

**POLİMERİK NANOKOMPOZİTLERE  
BİYOMOLEKÜLLERİN İMMOBİLİZASYONU  
VE ELDE EDİLEN YAPILARIN  
ENDÜSTRİYEL KULLANIM ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

**IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES  
ON POLYMERIC NANOCOMPOSITES AND  
RESEARCH OF THEIR INDUSTRIAL APPLICATIONS**

**SEDEF İLK**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**  
'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

  
.....  
Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Üye (Danışman)

  
.....  
Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

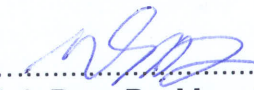
Üye (Yrd. Danışman)

  
.....  
Prof. Dr. Zakir RZAYEV

Üye

  
.....  
Doç. Dr. Eylem ÖZTÜRK GÜVEN

Üye

  
.....  
Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ...../...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca ...../...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# POLİMERİK NANOKOMPOZİTLERE BİYOMOLEKÜLLERİN İMMOBİLİZASYONU VE ELDE EDİLEN YAPILARIN ENDÜSTRİYEL KULLANIM ALANLARININ ARAŞTIRILMASI

SEDEF İLK

## ÖZ

Yapılan çalışmada, endüstriyel öneme sahip lakkaz enzimi nanokompozitlere immobilize edilerek reaktif boyar maddenin (Reactive Red 5) renk gideriminde kullanıldı. Bu amaçla, tez kapsamında poli(maleik anhidrit-*alt*-metil vinil eter) kopolimeri/oktadesil montmorillonit; [poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT] ve poli(MA-*alt*-MVE)-*g*-PLA/ODA-MMT nanokompozitleri sentezlendi ve bu nanoyapılara, fiziksel adsorpsiyon yoluyla lakkaz immobilize edildi.

Çalışmanın ilk aşamasında, kopolimer/ODA-MMT ve kopolimer-*g*-PLA/ODA-MMT nanokompozit yapıların sentezlenmesinde, silikat galerisindeki kopolimerin interkalasyon/yapraklanma ve laktik asit ve 1.4 dioksan ortamlarında, ODA-MMT varlığında kopolimer üzerine laktik asit monomerinin interlameller aşı kopolimerizasyonu yöntemleri kullanılmıştır.

Sentezlenen nanokompozitlerin, kimyasal ve fiziksel yapıları, yüzey ve iç morfojileri, termal davranışları, yapı-düzen-morfoloji ilişkileri; FTIR, <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR, XRD, SEM, TEM, DSC ve TGA analiz yöntemleriyle incelendi.

Çalışmanın ikinci aşamasında, sentezlenen bu nanoyapılara uygun lakkaz immobilizasyonu için optimum koşullar pH:4.5 , sıcaklık 37°C, lakkaz başlangıç konsantrasyonu 0.025 mg/ml , zaman ise 60 dakika olarak belirlendi.

Çalışmanın son aşamasında ise serbest lakkaz ve nanoyapılara immobilize lakkaz ile endüstriyel tekstil boyası olarak "Reactive Red 5" boyar madde renk giderimi çalışmalarında kullanıldı. Yüksek renk giderimi için optimizasyon çalışmalarında serbest ve immobilize lakkaz içi optimum pH'nın 5.0, sıcaklığın 20°C bulundu. Bunun yanında başlangıç boyar madde konsantrasyonu serbest lakkaz için 0,025 mg/L iken

immobilize lakkazda 0,05 mg/L bulundu. Optimum zaman çalışmalarında ise serbest lakkaz için 120 dakika, immobilize lakkaz için ise 90 dakika bulundu. Lakkaz, 4<sup>0</sup>C'de depolanarak zamana karşı renk giderimde verimliliği incelendiğinde serbest enzimin 27 gün sonunda %33 buna karşın immobilize lakkazın ise %65 olduğu gözlendi. Çalışmanın önemli diğer basamağı ise renk giderimi çalışmalarında kullanılan nanoyapıya immobilize lakkaz kompleksinin,  günde 10 kez tekrar kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %77.3 n korumaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sentez, kopolimer-g-PLA nanokompozitler, organo kil, aşı kopolimerizasyonu, enzim immobilizasyonu, lakkaz, boyar madde renk giderimi

Danışman: Prof. Dr. Necdet SAğLAM, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Eş Danışman: Prof. Dr. Zakir M. O. Rzayev, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

# IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON POLYMERIC NANOCOMPOSITES AND RESEARCH OF THEIR INDUSTRIAL APPLICATIONS

SEDEF İLK

## ABSTRACT

In this study, laccase enzyme (E.C.1.10.3.2.) with industrial importance was used in the decolorization of reactive coloring substance (Reactive Red 5) by being immobilized to nanocomposites. For this purpose, in the thesis study, laccase was immobilized onto nanocomposite structures [poly(MA-*alt*-MVE) copolymer/ODA-MMT and poly(MA-*alt*-MVE)-*g*-PLA/ODA-MMT] by physical absorption method.

In the first stage of the study, novel nanocomposites were synthesized by intercalation/exfoliation of copolymer between silicate galleries and interlamellar graft copolymerization of L-lactic acid (LA) monomer onto copolymer in the presence of ODA-MMT clay in 1,4-dioxane and LA solutions.

The chemical and physical structures, surface and inner morphology, thermal behaviors of synthesized nanocomposites, as well as structure-composition-morphology relationships were investigated by FTIR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, XRD, SEM, TEM DSC and TGA analysis methods.

In the second stage of the study, the optimum conditions for the laccase immobilization, which was appropriate for the synthesized nanostructures, were determined as pH:4.5, temperature 37°C, laccase initial concentration 0.025 mg/ml, and time as 60 minutes.

In the last stage, free and the immobilized laccase “Reactive Red 5” coloring substance as industrial textile dye were used for decolorization. In the optimization studies for high level decolorization, for both free and immobilized laccase, the optimum pH was found to be 5.0 and temperature 20 °C. Moreover, the initial coloring substance concentration was for free laccase 0,025 mg/L and 0,05 mg/L for immobilized laccase. Optimum time studies resulted in 120 minutes for free laccase

and 90 minutes for immobilized laccase. When the productivity of laccase, maintained at 4<sup>0</sup>C, in terms of decolorization and with respect to time was studied, at the end of 27 days, free enzyme was 33% while immobilized laccase was 65%. Another aspect of this study is the reapplication of immobilized laccase complex to the nanostructure for 10 times over a period of three days; it was found that 77.3% of the initial productivity is maintained.

**Keywords:** Synthesis, copolymer-g-PLA nanocomposites, organoclay, graft copolymerization, enzyme immobilization, laccase, removing of azo dyes

Advisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM, Hacettepe University, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Co-advisor: Prof. Dr. Zakir M. O. Rzayev, Hacettepe University, Nanotechnology and Nanomedicine Division

## TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi bünyesine katıldığım günden bu yana akademik ve akademik olmayan tüm konularda yardımlarını eksik etmeyen, lisans ve yüksek lisans çalışmalarım süresince benden ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez danışmanım ve çok değerli hocam Prof. Dr. Necdet Sağlam'a,

Çalışmalarım süresince geniş bilgi birikimini ve tecrübesini benimle paylaşan, her türlü yardımını ve anlayışını benden esirgemeyen çok değerli tez danışmanım ve hocam Prof. Dr. Zakir M. O. Rzayev'e,

Deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve manevi olarak her zaman yanımda hissettiğim, bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu'nun tüm üyelerine,

Tez çalışmam boyunca bilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Ahmet Çabuk'a, Doç. Dr. Mustafa Türk'e ve Yrd. Doç. Dr. Mesut Şam'a,

Çalışmada yapılan analizlerde, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen ve desteklerini her zaman hissettiğim Prof. Dr. Günay Kibarer ve çok kıymetli hocam Dr. Deniz Demircan Bozdoğan'a,

Tüm yüksek lisans hayatım ve akademik çalışmalarım sırasında yanımda olup benden yardımlarını, sonsuz hoşgörüsünü esirgemeyen, beni yüreklendiren arkadaşlarım Güler Ortaç ve Göknur Kara'ya,

Ve tüm yaşamım ve okul hayatım boyunca maddi manevi her konuda beni sonuna kadar destekleyen, her zaman yüreğimde sevgilerini hissettiğim ve borçlarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem ve babama,

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Sedef İlk

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZ</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Nanodolgu Maddeleri.....	4
2.1.1. Killer .....	7
2.1.1.1. Killerin yapısı.....	7
2.1.1.2. Montmorillonit .....	9
2.2. Nanokompozitler .....	12
2.2.1. Nanokompozitlerin sentez yöntemleri .....	13
2.2.2. Nanokompozitlerin sınıflandırılması.....	15
2.2.2.1. Nanokompozitlerin yapılarına göre sınıflandırılması.....	15
2.2.2.2. Nanokompozitlerin matrisine göre sınıflandırılması.....	18
2.2.2.3. Nanokompozitlerin boyutsal özelliklerine göre sınıflandırılması.....	18
2.2.3.Nanokompozitlerin özellikleri .....	20
2.2.4. Nanokompozitlerin kullanım alanları.....	21
2.2.5. Polimer/kil nanokompozitler.....	22
2.2.5.1. Maleik anhidritin alternatif kopolimerleri ve nanokompozitler .....	22
2.2.5.2. Poli(laktik asit) ve nanokompozitler.....	25
2.2.6. Polimer nanokompozitlerin yapı ve özelliklerini inceleyen analiz yöntemleri.....	27
2.2.6.1. Kimyasal yapılar (FTIR, <sup>1</sup> H NMR ve <sup>13</sup> C NMR) .....	27
2.2.6.2. Fiziksel yapılar (XRD analizleri).....	27
2.2.6.3. Yüzey ve iç morfolojileri (SEM ve TEM analizleri).....	28
2.2.6.4. Termal davranışları (DSC ve TGA -DTG).....	29



## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

### Sayfa

2.3. Lakkaz ve Yapısı .....	29
2.4. İmmobilizasyon ve İmmobilizasyon Yöntemleri .....	33
2.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri .....	36
2.4.1.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemi .....	36
2.4.1.2. Çapraz bağlama yöntemi.....	39
2.4.1.3. Tutuklama yöntemi.....	40
2.5. İmmobilizasyon ile İlgili Çalışmalar .....	41
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>44</b>
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Mikroorganizmalar.....	44
3.2. Yöntem.. .....	44
3.2.1. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi.....	45
3.2.1.1. Çözücü olarak polilaktik asit kullanılarak poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi .....	45
3.2.1.2. Çözücü olarak 1,4 dioksan kullanılarak poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi .....	46
3.2.1.3. Çözücü olarak fosfat tamponu kullanılarak poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi .....	47
3.2.2. Sentezlenen nanokompozitlerin karakterizasyonu.....	48
3.2.2.1. Kimyasal yapılar (FTIR, <sup>1</sup> H NMR ve <sup>13</sup> C NMR).....	48
3.2.2.2. Fiziksel yapılar (XRD analizleri).....	49
3.2.2.3. Yüzey ve iç morfolojileri (SEM ve TEM analizleri).....	49
3.2.2.4. Termal davranışları (DSC ve TGA-DTG) .....	49
3.2.3. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerinin antimikrobsal ve antitümör etkilerinin araştırılması .....	50
3.2.3.1. Antimikrobsal etkinin incelenmesi.....	50
3.2.3.2. Antitümör etkinin araştırılması.....	51
3.2.4. Lakkaz enzimi sentezi .....	52
3.2.5. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompozitlere enzim immobilizasyonu ve optimizasyon koşullarının incelenmesi.....	53
3.2.5.1. Lakkaz kalibrasyon eğrisinin hazırlanması .....	54
3.2.5.2. İmmobilizasyon koşullarına pH etkisi.....	54

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

### Sayfa

3.2.5.3. İmmobilizasyon koşullarına başlangıç lakkaz konsantrasyonu etkisi.....	54
3.2.5.4. İmmobilizasyon koşullarına sıcaklık etkisi.....	55
3.2.5.5. İmmobilizasyon koşullarına temas süresi etkisi.....	55
3.2.5.6. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin tayini .....	55
3.2.6. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk gideriminin ve optimizasyon çalışmalarının incelenmesi.....	56
3.2.6.1.“Reactive Red 5” boyar madde kalibrasyon eğrisi.....	57
3.2.6.2. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam pH'nın etkisi.....	57
3.2.6.3. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine başlangıç boyarmadde konsantrasyonu etkisi.....	58
3.2.6.4. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam sıcaklığı etkisi.....	59
3.2.6.5. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine temas süresi etkisi .....	60
3.2.6.6. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine depolanma süresinin etkisi .....	61
3.2.6.7.“Reactive Red 5” boyar madde renk gideriminin immobilize enzimin kullanım sayısı ile değişimi .....	61
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>62</b>
4.1. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT Nanokompozit Karakterizasyonu.....	62
4.1.1. Kimyasal yapıların (FTIR, <sup>1</sup> H NMR ve <sup>13</sup> C NMR) analizleri.....	62
4.1.1.1. FTIR analiz sonuçlarının incelenmesi .....	62
4.1.1.2. NMR ( <sup>1</sup> H NMR ve <sup>13</sup> C NMR ) analiz sonuçlarının incelenmesi.....	65
4.1.2. Fiziksel yapıların (XRD) analizleri .....	69
4.1.3. Yüzey ve iç morfoloji (SEM ve TEM ) analizleri.....	73
4.1.3.1. SEM analizleri.....	73
4.1.3.2.TEM analizleri.....	74
4.1.4. Termal davranışları (DSC ve TGA-DTG) .....	77
4.2. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT Nanokompozitine ait Antimikrobsal ve Antitümör Etkilerin İncelenmesi.....	78

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

### Sayfa

4.2.1. Antimikrobsal aktivitenin araştırılması .....	78
4.2.2. Antitümör aktivitenin araştırılması .....	81
4.3. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT Nanokompozite Lakkaz İmmobilizasyonu ve Optimizasyon Çalışmalarının İncelenmesi.....	82
4.3.1. Lakkaz kalibrasyon eğrisi.....	83
4.3.2. İmmobilizasyon koşullarına pH etkisi.....	84
4.3.3. İmmobilizasyon koşullarına başlangıç lakkaz konsantrasyonu etkisi.....	85
4.3.4. İmmobilizasyon koşullarına sıcaklık etkisi .....	86
4.3.5. İmmobilizasyon koşullarına temas süresinin etkisi.....	87
4.3.6. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin tayini .....	87
4.3.6.1. Serbest enzimin aktivitesinin tayini.....	87
4.3.6.2. İmmobilize enzim aktivitesinin tayini.....	88
4.4. Serbest ve İmmobilize Enzim ile “Reactive Red 5” Boyar Madde Renk Gideriminin ve Optimizasyon Çalışmalarının İncelenmesi.....	88
4.4.1.“Reactive Red 5” boyar madde kalibrasyonu.....	88
4.4.2.“Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi üzerine ortam pH’nın etkisi .....	89
4.4.3.“Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi üzerine başlangıç boyar madde konsantrasyonu etkisi .....	90
4.4.4.“Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi üzerine ortam sıcaklığının etkisi.....	92
4.4.5.“Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine temas süresinin etkisi etkisi.....	93
4.4.6. Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı.....	94
4.4.7. Tekrar kullanılabilirlik .....	95
<b>5. SONUÇLAR.....</b>	<b>97</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>104</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>118</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Nanokompozitlerde kullanılan nanodolgu maddeleri boyutları.....	6
Şekil2.2. Filosilikatların (2:1) atomik yapılarının ve kristal yapılarının gösterimi.....	8
Şekil 2.3. Montmorillonit simektit kilin SEM fotoğrafının şematik temsili.....	10
Şekil 2.4. Filosilikat tabaka yapıları.....	11
Şekil 2.5.Silikatlarda katyon değişimi.....	11
Şekil 2.6. Eş-anlı (In-Situ) polimerizasyon metodunun şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.7. Çözeltide polimer nüfuzu metodu şematik görünümü.....	14
Şekil 2.8. Eriyik fazda polimer nüfuzu metodu şematik görünümü .....	15
Şekil 2.9. Faz ayrışık mikrokompzit yapı.....	16
Şekil 2.10. Tabakalanmış yapı (intercalated).....	16
Şekil 2.11. Tabakalı yapı (exfoliated).....	17
Şekil 2.12. Tabakalı silikatlar ve polimerler arasındaki etkileşimden açığa çıkan farklı nanokompzit yapıları.....	17
Şekil 2.13. Nanokompzitlerin boyutsal özelliklerine göre sınıflandırılması.....	19
Şekil 2.14. Maleik anhidritin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.15. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	36
Şekil 2.16. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi.....	39
Şekil 3.1.Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT nanokompzitin (PLA ortamında) genel sentez şeması.....	46
Şekil 3.2. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT dioksan ortamında nanokompzitin genel sentez şeması.....	47
Şekil 4.1. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)( $M_n$ : $960 \times 10^3$ g/mol)/ODA-MMT nanokompzitin FTIR spektrumu.....	63
Şekil 4.2. Fonksiyonel kopolimer-g-PLA/ODA-MMT nanokompzitin FTIR spektrumu.....	64
Şekil 4.3. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE) /ODA-MMT nanokompzitin (dioksan ortamında) $^1H$ spektrumu. ....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.4. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE) ( $M_n = 1.13 \times 10^6$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ODA-MMT nanokompozitin $^1\text{H}$ ve $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.5. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE) ( $M_n = 960.000$ ve $485.000$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ODA-MMT nanokompozitlerin $^1\text{H}$ NMR spektrumu. ....	67
Şekil 4.6. Poly(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT( $M_n:960.000$ ) (%3) Dioksan ortamında sentezlenen nanokompozitin XRD spektrumu.....	69
Şekil 4.7. Saf ODA-MMT organokilin XRD spektrumu.....	70
Şekil 4.8. Çeşitli yöntemlerle sentezlenmiş Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)/ODA-MMT bazlı nanokompozitlerin $2\theta = 2-10$ XRD spektrumu.....	71
Şekil 4.9. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE) ( $M_n = 80.000$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ODA-MMT nanokompozitin XRD spektrumu.....	72
Şekil 4.10. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE) ( $M_n = 80.000$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ODA-MMT nanokompozitin SEM mikrografı.....	73
Şekil 4.11. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)( $M_n = 1.130.000$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ODA-MMT nanokompozitinin çeşitli boyutlarda oluşan nanoyapıların TEM iç morfoloji görüntüleri ve silikat tabakaların dağılımı.....	74
Şekil 4.12. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)( $M_n = 80.000$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ODA-MMT nanokompozitinin 100 nm ölçekte oluşan nanoyapıların TEM iç morfoloji görüntüleri.....	75
Şekil 4.13. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)( $M_n = 80.000$ g/mol)- <i>g</i> -PLA/ ODA-MMT nanokompozitinin 250 nm ölçekte oluşan "core-shell" morfoloji yapıların TEM iç morfoloji görüntüleri ve dağılımı.....	76
Şekil 4.14. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)( $M_n = 1.960 \times 10^3$ g/mol)/ODA-MMT nanokompozitin (Dioksan ortamında) DSC eğrileri.....	77
Şekil 4.15. Poli(MA- <i>alt</i> -MVE)( $M_n = 1.960.000$ g/mol) / ODA-MMT nanokompozitin (dioksan ortamında) TGA-DTG eğrileri.....	78
Şekil 4.16. Staphylococcus aureus üzerine antimikrobiyalaktivite testi.....	79
Şekil 4.17 Farklı molekül ağırlığındaki Poli(MA- <i>alt</i> -MVE) kopolimerlerinin Staphylococcus aureus ortamında oluşan antimikrobiyal zon grafiği .....	79
Şekil 4.18. Farklı molekül ağırlığındaki poli(MA- <i>alt</i> -MVE) kopolimerlerinin (PBS ortamında, pH:7.4) Staphylococcus aureus üzerine antimikrobiyal aktivite testi.....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.19. Farklı molekül ağırlığındaki poli(MA-alt-MVE) kopolimerlerinin (PBS ortamında, pH:7.4) Staphylococcus aureus üzerine antimikrobiyal zon grafiği.....	80
Şekil 4.20. Fosfat tamponu(ph:7.4) ortamında hazırlanan Poli(MA-alt-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerin farklı konsantrasyonlarda MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	81
Şekil 4.2. Lakkaz Kalibrasyon Eğrisi .....	83
Şekil 4.22. Lakkaz immobilizasyonuna pH etkisi.....	84
Şekil 4.23. Lakkaz başlangıç derişiminin adsorplanan lakkaz miktarına etkisi.....	85
Şekil 4.24. Sıcaklığın adsorplanan lakkaz miktarına etkisi.....	86
Şekil 4.25. Temas süresinin adsorplanan lakkaz miktarına etkisi.....	87
Şekil 4.26. Reaktif Red 5 Boyar Maddesinin Kalibrasyon Eğrisi.....	88
Şekil.4.27. Reaktif Red 5 boyarmadde renk giderimine ortam pH'nın etkisi.....	89
Şekil 4.28. Reaktif Red 5 boyar madde giderimine başlangıç boyar madde konsantrasyonunun etkisi.....	91
Şekil 4.29. Reaktif Red 5 boyar madde renk giderimine ortam sıcaklığının etkisi.....	92
Şekil 4.30. Reaktif Red 5 boyar madde renk giderimine temas süresinin etkisi.....	93
Şekil 4.31. Depo kararlılığı grafiği.....	94
Şekil 4.32. İmmobilize lakkaz enziminin tekrar kullanılabilme durumu.....	96

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri.....	35
Çizelge 4.1. Fiziksel ve kovalent bağlanma yöntemlerinde lakkaz immobilizasyonu.....	82
Çizelge 5.1 Fiziksel adsorpsiyon ve Kovalent bağlama immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Değiştirilerek uyarlanmıştır; Telefoncu,1986).....	100

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MMT	Montmorillonit
ODA-MMT	Oktadodesilamin Montmorillonit
K.D.K	Katyon Değişim Kapasitesi
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
MEK	Metil Etil Keton
DMF	<i>N,N</i> Dimetil Formamid
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçişli Elektron Mikroskobu
XRD	X-ışını difraktometresi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
<sup>1</sup> H NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
<sup>13</sup> CNMR	Karbon nükleer manyetik rezonans
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
TGA	Termal gravimetrik analiz
DTG	Diferansiyel termogravimetrik analiz

## 1. GİRİŞ

Tekstil sanayi, endüstri dalları arasında en çok su kullanılan alanlardan birisidir. Tekstil atık sularının renkli olması , bu atık suları diğer endüstriyel atık sularından ayıran en önemli özelliğidir. Tekstil endüstrisinde ortaya çıkan atık suların büyük bir kısmı boyama işlemlerinden kaynaklanmaktadır. Yeterli arıtma sağlanamaması durumunda, söz konusu atık sularda bulunan boyarmaddeler bulunduğu ortamlarda renk ve toksisite oluşumuna neden olmaktadır.

Atık sulardaki renk miktarı yüksek seviyelere ulaştığında, doğal sularda ışık geçirgenliğini azaltarak, fotosentezi engelleyebilmektedir. Ayrıca boyarmaddelerin bazı sucul organizmalarda birikmesi toksik ve kanserojenik ürünlerin meydana gelme riskini de beraberinde getirmektedir. Bu bağlamda boyarmadde içeren tekstil endüstrisi atık sularının renk giderim prosesleri ekolojik açıdan önem kazanmaktadır (Kocaer ve Alkan, 2000).

Atıkların yaratacağı sorunların giderilmesi için çeşitli arıtma sistemleri geliştirilmiştir, ancak bu sistemlerin kurulması ekonomiye önemli bir yük getirmektedir. Bu nedenle, çevre kirliliğine yol açan bazı zararlı maddelerin giderilmesinde düşük maliyetli ve etkin metotların geliştirilmesi ekonomik açıdan önemlidir.

Son yıllarda çevre kirliliğine yol açan atıkların daha etkin bir şekilde giderilmesi için geliştirilen yöntemler arasında biyoteknolojik yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Biyoteknoloji, organizmaların, biyolojik sistemlerin ve bunların süreçlerinin pratik ve ticari amaçlar için kullanılması olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojik süreçlerde temel kavram mikroorganizmaların atık maddeleri besin olarak kullanması ve çevreye zarar vermeyecek bileşiklere dönüştürmesidir (Dimile, 2005).

Mikroorganizmalar, atık maddeleri enzimatik olarak parçalamaktadırlar. Ancak mikroorganizma yerine doğrudan onlardan elde edilen enzimlerin kullanılması birçok avantaj sağlar (Park and Shalably, 1993). Enzimlerin kullanıldığı proseslerde, enzim kaynağı olarak, mikroorganizmaların kullanılması ile diğer yöntemlerde kullanılan havalandırma ve çöktürme tanklarına ihtiyaç olmadığı için, yatırım masrafları azalır. Enzimler seçici ve aktif biyomoleküllerdir ve bir destek üzerine tutuklandıklarında,



mikroorganizmalara göre daha geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışabilmektedirler. İmmobilizasyon ile enzimler, katalitik proseslerde aktifliklerini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanılabilirler.

İmmobilizasyon yönteminde destek olarak kullanılacak materyaller, kullanım amacına uygun şekilde seçilmelidir. Destek materyali, suda çözünmemeye, gözenekli yapıda olma, mekanik, kimyasal, biyolojik ve termal kararlılığa sahip olma gibi özelliklere sahip olmalıdır. İstenen özelliklerde hazırlanabilmesi ve maliyetlerinin düşük olması nedeniyle, polimerik materyaller daha çok kullanılmaktadırlar.

Bu tez çalışması kapsamında, tekstil atık sularında bulunan reaktif boyar madde "Reactive Red 5" renk giderimi, çalışma kapsamında sentezlenen poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlere immobilize lakkaz ile incelenmiştir.

Çalışmamız 3 aşamada gerçekleşmiştir:

1.Aşamada; Yapraklanma-absorpsiyon ve aşı polimerizasyonu yöntemleri ile yüzey katları oktadesil aminle modifiye edilen organik montmorillonit ODA-MMT eşliğinde çeşitli reaksiyon şartlarında poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitleri sentezlenmiştir.

Sentezlenen hibridlerin nano-yapılarının, termal ve kristalinite davranışlarının, taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu(TEM), X-ışını difraktometresi (XRD), FTIR ve <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektroskopisi, DSC-TGA ısısal analiz yöntemi kullanarak incelenmesi ve nano-yapı oluşumu mekanizmasının yapısal modellenmesi ve açıklanması, silikat tabakaları arası gerçekleşmesi beklenen fiziksel (H-bağı) ve kimyasal iletişimlerin incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

2.Aşamada; *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi, sentezlenen nano-kompozitlere fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiştir ve immobilizasyon için optimum koşullar incelenmiştir.

3.Aşamada ise; Bir nceki aşamada elde edilen immobilize lakkaz ile reaktif tekstil boyar maddelerinden "Reactive Red 5" renk giderimi için optimum koşullar araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında immobilize lakkaz ile yapılan bütün çalışmalar, serbest lakkaz ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Ayrıca boyar madde renk gideriminde, immobilize lakkazın depolanma ve tekrar kullanılma kararlılığı araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada elde edilen uygun süreçle reaktif boyarmaddelerin renk giderimi işlemlerinin en ekonomik şekilde gerçekleştirilmesinin yanı sıra insan ve evre sağlığı açısından en az zararlı ve uygun şekilde yapılması amaçlanmıştır. Çalışmanın temel amacında,boyar madde arıtımının verimli ve etkin bir şekilde yapılması ve arıtımda en az seviyede enzim ve enerji tüketiminin sağlanması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde deneysel kısmın daha iyi anlaşılabilmesi açısından nanokompozitler ve silikatların genel yapısı ve özellikleri, polimer silikat tabakalı nanokompozitler, lakkaz ve immobilizasyon ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

### 2.1. Nanodolgu Maddeleri

Polimerler genellikle performanslarını artırmak için çeşitli doğal ve sentetik bileşenlerle birlikte kullanılırlar. Bu bileşenler polimer dolgusu olarak adlandırılırlar. Nanodolgu maddeleri yıllardır plastik endüstrisinde büyük bir öneme sahiptir. Genellikle inorganik materyallerden oluşan nanodolgu maddelerini, diziliş ve yapısı itibarıyla polimer matriksinden farklı olan katı formdaki ek (ilave) maddeleri olarak tanımlayabiliriz. Dolgu maddelerinin modifiye edilip kullanılmasıyla, polimer daha kullanışlı hale gelir. Nanoboyuttaki bu partiküller, polimerlerin yüksek modül kazanmasını, dayanıklılığın artmasını, ısı direncinin artmasını, gaz geçirgenliğinin ve yanma özelliğinin azalmasını ve biyobozunurluğunun artmasını sağlar (Qinghui,2007). Nanodolgu maddeleri, kimyasal bağ oluşumunda, bir yapının doldurulmasında, polimer matriksinin konformasyonel pozisyonun düzenlenmesinde, birbirine yakın molekül gruplarının immobilizasyonunda ve ayrıca polimer matriksini yönlendirilmesi gibi bir çok uygulamada kullanılabilir. Nanodolgu maddelerinin; kalsiyum karbonat, seramik, karbon karası, sentetik(boehmit alüminyum), karbon nanotüp, karbon fiber, doğal fiber, seluloz, aktifleştirilmiş kil, doğal kil, sentetik kil, organokil, silika, montmorillonit, altın, gümüş, grafit, mika, talk, magnezyum hidroksit, fosfat, zinkoksit, polioliomerik silsesquoksan(POSS) nanodolgu maddeleri ([http://www.reade.com/Products/Nanomaterials/nanofillers\\_nanoadditives.html](http://www.reade.com/Products/Nanomaterials/nanofillers_nanoadditives.html)) gibi birçok çeşitleri vardır ve sayıları da gün geçtikçe artmaktadır.

Nanodolgu maddelerinin, destek özelliğine karar verilmesinde etkili ve yardımcı üç faktör vardır bunlar; partikül büyüklüğü, yapısı ve yüzey özellikleridir. Yukarıda bahsedilen bu üç özellikten dolgu malzemesinin partikül büyüklüğü en önemli etkiye sahiptir (Rothon ,1995; Blow,1971; Dick 2001; Eirich 1978). Bahsedilen güçlendirme teriminden kasıt; modulusta artış ve son özellikler olarak bilinen gerilim kuvveti, yırtılma direnci ve aşınma

direnci ile ilgili güçlendirmeler ile malzemenin nihai performansını arttırmaktır. Dolgu malzemelerinin partikül boyutu ve yapısı, yüzey alanı ve gözenekli yapı gibi karakteristik özellikleri (Vijayalekshmi V., 2009) vardır:

Partikül boyutu: Modulus ve gerilim kuvvetindeki artış, büyük bir oranda dolgu maddesinin partikül boyutuna bağlıdır. Daha küçük boyutlardaki dolgular büyük boyuttakilere oranla bileşime daha büyük destek sağlarlar. Partikül boyutu direk olarak dolgunun gram başına düşen yüzey alanıyla ters orantılı olduğu için, ana yapının matriks fazıyla temasta olan yüzey alanındaki artış aynı oranda destekte artışa sebep olacaktır. Partikül boyutunu düşürmek aynı zamanda polimer-dolgu etkileşimlerini başarılı bir şekilde etkileyecektir. Ortalama partikül boyutuna ek olarak, aynı zamanda matriks fazında partikül dağılımının da yapıyı güçlendirmede belirgin etkileri vardır.

Yüzey alanı: Destek derecesini belirleyen en önemli faktör, geniş polimer-dolgu malzemesi arayüzeyi geliştirmektir ve bu da sadece koloidal boyutlardaki partiküllerle sağlanabilir. Partiküle edilmiş katının yüzey alanı partikül büyüklüğüne bağlıdır. Gerçekte, partiküllerin boyutları çeşitli ve genellikle küreselden farklıdır. Aynı partikül boyutuna sahip farklı dolgu malzemeleri; silika ve karbon siyahı örneğinde olduğu gibi aynı desteği sağlamazlar. Aynı zamanda, partikül şekli de küresel, kübik, prizmatik, tübüler, pulsu, uzun gibi farklı dolgu malzemeleri için farklılıklar gösterebilir. Küresel olmayan partiküller daha başarılı destek sağlayabilirler.

Gözenekli yapı: Gözenekli yapı karbon karasının karakteristik özelliği olduğu gibi başka tanecikli dolgu tiplerinde de görülebilir. Yüksek derecede destek gerekmeyen durumlarda; Silikalar, killer, kalsiyum karbonat ve diğer mineral dolgu ve malzemeleri yaygın olarak kullanılır.

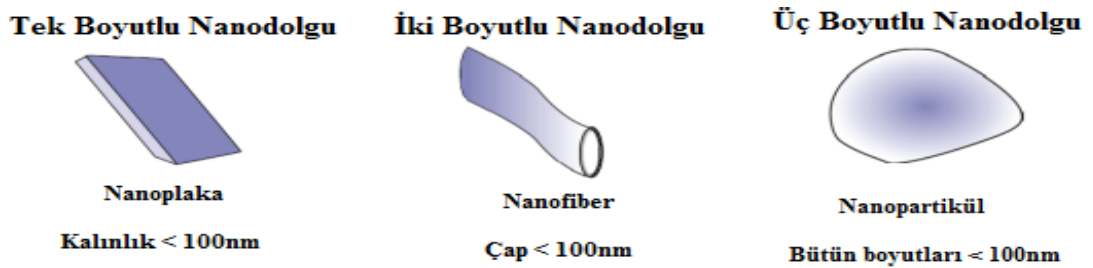
Partikül yapısı: Nanokompozit bileşiminin performansında yüzey alanına ek olarak dolgu şekli de etkili önemli bir faktördür. Mineralin kristal formuna bağlı olarak, inorganik ve mineral dolgular partikül geometrisinde dikkate değer farklılıklara sahiptir. Yüksek açılı oranına sahip destek partikülünün ve onun matrikse yapışmasının, kompozitin son özelliklerini kontrol edebilmek açısından büyük önemi vardır.

Kompozit materyalin özellikleri organik matriks ve nanodolgu maddelerinin belirli oranlarda karıştırılmasıyla önemli ölçüde etkilenir. Karbon karası, silikat ve diatomit gibi maddeler yıllardır polimer nanokompozitlerde, katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Ancak dolgu maddelerinin nanometrik boyutta anlaşılabilen karakterizasyonları ve özellikleri uzun yıllardır anlaşılammıştır (Guillaume et al., 2011). Nanokompozitlerle ilgili asıl başlangıç noktası nanodolgu maddelerinin işlevselliğinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Moleküler boyutta kuvvetlendirilmiş polimerin varlığında nanokompozitler, makroskobik boyutta aynı yöntem ile yapılmış kompozitlere göre, iki fazlı materyaller olarak yeni bir oluşum gösterirler. Bu yapıda, polimer yapıları ve polimer tabakalarının arasına nüfüs etmiş nanodolgu maddeleri olarak iki fazlı materyaller meydana gelmektedir (Biron, 2004; Gloaguen and Lefevre, 2007). Nanokompozitlerin özelliklerinin oluşması için temel olan iki parametre, nanodolgu maddesinin yayılması ve matriksle etkileşime girmesidir. Her iki parametre de dolgumaddesinin yüzeyinde meydana gelen kimyasal olaylardan etkilenir. Nanokompozitler nanodolgu maddelerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar (Guillaume et al., 2011) :

Bir boyutlu nanodolgu maddeleri: Plaka, zar, tabaka formundaki yapılar

İki boyutlu nanodolgu maddeleri: 0.1 µm çapından daha küçük çapa sahip nanotüp ve nanolifler

Üç boyutlu nanodolgu maddeleri: Nanometre boyutundaki silika boncuklar gibi eş boyuttaki nanopartiküller



Şekil 2.1. Nanokompozitlerde kullanılan nanodolgu maddeleri boyutları (ISO/TS27687, 2008)

En yaygın olarak kullanılan nanodolgu maddesi, doğada bol miktarda bulunduğundan ve yüksek biçimlendirme olanağından dolayı killerdir.

### **2.1.1. Killer**

Kil, ince taneli minerallerden meydana gelen ve doğal olarak oluşan hidratlaşmış alüminyum silikattır. AIPEA (Association International Pour L' etude des Argiles) terimler komitesinin tanımına göre killer; toprağın doğal olarak meydana gelmiş ve ince taneli minerallerden oluşan kısmıdır (Alemdar, 2001). Killer, kil mineralleri, kil dışı mineraller ve az da olsa hayvansal ya da bitkisel artıklardan oluşan organik maddeler içeren mineral karışımlardır.

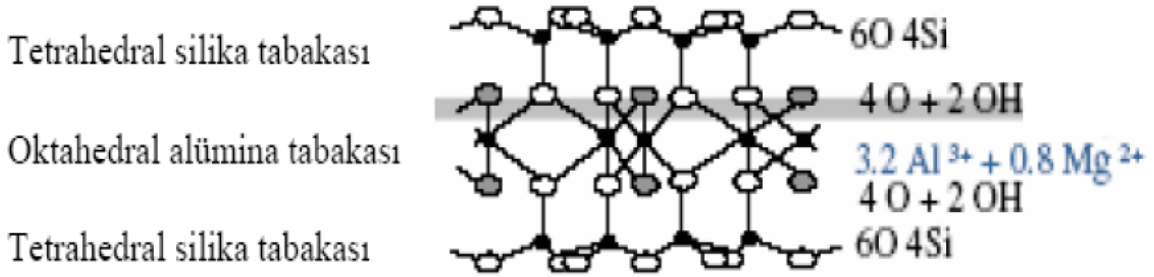
Kil minerallerine, sulu silikatlar veya alüminyum silikatlar denir. Fakat bazı minerallerde alüminyum yerine demir veya magnezyum bulunur. Bu mineraller toprakların, sedimentlerin ve kayaların koloidal fraksiyonunu oluşturmaktadırlar. Killeri kayalardan ayıran en önemli özellikleri, killer çok küçük boyutlu ve geniş yüzey alanlı kristallerden meydana gelir. Ayrıca killer yüksek adsorbsiyon özelliğine sahiptir. Killer tarihten bu yana ucuz maliyetleri, kolay ve bol miktarlarda bulunabilmeleri ayrıca adsorplama, plastiklik, kation değiştirme ve düşük poroziteye sahip olabilme gibi özelliklerinden dolayı endüstride yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Luckham and Rossi,1999).

#### **2.1.1.1. Killerin yapısı**

Kil mineralleri, oktahedral ve tetrahedral yapı olmak üzere iki tip atomik kristal yapıdan oluşur. Kil minerallerinin kristal yapıları; bu iki tip yapının oluşturdukları örgü tabakalarının farklı kombinasyonlarla üst üste gelmeleri ile oluşur. Oktahedral yapı üçer hidroksil ya da oksijenden oluşur ve iki tabaka arasında sıkı bir şekilde paketlenmiş kation (alüminyum, demir ya da magnezyum) atomu modeli sergiler. Bu yapı birimine gibsit adı verilir. Tetrahedral (silika) yapıda ise kenarlarda oksijen atomu bulunan bir düzgün dört yüzlünün ortasına bir silikon atomunun yerleşmiştir ve SiO<sub>2</sub> olarak ifade edilir. Kil mineralleri, oktahedral ve tetrahedral temel birimlerinin oluşturdukları farklı kombinasyonlara göre sınıflandırılırlar. Oluşan tabakalar bir tetrahedral, bir oktahedral

ise 1:1 tabakalı, iki tetrahedral, bir oktahedral ise 2:1 tabakalı, iki oktahedral, bir tetrahedral ve bir oktahedral ise 2:1+1 tabakalı olarak adlandırılır (Grim, 1953).

Filosilikatlar ise iki adet tetrahedral silikat tabakasının arasına bağlanmış  $Al^{+3}$  veya  $Mg^{+2}$  gibi metal iyonları, hidroksil grupları ve oksijen grupları içeren oktahedral tabakadan oluşur (Şekil 2.2.). Silikat galerisinde meydana gelen izomorfik değişimlerden dolayı ( $Al^{+3}$ 'ün  $Mg^{+2}$  ya da  $Mg^{+2}$ 'nin  $Li^+$  ile) galeri içinde negatif yük açığa çıkmakta ve bu negatif yük yine galerilerde yer alan alkali ya da toprak alkali metallerle dengelenmektedir (Gianellis, 1996).



Şekil 2.2. Filosilikatların (2:1) atomik yapılarının ve kristal yapılarının gösterimi

Killer ile ilgili yapılan ilk çalışmalar kilin mineralojik yapısı, farklı yapıdaki killerin sınıflandırılması, kimyasal tanımlanması, içyapısının aydınlatılması, sudaki şişme özelliğinin belirlenmesi ile ilgilidir. Kil parçacıklarının mineralojik yapıları anlaşıldıkça, killerin farklı maddeler, özellikle polimerler üzerindeki etkisi araştırılmaya başlanmıştır (Grim,1953; Searle and Grimshaw, 1960; Van Olphen,1977; Hoffman and Brindley, 1960; Worrall, 1986; Okada et al., 1990).

Kil parçacıklarının özelliklerinin geliştirilmesiyle birlikte 1950'lerden itibaren kil-polimer kompozitleri sentezlenmeye başlanmıştır. Araştırmalar ışığında killerin katkı malzemeleri ile olan etkileşimleri farklı tekniklerle karakterize edilmiştir ve kil tanelerinin yüzey yüklerinin ve silis tabakaları arasındaki mesafelerin değiştirilmesi ile etkileşimlerinin değiştirilebileceği anlaşılmıştır. Killerin tabakaları arasındaki mesafenin arttırılması killerin başka malzemeler ile etkileşimlerini kolaylaştırmaktadır. Tabakalar arasını

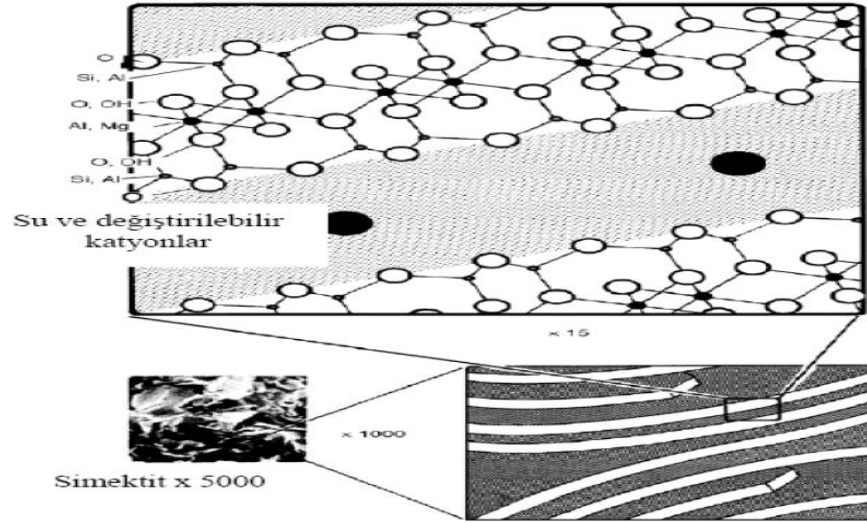
açmanın en kolay yolu kilin değişebilir katyonlarını alkil amonyum tuzları ile değiştirmektir. Böylece kile ilave edilen herhangi bir malzeme kilin yüzeyleriyle olduğu kadar tabakalar arasına girerek kilin iç yüzeyi ile de etkileşebilir duruma gelebilecektir (İşçi, 2007).

Killer polimer endüstrisinde, polimerin fiziksel-mekaniksel özelliklerini iyileştirmek için kuvvetlendirici amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Kilin polimer özelliklerini değiştirme etkisi, kilin partikül büyüklüğüne bağlı olan polimer matriksindeki dispersiyon derecesi tarafından belirlenmektedir. Bununla beraber kil yüzeyinin hidrofilik yapısı, organik polimer fazındaki homojen dispersiyonunu engellemektedir (Huang et al., 2001). Killer yüzeydeki OH gruplarından dolayı hidrofilitirler ve bu nedenle organik surfektanlarla muamele edilerek modifiye edilmelidirler. Killer, değişik özelliklerde kompleksler oluşturmak için kuaterner amonyum katyonları gibi organik bileşiklerle etkileşmektedir. Organik olarak modifiye olmuş kil nanokompozitlerin hazırlanması için kullanılır. Organik killer; kağıtta, kozmetikte, ilaç ve boya endüstrisinde kullanılmaktadır (Mortland, 1970). Ağırlıkça %10 kil ilavesi mekaniksel, termal, boyutsal ve bariyer performansı özelliklerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Çünkü nano ölçekte kil ve polimer arasındaki temas alanı oldukça büyüktür (Park et al., 2001). Ticari kil-nanokompozitler içinde en çok kullanılan kil tipi Montmorillonit (MMT)'dir.

#### **2.1.1.2. Montmorillonit**

Montmorillonit, hektorit, saponit, formika, florohektorit, vermikalit ve kaolinitten oluşan tabakalı silikat ailesindedir. Damour ve Salvetat (1847) tarafından Fransa'nın Montmorillon bölgesinde bulunan minerale "Montmorillonit (MMT)" adı verilmiştir. Montmorillonit, filosilikat minerallerin smektit grubu killerine dahildir ve oktahedral alümina tabakasının iki tetrahedral silika tabakaları arasında sıkışmasıyla meydana gelen katmanlardan oluşan 2:1 tabakalı yapıya sahiptir (Chigwada, 2005).

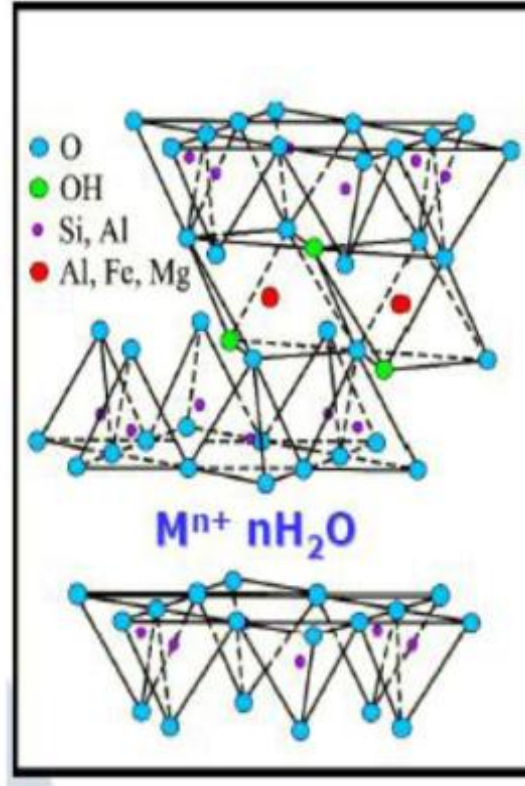




Şekil 2.3. Montmorillonit simektit kilin SEM fotoğrafının Şematik temsili (Carrado, 2003).

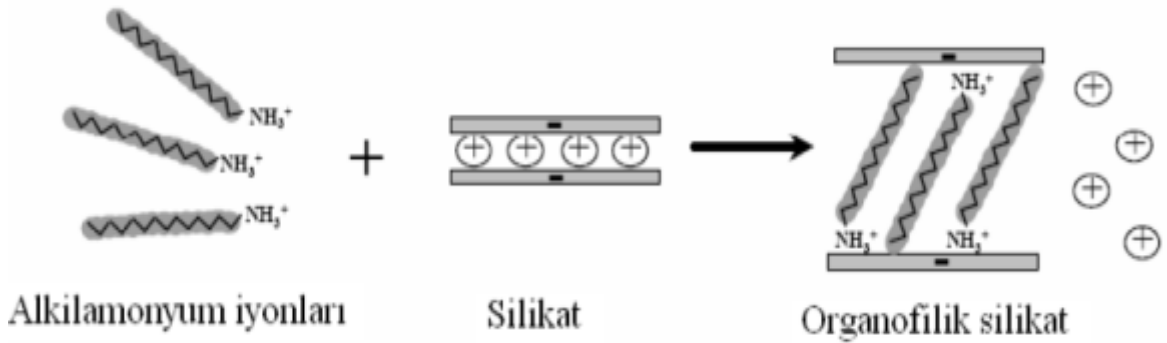
Montmorillonit katmanları arasında bulunan iyonlar, inorganik veya organik katyonlar ile yer değişebilir ve doğal olarak hidratize durumdadırlar. Burada bulunan inorganik katyonlara “Değişebilir Katyonlar” denir. Montmorillonit mineralinin ve diğer kil minerallerinin 100 gramında bulunan değisebilir inorganik katyonların, mili eşdeger molar ktle sayısına “Katyon Değişim Kapasitesi” (K.D.K.) denir. Bu değer tabakadan tabakaya değişen ortalama bir değer olarak kabul edilir (Durmuş, 2006). Tabakalardaki yk eksikliğine ve katyonlara bağlı olarak tek veya çok tabakalı adsorpsiyon görülebilir (Grimshaw, 1971).

Diğer tabakalı silikatlarda olduğu gibi MMT’de doğal olarak hidrofildir ve çoğu polimer ile uyumsuzdur. Nanokompozit oluşumu ve polimer ile inorganik faz arasında etkileşimin olması için öncelikle yzeyi organofilik yapmak gerekir. Montmorillonitler, polimer matrisinin inorganik bileşeni arasındaki olumlu etkileşimleri elde etmek için kolaylıkla yzeyssel olarak modifiye olabilmektedirler. Bu modifikasyon alkil amonyum gibi katyonik yzey aktif maddeler ile MMT’deki inorganik katyonların iyon değişim reaksiyonu yoluyla yer değiştirmesi ile gerçekleşir. Alkil amonyum iyonları silikat tabakaları arasındaki elektrostatik etkileşimi indirgeyerek galeriler arasına polimer difüzyonunu kolaylaştırır (Doh and Choa,1998).



Şekil 2.4. Filosilikat tabaka yapıları (Chigwada, 2005).

Alkil amonyum iyonları; tabakalar arasında yerleşmiş iyonlarla çok kolay yer değiştirdikleri için çok yaygın olarak kullanılırlar. Alkil amonyum iyonlarının tabakalar arasında farklı yapılar oluşturması, kil tabakasının yük yoğunluğuna bağlıdır. Amonyum iyonlarının, silikat tabakaları arasında elektrostatik etkileşimi düşürmesinden dolayı polimerin galeri içinde dağılımı kolaylaşır (Özden, 2004).



Şekil 2.5. Silikatlarda katyon değişimi (Zheng, 2005)

MMT'de bulunan silika tabakaları arasındaki katyon değişim kapasitesi, interkalasyon, şişme, gözeneklilik ve katalitik aktivite gibi ilginç özellikler sunar. Özellikle yüksek şişme kapasitesi polimerin etkin interkalasyonu için önemlidir (Wang et al., 2004). Bugün MMT bu özelliklerinden dolayı tüm kil mineralleri içerisinde en çok tercih edilen malzemedir (Seymour and Deanin,1987).

## 2.2. Nanokompozitler

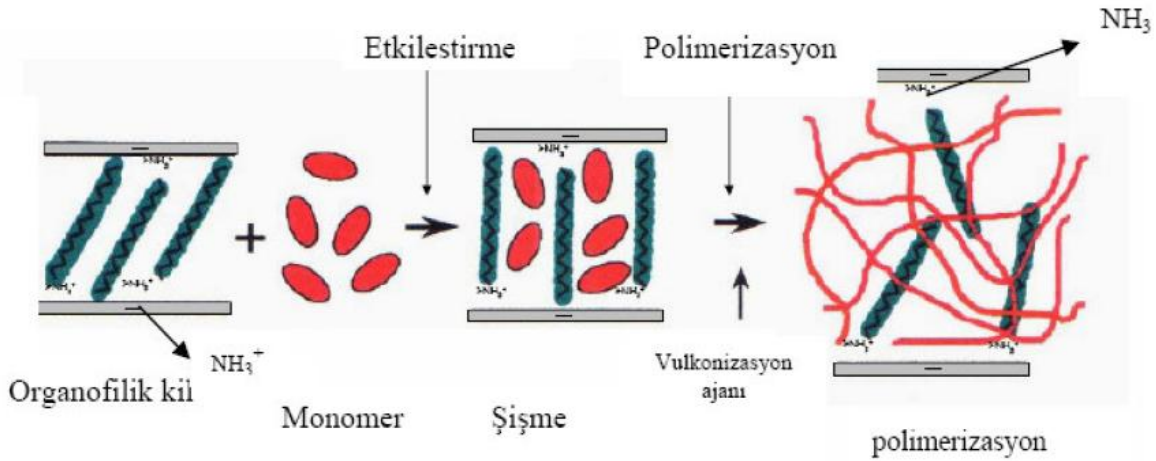
Kompozit malzemeler, iki veya daha fazla sayıdaki malzemelerin, en iyi özelliklerini bir araya toplamak ya da ortaya yeni bir özellik çıkarmak amacıyla, bu malzemelerin makro seviyede birleştirilmesiyle oluşan malzemelerdir. Nanokompozit malzemeler ise 1-100 nm aralığında ultra ince inorganik taneciklerden oluşmuş yeni teknoloji malzemelerdir ve kompozitlerin yeni bir sınıfıdır. Nanokompozit oluşumların gelişmiş yanma geciktirici özellikleri, arttırılmış eğilme modülleri ve ısıl şekil değiştirme sıcaklıkları ile düşük geçirgenlik özellikleri avantaj sağlamaktadır. Bunun yanında, sisteme güçlenme, iletkenlik, sertlik gibi farklı özellikler katan materyaller de içerebilir (Chigwada, 2005).

Nanokompozit üretimine yönelik olarak yapılan ilk öncül çalışmalar, 1993 (Usuki et al.) yılında yayınlanmıştır. Japonya'da Toyota'nın araştırma-geliştirme merkezi tarafından yapılan bu çalışmalarda polyamid-6-nanokil "hibrit" materyalinden bahsedilmektedir. Araştırmacılar, polyamid-6'nın sentezlenmesinde sisteme ilave ettikleri kil minerallerinin davranışlarını incelemişlerdir ve kil minerallerinin bu organik gruplarla etkileşime girdiği ve polyamid-6'nın termal kararlılığını ve mekanik dayanımını artırdığı anlaşılmıştır (Yano et al., 1993; Yu et al., 2004-a). Şimdi bu nanokompozit Toyota arabalarının motorlarının ateşleme zaman panel kapağı üretiminde kullanılmaktadır (Marco, 2000). Daha sonra hızla bu alanda çalışmaların ilerlemesiyle "nanokompozit " terimi (Lan and Pinnavaia, 1994, 1995; Giannelis, 1996) çalışmalarda kullanılmıştır. Bununla beraber nanokompozitler ile ilgili birçok araştırma başlamıştır.

### 2.2.1. Nanokompozitlerin sentez yöntemleri

Polimer silikat nanokompozit hazırlamak için işleme tekniğine göre kullanılan en yaygın üç metod vardır. Bu metodlar şu şekilde özetlenebilir (Zheng, 2005) :

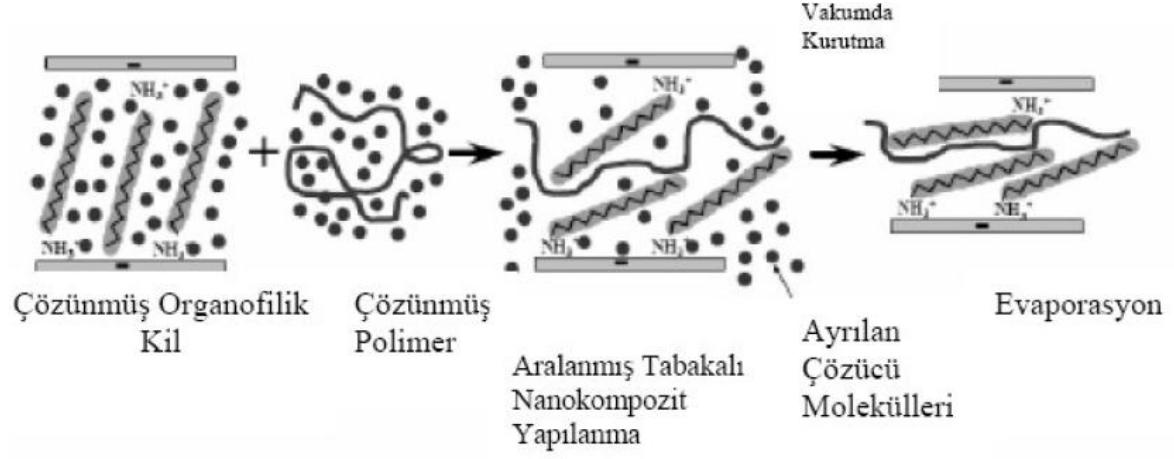
Eş anlı (In-situ) polimerizasyon yöntemi: Eş anlı polimerizasyon yönteminin esas prensibi, modifiye olmuş silikat, monomer çözeltisi içinde veya sıvı monomer içerisinde şişer ve monomer, silikat tabakasının boşluklarına girer. Bu kısımlarda tabakalar arasında polimer oluşumu (polimerizasyon) gerçekleştirilir. Polimerizasyon, uygun başlatıcı, maddenin eklenmesi, organik başlatıcı, ısı veya ışık ya da silikat şişirilmeden tabakalar arasına katyon değişimiyle yerleştirilen katalizör kullanılarak başlatılabilir (Beyer, 2002).



Şekil 2.6. Eş-anlı (In-Situ) polimerizasyon metodunun şematik gösterimi (Özden, 2004).

Çözeltide polimer nüfuzu metodu: Çözeltide polimer nüfuzu metodu, in situ polimerizasyon metoduna benzer. Bu yöntemde, polimerin çözünür, silikatında şişebilir olduğu sistem temel alınmıştır ve polimer-kil nanokompozit malzemeleri sentezlemek için polar çözücüler kullanılır. İlk olarak kil, metil etil keton (MEK), aseton, *N,N* dimetil formamid (DMF), toluen, kloroform veya su gibi çözücülerde şişirilir ve daha sonra polimer çözücüde çözünerek, çözülmüş polimer karışımı şişirilen kil tabakalarına ilave edilir. Son olarak vakum altında buharlaşmayla çözücü ortamdaki uzaklaştırılır. Bu

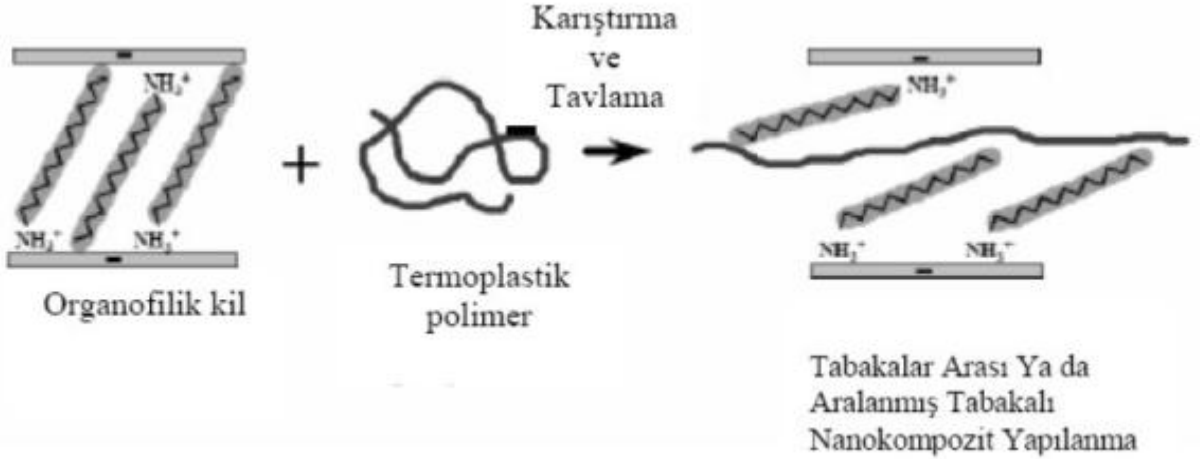
metodun avantajı; düşük polarite veya hiç polar olmayan polimerlerin kullanılmasıyla nanokompozit malzemelerin sentezlenebilmesidir (Beyer, 2002).



Şekil 2.7. Çözeltide polimer nüfuzu metodu şematik görünümü (Özden, 2004).

Eriyik fazda polimer nüfuzu yöntemi: Eriyik fazda polimer nüfuzu metodunun esas prensibi, polimer ve organofillik kilin yavaş yavaş ısıtılması ve kilin, polimer malzemenin arasına katılmasıyla nanokompozit malzemeyi elde etmektir. Bu yöntemde; silikat tabakası polimer matriksiyle karıştırılabilir. Tabaka yüzeyleri, seçilen polimerle yeterli ölçüde uygun olduğunda, polimer tabaka içi boşluğa ağır ağır ilerler ve polimer, kil tabakalarını aralanmış tabaka yapılı (intercalated) veya dağılmış tabaka yapılı (exfoliated) nanokompozit şeklinde ayırır (Cao et al., 2002).

Son yıllarda polimer silikat tabakalı nanokompozitlerin hazırlanmasında eriyik fazda karıştırma yöntemi çok kullanılmaktadır. Eriyik faz metodunun çok kullanılmasının sebepleri arasında, hiç çözelti kullanılmaması sayılabilir. Bu yüzden, eriyik faz yöntemi endüstriyel uygulamaları daha çevreci ve daha ekonomik hale getirmektedir (Ray and Okamoto 2003).



Şekil 2.8. Eriyik fazda polimer nüfuzu metodu şematik görünümü (Özden,2004).

Nanokompozit sentezinde genel bir yöntemin bulunmamasının başlıca nedeni sistemler arasındaki fiziksel ve kimyasal farklılıklarla yöntemlerde kullanılan ekipmanların birbirinden farklı olmasıdır. Her polimer sistemi, istenilen ürün özellikleri ve proses verimliliğine dayalı olarak farklı koşulları gereksinmektedir. Bu farklılıklardan dolayı da çalışmaların sonuçları birbirine eşdeğer olmamaktadır.

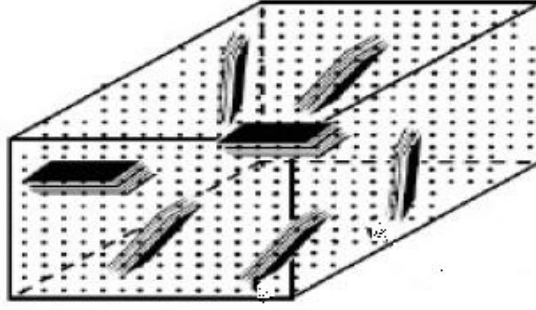
## 2.2.2. Nanokompozitlerin sınıflandırılması

Genel olarak nanokompozitler yapılarına, matrikslerine ve boyutsal özelliklerine göre üç sınıfa ayrılır:

### 2.2.2.1. Nanokompozitlerin yapılarına göre sınıflandırılması

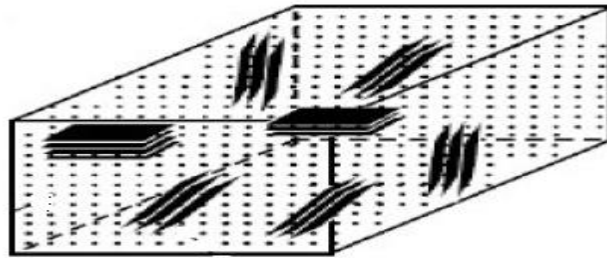
Polimer/kil nanokompozitler yapısal olarak 3 sınıfta (Serge et al., 2003) incelenmektedir :

Faz ayrışık mikrokompozit yapı: Kil kümeleri içine polimerin herhangi bir yayılması yoktur. Polimer ve organik kilin birbirine karışmadığı durumda polimer zincirleri kil minareleri galerilerine nüfuz edemez ve kil minareleri yığın halde birbirine tutunarak mikrokompozit yapı oluşur. Bu yapıda polimer zinciri silikat lamelleri arasına giremediğinden dolayı silikat tabakaları arası uzaklıklarda bir değişim gözlenmez.



Şekil 2.9. Faz ayrışık mikrokompozit yapı (Bafna, 2004).

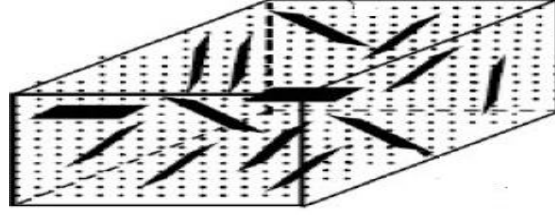
Tabakalanmış (intercalated) nanokompozit: Tabakalanmış yapıda polimer/nanodolu tabakası oranı sabit olduğundan nanokompozitler daha çok bileşik yapısındadır. Bu yapıda; polimer zincirleri, nanokil minarelerinin galerine nüfuz eder ve tabakalar arasındaki uzaklığı artırır fakat kil minarelerinin kristal düzenleri halen tam olarak bozulmaz yani plakaların yakınlık ve sırası korunur. Tabakalanmış yapıda, başlangıçtaki nanokilin çoklu tabaka yığınının, proses koşulları ve bileşim etkilerine bağlı olarak genellikle daha küçük yığınlar (tactoid) halinde parçalandığı gözlenir (Durmus, 2006). Tabakalanmış nanokompozitler, polimerlerin direk araya katılmaları ya da monomerlerinin 'eş-anlı' polimerizasyonu ile sentezlenirler (Rodlert and Plummer, 2003). Bu malzemeler elektronik ve yük taşıma özelliklerine sahiptirler (Cao et al., 2002).



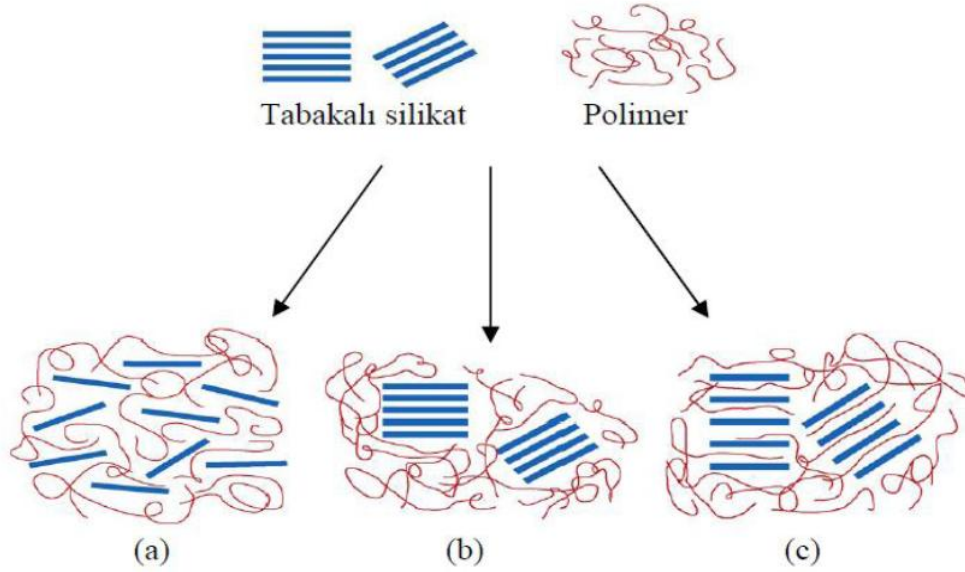
Şekil 2.10. Tabakalanmış yapı (intercalated) (Bafna, 2004).

Yapraklanmış (exfoliated) nanokompozit : Yapraklanmış yapıda, polimer zincirlerinin kil minarelli galerine nüfuz etmesiyle kil tabakalarının düzenli yığın yapısı tamamen bozulur ve maksimum dağılım gösterirler. Yapraklanmış polimer/kil nanokompozitlerinin fiziksel özelliklerindeki iyileşmeler tabakalanmış nanokompozit yapılarına göre daha

fazladır. Bu nanokompozitler, polimer ve kil arasındaki büyük ara yüzey alanı ve kilin homojen dağılımdan dolayı üstün mekaniksel özellikleriyle dikkat çekmektedirler. Yapraklanmış (exfoliated) nanokompozit yapı sentezinde en çok kullanılan yöntem 'eş-anlı' polimerizasyon yöntemidir (Durmuş, 2006).



Şekil 2.11. Tabakalı yapı (exfoliated) (Bafna, 2004)



Şekil 2.12. Tabakalı silikatlar ve polimerler arasındaki etkileşimden açığa çıkan farklı nanokompozit yapıları: (a) Faz ayrışık mikrokompazit, (b) Tabakalanmış (intercalated) nanokompozit, (c) Yapraklanmış (Exfoliated) nanokompozit.



### **2.2.2.2. Nanokompozitlerin matrisine göre sınıflandırılması**

Metal matrisli kompozitler: Metal matrisli kompozitlerde, matris sağlam ve dayanıklı metal yapıdadır. Ek (ilave) maddelerle kullanılan metal matrisli kompozitler daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilirler. Ek maddeler spesifik sertlik ve dayanıklılık, aşındırma direnci, boyutsal istikrarlığı ve termal iletkenliği güçlendirir. Metal matrisli kompozitler, yüksek sıcaklıkta kullanım imkanı, yanmama özelliği gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanında pahalı olması kullanım olanağını kısıtlar (Callister, 1997).

Seramik matrisli kompozitler: Seramik matrisli kompozitler yüksek dayanıklılık ve gerilim özelliklerinden dolayı yüksek sıcaklıktaki uygulamalarda geniş bir şekilde kullanılırlar. Fiber yapılarda gözlenebilen gerilim özellikleri, seramik matrisli kompozitler kullanılarak güçlendirilir (Kaw, 2006).

Polimer matrisli kompozitler: Polimerik materyaller en çok kullanılan matris materyalleridir. Ama polimerik materyallerin mekanik özellikleri endüstriyel uygulamalar için kuvvetlendirilmelidir (Matthews and Rowlings, 1994). Polimerik matrisli kompozitler, tabaka, fiber veya partikül şekline sahip organik veya organik dolgu maddeleri kullanılarak oluştururlar (Fischer ,2003).

### **2.2.2.3. Nanokompozitlerin boyutsal özelliklerine göre sınıflandırılması**

Nano yapının boyutsal özelliklerine göre (Pukánszky, 2005) nanokompozitleri 3 sınıfa ayırabiliriz:

Küresel nanokompozitler (3 boyutlu ): Tüm partikül boyutlarının nanometrik ölçekte olduğu nanopartiküllerdir. Genelde izo-boyutsal küresel partiküller olarak geçerler ve üç boyutlu bir yapıya sahiptirler. Partikül-partikül etkileşimleri genellikle polimer-dolgu yapışmasından daha önemlidir. Bu sınıfta en çok kullanılanlar karbon siyahı, çöktürülmüş kalsiyum karbonat ve silikattır. Çözelti-jel (Reynaud et al., 1999) ve polimerizasyon yöntemleriyle direkt olarak yüzeylerinden elde edilirler (von Werne and Paten, 1999).

Lif veya tüp şeklinde olan nanokompozitler (2 boyutlu ): İki boyutunun nanometrik diğer boyutunun ise daha büyük olduğu yapılardır. İki boyutlu olan nanokompozitlere lifler, nanotüpler ya da kil kristalleri örnek olarak verilebilir (Ebbesen, 1997). Nanotüp ve nanolifler ileri seviyede mekaniksel ve elektriksel özelliklere sahiptirler. Karbon nano tüpler son derece serttirler ve çok esnekler. Ayrıca, karbon nanotüpler karbon atomlarına bağlı olarak çok düzgün bir yapıya sahiptirler. Bu özellikleri, karbon nanotüpleri nanokompozitler için ideal kılmaktadır (Pukánszky, 2005).

Silikat tabakalı nanokompozitler (1 boyutlu ): Silikat tabakalı nanokompozitlerde, dolgu partiküllerinin bir boyutu nanometrik ölçekteyken diğer boyutları daha büyüktür. Silikat tabakaları; tetrahedral ve oktahedral olmak üzere iki farklı geometrik yapıdan meydana gelir. Tetrahedral silikon, oktahedral ise iki veya üç değerlikli metal katyon içerir. Bu geometrik yapılar 1:1 veya 2:1 oranında birleşirler. Bu nanopartiküller bir ya da birkaç nanometre kalınlığı ile yüzlerce ya da binlerce nanometre uzunluk ve genişliğe sahip kağıt şeklinde maddelerdir ve bu kompozit sınıfı polimer silikat tabakalı nanokompozitler olarak adlandırılırlar (Pinnavaia and Lan, 2000). Bentonit, hektorit, saponit en çok kullanılan silikat tabakalarıdır (Beyer, 2002).



Şekil 2.13. Nanokompozitlerin boyutsal özelliklerine göre sınıflandırılması

### 2.2.3.Nanokompozitlerin özellikleri

Polimer ve kil yada organokilden oluşan nanokompozitler çok küçük miktarlarda kil içerseler bile saf polimere kıyasla çok daha gelişmiş mekanik ve elektriksel özellikler, termal kararlılık, düşük gaz geçirgenliği ve optik geçirgenlik özelliklerine sahip olurlar (Ray and Okamoto, 2003; Chen et al., 2005; Messermith and Giannelis 1993; Yano et al.,1993).

Mekaniksel özellik: Organik-inorganik hibrid kompozitler; inorganik ve organik bileşenlerine göre daha üstün mekaniksel özellikler gösterirler. Saf polimer malzemeler; öğütme, sürtme, asınma ve yırtma gibi dış etkenlerden dolayı zincirlerinin kırılmasıyla mekaniksel bozunmalara uğrarlar. Fakat nano yapılı malzemeler çok sağlamdır ve kırılmalara karşı oldukça dayanıklıdır. Ayrıca, yüksek elastiklik modülüne sahiptirler ve burkulabilir, düzleştirilebilirler (Chen-rui et al., 2002).

Elektriksel özellik: Nanokompozit malzemelerin, yapılarında bulunan iyon değiştirici kilden dolayı elektriksel iletkenlikleri yüksektir. Kil, içine konulduğu polimerlerin kristalize olmasını engeller ve polimerin kristalize olmaması iletkenliği arttırmaktadır. Kil tanecikleri yüklü ise yükleriyle iletkenliğe katkıda bulunabilirler.

Termal kararlılık özelliği: Kil-polimer nanokompozitleri orjinal polimere göre daha yüksek camsı geçiş ve erime sıcaklıklarına, termal stabiliteye ve ateşe dayanım özelliklerine sahip olurlar. Polimer malzemeler yapılarındaki amorf ve kristal bölgenin varlığına göre ısı karşısında farklı davranırlar ve camsı geçiş sıcaklığında (Tg) yumuşarlar. Ayrıca ısı sürdürülürse polimer malzeme sıvılaşır. Kristal polimerler; sert ve amorf bölgeleri bulunmadığından camsı geçiş göstermezler. Camsı geçiş sıcaklığının üzerinde polimer zincir eğilir ve geometrisi bozulur. Fakat nanokompozit malzemelerde ise camsı geçiş sıcaklığı saf polimerlere kıyasla daha yüksektir.

Gaz geçirgenliği özelliği: Nanokil fazının varlığı hem gazların çözünürlüğünü azaltmakta hem de polimerik filmde çözünen gaz moleküllerinin difüzyonunu zorlaştırmaktadır.

Nanokil tabakalarının oluşturduğu zigzag difüzyon patikası, bu malzemelerle hazırlanan filmlerin bariyer özelliklerini geliştirmektedir (Yano et al., 1993).

Optik geçirgenlik özelliği: Kil parçacıkları, çok küçük boyutta olduklarından dolayı polimer matrisi içinde tek tek tabakalar halinde dağıldıklarında görünür ışıkta polimerin geçirgenliği ya değişmemekte veya az değişmektedir. Geleneksel kompozitlerde polimere ilave edilen tanecikler polimerin ışık geçirgenliğini gözle görünür oranda düşürürler (Pinnavaia and Lan, 2000; Ray and Okamoto, 2003).

#### **2.2.4. Nanokompozitlerin kullanım alanları**

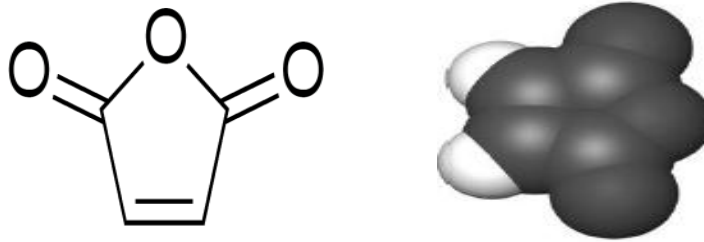
Nanokompozitlerde kullanılan malzemelerin fiyatlarının düşmesi, kompozitlerin hazırlanmasındaki teknik zorlukların çözülmesi, üretilen yapı elemanların ağırlığının azalması ve bu sebeple enerji tüketiminin düşmesi ve iyileştirilen mukavemet ve ısı kararlılık birlikte polimerik nanokompozitlerinin kullanımı son yıllarda artmaya başlamıştır. Nanokompozitler elektronik elemanlar, otomotiv sanayi, uçak sanayi ,enerji endüstrisi, biyomedikal endüstri, sağlık sektörü gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Polimerler yalıtkan malzemeler olmasına rağmen, son zamanlarda polimer matris içerisine iletken tanecikler katılarak elde edilen bazı iletken polimerik nanokompozitler geliştirilmiştir. İletken polimerlerin yaygın olarak kullanıldığı alanlar; sarj olabilen pil yapımı, elektronik alet (transistor, kapasitor, sensor) yapımı, iyon seçici elektrot yapımı, korozyon önleme, biyokimyasal analizler, foto elektrokimyasal hücreler ve elektroeolojik çalışmalarlardır. Nanoteknolojinin ve polimer nanokompozitlerin en çok gelişme kaydettiği ve gelecekte daha büyük buluşlara imza atılacak sektörlerin başında biyomedikal endüstrisi geliyor. Nanokompozitlerin sağladığı birçok esnekliği kullanan biyomedikal endüstrisinde ve sağlık sektöründe nanokompozitler; DNA, RNA gibi biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması, çeşitli enzimlerin immobilizasyonu, protein terapisi, kontrollü ilaç salınımı, protez uzuvlarda gibi birçok amaçla kullanılmaktadır (Şen ve diğ., 2010)

## 2.2.5. Polimer/kil nanokompozitler

Günlük yaşantımızın vazgeçilmez bir parçası olan polimerler yüksek mol kütleli bileşiklerdir. Polimerler, monomerlerin kimyasal bağlarla birbirlerine bağlanmaları sonucu oluşan bileşiklerdir (Compbell, 1994). Polimerleri elde etmek için başlangıçta kullanılan fonksiyonlu grupları bulunan basit moleküllere ise monomer denir. Eğer polimerler, tek tür monomerlerden oluşuyorsa homopolimer, iki farklı tür monomerden oluşuyorsa kopolimer olarak adlandırılır (Baysal, 1994). Bir polimerik malzemenin herhangi bir yerde kullanımının uygun olup olmadığı araştırılırken, öncelikle malzemenin mekanik ve ısıl özellikleri araştırılır. İstenilen özelliklere sahip polimerik malzeme elde edebilmek için kopolimerler sentezlenerek, istenilen yapı elde edilmeye çalışılır. Polimer-kil nanokompozitlere son zamanlarda olan ilgi organik-inorganik fazlar arası etkileşim artırılarak etkin bir karışım elde edilebilmesi ve böylece malzemelerin fiziksel ve mekanik özellikleri istenilen düzeye çıkabilmesinden kaynaklanır (Ray and Okamoto, 2003).

### 2.2.5.1. Maleik anhidritin alternatif kopolimerleri ve nanokompozitler

Maleik anhidrit, maleik asitteki karboksil gruplarının esterleşmesiyle oluşan bileşiktir. Maleik anhidrit bir reaktif monomerdir ve onun kopolimerleri de ana zincirde bulunan maleik anhidrid biriminden dolayı reaktif polimerler olarak anılır (Narayan, 1994).



Şekil 2.14. Maleik anhidritin kimyasal yapısı

Maleik anhidritin sahip olduğu fonksiyonel grupların verdiği birçok tepkime vardır. Maleik anhidritde bulunan çift bağlar sayesinde oluşan tepkimeler literatürde çok geniş bir şekilde yer almaktadır (Rzayev 1984). Anhidrit birimleri çeşitli amaçlara olanak sağlar.

Alkoliz/hidroliz, polariteyi ve direncin adezyon özelliklerini arttırmaya yarayan asit grupları ortaya çıkarabilir. Direnç tabakasının kalınlığını arttırmak için uygun amino gruplar içeren polimerlerle anhidrit reaksiyon verebilir. Maleik anhidrit polar yapılara tutunmayı artırmak için kullanılır. Reaksiyon, maleik anhidritin hidrolizinde oluşan hidroksil grubuyla tabakalı silikatın oksijen grubu arasında gerçekleşir (Kato et al.,1997; Lui and Wu, 2001). Maleik anhidrit (MA)'in terpolimer, kopolimer ve nanokompozitleri ticari amaçlarla kullanılan, düşük viskoziteli, suda çözünebilen ve yüksek fonksiyonel özellikleri olan maddelerdir. Maleik anhidrit kopolimerleri kaplama, yapıştırıcı, yağ katkısı, katyon değişim reçinesi ve diğer özel uygulamalarda kullanılmaktadır. Maleik anhidrit kopolimerleri çok kolaylıkla çeşitli tepkimelere katılabilir ve bu yüzden bunlar termoplastik ve termoreaktif polimer sentezi için çok elverişli bir başlangıç maddesidir. Anhidrit halkasının katılması ile elde edilen maleik anhidrit kopolimerleri fonksiyonel grup tepkimeleri tipinde çok sayıda tepkimelere neden olurlar (Rzayev 1984).

Maleik anhidritin, metil vinil eter ile alternatif kopolimerleri biyomühendislik süreçlerindeki uygulamalarda geniş kullanım alanına sahip, önemli biyomühendislik polimerler sınıfına dahildir. Bu tez çalışması kapsamında, nanokompozit sentezinde polimer olarak poli(maleik anhidrit-*alt*-metil vinil eter) kopolimeri ile çalışılmıştır.

### **Poli(maleik anhidrit-*alt*-metil vinil eter) ve nanokompozitler**

Son zamanlarda, optimum yapı-özellik bütünlüğüne sahip bir çok özel fonksiyonlu biyomühendislik polimerleri geliştirilmiştir. Biyomühendislikte fonksiyonel kopolimerler ve malzemeler; enzim ve gen taşıyıcıları, enzim ve protein kompleksleri, ilaç taşıyıcıları, tümör hedefli ilaç taşıyıcılar, ilaç taşıyıcı sistemler, kontrollü salım sistemleri, antitümör, antimikrobiyal ve antiviral ajanlar, sıvı embolik ajanlar, biyomedikal polimer malzemeler, membran immobilizasyon sistemleri, biyomembranlar, biyokatalistler, biyosorbantlar, uyarıya duyarlı polimerler ve hidrojel, biyosensörler, biyoçipler, biyorezistler ve peptid yada oligonükleotid sentezini gerçekleştiren ajanlar olarak kullanılıyor (Veron et al., 1996; Ladavière et al., 1999; Chaix et al., 1998 ; Butler, 1992; Zhou et al., 1998).

MA'nın alternatif kopolimerleri de biyomühendislik polimer sistemleri sınıfına dahil olmakla beraber nükleik asit ve proteinler gibi moleküllere en çok bağlanma yeteneğinde

olan polimerlerdir. Poly[(MA-*alt*-methyl vinyl ether (MVE)], poly(MA-*alt*-divinyl ether) ve poly(citraconic anhydride-*alt*-divinyl ether) etkin bir antitümör ajanı olarak hastalık teşhisi (Ladavière et al., 1999; Chaix et al., 1998) ve kemoterapide çeşitli uygulamalarda kullanılır (Butler, 1992). MA'nin divinil eterli alternatif siklopolimeri, yüksek biyolojik aktiviteye sahip biyomühendislik polimerleri olarak bilinirler. Antitümör, antiviral, antibakteryal, antifungal aktivite ajanı olarak kullanılır. Bu molekülün biyolojik etkisi moleküler ağırlığı ile belirlenir. Antitümör aktivitesi yaklaşık 10000, antiviral aktivitesi daha yüksek mol ağırlıkta ve toplam toksisitesi 30000 dolayındaki moleküler ağırlıkta gözlenmektedir (Butler, 1992; Volkova et al., 2002; Hirano et al., 1994).

Zhou ve ark. PH'a duyarlı faz ayrımlı poly(MA-co-methyl methacrylate-co-acrylic acid) ve poly(acrylamide-co-methacrylic acid-co-N-acryloxysuccinimide) polimerlerinin sentezini ve immuneseyde kullanımlarını bildirmiştir (Zhou et al.,1998). Ladaviere ve ark. nükleik asit problemlerinin çözülebilen konjugatlarının sentezi ve karakterizasyonu üzerine ve poly ma alt mve ile birlikte özellikle birleşme reaksiyonu ve oluşan konjugatların fizikokimyasal özellikleri üzerine bir çalışma yapmışlar (Ladaviere et al., 1999). Başka bir çalışmada ise kopolimer serbest amin grupları içeren oligodeoxiribonukletide bağlanmak için reaktif polimer olarak kullanılmıştır. Aşılama reaksiyonları ile bu polimerlerin üzerine kovalent protein immobilizasyonu, arttırılmış rekombinant protein immobilizasyonunu da rapor etmişler (Isosaki et al., 1992).

Lavaire ve ark. moleküllerin biyolojik etkisinin özellikle teşhis için ma gibi linear etkin polimerler üzerine immobilize edilebilirliğini göstermişlerdir. Bu yüzden BSA üzerine Manin kovalent immobilizasyonunun bir model protein olarak kullanıldığını rapor etmişlerdir. Polimere maksimum yükleme kapasitesi her molekül zincirinde 20 BSA molekülü olarak bulunmuştur. Moleküler ağırlığın etkisinin immobilizasyon reaksiyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Lavaire et al., 1999).

Ticari olarak elde edilen pektinaz enzimi poly(MA-co-polyalkilenoksit) ile kimyasal olarak modifiye edilmiştir ve hazırlanan biyosistemin enzimatik karakteristik özelliğinin tamamıyla değiştiği gözlenmiştir. Bu değişimin modifiye edilen kopolimerin hidrofiliğine ve modifikasyonun derecesine bağlı olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Shin-Ya et al.,

1998) Proteinlerin, MA kopolimeri gibi, fonksiyonel polimerlere kovalent immobilizasyonu birçok alanda çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.

### **2.2.5.2.Poli(laktik asit) ve nanokompozitler**

Son on yılda, biyomedikal ve ekolojik perspektiften dolayı, önemli bir ölçüde biyobozunur ve biyouyumlu polimerlere odaklanılmıştır. Genel olarak polimerler düşük üreme oranına sahip ve doğada kolay bir şekilde bozulmayan petrokimyasal ürünlerden üretilir. Kentsel atık hacminin hızlı bir şekilde artmasıyla biyobozunur polimerlere yönelilmiştir. Biyobozunur polimerler, plastik atıklar ve polimer üretimi için yenilenebilir kaynak olarak kullanılabilir.

Polylaktikler, yaralar (Taylor et al., 1994), cerrahi implantlar (Jain, 2000), doku kültürü (Mikos et al., 1994) ve kontrollü ilaç salımı (Park et al., 1992) gibi tıp alanındaki uygulamalarda önemlidir. Bunlar ağırlıklı olarak poly(- caprolactone) (PCL), poly(lactic acid) (PLA), and poly-(glycolic acid) PGA dır ve bunlardan PLA doğal polyesterler sınıfına dahildir ve medikal implantlarda, sütürlerde, kontrollü ilaç salımında kullanılan önemli bir biyobozunur polimerdir. PLA yapısının yeni fonksiyonel gruplar kazanmasıyla, daha gelişmiş özellikler ve daha ekonomik kompozitlerin, tabakalı yapıları, kaplama parçalarının ve karışımların hazırlanmasında bir yol açılmıştır. PLA en çok biyobozunabilen, biyouyumlu, üstün termal / mekanik özellikleri, yenilenebilir kaynak olarak kullanılmasından dolayı ilgi çekicidir. PLA, biyomedikal alanda 1960'ların başından beri kullanılmaktadır ve günümüzde tıp alanında geniş kullanım alanına sahiptir. PLA doğrusal, alifatik, termoplastik polyesterdir ve yenilenebilir kaynaklardan sentezlenir. Ayrıca hidrolitik ve enzimatik yollarla kolayca biyobozunabilir. Yaşayan organizmada biyobozunurluğunda ise PLA hidrolitik ayrışımıyla laktik asite dönüşerek karbonhidrat metabolizması için doğal aracı görevine sahiptir. PLA'nın diğer polimerle karıştırılmasıyla veya biyobozunur ve biyobozunur olmayan plastikleştiricilerin kullanımında, PLA etkisinin artmasıyla birçok yeni araştırma gerçekleştirilmiştir (Pochan and Krikorian, 2003) PLA'nın nihai kullanım özelliklerini PLA / tabakalı silikat nanokompozitler üretimiyle genişletmek için birçok çalışma yapılmaktadır.



Eski bir çalışmada Ogata ve arkadaşları, PLA matriksiyle organik kilin mikrometre boyutunda faz ayrımlı yapısını elde etmişlerdir. Bu yapıda silikat tabakaları, PLA matriksinde nanometre boyutunda dağılmamıştır. Bu çalışmadaki çözeltideki polimer nüfüsü yöntemiyle üretilen kompozit yapıda, organik olarak modifiye edilmiş montmorillonit, PLA yı güçlendirmek için kullanılmıştır (Ogata et al., 1997). Ray ve ark. organik modifiye edilmiş kili kullanarak eriyik fazda polimer nüfüsü yöntemiyle PLA ile tabakalanmış yapıda nanokompozit elde etmişlerdir. Bu çalışmalarda kil partikülünün boyutunun önemi ve tabakalanmış yapıdaki tabaklar arası mesafelerde etkili olan kil katyon değişim kapasitesini göstermişlerdir (Ray et al., 2002).

Pluta ve ark., ayrıca eriyik fazda polimer nüfüsü yöntemiyle, organokil ve Pla ile oluşturulan nanokompozitlerin uygulanabilirliğini göstermişlerdir. Bu çalışmalarda kil ve polimer matriksinin hem mikrofazda ayrılmış yapıları hem de PLA nın silikat tabakarı arasına tabakalanmış yapısı gözlenmiştir (Pluta et al., 2002).

Krikorian ve arkadaşları PLLA/organokil nanokompozitleri yapraklanmış yapı ile göstermişlerdir. PLLA/modifiye edilmiş kil nanokompozitlerindeki silikat tabakalarının dağılımını genişletmede modifiye yapının etkisini araştırmışlardır. Organokilde kullanılan organik modifinin çeşitli hidrofobik özellikleri ve karışabilirlikleriyle, tabakalanmış yapıdan tamamıyla yapraklanmış yapıya geçildiği gözlenmiştir (Pochan and Krikorian, 2003).

Depan ve ark., 2006, Laktik asit emdirilen kitosan ve tabakalı silikatların nanokompozitlerini hazırlamışlardır. Nanokompozitlerin hazırlanmasında; önce L-laktik asitin sıvı solüsyonunda kitosanı çözünmüşler, sodyum montmorillonitin dağılması sağlamışlar ve ardından ısıtıp filmin oluşturulması sağlamışlardır. Filmler PLA ile karşılaştırıldıklarında artan hidrofilitate göstermiştir ve ayrıca nanokompozitlerin saf kitosan-g-LA ve PLA'ya göre daha iyi termal ve fiziksel özellikler sergilediği gözlemlenmiştir (Depan et al., 2006).

## **2.2.6. Polimer nanokompozitlerin yapı ve özelliklerini inceleyen analiz yöntemleri**

### **3.2.6.1. Kimyasal yapılar (FTIR, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR)**

#### **Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)**

FTIR, Matematiksel Fourier Dönüşümü metodu ile bir frekans dizisinden oluşan kırmızı ötesi sinyalin frekanslarına ayıran ve her birini şiddeti ile gösteren işlem sonucunda ölçüm yapar. Organik ve inorganik bileşiklerin her ikisinde de karakter tanımlanması için kullanılabilir. Bu teknik, çeşitli kızılötesi ışık dalga boylarının absorpsiyonunu materyalin yapısı itibarıyla ölçme amaçlı ele alır. Bu kızılötesi absorpsiyon bantları spesifik moleküler bileşikler ve yapılarını tanımlar.

1964'ten beri FTIR bentonit kilin hidratasyonu ve platelerler arasındaki elektriksel çift katmanlı yapıların düzenlenmesi çerçevesinde kullanılmıştır. Kil plateletlerinde araya giren partikülü ve polimer arasındaki ilişkileri incelerken FTIR önemli olanaklar sağlar. Deneysel ve hesaplanan spektrumu karşılaştırarak iç yapının cinsini ve yoğunluğunu tanımlayabilir (Aranda and Ruiz-Hitzky, 1999).

#### **(<sup>1</sup>H) (<sup>13</sup>C) NMR spektroskopisi**

NMR atom çekirdeğinin kuantum mekanik manyetik özelliklerine dayanan fiziksel bir tekniktir. Tek sayılı proton veya nötron içeren atomlar içsel manyetik moment ve açısal momentuma sahiptirler, bilinen en genel atomlar hidrojen (<sup>1</sup>H) ve karbon (<sup>13</sup>C)'dur. Bunun yanında diğer elementler de incelenebilir. Katı fazda polimer silikat tabakalı nanokompozitlerde polimer yapıların matriks olarak kullanımı NMR'da gözlemlenmiştir (Van der Hart et al., 2001). PS/organo-MMT bileşiminde ise kil dispersiyon derecesinin ölçümünde kullanılmıştır (Bourbigot et al., 2003).

#### **2.2.6.2. Fiziksel yapılar (XRD analizleri)**

X-Ray Diffraction (XRD) spektroskopisi olarak bilinen X-ışınları kırınımı spektroskopisi isminden anlaşılacağı üzere denilen ultraviyole ışıktan daha kuvvetli fakat gamma ışınından daha zayıf enerjili X-ışını kullanılarak yapılan analizi temel alır. Bu aletler ile yapılan karakterizasyonda örnek türüne göre değişik uygulamalar görülmektedir. X-ışını kırınım difraksiyonu, silikat tabakalarının dağılımı hakkında kantitatif bilgiler verir.

Dağılmış tabaka yapılı (Intercalated) sistemlerde, tabakalar periyodik olarak düzenlenmiştir. Bu nedenle silikat tabakaların yansıması (reflection) x-ışını kırınımı difraksiyon modelinde incelenir. Silikat galerisine polimer girisi artarsa, kil tabakaların temel açıklığı (d-açıklığı) artar ve silikat piki yön değiştirir. Bundan dolayı tabakaların ayırımında periyodiklik azalır ve bu da silikat piki yoğunluğunu düşürür. Dağılmış tabakalı (exfoliated) sistemlerde, silikat tabakaları, polimer matriksinde rastgele dağılmıştır ve x-ışınımı modelinde silikat piki izlenemez (Zhu et al., 2001).

### **2.2.6.3. Yüzey ve iç morfolojileri (SEM ve TEM analizleri)**

#### **Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Taramalı elektron mikroskobu ışık yerine elektronların kullanıldığı bir mikroskoptur. Bir örnek parçasının yüzeyini ya da içini elektronlar yardımı ile gösteren büyüteçlere elektron mikroskobu denir. Taramalı elektron mikroskobu maddeleri üç boyutta görüntülemeyi sağlar. Bir taramalı elektron mikroskobunda akım ince tel üzerinden geçer ve tel elektronları yayacak kadar ısıtılır. SEM'in ana bileşenleri lens sistemi, elektron silahı, elektron toplayıcı, görsel ve kaydedici katot ışın tüpleri ve elektronlardır. Elektronlar yüksek voltaj (1-30kV) uygulandığında hızlanır, elektron sinyali elektromanyetik lenslere odaklanır (Wiley, 1971). SEM'de yüksek çözünürlük, çok iyi odaklanmış kısa dalga boylarındaki elektron ışınlarının madde yüzeyinden geçmesi ve saçılmış ya da ikincil elektronların gözlenmesiyle sağlanabilir(Wiley, 1993).

#### **Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)**

TEM, biyoloji, tıp, madde bilimleri ve yeryüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 600.000 kez büyüterek içyapılarını görüntüler. TEM yüksek elektron ışını saçan bir katod ve düzenleyici bir manyetik lensten oluşur. Kısmen iletilen elektron ışınları çok ince olan katı numunenin (50–200 nm) içyapısı ile ilgili bilgiler verir. Daha sonra seri halindeki manyetik lenslerle CCD (yükü-çift cihaz) kamerasına benzer floresan ekran, fotografik ekran ya da hassas sensörlere çarpına kadar büyütülür ve son olarak da bir monitör ya da bilgisayarda görüntülenir. TEM, XRD bilgilerini doğrudan elde etmek gibi bir metotla karışımıza çıkmakta ve düşük büyütmelelerde ek olarak polimer içindeki kil yığını kontrol

edebilmektedir. Düşük büyütmeler kilin saflığı ve kuvars gibi tabakalaşmamış partiküllerin varlığını da kontrol etmemizi sağlar (www.mri.psu.edu).

#### **2.2.6.4. Termal davranışları (DSC ve TGA-DTG)**

##### **Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC)**

Diferansiyel taramalı kalorimetre, polimerik malzemelerin ısıl analizleri için en üstün tekniktir. Diferansiyel taramalı kalorimetrenin çalışma prensibi; aynı sıcaklık alanı etkisinde bulunan referans malzeme numuneye enerji girişi farkının ölçümüne dayanmaktadır. Test sırasında genellikle sistemin sıcaklığı zamanın fonksiyonu olarak lineer biçimde arttırılır. Geçiş (transition) sırasında numune aniden ısı absorplar, eklenen ısı sensör tarafından bulunur. Bulunan sonuç DSC eğrisinin tepe noktasıdır. DSC ile polimerik malzemelerin geçiş sıcaklığı, reaksiyon ısı, geçiş ısı ve ısı kapasitesi belirlenir. DSC kullanımının en önemli avantajlarından biri hızıdır. Ayrıca çok küçük numunelerin dikkatli ölçümleri için uygundur (Işık, 2005).

##### **Eşzamanlı termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel termal gravimetrik (DTG) analizleri**

TGA / DTG eşzamanlı bir tekniktir. Örneğin, ağırlık değişimini ve referans ile arasındaki sıcaklık farkını kontrollü bir sıcaklık programı kullanarak ölçer.

### **2.3. Lakkaz ve Yapısı**

Biyoteknolojik işlemler, endüstriyel kullanımına yönelik ürünlerin sentezini, geliştirilmesini ve yeni teknolojilerin doğa ve çevre bilimlerine adaptasyonunu kapsar. Biyoteknolojik yöntemler ile farklı türde enzimlerin büyük miktarda minimum maliyetle sentezi mümkün olmuştur. Canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler, protein yapıdaki biyolojik katalizörlerdir ve biyokimyasal tepkimelerin kontrolünü sağlarlar. Yüksek derecede seçici olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların dengeye ulaşma süresini kısaltırlar (Öner, 2003).

Canlı organizmalarda çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık farklı endüstriyel amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Enzimleri endüstriyel işlemler için daha ilgi çekici hale getiren birçok özellik vardır. Endüstride üretilen ve kullanılan enzimlerin çoğu mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Mikrobiyal enzimlerin biyolojik proseslerle sentezlenmeleri ve farklı malzemelere tutturularak daha kararlı bir yapı oluşturmaları, enzimatik işlemlerin kimyasal işlemlere göre çevreye daha az zarar vermesi, kimyasal proseslere göre daha kolay koşullarda ve düşük maliyette gerçekleştirilebiliyor olması sonucunda enzimlerin deri ve deterjan endüstrileri, tekstil ve atık giderme, işlemlerinde kullanılma oranlarının zaman içerisinde artması enzimlerin endüstriyel alanda tercih edilmesinde temel sebeplerindendir (Kirk et al., 2002). Spesifiklikleri, uygun şartların kolay sağlanabilmesi, yüksek aktiviteleri, yüksek verimlilikleri ve protein yapılarından dolayı biyolojik olarak parçalanabiliyor olmaları sebebiyle enzimler organik sentezlerde, tıbbi testlerde, eczacılıkta, deterjanlarda, kimya endüstrisinde, gıda üretimi ve fermentasyonda, tarım ve ziraat alanlarında kullanılmaktadır.

Ekolojik kirliliğe neden olan yıkılması zor çok sayıda organik bileşiği beyaz çürükçül funguslar, hücre dışı ligninolitik enzim sistemleri sayesinde indirgeyebilirler. Lignin ve renk gidermek amacıyla kullandığı bilinen en yaygın beyaz çürükçül fungus türleri; *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes (Coriolus) versicolor* ve *Funalia trogii*dir. Son dönemlerde endüstriyel uygulamalardan en yaygın olarak tekstil endüstrisinde, boyar maddelerin ağartılmasında yer alan üç fonksiyonel enzimin Lignin peroksidaz (LiP), Mangan peroksidaz (MnP) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bağlı peroksidazlar olduğu belirtilmiştir. Diğer bir enzim ise sadece belirli türler tarafından üretilen bir hücre dışı enzim olan lakkazdır(Beilen and Li, 2002). Lakkazlar mavi bakır proteinleri olarak bilinmelerine rağmen yaygın olarak polifenol oksidazlar olarak tanımlanırlar. Polifenol oksidazlar ise son elektron alıcısı olarak moleküler oksijen içeren aromatik bileşikleri oksitleyebilme özelliğine sahip enzimlerdir (Mayer, 1987).

Lakkazlar ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından tanımlanmış ve daha sonra 1895 yılında Bertrand tarafından *metal içeren oksidaz* olarak karakterize edilmiştir. Bu durum lakkazı tanımlanan en eski enzimlerden biri yapar. Lakkazın molekül ağırlığı 70 kDa'dır (Feng, 1996; Sakurai, 1992). Lakkazlar mavi çoklu bakır oksidaz ailesinin, moleküler oksijenin 4 e<sup>-</sup> 'unun suya indirgenmesini katalizleyebilen bir üyesidir. Moleküler oksijenin indirgenmesi indirgen substratın 1e<sup>-</sup> oksidasyon ile sağlanır (Piontek et al., 2002). Lakkazlar aromatik aminler, syringaldazine ve nonfenolik bileşikler de radikaller haline yükseltgeyebilirler (Li et al., 1999; Bourbonnais et al., 1997). Bununla birlikte, sırf fenolik ve metoksifenolik asitleri değil dikarboksilik asitleri de metoksi gruplarına etki ederek yükseltgerler (Gianfreda et al., 1999).

Lakkaz holoenzimi; monomer, dimer hatta tetramer olarak bile bulunabilir. Lakkaz enzimlerinde aktif olan her bir lakkaz proteini katalitik aktivite gösterebilmek için en az 4 bakır atomu içerir. Bunlar 3 redoks merkezi şeklinde dağılmışlardır ve Tip1 (T1), Tip2 (T2), Tip3 (T3) bakır olarak gösterilirler. Bakır atomları lakkazın katalitik aktivitesinde önemli görev alırlar. Bu reaksiyonlar üç ana basamakta (Mester and Tien, 2000) meydana gelirler:

1. İndirgen substratın kendisi yükseltgenirken T1 bakırını indirger.
2. Açığa çıkan elektron T1 bakır bölgesinden üç çekirdekli olarak kümelenmiş T2 ve T3 bakır bölgelerine taşınır.
3. Üç çekirdekli olarak kümelenmiş T2 ve T3 bakır bölgesinde moleküler oksijen suya indirgenir.

Kinetik ve spektroskopik T1 ve T2 bakır atomlarının elektron alımını ve T2 ile T3 bakır atomlarında oksijen bağlanmasını içerdiğini göstermiştir (Mester and Tien, 2000).

Yaklaşık olarak 500 amino asitten oluşan lakkazın optimum sıcaklık aralığı 40-80°C arasında ve optimum pH aralığı ise 3,0-7,5 arasında değişiklik göstermektedir. Lakkaz enzimleri için en önemli parametrelerden birisi pH'dır. Bunun sebebi ise aktivitelerinin pH'a bağımlı olmasıdır. Fenolik substratlarda lakkaz enzimlerinin pH bağımlılıklarının çan eğrisi şeklinde olduğu görülür (Xu, 1997). Bilinen birçok lakkaz enziminin kökeni, başarılı

bir lignin parçalayıcısı olan beyaz-çürükçül funguslardır. İyi bilinen lakkaz üreticileri arasında *Podospora anserina*, *T. versicolor*, *Polyporus ostreatus*, *Neurospora crassa* (Froehner and Eriksson, 1974), *A. bisporus* (Wood, 1980), *Botrytis cinerea* (Marbach et al., 1984), *Pleurotus ostreatus* (Sannia et al., 1986), *Phlebia radiata* (Niku-Paavola et al., 1988), *Coriolus (Trametes) polyporus* (Rogalski et al., 1991), *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996), *Chaetomium thermophilum* (Chefetz et al., 1998) ve *Coprinus cinereus* (Schneider et al., 1999) gibi çok sayıda fungus bulunmaktadır. Beyaz çürükçül funguslar küresel karbon döngüsünün düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar (Hatakka, 1994). Beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor*, ağaçların gövdesinde yaşar ve karbon gereksinimini karşılamak için ağaç kabuğunu degrade eder. Bu sebeple; fonksiyonları ağaç kabuğunu parçalamak olan lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz gibi çeşitli enzimleri salgılamaktadır. Bu yetenekleri sebebiyle lakkaz türevi enzimler, endüstriyel proseslerde de sıklıkla kullanılmaktadır. *Trametes versicolor* bugüne kadar lakkaz sentezleyen funguslardan en çok çalışılmış olanıdır ve lakkaz hakkında bilinen çoğu bilgiye bu şekilde elde edilmiştir (Call and Mucke, 1997).

Lakkazlar, farklı substitüye fenolik bileşikler, aromatik aminleri ve bazı durumlarda inorganik bileşikler bile moleküler oksijeni kullanarak oksitleyebilmektedirler. Lakkaz enzimlerinin çok geniş bir yelpazedeki substratlar üzerinde aktivite gösterebilme yeteneği, son dönemlerde lakkaz enzimlerinin biyoremediasyon, tekstil boyalarında renk giderimleri, kâğıt hamurunun biyolojik olarak beyazlatılması, ortamdaki klor uzaklaştırılması gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak tercih edilmelerine yol açmıştır. Lakkazlar organizmaların immünitesinde, patojenitesinde, morfogenezinde ve pigmentasyonunda görev alabildikleri gibi humik asit ve lignin gibi karmaşık organiklerin moleküllerinin de metabolize edilmesinde de görev alabilirler.

Tekstil endüstrisinde dünyadaki boyar madde üretiminin yaklaşık 2/3'ü kullanılmaktadır (Riu et al., 1998) ve ürünlerin işlenmesini sağlayan yaş işlemler sırasında büyük miktarlarda su ve kimyasal madde harcanmaktadır (Zollinger, 2002). Kimyasal yapılarından dolayı bu boyalar suya, ışığa ve çeşitli kimyasal oksitleyici ajanların sebep olduğu renk solmalarına oldukça dirençlidirler (Poots and McKay, 197). Bu boyaların

çoğunun renk giderimlerini sağlamak da fazlasıyla zordur. Bununla birlikte yüksek çeşitliliğe sahip olan bu boyalarının hepsini aynı işlemler kullanarak parçalamak veya renk giderimlerini sağlamak da mümkün değildir. Bazı durumlarda bu boyaların reaksiyon ürünleri kendilerine göre toksik olabilir (Spadaro et al., 1994). Bu durumlarda tekstil boyası içeren atıkların işlenmesinde fiziko-kimyasal yöntemler yerine enzimatik yöntemler tercih edilmektedir. Tekstil boyalarının enzimatik parçalanması veya ağırtılması lakkaz v.b. ligninolitik enzimlere dayanmaktadır. Lakkaz enzimlerinin, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerine kıyasla kolay uygulanabilirlikleri ve aromatik yüksek çeşitlilikteki bileşiklerin parçalanmasında kullanılabilme için uygun olmaları sebebiyle, lakkaz içerikli boya giderme yöntemlerinin iyileştirilmesi lakkazların, günümüzde kullanılmakta olan sentetik tekstil boyaların da içinde olduğu (Couto et al., 2004) geniş çeşitlilikteki boyaları parçalayabilmedeki başarısından dolayı ilgi çekici bir çözüm olarak görülmektedir (Kasinath et al., 2003; Abadulla et al., 2000, Blázquez et al., 2004).

#### **2.4. İmmobilizasyon ve İmmobilizasyon Yöntemleri**

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleşir. Bu süreçlerde, katalizör olarak kullanılan serbest enzim, substart çözeltisi ile karıştırılır ve ortamda oluşan üründen sonra enzimlerin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması oldukça zor ve pahalı bir süreç gerektirir. Bu yüzden serbest enzimlerin, sürekli üretim süreçlerinde de kullanılması çok zordur. Ayrıca reaksiyonda kullanılan enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmaz ve bu yüzden reaksiyonun kontrolü serbest enzim kullanılığında çok zordur. Serbest enzimlerde görülen bu dezavantajları ortadan kaldırmak için pek çok metot denenmektedir, immobilizasyon bu amaçla kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir. İmmobilizasyon (tutuklama), enzimlerin katalitik aktivitelerini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır (Wong et al., 1994). Bir katıya tutundurulmuş, üzerinden geçen substratların ürünlere dönüşmesini sağlayan enzimlere immobilize enzimler denir. Enzim immobilizasyonu, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketinin önemli ölçüde kısıtlandığı bir yöntemdir (Bickerstaff, 1997). Enzimler suda çözünmeyen bir desteğe immobilize edilerek hem defalarca



kullanılabilirler hem de sürekli sistemlerde uygulanabilirler. Bu sayede, önemli miktarda ekonomik kazanç elde edilir. Günümüzde pek çok immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır (Karadağ, 2001). Özellikle son 30 yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla artmaktadır. Genel olarak immobilizasyon uygulamaları enzim sistemleri haricinde, uygun destek materyallerine ilaç, protein, mikroorganizma, bitki ve hayvan hücreleri, biyosensör ve biyoreaktör uygulamaları ve kontrollü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Mosbach, 1976).

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Grifftin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Grifftin sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını (E.C.3.2.1.26) [9001-57-4] mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. Bu gelişmenin ardından fizyolojik aktif proteinlerin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu üzerine çok çeşitli raporlar yayınlanmıştır.

İmmobilizasyon işlemiyle bir destek materyaline tutundurulmuş enzimin, serbest enzime göre; birçok kere kullanılabilmesi, sürekli sistemlerde uygulanabilmesi, enzimin istenildiği anda ortamdaki uzaklaştırılabilmesi ve reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulabilmesi, reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilmesi, doğal enzime kıyasla daha kararlı olması, çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklı olması, atık sıvı miktarını azaltması, maliyeti düşürmesi, enzimin yarılanma ömrünü uzatması ve enzimin oluşan ürünü kirletmemesi gibi birçok avantajı vardır (Aksoy, 2003; Mosbach, 1976; Zaborsky, 1973). Bunun yanında immobilize enzimlerin immobilizasyon işlemi boyunca enzim aktivitesinin azalması veya kaybolması olasılığı, çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığını sınırlayabilmesi ve enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksek olması gibi bazı dezavantajları da vardır (Durante et al., 2004; Trevan, 1980).

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan destek materyalinin önemi büyüktür. Uygun olarak seçilen bir destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını artırır (Dumitriu et al., 1988; Carr et al., 1980). Destek materyaline bağlanmada enzim molekülünün protein yapısından yararlanır.

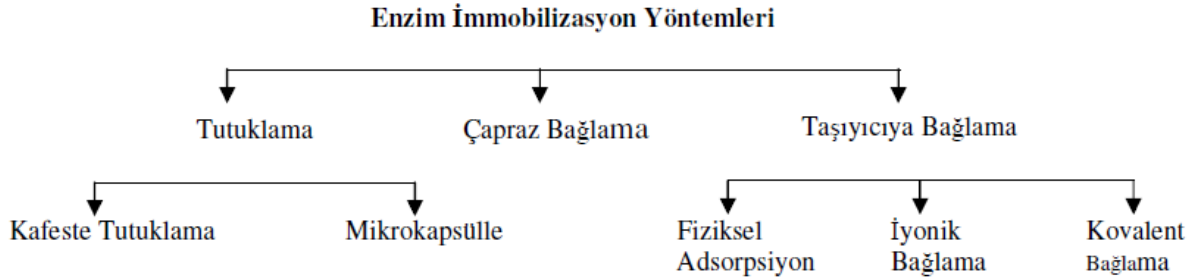
Enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar bağlanmada etkilidir. İmmobilizasyonda kullanılacak destek materyallerinde aranan bazı özellikler; geniş yüzeysel alan, hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli yapı, mekanik dayanıklılık, kimyasal ve termal dayanıklılık, yüksek tutuculuk, mikroorganizmalara karşı dirençli olma, ucuzluk, zehirsizlikdir. Enzim immobilizasyonunda destek olarak doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyaller (Çizelge 2.1.) kullanılmaktadır (Kaetsu et al., 1979).

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri (Kaetsu et al., 1979)

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nişasta	Akrilamit esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Metal oksitler
İpek		Bentonit

## 2.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri

En genel anlamda üç tür enzim immobilizasyon yöntemi vardır, bunlar; Taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama yöntemleridir (Telefoncu, 1986; Wiseman, 1975; Hartmeier, 1968).



Şekil 2.15. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1986; Wiseman, 1975; Hartmeier, 1968 ).

### 2.4.1.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemi

Tasıyıcı bağlama metodu en eski immobilizasyon yöntemidir, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara kovalent bağlar, iyonik bağlar, fiziksel adsorpsiyon veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır. Taşıyıcı seçiminde; partikül büyüklüğü, toplam yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi ölçütler esas alınır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Enzimin bağlanmasına göre bu yöntem üç alt sınıfta incelenmektedir:

- a. Fiziksel Adsorpsiyon
- b. İyonik Bağlanma
- c. Kovalent Bağlanma

### **Fiziksel adsorpsiyon yöntemi**

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, enzimin katı matriks üzerinde fiziksel adsorpsiyonuna dayanır. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi en eski ve basit immobilizasyon yöntemidir (Nelson and Griffen, 1916). Daha çok suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin immobilizasyonda kullanılmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon yönteminde; yüzey aktif suda çözünmeyen bir taşıyıcının enzim çözeltisi ile karıştırılır ve enzimin bağlanmasını yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon yöntemi, proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karsıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Bu yöntemde, immobilizasyondan sorumlu kuvvetler taşıyıcı ve enzim arasındaki hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (Chen et al., 1996). Fiziksel adsorpsiyon yönteminde pH, çözücü, iyon siddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörler etkilidir. En çok kullanılan taşıyıcılar; aktif karbon, nisasta, anyon ve katyon deşitiricili reçineler, sentetik polimerler, silikajel ve killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir (Uhlig, 1998).

Adsorpsiyonun en büyük avantajı genellikle hemen hemen hiç bağ ajanına ihtiyaç duymaması ve aktivasyon basamaklarının minimum olmasıdır. Enzim immobilizasyon işleminin basit şekilde gerçekleşir ve enzim aktiviteleri üzerine olumsuz etkileri olmaz. Değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı sağlar. Bağlanma fiziksel kuvvetlerle olduğu için enzimin konformasyonel yapısında daha az değişikliğe neden olur. Uygun bir taşıyıcıyla bu metot basit ve ucuz bir şekilde uygulanabilir. Ayrıca bu yöntemde kullanılan taşıyıcı yenilenecek tekrar kullanılabilir (Bickerstaff, 1997).

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir. Enzim taşıyıcıya zayıf bağlarla bağlanır ve bundan dolayı enzim, reaksiyon ortamına kaçarak ürünü kontamine edebilir. Optimum immobilizasyon koşulların saptanması güç olabilir çünkü fiziksel etkileşimler iyonik bağlardan daha zayıftır ve enzim, sıcaklık ve çözünen madde derişimi gibi çevresel faktörlere karşı daha duyarlı durumdadır. Fiziksel adsorpsiyonda bağlanma spesifik değildir, immobilizasyon esnasında protein olmayan maddeler ya da diğer proteinler de taşıyıcıya bağlanabilir. Bunun sonucunda immobilize enzimin özellikleri değişebilir (Bickerstaff, 1997).

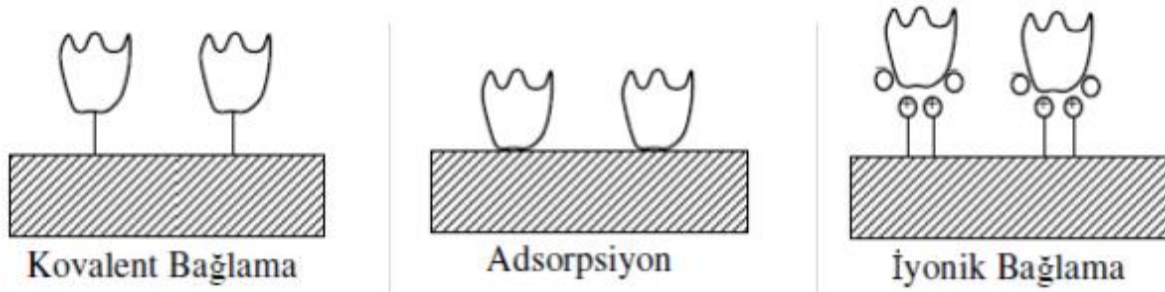
## **Kovalent bağlama yöntemi**

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzimin nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH<sub>2</sub>), karboksil grubu (CO<sub>2</sub>H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur (Uhlig, 1998). Kovalent bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerindeki göre daha kuvvetlidir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller (Carr and Bowers, 1980). Ayrıca enzim taşıyıcının üzerine tutturulmuş olduğundan, immobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir.

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak taşıyıcının aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Taşıyıcı; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir (Doğan, 2008).

## **İyonik bağlama yöntemi**

İyonik bağlanma metodu, enzimin iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Prosedür çok basittir ve taşıyıcının yenilenmesi ve enzimin tekrar kullanılabilirliği daha yüksektir. Immobilizasyon koşulları yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden konformasyonel yapısında ve aktif bölgelerinde çok az değişiklik gözlenir. İyonik bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar; fiziksel adsorpsiyona göre daha güçlü, kovalent bağlanma yöntemindeki bağlara kıyasla daha zayıftır (Chibata et al., 1972) .



Şekil 2.16. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi (Telefoncu, 1986)

#### **2.4.1.2. Çapraz bağlama yöntemi**

Enzimlerin immobilizasyonu diğer protein moleküllerine ya da çözünmez bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara olabildiği gibi proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla da sağlanabilir. Bu yöntem çapraz bağlanma yöntemi denir. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur (Sanjay ve Sugunan, 2006).

Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan çok fonksiyonlu maddeler, diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, glutaraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları epiklorhidrinler, triklor-s-triazin, heksametilen diizosiyanat, 2,4- diizotiyosiyanotoluendir (Gürsel et al., 2003).

### **2.4.1.3. Tutuklama yöntemi**

Bu yöntem, polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda mikrokapsülleme ve miseller ile enzimin hapsedilmesine dayanır (Arıca ve Hasırcı, 1987). Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınları ile başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir (Arıca ve Hasırcı, 1987). Bu yöntem, her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için kullanılabilir (Dumitriu, 1988). Tutuklama yönteminde sadece tek bir enzimin değil çoklu enzimlerin, hücrel organeller de immobilize edilebilir. Ama bu yöntemde taşıyıcıların yeniden elde edilmesi çok zordur ve yüksek molekül ağırlığındaki substratlar enzime zorlukla tutunurlar (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Tutuklama yöntemi beş ana grupta sınıflandırılabilir:

Kafes (polimer matrikste tutuklama): Enzimler, polisakkarit, protein ve sentetik gibi çeşitli polimerlerden birinin jel matriksi içine tutuklanır (Tanaka and Kawamoto, 1999). Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer matriksi içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu matriks yapısına sürekli olarak girip çıkabilir.

Mikro kapsül tipi: Bu yöntem enzimlerin çeşitli şekillerdeki yarı geçirgen membranlar içerisine konularak kaplanmalarıyla gerçekleştirilir. Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. (İnam et al., 2001).

Lipozom tipi: Bu yöntemde enzim, fosfolipitlerden hazırlanan sıvı membranlarda tutuklanırlar.

Membran tipi: Enzimler, reaksiyon çözeltisinden mikroultrafiltrasyon membranlarıyla ayrılırlar. (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Ters misel tipi: Ters misel tipinde biyokatalizör, yüzey aktif madde ile bir organik çözgenin karışımı ile oluşturulan ters miseller içine tutuklanmıştır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde öncelikle enzimin bağlanacağı destek materyalinin yapısı dikkate alınmalıdır (D'Souza and Godbole, 2002). Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır: *i.* Destek materyalinin mekanik özellikleri *ii.* Enzimin, reaksiyon koşullarında kararlı olması. *iii.* Çapraz bağlayıcı ajanın, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olması. *İiii.* immobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan işlemin enzimi etkilememesi, *iiii.* immobilize enzimin bazı kimyasal tepkimelerde devamlı katalizör olarak kullanılması durumunda immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır (Mosbach, 1976).

## 2.5. İmmobilizasyon ile İlgili Çalışmalar

Yeşilada ve Özcan tarafından yapılan çalışmada; *Trametes versicolor* kültürü kullanılarak, Orange II boyasının renk giderimi çalışılmıştır. Renk giderim hızının mantar kültür süzüntüsünün üreme evresine bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Yeşilada and Özcan, 1998).

D'Annibale, A. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *Lentinula edodes* kullanılarak elde edilen lakkaz, zeytinyağı fabrikalarında atık sulardaki fenollerin uzaklaştırılması üzerine çalışılmıştır. Çalışmada lakkaz, glutaraldehit ile çapraz bağlanma ve adsorpsiyon yöntemiyle kitosan üzerine immobilize edilmiştir. Optimum pH, serbest ve immobilize enzim için 4,0, optimum sıcaklık sırasıyla 50 °C ve 60 °C, Km değerleri sırasıyla 77 µM ve 256 µM olarak bulunmuştur (D'Annibale, et al., 1999).

D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise yine *Lentinula edodes*'ten elde edilen lakkazın atık sulardaki fenol bileşikleri üzerine etkilerini incelenmiştir. Çalışmada lakkaz, Eupergite adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir ve kinetik parametreler incelenmiştir. Serbest lakkazın Km sabiti 0,07 mM dan, Eupergite immobilize edildiğinde 0,15 mM'a artarken, V<sub>mak</sub> değerinin 1,9x10<sup>-2</sup> mM.dak<sup>-1</sup> den 7,6x10<sup>-3</sup> mM.dak<sup>-1</sup> e düştüğü gözlenmiştir (D'Annibale et al., 2000) .



Abadulla ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *Trametes hirsuta* 'dan elde edilen lakkaz enzimi ile triarylmethane, indigoid, azo ve anthraquinonic boyaların renk giderimini ve boyaların toksisitelerinin azaltılmasına etkisini araştırmışlardır. Membran reaktör sistemi kullanarak enzim, alüminyum üzerine immobilize edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda anthraquinonic boyaların biyoreaktör sisteminde %80 oranında toksisitesinin azaldığı ve anthraquinonic ve indigo carmine (Acid Blue 7)'nin azo boyalardan 2 kat daha hızlı parçalandığı gözlenmiştir (Abadulla et al., 2000).

Lante, A. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Plerotus ostreatus*'dan elde edilen lakkaz, adsorpsiyon yöntemi ile polietersülfon membrana immobilize edilmiştir. Immobilize enzimin atık sulardaki farklı fenol türevlerini uzaklaştırmasını araştırılmıştır. Siringaldazin substrat olarak kullanılmıştır. Çalışmada, serbest enzim için optimum pH 6,3 immobilize enzim için ise optimum pH 6,6, optimum sıcaklık ise serbest enzim için 40 °C immobilize enzim için ise 35 °C olduğunu bulmuşlardır. Enzimin bağlanma kapasitesini de %40 bulmuşlardır (Lante et al., 2000).

Freire, R.S. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın immobilizasyonu adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile yapılmıştır ve enzim aktifleştirilmiş karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize edilmiştir. Substrat olarak katekol kullanılmıştır ve optimum pH 5,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca, immobilize lakkazın aktifliğini 2 ay süresince koruduğunu belirlemişlerdir (Freire et al., 2001).

Ramsay ve Nguyen tarafından yapılan bir çalışmada ise *Trametes versicolor* tarafından üretilen lakkaz kullanılarak; Amaranth, Tropaeolin, R.blue 15, Congo red, R.Black 5, Cibacran Brilliant Red 36-P, Cibacron Brilliant Yellow 3B-A ve Remazol Brilliant Blue R boyaları üzerindeki renk giderimi etkisi araştırılmıştır. Analizler sonucunda Cibacron Brilliant Red 36-P, Cibacron Brilliant Yellow 3B-A ve Remazol Brilliant Blue R boyalarının renklerinin kısmen giderildiği ve Amaranth, Tropaeolin O, Congo Red, R.blue 15 ve R.black 5'in sırasıyla 3,5; 24,8; 22; 20 ve 48 saat sonra renklerinin tamamen giderildiği belirtilmiştir (Ramsay, 2002).

Dodor, D. E. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı kaolinit üzerine immobilize etmişler ve polisiklik aromatik hidro karbonların (PAH ) uzaklaştırma çalışmaları yapılmıştır. Optimum pH'ı 4,5 serbest enziminin optimum sıcaklığını 40 °C, immobilize enzimin ise 60 °C olduğunu tespit etmişlerdir ve ayrıca 4 °C de 4 ay depolandığında serbest enzimin aktifliğinin %90 ını koruduğunu, immobilize enzimde ise 4 °C de 90 gün depolama sonunda aktifliğinde kayıp olmadığını belirlemişlerdir (Dodor et al.,2004).

Hu, X. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz, adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile silika nanopartiküller ve kaolinit üzerine immobilize edilmiştir. Substrat olarak ABTS'yi kullanmış ve iki immobilizasyon yönteminin de optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Kaolinit üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş enzimin optimum pH sı 5,5 optimum sıcaklığı 50 °C, nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin optimum pH sını 6,0 optimum sıcaklığını ise 45 °C olarak belirlemişlerdir (Hu et al., 2007).

Xiao, H. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *Pcynoporus sanguineus*' dan elde edilen lakkaz kullanılmıştır ve lakkaz gutaraldehit ile amin sonlu nanokompozitlere çapraz bağlanmıştır. İmmobilizasyon iki basamakta gerçekleşmiştir; birinci basamakta çapraz bağlanma koşulları ikinci basamakta ise enzimin nanokompozitlere kovalent bağlanması koşulları incelenmiştir. Ayrıca lakkazın 5 kez art arda kullanımından sonra aktifliğinin %80 ini koruduğunu tespit etmişlerdir ( Xiao et al., 2006).

Güngörmedi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise *Trametes versicolor*'in kuru biyokütlesi kullanılmıştır ve Reaktif Red 198 boyarmaddesinin biyosorpsiyonu çalışılmıştır. çalışmada biyosorpsiyon için optimum koşullar belirlenmiştir. Çalışma sonucunda optimum pH 2,0, optimum biyokütle miktarı 0,4 g, optimum başlangıç boyarmadde konsantrasyonu 75 mg/l, optimum temas süresi 20 dk, optimum çalkalama hızı 100 r.p.m., optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edilmiştir ve optimum koşullarda en yüksek %92,57 verim elde edilmiştir (Güngörmedi ve ark., 2009).

### 3.MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Mikroorganizmalar

Poli(metil vinil eter-*alt*-maleik anhidrid) (*mw*:2.400.000, 1.980.000, 1.080.000, 216.000), Reaktif oktadesil amin-montmorillonit (ODA-MMT), Poli(laktik asit) (PLA), Dioksan ve 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDAC) Sigma-Aldrich(ABD) firmasından temin edilmiştir. Nutrient broth, Nutrient agar, Todd Hewitbroth Difco (ABD) firmasından temin edilmiştir. Boyar madde (reaktif red 5) Sarar Tekstil A.Ş.'den temin edilmiştir.

*E.coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Trametes versicolor* (ATCC200801) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar, aşağıda verilen 6 ana grup altında incelendi:

- Poli(maleik anhidrit-*alt*-metil vinil eter) /oktadesil amin montmorillonit (Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT) nanokompozit sentezi,
- Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit karakterizasyonu,
- Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitinin, farklı molekül ağırlığına sahip saf kopolimerlerin ve organo silikatın antimikrobiyal ve antitümör etkisinin araştırılması
- *Trametes versicolor*'dan lakkaz enziminin sentezlenmesi,
- Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozite lakkaz immobilizasyonu ve optimizasyon koşullarının incelenmesi,
- Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitine immobilize edilmiş lakkaz ile "Reactive Red 5" boyar madde renk gideriminin ve optimizasyon koşullarının incelenmesi.

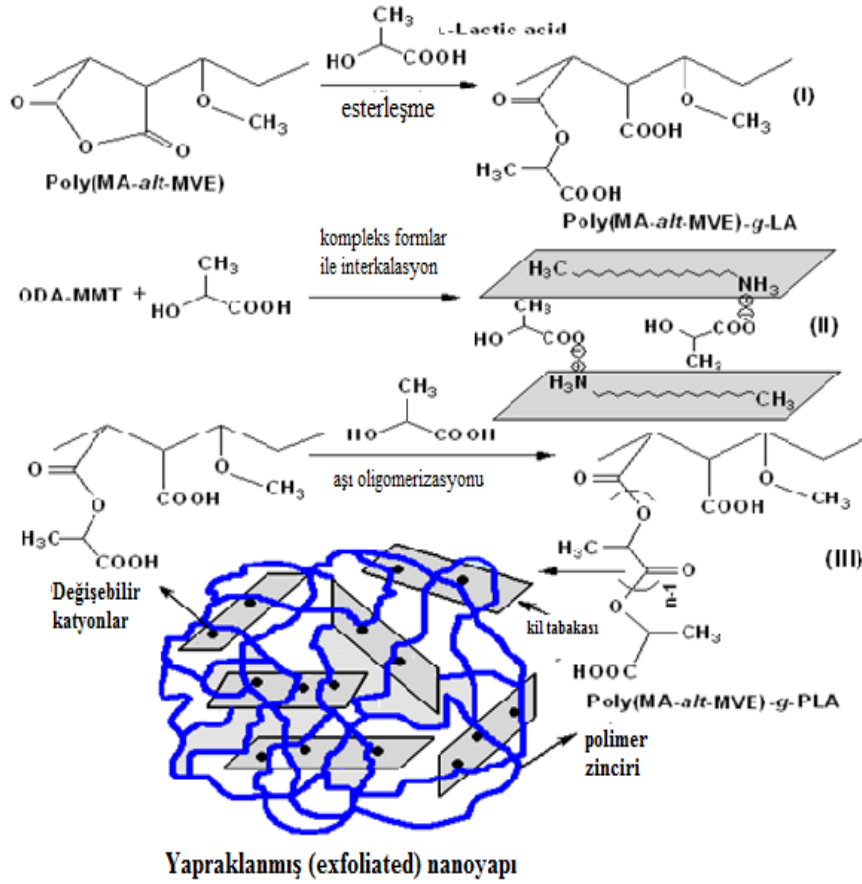
### **3.2.1. Poli(MA-*a/t*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi**

Farklı çözücüler kullanılarak sentezlenen poli(maleik anhidrit-*a/t*-metil vinil eter)/ODA-MMT nanokompozitlerle ilgili açıklayıcı bilgiler verildi.

Nanokompozitlerin sentezi iki yöntemle; interkalasyon/yapraklanma ve interlameller aşığı(graft) kopolimerizasyonu metodlarıyla yüzey katları oktadesil aminle modifiye edilen organik montmorillonit ODA-MMT eşliğinde çeşitli reaksiyon şartlarında gerçekleştirildi.

#### **3.2.1.1. Çözücü olarak polilaktik asit kullanılarak poli(MA-*a/t*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi**

Reaksiyonda kullanılacak kopolimer, kütlesinin %1 olacak şekilde alınarak çözücü (polilaktik asit) içerisinde magnetik karıştırıcı ile 3 saat karıştırıldı. Daha sonra bu çözücü içerisine kopolimer miktarının, kütlece % 3.2'si kadar ODA-MMT, silikat tabakalarının açılması ve çözünen polimer zincirlerinin tabakaların arasına daha iyi girmesi için damla damla eklendi ve magnetik karıştırıcı ile 3 saat daha karıştırılmaya devam edildi. Bazı deney koşullarında kopolimer ve organo silikat beraber tepkimeye sokulmadan önce agregasyon oluşumu azaltılmak için oda sıcaklığında ultrason banyosunda (Transsonic 470, Elma, Germany) 10, 20 ve 30 dakika olmak üzere bekletildi. Reaksiyondan alınan sıvı karışım fazla metanol ile çöktürüldü. Karışım 9000 rpm'de 15 dakika santrifuj edildi. Elde edilen yapı, vakumlu etüvde 40°C'de 1.2 psi basınçta 24 saat boyunca kurutuldu. Sentezlenen nanokompozit %75,7 verimlilikte ve kırık beyaz renkli ve toz haline getirilebilir olarak elde edildi.



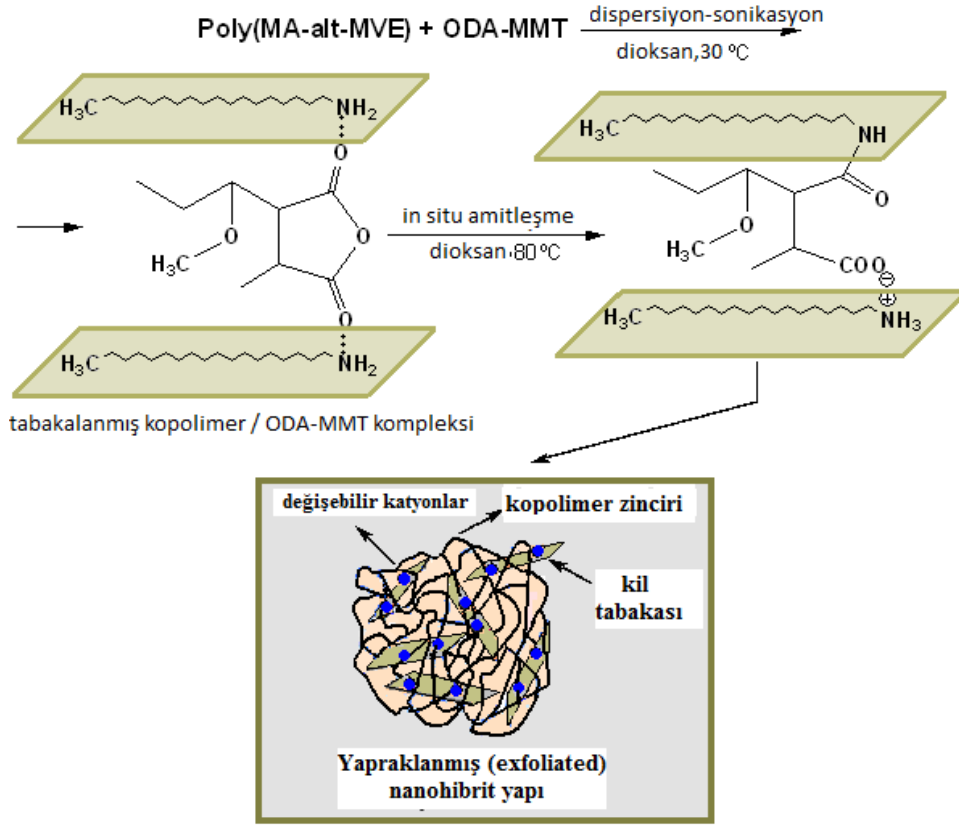
Şekil 3.1. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitinin (PLA ortamında) genel sentez şeması.

### 3.2.1.2. Çözücü olarak 1,4 dioksan kullanılarak poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi

Sentezde kullanılan kopolimer, önceki çalışmada olduğu gibi kütlesinin %1 olacak şekilde alındı ve bu çalışmada çözücü olarak 1,4 Dioksan kullanılıp magnetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 3 saat reaksiyona tabi tutuldu. Sonra içerisine kopolimer miktarının kütlece %3.2'si kadar ODA-MMT damla damla eklenip, magnetik karıştırıcı ile 4 saat daha karıştırıldı.

Reaksiyondan alınan sıvı karışım, fazla metanol ile çöktürüldü ve 9000rpm'de 15 dakika santrifuj edildi. Nanokompoziti, diğer safsızlıklardan ayırıştırmak için de dietil eterde

yıkandı. Elde edilen yapı, vakumlu etüvde 40°C de 1.2psi basınçta 24 saat boyunca kurutuldu. Sentezlenen nanokompozit %10 verimlilikte olup, açık sarı renkli ve toz haline getirilebilir olarak elde edildi.



Şekil 3.2. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT dioksan ortamında nanokompozitinin genel sentez şeması.

### 3.2.1.3. Çözücü olarak fosfat tamponu kullanılarak poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit sentezi

0.1 M Fosfat Tamponu ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ile hazırlanan nanokompozit yapılar antimikrobiyal test, antitümör aktivite ve immobilizasyon çalışmaları için kullanıldı. 0.1 M kullanılarak pH:7,4 olan fosfat tamponu ile hazırlandı ve pH 7,4 olarak ayarlandı. Hazırlanan çözücünün bir kısmı içerisine reaksiyonda kullanılacak kopolimer, kütlesinin %1 olacak şekilde katılıp ve eş zamanlı olarak çözücünün geri kalanın içerisine

kopolimer miktarının kütlece %3.2'si kadar ODA-MMT eklendi. Sonra her iki çözeltide magnetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırıldı. 24 saatlik süre sonunda kopolimerin bulunduğu çözelti şeffaf ve viskozitesi düşük bir karışım oluşumu gözlemlendi. Organo silikatın bulunduğu karışım ise viskozitesi daha yüksek, kırık beyaz renkli olarak izlendi. Daha sonra kopolimerin bulunduğu çözücü içerisine ODA-MMT karışımı damla damla eklenerek oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile 48 saat kadar karıştırıldı. Süre sonunda silikat tabakalarının açılması ve çözünen polimer zincirlerinin tabakaların arasına girmesi nedeniyle kırık beyaz renkli bir yapı gözlemlendi. Karıştırma işlemlerinin bu kadar uzun olmasının sebebi kopolimerin inorganik bir çözücüde uzun sürede çözünmesi ve çözünen kopolimerin organo silikat tabakaları arasına inorganik çözücü olan fosfat tamponunda uzun sürede nüfus etmesinin sağlanmasıydı. Reaksiyondan alınan sıvı karışım fazla metanol (%80) ile çöktürülmesi yapıldı. Çökmeyen kısım olasılığın karşına da metanol içerisinde bulunan karışım 9000rpm'de 15 dakika santrifuj edildi. Sonra 48 saat 25 °C'de 1,2 psi basınçta vakumlu etüvde bekletildi. Elde edilen ve kurutulan nanokompozit %87 verimlilikte olup sarı renkli, sert ve kırılabilir özellikteydi.

### **3.2.2. Sentezlenen nanokompozitlerin karakterizasyonu**

#### **3.2.2.1. Kimyasal yapılar (FTIR, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR)**

##### **FTIR spektroskopisi**

Bu çalışmada sentezlenen nanokompozitlerin analizleri Shimadzu, DR 811 marka Kyoto, Japonya FTIR spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Analizler 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında ve 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte yapıldı. Test örnekleri belirli oranlarda KBr ile toz halinde karıştırılarak hazırlandı.

##### **(<sup>1</sup>H) (<sup>13</sup>C) NMR spektroskopisi**

Bu çalışmada NMR spektroskopisi için kullanılan sistem BRUKER 400mhz / 54mm Ultrashield Standard, Almanya NMR sistemidir.

### **3.2.2.2. Fiziksel yapılar (XRD analizleri)**

Çalışmadaki analizlerde XRD-Rigaku D/MAX/2200-PC (Cu= 1,54059 Å) Bilecik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki cihazla yapıldı.

### **3.2.2.3. Yüzey ve iç morfolojileri (SEM ve TEM analizleri)**

#### **Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Çalışmada sentezlenen nanokompozitlerin SEM görüntü çalışmaları Bilecik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki JEOL JSM-6060LV model taramalı elektron mikroskobu ile yapıldı.

#### **Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi**

Çalışmamızda kullanılan JEOL JEM-2100F TEM, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarından yararlanıldı.

### **3.2.2.4. Termal davranışları (DSC ve TGA-DTG)**

#### **Eşzamanlı termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel termal gravimetrik (DTG) analizleri**

Çalışmada yapılan eşzamanlı termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Gravimetrik analizler DSC-DTG Setaram Instrumentations Labsys Caluire, Fransa) analizöründe, azot gazı atmosferinde, 100C/dk ısı aktarım hızında gerçekleştirildi.

#### **DSC analizi**

Çalışmada gereksinim duyulan polimerlerin ve nanokompozitlerin DSC analizleri Shimadzu - DSC-50 ile azot gazı atmosferinde gerçekleştirildi.



### **3.2.3. Poli(MA-alt-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerinin antimikrobsal ve antitümöral etkilerinin araştırılması**

Deneyde kullanılan saf organo silikatın (ODA-MMT) ve farklı molekül ağırlığındaki saf kopolimerlerin molekül ağırlığı, karşılaştırılmalı antimikrobsal etkisi ile laktik asit ve fosfat tamponu ortamında sentezlenen nanokompozitlerin, antimikrobsal etkileri araştırıldı.

Fosfat tamponu ortamında sentezlenen nanokompozitin ayrıca antitümöral etkisi için MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

#### **3.2.3.1. Antimikrobsal etkinin incelenmesi**

Farklı molekül ağırlığına sahip saf kopolimerler, ODA-MMT ve sentezlenen poli(MA-alt-MVE)/ODA-MMT nanokompozit yapının antimikrobiyal aktivite testi, disk difüzyon metodu ile belirlendi (Denizci, 1996;Çolak, 2006). Çalışmada patojen suş *Staphylococcus aureus*, 121°C'de 15 dakika sterilize edilen Todd Hewitt Broth (%3, pH:7.8) sıvı besiyerine 25ml/100ml Erlenmayer ve bulanıklığı Mc farland 0,5' e olacak şekilde ekimi yapılmış, inkübatörde 24 saat 37°C' de inkübe edildi. Antimikrobsal etkinin katı besiyerinde de izlenmesi amacıyla hazırlanan ve etiketlenen nutrient agar petrilere bulanıklığı yine Mc farland 0,5' olacak şekildeki bakteri kültüründen 0,1 ml alınarak steril cam baget çubukla ve nutrient agarlı petrilere yayılması yapıp inkübatörde 35-37°C' de inkübe edildi.

Farklı molekül ağırlığına sahip saf kopolimerler ODA-MMT ve sentezlenen poli(MA-alt-MVE)/ODA-MMT nanokompozit yapılarının, antimikrobiyal testi için, fosfat tamponu ve poli(laktik asit) (PLA) içinde çözüldü ve steril milipor filtrasyonun ardından 15 dakikada süreyle tekrar ultraviyole ışına maruz bırakıldı. Küçük petri kutusuna, 6.0 mm çapında Whatman No.1 filtre kağıdından diskler yapılarak otoklav sterilizasyonu yapıldı. Disklere steril anokompozit sıvısından 20 mikrolitre olacak şekilde emdirilerek etüvde kurumaya bırakıldı. Diskler steril ortanda ve pensler kullanılarak *Staphylococcus aureus* ekilen

nütrient agarlı petrilere yerleştirilerek 35-37°C' de 24 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Süre sonunda kağıt disk çevresinde oluşan clear (bakterinin ürenmediği alan) zonların çapları ölçülerek ve kontrol petri kutularındaki (bakteri bulunmayan) kağıt disk çapları dikkate alınarak antimikrobsal aktivite araştırıldı. Kontrol grubu petrilerdeki kağıt disklere, aynı koşullarda deneyin amacına göre 20 mikrolitre steril fosfat veya polilaktik asit emdirildi.

### **3.2.3.2. Antitümöral etkinin araştırılması**

Fosfat tamponu ortamında sentezlenen nanokompozitlerinin, MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1(stabil tetrazolyum tuzu) metodu ile tesbit edildi. Üretilen Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitler steril fosfat tamponu (pH:7.4) ile hazırlanmış ve 15 dakika ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakılarak sterilizasyon işlemi yapıldı.

İlk aşamada MCF-7 kanser hücrelerinin 48 well platelere her bir kuyucuğa  $10 \times 10^3$  hücre düşecek şekilde ekimi yapılmış, sonra kuyucuklara sıvı ortamda bulunan nanokompozit bileşikler 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde pipetlenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada her bir bileşik üç tekrarlı çalışılmıştır. Kontrol grubu olarak 48 saat sonunda sadece medium kullanılan her kuyucuğa 15  $\mu\text{l}$  WST-1 çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra, hücre canlılık tespiti için 48 kuyucuklu platelerin O.D yoğunluk değerleri, ELISA plate okuyucuda 420-480 nm'de yapıldı. WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmedi.

### 3.2.4. Lakkaz enzimi sentezi

Deneyisel çalışmalarımızda fenol oksidaz grubu enzimlerden lakkaz bakımından oldukça potent *Trametes (Coriolus) versicolor* ATTC 200801 fungus suşu kullanıldı. Stok kültürler Malt Extract Agar (Difco) katı besiyerine yapıp ve çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi. Aktifliğini kaybetmemeleri için stok kültürler her 4-6 haftada yatık malt extract agara transfer edildi. Deneyin amacına göre 28 °C'de 1-2 günlük inkübasyondan sonra çalışmalarda kullanıldı.

Lakkaz enziminin üretimi için modifiye-edilmiş Vogel Minimal besiyeri kullanıldı (Çiçek H. 2000). Besiyerinde kullanılan iz element stok çözeltisi (g/100 ml) : Sitrik asit.H<sub>2</sub>O: 2,5 g, ZnSO<sub>4</sub>: 2,5 g, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O: 0,5 g, CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O: 0.125 g, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O:0.025 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0.025 g, H<sub>3</sub>P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>). H<sub>2</sub>O: 0.025 g olacak şekilde hazırlanıp milipore filtrasyonla steril edildi. Vogel ana stok çözeltisi ise (g/100 ml) : Sodyum sitrat: 15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 25 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 10 g, MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O: 1,0 g, CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O: 0,5 g olacak şekilde hazırlandı. Modifiye Vogel Minimal besiyerini hazırlamak için Vogel Ana Stok çözeltisine % 1,0 oranında stok iz-element çözeltisi ve % 2 oranında glukoz eklendi. Besi yerinin pH'sı konsantre HCl ile 4.7'ye ayarlandı. 500 ml /1000 ml Erlenmayer olacak şekilde hazırlana besiyerleri otoklavda (110 °C de 1.5 atmosfer basınçta, 25 dakika) sterilize edildi. Milipor filtrasyaonla (0.45 µ delik çaplı, Millipore Co.)sterilize edilmiş stok thiamin çözeltisinden bu besiyerine son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde eklendi.

Besiyerlerine miçelyum suspansiyonları ekimi için, yatık stok malt-agarlı fungus şusuna 20 ml steril serum fizyolojik eklenerek homojenitesi sağlandı. Ekim, steril koşullarda 20 ml miçelyum-supansiyonu/500 ml besiyeri olacak şekilde yapıldı. Lakkaz üretimi için kültürler 30°C'de, 150 r.p.m çalkalama hızına ayarlanmış çalkalamalı-inkübatörde 10 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda fungus biyokitlesi, kültür sıvısından filtrasyonla (Whatman No:3) yöntemiyle ayrıldı. Elde edilen kültür filtratları çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanıldı.

### 3.2.5. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlere enzim immobilizasyonu ve optimizasyon koşullarının incelenmesi

Kovalent ve fiziksel yöntemle lakkazın kompozite bağlanma durumu uv-visible spektrometre (Schmadzu 1240) ile ölçülerek karşılaştırıldı. Deney şartları her iki yöntemde pH: 5.0, 30 dakika süre ve 37°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Fiziksel bağlanmada nanokompozit ve enzim doğrudan etkileşime sokulurken, kovalent bağlanma yönteminde nanokompozit önce EDC(1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit) ile etkileştirilerek enzim ilavesi yapıldı. Reaksiyon sonunda her iki yöntemde de immobilize yapılar, 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatantın, UV- visible spektrometrede, asetat tamponuna karşı 280 nm'de O.D'leri alındı.

İmmobilizasyon deneyleri kesikli sistem olarak yapıldı. 4,0 ml Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit çözeltisine, lakkaz enzimi denge süresi boyunca 30 dakika, 200 rpm rotasyonel şekilde karıştırıldı. Fiziksel adsorpsiyonla lakkaz immobilizasyonu için optimum pH, lakkaz enzimi başlangıç derişimi, süre ve sıcaklık araştırıldı. Daha sonra immobilize enzim ile reaktif red 5 boyar madde renk giderimi ve optimizasyon çalışmalarına geçildi.

MA-*alt*-MVE nanokompozitlerine lakkaz immobilizasyon kapasitelerinin belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik kullanıldı:

$$q = [(C_0 - C)V]/m \quad (3.1)$$

Burada q, birim nanoyapı üzerine adsorplanan lakkaz kütlesini (mg/g);  $C_0$  ve C sırasıyla, nanoyapılar ile lakkazın etkileştirilmeden önceki ve sonraki derişimlerini (mg/mL); V, hacmi (mL); m, deneylerde kullanılan nanoyapı kütlesini (g) göstermektedir.

### **3.2.5.1. Lakkaz kalibrasyon eğrisinin hazırlanması**

Lakkaz kalibrasyon eğrisini hazırlamak amacıyla 0,005mg/ml, 0,01mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml lakkaz çözeltileri, 0,1 M ve pH: 4.5 sodyum asetat tamponu kullanarak hazırlandı. Örnek çözeltiler 10 dakika 37°C etüvde (Edmund Bühler GmbH, Germany) bekletildikten sonra uv-görünür bölge spektrofotometresinde 280 nm Optik yoğunluklar (O.D.) okundu. Kalibrasyon grafiği lakkaz derişimlerine karşı absorbans değerleri kullanılarak yapıldı.

### **3.2.5.2. İmmobilizasyon koşullarına pH etkisi**

Enzim immobilizasyonunda ortam pH'sının etkisini belirlemek amacı ile pH 3,5 - 5,5 için 4,0 ml-0,1 M Asetat tamponu, pH 6,0-7,4 için ise 4,0 ml 0,1M Fosfat tamponu içine  $2,5 \times 10^{-3}$  g nanokompozit ilave edilerek 30 dakika süreyle, 37°C'de ve 200 r.p.m. çalkalamalı hızda tabi tutuldu. Optimum pH'ın hesaplanması için 3.2.5'teki eşitlik kullanıldı.

### **3.2.5.3. İmmobilizasyon koşullarına başlangıç lakkaz konsantrasyonu etkisi**

Enzim immobilizasyonunda lakkaz konsantrasyonunun immobilizasyon üzerine etkisini araştırmak amacıyla, lakkaz konsantrasyonu 0,005-0,01-0,025-0,05-0,075-0,1-0,15 mg/ml olacak şekilde, önceden belirlenen tüm deney koşulları (pH:4.5, nanokompozit miktarı  $2,5 \times 10^{-3}$  g, immobilizasyon süresi 30 dakika, 37°C'de ve 200 r.p.m. karıştırma hızında) sabit tutulmak kaydı ile gerçekleştirildi ve 3.2.5'teki eşitlik kullanılarak optimum lakkaz konsantrasyonu hesaplandı.

#### **3.2.5.4. İmmobilizasyon koşullarına sıcaklık etkisi**

Ortam sıcaklığının immobilizasyona etkisini belirlemek için 4-20-30-37-50-60°C'lerde denendi. Daha önceden yapılan koşullar sabit (pH:4.5, nanokompozit miktarı  $2,5 \times 10^{-3}$  g, immobilizasyon süresi 30 dakika, 37°C'de ve 200 r.p.m. karıştırma hızında) tutularak, 3.2.5'teki eşitlik yardımıyla optimum sıcaklığın hesaplanması yapıldı.

#### **3.2.5.5. İmmobilizasyonda temas süresi etkisi**

Nanokompozit yapı ile lakkaz enziminin immobilizasyon aşamasında temas süresinin etkinliği araştırıldı. Bu amaçla 5-10-20-30-45-60-90-120 dakikalarda Daha önceden yapılan koşullar sabit (pH:4,5, nanokompozit miktarı  $2,5 \times 10^{-3}$ g, immobilizasyon süresi 30 dakika, 37°C'de ve 200 r.p.m. karıştırma hızında) tutularak, optimum temas süresi hesaplanması için 3.2.5'teki eşitlik kullanılmıştır.

#### **3.2.5.6. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin tayini**

Kültür ortamı sıvılarında lakkaz aktivitesi ölçümleri Taşpınar ve Kolankaya (1998) tarafından kullanılan yöntemle yapıldı. Yöntem gereği reaksiyon tüplerine 1mM Guaikol (Sigma Co.) içeren 5mL Na-asetat tamponu (50 mM, pH 4,6) ve 0,1 mL enzim kaynağı konuldu. Kontrol tüplerde enzim kaynağı olarak kaynatılarak enzim aktivitesi ortadan kaldırılmış kültür sıvıları kullanıldı. Tüpler 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon tüplerindeki absorbans (optik dansite: O.D.) değişimleri 465 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (Schimadzu UV-1240) kontrole karşı okundu. U/ml enzim aktivitesi 37 °C'de, 1 dakikada, 465 nm'de O.D'yi 0,1 birim arttıran enzim miktarı olarak tanımlandı.

Aynı yöntem immobilize enzim çalışmalarında da uygulandı. İmmobilizasyon işleminden sonra nanokompozit kütlesi çöktürülerek, enzimle etkileşen substratın ürüne değişim absorbansı ölçülmüştür. Tüm denemeler 3 tekrarlı ve birbirinden bağımsız olarak oluşturulan deney grupları ile yapılmıştır.

### 3.2.6. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk gideriminin ve optimizasyon çalışmalarının incelenmesi

Optimizasyon çalışmaları için öncelikle reaktif red 5 boyarmaddesi için UV- visible spektrofotometre ile dalga boyu taraması yapılmış ve en yüksek absorbans değeri 545 nm olarak bulunmuştur. Bundan sonraki çalışmalarda bu değer sabit tutularak ölçümler yapılmıştır. Reaktif Red 5 biyosorpsiyonu için optimum koşullarının belirlenmesi amacıyla; Boyar madde kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve optimum pH, başlangıç boyarmadde konsantrasyonu, temas süresi ve sıcaklık parametreleri incelenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında toplam hacim 4 ml olacak şekilde çalışıldı. Lakkaz immobilize edilen nanokompozitler 7000 r.p.m’de 15 dakika santrifüj yapılarak çöktürülerek üzerine renk gideriminin takibi için 4,0 ml boya maddesi eklendi ve spektrofotometrede, 545 nm dalga boyunda, renk giderimi absorbans değerleri belirlendi. Tüm deneylerde kontrol grubu olarak lakkaz ilave edilmeyen boyarmadde çözeltileri kullanıldı. Renk giderme işlemindeki değişiklikleri, renk işlemi gerçekleştirilen çözeltiden alınan en son örneğin absorbans değeri dikkate alınarak % renk giderimi hesaplandı. Gerçekleştirilen renk gideriminin etkinliğinin “%” ifadesinde, aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$\text{Renk giderimi (\%)} = \frac{I-F}{I} \times 100 \quad (3.2)$$

I :Başlangıç absorbans değeri

F: Renk giderim işleminden sonraki absorbans değeri

“Reactive Red 5” boyarmaddesi ile gerçekleştirilen renk giderimi işlemi sonucunda, işlem görmüş boyarmadde çözeltilisine ait % renk giderimi değeri absorbans değerleri yardımıyla hesaplandı.

Elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini görebilmek amacıyla her çalışma en az  kez tekrarlandı. Kullanılan boyarmaddelerin renk giderimi işlemi esnasında alınan örneklere göre absorbans değerleri ve % renk giderimi değerleri, karşılaştırmalı çizelgeleri ile birlikte verildi.

#### **3.2.6.1. “Reactive Red 5” boyar madde kalibrasyon eğrisi**

Renk giderme işleminin incelenmesi amacıyla, öncelikle kullanılan boyar maddenin 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 ve 0.04 g/L olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda zelteleri hazırlanmış ve UV-Görünür Alan Spektrofotometresinde 545 nm dalga boyu aralığında incelendi ve her bir boyar madde için “kalibrasyon doğru denklemi” elde edildi.

#### **3.2.6.2. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam pH’nın etkisi**

#### **Serbest enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam pH’nın etkisi**

Serbest lakkazın, boyar madde renk gideriminde pH’nın etkisini belirleyebilmek amacı ile, 1-10 pH aralığı içindeki farklı pH’larda ve 50 mg/l boyarmadde içeren zelteler hazırlandı. pH 1.0-2.0 için KCl-HCl tamponu, pH 3.0-5,5 için 0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 6.0-7,4 için 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı. Herbir çözeltiye 0,025 mg/ml konsantrasyonunda serbest lakkaz eklenerek inkübe edildi. Ancak deney koşulları 25  C’de, boyar madde konsantrasyonu (50 mg/L) ve çalkalama hızı (200 rpm.) sabit tutuldu. Farklı pH değerlerinde reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6’da anlatılan yönteme göre yapıldı.



### **İmmobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam pH'nın etkisi**

Ortam pH değerinin immobilize lakkaz ile boyar madde renk giderimi üzerine etkisini belirlemek amacı ile geniş bir pH aralığında çalışılmıştır. Bu amaçla, 1-10 pH aralığında 50 mg/l boyarmadde içeren çözeltiler hazırlanmıştır. pH 1-2 için KCl-HCl tamponu, pH 3.0-5,5 için 0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 6-7,4 için 0,1 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu çözeltilere optimum koşullarda (pH:4.5, sıcaklık:37°C, zaman:1saat, lakkaz konsantrasyonu 0,025mg/ml, nanokompozit kütlesi:0,0025 g) önceden hazırlanan pellet şeklindeki immobilize lakkaz ilave edilir. Deney süresince tüm koşullar (zaman:30 dakika, sıcaklık:37°C, boyar madde konsantrasyonu 50 mg/L ve çalkalama hızı:200 r.p.m.) sabit tutulmuştur. Her bir pH değerindeki reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6'da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **3.2.6.3. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine başlangıç boyarmadde konsantrasyonu etkisi**

#### **Serbest enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine başlangıç boyarmadde konsantrasyonu etkisi**

Serbest lakkazın boyar madde renk giderimine başlangıç boyarmadde konsantrasyonu etkisini belirleyebilmek amacı ile boyarmadde konsantrasyonu 0,01-0,1 mg/l aralığında değiştirilmiştir. Herbir çözeltiliye 0,025 mg/ml konsantrasyonunda serbest lakkaz eklenmiştir. Tepkime süresince, pH(5.0), sıcaklık (25 °C) ve çalkalama hızı (200 rpm.) sabit tutulmuştur. Her bir konsantrasyon değerindeki reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6'da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **İmmobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine başlangıç boyarmadde konsantrasyonu etkisi**

Başlangıç boyarmadde konsantrasyonunun immobilize lakkaz ile boyar madde renk giderimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, Reaktif Red 5 başlangıç boyarmadde konsantrasyonu 0,01-0,1 mg/l aralığında değiştirilmiştir. Bu çözeltilere optimum koşullarda(pH:4.5,sıcaklık:37 C, zaman:1 saat, lakkaz konsantrasyonu 0,025mg/ml, nanokompozit kütlesi:0,0025 g) önceden hazırlanan pellet şeklindeki immobilize lakkaz ilave edilir. Deney süresince tüm koşullar (pH:5, zaman:30 dakika, sıcaklık:37°C ve çalkalama hızı:200 r.p.m.)sabit tutulmuştur. Her bir konsantrasyon değerindeki reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6’da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **3.2.6.4. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam sıcaklığı etkisi**

#### **Serbest enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam sıcaklığı etkisi**

Serbest lakkazın boyar madde renk giderimine sıcaklık etkisini belirleyebilmek amacı ile geniş bir sıcaklık aralığında(4-60 °C) çalışılmıştır. Herbir çözeltilere 0,025 mg/ml oranında serbest lakkaz eklenmiştir. Tepkime süresince, pH (5.0), boya konsantrasyonu (50 mg/L) ve çalkamala hızı(200 rpm) sabit tutulmuştur. Her bir sıcaklık değerindeki reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6’da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **İmmobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine ortam sıcaklığı etkisi**

Sıcaklığın immobilize lakkaz ile boyar madde renk giderimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 4-60 °C aralığında değişen sıcaklıklar denenmiştir. Bu çözeltilere optimum koşularda (pH:4.5, sıcaklık:37°C, zaman:1 saat, lakkaz konsantrasyonu 0,025mg/ml, nanokompozit kütlesi:0,0025 g) önceden hazırlanan pellet şeklindeki immobilize lakkaz ilave edilir ve tüm koşullar( pH:5, zaman:30 dakika, başlangıç boyar madde konsantrasyonu: 50mg/L ve çalkalama hızı:200 r.p.m.)sabit tutulmuştur. Her bir sıcaklık değerindeki reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6’da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **3.2.6.5. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine temas süresi etkisi**

#### **Serbest enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine temas süresi etkisi**

Serbest lakkazın boyar madde renk giderimine **zaman** etkisini belirleyebilmek amacı ile geniş bir zaman aralığında (5-120 dakika) çalışılmıştır. Herbir çözeltiliye 0,025 mg/ml oranında serbest lakkaz eklenmiştir. Tepkime süresince, pH (5.0), sıcaklık (25 °C), boya konsantrasyonu (50 mg/L) ve çalkalama hızı (200 rpm) sabit tutulmuştur ve değişen sürelerde örnekler alınmıştır. Her bir süre değeri için birbirinden bağımsız deney grupları oluşturulmuştur. Her bir zamanda alınan reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6’da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **İmmobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine temas süresi etkisi**

Zamanın immobilize lakkaz ile boyar madde renk giderimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 5-120 dakika aralığında değişen zaman aralığı denenmiştir. Bu çözeltilere optimum koşularda (pH:4.5,sıcaklık:37°C,zaman:1 saat, lakkaz konsantrasyonu 0,025mg/ml, nanokompozit kütlesi:0,0025 g) önceden hazırlanan pellet şeklindeki immobilize lakkaz ilave edilir ve tüm koşullar (pH:5, sıcaklık:37°C , başlangıç boyar madde konsantrasyonu: 50mg/L ve çalkalama hızı:200 r.p.m.) sabit tutulmuştur ve değişen sürelerde örnekler alınmıştır. Her bir süre değeri için birbirinden bağımsız deney grupları oluşturulmuştur. Belirlenen her bir zamanda alınan reaktif red 5 boyar maddesine ait % renk giderimi Bölüm 3.2.6’da anlatılan yöntemle göre yapıldı.

### **3.2.6.6. Serbest ve immobilize enzim ile “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine depolanma süresinin etkisi**

Enzim immobilizasyonundaki en önemli parametrelerden biri de immobilize edilmiş enzimin depolama karallığıdır. Hem serbest hemde immobilize lakkaz pH 4.5ta, sodyum asetat tamponu(0,01 M) içinde + 4 °C da depolanmıştır.Depolanmış serbest ve immobilize lakkazdan belirli aralıklarla (0.,3.,6.,9.,12.,15.,18.,21.,24.,27. gün) örnek alınarak Bölüm 3.2.6.’da anlatılan yöntemle göre boyar madde renk giderimi tayini yapıldı. Boyar madde renk gideriminde tepkime süresince, pH (5.0 ) ,boyar madde konsantrasyonu(50 mg/l) , sıcaklık (25 °C) ve çalkalama hızı (200rpm.) sabit tutuldu.

### **3.2.6.7. “Reactive Red 5” boyar madde renk gideriminin immobilize enzimin kullanım sayısı ile değişimi**

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 1 günde 10 kez tekrar kullanıldı. Bu amaçla optimum koşularda(pH:4.5, sıcaklık:37°C, zaman:1 saat, lakkaz konsantrasyonu 0,025mg/ml, nanokompozit kütlesi:0,0025 g) önceden hazırlanan pellet şeklindeki immobilize lakkazların Reaktif Red 5 boyar madde renk giderimine ait %

renk giderimi Bölüm 3.2.6'da anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5.0), boyar madde konsantrasyonu (50 mg/L), sıcaklık (25 °C) ve çalkalama hızı (200 rpm) sabit tutuldu.

Tüm denemeler 3 tekrarlı ve birbirinden bağımsız olarak oluşturulan deney grupları ile yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

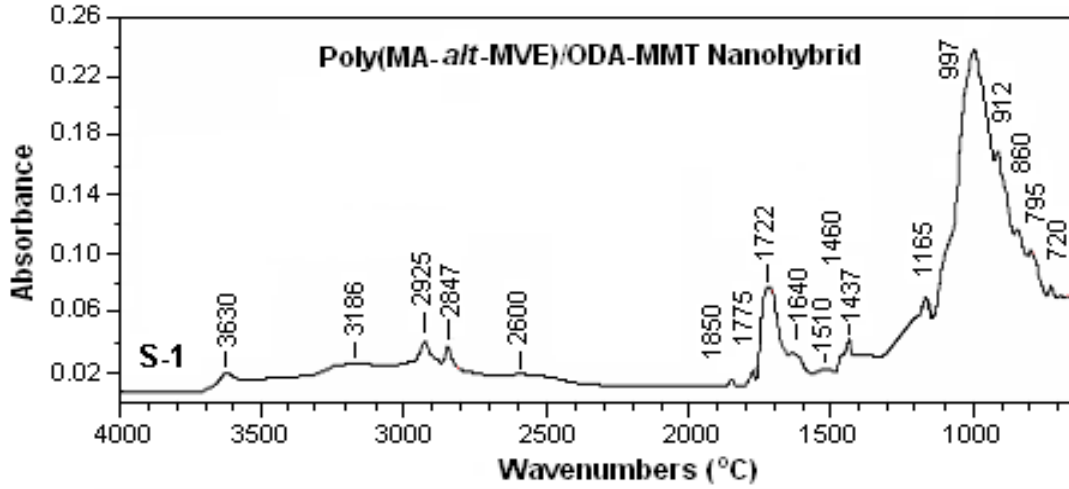
### 4.1. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT Nanokompozit Karakterizasyonu

#### 4.1.1. Kimyasal yapıların (FTIR, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR) analizleri

##### 4.1.1.1. FTIR analiz sonuçlarının incelenmesi ve açıklanması

Farklı çözücüler ile sentezlenen nanokompozitlerde, kopolimerler ve ODA-MMT arasındaki arayüzey etkileşimleri, FTIR analiz yöntemiyle incelenmiş ve ortaya koyulmuştur. FTIR spektrumlarının (Şekil 4.1 ve 4.2.) sonuçları her bir sistem için kopolimerleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve melzemelerin kimyasal yapıları çeşitli fonksiyonel gruplara uygun gelen karakteristik absorpsiyon bantlarının varlığı ile belirlenmiştir. Spektrumlar hem organik hem de kopolimerlere ait karakteristik pikleri içermektedir.

Farklı çözücüler eşliğinde sentezlenen poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerinin FTIR spektrumları Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. FTIR spektrumunda karbonil bölgesindeki anhidrit gruplarına ait piklerin şiddetlerinin önemli ölçüde azalırken (1850-1700 cm<sup>-1</sup>), asit ve amid gruplarına ait bölgedeki piklerin ortaya çıkması (1710-1630 cm<sup>-1</sup>), kopolimerlerin serbest karboksil içeren birimlerinin tabakaların yüzeyindeki alkil aminle (veya ammonium) amidleşme reaksiyonu üzerinden moleküler düzeyde hibritleştiğinin göstergesidir.

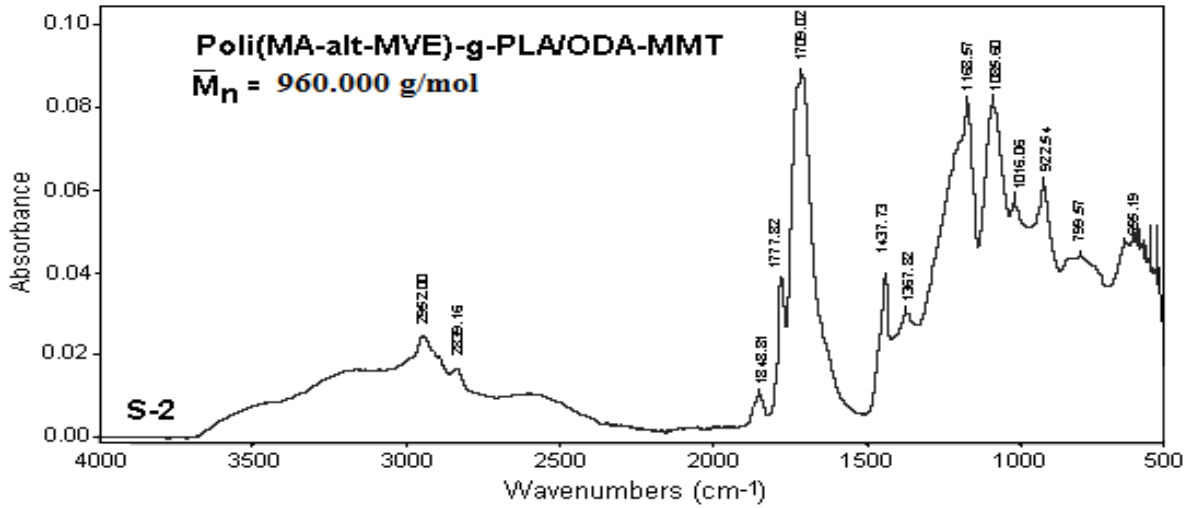


Şekil 4.1. Poli(MA-*alt*-MVE) ( $M_n$ :  $960 \times 10^3$  g/mol)/ODA-MMT nanokompozitin FTIR spektrumu (KBr pellet). Sentez yöntemi: dioksan ortamında tabakalar arası aşığı (graft) kopolimerizasyonu.

**Dioksan ortamında sentezlenen poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT (şekil 4.1) ( $\text{cm}^{-1}$ ):**

1850 ve  $1775 \text{ cm}^{-1}$  (Maleik anhidrit birimindeki C=O gerilme) ,  $1200 \text{ (m)}$  and  $1090 \text{ (m)}$   $\text{cm}^{-1}$  (Maleik anhidrit biriminde C-O ve C-O-C bantları),  $2925 \text{ cm}^{-1}$  (m) (Metil-vinil-eter birimindeki  $\text{CH}_3$  içerisindeki C-H bandı),  $2847 \text{ cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde  $\text{CH}_2$  içerisindeki C-H bandı (zincir ana yapı),  $1460$  ve  $1437 \text{ cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  deformasyonu),  $1352 \text{ cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde O- $\text{CH}_3$  içerisindeki  $\text{CH}_3$  deformasyonu),  $912 \text{ cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde C-O deformasyonu),  $720 \text{ cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  deformasyonu),  $1640$  ve  $1722 \text{ cm}^{-1}$  ( NH-C=O amid bandı),  $1510 \text{ cm}^{-1}$  (Hidrojen bağlı  $\text{COO}^-$  gerilimi ) ,  $3630 \text{ cm}^{-1}$  (Organo kil biriminde H-bağlı -SiOH veya OH grupları),  $3186 \text{ cm}^{-1}$  (Organokil biriminde H-bağlı  $\text{NH}_2$  grubu),  $2925 \text{ cm}^{-1}$  (Organokil biriminde CH gerilme (alkil grup)),  $2847 \text{ cm}^{-1}$  (Organokil biriminde  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  içerisinde C-H bandı),  $2600 \text{ cm}^{-1}$  (Oktadesil amine/amit içerisinde N-C bandı),  $1165 \text{ cm}^{-1}$  (Organokil biriminde C-H eğilme bandı) ,  $997 \text{ cm}^{-1}$  (Organo kil biriminde yapraklanmış (exfoliated) yapıdaki Si-O-Si gerilme),  $860 \text{ cm}^{-1}$  (Organokil

biriminde –SiOH içerisindeki Si–O gerilmesi), 795  $\text{cm}^{-1}$  (Organo kil biriminde C-H eğilme bandı)



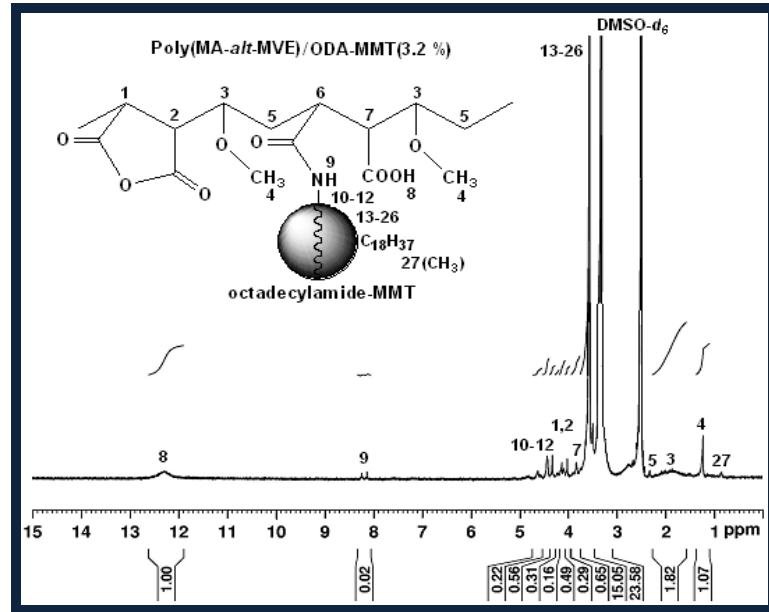
Şekil 4.2. Fonksiyonel kopolimer-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitinin FTIR spektrumu (KBr pellet). Sentez yöntemi: LA ortamında tabakalar arası aşığı (graft) kopolimerizasyonu.

**Polilaktik asit ortamında sentezlenen poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT:** 1848 ve 1777  $\text{cm}^{-1}$  (Maleik anhidrit birimindeki antisimetrik C=O gerilme), 1709  $\text{cm}^{-1}$  (Maleik anhidrit birimindeki simetrik C=O gerilme, asit C=O gerilmesi), 1300 (m) and 1180 (m)  $\text{cm}^{-1}$  (Maleik anhidrit biriminde C-O ve C-O-C bantları) 2962 (m)  $\text{cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter birimindeki CH<sub>3</sub> içerisindeki C-H bandı), 2869  $\text{cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde CH<sub>2</sub> içerisindeki C-H bandı), 1460 ve 1437  $\text{cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> deformasyonu), 1367  $\text{cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde O-CH<sub>3</sub> içerisindeki CH<sub>3</sub> deformasyonu), 1016  $\text{cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde C-O deformasyonu) 720  $\text{cm}^{-1}$  (Metil-vinil-eter biriminde CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> deformasyonu) 1640 ve 1722  $\text{cm}^{-1}$  ( NH–C=O amid bandı), 3630  $\text{cm}^{-1}$  (Organo kil biriminde H-bağlı –SiOH veya OH grupları), 3210  $\text{cm}^{-1}$  (Organokil biriminde H-bağlı NH<sub>2</sub> grubu), 2925  $\text{cm}^{-1}$  (Organokil biriminde CH gerilme (alkil grup)), 2879  $\text{cm}^{-1}$  (Organokil biriminde CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> içerisinde C–H bandı), 2610  $\text{cm}^{-1}$  (Oktadesil amine/amit içerisinde N–C bandı), 1367  $\text{cm}^{-1}$  (Organokil

biriminde C-H eğilme bandı), 1086 cm<sup>-1</sup> (Organo kil biriminde yapraklanmış (exfoliated) yapıdaki Si–O–Si gerilme), 922 cm<sup>-1</sup> (Organokil biriminde –SiOH içerisindeki Si–O gerilmesi), 790 cm<sup>-1</sup> (Organo kil biriminde C-H eğilme bandı)

#### 4.1.1.2. NMR (<sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR ) analiz sonuçlarının incelenmesi

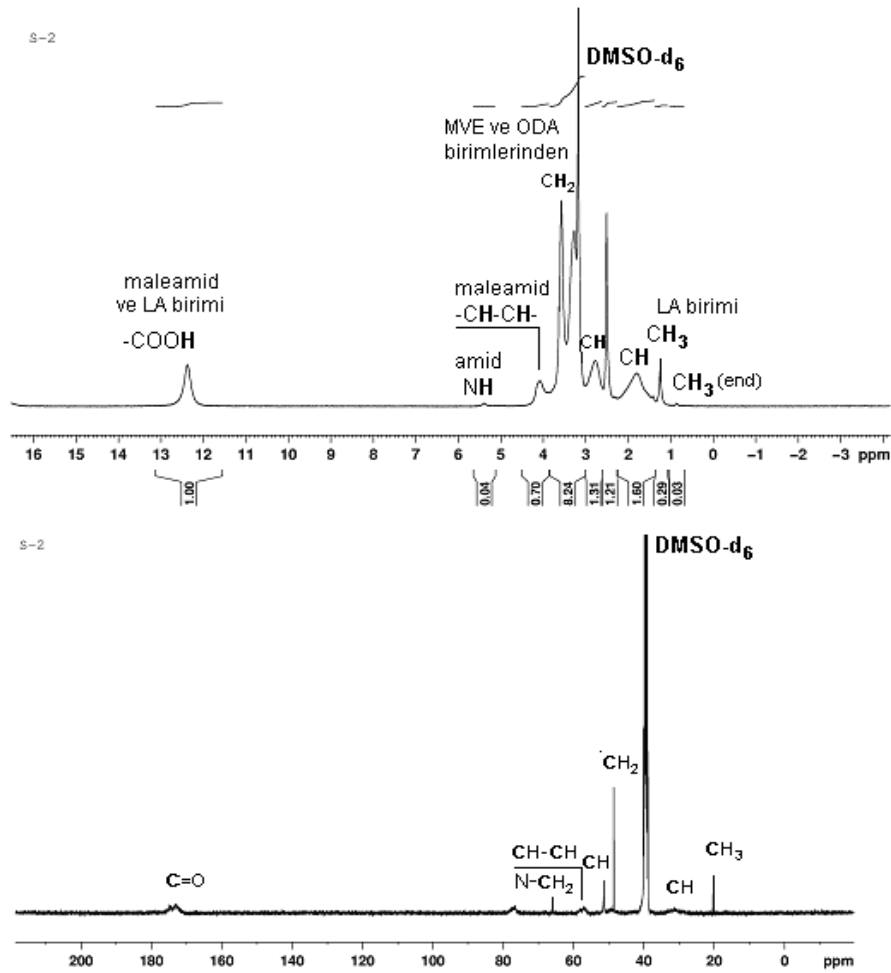
NMR atom çekirdeğinin kuantum mekanik manyetik özelliklerine dayanan fiziksel bir tekniktir. Tek sayılı proton veya nötron içeren atomlar içsel manyetik moment ve açısal momentuma sahiptirler, bilinen en genel atomlar hidrojen (<sup>1</sup>H) ve karbon (<sup>13</sup>C)'dur. Bunun yanında diğer elementler de incelenebilir. Çeşitli çözücü ortamlarında sentezlenen kompozitlerin kimyasal yapıları ve fonksiyonel grupların varlığı, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektroskopi yöntemlerle de incelenerek tespit edilmiştir. Bu analizlerin sonuçları ve gereken yorumları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.3. Poli(MA-*alt*-MVE) /ODA-MMT nanokompozitin (dioksan ortamında) <sup>1</sup>H spektrumu. Çözelti: DMSO-d<sub>6</sub>.

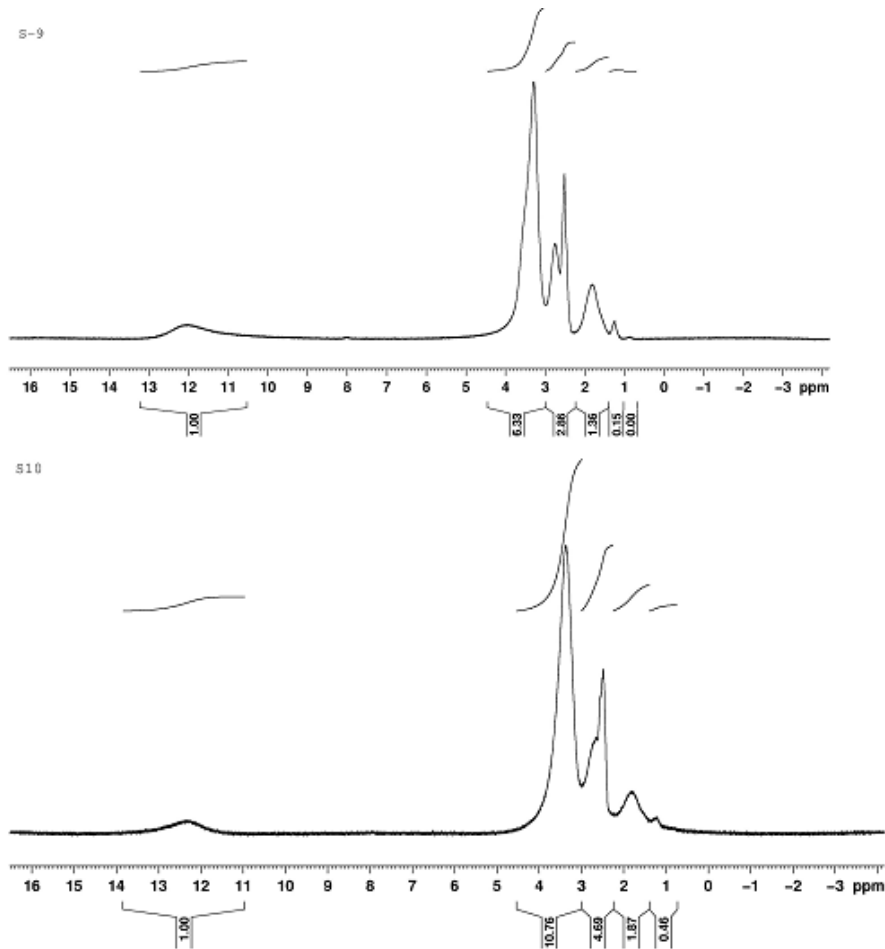


Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda poli(MA-*alt*-MVE) kopolimerinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu ile kıyaslandığında (Şekil 4.3), karakteristik pikler şu şekilde değişmiştir: Kopolimerin spektrumundan farklı olarak, nanokompozit yapının  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda, ana zincirdeki CH ve  $\text{CH}_2$  protonu ve  $\text{CH}_3$  (metoksi grubuna ait) proton piklerine ek olarak amin NH grubuna ait protona (9) ve COOH protonuna (8) ait pikler sırasıyla ortaya çıkmıştır. Karşılaştırmalı  $^1\text{H}$ -NMR pik analizi, poli(MA-*alt*-MVE) kopolimerinin anhidrit gruplarıyla ve ODA-MMT'nin yüzeyindeki alkil amonyum grupları arasında amidleşme reaksiyonunun gerçekleştiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.4. Poli(MA-*alt*-MVE) ( $M_n = 1.13 \times 10^6$  g/mol)-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu. Çözelti:  $\text{DMSO-d}_6$ .

Kopolimer-g-PLA silikat tabakalı nanokompozitinin kimyasal yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR analiz yöntemleriyle de tespit edilmiştir. Bu spektrumlarda karboksil grubunun protonuna ve C=O gruplarının carbon atomlarına, amid grubunun NH protonuna ve aşılınmış laktik asit birilerinin  $\text{CH}_3$  ve CH gruplarına ait piklerin varlığı gözlenilmiştir. Bu sonuçlar nanoyapı oluşumunda önemli katkıda bulunan in situ proseslerin; tabakalar- ve fazlararası kimyasal reaksiyonun (kopolimerin anhidrit gruplarına organik kilin octadesil amin fragmentleriye amidleşmesi) gerçekleşmesini göstermektedir.



Şekil 4.5. Poli(MA-*alt*-MVE) ( $M_n = 960.000$  ve  $485.000$  g/mol)-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitlerin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu. Çözelti:  $\text{DMSO-d}_6$ .

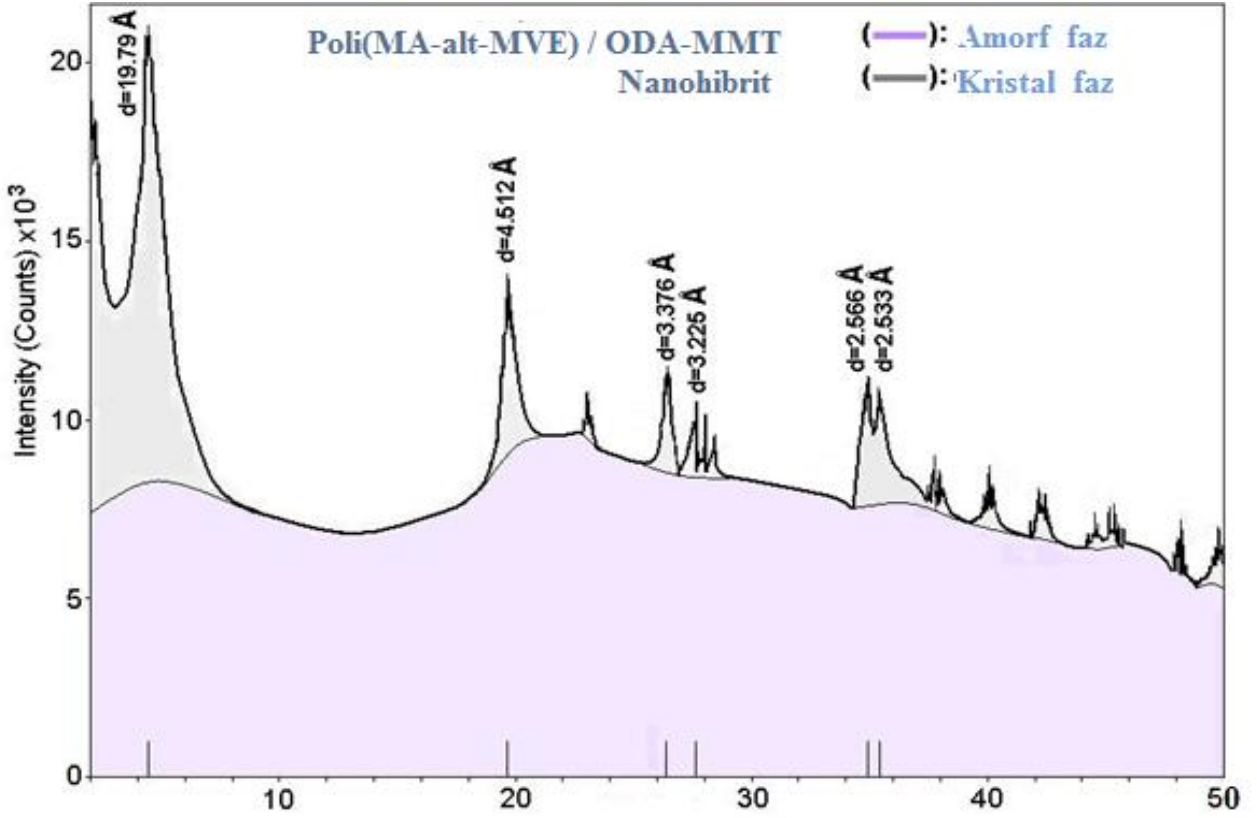
Şekil 4.4 poly(MA-*alt*-MVE)-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunu vermektedir. PLA ortamında sentezlenen nanokompozitlere ait  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda da, poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitinin spektrumu (Şekil 4.3) ile analogik pikler gözlenmiştir. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitinde, kopolimerinin anhidrit gruplarıyla, ODA-MMT'nin yüzeyinde bulunan alkil amonyum grupları arasında yine amidleşme reaksiyonunun gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Daha detaylı bilgiler  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (Şekil.4.4) yorumuyla ortaya koyulmuştur. Spektrumda aşağıdaki kimyasal kayma değerleri gözlenmiştir: 58.01 ppm ( -CH-O), 49.08 ppm (-CH-CH- zincir ana yapı), 32.3 ppm (CH<sub>3</sub>O ve -CH<sub>2</sub>). Poly(MA-*alt*-MVE)'ye ait karakteristik  $^{13}\text{C}$  NMR pikleri 20.49 ve 66.70 ppm'de gözlenir (Muenprasat et al., 2010). Bu çalışmada sentezlenen poli(MA-*alt*-MVE)-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitine ait  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda MA ve PLA gruplarına karşılık gelen bölgelerde (20. 51 ve 67.80 ppm) pik gözlenmiş olması poli(MA-*alt*-MVE) kopolimerine PLA'nın aşılmasındaki başarının bir göstergesidir. Aynı zamanda 174 ppm'de gözlenen pik (maleamid ve anhidrit C=O), aşılınmış kopolimer ile ODA-MMT arasındaki amid bağlanması hakkında bilgi verir.

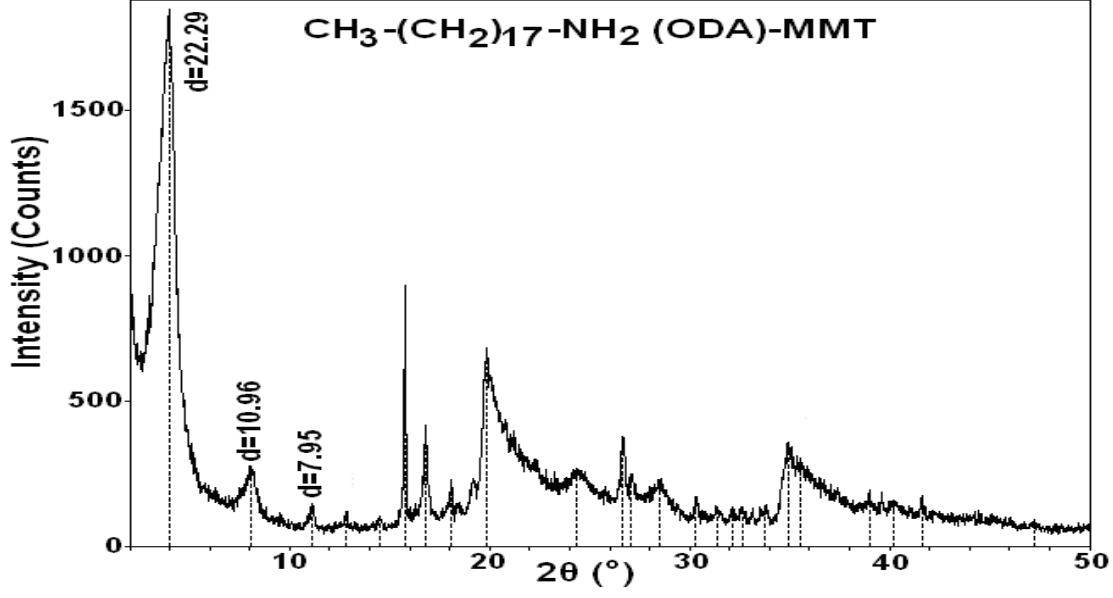
Laktik asitin matriks kopolimeri üzerine lamellerarası aşılama derecesi kullanılan kopolimerin molekül ağırlığına bağlı olarak gözlenen oranda değişmektedir. Aynı koşullarda farklı molekül ağırlıklara ( $M_n$ ) sahip matriks kopolimerleri kullanarak sentezlenmiş kopolimer-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitlerin NMR spektrumlarından (Şekil 4.5) görüldüğü gibi laktik asit birimlerine ait CH or CH<sub>3</sub> grublarının şiddeti ve pik alanı kopolimerin  $M_n$  değerlerinin azalmasıyla gözlenen derecede artmaktadır. Bundan dolayı nisbeten düşük  $M_n$  değerlerinde in situ proseslerin; fazlararası iletişimlerin (H-bağı, aşılama ve amidleşme) daha kolay gerçekleşmektedir.

#### 4.1.2. Fiziksel yapıların (XRD) analizleri

Sentezlenen nanokompozitlerin ve saf organik kilin (ODA-MMT) fiziksel yapılarının XRD analizleri aşağıdaki spektrumlarda gösterilmiş ve karşılaştırmalı analiz sonuçları açıklanmıştır.

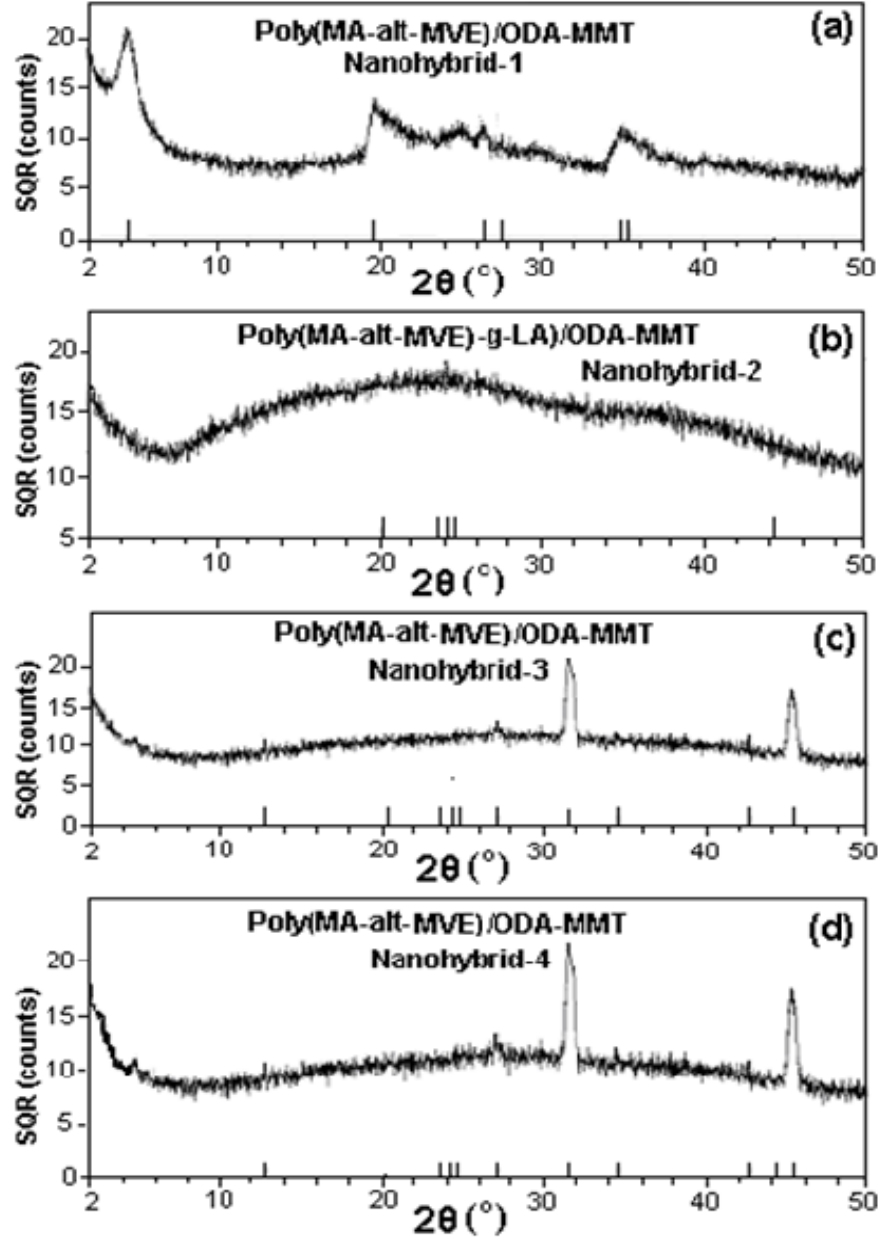


Şekil 4.6. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT ( $M_n$ :960.000) (%3) Dioksan ortamında sentezlenen nanokompozitin XRD spektrumu.

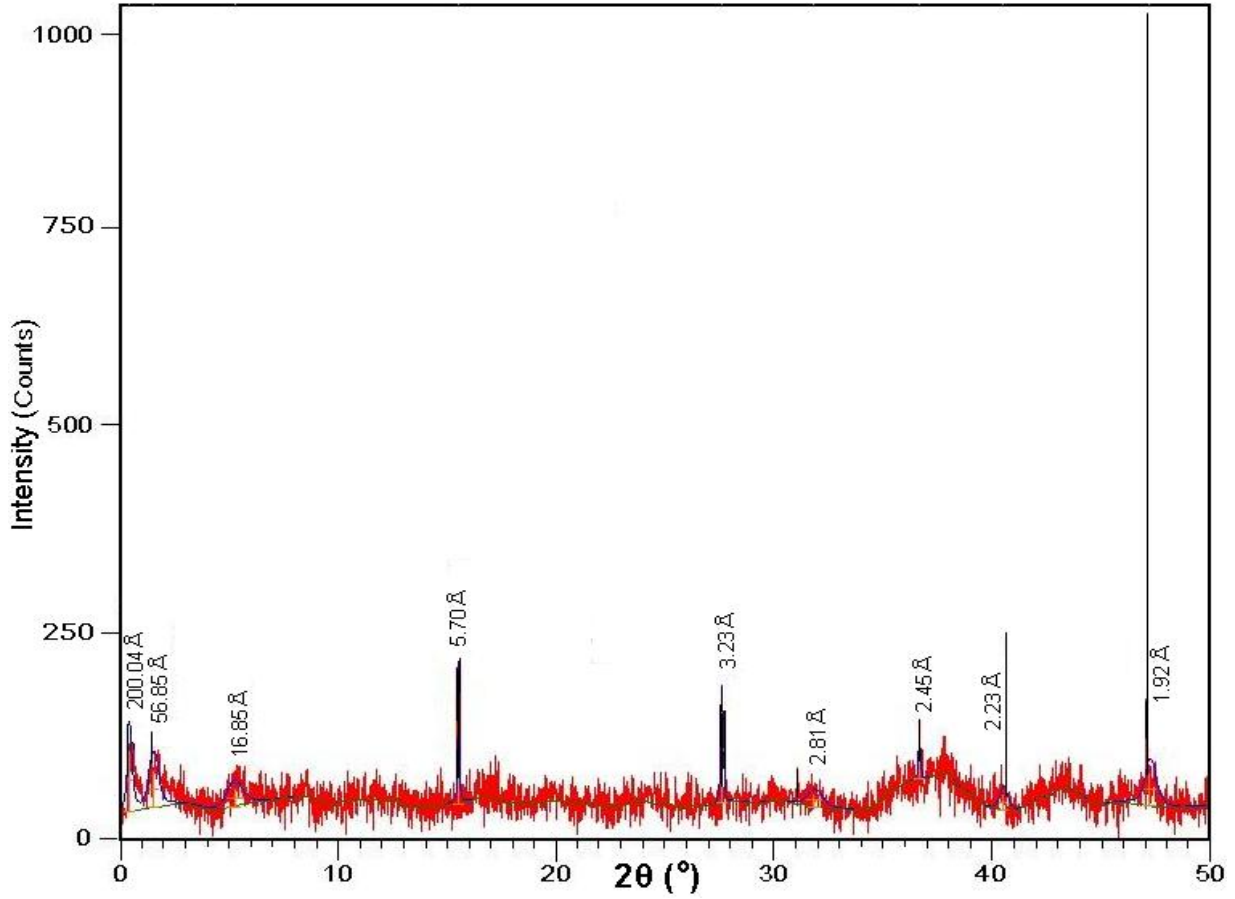


Şekil 4.7. Saf ODA-MMT organokilin XRD spektrumu.

Şekil 4.6 ve 4.7'deki XRD spektrumlarının karşılaştırmalı analiziden görüldüğü gibi saf organik kilin XRD spektrumundaki  $2\theta$ 'nın 8.15 ve 11.0 değerlerine uygun gelen ve tabakalı kristalin yapılara ait piklerin (tabakalararası mesafe  $d = 10.96$  ve  $7.95$  Å) nanokompozitin XDR spektrumunda (Şekil 4.6) tamamen yok olduğu gözlenilmiştir. Bu durum amorf yapıya sahip aşılınmış matriks kopolimerinin tabakalar arasında tam dağılımını göstermektedir. Spektrumdaki 1.pikin yok olması tabakalar arasında gerçekleşen in situ proseslerin gerçekleştiğini, 2.pikin yok olması ise tabakalar yüzeyine var olan Si-OH gruplarının kopolimerin anhidrid/asit gruplarıyla reaksiyona tabi tutulduklarını gösteren önemli unsurlardır. Ayrıca nanokompozitin yarı-kristalin yapıya geçişi ve az miktarda (3.2 %) organik kil kullanılmasına rağmen tabakaların şiddetli kristalin piklerinin ( $2\theta$ 'nın 1-4 aralığı değerlerine) varlığı incelenen nanokompozitte nanoyapıların oluşumunu tespit etmektedir.



Şekil 4.8. Çeşitli yöntemlerle sentezlenmiş Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT bazlı nanokompozitlerin genel(A) ve  $2\theta = 2-10$  (B) XRD spektrumu: (a) Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT-- nanohibrit-1 ( $M_n = 1.130.000$ , ortam-dioksan), (b) Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT-- nanohibrit-2 ( $M_n = 1.130.000$ , ortam-LA), (c) Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT--nanohibrit-3 ( $M_n = 960.000$ , fosfat tamponu ortamı, pH 7.4) ve (d) Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT—nanohibrit -4 ( $M_n = 80.000$ , fosfat tamponu ortamı, pH 7.4).



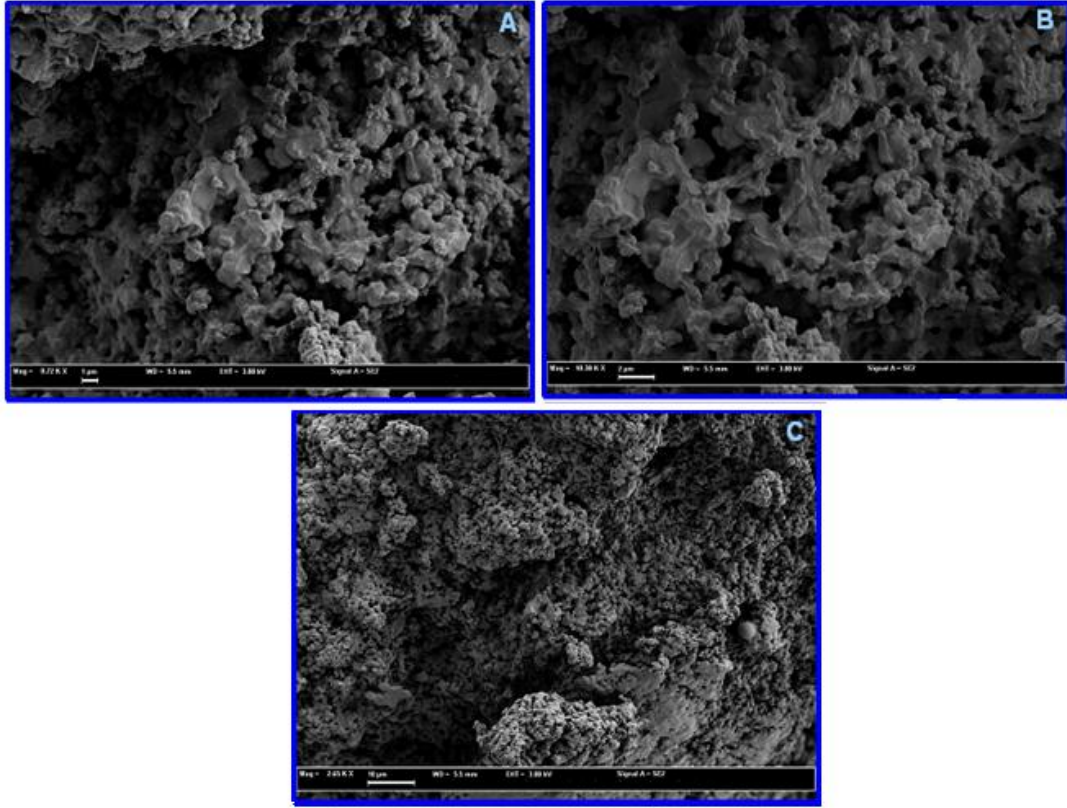
Şekil 4.9. Poli(MA-*alt*-MVE) ( $M_n = 80.000$  g/mol)-*g*-PLA/ODA-MMT nanokompozitin XRD spektrumu. Bu spektrum  $\text{CuK}_\alpha$  ve Ni filtresi ile donatılmış ( $\lambda = 1.5406$  Å) PAN-ANALYTICAL EMPYREAN X-ray difraktometer cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Şekil 4.8 ve 4.9'daki XRD spektrumları interlameller aşılama reaksiyonlarının koşullarına (1,4-dioksan ve temiz su ortamı) ve kullanılan kopolimerlerin  $M_n$  değerlerine bağlı olarak gözlenen derecede değiştiği gözlenmiştir. Dioksan ortamına sentezlenen nanokompozit su ortamına elde edilen nanokompozitlere nisbeten daha etkin tabakalararası dağılıma sahip olduğu görülmektedir. Su ortamına sentezlenen nanokompozitler kısmen şişme özelliklerinden dolayı daha büyük partiküller oluşturabilir.

### 4.1.3. Yüzey ve iç morfoloji (SEM ve TEM ) analizleri

#### 4.1.3.1. SEM analizleri

Çeşitli reaksiyon koşullarında ve ODA-MMT eşliğinde gerçekleştirilmiş laktik asitin Poli(MA-*alt*-MVE) üzerine aşılı(graft) polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiş silikat tabakalı kopolimer nanokompozitlerin SEM yüzey morfoloji görüntüleri aşağıdaki şekil 4.10 gösterilmiştir.



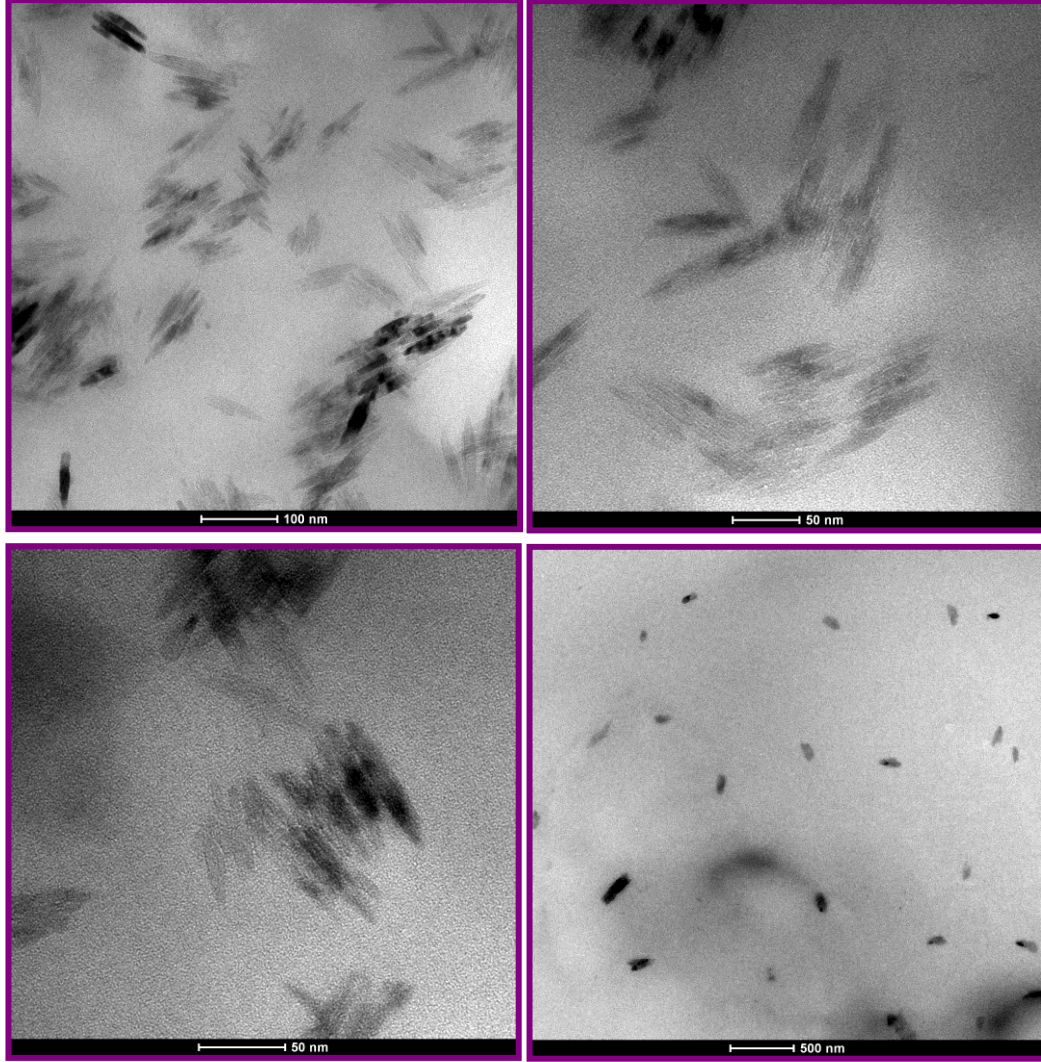
Sekil 4.10. Poli(MA-*alt*-MVE) ( $M_n = 80.000$  g/mol)-*g*-PLA/ODA-MMT nanokompozitin SEM mikrografı: görüntü boyutu: (A) 1 µm, (B) 2 µm ve (C) 10 µm.

Şekil 4.10'daki oktadesil amin-MMT(ODA-MMT) kilin eşliğinde alternatif kopolimer üzerine aşılanmış PLA nanokompozitinin çeşitli boyutlarda yapılmış SEM yüzey morfoloji görüntüleri bu nanosistem'de mikron ölçekdeki partiküllerin iyi dağılımını göstermektedir.



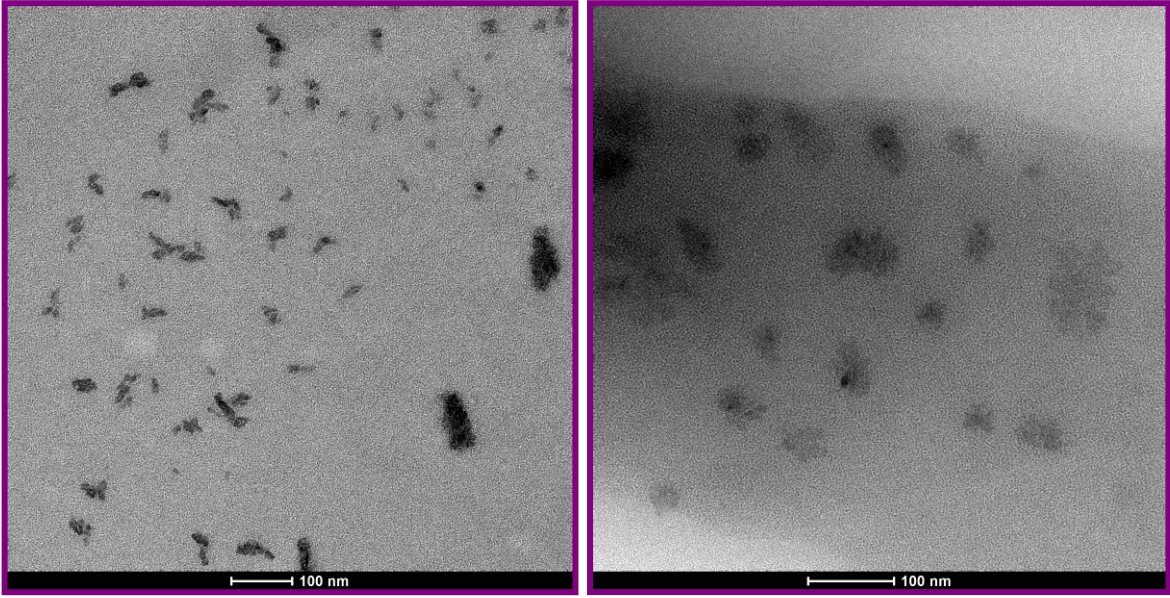
#### 4.1.3.2. Tem Analizleri

Çeşitli reaksiyon koşullarında ve ODA-MMT eşliğinde gerçekleştirilmiş laktik asitin Poli(MA-*alt*-MVE) üzerin interlameller aşılama kopolimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiş silikat tabakalı kopolimer nanokompozitlerin TEM iç morfoloji görüntüleri aşağıdaki şekil 4.11- 13'te gösterilmiştir.

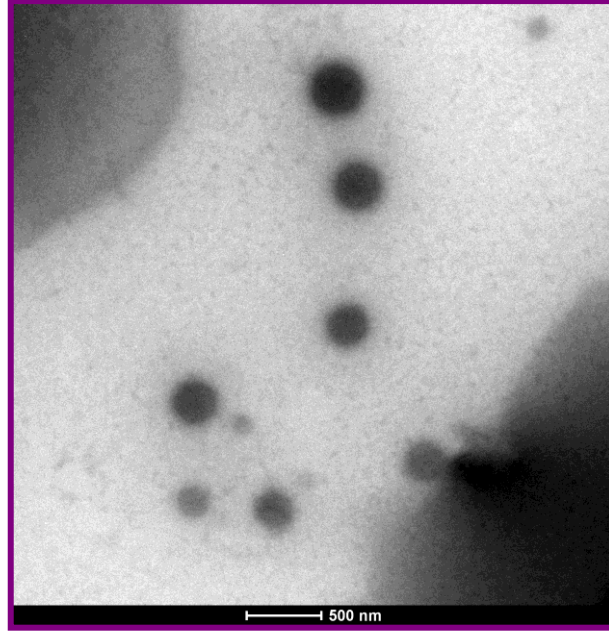


Şekil 4.11. Poli(MA-*alt*-MVE)( $M_n = 1.130.000$  g/mol)-*g*-PLA/ODA-MMT nanokompozitinin çeşitli boyutlarda oluşan nanoyapıların TEM iç morfoloji görüntüleri ve silikat tabakaların dağılımı.

Göründüğü gibi (Şekil 4.11) kopolimer-g-PLA makromolekülerinin ODA-MMT kil tabakaları arasına nüfuzu (interkalasyon) ve silikat tabakalarının önemli ölçüde dağılımı (yapraklanması-exfoliation) gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Poli(MA-*alt*-MVE)( $M_n = 80.000$  g/mol)-g-PLA/ODA-MMT nanokompozitinin 100 nm ölçekte oluşan nanoyapıların TEM iç morfoloji görüntüleri ve silikat tabakaların dağılımı. Sonikasyon süresi 10 dak ve reaksiyon karışımındaki LA monomerinin miktarı 10 ml.

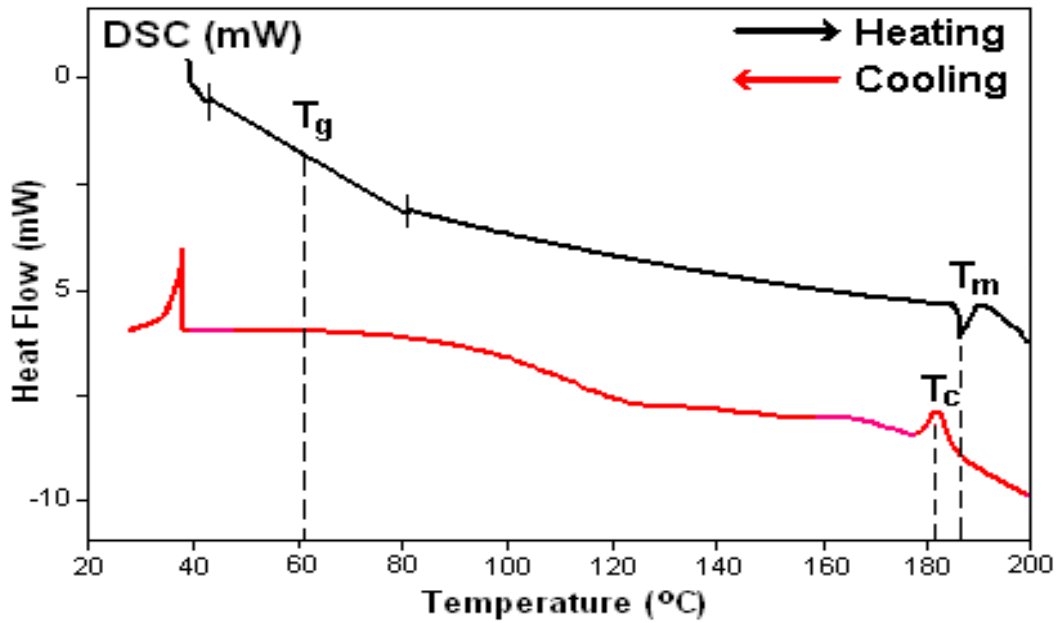


Şekil 4.13. Poli(MA-*alt*-MVE)( $M_n = 80.000$  g/mol)-*g*-PLA/ ODA-MMT nanokom- pozitinin 250 nm ölçekte oluşan "core-shell" morfoloji yapıların TEM iç morfoloji görüntüleri ve dağılımı. Sonikasyon süresi 30 dak ve reaksiyon karışımındaki LA monomerinin miktarı 20 ml.

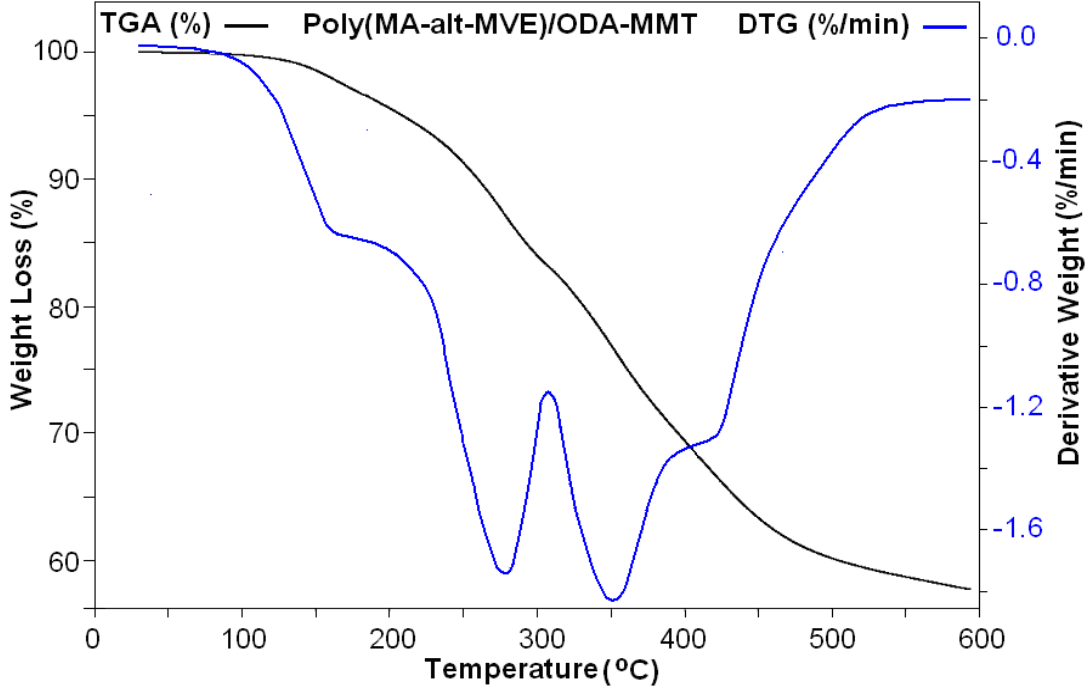
Şekil 4.11-13'teki TEM görüntülerinin karşılaştırılması sonucu matriks kopolimerinin molekuler ağırlıklarının, reaksiyon koşullarının (LA miktarı) ve sonikasyon süresinin iç morfoloji yapılarını ve silikat tabakalarının dağılımını önemi derecede etkilemektedir. En iyi dağılım molekül ağırlıkları daha düşük olan kopolimerlerde (Şekil 4.12 ve 4.13) gözlenmiştir. Ayrıca reaksiyon karışımındaki LA monomerinin daha çok miktarında ve sonikasyon süresinin daha fazla olduğu deney koşullarında "core shell" morfoloji yapılarının oluştuğu görülmektedir. Şekil 4.13'deki yapılarda farklı morfolojinin (yapraklanmış yapı) oluşumunu PLA zincirlerinin düşük miktarda olması ve silikat tabakalarının kaplanmasına yeterli derecede sağlamayacağı nedeniyle açıklanabilir.

#### 4.1.4. Termal davranışları (DSC ve TGA-DTG)

Sentezlenen kopolimerlerin, terpolimerlerin, nanokompozitlerin ve organo-MMT silikatının ısısal davranışları [camsı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ), erime noktası ( $T_m$ ), kristallenme sıcaklığı ( $T_c$ ), bozunma sıcaklığı ( $T_d$ ), ısısal bozunmada kütle kaybı ( $\Delta W$ ), erime entalpisi ( $\Delta H_m$ ) ve kristallenme entalpisi ( $\Delta H_c$ )] TGA-DTG ve DSC termal analiz metotları ile tayin edilmiş ve fonksiyonel polimerlerin “içeriği–yapısı–ısısal davranışı” ilişkileri incelenmiştir.



Şekil 4.14. Poli(MA-*alt*-MVE)( $M_n = 1.960 \times 10^3$  g/mol)/ODA-MMT nanokompozitin (Dioksan ortamında) DSC eğrileri: Erime ( $T_m$ ) ve kristalleşme ( $T_c$ ) sıcaklığı ısıtma ve soğutma şartlarında ( $5^\circ\text{C}/\text{dak}$  hızında) azot atmosferinde yapılmıştır.



Şekil 4.15 Poli(MA-*alt*-MVE)( $M_n = 1.960.000$  g/mol) / ODA-MMT nanokompozitin (dioksan ortamında) TGA-DTG eğrileri. Isıtma hızı 10°C/dak azot atmosferinde.

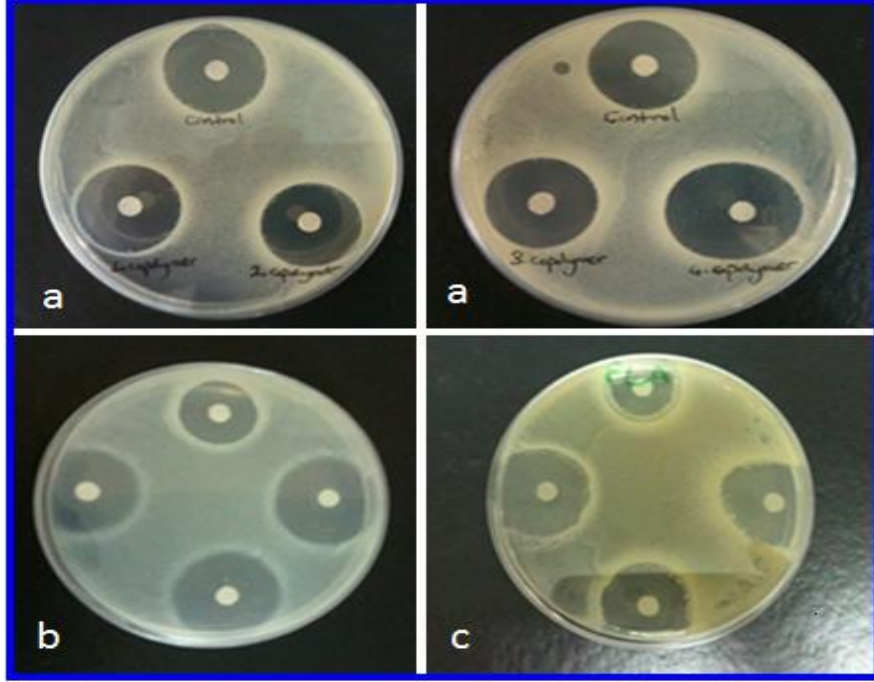
## 4.2. Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT Nanokompozitine Ait Antimikrobsal ve Antitümöral Etkilerin İncelenmesi

### 4.2.1. Antimikrobsal etkinin araştırılması

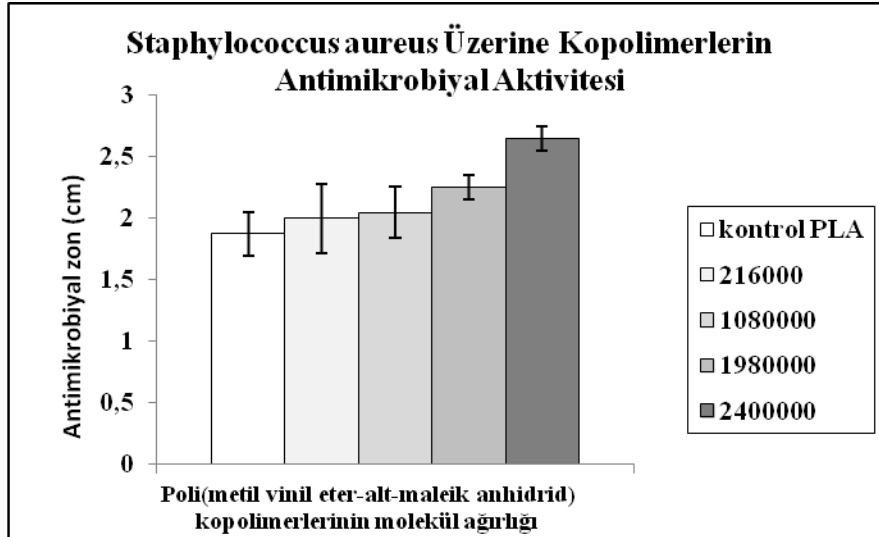
Farklı molekül ağırlığına sahip saf kopolimerler, organo silikat ODA-MMT ve sentezlenen MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozitin antimikrobsal aktivite testi, disk difuzyon metodu ile yapılarak ve 24 saatlik inkübasyon sonucu gerçekleştirildi.

Polilaktik asit(PLA) ortamında hazırlanan farklı molekül ağırlığındaki poli(maleik anhidrit-*alt* –metil vinil eter) kopolimerin moleküler ağırlığı ( $M_n$ ) arttıkça antimikrobsal özelliğinin arttığı görüldü (Şekil 4.16). Bu sonucun sayısal değerleri göz önüne alındığında en düşük moleküler ağırlıktaki kopolimer oluşan zon 1.8 cm iken, en yüksek moleküler ağırlıktaki zon çapı 2.7 olarak hesaplandı(Şekil 4.17).





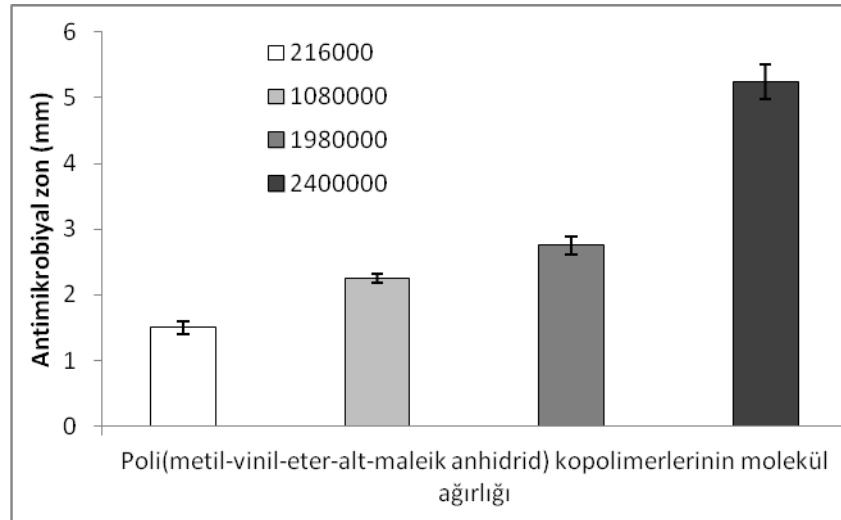
Şekil 4.16. *Staphylococcus aureus* üzerine antimikropsal aktivite testi (a) Farklı molekül ağırlığındaki saf kopolimerler (b)ODA-MMT, (c) Kopolimer-g-PLA/ODA-MMT nanokompozit yapı.



Şekil 4.17. Farklı molekül ağırlığındaki Poli(MA-*alt*-MVE) kopolimerlerinin *Staphylococcus aureus* ortamında oluşan antimikropsal etkisi.



Şekil 4.18. Farklı molekül ağırlığındaki poli(MA-alt-MVE) kopolimerlerinin *Staphylococcus aureus* üzerine antimikropsal aktivite testi.(PBS ortamı, pH:7,4)

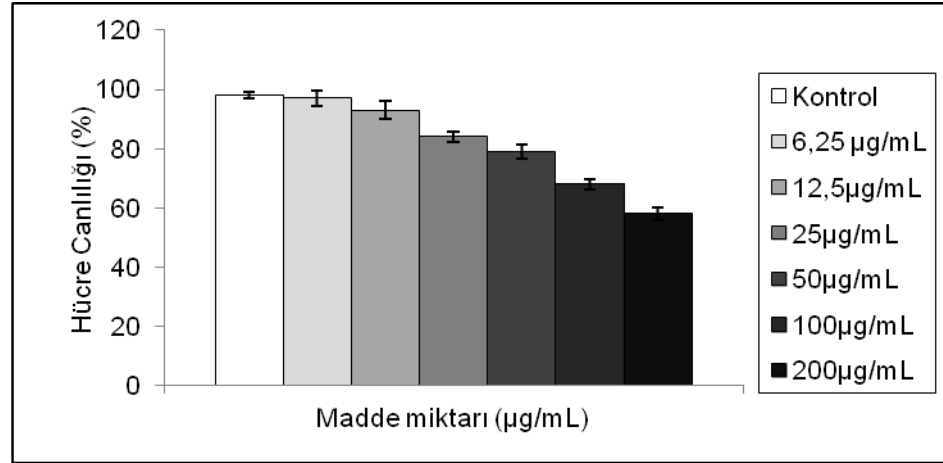


Şekil 4.19. Farklı molekül ağırlığındaki poli(MA-alt-MVE) kopolimerlerinin *Staphylococcus aureus* üzerine antimikropsal etkisi. (PBS ortamı, pH:7,4)

Fosfat tamponu ortamında hazırlanan farklı molekül ağırlığındaki poli(maleik anhidrit-*alt* –metil vinil eter) kopolimerin antimikropsal zon çalışmalarında ise benzer sonuçlar diğer bir deyişle moleküler ağırlığı ( $m_w$ ) arttıkça antimikropsal özelliğinin arttığı görüldü (Şekil 4.18). Bu çalışmada da sayısal değerler dikkate alındığında en düşük moleküler ağırlıktaki kopolimer oluşan zon 1.5 mm iken, en yüksek moleküler ağırlıktaki zon çapı 5.5 mm olarak hesaplandı(Şekil 4.19). Bu ise, bilindiği gibi organik çözücü olan PLA'nın, fosfat tamponuna göre daha fazla antimikropsal etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2. Antitümöral etkinin araştırılması

Fosfat tamponu ortamında sentezlenen Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerinin, WST-1 metodu kullanılarak MCF7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir ve absorbans yoğunluk değerlerinin ELİSA plate üzerinde okunmasıyla şekil 4.20'deki grafik gözlenmiştir:



Şekil 4.20. Fosfat tamponunda (pH:7.4) hazırlanan Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerin farklı konsantrasyonlarda MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. (n=3)



Yapılan sitotoksisite çalışmalarına göre % hücre canlılık oranları kompozit miktarı 6.25 µg/mL iken %97±2.7; 12.5 µg/mL iken %93±3.2; 25 µg/mL iken % 84±2.1; 50 µg/mL iken %79±3.2; 100 µg/mL iken %68±2.7 ve 200 µg/mL iken %58±3.5 bulundu ve kompozit miktarı arttıkça hücreler üzerine sitotoksisitesinin de arttığı saptandı.

#### **4.3. MA-*alt*-MVE/ODA-MMT Nanokompozite Lakkaz İmmobilizasyonu ve Optimizasyon Çalışmalarının İncelenmesi**

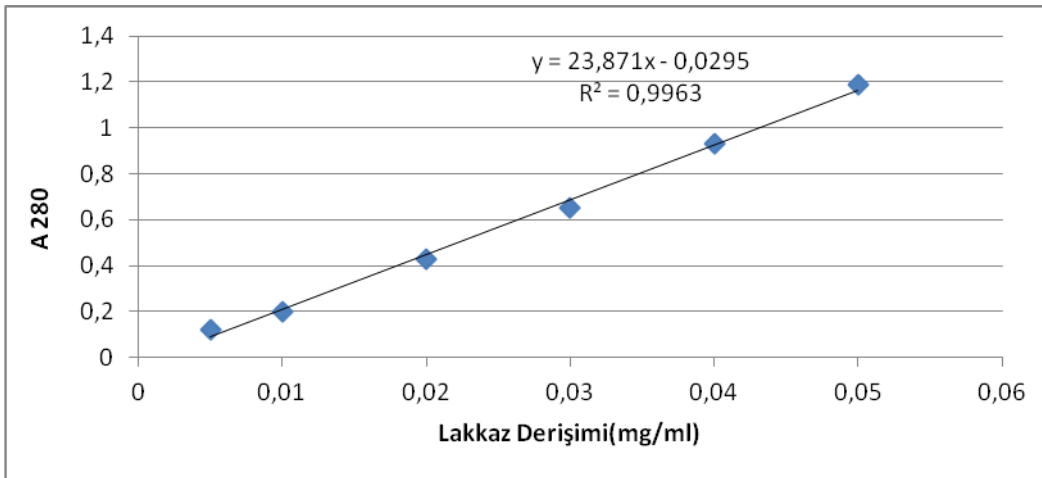
Yapılan ön denemelerde lakkaz enziminin, sentezlenen Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozit yapısına daha çok bağlanmasından dolayı fiziksel adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmeye çalışıldı. Kovalent ve fiziksel yöntemle lakkazın kompozite bağlanma durumu uv-visible spektrometre (Schimadzu 1240) ile ölçülerek karşılaştırıldı. Deney şartları her iki yöntemde pH:5,0, 30 dakika süre ve 37°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Fiziksel bağlanmada nanokompozit ve enzim doğrudan etkileşime sokulurken, kovalent bağlanma yönteminde nanokompozit önce EDAC ile etkileştirilerek enzim ilavesi yapıldı. her iki yöntem içinde sabit tutulmuştur ve reaksiyon sonunda her iki yöntemde de immobilize yapılar santrifüj (7000 rpm ve 15 dk.) edilerek çöktürüldü. Süpernatant örnekleri UV- visible spektrometrede 280nm'de asetat tamponuna karşı O.D. değerlerine bakıldı. Fiziksel yöntemle yapılan immobilizasyonda, kimyasal bağlanma yöntemine göre enzimin kompozite bağlanması % 34,5 fazla bulundu. Bu yüzden immobilizasyon çalışmalarımızda fiziksel bağlanma yöntemi tercih edildi. Fiziksel ve kovalent bağlanma yöntemleriyle bağlanan lakkaz miktarlarının verileri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fiziksel ve kovalent bağlanma yöntemlerinde lakkaz immobilizasyonu

İmmobilizasyon Verimliliği Bağlanma Yöntemi	İmmobilizasyon öncesi O.D.-280nm (Co)	İmmobilizasyon sonrası O.D.-280nm (C)	mg lakkaz/ g kompozit (Q)	immobilizasyon %
Kovalent	0,580	0,375	328	65.5
Fiziksel	0,720	0,407	500,8	100

#### 4.3.1. Lakkaz kalibrasyon eğrisi

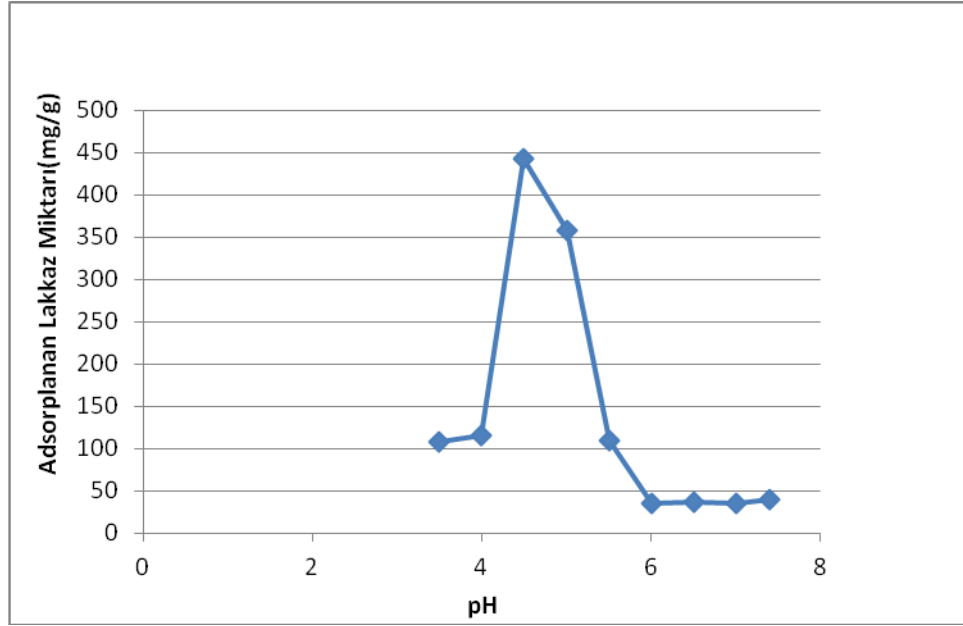
Lakkaz kalibrasyon eğrisini yöntemde belirtildiği şekilde yapıldı Lakkaz derisimlerine karşılık gelen O.D. değerleri şekil 4.21'de verildi. Şekilde de görüldüğü gibi kalibrasyon eğrisi  $R^2$  ; 0.9963 olarak doğrulukta bulundu.



Şekil 4.21. Lakkaz Kalibrasyon Eğrisi

### 4.3.2. İmmobilizasyon koşullarına pH etkisi

Şekil 4.22'de MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozitlere lakkaz immobilizasyonuna pH'nin etkisi verildi. MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozitinin en yüksek lakkaz bağlama kapasitesi pH 4.5 değerinde; 442,717 mg lakkaz/g olarak bulundu.



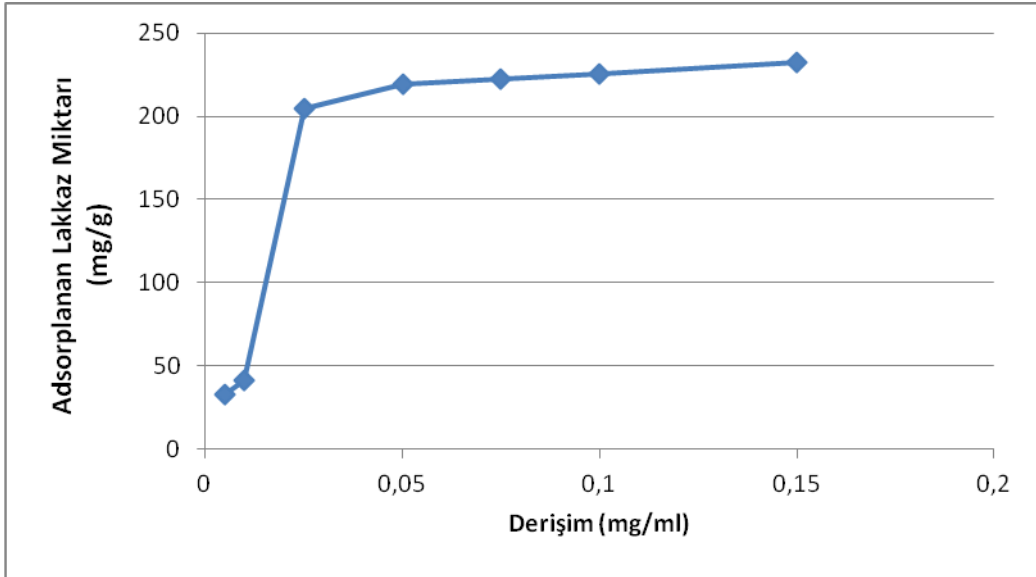
Şekil 4.22. Lakkaz immobilizasyonuna pH etkisi. MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozit derişimi: 0.0025 mg/ml; Başlangıç lakkaz derişimi:0.025 mg/ml İnkübasyon zamanı: 30 dk; Sıcaklık: 25 °C

Daha asidik ve bazik pH değerlerinde lakkaz adsorpsiyon kapasitesi azalmıştır. Sulu çözeltilerden proteinlerin maksimum adsorpsiyonlarının genellikle net yük taşımadıkları pH değerlerinde (izoelektrik nokta) gözleendiği bilindiğinden bu beklenen bir sonuçtur. Nanokompozite lakkaz İmmobilizasyonu koşullarında gözlenen(Şekil 4.22) optimum pH 4.5 değeri literatürdeki birçok çalışma ile desteklenmektedir. Shleev ve arkadaşları, lakkazın genel olarak pH 3.0 ile 5.2 arasında lakkazın optimum aktif değeri gösterdiğini belirlemişlerdir(Shleev et al.,2004). Dodor ve arkadaşları, *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı kaolinit üzerine immobilize etmişler, immobilizasyon işlemi için optimum

pH'yi 4.5 olarak belirlemişlerdir (Dodora et al.,2004). Zawisza ve arkadaşları, *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkazı altın elektrotlar üzerine biriktirilen terametoksilan'dan oluşturulan ince hidrofilik silika jelde mikrokapsülleme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin maksimum performans gösterdiği pH aralığını 4.2 – 5.2 bulmuşlardır (Zawisza et al.,2006).

#### 4.3.3. İmmobilizasyon koşullarına başlangıç lakkaz konsantrasyonu etkisi

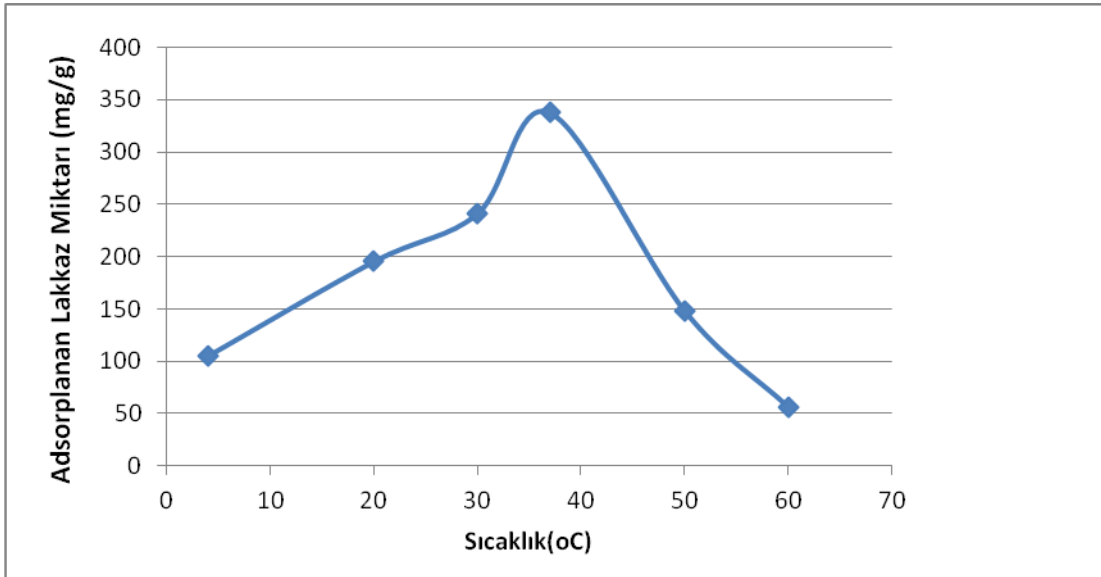
Lakkaz başlangıç derişiminin lakkaz adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.23'te verilmiştir. Bu bölümde adsorpsiyon izoterminin incelenmesi amaçlanmıştır. Şekilden görüldüğü gibi, çözeltideki lakkaz derişiminin artmasıyla, MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompoziti tarafından birim kütle başına adsorplanan lakkaz miktarı çalışılan kesikli sistemde 0.025 mg/mL`den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşıldı. Bu immobilizasyon sürecinde beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile immobilizasyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı ( $\Delta C$ ) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile immobilizasyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir.



Şekil 4.23. Lakkaz başlangıç derişiminin adsorplanan lakkaz miktarına etkisi. MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozit konsantrasyonu= 0.0025mg/ml; pH: 4.5; Sıcaklık: 25 °C, inkübasyon zamanı:30 dk

#### 4.3.4. İmmobilizasyon Koşullarına Sıcaklık Etkisi

MA-alt-MVE/ODA-MMT nanokompozite adsorplanan maksimum lakkaz miktarı 37°C'de 337,59 mg lakkaz/g olarak bulundu. Düşük sıcaklıkta (+4°C) gözlenen lakkaz adsorpsiyonu 105,12 mg lakkaz/g iken, 60°C'da bu değer 56.26 mg/g olarak gözlemlendi.

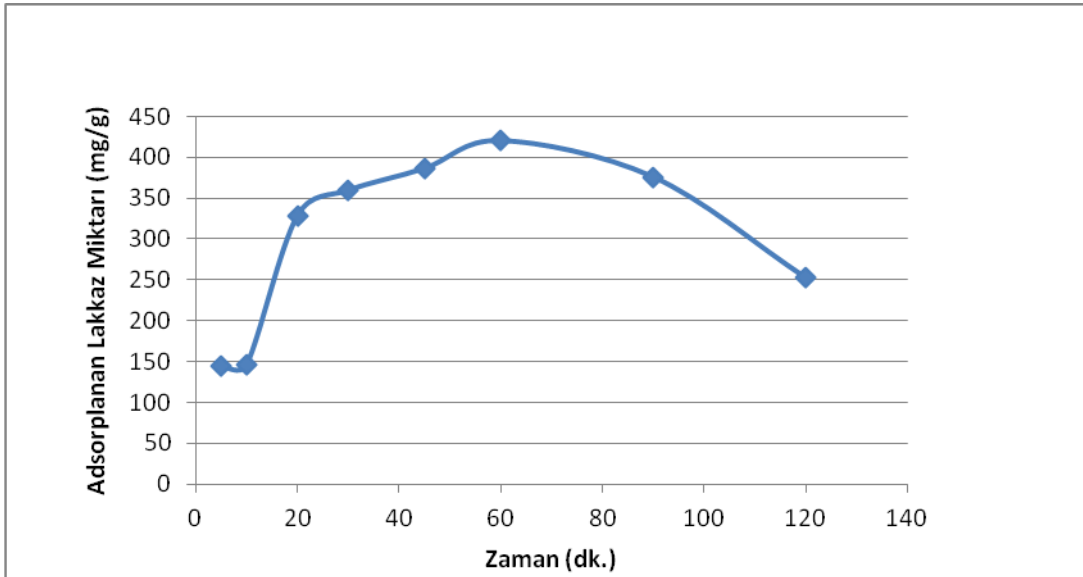


Şekil 4.24. Sıcaklığın adsorplanan lakkaz miktarına etkisi. (MA-alt-MVE/ODA-MMT nanokompozit konsantrasyonu 0,0025 mg/ml; Başlangıç lakkaz derişimi 0.025 mg/mL; pH: 4,5; İnkübasyon zamanı 30 dakika)

Şekil 4.24'te görüldüğü gibi literatür tarafından desteklenen optimum sıcaklık 37°C civarında bulundu. Durán ve arkadaşları, *Trametes versicolor* suşundan elde ettikleri lakkaz formlarını, atık sulardaki zeytin yağlarının arıtımda etkisini inceledikleri bir çalışmada optimum sıcaklığı 40°C dolaylarında olduğunu bulmuşlardır (Duran et al, 2007). Zelic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise *Trametes versicolor* kökenli lakkazı, arıtım amaçlı kullanmayı inceleyerek optimum sıcaklığın 35°C olduğunu belirtmişlerdir (Zelic et al, 2009).

#### 4.3.5. İmmobilizasyon koşullarına temas süresinin etkisi

MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozite adsorplanan maksimum lakkaz miktarı 60. dakikada 420.5mg lakkaz/g olarak bulundu. 60. dakikadan öncesinde ve sonrasında adsorplanan lakkaz miktarı maksimum değere ulaşmışken, kısa sürede (5. ve 10.dakikada) gözlenen lakkaz adsorpsiyonu sırasıyla 145.1 mg lakkaz/g ve 146.5 mg lakkaz/g gözlenmiştir. Ayrıca 60. dakikadan daha uzun sürelerde ise düşüş gözlendi. 120.dakikada lakkaz adsorpsiyonu ise 253,19 mg lakkaz/g olarak hesaplandı.



Şekil 4.25. Temas süresinin adsorplanan lakkaz miktarına etkisi. (MA-*alt*-MVE/ODA-MMT nanokompozit konsantrasyonu= 0,0025 mg/ml; Başlangıç lakkaz derişimi 0.025 mg/mL; pH: 4.5; Sıcaklık:37 °C)

#### 4.3.6. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin tayini

##### 4.3.6.1. Serbest enzimin aktivitesinin tayini

Reaksiyon tüplerindeki absorbans (optik dansite) değışmelerinin 465 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede kontrole karşı okunmasıyla enzim aktivitesi 3,86 IU/ml olarak bulunmuştur.

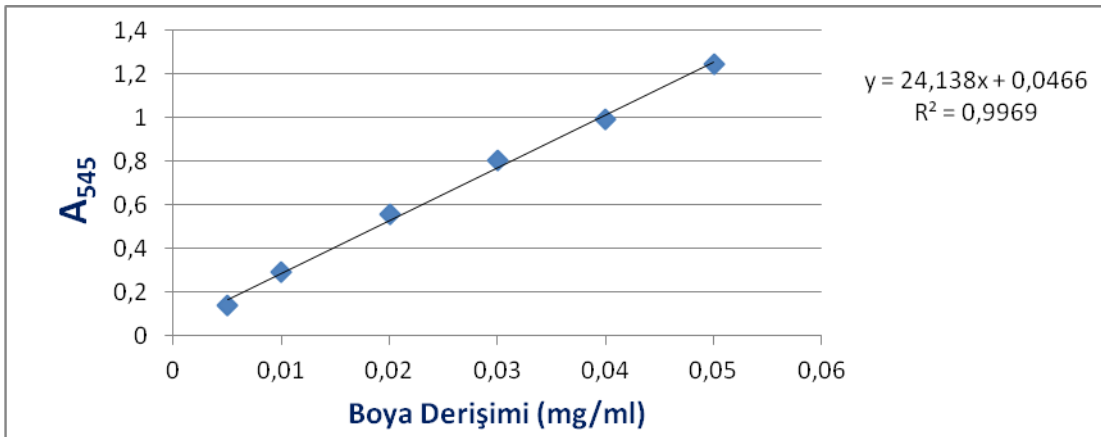
#### 4.3.6.2. İmmobilize enzim aktivitesinin tayini

İmmobilize enzimle reaksiyon tüpündeki absorbans değerleri 465 nm dalga boyunda ölçülerek enzim aktivitesi 5,56 IU/ml olarak bulundu. İmmobilize enzimin aktivitesinin serbest enzime kıyasla yüksek olması beklenen bir durumdur.

#### 4.4. Serbest ve İmmobilize Enzim ile “Reactive Red 5” Boyar Madde Renk Gideriminin ve Optimizasyon Çalışmalarının İncelenmesi

##### 4.4.1. “Reactive Red 5” boyar madde kalibrasyonu

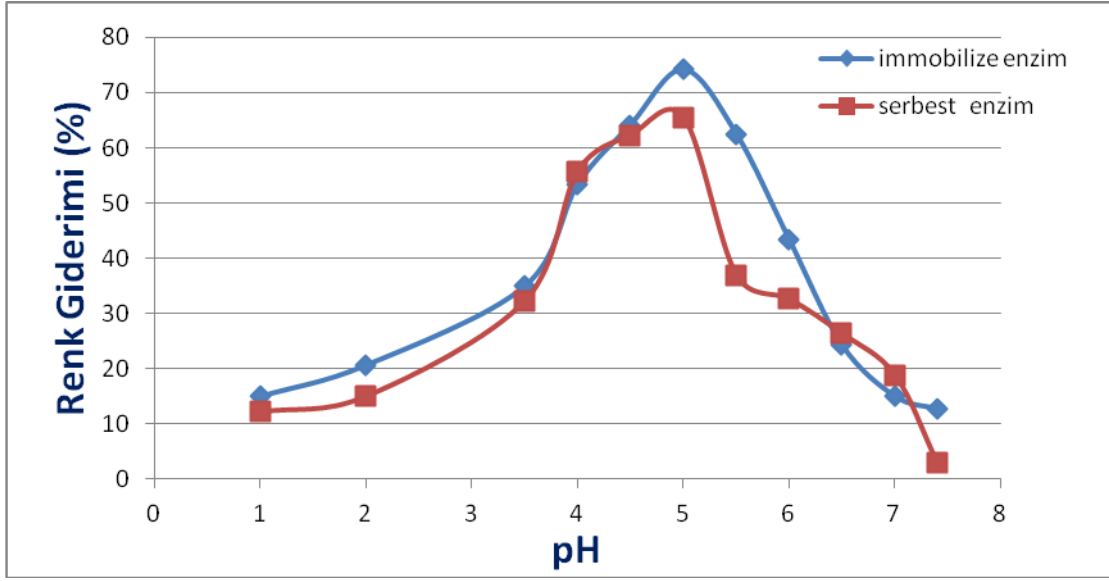
“Reactive Red 5” boyar madde kalibrasyon çalışmalarında UV-Görünür Alan spektrofotometresinde  $\lambda_{max}$ : 545 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınarak “kalibrasyon grafiği” oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği ve kalibrasyon doğru denklemi, Şekil 4.26'da gösterildi. Kalibrasyon eğrisinin çıkartılmasında  $R^2$  (0,9969) değeri oldukça anlamlı bulundu.



Şekil 4.26. Reactive Red 5 Boyar Maddesinin Kalibrasyon Eğrisi

#### 4.4.2. “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi üzerine ortam pH'nın etkisi

Serbest ve immobilize lakkazın “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine pH'ın etkisi denemelerinde pH aralığı geniş tutuldu ve 1.0 ve 7.4 arasında (pH 1-2 için KCl-HCl tamponu, pH 3,5–5.5 için 0.1 M sodyum asetat tamponu, pH 6.0–7.4 için 0.1 M fosfat tamponu) değiştirilerek veriler Şekil 4.27’de sunuldu.



Şekil.4.27. Reaktif red 5 boyarmadde renk giderimine ortam pH'nın etkisi

Şekil 4.27’den da görüldüğü gibi, maksimum % boya renk giderimi serbest lakkaz için hem de immobilize lakkaz için pH: 5.0 değerinde gözlemlendi. Optimum pH değerlerinde gözlenen en yüksek boyarmadde giderimi serbest lakkazda % 65.51 ve immobilize lakkazda ise %74.13 olarak bulundu.

İmmobilizasyon işlemi ile reaktif red 5'in renk giderimi çözeltinin artan pH değerinin olumsuz etki yaptığı görüldüğünden pH 5.0 değerinden itibaren pH değeri arttıkça biyosorpsiyon miktarında önemli bir azalma kaydedildi. Bu durum alkali koşullarda da devam ederek pH 7,0 ve pH 7,4'te çok düşük oranda renk giderimi gözlenmesi ile sonuçlandı. Mikroorganizmaların boyar madde renk giderimi etkinliğinin artan pH değeri ile önemli ölçüde azaldığı diğer araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir (Bayramoğlu,2006;



Mishra ve Tripathy,1993; Seshadri,1994). Bu durum, çözeltinin pH değerinin artmasıyla birlikte artan hidroksil iyon konsantrasyonu ile enzim üzerindeki aktif bölgelerin negatif yüklerle yüklenmesi ve dolayısıyla boyarmadde molekülleri ile elektrostatik etkileşimin olumsuz etkilenmesi ile açıklanabilir.

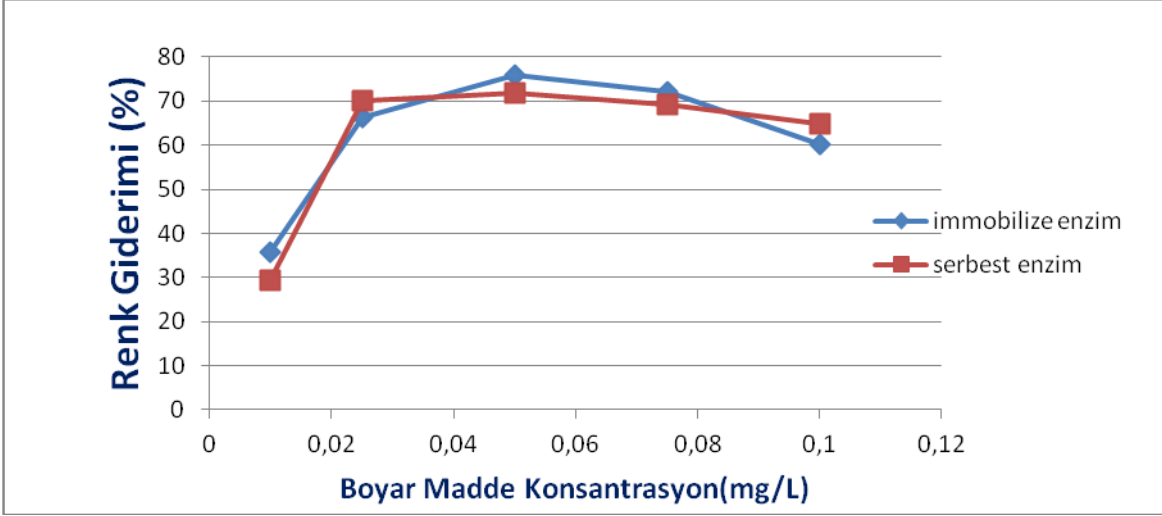
Optimizasyon çalışması sonucunda bulunan pH değeri literatür ile de desteklenmektedir. Daha önceden de bir çok araştırmacı immobilize lakkazın boyarmadde renk gideriminde yada bazı fenoliklerin klor bağlarını kırmak için kullanıldığı çalışmalarda optimum pH'ı 5.0 olarak bulmuşlardır(Arcand and Archibald, 1991; Taspinar ve Kolankaya, 1998). Inbathamizh L. ve arkadaşları, Reaktif Blue HFRL renk giderimi için Pleurotus ostreatus mantarından elde edilen lakkazı kullanmışlardır ve 4 ile 8 arasında değişen pH parametrelerinde çalışmışlardır. Reaktif boyanın renk giderimi en yüksek oranda pH:5.0 değerinde bulmuşlardır (Inbathamizh et al, 2012). Plou ve ark. Myceliophthora thermophila 'dan elde edilen lakkazı kovalent olarak polimetakrilat polimer bazlı boncuklara immobilize etmişlerdir ve 6 sentetik boyanın renk giderimini incelemişlerdir.Optimizasyon çalışmaları sonucunda pH'ın 3 ile 5 arasında olduğu değerlerde en yüksek oranda boya giderimi gerçekleştiğini belirtmişlerdir (Plou et al, 2007).

#### **4.4.3. “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi üzerine başlangıç boyar madde konsantrasyonu etkisi**

Başlangıç boyarmadde konsantrasyonu, sulu ve katı faz arasındaki bütün moleküllerin kütle transfer dirençlerini yenmek için etkinleştirici bir güçtür (Özer et al.,1999, Dönmez ve Aksu , 2002; Shukla,2002 ). Sulu ortamdaki kirleticilerin başlangıç konsantrasyonu, sulu ve katı faz arasındaki boyanın kütle transfer direncini yenmek için, dinamik güç sağlaması bakımından önemli bir parametredir.

Serbest ve immobilize lakkazın boya renk giderimine başlangıç boyar madde konsantrasyonun etkisi denemelerinde boyar madde konsantrasyon aralığı 0,01-0,1 mg/l aralığında değiştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.28'de sunuldu. Şekilden de görüldüğü gibi, maksimum % boyar madde renk giderimi etkinliği, serbest lakkaz için 0,025 mg/L iken, immobilize lakkaz için ise 0,05 mg/L konsantrasyon değerinde gözlemlendi. Bu değerlerde

gözlenen en yüksek % boyar madde giderimi etkinliği serbest enzim için %70.03 iken, immobilize enzim için % 75.85 gözlemlendi.

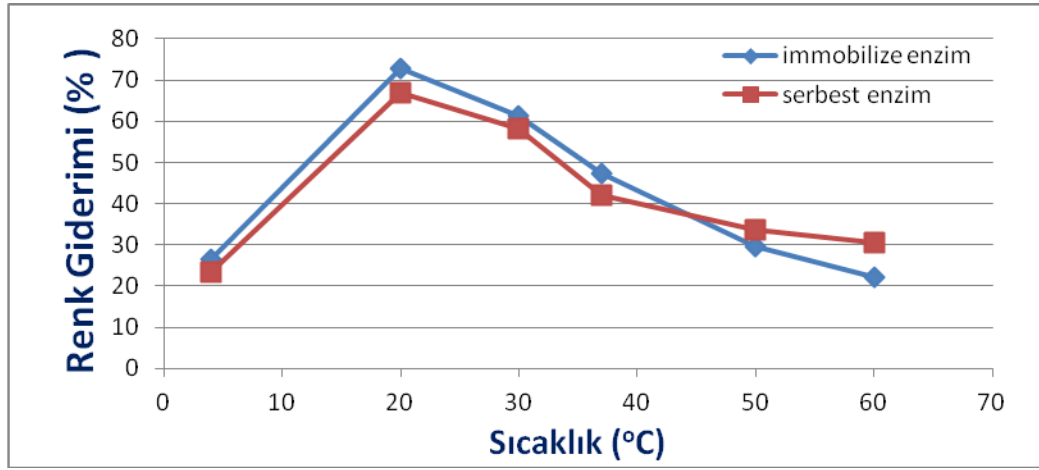


Şekil 4.28. Reaktif red 5 boyar madde giderimine başlangıç boyar madde konsantrasyonunun etkisi

Başlangıç boyar madde konsantrasyonunun belli bir noktaya artması ile boyar madde renk giderim miktarında da bir artış kaydedilmiştir. Belli bir değerden sonra ise boyar madde renk giderimde ortalama olarak %10 kadar bir düşüş gözlenmiştir. Literatürde de artan boyar madde konsantrasyonu ile belirli bir değere kadar boyarmadde gideriminin arttığı bildirilmiştir (Kumar et al,2006; Bakshi et al.1999). Kumar ve ark., (2006) bu durum enzimlerin hızlı bir şekilde yüzeysel biyosorpsiyonu gerçekleşir ve bu nedenle boyarmaddenin enzim yüzeyinde tutulabileceği etkin yüzeylerin hızla dolması ile açıklanabilir .

#### 4.4.4. “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi üzerine ortam sıcaklığının etkisi

Serbest ve immobilize lakkazın boya renk giderimine sıcaklığın etkisi denemelerinde sıcaklık aralığı 4 ve 60 °C arasında değiştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.29’da sunuldu. Şekilden de görüldüğü gibi, maksimum % boya renk giderimi etkinliği hem serbest lakkaz hem de immobilize lakkaz için 20°C değerinde gözlemlenmiştir. Optimum sıcaklıkta gözlenen renk giderimi serbest lakkaz için % 69.96 iken immobilize lakkaz için % 72.97 olarak gözlemlendi.



Şekil 4.29. Reaktif Red 5 boyar madde renk giderimine ortam sıcaklığının etkisi

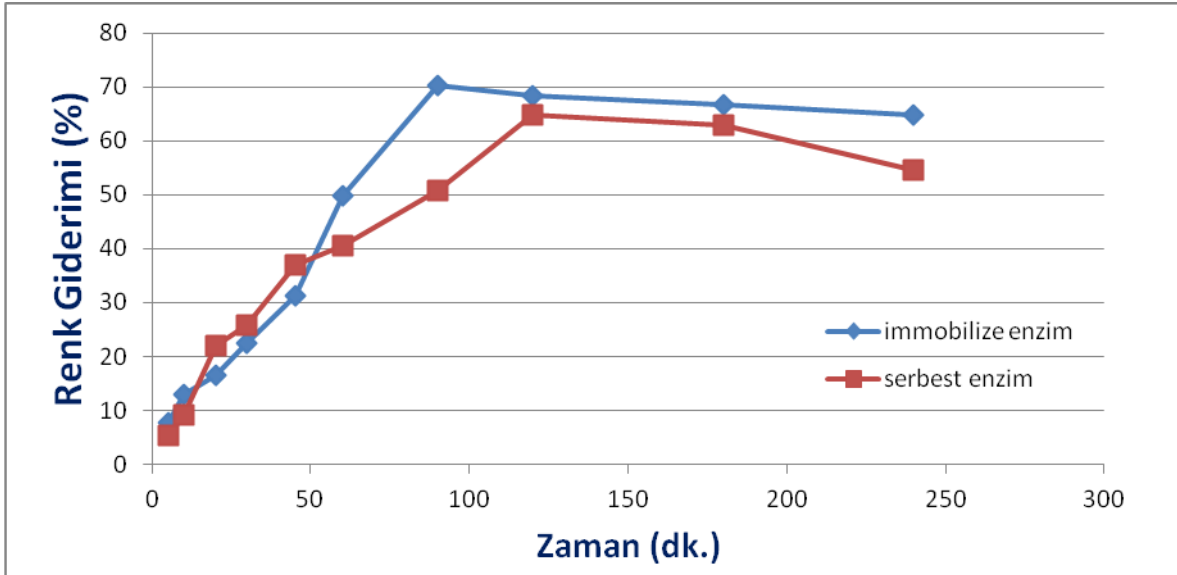
Bütün kimyasal tepkimelerde olduğu gibi enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklıkla artar. Ancak yüksek sıcaklıklara çıkıldığında enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeni ile aktiflikte düşüş gözlenir (Tekman ve Öner,1994). Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir (Mosbach,1976).

Ünal ve ark. yaptığı bir çalış bazı fenoliklerin klor giderimi ile ilgili yaptığı bir çalışmada *Trametes versicolor*dan elde edilen lakkaz kullanılmıştır ve optimum sıcaklığı 25 °C olarak bulmuşlardır (Ünal ve ark.,2011). 20 °C gibi yüksek olmayan bir sıcaklıkta elde edilen optimum renk giderimi yüzdesi çevresel uygulamalar için umut verici olarak değerlendirilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda elde edilen yüksek biyosorpsiyon değerlerinin

uygulanabilirliği maliyet açısından bir sınırlama ile karşı karşıyadır. Bu nedenle çevresel uygulamalarda endüstrinin koşulları da göz önünde bulundurularak, ilave bir ısıtma-soğutma sürecine bağımlı olamayan arıtım teknolojileri öne çıkmaktadır. Bu nedenle Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitine immobilize lakkaz ile yapılan optimizasyon sonucu gözlenen 20 °C, maliyeti düşük endüstriyel uygulamalar için umut verici olarak değerlendirilebilir.

#### 4.4.5. “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimine temas süresinin etkisi

Reaktif madde renk giderimi çalışmalarında önemli bir parametrede temas süresidir. Serbest ve immobilize lakkazın boyar madde renk giderimine temas süresinin etkisi denemelerinde süre aralığı 0 ve 120 dakika arasında değiştirilmiş ve sonuçlar şekil 4.30’da sunuldu. şekilde görüldüğü gibi, maksimum % boya renk giderimi etkinliğinde serbest lakkaz 120. dakika optimum değere ulaşırken, immobilize lakkaz da ise 90.dakikada gözlemlendi. İmmobilize enzim için 90. dakikadan sonra renk giderimi oranında önemli bir değişim kaydedilmedi. Ancak serbest lakkaz için renk giderimi oranında %10’a yakın bir düşüş saptandı.

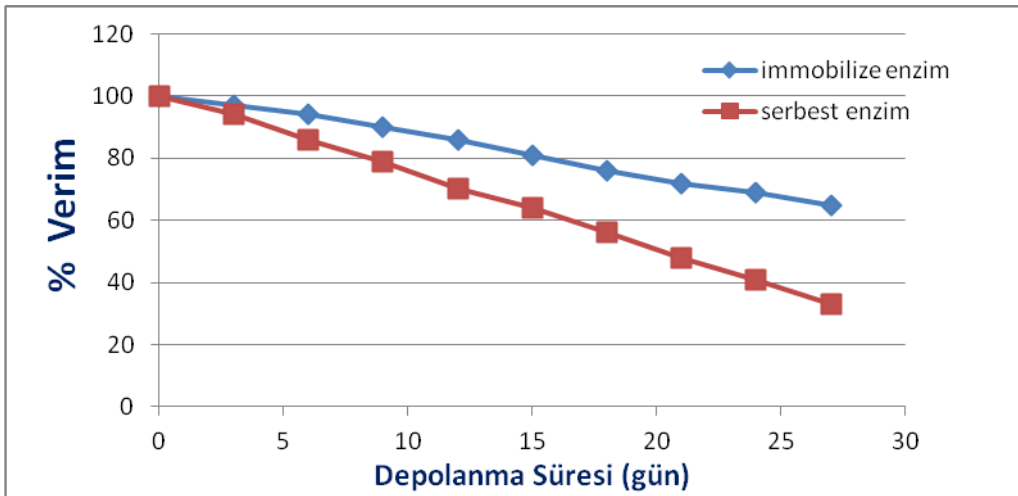


şekil 4.30. Reaktif red 5 boyar madde renk giderimine temas süresinin etkisi

Şekil 4.30'dan da görülebileceği gibi, 240 dakika boyunca belli aralıklarla örnekler alınarak yapılan ölçümler sonucunda 0. dakikadan sonra önemli bir değişimin olmadığı saptandı. Deneysel sürecin ilk 90 dakikasında immobilize enzimde bulunan ve "Reactive Red 5" için aktif bağlanma bölgeleri olarak görev yapabilecek bölgeler tamamen kaplanmaktadır. Bu nedenle 90. dakikadan sonra boyarmadde ile temasa devam edilse bile aktif bölgelerde bağlanabilecek bir bölge olmadığından sonuç değişmemektedir. Literatürde farklı boya ve boyarmaddelerin biyosorpsiyonu için farklı biyosorbentlerin kullanımları sonucunda farklı sürelerde dengeye ulaşıldığı görülmektedir (Tunali, 2009; Çolak, 2009; Zhang, 2009).

#### 4.4.6. Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı

Enzim immobilizasyonundaki en önemli parametrelerden biri de immobilize edilmiş enzimin depolama kararlılığıdır. Hem serbest hemde immobilize lakkaz pH 4.5'da, sodyum asetat tamponu (0,01 M) içerisinde +4 °C da serbest ve immobilize lakkaz muhafaza edilerek dan belirli zaman aralıklarında 0,05 g örnek alınarak Bölüm 3.2.6.'de anlatılan yöntemle göre boyar madde renk giderimi tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (4.5 ) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu. Depolama kararlılıklarının, depolama süresi ile değişimi Şekil 4.31de gösterilmiştir.



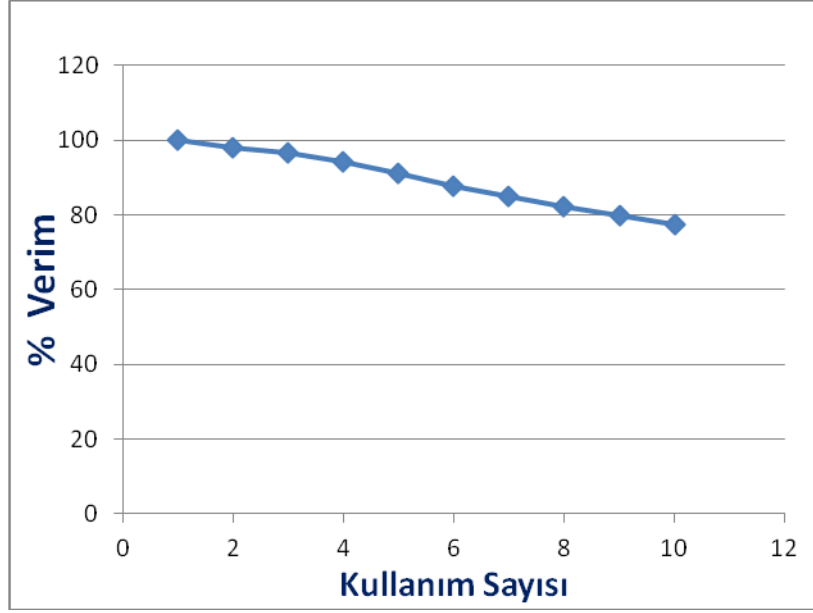
Şekil 4.31. Depo kararlılığı grafiği

Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilizasyonun, enzimi daha kararlı bir pozisyonda tuttuğu kesinlikle görülmektedir. Serbest enzimle yapılan 27 günlük çalışma sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin % 33'ünü koruduğu gözlenirken. immobilize lakkaz enziminin başlangıç aktivitesinin % 65'ini koruduğu gözlendi. Bu sonuçlar immobilize lakkaz enziminin aktivitesinin serbest lakkaza kıyasla iki kat koruduğunu göstermektedir.

Konuyla ilgili daha önce yapılan çalışmalarda da, immobilize lakkazın, serbest lakkazdan daha kararlı olduğu görülmektedir. D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada lakkaz, eupergite immobilize edilmiş ve 2 ayda % 85 aktivitesini korurken 6 ay sonunda aktivitesi % 53'e düşmüştür (D'Annibale et al, 2000 ). Başka bir çalışmada D'Annibale ve arkadaşları, 6 ayda % 17'ye düşen serbest lakkaz aktivitesinin, kitosana immobilize olduğunda % 60'a düştüğü belirtmişlerdir (D'Annibale et al,1999). Dodor ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, serbest lakkaz 4 ayda % 10 kadar bir aktivite kaybı gözlenirken, immobilize olduğunda aktivite kaybı gözlenmemiştir (Dodor et al, 2004). Quan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, lakkaz platin yüzeyine kovalent bağlandığında 2 ayda aktivitesinin % 80ini koruduğu görülmüştür (Quan et al, 2004).

#### **4.4.7. Tekrar kullanılabilirlik**

Bu çalışmada enzimler fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiş ve bu enzimlerin tekrar kullanım sayısını incelemek amacıyla Bölüm 3.2.6.'da anlatılan % renk giderimi üzerinden aktiflik tayini deneyleri yapıldı. Immobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 3 günde 10 kez tekrar kullanıldı. Tepkime süresince, pH (4.5) ve sıcaklık (25<sup>0</sup>C) sabit tutuldu.



Şekil 4.32. İmmobilize lakkaz enziminin tekrar kullanılabilme durumu

İmmobilize enzimin 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç veriminin % 77.3'ünü korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.31). Literatür ile karşılaştırıldığında bulunan %77.3 değerinin yüksek olduğu söylenebilir. PVA üzerine immobilize lakkaz enzimin 10 kullanımdan sonra aktifliğinin %60'ını koruduğu belirtilmiştir (Yinghui et al.,2002).

## 5. SONUÇLAR

Hızla artan dünya nüfusu ve buna paralel olarak artan üretim ve tüketim sonucunda bu ilişkiye paralel olarak geniş hacimde atık sulardan boya maddesinin uzaklaştırılmasında etkin ve düşük maliyetli olan, biyosorpsiyon gibi alternatif arıtma metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyoteknolojinin tanımı göz önüne alındığında insanlığın yararına ihtiyaç duyulan mal ve hizmetlerin üretiminde ekonomik, kolay kullanılabilir ve tekrarlanılabilir olmasının önemi ön plana çıkmaktadır. Özellikle içerdiği kirleticiler bakımından önem taşıyan atıksuların büyük bir çoğunluğunun boyama işlemlerinden kaynaklanan tekstil endüstrisinin neden olduğu çevresel kirlilik; bu endüstride kullanılması zorunlu olan kimyasallar ve hammaddeler, prosesler, uygulanan teknolojiler ve oluşan ürünler açısından değerlendirildiğinde oldukça karmaşıktır (USEPA,1997,1998). Tekstil boyalarını atık sulardan uzaklaştırma çalışmaları, son yıllarda yoğunlaşmış ve bu amaçla çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Uygulanan tekniklerin, çevreye yeni atıklar oluşturmaması ve maliyetlerinin düşük olması için yoğun çalışmaların yapılması gereklidir.

Sulu ortamlardaki ve/veya atık sulardaki kirletici ajanların uzaklaştırılması işleminde basidiomycetes grubundan beyaz-çürükçül odun mantarları olarak bilinen fungusların, atık sulardaki inorganik veya organik kirlilikleri parçaladıkları ve bu atıkları mikroorganizmaların bünyelerinde biriktirdiği rapor edilmiştir (Bayramoğlu ve Arıca, 2007). Bu biyolojik parçalanma işleminde kompleks lignolitik enzimatik sistemler organik molekülleri veya bileşiklerini biyolojik yolla parçalamaktadırlar (Robles et al,2000).

Bu çalışmada, beyaz bir çürükçül fungus olan *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlere fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildi ve sulu ortamlardan Reaktif red 5 boyar maddesinin uzaklaştırılmasında kullanıldı. Çalışmamız üç basamakta gerçekleşti. İlk basamakta interkalasyon/yapraklanma ve interlameller aşısı(graft) kopolimerizasyonu metodlarıyla poli(MA-*alt*-MVE)-g-PLA/ODA-MMT ve poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitleri sentezlenmiştir. İkinci basamakta ise sentezlenen nanokompozitlere *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi immobilize edilmiştir ve son basamakta da



poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlere immobilize lakkazın boya arıtımdaki aktivitesi araştırılmıştır.

1.Basamakta farklı çözücülerde sentezlenen poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitler çeşitli yöntemlerle analiz edilmiştir ve şu sonuçlara ulaşılmıştır:

- Deney; polilaktik asit, dioksan ve biyolojik deneyler için fosfat tamponu ortamlarında yapraklanma-absorpsiyon ve aşı polimerizasyonu yöntemleri ile yüzey katları oktadesil aminle modifiye edilen organik montmorillonit ODA-MMT eşliğinde çeşitli reaksiyon şartlarında gerçekleştirilmiştir. Bilinen metodlardan farklı olarak, aşılama yoluyla poli(laktik asit) (PLA)'nın, ODA-MMT üzerinden reaksiyona girmesi ve katilitik etkiyle organosilikatların alkil amonyum iyonlarıyla etkileşime girerek aşı kopolimerizasyonu gerçekleşmiştir. PLA dışında farklı çözücülerde kullanılarak (dioksan ve fosfat tamponu) iyi dağılım morfolojisi olan çok iyi yapraklanmış(dökülen) kopolimer/silikat tabakalı nanohibrit sistemler sentezlenmiştir.
- Bulgularda gösterilen Şekiller-Çizelgeler'de görüldüğü gibi, farklı molekül ağırlığındaki fonksiyonel kopolimerlerin ve organo-silikatların (yüzey modifiye edilmiş montmorillonitler ODA-MMT) eşliğinde interlameller aşılama polimerleşmesinden elde edilen nanokompozit hibridlerin yapı-özellikleri ilişkileri FTIR ve NMR spektroskopisi, termal (DSC, TGA-DTG), X-ray diffraksiyon (XRD) ve SEM-TEM morfoloji analiz yöntemleri kullanarak incelenmiştir.
- Tezin bu bölümünde elde edilen sonuçların genel açıklamaları:
  - (a) İnterkalasyon/yapraklanma ve interlameller aşı(graft) kopolimerizasyonu yöntemleriyle sentezlenme reaksiyonlarında karboksil grupları içeren polimer zincirlerin silikat galerileri arasına nüfuzu anhidrit gruplarının silikat tabakalarının yüzeyinde bulunan alkilaminle hidrojen bağı oluşturması ile gerçekleştiğini tespit eden faktörleri (FTIR ve XRD analiz sonuçları) dikkate alarak bu reaksiyonların nano-yapı oluşumunu da içeren genel mekanizması verilmiştir.
  - (b) Sentezlenen nanokompozitlerin yapı-özellikleri ilişkileri FTIR spektroskopisi, TGA-DSC ve XRD spektrometri ve SEM-TEM yüzey- ve iç-morfoloji analiz yöntemleriyle incelenmiştir. Farklı çözücüler kullanılarak sentezlenen nanokompozitlerin

kimyasal ve fiziksel yapıları ve özellikleri (ısısal davranışları ve yüzey morfolojisi) karşılaştırmalı incelenmiştir. Nanokompozitlerin organo-MMT silikatının düşük oranda (% 3.2) organo-MMT silikat içeriğine rağmen onların saf kopolimerlere göre daha farklı yapılara (yarı-kristalinite ve düzenli morfoloji) ve özelliklere (eriyik geçişi, yüksek termal davranışları) sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu gözlenen durum, organo-MMT tabakalarının yüzey fazlar arası temas alanının polimer zincirlerinin etkin nüfuzu sayesinde önemli derecede artmasıyla açıklanabilir.

(c) Sentezlenen sistemlerde nano-yapıların varlığı DSC-TGA, XRD ve SEM-TEM gibi termal, fiziksel yapı, yüzey morfoloji analizleriyle de desteklenmiştir: (1) DSC analiz sonuçları nanokompozitlerin semi-kristalite yapıya sahip olduklarını; (2) DSC eğrilerinde  $T_g$  ve  $T_m$  ısısal geçişlerin varlığı, (2) Farklı molekül ağırlığındaki kopolimer/organo-MMT nanokompozitin DSC-TGA davranışlarındaki gözlenen önemli farklılıklar ve karşılaştırmalı değerler; (3) XRD spektrumlarında kristalite fazlara uygun piklerin şiddetinin önemli derecede artması, silikat tabakalarını karakterize eden piklerin yer değişimi ve tabakalar arası mesafenin göstergesi olan tabakalar arası alanın (d-spacing) değerlerinin artması ve (4) SEM-TEM morfoloji görüntülerinde nanokompozitlerde silikat tabakaları yüzeyinde güçlü hidrojen bağının varlığına bağlı olarak daha düzenli ve yoğun morfoloji yapıların oluşumu, incelenen polimer sistemlerde nano-yapıların varlığının göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca reaktif ODA-MMT içeren nanokompozitlerin tabakalar arası proseslerde fiziksel iletişimin (H-bağı) yanısıra kimyasal reaksiyonun da (amidleşme) önemli katkıda bulunduğu söylenebilir.

2. Basamakta ise poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanoyapılarına lakkaz immobilizasyonu işlemi gerçekleşmiştir ve immobilizasyon için optimizasyon çalışmaları çalışmıştır. Bu bölümden çıkan sonuçlar:

- Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda fiziksel adsorpsiyon yönteminin, kovalent bağlanmaya göre daha fazla miktarda lakkaz enzimini tutmasından dolayı Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerine lakkaz enzimi fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle bağlanmıştır. Fiziksel bağlanma yönteminin kovalent bağlanmaya göre daha kolay gerçekleşmesi, maliyetinin daha düşük olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bunun yanında kovalent bağlanmaya göre bazı dezavantajlara da sahiptir. Kovalent ve fiziksel bağlanma yöntemlerinin üstünlükleri ve zayıf yönleri Çizelge 5.1’de kısaca özetlenmiştir. Söz konusu avantajlardan dolayı fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle deneye devam etmek çalışmamız için avantaj olmuştur.

Çizelge 5.1. Fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlama immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Değiştirilerek uyarlanmıştır; Telefoncu,1986)

<b>Karakteristik</b>	<b>Taşıyıcıya bağlama yöntemi</b>	
	Kovalent Bağlama	Fiziksel Adsorpsiyon
Hazırlama	Zor	Kolay
Substrat özgüllüğü	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün
Genel uygulanabilirlik	Orta	Düşük
İmmobilizasyon maliyeti	Yüksek	Düşük
Bağ gücü	Kuvvetli	Zayıf

İmmobilizasyon için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda:

-Poli(MA-*alt*-MVE)/ODA-MMT nanokompozitlerine lakkaz immobilizasyonu için optimum pH değeri 4.5, optimum sıcaklık değeri 37°C, optimum başlangıç lakkaz derişimi 0,025 mg/ml, optimum temas süresi 30 dakika bulunmuştur.

3.Basamakta ise “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi çalışmaları serbest enzim ve bir önceki basamaklarda elde edilen immobilize enzim ile gerçekleştirilmiştir. Boyar madde renk giderimi için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler:

- Boya bileşiklerini sulardan uzaklaştırma verimliliğini etkileyen önemli parametreler arasında ortamın pH'sı ve ortamdaki kirleticinin başlangıç konsantrasyonu olduğu bilindiğinden Boyar maddelerle kirlenmiş atık sular pH değerlerine göre farklılık göstermekte olduğundan boyar madde biyo etkileşimi, boyarmadde ve serbest veya immobilize enzim yapısına bağlıdır. Boyarmaddeler, doymamış bağlar ve farklı fonksiyonel gruplara sahip kompleks aromatik organik bileşiklerdir. Bu nedenle farklı pH değerlerinde farklı iyonizasyon değerlerine sahiptir ve bu da boyarmaddemolekülleri üzerindeki net yükü değiştirmektedir. Biyosorbent yüzey, farklı fonksiyonel grupları olan biyopolimerlere sahip olduğu için biyosorbent üzerindeki net yük de ortamın pH değerine bağlıdır. Dolayısıyla ortamın pH değeri sucul ortamlardan boyarmaddenin uzaklaştırılmasında önemli bir parametredir. Ortam pH'sı boya bileşiklerin çözünürlüğünü ve enzim yapısında mevcut olan fonksiyonel grupların iyonlaşmasına (örneğin, karboksilat, fosfat ve amino grupları) etki ettiğinden, önemli çevre kirleticisi grubu içerisinde yer alan “Reactive Red 5” azo boyar maddesinin sulu ortamlardan renk giderimi, doğal (serbest) ve/veya Poli(MA-*alt*-MVE) / ODA-MMT nanokompozitine immobilize edilmiş lakkaz adsorptif bölgeleri ile boya moleküllerinin sahip olduğu fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşime bağlıdır.

Serbest ve immobilize enzim ile karşılaştırılmalı olarak yapılan “Reactive Red 5” boyar madde renk giderimi çalışmalarında optimum pH değeri hem serbest hem immobilize

enzim için 5.0 bulunmuştur. Optimum pH değerinde % renk giderimi serbest enzim için % 65.51 ve immobilize enzim için %74.13'dür.

-Serbest ve immobilize enzim ile karşılaştırılmalı olarak yapılan "Reactive Red 5" boyar madde renk giderimi çalışmalarında optimum sıcaklık değeri hem serbest hem immobilize enzim için 20 °C bulunmuştur. Optimum sıcaklık değerinde % renk giderimi serbest enzim için %69.96 ve immobilize enzim için %72.97'dir. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen arıtım süreçleri kolay uygulanabilirliği, maliyeti düşürmesi açısından tercih edilmektedir. Çalışmamızdan çıkan sonuç da bu yönden umut vaat etmektedir

-Serbest ve immobilize enzim ile karşılaştırılmalı olarak yapılan "Reactive Red 5" boyar madde renk giderimi çalışmalarında optimum başlangıç boyar madde konsantrasyonu hem serbest hem immobilize enzim 50 mg/L bulunmuştur. Optimum konsantrasyon değerinde % renk giderimi serbest enzim için %70.03 ve immobilize enzim için %78.85 dir.

-Serbest ve immobilize enzim ile karşılaştırılmalı olarak yapılan "Reactive Red 5" boyar madde renk giderimi çalışmalarında optimum temas süresi, serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 120 ve 90 dk bulunmuştur. Optimum temas süresinde % renk giderimi serbest enzim için %65.8 ve immobilize enzim için % 70.91 dir.İmmobilize enzimin, serbest enzime göre daha kısa sürede optimum süreye gelmesi arıtımda zaman açısından kazanç sağlar ve bu yapıların uygulanabilirliği için bir avantaj sağlar.

-Bir destek materyalinde aranılan önemli özelliklerden biri de, bu malzemenin defalarca tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik ayırma işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltan bir etmendir. Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilir, ancak bu enzim uygun bir desteye immobilize edildiğinde defalarca kullanılabilir. Çalışmamızda kullandığımız immobilize enzim 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 77.3'ünü korumuştur. Elde edilen bu sonuç, çalışmamızdaki immobilize enzimin defalarca ve uzun sürece aktifliğini koruduğunu göstermektedir.

-İmmobilize edilmiş enzimin depolama kararlılığı, enzim immobilizasyonundaki en önemli parametrelerden biridir. 27 günlük çalışma sonunda, serbest enzim başlangıç aktivitesinin % 33'ünü korurken, immobilize lakkaz enzimi başlangıç aktivitesinin % 65'ini korumuştur. İmmobilize enzimin depolama kararlılığının, serbest enzimin iki katı kadar bulunması, immobilize enzimin etkinliğini göstermektedir. Çalışmamızda sentezlediğimiz nanoyapılar immobilizasyonda kararlılığı, depolanma süresindeki verimden de anlaşılmaktadır.

Özetle; Bu çalışma sonucunda erişilen veriler, interkalasyon/yapraklanma ve interlameller aşısı(graft) kopolimerizasyonu metodlarının endüstriyel üretim ve yeni yüksek aktivitede biyomühendislik polimer nano-malzemelerin hazırlanması, işlenmesi ve geliştirilmesinde kullanışlı bir yöntem olduğu, nano-yapıya sahip kopolimer/organo-MMT'lerin immobilizasyon süreçlerinde uyumlu bir yapıya sahip olduğu ve yeni akademik ve teknolojik araştırmalarda ve özellikle endüstriyel alanda boyar madde arıtımında yeni nanomalzemelerin geliştirilmesinde bir yol gösterici olacağı öngörülmektedir.

Çalışmamızın en dikkate değer özelliği, endüstriyel alanda kullanılmak üzere lakkaz immobilizasyonu için nano-boyutta, aktivasyon işlemi gerektirmeyen, enzimin doğrudan ve kolaylıkla immobilize edilebildiği, ucuz yeni bir destek materyali olarak poli(MA-*alt*-MVE)/ ODA-MMT nanokompozit yapılar sentezlenmiş olmasıdır.

## KAYNAKLAR

- Abadulla, E.;** Tzanov, T.; Costa, S.; Robra, K.; Cavaco-Paulo, A.; Gubitz, G.M.: "Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000) 3357–3362.
- Aksoy, C.,** "Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 26-28 (2003).
- Alemdar, A.,** 2001. Bentonit ve montmorillonit dispersiyonlarının reolojik, viskoelastik, kolloidal özellikleri üzerine organik ve inorganic katkıların etkisi, Doktora Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Aranda, P. and Ruiz-Hitzky, E.,** 1999 "Poly(ethylene oxide)/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-smectite nanocomposites", *Appl. Clat Sci.*, 15 119-135.
- Araujo E.M.,** Melo, T.J.A, Santana L.N.L., Neves G.A, Ferreira H.C., Lira H.L., Carvalho L.H., M.M.A'vila Jr., Pontes M.K.G. , Araujo I.S., *Materials Science and Engineering B* 112(2004)175-178.
- Arcand, R.L. and Archibald, F.S.** (1991). Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol* 13, 194–203.
- Arıca, M. Y.,** Testereci, H. N., and Denizli, A. 1998. Dye-ligand and metal chelate poly [2-hydroxyethylmethacrylate] membranes for affinity separation of proteins. *J. Chromatogr, A*, 799: 83-91.
- Bafna, A. A.,** 2004, "Polyethylene-Clay Nanocomposites: Processing-Structure-Property Relationship", The Department of Chemical and Materials Engineering of The College of Engineering, The University of Cincinnati, Doktora Tezi, 19-42.
- Bakshi, D.K. ,** Gupta K.G., Sharma P., "Enhanced biodecolorization of synthetic textile dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium* under improved culture conditions", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, pp. 507-509, 1999.
- Bayramoğlu G. and Arıca M. Y.,** Biosorption of Reactive Red-120 Dye From Aqueous Solution By Native and Modified Fungus Biomass Preparations of *Lentinus sajor-caju*, *Journal of Hazardous Materials* 149(2), 499-507(2007).

- Bayramoğlu G.**, G. Celik and M. Y. Arica, Biosorption of Reactive Blue 4 Dye By Native and Treated Fungus *Phanerocheate Chrysosporium*, Batch and Continuous Flow System Studies, *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1689-1697(2006).
- Baysal. B.**, 1994, *Polimer Kimyası*, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Beilen, J. and Li, Z.**, (2002) "Enzyme Technology: an Overview" *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338–344.
- Beyer G.**, Elsevier Science Volume 4, Number 10, October 2002, pp. 22-28(7).
- Bickerstaff, G.F.**, 1997. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Biron, M.** (2004). *Thermosets and composites*, Technical information for plastics users, Elsevier Ltd. Blow CM, Editor, *Rubber technology and Manufacture*, The Chemical Rubber Co Ohio 1971; p509.
- Bourbigot S.**, Vanderhart D.L., Gilman J.W., Awad W.H., Davis R.D., Morgan A.B., Wilkie C.A., 2003 "Investigation Of Nanodispersion in Polystyrene-Montmorillonite Nanocomposites By Solid-State NMR", *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, 41, 3188-3213.
- Bourbigot, S.**, Banderhart, D. L., Gilman, J. W., Awad, W. H., Davis, R. D., Morgan, A. B., Wilkie, C. A., *Journal of Polymer Physics* , Vol.41, 3188-3213(2003)©2003 Wiley Periodicals, Inc. 42. Giannelis,E.P.;Vaia,R.A; Jandt,K.D.; Kramer, E.J.*Macromolecules* 1995,28,8080-8085.
- Bourbonnais, R.**, Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S., (1997) "Reactivities Of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds" *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4627-4632.
- Burbaev, I.G.** Gazaryan, A.I.Yaropolov, "Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes" *a Biochimie* 86 (2004) 693–703
- Butler G.B.**, *Cyclopolymerization and cyclocopolymerization*, Marcel Dekker: New York, 1992.
- Call, H., Mucke, L.**, (1997) "History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym process)" *J. Biotechnol.*, 53: 163-202.



- Callister W.**, "Materials Science and Engineering: An Introduction", 4th Edition, John-Wiley & Sons, USA, 1997.
- Cao, Y.M.**, SUN, J., YU, D.H., Journal of Applied Polymer Science, Vol.83,70-77(2002).
- Carliell, C.M.**, Barclay, S.J., Naidoo, N., Buckley, C.A., Mulholland, D.A. and Senior, E., 1995. Microbial Decolourisation of a Reactive Azo Dye Under Anaerobic Conditions. Water(SA), 21: 61-69.
- Carr, P. W. and Bowers, L. D.**, "Support considerations in chemical analysis", Enzymes, Academic Press, New York, 56: 167-170 (1980).
- Carrado, K. A.**, 2003, Advanced Polymeric Materials: Structure Property Relationships, G. Shonaike and S. Advani, Eds., CRC Press LLC, Boca Raton, FL, Chapter 10, 349-396.
- Chaix C**, Minard-Basquin C, Delair T, Pichot C, Mandrand B. J Appl Polym Sci 1998;70:2427.
- Chefetz, B.;** Chen, Y.; Hadaar, Y.: "Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification", Appl. Environ. Microbiol., 64 (1998) 3175–3179.
- Chen Y**, Zhou S, Yang H, Wu L. J Appl Polym Sci 2005 ;95 :1032.
- Chen-ruí T.**, Jeng-yue W., Hsin-yí L., Feng-chih C., Journal of Applied Polymer Science, Vol.85,1370-1377(2002).
- Chiwada, G.**, 2005, "Effects of Additives and Structure of Surfactants on Fire Retardancy of Polymer Nanocomposites", The Faculty of The Graduate School, Marquette University, Doktora Tezi, 1-8.
- Compbell, I.M.**, 1994, Introduction to Synthetic Polymers, Oxford University Press. New York.
- Couto, R.S.;** Hofer, D.; Sanromán, M.A.; Gübitz, G.M.: "Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor. Application to decolourisation of dyes from a leather factory", Eng. Life Sci., 4 (2004) 233–238.
- Couto, R.S.;** Sanromán, M.A.; Gübitz, G.M.: "Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*", Chemosphere, 58 (2005) 417–422.

- Çapar, G.;** Yetiş, Ü.; Yılmaz, L.: “Halı Boyama Atık Sularının Membran Prosesleri ile Arıtımı”, SKKD, Cilt 14, Sayı 2, (2004) 9-15
- Çolak F.,** Atar N., Olgun A., “Biosorption of acidic dyes from aqueous solution by *Paenibacillus macerans*: Kinetic, thermodynamic and equilibrium studies”, *Chemical Engineering Journal*, 150, pp. 122-130, 2009.
- D’Annibale, A.,** Stazi, A., Vinciguerra, S.R. and Giovannozzi, V.G., “Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater”, *Biotechnol*, 77: 265-273 (2000).
- D’Annibale, A.,** Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. and Sermanni, G.G., “Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment”, *Process Biochem*, 34: 697-706 (1999).
- D’Souza, S. F. and Godbole, S. S.,** “Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine”, *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 52: 59-62 (2002). de l’ingénieur AM 5205: 19.
- Dick JS,** Editor, *Rubber Technology: Compounding and testing for Performance*, Hanser publishers, 2001; p523.
- Dimile, E.:** “Tekstil Terbiye İşletmelerinde Atık Su Renginin Giderilmesi ”, Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi, İstanbul, Türkiye, (2005)
- Dodor, D.E.,** Hwang, H. and Ekunwe, S.I.N., “Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*”, *Enzyme Microb Tech*, 35: 210-217 (2004).
- Doğan G.,** Yeni nesil polimerik yapıların hazırlanması ve enzim immobilizasyonunda kullanılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Yüksek lisans tezi, Aydın, 11-19(2008)
- Doh J. G., Cho, I.,** “Synthesis and properties of polystyrene-organoammonium montmorillonite hybrid”, *Polymer Bulletin*, 41: 511-518 (1998).
- Dönmez, G.,** Aksu, Z., “Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species”, *Process Biochem.*, 38, pp. 751–762, 2002.
- Dumitriu, S.,** Popa, M., and Dumitriu, M. 1998. Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers. *J. Bioact. Compat. Pol.*, 3: 243-312.
- Duran N.,** Rosa M.A. , D’annibale A., Gianfreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme Microbiol. Technol.* 31, 907–931.

- Durante D**, Casadio R, Martelli PL, Tasco G, Portaccio M, De Luca P, Bencivenga U, Rossi S, Di Martino S, Grano V, Diano N, Mita DG. 2004. Isothermal and nonisothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *J Mol Catal B-Enzym*, 27: 191-206.
- Durmus, A.**, 2006, "Poliiolefin Nanokompozitlerin Hazırlanması", İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1-41.
- Ebbesen, T.W. (Ed.)**, 1997, "Carbon Nanotubes", CRC Press, Boca Raton, FL.
- Eggert, C.**; Temp, U.; Dean, J.F.D.; Eriksson, K.E.L.: "The lignolytic system of white rot fungus *Pycnocarpus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (1996) 1151–1158.
- Eirich F.R**, Editor, *Science and Technology of Rubber*, Academic Press, New York, 1978; s633.
- Feng, Xu** (1996) "Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as well as Halide Inhibition" *Biochemistry*, 35: 7608-7614.
- Fischer H.**, *Materials Science and Engineering*, C 23, 763–772, 2003.
- Freire, R.S.**, Duran, N. and Kubota, L., "Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds", *Talanta*, 54: 681-686. (2001).
- Froehner, S.C.; Eriksson, K.E.:** "Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase", *J. Bacteriol.*, 120 (1974) 458–465.
- Gianellis, E. P.**, 1996. Polymer-layered silicate nanocomposites : a review from preparation to processing. *Prog. Polym Sci.* 28:1539-1641.
- Gianfreda, L.**, Xu, F., Bollag J.M., (1999) "Laccases: A Useful Group Of Oxidoreductive Enzymes" *Bioremed. J.*, 3:1-25.
- Gloaguen, J. & Lefevre, J.** (2007). *Nanocomposites polymers/silicates en feuillets, Techniques*
- Grim, R. E.**, 1953. *Clay Minerology*, McGraw-Hill book, New York.
- Grimshaw, R. W.**, "The Chemistry and Physics of Clays", Ernest Bern Ltd., London, 138-146, 232-257, 446-449, 968-979 (1971).

- Güngörmedi, G.**, Şaşmaz, S., Aytar, P., Gedikli, S., Ünal, A., Çabuk, A., Kolankaya, N., “Biosorption of Dyestuff Reactive RED 198 with Biomass of *Trametes versicolor*”, Journal of Engineering and Architecture Faculty of Eskişehir Osmangazi University, Vol: XXII, No:2, 2009.
- Gürsel, A.**, Alkan, S., Toppare, L. and Yagcı, Y. 2003. Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *React. Funct. Polym.*, 57: 57-65.
- Hartmeier, W.**, 1968, *İmmobilisierte Biokatalysatoren*, Springer Verlag, New York.
- Hatakka, A.**, (1994) “Lignin-Modifying Enzymes from Selected White- Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation” *Fems Microbiol Rev.*, 13: 125– 35.
- Hirano T**, Todorski T, Kato S, Yamamoto H, Caliceti P. *J Control Rel* 1994;28 (1-3):203.
- Hoffman, R.W.**, Brindley, G.W., 1960. Adsorption of nonionic aliphatic molecules from aqueous solutions on montmorillonite, clay-organic studies, II, *Geochim Cosmochim. SActa*, 20,15-29.
- İnbathamizh L.** , Malini Devi V., Mekalai Ponnu T., Premalatha S. and Divy M., “Dye Decolorization using Fungal Laccase”, *Bulletin of Environment, Pharmacology & Life Sciences* Volume 1, Issue 3, February 2012: 67 – 71
- İsosaki K**, Seno N, Matsumoto I, Koyama T, Moriguchi S. *J Chromatogr* 1992;595:123.
- İşık, F.**, 2005, "Nanocomposites Based On Blends of Polyethylene", The Graduate School of Natural and Applied Sciences Of Middle East Technical University, Yüksek Lisans Tezi, Doktora Tezi, 7-41.
- İnam, R.**, Çaykara, T. and Özyürek, C. 2001. Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels. *Sep Sci Technol*, 36(7): 1451-1461.
- İşçi S.**, “Kil/PVA ve Organokil/PVA Nanokompozitlerin Sentezi ve Karakterizasyonu”, Doktora Tezi,, 2007, sayfa1-6.
- Jain, R. A.** *Biomaterials* 2000, 21, 2475-2490.
- Jun-chao Huang**, Zi-kang Zhu, Xiao-dong Ma, Xue-feng Qian, Jie Yin. *Journal of Materials Science* 36 (2001)871-877.
- K.V. Kumar**, V. Ramamurthi and S. Sivanesan, “Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora* sp. a fresh water algae”, *Dyes Pigments*, pp. 69:74-79, 2006.

- Kaetsu, I.**, Kamura, M. and Yoshida, M., “Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature”, *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 847-849 (1979).
- Kasinath, A.**; Novotny, C.; Svobodova, K.; Patel, K.C.; Šašek V.: “Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packedbed bioreactor”, *Enzyme Microb. Technol.*, 32 (2003) 167–173.
- Kato M.**, Usuki A., Okada, A., Kurauchi T., *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 137-139, 1997.
- Kaw A.K.**, “Mechanics of Composite Materials”, 2nd Edition, CRS Press, Boca Raton, Fla., 2006.
- Kirk, O.**, Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., (2002) “Industrial Enzyme Applications” *Current Opinion In Biotechnology*, 13: 345-351.
- Kocaer, F; Alkan, U:** “Boyarmadde İçeren Tekstil Atık Sularının Arıtım Alternatifleri”, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt 7, Sayı 1, (2002) 47-55.
- Krikorian, V. and Pochan, D.J.**, Poly (L-Lactic Acid)/Layered Silicate Nanocomposite: Fabrication, Characterization, and Properties Department of Materials Science and Engineering and Delaware Biotechnology Institute, University of Delaware, Newark, Delaware 19716 Received May 16, 2003. Revised Manuscript Received July 30, 2003.
- Kunamneni A.**, Ballesteros A., Plou F. J. and Alcalde M., “Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications,” in *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Mendez-Vilas, Ed., vol. 1, pp. 233–245, Formex, Badajoz, Spain, 2007.
- Ladavière C.**, Delair T, Domard A, Pichot C, Mandrand B. *J Appl Polym Sci* 1999;71:927.
- Lan, T. & Pinnavaia, T.** (1994). Clay-reinforced epoxy nanocomposites, *Chemistry of Materials*6: 2216–2219.
- Lan, T.**, Kaviratna, P. & Pinnavia, T. (1995). Mechanism of clay tactoid exfoliation in epoxy-clay.
- Lante, A.**, Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P. “Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor”, *Process Biochem*, 36: 51-58 (2000).

- Li, K.**, Xu, F., Eriksson, K.E., (1999) "Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound" *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(6): 2654-2660.
- Liu X., Wu Q.**, Polymer nanocomposites., *Chemistry of Materials* 7(11): 2144–2150.
- Luckham, P. F., Rossi, N.**, "The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions", *Adv. Colloidal Interface*, 82: 43-92 (1999).
- Macheteau, M.**; Boudet, A.M.; Goffner, D.: "Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family in poplar", *Eur. J. Biochem.*, 259 (1999) 485–495.
- Marbach, I.**; Harel, E.; Mayer, A.M.: "Molecular properties of extracellular Botrytis cinerea laccase", *Phytochemistry*, 13 (1984) 2713–2717.
- Marquis, D.M.**, Guillaume, E. and Chivas-Joly,C., *Properties of Nanofillers in Polymer* Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) France,2011.
- Matthews F.L.**, Rowlings R.D., "Composite Materials, Engineering & Science", Chapman & Hall, London, New York, 1994.
- Mayer, A.M.** (1987) "Polyphenoloxidases In Plants: Recent Progress" *Phytochemistry*, 26: 11-20.
- Messermith PB, Giannelis EP.** *Chem Mater* 1993;5:1064.
- Mester, T., Tien, M.**, (2000) "Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in The Degradation of Environmental Pollutants" *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 51-59.
- Mikos, A. G.**; Lyman, M. D.; Freed, L. E.; Langer, R. *Biomaterials* 1994, 15, 55-58.
- Mishra G.**, Tripathy, M., A Critical Review of The Treatment for Decolourization of Textile Effluent. *Colourage* 40, 35–8(1993).
- Mortland, M.M.**, *Clay-Organic Complexes and Interactions*, *Adv. Agronomy* 22 (1970).
- Mosbach, K.**, "Methods in enzymology", *Enzymology*, Academic Press, New York, 44-49 (1976).
- Narayan, R.**, In *Emerging Technologies for Materials and Chemicals from Biomass.*, ACS Symp. Ser. 476, Rowell, R.M; Schultz, T.P. and Narayan, R. Eds., Washington DC, 1990, p. 1.

- Nelson, J. M. and Griffin, E. G.** (1916) Adsorption of invertase. *J. Am. Chem. Soc.* 38, 1109–1115
- Niku-Paavola, K.E.;** Salola, P.; Raunio, V.: “Lignolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata*”, *J. Biochem.*, 254 (1988) 877–884.
- Ogata, N.;** Jimenez, G.; Kawai, H.; Ogihara, T. *J. Polym. Sci Part B: Polym. Phys.* 1997, 35, 389-396.
- Okada, A.,** Kawasumi, M., Usuki, A., Kojima, Y., Kurauchi, T., Kamigaito, O., 1990. A Synthesis and properties of nylon-6/clay hybrids, *MRS Symposium Proceedings*, 171, 45-50.
- Öner, C.,** 2003, *Genetik Kavramlar*, Palme yayıncılık.
- Özden, G.,** 2004, "Synthesis and Characterization of Polystyrene Clay Nanocomposites", The Graduate School of Natural and Applied Sciences Of Middle East Technical University Yüksek Lisans Tezi, 1-12.
- Özer, A.,** Özer, D., Ekiz, H.I. “Application of Freundlich and Langmuir models to multistage purification process to remove heavymetal ions by using Schizomeris leibleinii”, *Process Biochem.*, 34, pp. 919–927, 1999.
- Park, C.I.,** Park, O.O., Lim, J.G., Kim, H.J., *Polymer* 42 (2001) 7465-7475.
- Park, K.,** Shalably, S.W.W., Park, H., “Biodegradable hydrogels for drug delivery”, Technomic Publishing Co. Inc., 1-12, 35-66 (1993).
- Park, T. G.;** Cohen, S.; Langer, R. *Macromolecules* 1992, 25, 116-122.
- Philips, D.,** 1996. Enviromentally Friendly, Productive and Realiabe: Prioritied for Cotton Dyes and Dyeing Processes. *J. Soc. Dyers Color.*, 12:183-186.
- Pinnavaia, T.J. and Lan, T.,** 2000 “Hybrid organic-inorganic nanocomposites and methods of preparation”, US Pat., 6.017.632, 25.01.2000a, Appl. 20.08.1998, to Claytec, Inc.
- Piontek, K.,** Antorinis, M., Choinowski, T. (2002) “Crystal Structure of A Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* At 1.90-Å Resolution Containing A Full Complement Of Coppers” *Biological Chemistry J.*, 277: 37663-37669.
- Pluta, M.;** Galeski, A.; Alexandre, M.; Paul, M. A.; Dubois, P. *J. Appl. Polym. Sci.* 2002, 86, 1497-1506.
- Poots, V.J.P.;** McKay, J.J.: “The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents-I Peat”, *Water Res.*, 10 (1976) 1061–1066.

- Pukánszky, B.**, European Polymer Journal 41(2005) 645-662.
- Qinghui M.**, Synthesis and Characterization of Structurally Well-Defined Polymer-Layered Silicate Nanocomposites, Doktora tezi, 2007 , 2-5.
- Quan, D.**, Kim Y. and ShinW., J. Electroanal. Chem, 561, 181(2004).
- Ramsay, J.A. and Nguyen, T.**, 2002. Decoloration of Textile Dyes by *Trametes versicolor* and Its Effect on Dye Toxicity. Biotechnology Letters, 24: 1757-1761.
- Ray, S. S.**; Maiti, P.; Okamoto, M.; Yamada, K.; Ueda, K. Macromolecules 2002, 35, 3104-3110.
- Ray, S.S.; Okamoto, M.**, 2003. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation from processing. Prog. Polym. Sci. 28:1539-1641.
- Reynaud, E.**, Gauthier, C. and Perez, J., 1999, "Nanophases in Polymers", Rev. Metal./ Cab. Inf Tech., 96 169-176.
- Riu, J.**; Schönsee, I.; Barcelo, D.: "Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry", J. Mass Spectrom., 33 (1998) 653–663.
- Robles, R.**; Lucas, G. A. Cienfuegos and A. Galvez, Enzyme and Microb. Technol. 26, 484(2000).
- Rodlert, M., Plummer, C., et al.**, 2003, "Hyperbranched Polymer /Montmorillonite Clay Nanocomposites, Polymer", 45: 949-960
- Rogalski, J.**; Lundell, T.; Leonowicz, A.; Hatakka, A.: "Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions", Acta Microbiol. Pol., 40 (1991) 221–234.
- Rothon R.** Editor, Particulate- Filled Polymer Composites, Longman Scientific & Technical, New York, 1995; p371.
- Rzaev, Z.M.O.**; Milli, H. And Akovalı, G., 1996, Complex-radical Alternating Copolymerization of trans-Stilbene with N-Substituted Maleimides, Polymer International, 41, 259-265.
- Sakurai, T.** (1992) "Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate(II)" Biochem. J., 284: 681–685.



- Sanjay, G., and Sugunan, S.** 2006. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chem.*, 94: 573- 579.
- Sannia, G.;** Giardina, P.; Luna, M.; Rossi, M.; Buonocore, V.: "Laccase from *Pleurotus ostreatus*", *Biotechnol. Lett.*, 8 (1986) 797–800.
- Schneider, P.;** Caspersen, M.B.; Mondorf, K.; Halkier, T.; Skov, L.K.; Østergaard, P.R.; Brown, K.M.; Brown, S.H.; Xu, F.: "Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase", *Enzyme Microbial. Technol.*, 25 (1999) 502–508.
- Searle, A. B.,** Grimshaw, R.A., 1960. *The Chemistry and Physics of Clays and other Ceramic Materials*, Ernest Benn limited, London.
- Sen, F.,** Palancioğlu, H., Aldas, K., *Polimerik Nanokompozitler ve Kullanım Alanları*, *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 7, No: 1, 2010 (111-118)*
- Seshadri S.,** P. L. Bisho and A. M. Agha, *Waste Manag.* 14, 127(1994).
- Seymour, R. B., Deanin, R. D.,** "History of Polymeric Composites", VNU Science Press BV, Utrecht, 64 (1987).
- Shin-Ya Y,** Kajiuchi T, Hinode H, Park JW. *J Chem Engng Jpn* 1998;31:930.
- Shleev S.V.,** O.V. Morozova, O.V. Nikitina, E.S. Gorshina, T.V. Rusinova, V.A. Serezhenkov, D.S. , Gazaryan I.G. , Yaropolov A.I. , "Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes", *Biochimie* 86, 693–703, 2004
- Shukla A.,** Y. Zhang, P. Dubey, et. al., "The role of sawdust in the removal of unwanted materials from water", *J. Hazard. Mater.*, 95, pp. 137–152, 2002.
- Spadaro, J.T.;** Lorne, I.; Renganathan, V.: "Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation", *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 1389–1393.
- Swamy, J.,** 1998. *The Biodecoloration of Textile Dyes by White – Rot Fungus *Trametes versicolor*. A Master Thesis Submitted to The Department of Chemical Engineering, 1-100.*
- Tanaka, A., and Kawamoto T. ,**1999, *Cell and Enzyme Immobilization*. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. Demain A. L. and Davies J. E., American Society for Microbiology. ISBN 1-55581-128-0. Washington.
- Taspinar, A. and Kolankaya, N. ,**1998, Optimization of enzymatic chlorine removal from Kraft pulp. *B. Environ. Contam. Tox.* 61, 15–21.

- Taylor, M. S.;** Daniels, A. U.; Andriano, K. P.; Heller, J. J. Appl. Biomater. 1994, 5, 151-157.
- Tekman, S., Öner, N.,** "Genel Biyokimya", İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 47-49 (1994).
- Telefoncu A.,** "İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri", Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 193-249 (1986).
- Trean, M.D.** 1980. Techniques of immobilization, Immobilized Enzyme. John Wiley and Sons, New York, 37-44.
- Tunali. S,** Akar, T., Cabuk A., "Decolorization of a textile dye, Reactive Red 198 (RR198), by *Aspergillus parasiticus* fungal biosorbent", Brazilian Journal of Chemical Engineering, 26, 2, pp. 399-405, 2009.
- Uhlig, H.,** 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, John Wiley & Sons, USA.
- USEPA,** Handbook of Advanced Photochemical Oxidation Processes, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington DC 20460, EPA/625/R-981004. Washington DC, 1998
- USEPA,** Profile of the Textile Industry, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Compliance Sector Notebook Project, EPA/310- R-97-009(1997).
- Van der Hart, D.L.,** Asano, A. and Gilman, J.W., 2001 "Solid-State NMR investigation Of Paramagnetic Nylon-6 Clay Nanocomposites". 1. Crystallinity, morphology, and the direct influence of Fe<sup>3+</sup> on nuclear spins", Chem. Mater. 13, 3781-95.
- Van Olphen, H.,** 1977. Introduction to Clay Chemistry, Wiley, New York.
- Veron L,** Bignicourt MCD, Delair T, Pichot C, Mandrand B. J Appl Polym Sci 1996;60:235.
- Vijayalekshmi V.,** Studies on Natural Rubber/Clay Nanocomposites: Effect of Maleic Anhydride Grafting of Rubber Thesis submitted to the Cochin University of Science and Technology In the partial fulfillment of the requirements for the award of the degree of Doctor of Philosophy in Polymer Science Under the Faculty of Technology.
- Volkova F,** Gorshkova MYu, Ivanov PE, Stotskaya LL. Polym Adv Tech 2002; 13:1067.
- Von Werne, T. And T.E. Patten,** 1999, "Preparation of structurally well defined polymer nanoparticle hybrids with controlled/living radical polymerization", J. Am Chem. Soc., 121 7409-10.

- Wang, M.**, Zhao, F., Guo, Z., Dong, S., "Poly(vinylidene fluoridehexafluoropropylene)/ organo-montmorillonite clays nanocomposite lithium polymer electrolytes", *Electrochimica Acta*, 49: 3595-3602 (2004).
- Wiley J.**, 1971, "Encyclopedia of Polymer science and Technology", vol.15, 79-509, New York.
- Wiley J.**, 1993, "Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology", 4th ed., New York, 1993.
- Wiseman, A.**, 1975, *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Halsted Press, New York.
- Wong, C.H., and Whitesides, G.M.** (1994). *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Great Britain.
- Wong, Y.X., YU, J.**, 1999. Laccase-catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes, *Water Research*, 33, 16, 3512-3520.
- Wood, D.A.:** "Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*", *J. Gen. Microbiol.*, 117 (1980) 327–338.
- Worrall, W.E.**, 1986. *Clays and Ceramic Raw Materials*, Elsevier, London.
- Xiao, H.**, Huang, J., Liu, C. and Jiang, D., "Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method", *T Nonferr Metal Soc*, 16: 414-418 (2006).
- Xiao, Y.;** Zhang, S.; Hu, Q.; Jiang, W.; Pu, C.; Shi, Y.: "Immobilization of fungal laccase on chitosan and its use in phenolic effluents treatment", *Weishengwu Xuebao*, 43 (2003) 245–250.
- Xu, F.:** "Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases", *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 924–928.
- Yano K,** Usuki A, Okada A, Kurauchi T, Kamigaito O. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 1993;31:2493.
- Yeşilada, Ö., and Özcan, B.**, 1998. Decolorization of Orange II Dye With The Crude Culture Filtrate of White Rot Fungus, *Coriolus versicolor*. *Tr. J. of Biology*, 22: 463-476.
- Yinghui, D.**, Qiuling, W. and Shiyu, F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", *Lett. Appl. Microbiol*, 35: 451–456 (2002).

- Yoo, E.S.**, Libra, J., Wiesmann, U., 2000. Reduction of Azo Dyes by Desulfovibrio Desulfuricans, *Water Science and Technology*, 41, 12, 15-22.
- Yu, Y-H.**, Yeh, J-M., Liou, S-J., Chen, C.L., Liaw, D-J. ve Lu, H-Y. (2004-a) Preparation and properties of polyimide- clay nanocomposite materials for anticorrosion application, *J. Appl. Poly.Sci.*, 92(6), 3573-3582.
- Zaborsky, O.**, "Adsorption Immobilized Enzyme", Ed. by Weast, R. C., CRC Press, Ohio, 37-44 (1973).
- Zanetti, M.**, Lomakin, S., Camino, G., *Polymer Layered Silicate Nanocomposites*, *Macromol. Mater. Eng.* 279, 1-9(2000).
- Zawisza, I.**, Rogalsky, J. and Opallo, M., "Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film", *J Electroanal Chem*, 588: 244-252 (2006).
- Zelić, B.**; Tisma M, Sudar M, Vasić-Racki D, "Mathematical model for Trametes versicolor growth in submerged cultivation", *BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING*, Volume 33, Number 6 (2010), 749-758.
- Zhang Z.**, S. Xia, X. Wang, et. al., "A novel biosorbent for dye removal: Extracellular polymeric substance (EPS) of *Proteus mirabilis* TJ-1", *Journal of Hazardous Materials*, 163, pp. 279–284, 2009.
- Zheng., X.**, 2005, " Applications of Polymer-Layered Clay Nanocomposites", Maguette Üniversitesi Doktora Tezi, Milwaukee, Wisconsin, 1-7.
- Zhou P**, Deng YZ, Zeng YE. *Chem J Chin Univ Chin* 1998;19:198.
- Zhu Jin**, Morgan Alexander B., Lamelas Frank J., Wilkie Charles A., Fire properties of polystyrene-clay nanocomposites, *Chem Mater*, 13, 3774-3780, 2001.)
- Zollinger, H.**: "Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. Colour chemistry". New York: John Wiley-VCH Publishers (2002) 92-100.

### **İnternet Kaynakları**

[www.reade.com/Products/Nano materials/nanofillers\\_nanoadditives](http://www.reade.com/Products/Nano%20materials/nanofillers_nanoadditives)

[www.mri.psu.edu](http://www.mri.psu.edu)

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı: Sedef İlk

Doğum Yeri : Niğde,

Doğum Tarihi: 01.02.1986

### **EĞİTİM DURUMU**

Lisans Öğrenimi: Hacettepe Ün., Biyoloji Öğretmenliği

Yüksek Lisans Öğrenimi: Hacettepe Üni., Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D.

Yabancı Diller: İngilizce ve Almanca