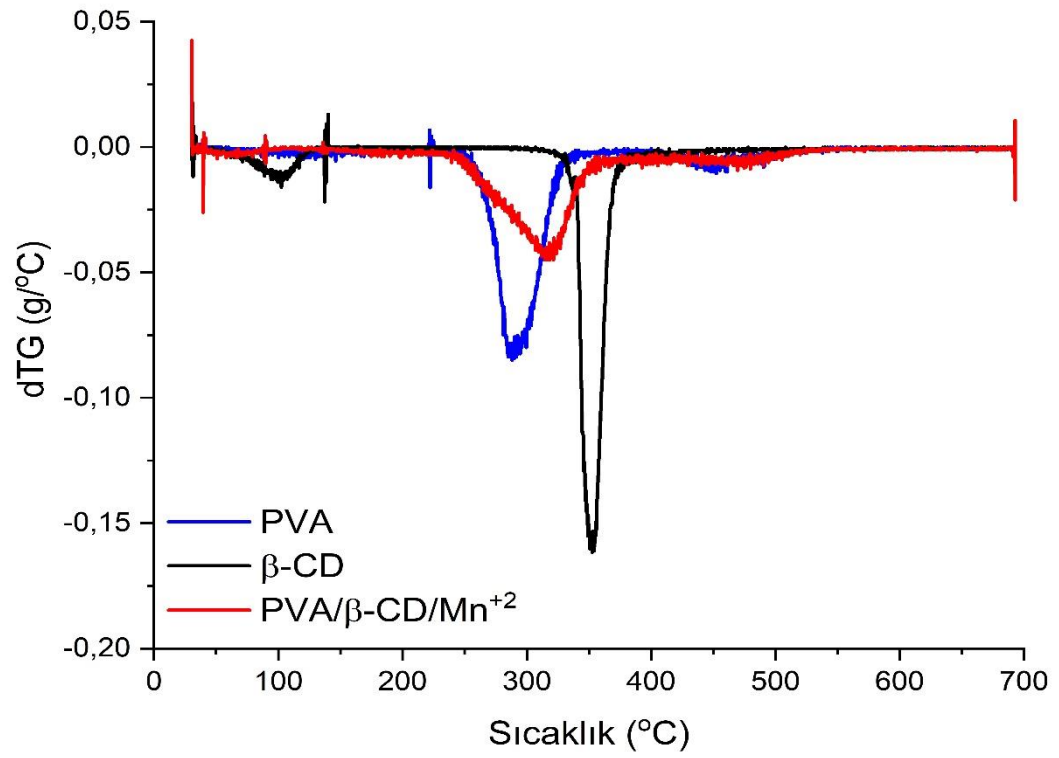
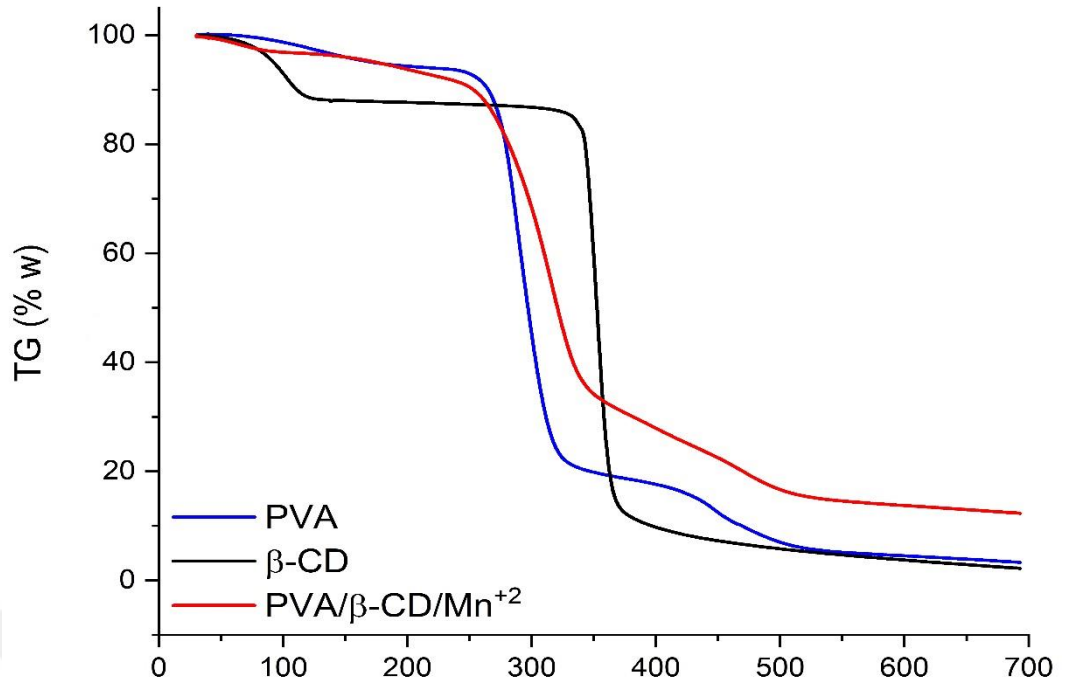
PVA/β-CD nanofiber membranların yapısına ait olan eğrilere bakıldığında polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapıdaki farklılıklardan ve polimerler arasındaki etkileşmeden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden 275°C'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %5,5'lik bir kütle azalımı görüldü. 275-380°C arasında kütle sabit bir oranda azalma göstermiş ve diğer polimerlere oranla daha yumuşak gerçekleştiği görüldü. Bu aşamada ilk kütlede göre yaklaşık %75'lik bir azalma gerçekleştiği görüldü. Bu durum -OH grupları arasında oluşan hidrojen bağından ve çapraz bağlama (glutaraldehit) işleminden kaynaklanıyor olabilir. 380-490°C arasında ilk kütlede oranla %90'lık bir bozunma gözlemlendi. PVA ve β-CD polimerlerinin maksimum bozunma sıcaklıkları sırası ile 289°C ve 353°C'dir. PVA/β-CD nanofiber membran yapısının maksimum bozunma sıcaklığı ise her iki polimerin bozunma sıcaklıklarında daha yüksek olup 460°C olarak bulundu. Analiz sonunda PVA/β-CD için kül kalıntı miktarı %6 olarak belirlendi. PVA/β-CD nanofiber

membran yapısı ham PVA ve ham β -CD'ye göre daha yüksek termal kararlılığa sahiptir bu durum nanofiberlerin yapısında bulunan PVA ve β -CD arasında oluşan hidrojen bağları ile açıklanabilir.



Şekil 3.30. Ham PVA, ham β -CD ve PVA/ β -CD nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

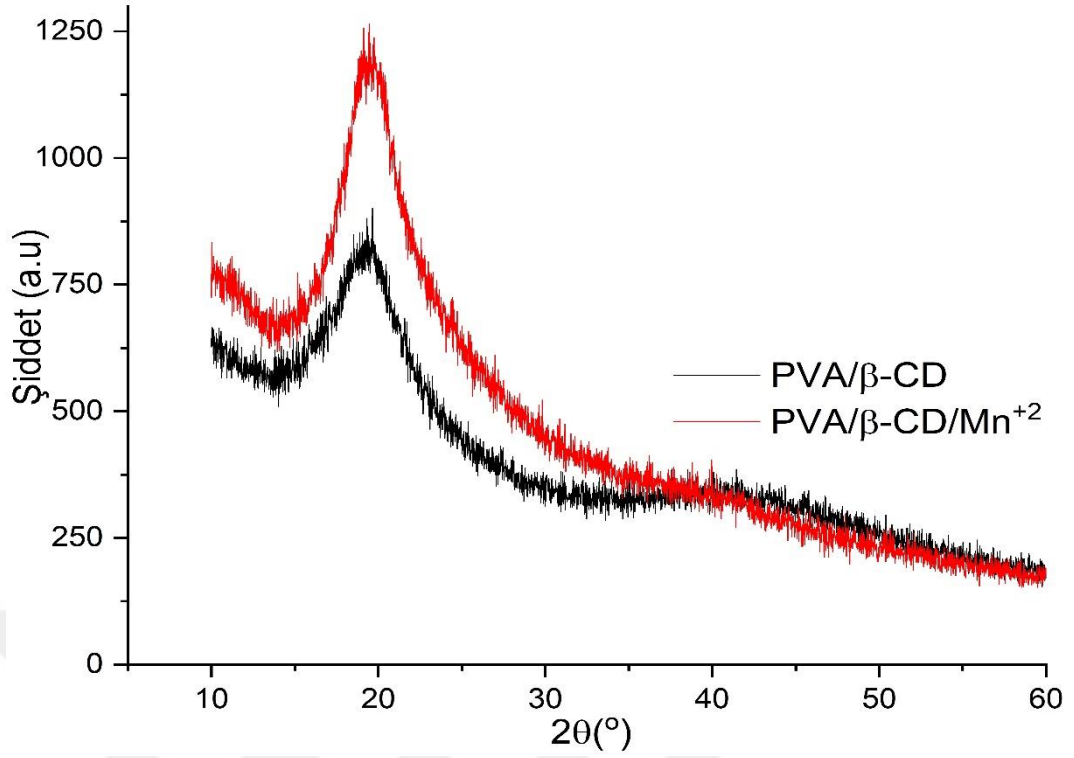
PVA, β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber yapılarına ait TG ve dTG eğrileri ise Şekil 3.31.'de verildi. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranların yapısına ait olan eğrilere bakıldığında ise polimerlerin ham haldeki bozunma eğrilerinde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıklar polimerler arasındaki tekstural yapılarıdaki farklılıklardan, polimerler arasındaki etkileşmeden ve Mn^{+2} iyonlarının polimerle yaptığı etkileşimlerden kaynaklı olabilir. TG eğrilerinden $250^{\circ}C$ 'nin altında suyun yapıdan uzaklaşmasına bağlı olarak %9'luk bir kütle azalımı görüldü. $250-340^{\circ}C$ arasında kütle sabit bir oranda azalma gösterdi ve diğer polimerlere oranla daha yumuşak gerçekleşti. Bu aşamada ilk kütleyle göre yaklaşık %65'lik bir azalma gerçekleştiği görüldü. Bu durum -OH grupları arasında oluşan hidrojen bağından, çapraz bağlama (glutaraldehit) işleminden ve yapıda bulunan Mn^{+2} iyonlarının polimerler ile oluşturduğu koordinasyondan kaynaklanıyor olabilir. $340-511^{\circ}C$ arasında ilk kütleyle oranla %85'lik bir bozunma gözlemlendi. PVA ve β -CD polimerlerinin maksimum bozunma sıcaklıkları sırası ile $289^{\circ}C$ ve $353^{\circ}C$ 'dir. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membran yapısının maksimum bozunma sıcaklığı ise her iki polimerin bozunma sıcaklığı arasında bir değer olan $320^{\circ}C$ olarak bulundu. Analiz sonunda PVA/ β -CD/ Mn^{+2} için kül kalıntı miktarı %12 olarak belirlendi. Bu durum nanofiberlerin yapısında bulunan PVA ile β -CD arasında oluşan hidrojen bağları ve Mn^{+2} iyonlarının hem PVA hem de β -CD ile arasında oluşan koordinasyon ile açıklanabilir.



Şekil 3.31. Ham PVA, ham β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlere ait TGA ve dTG eğrileri

3.4.4. XRD analizi

PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiber membranlarına ait XRD spektrumları Şekil 3.32.'de verildi. PVA/ β -CD nanofiber membranına ait spektrumun incelendiğinde $2\theta=19,4^\circ$ 'de bir pik ve $2\theta=40,8^\circ$ 'da bir omuz verdiği görüldü. Yapıya Mn⁺² ilavesi ile elde edilen PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiber membranlara ait spektrum incelendiğinde $2\theta=18,9^\circ$ 'de bir pik görülürken, $2\theta=40,8^\circ$ görülen pik gözlenmedi. Mn⁺² iyonlarının dahil edilmesinden dolayı polimer çözeltisinin iletkenliği ve nanofiber yapısını değiştirdiği için, elde edilen PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiberinin kristal yapısı değiştiği şeklinde yorumlanabilir. Yapıya Mn⁺² ilavesi ile PVA/ β -CD nanofiber tepe noktasının sola kayması, kristal kafes içinde farklı aralığa sahip farklı türde bir kristal formun oluştuğu şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuçlar her iki nanofiber membranın kristal formlarının ve PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiberlerdeki yönlendirmenin PVA/ β -CD nanofiber membranlarda bulunanlardan farklı olduğunu göstermektedir. Bunlara ek olarak Mn⁺² ilavesiyle sonucunda PVA/ β -CD nanofiber membranına ait spektrum PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiber membranı ile karşılaştırıldığında şiddette azalmalar görülmektedir. Bu durumun nedeni Mn⁺²'nin hem PVA hem de β -CD ile moleküler seviyede harmanlanmasından kaynaklandığı söylenebilir. Literatürde yapıya başka bir polimer ya da metal ilavesi ile pik şiddetinde polimerin yapısına bağlı olarak artışın gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur (Lakshmi vd., 2015; Altındaş Yıldırım, 2018).



Şekil 3.32. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerine ait XRD spektrumları

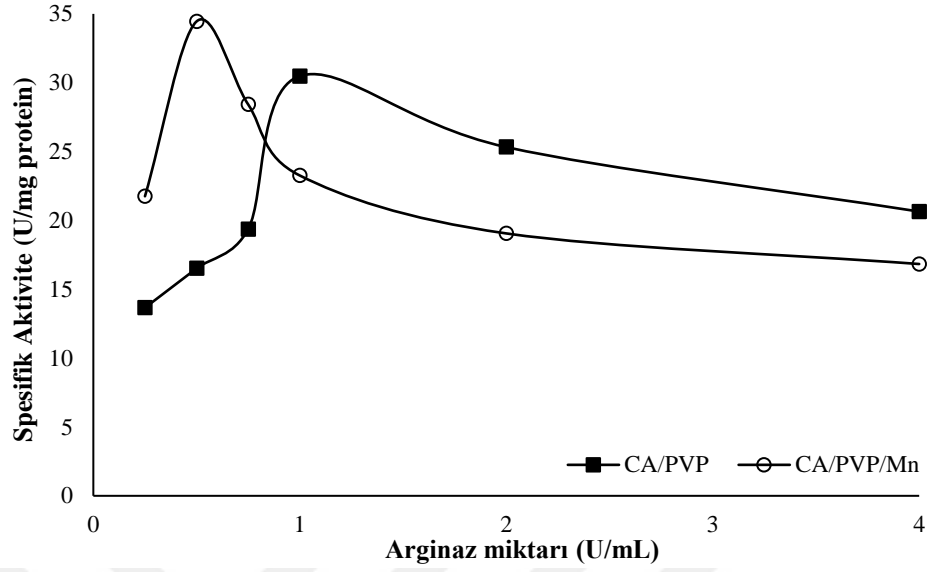
3.5. CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları

Optimum koşullarda sentezlenen CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz enzimi adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak immobilize edildi. Optimizasyon parametreleri olarak arginaz miktarı, nanofiber miktarı, adsorpsiyon süresi ve çapraz bağlayıcı miktarı çalışıldı. Karakterizasyon kısmında ise optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri incelendi.

3.5.1. Arginaz miktarı

CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum enzim miktarını belirlemek için 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 ve 4 U/mL miktarlarında arginaz enzimi kullanıldı. Hem arginaz immobilize CA/PVP hem de arginaz immobilize CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Farklı derişimlere karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.33'deki sonuçlara göre arginaz immobilize CA/PVP

nanofiberleri için optimum enzim miktarı 1 U/mL, CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberleri için ise 0,5 U/mL olarak bulundu.



Şekil 3.33. CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi

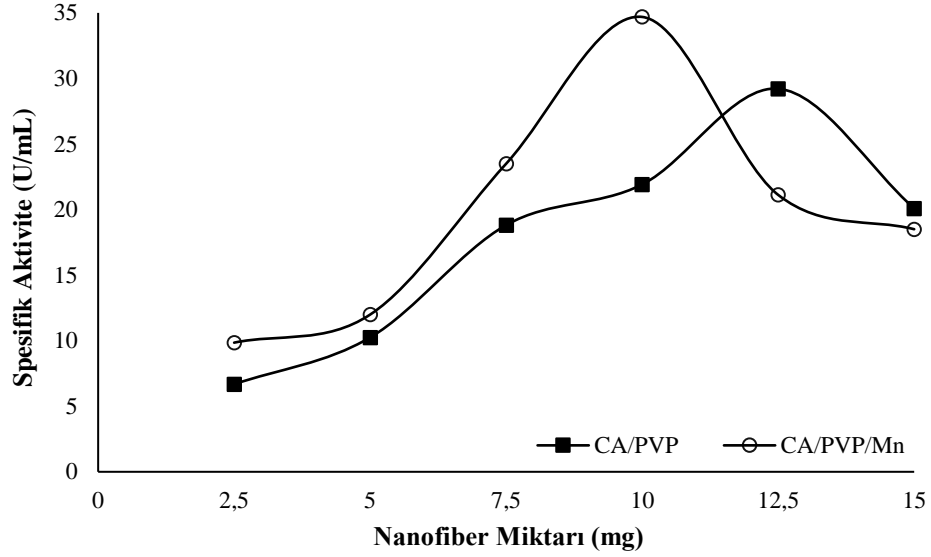
Nanomalzemelere enzim immobilizasyonu optimizasyon çalışmalarında en önemli parametrelerden biri enzim miktarıdır. Her iki nanofiber için de optimum arginaz miktarının üzerindeki miktarlarda spesifik aktivite giderek azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni ortamdaki taşıyıcı miktarının yetersiz olması olabilir. Ayrıca ortamdaki arginaz molekülleri taşıyıcı yüzeyine bağlanması sırasında multi adsorpsiyon gerçekleşmiş olabilir.

Arginaz immobilize CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberler için optimum enzim miktarı CA/PVP nanofiberlere göre daha düşük bulundu. CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlerin yapısında bulunan Mn²⁺ iyonları, optimum enzim miktarının altındaki miktarlarda birim Mn²⁺ başına düşen enzim miktarı az olduğu için enzim aktivite göstermemiş olabilir. Optimum enzim miktarının üzerindeki derişimlerde ise enzim miktarı artmasına rağmen Mn²⁺ miktarı sabittir. Bu nedenle enzimin aktivite kazanabilmesi için gerekli olan Mn²⁺ miktarı ortamda bulunmadığı için aktivite düşmüş olabilir.

3.5.2. Nanofiber miktarı

CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum taşıyıcı miktarını belirlemek için 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 15 mg nanofiber

immobilizasyon işleminde kullanıldı. Hem arginaz immobilize CA/PVP hem de arginaz immobilize CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Taşıyıcı miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.34.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize CA/PVP nanofiberleri için optimum taşıyıcı miktarı 12,5 mg, CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberleri için ise 10 mg olarak bulundu.



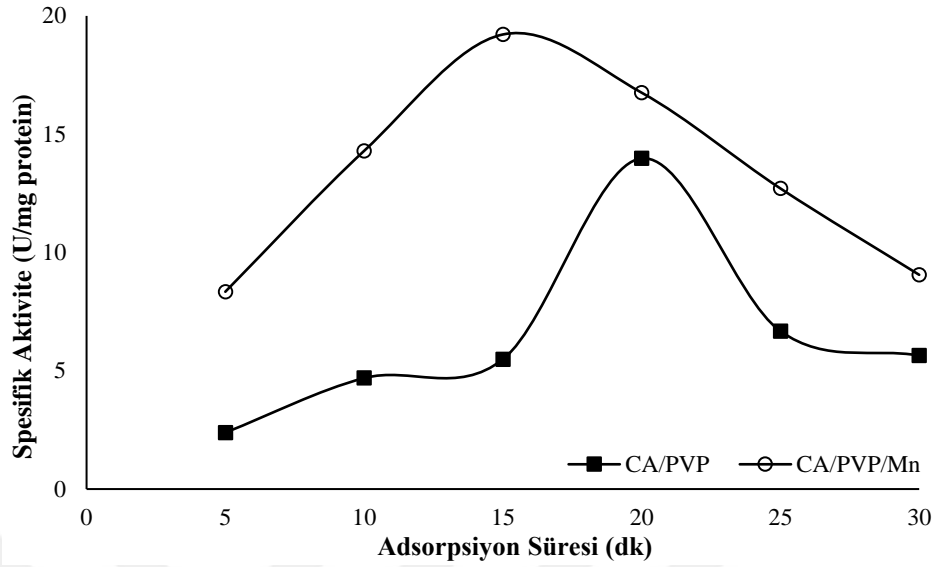
Şekil 3.34. CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi

Optimum taşıyıcı miktarının altındaki miktarlarda, ortamda yeterli fiber bulunmadığı için enzim moleküllerinin tamamı immobilize olamamış olabilir. Optimum taşıyıcı miktarının üstündeki miktarlarda ise; fiber miktarının fazla olması immobilize edilen enzim ile substrat arasında gerçekleşmesi gereken etkileşime sterik olarak engel olmuş olabilir.

3.5.3. Adsorpsiyon süresi

CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda öncelikle adsorpsiyon daha sonra çapraz bağlama yöntemleri kullanıldı. Enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve çapraz bağlayıcı miktarı sabit tutularak optimum adsorpsiyon süresini belirlemek için 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika süre ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla adsorpsiyon süresine karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.35.'deki sonuçlara

göre arginaz immobilize CA/PVP nanofiberleri için adsorpsiyon süresi 20 dakika, CA/PVP/Mn⁺² nanofiberleri için ise 15 dakika olarak bulundu.



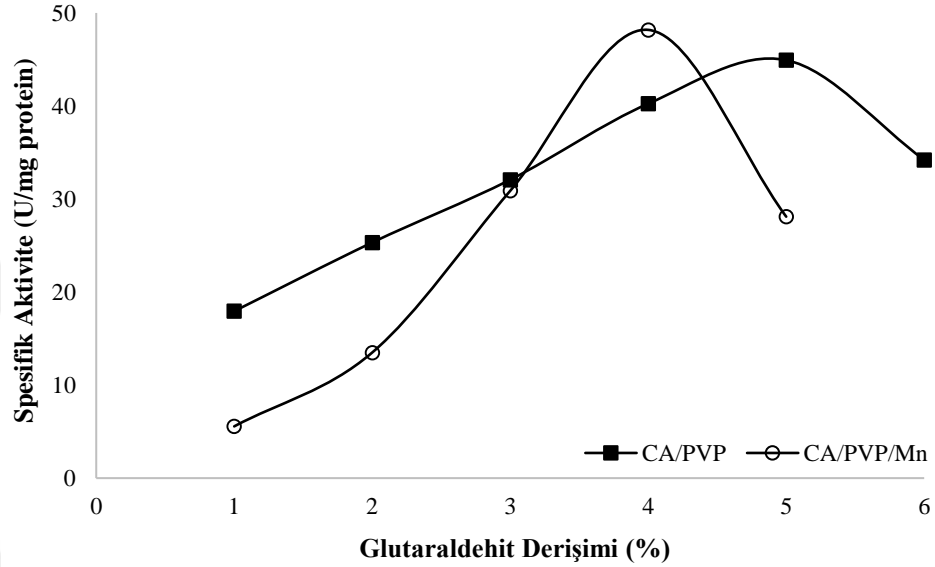
Şekil 3.35. CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

CA/PVP nanofiberlerin yüzeyi 20. dakikada, CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin yüzeyi ise 15. dakikada arginaz enzimi molekülleri bakımından doygunluğa ulaştı ve bu sürelerden sonra immobilize enzim molekülleri taşıyıcı yüzeyinden desorbe olmaya başlamış olabilir. Ayrıca CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin yapısında bulunan ve arginaz enziminin aktivitesi için gerekli olan Mn⁺² iyonları enzimin fibere olan ilgisini etkilemiş olabilir. Daha kısa sürede ve daha etkili bir immobilizasyon işleminin gerçekleşmesine neden olduğu söylenebilir. Bunun yanında Mn⁺² iyonlarının koordinasyon kabiliyeti nedeniyle ilave bağlar yapmak suretiyle grafikten de anlaşılacağı üzere enzimin desorpsiyonunun kademeli olarak gerçekleşmesini sağlamıştır. Bu nedenle, CA/PVP nanofiber için bunu söylemek mümkün değildir.

3.5.4. Çapraz bağlayıcı miktarı

Enzim immobilizasyonunda glutaraldehit yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardan bir tanesidir. Kolay elde edilebilir olması, güvenli olması ve ekonomik olması gibi nedenlerden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlama işlemi geri dönüşümsüz olarak ve nötr pH'a yakın şartlarda gerçekleşir.

Optimum glutaraldehit derişimini belirlemek için enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve adsorpsiyon süresi sabit tutularak %1, %2, %3, %4, %5 ve %6 glutaraldehit derişimlerinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla çapraz bağlayıcı miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.36.'daki sonuçlara göre arginaz immobilize CA/PVP nanofiberleri için optimum glutaraldehit miktarı %5, CA/PVP/Mn⁺² nanofiberleri için ise %4 olarak bulundu.



Şekil 3.36. CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi

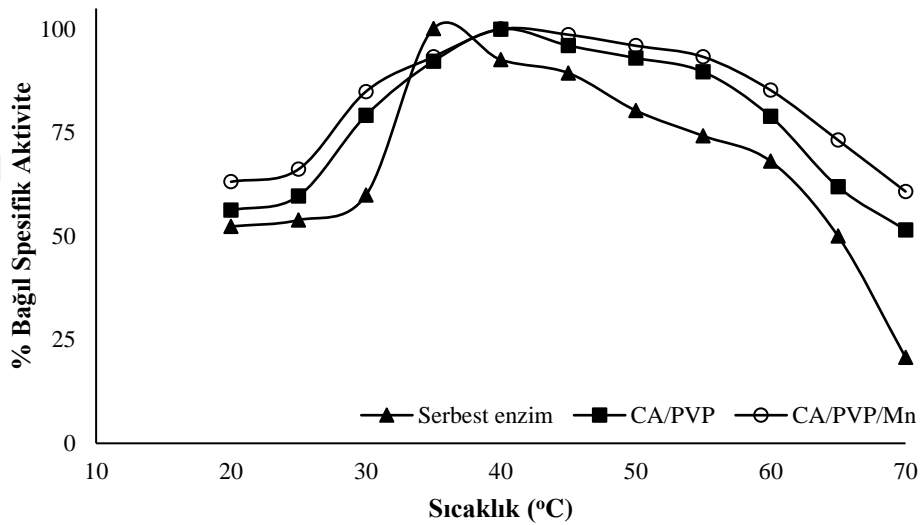
Optimum GA miktarının altındaki değerlerde, ortamdaki GA miktarı enzim moleküllerinin nanofiberlere immobilize olması için yetersiz gelmiş olabilir. Optimum GA miktarının üzerindeki değerlerde ise, ortamdaki GA miktarının enzim moleküllerinin aktif merkezini etkilemesi ile birlikte enzimin yapısında konformasyonel değişiklikler meydana gelmiş olabilir.

Zhang ve arkadaşları tarafında yapılan bir çalışmada rekombinant insan arginaz-1 enzimi glutaraldehit kullanılarak kitosan parçacıklara immobilize edilmiştir. Bu çalışmada glutaraldehit derişimi %0,5-2,5 olacak şekilde çalışılmıştır ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça göreceli aktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır (Zhang vd., 2015). Yapılan bir başka çalışmada ise arginaz-1 selüloz mikrokürelelere glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Glutaraldehit derişimi 0,3, 0,5, 0,8 ve 1,0 mM olacak şekilde deneyler yapılmış ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça aktivitenin azaldığı gözlenmiştir (Li vd., 2014).

3.5.5. Optimum sıcaklık

Ortam sıcaklığındaki değişme enzim aktivitesinin de değişmesine neden olur. Sıcaklığın artması ile enzim molekülleri arasındaki çarpışma sayısı artar ve bunun sonucu olarak genellikle tepkime hızında artmaktadır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Ancak enzimler protein yapısında olmalarından dolayı optimum sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda enzimler denatüre olabilirler ve aktiviteleri azalabilir.

CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin sıcaklıkla değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için aktivite sıcaklığı 20-70°C aralığında değiştirilerek aktivite tayini yapıldı. Şekil 3.37.'de görüldüğü gibi serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 35°C iken bu değer arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar için ise 40°C olarak bulundu.



Şekil 3.37. CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri

Grafik incelendiğinde serbest arginaz aktivitesi optimum sıcaklıktan düşük ve yüksek değerlerde azalırken, arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların sıcaklık profili daha geniş bir alana yayılım gösterdi. Bu, immobilizasyon işlemi sonrası nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan CA ve PVP polimerlerinin ve Mn⁺² iyonlarının

enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığı şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca arginaz immobilize CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar immobilize CA/PVP nanofiber membranlara göre tüm sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdi. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn⁺²'nin değişen sıcaklık ile oluşan ısı değişimlerine karşı membran yapılarını daha dirençli bir hale getirdiği söylenebilir.

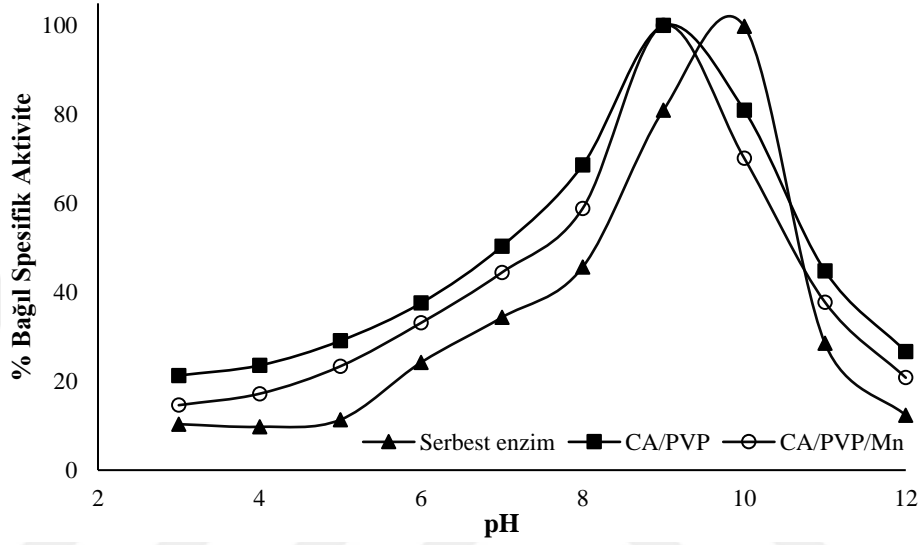
Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık sırasıyla 40°C ve 60°C olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 37°C iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 38°C olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C'de olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz-1 enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-1 selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur.

3.5.6. Optimum pH

Ortam pH'ında meydana gelen değişiklikler enzimin aktivitesinin değişmesine neden olabilir. Enzimler protein yapısında oldukları için yapılarındaki aminoasit

kalıntılardaki iyonik özellikler aşırı asidik ve bazik ortamlarda değişebileceğinden enzimin denatüre olmasına neden olabilir.

CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin pH ile değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için aktivite ortamının pH'ı 3,0-12,0 aralığında değiştirilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve Şekil 3.38.'de verildi.



Şekil 3.38. CA/PVP ve CA/PVP/ Mn⁺² nanofiberlere üreaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri

Grafik incelediğinde serbest enzimin optimum pH 10,0 iken, arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar için ise optimum pH 9,0 olarak bulundu. Serbest enzim özellikle aşırı asidik ve bazik koşullarda yaklaşık %10 civarında aktivitede gösterirken arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar ise aktivitelerinin %20'sini koruduğu görüldü. Optimum pH'daki asidik bölgeye kayma membran yapısında bulunan selüloz temelli olan CA'dan kaynaklanmaktadır. Özellikle CA negatif yüklü yüzeylere sahip olduğu için asidik ortamlarda enzimin mikroçevresinin tamponlama etkisiyle bir koruma sağladığı düşünülebilir.

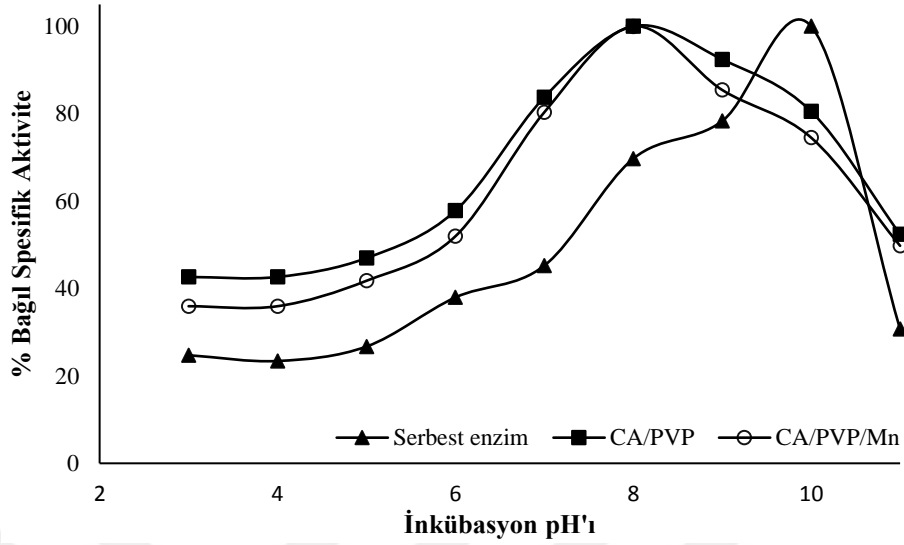
Arginaz immobilize CA/PVP nanofiber membranlar immobilize CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlara göre tüm pH değerlerinde daha yüksek aktivite göstermiştir. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn⁺² iyonlarının enzim moleküllerinin yanında CA ve PVP yapısında bulunan enzimin mikroçevresine tamponlama yapabilen gruplar ile şelat oluşturduğu söylenebilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğeri arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH değeri 10,0 immobilize enzim için ise 9,5-10,5 aralığında bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest arginaz için optimum pH 11,0 iken, poliakrilamid destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise 9,5 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH 7,0 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 7,5 olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz-I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH değeri 7,0-11,0 aralığında bulunmuştur. Grady ve Joyce (1980) yılında yapılan çalışmada ise arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara sığır karaciğer arginazı enkapsüle edilmiştir ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH değerinin 10,0 olduğu görülmüştür.

3.5.7. pH kararlılığı

CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin pH kararlılığını belirleyebilmek amacıyla immobilize nanofiberler pH 3,0-11,0 aralığında hazırlanan tamponlar içerisinde 1 saat

inkübe edildi. İnkübe edilen immobilize nanofiberlerin aktivite tayinleri sonucunda pH kararlılıklarının grafiği Şekil 3.39.'da verildi.



Şekil 3.39. CA/PVP ve CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri

Her iki nanofiber membran taşıyıcıya da immobilizasyon işleminden sonra hem asidik hem de bazik bölgelerde serbest enzime göre önemli derecede pH kararlılığı gösterdi. Özellikle asidik koşullarda her iki nanofiber membran taşıyıcıda serbest enzime göre daha alkali mikroçevre sunduğu için daha yüksek aktivite gösterdi. CA negatif yüklü yüzeylere sahip olduğu için immobilize enzim için daha alkali mikroçevre sunar ve aşırı asidik ortamlarda tampon görevi gördüğü söylenebilir. Arginaz immobilize CA/PVP/Mn²⁺ nanofiberler aynı pH koşullarında CA/PVP nanofiber membranlara göre daha düşük aktivite gösterdi. Bunun nedeni ise yapıdaki Mn²⁺ iyonlarının CA yapısındaki ve PVP yapısındaki pH değişimlerine karşı tampon görevi görebilecek gruplar ile şelat oluşturması olabilir. Sonuç olarak immobilize enzim çok asidik ve çok bazik koşullarda taşıyıcının sahip olduğu avantajlı yapısından dolayı denatüre olmadan aktivitesini önemli ölçüde koruduğu görüldü.

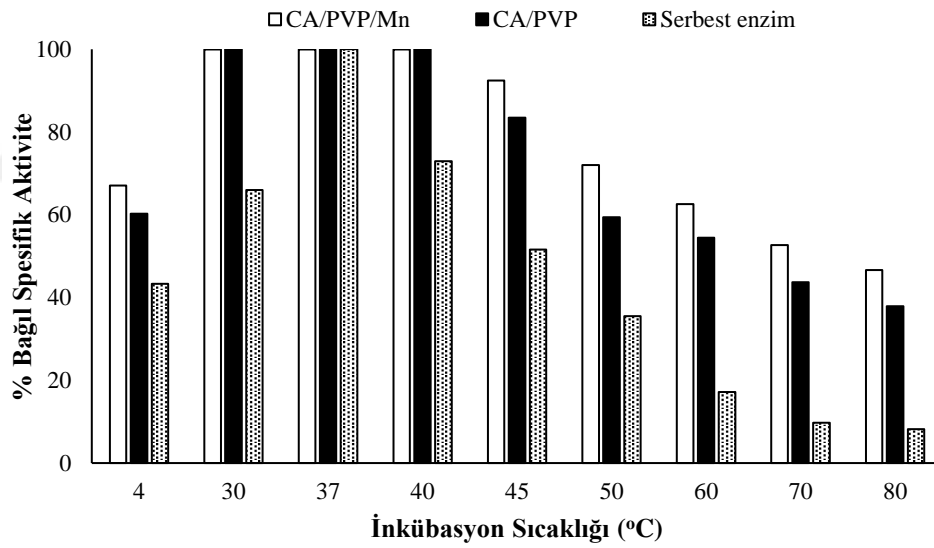
Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, yapılan pH kararlılığı deneyleri sonucunda serbest enzim için optimum değer 7,5 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 8,0 olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidrosietilmetil akrilat üzerine

immobilize edilmiş ve pH kararlılığı deneylerinde serbest enzim için optimum değer 8,0 iken immobilize enzim için bu değer 5,0-9,0 aralığında olduğu bulunmuştur.

3.5.8. Termal kararlılık

Termal kararlılık enzimlerin aktivitelerinde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir. Enzimlerin geniş sıcaklık aralıklarında uzun süre aktivitelerini korumaları endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarına olanak sağlar. İmmobilizasyon sonrasında enzimlerin üç boyutlu yapısında değişiklikler meydana gelebilir ve bunun sonucunda enzimlerin termal kararlılığı değişiklik gösterebilir.

CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için farklı (4, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80°C) sıcaklıklardaki su banyolarında 1 saat inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuçlar Şekil 3.40.'da verildi.



Şekil 3.40. CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği

Grafik incelendiğinde arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların çalışılan tüm sıcaklıklarda serbest arginaz enzimine göre daha kararlı olduğu görüldü. Özellikle 30, 37 ve 40°C'de hem CA/PVP hem de CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranlar aktivitelerini tamamen korumuşlardır. 80°C'de arginaz immobilize CA/PVP/Mn⁺² nanofiberler aktivitelerinin %47'sini koruduğu gözlemlendi. Aynı sıcaklıkta arginaz immobilize CA/PVP nanofiber membranlar aktivitesinin

%38'ini korurken serbest enzim ise aktivitesinin sadece %8'ini koruduğu görüldü. Bu durum immobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan CA ve PVP polimerlerinin ve Mn^{+2} iyonlarının enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığı şeklinde yorumlanabilir. Özellikle nanofiber membranlarda bulunan CA üzerindeki hidroksil gruplarının suda özel bir şekilde yapılanabilme özellikleri sayesinde her iki membrana ilave kararlılık kazandırmıştır. Ayrıca CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranların çalışılan her sıcaklıkta daha kararlı olmasının en önemli nedeni yapısında bulunan Mn^{+2} iyonlarının enzim ile şelat yapabilmesi nedeniyle yapıya ilave kararlılık kazandırması ve enzimin denatürasyonunu engellemesi olabilir. Aynı zamanda immobilizasyon işlemi sonrasında kararlılıktaki artış, nanofiber membran taşıyıcı ile enzim arasında oluşan kararlı bağların kırılması için gereken enerjinin çok yüksek olmasından da kaynaklanabilir. Ayrıca, membranların özellikle yüksek sıcaklıklarda ortamdaki ısının şiddetini üzerine alarak olması gereken sıcaklığın şiddetini enzimin üzerine yansıtmasına engel olarak, enzimin denature olmasını engellemesiyle açıklanabilir.

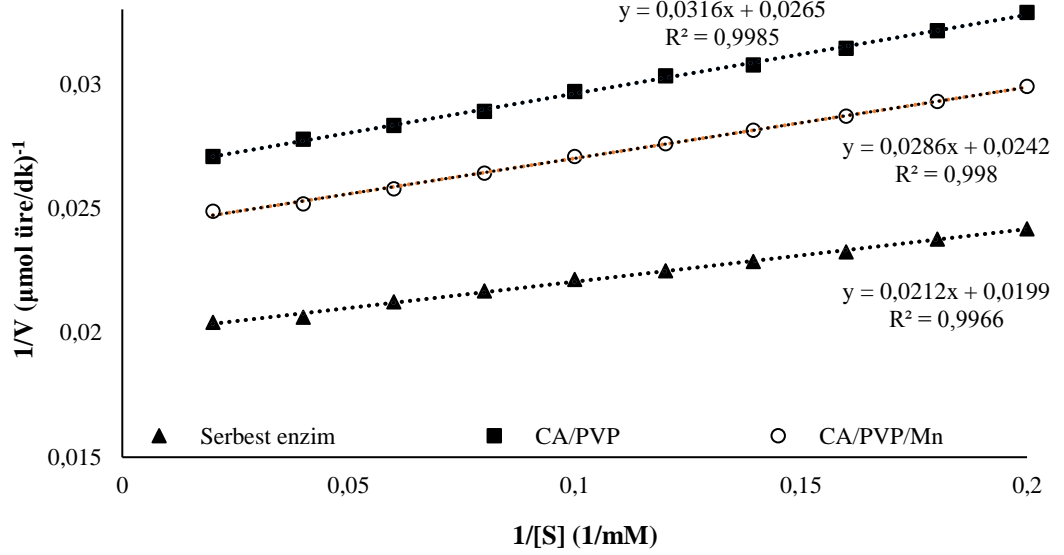
Turras (2008) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus Subtilis*'den elde edilen arginaz enzimi Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA, Sepabeads EC-EP ve Eupergit C 250 L olmak üzere 4 farklı epoksi desteklere immobilize edilmiştir. 60°C'de yapılan termal kararlılık deneyleri sonucunda 3 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybederken, Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA ve Eupergit C 250 L 2 saat sonunda aktivitelerinin %50'sini kaybetmiştir. Immobilize Sepabeads EC-EP ise 6 saat sonunda aktivitesinin %60'ını korumuştur. Başka bir çalışmada poliakrilamid destek üzerine arginaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 40, 60 ve 70°C'de immobilize enzim için termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. 40°C'de immobilize enzim 120 dakika sonunda aktivitesini korumayı başarırken, 60°C'de 60 dakika sonunda aktivitesinin %80'ini kaybederken, 70°C ise 30 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybetmiştir (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidroksietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim 30 dakika boyunca 20-100°C aralığında tutularak termal kararlılık profilleri incelenmiştir. Serbest enzim 20-45°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken, 45°C üzerindeki sıcaklıklarda aktivite kaybetmeye başlamıştır ve 65°C'de

aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 25-75°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla aktivitesini kaybetmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise rekombinant insan arginaz-I enzimi ve kitosan parçacıklara immobilize edilmiş enzim için 40, 50 ve 60°C'de termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. Serbest enzim 40°C'de 225 dakika sonunda aktivitesinin %20'sini kaybederken immobilize enzim ise sadece %10'unu kaybetmiştir. 50°C'de serbest enzim 25 dakika sonra aktivitesinin %50'sini kaybederken immobilize enzim ise 225 dakika sonunda aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. 60°C'de ise serbest enzim %30 aktivite gösterirken immobilize enzim 60 dakika sonunda aktivitesinin %40'unu korumayı başarmıştır (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise arginaz-I ve selüloz mikrokürelere immobilize arginaz-I için yapılan termal kararlılık çalışmalarında 60°C'de serbest enzim 2 saat sonunda %13,5 aktivite gösterirken immobilize enzim 30 dakika sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir ve yüksek sıcaklıklarda hem serbest enzim hem de immobilize enzimin kararlı olmadığı gözlenmiştir. 40°C'de ise hem serbest enzim hem de immobilize enzim 4 saat sonunda aktivitelerinin %90'unu korumayı başarmıştır. Yine aynı çalışmada 37°C'de 15 saat sonra serbest enzim aktivitesinin %50'sini korurken immobilize enzim %10 aktivite göstermiştir. 20°C'de 25 saat sonunda serbest enzim yaklaşık %40 aktivite gösterirken immobilize enzim %30 aktivite göstermiştir. 4°C'de ise 25 saat sonunda hem serbest hem de immobilize enzim aktivitesinin tamamını korumuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada hem serbest arginaz hem de arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylona enkapsüle edilen arginaz 4-80°C aralığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından termal kararlılık profilleri çıkarılmıştır. Serbest enzim maksimum aktivitesini 37°C'de immobilize enzim ise 45°C'de yapılan inkübasyon işlemi sonrasında göstermişlerdir. Serbest enzim sadece 4°C'de ve 20°C'de immobilize enzime göre daha yüksek aktivite gösterirken çalışılan diğer tüm sıcaklıklarda ise immobilize enzim daha yüksek aktivite göstermiştir.

3.5.9. Kinetik parametreler

İmmobilizasyon işlemi sonrasında enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişimler, sterik etkiler, enzimin mikroçevresinde meydana gelen değişiklikler ve difüzyon etkileri gibi nedenlerden dolayı enzimlerin kinetik davranışlarında değişiklikler gözlenebilir. Arginaz immobilizasyonu sonrasında meydana gelen bu

değişimleri gözlemek için hazırlanan immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların kinetik davranışları, 5-50 mM aralığında L-arginin kullanılarak Lineweaver-Burk yaklaşımı ile belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.41.'de, K_m ve V_{max} değerleri ise Çizelge 3.9.'da verildi.



Şekil 3.41. Arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.9. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri

Taşıyıcı	K _m (mM)	V _{max} (µmol üre/dk) ⁻¹
Serbest arginaz	1,06	50,25
CA/PVP	1,19	37,74
CA/PVP/Mn ⁺²	1,18	41,32

Serbest enzimle karşılaştırıldığında her iki immobilize nanofiber membranın K_m değerlerinde küçük de olsa bir artış, bununla beraber V_{max} değerlerinde ise azalma gözlemlendi. Immobilize enzimin K_m değerindeki bu küçük de olsa meydana gelen artış, enzimin substrata olan ilgisinde yani afinitesindeki azalışı ifade etmektedir. Immobilizasyon sonrası substratı bağlayan enzimin konformasyonel esnekliğinde azalma, taşıyıcıdan kaynaklanan sterik engeller ve difüzyon kısıtlaması gibi nedenlerden dolayı bu azalma meydana gelmiş olabilir. Arginaz immobilize CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların K_m değerlerinin aynı oranda arttığı, V_{max} değerinin ise CA/PVP nanofiber membranlarında daha fazla azaldığı görüldü. Her iki immobilize nanofiber membranın substrata olan ilgilerinin aynı olduğu fakat CA/PVP/Mn⁺² nanofiber membranların reaksiyonu daha hızlı katalizlediği sonucuna varılabilir. Hızdaki bu fark arginaz aktivitesi için gerekli olan CA/PVP/Mn⁺² yapısında

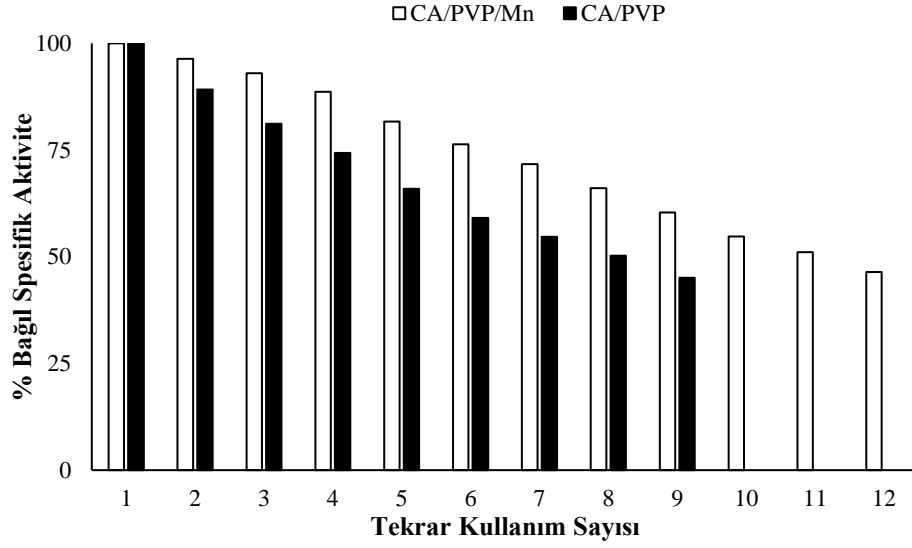
bulunan Mn^{+2} iyonlarının reaksiyonda aktivite olarak görev aldığı yönünde yorumlanabilir.

Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmalarında immobilizasyon sonrası K_m değerinde artışın gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara arginaz enzimi enkapsüle edilmiştir ve K_m değerinin serbest enzime göre 10×10^{-3} M'dan $18,5 \times 10^{-3}$ M'a arttığı gözlemlenmiştir (Grady ve Joyce, 1980). Yapılan başka bir çalışmada arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre $3,8 \times 10^{-3}$ M'dan $4,4 \times 10^{-3}$ M'a arttığı bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest enzim için K_m değeri $3,6 \times 10^{-2}$ M iken poliakrilamid destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise yaklaşık 10 kat artarak $3,7 \times 10^{-1}$ M olarak gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan bir başka çalışmada ise *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilen arginaz enzimi polietilen glikole immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre bir hayli artarak 4,8 mM'dan 15,2 mM'a arttığı, V_{max} değerinin ise 21,7 U/mg/dk'dan 14,08 U/mg/dk'ya azaldığı raporlanmıştır (El-Sayed vd., 2014). Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Idiomarina sediminium* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre bir miktar artarak 2,44 mM olduğu ve V_{max} değerinin ise 169,49 U/mL/dk olduğu belirtilmiştir.

3.5.10. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilizasyon işleminin en önemli avantajlarından biride tekrar kullanılabilirliktir. Serbest enzimler endüstriyel uygulamalarda tek bir kez kullanılabilirken immobilize enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler.

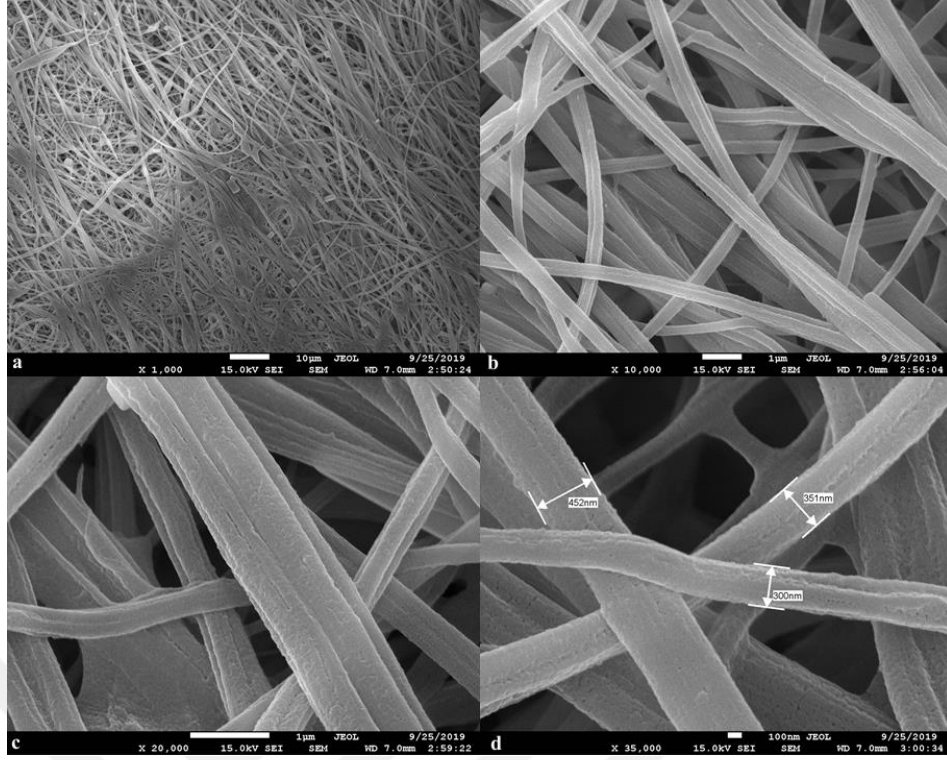
Şekil 3.42. incelendiğinde arginaz immobilize CA/PVP nanofiber membranlar 9 kullanım sonucunda aktivitesi %50'nin altına düşerken arginaz immobilize CA/PVP/ Mn^{+2} nanofiber membranların aktivitesi ise 12 kullanım sonrası %50'nin altına düşdüğü görüldü. Bu sonuç Mn^{+2} iyonlarının arginaz moleküllerinin membranlara immobilizasyonunda bağlanma noktalarından biri olarak kullanıldığı ve immobilizasyon işlemi sonrasında enzime ilave kararlılık kazandırdığı şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 3.42. CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği

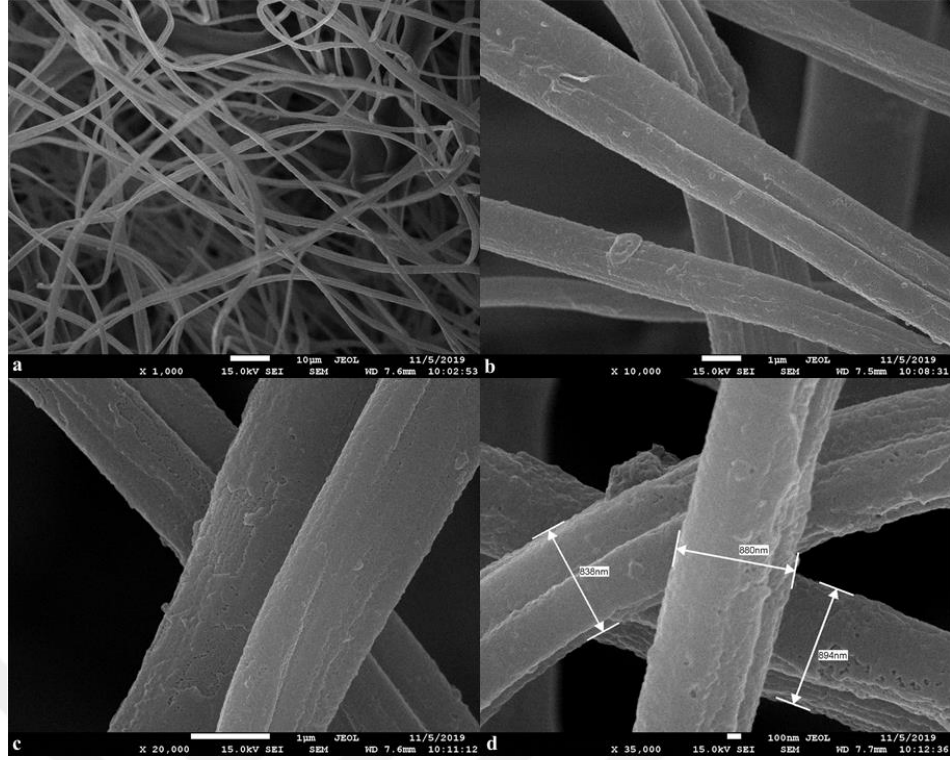
Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmaları incelendiğinde sadece iki çalışmada tekrar kullanılabilirlik üzerine çalışmalar yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalardan Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve 5 kullanım boyunca aktivitesinin tamamını, 7 kullanım sonrası ise %83,4'ünü koruduğu görülmüştür. Yapılan bir diğer çalışmada ise *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve 40 ve 60°C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. 40°C'de 5 kullanım sonrasında aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği, 60°C'de ise 3 kullanım sonrası aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği görülmüştür (Zhang vd., 2016).

Arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.43.'de verildi. Şekil 3.1.'de verilen CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarını tam olarak koruyamadıkları, yapılarının değiştiği ve ortalama çaplarının 300-452 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği gibi immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının bozulmasının nedeni enzim molkeüllerini nanofiber membrana immobilize etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıdır (Song vd., 2012; Pesaran vd., 2015). Enzimin çapraz bağlayıcı kullanılarak nanofibere immobilize edilmesi sonucu nanofiber yapısında değişiklik meydana gelebilir. Ayrıca Şekil 3.43.'de incelendiğinde arginaz enziminin fiberler üzerine immobilize olduğu görüldü.



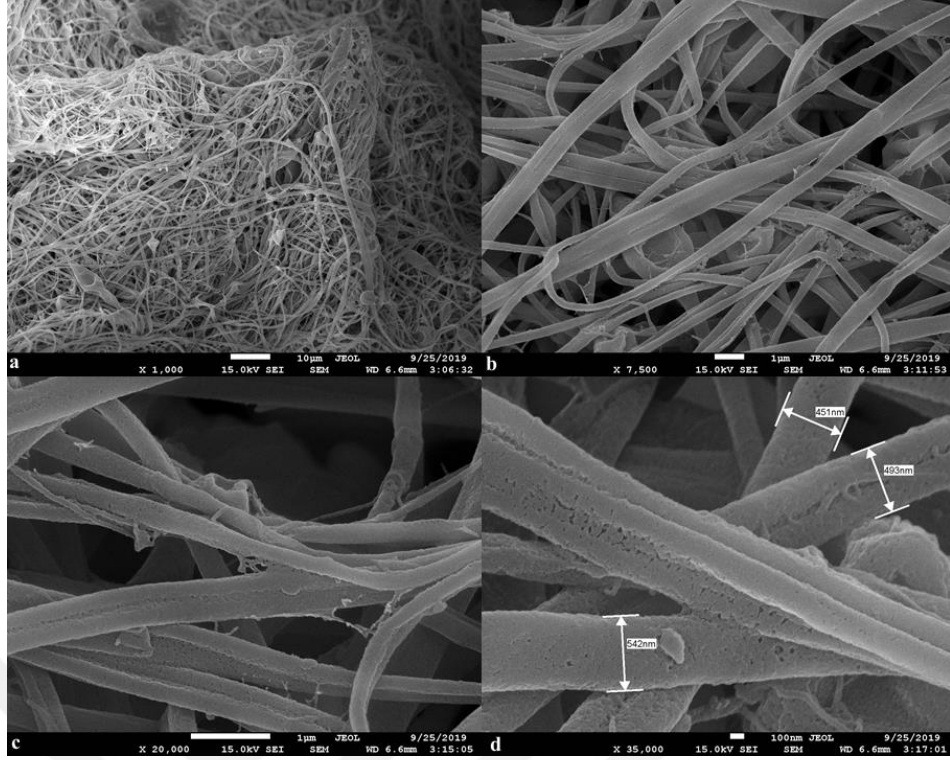
Şekil 3.43. Arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

9 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.44.'de verildi. Şekil 3.44. incelendiğinde 9 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.1. hem de Şekil 3.43.'de verilen yapılaraya göre daha dağınık bir yapıda olduğu gözlemlendi. Tekrar kullanım işlemi sonrasında CA/PVP nanofiber yapıları morfolojilerini kademeli olarak kaybettiği ve bunun sonucunda toplam yüzey alanının azaldığı söylenebilir. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. Bunun dışında nanofiber yapısının bozulmasında bir diğer önemli etki arginaz enziminin aktive tayininin ikinci aşamasında fiberlerin 100°C'ye maruz kalmaları ile birlikte nanofiberlerin birbirine yapışması ile açıklanabilir. Bu etkilerin sonucu olarak 9 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin yapılarının bozulduğu ve ortalama çaplarının artarak 838-894 nm civarında olduğu görüldü.



Şekil 3.44. 9 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

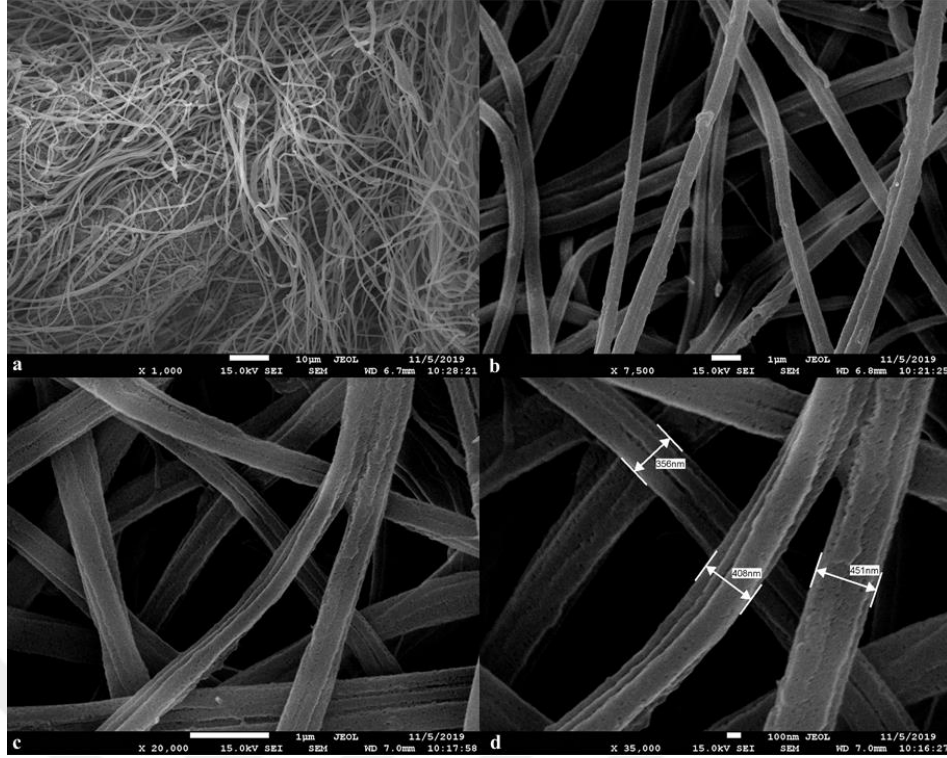
Arginaz immobilize CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.45.'de verildi. Şekil 3.2.'de verilen CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarını kısmen de olsa koruduğu, yapılarının değişmediği ve ortalama çaplarının 452-542 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının korunduğu çalışmalar mevcuttur (İspirli Doğaç vd., 2017). Şekil 3.45. incelendiğinde arginaz enziminin fiberlerin hem yüzeylerine hem de iç kısımlarına immobilize olduğu gözlemlendi. CA/PVP nanofiberlerin aksine enzim fiberlerin iç kısımlarında girerek immobilize olmuştur. Bu durumun nedeni Şekil 3.1.'de verilen CA/PVP nanofiberlerin ve Şekil 3.2.'de verilen CA/PVP/Mn⁺² nanofiberleri için verilen SEM görüntüleri incelendiğinde görülmektedir. CA/PVP nanofiberlerinin ortalama çapları 127-151 nm arasında iken CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerinin ortalama çapları ise 343-423 nm arasındadır. CA/PVP nanofiberlerinin çapları daha küçük olduğu için enzim molekülleri bu fiberlerin iç kısımlarına girememiş ve fiberlerin yüzeylerine immobilize olmuş olabilir.



Şekil 3.45. Arginaz immobilize CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x7,500 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelele

12 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.46.'da verildi. Şekil 3.46. incelendiğinde 12 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.2. hem de Şekil 3.45.'de verilen yapılar göre kısmen de olsa yapının korunduğu ve ortalama çaplarını 356-451 nm civarında olduğu gözlemlendi. Tekrar kullanım işlemi sonrasında CA/PVP/Mn⁺² nanofiber yapıları morfolojilerini kademeli olarak kaybettiği ve bu da toplam yüzey alanını azalmasına neden olduğu söylenebilir. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir.

Tekrar kullanım sonrası CA/PVP ve CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerinin yapıları incelendiğinde CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerinin yapılarının daha iyi korunduğu görülmektedir. Bu durum CA/PVP/Mn⁺² nanofiberlerinin yapısında bulunan hem enzim aktivitesine hem de yapının kararlılığına olumlu etki eden mangan varlığı ile açıklanabilir.



Şekil 3.46. 12 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize CA/PVP nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1000 (b) x7,500 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

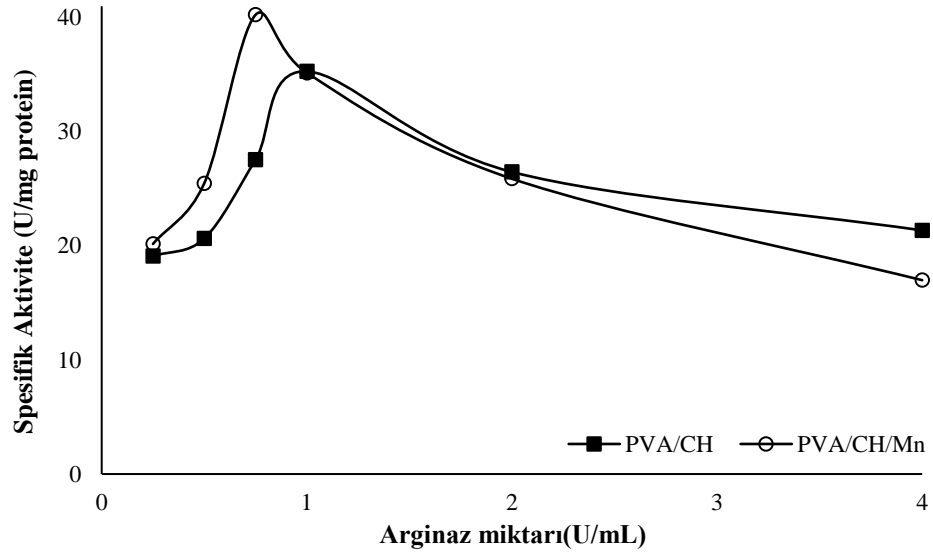
3.6. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu ve Karakterizasyon Çalışmaları

Optimum koşullarda sentezlenen PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz enzimi, adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak immobilize edildi. Optimizasyon parametreleri olarak arginaz miktarı, nanofiber miktarı, adsorpsiyon süresi ve çapraz bağlayıcı miktarı çalışıldı. Karakterizasyon kısmında ise optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri incelendi.

3.6.1. Arginaz miktarı

PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum enzim miktarını belirlemek için 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 ve 4 U/mL miktarlarında arginaz enzimi kullanıldı. Hem arginaz immobilize PVA/CH hem de arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Farklı derişimlere karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.47.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize

PVA/CH nanofiberleri için optimum enzim miktarı 1 U/mL, PVA/CH/Mn⁺² nanofiberleri için ise 0,75 U/mL olarak belirlendi.



Şekil 3.47. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi

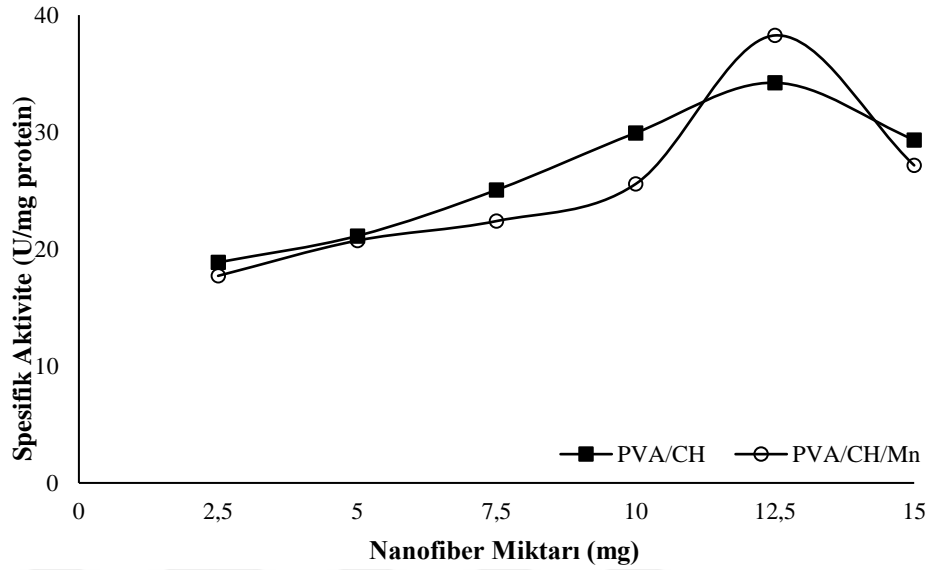
Her iki nanofiber için de optimum arginaz miktarının üzerindeki miktarlarda spesifik aktivite giderek azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni ortamdaki taşıyıcı miktarının yetersiz olması olabilir. Ayrıca ortamdaki arginaz molekülleri taşıyıcı yüzeyine bağlanması sırasında multi adsorpsiyon gerçekleşmiş olabilir.

Arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberler için optimum enzim derişimi PVA/CH nanofiberlere göre daha düşük bulundu. PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin yapısında bulunan Mn⁺² iyonları, optimum enzim miktarının altındaki miktarlarda birim Mn⁺² başına düşen enzim miktarı az olduğu için, enzim aktivite göstermemiş olabilir. Optimum enzim miktarının üzerindeki derişimlerde ise enzim miktarı artmasına rağmen Mn⁺² miktarı sabittir. Bu nedenle enzimin aktivite kazanabilmesi için gerekli olan Mn⁺² miktarı ortamda bulunmadığı için aktivite düşmüş olabilir.

3.6.2. Nanofiber miktarı

PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum taşıyıcı miktarını belirlemek için 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 15 mg nanofiber immobilizasyon işleminde kullanıldı. Hem arginaz immobilize PVA/CH hem de arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Taşıyıcı

miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.48.'deki sonuçlara göre hem PVA/CH hem de PVA/CH/Mn⁺² arginaz immobilize nanofiberler için optimum taşıyıcı miktarı 12,5 mg olarak bulundu.

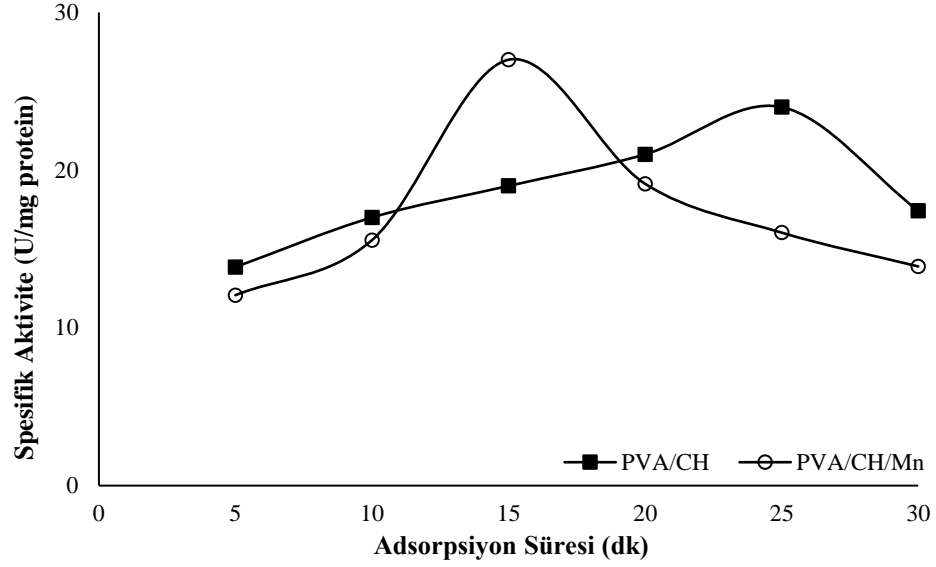


Şekil 3.48. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi

Optimum taşıyıcı miktarının altındaki miktarlarda, ortamda yeterli fiber bulunmadığı için enzim moleküllerinin tamamı immobilize olamamış olabilir. Optimum taşıyıcı miktarının üstündeki miktarlarda ise; fiber miktarının fazla olması immobilize edilen enzim ile substrat arasında gerçekleşmesi gereken etkileşime sterik olarak engel olmuş olabilir.

3.6.3. Adsorpsiyon süresi

PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda öncelikle adsorpsiyon daha sonra çapraz bağlama yöntemleri kullanıldı. Enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve çapraz bağlayıcı miktarı sabit tutularak optimum adsorpsiyon süresini belirlemek için 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika süre ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla adsorpsiyon süresine karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.49.'daki sonuçlara göre arginaz immobilize PVA/CH nanofiberleri için adsorpsiyon süresi 25 dakika, PVA/CH/Mn⁺² nanofiberleri için ise 15 dakika olarak bulundu.

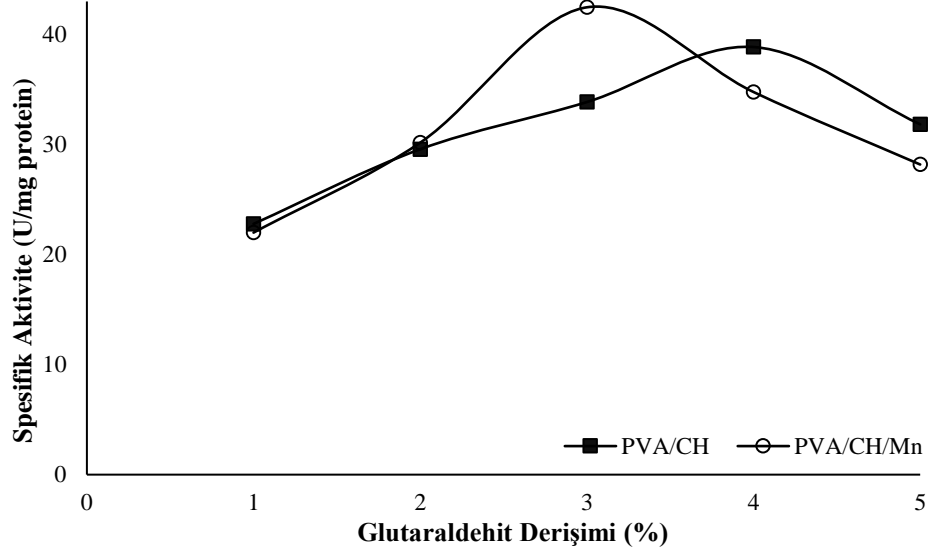


Şekil 3.49. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

PVA/CH nanofiberlerin yüzeyi 25. dakikada, PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin yüzeyi ise 15. dakikada arginaz enzimi molekülleri bakımından doygunluğa ulaştığı ve bu sürelerden sonra immobilize enzim moleküllerinin desorbe olmaya başladığı söylenebilir. Ayrıca PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin yapısında bulunan ve arginaz enziminin aktivitesi için gerekli olan Mn⁺² iyonları enzimin fibere olan ilgisini koordinasyon nedeniyle etkilemiş ve daha kısa sürede ve daha etkili bir immobilizasyon işleminin gerçekleşmesine neden olmuş olabilir. Bunun yanında Mn⁺² iyonlarının koordinasyon kabiliyeti nedeniyle ilave bağlar yapmak suretiyle grafikte de anlaşılacağı üzere enzimin desorpsiyonunun kademeli olarak gerçekleşmesini sağlamıştır. Bu nedenle, PVA/CH nanofiber için bunu söylemek mümkün değildir.

3.6.4. Çapraz bağlayıcı miktarı

Optimum glutaraldehit miktarını belirlemek için enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve adsorpsiyon süresi sabit tutularak %1, %2, %3, %4 ve %5 glutaraldehit miktarlarında immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla çapraz bağlayıcı miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.50.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PVA/CH nanofiberleri için optimum glutaraldehit miktarı %4, PVA/CH/Mn⁺² nanofiberleri için ise %3 olarak bulundu.



Şekil 3.50. PVA/CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi

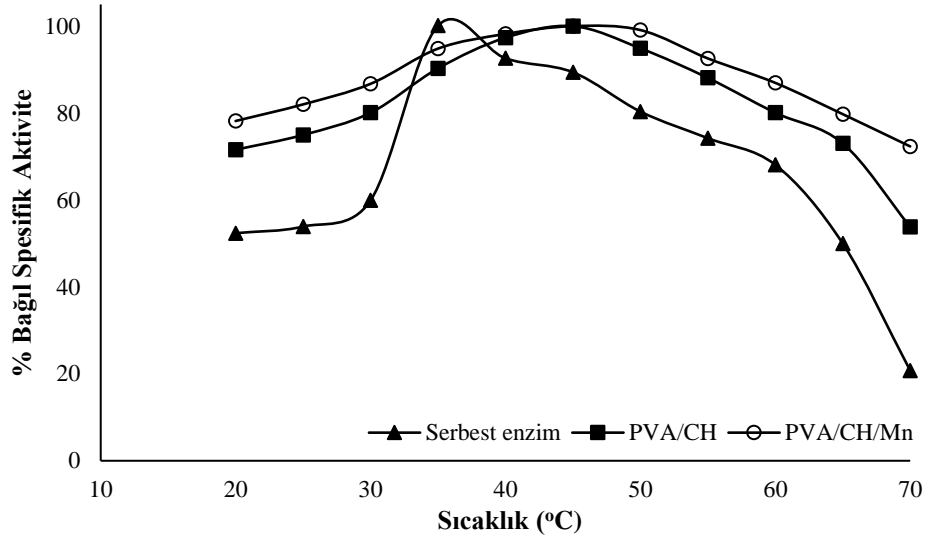
Optimum GA miktarının altındaki değerlerde, ortamdaki GA miktarı enzim moleküllerinin nanofiberlere immobilize olması için yetersiz gelmiş olabilir. Optimum GA miktarının üzerindeki değerlerde ise, ortamdaki GA miktarının enzim moleküllerinin aktif merkezini etkilemesi ile birlikte enzim yapısında konformasyonel değişiklikler meydana gelmiş olabilir.

Zhang vd. tarafından yapılan bir çalışmada rekombinant insan arginaz-I enzimi glutaraldehit kullanılarak kitosan parçacıklara immobilize edilmiştir. Bu çalışmada glutaraldehit derişimi %0,5-2,5 olacak şekilde çalışılmıştır ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça göreceli aktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır (Zhang vd., 2015). Yapılan bir başka çalışmada ise arginaz-I selüloz mikrokürelere glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Glutaraldehit derişimi 0,3; 0,5; 0,8 ve 1,0 mM olacak şekilde deneyler yapılmış ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça aktivitenin azaldığı gözlenmiştir (Li vd., 2014).

3.6.5. Optimum sıcaklık

PVA/CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin sıcaklıkla değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için aktivite sıcaklığı 20-70°C aralığında değiştirilerek aktivite tayini yapıldı. Şekil 3.51.'de görüldüğü gibi serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 35°C iken bu değer

arginaz immobilize PVA/CH için 40-45°C arasında iken arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² için ise 40-50°C arasındadır.



Şekil 3.51. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri

Grafik incelendiğinde serbest arginaz aktivitesi optimum sıcaklıktan düşük ve yüksek değerlerde azalırken, arginaz immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların sıcaklık profili daha geniş bir alana yayıldığı görüldü. Bu, immobilizasyon işlemi sonrası nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan PVA ve CH polimerlerinin ve Mn⁺² iyonlarının enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığını gösterdi. Ayrıca arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar immobilize PVA/CH nanofiber membranlara göre tüm sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdiği görüldü. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn⁺²'nin değişen sıcaklık ile oluşan ısı değişimlerine karşı membran yapılarını daha dirençli bir hale getirdiğini söylemek mümkündür. Her iki immobilize nanofiber membranda 20-65°C arasında en fazla %30 aktivite kaybı gösterdiler. Sadece arginaz immobilize PVA/CH nanofiber membranı 70°C'de aktivitesinin %46'sını kaybetti. Her iki nanofiber membranın sıcaklık değişimlerine karşı göstermiş oldukları bu direnç; yapılarında bulunan ve termal kararlılık özelliği ile dikkat çeken PVA polimerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

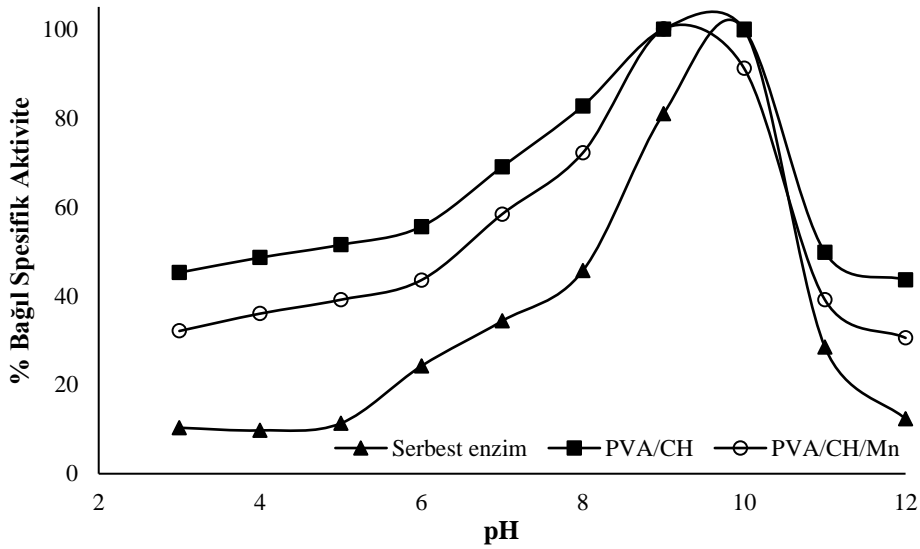
Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık sırasıyla 40°C ve 60°C olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerini çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 37°C iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 38°C olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz-I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur.

3.6.6. Optimum pH

PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin pH ile değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için aktivite ortamın pH'ı 3,0-12,0 aralığında değiştirilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve Şekil 3.52.'de verildi.

Grafik incelediğinde serbest enzimin optimum pH 10,0 iken, bu değer arginaz immobilize PVA/CH için 9,0-10,0 aralığında ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar için ise 9,0 olarak bulundu. Serbest enzim özellikle aşırı asidik ve bazik koşullarda yaklaşık %10 civarında aktivitede gösterirken, arginaz immobilize PVA/CH ve

PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranların ise aktivitelerini sırasıyla %45 ve %32 civarında koruduğu görüldü. İmmobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranın yapısında bulunan fonksiyonel grupların varlığı aktivitenin düşük ve yüksek pH değerlerinde korunmasını sağlar. Optimum pH'daki asidik bölgeye kayma membran yapısında bulunan CH'den kaynaklanmaktadır. CH doğal bir polimer olup aynı zamanda polikationik bir polimerdir. Polikationlar serbest enzime göre immobilize enzimler için daha alkali mikroçevre sundukları için optimum pH değerinin daha asidik olmasını sağlarlar. Ayrıca hem PVA'nın hem de CH'nin yapısında bulunan -OH grupları yüksek bazik ortamlarda enzime sağladığı mikroçevrenin tampon etkisi göstermesi nedeniyle koruma görevi gördüğü söylenebilir. Ayrıca CH'nin yapısında bulunan ve alkali ortamda -NH₂ formunda, asidik ortamda -NH₃⁺ formunda bulunan gruplar, ortamın pH değişimlerine karşı tampon etkisi gösterdiği için enzimin mikroçevresine koruma sağladığı söylenebilir. Serbest enzimin daha az aktivite gösterdiği pH ortamlarında immobilize nanofiber membranların daha yüksek aktivite göstermesi bu ortamlarda pH değişikliğine karşı immobilize enzimin dirençli olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.52. PVA/CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri

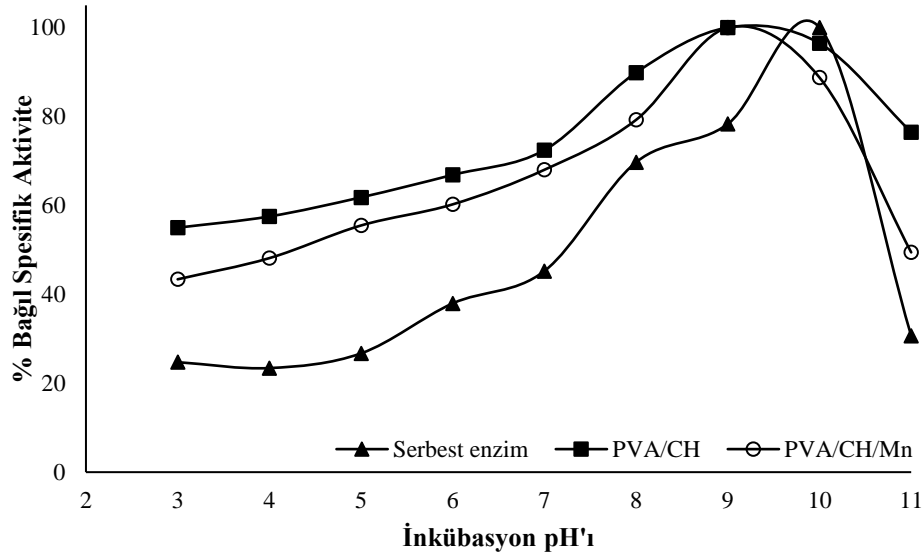
Arginaz immobilize PVA/CH nanofiber membranlar immobilize PVA/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlara göre tüm pH değerlerinde daha yüksek aktivite gösterdiği görüldü. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn²⁺ iyonlarının, enzim moleküllerinin yanında, PVA'nın ve CH'nin yapısında bulunan ve pH değişimlerine

karşı tampon görevi gören -OH ve -NH₂ grupları ile şelat oluşturduğu ve böylece mikroçevrenin tampon etkisinin azaldığı söylenebilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğeri arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH değeri 10,0, immobilize enzim için ise 9,5-10,5 aralığında bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest arginaz için optimum pH 11,0 iken, poliakrilamit destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise 9,5 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH 7,0 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 7,5 olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz-I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH değeri 7,0-11,0 aralığında bulunmuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada ise arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara sığır karaciğer arginazı enkapsüle edilmiştir ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH değerinin 10,0 olduğu görülmüştür.

3.6.7. pH kararlılığı

PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin pH kararlılığını belirleyebilmek amacıyla immobilize nanofiberler pH 3,0-11,0 aralığında hazırlanan tamponlar içerisinde 1 saat inkübe edildi. İnkübe edilen immobilize nanofiberlerin aktivite tayinleri sonucunda pH kararlılıklarının grafiği Şekil 3.53.'de verildi.



Şekil 3.53. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri

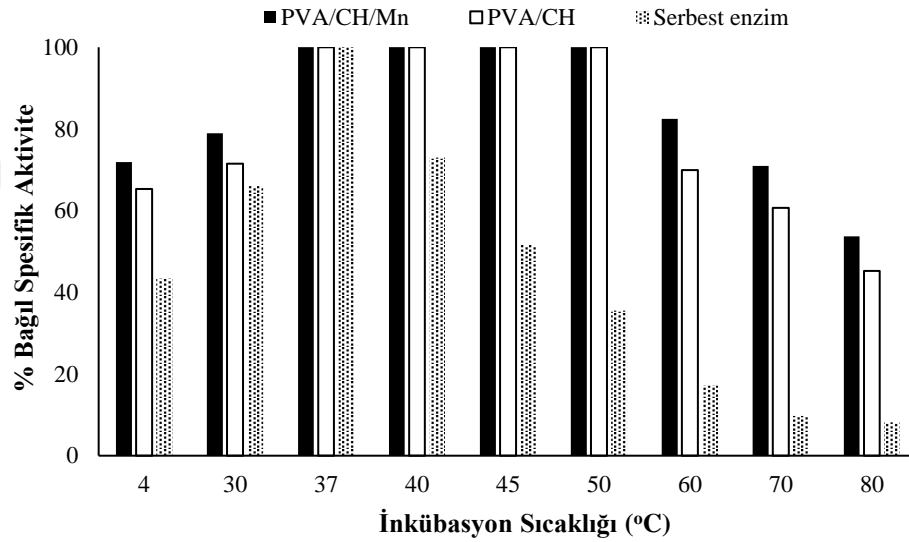
Her iki nanofiber membran taşıyıcıya da immobilizasyon işleminin ardından hem asidik hem de bazik bölgelerde enzimin pH kararlılığının serbest enzime göre önemli derecede artış gösterdiği görüldü. Bunun nedeni nanofiber membranların yapısında bulunan amino ve hidroksil gruplarının enzimin etrafını çevreleyerek korumasıdır. Hem PVA'nın hem de CH'nin yapısında bulunan -OH grupları hem asidik hem de bazik ortamlarda, CH'nin yapısında bulunan -NH₃⁺ grupları ise bazik ortamlarda enzime sağladığı mikroçevrenin tampon etkisi göstermesi nedeniyle pH değişimlerine karşı koruma görevi gördüğü söylenebilir.

Arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberler aynı pH koşullarında PVA/CH nanofiber membranlara göre daha düşük aktivite gösterdiği görüldü. Bunun nedeni ise yapıdaki Mn⁺² iyonlarının PVA ve CH yapısındaki pH değişimlerine karşı tampon görevi görebilecek gruplar olan -OH ve -NH₂ ile pH değerlerine bağlı olarak şelat oluşturması olabilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, yapılan pH kararlılığı deneyleri sonucunda serbest enzim için optimum değer 7,5 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 8,0 olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidrosietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve pH kararlılığı deneylerinde serbest enzim için optimum değer 8,0 iken immobilize enzim için bu değer 5,0-9,0 aralığında olduğu bulunmuştur.

3.6.8. Termal kararlılık

PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için farklı (4, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80°C) sıcaklıklardaki su banyolarında 1 saat inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuçlar Şekil 3.54.'de verildi.



Şekil 3.54. PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği

Grafik incelendiğinde arginaz immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların çalışılan tüm sıcaklıklarda serbest arginaz enzimine göre daha kararlı olduğu görülmektedir. Arginaz immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların 30, 37, 45 ve 50°C'de aktivitelerinin %100'ünü koruduğu görülmektedir. Çalışılan tüm sıcaklıklarda arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar aktivitelerinin %50'sinden fazlasını korurken, arginaz

immobilize PVA/CH nanofiber membranlar sadece 80°C’de aktivitesi %50’nin altına düşmektedir. Bu durum immobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan PVA ve CH polimerlerinin ve Mn^{+2} iyonlarının enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığını göstermektedir. Özellikle nanofiber membranlarda bulunan PVA ve CH üzerindeki hidroksil gruplarının suda özel bir şekilde yapılanabilme özellikleri sayesinde her iki membrana ilave kararlılık kazandırmıştır. Ayrıca PVA/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranların çalışılan her sıcaklıkta daha kararlı olmasının en önemli nedeni yapısında bulunan Mn^{+2} iyonlarının enzim molekülleri ile şelat yapabilmesi nedeniyle daha kararlı bir yapı oluşturması enzimin denatürasyonunu engellemiş olabilir. Aynı zamanda immobilizasyon işlemi sonrasında kararlılıktaki artış, nanofiber membran taşıyıcı ile enzim arasında oluşan kararlı bağların kırılması için gereken enerjinin çok yüksek olmasından da kaynaklanabilir. Buna ek olarak membranların özellikle yüksek sıcaklıklarda ortamdaki ısının şiddetini üzerine alarak olması gereken sıcaklığın şiddetini enzim üzerine yansımaya engel olarak enzimin denature olmasını engellenmesiyle açıklanabilir.

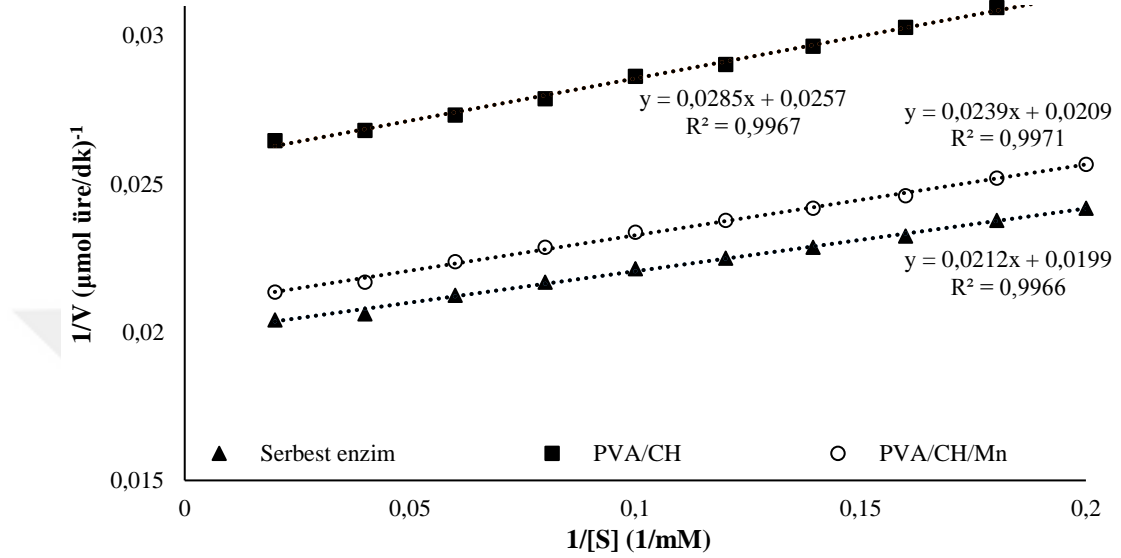
Turras (2008) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus Subtilis*’den elde edilen arginaz enzimi Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA, Sepabeads EC-EP ve Eupergit C 250 L olmak üzere 4 farklı epoksi desteğe immobilize edilmiştir. 60°C’de yapılan termal kararlılık deneyleri sonucunda 3 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin %50’sinden fazlasını kaybederken, Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA ve Eupergit C 250 L 2 saat sonunda aktivitelerinin %50’sini kaybetmiştir. İmmobilize Sepabeads EC-EP ise 6 saat sonunda aktivitesinin %60’ını korumuştur. Başka bir çalışmada poliakrilamid destek üzerine arginaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 40, 60 ve 70°C’de immobilize enzim için termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. 40°C’de immobilize enzim 120 dakika sonunda aktivitesini korumayı başarırken, 60°C’de 60 dakika sonunda aktivitesinin %80’ini kaybederken, 70°C ise 30 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybetmiştir (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidroksietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim 30 dakika boyunca 20-100°C aralığında tutularak termal kararlılık profilleri incelenmiştir. Serbest enzim 20-45°C aralığında aktivitesinin tamamını

korurken 45°C üzerindeki sıcaklıklarda aktivite kaybetmeye başlamıştır ve 65°C'de aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 25-75°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla aktivitesini kaybetmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise rekombinant insan arginaz-I enzimi ve kitosan parçacıklara immobilize edilmiş enzim için 40, 50 ve 60°C'de termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. Serbest enzim 40°C'de 225 dakika sonunda aktivitesinin %20'sini kaybederken immobilize enzim ise sadece %10'unu kaybetmiştir. 50°C'de serbest enzim 25 dakika sonra aktivitesinin %50'sini kaybederken immobilize enzim ise 225 dakika sonunda aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. 60°C'de ise serbest enzim %30 aktivite gösterirken immobilize enzim 60 dakika sonunda aktivitesinin %40'ını korumayı başarmıştır (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise arginaz-I ve selüloz mikrokürelere immobilize arginaz-I için yapılan termal kararlılık çalışmalarında 60°C'de serbest enzim 2 saat sonunda %13,5 aktivite gösterirken immobilize enzim 30 dakika sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir ve yüksek sıcaklıklarda hem serbest enzim hem de immobilize enzimin kararlı olmadığı gözlenmiştir. 40°C'de ise hem serbest enzim hem de immobilize enzim 4 saat sonunda aktivitelerinin %90'ını korumayı başarmıştır. Yine aynı çalışmada 37°C'de 15 saat sonra serbest enzim aktivitesinin %50'sini korurken immobilize enzim %10 aktivite göstermiştir. 20°C'de 25 saat sonunda serbest enzim yaklaşık %40 aktivite gösterirken immobilize enzim %30 aktivite göstermiştir. 4°C'de ise 25 saat sonunda hem serbest hem de immobilize enzim aktivitesinin tamamını korumuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada hem serbest arginaz hem de arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylona enkapsüle edilen arginaz 4-80°C aralığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından termal kararlılık profilleri çıkarılmıştır. Serbest enzim maksimum aktivitesini 37°C'de immobilize enzim ise 45°C'de yapılan inkübasyon işlemi sonrasında göstermiştir. Serbest enzim sadece 4°C'de ve 20°C'de immobilize enzime göre daha yüksek aktivite gösterirken çalışılan diğer tüm sıcaklıklarda ise immobilize enzim daha yüksek aktivite göstermiştir.

3.6.9. Kinetik parametreler

İmmobilizasyon işlemi sonrasında enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişimler, sterik etkiler, enzimin mikroçevresinde meydana gelen değişiklikler ve difüzyon etkileri gibi nedenlerden dolayı enzimlerin kinetik davranışlarında

değişiklikler gözlemlenebilir. Arginaz immobilizasyonu sonrasında meydana gelen bu değişimleri gözlemlemek için hazırlanan immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların kinetik davranışları, 5-50 mM aralığında L-arginin kullanılarak Lineweaver-Burk yaklaşımı ile belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.55.'de, K_m ve V_{max} değerleri ise Çizelge 3.10.'da verildi.



Şekil 3.55. Arginaz immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.10. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri

Taşıyıcı	K _m (mM)	V _{max} (µmol üre/dk) ⁻¹
Serbest arginaz	1,06	50,25
PVA/CH	1,11	38,92
PVA/CH/Mn ⁺²	1,14	47,85

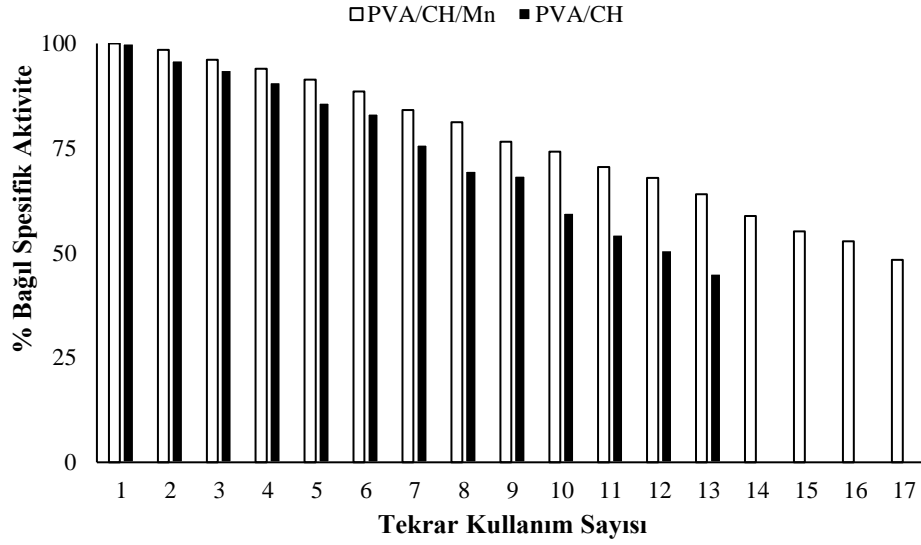
Serbest enzimle karşılaştırıldığında her iki immobilize nanofiber membranın K_m değerlerinde çok küçük de olsa bir artış, bununla beraber V_{max} değerlerinde ise azalma gözlemlendi. Immobilize enzimin K_m değerindeki bu çok küçük de olsa meydana gelen artış, enzimin substrata olan ilgisinde yani afinitesindeki azalışı ifade etmektedir. Bu azalmanın nedenleri immobilizasyon sonrası substratı bağlayan enzimin konformasyonel esnekliğinde azalma, taşıyıcıdan kaynaklanan sterik engeller ve difüzyon kısıtlaması olabilir. Arginaz immobilize PVA/CH ve PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların K_m değerlerinin hemen hemen aynı oranda arttığı, V_{max} değerinin ise PVA/CH nanofiber membranlarında daha fazla azaldığı görüldü. Her iki immobilize nanofiber membranın substrata olan ilgilerinin aynı oranda azaldığı fakat PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların reaksiyonu daha hızlı katalizlediği sonucuna

varılabilir. Hızdaki bu fark arginaz aktivitesi için gerekli olan PVA/CH/Mn⁺² yapısında bulunan Mn⁺² iyonlarının immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesine olumlu yönde etki ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmalarında immobilizasyon sonrası K_m değerinde artışın gözleendiği çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara arginaz enzimi enkapsüle edilmiştir ve K_m değerinin serbest enzime göre 10x10⁻³ M'dan 18,5x10⁻³ M'a arttığı gözlenmiştir (Grady ve Joyce, 1980). Yapılan başka bir çalışmada arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre 3,8x10⁻³ M'dan 4,4x10⁻³ M'a arttığı bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest enzim için K_m değeri 3,6x10⁻² M iken poliakrilamid destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise yaklaşık 10 kat artarak 3,7x10⁻¹ M olarak gözlenmiştir. Literatürde yer alan bir başka çalışmada ise *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilen arginaz enzimi polietilen glikole immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre bir hayli artarak 4,8 mM'dan 15,2 mM'a arttığı, V_{max} değerinin ise 21,7 U/mg/dk'dan 14,08 U/mg/dk'ya azaldığı raporlanmıştır (El-Sayed vd., 2014). Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Idiomarina sediminium* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre bir miktar artarak 2,44 mM olduğu ve V_{max} değerinin ise 169,49 U/mL/dk olduğu belirtilmiştir.

3.6.10. Tekrar kullanılabilirlik

Şekil 3.56. incelendiğinde arginaz immobilize PVA/CH nanofiber membranlar 13 kullanım sonucunda aktivitesi %50'nin altına düşerken arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiber membranların aktivitesi ise 17 kullanım sonrası %50'nin altına düştüğü görüldü. Bu sonuç Mn⁺² iyonlarının arginaz moleküllerinin membranlara immobilizasyonunda bağlanma noktalarından biri olarak kullanıldığı ve immobilizasyon işlemi sonrasında enzime ilave kararlılık kazandırdığını göstermektedir.

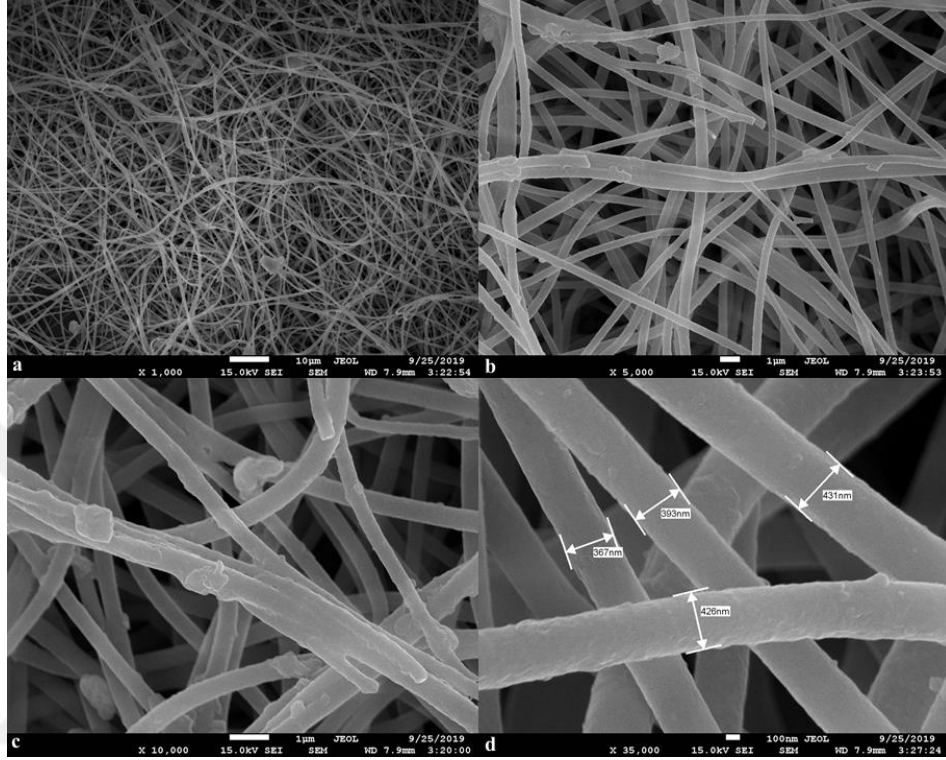


Şekil 3.60. PVA/CH ve PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği

Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmaları incelendiğinde sadece iki çalışmada tekrar kullanılabilirlik üzerine çalışmalar yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalardan Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve 5 kullanım boyunca aktivitesinin tamamını, 7 kullanım sonrası ise %83,4'ünü koruduğu görülmüştür. Yapılan bir diğer çalışmada ise *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve 40 ve 60°C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. 40°C'de 5 kullanım sonrasında aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği, 60°C'de ise 3 kullanım sonrası aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği görülmüştür (Zhang vd., 2016).

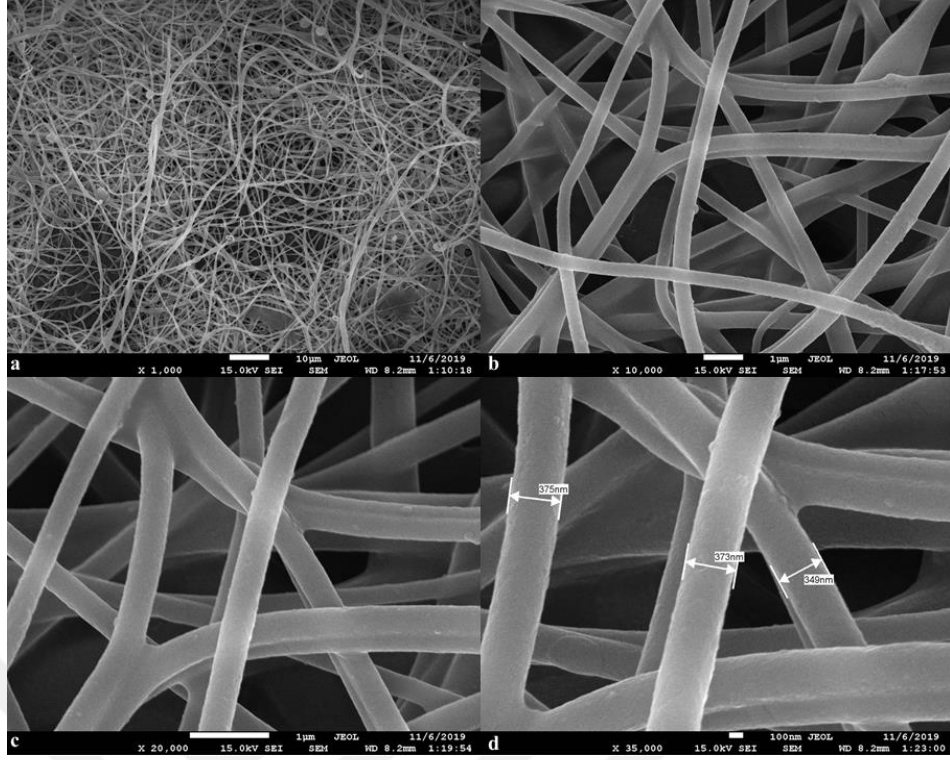
Arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.57.'de verildi. Şekil 3.9.'da verilen çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarında az da olsa değişiklikler olduğu, yapının kısmen de olsa korunduğu ortalama çaplarının bir miktar artarak 367-431 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği gibi immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının değişmesinin nedeni enzim moleküllerini nanofiber membrana immobilize etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıdır (Song vd., 2012; Pesaran vd., 2015). Enzimin çapraz bağlayıcı kullanılarak nanofibere immobilize edilmesi sonucu nanofiber yapısında değişiklik meydana gelebilir. Ayrıca Şekil 3.57. incelendiğinde

immobilizasyon işlemi sonrasında arginaz enziminin hem yapının yüzeyine hem de fiber yüzeyine immobilize olduğu görüldü. İmmobilizasyon işlemi sonrası fiber yüzeylerine tutunan enzim molekülleri nedeniyle fiber yüzeyleri pürüzlü bir şekil almıştır.



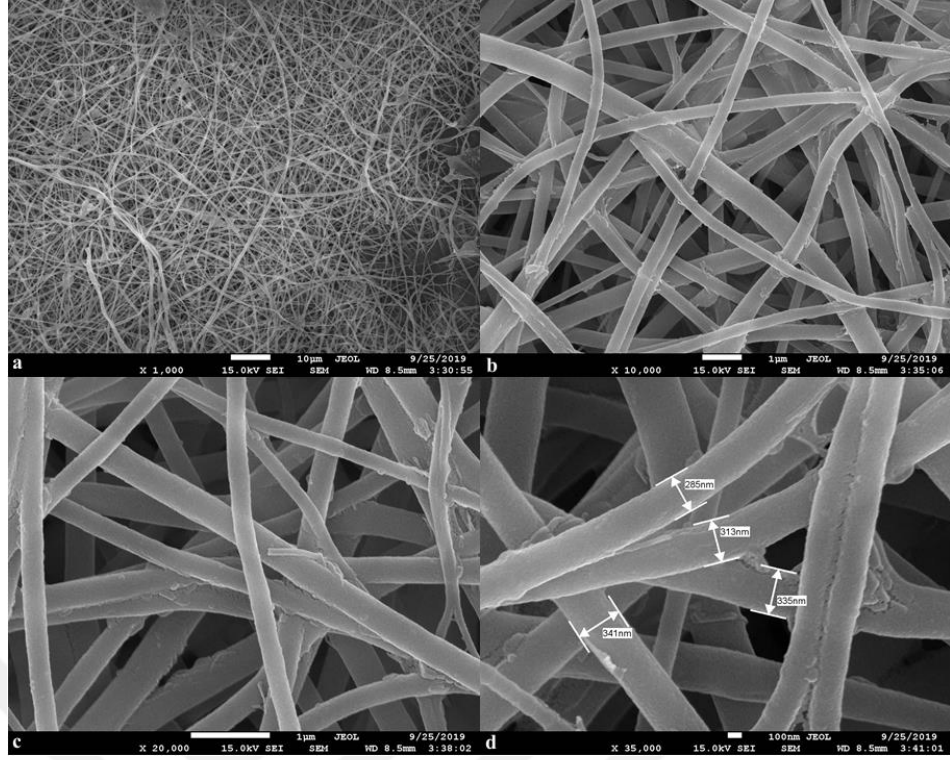
Şekil 3.57. Arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x5,000 (c) x10,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

13 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.58.'de verildi. Şekil 3.58. incelendiğinde 13 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.9. hem de Şekil 3.57.'de verilen yapılarada bariz bir değişiklik gözlenmedi. Ama yinede tekrar kullanım işlemi sonrasında PVA/CH nanofiber yapıları morfolojilerini kademeli olarak kısmende olsa kaybettiği ve bunun da toplam yüzey alanını azalttığı görüldü. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. 13 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin yapılarının değişmediği ve ortalama çaplarının 349-375 nm civarında olduğu görüldü.



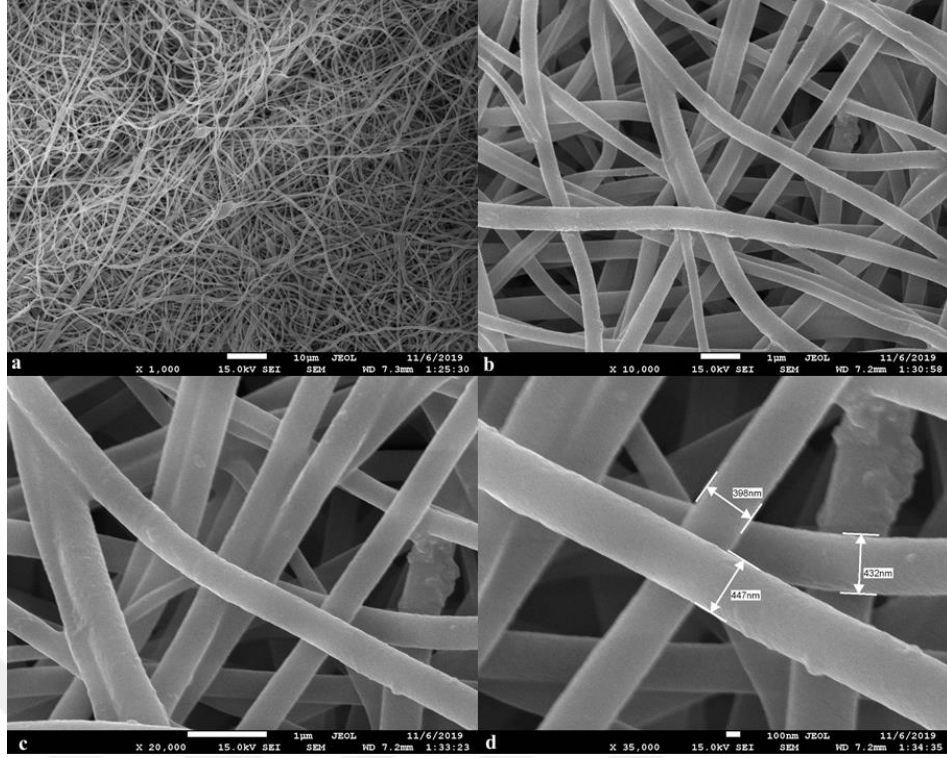
Şekil 3.58. 13 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

Arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.59.'da verildi. Şekil 3.11.'de verilen PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarının değişmediği ve ortalama çaplarının 285-341 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının korunduğu çalışmalar mevcuttur (İspirli Doğaç vd., 2017). Ayrıca Şekil 3.59. incelendiğinde immobilizasyon işlemi sonrasında arginaz enziminin hem yapının yüzeyine hem de fiber yüzeyine immobilize olduğu görüldü. Immobilizasyon işlemi sonrası fiber yüzeylerine tutunan enzim molekülleri nedeniyle fiber yüzeyleri pürüzlü bir şekil almıştır.



Şekil 3.59. Arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

17 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.60.'da verildi. Şekil 3.60. incelendiğinde 17 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.11. hem de Şekil 3.59.'da verilen yapılar göre yapıda bariz bir değişiklik gözlenmedi. Ama yine de tekrar kullanım işlemi sonrasında PVA/CH/Mn⁺² nanofiber yapıları morfolojilerini kademeli olarak kısmende olsa kaybettiği ve bunun da toplam yüzey alanını azalttığı görüldü. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. 17 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH nanofiberlerin yapılarının genel olarak değişmediği ve ortalama çaplarının bir miktar artarak 396-447 nm civarında olduğu görüldü.



Şekil 3.60. 17 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

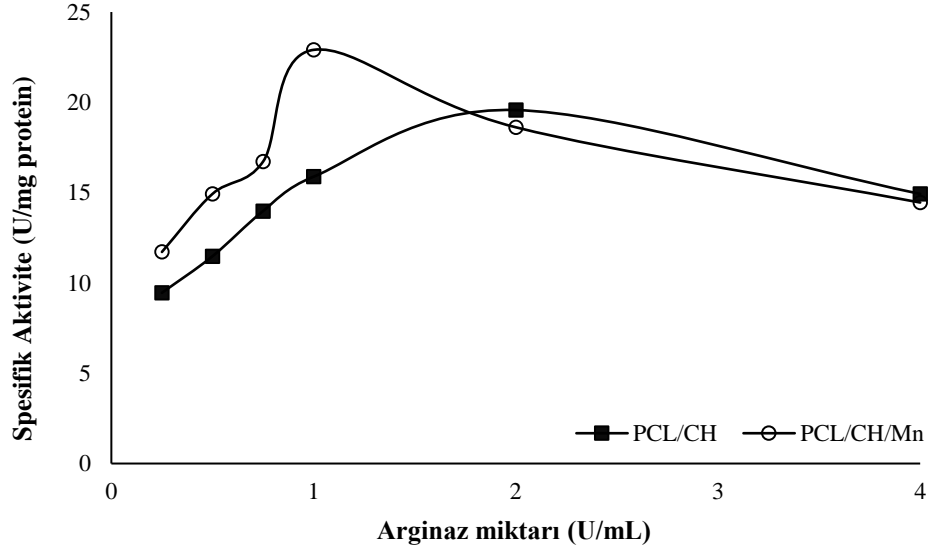
3.7. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu ve Karakterizasyonu Çalışmaları

Optimum koşullarda sentezlenen PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz enzimi, adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak immobilize edildi. Optimizasyon parametreleri olarak arginaz miktarı, nanofiber miktarı, adsorpsiyon süresi ve çapraz bağlayıcı miktarı çalışıldı. Karakterizasyon kısmında ise optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri incelendi.

3.7.1. Arginaz miktarı

PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum enzim miktarını belirlemek için 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 ve 4 U/mL miktarlarında arginaz enzimi kullanıldı. Hem arginaz immobilize PCL/CH hem de arginaz immobilize PCL/CH/Mn⁺² nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Farklı derişimlere karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.61.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PCL/CH

nanofiberleri için optimum enzim miktarı 2 U/mL, PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberleri için ise 1 U/mL olarak bulundu.



Şekil 3.61. PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi

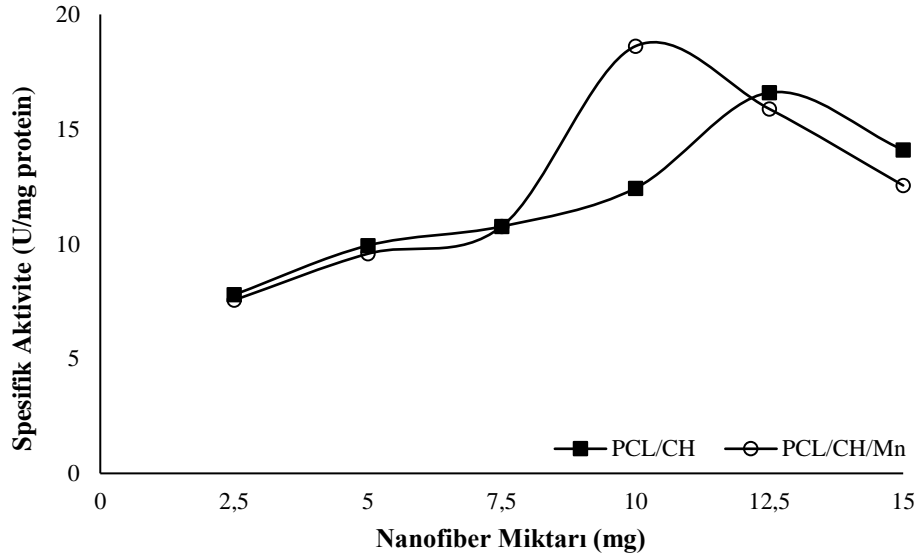
Her iki nanofiber için de optimum arginaz miktarının üzerindeki miktarlarda spesifik aktivite giderek azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni ortamdaki taşıyıcı miktarının yetersiz olması olabilir. Ayrıca ortamdaki arginaz molekülleri taşıyıcı yüzeyine bağlanması sırasında multi adsorpsiyon gerçekleşmiş olabilir.

Arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberler için optimum enzim derişimi PCL/CH nanofiberlere göre daha düşük bulundu. PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin yapısında bulunan Mn²⁺ iyonları, optimum enzim miktarının altındaki miktarlarda birim Mn²⁺ başına düşen enzim miktarı az olduğu için enzim aktivite göstermemiş olabilir. Optimum enzim miktarının üzerindeki derişimlerde ise enzim miktarı artmasına rağmen Mn²⁺ miktarı sabittir. Bu nedenle enzimin aktivite kazanabilmesi için gerekli olan Mn²⁺ miktarı ortamda bulunmadığı için aktivite düşmüş olabilir.

3.7.2. Nanofiber miktarı

PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum taşıyıcı miktarını belirlemek için 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 15 mg nanofiber immobilizasyon işleminde kullanıldı. Hem arginaz immobilize PCL/CH hem de arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Taşıyıcı

miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.62.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PCL/CH nanofiberleri için optimum taşıyıcı miktarı 12,5 mg, PCL/CH/Mn⁺² nanofiberleri için ise 10 mg olarak bulundu.

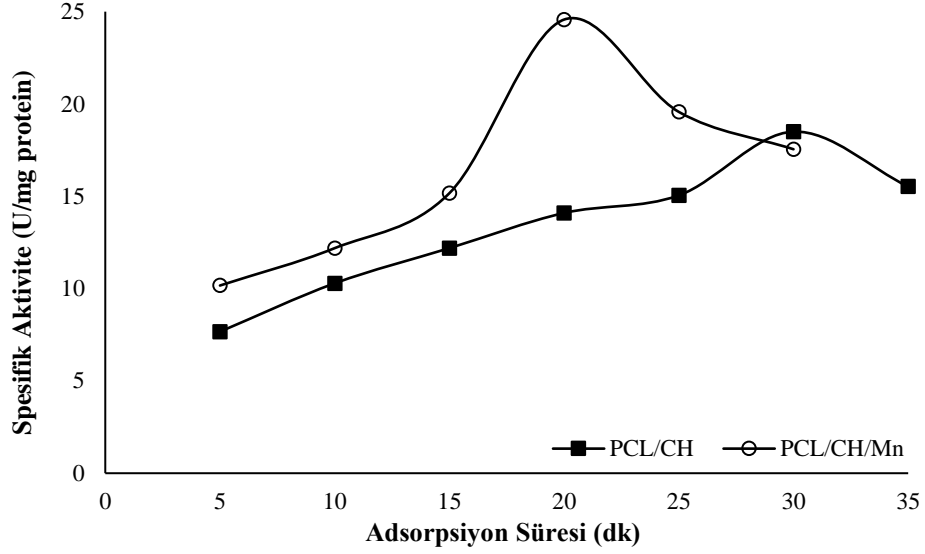


Şekil 3.62. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi

Optimum taşıyıcı miktarının altındaki miktarlarda, ortamda yeterli fiber bulunmadığı için enzim moleküllerinin tamamı immobilize olamamış olabilir. Optimum taşıyıcı miktarının üstündeki miktarlarda ise; fiber miktarının fazla olması immobilize edilen enzim ile substrat arasında gerçekleşmesi gereken etkileşime sterik olarak engel olmuş olabilir.

3.7.3. Adsorpsiyon süresi

PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda öncelikle adsorpsiyon daha sonra çapraz bağlama yöntemleri kullanıldı. Enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve çapraz bağlayıcı miktarı sabit tutularak optimum adsorpsiyon süresini belirlemek için 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 dakika süre ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla adsorpsiyon süresine karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.63.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PCL/CH nanofiberleri için adsorpsiyon süresi 30 dakika, PCL/CH/Mn⁺² nanofiberleri için ise 20 dakika olarak bulundu.

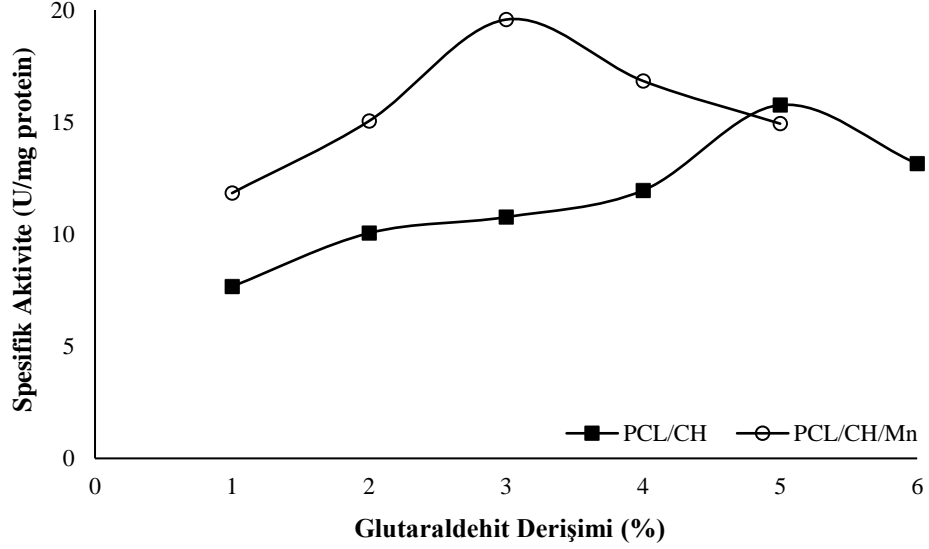


Şekil 3.63. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

PCL/CH nanofiberlerin yüzeyi 30. dakikada, PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerin yüzeyi ise 20. dakikada arginaz enzimi molekülleri bakımından doygunluğa ulaştığı ve bu sürelerden sonra immobilize enzim moleküllerinin desorbe olmaya başladığı görüldü. Ayrıca PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerin yapısında bulunan ve arginaz enziminin aktivitesi için gerekli olan Mn⁺² iyonları enzimin fibere olan ilgisini etkilediği ve daha kısa sürede ve daha etkili bir immobilizasyon işleminin gerçekleşmesine neden olduğu söylenebilir. Bunun yanında Mn⁺² iyonlarının koordinasyon kabiliyeti nedeniyle ilave bağlar yapmak suretiyle grafikte anlaşılabileceği üzere enzimin desorpsiyonunun kademeli olarak gerçekleşmesini sağlamıştır. Bu nedenle, PCL/CH nanofiber için bunu söylemek mümkün değildir.

3.7.4. Çapraz bağlayıcı miktarı

Optimum glutaraldehit miktarını belirlemek için enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve adsorpsiyon süresi sabit tutularak %1, %2, %3, %4, %5 ve %6 glutaraldehit miktarlarında immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla çapraz bağlayıcı miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.64.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PCL/CH nanofiberleri için optimum glutaraldehit miktarı %5 iken PCL/CH/Mn⁺² nanofiberleri için ise %3'tür.



şekil 3.64. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi

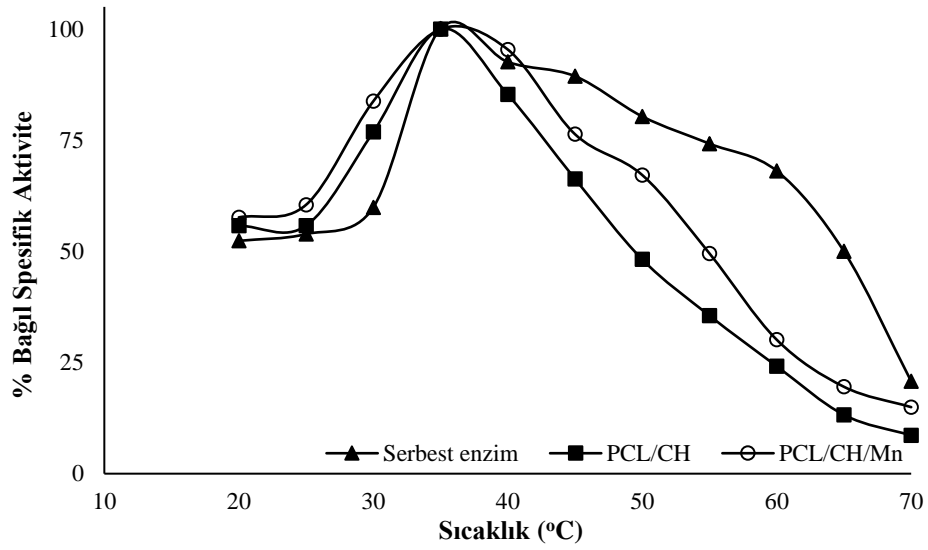
Optimum GA miktarının altındaki değerlerde, ortamdaki GA miktarı enzim moleküllerinin nanofiberlere immobilize olması için yetersiz gelmiş olabilir. Optimum GA miktarının üzerindeki değerlerde ise, ortamdaki GA miktarının enzim moleküllerinin aktif merkezini etkilemesi ile birlikte enzim yapısında konformasyonel değişiklikler meydana gelmiş olabilir.

Zhang vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada rekombinant insan arginaz-I enzimi glutaraldehit kullanılarak kitosan parçacıklara immobilize edilmiştir. Bu çalışmada glutaraldehit derişimi %0,5-2,5 olacak şekilde çalışılmıştır ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça goreceli aktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada ise arginaz-I selüloz mikrokrelelere glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Glutaraldehit derişimi 0,3; 0,5; 0,8 ve 1,0 mM olacak şekilde deneyler yapılmış ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça aktivitenin azaldığı gözlenmiştir (Li vd., 2014).

3.7.5. Optimum sıcaklık

PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin sıcaklıkla değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için aktivite sıcaklığı 20-70°C aralığında değiştirilerek aktivite tayini yapıldı. şekil

3.65.'de görüldüğü gibi hem serbest enzim hem de arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² için optimum sıcaklık değeri 35°C olarak bulundu.



Şekil 3.65. PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri

Grafik incelendiğinde hem serbest arginaz aktivitesi hem de arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların aktiviteleri optimum sıcaklıktan düşük ve yüksek değerlerde azaldığı görüldü. Enzim immobilizasyonundan sonra PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların optimum sıcaklığında serbest enzime göre herhangi bir değişim gözlenmezken optimum sıcaklığın altındaki değerlerde immobilize enzim serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterdi. Optimum sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda ise sadece 40°C'de PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Optimum sıcaklığın üzerindeki diğer değerlerde ise her iki enzim immobilize nanofiber membranda serbest enzime göre daha düşük aktivite gösterdi. Özellikle 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda arginaz immobilize PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranı aktivitesinin sadece %30'unu korurken bu değer PCL/CH nanofiber membranı için %24'tür. Bu durumun en önemli nedeni her iki nanofiber membranın yapısında bulunan PCL'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü PCL polimerinin erime noktası 60°C'dir. Bu nedenle sıcaklık arttıkça her iki nanofiber membranın yapısı bozulmakta ve enzim ile taşıyıcı membran arasındaki etkileşimlerde konformasyonel değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca, sıcaklık artışı ile ortamdaki ısıyı tolere edecek nanofiberlerin enzime sunduğu mikroçevre yapısı bozulmaktadır.

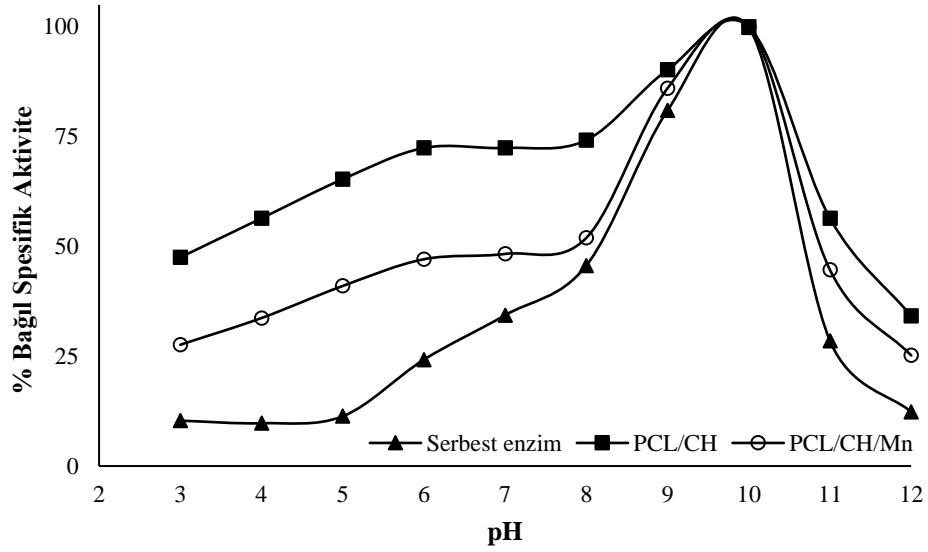
Bu nedenlerden dolayı sıcaklık arttıkça enzim immobilize nanofiber membranların aktiviteleri azalmaktadır. Arginaz immobilize PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlar immobilize PCL/CH nanofiber membranlara göre tüm sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdiği gözlemlendi. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn⁺²'nin değişen sıcaklık ile oluşan ısı değişimlerine karşı membran yapılarını daha dirençli bir hale getirdiğini göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık sırasıyla 40°C ve 60°C olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 37°C iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 38°C olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz-I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz-I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur.

3.7.6. Optimum pH

PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin pH ile değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için

aktivite ortamının pH'ı 3,0-12,0 aralığında değiştirilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve Şekil 3.66.'da verildi.



Şekil 3.66. PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri

Grafik incelediğinde hem serbest enzim hem de arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlar için optimum pH değeri 10,0 olarak bulundu. Serbest enzim özellikle aşırı asidik ve bazik koşullarda yaklaşık %10 civarında aktivitede gösterirken arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlar ise aktivitelerini aşırı bazik ortamda sırasıyla %34 ve %25 civarında, aşırı asidik ortamda ise sırasıyla %48 ve %28 civarında korudukları görüldü. İmmobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranın yapısında bulunan fonksiyonel grupların varlığı aktivitenin düşük ve yüksek pH değerlerinde korunmasını sağlamıştır. Optimum pH'ın altındaki ve üzerindeki pH değerlerinde immobilize nanofiber membranların serbest enzime göre daha yüksek aktivite göstermesinin nedeni membran yapısında bulunan CH'den kaynaklanmaktadır. CH doğal bir polimer olup aynı zamanda polikasyonik bir polimerdir. Polikasyonlar serbest enzime göre immobilize enzimler için daha alkali mikroçevre sundukları için asidik pH değerlerinde tampon görevi görürler. Ayrıca CH'nin yapısında bulunan -OH grupları ve -NH₂ grupları yüksek bazik ortamlarda, -NH₃⁺ grupları ise yüksek asidik ortamlarda enzime sağladığı mikroçevrenin tampon etkisi göstermesi nedeniyle koruma görevi gördüğü söylenebilir. Serbest enzimin daha düşük aktivite gösterdiği pH ortamlarında immobilize nanofiber membranların daha yüksek aktivite göstermesi

bu ortamlarda pH değişikliğine karşı immobilize enzimin dirençli olduğunu göstermektedir.

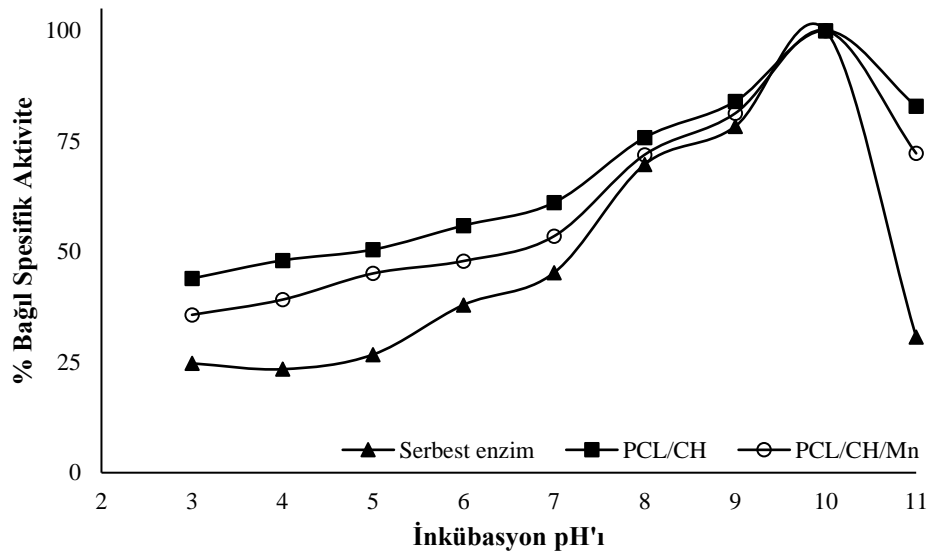
Arginaz immobilize PCL/CH nanofiber membranlar immobilize PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlara göre tüm pH değerlerinde daha yüksek aktivite gösterdiği görüldü. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn⁺² iyonlarının, enzim moleküllerinin yanında, CH'nin yapısında bulunan ve pH değişimlerine karşı tampon görevi gören -OH ve -NH₂ grupları ile şelat oluşturduğu ve böylece mikroçevrenin tampon etkisinin azaldığı söylenebilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğeri arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH değeri 10,0, immobilize enzim için ise 9,5-10,5 aralığında bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest arginaz için optimum pH 11,0 iken, poliakrilamid destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise 9,5 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH 7,0 iken bu değeri immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 7,5 olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH değeri 7,0-11,0 aralığında bulunmuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada ise arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara sığır karaciğeri arginazı enkapsüle edilmiştir ve hem

serbest hem de immobilize enzim için optimum pH değerinin 10,0 olduğu görülmüştür.

3.7.7. pH kararlılığı

PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin pH kararlılığını belirleyebilmek amacıyla immobilize nanofiberler pH 3,0-11,0 aralığında hazırlanan tamponlar içerisinde 1 saat inkübe edildi. İnkübe edilen enzimlerin aktivite tayinleri sonucunda pH kararlılıklarının grafiği Şekil 3.67.'de verildi.



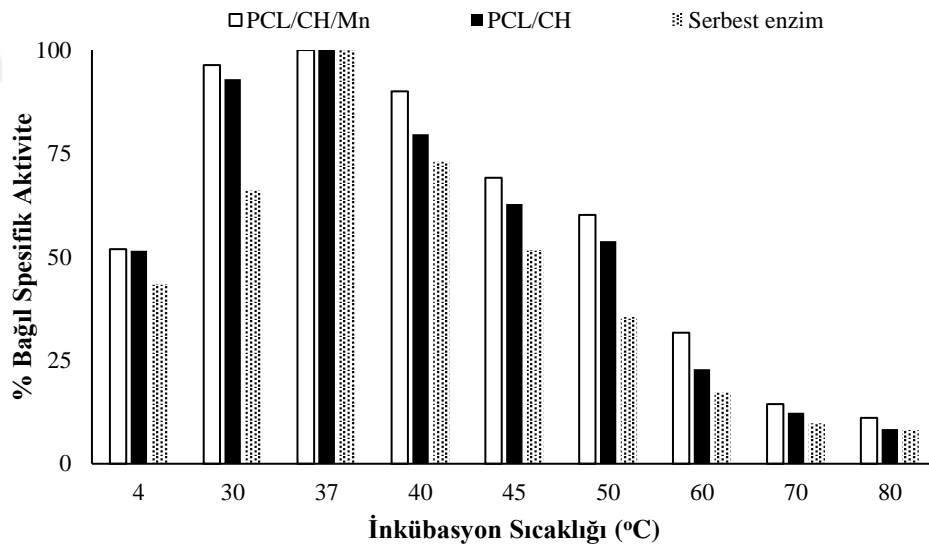
Şekil 3.67. PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri

Her iki nanofiber membran taşıyıcıya da immobilizasyon işleminin ardından hem asidik hem de bazik bölgelerde enzimin pH kararlılığının serbest enzime göre daha yüksek olduğu görüldü. Bunun nedeni nanofiber membranların yapısında bulunan amino, hidroksil ve karbonil gruplarının enzimin etrafını çevreleyerek korumasıdır. CH'nin yapısında bulunan -OH grupları ve -NH₂ grupları yüksek bazik ortamlarda, CH'nin yapısında bulunan -NH₃⁺ grupları ve PCL'nin yapısında bulunan -C=O grupları ise yüksek asidik ortamlarda enzime sağladığı mikroçevrenin tampon etkisi göstermesi nedeniyle pH değişimlerine karşı koruma görevi gördüğü söylenebilir. Arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin aynı pH koşullarında PCL/CH nanofiber membranlara göre daha düşük aktivite gösterdiği görüldü. Bunun nedeni ise

yapıdaki Mn^{+2} iyonlarının PCL ve CH yapısındaki pH değişimlerine karşı tampon görevi görebilecek gruplar olan $-C=O$, $-OH$ ve $-NH_2$ ile şelat oluşturması olabilir. Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, yapılan pH kararlılığı deneyleri sonucunda serbest enzim için optimum değer 7,5 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 8,0 olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidrosietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve pH kararlılığı deneylerinde serbest enzim için optimum değer 8,0 iken immobilize enzim için bu değer 5,0-9,0 aralığında olduğu bulunmuştur.

3.7.8. Termal kararlılık

PCL/CH ve PCL/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için farklı (4, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80°C) sıcaklıklardaki su banyolarında 1 saat inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuçlar Şekil 3.68.'de verildi.



Şekil 3.68. PCL/CH ve PCL/CH/ Mn^{+2} nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği

Grafik incelendiğinde arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranların çalışılan tüm sıcaklıklarda serbest arginaz enzimine göre daha kararlı olduğu görülmektedir. Bu durum immobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel

değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan PCL ve CH polimerlerinin ve Mn^{+2} iyonlarının enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığını göstermektedir. Özellikle nanofiber membranlarda bulunan CH üzerindeki hidroksil gruplarının suda özel bir şekilde yapılanabilme özellikleri sayesinde her iki membrana ilave kararlılık kazandırdığı söylenebilir.

Arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranların 30 ve 37°C'de aktivitelerinin %100'ünü koruduğu görülmektedir. 37°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranların aktiviteleri giderek azalmaktadır. Özellikle 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda her iki nanofiber membran için aktiviteleri %50'nin altına düşmektedir. Bunun en önemli nedeni her iki nanofiber membran yapısında bulunan ve erime noktası 60°C olan PCL'den kaynaklanmaktadır. Sıcaklık PCL'nin erime noktasına yaklaştıkça taşıyıcının yapısı bozulmakta ve enzim ile taşıyıcı membran arasındaki etkileşimler konformasyonel olarak değişime uğramaktadır. Bunun sonucu olarak ortamdaki ısı artışı tolere edecek mikroçevre yapısı bozulmaktadır. Bu nedenlerden dolayı sıcaklık arttıkça enzim immobilize nanofiber membranların aktiviteleri azalmaktadır.

Ayrıca PCL/CH/ Mn^{+2} nanofiber membranların çalışılan her sıcaklıkta daha kararlı olmasının en önemli nedeni yapısında bulunan Mn^{+2} iyonlarının enzim molekülleri ile şelat yapabilmesi nedeniyle daha kararlı bir yapı oluşturması enzimin denatürasyonunu engellemiş olabilir. Aynı zamanda immobilizasyon işlemi sonrasında kararlılıktaki artış, nanofiber membran taşıyıcı ile enzim arasında oluşan kararlı bağların kırılması için gereken enerjinin çok yüksek olmasından da kaynaklanabilir.

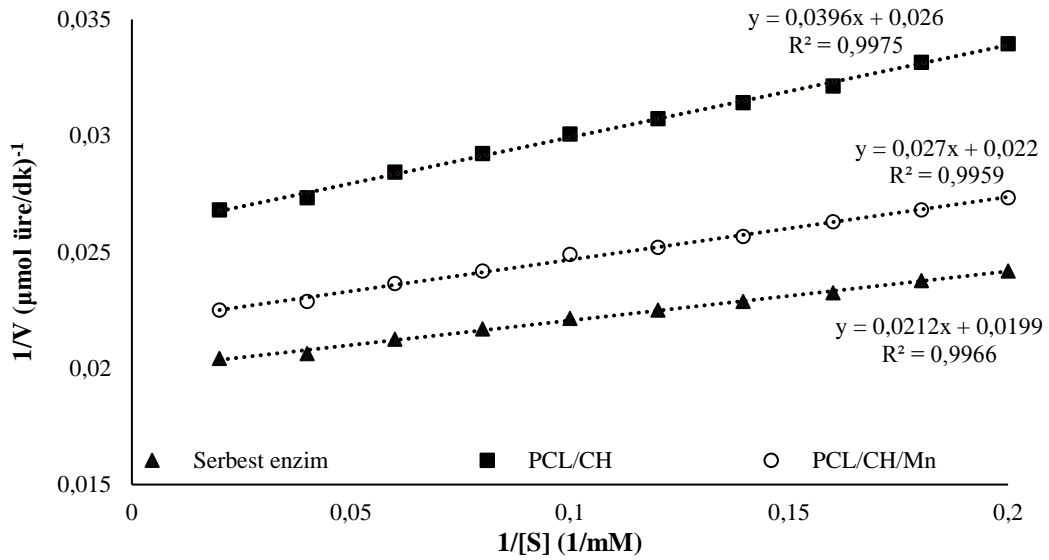
Turras (2008) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus Subtilis*'den elde edilen arginaz enzimi Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA, Sepabeads EC-EP ve Eupergit C 250 L olmak üzere 4 farklı epoksi desteğe immobilize edilmiştir. 60°C'de yapılan termal kararlılık deneyleri sonucunda 3 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybederken, Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA ve Eupergit C 250 L 2 saat sonunda aktivitelerinin %50'sini kaybetmiştir. Immobilize Sepabeads EC-EP ise 6 saat sonunda aktivitesinin %60'ını korumuştur. Başka bir çalışmada poliakrilamid destek üzerine arginaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 40, 60 ve 70°C'de immobilize enzim için termal

kararlılık deneyleri yapılmıştır. 40°C’de immobilize enzim 120 dakika sonunda aktivitesini korumayı başarırken, 60°C’de 60 dakika sonunda aktivitesinin %80’ini kaybederken, 70°C ise 30 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybetmiştir (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidroksietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim 30 dakika boyunca 20-100°C aralığında tutularak termal kararlılık profilleri incelenmiştir. Serbest enzim 20-45°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken, 45°C üzerindeki sıcaklıklarda aktivite kaybetmeye başlamıştır ve 65°C’de aktivitesinin %50’sini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 25-75°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken 75°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla aktivitesini kaybetmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise rekombinant insan arginaz I enzimi ve kitosan parçacıklara immobilize edilmiş enzim için 40, 50 ve 60°C’de termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. Serbest enzim 40°C’de 225 dakika sonunda aktivitesinin %20’sini kaybederken immobilize enzim ise sadece %10’unu kaybetmiştir. 50°C’de serbest enzim 25 dakika sonra aktivitesinin %50’sini kaybederken immobilize enzim ise 225 dakika sonunda aktivitesinin %50’sini kaybetmiştir. 60°C’de ise serbest enzim %30 aktivite gösterirken immobilize enzim 60 dakika sonunda aktivitesinin %40’ını korumayı başarmıştır (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise arginaz I ve selüloz mikrokürelere immobilize arginaz I için yapılan termal kararlılık çalışmalarında 60°C serbest enzim 2 saat sonunda %13,5 aktivite gösterirken immobilize enzim 30 dakika sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir ve yüksek sıcaklıklarda hem serbest enzim hem de immobilize enzimin kararlı olmadığı gözlenmiştir. 40°C’de ise hem serbest enzim hem de immobilize enzim 4 saat sonunda aktivitelerinin %90’ını korumayı başarmıştır. Yine aynı çalışmada 37°C’de 15 saat sonra serbest enzim aktivitesinin %50’sini korurken immobilize enzim %10 aktivite göstermiştir. 20°C’de 25 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin yaklaşık %40’ını korurken, immobilize enzim aktivitesinin %30’unu korumuştur. 4°C’de ise 25 saat sonunda hem serbest hem de immobilize enzim aktivitesinin tamamını korumuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada hem serbest arginaz hem de arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylona enkapsüle edilen arginaz 4-80°C aralığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından termal kararlılık profilleri çıkarılmıştır. Serbest enzim maksimum aktivitesini 37°C’de immobilize enzim ise 45°C’de yapılan inkübasyon işlemi sonrasında göstermişlerdir. Serbest enzim sadece

4°C’de ve 20°C’de immobilize enzime göre daha yüksek aktivite gösterirken çalışılan diğer tüm sıcaklıklarda ise immobilize enzim daha yüksek aktivite göstermiştir.

3.7.9. Kinetik parametreler

İmmobilizasyon işlemi sonrasında enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişimler, sterik etkiler, enzimin mikroçevresinde meydana gelen değişiklikler ve difüzyon etkileri gibi nedenlerden dolayı enzimlerin kinetik davranışlarında değişiklikler gözlenebilir. Arginaz immobilizasyonu sonrasında meydana gelen bu değişimleri gözlemlemek için hazırlanan immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların kinetik davranışları, 5-50 mM aralığında L-arginin kullanılarak Lineweaver-Burk ile belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.69.’da, K_m ve V_{max} değerleri ise Çizelge 3.11.’de verildi.



Şekil 3.69. Arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.11. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri

Taşıyıcı	K _m (mM)	V _{max} (µmol üre/dk) ⁻¹
Serbest arginaz	1,06	50,25
PCL/CH	1,52	38,46
PCL/CH/Mn ⁺²	1,23	45,45

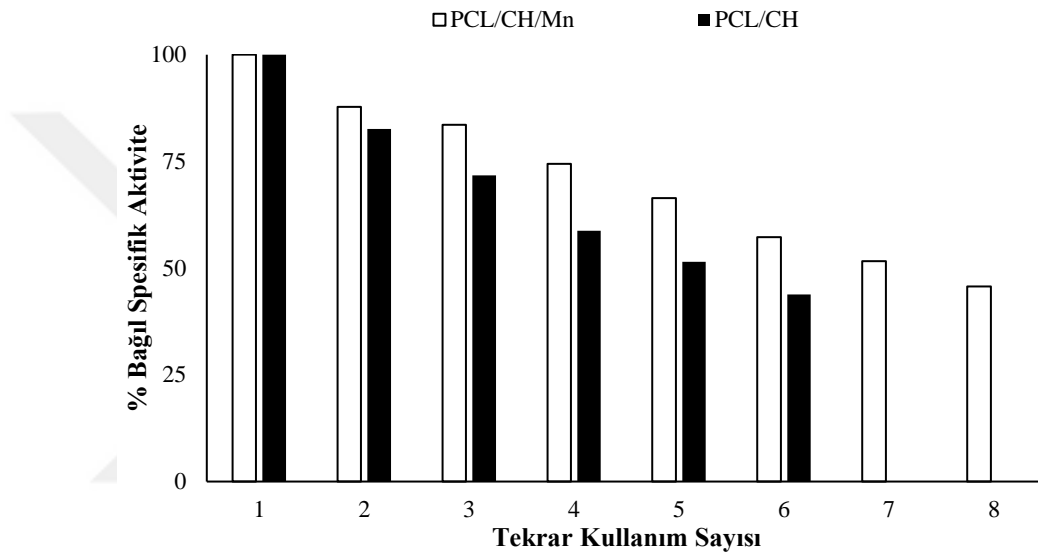
Arginaz immobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranlarının kinetik parametreleri serbest enzimle karşılaştırıldığında K_m değerlerinin arttığı, V_{max} değerlerinin ise azaldığı görüldü. K_m değerlerinde meydana gelen bu artış

immobilizasyon sonrası substratı bağlayan enzimin konformasyonel esnekliğinde azalma, taşıyıcı membrandan kaynaklanan sterik engeller ve difüzyon kısıtlaması gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Bu artış immobilizasyon sonrası enzimin substrata olan ilgisinde bir azalmanın söz konusu olduğunu gösterir. Bu ilginin azalmasının sonucu reaksiyon hızında da bir azalma olmuştur. İmmobilize PCL/CH ve PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların kinetik parametreleri karşılaştırıldığında PCL/CH nanofiberinin K_m değerinin daha büyük, V_{max} değerinin ise daha düşük olduğu görüldü. Bu durum PCL/CH/Mn⁺² nanofiber membranların yapısında bulunan Mn⁺² iyonlarının immobilizasyonu sonrasında enzimin konformasyonel esnekliğinde meydana gelen azalmayı kısıtladığı ve yapıya kararlılık kazandırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmalarında immobilizasyon sonrası K_m değerinde artışın gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara arginaz enzimi enkapsüle edilmiştir ve K_m değerinin serbest enzime göre 10x10⁻³ M'dan 18,5x10⁻³ M'a arttığı gözlenmiştir (Grady ve Joyce, 1980). Yapılan başka bir çalışmada arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre 3,8x10⁻³ M'dan 4,4x10⁻³ M'a arttığı bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest enzim için K_m değeri 3,6x10⁻² M iken poliakrilamid destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise yaklaşık 10 kat artarak 3,7x10⁻¹ M olarak gözlenmiştir. Literatürde yer alan bir başka çalışmada ise *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilen arginaz enzimi polietilen glikole immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre bir hayli artarak 4,8 mM'dan 15,2 mM'a arttığı, V_{max} değerinin ise 21,7 U/mg/dk'dan 14,08 U/mg/dk'ya azaldığı raporlanmıştır (El-Sayed vd., 2014). Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Idiomarina sediminium* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre bir miktar artarak 2,44 mM olduğu ve V_{max} değerinin ise 169,49 U/mL/dk olduğu belirtilmiştir.

3.7.10. Tekrar kullanılabilirlik

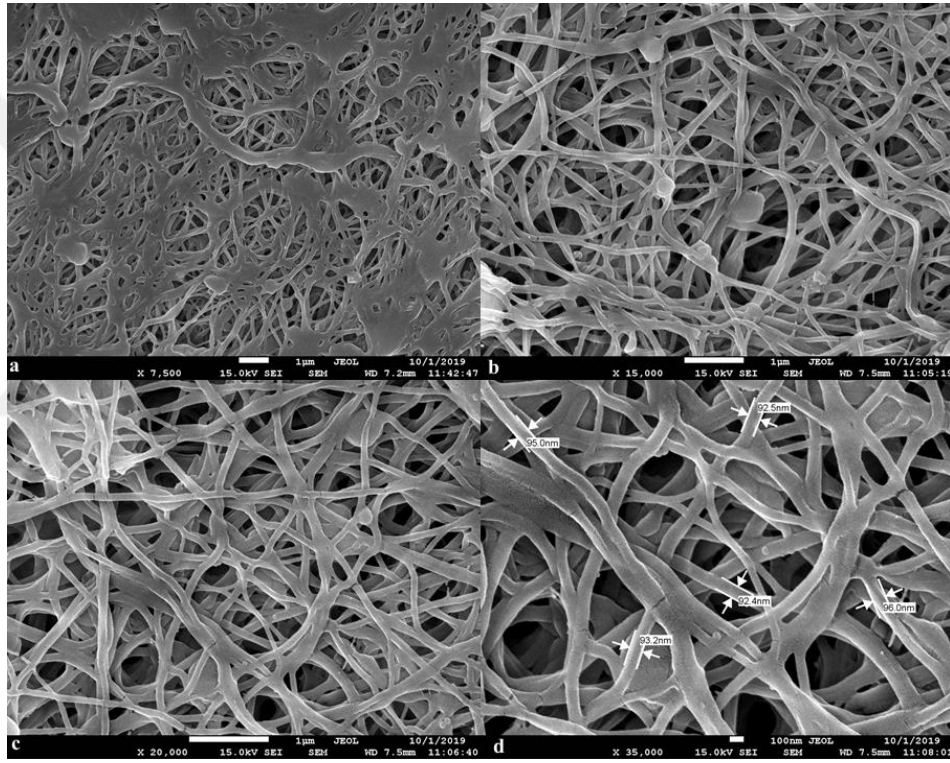
Şekil 3.70. incelendiğinde arginaz immobilize PCL/CH nanofiber membranların 6 kullanım sonucunda aktivitesi %50'nin altına düşerken arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiber membranların aktivitesi ise 8 kullanım sonrası %50'nin altına düştüğü görüldü. Bu sonuç Mn²⁺ iyonlarının arginaz moleküllerinin membranlara immobilizasyonunda bağlanma noktalarından biri olarak kullanıldığı ve immobilizasyon işlemi sonrasında enzime ilave kararlılık kazandırdığını şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 3.70. PCL/CH ve PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği

Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmaları incelendiğinde literatürde yer alan sadece iki çalışmada tekrar kullanılabilirlik üzerine çalışmalar yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalardan Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve 5 kullanım boyunca aktivitesinin tamamını, 7 kullanım sonrası ise %83,4'ünü koruduğu görülmüştür. Yapılan bir diğer çalışmada ise *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve 40°C ve 60°C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. 40°C'de 5 kullanım sonrasında aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği, 60°C'de ise 3 kullanım sonrası aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği görülmüştür (Zhang vd., 2016).

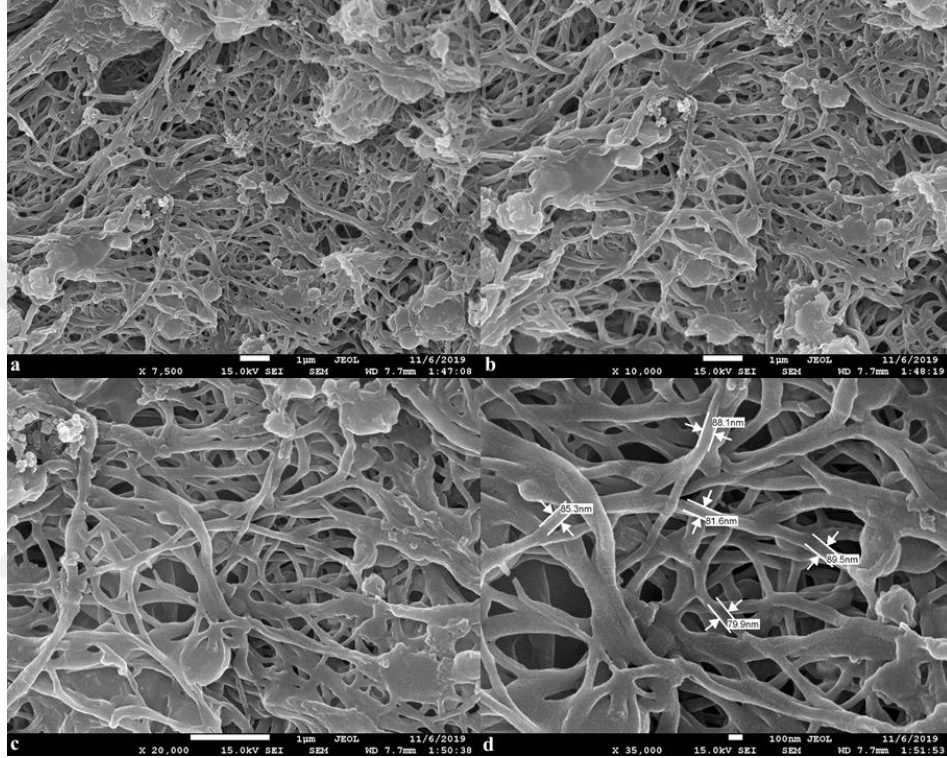
Arginaz immobilize PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.71.'de verildi. Şekil 3.17.'de verilen PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarının değiştiği, ortalama çaplarının azaldığı ve 92-96 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği gibi immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının bozulmasının nedeni enzim moleküllerini nanofiber membrana immobilize etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıdır (Song vd., 2012; Pesaran vd., 2015). Enzimin çapraz bağlayıcı kullanılarak nanofiberlere immobilize edilmesi sonucu nanofiber yapısında değişiklik meydana gelebilir. Ayrıca Şekil 3.71. incelendiğinde arginaz enziminin yapının yüzeyine immobilize olduğu görüldü.



Şekil 3.71. Arginaz immobilize PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x7,500 (b) x15,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

6 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.72.'de verildi. Şekil 3.72. incelendiğinde 6 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.17. hem de Şekil 3.71.'de verilen yapılaraya göre yapının tamamen farklılaştığı gözlemlendi. Tekrar kullanım işlemi sonrasında PCL/CH nanofiber yapılarının morfolojilerinin bozulduğu ve bunun sonucunda da toplam yüzey alanına azalma meydana geldiği görüldü. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya

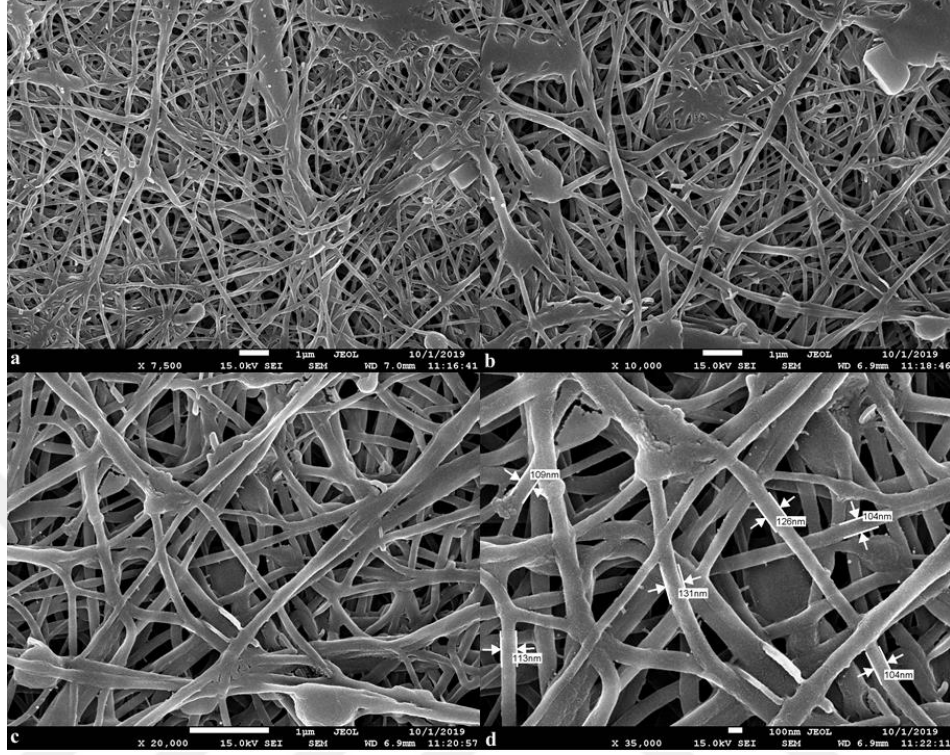
desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. Bunun dışında PCL/CH nanofiber yapısının bozulmasındaki en önemli etki arginaz enziminin aktive tayininin ikinci aşamasında fiberlerin 100°C'ye maruz kalmalarıdır. PCL polimerinin erime sıcaklığı 60°C'dir. Bu nedenle her tekrar kullanım sonrasında aktivite tayininde fiber 100°C'ye maruz kaldığı için nanofiber yapısındaki PCL'nin erimesi sonucu yapıda bozulmalar meydana gelmiş ve fiberlerin ortalama çaplarının azaldığı ve 80-90 nm civarında olduğu görüldü.



Şekil 3.72. 6 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PCL/CH nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x7,500 (b) x15,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

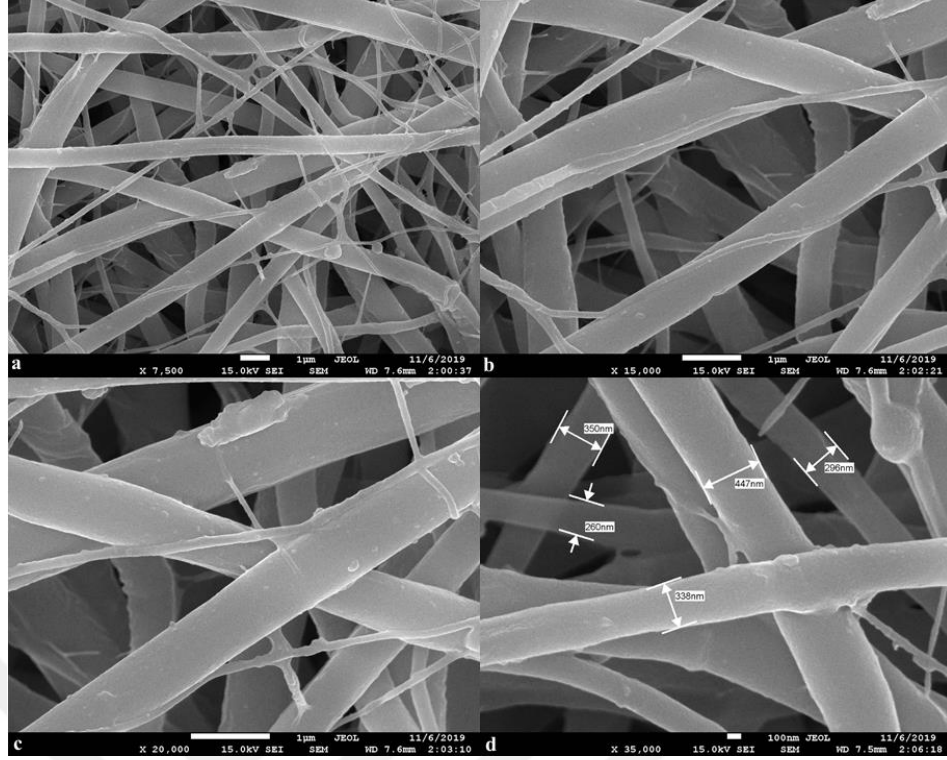
Arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.73.'de verildi. Şekil 3.18.'de verilen PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarının korunmadığı ve ortalama çaplarının 104-131 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği gibi immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının bozulmasının nedeni enzim moleküllerini nanofiber membrana immobilize etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıdır (Song vd., 2012; Pesaran vd., 2015). Enzimin çapraz bağlayıcı kullanılarak nanofibere immobilize edilmesi sonucu nanofiber yapısında değişiklik meydana gelebilir. Şekil 3.73. incelendiğinde arginaz enziminin fiberler üzerine immobilize olduğu gözlemlendi. Arginaz immobilizasyonu sonrasında

PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerinin yapısının PCL/CH nanofiberlere daha iyi korunduğu gözlemlendi. Bunun nedeni ise yapıda bulunan manganın yapıya kararlılık kazandırmasıdır.



Şekil 3.73. Arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x7,500 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

8 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize PCL/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.74.'de verildi. Şekil 3.74. incelendiğinde 8 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.18. hem de Şekil 3.74.'de verilen yapılaraya göre yapının farklılaştığı gözlemlendi. Tekrar kullanım işlemi sonrasında PCL/CH/Mn²⁺ nanofiber yapılarının morfolojilerinin bozulduğu ve bunun da toplam yüzey alanının azalmasına neden olduğu söylenebilir. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. Bunun dışında PCL/CH/Mn²⁺ nanofiber yapısının bozulmasındaki en önemli etki arginaz enziminin aktive tayininin ikinci aşamasında fiberlerin 100°C'ye maruz kalmalarıdır. PCL polimerinin erime sıcaklığı 60°C'dir. Bu nedenle her tekrar kullanım sonrasında aktivite tayininde fiber 100°C'ye maruz kaldığı için nanofiber yapısındaki PCL'nin erimesi sonucu yapıda bozulmalar meydana gelmiş, fiberlerin ortalama çaplarının arttığı ve 260-447 nm civarında olduğu görüldü.



Şekil 3.74. 8 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/CH/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

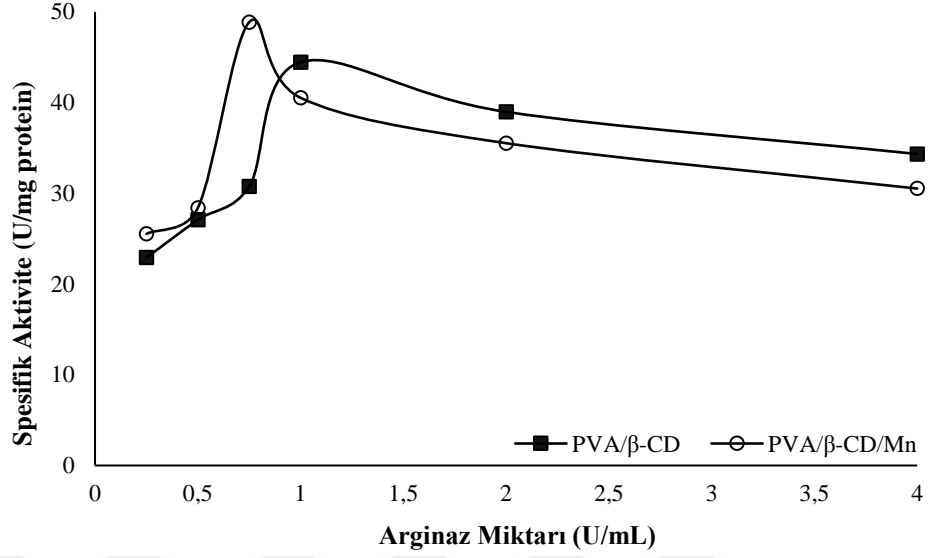
3.8. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ Nanofiberlere Arginaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu ve Karakterizasyonu Çalışmaları

Optimum koşullarda sentezlenen PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz enzimi, adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak immobilize edildi. Optimizasyon parametreleri olarak arginaz miktarı, nanofiber miktarı, adsorpsiyon süresi ve çapraz bağlayıcı miktarı çalışıldı. Karakterizasyon kısmında ise optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri incelendi.

3.8.1. Arginaz miktarı

PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum enzim miktarını belirlemek için 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 ve 4 U/mL miktarlarında arginaz enzimi kullanıldı. Hem arginaz immobilize PVA/β-CD hem de arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Farklı derişimlere karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.75.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize

PVA/ β -CD nanofiberleri için optimum enzim miktarı 1 U/mL, PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberleri için ise 0,75 U/mL olarak bulundu.



Şekil 3.75. PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum enzim miktarının belirlenmesi

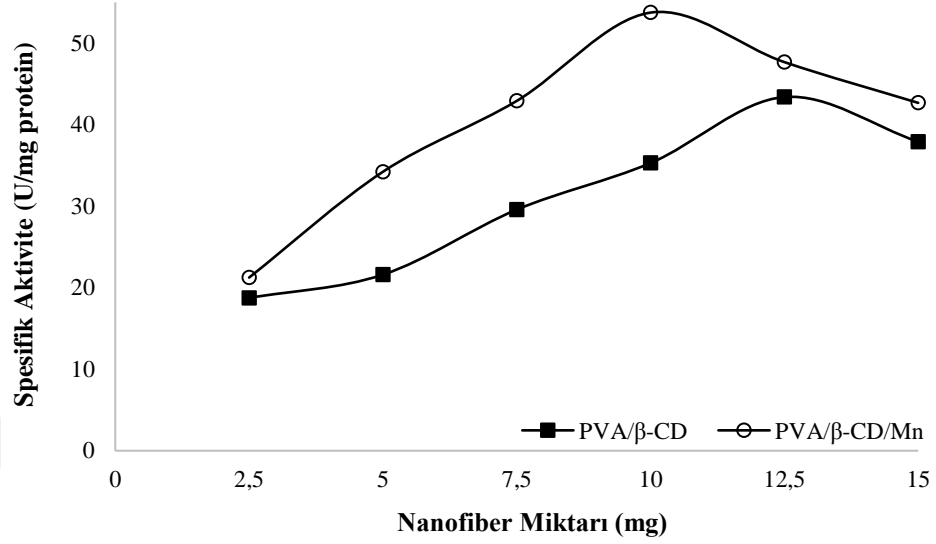
Her iki nanofiber için de optimum arginaz miktarının üzerindeki miktarlarda spesifik aktivite giderek azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni ortamdaki taşıyıcı miktarının yetersiz olması olabilir. Ayrıca ortamdaki arginaz molekülleri taşıyıcı yüzeyine bağlanması sırasında multi adsorpsiyon gerçekleşmiş olabilir.

Arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberler için optimum enzim miktarı PVA/ β -CD nanofiberlere göre daha düşük bulunmuştur. PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerin yapısında bulunan Mn^{+2} iyonları, optimum enzim miktarının altındaki miktarlarda birim Mn^{+2} başına düşen enzim miktarı az olduğu için enzim aktivite göstermemiş olabilir. Optimum enzim miktarının üzerindeki derişimlerde ise enzim miktarı artmasına rağmen Mn^{+2} miktarı sabittir. Bu nedenle enzimin aktivite kazanabilmesi için gerekli olan Mn^{+2} miktarı ortamda bulunmadığı için aktivite düşmüş olabilir.

3.8.2. Nanofiber miktarı

PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda optimum taşıyıcı miktarını belirlemek için 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 15 mg nanofiber immobilizasyon işleminde kullanıldı. Hem arginaz immobilize PVA/ β -CD hem de

arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberler için aktivite tayini yapıldı. Taşıyıcı miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.76.'daki sonuçlara göre arginaz immobilize PVA/ β -CD nanofiberleri için optimum taşıyıcı miktarı 12,5 mg, PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberleri için ise 10 mg olarak bulundu.

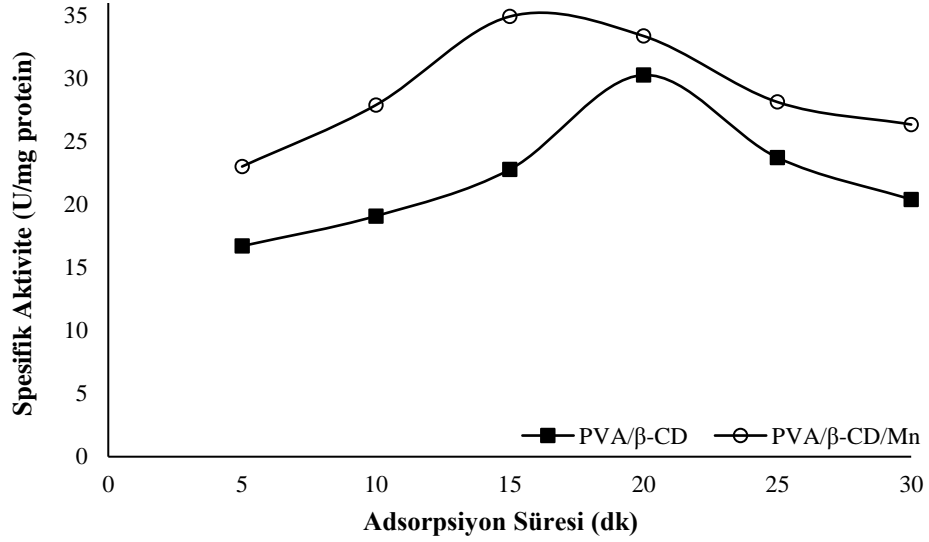


Şekil 3.76. PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum nanofiber miktarının belirlenmesi

Optimum taşıyıcı miktarının altındaki miktarlarda, ortamda yeterli fiber bulunmadığı için enzim moleküllerinin tamamı immobilize olamamış olabilir. Optimum taşıyıcı miktarının üstündeki miktarlarda ise; fiber miktarının fazla olması immobilize edilen enzim ile substrat arasında gerçekleşmesi gereken etkileşime sterik olarak engel olmuş olabilir.

3.8.3. Adsorpsiyon süresi

PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlere arginaz immobilizasyonunda öncelikle adsorpsiyon daha sonra çapraz bağlama yöntemleri kullanıldı. Enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve çapraz bağlayıcı miktarı sabit tutularak optimum adsorpsiyon süresini belirlemek için 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika süre ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla adsorpsiyon süresine karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.77.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PVA/ β -CD nanofiberleri için adsorpsiyon süresi 20 dakika, PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberleri için ise 15 dakika olarak bulundu.

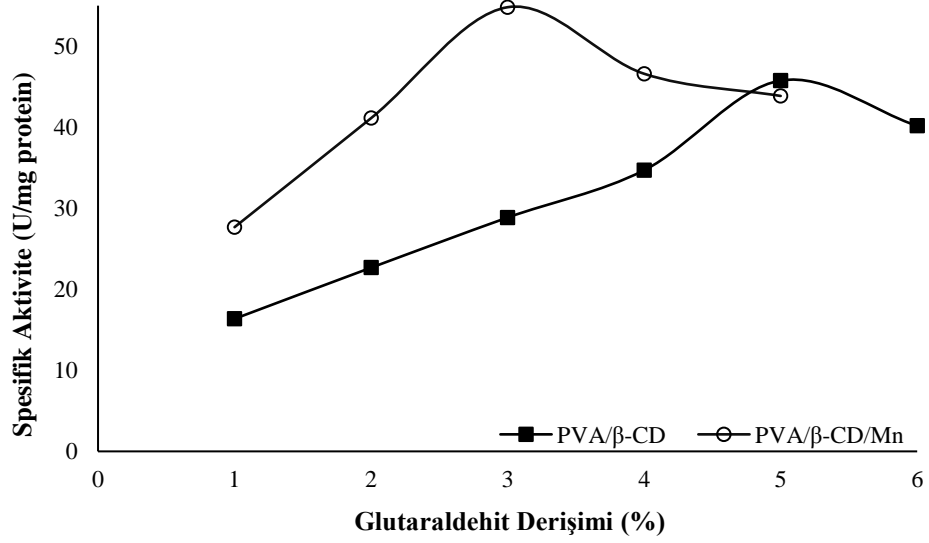


Şekil 3.77. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerine arginaz immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

PVA/β-CD nanofiberlerin yüzeyi 20. dakikada, PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerin yüzeyi ise 15. dakikada arginaz enzimi molekülleri bakımından doygunluğa ulaştığı ve bu sürelerden sonra immobilize enzim molekülleri desorpsiyon olmaya başladığı söylenebilir. Ayrıca PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerin yapısında bulunan ve arginaz enziminin aktivitesi için gerekli olan Mn²⁺ iyonları enzimin fibere olan ilgisini etkilemiştir ve daha kısa sürede ve daha etkili bir immobilizasyon işleminin gerçekleşmesine neden olmuştur. Bunun yanında Mn²⁺ iyonlarının koordinasyon kabiliyeti nedeniyle ilave bağlar yapmak suretiyle grafikte anlaşılabileceği üzere enzimin desorpsiyonunun kademeli olarak gerçekleşmesini sağlamıştır. Bu nedenle, PVA/β-CD nanofiber için bunu söylemek mümkün değildir.

3.8.4. Çapraz bağlayıcı miktarı

Optimum glutaraldehit miktarını belirlemek için enzim miktarı, taşıyıcı miktarı ve adsorpsiyon süresi sabit tutularak %1, %2, %3, %4, %5 ve %6 glutaraldehit miktarlarında immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Aktivite ölçümünün ardından elde edilen veriler yardımıyla çapraz bağlayıcı miktarına karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Şekil 3.78.'deki sonuçlara göre arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiberleri için optimum glutaraldehit miktarı %5, PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberleri için ise %3 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.78. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerine arginaz enzimi immobilizasyonu için optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi

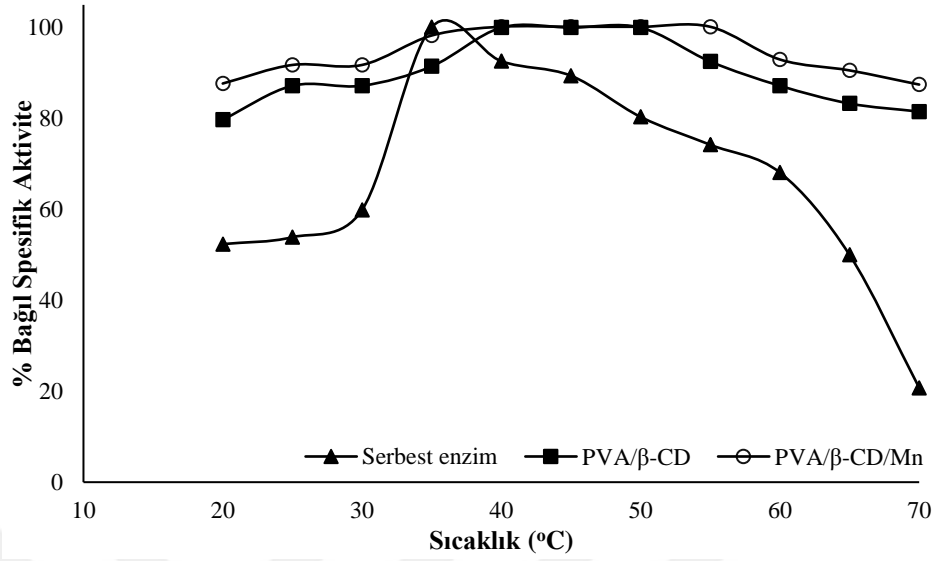
Optimum GA miktarının altındaki değerlerde, ortamdaki GA miktarı enzim moleküllerinin nanofiberlere immobilize olması için yetersiz gelmiş olabilir. Optimum GA miktarının üzerindeki değerlerde ise, ortamdaki GA miktarının enzim moleküllerinin aktif merkezini etkilemesi ile birlikte enzim yapısında konformasyonel değişiklikler meydana gelmiş olabilir.

Zhang vd. (2015) tarafında yapılan bir çalışmada rekombinant insan arginaz I enzimi glutaraldehit kullanılarak kitosan parçacıklara immobilize edilmiştir. Bu çalışmada glutaraldehit derişimi %0,5-2,5 olacak şekilde çalışılmıştır ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça göreceli aktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada ise arginaz I selüloz mikrokürelere glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Glutaraldehit derişimi 0,3; 0,5; 0,8 ve 1,0 mM olacak şekilde deneyler yapılmış ve çapraz bağlayıcı derişimi arttıkça aktivitenin azaldığı gözlenmiştir (Li vd., 2014).

3.8.5. Optimum sıcaklık

PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin sıcaklıkla değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile karşılaştırabilmek için aktivite sıcaklığı 20-70°C aralığında değiştirilerek aktivite tayini yapıldı. Şekil 3.79.'da görüldüğü gibi serbest enzim için optimum sıcaklık

değeri 35°C iken bu değer arginaz immobilize PVA/β-CD için 45-50°C arasında iken arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² için ise 45-55°C arasındadır.



Şekil 3.79. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri

Grafik incelendiğinde serbest arginaz aktivitesi optimum sıcaklıktan düşük ve yüksek değerlerde azalırken, arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların sıcaklık profili çok daha geniş bir alana yayılım gösterdi. Bu, immobilizasyon işlemi sonrası nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan PVA ve β-CD polimerlerinin ve Mn⁺² iyonlarının enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığını göstermektedir. Ayrıca arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranlar immobilize PVA/β-CD nanofiber membranlara göre tüm sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdi. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn⁺²'nin değişen sıcaklık ile oluşan ısı değişimlerine karşı membran yapılarını daha dirençli bir hale getirdiğini göstermektedir.

Her iki immobilize nanofiber membranda 20-65°C arasında en fazla %20 aktivite kaybı gösterdi ve optimum sıcaklık değeri serbest enzime göre daha yüksektir. Bunun nedeni sentezlenen PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların yapısında bulunan boşluklara ve oluşan ağ örgüsü enzimin tüm sıcaklıklarda ortam sıcaklığından etkilenmeden özellikle yüksek sıcaklıklarda enzimin denatüre olmadan ısı değişimlerine karşı dayanıklı bir mikroçevre sunduğu düşünülebilir. Ayrıca her iki

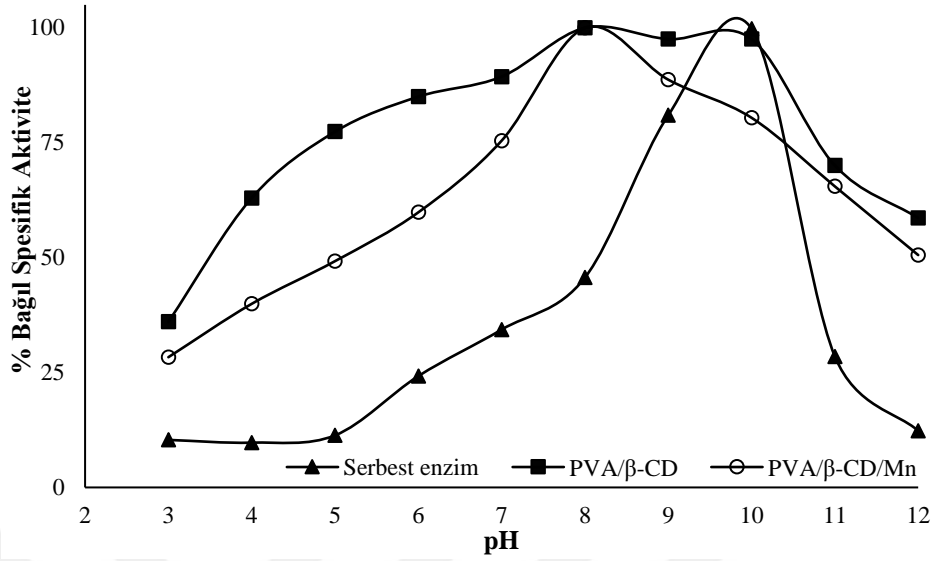
nanofiber membranın sıcaklık değişimlerine karşı göstermiş oldukları direnç; yapılarında bulunan ve termal kararlılık özelliği ile dikkat çeken PVA polimerinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Aynı zamanda PVA'nın ve β -CD'nin yapısında bulunan hidroksil gruplarının suda özel bir şekilde yapılanabilme özellikleri sayesinde her iki membrana da ilave kararlılık kazandırdığı söylenebilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık sırasıyla 40°C ve 60°C olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 37°C iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 38°C olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiköller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz I selöloz mikrokörelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur.

3.8.6. Optimum pH

PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/Mn⁺² nanofiber membranlara immobilize edilen arginaz enzimi aktivitesinin pH ile değişimini belirlemek ve serbest arginaz ile

karşılaştırabilmek için aktivite, ortamın pH'ı 3,0-12,0 aralığında değiştirilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve Şekil 3.80.'de verildi.



Şekil 3.80. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri

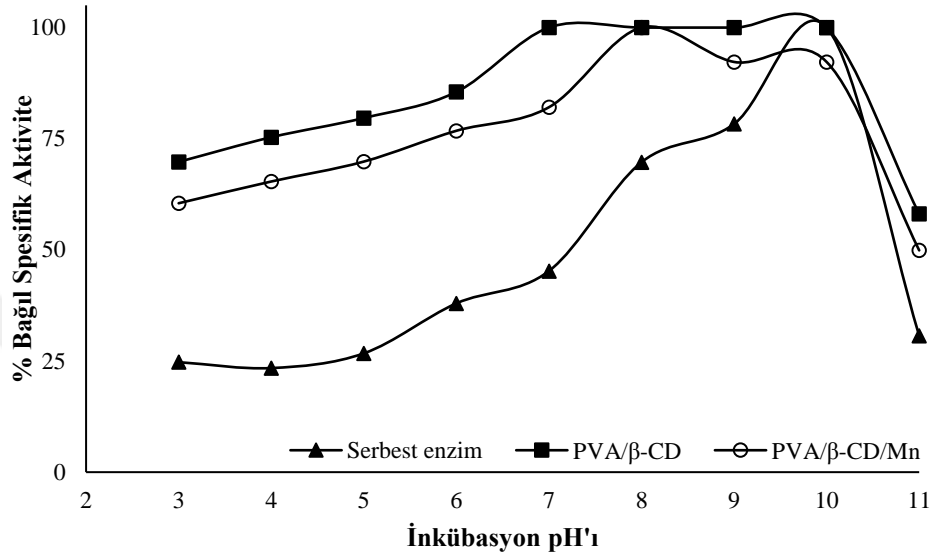
Grafik incelediğinde serbest enzimin optimum pH 10,0 iken, bu değer arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlar için ise pH 8,0 olarak bulundu. Serbest enzim aşırı asidik koşullarda yaklaşık %10 civarında aktivite gösterirken arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlar ise aktivitelerini sırasıyla %28 ve %30 civarında korudukları görüldü. Aşırı bazik koşullarda ise serbest enzim aktivitesinin %12'sini korurken arginaz immobilize PVA/β-CD %59'unu, PVA/β-CD/Mn²⁺ ise %51'ini korudu. İmmobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranın yapısında bulunan fonksiyonel grupların varlığı aktivitenin düşük ve yüksek pH değerlerinde korunmasını sağladı. Optimum pH'daki asidik bölgeye kayma membran yapısında bulunan PVA ve β-CD'den kaynaklanmaktadır. PVA ve β-CD serbest enzime göre immobilize enzimler için daha alkali mikroçevre sundukları için optimum pH değerinin daha asidik olmasını sağladıkları söylenebilir. Bir başka ifade ile hem PVA'nın hem de β-CD'nin yapısında bulunan -OH grupları yüksek bazik ortamlarda enzime sağladığı mikroçevrenin tampon etkisi göstermesi nedeniyle koruma görevi gördüğü söylenebilir. Serbest enzimin daha az aktivite gösterdiği pH ortamlarında immobilize nanofiber membranların daha yüksek aktivite göstermesi bu ortamlarda pH değişikliğine karşı immobilize enzimin dirençli olduğunu göstermektedir.

Arginaz immobilize PVA/ β -CD nanofiber membranlar immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlara göre tüm pH değerlerinde daha yüksek aktivite gösterdiği görüldü. Bu durumda arginaz aktivitesi için gerekli Mn^{+2} iyonlarının, enzim moleküllerinin yanında, PVA'nın ve β -CD'nin yapısında bulunan ve pH değişimlerine karşı tampon görevi gören -OH grupları ile şelat oluşturduğu ve böylece mikroçevrenin tampon etkisinin azaldığı söylenebilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğeri arginaz enzimi poli hidroksi etil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH değeri 10,0, immobilize enzim için ise 9,5-10,5 aralığında bulunmuştur (Veronese vd., 1989). Dala ve Szajani (1994) tarafından yapılan çalışmada serbest arginaz için optimum pH 11,0 iken, poliakrilamid destek üzerine immobilize arginaz enzimi için ise 9,5 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise PVA-sodyum alginat boncuk hazırlanmış ve bu boncuk bakteri hücrelerinin çoğaltılacağı besi ortamına ilave edilerek *Idiomarina sediminum*'un immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra immobilize edilmiş bakteriden arginaz enzimi saflaştırılmış ve PVA-sodyum alginat boncuklar üzerine immobilize arginaz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Unissa vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Idiomarina sediminum* H1695'ten saflaştırılmış l-arginaz enzimi poli etilen glikol üzerine immobilize edilmiş ve serbest enzim için optimum pH 7,0 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış göstererek 7,5 olmuştur. Bir başka çalışmada ise insan arginaz I enzimi gümüş nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur (Stasyuk vd., 2011). Diğer bir çalışma da *E.coli* hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2016). Rekombinant insan arginaz I enzimi bir başka çalışmada kitosan parçacıklara immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim için optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve immobilize enzim için optimum pH değeri 7,0-11,0 aralığında bulunmuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada ise arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylon membranlara sığır karaciğer arginazı enkapsüle edilmiştir ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH değerinin 10,0 olduğu görülmüştür.

3.8.7. pH kararlılığı

PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin pH kararlılığını belirleyebilmek amacıyla immobilize nanofiberler pH 3,0-11,0 aralığında hazırlanan tamponlar içerisinde 1 saat inkübe edildi. İnkübe edilen nanofiberlerin aktivite tayinleri sonucunda pH kararlılıklarının grafiği Şekil 3.81.'de verildi.



Şekil 3.81. PVA/ β -CD ve PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri

Her iki nanofiber membran taşıyıcıya da immobilizasyon işleminin ardından hem asidik hem de bazik bölgelerde enzimin pH kararlılığının serbest enzime göre önemli derecede artış gösterdiği görüldü. Bunun nedeni nanofiber membranların yapısında bulunan hidroksil gruplarının enzimin etrafını çevreleyerek korumasıdır. Hem PVA'nın hem de β -CD'nin yapısında bulunan -OH grupları asidik ortamlarda enzime sağladığı mikroçevrenin tampon etkisi göstermesi nedeniyle pH değişimlerine karşı koruma görevi gördüğü söylenebilir.

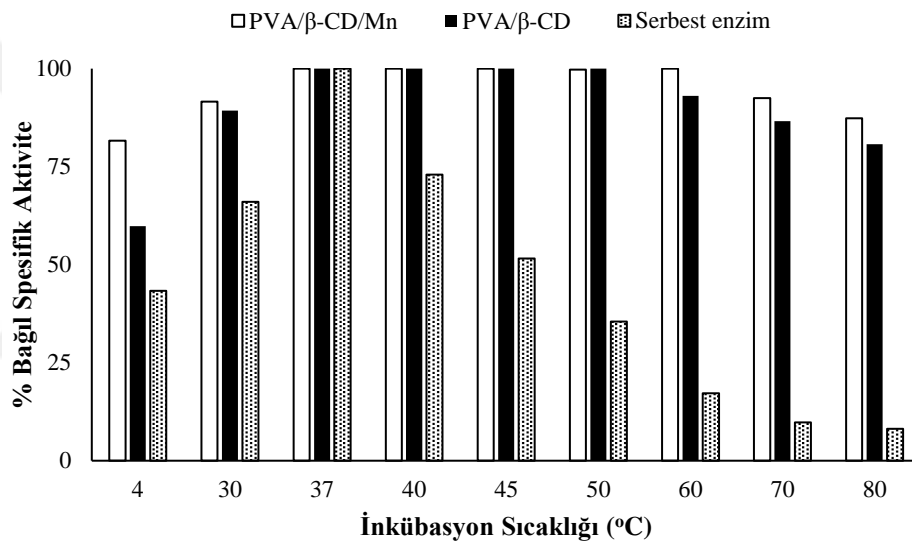
Arginaz immobilize PVA/ β -CD nanofiberler aynı pH koşullarında PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlara göre daha yüksek aktivite gösterdiği görüldü. Bunun nedeni ise yapıdaki Mn^{+2} iyonlarının PVA ve β -CD yapısındaki pH değişimlerine karşı tampon görevi görebilecek gruplar olan -OH ile şelat oluşturması olabilir.

Yapılan bir çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan arginaz enzimi poliakrilamid destek üzerine immobilize edilmiş, yapılan pH kararlılığı deneyleri sonucunda serbest enzim için optimum değer 7,5 iken bu değer immobilize enzim için çok az bir artış

göstererek 8,0 olarak bulunmuştur (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidrosietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve pH kararlılığı deneylerinde serbest enzim için optimum değer 8,0 iken immobilize enzim için bu değer 5,0-9,0 aralığında olduğu bulunmuştur.

3.8.8. Termal kararlılık

PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlar üzerine immobilize edilen arginaz enziminin ve serbest arginaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için farklı (4, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80°C) sıcaklıklardaki su banyolarında 1 saat inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuçlar Şekil 3.82.'de verildi.



Şekil 3.82. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında termal kararlılık grafiği

Grafik incelendiğinde arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranların çalışılan tüm sıcaklıklarda serbest arginaz enzimine göre daha kararlı olduğu görülmektedir. Arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranların 37, 40, 45, 50 ve 60°C'de aktivitelerinin %100'ünü koruduğu, PVA/β-CD nanofiber membranların ise 37, 40, 45 ve 50°C'de aktivitelerinin %100'ünü koruduğu görülmektedir. Arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranların en düşük aktivite gösterdiği sıcaklık 4°C olup bu sıcaklıkta bile aktivitesinin %82'sini korumaktadır. Sıcaklık yükselmesine rağmen bu nanofiber membranlar aktivitelerini korumayı sürdürdüğü gözlemlendi. PVA/β-CD nanofiber membranların ise en düşük

aktiviteyi 4°C’de göstermiş olup aktivitesinin %60’ını korudu. Diğer tüm sıcaklıklarda PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranlara göre nispeten daha az aktivite gösterdiği görüldü. Bu durum immobilizasyon işlemi sonrasında nanofiber membranlar ile arginaz arasındaki etkileşimlerin önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını ve nanofiber membranların yapısında bulunan PVA ve β-CD polimerlerinin ve Mn⁺² iyonlarının enzimin konformasyonel kararlılığına önemli katkı sağladığını göstermektedir. Özellikle nanofiber membranlarda bulunan PVA ve β-CD üzerindeki hidroksil gruplarının suda özel bir şekilde yapılanabilme özellikleri sayesinde her iki membrana ilave kararlılık kazandırmıştır. Ayrıca PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların çalışılan her sıcaklıkta daha kararlı olmasının en önemli nedeni yapısında bulunan Mn⁺² iyonlarının enzim molekülleri ile şelat yapabilmesi nedeniyle daha kararlı bir yapı oluşturması ile enzimin denatürasyonunu engellemiş olabilir. Aynı zamanda immobilizasyon işlemi sonrasında kararlılıktaki artış, nanofiber membran taşıyıcı ile enzim arasında oluşan kararlı bağların kırılması için gereken enerjinin çok yüksek olmasından da kaynaklanabilir. Bunlara ek olarak, membranların özellikle yüksek sıcaklıklarda ortamdaki ısının şiddetini üzerine alarak olması gereken sıcaklığın şiddetini enzim üzerine yansıtmasına engel olarak enzimin denature olmasını engellenmesiyle açıklanabilir.

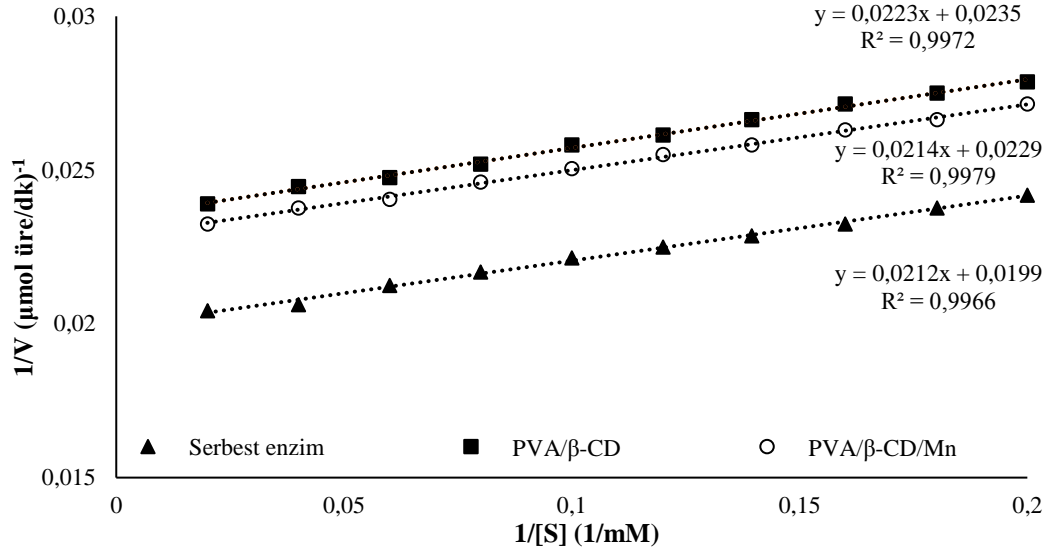
Turras (2008) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus Subtilis*’den elde edilen arginaz enzimi Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA, Sepabeads EC-EP ve Eupergit C 250 L olmak üzere 4 farklı epoksi desteğe immobilize edilmiştir. 60°C’de yapılan termal kararlılık deneyleri sonucunda 3 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin %50’sinden fazlasını kaybederken, Sepabeads EC-HFA, bloke edilmiş Sepabeads EC-HFA ve Eupergit C 250 L 2 saat sonunda aktivitelerinin %50’sini kaybetmiştir. Immobilize Sepabeads EC-EP ise 6 saat sonunda aktivitesinin %60’ını korumuştur. Başka bir çalışmada poliakrilamid destek üzerine arginaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 40, 60 ve 70°C’de immobilize enzim için termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. 40°C’de immobilize enzim 120 dakika sonunda aktivitesini korumayı başarırken, 60°C’de 60 dakika sonunda aktivitesinin %80’ini kaybederken, 70°C ise 30 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybetmiştir (Dala ve Szajani, 1994). Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidroksietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve hem serbest enzim hem de immobilize enzim 30 dakika boyunca 20-100°C aralığında tutularak termal kararlılık

profilleri incelenmiştir. Serbest enzim 20-45°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken, 45°C üzerinde sıcaklıklarda aktivite kaybetmeye başlamıştır ve 65°C'de aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 25-75°C aralığında aktivitesinin tamamını korurken 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla aktivitesini kaybetmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise rekombinant insan arginaz I enzimi ve kitosan parçacıklara immobilize edilmiş enzim için 40, 50 ve 60°C'de termal kararlılık deneyleri yapılmıştır. Serbest enzim 40°C'de 225 dakika sonunda aktivitesinin %20'sini kaybederken immobilize enzim ise sadece %10'unu kaybetmiştir. 50°C'de serbest enzim 25 dakika sonra aktivitesinin %50'sini kaybederken immobilize enzim ise 225 dakika sonunda aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. 60°C'de ise serbest enzim %30 aktivite gösterirken immobilize enzim 60 dakika sonunda aktivitesinin %40'ını korumayı başarmıştır (Zhang vd., 2015). Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise arginaz I ve selüloz mikrokürelere immobilize arginaz I için yapılan termal kararlılık çalışmalarında 60°C'de serbest enzim 2 saat sonunda %13,5 aktivite gösterirken immobilize enzim 30 dakika sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir ve yüksek sıcaklıklarda hem serbest enzim hem de immobilize enzimin kararlı olmadığı gözlenmiştir. 40°C'de ise hem serbest enzim hem de immobilize enzim 4 saat sonunda aktivitelerinin %90'ını korumayı başarmıştır. Yine aynı çalışmada 37°C'de 15 saat sonra serbest enzim aktivitesinin %50'sini korurken immobilize enzim %10 aktivite göstermiştir. 20°C'de 25 saat sonunda serbest enzim yaklaşık %40 aktivite gösterirken immobilize enzim %30 aktivite göstermiştir. 4°C'de ise 25 saat sonunda hem serbest hem de immobilize enzim aktivitesinin tamamını korumuştur. Grady ve Joyce (1980) tarafından yapılan çalışmada hem serbest arginaz hem de arayüzey polimerizasyonu ile elde edilen naylona enkapsüle edilen arginaz 4-80°C aralığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından termal kararlılık profilleri çıkarılmıştır. Serbest enzim maksimum aktivitesini 37°C'de immobilize enzim ise 45°C'de yapılan inkübasyon işlemi sonrasında göstermişlerdir. Serbest enzim sadece 4°C'de ve 20°C'de, immobilize enzime göre daha yüksek aktivite gösterirken çalışılan diğer tüm sıcaklıklarda ise immobilize enzim daha yüksek aktivite göstermiştir.

3.8.9. Kinetik parametreler

İmmobilizasyon işlemi sonrasında enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişimler, sterik etkiler, enzimin mikroçevresinde meydana gelen değişiklikler ve

difüzyon etkileri gibi nedenlerden dolayı enzimlerin kinetik davranışlarında değişiklikler gözlenebilir. Arginaz immobilizasyonu sonrasında meydana gelen bu değişimleri gözlemek için hazırlanan immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların kinetik davranışları, 5-50 mM aralığında L-arginin kullanılarak Lineweaver-Burk ile belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.83.'de, K_m ve V_{max} değerleri ise Çizelge 3.12.'de verildi.



Şekil 3.83. Arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlere ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.12. Serbest ve immobilize arginaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri

Taşıyıcı	K _m (mM)	V _{max} (μmol üre/dk) ⁻¹
Serbest arginaz	1,06	50,25
PVA/β-CD	0,95	42,55
PVA/β-CD/Mn ⁺²	0,93	43,67

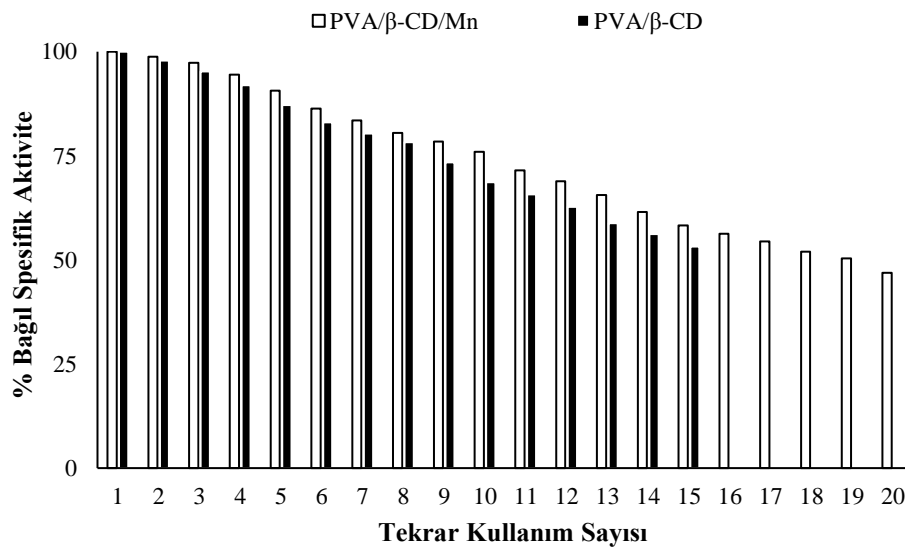
Serbest enzimle karşılaştırıldığında her iki immobilize nanofiber membranında K_m değerlerinde küçük de olsa bir azalma meydana geldiği görüldü. K_m değerindeki bu azalma immobilizasyon sonrası taşıyıcı yapısında bulunan ilgili fonksiyonel grupların enzimin konformasyonunu olumlu etkilediği ve enzimin substrata olan ilgisinin arttığı şeklinde yorumlanabilir. Bir başka ifade ile taşıyıcının enzimin yapısal kararlılığına olumlu yönde etki ettiği söylenebilir.

Arginaz immobilize PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların K_m değerlerinin hemen hemen aynı oranda azaldığı, V_{max} değerinin ise PVA/β-CD nanofiber membranlarında bir miktar daha fazla azaldığı görüldü. Her iki immobilize

nanofiber membranın enzimin substrata olan ilgisini aynı oranda arttırdığı fakat PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların reaksiyonu daha hızlı katalizlediği sonucuna varılabilir. Hızdaki bu fark arginaz aktivitesi için gerekli olan PVA/CH/Mn⁺² yapısında bulunan Mn⁺² iyonlarının immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesine olumlu yönde etki ettiği şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmalarında immobilizasyon sonrası K_m değerinde azalmanın gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur. Veronese vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada arginaz enzimi poli hidrosietilmetil akrilat üzerine immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre 4,4x10⁻³ M'dan 3,8x10⁻³ M'a azaldığı görülmüştür. El-Sayed vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilen arginaz enzimi kitosana immobilize edilmiş ve K_m değerinin serbest enzime göre 4,8 mM'dan 4,47 mM'a azaldığı, V_{max} değerinin ise 21,7 U/mg/dk'dan 18,86 U/mg/dk'ya azaldığı gözlenmiştir.

3.8.10. Tekrar kullanılabilirlik



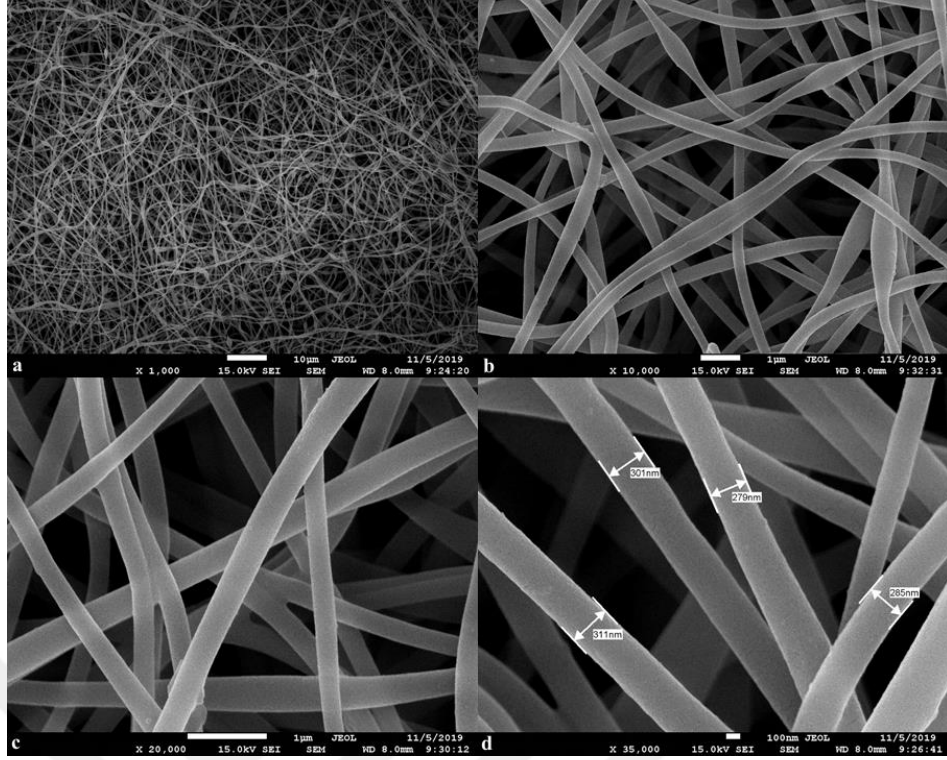
Şekil 3.84. PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlere arginaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım grafiği

Şekil 3.84. incelendiğinde arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiber membranlar 15 kullanım sonucunda aktivitesi %50'nin altına düşerken arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber membranların aktivitesi ise 20 kullanım sonrası %50'nin altına düştüğü görüldü. Bu sonuç Mn⁺² iyonlarının arginaz moleküllerinin membranlara

immobilizasyonunda bağlanma noktalarından biri olarak kullanıldığı ve immobilizasyon işlemi sonrasında enzime ilave kararlılık kazandırdığını göstermektedir.

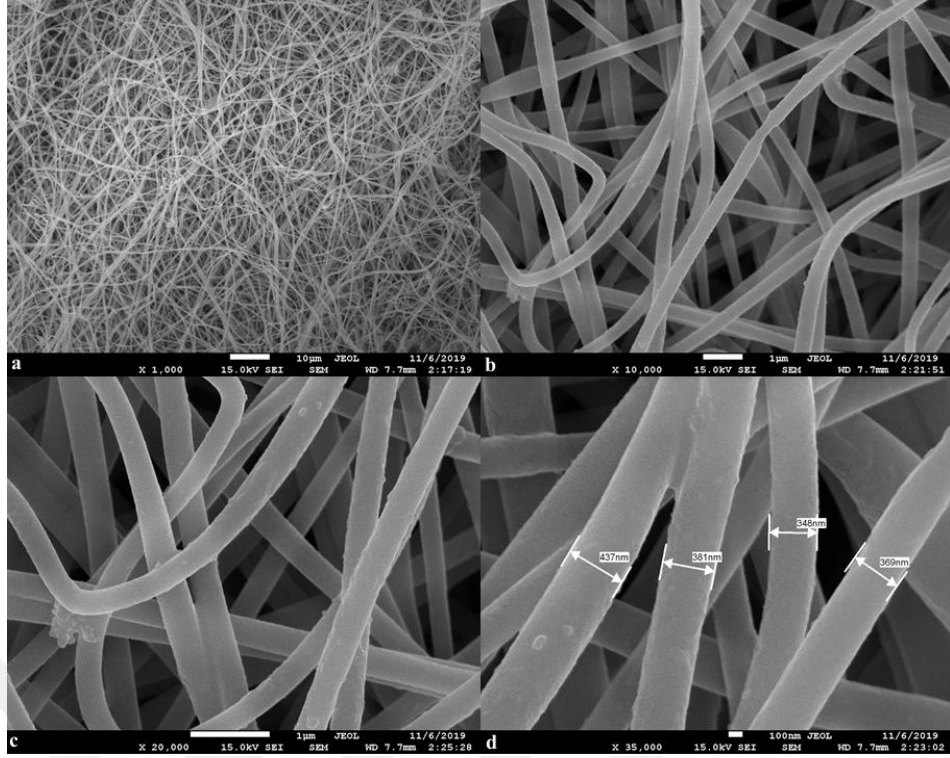
Literatürde yapılan arginaz immobilizasyonu çalışmaları incelendiğinde literatürde yer alan sadece iki çalışmada tekrar kullanılabilirlik üzerine çalışmalar yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalardan Li vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada arginaz I selüloz mikrokürelere immobilize edilmiş ve 5 kullanım boyunca aktivitesinin tamamını, 7 kullanım sonrası ise %83,4'ünü koruduğu görülmüştür. Yapılan bir diğer çalışmada ise *E.coli* bakteri hücreleri kullanılarak tasarlanmış buz çekirdeklenme proteinleri üzerine insan arginaz I enzimi immobilize edilmiş ve 40°C ve 60°C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. 40°C'de 5 kullanım sonrasında aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği, 60°C'de ise 3 kullanım sonrası aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiği görülmüştür (Zhang vd., 2016).

Arginaz immobilize PVA/ β -CD nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.85.'de verildi. Şekil 3.25.'de verilen çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/ β -CD nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarında çok az da olsa değişiklikler olduğu, yapının korunduğu ortalama çaplarının 279-311 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği gibi immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının değişmesinin nedeni enzim moleküllerini nanofiber membrana immobilize etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıdır (Song vd., 2012; Pesaran vd., 2015). Enzimin çapraz bağlayıcı kullanılarak nanofibere immobilize edilmesi sonucu nanofiber yapısında değişiklik meydana gelebilir. Ayrıca Şekil 3.85. incelendiğinde immobilizasyon işlemi sonrasında arginaz enziminin fiber yüzeylerine immobilize olduğu görüldü. İmmobilizasyon işlemi sonrası fiber yüzeylerine tutunan enzim molekülleri nedeniyle fiber yüzeyleri pürüzlü bir şekil almıştır.



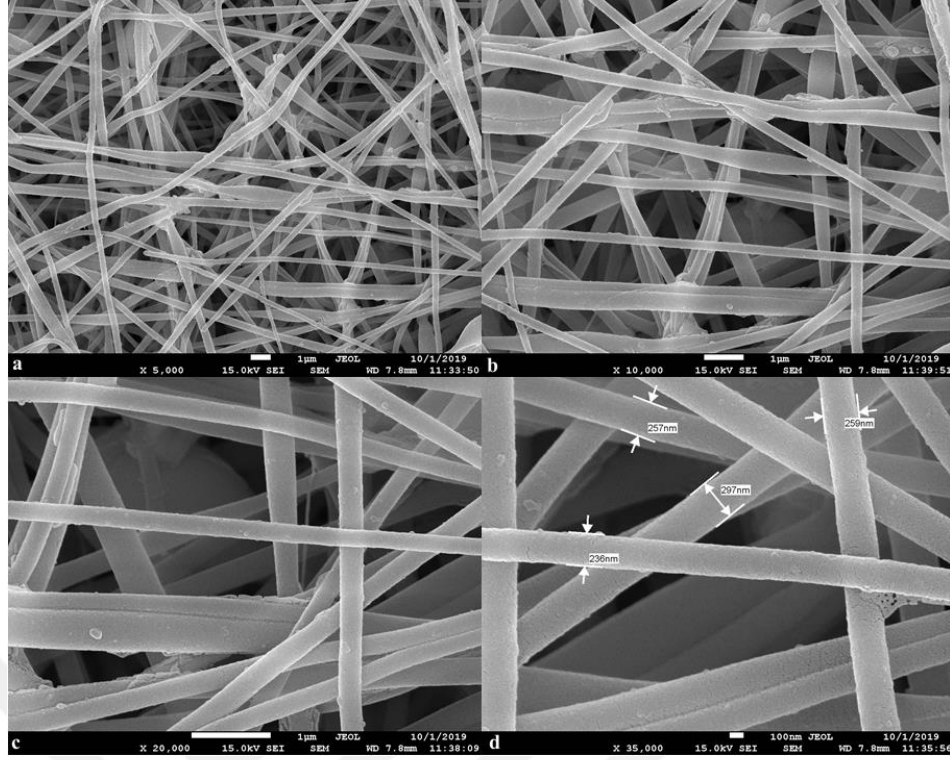
Şekil 3.85. Arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

15 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.86.'da verildi. Şekil 3.86. incelendiğinde 15 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.25. hem de Şekil 3.85.'de verilen yapılarla göre yapıda kayda değer bir değişiklik gözlenmedi. Ama yinede tekrar kullanım işlemi sonrasında PVA/β-CD nanofiber yapıları morfolojilerini kısmende olsa kademeli olarak kaybettiği ve bunun sonucu toplam yüzey alanının azaldığı söylenebilir. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. 15 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiberlerin yapılarının değişmediği ve ortalama çaplarının 348-437 nm civarında olduğu görüldü. Tekrar kullanım sonrasında yapının korunmasında termal kararlılık özelliği ile dikkat çeken PVA polimerinin önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.



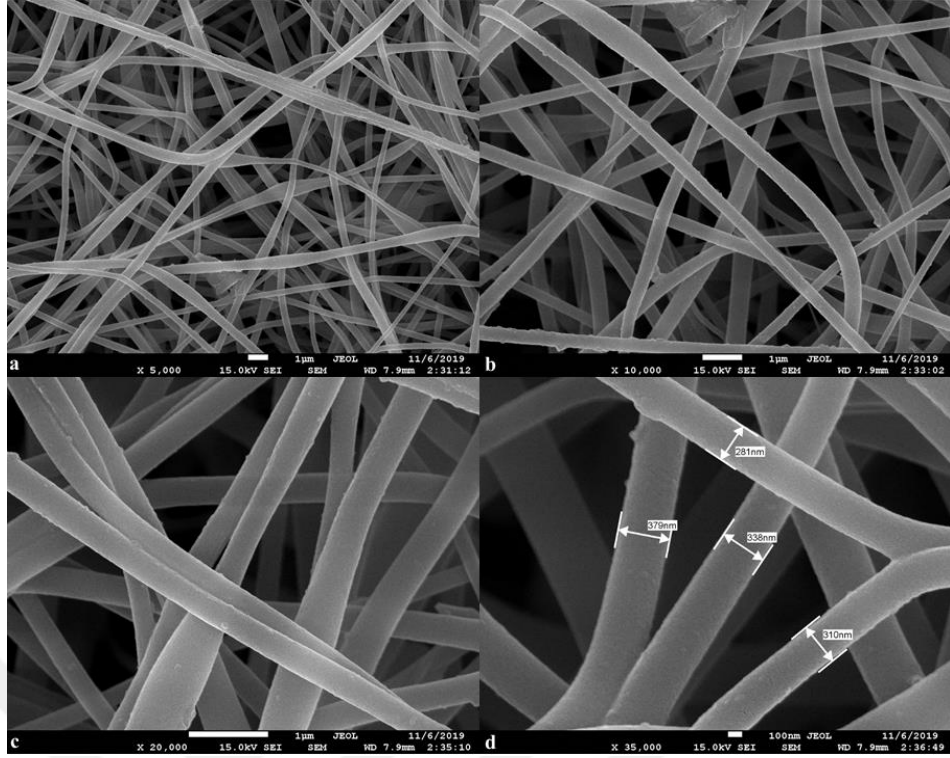
Şekil 3.86. 15 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/β-CD nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x1,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

Arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 3.87.'de verildi. Şekil 3.27.'de verilen çapraz bağlama işlemi sonrası PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında nanofiberlerin yapılarının hemen hemen tamamen korunduğu ve ortalama çaplarının 236-297 nm civarında olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği gibi immobilizasyon işlemi sonrası nanofiberlerin yapılarının değişmesinin nedeni enzim moleküllerini nanofiber membrana immobilize etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıdır (Song vd., 2012; Pesaran vd., 2015). Enzimin çapraz bağlayıcı kullanılarak nanofibere immobilize edilmesi sonucu nanofiber yapısında değişiklik meydana gelebilir. Ayrıca Şekil 3.87. incelendiğinde immobilizasyon işlemi sonrasında arginaz enziminin fiber yüzeylerine immobilize olduğu görüldü. İmmobilizasyon işlemi sonrası fiber yüzeylerine tutunan enzim molekülleri nedeniyle fiber yüzeyleri pürüzlü bir şekil almıştır.



Şekil 3.87. Arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x5,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

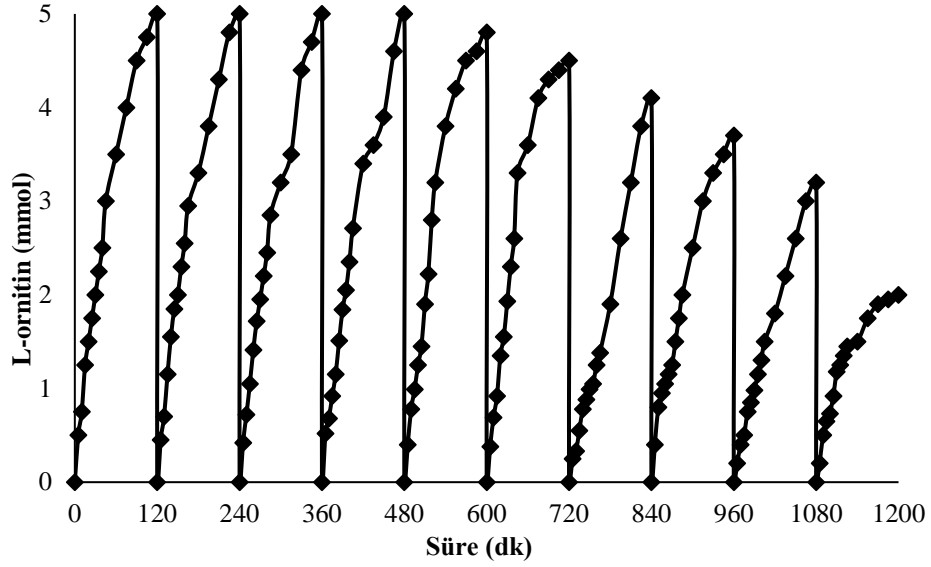
20 tekrar kullanım sonrasında arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 3.88.'de verildi. Şekil 3.88. incelendiğinde 20 tekrar kullanım sonucu hem Şekil 3.27. hem de Şekil 3.87.'de verilen yapılar göre önemli bir değişiklik gözlenmedi. Ama yinede tekrar kullanım işlemi sonrasında PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiber yapıları morfolojilerini kısmende olsa kademeli olarak kaybetti ve bu da toplam yüzey alanının azalmasına neden oldu. Tekrar kullanım sonrası nanofiberlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler immobilize durumdaki enzimin denatürasyonuna veya desorpsiyonuna neden olduğu için immobilize arginaz enziminin etkinliğinde azalma görülmüş olabilir. 20 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn⁺² nanofiberlerin yapılarının değişmediği ve ortalama çaplarının 348-437 nm civarında olduğu görüldü. Tekrar kullanım sonrasında yapının korunmasında termal kararlılık özelliği ile dikkat çeken PVA polimerinin ve hem arginaz aktivitesi için gerekli hem de yapıya kararlılık sağladığı için manganın önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.88. 20 tekrar kullanım sonrası arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) x5,000 (b) x10,000 (c) x20,000 (d) x35,000 büyütmelemlerle

3.9. Geri Döngülü Kolon Sistemi ile L-Ornitin Üretimi

Enzimatik reaksiyonların kontrollü ve reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan optimum koşulların sabit kalması gibi avantajlar sunduğu için arginaz immobilize nanofiber membranlardan L-ornitin üretimi çalışmalarında geri döngülü kolon sistemi kullanıldı. Elektroegirme yöntemi ile üretilen ve daha sonrasında arginaz immobilizasyonu yapılan sekiz nanofiber membran platformlarından aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlar kullanıldı. Kolon, arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlar ile dolduruldu ve kolonun dış çeperinden 45°C'de sabit sıcaklıkta su sirkülasyonu sağlandı. 100 mL 50 mM pH'ı 8,0 olan L-arginin çözeltisi rezervuara koyuldu ve bu substrat çözeltisi sürekli manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Akış hızı ise 1 mL/dk olarak ayarlandı ve pompa çalıştırıldı. Başlangıçta ve reaksiyon boyunca belirli zaman aralıklarında rezervuar içinden örnekler alındı. Her döngü sonunda substrat çözeltisi yenilendi ve ölçümler tekrar alındı.



Şekil 3.89. Geri döngülü kolon sistemi ile üretilen L-ornitin miktarı grafiği

Şekil 3.89'da arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar ile doldurulmuş döngülü kolon sistemi kullanılarak her bir döngüde zamana bağlı olarak oluşan L-ornitin miktarları verildi. İlk 4 döngüde 120 dakika sonunda 5 mmol, 5. döngüde 4,8 mmol, 6. döngüde 4,5 mmol, 7. döngüde 4,1 mmol, 8. döngüde 3,7 mmol, 9. döngüde 3,2 mmol ve 10. döngüde ise 2 mmol L-ornitin üretimi sağlandı. İlk 4 döngüde L-ornitin oluşum verimi %100 iken 10. döngü sonunda %40'a düşmektedir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu doktora tez çalışmasında elektroğirme yöntemiyle sentezlenen CA/PVP, CA/PVP/Mn²⁺, PVA/CH, PVA/CH/Mn²⁺, PCL/CH, PCL/CH/Mn²⁺, PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membran platformlara arginaz immobilizasyonu yapılarak, hazırlanan arginaz immobilize platformların optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

İlk aşamada elektroğirme yöntemi ile CA/PVP, CA/PVP/Mn²⁺, PVA/CH, PVA/CH/Mn²⁺, PCL/CH, PCL/CH/Mn²⁺, PVA/β-CD ve PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber yapıların sentezi, sentez parametrelerinin optimizasyonu ve sentezlenen nanofiberlerin karakterizasyon çalışmaları yapıldı. İkinci kısımda optimum koşullarda sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan nanofiber membranlara arginaz immobilizasyonu gerçekleştirildi ve immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyonu yapıldı. Üçüncü aşamada ise aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan nanofiber membran platformu kullanılarak L-ornitin oluşturma performansı incelendi.

Elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiberlerin sentez optimizasyonu için, % polimer derişimleri, % Mn²⁺ derişimi, uygulanan voltaj, iğne-toplayıcı arası uzaklık ve polimer çözeltisinin enjeksiyon hızı parametreleri belirlendi. Optimizasyonu yapılan nanofiberlerin karakterizasyonu için ise SEM, ATR-FTIR, TGA ve XRD analizleri yapıldı.

Daha sonra optimum koşullarda sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan nanofiber membranlara arginaz immobilizasyonunun optimizasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında; enzim miktarı, nanofiber miktarı, adsorpsiyon süresi ve glutaraldehit miktarı temel parametreler olarak araştırıldı. Optimum koşullarda hazırlanan immobilize arginaz sistemlerin karakterizasyonun da ise; optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri araştırıldı.

Son olarak ise aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan arginaz immobilize PVA/β-CD/Mn²⁺ nanofiber membranlar ile hazırlanan geri döngülü kolon sistemiyle

protein biyosentezinde rol alan, poliaminlerin biyosentezi için öncül olan L-ornitin oluşturma performansı incelendi.

Yapılan immobilizasyon optimizasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları göz önünde alındığı elektroğirme yöntemi ile sentezlenen ve taşıyıcı olarak kullanılan taşıyıcılar aktivite ve kararlılık açısından değerlendirildiğinde en iyi performans arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlardan alınmıştır. Serbest arginaz enzimi için optimum sıcaklık $35^{\circ}C$ iken arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar için bu değer yükseldi ve $45-55^{\circ}C$ aralığında bulundu. Serbest arginaz enzimi için optimum pH değeri 10 iken bu değer arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar için azalarak 8 olarak bulundu. pH kararlılık ve termal kararlılık açısından arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranlar serbest enzime göre çok daha geniş aralıklarda daha yüksek aktivite gösterdi. Ayrıca yapılan tekrar kullanılabilirlik deneylerinde 20 kullanım sonucunda arginaz immobilize PVA/ β -CD/ Mn^{+2} nanofiber membranların aktivitelerinin %50'nin altına düştüğü bulundu. Yapılan uygulama çalışmalarında geri döngülü kolon sistemi ile L-ornitin üretim performansı incelendi. Yapılan uygulama çalışmalarında ilk 4 döngü sonunda L-ornitin üretim verimi %100 iken, 10 döngü sonunda verimin %50'nin altına düştüğü görüldü.

Nanofiberler sahip oldukları pek çok eşsiz özellikleri nedeniyle birçok farklı alanda kullanılırlar. Bu eşsiz özelliklerinden dolayı son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Günümüzde pek çok nanofiber üretim tekniği kullanılarak nanofiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerden en önemlisi elektroğirme yöntemidir. Bu yöntem ile elektrostatik kuvvetler yardımıyla nanometre ile mikrometre arasında değişen çaplarda polimer fiberlerin üretimi yapılabilir. Elektroğirme yöntemi etkin, kolay uygulanabilen, ekonomik, hızlı ve çok yönlü olması dolayısıyla diğer üretim yöntemlerinin önüne geçmektedir. Bu yöntem homojen çap, yüksek yüzey/hacim oranına sahip, ayarlanabilir gözeneklilik ve tercih edilen özelliklere ulaşmak için nanofiber boyutunu ve morfolojisini kontrol etme kabiliyeti gibi sayısız avantajlar sunar. Bu nedenle bu yöntem ile üretilmiş nanofiberler ilaç salınımı, doku mühendisliği, enerji depolama ve dönüşüm, savunma sanayi ve enzim immobilizasyonu olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır.

Enzim immobilizasyonu, çözültide serbest halde hareket edebilen ve suda çözünen enzim moleküllerinin, suda çözünmeyen katı bir taşıyıcıya bağlanarak taşıyıcı

üzerinde hareketlerinin kısıtlanması olarak tanımlanabilir. Enzim immobilizasyonunun amacı, uzun ömürlü ve ılımlı operasyonel koşullar altında çalışabilen sağlam bir biyokatalizör geliştirmektir. İmmobilize enzimler tekrar tekrar kullanılmaları, enzimatik reaksiyonu herhangi bir anda başlatmak, devam ettirmek, istenildiği anda durdurmak ve immobilizasyon sonrası enzimin kararlılığını artırarak denatüre olma olasılığını azaltma gibi pek çok avantaj sunmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda endüstride immobilize enzim kullanımı giderek artmaktadır.

L-ornitin (L-Orn) üre döngüsünde bir ara metabolit olarak işlev gören protein yapısında olmayan bir amino asittir. Karaciğer hastalıklarının tedavisinde, kalp fonksiyonlarının güçlendirilmesinde, kilo kaybetmede ve bağışıklığı artırıcı olarak kullanıldığı için metabolizmada önemli bir rol oynamaktadır. Bu çok yönlü avantajlara dayanarak, L-ornitin özellikle sağlık ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, L-ornitin üretimi son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. L-Ornitinin endüstriyel üretimi için kimyasal sentez, fermantasyon ve enzimatik sentez (arginaz yöntemi) olmak üzere 3 temel yöntem vardır. Kimyasal sentez ve fermantasyon yöntemleri birçok dezavantaja sahip oldukları için tercih edilmemektedirler. Arginaz kullanılan yöntem, kimyasal sentez ve fermantatif üretime kıyasla, seçilen reaksiyonlar için spesifikliği, basit cihazlar ve prosedürleri kullanması ve suda çözünürlüğü düşük olan substratları çözebilmek için kullanılan yardımcı çözücülere toleransı sayesinde avantajlıdır.

Bu tez kapsamında elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiberlere arginaz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirildi. Serbest enzime göre daha ılımlı koşullarda ve daha kararlı arginaz immobilize nanofiber membranlar geliştirildi. Bu tez çalışması ile immobilize arginaz enzimleriyle oluşturulmuş yeni nanofiber membranlarla, sağlık ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan protein yapısında olmayan bir amino asit olan L-ornitini yüksek kaliteli üretmek için verimli, kolay, alternatif, ekonomik ve tekrarlanabilir yeni bir yöntem geliştirildiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abbas, K.A., Saleh, A.M., Mohamed, A. ve MohdAzhan, N. (2009) The recent advances in the nanotechnology and its applications in food processing: a review. *J Food Agric Environ*, 7: 14-17.
- Abdin, M.Z. (2007) Enhancing bioactive molecules in medicinal plants, In: Tan Y, Bay B, Liu C, editors, Natural products-essential resources for human survival, Singapore: World Scientific Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Adachi, E. (2000) Three-dimensional self-assembly of gold nanocolloids in spheroids due to dialysis in the presence of sodium mercaptoacetate. *Langmuir*, 16: 6460-6469.
- Agarwal, P.K. (2006) Enzymes: an integrated view of structure, dynamics and function. *Microb Cell Fact*, 5: 2
- Alfadul, S.M. ve Elneshwy, A.A. (2010) Use of nanotechnology in food processing, packaging and safety-review. *Afri J Food Agric Nutr Dev*, 10: 2719-2739.
- Altan, N. (2000) Biyokimya Olgu Yaklaşımı, Palme Yayıncılık, 69-74s, Ankara.
- Altıntaş Yıldırım, Ö. (2018) Synthesis Of Ag-Doped ZnO Nano Fibers Using Electrospinning Method and Their Photocatalytic Activities, *S.Ü. Müh Bilim ve Tekn Derg*, 6(4):633-642.
- Amarakoon, I.I., Hamilton, C.L., Mitchell, S.A., Tennant, P.F. ve Roye, M.E. (2017) Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies 2017, Pages 549-563 Chapter 28-Biotechnology, Academic Press
- Ansari, S. A. ve Husain, Q. (2012) Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Bioprod Process*, 90: 351-359.
- Araújo, R., Casal, M. ve Cavaco-Paulo, A. (2008) Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatal Biotransfor*, 26 (5): 332-349.

- Archana, D., Singh, B.K., Dutta, J. ve Dutta, P.K. (2015) Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Biol Macromol*, 73: 49-57.
- Arthanareeswaran, G., Thanikaivelan, P., Srinivasn, K., Mohan, D. ve Rajendran, M. (2004) Synthesis, characterization and thermal studies on cellulose acetate membranes with additive, *Eur Polym J*, 40:2153–2159.
- Ash, D.E., Cox, J.D. ve Christianson, D.W. (1999) Arginase: A Binuclear Manganese Metalloenzyme In Manganese and Its Role in Biological Processes; Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Metal Ions in Biological Systems, Vol. 37; M. Dekker: New York, ss 407-428.
- Ası, T. (1999) Çizelgelerle biyokimya, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, 206s.
- Azais, P., Duclaux, L., Florian, P., Massiot, D., Lillo-Rodenas, M.A., Linares-Solano, A., Peres, J.P., Jehoulet, C. ve Beguin, F. (2007) Causes of supercapacitors ageing in organic electrolyte. *J Power Sources*, 171: 1046-1053.
- Barbul, A., Rettura, G., Levenson, S.M. ve Seifter, E. (1977) Arginine: a thymotropic and wound-healing promoting agent, *Surg Forum*, 28:101–103.
- Barbul, A., Rettura, G., Levenson, S.M. ve Seifter, E. (1983) Wound healing and thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action, *Am J Clin Nutr*, 37:786–794.
- Baker, S. ve Satish, S.(2012) Endophytes: toward a vision in synthesis of nanoparticle for future therapeutic agents. *Int J Bio-Inorg Hybrid Nanomater* 1(2): 67-77.
- Barhoum, A., Bechelany, M., Salam, A. ve Makhlof, H. (2019) *Handbook of Nanofibers*, Springer Nature Switzerland, 1170s.
- Barış, N., Turgan, N. ve Ersöz, B. (2004) Argininin tıpsal biyokimyadaki önemi, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(2): 83-90.
- Bayındırlı, A. (1995) Immobilization of enzymes and potential applications in food industry. *GIDA J. Food* 20(2): 113-116.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. ve Stryer, L. (2002) Biochemistry 5th edn (New York: W H Freeman).

- Bhardwaj, N. ve Kundu, S.C. (2010) Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*, 28: 325-347.
- Bhatia, S. (2018) Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Enzymes, proteins and bioinformatics, IOP Publishing, Bristol, 350s.
- Bhushan, B. (2010) Springer handbook of nanotechnology. Technology & Engineering, Springer Science & Business Media.
- Bickerstaff, G.F. (2009) Immobilisation of enzymes and cells. In: Walker, J.M., Rapley, R. (Eds.), *Molecular Biology and Biotechnology*, fifth ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 454–491.
- Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Guo, S., Hu, H., Wang, W. ve Zhang, X. (2017) State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: a review from immobilization to implementation view point. *Int J Biol Macromol*, 108: 893-901.
- Billiar, T.R. (1995) Nitric oxide novel biology with clinical relevance, *Ann Surg*, 221:339-349.
- Blanco, A., Blanco G. (2017) *Medical Biochemistry*, Academic Press, London, 805 s.
- Boehr, D.D., Nussinov, R. ve Wright, P.E. (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol*, 5: 789-796.
- Bordage, S., Pham, T.N., Zedet, A., Guglielmetti, A.S., Nappey, M., Demougeot, C. ve Girard-Thernier, C. (2017) Investigation of mammal arginase inhibitory properties of natural ubiquitous polyphenols by using an optimized colorimetric microplate assay. *Planta Medica*, 83:647–653.
- Borjigin, M., Eskridge, C., Niamat, R., Strouse, B., Bialk, P. ve Kmiec, E.B. (2010) Electrospun fiber membranes enable proliferation of genetically modified cells, *Int J Nanomed*, 8:855–864.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochem*, 72: 248-254.

- Brena, B.M. ve Batista-Viera, F. (2006) Immobilization of enzymes: a literature review. In: Guisán, J.M. (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, Totowa, NJ, 420 s.
- Buchholz, K. ve Collins, J. (2013) The roots: a short history of industrial microbiology and biotechnology, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 3747-3762.
- Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y. ve Martin, D.C. (1999) Processing microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40: 7397.
- Bud, R. (1993) *The uses of life: A history of biotechnology*, New York: Cambridge University Press.
- Bull, A., Holt, B. ve Lilly, M. (1982) *Biotechnology international trends and perspectives*, Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Castillo, L., Chapman, T.E., Sanchez, M., Yu, Y.M., Burke, J.F., Ajami, A.M., Vogt, J. ve Young, V.R. (1993) Plasma arginine and citrulline kinetics in adults given adequate and arginine-free diets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7749-7753.
- Cernia, E., Deflini, M., Cocco, E., Palocci, C. ve Soro, S. (2002) Investigation of lipase-catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: Use of NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction. *Bioorg Chem*, 30: 276-284.
- Chae, H.J., In, M.J. ve Kim, E.Y. (1998) Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. *Appl Biochem Biotechnol*, 73 (2): 195-204.
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S. ve Drioli, E. (2016) Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 36 (1): 43-58.
- Champe, P.C., Harvey, R. ve Ferrier D. (2011). *Biochemistry*, 5rd Ed., Wolters Kluwer Inc., Philadelphia.
- Chapman, J., Ismail, A.E. ve Dinu, C.Z. (2018) Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks, catalysts, *Catalysts*, 8: 238.

- Chatterjee, P.K. ve Conrad, C.M. (1968) Thermogravimetric analysis of cellulose, *J Polym Sci*, 6:3217-3233.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R. ve Watkins, R. (2008) Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contamin*, 25: 241-258.
- Chaudhuri, K. (2013) Recombinant DNA technology, The Energy and Resources Institute.
- Chibata, I. ve Tosa, T. (1981) Use of immobilized cells. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 10: 197-216.
- Choudhury, H., Gorain, B., Karmakar, S., Biswas, E., Dey, G., Barik, R., Mandal, M. ve Pal, T.K. (2014) Improvement of cellular uptake, in vitro antitumor activity and sustained release profile with increased bioavailability from a nanoemulsion platform. *Int J Pharm*, 460: 131-43.
- Christianson, D.W. ve Alexander, R.S. (1989) Carboxylate–histidine–zinc interactions in protein structure and function. *J Am Chem Soc*, 111: 6412-6419.
- Corraliza, I.M., Campo, M.L., Soler, G. ve Modolell, M. (1994) Determination of arginase activity in macrophages: A micromethod *J Immunol Methods* 174:231–235.
- Costa, S.A., Azevedo, H.S. ve Reis, R.L. (2005) Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press/Taylor & Francis Group/LLC, Boca Raton, FL, 301-324.
- Creighton, J.R. ve Ho, P. (2001) Introduction to chemical vapor deposition (CVD). ASM international chemical vapor deposition (#06682G). ASM International, Materials Park.
- Csermely, P., Palotai, R. ve Nussinov, R. (2010) Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events. *Trends Biochem Sci*, 35: 539-546.
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M. ve Cummins, E. (2012) Nanotechnologies in the food industry-recent developments, risks and regulation. *Trends Food Sci Technol*, 24: 30-46.

- Çetinus, S.A. ve Öztop, H.N. (2003) Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzym Microb Technol*, 32 (7): 889-894.
- Dabbs, D.M. ve Aksay, I.A. (2000) Self-assembled ceramics produced by complex-fluid templation. *Ann Rev Phys Chem*, 51(1): 601-622.
- Dala, E. ve Szajani, B. (1994) Immobilization, Characterization and Laboratory-Scale Application of Bovine Liver Arginase, *Appl Biochem and Biotechnol*, 49:203-215.
- Datta, S., Christera, L.R. ve Rajaram, Y.R.S. (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and suport materials. *3 Biotech*, 3: 1-9.
- Deitzel, J.M., Kelmeyer, J., Harris, D. Ve Beck Tan, N.C. (2001) The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1): 261-272.
- Dekkers, J.C.M. (2012) Application of genomics tools to animal breeding, *Curr Genomics*, 13: 207-212.
- Demir, M.M., Yilgor, I., ve Yilhor, E. (2002) Electrospinning of polyurethane fibers *Polymer*, 43(11): 3303-3309.
- Dewan, S.S. (2017) Global Markets for Enzymes in Industrial Applications; BCC Research: Wellesly, MA, USA.
- Di Cosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A.J. ve Bohlmann, G. (2013) Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev*, 42: 6437-6474.
- Diamond, J. (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication, *Nature*, 418: 700-707.
- Dillon, A.C., Jones, K.M., Bekkedahl, T.A., Kiang, C.H., Bethune, D.S. ve Heben, M.J. (1997) Storage of hydrogen in single-walled carbon nanotubes. *Nature*, 386: 377-379.
- Dillon, B.J., Prieto, V.G., Curley, S.A., Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S. ve Clark, M.A. (2004) Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer*, 100: 826-833.

- Ding, B., Wang, X. ve Yu, J. (2019) *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 806 s.
- Doshi, J. ve Reneker, D. (1995) Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat*, 35(2): 151-160.
- Dresselhaus, M.S., Chen, G., Tang, M.Y., Yang, R.G., Lee, H., Wang, D.Z., Ren, Z.F., Fleurial, J.P. ve Gogna, P. (2007) New directions for low-dimensional thermoelectric materials. *Adv Mater*, 19: 1043-1053.
- Ebert, K., Fritsch, D., Koll, J. ve Tjahjwiguna, C. (2004) Influence of inorganic fillers on the compaction behaviour of porous polymer based membranes. *J Membrane Sci*, 233: 71-78.
- Ebrahimi, N. ve Mansoori, G.A. (2014) Reliability for drug targeting in cancer treatment through nanotechnology (a psychometric approach). *Int J Med Nano Res*, 21: 1-5.
- Ehrman, S.H., Friedlander, S.K. ve Zachariah, M.R. (1999) Phase segregation in binary SiO₂/TiO₂ and SiO₂/Fe₂O₃ nanoparticle aerosols formed in a premixed flame. *J Mater Res*, 14: 4551-4561.
- Elahi, M.F., Lu, W., Guoping, G. ve Khan, F. (2013) Core-shell fibers for biomedical applications-a review. *J Bioeng Biomed Sci*, 3: 121.
- El-Sayed, A.S., Shindia, A.A., Diab, A.A. ve Rady, A.M. (2014) Purification and immobilization of L-arginase from thermotolerant *Penicillium chrysogenum* KJ185377.1; with unique kinetic properties as thermostable anticancer enzyme. *Arch Pharm Res*, 37(10): 1-10.
- Epstein, R.I. ve Malloy, K.J. (2009) Electrocaloric devices based on thin-film heat switches. *J Appl Phys*, 106: 064507-064509.
- Erbaş, H., Erten, O., Dağlar, A. ve İrfanoğlu, M.E. (2006) Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(3): 129-134.
- Fauci, A.S. (2001) Infectious diseases: considerations for the 21st century, *Clin Infect Dis*, 32: 675-685.

- Feun, L.G., Kuo, M.T. ve Savaraj, N. (2015) Arginine deprivation in cancer therapy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18: 78-82.
- Feynman, R.P. (1960) There is plenty of room at the bottom. *Eng Sci*, 23: 22-36.
- Ficai, A. ve Grumezescu, A.M. (2017) Nanostructures for Cancer Therapy Nanostructures in Therapeutic Medicine Series, Elsevier-Health Sciences Division, Philadelphia, United States, 1024 s.
- Fischer, J.D., Holliday, G.L. ve Thornton, J.M. (2010) The cofactor database: organic cofactors in enzyme catalysis. *Bioinformatics*, 26: 2496-2497.
- Fong, H., Chun, I. Ve Reneker, D. (1999) Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, 40: 4585-4592.
- Frank, K.K. ve Yuqin, W. (2014) *Introduction to Nanofiber Materials*, Cambridge University Press, 267 s.
- Franzén, R. ve Tois, J. (2003) Purine and sugar chemistry on solid phase-100 years after the Emil Fischer's chemistry Nobel Prize 1902, *Comb Chem High Throughput Screen*, 6: 433-444.
- Garcia-Martinez, J., Lancaster, T.M. ve Ying, J.Y. (2008) Synthesis and catalytic applications of selfassembled carbon nanofoams. *Adv Mater*, 20(2): 288-292.
- Gasaymeh, S.S., Radiman, S., Lee, Y.H., Saion, E. ve Saeed, G.H.M. (2010) Synthesis and characterization of silver/Polyvinilpirrolidone (AG/PVP) nanoparticles using gamma irradiation techniques, *American J Appl Sci*, 7:879-888.
- Ghorbanpour, M., Khanuja, M. ve Varma, A. (2017) *Nanoscience and plant-soil systems*. Springer, Technology & Engineering, Soil Biology, 553 s.
- Gilmanl, J.W. (1995) Thermal decomposition chemistry of poly(vinyl alcohol), *Fire Polym II Mater Test Hazard Prev ACS*, 599:161-185.
- Giordano, F., Novak, C. ve Moyano, J.R. (2001) Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds, *Thermochimica Acta*, 380:123-151.

- Greiner, A. ve Wendorff, J.H. (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed*, 46: 5670-5703.
- Guo, S., Zhang, X., Zhu, W., He, K., Su, D., Su, D., Mendoza-Garcia, A., Ho, S.F., Lu, G. ve Sun, S. (2014) Nanocatalyst superior to Pt for oxygen reduction reactions: the case of core/shell Ag (Au)/CuPd nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 136(42): 15026-15033.
- Gürdöl, F., ve Ademoğlu, E. (2010) *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevi, Hadımköy, İstanbul. 691.
- Haines, R.J., Pendleton, L.C. ve Eichler, D.C. (2011) Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *J Biochem Mol Bio*, 2: 8-23.
- Harold, E.S. (1991) Immobilized enzymes: applications to bioprocessing of food enzymology. In: Fox, P.F. (Ed.), *Food Enzymology*. Elsevier Applied Science, New York, NY, 322-350.
- Hartmeier, W. (1988) *Immobilized Biocatalysts: An introduction*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, s. 212.
- Hassan, M.A., Yeom, B.Y., Wilkie, A., Pourdeyhimi, B. ve Khan, S.A. (2013) Fabrication of nanofiber meltblown membranes and their filtration properties. *J Membr Sci*, 427: 336-344.
- He, C., Nie, W. ve Feng, W. (2014) Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering. *J Mater Chem B*, 2: 7828-7848.
- Herzfeld, A. ve Raper, S.M. (1976) The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem J*, 153: 469-478.
- Hildebrand, H., Mackenzie, K. ve Kopinke, F.D. (2009) Pd/Fe₃O₄ nano-catalysts for selective dehalogenation in wastewater treatment processes-influence of water constituents. *Appl Catal B: Environ*, 91: 389-396.
- Holme, D.J. ve Peck, H. (2005) *Analytical Biochemistry*, 3. Baskı, Prentice Hall, England, 501s.

- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M. ve Ramakrishna, S. (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*, 63(15): 2223-2253.
- Iijima, S., Brabec, C., Maiti, A. ve Bernholc, J. (1996) Structural flexibility of carbon nanotubes. *J Chem Physiol*, 104(5): 2089-2092.
- Illanes, A. (2008) Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer, 2008.
- Illanes, A., Cauerrhff, A., Wilson, L. ve Castro, G.R. (2012) Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol*, 115: 48-57.
- Jafarali, K.M., Jayakumar, C. ve Prajapati, J.B. (2013) Potential of nanotechnology in functional foods. *Emir J Food Agric*, 25: 10-19.
- Jain, D., Daima, H.K., Kachhwala, S. ve Kothari, S.L. (2009) Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Digest J Nanomater Biostruct*, 4: 557-563.
- Jesionowski, T., Zdarta, J. ve Krajewska, B. (2014) Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20: 801-821.
- Jeun, J.P., Kim, Y.H., Lim, Y.M., Choi, J.H., Jung, C.H., Kang, P.H. ve Nho, Y.C. (2007) Electrospinning of poly (L-lactide-co-D, L-lactide). *J Ind Eng Chem*, 13(4): 592-596.
- Jiang, J., Chen, D.R. ve Biswas, P. (2007) Synthesis of nanoparticles in a flame aerosol reactor with independent and strict control of their size, crystal phase and morphology. *Nanotechnology*, 18: 285603-285611.
- Jolivet, J.P., Froidefond, C., Pottier, A., Chaneac, C., Cassaignon, S., Tronc, E. ve Euzen, P. (2004) Size tailoring of oxide nanoparticles by precipitation in aqueous medium. A semi-quantitative modelling. *J Mater Chem*, 14: 3281-3288.
- Kafarski, P. (2012) Rainbow code of biotechnology. *Chemik*, 66(8): 811-816.
- Kandemir, F.M. ve Özdemir, N. (2008) L-Lizin ve L-Ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. *Firat Üniv Sağ Bil Derg*, 22(1): 1-4.

- Kanyo, Z.F., Scolnick, L.R., Ash, D.E. ve Christianson, D.W. (1996) Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, 383: 554-557.
- Karn, B., Kuiken, T. ve Otto, M. (2009) Nanotechnology and *in situ* remediation: a review of the benefits and potential risks. *Environ Health Perspect*, 117(12): 1813-1831.
- Katti, D.S., Robinson, K.W., Ko, F.K. ve Laurencin, C.T. (2004) Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters,” *J Biomed Mater Res B*, 70B(2): 286-296.
- Kawachi, Y., Kugimiya, S., Nakamura, H. ve Kato, K. (2014) Enzyme encapsulation in silica gel prepared by polylysine and its catalytic activity. *Appl Surf Sci*, 314: 64-70.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2012) *Biyokimya*. 9. baskı. Aktif Yayınevi, Erzurum. 643.
- Kennedy, M.J. (1992) The evolution of the word biotechnology, *Trends Biotechnol*, 9:218-220.
- Kesharwani, P., Jain, K. ve Jain, N.K. (2014) Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci* 39(2): 268-307.
- Khan, W.S. (2010) Fabrication and Characterization of Polyvinylpyrrolidone and Polyacrylonitrile Electrospun nanocomposite Fibers, PhD dissertation, Department of Mechanical Engineering, Wichita State University, December, 2010.
- Kim, G.T., Lee, J.S., Shin, J.H., Ahn, Y.C., Jeong, K.H., Sung, C.M. ve Lee, J.K. (2004) Effect of humidity on the microstructures of electrospun polystyrene nanofibers *Microsc Microanal*, 10(S02): 554-555.
- Kim, S. (2013) *Marine pharmacognosy: Trends and applications*, Boca Rotan, FL: CRC Press, Taylor and Francis group.
- Klein, D. ve Morris, D.R. (1978) Increased arginase activity during lymphocyte mitogenesis. *Biochem Biophys Res Comm*, 81: 199-204.

- Ko, F. ve Wan, Y. (2014) Nanofiber technology. In Introduction to Nanofiber Materials (pp. 44-63). Cambridge: Cambridge University Press.
- Ko, F.K. (2004) Nanofiber technology: bridging the gap between nano and macro world, in Nanoengineered Nanofibrous Materials, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, s 544.
- Koshland, D.E. (1995) The key-lock theory and the induced fit theory *Angew. Chem Int Ed Engl*, 33: 2375-2378.
- Koski, A., Yim, K. ve Shivkumar, S. (2004) Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mater Lett*, 58(3-4), 493-497.
- Krebs, H. A. ve Henseleit, K. (1932) Untersuchungen uber die Harnstoffbildung im Tierkorper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 210: 33-66.
- Kutlu, N. (2017), *Elektro Eğirme (Electrospinning) Yöntemi İle Hazırlanan Polivinil Alkol/Kitosan Nanofiberlerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Üreaz İmmobilizasyonu İçin Kullanılabilirliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 100 s.
- Lak, A., Mazloumi, M., Mohajerani, M.S., Zanganeh, S., Shayegh, M.R., Kajbafvala, A., Arami, H. Ve Sadrnezhaad, S.K. (2008) Rapid formation of mono-dispersed hydroxyapatite nanorods with narrow-size distribution via microwave irradiation. *J Am Ceram Soc*, 91: 3580-3584.
- Lakshmi, M., Vijaya K.K., Thyagarajan, K. (2015) An investigation of structural and magnetic properties of Cr-Zn ferrite nanoparticles prepared by a sol-gel process, *J Nanostruct Chem*, 5:365-373.
- Lee, H.C. (2006) Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med*, 12: 317-323.
- Lee, J.S., Choi, K.H., Ghim, H.D., Kim, S.S., Chun, D.H., Kim, H.Y. ve Lyoo, W.S. (2004) Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *J Appl Polym Sci*, 93: 1638.
- Lee, K.H., Kim, H.Y., Khil, M.S., Ra, Y.M. ve Lee, D.R. (2003) Characterization of nano-structured poly (ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, 44(4): 1287-1294.

- Lemieux, R.U. ve Spohr, U. (1994) How Emil Fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 50: 1-20.
- Li, D., Zhang, W., Sun, R., Hua-Yong, H.T. ve Chen, G. (2016) Soft-template construction of threedimensionally ordered inverse opal structure from $\text{Li}_2\text{FeSiO}_4/\text{C}$ composite nanofibers for high-rate lithium-ion batteries. *Nanoscale*, 8: 12202-12214.
- Li, M., Yang, J., Qu, H., Zhang, Q., Bai, F. ve Bai, G. (2014), Novel immobilization of arginase 1 via cellulose-binding domain and its application in producing of L-ornitine. *App Biochem Microbiol*, 50(1): 43-48.
- Li, Y., Lee, N.H., Hwang, D.S., Song, J.S., Lee, E.G., Kim, S.J. (2004) Synthesis and characterization of nano titania powder with high photoactivity for gas-phase photo-oxidation of benzene from TiOCl_2 aqueous solution at low temperatures. *Langmuir*, 20(25): 10838-10844.
- Li, Z. ve Wang, C. (2013) Effects of working parameters on electrospinning, one-dimensional nanostructures. *Springer Briefs Mater*.
- Liang, D., Hsiao, B.N.S. ve Chu, B. (2007) Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 59: 1392-1412.
- Ling, N.R. (1983) Properties of the monoclonal antibodies produced by hybridoma technology and their application to the study of diseases, *Immunology*, 49: 202-203.
- Liu, H. ve Hsieh, Y. (2002) Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *J Polym Sci Pol Phys*, 40(18): 2119-2129.
- Machado, B.F. ve Serp, P. (2012) Graphene-based materials for catalysis. *Catal Sci Technol*, 2: 54-75.
- Matthew, D.B., Dmitry, L., Deepak, T. ve Michel, D. (2007) Nano fiber based drug delivery; nanoparticulate drug delivery systems. *Informa healthcare*, 166: 64-65.
- Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. ve Bowlin, G.L. (2002) Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3(2): 232-238.

- Mazoochi, T., Hamadani, M., Ahmadi, M. ve Jabbari, V. (2012) Investigation on the morphological characteristics of nanofibrous membrane as electrospun in the different processing parameters. *Int J Ind Chem*, 3: 2.
- Mirsasaani, S.S., Hematia, M., Tavasolid, T., Dehkorda, E.S., Yazdia, G.T. ve Poshtiri, D.A. (2013) Nanotechnology and nanobiomaterials in dentistry. In: *Nanobiomaterials in clinical dentistry. Elsevier Inc*, 692 s.
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F. ve Wahab, R.A. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 29(2): 205-220.
- Morrell, P.L., Buckler, E.S. ve Ross-Ibarra, J. (2012) Crop genomics: Advances and applications, *Nat Rev Genet*, 13: 85-96.
- Morris, S.M. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 22: 87-105.
- Morris, S.M., Bhamidipati, D. ve Kepka-Lenhart, D. (1997) Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene*, 193: 157-161.
- Mukhopadhyay, S.S. (2014) Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnol Sci Appl*, 7: 63-71.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. ve Rodwell V.W, (2003). *Harper's Biochemistry*, 26th Ed., McGraw-Hill Companies, United States of America.
- Nader, R., Andrea, R.H. ve Carl, T.W. (2018) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 8th Edition*, Elsevier, ABD, 1088s.
- Nair, A.J. (2008) *Principles of biotechnology*. London: Laxmi Publications.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (2012) *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 244 s.
- Nguyen, D.X. ve Massague, J. (2007) Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 8: 341-352.

- Nisha, S., Arum, K.S. ve Gobi, N. (2012) A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chem Sci Rev Let*, 1(3): 148-155.
- Northrop, J.H. (1930) Crystalline pepsin: isolation and tests of purity. *J Gen Physiol*, 13: 739-766.
- Obreja, V.V.N. (2008) On the performance of supercapacitors with electrodes based on carbon nanotubes and carbon activated material-a review. *Physica E*, 40: 2596-2605.
- O'Grady, P. ve Joyce, P. (1980) Microencapsulation of bovine liver arginase: characterization and in vivo evaluation of its effect on the growth of the L1210 murine leukaemia, *Enzyme Microb Technol*, 3:149-152.
- Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E., 2006. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara. 813.
- Özdemir, N. ve Özçelik, M. (2001) Manda karaciğer ve böbrek doku arginazının fotoinaktivasyonu ve kinetik özellikleri. *Türk J Vet Anim Sci*, 25: 995-1000.
- Pai, C.-L., Boyce, M.C. ve Rutledge, G.C. (2009) Morphology of porous and wrinkled fibers of polystyrene electrospun from dimethylformamide. *Macromolecules*, 42(6): 2102-2114.
- Pan, X., Fan, Z., Chen, W., Ding, Y., Luo, H. ve Bao, X. (2007) Enhanced ethanol production inside carbon-nanotube reactors containing catalytic particles. *Nat Mater*, 6: 507-511.
- Park, J.C. ve Song, H. (2011) Metal silica yolk-shell nanostructures as versatile bifunctional nanocatalysts. *Nano Res*, 4: 33-49.
- Patil, G., Sarode, C., Patil, R. ve Gokhale, S. (2012) CVD synthesis of highly graphitized singlewalled carbon nanotubes using nitrogen-pretreated FeMo/MgO catalyst. *Chem Lett*, 41:871-873.
- Pera, L.M., Baigori, M.D., Pandey, A. ve Castro, G.R. (2015) Biocatalysis, in: *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*, Elsevier Ltd, 391-408.
- Percudani, R. ve Peracchi, A. (2003) A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep*, 4: 850-854.

- Pereira, V.A.J., Queiroz de Arruda, I.N., Stefani R., (2015) Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Timee Temperature Indicators for application in intelligent food packaging, *Food Hydrocolloids* 43:180-188.
- Persenaire, O., Alexandre, M., Dege'e, P., Dubois, P. (2001) Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(E-caprolactone), *Biomacromolecules*, 2:288-294.
- Poole, J.C.P. ve Owens, F.J. (2003) Introduction to nanotechnology. In: Technology & engineering. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Prasad, K.S., Pathak, D., Patel, A., Dalwadi, P., Prasad, R., Patel, P. ve Selvaraj, K. (2011) Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tobaccum* leaf extract and study of their antibacterial effect. *Afr J Biotechnol*, 10: 8122-8130.
- Prasad, R., Bagde, U.S. ve Varma, A. (2012) An overview of intellectual property rights in relation to agricultural biotechnology. *Afr J Biotechnol*, 11: 13746-13752.
- Price, N.C. (1979) What is meant by 'competitive inhibition. *Trends in Biochem Sci*, 4: 272.
- Qiu, F., Huang, J. ve Sui, M. (2015) Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers. *Cancer Lett*, 364: 1-7.
- Qu, X., Alvarez, P.J. ve Li, Q. (2013) Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Res*, 47(12): 3931-3946.
- Quirk, R.A., Chan, W.C., Davies, M.C., Tendler, S.J. ve Shakesheff, K.M. (2001) Poly (L-lysine)- GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly (lactic acid). *J Biomat*, 22(8): 856-872.
- Rai, M. ve Ingle, A. (2010) Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94(2): 287-293.
- Rajput, N. (2015) Methods of preparation of nanoparticles-a review. *Int J Adv Eng Technol*, 7(4): 1806-1811.

- Ramarkrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T. ve Ma, Z. (2005) An introduction to electrospinning and nanofibers, Singapore, World scientific, 382.
- Rardin, R.L., Tolman, W.B. ve Lippard, S.J. (1991) Monodentate carboxylate complexes and the carboxylate shift implications for polymetalloprotein structure and function. *New J Chem*, 15: 417-430.
- Ratner, M. ve Ratner, D. (2002) Nanotechnology: A Gentle Introduction to the Next Big Idea, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Reczkowski, R.S. ve Ash, D.E. (1992) EPR evidence for binuclear MN(II) centers in rat-liver arginase. *J Am Chem Soc*, 114: 10992-10994.
- Reeds, P.J. (2000) Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J Nutr*, 130: 1835S-1840S.
- Roco, M.C. (2007) Handbook on Nanoscience, Engineering and Technology, second ed., Taylor and Francis, Boca Raton, FL.
- Rogers, Q.R. ve Visek, W.J. (1985) Metabolic role of urea cycle intermediates: nutritional and clinical aspects: introduction. *J Nutr*, 115: 505-508.
- Ronda, L., Bruno, S., Campanini, B., Mozzarelli, A., Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Cupane, A., Levantino, M. ve Bettati, S. (2015) Immobilization of proteins in silica gel: biochemical and biophysical properties. *Curr Org Chem*, 19: 1653-1668.
- Rosevear, A., Kennedy, J.F. ve Cabral, J. (1987) Immobilized Enzymes and Cells. CRC Press/ Adam Hilger, Philadelphia, PA. s 248.
- Schroeder, S.A., Heller, D.A., Winslow, M.M., Dahlman, J.E., Pratt, G.W., Langer, R., Jacks, T. ve Anderson, D.G. (2012) Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Rev*, 12: 39-50.
- Sharon, M., Choudhary, A.K. ve Kumar, R. (2010) Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *J Phytol*, 2: 83-92.
- Sheldon, R.A., ve van Pelt, S. (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev*, 42: 6223-6235.

- Shen, L.J., Lin, W.C., Beloussow, K. ve Shen, W.C. (2003) Resistance to the antiproliferative activity of recombinant arginine deiminase in cell culture correlates with the endogenous enzyme, argininosuccinate synthetase. *Cancer Lett*, 191: 165-170.
- Shown, I., Banerjee, S., Ramchandran, A.V., Geckeler, K.E. ve Murthy, C.N. (2010), Synthesis of Cyclodextrin and Sugar-Based Oligomers for the Efavirenz Drug Delivery, *Macromol. Symp.* 287:51–59.
- Silva, B.F., Perez, S., Gardinalli, P., Singhal, R.K., Mozeto, A.A., Barcelo, D. (2011) Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *Trends Anal Chem*, 30: 528-540.
- Simon, P. ve Gogotsi, Y. (2008) Materials for electrochemical capacitors. *Nat Mater*, 7(11): 845-854.
- Simoni, R.D., Hill, R.H. ve Vaughan, M. (2002) Urease, the first crystalline enzyme and the proof that enzymes are proteins: the work of James B Sumner. *J Biol Chem*, 277: 23e.
- Sirisha, V.L., Jain, A. ve Jain, A. (2016) Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Adv Food Nutr Res*, 79: 179-211.
- Smith, K.A. (2012) Louis Pasteur, the father of immunology? *Front Immunol*, 3:68.
- Solas, M.T., Vicente, C., Xavier, L. ve Legaz, M.E. (1994) Ionic adsorption of catalase on bioskin: kinetic and ultrastructural studies. *J Biotechnol*, 33(1): 63-70.
- Stander, L. ve Theodore, L. (2011) Environmental implications of nanotechnology-an update. *Int J Environ Res Public Health*, 8: 470-479.
- Stander, L. ve Theodore, L. (2011) Environmental implications of nanotechnology-an update. *Int J Environ Res Public Health*, 8: 470-479.
- Stasyuk, N., Serkiz, R., Mudry, S., Gayda, G., Zakalskiy, A., Kovalchuk, Y., Gonchar, M. ve Nisnevitch, M. (2011) Recombinant human arginase I immobilized on gold and silver nanoparticles: preparation and properties. *Nanotechnol Dev*, (1:3e): 11-15.

- Stojanovska, E., Canbay, E., Pampal, E.S., Calisir, M.D., Agma, O., Polat, Y., Simsek, R., Serhat Gundogdu, N.A., Akgul, Y. ve Kilic, A. (2016) A review on non-electro nanofibre spinning techniques. *RSC Adv*, 87: 83783–83801.
- Subramani, K., Elhissi, A., Subbiah, U. ve Ahmed, W. (2019) *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry, Introduction to nanotechnology*, Elsevier Inc.
- Talekar, S., Waingade, S., Gaikwad, V., Patil, S.ve Nagavekar, N. (2012) Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase. *J Biochem Technol*, 3(4): 349-353.
- Tamasan, M. ve Simon, V. (2012) Thermal and structural characterization of montmorillonite poly(vinyl alcohol) nanocomposites, *J Optoelectron Adv Mater*, 14:1053-1058.
- Taniguchi, N. (1974) On the basic concept of “Nano-Technology”, *Proceedings of the International Conference on Production Engineering Tokyo*, Part II, Japan Society of Precision Engineering, Tokyo, 5-10.
- Tekman, S. ve Ömer, N. (1981) *Genel Biyokimya*, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, s.335.
- Tischer, W. ve Wedekind, F. (1999) Immobilized enzymes: methods and applications. *Topics in Current Chemistry*. 200. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 95-126.
- Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J.M., Ortiz, C., Fernández-Lafuente, R. ve Guisan, J.M. (2002) Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: optimization of the biocatalyst's stability. *Biotechnol Prog*, 18(6): 1221-1226.
- Tran, D.N. ve Balkus, K.J. (2011) Perspective of recent progress in immobilization of enzymes, *ACS Catal*, 1: 956-968.
- Tsai, F.Y., Wu, C.L., Mou, C.Y., Chao, M.C., Lin, H.P. ve Liu, S.T. (2004) Palladium bipyridyl complex anchored on nanosized MCM-41 as a highly efficient and recyclable catalyst for Heck reaction. *Tetrahedron Lett*, 45:7503-7506.

- Unissa, R., Anusha, M., Divya, V., Sagarika, Y., ve Sowmya, M. (2017) Study on pegylation of therapeutic enzyme L-arginase and its physiochemical properties for improving its pharmaceutical characteristics. *Int J Adv Biotech Res*, 8: 369-374.
- Unissa, R., Sudhakari M. ve Reddy, A.S.K. (2015) *In vitro* anticancer activity of L-arginase produced from *Idiomarina sediminum*; H1695. *J Chem Pharm Res*, 7(9): 764-770.
- Verma, A.S., Agrahari, S., Rastogi, S. ve Singh, A. (2011) Biotechnology in the realm of history, *J Pharm Bioall Sci*, 3: 321-323.
- Veronese, F.M., Visco, C., Benassi, A., Lora, S., Carezza, M., Palma, G. (1988) Properties and Potential Applications of Arginase Immobilized by Radiation-induced Polymerization of Acrylic Monomers, *Ann New York Academy Of Sci*, 115-120
- Veronese, F.M., Boccu, E., Caliceti, P., Lora, S., Carezza, M., Palma, G. (1989) Arginase Immobilization on Poly(hydroxyethyl acrylate), *Matrix Beads, J Bioact Compat Pol*, 4:42-50.
- Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J. ve Dijk, A. (2003) Incorporation of drugs in an amorphous state in electrospun nanofibers composed of as water insoluble, non biodegradable polymer. *J Control Release*, 92(3): 349-360.
- Voet, D., Voet, J.G. (2011) *Biochemistry*, John Wiley & Sons. Press, New York, USA, 1756s.
- Voget, S., Steele, H.L. ve Streit, W.R. (2006) Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol*, 126 (1): 26-36.
- Walser, T., Demou, E., Lang, D.J. ve Hellweg, S. (2011) Prospective environmental life cycle assessment of nanosilver t-shirts. *Environ Sci Technol*, 45: 4570-4578.
- Walsh, G. (2005) Therapeutic insulin and their large-scale manufacture, *Appl Microbiol Biotechnol*, 67(2): 151-159.
- Wang, B., Kral, P. ve Thanopoulos, I. (2006) Docking of chiral molecules on twisted and helical nanotubes: nanomechanical control of catalysis. *Nano Lett*, 6(9): 1918-1921.

- Wang, J. ve Nain, A.S. (2014) Suspended micro/nanofiber hierarchical biological scaffolds fabricated using non-electrospinning STEP technique. *Langmuir*, 30(45): 13641-13649.
- Wannatong, L., Sirivat, A. ve Supaphol, P. (2004) Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. *Polym Inter*, 53(11): 1851-1859.
- Wheatley, D.N. ve Campbell, E. (2003) Arginine deprivation, growth inhibition and tumor cell death: 3. Deficient utilisation of citrulline by malignant cells. *Br J Cancer*, 89: 573-576.
- Woodley, J.M., Breuerb, M. ve Mink, D. (2013) A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production, *Chem Eng Res Des*, 91: 2029-2036.
- Wu, C.M., Chiou, H.G., Lin, S.L. ve Lin, J.M. (2012) Effects of electrostatic polarity and the types of electrical charging on electrospinning behavior. *J App Polym Sci*, 126: E89.
- Wu, G. ve Morris, S.M. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 336: 1-17.
- Yang, Y., Porté, M.C., Marmey, P., El Haj, A.J., Amédée, J. ve Baquey, C. (2003) Covalent bonding of collagen on poly (L-lactic acid) by gamma irradiation. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 207(2): 165-174.
- Zhang X., Liu J., Yu X., Wang F., Yi L., Li Z., Liu Y. ve Ma L. (2015) High-level expression of human arginase I in *Pichia pastoris* and its immobilization on chitosan to produce L-ornithine. *BMC Biotechnol*, 15: 66.
- Zhang, C. (2012) Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. Antibody methods and protocols, *Methods Mol Biol*, 901, 117-135.
- Zhang, G., Guo, B. ve Chen, J. (2006) MCO_2O_4 ($\text{M}^{1/4}$ Ni, Cu, Zn) nanotubes: template synthesis and application in gas sensors. *Sensor Actuators B-Chem*, 114(1): 402-409.
- Zhang, S. (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol*, 21(10): 1171-1178.

- Zhang, Z., Tang, R., Bian, L., Mei, M., Li, C. ve Ma, X. (2016) Surface Immobilization of Human Arginase-1 with an Engineered Ice Nucleation Protein Display System in *E. coli*, *PLoS ONE*, 11(8):e0160367. doi:10.1371/journal.pone.0160367
- Zhang, X. ve Lua, Y. (2014) Centrifugal spinning: an alternative approach to fabricate nanofibers at high speed and low cost. *Polym Rev*, 54: 677-701.
- Zhao, S.L., Wu, X.H., Wang, L.G. ve Huang, Y. (2004) Electrospinning of ethylcyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. *J App Polym Sci*, 91: 242.
- Zhao, Y., Qiu, Y., Wang, H., Yu, C., Jin, S. ve Chen, S. (2016) Preparation of nanofibers with renewable polymers and their application in wound dressing. *Int J Polym Sci*, 2016: 4672839.
- Zhong, X.H., Kim, K.S., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S. ve Chu, B. (2002) Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43: 4403.
- Zimin, A., Delcher, A., Florea, L., Kelley, D., Schatz, M., Puiu, D., Hanrahan, F., Perteau, G., Van Tassel, C.P., Sonstegard, T.S., Marçais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J.A. ve Salzberg, S.L. (2009) Whole genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*, *Genome Biol*, 10: R42.
- Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B.S. ve Chu, B. (2002) Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43(16): 4403-4412.
- Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R. ve Sanjust, E. (2016) Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. *Molecules*, 21: 1577.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Ceyhun Işık
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: Eskişehir/ 21.12.1987
Medeni Hali : Evli
Telefon : 05309596258
E-posta : ceyhunisik@mu.edu.tr

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2013
Doktora	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2019

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2011-	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Tezler

Yüksek lisans tezi: “Mis Zambağının (*Lilium Candidum*) Biyokimyasal Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Endüstriyel Amaçlı Kullanılabilirliğinin Araştırılması” Danışman Prof. Dr. Nazan Demir, Muğla, 2013.

Yabancı Dil(ler)

İngilizce (YÖKDİL puanı 80,0)

Bilimsel Faaliyetler

1. Yayınlar

A. Sci Kapsamında Taranan Dergilerde

A1. Ceyhun Işık, Gökmen Arabacı, Yasemin İspirli Doğaç, İlyas Decevi, Mustafa Teke (2019). Synthesis and characterization of electrospun PVA/Zn²⁺ metal composite nanofibers for lipase immobilization with effective thermal, pH stabilities and reusability. *Materials Science and Engineering: C*, 99,1226-1235.

A2. Okay Nazlı, Tuba Baygar, Cigdem Elif Demirci Donmez, Ozcan Dere, Ali İhsan Uysal, Alper Aksozek, **Ceyhun Isik**, Selcuk Akturk (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity of polyurethane/Hypericum perforatum extract (PHPE) composite. *Bioorganic Chemistry*, 82, 224–228.

A3. Nazan Demir, Hayrunnisa Nadaroglu, Yasar Demir, **Ceyhun Isik**, Esen Taskin, Ahmet Adiguzel, Medine Gulluce (2014). Purification and characterization of an alkaline pectin lyase produced by a newly isolated *Brevibacillus borstelensis* (P35) and its applications in fruit juice and oil extraction. *European Food Research and Technology*, 239:127–135.

B. SCI dışında Uluslararası İndeksli Dergilerde

B1. Nazan Demir, Hayrunnisa Nadaroglu, Asuman Ozkan, Esen Tasgin, **Ceyhun Isik**, Yasar Demir (2014). Purification of Paraoxonase Enzyme From the Sera of Patients with Behcet's Disease and Analyzing the Effects of the Drugs Containing Imuran (Azathioprine), Prednisolone (Methylprednisolone) and Colchium (Colchicine). *Drug Metabolism Letters*, 8:67-75.

C. Bilimsel Toplantılar (Konferans, Panel, Sempozyum, Kongre, Seminer)

✓ Uluslararası Kongre ve Sempozyumlarda

C1. Ceyhun Işık, Mustafa Teke (2019). Immobilization Of Arginase On Cellulose Acetate (CA)/Polyvinylpyrrolidone (PVP)/Mn²⁺ Electrospun Nanofibers With Efficient And Effective Stability Properties. 2. Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (EBAT 2019), 26-29 October 2019, Antalya, Turkey.

C2. Ceyhun Işık, Mustafa Teke (2019). Immobilization and Characterization of Arginase onto Electrospun Cellulose Acetate/Polyvinylpyrrolidone as High-Performance Membrane Platform for Efficient and Reusable. The 44Th FEBS CONGRESS (FEBS 2019), 6-11 July, Krokow, Poland.

C3. Ceyhun Işık, Mustafa Teke (2019). Cellulose Acetate/Polyvinylpyrrolidone Electrospun Nanofibers: Fabrication and Characterization. Electrospinning and Related Techniques: From Design to Production of Advanced Polymer Materials and Devices (EUPOC 2019), 12-16 May, Como, Italy.

C4. Selen Kızıldağ, **Ceyhun Işık**, Yasemin İspirli Doğaç, Mustafa Teke (2018) Immobilization And Characterization of β -D-Galactosidase onto Eggshell Membrane as a Natural Carrier Platform. 1. Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (EBAT 2018), 27-30 October 2018, Antalya, Turkey.

C5. Yasemin İspirli Doğaç, **Ceyhun Işık**, Mustafa Teke (2018). Optimization and Characterization on magnetic nanogels for enhanced stability properties of immobilized enzyme. II. International Joint Science Congress of Materials and Polymers (ISCMP), 9-12 October 2018, Durres, Albania.

C6. **Ceyhun Işık**, Nurdan Saraç, Mustafa Teke, Aysel Uğur (2018). Immobilization of Lipase-Producing Bacteria *Acinetobacter haemolyticus* on EggShell Membrane. 4th International Conference on New Trends in Chemistry, 10-12 May 2018, St. Petersburg, Russia.

C7. **Ceyhun Işık**, Gökmen Arabacı, Yasemin İspirli Doğaç, İlyas Deveci, Mustafa Teke, (2018). Electrospun Polyvinyl alcohol/ZnO Nanofiber as a New Carrier for Lipase Immobilization: An Optimization Study. 4th International Conference on New Trends in Chemistry, 10-12 May 2018, St. Petersburg, Russia.

C8. **Ceyhun Işık**, Yasemin İspirli Doğaç, İlyas Deveci, Mustafa Teke (2018). Immobilization and Characterization of Acetylcholine Esterase onto Electrospun Polyvinyl Alcohol-Zn²⁺ as a New Nanofiber Membran Platform. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 26-27 April 2018, Ankara, Turkey.

C9. **Ceyhun Işık**, Gökmen Arabacı, Yasemin İspirli Doğaç, İlyas Deveci, Mustafa Teke (2017). Lipase Immobilization Onto Polyvinyl Alcohol/ZnO Electrospun Nanofibers With Effective Stability Properties. 4th International TURK-PAK Conference On Chemical Sciences (ITPCCS 2017), 26-28 October 2017, Konya, Turkey.

C10. Gökmen Arabacı, Yasemin İspirli Doğaç, **Ceyhun Işık**, İlyas Deveci, Mustafa Teke (2017). Characterization of Electrospun Polyvinyl Alcohol/Chitosan Nanofiber: Using for Conversion of Glucose to Fructose. Ancon-International Congress on Chemistry and Materials Science, 5-7 October 2017, Ankara, Turkey.

C11. Gökmen Arabacı Yasemin, İspirli Doğaç, İlyas Deveci, **Ceyhun Işık**, Mustafa Teke (2017). Structural Characterization of Electrospun PVA/ZnO Composite Nanofibers. III. International Turkish Congress on Molecular Spectroscopy (TURCMOS2017), 26-29 August 2017, Bodrum, Turkey.

C12. Ceyhun Işık, Şeyda Kıvrak, Tolga Göktürk, İbrahim Kıvrak (2017). Determination of Chemical Composition of Petroselinum crispum Seed by GC/MSD. III. International Turkish Congress on Molecular Spectroscopy (TURCMOS2017), 26-29 August 2017, Bodrum, Turkey.

✓ **Ulusal Kongrelerde**

C13. Ceyhun Işık, İbrahim Kıvrak, Yaşar Demir, Mansur Harmandar, Nazan Demir (2012). Beyaz Zambak (*Lilium candidum* L.) Çiçeğinde Kozmetik Amaçlı Kullanım için Bazı Enzim, Antimikrobiyal, Vitamin ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. XXVI Ulusal Kimya Kongresi, 1-6 Ekim 2012, Muğla, Türkiye.

C14. Demir Nazan, Uçkaya Fatih, Demiray Ayşe, Demir Yaşar, **Işık Ceyhun** (2012). Bataklık Süseni (*Iris Pseudacorus*) Bitkisinin Çiçeğinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, XXVI Ulusal Kimya Kongresi, 1-6 Ekim 2012, Muğla, Türkiye.

C15. Ceyhun Işık, İbrahim Kıvrak, Nazan Demir, Yaşar Demir (2013). Kantaron Bitkisinin Esansiyel Yağ Kompozisyonu ve Aroma Verici Uçucu Organik Bileşiklerinin Belirlenmesi. 3.Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 17-19 Şubat 2013, Antalya, Türkiye.

C16. Nazan Demir, **Ceyhun Işık**, Yaşar Demir, Meryem Uçkaya (2013). Yer Elmasından (*Heliantus Tuberosus*) Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Tanımlanması Ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisitlerin Etkisinin İncelenmesi. XIII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 15-18 Mayıs 2013, Burdur, Türkiye.

C17. Ceyhun Işık, Nazan Demir, Yaşar Demir (2014). Hint İnciri (*Opuntia ficus-indica*) Meyvelerinin Biyokimyasal Aktivitelerinin Araştırılması ve İlaç Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. 21.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 28 Mayıs-1 Haziran 2014, Nevşehir, Türkiye.

C18. Ceyhun Işık, Nazan Demir (2014). Muğla’da Yetişen Yerel Güllerin Biyokimyasal Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Endüstriyel Amaçlı Kullanılabilirliğinin Araştırılması. 21. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 28 Mayıs-1 Haziran 2014, Nevşehir, Türkiye.

C19. Ceyhun Işık, Nazan Demir, Yaşar Demir (2014). Hint İnciri (*Opuntia ficus-indica*) Bitkisinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.

C20. Ceyhun Işık, İbrahim Kıvrak, Nazan Demir, Yaşar Demir (2014). Mis Zambağının (*Lilium candidum* L.) Serbest Amino Asit İçeriğinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.

2. Proje Faaliyetleri

GÖREV TÜRÜ	PROJE ADI	KURULUŞ
Araştırmacı	TÜBİTAK-218Z092 Elektroçirime Yöntemi ile Sentezlenen Yeni Nanofiber Membran Platformlara Arginaz Enziminin İmmobilizasyonu ve Uygulanabilirliğinin Araştırılması	TÜBİTAK 1002-Uluslararası (218Z092) 2019-Devam Ediyor
Araştırmacı	MUBAP19/076/04/1 Arginaz Enziminin İmmobilizasyonu Ve Uygulamalarına Yönelik Nanofiber Membran Platformlarının Hazırlanması	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Destek Programları (MUBAP19/076/04/1) 2019-Devam Ediyor
Araştırmacı	MUBAP18/032 Manyetik pHEMA Nanojellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Üreaz İmmobilizasyonunda Kullanımı	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Destek Programları (MUBAP18/032) 2018-2019
Araştırmacı	MUBAP15/138 Portakal ve Limon Meyvelerinden Gıda Boyası, Gıda Aroması ve Pektin Üretimi	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Destek Programları (MUBAP15/138) 2015-2017