

AMILOİD TABANLI BİYOKATALİTİK MEMBRAN ÜRETİMİ

GÖZDE KABAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞUSTOS 2015
ANKARA

Fen Bilimleri Enstitü onayı

Prof. Dr. Osman EROĞUL

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Osman EROĞUL

Anabilim Dalı Başkanı

Gözde KABAY tarafından hazırlanan AMİLOİD TABANLI BİYOKATALİTİK MEMBRAN ÜRETİMİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Urartu Ö. Ş. ŞEKER

İkinci Tez Danışmanı

Tez Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Osman EROĞUL

Üye : Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Urartu Ö. Ş. ŞEKER

Üye : Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

Üye : Doç. Dr. G. Barış BAĞCI

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gözde KABAY

Üniversitesi : TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Enstitüsü : Fen Bilimleri

Anabilim Dalı : Biyomedikal Mühendisliği

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet MUTLU

İkinci Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Urartu Ö. Ş. ŞEKER

Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ağustos 2015

GÖZDE KABAY

AMILOİD TABANLI BİYOKATALİTİK MEMBRAN ÜRETİMİ

ÖZET

Son dönemlerde doğadan esinlenerek yeni nesil biyoyumlu malzeme üretimi üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bu malzemelerin biyomedikal uygulamalarda kullanımı biyomateryaller, biyosensörler, fonksiyonel membranlar ve yapay doku iskeleleri gibi çeşitlilik göstermektedir.

Bu çalışmada “doğal ve fonksiyonel” özellikleri olan biyokatalitik membran üretimi amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, model altyapı proteini olarak seçilen sığır serum albümin ıslak kimya teknikleri ile amiloid forma dönüştürülmüştür. Glikoz oksidaz enzimi yapıdaki aktif biyolojik ajan olarak seçilmiştir. Biyokatalitik membran elektro-eğirme yöntemi ile “nano” ölçekte fiberlerin rastgele yığını şeklinde üretilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar, üretilen biyokatalitik membranın yapısındaki proteinin amiloid forma dönüştürülebildiğini, yapıdaki enzimin 0,7 μA akım şiddeti yarattığını ve 2547 U/m^2 aktiviteye erişilebildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyokatalitik membran, Biyosensör, Elektro-eğirme, Glikoz Oksidaz, Sığır Serum Albümin

University : TOBB University of Economics and Technology
Institute : Institute of Natural and Applied Sciences
Science Programme : Biomedical Engineering
Supervisor : Prof. Dr. Mehmet MUTLU
Second Supervisor : Assoc. Prof. Urartu Ö. Ş. ŞEKER
Degree Awarded and Date: MSc. – August 2015

GÖZDE KABAY

PRODUCTION OF AMYLOID BASED BIOCATALYTIC MEMBRANE

ABSTRACT

In the recent years, the researches on the production of new generation biocompatible materials are inspired by the nature. The use of these materials in biomedical applications vary as, biomaterials, biosensors, functional membranes and artificial tissue scaffolds. In this study, production of a biocatalytic membrane with "natural and functional" features, was intended. Towards this goal, bovine serum albumin was selected as the model infrastructure protein. Then, it had been transformed into amyloid form with the wet chemistry techniques. Glucose oxidase is selected as the active agent in the biological structure. Biocatalytic membrane was produced with electro-spinning method, in the form of random bundle of nanofibers.

The results of the studies carried out within the scope of the thesis showed that, the protein used to produce biocatalytic membrane can be converted into amyloid form, the enzyme in the structure was created a current of 0.7 μA and achieved an activity of 2547 U/m^2 .

Keywords: Biocatalytic membrane, Biosensor, Electrospinning, Glucose oxidase, Bovine serum albumin

TEŞEKKÜR

Öncelikle, çalışmalarımın her aşamasında benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen, öğrencilerini herkesin ve herşeyin üstünde tutan değerli hocam Prof. Dr. Mehmet MUTLU' ya,

Her zaman gülen yüzüyle bana destek olan saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. Osman EROĞUL, Doç. Dr. G. Barış BAĞCI ve Doç. Dr. Emre Ersin ÖREN ve Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ' a,

Bu çalışmanın fikrini vererek bu ürünün ortaya çıkmasını sağlayan yardımcı danışmanım Yrd. Doç. Dr. Urartu Ö. Ş. ŞEKER' e, çalışmam süresince laboratuvarının kapılarını sorgusuzca açan Doç. Dr. Ali BOZBEY' e ve Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI' ya,

Güzel bir laboratuvarında ve ortamda çalışma imkanı sunarak beni destekleyen değerli TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi ailesine,

Bana hem çalışmalarımında var gücüyle destek olan hem de dostluklarıyla Ankara'yı güzelleştiren, her seferinde iyi ki var dediğim, Gizem, Ümit, Zahide, Emre, Sevde, Bilgehan ve Oğuz' a,

En önemli yol göstericim, en sevdiğim, yanımda olmasa da beni bir yerlerden izlediğine ve gurur duyduğuna inandığım canım babama, güzel aileme ve burada adını sayamadığım hayat enerjimi canlı tutan tüm dostlarıma teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Başlık	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı.....	1
2. LİTERATÜR	3
2.1. Biyomalzemeler.....	3
2.2. Protein ve Yapısı.....	4
2.2.1. Sığır Serum Albümin ve Yapısı.....	7
2.3. Proteinlerin Denatürasyon Mekanizması ve Amiloid Dönüşümü.....	7
2.4. Elektro-eğirme Yöntemi.....	9
2.4.1. Elektro-Eğirme Sisteminin Çalışma Prensibi.....	10
2.4.2. Taylor Konisinin Oluşumu ve Jette Oluşan Kararsızlıklar.....	12
2.4.3. Elektro-Eğirme İşlem Parametreleri.....	13
2.4.3.1. Voltaj.....	13
2.4.3.2. Akış hızı.....	13
2.4.3.3. Sıcaklık.....	13
2.4.3.4. Toplayıcının Etkisi.....	14

2.4.3.5. İğne Çapı.....	14
2.4.3.6. Toplayıcı ve İğne Ucu Arası Mesafe.....	14
2.4.4. Elektro-Eğirme İşleminde Kullanılan Polimer Çözeltisine ait Parametreler.....	15
2.4.4.1. Moleküler Ağırlık ve Çözelti Viskozitesi.....	15
2.4.4.2. Yüzey Gerilimi.....	15
2.4.4.3. Çözelti İletkenliği.....	15
2.4.4.4. Çözücünün Dielektrik Etkisi.....	16
2.4.5. Elektro-Eğirme İşlemini Etkileyen Çevresel Faktörler.....	16
2.4.5.1. Nem.....	16
2.4.5.2. Atmosfer Çeşidi.....	16
2.4.5.3. Basınç.....	16
2.5. Enzim ve Yapısı.....	16
2.5.1. Glikoz Oksidaz.....	18
2.5.2 Enzim Aktivitesi ve Ölçümü.....	19
2.5.3. Amperometrik Ölçüm Yöntemi.....	19
2.6. Yüzey Analiz Teknikleri.....	20
2.6.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	20
2.6.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM).....	21
2.6.3. Optik (Işık) Mikroskobu.....	22
3. DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	23
3.1. Gereçler.....	24
3.1.1. Elektrokimyasal Ölçüm Düzenegi.....	24
3.2. Yöntemler.....	25

3.2.1. Ön Çalışmalar.....	25
3.2.1.1. Elektro-Eğirme Sisteminin Kurulumu.....	25
3.2.1.2. Nanolif Üretimi.....	26
3.2.1.2.1. Protein çözeltilisinin hazırlanması.....	26
3.2.1.2.2. SSA çözeltilisi kullanılarak elektro-eğirme işlemleri yapılması.....	27
3.2.2. Protein-enzim Çözeltilerinin Hazırlanması ve Amiloid Dönüşümü.....	27
3.2.3. Protein-enzim Tabanlı Biyokatalitik Membranların Üretimi.....	28
3.2.4. Biyokatalitik Membranların Karakterizasyonu.....	28
3.2.5. Enzimatik Aktivitenin Saptanması.....	29
4. SONUÇ VE TARTIŞMALAR.....	31
4. 1. Ön Çalışmalar Kapsamında Ulaşılan Sonuçlar.....	31
4.1.1. Protein Çözeltilerinin Hazırlanması ve Amiloid Formun Elde Edilmesi	32
4.1.2 Elektro-eğirme Düzenine Kurulumuna Yönelik Ön Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	33
4.2. Protein-enzim Çözeltilerinin Hazırlanması ve Amiloid Formun Elde Edilmesi.....	38
4.2.1. Elektro-eğirme Yöntemi ile SSA-GOD İskelelerin Üretilmesi, Karakterizasyonu ve İşlem parametrelerinin İyileştirilmesi.....	39
4.3. Enzimatik Aktivitenin Saptanması.....	47
5.SONUÇLAR VE GELECEK ÇALIŞMALAR.....	54
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Elektrokimyasal ölçüm sırasında kullanılan cihazlar ve özellikleri	25
Çizelge 4.1. Sistem düzeneği doğrultusunun eğirme parametrelerine etkisi	
A) yatay, B) düşey düzenek	34
Çizelge 4.2. Voltajın lif çapına ve sürekli fiber yapısına etkisi	
A) 8kV, B) 12 kV, C) 15 kV	36
Çizelge 4.3. Akış hızının lif çapına ve sürekli fiber yapısına etkisi	
A) 0.6, B) 0.45, C) 0.25 ml/sa	37
Çizelge 4.4. A, B, C ve D örneklerine ait çözücü parametreleri ve çözeltilere ait viskoziteler. Örnekler, kütlece %12 SSA, 10 eşdeğer bağ β-ME ve 200 U/ml GOD içermektedir	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Proteine ait birincil yapı organizasyonu gösterimi	5
Şekil 2.2. Proteine ait ikincil yapı organizasyonu gösterimi	5
Şekil 2.3. Hemoglobün proteininin, (A) üçüncül ve (B) dördüncül yapı organizasyonu gösterimi.....	6
Şekil 2.4. Sığır Serum Albümin	7
Şekil 2.5. Basit Elektro-eğirme düzeneği	10
Şekil 2.6. Taylor konisinin voltaj artışına bağlı değişimi	11
Şekil 2.7. Şırınga ucunda damlaya etki eden kuvvetler	11
Şekil 2.8. Gerilim artışının jet üzerindeki etkisi	12
Şekil 2.9. Enzim-substrat ilişkisinin şematik gösterimi	17
Şekil 2.10. Glikoz oksidaz	18
Şekil 3.1. Elektro-eğirme düzeneğinin kurulumu A) yatay, B) düşey sistem düzeneği	26
Şekil 4.1. %12 SSA, 1.5:1 v:v TFE:PBS ile hazırlanan çözeltiliye ait görüntüler. Kongo kırmızı boya ile boyama A) öncesi, B) sonrası	32
Şekil 4.2. A çözeltisi (1.5:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü	40
Şekil 4.3. B çözeltisi (3:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü	40
Şekil 4.4. C çözeltisi (4.5:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü	41
Şekil 4.5. D çözeltisi (1.5:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü	41
Şekil 4.6. Voltajın fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüleri C1) 12 kV, C2)15 kV	42

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Akış hızının fiber çapına ve dağılımına etkisi A1) 0,35 ml/sa, A2) 0,25 ml/sa	44
Şekil 4.8. A çözeltisiyle hazırlanan membranın Kongo kırmızısı boya ile boyama A) öncesi, B) sonrası görüntüleri	45
Şekil 4.9. Kongo kırmızısı boya ile boyanan A membranına ait optik mikroskop görüntüsü	45
Şekil 4.10. Protein (BSA) ve protein- enzim (BSA- GOD) tabanlı membranlara ait FTIR spektrumu	46
Şekil 4.11. 1-60 dakika zaman aralıklarında A çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri	47
Şekil 4.12. 1-60 dakika zaman aralıklarında B çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri	48
Şekil 4.13. 1-60 dakika zaman aralıklarında C çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri	49
Şekil 4.14. 1-60 dakika zaman aralıklarında D çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri	50

KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
β-ME	Beta Merkaptoetanol
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FIR	Uzak Dalga Boylu Kızıl Ötesi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GOD	Glikoz Oksidaz
HFIP	Hekzafloroizopropanol
IR	Kızıl Ötesi
MIR	Orta Dalga Boylu Kızıl Ötesi
SSA	Sığır Serum Albümin
NIR	Yakın Dalga Boylu Kızıl Ötesi
PBS	Tamponlanmış Fosfat Solüsyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TFE	Trifluoroetanol
UV	Morötesi

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı

Günümüz araştırmalarında, doğanın yapısal işleyişi ve organizasyonunu anlamaya yönelik “mimicking the nature” prensibi ile hareket edilmektedir. Bu doğrultuda malzeme üretimi yapılırken, konvansiyonel eşleniklerinin dışında kalan, yeni ve fonksiyonel özelliklere sahip, doğal yapılar tercih edilmektedir.

Gelişmiş özelliklere sahip bu malzemeler, membran ya da iskele halinde üretilebilir ayrıca yapıya eklenen biyoaktif ajanlar sayesinde söz konusu membranlar fonksiyonelleştirilebilir. Yapıyı fonksiyonelleştirmekte kullanılan biyoaktif ajanın performansı bu biyoaktif ajanı destekleyen genellikle nanoyapıdaki malzemelerin (nanoparçacıklar, nanotüpler, nanofiberler) özelliklerine bağlıdır. Örneğin, enzim yapısını destekleyici olarak nanoparçacık veya nanotüp kullanıldığı durumlarda substratla enzim arasında difüzyon limitleri oluşabilmekteyken; nanofiberler bu difüzyon limitlerini oldukça düşürmektedir [1]. Bu fonksiyonel membranların üretilmesinde en sık kullanılan fiber üretim yöntemi olarak elektro-eğirme (electrospinning) öne çıkmaktadır.

Günümüz membran çalışmalarında, bahsedilen fonksiyonel yapıları destekleyici ve koruyucu doğal altyapı malzemesi olarak farklı proteinler, albümin [1-4], kasein [5], hemoglobin ve miyoglobin [6,7], insülin ve lizozim [3,8] kullanılmıştır. Bu doğal alt yapı malzemelerini fonksiyonelleştirmek için; aktif ajan olarak çoğunlukla enzim kullanılmakta, ayrıca hormonlar, büyüme faktörleri [9] ve diğer aktif biyolojik ajanlarda “biyoaktif membran” yapısı içerisinde yer alabilmektedirler. Bu ajanlar doğrudan yapıya katılabileceği gibi, sonradan çeşitli immobilizasyon yöntemleri ile bağlanarak da biyoaktif membran üretilebilmektedir [10].

Bu çalışmanın amacı, biyoteknoloji ve biyomühendislik araştırmalarında kullanılmak üzere, biyolojik olarak aktif, diğer bir deyişle “doğal ve fonksiyonel” özellikleri olan yeni yapıların üretimidir. Bu kapsamda, doğal taşıyıcı yapı olarak “amiloid protein” ve aktif biyolojik ajan olarak “enzim” seçilmiştir. Model olarak seçilen Sığır Serum Albümin (SSA) proteini ve model biyoaktif ajan glikoz oksidaz (GOD) enzimi, çözelti

olarak hazırlanırken çeşitli orandaki çözücülerle amiloid forma dönüştürülmüş ve ardından elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan son membran yapısında bulunan enzimin aktivite göstermesi ile herhangi bir immobilizasyon işlemi yapılmadan Biyokatalitik membran üretiminin gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Membranlardaki fonksiyonelliğinin ölçüsü olan enzim aktiviteleri elektrokimyasal ölçüm yöntemiyle test edilmiş ve bu kapsamda iyileştirme çalışmaları yapılmıştır.

2. LİTERATÜR

2.1. Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, insan vücudundaki herhangi bir organ, doku veya fonksiyonel kısmın tedavi edilmesi ya da tamamen değiştirilmesi için kullanılabilen doğal karakterli olabildiği gibi yapay olarak da üretilebilen malzemelerdir [11]. Başka bir tanımla, belli bir fonksiyonu yerine getirmek üzere canlı sistemle vücut dışında (in vitro) veya içinde (in vivo) belli sürelerle temas eden malzeme ve cihazlarda yer alan tüm materyallere verilen genel bir addır [12]. Bir malzemenin biyomalzeme olarak kullanılabilmesi için bazı özellikleri sağlaması gerekmektedir.

Bunlar;

- Canlı sistemle uyumlu olmaları,
- Kolaylıkla ve iyi bir şekilde saflaştırılabilmesi, işlenebilmesi ve sterilize edilebilmesi,
- Biyomalzemelerin kullanılacağı yere göre istenilen fonksiyonel özelliklere (geçirgenlik, elastikiyet, elektrik ve termal özellikler, vb.), yeterli biyomekanik dayanıma (çekme, baskı ve çarpma), istenilen fiziksel özelliklere (kristalinite, vb.) sahip olması,
- Sahip oldukları özellikleri, canlı sistemle temas süresince korumalarıdır.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan biyomalzemeler; polimer, kompozit, metal ve alaşımları, seramikler ve biyolojik malzemelerden oluşmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda, fiziksel ve mekanik özellikleri malzeme seçiminde belirleyici iken; günümüzde bu malzemelerin gösterdiği biyolojik performansta önem kazanmıştır. Bu durum malzeme çalışmalarında fonksiyonellik kazandırılmış doğal yapıların (proteinler, polisakkaritler ve biyokompozitler) özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanımını ön plana çıkarmıştır [10, 12, 13].

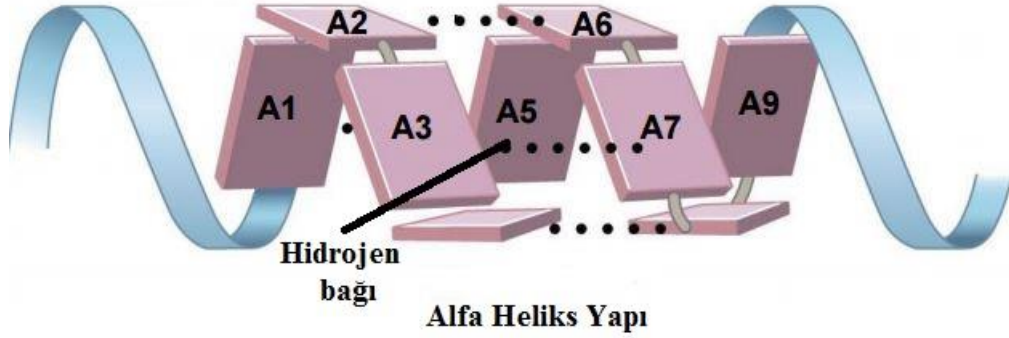
2. 2. Protein ve Yapısı

Doğada bulunan birçok malzeme, birbirinden farklı özelliklere ve biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bu durumun temel nedeni, malzemelerin yapısal sıralanmalarındaki farklılıkların malzeme özelliklerini etkileyerek onlara farklı fonksiyonlar yüklemesidir. Bu nedenle, malzemeyi oluşturan bileşenlerin türüne kıyasla, bu bileşenlerin aralarındaki hiyerarşik yapıların anlaşılması biyolojik sistemlerin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Canlılığı oluşturan dört büyük ana molekül grubu: nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar ve proteinlerdir. Proteinler, aminoasitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasıyla düz bir zincirde kovalent-peptit bağlarıyla oluşmuş polipeptitlerdir.

Proteinlerin yapılarındaki kovalent bağları, peptit bağları ve disülfid bağları oluştururken; kovalent olmayan bağlar ise hidrojen bağları, iyon bağları ve hidrofob bağlar (apolar bağlar)'dır. Disülfid bağları, İki sistein kalıntısı arasında, sülfhidril (tiyol, -SH) gruplarının H kaybetmeleri sonucu oluşan S-S bağlarıdır. Disülfid bağlarının bir protein molekülünün şeklinin oluşmasında ve korunmasında önemli etkisi vardır [14].

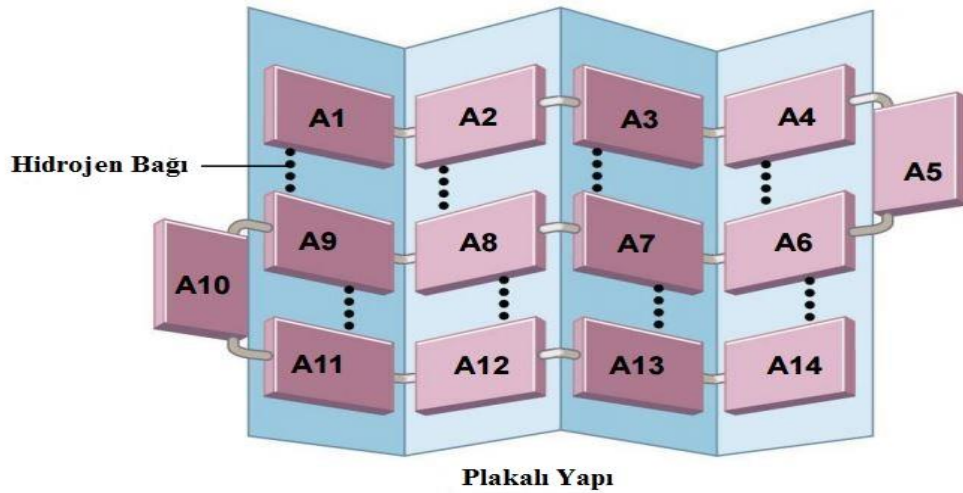
Proteinler için başlıca dört yapı düzeyi tanımlanmıştır. Bu yapı düzeyleri; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) olarak sınıflandırılmaktadır.

Bir proteini meydana getiren amino asit dizisinden oluşan polipeptit zinciri, o proteinin “birincil yapısı” olarak gösterilir (Şekil 2.1). Birincil yapıda temel olarak, 20 amino asitten oluşan özel sekansa sahip peptit rezidüsü bulunmaktadır. Her peptit rezidüde genel olarak $-NH-C_xHR-CO-$ zinciri bulunur. Bu zincirdeki radikal grup ($-R$) yapıya özel fonksiyonel karakteristiğın kazandırılmasında etkilidir.



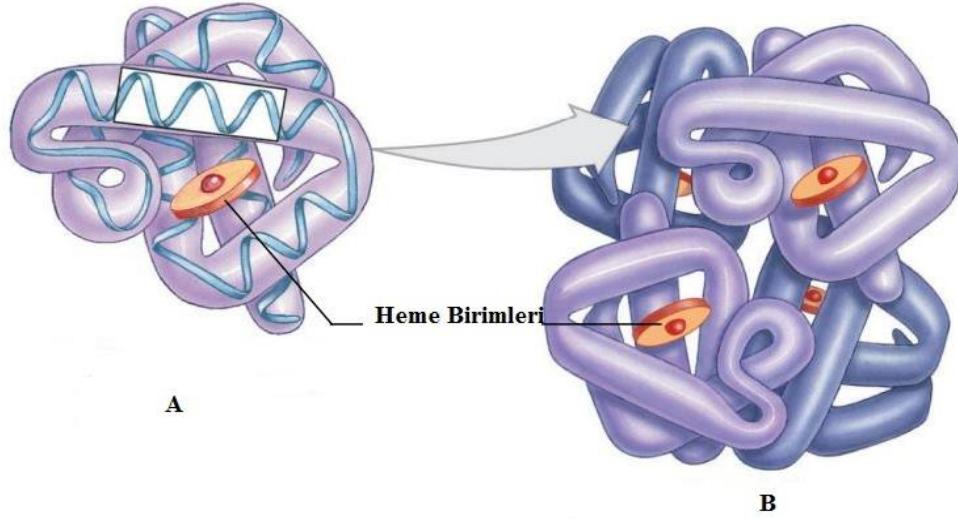
Şekil 2.1. Proteine ait birincil yapı organizasyonu gösterimi [15].

İkincil yapı bir polipeptit zincirinin, komşu amino asitlerin aralarında kurdukları hidrojen köprüleri sonucu, kazandığı yapı düzenine karşılık gelir. H köprüleri amino asitleri bağlayan polipeptit zinciri üzerinde kurularak bu yapılara kararlılık kazandırır. Bu nedenle stabilitesi en yüksek olan yapı α -sarmal proteinlerine aittir. α -sarmal proteinlerin çoğunda sarmalın bir yüzü hidrofobik iken diğer yüzü ve yan zincirler hidrofilik kalıntılarla bağlanmıştır. Proteinlerin α -sarmal yapısında, sağa dönen bir sarmal biçiminde bükülen polipeptit omurgası, hidrojen bağlarının oluşması için ortam sağlar. Buna karşın, plakalı protein yapı katlanmalar gösterir. Plakalı yapılarda, hidrojen köprüleri farklı polipeptit zincirleri arasında kurulur. İki paralel polipeptit zinciri ikincil yapı oluşturduğunda zincirlerin birbirine yaklaştığı yerlerde kükürtlü aminoasitlerin aracılığıyla disülfid bağları oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Proteine ait ikincil yapı organizasyonu gösterimi [15].

Üçüncül yapı, polipeptit zincirlerinin uzak bölümlerindeki grupların birbirleriyle kurdukları (S-S, Hidrojen, Van der Waals vb.) bağlar sonucu oluşan küresel yapı düzenidir. Genellikle küresel proteinlerde gözlemlenen bu yapı proteinlere üç boyutlu şekillerini verir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hemoglobin proteininin, (A) üçüncül ve (B) dördüncül yapı organizasyonu gösterimi [15].

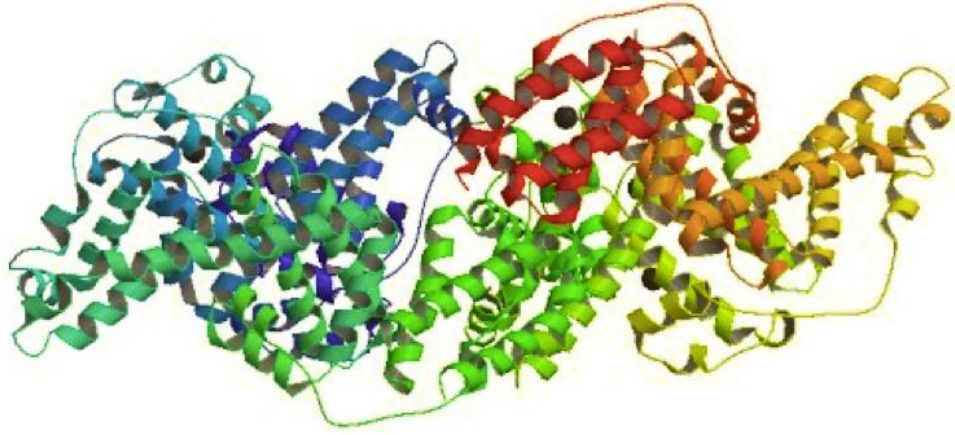
Dördüncül yapı düzeni, birden çok polipeptit zincirinden meydana gelen proteinlerde (hemoglobin, immüoglobulin vb.) görülür. Böyle proteinler, altbirim adı verilen polipeptit zincirlerinin zayıf bağlarla ya da S-S köprüleriyle birleşmesi sonucu oluşurlar. Dördüncül yapının oluşumunda moleküllerin asimetric yapıları ve altbirimlerin birbirlerini tamamlayan yüzeyleri belirleyici olur. Bu etkileşimlere bağlı olarak çok yüzeyli yapı düzenleri ortaya çıkar [16].

Geçmiş çalışmalarda, fiber ve küresel yapılı proteinlerin biyoaktif ajanlar için koruyucu olduğu gözlemlenmiş, nano boyuta indikçe gelişen mekanik özelliklerden faydalanmak için protein yapılar saf halde ya da sentetik polimerlerle kullanılarak fiber yapısında biyokompozit malzemeler üretilmiştir. Bu biyokompozitler, sahip oldukları iyileştirilmiş mekanik özellikler, biyoyumluluk ve biyofonksiyonellik gibi özellikler sayesinde biyomedikal alandan doku mühendisliğine, biyomalzeme üretiminden biosensörlere kadar pek çok alanda kullanılmaktadır [4, 10, 12, 13, 17].

2.2.1. Sığır Serum Albümin ve Yapısı

Sığır serum albümin (SSA), 17 tane molekül içi disülfid bağına sahip, yaklaşık 66.5 kDa molekül ağırlığında olan, sistein açısından zengin, küresel bir proteindir (Şekil 2.4.). Sudaki çözünürlüğünün yüksek olması (>100 mg/mL) ve çapraz bağlanmaya imkan tanınması nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda model protein olarak sıkça tercih edilmektedir. Ayrıca, biyoaktif ajanları koruyarak, bu yapıların stabilitesini arttırması sebebiyle biyosensör uygulamalarında da kullanılmaktadır [4, 17].

SSA' in yukarıda bahsedilen uygulamalarda kullanımı, genellikle sahip olduğu üçüncül yapı formunun uygun kimyasallar eşliğinde açılarak amiloidleşme sağlanması ve yeni oluşan bu yapının sabitlenmesi ile mümkündür [18]. Bu şekilde mekanik özellikleri güçlendirilmiş, doğal yapıda ve suda çözünmeyen kararlı bir biyokompozit malzeme üretmek mümkündür [3, 4, 17, 18].



Şekil 2.4. Sığır Serum Albümin [19].

2.3. Proteinlerin Denatürasyonu Mekanizması ve Amiloid Dönüşümü

Bir proteinin denatürasyonu, molekülündeki yan bağların yıkılması ile polipeptit zincirin katlarının açılması ardından farklı bir biçimde yeniden katlanması olayıdır. Bir proteinin denatürasyonu, proteinin üçüncül yapısının bozulması, ikincil ve birincil yapısının korunması biçiminde olursa tersinirdir. Buna karşın, proteinin tersiyer ve

ikincil yapısının bozulması, yalnızca birincil yapısının korunması biçiminde olursa tersinmezdir. Proteinin denatürasyonu, çoğu kez hidrojen bağlarını yıkan etkilerle olur. Denatürasyona neden olan temel etkenler: Isı, X-ışını ve UV ışınlar, ultrason, asit etkisi, alkali etkisi, organik çözücülerin etkisi, vb. olarak sıralanabilir [16]. Literatürdeki protein denatürasyonu çalışmalarında yapı, genel olarak β -ME kullanılarak açılmakta, ardından flor grubuna sahip alkoller (HFIP, TFE vb.) kullanılarak elde edilen alt form sabitlenmektedir [18]. Bu şekilde amiloid adı verilen suda çözünmeyen protein agregatlar elde edilmektedir. Dış ortamda hemen hemen bütün proteinler çevre şartları değiştirilerek amiloid oluşturabilirken, hücre içi ortamda amiloidleşme kolay gerçekleşmemektedir.

Öncül proteinin birikimi amiloid oluşumunu başlatan ilk basamaktır. Amiloid tipleri, yapı itibariyle birbirine benzese de öncül proteinleri birbirinden farklıdır. Aynı amiloid öncül proteinleri biraraya gelerek amiloid fibrillerini oluşturur. Bu sebeple fibrillerin kütlece büyük kısmını amiloid öncülü proteinler oluşturur dolayısıyla; farklı amiloid tiplerinin içerdiği proteinler birbirinden farklıdır [21].

Amiloid öncülü proteinlerin konsantrasyonu arttığında veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki bir mutasyon ya da polimorfizm sonucunda sentezlenen öncül proteinlerin proteazlar tarafından yeterince yıkılmaması sonucunda amiloid yapısını oluşturacak olan amiloid proteinleri meydana gelmektedir. Bu proteinler kararsız yapıda olup, çevresel faktörlerin etkisiyle (sıcaklık, pH, metal iyonları, okside edici ajanlar gibi) beta tabakası yapısı kazanmaktadır [21].

Alzheimer, Parkinson, şeker hastalığı gibi birçok önemli hastalığın oluşma sebebinin öncül proteinlerin birikimi olduğu düşünülse de bu oluşum mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Gerek bu mekanizmayı araştırmak gerekse biyoteknolojik uygulamaların birçok alanında bu proteinler hücre dışı ortamda yapay olarak üretilmektedir [22]. Örneğin, elektro-eğirme (forced assembly) yöntemi kullanılarak üretilen fiber formdaki amiloid protein membranlar, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve gelişmiş mekanik özelliklere sahip olmaları nedeniyle biyolojik tabanlı çalışmalara uygunluk göstermektedir.

2.4. Elektro-eğirme Yöntemi

Elektro-eğirme yöntemi nano seviyeden mikro seviyeye nanolif üretimi yapmayı sağlayan bir yöntemdir. Günümüzde, nanolif elde etmek için kullanılan üretim yöntemleri; fibrilasyon, meltblown, bikomponent ve elektro-eğirme sistemleridir. Geleneksel polimer lif üretimi; eriyikten çekim, çözülden çekim ve jel halinden lif üretimi işlemlerini kapsar. Bu metotların ortak özelliği, mekanik bir şekilde eriyik polimeri ya da çözeltiyi düselerden geçirip, daha sonra çekme işlemine tabi tutarak lif elde etmektir [23].

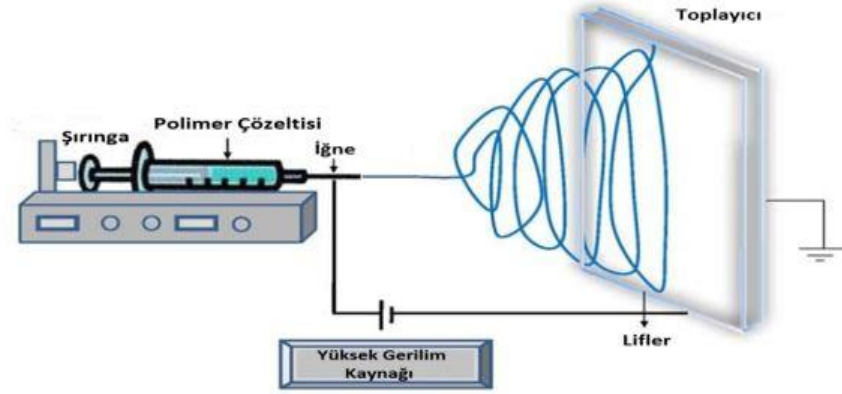
Geleneksel eğirme işlemlerinden farklı olarak, elektro-eğirme yönteminde polimer çözümleri elektrik alan kuvvetleri etkisinde jet oluşturma prensibine dayanır. Bu yöntemde temel olarak, yüksek voltaja maruz bırakılan polimer çözeltisi benzer yükler ile yüklenecek elektrik alanda ayrışma ve incelme gösterip, çok ince lif yapılar oluşturur.

Elektro-eğirme (electrospinning) yöntemi; elektro-püskürtme (spray) ve eğirme tekniklerinin birleşiminden oluşan bir teknik olarak düşünülebilir. Bir boyutlu nano yapıların (nano lif, nano çubuk, nano tüp vb.) eldesi için “yukarıdan aşağıya” (top-down) yaklaşımına sahip metotların içinde en etkili olanı elektro-eğirme yöntemidir. Nano boyutun etkisi; yüksek yüzey enerjisi, mekanik dayanım, yüksek mukavemet, yüksek termal ve elektriksel iletkenlik olarak kendini gösterir. Fiber çapları 100 nm’ nin altına indikçe nanofiberlerin elastik modülü ve mekanik güçleri artmaktadır [24].

Elektro-eğirme yönteminin önemli avantajları: yüksek yüzey alanına/hacim oranına ve nanometre mertebesinde çapa sahip çok ince fiber yapı elde edebilmek, işlem sırasında kolaylık sağlamak, hazırlanacak membrana işlevsellik ve mekaniksel gelişim sağlama olarak sıralanabilir. Birçok malzemenin elektro-eğirme işlemine tabi tutulabilmesi, son yıllarda bu yöntemle sentezlenen iskelelerin, doku mühendisliği, yara iyileşmesi, kemik yenilenmesi ve in vivo bölgesel ilaç salımı gibi alanlardaki potansiyel kullanım alanlarının genişliği nedeniyle tercih edilmesini sağlamıştır [23].

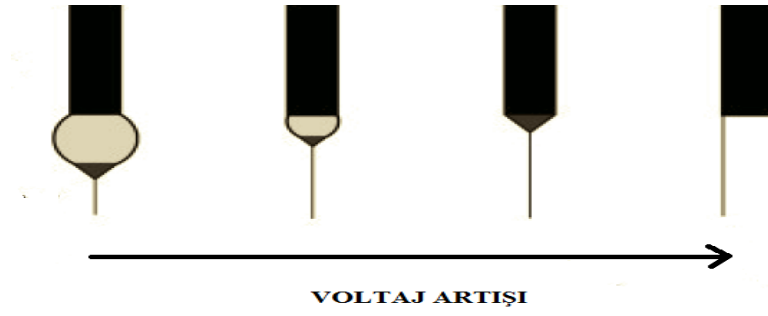
2.4.1. Elektro-Eğirme Sisteminin Çalışma Prensibi

Elektro-eğirme sistemi (Şekil 2.5) basit bir kurulumla sahiptir: şırınga içerisine polimer çözeltisi doldurulur pompaya bağlanır ve şırıngadan belirli bir mesafe uzaklığa toplayıcı iletken plaka yerleştirilir. Yüksek gerilim sağlayacak doğru akım güç kaynağının pozitif kutbu şırınganın metal iğnesine bağlanır, negatif kutup ise toplayıcı levhaya bağlanır ya da toplayıcı levha topraklanır. Güç kaynağı eşliğinde iğne ucu-toplayıcı arasına yüksek gerilim uygulanır.

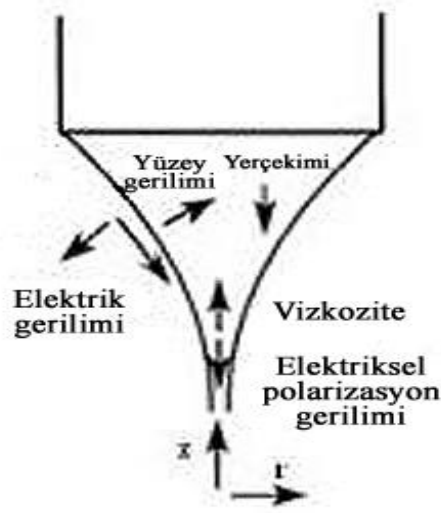


Şekil 2.5. Basit Elektro-eğirme düzeneği

Kritik voltaj değerine ulaşıldığında, elektriksel olarak yüklenmiş olan çözelti jet sisteme uygulanan akış hızı ve voltaj etkisinde toplayıcıya doğru hareket eder. Elektriksel itme kuvvetleri yüzey gerilimini yenmeden hemen önce damlacığın ucunda oluşan şekle “Taylor Konisi” denir. Bu yapı oluşuktan sonra elektrik alanın kritik seviyede artırılmasıyla elektriksel itme kuvvetleri yüzey gerilimini yener ve jet koni oluşur. Voltaj daha fazla arttırıldığında, polimer jet bir müddet düz bir çizgide ilerledikten sonra kırılır ve halkalı bir spiral yol izler. Elektriksel kuvvetler jeti uzatarak çok ince bir lif haline getirir (Şekil 2.6). Bu yol boyunca çözücü buharlaşır ve toplayıcı üzerinde liflerin birikimi gözlemlenir [23, 26]. Elektro-eğirme işlemi sırasında, damlaya etki eden kuvvetler Şekil 2.7.’ da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Taylor konisinin voltaj artışına bağlı değişimi



Şekil 2.7. Şırınga ucunda damlaya etki eden kuvvetler [25].

Elektro-eğirme işleminin doğru şekilde gerçekleştirilebilmesi bazı önemli noktalar;

- Polimeri çözmek için uygun çözücü seçimi,
- Uygun çözelti viskozitesi ve yüzey gerilimi,
- Polimer çözeltinin viskozitesi ve yüzey gerilimini yenecek büyüklükte voltaj uygulaması,
- Çözücünün buharlaşması için uygun mesafe

olarak sıralanabilir.

2.4.2. Taylor Konisinin Oluşumu ve Jette Oluşan Kararsızlıklar

Elde edilen fiberlerin çapı ve yapısı çözelti, sistem ve ortam parametrelerine bağlı olarak değişmektedir. Bahsedilen bu parametrelerden bazıları, bu süreç için kritik öneme sahiptir. Örneğin, metal uca bağlanan elektrot, sisteme yüksek gerilim uygulandığında şırınganın içerisindeki polimer çözelti atomlarını polarize eder. Sistemdeki gerilim arttırıldığında çözültideki polarize olmuş yükler birbirini iterek yüzey gerilimini yenmeye çalışır. Belli bir elektrik alan değerinden sonra (5-30 kV) yüzey gerilimiyle elektriksel kuvvet birbirini dengeler ve bu sırada Taylor konisi oluşur. Gerilimin bu kritik noktadan sonra daha fazla arttırılması, jetin hızlanmasını sağlar [28].

Jet iğne ucundan çıktığı anda kararsızdır ve bu kararsızlık jetin hedef levhaya ulaşana kadar uzamasını ve incelmesini sağlar (Şekil 2.8) [29].



Şekil 2.8. Gerilim artışının jet üzerindeki etkisi

Elektro-eğirme sistemi hakkında yapılan birçok çalışmada, çözelti ve sistem parametrelerinin iyileştirilmesinin önemi vurgulanmaktadır. Bu parametrelerin iyileştirilmesi durumunda, üretilmesi düşünülen malzemeye ait özelliklerin kontrolü sağlanabilir.

2.4.3. Elektro-Eğirme İşlem Parametreleri

2.4.3.1. Voltaj

Voltaj kaynağı sisteme sağladığı elektriksel kuvvet etkisinde çözeltideki yükleri indükler ayrıca çözeltilerin eğilmesi için gerekli elektrik alanı yaratır. Uygulanan voltaj miktarının iyileştirilmesi, fiber çapının istenilen boyutta ayarlanması açısından oldukça önemlidir. Genellikle 5 kV' tan büyük negatif veya pozitif voltaj, iğne ucundaki damlacığın Taylor konisi oluşturması için gereklidir. Taylor konisinin kararlı olarak elde edilmesi için akış hızının ve voltajın iyi ayarlanması gerekir [29].

Eğer sisteme uygulanan voltaj fazla yüksek olursa çözeltili yükü ve elektrik alan kuvvetleri artacağından, toplayıcıya daha fazla hacimde çözeltili taşınır. Bu şekilde jet büyüyeceği için lif çapının da artması beklenir [30].

2.4.3.2. Akış Hızı

Sabit Taylor konisi elde etmek için akış hızı çok önemlidir. Akış hızı arttıkça iğne ucunda toplanan damlacık boyutu da artacağı için elde edilen fiberlerin çapı ve boncukların boyutu artar [30, 33].

Damlacık boyutu artınca yol boyunca taşınan çözücü miktarı da artar dolayısıyla çözücünün buharlaşması için daha çok zaman gerekir. Başka bir deyişle düşük besleme oranı çözücünün buharlaşması için önemlidir. Akış hızı ve voltaj birbiriyle çok ilintili iki parametredir. Bu nedenle sistem parametrelerinin iyileştirilmesi yapılırken bu durum göz önünde tutulmalıdır.

2.4.3.3. Sıcaklık

Sıcaklık çözücünün buharlaşma oranını arttırırken çözeltili viskozitesini düşürür. Daha düzenli küçük çaplı fiberler elde edilir ancak çözeltiliye enzimler ve proteinler gibi biyomoleküller eklenmesi durumunda yüksek sıcaklıkta bu yapıların bozulması işlemin olumsuz etkilenmesine neden olur. Bu nedenle canlı yapılar kullanılarak hazırlanmış çözeltiler kullanılırken, yapının bozulmasını engellemek için düşük sıcaklık uygulanmalı, çözücünün buharlaşmasını sağlamak için bu yapılar buharlaşma

noktası düşük çözücülerde çözülmelidir [33].

2.4.3.4. Toplayıcının Etkisi

Elektro-eğirme işleminin gerçekleşmesi için iğne ucu-toplayıcı arasında elektrik alan oluşması istenir, bu sebeple toplayıcı levha alüminyum gibi iletken malzemelerden seçilir. Ayrıca, iletken levha topraklanarak daha kararlı potansiyel fark meydana gelmesi sağlanır.

Eğer toplayıcı yüzey olarak yalıtkan kullanılıyorsa, bu yalıtkan malzeme iletken levhanın yerleştirilir. Elektro-eğirme sırasında fiberler toplayıcı üzerine hızla yüklerini bırakırlar, yalıtkan toplayıcıda topraklama olmayacağı için biriken yüklerin itme kuvveti neticesinde fiberler üst üste birikemez ve toplayıcı yüzeyde daha seyrek birikirler [32, 33].

Sadece toplayıcının iletkenliği değil, toplayıcının şekli ve hareketli olup olmaması da fiber karakteristiğini etkiler. Buna ek olarak, daha düzenli dizilime sahip lifler elde etmek için yardımcı elektrik alan ya da manyetik alan kaynakları da kullanılabilir.

2.4.3.5. İğne Çapı

Küçük iç çapa sahip iğneler, tıkanmayı azalttığı gibi fiberlerdeki olası boncuklaşma miktarını da düşürür. Bu şekilde iğne ucunda daha küçük damla oluşacağı için yüzey gerilimi artar, dolayısıyla sisteme voltaj uygulandığında oluşan jet, büyük iğne çaplı sisteme kıyasla daha az hızlanır. Jetin uzaması ve incelmesi için gerekli uçuş zamanı artacağı için daha ince ve boncuksuz fiberler elde edilebilir [33].

2.4.3.6. Toplayıcı ve İğne Ucu Arası Mesafe

Toplayıcı ve iğne ucu arasındaki mesafe azaltıldığında, jetin izlediği yol kılalacağı için çözücün buharlaşması için gereken uçuş zamanı azalır. Mesafe, elektrik alan kuvveti ile ters orantılı olarak değiştiği için, sonuç olarak kısa mesafelerde jetin uzamasını sağlayan elektrik alan kuvvetleri azalır ve fiber çapı artar [29, 33]. İğne ucu-toplayıcı arası mesafe, çözeltilinin viskozitesi ve çözücü özellikleri de dikkate alınarak ayarlanmalıdır.

2.4.4. Elektro-Eğirme İşleminde Kullanılan Polimer Çözeltisine ait Parametreler

2.4.4.1. Moleküler Ağırlık ve Çözelti Viskozitesi

Polimerin moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu, hazırlanan çözeltinin viskozitesini etkilemektedir. Polimerin moleküler ağırlığı büyükse yani polimer zincirleri uzunsu çözeltinin viskozitesi de yüksektir. Elektro-eğirme işlemi sırasında polimer çözeltisinin gerilmesi ve incilmesi sonucu fiber yapı oluşur. Polimer zincirlerinin birbirlerine dolanması sayesinde elektriksel olarak gerilen jet kırılmadan, düzgün fiber yapı oluşumunu sağlar. Bu nedenle elektro-eğirme işleminde monomer çözeltileri kullanmak elverişli değildir ve eğirme yüksek moleküler ağırlıklı polimer çözeltileri kullanılır.

Viskozitesi düşük çözeltiler ile fiber yapı elde etmek güç olduğu gibi, viskozitesi çok yüksek olan çözeltilerin de eğirme işlemi başlayamadan iğne ucunda çözeltinin kuruması ve sürekli bir eğirme işlemi gözlenememesi gibi dezavantajları vardır [30].

Çoklu jet oluşmadığı sürece fiber çapı en çok çözelti viskozitesine bağlıdır. Çözeltinin konsantrasyonu artarsa viskozitesi artar. Viskozitesi yüksek çözeltiler bükülme kararsızlıklarına daha fazla karşı koydukları için toplayıcı üzerinde fiberlerin daha küçük bir alanda biriktikleri görülmüştür, bu durum jetin fazla incelememesini ve fiber çaplarının daha büyük olmasını açıklar [29].

2.4.4.2. Yüzey Gerilimi

Yüzey gerilimi yüzey alanını düşürme eğilimindedir, bunu da damlacık oluşturarak gerçekleştirir. Bu amaçla, hazırlanacak çözeltilere etanol gibi düşük yüzey gerilimine sahip çözücüler eklenerek düzgün fiber elde edilebilir [34].

2.4.4.3. Çözelti İletkenliği

Elektro-eğirme işleminde damla yüzeyinde toplanan yüklerin itme kuvveti ile polimer çözeltisi gerilir. Eğer çözelti tamamen gerilmezse, boncuk formu oluşur. Bu nedenle, çözeltilere az miktarda tuz ya da polielektrolit eklenerek çözeltinin taşıdığı yük

arttırılabilir. Bu şekilde çözelti daha fazla gerilir, daha ince ve boncuksuz fiber yapı oluşumu gerçekleşir [30]. Çözelti iletkenliği arttıkça jet çapı da küçüleceği için bükülme kararsızlığı artar. Dolayısıyla fiberler daha geniş bir alanda toplanır.

2.4.4.4. Çözücünün Dielektrik Etkisi

Elektro-eğirme işleminde jete etki eden bükülme kararsızlıkları çözeltinin artan dielektrik sabiti ile artar.

2.4.5. Elektro-Eğirme İşlemini Etkileyen Çevresel Faktörler

2.4.5.1. Nem

Ortamdaki nem, çözeltideki çözücünün buharlaşma oranını belirler. Nem oranı çok düşük olduğu zaman, uçucu olan çözücü çok çabuk buharlaşacaktır. Hatta çözücü iğne ucundayken buharlaşabilir ve elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilemeden iğne tıkanabilir.

2.4.5.2. Atmosfer Çeşidi

Farklı gazlar yüksek elektrik alan altında farklı davranış göstereceği için hava yerine farklı gazların kullanıldığı ortam elektro-eğirme işlemi etkileyecektir.

2.4.5.3. Basınç

Ortam basıncı atmosfer basıncının altında olduğunda sıvının akmaya karşı direnci azalır, bu durum oluşan jette kararsızlıklara sebep olur. Viskozitesi düşük çözeltiler için düşük basınçta elektro-eğirme gerçekleşmeyebilir. Ancak viskozitesi yüksek çözeltilerle çalışırken vakum altında elektro-eğirme gerçekleştirilebilir [32].

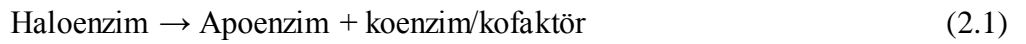
2.5. Enzim ve Yapısı

Kendisi parçalanmadan veya değişikliğe uğramadan kimyasal reaksiyonu katalizleyen protein moleküllerine enzim denir. Tüm enzim molekülleri genel olarak proteinlerin karakteristiği olan birincil, ikincil ve tersiyer yapılara sahiptir. Bu yapılar, altbirim (protomer) gruplarının bir araya gelmesiyle oluşur. Enzimlerin katalitik aktivitesi gibi

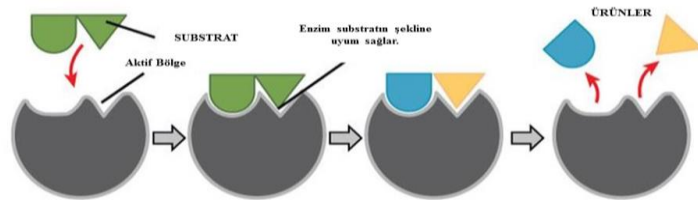
biyolojik aktiviteleri sıklıkla oligomerik molekülünün bir özelliğidir, dolayısıyla altbirimlerin (protomerler) varlığı enzimin aktivitesini etkiler.

Aktivite, enzimin birim zaman başına dönüştürdüğü substrat mol sayısının ifadesidir. Enzim yapısındaki herhangi bir bozulma enzim yapısında aktivite kaybının gerçekleşmesine sebep olur. Eğer denatürasyon çok ilerlememişse tıpkı proteinlerde bahsedildiği şekilde (Bölüm 2.3), denatüre edici etkenin uzaklaştırılmasıyla aktivite geri döner. Uzamış veya ileri derecedeki denatüre edici koşullarsa aktivitede geri dönüşümsüz bir kayba sebep olur [16, 35].

Bazı enzimler yalnız proteinden oluşmuştur. Fakat çoğunluğunda yapı ve görev bakımından farklı olan “apoenzim” ve “koenzim/kofaktör” olarak adlandırılan iki ayrı grup bulunur. Apoenzim kısmı, enzimin özgünlüğünü yani sadece katalizleyeceği reaksiyonu belirleyen kısımdır ve protein yapısındadır. Isı ile kolayca yapısı bozulur. Koenzim ise enzimin yardımcı ve apoenzime bağlandığı durumda onu etkinleştiren kısımdır. Yapısı, organik ya da inorganik maddelerden meydana gelmiştir. En önemli yardımcı enzimler vitaminlerdir. Apoenzim ile koenzimin birlikte oluşturduğu gruba tam enzim anlamına gelen haloenzim (aktif enzim) denir (Denklem 2.1).



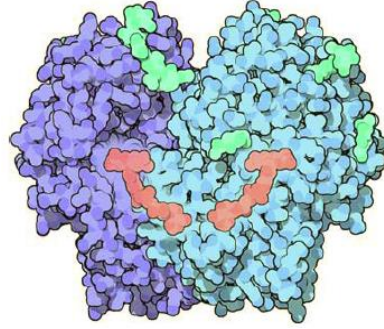
Enzimler genellikle renksizdir ve suda çözülür. Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise ürün adı verilir. Enzim-substrat ilişkisi anahtar ile kilidin uyumuna benzer. Enzim molekülündeki aktif bölge substratına geçici olarak bağlanmasını ve enzim-substrat bileşiğinin oluşumunu sağlar (Şekil 2.9). Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere dönüşür. Enzim ise reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar tekrar kullanılabilir.



Şekil 2.9. Enzim-substrat ilişkisinin şematik gösterimi

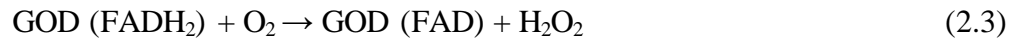
2.6.1. Glikoz Oksidaz

Glikoz oksidaz (GOD), yaklaşık 65 kDa molekül ağırlığına sahip alt birimlerin ve iki özdeş FAD koenziminin oluşturduğu kararlı yapıda bir glikoproteindir. Bazı mantarlar ve böceklerden doğal olarak üretilir ve substratın glikozla tepkimesi sonucunda oluşturduğu katalitik ürün sayesinde elektrokimyasal olarak aktiftir. Sahip olduğu aktivite özelliği nedeniyle, glikoz sensörleri, yakıt hücreleri ve fonksiyonel membranlar gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Şekil 2.10 da küf mantarından (*Aspergillus Niger*) elde edilen glikoz oksidaz enzimi, karbonhidrat zincirleri yeşil, enzim mavi, FAD koenzimler ise pembe renkte olacak şekilde gösterilmektedir.



Şekil 2.10. Glikoz oksidaz [19].

Glikoz oksidaz enzimi (GOD), moleküler oksijen (O_2) varlığında, aşağıdaki reaksiyona göre glikozun glikonik asite dönüşümünü katalizler:



Glikoz oksidaz enziminin substratla tepkimeye girebilmesi, FAD (flavin adenin dinükleotit) koenzimi varlığında gerçekleşir. FAD, elektron akseptörü olarak davranarak glikozun yükseltgenmesini sağlar. Daha sonra moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen perokside dönüştürür, kendisi de okside haline geri döner.

Amperometrik glikoz tayini, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin (H_2O_2) sabit potansiyelde yükseltgenmesi sonucunda oluşan anodik akımın

ölçülmesine dayanılarak yapılmaktadır [39].



Glikoz miktarı, oluşan hidrojen peroksitle orantılı olduğu için ölçülen anodik akımdan glikoz derişimi bulunur.

2.5. Enzim Aktivitesi ve Ölçümü

Enzim aktivitesi, enzimin belli koşullarda sahip olduğu aktif enzim miktarının bir ölçüsüdür ve birim zamanda değişime veya dönüşüme uğratılan substrat miktarının mol sayısı cinsinden ifade edilir.

Enzim aktivite tayininde kullanılan yöntemler;

- Spektrofotometrik yöntemler
- Fluorimetrik yöntemler
- Lüminesans yöntemler
- İmmunokimyasal yöntemler
- İyon selektif ve oksijen selektif elektronlar
- Radyometrik yöntemler
- Kalorimetrik ve manometrik teknikler olarak sınıflandırılabilir [36].

Ayrıca, enzimlerin biyokompozit membran halinde üretildiği durumlarda, biyolojik hassasiyete sahip bileşenler, elektrotlara adapte edilerek sinyal üretebilecek hale getirilebilir. Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir. Bu şekilde, yukarıda bahsedilen tüm bu yöntemlere alternatif olarak biyosensörlerin altbasamağı olan elektrokimyasal ölçüm yöntemleri kullanılarak biyokompozit yapıdaki yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin miktarına bağlı olarak değişen akım belirlenebilir ve bu şekilde membranların aktivitesi hesaplanabilir [4, 17, 37].

2.5.1. Amperometrik Ölçüm Yöntemi

Genellikle biyosensör uygulamalarına yönelik kullanılan bu yöntem, sabit voltaj uygulanan sistemin verdiği cevabı akım cinsinden ölçüm prensibiyle çalışır. Elektrokimyasal olarak gerçekleşen bu işlemde okunan akım, çalışma elektrotunda

yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır. En büyük dezavantajı dolaylı ölçüm olan bu sistemlerin, yüksek hassasiyetleriyle bu dezavantajları telafi edilir.

2.6. Yüzey Analiz Teknikleri

Herhangi bir katı materyalin fiziksel ve kimyasal yüzey özelliklerinin belirlenmesi, bu materyalin kullanılacağı uygulamalar için uygunluğunun belirlenmesinde önemli bir basamaktır. Malzemelerin yüzey kimyasal yapıları genellikle spektroskopik teknikler ile tanımlanır. Bu tekniklerde enerji yüklü tanecikler örnek yüzeyine yönlendirilir ve malzemedeki emisyonu incelenir. Tam bir yüzey karakterizasyonu için ihtiyaç duyulan bilginin derlenmesi birçok tekniğin birlikte kullanılmasını gerektirmektedir

2.6.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR, düşük enerjili kızıl ötesi (IR) bölgedeki ışınların kullanıldığı absorpsiyon spektroskopisidir. IR tekniğinde, moleküllerdeki kimyasal bağların titreme, eğilme, bükülme, sallanma vb. tüm hareketleri için gerekli olan enerji, IR ışınların elektromanyetik enerjisinden absorplanır.

Elektromanyetik spektrum, kızıl ötesi bölge 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} aralığında olup bu bölge; yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR) $4000\sim 14000\text{ cm}^{-1}$, orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR) $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR) $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$ olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. Moleküllerdeki titreşim frekanslarına uyan IR ışınların dalga sayıları $4000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ arasında, yani yaklaşık $15\text{ }\mu\text{m}$ ile $2.5\text{ }\mu\text{m}$ dalgaboyu aralığında değişmektedir.

Spektrofotometrelerin kullanımında, monokromatörler yardımıyla dalgaboyları seçilerek herhangi bir anda sadece seçilen dalgaboyundaki spektroskopik bilgi toplanır. FTIR spektroskopisinde ise monokromatör bulunmaz, tüm frekanslardaki bilgiler aynı anda toplanabilir ve spektrumları frekans ölçeğinde değil zaman ölçeğinde elde edilir. Elde edilen veri bilgisayar aracılığıyla matematiksel “ters fourier

dönüşümü” metodu uygulanarak frekans ölçeğindeki bilgilere dönüştürülür. Bu yöntemle veri zaman boyutundan frekans boyutuna geçirilir ve farklı frekanslardaki absorpsiyonlar grafiğe dökülür. Interferogram denilen bu spektrum, absorpsiyon spektrumunun fourier dönüşümüdür. Burada ölçülen absorpsiyon/transmitanslar pikler ile ifade edilir. Kimyasal bağlar (C-H, C-C gibi) aynı miktarda aynı şekilde enerji absorblamadıkları için elde edilen pikler, molekül içindeki fonksiyonel grupları tanımlar. Pikler yapılarına bağlı olarak kuvvetli, orta ve zayıf, şekillerine bağlı olarak geniş, orta ve dar olarak tanımlanır. IR spektrumları, piklerin bulunduğu yere, yapılarına ve şekillerine göre irdelenerek numunelerde malzeme cinsi tayin edilir. Ölçülen absorpsiyon, konsantrasyona ve numune kalınlığına doğrudan bağlıdır. Pik boyu ve pik alanı ölçülerek standartlar ile karşılaştırmak suretiyle miktar tayini de yapılabilir.

Özellikle biyolojik molekül çalışmalarında bu tekniğin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Örneğin; proteinlerin ikincil yapı düzeyi ve absorpsiyon frekans bantları arasındaki ilişki kullanılarak yapısal bileşenler kolayca belirlenmektedir [40].

2.6.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Taramalı elektron mikroskop, yüzey davranışlarının daha iyi anlaşılabilmesi için morfolojik ve topografik bilgi veren yüzey analiz yöntemlerinden biridir. SEM tekniğinde örnek, elektron demetleriyle bombardıman edilir. Elektronların dalga boylarının kısa olması nedeniyle optik mikroskoba göre daha iyi çözünürlük elde edilir.

Elektronların örnek içerisinden geçebilmesi için örneğin iletken olması gerekmektedir. Analizi yapılacak örneğin yalıtkan olması durumunda yüzeye özel yöntemlerle altın püskürtülerek ince bir iletken film oluşturulur.

SEM analizinde elektron tabancasında bulunan filamentten yayılan elektron demeti örneğe doğru hızlandırılır ve çeşitli yoğunlaştırıcı manyetik lensler yardımıyla odaklanır. Odaklanan elektron demeti örnek üzerinde bir noktaya çarptığında örnek yüzeyindeki atomlarla elektron demetindeki elektronlar arasında birçok çarpışma meydana gelir. Bu çarpışmaların sonucu olarak örnek yüzeyinde en dışta bulunan

atomların elektronları kopar. İkincil elektronlar da denen bu elektronların kinetik enerjileri göreceli olarak daha azdır ve kolaylıkla bir dedektör tarafından çekilebilirler. Bu noktasal alandan yayılan elektronlar dedektörde sayılarak bilgisayarda nokta olarak kaydedilirler. Örneğin büyütülmüş görüntüsü küçük bir alanın elektron demeti ile taranarak her noktadan çıkan elektronların belirlenip ekran üzerinde işlenmesiyle oluşur. Hem örneğin topografisi hem de atom numaraları örnekten yayımlanan ikincil elektronların sayısını etkiler ve bu faktörler oluşan görüntüde yansıtılır. Sonuç olarak elde edilen görüntüde tıpkı olağan fotoğraflardaki gibi gölge ve perspektif oluşur [41].

2.6.3. Optik (Işık) Mikroskobu

Mikroskop, çeşitli merceklerin kullanılması ve bu merceklerin düzenlenmesi ile objelerin görüntülerinin büyütülmesine olanak veren ve biyolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir alettir. Mikroskobun bir diğer önemli işlevi, objelerin büyütülmesini sağlarken, dereceli bir şekilde büyütülen objelerin çözünürlüğünü veya netliğini de artırmaktadır. Dolayısıyla, mikroskop objelerin büyütülmesi ve aynı anda dereceli bir şekilde objelerin çözünürlüğünü arttırmaktadır.

Görüntü büyütülmesi ve çözünürlük es zamanlı düşünülmesi gereken iki olaydır. Mikroskoplarda, çözünürlük ve görüntü büyütülmesi, ışık ve mikroskop lensleri ile sağlanmaktadır. Lensler, kullanılan ışığı çeşitli amaçlar için yönlendirmemizi sağlamaktadır. Görüntü büyütülmesi, sanıldığı gibi aksine, çözünürlük ile bire bir ilişkili değildir.

Temel olarak biyolojik örneklerin görüntülenmesinde kullanılan ışık mikroskobu, yeni nesil cihazlarda sağlanan bilgisayar desteği ile örnekleri görüntülemenin yanı sıra, bu yapıların ayrıntılı analizlerini yapmaya da olanak tanımaktadır.

3. DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın temel amacı, biyomalzeme araştırmalarında kullanılmak üzere, yeni ve biyolojik olarak aktif yapıya sahip, diğer bir deyişle “doğal ve fonksiyonel” özellikleri olan yapıların üretiminin gerçekleştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda, doğal taşıyıcı yapı olarak “amiloid protein” ve aktif biyolojik ajan olarak “enzim” in kullanıldığı keçe lif (non-woven) yapısında membranlar elektro-eğirme tekniği kullanılarak “nano” ölçekte fiberlerin rastgele yığını olarak üretilmiştir.

Çalışmanın basamakları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Elektro-eğirme sisteminin kurulumuna yönelik yapılan ön çalışmalar,
- Nanolif üretiminde kullanılacak olan çözelti ve işlem parametrelerinin belirlenmesi, liflerin karakterizasyonu ve sonuçların iyileştirilmesine yönelik ön çalışmalar,
- Protein-enzim çözeltilerinin hazırlanması ve amiloid dönüşümü için gerekli parametrelerin belirlenmesi,
- Elektro-eğirme işlemi kullanılarak protein-enzim tabanlı biyokatalitik membranların üretilmesi ve işlem parametrelerinin iyileştirilmesi,
- Biyokatalitik membranlara ait fiziksel ve kimyasal karakterizasyonların gerçekleştirilmesi,
- Biyokatalitik membranlardaki enzimatik aktivitenin elektrokimyasal yöntemle tayin edilmesi,

olarak 6 ana başlık halinde kurgulanmıştır.

Bu doğrultuda, geçmiş dönemlerdeki araştırmalarımızda kullandığımız ve fiber üretimi açısından en yüksek performansı elde ettiğimiz elektro-eğirme düzeneği hazırlanarak, ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda ağırlıklı olarak saf protein kullanılmış ve fiber oluşumu için parametre taraması düzeneğin şekli, akış hızı, uygulanan voltaj ve iğne ucu toplayıcı arası mesafe gibi değişkenler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, saf protein tabanlı fiber oluşumunun gözlendiği şartlar, enzim katkılı biyokatalitik membran üretimine yönelik araştırmaların temelini

oluşturmuştur. Farklı parametrelere göre üretilen membranlar fiziksel ve kimyasal açıdan karakterize edilmiş ve seçilen membranlardaki enzimatif aktivitenin gözlemlenmesi için gereken standardizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda hazırlanan membranlardaki enzim aktivitesi, amperometrik olarak tayin edilmiş ve sonuçlar enzim aktivitesi cinsinden ifade edilmiştir.

Bu çalışmaların detayları ileriki bölümlerde sunulmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.



3.1. Gereçler

Elektro-eğirme işleminde kullanılan, Glikoz oksidaz (GOD) (Asp. Niger, özgün aktivite: 109 U/mg), Beta Merkaptotanol (β -ME), Kongo kırmızı boyası (Congo Red), ve 2,2,2 Trifluoroetanol (TFE) Sigma (ABD) firmasından temin edilmiş ve doğrudan kullanılmıştır. Aynı firmadan temin edilen D-(+) Glikoz, PBS (pH 7,4) içerisinde farklı molaritelerde stok çözelti şeklinde hazırlanmış ve amperometrik ölçümlerde kullanmak üzere +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Belirtilen çözeltiler kullanımdan önce 8 saat oda sıcaklığında (25 °C) bırakılmıştır. Tampon çözeltisi hazırlamak için kullanılan diğer tüm kimyasallar (NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) ve sığır serum albümin (SSA) (M_a ≈ 66000 Da) Acros Organics (ABD)' den temin edilmiştir.

3.1.1. Elektrokimyasal Ölçüm Düzenegi

Oksidaz bazlı enzimlerin aktivite ölçümlerinde genel olarak amperometrik yöntem tercih edilmektedir. Bu amaçla, DropSens (μ Stat 200, İspanya) cihazı ve bu cihazla uyumlu AgCl elektrotlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Elektrokimyasal ölçüm sırasında kullanılan cihazlar ve özellikleri

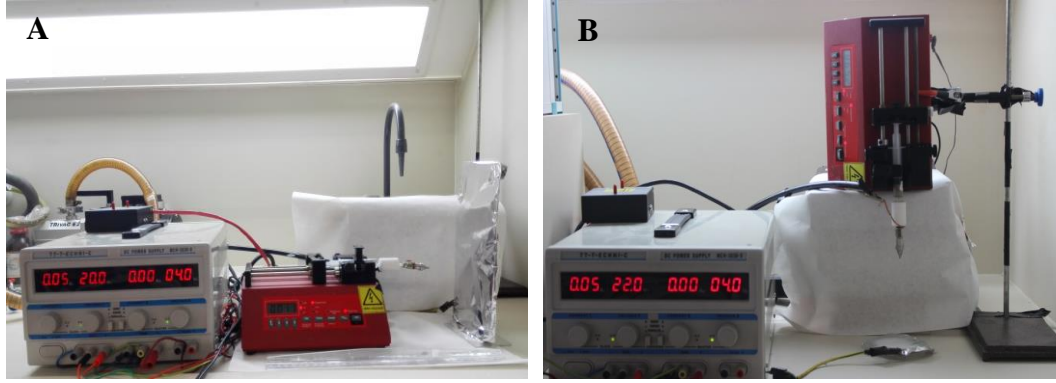
Kullanılan Cihazlar	Özellikleri
 Screen-Printed Elektrot	Çalışma elektrodu altın, referans elektrodu ve elektrik kontakları gümüş. 50 µL hacimde ölçüme uygun
 Potensiyostat/Galvanostat MicroStat 400	Voltametrik, Amperometrik veya potansiyometrik ölçümlerde kullanılabilme özelliği. DropView Software ile deneylerin takibi ve kontrolü. Boyutlar: 12.5 x 9.5 x 4.0 cm (Uzunluk x genişlik x yükseklik) Akım ölçüm aralığı: ±1nA ile ±10mA arası

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ön Çalışmalar

3.2.1.1. Elektro-Eğirme Sisteminin Kurulumu

Elektro-eğirme sistemi düzeneğinde toplayıcı olarak, standardizasyonu sağlama amaçlı 10 x 10 cm² alanında kesilen alüminyum folyo yüzeyler kullanılmıştır. Güç kaynağından çıkan pozitif elektrot (katot) şırınga iğnesine, topraklanan diğer elektrot (anot) ise toplayıcı levhaya bağlanmıştır. Pompa, yatay ve dikey olacak konumda destek üzerine kısaç yardımıyla sabitlenerek istenilen pozisyon verilmiştir. Şekil 2.1’ de düzeneğin yatay ve düşey kurulumları sonrası görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Elektro-eğirme düzeneğinin kurulumu, A) yatay, B) düşey sistem düzeneği

3.2.1.2 Nanolif Üretimi

Saf protein kullanarak hazırlanması amaçlanan elektro-eğrilmiş membranların alt yapısını oluşturan protein çözeltilerinin hazırlanması, elektro-eğirme işleminin parametreleri ve hazırlanan membranların karakterizasyonu ile ilgili gerçekleştirilen ön çalışmalara ait bilgiler aşağıda sırasıyla sunulmuştur.

3.2.1.2.1. Protein çözeltisinin hazırlanması

Biyomoleküllerle yapılan çalışmalarda toksik etki yaratmaması açısından tercih edilen izotonik fosfat (PBS) tamponu, pH 7,4 olacak şekilde, distile su içerisinde, 0.067 M di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi ve 0.067M sodyum di-hidrojen fosfat (NaH_2PO_4) çözeltileri kullanılarak hazırlanmış ve +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Protein çözeltisi hazırlama aşamasında, doğal halde küresel olan SSA, ağırlıkça %12 olacak şekilde PBS tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş ardından 10 eşdeğer bağ β -ME eklenmiştir. Son olarak, çözeltiliye farklı hacimlerde (9:1; 4.5:1; 3:1 ve 1.5:1 (v:v) TFE:PBS) TFE eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda, 600 rpm hızla karıştırılan protein çözeltisi, karışma işlemi sonrasında 5 ml' lik şırıngaya çekilerek elektro-eğirme işlemine hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.2.2. SSA çözeltisi kullanılarak elektro-eğirme işlemleri yapılması

Elektro-eğirme işlemi için, Bölüm 3.2.1.2.1 de bahsedildiği şekilde, 3:1 (v:v) TFE:PBS oranında hazırlanan SSA çözeltisi kullanılarak, sistem doğrultusu, akış hızı, sisteme uygulanan voltaj gibi parametreler için ön çalışmalar gerçekleştirilmiş ve farklı yapıda fiberler üretilmiştir.

İşlem parametrelerinin iyileştirilmesi aşamasında, iğne ucu toplayıcı arası mesafe 10 cm' ye sabitlenerek, sistem düşey ve yatay olacak şekilde konumlandırılmış, akış hızı 0.2-0.6 ml/sa, gerilim 9-20 kV aralığında değiştirilerek referans yüzeyler kaplanmıştır.

Üretilen membranlar optik mikroskop (Nikon Eclipse, LV100) kullanılarak incelenmiştir. Elektro-eğirme işlemi süresince ve membranların karakterizasyonları sonucunda elde edilen tüm veriler; Taylor konisinin oluşumu ve şekli, fiberlerin kollektör üzerindeki sürekli dağılımı ve çapı gibi değişkenlere bağlı olarak değerlendirilmiş ve işlem parametreleri iyileştirilmiştir.

3.2.2. Protein-enzim Çözeltilerinin Hazırlanması ve Amiloid Dönüşümü

Biyokatalitik membran altyapısında kullanılmak üzere, protein-enzim içeren çözeltinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Bölüm 3.2.1.2.1 de belirtildiği şekilde saf protein çözeltileri hazırlanmış, ardından 200 U/ml konsantrasyona sahip GOD, hazırlanan SSA çözeltilerine ilave edilmiştir. Elde edilen çözeltiler, manyetik karıştırıcıda 600 rpm hızda karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan çözeltilere ait viskoziteler, viskozimetre cihazı (Brookfield, LVDV-II, ABD) ile ölçülerek, çözücü oranlarındaki değişimin elektro-eğirme işlem parametrelerine etkisi incelenmiştir. Son aşamada, küresel proteinin amiloid yapıya dönüşümü Puchtler Metodu kullanılarak incelenmiştir [45].

3.2.3. Protein-enzim Tabanlı Biyokatalitik Membranların Üretimi

Biyoaktif elektro-eğrilmiş fiberlerin yığılması ile hazırlanması hedeflenen membranlar için, Bölüm 3.2.2’ de belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltiler, 0.8 mm iç yarıçaplı iğneye sahip 5ml lik şırıngaya çekilerek, metal desteğe sabitlenmiştir.

Membran yapısına ve biyokatalitik aktiviteye, akış hızının ve uygulama voltajının etkisini belirlemek üzere, Bölüm 3.2.1.2.2’ de belirlenen işlem parametreleri kullanılarak; sistem düşey doğrultuda, 10 cm iğne ucu-toplayıcı arası mesafede sabitlenmiş, akış hızı 0.25-0.45 ml/sa, çalışma voltajı 9-12 kV aralıklarında ayarlanarak membran üretimi gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca çözücü etkisinin incelenmesi amacıyla, farklı çözücü derişimlerinde hazırlanan çözeltiler kullanılarak aynı işlem parametrelerinde üretilen membranlar karşılaştırılmıştır. İyileştirme yapılan çözücü konsantrasyonu sabit tutularak, bu orandaki çözelti (TFE:PBS 1.5:1 v:v) 1-60 dakika zaman aralıklarında eğrilmiş, bu şekilde zamana bağlı birikim-aktivite ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bunlara ek olarak, ağırlıkça %12 SSA içeren hacimce 1.5:1 TFE:PBS kullanılarak hazırlanan protein çözeltilerine, iki farkı enzimatik aktivite içerecek şekilde, 100 U/ml veya 200 U/ml enzim eklenerek, eğirme işlemi gerçekleştirilmiş, bu şekilde çözeltideki enzim miktarının aktivite üzerine etkisini gözlenmiştir.

Biyoaktif membran yapısındaki olası amiloid oluşumu, eğirme işlemi sonrasında Puchtler Metodu [45, 46] kullanılarak incelenmiştir.

Tüm deneyler oda sıcaklığında (≈ 25 °C) gerçekleştirilmiş olup, deney sonrasında hazırlanan bütün örnekler yapılarındaki enzimin zarar görmemesi için -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Biyokatalitik Membranların Karakterizasyonu

Elektroeğrilmiş biyoaktif membranlara ait karakterizasyon çalışmaları, çalışmalardaki her bir süreç ile paralel yürütülmüştür. Membranlara ait fiziksel karakterizasyonlar, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Teknoloji

Merkezinde bulunan Süperiletken Laboratuvarı' ndaki Optik Mikroskop (Nikon Eclipse, LV100, ABD) ve Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) bünyesinde bulunan E-SEM (FEI-Quanta 200 FEG, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kongo kırmızısı ile çözeltiler elektro işlemi ve sonrasında boyanarak amiloid yapı incelenerek ilk kimyasal karakterizasyon gerçekleştirilmiş ve hazırlanan membranların yüzeylerinde bulunan fonksiyonel gruplar, FTIR (Perkin Elmer Spectrum, 100, ABD) cihazı ile tanımlanmıştır.

3.2.5. Enzimatik Aktivitenin Saptanması

Biyokatalitik membranlara ait görünür (apparent) enzim aktivitelerinin belirlenmesinde amperometrik ölçüm yöntemi kullanılmıştır [47, 48]

İlk aşama olarak biyokatalitik membranlar, her birindeki çözelti ile etkileşim alanı 25 cm² olacak şekilde fiber yoğun bölgelerine dikkat edilerek kesilmiştir. Ardından, membranlar Bölüm 2.2.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanan PBS çözeltisi içerisine daldırılmış, 20 dakika dengeye gelmesi beklendikten sonra altın elektrot, 650 mV' luk sabit voltaj altında polarize edilmiş, amperometrik ölçüm yapılarak baz sinyal kaydedilmiştir. Ardından, 100 mM stok glikoz çözeltisi, son derişimler 0.05-50 mM aralığında olacak şekilde PBS' e eklenerek sistemdeki akım değişimi gözlemlenmiş ve kaydedilmiştir.

Amperometrik ölçümler Bölüm 2.3' de verilen yöntemle hazırlanan tüm membranlar için tekrarlanmıştır. Öncelikle çözücü hacmi oranının (TFE:PBS) aktiviteye etkisini incelemek amacıyla farklı çözücü oranlarında (9:1; 4.5:1; 3:1 ve 1.5:1 (v:v) TFE: PBS) 1-60 dakika zaman aralıklarında aynı elektro-eğirme işlem parametreleriyle üretilen membranlardaki glikoz derişimine karşı cevaplar akım cinsinden ölçülmüştür. Sonuçlara göre en yüksek akım değişimine sahip olduğu belirlenen membran üzerinde iyileştirme çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla, farklı birikim süreleri (1-60 dakika) ve voltaja (9-21 kV) maruz bırakılan membranlarda, elektro-eğirme işlem parametrelerinin aktivite üzerine etkisini incelenmiştir.

Amperometrik ölçümlerden elde edilen sonuçların anlamlandırılması amacıyla, PBS çözeltisindeki serbest glikoz oksidaz için farklı glikoz derişimindeki (10-20 mM) akım değerleri okunarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş, böylece en yüksek aktiviteye sahip membranlarda ölçülen akım değişimleri, enzim aktivitesi cinsinden ifade edilmiştir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMALAR

Biyoteknoloji ve biyomühendislik gibi alan araştırmalarında kullanılmak üzere, biyolojik olarak aktif, diğer bir deyişle “doğal ve fonksiyonel” özellikleri olan yeni yapıların üretimini hedefleyen bu araştırmada, doğal taşıyıcı olarak “amiloid protein” ve aktif biyolojik ajan olarak “enzim” kullanılarak üretilen membranlarla ilgili çalışmalarına ait sonuçlar bu bölümde sunulmuştur.

Öncelikle literatürle kıyaslandığında [2, 4], daha düşük TFE:PBS (v:v) oranlarında, sürekli dağılıma sahip ve 200-500 nm aralığında sığır serum albümin (SSA) bazlı fiber elde etmeye yönelik ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda belirlenen işlem parametreleri ve üretilen membranların optik mikroskop görüntülerinden faydalanılarak, SSA-GOD amiloid çözeltileri hazırlanmış ve elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Üretilen bu membranlara ait fiziksel karakterizasyonlar, optik mikroskop ve SEM ile, kimyasal karakterizasyon çalışmaları ise; FTIR ile yapılmıştır. Ayrıca, membranların yapısındaki enzim aktivitesini belirlemek amacıyla, elektrokimyasal ölçüm yöntemleri kullanılmıştır.

DeneySEL Gereç ve Yöntemler bölümünde 6 ana başlık altında özetlenen tez çalışmasında, biyokatalitik membranların fonksiyonelliğini ve performansını belirleyen parametreler ve enzim aktivitesi ölçümlerine ait sonuçlar bu bölümde açıklanmaktadır.

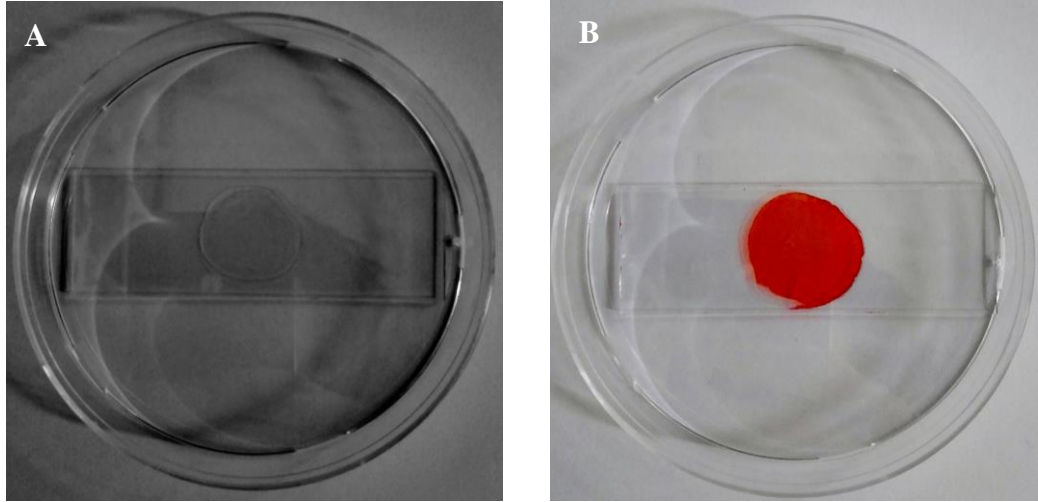
4. 1. Ön Çalışmalar Kapsamında Ulaşılan Sonuçlar

Bölüm 2.1’ de belirtilen yöntemler kapsamında hazırlanan sığır serum albümin çözeltileri kütlece %12 SSA ve 3:1 (v:v) oranında TFE:PBS içermektedir. Bu çözeltiler kullanılarak, Bölüm 3.1 ve Bölüm 3.2’ de bahsedilen parametre aralıklarında elektro-eğirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme düzeneğine ait çözeltiler ve işlem parametrelerinin iyileştirme çalışmalarına ait elde edilen sonuçlar aşağıdaki bölümlerde detaylı olarak açıklanmaktadır.

4.1.1. Protein Çözeltilerinin Hazırlanması ve Amiloid Formun Elde Edilmesi

Sığır serum albümin, doğal halde küresel bir proteindir. Elektro-eğirme işlemini gerçekleştirebilmek için, küresel proteinlerin sahip olduğu tersiyer yapının açılması ve yapının daha alt formlara (α sarmal, β yaprak) indirgenmesi gerekmektedir [2]. Bu çalışmada, SSA tampon çözeltide çözüldükten sonra tersiyer bağların kırılması ve amiloid hale geçiş için proteine ait her disülfid bağ sayısına denk gelecek miktarda Beta Merkaptotanol ilavesi gerçekleştirilmiştir. Ardından indirgenen bu yapının sabitlenmesi ve kararlı bir eğirme işlemi gerçekleştirebilmek için açılan S bağlarına bağlanacak flor grubuna sahip 2,2,2 Trifluoroetanol kullanılmıştır.

Elde edilen bu çözeltilere ait amiloid yapıya dönüşümü gözlemek için literatürde verildiği şekilde, hazırlanan çözelti Kongo kırmızısı boya kullanılarak boyanmış, yapıdaki amiloidleşmenin varlığı renk değişimi olarak gösterilmiştir (Şekil 4.1) [45, 46]. Bu sonuç, TFE:PBS oranının 1.5:1 (v:v) oranında kullanılması ile elde edilerek, literatürde verilen 9:1 oranının çok daha altındaki değerlerde dahi amiloid yapıya ulaşılabildiği gösterilmiştir [2].



Şekil 4.1. %12 SSA, 1.5:1 TFE:PBS ile hazırlanan çözeltilere ait görüntüler. Kongo kırmızı boya ile boyama A) öncesi, B) sonrası.

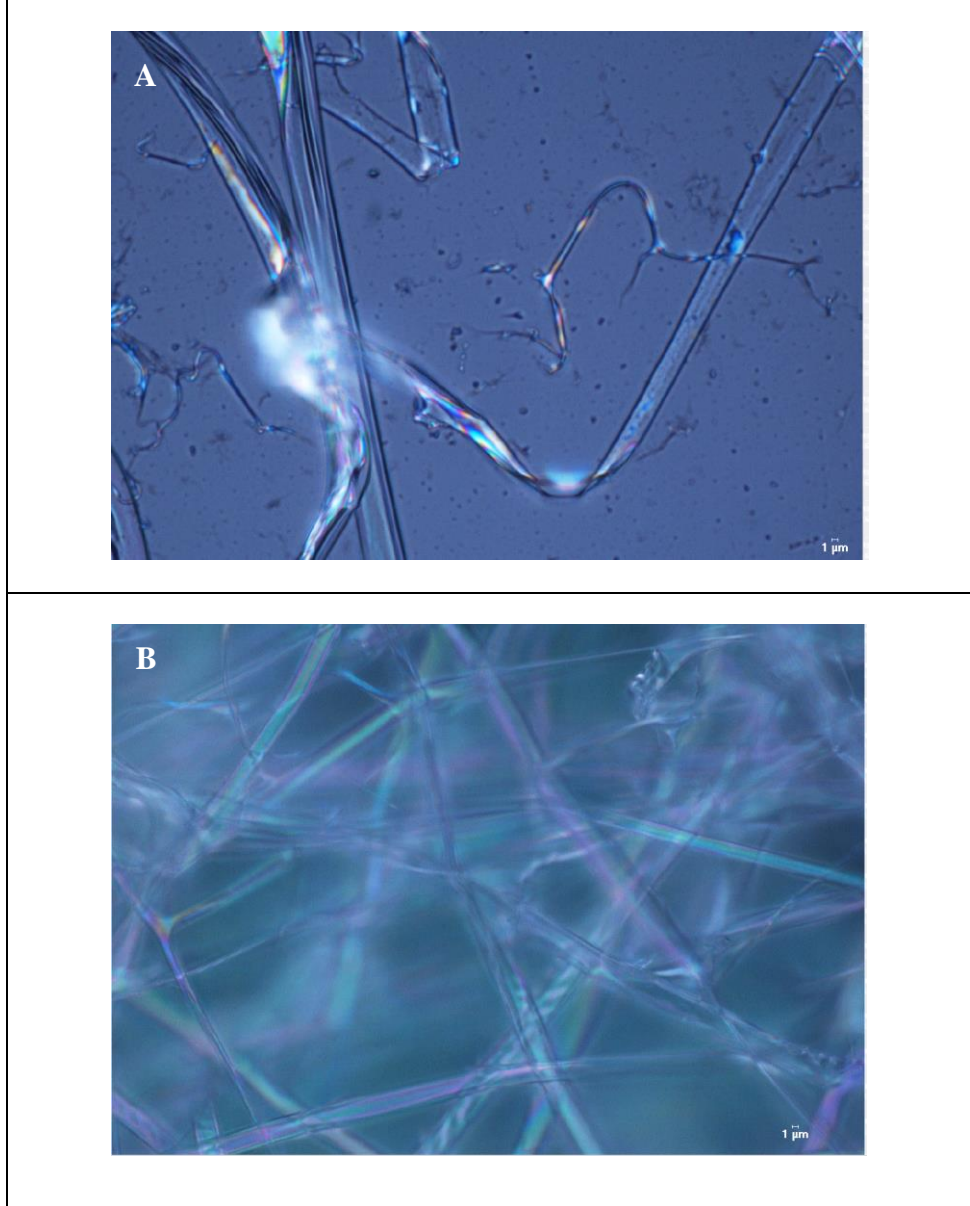
4.1.2 Elektro-eğirme Düzeneginin Kurulumuna Yönelik Ön Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

Elektro-eğirme işlemi ile ilgili ön denemeler, çözelti parametreleri ayarlanarak (% 12 w/v SSA, 10 eşdeğer bağ β -ME, 3:1 (v:v) TFE:PBS) gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde iğne ucu-toplayıcı arasındaki uzaklık sabit tutulmuş (10 cm), sistemin doğrultusu (düşey veya yatay), voltaj (8-15 kV) ve akış hızı (0.2-0.6 ml/sa) gibi işlem parametrelerinden etkilenen fiber morfolojileri incelenmiştir.

İlk parametre olarak, elektro-eğirme işleminin gerçekleştirildiği sistemin yatay veya düşey doğrultuda olmasının Taylor konisinin oluşumuna ve fiber dağılımına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, %12 (w/v) SSA, 10 eşdeğer bağ β -ME, 3:1 (v:v) TFE:PBS çözeltisi kullanılarak, iğne çapı 0.80 mm, iğne ucu toplayıcı arası uzaklık 10 cm ve akış hızı 0.6 ml/sa olacak şekilde 10 kV voltaj altında, eğirme sistemleri yatay ve düşey doğrultudaki konumlandırılarak elektro-eğirme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Sistemin doğrultusu, üretilen fiberlerin yapısında gözle görülür farklılıklara sebep olmuştur. Yatay (A) ve düşey (B) sistemlerde üretilen fiberlere ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.2.' de gösterilmektedir. Yatay düzenek kullanılması durumunda, Taylor konisinin ve üretilen liflerin yapısının, elektrik alanın zemine paralel olmasından dolayı olumsuz etkilendiği ve çalışmamıza uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuca ilaveten düzenek yatay konumda olduğunda, iğne ucunda çok fazla damlama oluşumu gözlenmiştir. Sistem düşey doğrultuda kullanıldığında ise; elektrik alan ve yerçekimi kuvvetlerinin aynı doğrultuda olmasının, yüksek voltaj altındaki çözeltiye ait yüzey kuvvetlerini daha kolaylıkla yenebilmesini ve bu şekilde kararlı jet oluşmasını sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, liflerin toplayıcı merkezinde yoğunlaşacak şekilde levhayı kaplaması ve bu nedenle toplayıcıda biriken fiber miktarında kayıp olmaması düşey çalışmanın avantajıdır. Optimizasyon çalışmalarının diğer aşamalarında sistem düşey şekilde kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Sistem düzeneđi dođrultusunun eđirme parametrelerine etkisi A) yatay, B) dűşey düzenek.



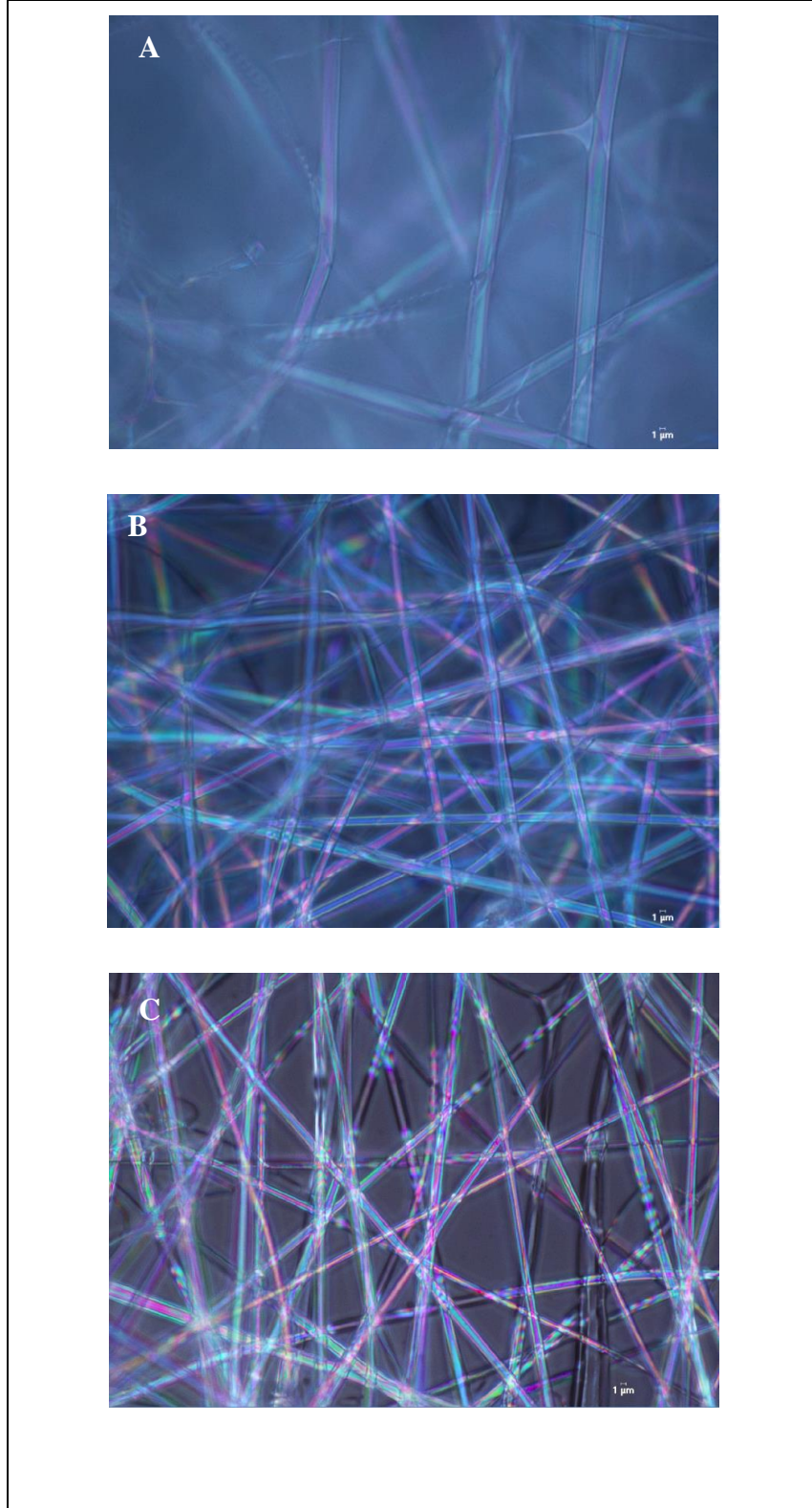
Ön çalışmalarda, ikinci parametre olarak, elektro-eğirme sisteminde uygulanan voltajın fiber yapısına ve oluşan Taylor konisine etkisi incelenmiştir. Bu grup ön denemelerde, seçilen 0.6 ml/sa akış hızının, yine ön denemelerde seçilen 8, 12 ve 15 kV voltaj uygulamalarındaki üretilen fiberler karşılaştırılmıştır

Akış hızıyla doğrudan orantılı olarak uygulanması gereken voltaj değerinin yükseltilmesi sonucunda, çözücü toplayıcıya ulaşana kadar tamamen buharlaşmamıştır. Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi, diğer parametreler sabit tutulup voltaj arttırıldığında, ölçülen ortalama fiber çaplarının 820 nm seviyesinden 564 nm seviyesine azalmasına rağmen fiberlere ait olan sürekli yapıların, yüksek voltaj değerlerinde kopmalarla bozulduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca belirtilen parametreler kullanıldığında, toplayıcı üzerinde damla halinde çözelti biriktiği de not edilmiştir. Bunun sebebi, akış hızı ile orantılı olarak uygulanması gereken voltajın, polarize olan yük miktarının artışıdan dolayı Taylor konisini ideal şekilde oluşturamamasıdır. Ayrıca, 8 ve 15 kV arasında uygulanan voltaj değerlerinin, güç kaynağının kapasitesi nedeni ile daha yüksek seviyelere çıkarılamaması, 0.6 ml/sa akış hızı için ideal olabilecek bir Taylor konisi yapısına ve dolayısıyla üretilen fiber yapısına olumsuz etkide bulunmuştur.

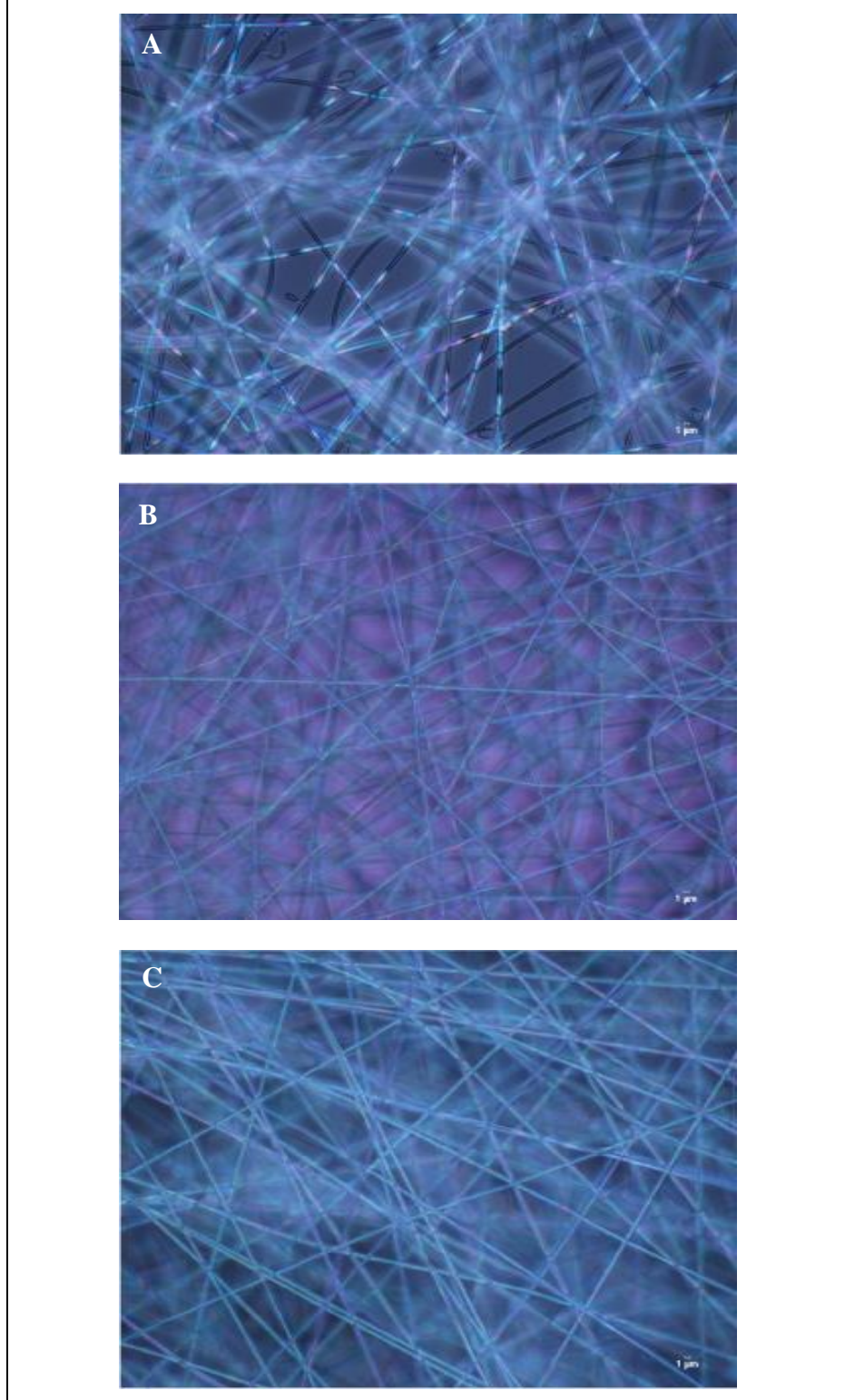
Parametre çalışmalarında uzaklığın sabit (10cm) olarak belirlenmesinden dolayı, ön çalışmaların son aşaması olarak akış hızına bağlı değişen fiberlerin yapısı incelenmiştir. Diğer parametreler sabit tutularak, akış hızındaki değişimin fiber yapısı ve toplayıcı üzerindeki fiber dağılımına etkisini incelemek için üretilen membranlara ait görüntüler Çizelge 4.3' te gösterilmektedir.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, akış hızının 0,6 ml/sa seviyesinden 0,25 ml/sa değerine azaltılması durumunda taşınan çözelti miktarının azaltıldığı ve fiber dağılımının daha sürekli olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun temel nedeni, düşük akış hızlarında daha az miktarda çözelti taşınması sonucunda çözücüsünün uçmasının kolaylaşmasıdır. Bu şekilde düşük akış hızında üretilen fiberlerin hem daha sürekli yapıda olduğu hem de çap değerlerinin 565 nm seviyesinden 340 nm seviyesine sahip fiber üretimi gerçekleştirildiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Voltajın lif çapına ve sürekli fiber yapısına etkisi, A) 8 kV, B) 12 kV, C) 15 kV.



Çizelge 4.3. Akış hızının lif çapına ve sürekli fiber yapısına etkisi A) 0.6, B) 0.45, C) 0.25 ml/sa



Yapılan ön çalışmalar sonucu elde edilen bulgular kapsamında, düşey sistemde, iğne ucu ve toplayıcı arası 10 cm mesafeye sahip, 9-12 kV voltaj aralığı ve 0.25-0.45 ml/sa akış hızlarında eğrilen fiberlerin diğer parametreler kullanılarak üretilen fiberlere kıyasla daha ince çaplı, sürekli bir dağılım gösteren ve uygun morfolojide olduğuna karar verilmiştir. SSA-GOD kullanılarak üretilen fiberler, ön çalışmalarda elde edilen bulgular göz önünde bulundurularak eğirme işlemine tabi tutulmuştur.

4.2. Protein-enzim Çözeltilerinin Hazırlanması ve Amiloid Formun Elde Edilmesi

Ön çalışmalardan faydalanılarak, kütlece %12 olacak şekilde PBS içerisinde çözülerek hazırlanan SSA çözeltisine, 10 eşdeğer bağ β -ME ve 9.0:1; 4.5:1; 3.0:1 ve 1.5:1 (v:v) TFE:PBS oranlarında TFE eklenmiştir. Saf protein çözeltisinden farklı olarak, çözeltiliye ayrıca 200 U/ml konsantrasyonunda enzim ilave edilmiştir. β -ME' ün, protein yapısındaki disülfid (S-S) bağlarını kırarak tersiyer yapısını açması, ardından çözeltiliye eklenen TFE' nin yapısındaki flor gruplarıyla açılan S bağlarını kapatarak, amiloid formun göstergesi olan β yapraklarını sabitlemesi beklenmektedir. Elektro-eğirme işleminin sağlıklı şekilde gerçekleştirilmesi açısından bakıldığında, çözelti parametrelerinin doğru belirlenmesi temel bir öneme sahiptir. Viskozitenin eğirme işleminde çözeltiliye ait etkin bir parametre olması nedeniyle hazırlanan her çözelti için oda sıcaklığında (25°C) viskozite değerleri ölçülmüştür. Viskozite ölçümleri okulumuz TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi' nde bulunan viskozimetre (Brookfield, LVDV-II, ABD) cihazıyla yapılmıştır. Çizelge 4.4' te hazırlanan çözeltiler ve bu çözeltilere ait viskozite değerleri verilmektedir.

Çizelge 4.4. A, B, C ve D örneklerine ait çözücü parametreleri ve çözeltilere ait viskoziteler. Örnekler, kütlece %12 SSA, 10 eşdeğer bağ β -ME ve 200 U/ml GOD içermektedir.

Çözelti	TFE: PBS (pH:7,4) (v:v)	Viskozite, μ (Pa.s)
A	1.5:1	0.326
B	3.0:1	0.345
C	4.5:1	0.356
D	9.0:1	0.370

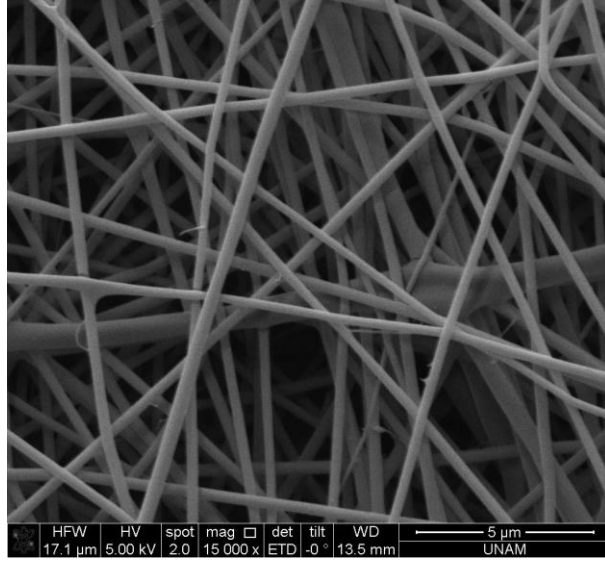
TFE' ün oda koşullarındaki dinamik viskozitesi 0,00175 Pa.s' dir. Viskozite değerlerinden anlaşılacağı üzere, çözeltideki TFE:PBS oranının artışı viskozitenin az miktarda da olsa yükselmesine neden olmaktadır. Viskozite, elektro-eğirme sistemlerinde çözücü parametrelerini dolayısıyla oluşan fiber yapılarını doğrudan etkilemektedir. Bu durumu açıklamak için farklı çözücü derişimlerdeki çözeltiler elektro-eğirme işlemine tabi tutulmuş, çözücü oranlarına bağlı fiber yapısında oluşan değişimler gösterilmiş ve fiberlerde amiloid yapının korunduğu literatürde belirtildiği şekilde test edilmiştir [45, 46].

4.2.1. Elektro-eğirme Yöntemi ile SSA-GOD İskelelerin Üretilmesi, Karakterizasyonu ve İşlem Parametrelerinin İyileştirilmesi

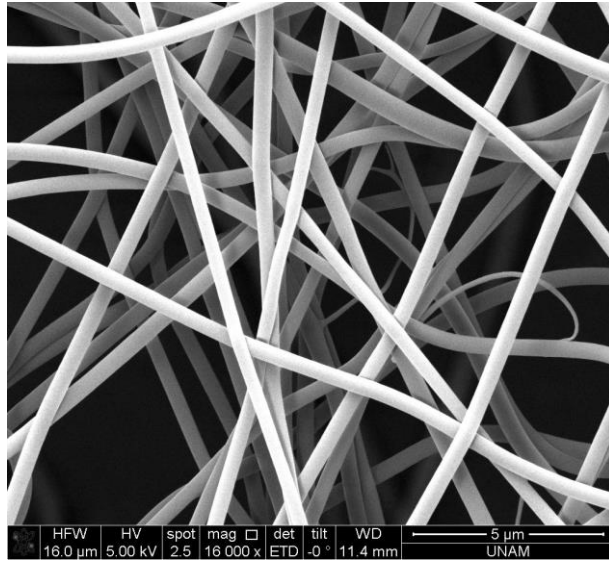
Ön çalışmalar sonucunda çözücü derişimlerine karar verilen protein-enzim çözeltileri hazırlanmış, düşey sistemde, iğne ucu-toplayıcı arası 10 cm mesafeye sabitlenerek, 12 kV voltaj altında ve 0.35ml/sa akış hızlarında eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında, üretilen fiberlerin çözücü derişimlerine bağlı değişen morfolojilerine ait SEM görüntüleri alınarak, Şekil 4.2- 4.5' da gösterilmiştir.

A (1.5:1 TFE: PBS v:v) çözeltisi kullanılarak hazırlanan fiberlere ait SEM görüntüsü incelendiğinde, belirtilen sistem parametrelerinde B, C ve D örneklerine kıyasla çok daha sürekli yapıda ve ortalama yarıçapı 235 nm olan fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Belirtilen elektro-eğirme parametreleri, çözelti jet toplayıcıya ulaşana kadar az miktarda TFE' ün uçmasına yeterli olmuş ve bu şekilde fiber çapının en ince seviyede olacak şekilde ve kopmadan üretim gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).

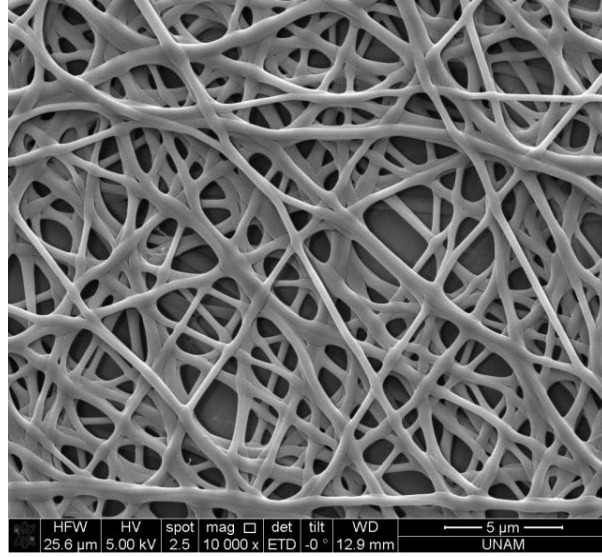
B (3:1 TFE: PBS v:v) çözeltisi kullanılarak hazırlanan fiberlere ait SEM görüntüsü incelendiğinde ise, belirtilen elektro-eğirme parametrelerinde, çözelti jet toplayıcıya ulaşana kadar uçan TFE miktarının yeterli olmadığı ve bu nedenle ortalama fiber çapının A çözeltisi kullanılarak hazırlanan membrandaki fiberlere kıyasla 476 nm seviyesine yükseldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



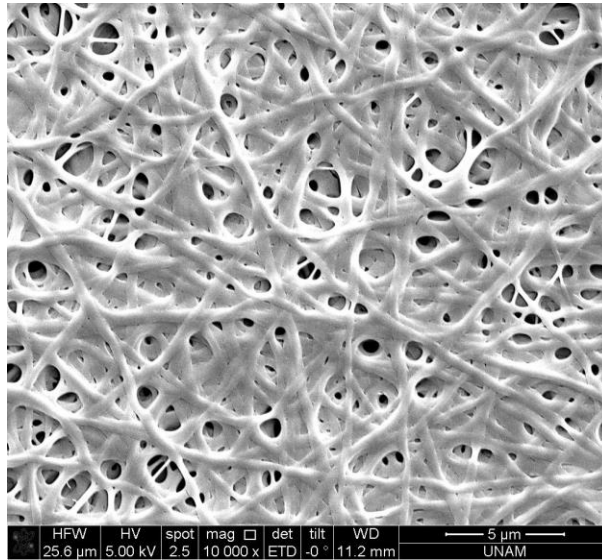
Şekil 4.2. A çözeltisi (1.5:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü



Şekil 4.3. B çözeltisi (3:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü.



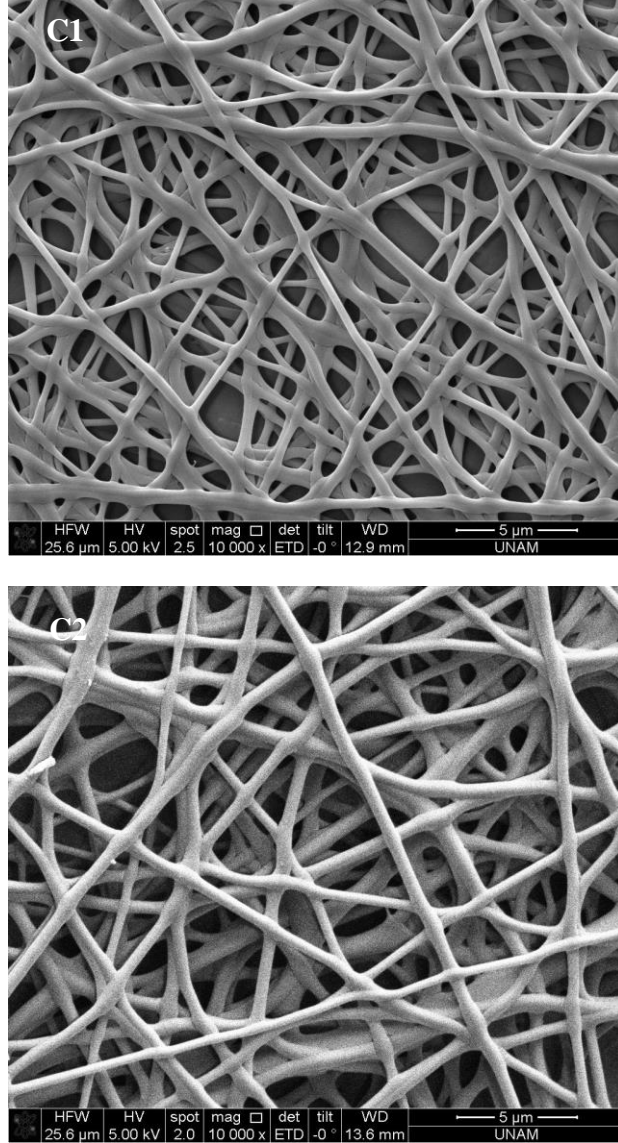
Şekil 4.4. C çözeltisi (4.5:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü



Şekil 4.5. D çözeltisi (9:1 v:v TFE:PBS) kullanılarak hazırlanan membranlardaki çözücü miktarının fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüsü

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 incelendiğinde ise, çözücü konsantrasyonunun C ve D örneklerindeki artışına karşın voltaj ve akış hızının sabit kalması, üretilen fiberlerdeki çözücünün uçamamasına dolayısıyla fiberlerin kademeli olarak kalınlaşmasına neden olmuştur. Bu durumun temel sebebinin, artan TFE oranına bağlı olarak artış gösteren viskozite olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, iyileştirme çalışmalarının ikinci aşaması olarak 4.5:1 v:v TFE:PBS oranında çözücü

kullanılarak hazırlanan C fiberlerine sisteme uygulanan voltajın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla voltaj değeri 12 kV değerinden 15 kV' a yükseltilmiş ve bu şekilde üretilen fiberlere ait SEM görüntüleri Şekil 4.6' da belirtildiği şekilde incelenmiştir.



Şekil 4.6. Voltajın fiber çapına ve dağılımına etkisine ait SEM görüntüleri
C1) 12 kV, C2) 15 kV.

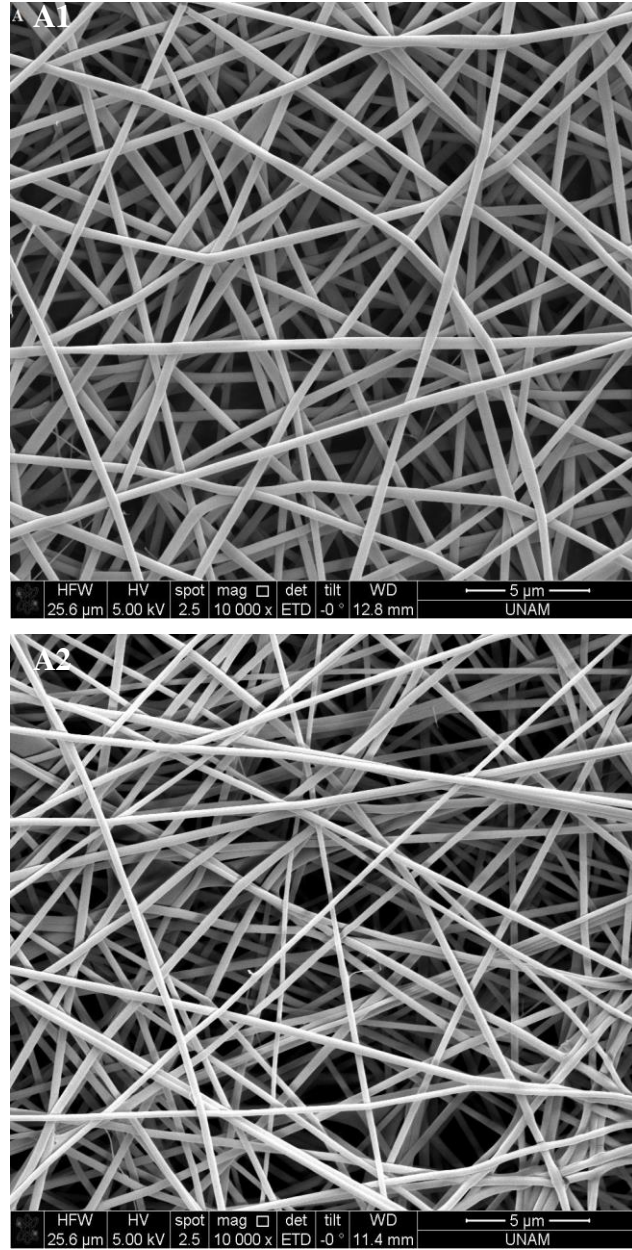
SEM sonuçları değerlendirildiğinde, 12 kV' a (C1) maruz bırakılarak üretilen membranda gözlemlenen yapının, voltajın 15 kV' a (C2) yükseltilmesi halinde daha düzgün hale geldiği ve ortalama yarıçapın 1.04 μ m seviyesinden 784 nm seviyesine düştüğü gözlemlenmiştir. Bu şekilde, sisteme uygulanan voltaj artışı hem Taylor

konisinin düzgün oluşumunu hem de fiber çapının kopmadan incelmesini sağlamıştır. Ayrıca bu durum, protein-enzim çözeltilerinin elektro-eğrilmesi sırasında uygulanması gereken kritik voltaj değerinin saf protein çözeltisinden farklı olduğu ve çözücü miktarına bağlı olarak artan viskozitenin sisteme uygulanması gereken voltajı doğrudan etkilediğini göstermiştir.

Bu nedenle, Taylor konisinin elde edilebilmesi ve fiber çapının incelmesi için, 1.5:1 (v:v) TFE:PBS çözücü oranından daha yüksek çözücü miktarına sahip olan çözeltilerde sisteme 12 kV değerinden daha yüksek voltaj uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Elektro-eğirme işleminde voltaj ve akış hızı birbirine doğrudan bağlı olduğundan iyileştirme çalışmasının bir sonraki aşamasında A çözeltisi kullanılarak, 0.35 ml/sa ve 0.25 ml/sa akış hızlarında üretilmiş, akış hızının iyileştirilmesi gerçekleştirilen fiberlerin çapı ve dağılımı üzerindeki etkisi incelenmiş, elde edilen verilere ait SEM görüntüleri Şekil 4.7' de gösterilmektedir.

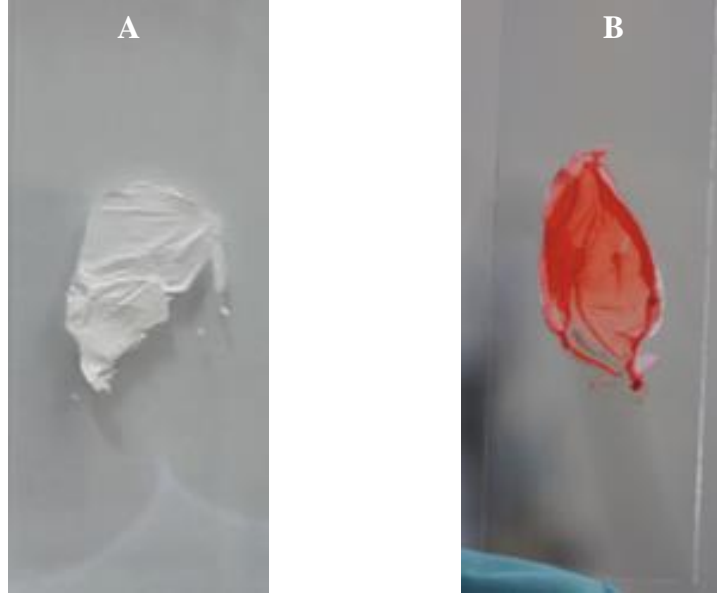
Diğer parametreler sabit tutularak akış hızı düşürüldüğünde daha az miktarda taşınan çözeltideki çözücünün uçması sebebiyle lif çapının 407 nm seviyesinden 193 nm' seviyesine azaldığı fakat çap dağılımının düzgün olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durumun nedeni, 0.25 ml/sa akış hızı değerinde uygulanan 12 kV voltaj değerinin yüksek gelmesidir.



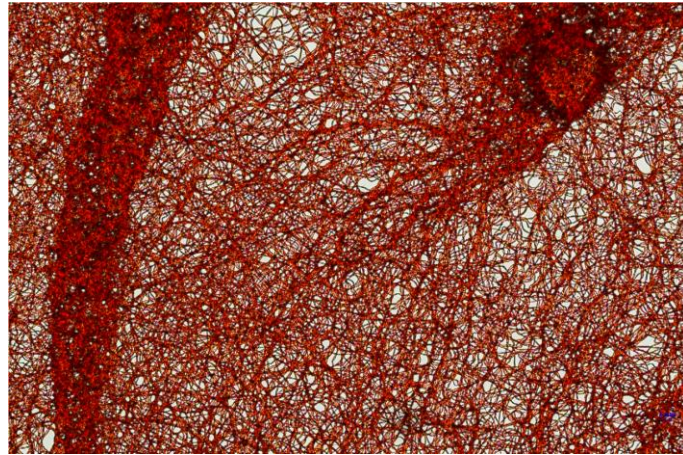
Şekil 4.7. Akış hızının fiber çapına ve dağılımına etkisi, A1) 0,35 ml/sa
A2) 0,25 ml/sa.

Yukarıda detaylı olarak bahsedilen tüm bu parametreler kullanılarak, farklı çözücü parametrelerine sahip A, B, C, D membranlarının elektro-eğirme işlem koşulları iyileştirilmiştir.

Amiloid yapının, üretilen membranlarda da korunduğunu gözlemlemek için literatürde verildiği şekilde hazırlanan iskeleler, Kongo kırmızısı boya kullanılarak boyanmış, yapıdaki amiloid dönüşümün varlığı renk değişimi olarak gösterilmiştir (Şekil 4.8).



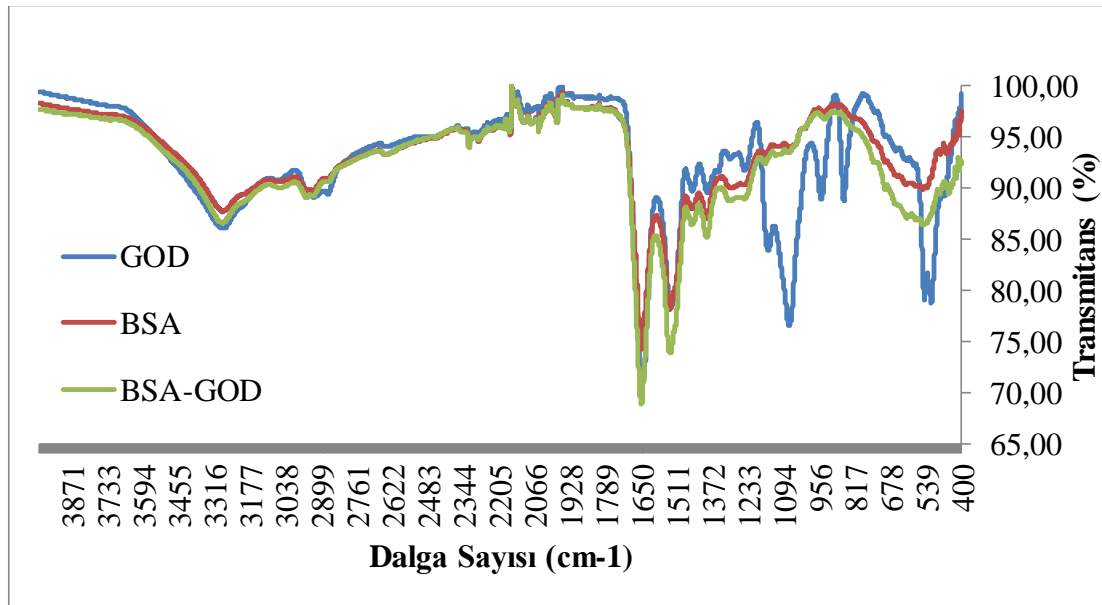
Şekil 4.8. A çözeltisiyle hazırlanan membranın Kongo kırmızısı boya ile boyama A) öncesi, B) sonrası görüntüleri



Şekil 4.9. Kongo kırmızısı boya ile boyanan A membranına ait optik mikroskop görüntüsü

Bu kapsamda, elektro-eğirme işlemi sonucunda hazırlanan membranların yapısını oluşturan amiloid formun korunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Bu durumun ayrıntılı incelemesi için, FTIR yapı karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda amiloid protein ve protein-enzim çözeltisi kullanılarak üretilen membranlar karşılaştırılmış, enzim ilavesinin membran yapısında oluşturduğu değişim incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki örnekte görülen gerilme titreşim bantları –OH bandı 3300 cm^{-1} ve N–H bandı 1650 cm^{-1} , N–O asimetrik bandı ise 1536 cm^{-1} dalga sayılarına karşılık gelmektedir (Şekil 4.4). Bu örnekler, katı GOD ile karşılaştırıldığında, protein-enzim membrana ait N–H bandında süperpozisyon etkisiyle genişleme görülürken; –OH bandında daralma gözlemlenmiştir. Ayrıca, glikoz oksidaza ait 1110 ve 857 cm^{-1} seviyesindeki O–H ve C–N piklerin yok olması, kullanılan çözücüler etkisinde enzim yapının değişime uğradığını göstermektedir. Bu membranların spektrum incelemesi yapıldığında amiloidleşme sonrasında, BSA ve BSA-GOD' a ait bantlar arasında ihmal edilecek kadar az fark olması, iki yüzeyin benzer özellikler gösterdiğini, yani enzimlerin amiloid yapı içerisinde hapsediğini kanıtlamaktadır.

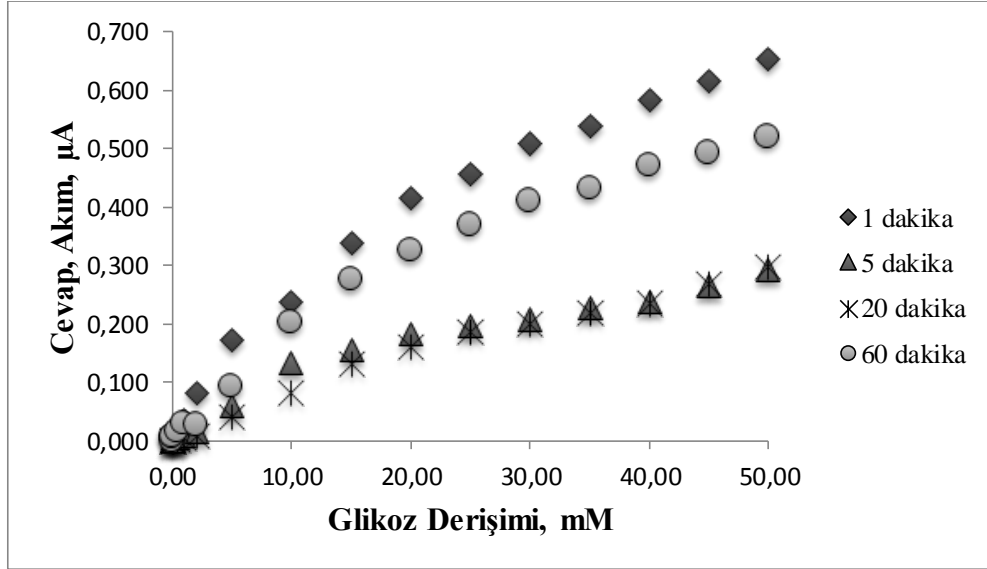


Şekil 4.10. Protein (BSA) ve protein- enzim (BSA- GOD) tabanlı membranlara ait FTIR spektrumu

4.3. Enzimatik Aktivitenin Saptanması

Biyokatalitik membranlardaki enzimatik aktivitenin elektrokimyasal yöntemle tayin edilmesi amacı ile Çizelge 4.4' te belirtilen oranlarda çözeltiler hazırlanmış ve membran üretimi gerçekleştirilmiştir. Eniyileştirme sonuçları kapsamında membranların üretim işlemi, elektro-eğirme parametreleri 0.35 ml/sa akış hızı, 10 cm iğne ucu-toplayıcı arası mesafe ve 12 kV voltaj olacak şekilde gerçekleştirilmiş, 1, 5, 20 ve 60 dakika süre ile hazırlanan membranların yapısındaki enzimin görünür aktiviteleri saptanmıştır.

Bu doğrultuda, glikoz çözeltisi ile etkileşim alanı 25 cm² de sabitlenmiş membranların yapısında bulunan glikoz oksidaz enziminin, 0.05 mM–50 mM aralığında glikoz derişimlerine verdiği cevaplar, akım cinsinden kaydedilmiş ve Şekil 4.4-4.7 hazırlanmıştır.

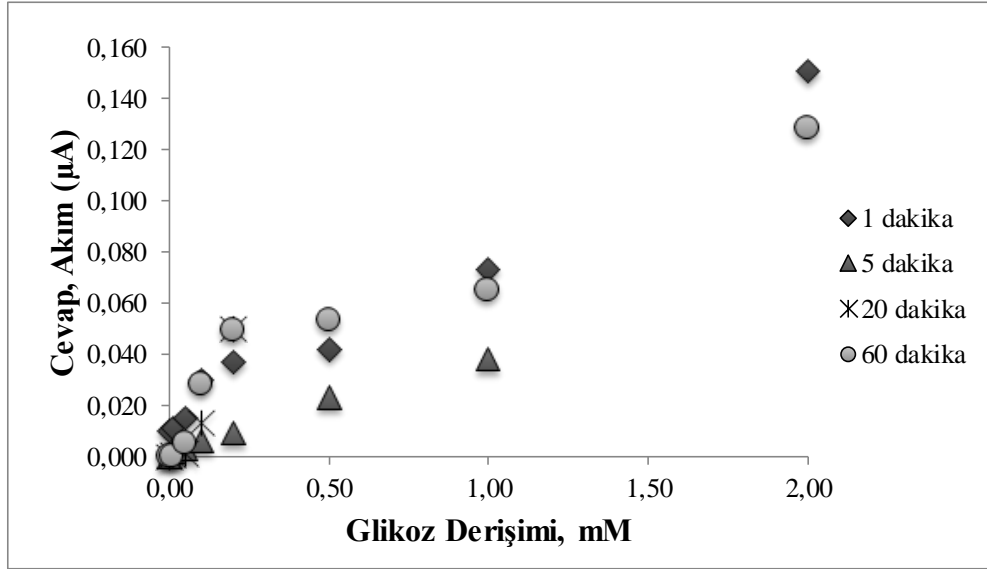


Şekil 4.11. 1-60 dakika zaman aralıklarında A çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri

Şekil 4.11' de amperometrik ölçümü yapılan 1.5:1 (v:v) TFE:PBS oranındaki fiberlerin değişen glikoz konsantrasyonuna karşı cevap eğrileri akım cinsinden gösterilmektedir. Farklı sürelerde üretilen membranların yapısındaki enzimin glikoz derişimine karşı verdiği cevap eğrileri incelendiğinde şu sonuçlar gözlenmiştir. Bu

grup fiberlerde kaydedilen en yüksek akım şiddeti, $0.7 \mu\text{A}$ seviyesindedir. Bu değer, yapının en ince olduğu ve dolayısı ile en az enzimi içeren, 1 dakika sürede toplanan fiberlerin oluşturduğu membranda gözlenmiştir. Benzer şekilde, membranın glikoz derişimine karşı verdiği cevabın doğrusal olarak seyrettiği en geniş bölge sınırı, yani sistemin doğrusallık sınırı, yine 1 dakika sürede hazırlanan membran için 20 mM glikoz olarak tespit edilmiştir. Daha uzun birikim süresi içinde hazırlanan membranlarda doğrusallık sınırlarının üst noktası daha düşük değerlerde kalmıştır.

Şekil 4.12' de amperometrik ölçümü yapılan 3:1 (v:v) TFE:PBS oranındaki fiberlerin değişen glikoz konsantrasyonuna karşı cevap eğrileri akım cinsinden gösterilmektedir.

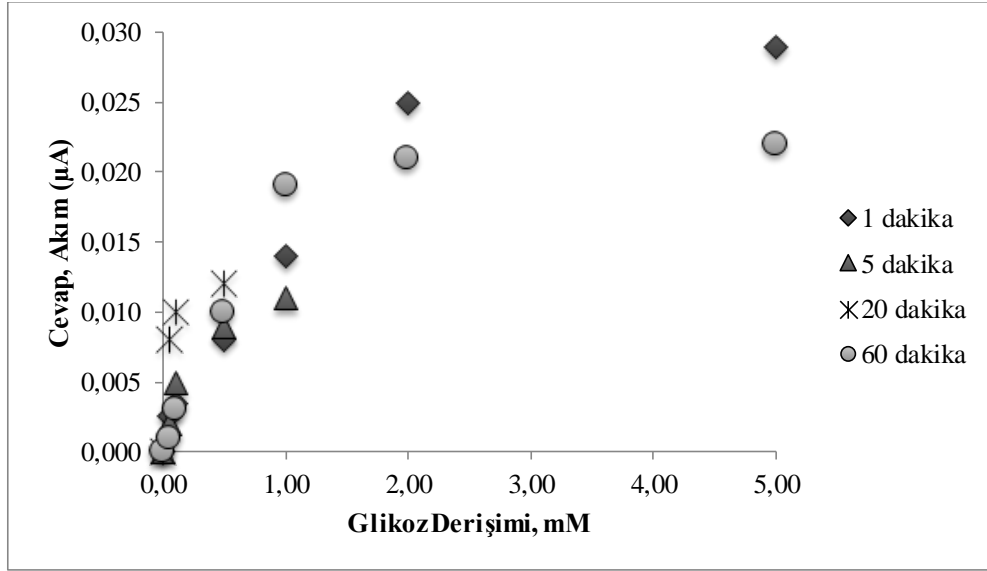


Şekil 4.12. 1-60 dakika zaman aralıklarında B çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri

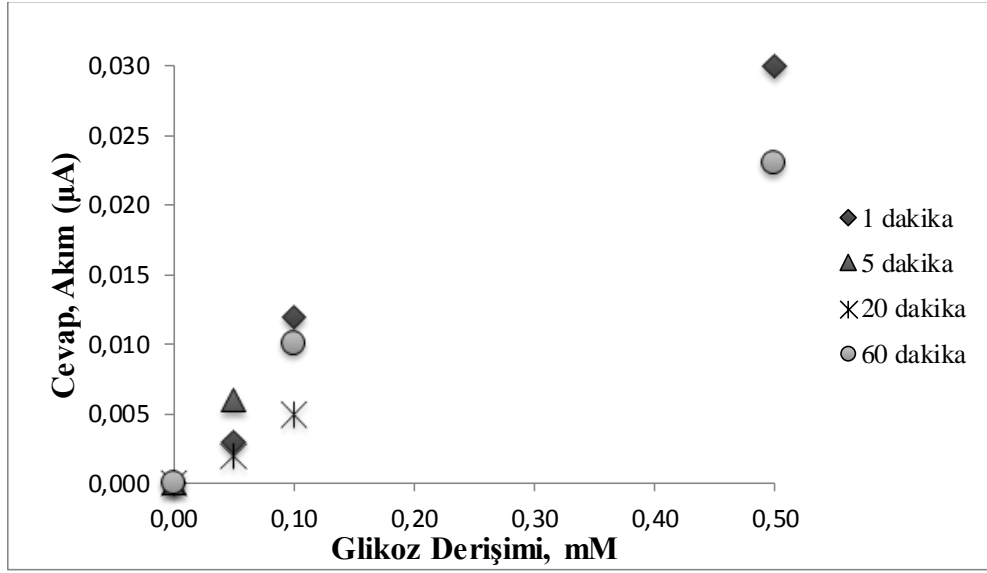
Elde edilen sonuçlara göre, artan TFE oranlarında elde edilen cevabın $0.7 \mu\text{A}$ seviyelerinden $0.15 \mu\text{A}$ seviyesine kadar düştüğü anlaşılmaktadır. Bu durumun temel nedeni, artan çözücü oranının enzimin yapısına zarar vermesidir. Ayrıca, sistemden cevap alınabilecek en yüksek seviyedeki glikoz derişiminin, 1.5:1 (v:v) oranında hazırlanan membrandaki 50 mM seviyesinden 2 mM seviyesine kadar inmesine yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu gerileme 4.5:1 ve 9:1 oranlarındaki çözelti ile hazırlanan membranlarda, daha da belirginleşmiş ve ölçüm yapılabilen en yüksek glikoz derişimi 0.5 mM seviyesine kadar inmiştir. Cevap akımında görülen düşüş ise $0.03 \mu\text{A}$

seviyesine gerilemiştir. Tüm bu sonuçlar birleştirildiğinde, artan TFE:PBS oranının enzimin yapısına oldukça zarar verdiği anlaşılmıştır.

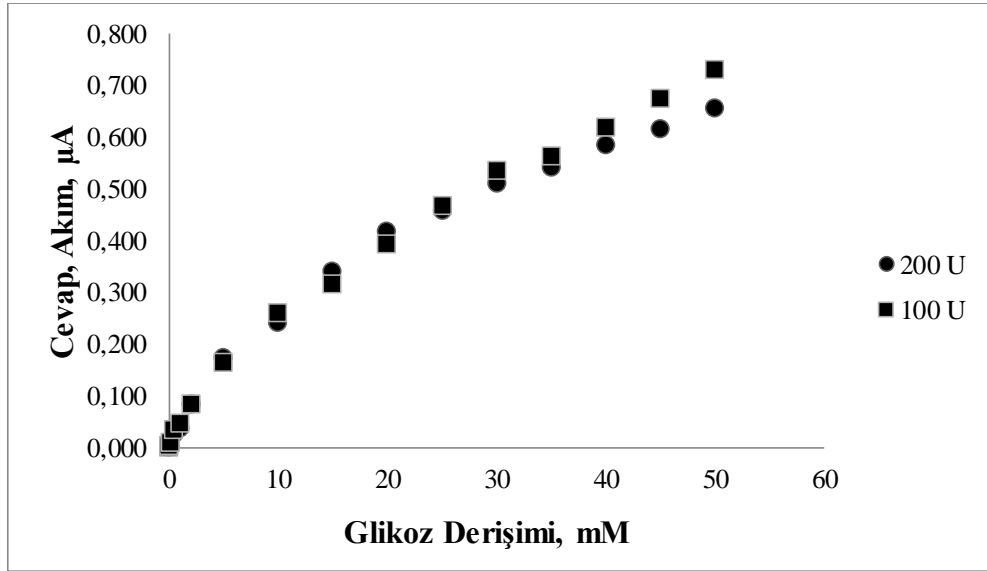
Şekil 4.13 ve 4.14'te, aynı şartlarda ölçümü yapılan 4.5:1 (v:v) TFE:PBS, 9:1 (v:v) TFE:PBS oranındaki fiberlerin değişen glikoz konsantrasyonuna karşı oluşan cevap eğrileri akım cinsinden gösterilmektedir. Görüldüğü üzere, TFE oranını artması hem lineer bölgenin daralmasını hem de alınan cevabın miktarını olumsuz etkilemiştir.



Şekil 4.13. 1-60 dakika zaman aralıklarında C çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri



Şekil 4.14. 1-60 dakika zaman aralıklarında D çözeltisi kullanılarak hazırlanan membranların, değişen glikoz konsantrasyonuna karşı gösterdikleri görünür cevap eğrileri



Şekil 4.15. Membran yapısındaki farklı enzim aktivitesinin glikoz derişimine karşı oluşturdukları görünür cevap eğrileri (birikim süresi: 1 dk; çözelti tipi: A)

En yüksek akım şiddetine ulaşılan dolayısıyla da en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen A çözeltisi ile üretilen membranlar kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir. Bu aşamada, enzimatik aktivite ölçümlerinde difüzyon engelini etkisini incelemek için A çözeltisi ile hazırlanmış 100 U ve 200 U/ml'lik konsantrasyonda

enzim içeren membranlar kullanılmış, elde edilen sonuçlar Şekil 4.15' te gösterilmiştir.

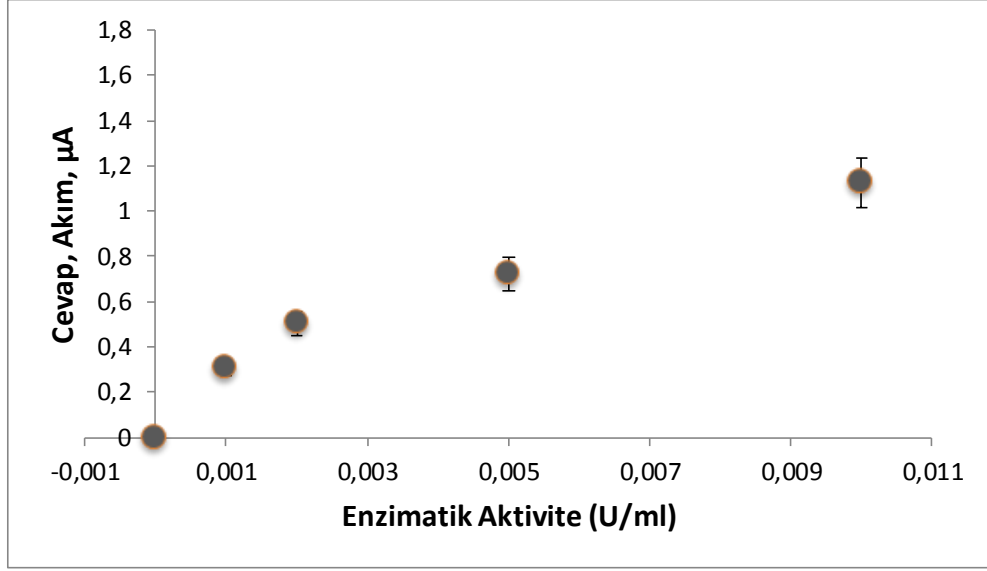
Grafikten anlaşılacağı üzere, çözelti içerisindeki glikoz oksidaz derişiminin arttırılması, membranların farklı glikoz derişimlerine karşı gösterdikleri cevabı değiştirmemiştir. Bu durum incelendiğinde membranların, glikoza karşı verdikleri cevabın difüzyon kısıtlamalarına bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen bu sonuçlara ait genel değerlendirme yapıldığında, aşağıdaki mekanizmaların geğerli olduğu sonucuna varılmaktadır:

Amiloid yapıdaki SSA matriksi içerisinde kapanlanan (entrapment) enzimlerin aktivite gösterdiği, buna karşı glikozun bu enzime varabilmek için zorlu bir aktarım mekanizmasını açması gerektiği düşünölmektedir. Bu aşamadan sonra geręekleřen tepkime sonucunda oluşan hidrojen peroksitinde geri difüzlenerak yığın akışa karışması, bunun yanında son aşamada 650 mV ta polarize edilen elektrot yüzeyinde bozunması gibi kademelerin sisteme ait hız kısıtlayıcı basamaklar olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuçlar kimyasal kinetik açışından incelendiğinde ise, reaktif olarak tepkimeye giren glikozun, enzime ulaşma yolunda karşılaştığı dirençler, diğer bir deyişle kütle aktarım ve difüzyon kısıtlarının, enzime ulaştıktan sonra geręekleřen tepkime yanında kontrol açışından çok daha önemli olduğu anlaşılmaktadır. Çünkü sistemin cevabını, tepkimenin değil, yüksek oranda kütle aktarımının kontrol ettiği durumlarda, membran yapısındaki enzim miktarının (uzun süreli birikim) veya çözeltiye eklenen enzim aktivitesinin herhangi bir etkisi olmamaktadır. Bu durum, 60 dakika birikim süresi sonucu üretilen membranın glikoz derişimine verdiği cevaptan da anlaşılmaktadır.

Bu sonuçların kinetik ve sistem dinamiği ile ilgili olarak yorumlanması doğrultusunda, ileriki dönemlerde yapılması planlanan çalışmalar Bölüm 5 te sunulmuştur.

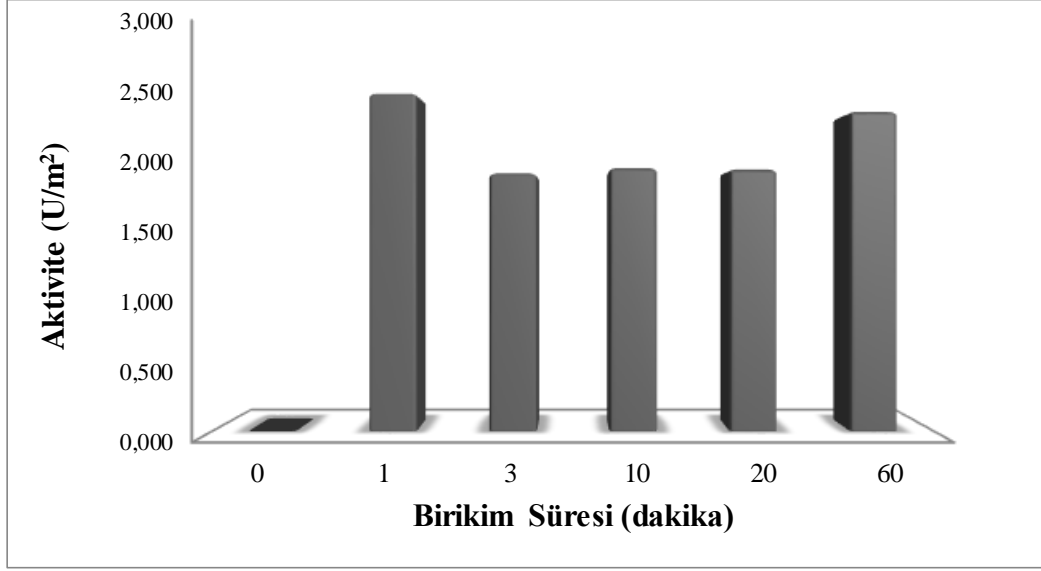
Son olarak değişen glikoz derişimine karşı verilen cevabın en yüksek olduğu belirlenen 1-60 dakika zaman aralıklarında A çözeltisi kullanılarak geręekleřtirilen elektro-eğirme işlemi ile hazırlanan membranlara ait aktivite miktarının belirlenmesi için gerekli kalibrasyon işlemi geręekleřtirilmiřtir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Serbest glikoz oksidaza ait kalibrasyon eğrisi (Kalibrasyon işlemi 10mM glikoz konsantrasyonuna sahip PBS içerisinde gerçekleştirilmiştir.)

Bu doğrultuda, aktivitesi bilinen serbest glikoz oksidazın, 10 mM glikoz derişimindeki PBS içerisine artan oranlarda eklenmesi sonucunda verdiği cevaplar akım cinsinden ölçülmüştür. Bu şekilde elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak, farklı birikim sürelerinde üretilen A membranlarına ait cevap akımları, aktivite cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 4.17).

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17' den anlaşılacağı üzere Şekil 4.11' de farklı birikim sürelerinde A çözeltisi ile hazırlanan membranlara ait glikoz derişimi-cevap akımı cinsinden verilen değerler, birikim süresi değişimine bağlı olarak gösterdikleri aktivite cinsinden hesaplanarak grafik haline getirilmiştir. Bu sonuç, A çözeltisi ile hazırlanan membranlara ait aktivite değerlerinin farklı birikim sürelerinden bağımsız olacak şekilde birbirine oldukça yakın olduğunu buna karşın belirlenen en yüksek aktivite (2547 U/m^2) 1 dakikalık elektro-eğirme işlemi sonucunda A çözeltisi ile hazırlanan membranlarda gözlenmiştir.



Şekil 4.17. Farklı birikim sürelerinde A çözeltisi kullanılarak elektro-eğime işlemi gerçekleştirilen membranlara ait aktiviteler

5. SONUÇLAR VE GELECEK ÇALIŞMALAR

Bu çalışma kapsamında, biyomalzeme araştırmalarında kullanılmak üzere “doğal ve fonksiyonel” özellikleri olan membranların üretilebileceği gösterilmiştir. Bu membranlar “biyomalzeme” ve “biyosensör” uygulamalarında kullanılmak üzere model olarak seçilen sığır serum albüminin amiloid formu ve aktif biyolojik ajan olarak seçilen glikoz oksidaz enzimi kullanılarak elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Sığır serum albüminin amiloid forma döndürülmesi amacı ile yapılan ön çalışmalarda bu dönüşümün sağlanabildiği ve bu formu kullanarak hazırlanan protein çözeltilerinin elektro-eğirme yöntemi için uygun hale geldiği görülmüştür.
- Amiloid formdaki proteinin çözeltilerine katılan enzimin aktivitesini hem çözeltideki TFE oranının artması ile hem de elektro-eğirme işlemi ile belli oranda kaybettiği, fakat sistem parametrelerindeki eniyileştirme çalışmaları ile bu oranın kabul edilebilir seviyelerde tutulabileceği görülmüştür.
- Biyosensör uygulamalarında olduğu gibi, üretilen biyokatalitik membrandaki enzim aktivitesi, amperometrik yöntemle ölçülmüş ve μA seviyesinde akım şiddeti görülmüştür. Bu sonuç, yeni yapının, biyosensör uygulamaları, özellikle “enzim elektrodlar” için ideal bir yapı olduğunu göstermektedir.
- Benzer şekilde, büyüme faktörleri, hormonlar vb. gibi farklı biyoaktif ajanlar kullanılarak, hem doğal yapının korunduğu hem de fonksiyonel “biyomalzemelerin” hazırlanabileceği gösterilmiştir.
- Farklı parametrelerde üretilen membranların yapısındaki enzim aktivitesinin ölçümünde elde edilen sonuçlar, sistemdeki dinamik davranışın tamamen difüzyon kontrollü olduğunu, enzim kinetiğinin hiçbir membran türünde etkin olamadığını göstermiştir.

Yukarıda açıklamaya çalışılan durum, önceki çalışmalarımızda da karşımıza çıkan ve difüzyon kısıtlamalarının artması ile biyosensörlerde substrata karşı doğrusallık sınırının arttığını gösterdiğimiz yayınlarımız ile de uyum içerisindedir [47, 48]. Bu çalışmada da, 1 dakika boyunca toplanan fiberlerin oluşturduğu membrana ait doğrusallık sınırı tüm diğer membranlardan, diğer bir deyişle yapısında daha fazla enzim miktarı bulunması beklenen yapılardan daha yüksek bir doğrusallık değeri göstermiştir. Bu durumda çok net olarak göstermektedir ki, membranın enzimatik tepkisi, tamamen kütle aktarım kontrollü olup enzim miktarından bağımsızdır.

Bu araştırmanın gelecek dönem yapılması düşünülen aşamalarında, araştırma grubumuzda daha önceki dönemlerde biyosensörlere yönelik çalışmalarındaki gibi, sisteme ait, etkinlik faktörü ve Thiele Modülü gibi boyutsuz grupların hesaplanması ve aynı anda gerçekleşmesi beklenen kinetik davranış ile kütle aktarım mekanizmalarının karşılaştırılması yönünde çalışmalar yapılacaktır [49-51]

KAYNAKLAR

- [1] Khadka, D. B., Haynie, D. T., Protein-and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(8), 1242-1262, 2012.
- [2] Dror, Y., Ziv, T., Makarov, V., Wolf, H., Admon, A., Zussman, E., Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules*, 9(10), 2749-2754, 2008.
- [3] Raheja, A., Agarwal, A., Muthuvijayan, V., Chandra, T. S., Natarajan, T. S., Studies on Encapsulation of Bovine Serum Albumin, Lysozyme and Insulin Through Coaxial Electrospinning. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 3(6), 669-672, 2013.
- [4] Kowalczyk, T., Nowicka, A., Elbaum, D., Kowalewski, T. A., Electrospinning of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors. *Biomacromolecules*, 9(7), 2087-2090, 2008.
- [5] Xie, J., Hsieh, Y. L., Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme. *Journal of Materials Science*, 38(10), 2125-2133, 2003.
- [6] Ding, Y., Wang, Y., Li, B., Lei, Y., Electrospun hemoglobin microbelts based biosensor for sensitive detection of hydrogen peroxide and nitrite. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9), 2009-2015, 2010.
- [7] Barnes, C. P., Smith, M. J., Bowlin, G. L., Sell, S. A., Tang, T., Matthews, J. A., Nimitz, J. C., Feasibility of electrospinning the globular proteins hemoglobin and myoglobin. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 1, 2006.
- [8] Wang, X., Li, Y., He, X., Chen, S., Zhang, J. Z., Effect of strong electric field on the conformational integrity of insulin. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(39), 8942-8952, 2014.
- [9] Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J. J., Fan, M., Chen, Z., Jansen, J. A., Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical research*, 28(6), 1259-1272, 2011.
- [10] Korhonen, H., Pihlanto, A., Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960, 2006.
- [11] Park, Joon; Lakes, Roderic S. *Biomaterials: an introduction.*, Springer Science & Business Media, New York, 2007.
- [12] Reddy, N., Reddy, R., Jiang, Q., Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, 33(6), 362-369, 2015.

- [13] Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S., Lelkes, P. I., Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5999-6008, 2005.
- [14] Buxbaum, E., *Fundamentals of protein structure and function* (Vol. 31), Springer, New York, 2007.
- [15] Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., *Principles of biochemistry*, Pearson, Boston, 2012.
- [16] Ercan A.M., *Proteinlerin Fonksiyonel Yapısı Ve Biyofiziksel Özellikleri, Biyofizik Ders Kitabı*, Dursun Ş., Ed., İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- [17] Hamerly, T., Heinemann, J., Tokmina- Lukaszewska, M., Luszczek, E. R., Mulier, K. E., Beilman, G. J., Bothner, B., Bovine serum albumin as a molecular sensor for the discrimination of complex metabolite samples. *Analytica chimica acta*, 818, 61-66, 2014.
- [18] Kang, Y. N., Kim, H., Shin, W. S., Woo, G., & Moon, T. W., Effect of Disulfide Bond Reduction on Bovine Serum Albumin-Stabilized Emulsion Gel Formed by Microbial Transglutaminase. *Journal of food science*, 68(7), 2215-2220, 2003.
- [19] “RCSB Protein databank” erişim adresi: <http://www.rcsb.org/>, erişim tarihi: 23 Temmuz 2006.
- [20] Westermark P., Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J*; 272:5942-9, 2005.
- [21] Merlini G, Bellotti V., Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*; 349:583-96, 2003.
- [22] Chiti, F., & Dobson, C. M., Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333-366, 2006.
- [23] Greiner, A., & Wendorff, J. H., Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(30), 5670-5703, 2007.
- [24] He J., Wan Y., Xu L., Nano-effects, quantum-like properties in electrospun Nanofibers, *Chaos, Solitons and Fractals* 33, 26–37, 2007 b.
- [25] Süslü A., Özdemir M., Tekmen Ç., Çelik E., Cöcen Ü., Gümüş Katkılı TiO₂ Nanofiberlerin Elektro-Eğirme Yöntemi ile Üretilmesi ve Karakterizasyonu, *Anadolu University Journal of Science and Technology*, Vol.10, No:1, 277-284, 2009.
- [26] Li D., Wang Y., Xia Y., Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer by Layer Stacked Films, *Advanced Materials*, 16-4, 2004.

- [27] Sill, T. J., Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006, 2008.
- [28] Yarin, A. L., Koombhongse, S., & Reneker, D. H., Bending instability in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*, 89(5), 3018-3026, 2001.
- [29] Zhao S. L., Wu X. H., Wang L. G., Huang Y., Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions, *J Appl. Polym. Sci.*, 91-242-246, 2004.
- [30] Zhong X. H., Kim K. S., Fang D. F., Ran S. F., Hsiao B. S., Chu B., Structure and Process Relationship of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes, *Polymer* 43, 4403-4412, 2002.
- [31] Hayati, I., Bailey, A., & Tadros, T. F., Investigations into the mechanism of electrohydrodynamic spraying of liquids: II. Mechanism of stable jet formation and electrical forces acting on a liquid cone. *Journal of colloid and interface science*, 117(1), 222-230, 1987.
- [32] Theron, S. A., Zussman, E., & Yarin, A. L., Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*, 45(6), 2017-2030, 2004.
- [33] Tan, S. H., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S., Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, 46(16), 6128-6134, 2005.
- [34] Fong H., Chun I., Reneker D. H., Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer*. 40, 4585-4592, 1999.
- [35] Palmer, T., & Bonner, P. L., *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*, Elsevier, Nottingham Trent University, UK, 2007.
- [36] Bergmeyer, Hans-Ulrich (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Elsevier, 2012.
- [37] Aykut, U., Temiz, H., *Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı*. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59, 2006.
- [39] Sun, J., Zhu, Y., Yang, X. and Li, C., Photoelectrochemical glucose biosensor incorporating CdS nanoparticles. *Particuology*, Vol. 7; 347-352, 2009.
- [40] Jackson, M., & Mantsch, H. H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(2), 95-120, 1995.
- [41] Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A., *Principles of Instrumental Analysis* (5th ed.), Brooks/Cole Publishing Company ISBN 0-495-01201-7, 1998.

- [42] Stephens, D. J., & Allan, V. J., Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616), 82-86, 2003.
- [43] Rodoplu, D., & Mutlu, M., Effects of electrospinning setup and process parameters on nanofiber morphology intended for the modification of quartz crystal microbalance surfaces. *J. Eng. Fiber. Fabr*, 2, 118-23, 2012.
- [44] Rodoplu, D., Sen, Y., & Mutlu, M., Modification of quartz crystal microbalance surfaces via electrospun nanofibers intended for biosensor applications. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 5(4), 444-451, 2013.
- [45] Puchtler, H. O. L. D. E., & Sweat, F. A. Y. E., Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem*, 13(8), 693-4, 1965.
- [46] Howie, A. J., Brewer, D. B., Howell, D., & Jones, A. P., Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light. *Laboratory Investigation*, 88(3), 232-242, 2008.
- [47] Koochaki Z, Higson SPJ, Mutlu M, Vadgama P, (1993). The Diffusion Limited Oxidase-Based Glucose Enzyme Electrode: Relation Between Covering Membrane Permeability and Substrate Response, *J. of Membrane Science*, 76-(2-3), 261-268, 1993.
- [48] Boyacı İH, Mutlu M, Amperometric Biosensors in Food Processing, Safety and Quality Control, in. "Biosensors in Food Processing, Safety and Quality Control", Mehmet Mutlu (ed.), Taylor and Francis, CRC Press, Boca Raton, 1-52, 2010.
- [49] Mutlu S, Mutlu M, Vadgama P, Piskin E, Sandwich Type Amperometric Enzyme Electrodes for Determination of Glucose, in "Diagnostic Polymeric Materials", A.M. Usmani and N. Akmal, eds., American Chemical Society (ACS) Symposium Series, 71-(83)-556, 1994.
- [50] Mutlu M, Mutlu S, The Effect of Crosslink Density on Permeability in Biosensors: An Unsteady-State Approach, *J. Biotechnology Techniques*, 9(4), 277-282, 1995.
- [51] Mutlu S, Mutlu M, Pişkin E, A Kinetic Approach To Oxidases Based Enzyme Electrodes: The Effect of Enzyme Layer Formation on the Response Time, *The Biochemical Engineering Journal*, 1.(39)-43, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KABAY, Gözde
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 23.08.1989, İZMİR
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (543)- 5281989
e-mail : gkabay@etu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi	2015
Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi/Fizik Eğitimi	2013

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2013	Buca Anadolu Lisesi, İZMİR	Stajyer Öğretmen
2012- 2013	Ütopya Bilim ve Sanat Merkezi	Fizik Öğretmeni
2010- 2011	İZDEM Etüt Merkezi	Fizik Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

- Yurumezolu, K., Isik, H., Arıkan, G., & Kabay, G. (2015). Teaching the absorption of light colours using an artificial rainbow. *Physics Education*, 50(4), 402.
- Kabay G., Kaleli G., Dincel O., Mutlu M., Physical Modification of Polycarbonate Nanorod Arrays by Low- Pressure Low-Frequency Oxygen Plasma, FP7- KORANET Course on Novel Approaches in Non Thermal Processing of Materials (2014).
- Sultanova, Z., Kabay, G., Kaleli, G., & Mutlu, M., Coaxial electrospun PCL/PVA-chitosan nanofibers: A novel non-viral gene delivery scaffold. In *Plasma Sciences (ICOPS), 2015, IEEE International Conference on* (pp. 1-1). IEEE.
- Investigation of Low-Pressure Low-Frequency Oxygen Plasma on Chemical/Physical Properties of Polycarbonate Nanorod Arrays, Altuntas S., Kabay G., Büyükserin F., Mutlu M., 1st IMEPS Conference, IMEPS, (2014).

- Preparation of Enzyme- carrying Living Membranes Produced by Electrospinning for Biosensor Applications, Kabay G., Kaleli G., Sultanova Z., Seker U.O. S., Mutlu M., 2nd International Congress on Biosensors, Gediz University (2015).
- Performance of Enzyme Immobilisation Methods on Bio-inspired Albumin Scaffolds, Kabay G., Kaleli G., Sultanova Z., Seker U.O. S., Mutlu M., NART, (2015).