

Arif SOYSAL

Doktora Tezi

KÜ 2015

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

BAZI ENDÜSTRİYEL ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN AŞI
KOPOLİMERİZASYONLA LİFSİ BİR DESTEK
MADDESİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Arif SOYSAL

MAYIS 2015

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

BAZI ENDÜSTRİYEL ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN AŞI
KOPOLİMERİZASYONLA LİFSİ BİR DESTEK
MADDESİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Arif SOYSAL

MAYIS 2015

Kimya Anabilim Dalında Arif SOYSAL tarafından hazırlanan BAZI ENDÜSTRİYEL ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN AŞI KOPOLİMERİZASYONLA LİFSİ BİR DESTEK MADDESİNİN GELİŞTİRİLMESİ adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM
Kimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU _____
Üye : Doç. Dr. Abdurrahman ASAN _____
Üye : Doç. Dr. Nuran IŞIKLAN _____
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ramazan COŞKUN _____
Üye : Yrd. Doç. Dr. Zülfikar TEMOÇİN _____

25 / 05 / 2015

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

BAZI ENDÜSTRİYEL ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU İÇİN AŞI KOPOLİMERİZASYONLA LİFSİ BİR DESTEK MADDESİNİN GELİŞTİRİLMESİ

SOYSAL, Arif

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Mayıs 2015, 141 Sayfa

Bu çalışmada; peroksidaz (HRP), lakkaz ve lipaz gibi endüstriyel enzimlerin immobilizasyonu için bir destek materyalinin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için çalışmanın 1. aşamasında Poli (Etilen tereftalat) liflere, GMA (glisidil metakrilat) ve MAAm (metakrilamit) monomer karışımı, benzoil peroksit (BPO) başlatıcısı yardımıyla aşılanmıştır. Aşılama yüzdesine çeşitli parametrelerin etkileri araştırılmıştır. Aşılama için optimum şartlar, $[BPO] = 8 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $t = 180$ dakika olarak bulunmuştur. Aşılama hızının GMA/MAAm karışım derişimine 1,03 ve BPO derişimine ise 0,51'inci dereceden bağlı olduğu bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında; GMA/MAAm monomer karışımı aşılanmış PET liflere, HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilizasyonu kovalent bağlanma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için monomer karışımı aşılanmış PET lifler,

üzerinde amin grupları türetmek için önce etilen diamin ile sonra da Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiştir. Modifiye lifler glutaraldehit ile aktive edildikten sonra HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilizasyonu kovalent olarak gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize haldeki bu enzimlerin aktivitelerine bazı değişkenlerin etkisi araştırılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivite gösterdikleri maksimum sıcaklıklar, HRP ve lipaz için 50 °C, lakkaz için 35 °C olarak bulunmuştur. Immobilizasyon; HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin termal ve depolanma kararlılıklarını arttırmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca immobilize enzimlerin endüstride kullanım alanlarına ilişkin örnek çalışmalar yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Poli (etilen tereftalat) lif, glisidil metakrilat, metakrilamit,

HRP, lakkaz, lipaz, kovalent immobilizasyon

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A FIBROUS SUPPORT MATERIAL WITH GRAFT COPOLIMERIZATION FOR IMMOBILIZATION OF SOME INDUSTRIAL ENZYMES

SOYSAL, Arif

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

May 2015, 141 pages

In this study, synthesis of a support material was aimed for the immobilization of industrial enzymes, such as peroxidase (HRP), laccase and lipase. For this aim, in the first stage of study, Poly (ethylene terephthalate) (PET) fibers were grafted with glycidyl methacrylate-methacrylamide (GMA-MAAm) monomer mixture using benzoyl peroxide (BPO) as initiator. Effect of various parameters on grafting percentage were investigated. Optimum conditions for grafting were found to be $[BPO] = 8 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ and $t = 180 \text{ min}$. The rate of grafting was found to 1,03 power of monomer mixture (GMA/MAAm) concentration and 0,51 power of initiator concentration.

In the second stage of the study, immobilization of HRP, laccase and lipase enzymes were achieved by covalent bonding technique to GMA/MAAm monomer mixture grafted PET fibers. Therefore, monomer mixture grafted PET fibers were

modified firstly with ethylenediamine and then Hofmann conversion reaction to derive the amine groups on PET fibers. The modified fibers were then activated with glutaraldehyde and HRP, laccases and lipase enzymes were immobilized covalently. The effect of some variables, on the activity of these enzymes which were free and immobilized was investigated. The maximum activity of the free and the immobilized enzymes occurred at 50 °C for the HRP and lipase, at 35 °C for the laccase. Immobilization; increased thermal and storage stability of the HRP, laccase, and lipase enzymes. Kinetic parameters of free and immobilized enzymes were determined. Besides, sample tests were performed regarding use of immobilized enzymes in industry.

Key words: Poly (ethylene terephthalate) fiber, glycidyl methacrylate, methacrylamide, HRP, laccase, lipase, covalent immobilization

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımını esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU' na, ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez izleme komitesi üyeleri Sayın Doç. Dr. Nuran IŞIKLAN ve Sayın Doç. Dr. Abdurrahman ASAN' a, tezime katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezime 2012/6 projesi kapsamında gereken finansal desteği sağlayan Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları ve Koordinasyon Birimine (BAP) teşekkür ederim.

Son olarak bana birçok konuda olduğu gibi manevi desteğini esirgemeyen aileme teőekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Polimerler.....	4
2.2. Kopolimerizasyon.....	4
2.3. Lifler.....	6
2.4. Poliester Lifler.....	6
2.5. PET Lif Üretim Yöntemi.....	7
2.6. PET' in Özellikleri.....	9
2.7. Enzimlerin Yapısı ve Özellikleri.....	10
2.8. Enzim Kinetiği.....	11
2.9. İmmobilize Enzimler.....	13
2.10. Kovalent Bağlanma ile Enzim İmmobilizasyonu.....	14
2.11. HRP Enziminin Özellikleri.....	15
2.12. Lakkaz Enziminin Özellikleri.....	16

2.13. Lipaz Enziminin Özellikleri.....	17
2.14. Tezin Amacı.....	17
2.15. Literatür Özeti.....	18
2.15.1. PET Lif'in Aşı Kopolimerizasyonu ile İlgili Literatür Taraması.....	18
2.15.2. Enzim İmmobilizasyonu ile İlgili Literatür Taraması.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Cihaz ve Düzenekler	25
3.2. Kimyasal Maddeler	26
3.3. Aşı Kopolimerizasyon Yöntemi	28
3.4. GMA/MAAm Aşılanmış PET Liflerde Metakrilamit Miktarının Tayini	29
3.5. Aşılanmış PET Liflerin Su Tutma Kapasitelerinin Tayini	29
3.6. PET Liflerin Boyanması ile İlgili Deneyler.....	30
3.7. Lif Çaplarının Ölçülmesi ve SEM Fotoğrafları	30
3.8. Aşılanmış PET Liflerin Tg Değerlerinin Bulunması.....	31
3.9. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	31
3.10. PET Liflerin FTIR Analizi.....	31
3.11. Enzim Çalışmaları.....	32
3.11.1. Enzim Destek Materyalinin Hazırlanması.....	32
3.11.2. Modifiye PET Liflerin FTIR Analizi	33
3.11.3. Enzim İmmobilizasyonu.....	33
3.11.4. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	34
3.11.4.1.HRP Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
3.11.4.2.Lakkaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	35
3.11.4.3.Lipaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	36
3.11.5. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu.....	37

3.11.6. Enzim Aktivite Şartlarının Optimizasyonu	38
3.11.6.1.Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	38
3.11.6.2.Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	39
3.11.6.3.Enzim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi.....	39
3.11.6.4.Enzimlerin Termal Kararlılığı	40
3.11.6.5.Enzimlerin Depolanma Kararlılığı	41
3.11.6.6.İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanım Kararlılığı.....	41
3.11.7. Enzim Uygulamaları.....	42
3.11.7.1.HRP ve Lakkaz'ın Fenol Degradasyonunda Kullanımı	42
3.11.7.2.Lipaz Enziminin Yağ Hidrolizinde Kullanımı	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Aşılama Mekanizması.....	45
4.2. Aşı Yüzdesi Üzerine Monomer Karışım Oranının Etkisi	46
4.3. Aşı Yüzdesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	48
4.4. Aşı Yüzdesi Üzerine Polimerizasyon Süresinin Etkisi.....	49
4.5. Aşı Yüzdesi Üzerine Başlatıcı Derişiminin Etkisi.....	51
4.6. Aşı Yüzdesi Üzerine Monomer Karışım Derişiminin Etkisi	52
4.7. Aşılama Kinetiği	53
4.7.1. GMA / MAAm'in Bireysel Derecesi	54
4.7.2. Başlatıcının Bireysel Derecesi.....	56
4.8. Aşılama PET Liflerin Su Tutma Kapasitelerinin Tayini	58
4.9. PET Liflerin Boyanabilirliği	59
4.10. Lif Çaplarının Ölçülmesi ve SEM Fotoğrafları	60
4.11. Aşılama PET Liflerin Tg Değerlerinin Bulunması.....	62
4.12. Termogravimetrik Analiz Sonuçları	64

4.13. PET Liflerin FTIR Analizi.....	65
4.14. Enzim Çalışmaları.....	66
4.14.1. Enzim Destek Materyalinin Hazırlanması.....	66
4.14.2. Modifiye PET Liflerin FTIR Analizi	76
4.15. Enzim İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu.....	78
4.15.1. Enzim İmmobilizasyonuna pH'nın Etkisi	78
4.15.2. Enzim İmmobilizasyonuna Aşı Yüzdesinin Etkisi.....	81
4.16. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	84
4.16.1. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi	84
4.16.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	87
4.16.3. Enzim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi.....	91
4.17. Enzimlerin Termal Kararlılığı.....	98
4.17.1. Enzimlerin Depolanma Kararlılığı	103
4.17.2. Enzimlerin Tekrar Kullanım Kararlılığı.....	107
4.18. Enzim Uygulamaları	111
4.18.1. HRP ve Lakkaz Enzimlerinin Fenol Degradasyonunda Kullanımı..	111
4.18.2. Lipaz Enziminin Yağ Hidrolizinde Kullanımı	114
5. SONUÇLAR	117
5.1. Sonuçlar-1	117
5.2. Sonuçlar-2.....	118
KAYNAKLAR	120

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. GMA'nın fiziksel özellikleri.....	26
3.2. MAAM'in fiziksel özellikleri	27
4.1. GMA, MAAM ve GMA/MAAM karışımı aşılınmış PET zincirdeki monomer aşı yüzdeleri.....	47
4.2. [GMA/MAAM] monomer karışımının bireysel derecesinin hesaplanması.....	55
4.3. [GMA/MAAM] için başlatıcının bireysel derecesinin hesaplanması.....	56
4.4. GMA/MAAM aşılınmış PET liflerin çap ve T_g değerlerinin aşısı yüzdeleri ile değişimi.....	62
4.5. Farklı aşısı yüzdelerine sahip GMA/MAAM aşılınmış PET liflerin termogram verileri	65
4.6. HRP enziminin kinetik parametreleri.....	93
4.7. Lakkaz enziminin kinetik parametreleri.....	96
4.8. Lipaz enziminin kinetik parametreleri.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Michaelis-Menten grafiği	12
2.2. Lineweaver-Burk grafiği.....	13
2.3. Amin grupları içeren destek materyaline kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu	14
2.4. Şiringaldazinin Lakkaz ile tepkimesi.....	16
2.5. Yağların lipaz enzimi ile hidroliz tepkimesi.....	17
4.1. GMA / MAAM monomer karışımı aşılınmış PET lif modeli.....	46
4.2. Aşı yüzdesi üzerine sıcaklığın etkisi	49
4.3. Aşı yüzdesi üzerine sürenin etkisi.....	50
4.4. Aşı yüzdesi üzerine başlatıcı derişiminin etkisi	52
4.5. Aşı yüzdesi üzerine monomer karışım derişiminin etkisi.....	53
4.6. Aşılama hızının monomer karışım derişimi ile değişimi.....	55
4.7. Aşılama hızının başlatıcı derişimi ile değişimi.....	56
4.8. GMA/MAAM aşılınmış lifler için su adsorpsiyonunun aşı yüzdesi ile değişimi.....	59
4.9. GMA/MAAM aşılınmış PET liflerin boyanabilirliğin aşı yüzdesi ile değişimi.....	60
4.10. Aşılınmamış ve (GMA/MAAM) aşılınmış PET liflerin SEM fotoğrafları...	61
4.11. Aşılınmamış ve farklı aşı yüzdelere sahip PET-g-GMA/MAAM'in DSC Termogramları.....	63
4.12. Aşılınmamış PET ve belirli aşı yüzdelere sahip GMA/MAAM aşılınmış	

PET liflerin TGA termogramları.....	64
4.13. Aşılanmamış ve GMA/MAAm aşılanmış PET liflerin FTIR spektrumları ...	66
4.14. NaOCl derişiminin Hofmann dönüşüm reaksiyonu üzerine etkisi.....	68
4.15. NaOH derişiminin Hofmann dönüşüm reaksiyonu üzerine etkisi.....	69
4.16. Reaksiyon süresinin Hofmann dönüşüm reaksiyonu üzerine etkisi.....	69
4.17. Modifiye PET liflere glutaraldehit bağlanmasının zaman ile değişimi.....	70
4.18. Modifiye PET liflere enzim immobilizasyon süresinin enzim aktivitesi ile değişimi.....	71
4.19. HRP enzimi aktivitesine, farklı modifikasyon yöntemlerinin etkisi etkisi.....	72
4.20. Lakkaz enzimi aktivitesine, farklı modifikasyon yöntemlerinin etkisi.....	73
4.21. Lipaz enzimi aktivitesine, farklı modifikasyon yöntemlerinin etkisi.....	73
4.22. Enzim immobilizasyon mekanizması.....	75
4.23. Aşılanmış PET liflerin modifikasyonuna ilişkin FTIR spektrumları.....	77
4.24. HRP immobilizasyonuna pH'nın etkisi.....	78
4.25. Lakkaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi.....	79
4.26. Lipaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi.....	79
4.27. İmmobilize HRP aktivitesine aşı yüzdesinin etkisi.....	82
4.28. İmmobilize lakkaz aktivitesine aşı yüzdesinin etkisi.....	82
4.29. İmmobilize lipaz aktivitesine aşı yüzdesinin etkisi.....	83
4.30. HRP enziminin aktivitesine pH'ın etkisi.....	84
4.31. Lakkaz enziminin aktivitesine pH'ın etkisi.....	85
4.32. Lipaz enziminin aktivitesine pH'ın etkisi.....	86
4.33. HRP enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	88
4.34. Lakkaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	89

4.35. Lipaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	90
4.36. Serbest HRP enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	92
4.37. İmmobilize HRP enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	93
4.38. Serbest lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	95
4.39. İmmobilize lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	95
4.40. Serbest lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	97
4.41. İmmobilize lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	97
4.42. HRP enziminin termal kararlılığı.....	98
4.43. Lakkaz enziminin termal kararlılığı.....	100
4.44. Lipaz enziminin termal kararlılığı.....	101
4.45. HRP enziminin depolanma kararlılığı.....	103
4.46. Lakkaz enziminin depolanma kararlılığı.....	105
4.47. Lipaz enziminin depolanma kararlılığı.....	106
4.48. HRP enziminin tekrar kullanım kararlılığı.....	108
4.49. Lakkaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı.....	109
4.50. Lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı.....	110
4.51. HRP enziminin belirli sürelerde fenol degradasyonuna etkisi.....	112
4.52. Lakkaz enziminin belirli sürelerde fenol degradasyonuna etkisi.....	113
4.53. Serbest ve immobilize lipaz enziminin farklı yağ türlerinin hidrolizine etkisi.....	115

KISALTMALAR DİZİNİ

PET	Poli (etilen tereftalat)
BPO	Benzoil peroksit
GMA	Glisidil metakrilat
MAAm	Metakrilamit
EDA	Etilen diamin
ES	Enzim substrat kompleksi
EÜ	Enzim ürün kompleksi
HRP	Horseradish peroksidaz
SEM	Taramalı Elektron Mikrokobu
FTIR	Fourirer Transform Infrared Spektroskopisi
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
TGA	Termo Gravimetrik Analiz

1. GİRİŞ

Enzimler, endüstriden tıba kadar geniş kullanım alanına sahip biyokatalizörlerdir. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^3 - 10^8 kere daha hızlıdır. Genel olarak her enzim molekülü 100 - 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir [1]. Ekonomik açıdan çok yüksek maliyete sahip olan enzimlerin endüstriyel alanda daha da yaygınlaşması için onların tepkime ortamından geri kazanılması ve tekrar kullanılabilmesi oldukça önemlidir. Enzim immobilizasyonu, enzimlerin tekrar kullanımına imkan sağladığı gibi ürünün reaksiyon ortamında enzimler tarafından kirletilmemesine, enzim kararlılığının artmasına ve enzimatik reaksiyonun kontrolüne imkân sağlar.

Adsorpsiyon, tutuklama, iyonik bağlama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi yaygın olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemleri vardır [2]. Birçok immobilizasyon yöntemine kıyasla daha yüksek enzim aktivitesi sağladığından dolayı, bu çalışmada enzimin destek materyaline immobilizasyonunda kovalent bağlama yöntemi kullanıldı.

Enzim immobilizasyonunda destek materyalleri, suda çözünmeyen katı materyaller veya polimerler olabilir. Enzim destek materyali, suda çözünmemeli ve hidrofobik karakterli olmamalıdır. Mekanik kararlılığa sahip olma, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler de bir enzim destek materyalinde aranacak özelliklerdir. Sıralanan bu özelliklere sahip olduğundan dolayı bu tez çalışmasında enzim destek materyali olarak, GMA/MAAm monomer karışımı aşılınmış PET lifler kullanıldı.

PET dünyada en fazla üretilen sentetik bir lifdir. 2002 yılında üretilen sentetik elyafın, % 58'lik bir payına sahiptir [3]. PET lif, ucuz hammaddesi ve düşük üretim maliyetine sahip olmasından dolayı, hazır giyimde tercih edilmektedir. PET lifi avantajlı kılan bu özelliklerinin yanında, hidrofobik karakterli olmasından kaynaklanan su tutma kapasitesi ve boyana bilirliliğinin sınırlı olması, yüksek statik yüklenme ve zayıf yapışkanlık gibi dezavantajlara da sahiptir [4]. PET liflerin sahip olduğu bu olumsuz özellikleri geliştirmek için kullanılan yöntemlerden birisi de liflerin modifikasyonudur. Aşı kopolimerizasyon yöntemi, PET lifleri modifiye etmek için kullanılan bir yöntemdir. Aşı kopolimerizasyon ile bir veya birden fazla monomer karışımı PET liflere aşılanabilir. Aşılamadaki temel amaç, farklı fonksiyonel gruplara sahip olan monomerlerin özelliklerinin, PET life kazandırılması ile PET lifin zayıf olan özelliklerini geliştirmektir.

Aşı kopolimerlerde, kimyasal yapıları farklı iki polimer zinciri, az veya çok bağlanma noktalarından birbirine bağlanır. PET lifin aşılama ile kazanacağı özellikleri, life aşılanacak monomer veya monomerler belirlediği için, aşılamada kimyasal aktivite gösterebilecek fonksiyonel gruplara sahip monomerler seçilir [5]. Aşılanması düşük olan monomerlerin aşı verimini arttırmak için, ikinci bir monomerin varlığında aşı kopolimerizasyon yapılır. İkinci monomerin sinerjik etkisinden dolayı aşılama verimi artar [6].

Bu tez çalışmasında; HRP, lakkaz ve lipaz gibi bazı endüstriyel enzimlerin immobilizasyonu için yeni bir destek materyalinin üretilmesi amaçlandı. Çalışmada bir enzim destek maddesinde bulunması gereken birçok özelliği taşımasından dolayı, PET lifler kullanıldı. Bu tercih nedenlerinin yanında, PET liflerin hidrofobik bir yapıya sahip olması, bir enzim destek maddesinde tercih edilmeyen bir durumdur. Bundan dolayı PET life MAAM monomerinin aşılanmasıyla lifler üzerinde polar

NH₂ grupları oluşturularak hidrofilik özelliği geliştirildi. Genel olarak 2 aşamadan oluşan bu tezin ilk aşamasında PET liflere, GMA ve MAAM monomer karışımı aşıldı. Aşılmaya etki eden bazı parametrelerin etkisi araştırılarak, monomer karışımı aşılanmış PET lifler karakterize edildi. Çalışmanın ikinci aşamasında ise; monomer karışımı aşılanmış PET liflere, HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilizasyonu kovalent bağlanma yöntemi ile gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri ve aktiviteleeri belirlendi. Serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleerine bazı değişkenlerin etkisi araştırılarak, immobilize enzimlerin uygulama alanları da araştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Polimerler

Polimerler, çok sayıda aynı veya farklı atomların kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Polimerler, doğal veya sentetik olabilir. Sentetik polimerler genellikle çok sayıda tekrarlanan, “monomer” denilen basit birimlerden oluşur. Doğal polimerler ise doğada kendiliğinden oluşan polimerlerdir. Örneğin selülöz ve nişasta doğada en çok bulunan doğal polimerlerdir [7].

Polimerler; monomer çeşitlerine göre homopolimerler ve kopolimerler olmak üzere iki sınıfta incelenirler [8].

Homopolimer: Tek cins monomerlerden meydana gelen polimerlerdir. Tek bir monomer –A- ile gösterildiğinde, homopolimerin genel formülü $X-(A)_n-Y$ şeklinde gösterilir.

Kopolimer: Yapısında birden fazla farklı monomerler içeren polimerlerdir. Kopolimer; rastgele, ardışık veya bloklar şeklinde bulunabilir.

2.2. Kopolimerizasyon

Polimerizasyon ortamında birden fazla monomer bulunduğu zaman, homopolimer yanında kopolimer de meydana gelir. Polimerizasyon ortamına başlatıcı ilave edildiğinde, her monomer kendine özgü ilk polimerik radikali

meydana getirir. Meydana gelen bu radikaller kendi monomerleri veya öteki monomer ile reaksiyona girerler. Diziliş sırasına göre monomerler dört tür kopolimer oluşturabilirler [8]. Polimerizasyon ortamında A ve B iki ayrı cins monomer iken aşağıda belirtilen kopolimer türleri hazırlanabilir;

1. A ve B monomerleri zincir boyunca dağınık sıralanması ile oluşmuş rastgele kopolimerler:



2. A ve B monomerlerinin, polimer zinciri boyunca art arda sıralanarak oluşturduğu ardışık kopolimerler: Böyle polimerler genellikle katılma veya kondenzasyon reaksiyonlarında oluşur.



3. A monomerinden oluşmuş polimer bloklarının B monomerinden oluşmuş polimer bloklarına bağlanması ile meydana gelen blok kopolimerler:



4. A monomerlerinden oluşan makromolekül zincirine, B moleküllerinden oluşmuş oligomerlerin aşılmasıyla elde edilen dallı kopolimerler.



2.3. Lifler

Uzunluğunun kalınlığına oranı yüksek olan, esnek ve homojen yapıdaki materyallerdir. Kesin bir değer olmamakla birlikte bir lifin uzunluk/çap oranının en az 100 olması gerektiği kabul edilir.

Lifler, elde edildikleri kaynağa göre doğal ve sentetik lifler olmak üzere iki gruba ayrılabilir [9].

Doğal lifler, doğadan sağlanırlar ve lif haline getirilmelerinde insan emeği yoktur. Basit n işlemlerden geçirilerek sanayide doğrudan kullanılırlar.

Lif retiminde kullanılan polimer, yapay olarak elde edilip daha sonra lif haline getirilebilir. Bu Şekilde yapay lifler elde edilmiş olur. Yapay lifler genel olarak; Poliamit lifler, akrilik ve modakrilik lifler, olefin lifler, elastomerik lifler ve poliestere-ter lifler Şeklinde sınıflandırılabilirler.

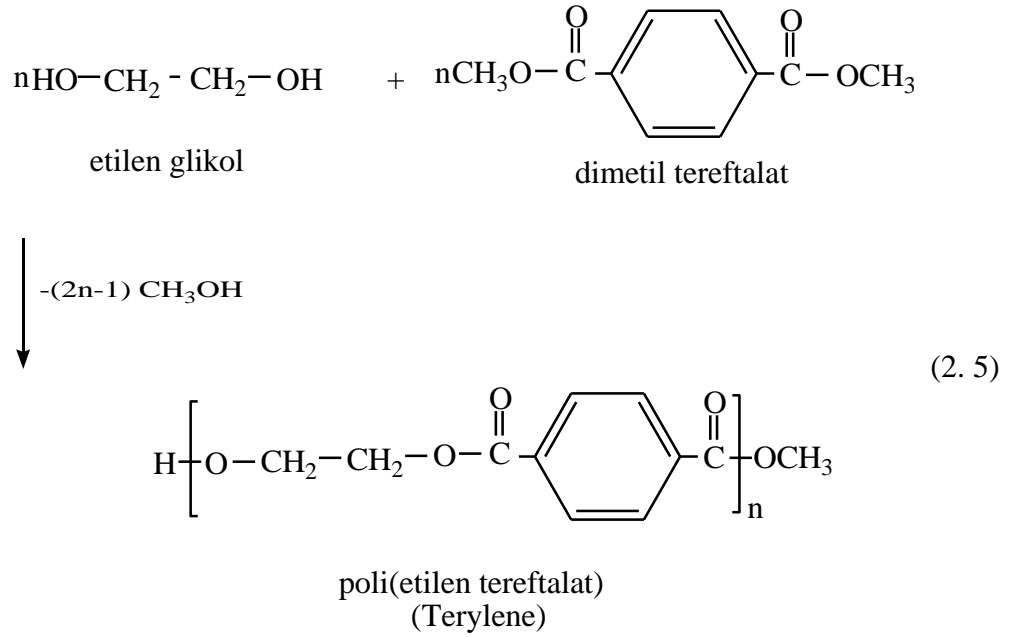
2.4. Poliestere Lifler

Yapısında kütlece en az % 85 oranında bir hidroksi alkol ve teraftalik asidin esterini bulunduran polimerlerden üretilen liflerdir. Poliesterler, tekstil, elektrik ve otomotiv gibi birçok sanayi alanında kullanılan polimer türüdür. Doğrusal bir yapıya sahip olan PET, çok önemli bir poliestere liftir. Endüstriyel olarak PET, teraftalik asit ya da dimetil teraftalatın etilen glikol ile polimerizasyonu sonucu elde edilen bir kondenzasyon polimeridir [10].

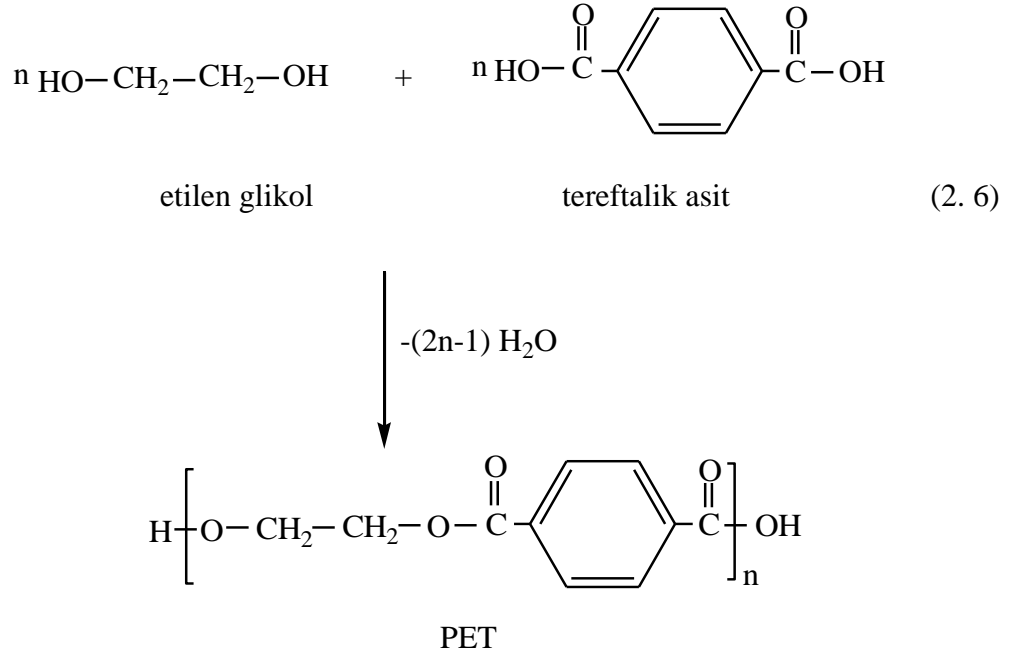
2.5. PET Lif Üretim Yöntemi

Carothers, lif üretmek için, ilk kez adipik asit ve etilen glikol gibi maddeler kullanarak doğrusal poliesterler sentezledi. Daha sonra araştırmalarını ester değişim tepkimeleri üzerine yoğunlaştırıp, bugün de PET üretiminde kullanılan yöntemi geliştirdi. PET lif, eriyikten lif çekme işlemi ile üretilir. Lif üretiminde kullanılan PET için geliştirilmiş 2 yöntem vardır [7].

a) Birinci yöntemde dimetil tereftalat ile etilen glikol kullanılır.



b) İkinci yöntem de ise saf tereftalik asit, etilen glikol ile tepkimeye girer.



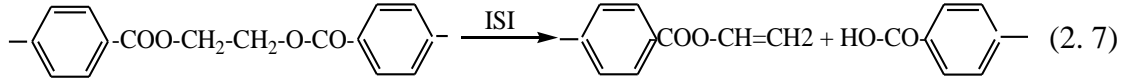
Her iki yöntem için de gerekli olan etilen glikol, etilenin oksidasyonu ve hidrasyonundan elde edilir. Burada saflaştırma bir sorun yaratmaz. Bunun yanı sıra *p*-ksilenin oksidasyonu ile elde edilen tereftalik asit, katı ve toz halinde olup saflaştırılması zordur. Bu nedenle düşük erime noktasına sahip ve daha kolay saflaştırılan dimetil tereftalat, tereftalik asit yerine kullanılmaktadır. Birinci yöntemin dezavantajı trans esterleşme sonucu açığa çıkan su yerine yanıcı ve parlayıcı bir alkol olan metanolün olmasıdır. Bundan dolayı bu yolla yapılan esterleşmede daha dikkatli olunmalıdır. Polimerizasyon işlemi, tek bir reaktörde vakum altında sürekli karıştırılarak 290 °C’ de gerçekleştirilir. Böylece monomer molekülleri birleşerek birçok monomerden oluşan polimer zincirlerini oluştururlar.

2.6. PET' in Özellikleri

PET, yüksek elastik özelliği, düşük nem tutma yeteneği (%100 bağıl nemde %1), mekanik kararlılığı ve aşınmaya karşı direnci yüksek olan bir polimerdir.

Erime noktası (258-263 °C) olan PET'in camsı geçiş sıcaklığı (80 °C)'dir. 1.camsı geçiş sıcaklığında, PET lifte etilen (-CH₂-CH₂-) gruplarındaki rotasyon ve titreşim hareketleri etkili iken, aromatik halkaların hareketliliği daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmektedir.

PET lif, naylondan daha dayanıklıdır. Işık etkisi, bakteri ve böceklere karşı dayanıklı olup degretasyona uğramaz. PET, erime noktası üzerindeki sıcaklıklarda degrede olur. PET'de ısısal degretasyon, ester bağlarından rasgele zincir kopması şeklinde meydana gelir. PET'in ısısal degretasyon tepkimesinin aşağıdaki gibi olduğu belirtilmiştir [11].



PET, sıcak metakrezol, triklorasetik asit ve *o*-klor fenol gibi organik çözücülerde çözünür. Zayıf asitlere karşı, kaynama noktasında bile dirençlidir. Kuvvetli asitlerde, HCl' ye karşı soğukta direnç gösterebilir. Zayıf alkalilerden etkilenmez ancak kuvvetli alkalilere karşı direnci azdır. Beyazlatıcı maddelere, deterjanlara, sabunlara, keton ve alkollere karşı dayanıklıdır. PET, yükseltgeyici maddelere karşı dirençlidir. Örneğin sülfürik aside üç günlük sürede 60 °C'de direnç göstermiştir.

PET lifler, 1. camsı geçiş sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda, iyi bir verim ile boyanamamaktadır. PET liflerin boyanmasında genellikle dispers boyalar kullanılır. Dispers boyalar, PET lif yapısına fiziksel olarak yerleşirler. Boyanın PET liflere yeterince difüzlenebilmesi için, benzen halkalarının titreşim enerjilerinin, bunlar arasındaki yoğun çekim kuvvetlerini yenebilecek düzeye çıkması gerekir.

2.7. Enzimlerin Yapısı ve Özellikleri

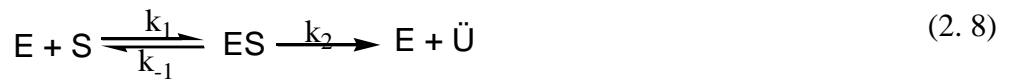
Enzimler, protein yapısında olan ve canlı hücreler tarafında sentezlenen biyokatalizörlerdir. Enzimler bazı özellikleri ile diğer katalizörlerden farklıdır.

Enzimatik reaksiyonlar, diğer katalizörlere göre çok daha hızlıdır. Katalizörlerin çoğu çeşitli kimyasal reaksiyonda görev yapmalarına karşılık, enzimler bir reaksiyonu spesifik olarak katalize eder. Enzimler, laboratuvar koşullarında çok yüksek sıcaklıklarda ve büyük bir enerji ile gerçekleşecek bir reaksiyonu, daha az enerji ile daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirebilirler [12].

Her enzim molekülünde aktif merkez denilen özel bir bölge vardır. Enzim molekülündeki bu aktif merkez, substratla uyumlu üç boyutlu bir yüzey oluşturan amino asit yan zincirleri içerir. Aktif merkez, substratı bağlayarak bir enzim–substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES kompleksi, enzim–ürün (EÜ) kompleksine dönüşür ve ürün enzim yüzeyinden ayrılır [13].

2.8. Enzim Kinetiği

Enzimler çoğunlukla Michaelis-Menten kinetiği gösterirler. Michaelis-Menten, enzim katalizli reaksiyonların özelliklerinin genelini kapsayan bir model öne sürmüştür. Bu modelde, enzim substratına geri dönüşümlü olarak bağlanıp bir enzim substrat kompleksi meydana getirir. Daha sonra oluşan kompleks ürüne dönüşür.



Burada S; substrat, E; enzim, ES; enzim-substrat kompleksi k_1 , k_{-1} ve k_2 hız sabitleridir. Bir enzimatik reaksiyonun hızı, substrat ve enzim konsantrasyonuna bağlıdır. Michaelis- Menten denklemi, reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Enzimatik reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilirse hiperbolik bir eğri meydana gelir. Leonor Michaelis ve Maud Menten bu hiperbolik eğri eşitliğini enzim kinetiğine uygulayarak, Michaelis-Menten denilen aşağıdaki eşitliği elde etmişlerdir [14].

$$V_0 = \frac{V_{\text{mak}} [S]}{K_m + [S]} \quad (2. 9)$$

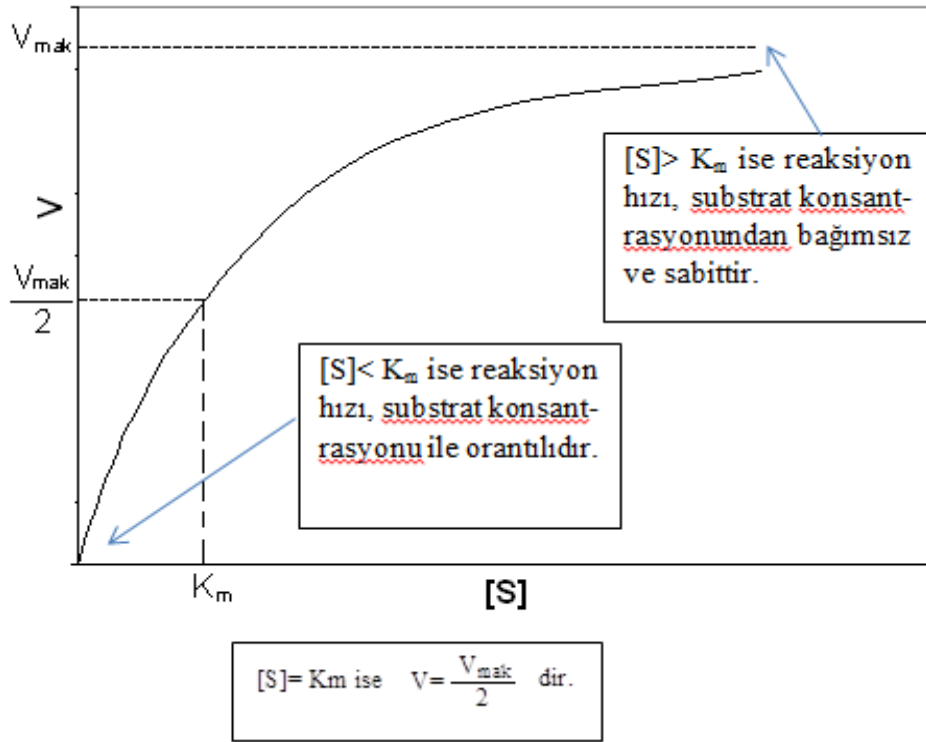
Michaelis-Menten eşitliğinde;

V_0 = ilk hız, V_{mak} : Maksimum hız, $[S]$: Substrat derişimi, K_m : Micheales sabitini göstermektedir. K_m enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. K_m 'nin sayısal değeri, reaksiyon hızının yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonudur. Enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Sayısal olarak küçük K_m , enzimin substrata ilgisinin

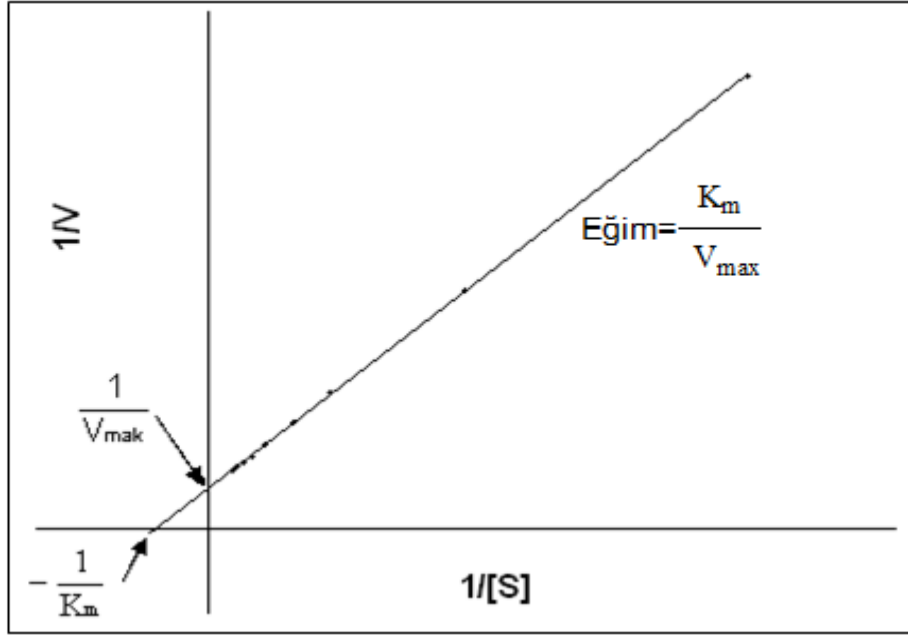
yüksek olduğunu gösterirken, sayısal olarak yüksek K_m ise enzimin substrata olan ilgisinin düşük olduğunu gösterir.

K_m ve V_{mak} değerlerini daha kolay hesaplayabilmek için Michealis-Menten bağıntısı yeniden düzenlenebilir. Eğer $1/V_0$, $1/[S]$ 'ye karşı grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir. Bu grafiğe Lineweaver-Burk grafiği (çift resiprok eğrisi) denir [1].

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{mak}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (2.10)$$



Şekil 2. 1. Michaelis-Menten grafiği



Şekil 2. 2. Lineweaver-Burk grafiği

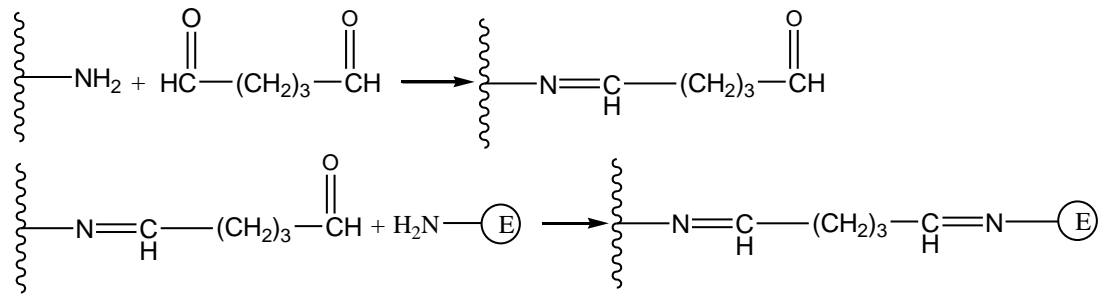
2.9. İmmobilize Enzimler

Enzimler, suda çözünebilen biyokatalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların büyük çoğunluğu çözelti ortamında gerçekleştiği için, biyokatalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması imkansızdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenildiği zaman uzaklaştırılmadığı için, reaksiyonun kontrolü çok zordur. Reaksiyonun istenilen zamanda durdurabilmesi için ortama inhibitör katılması gerekir. İnhibitör ilavesi reaksiyon ortamında kirliliğe neden olur. Reaksiyon ortamında kirlenen ürünün saflaştırılması maliyeti artırır. Bu sorunları çözebilmek ve enzimleri endüstriyel uygulamalarda daha uygun hale getirmek immobilize enzimler kullanılır. Endüstriyel uygulamalarda adsorpsiyon, tutuklama, iyonik bağlama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi yaygın olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemleri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında enzimlerin

kovalent immobilizasyonu kullanıldığı için, kovalent immobilizasyondan kısaca bahsedilecektir.

2.10. Kovalent Bağlanma ile Enzim İmmobilizasyonu

Bu yöntemde enzimler, çeşitli destek materyallerine kovalent bağ ile bağlanırlar. Kovalent bağlanma, enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştirilir. Bu yüzden enzimlerin destek materyale kovalent olarak bağlanabilmesi için destek materyalin amin, hidroksil, karboksil ve epoksi grupları gibi fonksiyonel gruplar içermesi gerekmektedir. Enzim immobilize edilmeden önce, destek materyal üzerindeki fonksiyonel gruplar aktive edilmelidir. Enzim proteinindeki bazı gruplar ile aktive edilmiş destek materyalinin reaksiyona girmesi sonucunda, enzimin kovalent immobilizasyonu gerçekleşir. Bir enzimin, amin grupları içeren bir destek materyale kovalent bağlanma ile immobilizasyonu şekil 2.3’de verilmiştir [15].

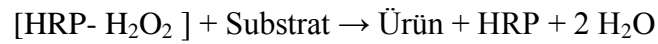


Şekil 2.3. Amin grupları içeren destek materyaline kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu

Kovalent bağlanma ile immobilize enzim, destek materyalin yüzeyinde bulunduğu için substrat ile kolayca etkileşmesi gibi avantaja sahip iken, bağlanma sonucu enzimin aktif merkezinin kısmen bloke olabildiği ve immobilizasyon için optimum şartların belirlenmesinin zor oluşu gibi dezavantajlara da sahiptir. Bu dezavantajlarına rağmen enzimlerin kovalent immobilizasyonu yüksek aktivite sağladığından, analitik amaçlar için uygulanan bir yöntemdir [16].

2.11. HRP Enziminin Özellikleri

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), oksitleyici olarak hidrojen peroksit kullanan oksidoredüktazlardır. Türlerinin büyük bir çoğunluğu N-bağlı oligosakkarit içeren glikoproteinlerdir [17]. Hücre içerisinde toksik bir ürün olan hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında rol aldığı için birçok organizmada bulunur.

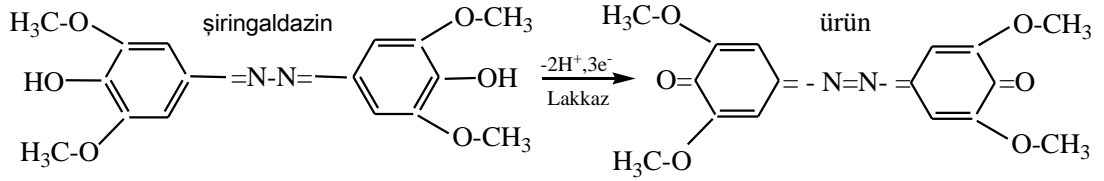


Yabancu köklerinden izole edilen HRP, başlıca tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Fenol, bifenol, anilin gibi aromatik bileşiklerin ve azo boyaların atık sulardan giderilmesi gibi endüstriyel uygulamalarda etkili olduğu da bilinmektedir [18, 19, 20].

2.12. Lakkaz Enziminin Özellikleri

Gliko protein yapısına sahip olan lakkaz enzimi, her molekülü dört bakır iyonu içeren bir oksidoredüktazdır. Bilinen en eski enzim olup, 1883 yılında Yoshida tarafından, *Rhus vernicifera*'nın öz suyundan izole edilmiştir. Bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve mantarlardan izole edilebilmektedir [21].

Optimum pH aralığı 3,0-7,5 olan lakkaz enziminin, optimum sıcaklık aralığı ise 40-80 °C arasında değişmektedir. 4-benzendiol, siringaldazin, naftol, diklorofenol, metoksifenol, askorbat, pirogallol, kresol, syringic asit vb. türevleri, lakkaz enziminin reaksiyon verdiği substratlardandır. Şekil 2.4' te bu tez çalışmasında substrat olarak kullanılan şiringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime ve sonuçta oluşan ürün gösterilmektedir [22].



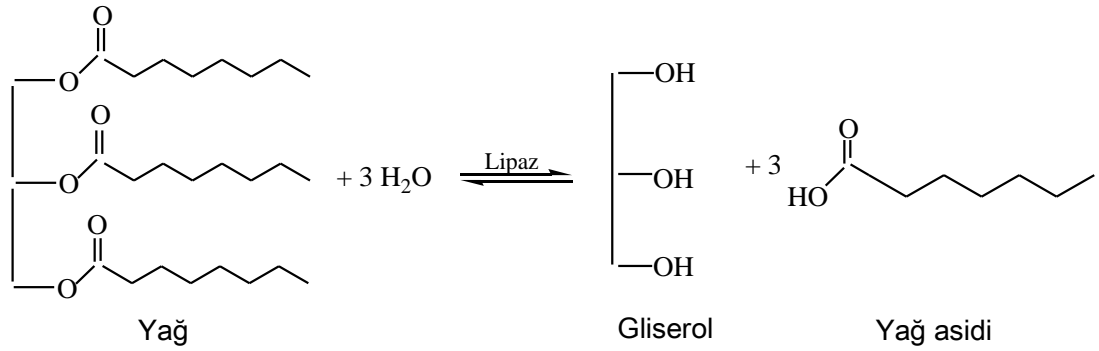
Şekil 2. 4. Şiringaldazinin Lakkaz ile Tepkimesi

Oksideradüktazlar sınıfından olan lakkaz enzimleri son yıllarda, büyük oranda parçalanmayan çevresel kirlilikleri, fenolik ve fenolik olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme yeteneklerinden dolayı, birçok biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirler [23, 24].

2.13. Lipaz Enziminin Özellikleri

Lipaz enzimleri, yağlar ve yağ asidi esterlerini hidroliz ederler. Lipaz, emülsiyonun yağ-su geçiş fazında katalizini gerçekleştirir [25]. Lipaz enziminin hidroliz reaksiyonu Şekil 2.5.'te gösterilmiştir [26].

Lipaz enzimleri; bakteri, maya ve küflerden izole edilmektedir. Lipaz enzimlerinin, gıda endüstrisi, biyosensörler, biyodizel ve pestisitlerin yapımı, deterjan ve deri sanayii, çevre yönetimi, kozmetik ve parfüm sanayii gibi uygulama alanları bulunmaktadır [27, 28].



Şekil 2.5. Yağların lipaz enzimi ile hidroliz tepkimesi

2.14. Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında; HRP, lakkaz ve lipaz gibi bazı endüstriyel enzimlerin immobilizasyonu için yeni bir destek materyalinin üretilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, hidrofobik bir yapıya sahip olma haricinde, bir enzim destek materyalinde bulunması gereken birçok özelliği (mekanik kararlılığa sahip olma, pH

ve çözücülere karşı dayanıklı olması) taşınmasından dolayı, PET lifler kullanıldı. PET lifin çözelti ortamından istenildiği zaman uzaklaştırılabilme kolaylığı sağlaması başka bir tercih nedenidir.

PET lifin hidrofilik özelliğini geliştirmek için, GMA/ MAAm monomer karışımı aşılansarak, lifler üzerinde polar gruplar oluşturulmuştur. Böylece PET lifler üzerinde, HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin bağlanabileceği fonksiyonel gruplar oluşturularak endüstriyel öneme sahip enzimlerin kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilize ve serbest enzimlerin aktiviteleri ve kararlılıkları belirlenerek, immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalara yönelik kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.15. Literatür Özeti

2.15.1. PET Lif'in Aşı Kopolimerizasyonu ile İlgili Literatür Taraması

Farklı monomer veya monomer karışımlarının PET veya benzer destek maddeleri üzerine aşılmasına ilişkin, son yıllarda yapılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Azizinezhad, PET lifler üzerine BPO başlatıcısı yardımıyla, 2-hidroksi propil metakrilat /akrilik asit monomer karışımını aşlamış, monomer karışımı aşılans PET lifleri karakterize ederek, 90 °C sıcaklık, 1 saat polimerizasyon süresi ve $[BPO] = 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ başlatıcı derişiminde en yüksek aş verimini elde etmiştir. Fariborz çalışmasında, aşılans PET liflerin asidik ve bazik boyalar ile boyanabilme özelliklerini de araştırmıştır [29].

Azizinezhad, başka bir çalışmasında PET lifler üzerine, 4,4'-azobis (4-siyanovalerik asit) başlatıcısı yardımıyla, 2-hidroksipropil metakrilat monomerini aşılıyarak, aşılama şartlarını optimize etmiş, aşılama kinetiğini araştırmıştır. Çalışma sonucunda aşılama hızının, monomer derişimine 1,25 ve başlatıcı derişimine ise 0,90'ncı dereceden bağı olduğunu rapor etmiştir [30].

Coşkun ve Akdeniz, PET lifler üzerine maleik asit/metakrilamit monomer karışımını BPO başlatıcısı yardımıyla aşılıyarak, aşılama verimine bazı parametrelerin etkisini araştırmışlardır. Daha sonra monomer karışımı aşılanmış PET liflerin, su tutma kapasitesi, asidik ve bazik boyalar ile boyanabilme özelliklerini incelemişlerdir [31].

Liu ve arkadaşları poli etilen üzerine, mikrodalga yöntemi kullanarak, akrilonitril / akrilik asit monomer karışımlarını aşılımış, aşılama kinetiğini incelemişlerdir. Çalışmalarında nitril gruplarının varlığının yapıyı daha hidrofil yaptığını rapor etmişlerdir [32].

Seko ve arkadaşları, poli etilen lifler üzerine mikrodalga yöntemini kullanarak GMA monomerini, bir yüzey aktif madde olan sodyum dodesil sülfat varlığında aşılımış, aşılama şartlarını belirlemişlerdir [33].

Kordoghli ve arkadaşları, 254 nm'de UV ışınları yardımıyla, klor gazını elektrofilik substitüsyon reaksiyonu ile PET kumaş aşılımışlardır. Aşılama sonucunda modifiye PET lifin katyonik boylarla daha kolay boyanabildiğini rapor etmişlerdir [34].

Mohamed ve arkadaşları, PET kumaş üzerine dimetilaminopropil metakrilamit (DMAPMA) monomerini, UV ışınları yardımı ve benzofenon başlatıcısı kullanarak aşılımışlardır. Çalışmada ayrıca modifiye edilen PET liflerin antibakteriyel özellikleri de incelenmiştir [35].

Arslan, PET lifler üzerine, GMA monomerini aşılıyarak, aşılama şartlarını optimize etmiştir. Daha sonra, aşılanmış PET lifleri 1,6-diamino hekzan ile modifiye ederek, sulu ortamda asidik boya (Kongo kırmızısı) gideriminde kullanmıştır [36].

Arslan başka bir çalışmasında, PET liflere, akrilamit/HEMA monomer karışımını BPO başlatıcısı yardımıyla aşılama, aşılama şartlarını belirleyerek, monomer karışımı aşılanmış PET lifleri karakterize etmiştir [37] .

Liu ve Sun PET üzerine alil bir monomer olan 3-allil-5,5-dimetilhidantoin (ADMH)'i BPO başlatıcısı yardımıyla aşılama, aşılama şartlarını optimize ederek ürünü karakterize etmişlerdir [38].

Coşkun, PET lifler üzerine krotonik asit/metakrilamit monomer karışımını BPO başlatıcısı yardımıyla aşılıyarak, aşılama verimine bazı parametrelerin etkisini araştırmıştır. Daha sonra monomer karışımı aşılanmış PET liflerin, su tutma kapasitesi, asidik ve bazik boyalar ile boyanabilme özelliklerini incelemiştir [39] .

Yiğitoğlu ve Arslan, PET lifler üzerine 4-VP / HEMA monomer karışımını BPO yardımıyla aşılıyarak, aşılama verimine bazı parametrelerin etkisini araştırmışlardır. 4-VP / HEMA monomer karışımı aşılanmış PET liflerin, su tutma kapasitesi, asidik ve bazik boyalar ile boyanabilme özelliklerini incelemiştir [40].

Coşkun, itakonik asit/metakrilamit monomer karışımını, BPO başlatıcısı yardımıyla PET lifler üzerine aşılıyarak, aşılama şartlarını belirlemiştir. Ayrıca monomer karışımı aşılanmış PET liflerin, su tutma kapasitesi, asidik ve bazik boyalar ile boyanabilme özelliklerini incelemiştir [41] .

Liu ve Li, metil akrilatın PET lif üzerine aşılmasında polimerizasyon sıcaklığı 20 °C ile 45 °C arasında tutulmuş ve sıcaklığın yükseltilmesiyle aşılama verimi artmıştır. Ayrıca metil akrilatın PET lif üzerine aşılmasında başlatıcı verimi $16,29 \times 10^{-4}$ mol/L, monomer derişiminin 3,8 mol/L ye kadar arttırılması ile aşılama

veriminin önemli derecede arttığını daha yüksek başlatıcı ve monomer derişimlerinde ise azaldığını gözlemişlerdir [42].

2.15.2. Enzim İmmobilizasyonu ile İlgili Literatür Taraması

Literatürde, son yıllarda bazı destek maddelerine immobilize edilmiş HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerine ilişkin yapılmış bazı çalışmalar rapor edilmiştir.

Prodanović ve arkadaşları, 1,2- diamino etan ile modifiye edilmiş poly(GMA-*ko*-EGDMA) destek maddesi üzerine glutaraldehit ve periyodat varlığında, HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir [43].

Caramori ve Fernandes, poli(etilen tereftalat)- poli(anilin) kompozit karışımı üzerine HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyondan sonra enzim karalılığının arttığını ve immobilize enzimin çok kez kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [44].

Celebi ve arkadaşları çeşitli polisülfon destek maddelerine HRP enzimini kovalent olarak immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimin aktivitesine etki eden bazı parametreleri araştırmışlardır. Ayrıca immobilize enzimin asidik ve bazik boya degradasyonundaki etkisini araştırmışlardır [45].

Arslan, GMA-*g*-PET destek materyalini 1,6- diaminoheksan (HMDA) ile modifiye ederek, HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmiş ve immobilize enzimi boya (metiloranj) degradasyonunda kullanmıştır [46].

Kondyurin ve arkadaşları, modifiye edilmiş polietilene, HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir [47].

Temoçin ve Yiğitoğlu, akrilamit aşılınmış PET lifleri, glutaraldehit ile modifiye ederek, elde edilen destek materyaline HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Bazı parametrelerin, serbest ve immobilize enzimin aktivitesine etkisini araştırmışlardır [48].

Zhai, Zhang ve arkadaşları, kitosan-haloysit hibrit nano tüplerine, glutaraldehit varlığında HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimi, atık sulardaki fenol gideriminde kullanmışlardır [49].

Sathishkumara ve arkadaşları, selülöz nano fiberler üzerine, lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Immobilize lakkaz enziminin tekstil atık sularındaki boya gideriminde kullanılabileceği sonucunu rapor etmişlerdir [50].

Cristovaoa ve arkadaşları, yeşil Hindistan cevizi lifleri üzerine ticari lipaz enzimini adsorpsiyon yöntemi ile immobilize ederek, immobilize enzimi tekstil atık sularındaki boya degradasyonunda kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [51].

Palvannan ve arkadaşları, poliüretan nano fiberler üzerine, glutaraldehit üzerinden lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir [52].

Fatarellaa ve arkadaşları, naylon 6 film ve nano fiberler üzerine, lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize ederek, ilginç özellikleri ile immobilize enzimin endüstride kullanılabilecek önemli bir biyokatalizör olabileceğini rapor etmişlerdir [53].

Kanmani ve arkadaşları, *Staphylococcus pasteurii*'den izole ettikleri lipaz enzimini saflaştırarak yağların biyodegradasyonunda kullanmışlardır. İzole ettikleri enzimin, deterjan formülasyonları ve biyodizel üretimi gibi endüstriyel uygulamalar için uygun olduğunu rapor etmişlerdir [54].

Yücel ve arkadaşları, üç farklı kaynaktan elde edilmiş lipaz enzimini, selit 545, silika jel ve stiren-divinil benzen kopolimeri olmak üzere üç ayrı destek

materyaline adsorpsiyon ve kovalent yöntemlerini kullanarak immobilize etmişlerdir. Daha sonra immobilize enzimleri bitki yağlarından biyodizel üretiminde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [55].

Temoçin, hidrofobik bir destek maddesi olan PET-g- GMA üzerinde, etilen diamin ile amin grupları oluşturmuştur. Glutaraldehit ile aktive edilmiş destek materyale lipaz enzimini kovalent olarak immobilize etmiştir. Daha sonra immobilize enzimi zeytinyağının hidrolizi ve oleik asitin esterleşme reaksiyonunda kullanmıştır [56].

Guan-Jie Chen ve arkadaşları hidrofobik ve hidrofilik özelliklere sahip olan selülöz, cam elyafı ve poliviniliden florür destek maddelerini, 1,4-diamino metan ile modifiye ettikten sonra glutaraldehit ile aktive edip, lipaz enzimini kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir [57].

Zhu ve Sun, glutaraldehit ile aktive edilmiş Poly (vinil alkol-ko-etilen) (PVA-ko-PE) nanofiber membranlara lipaz enzimini kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin endüstride kullanılabilecek iyi bir biyokatalizör olabileceğini rapor etmişlerdir [58].

Li ve Chen, poli(propilen), PET ve viskoz fiber gibi destek maddeleri üzerine lipaz enzimini glutaraldehit varlığında kovalent immobilizasyonlarını karşılaştırmalı olarak yapmışlardır [59].

Sheng-Feng Li, Yi-Hsuan Fana ve arkadaşları, poli (akrilonitril) (PAN) nano fiber membranı üzerine lipaz enzimini kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimi endüstride, biyodizel üretimi gibi esterleşme reaksiyonlarında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [60].

Yiğitoğlu ve Temoçin, bazı bitkisel yağların hidrolizinde kullanmak üzere, glutaraldehit ile aktive edilmiş poliester lifler (PET-g-AAm) üzerine lipaz immobilize etmişlerdir [61].

Ashjaria ve arkadaşları, epoksi grubu ile fonksiyonlandırılmış silika ve silika nano parçacıklara (MCM-41 ve SBA-15), lipaz enzimini çoklu noktadan kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin aktivite şartlarını araştıran Ashjaria ve arkadaşları immobilizasyondan sonra immobilize lipaz enzimin çoklu bağlanmadan dolayı stabilitesi ve yeniden kullanılabilme özelliğinin çok geliştiğini rapor etmişlerdir [62].

Milena de Souza Bezerra ve arkadaşları, yeşil Hindistan cevizi liflerine lakkaz enzimini immobilize ederek, immobilize enzimi elma suyunun arıtılmasında (renginin berraklaştırılmasında) kullanmışlardır. İmmobilize enzimi 10 kez kullandıklarında immobilize enzimin başlangıç aktivitesini yaklaşık olarak koruduğu ve bulanıklığı % 29 oranında azalttığını rapor etmişlerdir [63].

Khoobi ve arkadaşları, polietilen imin (PEİ) ile modifiye edilmiş, süperparamagnetik Fe₃O₄ nanoparçacıklara lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Ürünü karakterize ederek, immobilize enzimi *n*-hekzan ve serbest çözücü ortamında, etil valeratın esterleşme reaksiyonunda kullanmışlardır. İmmobilize lipaz enzimi *n*-hekzan ve serbest çözücü ortamındaki esterleşme yüzdesini sırasıyla, % 72,9 ve % 28,9 olarak rapor etmişlerdir [64].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Cihaz ve Düzenekler

Bu tez çalışmasında; Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler ve Koordinasyon Birimi (BAP)' tan 2012/6 nolu proje kapsamında aşağıdaki cihazlar hizmet alımı gerçekleştirilerek kullanılmıştır.

İnfrared spektrumları, Merkezi Araştırma Laboratuvarından hizmet alımı ile, Bruker marka, vartex 70 V model FTIR spektrofotometresi ile elde edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri, Merkezi Araştırma laboratuvarından hizmet alımı ile JOEL JSM 5600 model elektron mikroskobu ile elde edilmiştir.

Numunelerin elementel analizi, Merkezi Araştırma Laboratuvarından hizmet alımı ile LECO CHNS 932 marka ve model cihaz ile yapılmıştır.

Numunelere ait DSC eğrileri, Merkezi Araştırma Laboratuvarından hizmet alımı ile TA Q 2000 model diferansiyel tarama kalorimetresi ile elde edilmiştir.

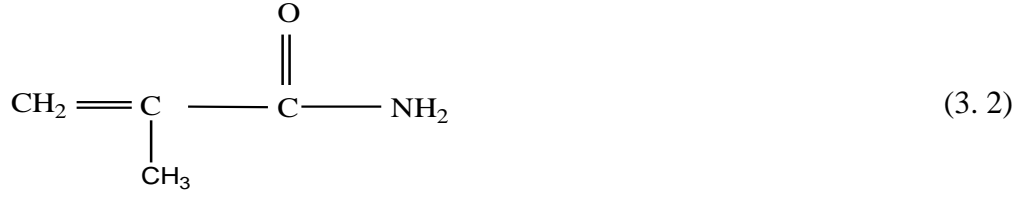
Numunelere ait TGA eğrileri, Merkezi Araştırma Laboratuvarından hizmet alımı ile TA Q500 model termo gravimetrik analiz cihazı ile elde edilmiştir.

Deneyisel çalışmalarda, hizmet alımı dışında kullanılan cihaz ve düzenekler aşağıda verilmiştir.

Çözeltilerin renk yoğunluğu, TU-1810 DASPV model UV-Visible spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

Çözeltilerin pH değerlerini ölçmek için Hanna marka 221 model dijital pH metre kullanılmıştır.

Metakrilamit (MAAm): MAAm'in kimyasal yapısı aşağıdaki şekildedir. Fiziksel özellikleri ise Çizelge 3.2.'de verilmiştir.



Çizelge 3.2. MAAm'in fiziksel özellikleri

Formülü	C ₄ H ₇ ON
MA (g/mol)	85,1
E.N. (° C)	106-110
Sudaki çözünübilirliği (25 ° C'de)	202 g/L
K.N.(° C)	215

Başlatıcı: Bu çalışmada başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO) Merck firmasından temin edilmiştir. Metanol ve kloroform karışımında kristallendirilerek kurutu olduktan sonra kullanılmıştır.

Diğer kimyasal maddeler: Analitik saflıkta olan metanol, kloroform, etanol, asetik asit, sodyum asetat, glisin, sitrik asit, Kongo kırmızısı, metilen mavisi, fosforik asit, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, borik asit, glutaraldehit, izooktan, fenol, bakır (II) sülfat, piridin, oleik asit Sigma-Aldrich firmasından, sodyum dihidrojen fosfat, aseton, hidrojen peroksit Panreac firmasından, sitrik asit, sodyum karbonat Daejung firmasından, etilen diamin, sodyum hipoklorit Merck firmasından temin edildikleri şekilde kullanılmışlardır. *Horseradish* kaynaklı HRP (EC 1.11.1.7) ve pirogallol Sigma firmasından temin edilmiştir. Lakkaz, *Trametes Versicolor* kaynaklı olup, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin (şiringaldazin) ile birlikte Sigma- Aldrich

firmasından temin edilmiştir. Lipaz, *Candida Rugosa* kaynaklı olup, Sigma firmasından satın alınmıştır.

3.3. Aşı Kopolimerizasyon Yöntemi

PET lifler üzerine, GMA/MAAm monomer karışımı aşağıda özetlendiği şekilde aşılanmıştır. PET lifler 100 mL'lik polimerizasyon tüpüne alındıktan sonra, üzerine uygun miktarlarda monomer karışımı (GMA/MAAm) ilave edilmiştir. Daha sonra karışım üzerine 2 mL asetonda çözülmüş BPO ilave edilip, su ile 20 mL'ye tamamlanarak sıcaklığı kontrol edilebilen bir su banyosuna daldırılmıştır. Belirli bir süre sonunda, polimerizasyon ortamından alınan lif örnekleri önce 8 saat sokslet'de aseton ile daha sonrada 6 saat 50-60 °C'deki suda yıkanmıştır. Aşılanmış PET lifler 50 °C'de kurutulduktan sonra aşılama yüzdesi hesaplanmıştır. Aşılama yüzdesi (%A), orijinal ve aşılanmış lif kütlelerinden aşağıdaki eşitlik yardımıyla gravimetrik olarak hesaplanmıştır [65].

$$\%A = \frac{m_g - m_o}{m_o} \times 100 \quad (3.3)$$

m_g : aşılanmış lifin kuru kütlesi

m_o : orijinal lifin kuru kütlesi

3.4. GMA/MAAm Aşılanmış PET Liflerde Metakrilamid Miktarının Tayini

Monomer karışımı aşılanmış PET liflerde, yapıya dahil olan metakrilamid miktarı, elementel analiz yöntemiyle bulunan azot miktarından, aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır [41].

$$\% \text{MAAm} = \% \text{N} \left(\frac{m_g}{m_o \cdot 14} \right) \times M \quad (3.4)$$

M: metakrilamidin molekül kütlesi (85,10 g/mol)

m_g : aşılanmış lifin kütlesi

m_o : aşılanmamış lifin kütlesi

PET life aşılana GMA aşu miktarı ise toplam aşılama miktarından, MAAm aşu miktarının çıkarılması ile elde edilmiştir.

3.5. Aşılanmış PET Liflerin Su Tutma Kapasitelerinin Tayini

Farklı aşu yüzdelerine sahip PET lifler, deiyonize su içerisinde oda sıcaklığında 48 saat bekletilmiştir. Su içerisinde alınan lifler, filtre kâğıdı arasında kurulanıp tartılmıştır. Liflerin su tutma kapasiteleri % olarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır [40].

$$\% \text{ Su tutma kapasitesi} = \frac{m_s - m_k}{m_k} \times 100 \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte;

m_s : Suda bekletilmiş PET lifin kütlesi (g),

m_k : Kuru PET lifin kütlesi (g).

3.6. PET Liflerin Boyanması ile İlgili Deneyler

Aşılammamış ve farklı yüzdelerdeki GMA/MAAm aşılammamış PET lifler, 50 mg/L derişimindeki Kongo kırmızısı boya ile literatürde belirtilen şartlarda [36, 40], 150 dak süreyle karıştırılmıştır. Farklı çözeltilerdeki boya miktarı daha önceden hazırlanmış çalışma eğrisi yardımıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ölçümler TU-1810 DASPV model bir spektrofotometre ile 497 nm'de yapılmıştır.

Aşılammamış ve farklı yüzdelerdeki GMA/MAAm aşılammamış PET lifler, 50 mg/L derişimindeki metilen mavisi ile optimum şartlarda [40], 150 dak süreyle karıştırılmıştır. Farklı çözeltilerdeki boya miktarı daha önceden hazırlanmış çalışma eğrisi yardımıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ölçümler TU-1810 DASPV bir spektrofotometre ile 665 nm'de yapılmıştır.

3.7. Lif Çaplarının Ölçülmesi ve SEM Fotoğrafları

Aşılammamış ve aşılammamış PET liflerin çap ölçümleri ve SEM fotoğrafları JOEL Model JSM 5600 elektron mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, lif

örneklerinin 2-3 ayrı bölgesinden alınarak, ortalamaları çap değeri olarak kabul edilmiştir.

3.8. Aşılınmış PET Liflerin Tg Değerlerinin Bulunması

Termal analizler TA Q 2000 model diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazı ile yapılmıştır. Örnekler 10°C/dak. ısıtma hızında 90 °C ye kadar ısıtılmıştır. Bu sıcaklıkta 10 dak izotermal olarak bekletilip 0 °C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra 10 °C/dak ısıtma hızı ile tekrar 400 °C'ye kadar ısıtılarak DSC termogramları alınıp, Tg değerleri bulunmuştur.

3.9. Termogravimetrik Analiz (TGA)

TGA, 25-900 °C aralığında TA Q500 model TGA cihazı kullanılarak akış hızı 200 ml/dak olan He atmosferinde yapılmıştır. Örnekler oda sıcaklığından başlayarak 10 °C/dak'lık bir ısıtma hızı ile ısıtılmıştır.

3.10. PET Liflerin FTIR Analizi

GMA/MAAm monomer karışımı aşılınmış PET lif örneklerinin FTIR spektrumları Bruker marka, vartex 70 V model spektrofotometresi ile alınmıştır.

3.11. Enzim Çalışmaları

3.11.1. Enzim Destek Materyalinin Hazırlanması

GMA/MAAm aşılınmış PET lif, bu çalışmada enzim destek materyali olarak kullanılmıştır. Enzimin destek materyaline bağlanmasında, kovalent bağlanma yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla aşılınmış PET lif üzerine enzim immobilizasyonu aşağıdaki adımlar ile gerçekleştirilmiştir.

1. Immobilizasyonun GMA üzerinden gerçekleştirilmesi, literatürde tanımlandığı gibi yürütülmüştür. Bunun için monomer karışımı aşılınmış PET lif, etilendiamin (EDA) içerisinde belirli bir süre karıştırılarak modifiye edilmiş ve lifler üzerinde amin grupları oluşturulmuştur [56]. Bu gruplar glutaraldehit ile aktive edilerek enzim immobilize edilmiştir.
2. Monomer karışımı aşılınmış PET lif üzerindeki amit gruplarının amin gruplarına dönüşümünü gerçekleştirmek için, Hofmann dönüşüm reaksiyonu kullanılmıştır [48]. Amin grupları glutaraldehit ile aktive edilerek enzim immobilize edilmiştir.

Hofmann dönüşüm reaksiyonu için; 0,03 g kütleli GMA/MAAm -g-PET lif örnekleri, belirli derişimlerde, NaOH (10 ml) ve NaOCl (10 ml) çözeltileri içerisinde alınarak, oda sıcaklığında 150 rpm hızda karıştırılmıştır. Ortamdan alınan PET lif örnekleri, tampon çözelti ve saf suda bir kaç kez yıkandıktan sonra kullanılmıştır. Hofmann dönüşüm reaksiyonuna NaOH, NaOCl derişimi ve karıştırma süresinin etkisi araştırılmıştır. Ayrıca modifiye edilmiş PET liflere glutaraldehitin bağlanma süresi ve enzim immobilizasyon süresi de optimize edilmiştir.

3. Monomer karışımı aşılınmış PET lifler, önce birinci adım daha sonra ikinci adım kullanılarak modifiye edilmiştir. Her iki adım sonucu PET lifler üzerinde oluşan amin grupları, glutaraldehit ile aktive edilerek enzim immobilize edilmiştir.

İmmobilizasyon sonucunda enzimin en yüksek aktivite gösterdiği adım ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.11.2. Modifiye PET Liflerin FTIR Analizi

Aşılınmamış, GMA/ MAAm monomer karışımı aşılınmış, EDA - Hofmann reaksiyonu ile modifiye edilmiş ve glutaraldehit ile aktive edilmiş PET lif örneklerinin FTIR spektrumları Bruker marka, vartex 70 V model spektrofotometresi ile alınmıştır.

3.11.3. Enzim İmmobilizasyonu

Önce EDA ile daha sonra Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiş PET lif örnekleri, %4 (m/v) derişimli 5 mL hacimli glutaraldehit çözeltisi ile belirli bir süre 150 rpm hızda karıştırılarak aktive edilmiştir. Aktivasyon işleminden sonra PET lif örnekleri önce tampon çözelti (pH=7) ile daha sonra deiyonize su ile birkaç kez yıkanmıştır. Glutaraldehit ile aktive edilmiş PET lifler, içerisinde belirli derişim ve hacimlerde enzim çözeltisinin bulunduğu vialler içerisinde belirli bir süre ve hızda karıştırılarak, enzimin liflere immobilize olması sağlanmıştır. Enzim

immobilize edilmiş PET lifler, aktivite deneylerinde kullanılmadan önce tampon çözelti (pH=7) ve deiyonize suda yıkanmıştır.

3.11.4. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.11.4.1. HRP Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Pirogallol ve hidrojen peroksit, HRP enziminin aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak, kullanılmıştır. Belirli derişimdeki 2 ml pirogallol çözeltisi üzerine 1,5 mL tampon çözelti ve 0,5 mL hidrojen peroksit çözeltisi (10 mmol/L) eklenmiştir. Serbest HRP aktivitesi, aktivite ortamına enzim (0.02 mg/ml, 0.03ml) ilavesinden 1 dakika sonra, immobilize HRP aktivitesi ise aktivite ortamına enzim immobilize edilmiş lif dahil edildikten 4 dakika sonra, ortamdaki örnek alınarak belirlenmiştir. Aktivite deneyleri, aynı şartlarda serbest ve immobilize HRP enzimlerinin bulunmadığı ortamda tekrarlanarak, elde edilen absorbans değerleri referans değerler olarak kabul edilmiştir. Purpurogallin'in 0,125–1 µmol/mL derişim aralığında bir seri çözeltisi hazırlanarak, HRP aktivitesinin belirlenmesinde kalibrasyon grafiğı olarak kullanılmıştır. HRP enziminin aktivitesi, ortamda ürün olarak oluşan purpurogallin çözeltisinin renk yoğunluğunun 420 nm dalga boyunda bir UV-visible spektrofotometre ile ölçülmesiyle belirlenmiştir.

1 Ünite (HRP aktivitesi), dakikada mL'de 1µmol ürün (purpurogallin) açığa çıkaran HRP miktarı olarak tanımlanmıştır. Serbest ve immobilize HRP enziminin % bağıl aktivitesi, her çalışma için aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl aktivite (\%)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.11.4.2. Lakkaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Şiringaldazin, lakkaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılmıştır. Aktivite ortamında 3 mL tampon çözelti üzerine 1 mL şiringaldazin çözeltisi (0,3 mM) eklenmiştir. Serbest lakkaz aktivitesi, aktivite ortamına (0,03 mL, 0,2 mg/mL) lakkaz ilavesinden 10 dakika sonra, immobilize lakkaz aktivitesi ise aktivite ortamına enzim immobilize edilmiş lif dahil edildikten 20 dakika sonra, ortamdaki örnek alınarak belirlenmiştir. Aktivite deneyleri aynı şartlarda serbest ve immobilize lakkazın bulunmadığı ortamda tekrarlanarak elde edilen absorbans değerleri referans değerler olarak kabul edilmiştir. Enzim aktivitesi, ortamda oluşan pembe renkli ürünün, derişim değişimi takip edilerek belirlenmiştir [66]. Kalibrasyon grafiği için farklı derişimlerde (0,05-0,6 mM) şiringaldazin çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu derişimlerdeki çözeltilerden 1'er mL alınarak üzerlerine 3 mL tampon çözelti ve 0,03 mL enzim (0,2 mg/mL) çözeltisi eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika çalkalandıktan sonra oluşan pembe renkli çözeltilerin renk yoğunluğu 525 nm dalga boyunda bir UV- visible spektrofotometre ile belirlenmiştir.

1 Ünite (lakkaz aktivitesi); dakikada, mL'de 1 µmol ürün (kinon) açığa çıkaran lakkaz miktarıdır. Serbest ve immobilize lakkaz enziminin % bağıl aktivitesi, her çalışma için aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl aktivite (\%)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (3.7)$$

3.11.4.3. Lipaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Zeytinyağı, lipaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılmıştır. Zeytinyağı izooktan içerisinde çözülerek organik bir faz elde edilmiştir. Lipaz enzimi için aktivite deneyleri, organik faz ile tampon çözeltinin oluşturduğu iki fazlı reaksiyon ortamında yürütülmüştür. Serbest (1mg/ml, 0,1ml) ve immobilize lipaz enzimleri, 2 mL zeytinyağı-izooktan çözeltisi ve 2 mL tampon çözeltiden oluşan iki fazlı hidroliz ortamında, sıcaklığı 35 °C'ye ayarlanmış bir çalkalayıcı su banyosunda 150 rpm hızda ve 30 dak süre ile inkübe edilmiştir. Hidroliz ürününü içeren organik faz deney tüpüne alınmıştır. Aktivite deneyleri aynı şartlarda serbest ve immobilize lipazın bulunmadığı ortamda tekrarlanarak elde edilen absorbans değerleri referans değerler olarak kabul edilmiştir. Lipaz enziminin aktivitesi, zeytinyağını hidroliz etmesi sonucu oluşan serbest yağ asidinin derişim değişimi takip edilerek belirlenmiştir. Hidroliz sonucu açığa çıkan serbest yağ asidinin derişimi, yağ asitlerinin Cu(II) iyonları ile izooktan içerisinde oluşturdukları çözeltinin renk yoğunlukları 715 nm dalga boyunda bir UV- visible spektrofotometre ile belirlenmiştir [56, 61].

Derişim aralığı 0,5–3 mg/mL olan, bir seri oleik asit- izooktan çözeltisi ile kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Serideki her bir çözeltinin 2 mL'si, içerisinde 0,5 mL bakır- piridin reaktifinin bulunduğu deney tüplerine aktarılmıştır. Tüpler bir vorteks karıştırıcı ile bir dakika boyunca şiddetli karıştırıldıktan sonra izooktan ve su

fazının ayrılması için dinlendirilmiştir. Tüplerdeki organik fazın renk yoğunluğu, bir UV-visible spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bakır-piridin reaktifini hazırlamak için 5 g Bakır(II) asetat deiyonize suda çözülerek bir gece dinlenmeye bırakılmıştır. Süzülerek ayrılan çözeltinin pH'sı, piridin ile pH= 6'ya ayarlanarak hacmi deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 Ünite (Lipaz enzim aktivitesi); dakikada, mL'de 1 µmol serbest yağ asidi açığa çıkararak lipaz miktarı olarak tanımlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz enziminin % bağıl aktivitesi, her çalışma için aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl aktivite (\%)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (3.8)$$

3.11.5. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilizasyonuna, çözelti pH'ının ve PET lifin aşılama yüzdesinin etkisi araştırılmıştır.

HRP enzimi için pH= 3-8, lakkaz için pH= 4-8 ve lipaz için pH= 3-8 aralıklarında ayarlanmış enzim çözeltileri ile immobilizasyon işlemi gerçekleştirilerek, söz konusu enzimlerin immobilizasyonuna çözelti pH'ının etkisi araştırılmıştır. Lifler tampon ve deiyonize suda yıkandıktan sonra enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH değerleri, her bir enzimin immobilizasyonu için en uygun pH değeri olarak kabul edilmiştir.

Farklı aşılama yüzdelerine sahip PET lifler kullanılarak, aşılama yüzdesinin enzim immobilizasyonuna etkisi araştırılmıştır. Maksimum aktivitenin elde edildiği aşılama yüzdesi, immobilizasyon için en uygun aşılama yüzdesi olarak kabul edilmiştir.

3.11.6. Enzim Aktivite Şartlarının Optimizasyonu

3.11.6.1. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin aktivitelerine pH'nın etkisi, farklı pH'larda (pH= 3-9) 0,05 M tampon çözeltiler içinde hazırlanmış 10 mmol / L derişimindeki pirogallol çözeltileri ile 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında sırasıyla 1 ve 4 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin aktivitelerine pH'nın etkisi, farklı pH'larda (pH= 4,5-7) 0,05 M tampon çözeltiler içinde hazırlanmış 0,3 mmol / L derişimindeki şiringaldazin çözeltileri ile 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında sırasıyla 10 ve 20 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktivitelerine pH'nın etkisi, farklı pH'larda (pH= 4-9) 0,05 M tampon çözeltiler ile izooktanda çözülmüş zeytinyağı çözeltilerinden oluşan iki fazlı sistem hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz'ın aktiviteleri, iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda, 35 °C'de ve 30 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

3.11.6.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin aktivitelerine sıcaklığın etkisi, daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da, 10 mmol / L derişime sahip olan pirogallol çözeltileri ile 150 rpm hızda ve 20- 70 °C sıcaklık aralığında sırasıyla 1 ve 4 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin aktivitelerine sıcaklığın etkisi, daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da, 0,3 mmol / L derişime sahip olan şiringaldazin çözeltileri ile 150 rpm hızda ve 20- 70 °C sıcaklık aralığında sırasıyla 10 ve 20 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktivitelerine sıcaklığın etkisini araştırmak için, daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da, 455 mg/mL olan izooktan içerisinde çözülmüş zeytinyağı çözeltisi ve tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz'ın aktivitelerine sıcaklığın etkisi, iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 20–70 °C sıcaklık aralığında 30 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

3.11.6.3. Enzim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin aktivitelerine substrat derişiminin etkisi, daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da, derişimi 0,5-30 mmol / L olan bir seri pirogallol çözeltileri ile 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında sırasıyla 1 ve 4 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin aktivitelerine substrat derişiminin etkisi, daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da, derişimi 0,025-0,6 mmol / L derişime sahip olan bir seri şiringaldazin çözeltileri ile 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında sırasıyla 10 ve 20 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktivitelerine substrat derişiminin etkisini araştırmak için, derişimi 45,5– 910 mg/mL olan izooktan içerisinde çözülmüş zeytinyağı çözeltisi ve tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz'ın aktiviteleri iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 35 °C'de 30 dak inkübe edilerek belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize HRP, lakkaz, lipaz enzimlerinin aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

3.11.6.4. Enzimlerin Termal Kararlılığı

HRP enziminin termal kararlılığını belirlemek için, serbest ve immobilize enzimin, tampon çözelti içerisinde 60 °C sıcaklığındaki su banyosunda 210 dakika inkübe edilmiştir. Serbest ve immobilize HRP'den belirli zamanlarda örnekler alınarak oda sıcaklığına kadar soğutulup, aktiviteleri derişimi 10 mmol/L olan pirogallol çözeltisi içerisinde, 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında inkübe edilerek belirlenmiştir.

Lakkaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için, serbest ve immobilize enzimin, tampon çözelti içerisinde 45 °C sıcaklığındaki su banyosunda 180 dakika inkübe edilmiştir. Serbest ve immobilize lakkazın belirli zamanlarda örnekler

alınarak oda sıcaklığına kadar soğutulup, aktiviteleri derişimi 0,3 mmol/L olan şiringaldazin çözeltisi içerisinde, 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında inkübe edilerek belirlenmiştir.

Lipaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için, serbest ve immobilize enzim, tampon çözelti içerisinde 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 180 dakika inkübe edilmiştir. Serbest ve immobilize lipaz'dan belirli zamanlarda örnekler alınarak oda sıcaklığına kadar soğutulup, aktiviteleri derişimi 455 mg/mL olan izooktan içerisinde çözülmüş zeytinyağı çözeltisi ve tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda, 35 °C sıcaklıkta ve 30 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

3.11.6.5. Enzimlerin Depolanma Kararlılığı

Serbest ve immobilize HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra, 4 °C'de belirlenen tampon çözeltiler içerisinde 60 gün süre ile depolanmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerinin aktiviteleri, belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak belirlenmiştir.

3.11.6.6. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanım Kararlılığı

Tekrar kullanım kararlılığını belirlemek için immobilize HRP enzimi, derişimi 10 mmol/L olan pirogallol çözeltisi içerisinde, 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her aktivite belirlenmesinden sonra immobilize PET

lif, tampon çözelti ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Aktivite belirleme çalışması 15 defa tekrar edilmiştir.

Tekrar kullanım kararlılığını belirlemek için immobilize lakkaz enzimi, derişimi 0,3 mmol/L olan şiringaldazin çözeltisi içerisinde, 150 rpm hızda ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her aktivite belirlenmesinden sonra immobilize PET lif, tampon çözelti ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Aktivite belirleme çalışması 10 defa tekrar edilmiştir.

Tekrar kullanım kararlılığını belirlemek için immobilize lipaz enzimi, derişimi 455 mg/mL olan izooktan içerisinde çözülmüş zeytinyağı çözeltisi ve tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda, 35 °C sıcaklıkta ve 30 dak inkübe edilmiştir. Her aktivite belirlenmesinden sonra immobilize PET lif, tampon çözelti ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Aktivite belirleme çalışması 10 defa tekrar edilmiştir.

3.11.7. Enzim Uygulamaları

3.11.7.1. HRP ve Lakkaz'ın Fenol Degradasyonunda Kullanımı

Fenol degradasyonunda % 117 GMA/MAAm (30/70 mol) aşılınmış PET lifler kullanılmıştır. Monomer karışımı aşılınmış PET lifler, bölüm 3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Monomer karışımı aşılınmış PET lifler, önce EDA ile daha sonrada Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiştir (3.12.1). Daha sonra modifiye PET lifler glutaraldehit ile aktive edilerek enzim immobilize edilmiştir (3.12.2).

HRP ve lakkaz immobilize edilmiş PET liflerin fenol degradasyonunda kullanılması çalışmasında Hou ve arkadaşlarının [67] önerdiği yöntem kullanılmıştır.

HRP ve lakkaz enzimlerinin fenol degradasyonunda kullanılması serbest ve immobilize enzim için aynı anda gerçekleştirilmiştir. HRP için aktivite ortamı; 0,5 ml fenol (200 mM), 0,5 ml H₂O₂ (400 mM), 0,5 ml 4-amino antipirin ve 2,5 ml tampon çözelti (pH=7, fosfat) olarak belirlenmiştir. Lakkaz için aktivite ortamı ise; 0,5 ml fenol (200 mM) çözeltisine 0,5 ml 4-amino antipirin ve 3 ml tampon çözelti (pH=7, fosfat) olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzim eklendikten sonra, belirli zamanlarda ortamdan örnekler alınarak, enzimlerin fenol degradasyonundaki aktiviteleri 510 nm'de spektrofotometre ile belirlenmiştir. Aktivite deneyleri aynı şartlarda serbest ve immobilize enzimlerin bulunmadığı ortamda tekrar edilerek elde edilen absorbans değerleri referans değerler olarak kabul edilmiştir. HRP ve lakkaz enzimlerinin çözelti ortamındaki aktivitesi, ürün olarak ortamda oluşan kırmızı renkli kinon iminin derişim değışimi takip edilerek belirlenmiştir.

3.11.7.2. Lipaz Enziminin Yağ Hidrolizinde Kullanımı

Serbest ve immobilize lipaz enzimleri, bu çalışmada farklı yağ türlerinin hidrolizinde kullanılmıştır. Hidroliz deneylerinde, % 117 GMA/MAAm (30/70 mol, %) aşılınmış PET lifler kullanılmıştır. Monomer karışımı aşılınmış PET lifler, bölüm 3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlandı.

Monomer karışımı aşılınmış PET lifler, daha önce anlatıldığı gibi, önce EDA ile daha sonrada Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiştir (3.12.1).

Daha sonra glutaraldehit ile aktive edilmiş modifiye PET liflere bölüm 3.12.2’de anlatıldığı gibi enzim immobilize edilmiştir.

Zeytinyağı, ayçiçek yağı, mısır yağı, kanola yağı, soya yağı ve fındık yağı hidroliz deneylerinde kullanılan yağ türleridir. Kullanılan her bir yağ türü izooktan içerisinde çözülerek organik bir faz elde edilmiştir. Aktivite deneyleri organik faz ile tampon çözeltinin oluşturduğu iki fazlı reaksiyon ortamında yürütülmüştür. Serbest ve immobilize lipaz enzimleri 2 mL yağ-izooktan çözeltisi ve 2 mL tampon çözeltiden oluşan iki fazlı hidroliz ortamında, sıcaklığı 35 °C’ye ayarlanmış bir çalkalayıcı su banyosunda 150 rpm hızda ve 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra hidroliz ürününü içeren organik faz deney tüpüne alınmıştır. Aktivite deneyleri aynı şartlarda serbest ve immobilize lipazın bulunmadığı ortamda tekrar edilerek elde edilen absorbans değerleri referans değerler olarak kabul edilmiştir. Enzim aktivitesi, lipaz enziminin farklı yağ türlerini hidroliz etmesi sonucu oluşan serbest yağ asidinin derişim değişimi takip edilerek belirlenmiştir. Açığa çıkan serbest yağ asidinin derişimi, yağ asitlerinin Cu(II) iyonları ile izooktan içerisinde oluşturdukları renkli çözeltinin optik yoğunlukları 715 nm dalga boyunda, spektrofotometre ile ölçülerek belirlenmiştir [56, 61].

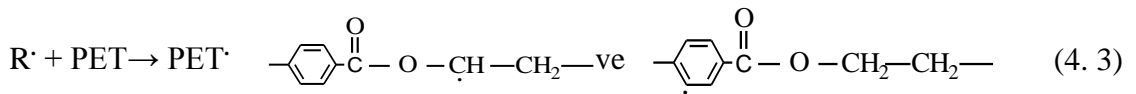
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

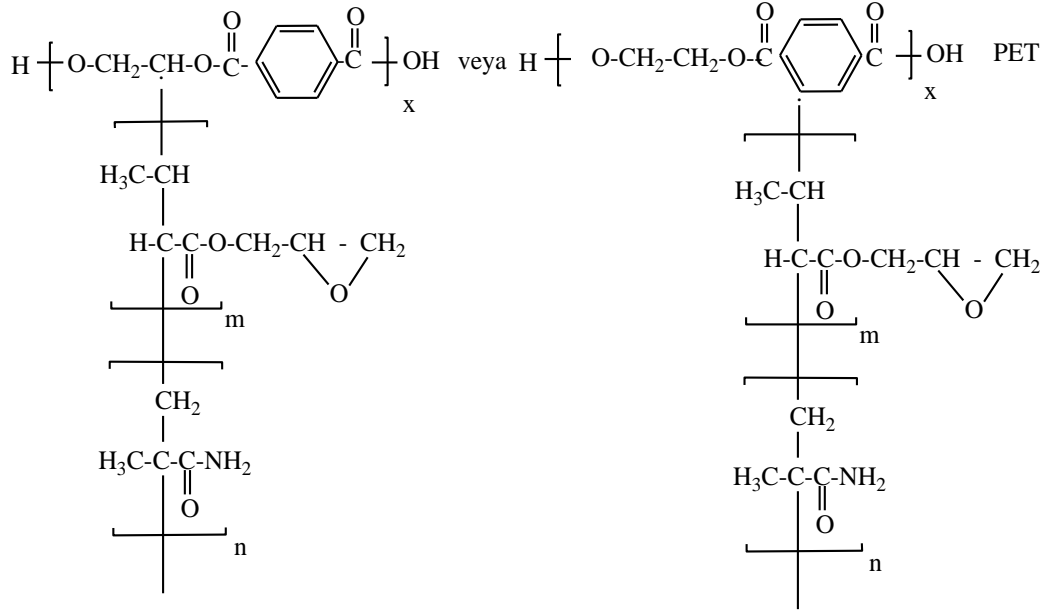
4.1. Aşılama Mekanizması

Ana polimere (PET) radikal etkisi ile aşı kopolimer eldesi zincir transfer tepkimelerinden yararlanılarak gerçekleştirilebilir. Serbest radikal, PET üzerinden bir atom (hidrojen) kopararak monomerlerin aşılabilmesi için aktif merkezler oluşturur. İlgili mekanizma aşağıda gösterilmiştir. Ayrıca GMA/MAAm monomer karışımı aşılınmış PET life ait muhtemel model Şekil 4.1' de gösterilmiştir. BPO'nun termal olarak parçalanması ile aşağıdaki radikaller oluşabilir.



$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}\cdot$ ve $\text{C}_6\text{H}_5\cdot$ radikalleri polimerizasyon ortamında PET üzerinde aktif merkezler oluşturur [68].





Şekil 4.1. GMA / MAAM monomer karışımı aşılansın PET lif modeli

4.2. Aşı Yüzdesi Üzerine Monomer Karışım Oranının Etkisi

GMA, MAAM ve GMA/MAAM karışımının, BPO başlatıcısı kullanılarak PET life aşılmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Monomer karışım oranlarının, aşı yüzdesi üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada toplam monomer karışım derişimi 0,3 M’da sabit tutulup, GMA ve MAAM monomerleri farklı miktarlarda alınarak aşı yüzdeleri belirlenmiştir.

GMA’nın PET liflere tek başına aşılmasında, aşı yüzdesi GMA derişimine bağlı olarak artmakta ve 0,3 M derişiminde % 141,63 değerine ulaştığı Çizelge 4.1’de görülmektedir. Benzer şekilde MAAM’in liflere tek başına aşılmasında da aşı yüzdesi, MAAM derişimine bağlı olarak artmaktadır (% 16,99). Karışımlardaki her bir aşı yüzdesi, GMA ve MAAM’in tek başına aşı yüzdelerinden

daha yüksektir. PET liflere, GMA ile MAAM monomer karışımlarının birlikte aşılması durumunda, aşı yüzdesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Örneğin, GMA ile MAAM'ın PET liflere birlikte aşılmasında maksimum aşı yüzdesi, 90/10 mol oranında % 209,8 olarak hesaplanmıştır. Aynı karışım oranlarında GMA, MAAM'ın tek başlarına aşılmasında ise aşı yüzdeleri sırasıyla % 123,42 ve % 3,99'dur. Benzer sonuçlar, maleik asit / metakrilamit [31] akrilamit / HEMA [37], krotonik asit / metakrilamit [39], 4-VP / HEMA [40], ve itakonik asit / metakrilamit [41] monomer karışımlarının PET lif üzerine aşılmasında da bildirilmiştir.

PET life aşılınmış polimer zincirleri, GMA ile MAAM monomerlerine ait fonksiyonel grupları içermektedir. PET life aşılınan MAAM'ın aşı yüzdesi elemental analiz yöntemi kullanılarak azot analizi ile belirlenmiştir. PET life aşılınmış GMA'nın aşı yüzdesi, toplam aşı yüzdesinden MAAM'ın aşı yüzdesi çıkartılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de ayrıca element analiz sonucuna göre, aşılınmış zincirdeki monomer aşı yüzdeleri de verilmiştir.

Çizelge 4.1 GMA, MAAM ve GMA/MAAM karışımı aşılınmış PET zincirdeki monomer aşı yüzdeleri

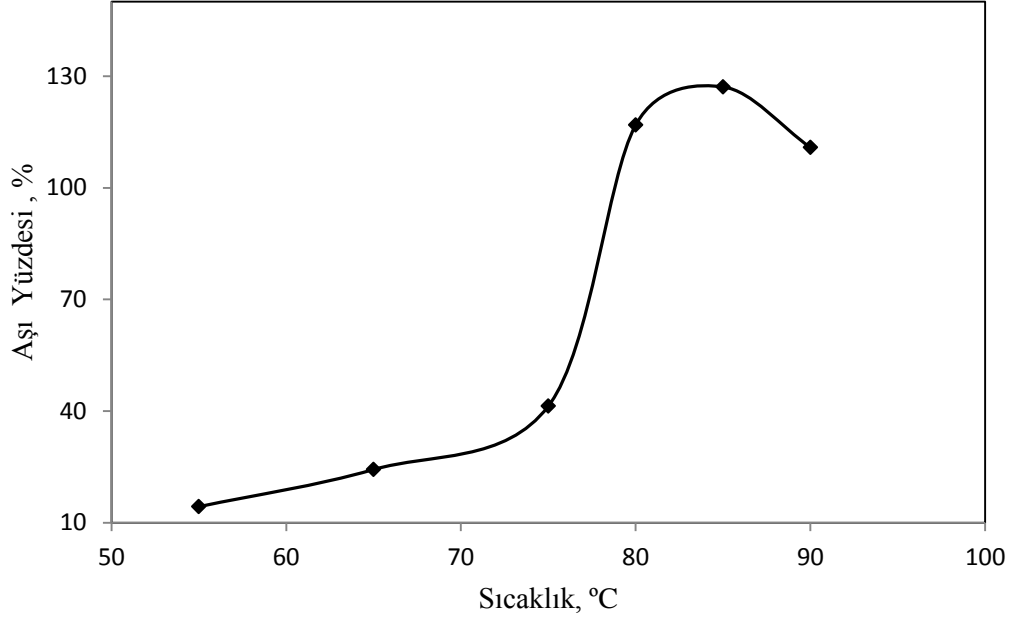
GMA/MAAM karışımı, (% mol)	Aşı yüzdesi, %			Aşı yüzdesi, % (element analizine göre)		
	Tek GMA	Tek MAAM	GMA/MAAM	N	GMA	MAAM
0 / 100	0	16,99				
10 / 90	9,09	13,92	26,2	0,64	21,15	5,05
30 / 70	46,79	11,66	116,88	5,05	48,92	67,96
50 / 50	63,32	9,14	133,17	2,8	92,26	40,91
70 / 30	116,59	6,86	196,49	1,46	170,17	26,32
90 / 10	123,42	3,99	209,8	0,55	199,27	10,53
100 / 0	141,63	0				

[GMA/MAAM]=0,3 M; [BPO]= $8,0 \times 10^{-3}$ M; T= 85 °C; t= 4 saat

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi, GMA’nın varlığında MAAM aşı kopolimer verimi, tek başına kullanımındaki aşı yüzdelerine göre daha büyük bir artış göstermiştir. Bu artış sinerjik etki ile açıklanabilir. Tek başına düşük aşı yüzdesine sahip olan monomerlerin aşı yüzdesini arttırmak için, yüksek aşı yüzdesine sahip ikinci bir monomerin varlığında aşı kopolimerizasyon işlemi yapılarak aşı yüzdesi arttırılabilir [41, 69]. Örneğin, 30/70 mol oranında, GMA/MAAM karışımındaki MAAM aşı yüzdesi % 11,66 iken, GMA’nın varlığında sinerjik etki ile % 67,96’ya çıkmıştır.

4.3. Aşı Yüzdesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

GMA/MAAM monomer karışımının PET liflere aşılması üzerine sıcaklığın etkisi 55-90 °C aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir. Sıcaklık 85 °C’ye kadar arttırıldığında, aşı yüzdesinin de arttığı görülmüştür. GMA/MAAM monomer karışımının PET liflere aşılmasında, maksimum aşı yüzdesi 85 °C sıcaklıkta elde edilmiştir. Bu sıcaklık değeri, PET’ in camsı geçiş sıcaklığına (80 °C) yakın bir değerdir. Camsı geçiş sıcaklığı ve üzerinde, polimer zincirleri hareket yeteneği kazanmış ve monomer moleküllerinin PET liflere difüzyonu kolaylaştırdığı için aşı yüzdesinin de arttığı düşünülmektedir. Ayrıca sıcaklık artışı ile başlatıcının bozunma hızının arttığı ve buna bağlı olarak ortamdaki radikal derişimi de arttığı için aşı yüzdesinin arttığı söylenebilir.



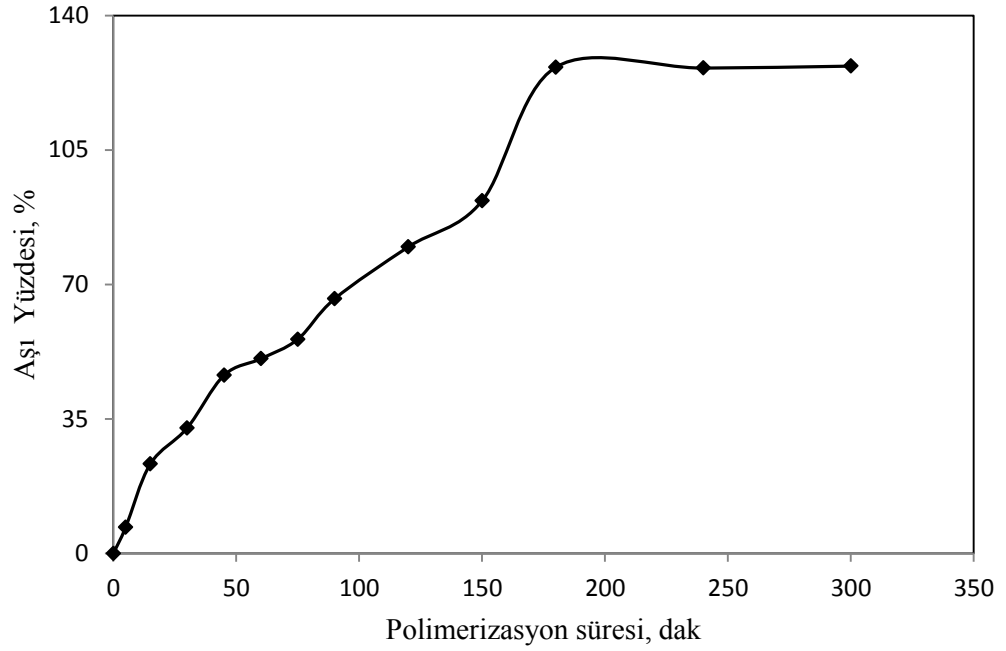
Şekil 4.2. Aşılma yüzdesi üzerine sıcaklığın etkisi ; [GMA / MAAM] = 0,3 M
(30/70 mol); [BPO] = $8,0 \times 10^{-3}$; t = 240 dak

PET lifler üzerine GMA/MAAM monomer karışımının aşılmasında, sıcaklığın 85 °C'nin üzerine çıkması ile aşılma yüzdesinde azalma gözlenmiştir. Sıcaklık artışı ile başlatıcı radikalleri daha çok kendi aralarında birleşerek sonlanma tepkimelerine girdikleri için aşılma yüzdesinin azaldığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar akrilamit/HEMA [37] ve 4-VP/HEMA [40] monomer karışımlarının PET lif üzerine aşılmasında da gözlenmiştir.

4.4. Aşılma Yüzdesi Üzerine Polimerizasyon Süresinin Etkisi

GMA/MAAM monomer karışımının PET life aşılmasına polimerizasyon süresinin etkisi, (5-300 dak) zaman aralığında incelenmiş ve Şekil 4.3'te

gösterilmiştir. Polimerizasyon süresi arttıkça aşı yüzdesi de hızlı bir şekilde artmıştır. Maksimum aşı yüzdesi 180 dakikada elde edilmiştir (% 126,53). Daha sonraki sürelerde aşı yüzdesinde bir artış gözlenmemiştir. 180 dak'ya kadar aşı yüzdesindeki artış, PET lifler üzerinde aşılınmış yeni zincirlerin oluşumuna bağlanabilir. Daha sonraki sürelerde polimerizasyon ortamında homopolimer ve kopolimer derişiminin artması ile vizkozitenin arttığı ve bir difüzyon bariyerinin oluşmasına neden olduğu düşünülebilir. Bu nedenlerden dolayı 180 dakikadan sonraki sürelerde, aşı yüzdelерinde bir değişim gözlenmediği söylenebilir.



Şekil 4.3. Aşı yüzdesi üzerine sürenin etkisi: [GMA / MAAM] = 0,3 M

(30/70 mol); [BPO] = $8,0 \times 10^{-3}$; T = 85 °C

Literatürde, BPO başlatıcısı ile 2- hidroksipropil metakrilat / akrilik asit monomer karışımının [29], 4,4'-azobis (4-siyanovalerik asit) başlatıcısı ile

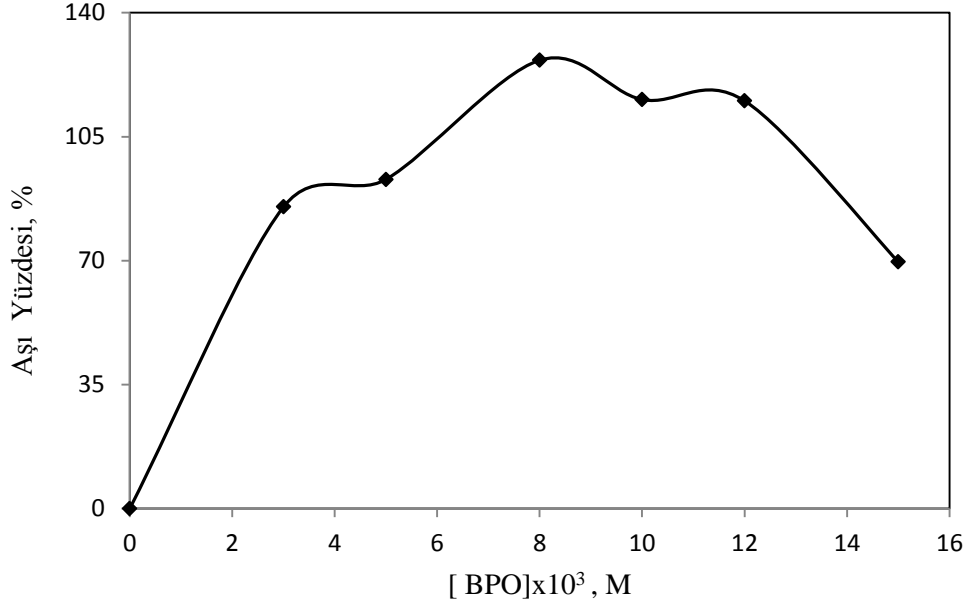
2- hidroksipropil metakrilat [30], AIBN başlatıcısı ile metakrilamit [70] ve BPO başlatıcısı ile 4-VP [71] monomerlerinin PET lif üzerine aşılmasında da aşı yüzdesinin belirli bir süreden sonra sabit kaldığı rapor edilmiştir.

4.5. Aşı Yüzdesi Üzerine Başlatıcı Derişiminin Etkisi

GMA/MAAm monomer karışımının PET life aşılmasında, BPO derişiminin aşı yüzdesine etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.4' te gösterilmiştir. Çalışmada maksimum aşı yüzdesi, 8×10^{-3} M başlatıcı derişiminde elde edilmiştir (% 126,6). Bu derişim değerine kadar aşı yüzdesi artmış, ancak sonraki başlatıcı derişimlerinde aşı yüzdesinin düştüğü gözlenmiştir.

Başlatıcı derişiminin artması, serbest radikallerin ($C_6H_5COO\cdot$ ve $C_6H_5\cdot$) sayısının artmasına neden olmuştur. Serbest radikal sayısının artması hem homopolimerik, hem de kopolimerik radikal zincirlerini arttırarak, zincir transfer tepkimelerinin hızını arttırmıştır. Bunun sonucunda aşı yüzdesi de artmıştır.

BPO'nun optimum derişim değeri üzerindeki değerlerde, ortamdaki radikal derişimi arttığı için sonlanma tepkimelerinin de arttığı söylenebilir. Artan sonlanma tepkimeleri PET lif üzerinde aktif merkez oluşumunu ve zincir büyümelerini engellemiştir. Bu durumun aşı yüzdesinin düşmesine neden olduğu düşünülmüştür. Sonuçlar literatürle uyum içerisindedir [29, 30, 31].

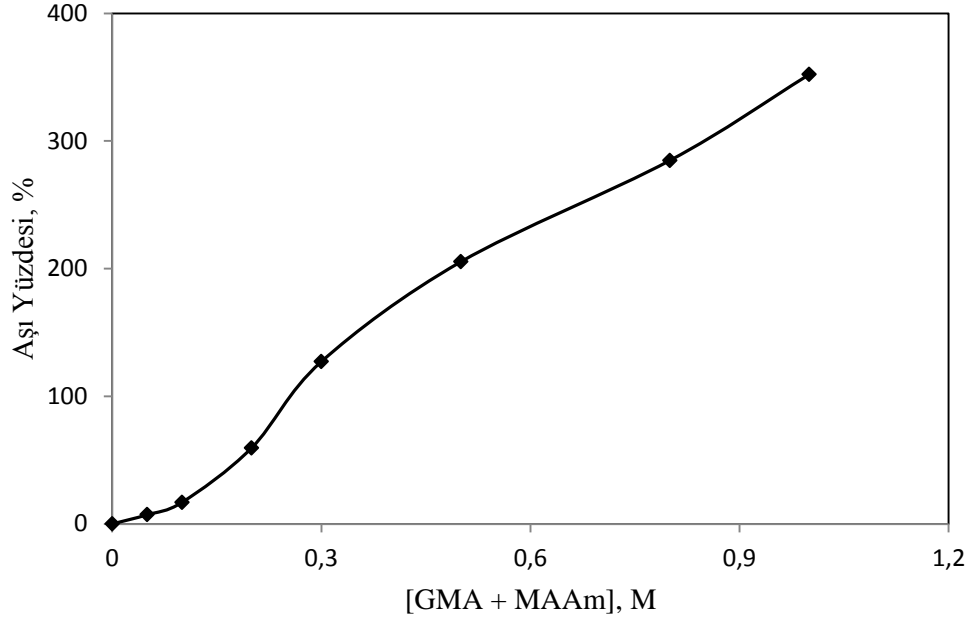


Şekil 4.4. Aşı yüzdesi üzerine başlatıcı derişiminin etkisi [GMA / MAAm]= 0,3 M (30/70 mol); t= 180 dak ; T= 85 °C

4.6. Aşı Yüzdesi Üzerine Monomer Karışım Derişiminin Etkisi

PET liflere GMA/MAAm monomer karışımının aşı yüzdesine, monomer karışımı derişimi 0,05-1 M aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Monomer karışım derişiminin 1 M'dan sonraki derişim değerlerinde PET lif, esnekliğini kaybederek deforme olmuş ve bu yüzden çalışılmamıştır. GMA/MAAm monomer karışım derişiminin artması ile aşı yüzdesi artmaktadır. 1 M monomer karışım derişiminde aşı yüzdesi % 352,11'e ulaşmıştır. Monomer derişiminin artmasıyla PET life difüzlenen monomer moleküllerinin sayısının arttığı ve polimerizasyon ortamında aktif homopolimer ve kopolimer zincirlerinin oluşması ile bu aktif zincirlerin, PET liflerden zincir transfer tepkimeleri ile hidrojen koparması, PET lif üzerindeki aktif merkez sayısı artmış olabilir. PET lif üzerinde

oluşan yeni aktif merkezlerin ve aktif aşılansmış yan zincirlerin oluşması ile monomer moleküllerinin PET liflere aşılansmasının kolaylaştığı ve buna bağlı olarak aşılans yüzdesinin arttığı düşünülmektedir [33, 72].



Şekil 4.5. Aşılans yüzdesi üzerine monomer karışım derişiminin etkisi

[GMA / MAAm]=30/70 mol; [BPO]= 8×10^{-3} M; t=180 dak.; T= 85°C

4.7. Aşılansma Kinetiği

Aşılansma hızı (R_g), aşğıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır [37].

$$R_g = \frac{m_g - m_o}{V \times t} \times 1000 \quad (4.4)$$

V: toplam hacim (mL)

t: aşılansma süresi (s)

PET liflere, GMA/MAAm monomer karışımının aşılmasında, aşı kopolimerizasyon hızının (R_g), monomer ve başlatıcı derişimine bağılılığı aşıdaki bağıntı ile verilmiştir [73].

$$R_g = k [GMA / MAAm]^m \times [BPO]^n \quad (4.5)$$

Bu bağıntıdaki “m” ve “n” monomer ve başlatıcının bireysel dereceleri deneysel olarak belirlenmiştir.

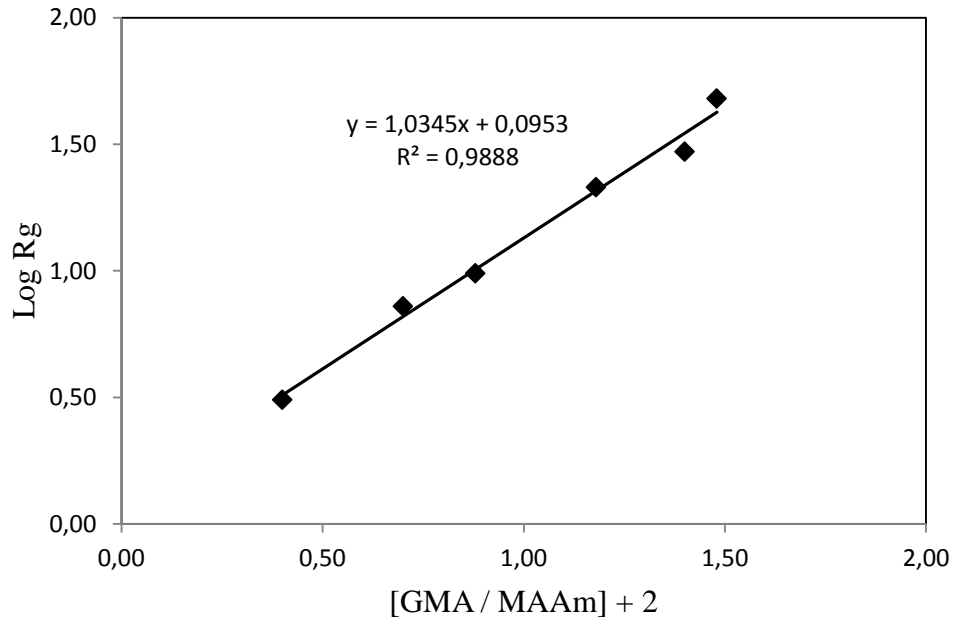
4.7.1. GMA / MAAm’in Bireysel Derecesi

Aşılma hızının, GMA / MAAm derişimi ile değişimini gösteren deneysel sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelge 4.2’deki veriler kullanılarak Log R_g ’ye karşı Log [GMA / MAAm] grafiğe alınmış ve Şekil 4.6 elde edilmiştir. Doğrunun eğiminden aşılma hızının, GMA / MAAm karışımı derişimine 1,03’üncü dereceden bağılı olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. [GMA/MAAm] monomer karışımının bireysel derecesinin hesaplanması

[GMA/MAAm], M	Aşılma Yüzdesi, %	Log[GMA+MAAm]+2	R _g 10 ⁴ , g. L ⁻¹ .s ⁻¹	LogR _g
0,025	1,28	0,40	3,08	0,49
0,050	2,94	0,70	7,17	0,86
0,075	3,99	0,88	9,75	0,99
0,150	9,06	1,18	21,42	1,33
0,250	11,26	1,40	29,67	1,47
0,300	18,41	1,48	47,75	1,68

[BPO]= 8x10⁻³ mol L⁻¹; T=85 °C; t= 10 dak.



Şekil.4.6. Aşılma hızının monomer karışım derişimi ile değişimi;

[GMA/MAAm]= 0,3 M (30/70 mol); [BPO]= 8x10⁻³ M; t=10 dak.;

T= 85 °C

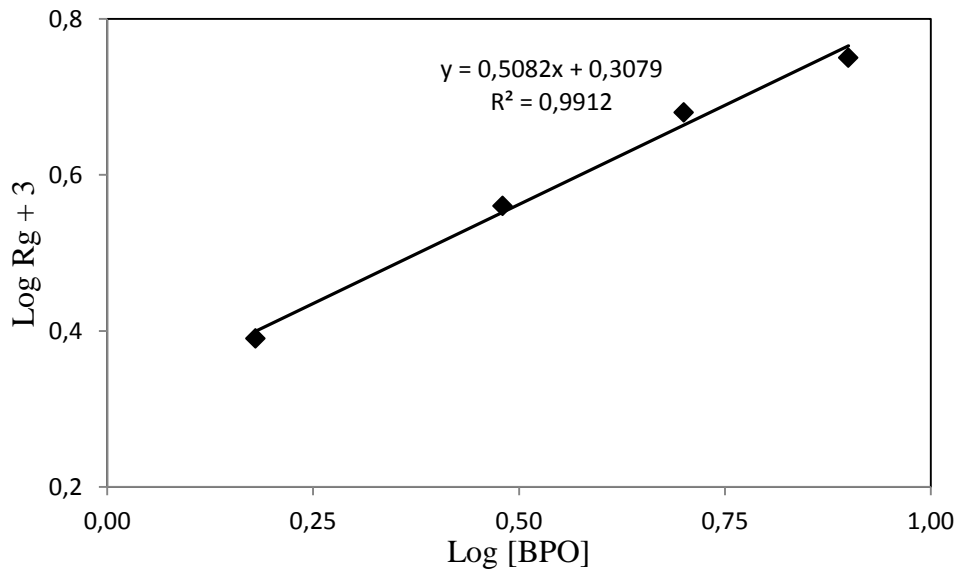
4.7.2. Başlatıcının Bireysel Derecesi

Aşılama başlangıç hızının, BPO derişimi ile değişimini gösteren deneysel sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelge 4.3'deki veriler kullanılarak Log R_g ye karşı Log [BPO] grafiğe alınmış ve Şekil 4.7 elde edilmiştir. Doğrunun eğiminden aşılama hızının BPO derişimine 0,51'inci dereceden bağlı olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3. [GMA/MAAm] için başlatıcının bireysel derecesinin hesaplanması

[BPO]x10 ³ ,M	Aşı yüzdesi, %	Log [BPO]	R _g , g.L ⁻¹ .s ⁻¹	LogR _g +3
1,5	7,09	0,18	0,002458	0,39
3	12,77	0,48	0,003642	0,56
5	16,63	0,70	0,00475	0,68
8	20,47	0,90	0,005608	0,75

[GMA/MAAm]= 0,3 mol L⁻¹ (30/70 mol); T= 85 °C; t= 10 dak.



Şekil 4.7. Aşılama hızının başlatıcı derişimi ile değişimi

[GMA/MAAm]= 0,3 M (30/70 mol); t=10 dak.; T= 85 °C

GMA / MAAm karışımları için monomer ve başlatıcının bireysel dereceleri 4.2 bağıntısında yerine konularak, aşağıdaki hız denklemi elde edilmiştir.

$$R_g = k [GMA/MAAm]^{1,03} \times [BPO]^{0,51} \quad (4. 6)$$

Bu çalışmada elde edilen sonuçların, literatürlerdeki PET liflere ait bazı kinetik çalışmalarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür. PET lif üzerine, 4,4'-azobis(4-siyanovalerik asit) başlatıcısı kullanılarak, 2-hidroksipropil metakrilat monomerinin aşılmasında aşılama hızının, monomer ve başlatıcı derişimine sırasıyla, 1,25 ve 0,90'inci dereceden bağlı olduğu bildirilmiştir [30].

PET liflere BPO başlatıcısı kullanılarak, akrilamit/HEMA monomer karışımının aşılmasında aşılama hızının, monomer ve başlatıcı derişimine sırasıyla 1,39 ve 0,37'inci dereceden bağlı olduğu bildirilmiştir [37].

PET liflere BPO başlatıcısı kullanılarak, krotonik asit/metakrilamit aşılmasında aşılama hızının, monomer ve başlatıcı derişimine sırasıyla 0,89 ve 0,47'nci dereceden bağlı olduğu bildirilmiştir [39].

PET liflere BPO başlatıcısıyla, 4-VP/HEMA aşılmasında aşılama hızının monomer ve başlatıcı derişimine sırasıyla 1,5 ve 0,3'ncü dereceden bağlı olduğu belirtilmiştir [40].

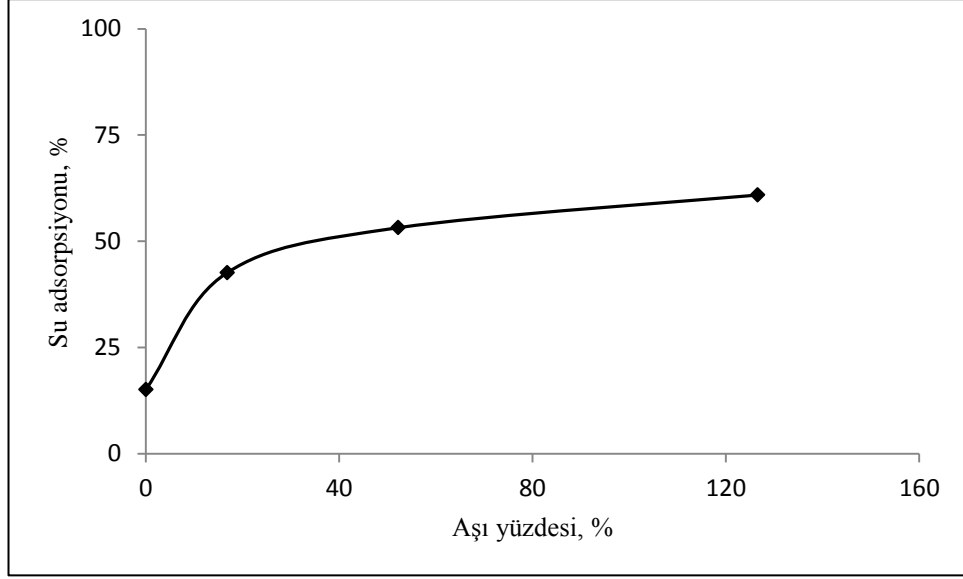
PET liflere AIBN başlatıcısı kullanılarak, *N*-vinilimidazol aşılmasında aşılama hızının, monomer ve başlatıcı derişimine sırasıyla 1,4 ve 0,7'nci dereceden bağlı olduğu belirtilmiştir [74].

PET liflere BPO başlatıcısı kullanılarak, akrilik asit / 2-hidroksi propil metakrilat monomer karışımı aşılmasında, monomer ve başlatıcı derişimine sırasıyla 0,6 ve 0,63'üncü dereceden bağı olduğu belirtilmiştir [75].

Literatürde verilen çalışmalardan da görüldüğü gibi, aşılama hızının monomer ve başlatıcı derişimlerine bağı olduğu görülmektedir. Ayrıca aşılama hızının, PET lif ana zincirine aşılama monomer ve kullanılan başlatıcının türüne göre değıştiğı görülmektedir.

4.8. Aşılama PET Liflerin Su Tutma Kapasitelerinin Tayini

Hidrofobik yapıdaki PET liflerin su tutma kapasitelerini arttırmak için, PET liflere GMA/MAAm monomer karışımları aşılama PET liflerin hidrofilik özellikleri geliştirilmiştir. GMA/MAAm (30/70 mol) monomer karışımı aşılama PET liflerin su tutma yüzdeleri, liflerin kütle artışından belirlenerek sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Şekil 4.8'den görüldüğü gibi aşılama yüzdesi arttıkça, GMA/MAAm aşılama PET liflerin su tutma kapasiteleri de artmıştır. Aşılama PET lifler % 15,15'lik su tutma yüzdesine sahip iken, % 126,6'lık aşılama yüzdesine sahip PET liflerin su tutma yüzdesi % 60,89 değıerine ulaşmıştır. PET liflere GMA/MAAm monomer karışımının aşılama ile lif yapısına polar özellikteki $-NH_2$ gibi hidrofilik grupların girmesiyle, su tutma kapasiteleri arttığı düşünölmektedir [31, 37, 75].



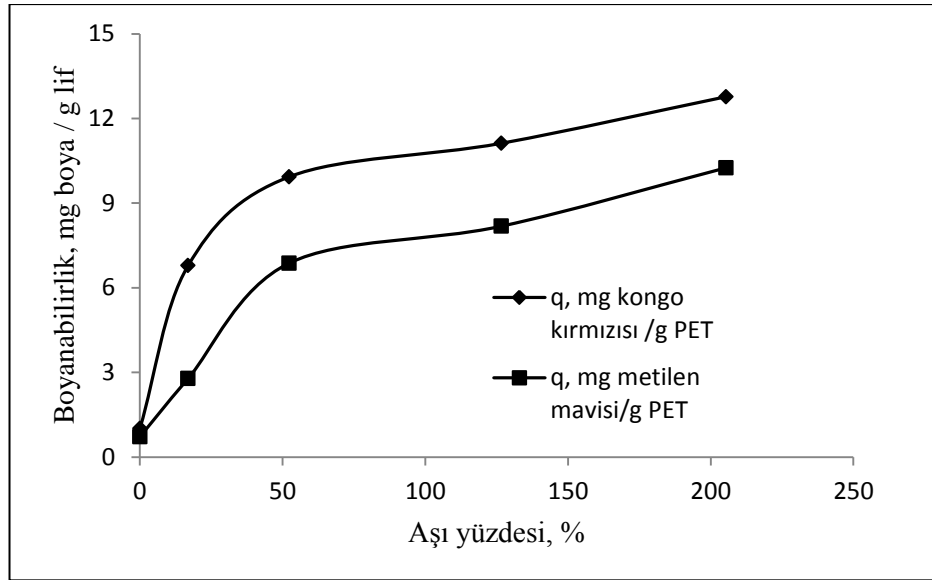
Şekil 4.8. GMA/MAAm aşılanmış lifler için su adsorpsiyonunun aşı yüzdesi ile değişimi

4.9. PET Liflerin Boyanabilirliği

Uygun fonksiyonel gruplar içermediği için sadece dispers boyalar ile boyanabilen PET liflere uygun monomerlerin aşılanmasıyla, PET liflerin hem asidik hem de bazik boyalarla boyanabilmesi sağlanabilir. Bu çalışmada PET liflere GMA/MAAm monomer karışımı aşılanarak, asidik ve bazik boya molekülleri ile etkileşebilecek $-NH_2$ grupları sayesinde [76], PET liflerin hem asidik hem de bazik boyalarla boyanabilmesi sağlanmıştır.

Şekil 4.9'da belirli aşı yüzdelere sahip GMA/MAAm monomer karışımının, asidik ve bazik boyalar ile boyanabilirliklerinin değişimi gösterilmiştir. GMA/MAAm aşılanmış PET liflerin, hem asidik (Kongo kırmızısı) hem de bazik bir boya (metilen mavisi) ile iyi boyanabildiği görülmüştür. Aşılanmış PET liflerin

boyanabilme kapasitesinin, aşı yüzdesi ile arttığı görülmüştür. % 205,33 aşı yüzdesine sahip GMA/MAAm aşılanmış PET liflerin boyanabilirliği, asidik ve bazik boyalar için sırasıyla 12,77 ve 10,25 mg boya / g PET lif olarak bulunmuştur. PET liflerin özellikle asidik boya ile daha iyi boyanabilme nedeninin, polimer zinciri üzerindeki $-NH_2$ gruplarının asidik boya molekülleri ile etkileşmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir [77, 78].



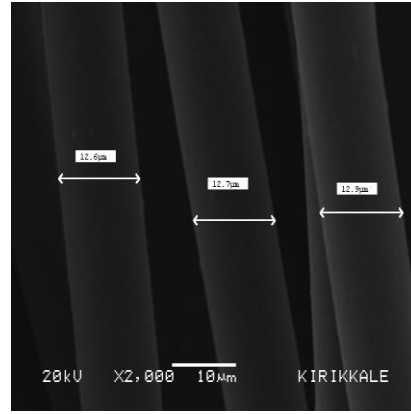
Şekil 4.9. GMA/MAAm aşılanmış PET liflerin boyanabilirliğinin aşı yüzdesi ile değişimi

4.10. Lif Çaplarının Ölçülmesi ve SEM Fotoğrafları

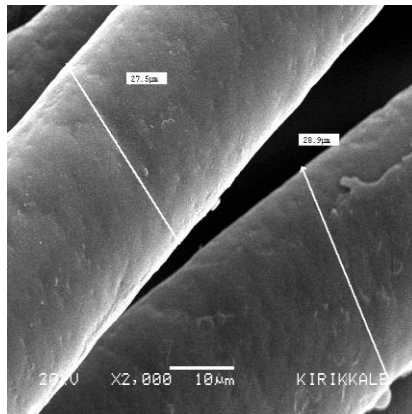
Çizelge 4.4'te, farklı yüzdelerde GMA/MAAm monomer karışımı aşılanmış PET liflerin çap değerleri verilmiştir. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi aşı yüzdesi arttıkça liflerin çap değerleri artmaktadır. Aşılanmamış PET liflerin çapı $12,7 \mu m$

iken, % 205,33 aşı yüzdesine sahip GMA/MAAm aşılammış PET liflerin çaplarının 40,7 µm'ye yükseldiği gözlenmiştir. Literatürde, PET liflere farklı monomerlerin aşılannması ile lif çaplarının arttığı belirtilmiştir [36, 39, 79].

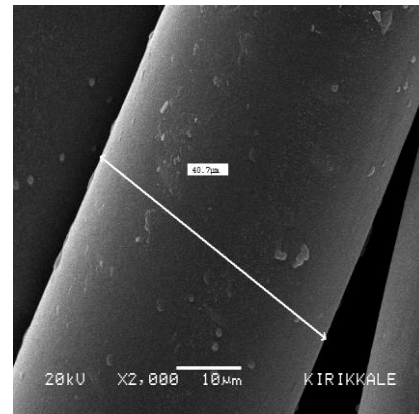
Şekil 4.10'da aşılannmamış ve farklı yüzdelerdeki GMA/MAAm monomer karışımı aşılammış PET liflerin SEM fotoğrafları verilmiştir. SEM fotoğraflarında görüldüğü gibi aşılannmamış PET lifin yüzeyi (Şekil 4.10 A) düz ve pürüzsüzdür. Farklı aşı yüzdelerine sahip PET liflerin (Şekil 4.10.B,C) ise lif çaplarının arttığı ve daha pürüzlü bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir. SEM fotoğrafları GMA/MAAm monomer karışımının PET life aşılannmışının diğeri bir kanıttır.



(A)



(B)



(C)

Şekil 4.10. A) Aşılannmamış PET lif B) % 126,60 (GMA/MAAm) C) % 205,33

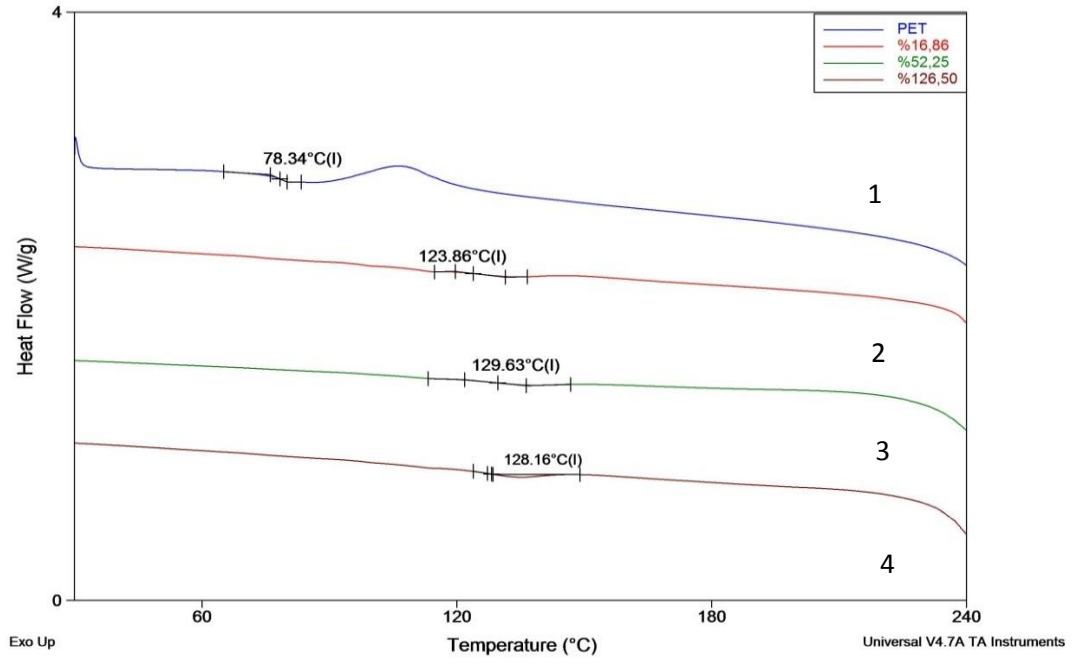
(GMA/MAAm) aşılammış PET lifler

4.11. Aşılanmış PET Liflerin T_g Değerlerinin Bulunması

Aşılanmamış ve GMA/MAAm aşılanmış PET liflerin T_g değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Ayrıca aynı örneklerin belirli aşu yüzdelere ait, DSC eğrileri Şekil 4.11'da verilmiştir. Çizelge 4.4'ten % 52,25 aşu yüzdesine kadar T_g değerlerinin arttığı, sonraki aşu yüzdelesinde T_g değerlerinin değişmediği görülmektedir. Karbonil, α -metil grupları ve polaritesi yüksek yan grupların PET lif yapısına girmesiyle, aşılanmış PET liflerin T_g değerleri artmıştır [31, 40, 41].

Çizelge 4.4. GMA/MAAm aşılanmış PET liflerin çap ve T_g değerlerinin aşu yüzdesi ile değişimi

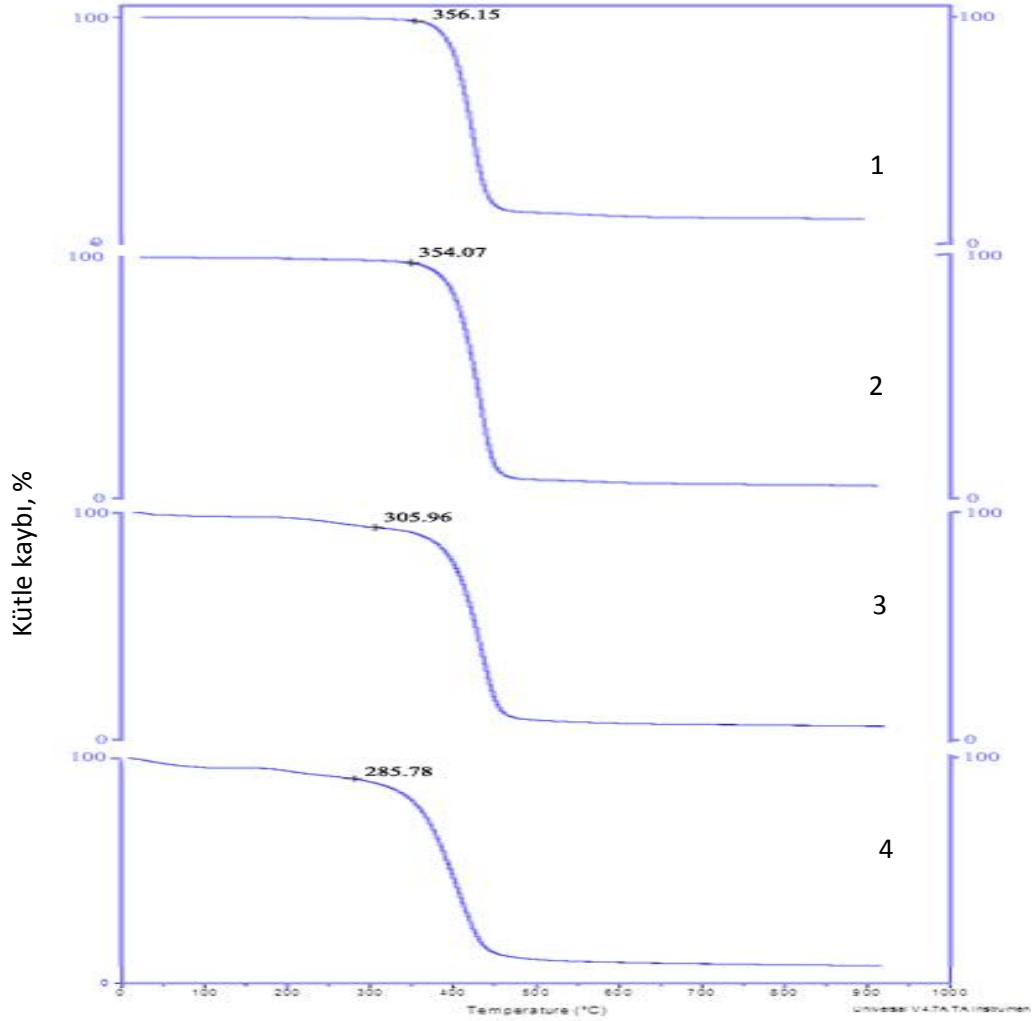
Aşu yüzdesi. %	Çap (μm)	T _g ($^{\circ}\text{C}$)
Aşılanmamış	12,7	78,34
16,86	13,3	123,86
52,25	15,1	129,63
126,6	28,2	128,16
205,33	40,7	-



Şekil 4.11 Aşılanmamış ve farklı aşı yüzdelere sahip PET-g-GMA/MAAm'ın DSC Termogramları; Saf PET (1), % 16,86 (2), % 52,25 (3), % 126,50 (4)

4.12. Termogravimetrik Analiz Sonuçları

Şekil 4.12’de aşılammış PET lif ile farklı aşı yüzdelere sahip GMA/MAAm karışımı aşılammış PET liflerin TGA termogramları görülmektedir. Şekil 4.12’den faydalanılarak Çizelge 4.5 oluşturulmuştur.



Şekil 4.12. Aşılammış PET ve belirli aşı yüzdelere sahip GMA/MAAm

aşılammış PET liflerin TGA termogramları; Aşılammış PET (1);

% 16,86 (2); % 52,25 (3); % 126,60 (4)

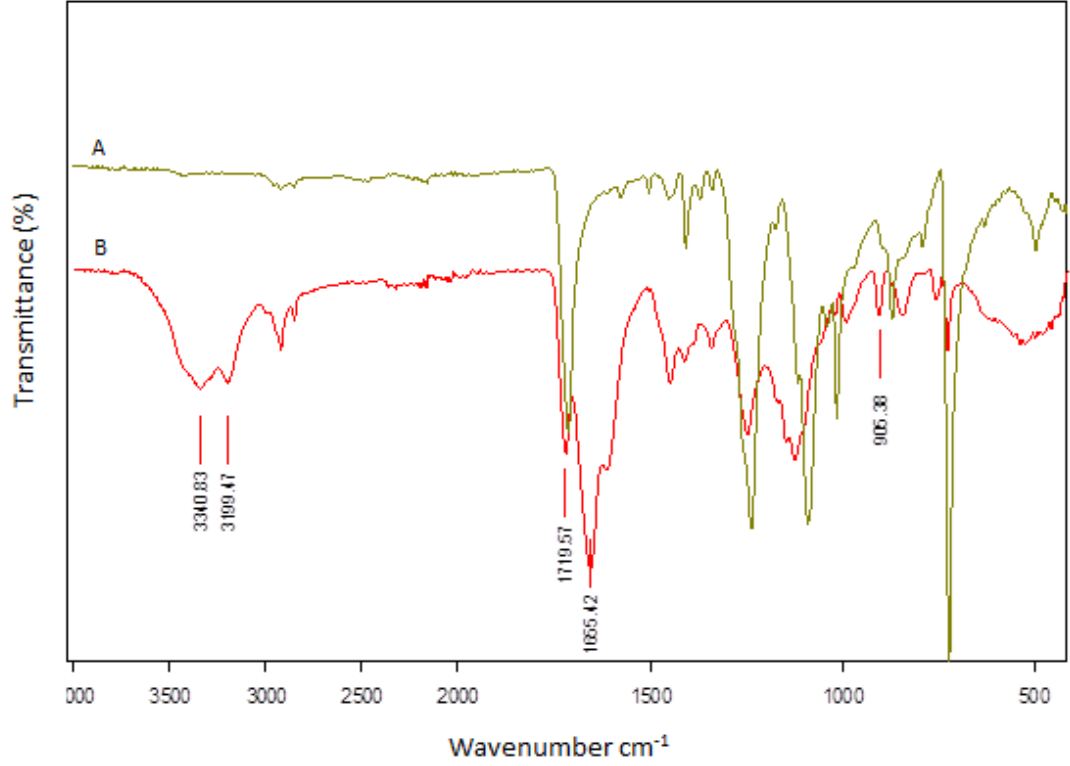
Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi farklı aşılama yüzdelere sahip GMA/MAAm aşılansmış PET liflerin bozunma başlangıç sıcaklıkları, aşı yüzdesi arttıkça düşmektedir. Bu sonuçlardan, GMA/MAAm aşılansmış PET liflerin ısı kararlılığının, aşılansmamış PET liflere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Sonuçların literatürle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir [39, 41, 70].

Çizelge 4.5. Farklı aşı yüzdelere sahip GMA/MAAm aşılansmış PET liflerin termogram verileri

Aşı yüzdesi, %	Bozunma Başlangıç Sıcaklığı (IDT °C)	Bozunma Bitiş Sıcaklığı (FDT °C)	Kütle kaybı, %	Artık , %
0	356	474	87,33	12,67
16,86	354	470	90,96	9,04
52,25	306	466	90,86	9,14
126,6	286	459	87,13	12,87

4.13. PET Liflerin FTIR Analizi

Şekil 4.13'te aşılansmamış ve GMA/MAAm monomer karışımı aşılansmış PET liflerin FTIR spektrumları gösterilmiştir. Şekil 4.13.A ve şekil 4.13.B'de 1719 cm^{-1} pikler PET lifteki CO (karbonil) pikini göstermektedir. Şekil 4.13.B' de 1655 cm^{-1} de görülen pik amit grubundaki CO pikini göstermektedir. Yine şekil 4.13.B'de 3340 ve 3199 cm^{-1} deki pikler metakrilamit'deki NH_2 grubunu göstermektedir. Şekil 4.13.B'de 905 cm^{-1} de görülen pik ise GMA'daki epoksi piklerine aittir [80] . Bu sonuçlar PET lif üzerine her iki monomerin aşılandığının güçlü kanıtlarıdır.



Şekil 4.13. Aşılınmamış (A) ve % 126 GMA/MAAm aşılınmış PET liflerin (B) FTIR spektrumları

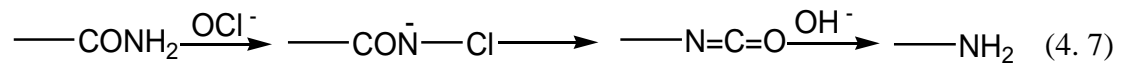
4.14. Enzim Çalışmaları

4.14.1. Enzim Destek Materyalinin Hazırlanması

GMA/MAAm aşılınmış PET lif bu çalışmada enzim destek maddesi olarak kullanılmıştır. Enzimin destek materyaline immobilizasyonu üç adımda gerçekleştirilmiştir. Birinci adımda, PET-g-GMA/MAAm lif üzerinde amin grupları oluşturmak için PET lif, etilendiamin (EDA) içerisinde 30 dk karıştırılarak modifiye

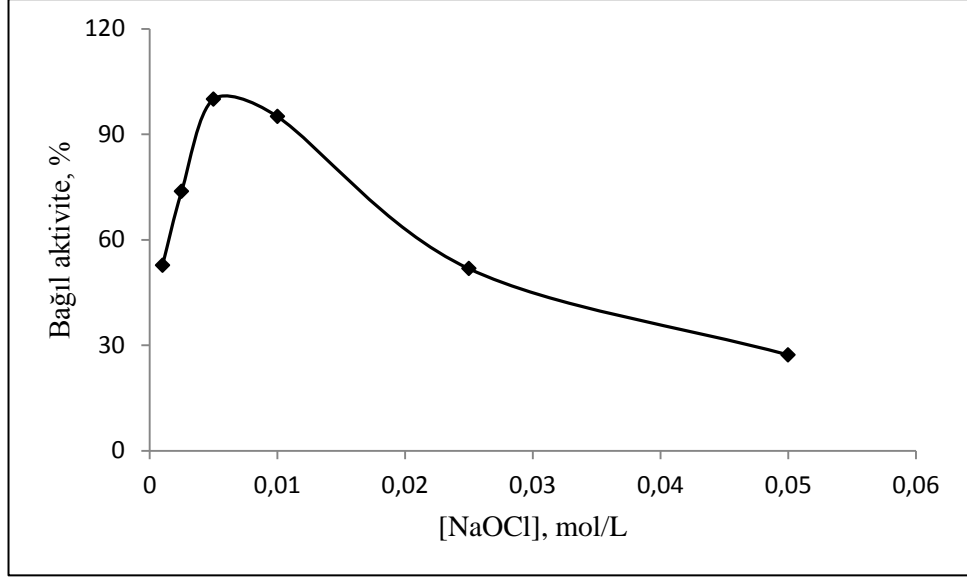
edilmiştir. PET lif üzerinde amin grupları oluşturulduktan sonra, glutaraldehit ile aktive edilerek enzim immobilize edilmiştir.

İkinci adımda Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile GMA/MAAm aşılans PET lif üzerindeki amit gruplarının amin gruplarına dönüşümünü gerçekleştirilmiştir. Amin grupları glutaraldehit ile aktive edilerek enzim immobilize edilmiştir. Bu dönüşüm aşağıdaki basamaklarla ilerler [81].



NaOH derişimi, NaOCl derişimi ve karıştırma süresinin Hofmann dönüşüm reaksiyonuna etkisi araştırılmıştır. Ayrıca modifiye edilmiş PET life glutaraldehitin bağlanma süresi ve enzimin immobilizasyon süresi optimize edilmiştir. Hofmann dönüşüm reaksiyonu için optimum şartların belirlenmesinde, HRP enzimi model olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu değerler, Hofmann dönüşüm reaksiyonu için optimum şartlar olarak kabul edilmiştir.

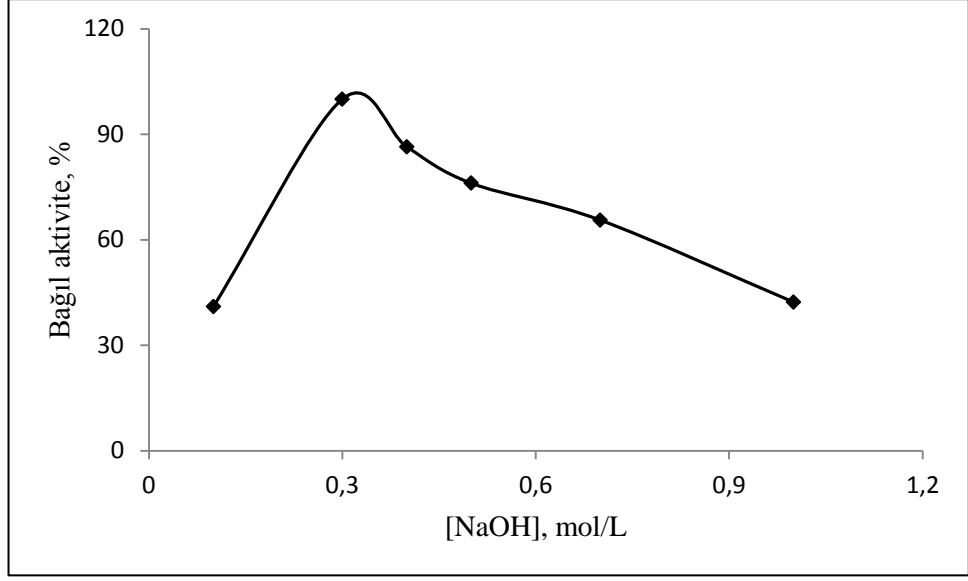
Şekil 4.14'te Hofmann reaksiyonuna, NaOCl derişiminin etkisi verilmiştir. Hofmann dönüşüm reaksiyonu için en uygun NaOCl derişiminin 5×10^{-3} M olduğu belirlenmiştir. Bu derişim değerinde en yüksek enzim aktivitesi elde edilmiş ve dolayısıyla ortamda daha fazla purpurogallin elde edilmiştir. Daha sonraki derişim değerlerinde daha düşük bağıl aktivite elde edilmiştir.



Şekil 4.14. NaOCl derişiminin Hofmann dönüşüm reaksiyonu üzerine etkisi

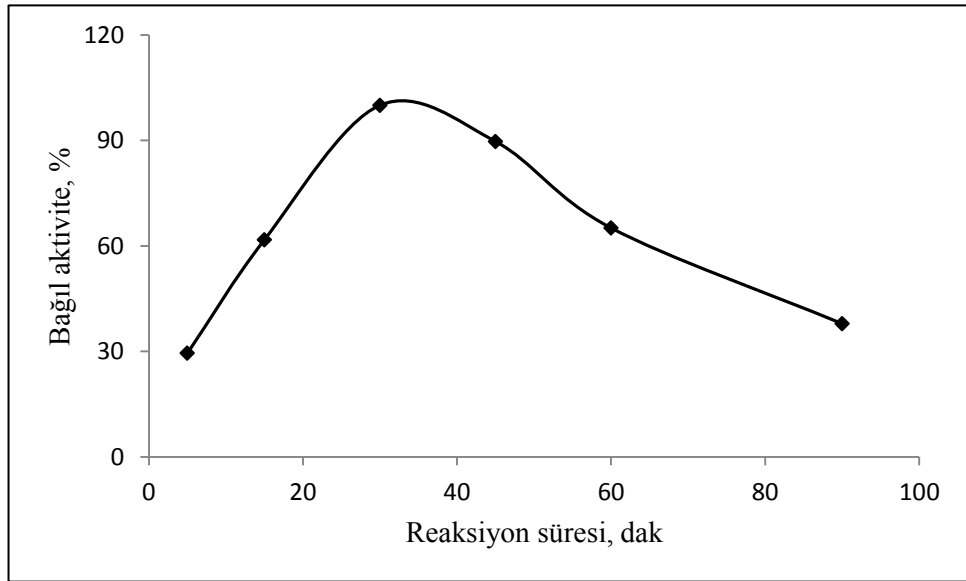
Hofmann dönüşüm reaksiyonu, PET lif üzerindeki amit gruplarının klorlanması ile başlamaktadır. Sano ve arkadaşları [81], düşük NaOCl derişimlerinde PET lif üzerindeki amit gruplarının zor klorlandığını, yüksek NaOCl derişimlerinde ise poli(akrilamit)'in ana zinciri üzerinde rasgele kırılmalar olduğunu rapor etmişlerdir.

Şekil 4.15'de Hofmann reaksiyonuna, NaOH derişiminin etkisi verilmiştir. Hofmann dönüşüm reaksiyonunun son basamağında OH⁻ iyonları, izosiyanat gruplarının amin gruplarına hidroliz olmasında rol almaktadır. Şekilde görüldüğü gibi 0,3 M NaOH derişiminde en yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir. Bu derişim değerinden sonraki değerlerde enzim aktivitelerinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.15. NaOH derişiminin Hofmann dönüşüm reaksiyonu üzerine etkisi

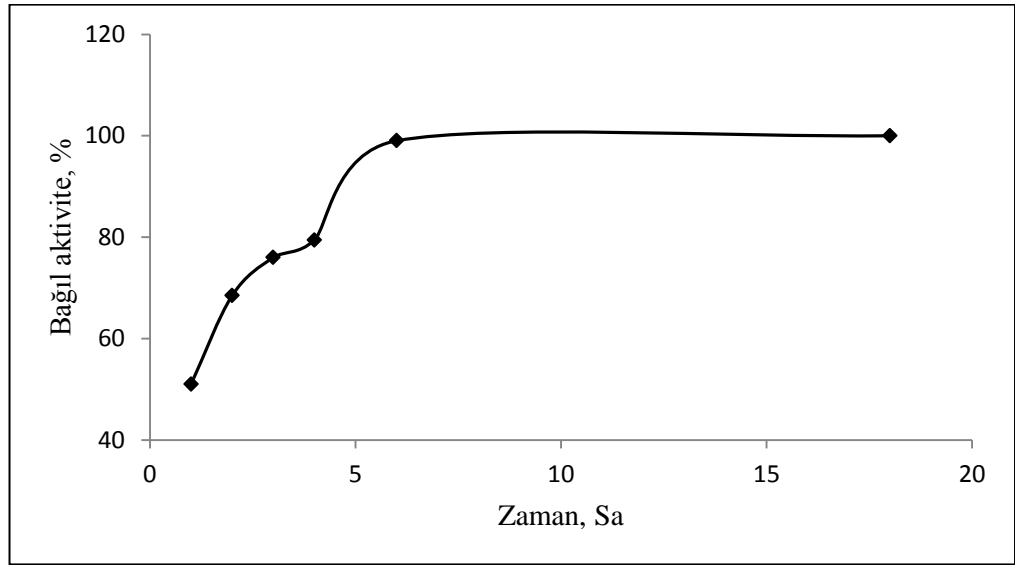
Hofmann dönüşüm reaksiyonuna, reaksiyon süresinin etkisi Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, enzim aktivitesi ilk 30 dakikada artmaktadır. Bu süreden sonra, liflerin deformasyonundan dolayı, enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.16. Reaksiyon süresinin Hofmann dönüşüm reaksiyonu üzerine etkisi

Modifiye edilmiş PET liflere glutaraldehit bağlanmasının, zaman ile değişimi Şekil 4.17’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi PET liflerin glutaraldehit ile temas süresi arttıkça enzim aktivitesi de artmaktadır. Glutaraldehitin PET liflere bağlanması 6 saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu süreden sonra enzimin bağlı aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Chang ve Tang, $-NH_2$ grubu bağlantılı Magnetik Fe_3O_4/SiO_2 parçacıklara HRP enzimini immobilize etmiş ve immobilize enzimin aktivitesi üzerine glutaraldehit konsantrasyonunun etkisini incelemiştir. Belirli bir glutaraldehit derişiminden sonra, enzim yapısındaki bozulmadan ve bu bozulma sonucu enzimin substrata erişiminin kısıtlandığı veya azaldığını ve bunun sonucunda da enzim aktivitesinde bir azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir [82].

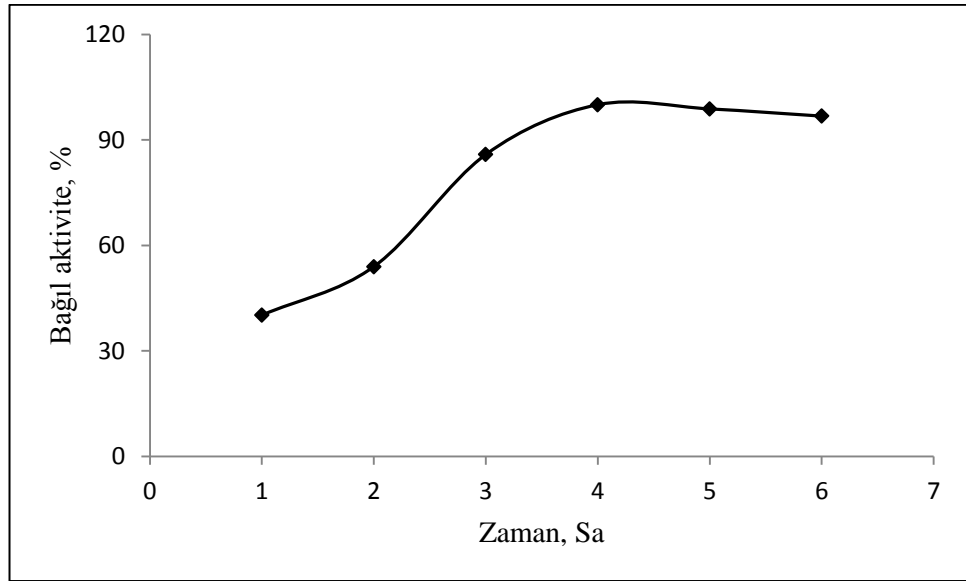


Şekil 4.17. Modifiye PET liflere glutaraldehit bağlanmasının zaman ile değişimi

Glutaraldehit ile aktive edilmiş modifiye PET lif üzerine enzim bağlanma süresinin enzim aktivitesi ile değişimi Şekil 4.18’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü

gibi PET liflerin enzim çözeltisi ile temas süresi arttıkça, enzim aktivitesi artmaktadır. Enzim aktivitesi 4 saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu süreden sonra enzim aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Nwagu ve arkadaşları, poli (glutaraldehit) ile fonksiyonlandırılmış polimetakrilat kürelere, amilaz enzimini immobilize etmişlerdir. Çalışmada immobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Immobilizasyon süresinin ilk 6 saatine kadar enzim aktivitesinde bir artma olduğunu, daha sonraki sürelerde ise enzim aktivitesinde önemli bir artış olmadığını ve substratın enzime doyduğunu rapor etmişlerdir [83].

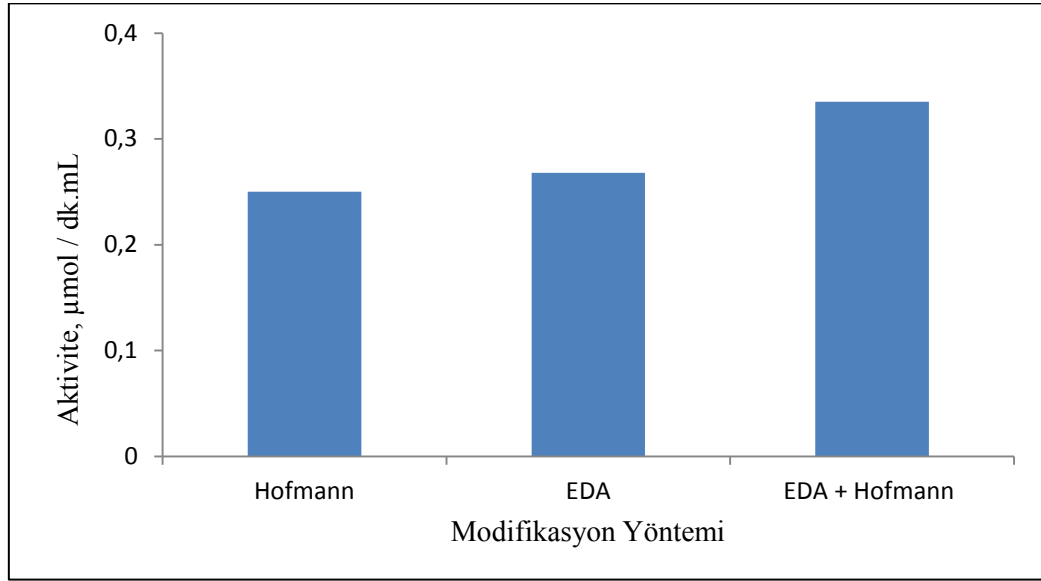


Şekil 4.18. Modifiye PET liflere enzim immobilizasyon süresinin enzim aktivitesi ile değişimi

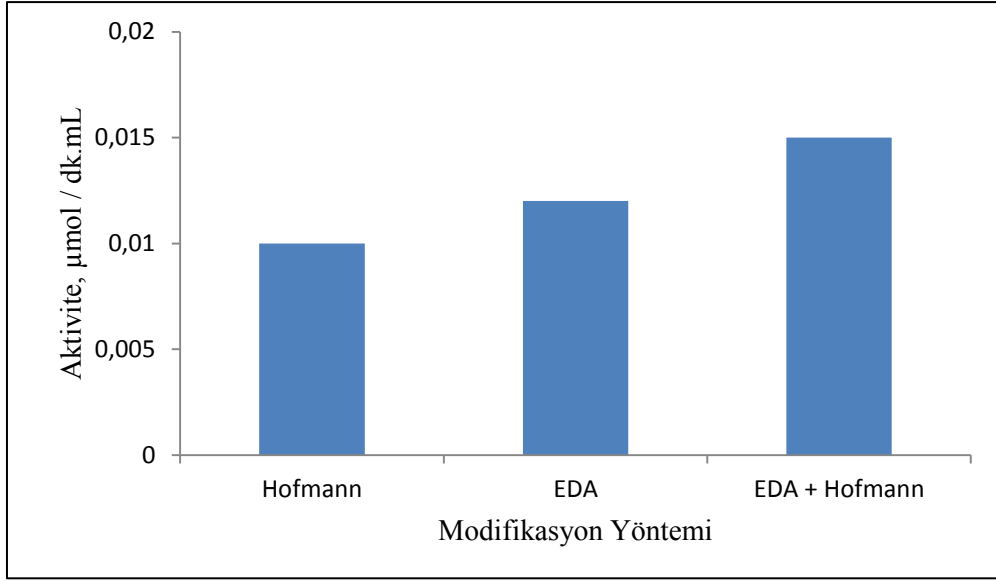
Üçüncü adımda, GMA/MAAm (30/70 mol) karışımı aşılınmış PET lif üzerinde, hem etilendiamin içerisinde karıştırılarak (1. adım), hem de Hofmann dönüşüm reaksiyonu kullanılarak (2. adım), amin grupları türetilmiştir. Bu aşamada

aşlanmış PET lifler, önce etilen diaminde 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Tampon ve deiyonize suda yıkanan liflere, Hofmann dönüşüm reaksiyonu (15 dk) uygulanarak, PET lif üzerindeki amit gruplarının amin gruplarına dönüşümü sağlanmıştır. Tekrar yıkanan lifler, % 4'lük glutaraldehit çözeltisi ile aktive edildikten sonra enzim immobilize edilmiştir.

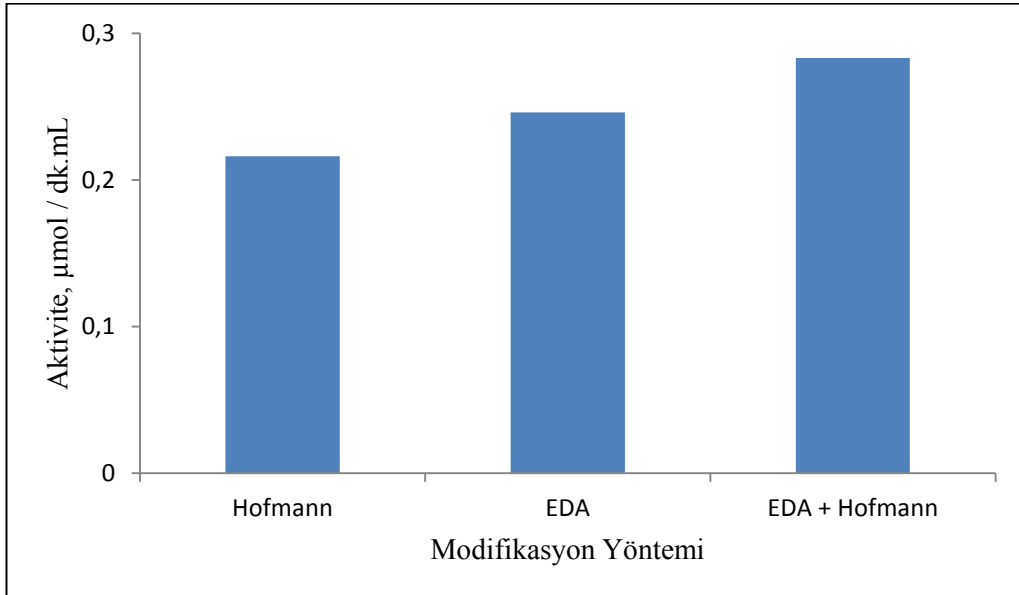
Yukarıdaki adımların uygulanması sonucunda en yüksek aktivite, 3. adımın kullanılması sonucunda elde edilmiştir. Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21, PET-g-GMA/MAAm liflerinin farklı yöntemlerle modifiye edilerek HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilize edilmesi sonucu, gösterdikleri aktiviteleri göstermektedir.



Şekil 4.19. HRP enzimi aktivitesine, farklı modifikasyon yöntemlerinin etkisi



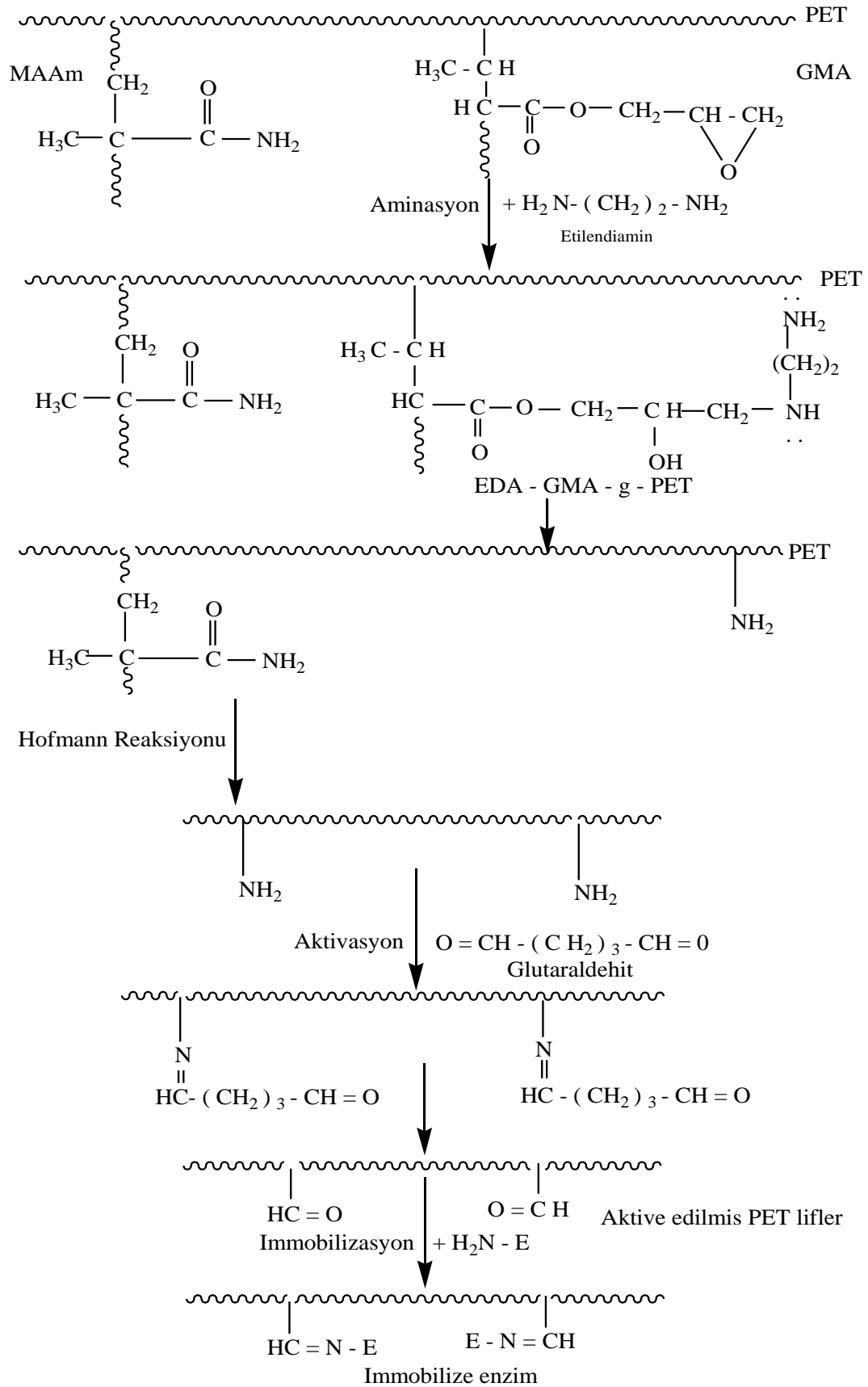
Şekil 4.20. Lakkaz enzimi aktivitesine, farklı modifiye yöntemlerinin etkisi



Şekil 4.21. Lipaz enzimi aktivitesine, farklı modifiye yöntemlerinin etkisi

Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21’de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi, hem etilen diamin, hem de Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiş PET liflere; HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilize edilmesinden elde edilmiştir. Aşılınmış PET lifler üzerinde, her iki yöntemin kullanılması sonucunda daha fazla amin grubu olduğundan, amin grupları üzerinden yapıya daha fazla glutaraldehit bağlanmış ve dolayısıyla daha fazla enzim immobilize olmuştur. Bunun sonucunda daha yüksek aktivite elde edilmiştir. İmmobilizasyonda kullanılan reaksiyon basamakları Şekil 4.22’de gösterilmektedir.

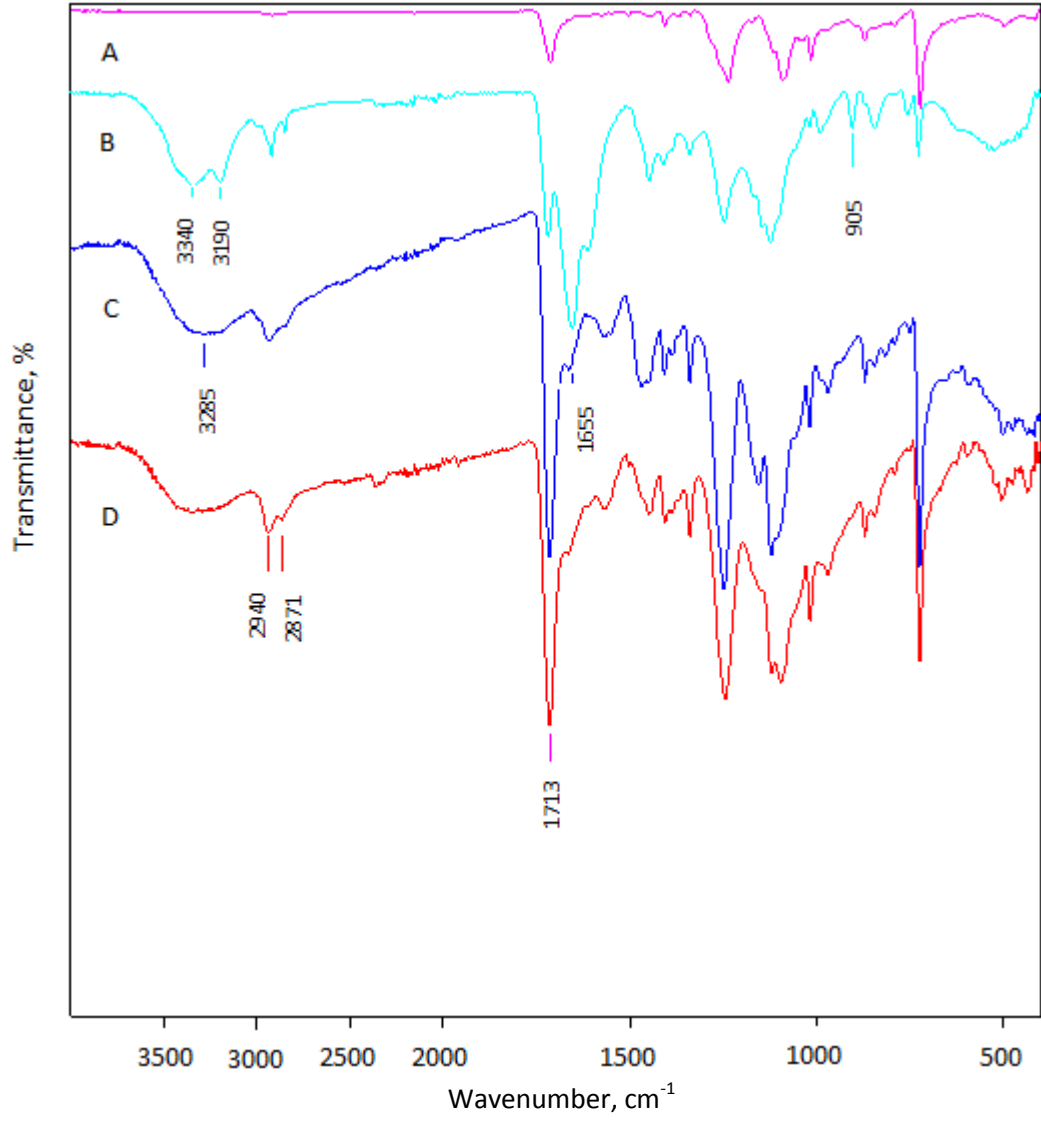
En yüksek aktivite, hem etilen diamin hem de Hofmann dönüşüm reaksiyonu uygulanarak modifiye edilmiş liflere enzim immobilize edilerek elde edildiğinden, çalışmanın bundan sonraki aşamalarında liflere enzim immobilizasyonu için üçüncü adım kullanılmıştır.



Şekil 4. 22. Enzim immobilizasyon mekanizması

4.14.2. Modifiye PET Liflerin FTIR Analizi

Şekil 4.23'te aşlanmamış PET lifin (a), GMA / MAAm aşlanmış PET lifin (b), etilen diamin ve Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiş PET lifin (c), ve glutaraldehit bağlanmış PET lifin (d), FTIR spektrumları verilmiştir. Spektrum a ve b karşılaştırıldığında, b spektrumunda metakrilamide ait karbonil grubunun gerilme piki ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$) ve assosiyel olmamış N-H titreşim pikleri (~ 3340 ve 3199 cm^{-1}) görülmüştür. Bu veriler metakrilamidin PET lif üzerine aşıldığını göstermektedir. Ayrıca b spektrumunda ($\sim 905 \text{ cm}^{-1}$)'de görülen pik epoksi pikidir. Bu pik GMA'nın PET life aşıldığının bir kanıtıdır. Spektrum b ve c incelendiğinde ise, karbonil grubuna ait ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$)'de görülen pikin şiddetinde azalma görülmüştür. Ayrıca 3340 ve 3199 cm^{-1} N-H titreşim piklerinin 3285 cm^{-1} 'de daha geniş bir assosiyel N-H titreşim pikine dönüşmüştür. Bu bilgilerden etilen diamin ve Hofmann reaksiyonu ile PET lif üzerindeki metakrilamid gruplarının bir kısmının amin gruplarına dönüştüğü anlaşılmıştır. Spektrum c ve d karşılaştırıldığında ise yapıya glutaraldehidin katılması ile 1655 cm^{-1} de elde edilen pikte genişleme görülmüştür. Pikteki genişleme aldehit karbonilinden ve amin ile aldehit arasında meydana gelen imin bağından (C=N) kaynaklanmaktadır. Ayrıca 2871 cm^{-1} dalga boyunda glutaraldehidin karakteristik piki (C-H gerilme titreşimi -CHO) elde edilmiştir. Glutaraldehidin yapıya katılması ile 2940 cm^{-1} C-H (-CH₂-) gerilme titreşiminden kaynaklanan pikin şiddetinde artış gözlenmiştir.

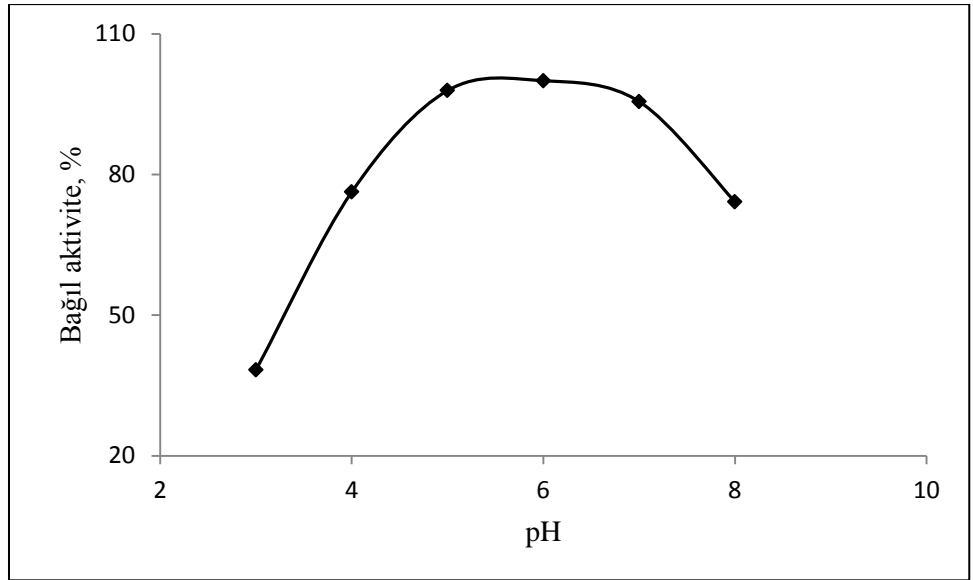


Şekil 4.23 Aşılanmış PET liflerin modifikasyonuna ilişkin FTIR spektrumları;
A-aşılanmamış PET lifin, B- PET-g- GMA / MAAm lif, C- EDA ve Hofmann ile modifiye edilmiş PET lif ve D- glutaraldehit bağlanmış PET

4.15. Enzim İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

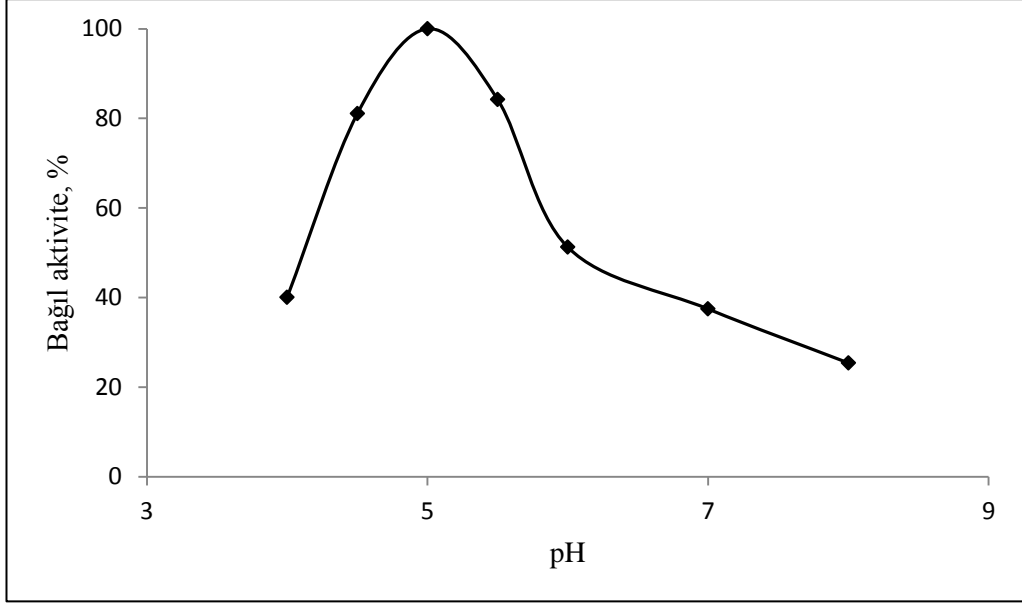
4.15.1. Enzim İmmobilizasyonuna pH'nın Etkisi

HRP enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi, Şekil 4.24'te verilmiştir. İmmobilize HRP enzimi için en yüksek aktivite pH= 5-7 aralığında elde edilmiştir.



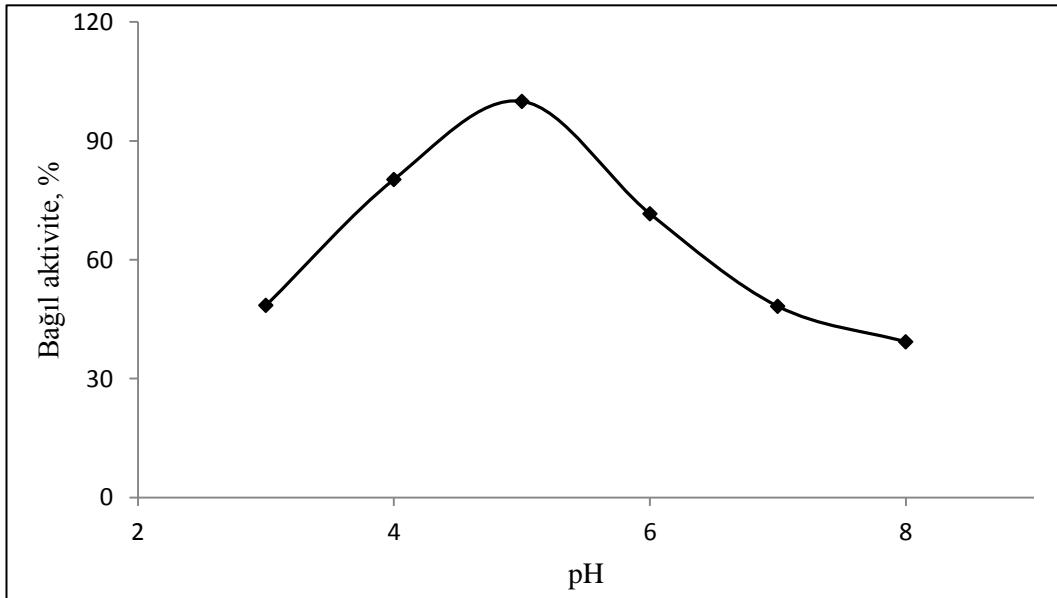
Şekil 4.24. HRP immobilizasyonuna pH'nın etkisi

Lakkaz enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi, Şekil 4.25'te verilmiş ve lakkaz için en yüksek immobilizasyon pH 5'te gerçekleşmiştir.



Şekil 4.25. Lakkaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi

Lipaz enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi, Şekil 4.26'da verilmiş ve lipaz için en yüksek immobilizasyon pH 5'te gerçekleşmiştir.



Şekil 4.26. Lipaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi

İmmobilize HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin aktiviteleri, immobilizasyon ortamının pH'ına bağı olarak değişmiştir. Enzim molekölü üzerinde kovalent bağı oluşturduğı noktanın, immobilizasyonun gerekleştigi pH değerine bağı olduğı düşünölmektedir. Wang ve arkadaşları [84], enzimlerin destek materyaline en yüksek miktarda immobilize olduğı pH'nın, genellikle daha az çözündükleri için enzimlerin izoelektrik noktaları veya daha yakın değerlerinde gerçekleştiklerini rapor etmişlerdir. HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin modifiye PET liflere immobilizasyonunun gerekleştigi optimum pH değerlerinde (6, 5, 5) kovalent bağlanmanın gerekleşmediğı ve enzimin aktif merkezinin maskelendiğı düşünölebilir. Ayrıca PET lif üzerindeki serbest aldehit grupları ile enzimin aktif merkezinden uzak bölgelerdeki amin grupları arasında bir reaksiyonun gerekleştigi düşünölebilir [48].

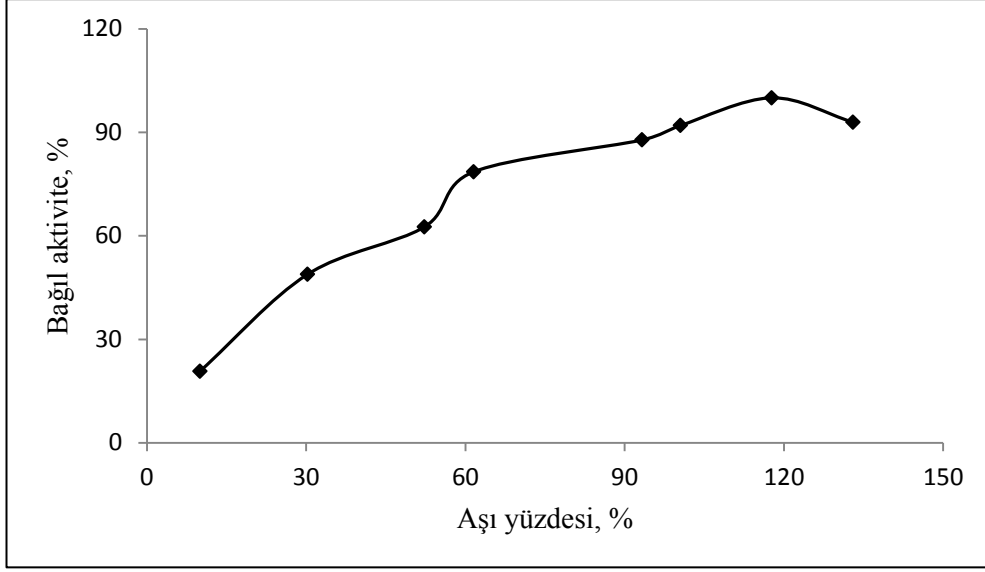
Yücel [85], zeytin ezmesi üzerine lipaz enzimi immobilize ederek, biyodizel üretiminde kullanmıştır. Yücel, immobilizasyona pH'nın etkisini, 5-9 aralığında araştırmış, en yüksek aktivitenin pH= 6'da gerekleştigini ve yüksek pH değerlerinde enzimin denatüre olmasıyla aktivitesini kaybettiğini rapor etmiştir.

Azevedo ve arkadaşları [86], karbon nano tüplere HRP enzimini immobilize ederek, immobilizasyon şartlarını optimize etmişlerdir. Karbon nano tüplere HRP immobilizasyonunun gerekleştigi en yüksek pH 6 olarak rapor etmişlerdir. alışmalarında HRP enzimi için immobilizasyon pH'ının genellikle asidik ve nötral bölgelerde, bazık bölgelere göre daha yüksek ihtimalde gerekleştigini rapor etmişlerdir.

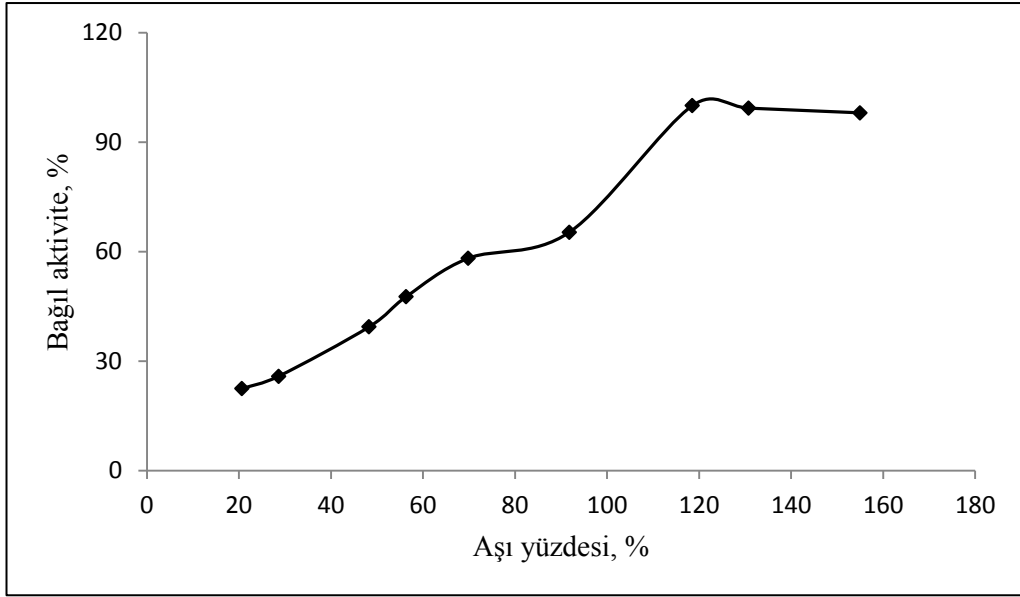
4.15.2. Enzim İmmobilizasyonuna Aşı Yüzdesinin Etkisi

HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin immobilizasyonuna, GMA/MAAm monomer karışımının PET lif aşı yüzdelерinin etkisi sırası ile Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve 4.29'da verilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi GMA/MAAm monomer karışımının PET lif üzerine aşı yüzdesi arttıkça, her üç enzimin aktivitesinin de arttığı görülmüştür.

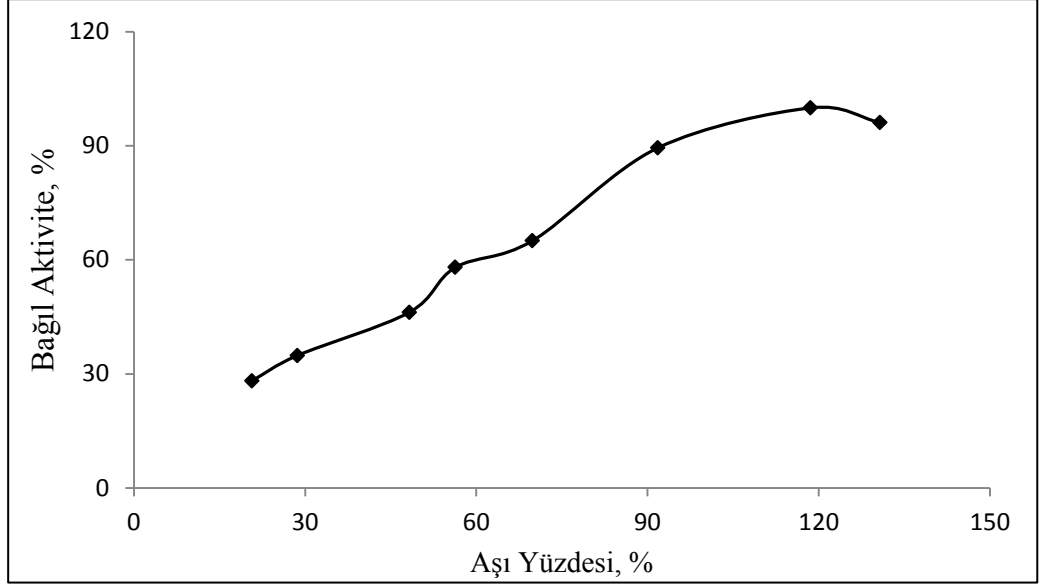
İmmobilize olan enzim miktarı, PET lif üzerinde bulunan fonksiyonel grup sayısı ile orantılıdır. PET lif yüzeyinde amit ve epoksi gruplarının artışı, aynı zamanda PET lif yüzeyinde Hofmann reaksiyonu ve etilen diamin ile amin gruplarının artışı anlamına gelmektedir. Bu nedenle fonksiyonel grup sayısına bağlı olarak enzim aktivitelerinde artma gözlenmiştir. Enzim aktivitelerindeki artış HRP, lakkaz ve lipaz enzimleri için yaklaşık % 120 değerine kadar devam ettiği gözlenmiştir. Bu aşı yüzdesinden sonra enzim aktivitelerinde önemli bir değişim gerçekleşmemiştir. Bunun nedeninin hidrofobik etkileşim veya destek materyali üzerinde protein yığılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.27. İmmobilize HRP aktivitesine aşı yüzdesinin etkisi



Şekil 4.28. İmmobilize lakkaz aktivitesine aşı yüzdesinin etkisi



Şekil 4.29. İmmobilize lipaz aktivitesine aşı yüzdesinin etkisi

Arslan [46], GMA aşılannmış PET liflere HRP enzimini immobilize etmiş, enzim aktivitesinin % 25 aşılama verimine kadar arttığını, bu değerdan sonra enzim aktivitesinde bir azalma olduğunu rapor etmiştir.

Shukla ve Devi [87], HRP enzimini akrilamit-2-hidroksi etil metakrilat kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Enzim aktivitesinin kopolimerdeki akrilamit oranına bağılı olarak değıştığını ve aktivitenin %50 akrilamit oranına kadar arttığını, bu değerdan sonra aktivitede azalma gözleendiğini rapor etmişlerdir.

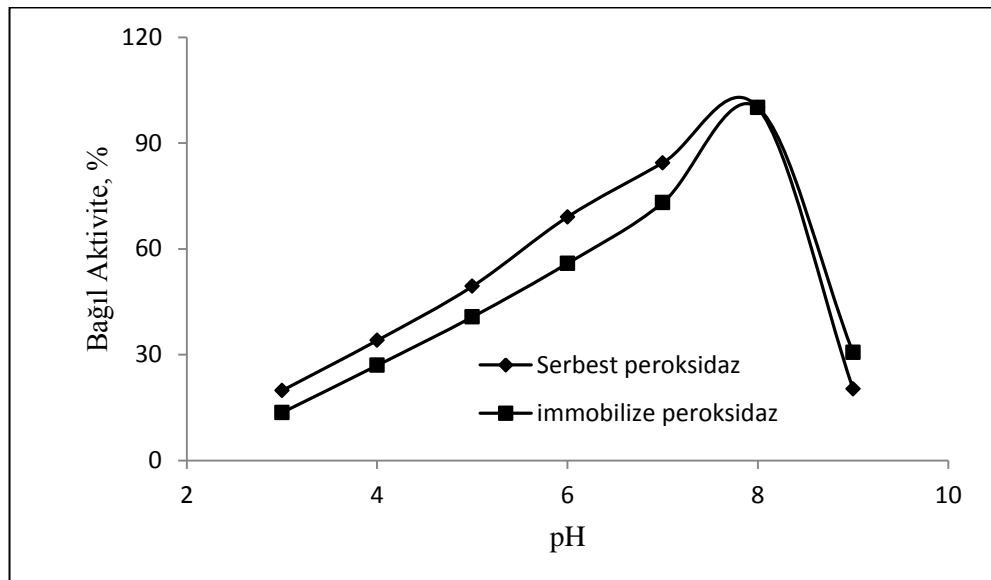
4.16. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.16.1. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin aktiviteleri ile pH arasındaki ilişki Şekil 4.30'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi serbest ve immobilize HRP enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8'dir.

Matto ve diğerleri con-A selülöz destek maddesi üzerine HRP enzimini immobilize etmiş, serbest ve immobilize enzim için maksimum aktivite gösterdiği pH'yı 6 olarak rapor etmişlerdir [88].

Zhai ve diğerleri, kitosan-halloysit (alüminyum silikat bileşeni) hibrit nano tüpleri üzerine HRP enzimi immobilize etmiş, immobilize enzimi atık sulardaki fenol gideriminde kullanmışlardır. Serbest ve immobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olarak rapor edilmiştir [49].

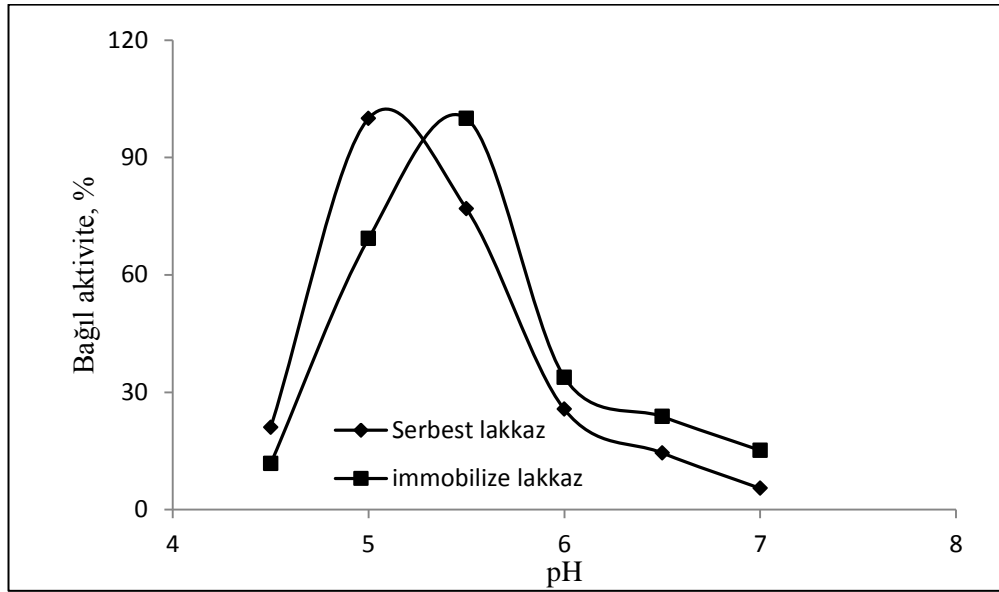


Şekil 4.30. HRP enziminin aktivitesine pH'nın etkisi

Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin aktiviteleri ile pH arasındaki ilişki Şekil 4.31’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi serbest ve immobilize lakkaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değerleri sırasıyla 5 ve 5,5’tir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Spinelli ve diğerleri, Amberlite IR-120 H küreler üzerine lakkaz enzimini immobilize etmiş, serbest ve immobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini 4,5 olarak bulmuşlardır [89].

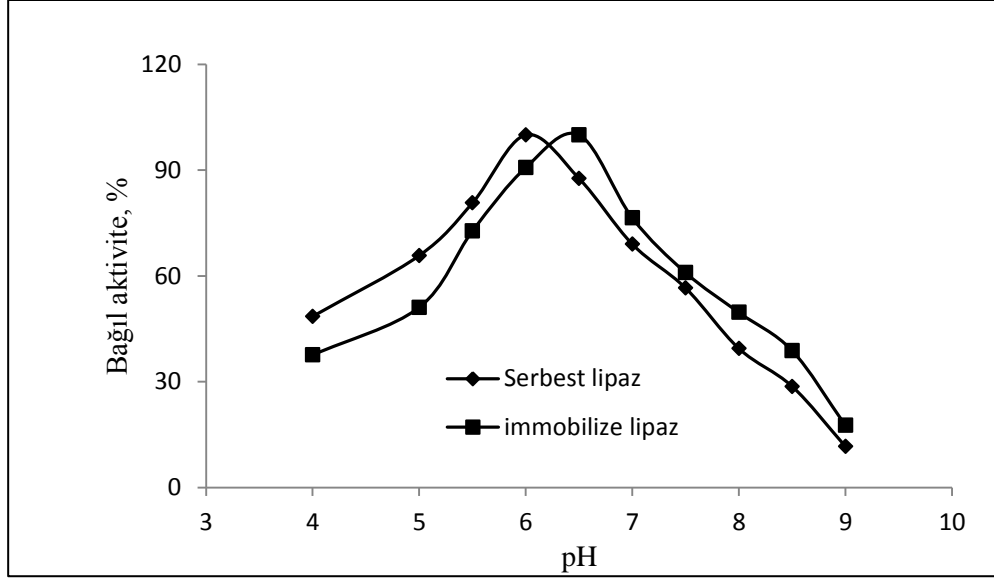
Doğan ve arkadaşları, poli (glisidil metakrilat) sirojellerine lakkaz enzimini immobilize ederek, immobilize enzimi fenol degradasyonunda kullanmışlardır. Çalışmalarında serbest ve immobilize enzimin aktivite gösterdiği en yüksek pH’yı 5 olarak rapor etmişlerdir [90].



Şekil 4.31. Lakkaz enziminin aktivitesine pH’ın etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktiviteleri ile pH arasındaki ilişki Şekil 4.32’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi serbest ve immobilize lipaz

enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değerleri sırasıyla 6 ve 6,5'tur. Sonuçlar literatür ile uyum içerisindedir.



Şekil 4.32. Lipaz enziminin aktivitesine pH'ın etkisi

Huang ve arkadaşları, selülöz nano fiber membranlar üzerine lipaz enzimini immobilize ettiği çalışmalarında, serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivite gösterdiği maksimum pH'yı sırasıyla, 5,5 ve 6 olarak rapor etmişlerdir [91].

Hou ve arkadaşları, magnetik polidopamin/aljinat biyokomposite lipaz enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize enzim için optimum aktivite şartlarını araştırmışlardır. Araştırmalarının sonucunda serbest ve immobilize enzimin aktivite gösterdiği en uygun pH'nın 7 olduğunu rapor etmişlerdir [92].

pH sulu çözeltide enzimatik aktiviteyi değiştiren en önemli faktörlerden biridir. Enzim immobilizasyonu sonucunda optimum pH'nın değişmesiyle enzimin konformasyonel yapısı da değişikliğe uğrar. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyale bağlı olarak, immobilize enzimlerin optimum pH değerlerinde

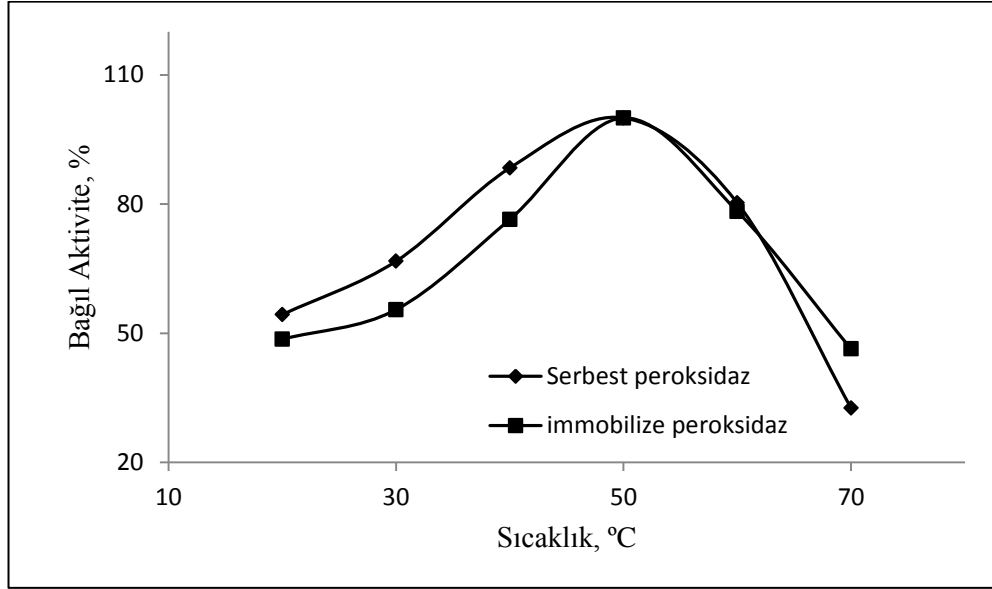
serbest enzimlere göre değişim meydana gelebilmektedir. Çünkü enzim aktivitesi çevresel şartlardan önemli ölçüde etkilenmektedir [93]. GMA/MAAm-g-PET lifler üzerine immobilize edilen HRP enziminin immobilizasyon ile konformasyonel yapısında bir değişikliğin olmadığı ve enzimin pH profilinde bir değişmenin meydana gelmediği söylenebilir. İmmobilizasyon sonucunda lakkaz ve lipaz enzimlerinin pH profilinde değişme meydana geldiği ve buna bağlı olarak enzimlerin konformasyonel yapılarının değiştii düşünölebilir. Ayrıca immobilize ve serbest enzimlerin maksimum aktivitelerinin farklı pH değerlerinde gözlemlenmesi, immobilize sistemlerde hidrojen iyonlarının destek materyalin mikro çevresi ile çözelti içerisindeki dağılımlarının farklı olmasından kaynaklanabilir [94].

4.16.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin aktiviteleri ile sıcaklık arasındaki ilişki Şekil 4.33'te verilmiştir. Şekilde göröldüğü gibi serbest ve immobilize HRP enzimlerinin aktiviteleri 50 °C sıcaklığa kadar artmıştır. Maksimum enzim aktivitesi serbest ve immobilize sistem için 50 °C sıcaklıkta elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyum içerisinde. Literatürde farklı desteklere immobilize edilen HRP'nin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 30-60 °C aralığında verilmiştir.

Matto ve arkadaşları con-A selölöz destek maddesi üzerine HRP enzimini immobilize etmiş, serbest ve immobilize enzim için maksimum aktivite göstereceği sıcaklık değerini 40 °C olarak rapor etmişlerdir [88].

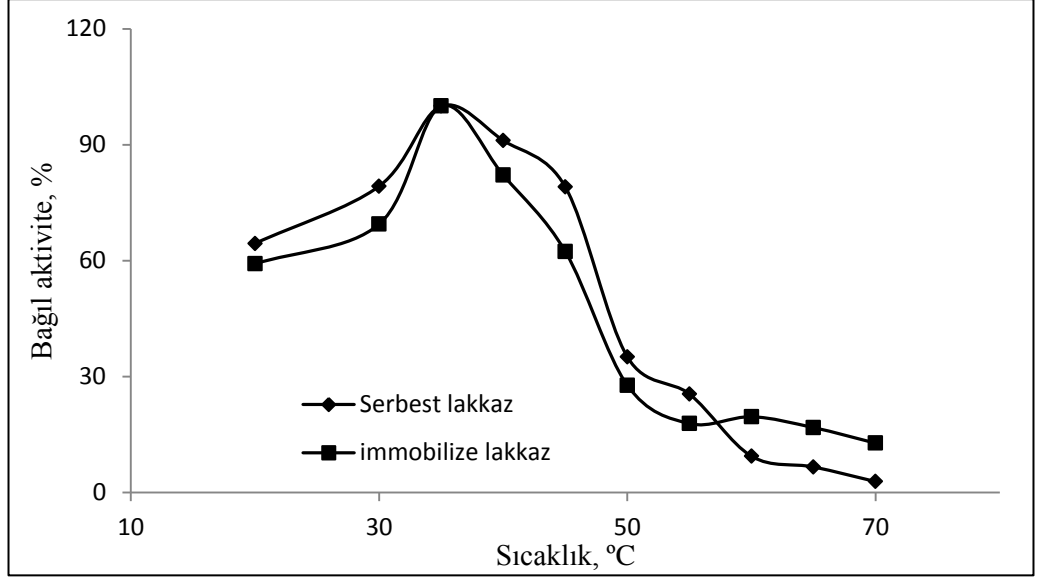
Mohamed ve arkadaşları, siyanürik klorür ile fonksiyonlandırılmış yüne HRP enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimin aktivite gösterdiği maksimum sıcaklığı 30 °C olarak rapor etmişlerdir [95].



Şekil 4.33. HRP enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin aktiviteleri ile sıcaklık arasındaki ilişki Şekil 4.34'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesi 35 °C sıcaklığa kadar artmıştır. Maksimum enzim aktivitesi serbest ve immobilize sistem için 35 °C sıcaklıkta elde edilmiştir.

Çorman ve arkadaşları, ortalama büyüklükleri 158,2 nm olan Poli(hidroksietilmetakrilat-N-metakrilolil-(1)- histidinmetilester) PHEMAH nano kürelere lakkaz enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimin aktivite gösterdiği maksimum sıcaklığı 35 °C olarak rapor etmişlerdir [96].

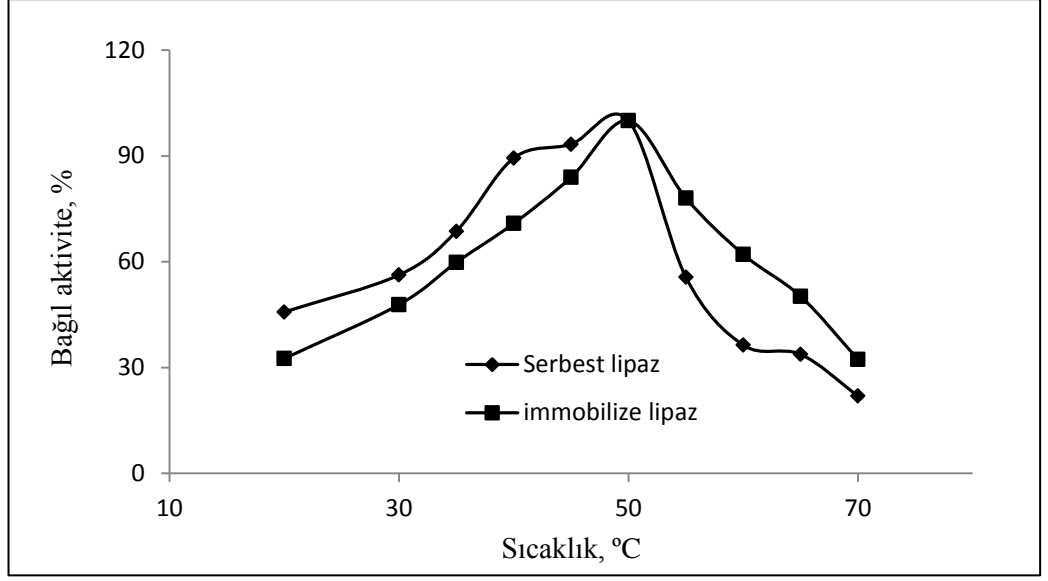


Şekil 4. 34. Lakkaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktiviteleri ile sıcak arasındaki ilişki Şekil 4.35'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivitesi 50 °C sıcaklığa kadar artmıştır. Maksimum enzim aktivitesi serbest ve immobilize sistem için 50 °C sıcaklıkta elde edilmiştir.

Wang ve arkadaşları, üç boyutlu grafen oksit- kitosan kompozitine lipaz enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerini araştırmışlardır. Enzimlerin aktivite gösterdikleri en yüksek sıcaklık değerini 50 °C olarak rapor etmişlerdir [97].

Lin Lei ve arkadaşları, Fe_3O_4/SiO_x magnetik partüküller üzerine ATRP polimerizasyon yöntemiyle GMA monomerini aşıl原因arak, elde ettikleri materyali enzim destek maddesi olarak kullanmışlardır. Materyale lipaz enzimi immobilize ederek, serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktivite gösterdiği maksimum sıcaklık değerini 40 °C olarak rapor etmişlerdir [98].



Şekil 4. 35. Lipaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

Enzimlerin katalitik aktiviteleri onların konformasyonel yapıları ile ilgilidir. Enzimler de biyolojik katalizörler olduğundan, kimyasal katalizörlerde olduğu gibi aktiviteleri sıcaklık artışı ile artar. Sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışma artmakta ve buna bağlı olarak da genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Serbest enzimler yüksek sıcaklıklarda kararsızdırlar. Çünkü sıcaklık artışı ile birlikte enzimlerin katalitik aktivitesinin bağlı olduğu konformasyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir. Enzimler protein yapılı oldukları için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrarlar. Bu yüzden hızlı bir şekilde aktivite kaybederler. Enzim molekülleri için, immobilizasyon daha sert bir yapı sağlar böylece yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonel geçişini önler [99, 100].

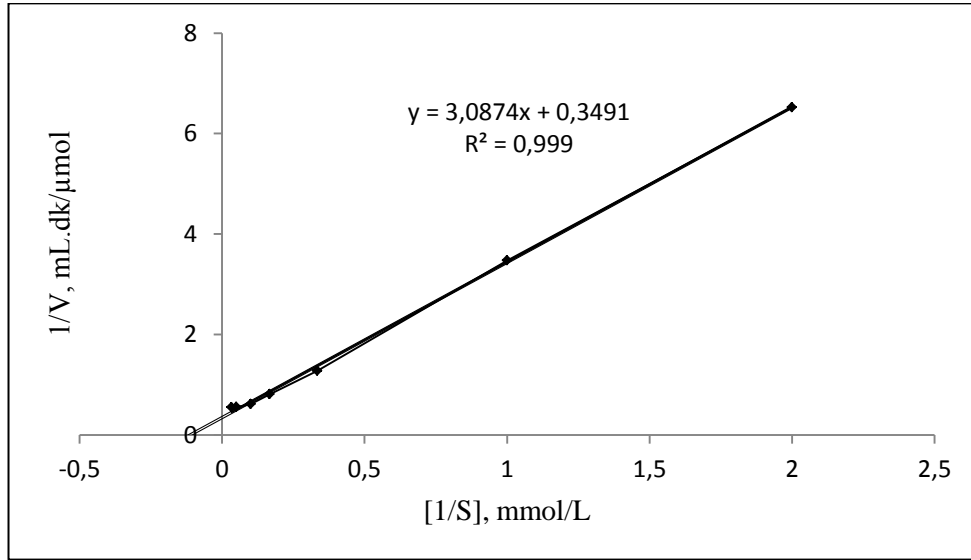
4.16.3. Enzim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest ve immobilize HRP enzimlerinin Lineweaver-Burk grafikleri sırası ile Şekil 4.36 ve Şekil 4.37’de verilmiştir. Serbest ve immobilize HRP enzimlerine ait kinetik parametreler grafikler yardımıyla formül 2.10’a göre hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize HRP enzimlerine ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. İmmobilizasyondan sonra, HRP enziminin K_m değerinde bir artış gözlenmiştir. K_m değerindeki bu değişim, immobilizasyon yöntemi ve destek materyalinin, enzimin substrata olan özgülüğünü etkilediğini göstermektedir. Literatürde K_m değerindeki bu artışın, enzimin destek materyale bağlanmasıyla esnekliğini kaybetmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca enzimin destek materyaline bağlanma sırasındaki aktivite kaybı, K_m değerinin artmasına neden olmuştur [84]. Serbest enzimin V_{mak} değeri immobilizasyondan sonra azalmıştır. Bu durum aynı substrat konsantrasyonunda ürünün elde edilme hızının serbest ve immobilize HRP enzimleri için farklı olduğunu göstermektedir. V_m değerleri arasındaki bu farkın, oluşan ürünün aşılınmış PET lif yüzeyine adsorplanmış olması ihtimalinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca immobilizasyon ile V_m değerindeki azalış literatürde; enzim destek materyalinin sterik engel nedeniyle, enzimin aktif bölgesine substratın erişebilirliğinin azalması şeklinde yorumlanmaktadır [84] . Elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

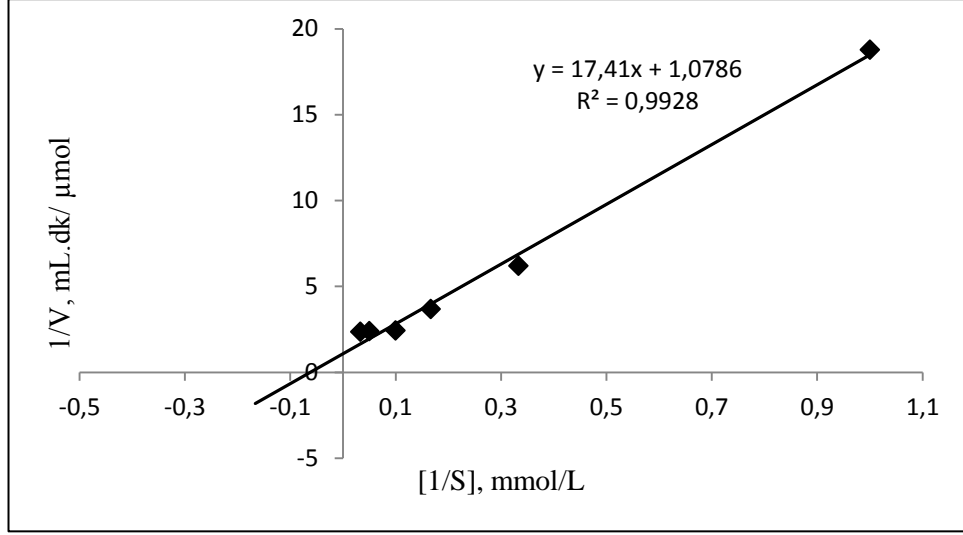
Prodanović ve arkadaşları, 1,2- diamino etan ile modifiye edilmiş poli(GMA-ko-EGDMA) destek maddesi üzerine glutaraldehit ve periyodat varlığında, HRP enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Çalışmasında, serbest HRP enziminin K_m değerinin 1,93 mmol /mL iken, immobilize HRP

enziminin 10,8 mmol/L değerine arttığını, serbest enzimin V_{mak} değerinin, immobilize enzimin V_{mak} değerinden yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [43].

Jiang ve arkadaşları, fosfolipit- titan partikülleri ile elde edilmiş kapsüllere HRP enzimini hapsederek, immobilize enzimi atık sulardaki 2-kloro fenol ve bazı boyaların giderilmesinde kullanmışlardır. Jiang ve arkadaşları çalışmalarında, serbest HRP enzimi için K_m değerinin 1,98 mM 'dan, immobilizasyondan sonra 8,21 değerine arttığını, serbest enzimin V_{mak} değerinin 2,53 mM/dak değerinden, immobilizasyondan sonra 0,53 mM/dak V_{mak} değerine düştüğünü rapor etmişlerdir [101].



Şekil 4.36. Serbest HRP enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.37. İmmobilize HRP enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.6. HRP enziminin kinetik parametreleri

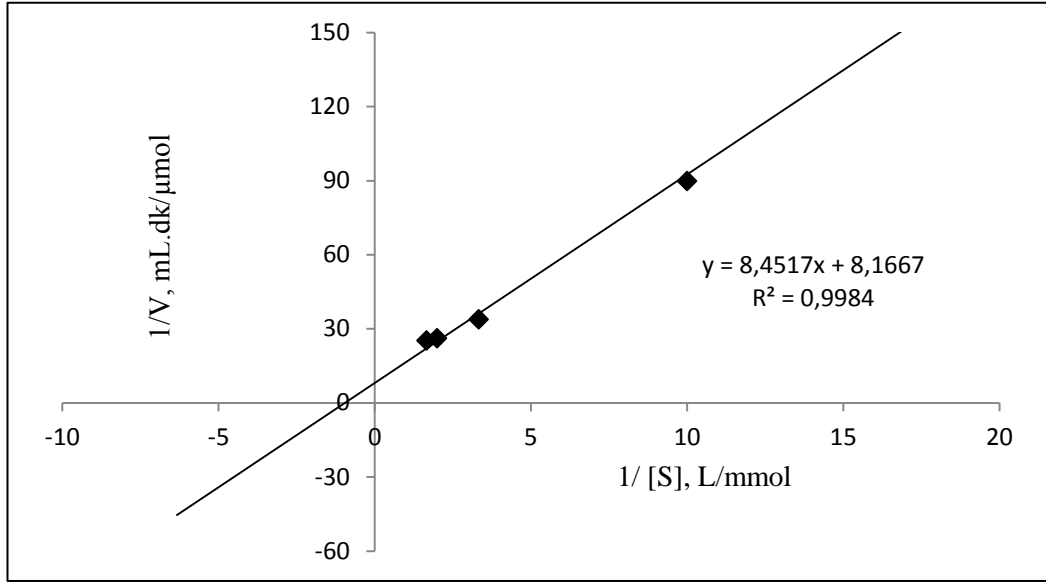
Enzim	V_{mak} ($\mu\text{mol/mL.dak}$)	K_m (mmol/L)	R^2
Serbest HRP	2,86	8,85	0,999
İmmobilize HRP	0,93	16,15	0,992

Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafikleri sırası ile Şekil 4.38 ve Şekil 4.39’da verilmiştir. Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerine ait kinetik parametreler grafikler yardımıyla formül 2.2’ye göre hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize lakkaz enzimlerine ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. İmmobilizasyondan sonra lakkaz enziminin K_m değerinde, ciddi bir artış gözlenmemiştir. Bu sonuç, immobilizasyon yöntemi ve destek materyalinin, enzimin substrata (şiringaldazin) olan özgülüğünü çok fazla etkilemediğini göstermektedir. Serbest lakkazın V_{mak} değeri, immobilizasyondan sonra azalmıştır. Bu durum aynı substrat konsantrasyonunda ürünün elde edilme

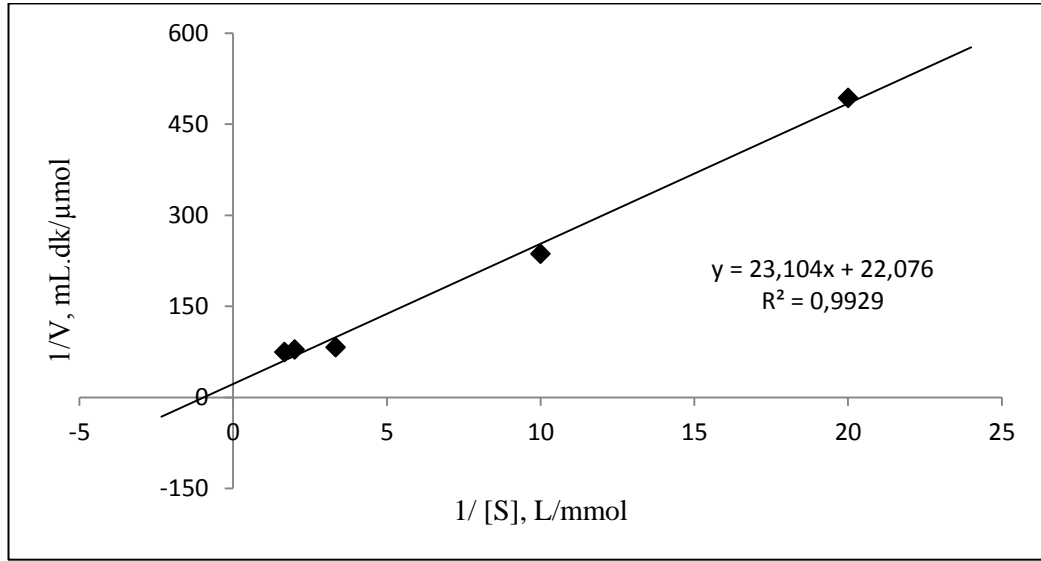
hızının serbest ve immobilize lakkaz enzimleri için farklı olduğunu göstermektedir. V_m değerleri arasındaki bu farkın, oluşan ürünün aşılınmış PET lif yüzeyine adsorplanmış olma ihtimalinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir.

Gökgöz ve arkadaşları, lakkaz enzimini, poliakrilamid (PAAm), poliakrilamid - *k*-karragenan (PAAm-K1) ve poliakrilamid- *k*-karragenan (PAAm-K2) jelleri içine hapsetme yoluyla immobilize etmişlerdir. Gökgöz çalışmasında, serbest lakkaz enziminin K_m değerinin 0,088 mM iken, yukarıdaki immobilize lakkaz enzimleri için K_m değerleri sırasıyla, 0,139, 0,133, 0,131 değerlerine arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca V_{mak} değerleri, serbest enzim için 2.83×10^{-3} mM / dak iken, immobilize enzimler için sırasıyla, 4.51×10^{-3} , 4.76×10^{-3} , ve 4.97×10^{-3} mM /dak olarak rapor etmişlerdir [102].

Çorman ve arkadaşları, ortalama büyüklükleri 158,2 nm olan Poli(hidroksietilmetakrilat-*N*-metakriloil-(1)-histidinmetilester) PHEMAH nano kürelere lakkaz enzimini immobilize ederek, serbest enzim için K_m değerinin immobilizasyondan sonra arttığını, V_{mak} değerinin ise immobilizasyondan sonra düştüğünü rapor etmişlerdir [96].



Şekil 4.38. Serbest lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.39. İmmobilize lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

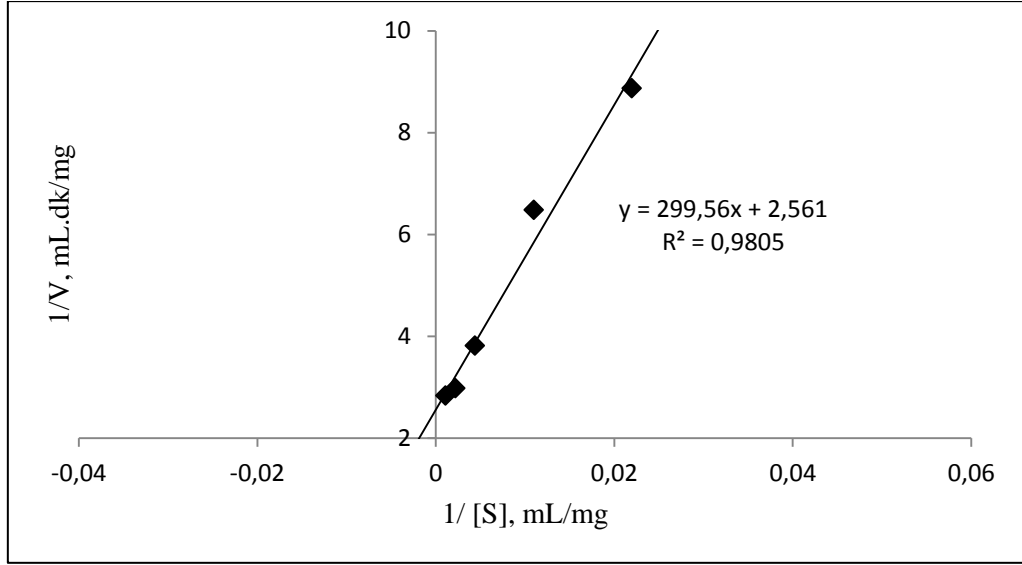
Çizelge 4.7. Lakkaz enziminin kinetik parametreleri

Enzim	V_{mak} ($\mu\text{mol/mL.dak}$)	K_m (mmol/L)	R^2
Serbest Lakkaz	0,122	1,035	0,998
İmmobilize Lakkaz	0,045	1,046	0,993

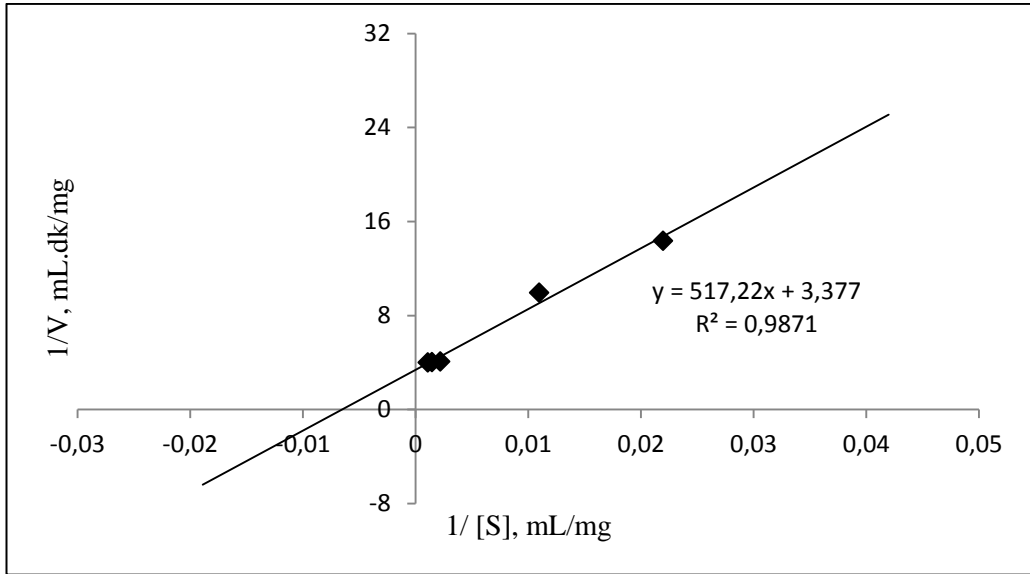
Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafikleri sırası ile Şekil 4.40 ve Şekil 4.41’de verilmiştir. Serbest ve immobilize lipaz enzimlerine ait kinetik parametreler grafikler yardımıyla formül 2.2’ye göre hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz enzimlerine ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. İmmobilizasyondan sonra lipaz enziminin V_{mak} değerinde bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca immobilizasyon lipaz enzimin K_m değerinin artmasına neden olmuştur. K_m değerindeki artış, konformasyonel değişim sonucu enzim-substrat kompleksinin oluşma ihtimalinin azalmasından ya da substratın immobilize enzimin aktif merkezine taşınmasının sınırlandırılmasına bağlanabilir [103].

Pahujani ve arkadaşlarının, glutaraldehit ile aktive edilmiş nylon 6’ya lipaz enzimini immobilize ettiği çalışmada serbest ve immobilize enzime ait kinetik parametreler belirlenmiştir. Pahujani çalışmasında serbest enzim için K_m ve V_m değerlerini sırasıyla, 3,8 mM ve 4 mM olarak, V_m değerlerini ise serbest ve immobilize enzim için, 0.72 ve 10 $\mu\text{mol/ml. dak}$ olarak rapor etmişlerdir [104].

Raghuvanshi ve Gupta, gözenekli yapıya sahip olan bir destek maddesi üzerine lipaz enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize lipaz enzimlerine ait kinetik parametreleri belirlemişlerdir. Serbest enzim için K_m ve V_m değerlerini sırasıyla 0,3 mM ve 1 $\mu\text{mol/ml. dak}$, immobilize enzim için K_m ve V_m değerlerini ise 4 mM ve 10 $\mu\text{mol/ml. dak}$ olarak rapor etmişlerdir [105].



Şekil 4.40. Serbest lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



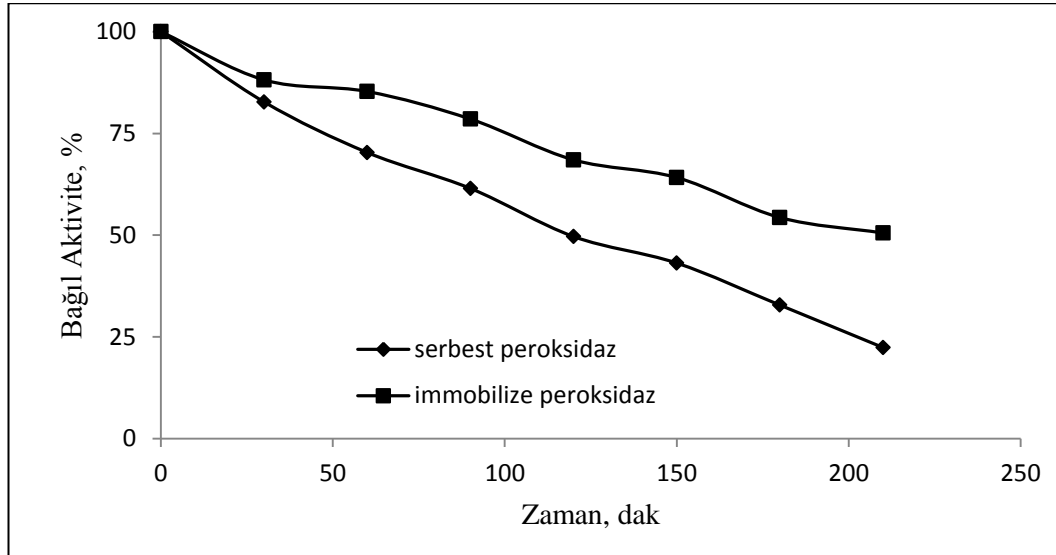
Şekil 4.41. İmmobilize lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. Lipaz enziminin kinetik parametreleri

Enzim	V_{mak} (mg / mL.dak)	K_m (mg / ml)	R^2
Serbest Lipaz	0,39	116,97	0,981
İmmobilize Lipaz	0,296	153,16	0,987

4.17. Enzimlerin Termal Kararlılığı

Serbest ve immobilize HRP enzimleri, 60 °C sabit sıcaklıktaki su banyosunda ve tampon çözelti (pH= 8) içerisinde 210 dakika inkübe edilerek termal kararlılıkları incelenmiştir. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.42’de verilmiştir.



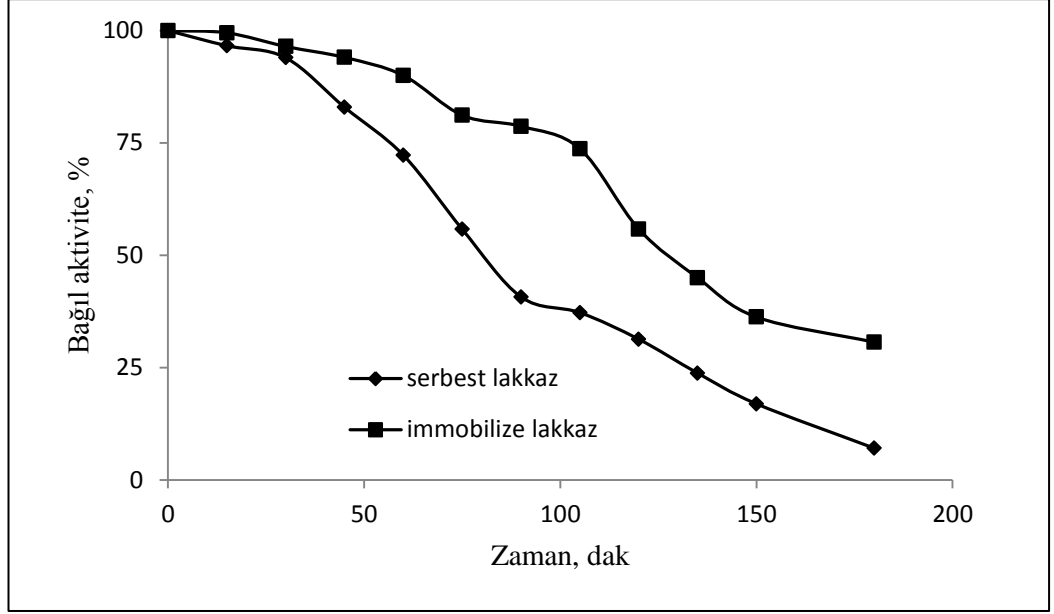
Şekil 4.42. HRP enziminin termal kararlılığı

Şekilde görüldüğü gibi immobilize HRP'nin, serbest HRP enzimine göre daha iyi termal kararlılık gösterdiği görülmektedir. Immobilize HRP 210 dakikanın sonunda, başlangıç aktivitesini % 50,53 oranında korurken, serbest enzim ancak % 22 oranında korumuştur. Immobilize enzimin 1 saatlik sürenin sonunda aktivitesinin % 85, 31'ini koruduğu gözlenmiştir.

Li ve arkadaşları, karbon nano tüpler üzerine HRP ve lakkaz enzimlerini immobilize ederek, enzimlerin belirli sıcaklıklardaki termal kararlılıklarını incelemişlerdir. Enzimleri 30 °C'den 60 °C aralığındaki sıcaklıklarda 1 saat inkübe ederek termal kararlılık çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. HRP enzimi için 1 saatlik sürenin sonunda 60 °C'de serbest enzim aktivitesinin % 55'ini korurken, immobilize HRP enzimi aktivitesinin % 70'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [106].

Park ve arkadaşları, HRP enzimini peptit nano tüplere kapsülleme yöntemi ile immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimin 55 °C'deki termal kararlılıklarını incelemişlerdir. Bu sıcaklıkta serbest enzim başlangıç aktivitesinin % 60'ını korurken, immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 80'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [107].

Serbest ve immobilize lakkaz enzimleri, 45 °C sabit sıcaklıktaki su banyosunda ve tampon çözelti içerisinde (pH=5) 180 dakika inkübe edilerek termal kararlılıkları incelenmiştir. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.43'te verilmiştir.



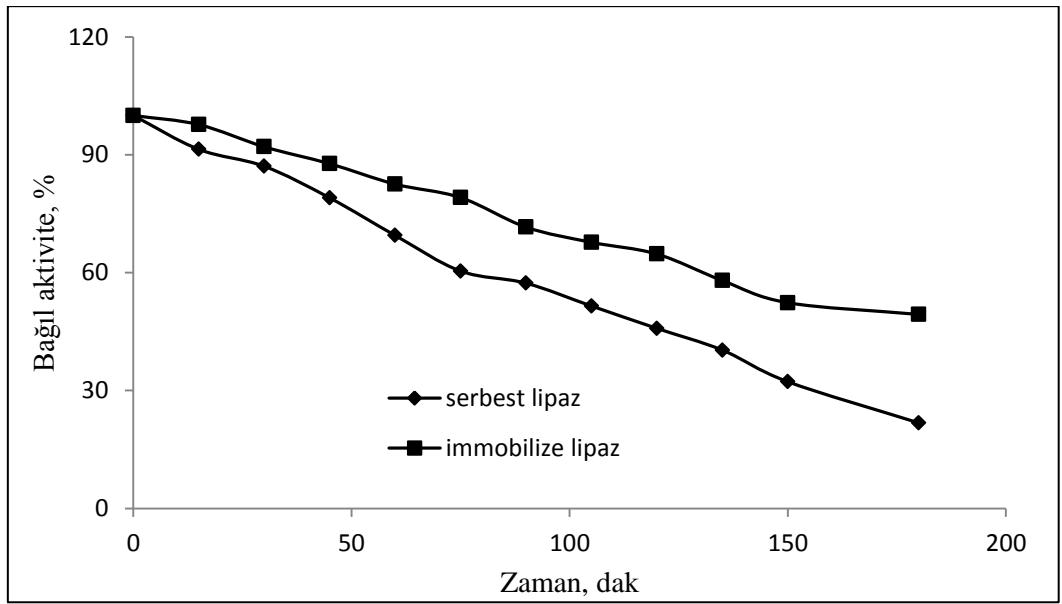
Şekil 4.43. Lakkaz enziminin termal kararlılığı

Şekilde görüldüğü gibi immobilize lakkaz enzimi, serbest lakkaz enzimine göre daha iyi termal kararlılık göstermiştir. İmmobilize lakkaz 180 dakikanın sonunda, başlangıç aktivitesini % 30,67 oranında korurken serbest enzim, başlangıç aktivitesini % 7,09 oranında korumuştur.

Daâssi ve arkadaşları, lakkaz enzimini, Ca-aljinat kürelere hapsedme yöntemi ile immobilize etmiş ve immobilize enzimi bazı tekstil boyalarının biyodegradasyonunda kullanmışlardır. Daassi çalışmasında, serbest ve immobilize enzimi, 55 °C sıcaklıkta 210 dk inkübe ederek, enzimlerin termal kararlılıklarını incelemiştir. Bu sürenin sonunda serbest lakkaz başlangıç aktivitesinin % 3'ünü korurken immobilize enzim başlangıç aktivitesinin % 67'sini koruduğunu rapor etmişlerdir [108].

Silva ve arkadaşları, 1,6- hekzan diamin ile fonksiyonlandırılmış poliamit 6,6 liflere, lakkaz enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimi 25 °C’de 79 saat inkübe ederek termal kararlılıklarını incelemişlerdir. Bu sürenin sonunda immobilize enzimin, serbest enzime göre % 18 daha fazla aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir [109].

Serbest ve immobilize lipaz enzimleri, 50 °C sabit sıcaklıktaki su banyosunda ve tampon çözelti içerisinde (pH=5) 180 dakika inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.44’te verilmiştir.



Şekil 4.44. Lipaz enziminin termal kararlılığı

Şekilde görüldüğü gibi immobilize lipaz enzimi, serbest lipaz enzimine göre daha yüksek termal kararlılık gösterdiği görülmektedir. İmmobilize lipaz 180 dakikanın sonunda, başlangıç aktivitesini % 49,37 oranında korurken, serbest enzim başlangıç aktivitesini % 21,77 oranında korumuştur.

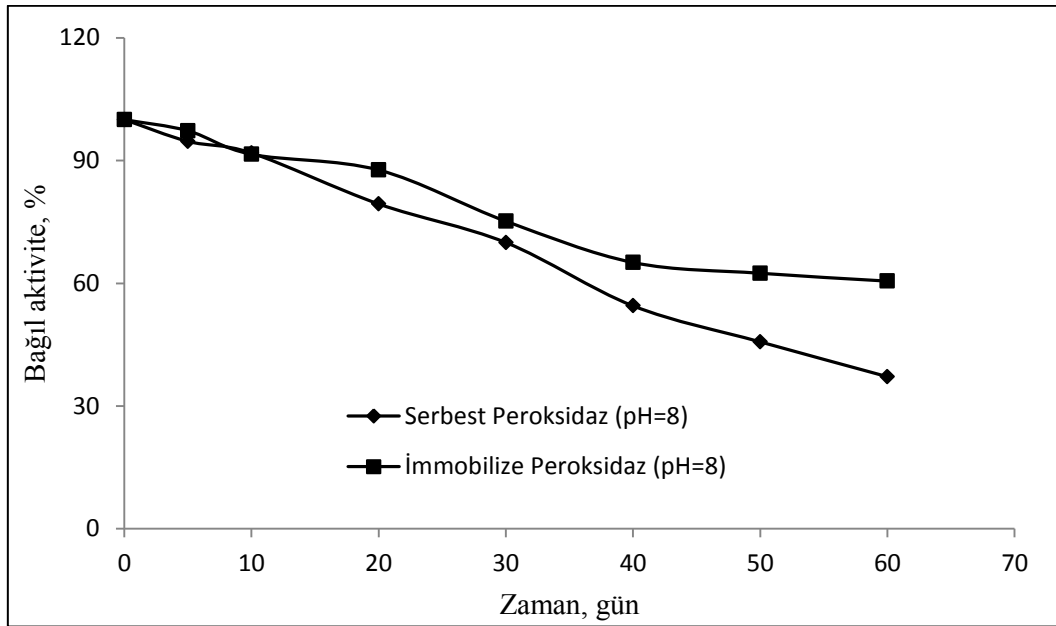
Yong ve arkadaşları, modifiye-Fe₃O₄ nanopartiküllere GMA ve metakriloksietil trimetil amonyum klorür monomerlerini aşilayarak modifiye etmişlerdir. Aşılama sonucunda elde ettikleri ürünü, lipaz enzimi için destek maddesi olarak kullanmışlardır. Yong ve arkadaşları, pH= 7 tamponunda 25-80 °C sıcaklık aralığında serbest ve immobilize lipaz enziminin termal kararlılıklarını araştırmış, 80 °C'de immobilize enzim başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 35'ini korurken, serbest enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 10'unu koruduğunu rapor etmişlerdir [110].

Gong ve arkadaşları, sodyum periyodat ile aktive edilmiş lif kabağı süngerine lipaz enzimini kovalent olarak immobilize etmiş, serbest ve immobilize lipazın termal kararlılıklarını araştırmışlardır. Bunun için serbest ve immobilize enzimi 60 °C sıcaklıkta, tampon çözeltide 3,5 saat inkübe etmişlerdir. Bu sürenin sonunda serbest enzim başlangıç aktivitesinin tamamına yakını kaybederken, immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50' sini koruduğunu rapor etmişlerdir [111].

Elde edilen deneysel sonuçlar, immobilizasyonun enzimlerin termal kararlılıklarını arttırdığını ve immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre termal stabilitesinin daha iyi olduğunu göstermektedir. Çünkü enzim ve destek maddesi arasındaki etkileşim yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonel geçişini önleyebilmektedir. Immobilize enzimlerde konformasyonel esnekliğin azalmasından dolayı termal kararlılık artmaktadır [112, 113]. Ayrıca hidrofobik etkileşim ihtimali ile enzimlerin destek materyaline birçok noktadan bağlanmış olması, immobilize enzimde termal kararlılığı arttırmış olabilir [113].

4.17.1. Enzimlerin Depolanma Kararlılığı

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajlarından birisi de daha yüksek depolanma kararlılığı göstermeleridir. Serbest ve immobilize HRP enzimleri, tampon çözelti (pH=8) içerisinde 4 °C’de depolanmıştır. Belirli zamanlarda örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.45’te gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize HRP enzimi, tampon çözelti içerisinde 60 gün depolandığında başlangıç aktivitesini % 60,54 oranında korurken, serbest HRP enzimi 60 gün depolanma sonunda, başlangıç aktivitesinin % 37, 18 ’ini koruduğu görülmektedir.



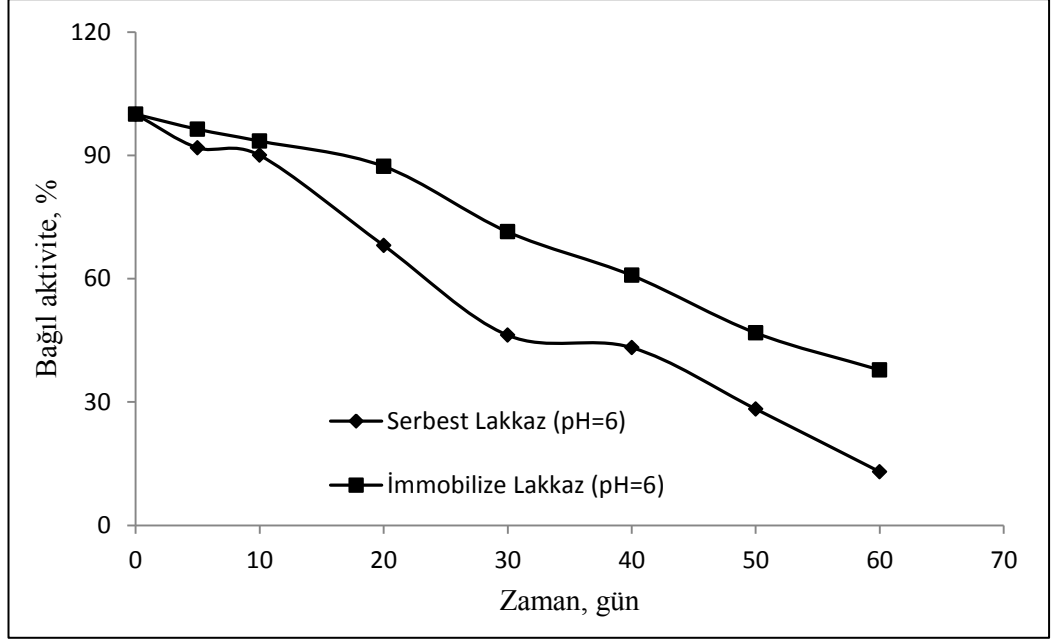
Şekil 4.45. HRP enziminin depolanma kararlılığı

Zhai ve arkadaşları, kitosan-haloysit hibrit nano tüplere HRP enzimini immobilize etmiş ve immobilize enzimi fenol gideriminde kullanmışlardır. Zhai ve

arkadaşları, çalışmasında serbest ve immobilize HRP enzimlerini, pH=7 tamponunda 4 °C'de 35 gün inkübe ederek, enzimlerin depolanma kararlılıklarını araştırmışlardır. Bu şartlarda serbest enzim 35 günlük inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin % 27'sini korurken, immobilize enzim yaklaşık olarak başlangıç aktivitesini korumuştur [49].

Kim ve arkadaşları, kil minerali üzerine HRP enzimini immobilize ederek, fenol gideriminde kullanmışlardır. Jun Kim ve arkadaşları çalışmasında serbest ve immobilize HRP enzimlerini pH= 7 tamponunda 5 °C' de 50 gün inkübe ederek, enzimlerin depolanma kararlılıklarını araştırmışlardır. Bu şartlarda serbest enzim başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiş, immobilize enzim ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 80'ini korumuştur [114].

Serbest ve immobilize lakkaz enzimleri, tampon çözelti (pH=6) içerisinde 4 °C'de depolanmıştır. Belirli zamanlarda örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.46'da gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize lakkaz enzimi, tampon çözelti içerisinde 60 gün depolandığında başlangıç aktivitesini % 37,79 oranında korurken, serbest lakkaz enzimi 60 gün depolanmanın sonucunda, başlangıç aktivitesinin % 13,02 'sini koruduğu görülmektedir.



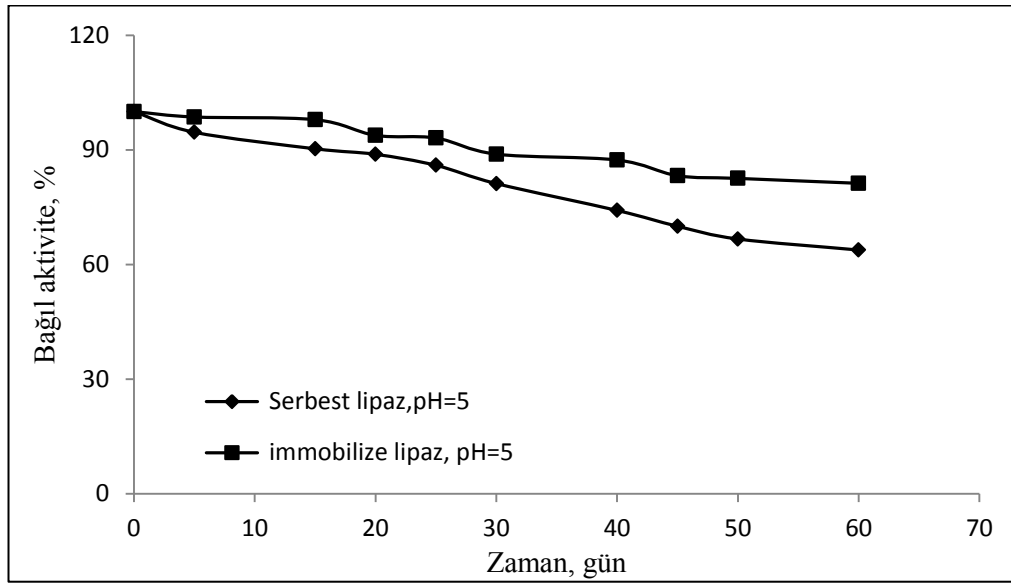
Şekil 4.46. Lakkaz enziminin depolanma kararlılığı

Plagemann ve arkadaşları, bal peteği üzerine lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize ederek serbest ve immobilize enzimin, pH= 7'de 4 °C'de depolanma kararlılıklarını araştırmışlardır. Bu şartlar altında 3,5 ay sonra serbest enzim başlangıç aktivitesinin % 42'sini korurken, immobilize enzimin ise başlangıç aktivitesinin % 59'unu koruduğunu rapor etmişlerdir [115].

Sathishkumar ve arkadaşları, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nano fiberlere lakkaz enzimini immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimin depolanma kararlılıklarını araştırmışlardır. İmmobilizasyon ile serbest enzime göre enzimin depolanma kararlılıklarının arttığını rapor etmişlerdir [116].

Serbest ve immobilize lipaz enzimleri, tampon çözelti (pH=5) içerisinde 4 °C'de depolanmıştır. Belirli zamanlarda örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.47'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize lipaz enzimi, tampon çözelti içerisinde 60 gün depolandığında

başlangıç aktivitesini % 81,23 oranında korurken, serbest lipaz enziminin 60 gün depolanma süresinin sonucunda başlangıç aktivitesinin % 63,77 'sini koruduğu görülmektedir. Ayrıca serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin pH 7 tampon çözeltisi içerisindeki depolanma kararlılıkları da araştırılmış ve daha düşük depolanma kararlılığı gösterdikleri gözlenmiştir.



Şekil 4.47. Lipaz enziminin depolanma kararlılığı

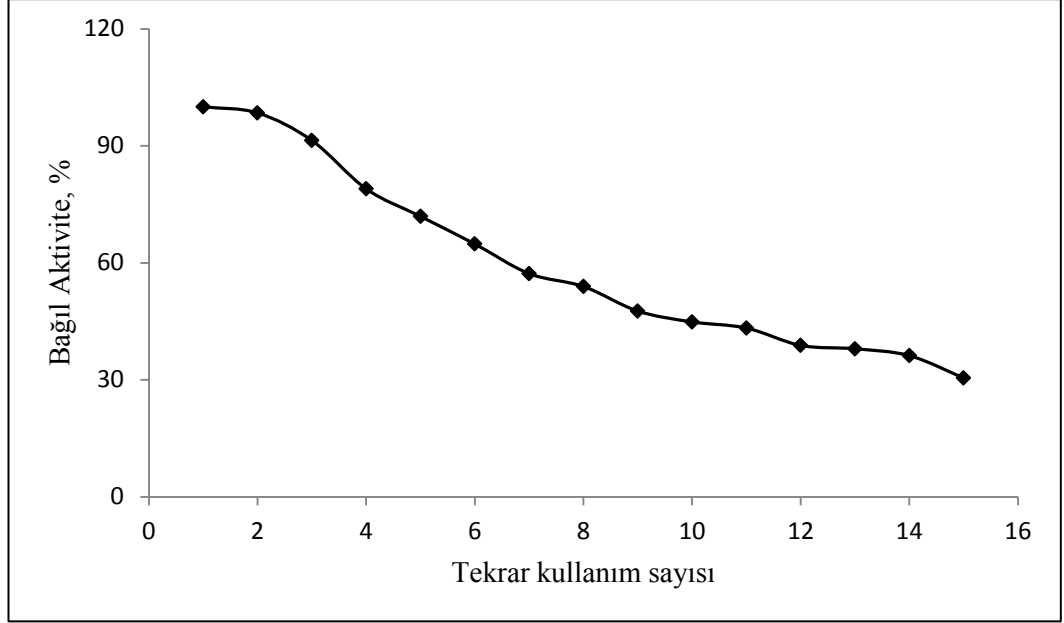
Yiğitoğlu ve Temoçin, akrilamit aşılansmış PET liflere kovalent bağlanma yöntemi ile lipaz enzimini immobilize ettiği çalışmalarında, pH=7 ve pH= 4'deki depolanma kararlılıklarını belirlemişlerdir. 60 günlük zaman içerisinde pH= 7'de serbest enzimin immobilize enzime göre daha yüksek depolanma kararlılığı gösterirken, pH=4'de immobilize enzimin (% 90), serbest enzime (% 75) göre daha yüksek depolanma kararlılığı gösterdiğini rapor etmişlerdir [61].

Vaidya ve diğeri, lipaz enzimini poli(allil glisidil eter-ko-etilen glikol dimetakrilat) kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize ve serbest enzimi 30 gün süre ile depolanma kararlılığını incelemişlerdir. Serbest enzimin onuncu günde başlangıç aktivitesinin % 14'ünü koruyabildiğini buna karşı immobilize enzimin ise otuzuncu günde başlangıç aktivitesinin % 80'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [117].

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna bağlı olarak da aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Immobilizasyon işlemi ile enzimlerin aktiviteleri iyileştirilebilir. Elde edilen deneysel sonuçlardan immobilizasyonun peroksidaz, lakkaz ve lipaz enzimlerinin depolanma kararlılıklarını arttırdığı gözlenmiştir.

4.17.2. Enzimlerin Tekrar Kullanım Kararlılığı

Immobilize enzimlerin en önemli avantajlarından birisi de tekrar tekrar kullanılabilirlerdir. Serbest enzimler sadece bir kez kullanılabilirler ve aktivite ortamlarından alınıp tekrar kullanılabilirleri çok zordur. Ancak uygun bir desteğe immobilize edildiklerinde defalarca kez kullanılabilirlerdir. Immobilize HRP enziminin tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.48'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize HRP enziminin bağıl aktivitesi, kullanım sayısına bağlı olarak azalmaktadır. Immobilize HRP enziminin, 15 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesini % 30,45 oranında koruduğu görülmektedir.

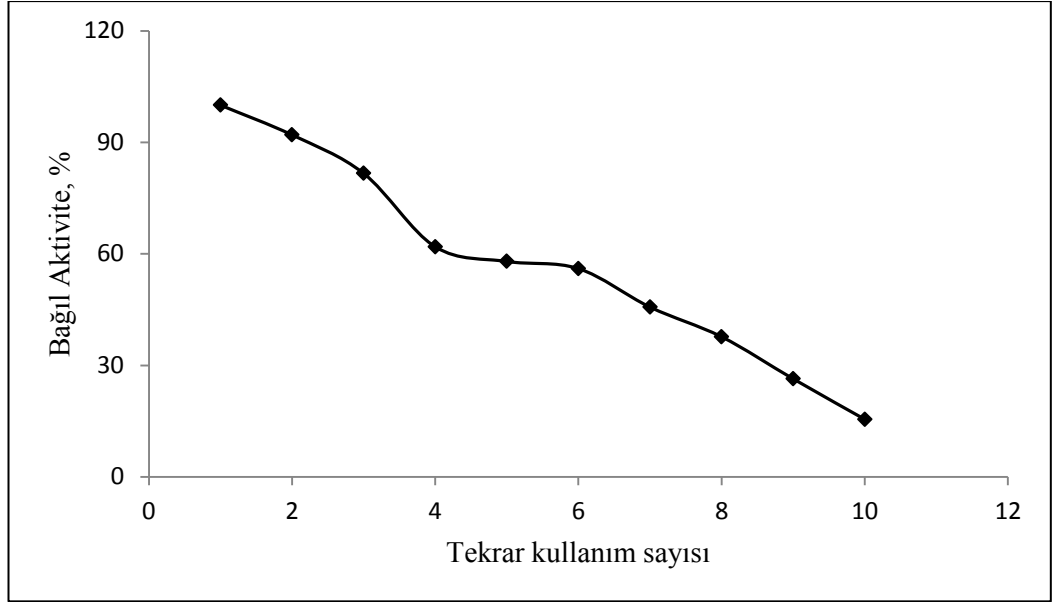


Şekil 4.48. HRP enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Barbosa ve arkadaşları, FeSO_4 ve FeCl_3 ile magnetize edilmiş polianilin üzerine HRP enzimini immobilize ederek, ortamda düşük ve yüksek derişimde H_2O_2 varlığındaki immobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarını karşılaştırmışlardır. Yüksek H_2O_2 derişiminde, magnetit ile etkileşiminden kaynaklandığı düşünülen bir enzim inaktivasyonunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Barbosa ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aktivite ortamındaki yüksek H_2O_2 derişiminde, immobilize enzim 9 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesinin % 50'sini korurken, düşük H_2O_2 derişiminde immobilize enzim 13 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesinin % 50'sini koruduğunu rapor etmişlerdir [118].

İkbal ve Asgher, sol-gel matrikse HRP enzimini immobilize ederek, immobilize enzimin tekrar kullanım kararlılıklarını belirlemişlerdir. Immobilize enzimin 10 kez kullanılması sonucunda, başlangıç aktivitesinin % 84,6'sını koruduğunu rapor etmişlerdir [119].

İmmobilize lakkaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını belirlemek için, substrat olarak derişimi 0,3 mmol/L olan şiringaldazin çözeltisi kullanılmıştır. İmmobilize lakkaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.49'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize enzimin bağıl aktivitesi kullanım sayısına bağılı olarak azalmaktadır. İmmobilize lakkaz enzimi, 10 tekrar kullanım sonucunda başlangıç aktivitesini % 15,48 oranında koruduğu görülmektedir.



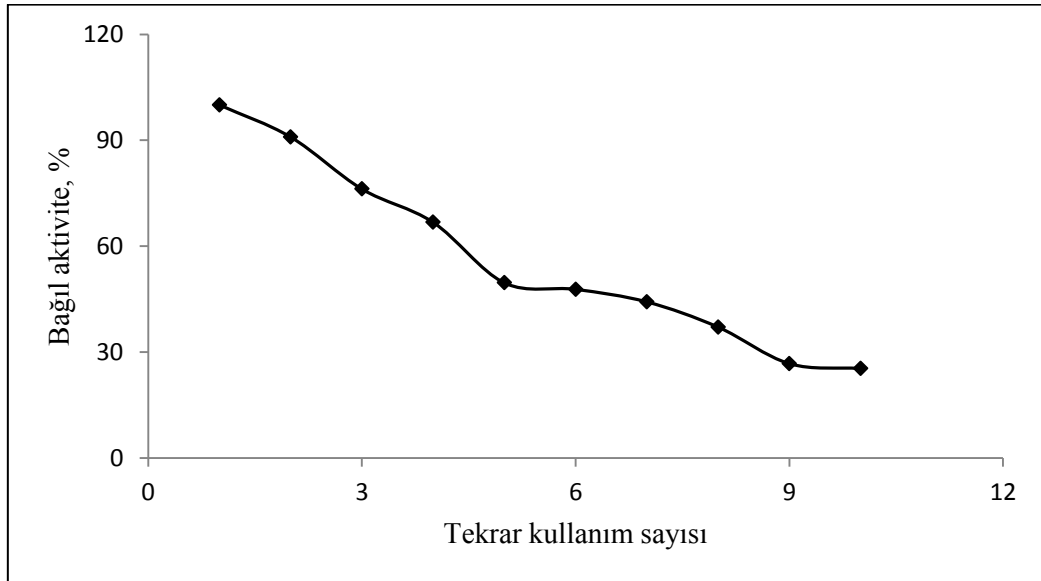
Şekil 4.49. Lakkaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Valle-Vigon ve Fuertes, magnetik olarak ayrılabilir karbon kapsüllere lakkaz enzimini immobilize ederek, immobilize enzimi Asit Green 25 ve Remazol Brilliant Blue R boyalarının degradasyonunda kullanmışlardır. İmmobilize lakkaz enziminin iki farklı boyanın degradasyonundaki tekrar kullanım kararlılıkları belirlenmiştir. İmmobilize lakkaz enziminin 8 kez kullanılması sonucunda Asit

Green 25 boyasının yaklaşık % 80'inin degrade ettiği, 6 kez kullanılması sonucunda Remazol Brilliant Blue R boyasının yaklaşık % 80'ini degrade ettiğini rapor etmişlerdir [120].

Wang ve arkadaşları, mezo gözenekli silika nano partiküllere lakkaz enzimini immobilize ederek, immobilize enzimin tekrar kullanım sayısını belirlemişlerdir. Immobilize lakkaz enziminin 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktivitesinin % 86,6'sını koruduklarını rapor etmişlerdir [121] .

İmmobilize lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.50'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize enzimin bağıl aktivitesi kullanım sayısına bağlı olarak azalmaktadır. İmmobilize lipaz enziminin, 10 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesini % 25,37 oranında koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.50. Lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Abdullah ve arkadaşları, aminopropil aşlanmış mezo gözenekli SBA-15'e lipaz enzimini immobilize etmiş, immobilize enzimi laurik asit ile sitonelol

esterleşme reaksiyonunda kullanmışlardır. İmmobilize enzimin, esterleşme reaksiyonunda 4 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktivitesinin % 90'ını koruduğunu rapor etmişlerdir [122].

Li ve Wu, PAN (poliakrilonitril) nano fiber membranlara lipaz enzimini immobilize ederek, immobilize enzimi soya yağı hidrolizinde kullanmışlardır. Hidroliz deneylerinde, immobilize lipaz enzimi 20 kez kullandıklarında, immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 65'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [123].

Kuo ve arkadaşları, kitosan kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllere lipaz enzimini immobilize etmiş ve immobilize enzimin tekrar kullanma kararlılıklarını araştırmışlardır. Araştırmalarında immobilize enzimin 20 kez kullanım sonucunda başlangıç aktivitelerinin % 83'ünü koruduklarını rapor etmişlerdir [124].

Maliyeti oldukça yüksek olan enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, ekonomik açıdan çok önemlidir. İmmobilizasyon ile enzim, reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılıp, tekrar kullanılabilir. Serbest enzime göre daha kararlı olan immobilize enzimlerde, belirli sayıda kullanımdan sonra aktivite kaybederler. Kuo ve arkadaşları aktivitedeki bu kaybı, enzim zamanla denatürasyonuna ve destek materyalinden ayrılmasına bağlamışlardır [124].

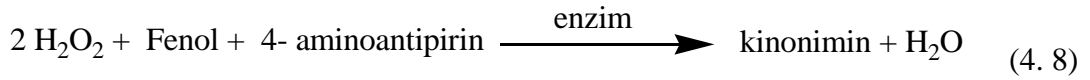
4.18. Enzim Uygulamaları

4.18.1. HRP ve Lakkaz Enzimlerinin Fenol Degradasyonunda Kullanımı

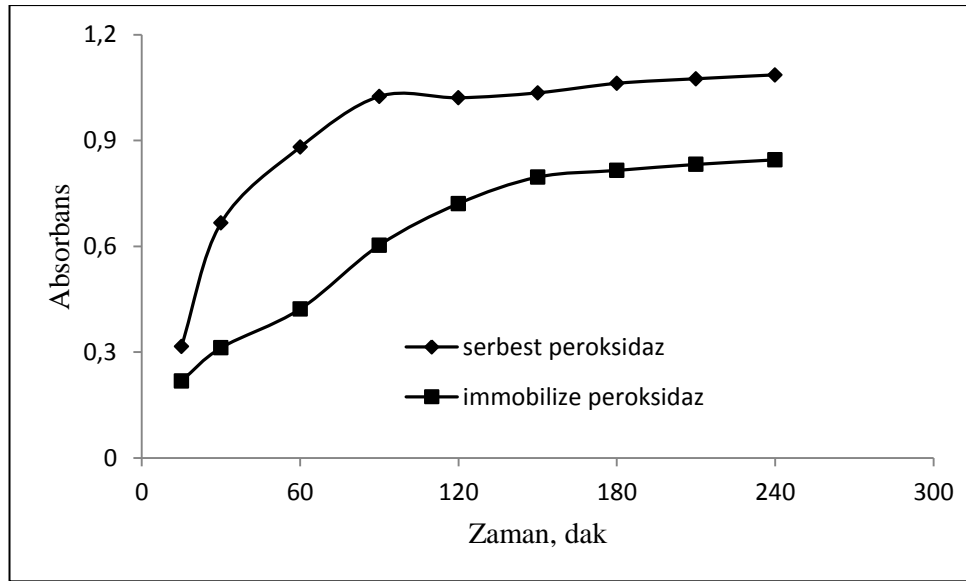
Fenol ve fenol türevleri yüksek derecede kararlı bileşikler olduklarından oldukça toksik ve kanserojendir. Fenolün atık sulardan uzaklaştırılmasında kimyasal

ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Fenol kolay degrede edilebilen bir kimyasal değildir ancak mikroorganizmalar ve bazı enzimler tarafından daha kolay degrede edilebilmektedir.

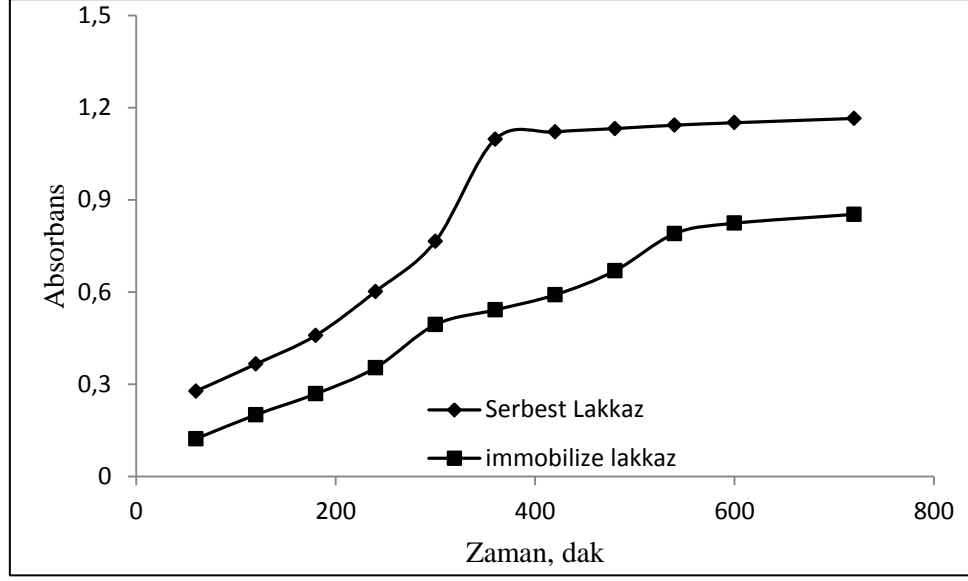
Serbest ve immobilize HRP ve lakkaz enzimlerinin fenol degradasyonunda kullanıldığı bu çalışmada, Hou'nun [67] önerdiği yöntem kullanılmıştır.



Serbest ve immobilize HRP ve lakkaz enzimlerinin belirli sürelerde fenol degradasyonundaki etkisi Şekil 4. 51 ve Şekil 4.52'de verilmiştir.



Şekil 4. 51. HRP enziminin belirli sürelerde fenol degradasyonuna etkisi



Şekil 4. 52. Lakkaz enziminin belirli sürelerde fenol degradasyonuna etkisi

Şekil 4. 51 ve Şekil 4.52’de görüldüğü gibi serbest HRP enzimi 90 dak’da 1,025 absorbans değeri ile maksimum fenol degrade ettiğinde, serbest lakkaz enzimi 360 dak’da 1,097 absorbans değeri ile maksimum fenol degrade etmiştir. İmmobilize HRP enzimi ile maksimum fenol degradasyonu 150 dak’da 0,796 absorbans değerine ulaştığında, serbest lakkaz enzimi ile 0,79 absorbans değerine 540 dak’da ulaşılmıştır.

Hou ve arkadaşları, poli (stiren-ko-glisidil metakrilat) kürelerine glikoz oksidaz enzimini kovalent olarak immobilize ederek destek materyalini fenol degradasyonunda kullanmışlardır. Glikoz oksidaz enzimi ile maksimum fenol degradasyonu 90 dak’lık sürenin sonunda 0,4 absorbans değerine ulaştığını rapor etmişlerdir [67].

Doğan ve arkadaşları, poli (glisidil metakrilat) sirojellere lakkaz enzimini immobilize ederek, fenolik bir bileşik olan (3,5-dinitro salisilik asit) (DNS)

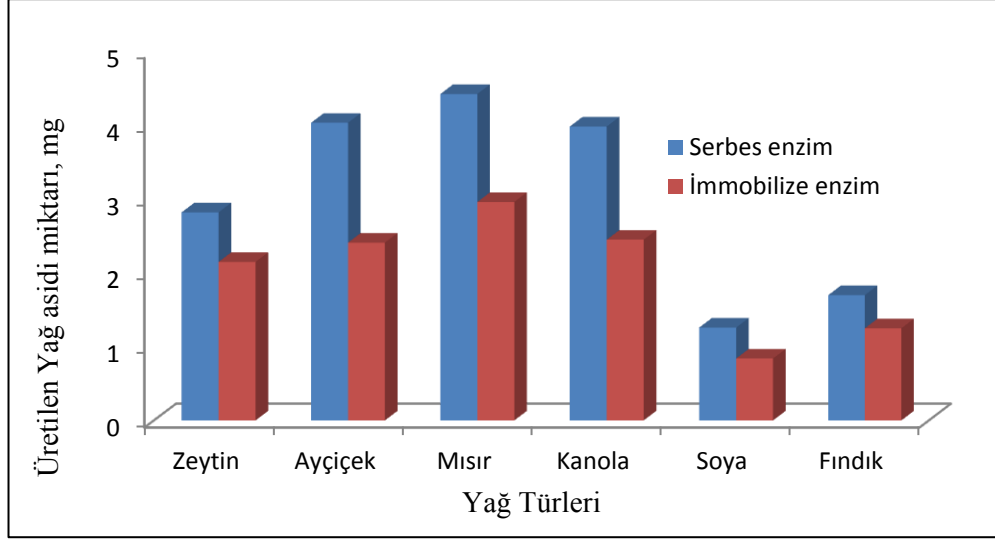
degradasyonunda kullanmışlardır. Degradasyon ürününü sıvı kromatografisi ve tandem kütle spektroskopisi ile kinon olarak karakterize etmişlerdir [90].

Chang ve Tang, NH_2 ile modifiye edilmiş Magnetik $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ parçacıklara HRP enzimini immobilize ederek, immobilize enzimi H_2O_2 'nin varlığında, bir fenol bileşiği olan 2,4-diklorofenol'ün degradasyonunda kullanmışlardır. İmmobilize enzim optimum şartlarda, (30 °C, pH= 6,4) 180 dak'da yaklaşık % 80 fenol degrade ettiğini rapor etmişlerdir [82].

Bu çalışmada immobiliz HRP ve lakkaz enzimleri için substrat olarak sırasıyla pirogallol ve şiringaldazin kullanılmıştır. Kullanılan substratların fenol gibi aromatik halkalı yapılar içermesi, enzimlerin fenolü substratı gibi görüp kinon denilen yapıya yükseltgediği düşünülmektedir.

4.18.2. Lipaz Enziminin Yağ Hidrolizinde Kullanımı

Lipaz enziminin farklı yağ türlerinin hidrolizine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, kullanılan yağ türlerinin her biri ayrı ayrı substrat olarak kullanılmıştır. Üretilen toplam yağ asidi miktarının, kullanılan yağ türleri ile değişimi Şekil 4. 53'te verilmiştir.



Şekil 4. 53. Serbest ve immobilize lipaz enziminin farklı yağ türlerinin hidrolizine etkisi [Substrat]= 0, 45 g/ mL, 35 °C, 30 dak

Şekil 4. 53' de, serbest ve immobilize lipaz enziminin mısır yağında en yüksek, soya yağında ise en düşük miktarda yağ asidi ürettiği görülmektedir. İmmobilize lipaz enziminin, optimum şartlarda mısır yağından 2,96 mg yağ asidi üreterek, yağların hidrolizinde kullanılabilecek bir materyal olduğu görülmüştür.

Yiğitoğlu ve Temoçin, akrilamit aşlanmış PET liflere lipaz enzimini kovalent olarak immobilize etmiş, serbest ve immobilize enzimleri farklı yağ türlerinin hidrolizinde kullanmışlardır. 0,1 g/ ml substrat derişimde, en yüksek miktarda yağ asidinin kanola ve mısır yağında (3 mg) en düşük miktarda yağ asidinin ise soya yağında (2,5 mg) üretildiğini rapor etmişlerdir [61].

Lipaz enzimlerinin substratları genellikle bitkisel ve hayvansal yağlardır. Kullanılan yağların bazıları, literatürde genellikle kullanılan substratlar arasında yer almaktadır. Bir katı veya sıvı yağın hidrolizlenme hızı kullanılan lipaz kaynağı ile doğrudan ilişkilidir. Bazı lipazlar reaksiyonları spesifik olarak hidrolizlemekte,

bazıları ise belirli yağ asitlerine karşı spesifik olarak aktivite göstermektedir. Genel olarak lipazların birçoğu orta uzunluktaki yağ asitlerinin hidrolizini kolaylıkla gerçekleştirmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, *Candida Rugosa* kaynaklı lipazın sadece 2 pozisyonundaki yağ asitlerine spesifik olduğu rapor edilmiştir [125].

5. SONUÇLAR

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar; polimer ve karakterizasyonu ile ilgili kısım Sonuç -1, enzim ile ilgili kısım ise Sonuç-2 olarak verilmiştir.

5.1. Sonuçlar-1

1. GMA / MAAm monomer karışımının PET liflere aşılmasında, en yüksek (% 209,8, GMA / MAAm, 90/10 mol) aşı yüzdesine $[BPO] = 8 \times 10^{-3} M$, $[GMA / MAAm] = 0,3 M$, $t = 180$ dak. ve $t = 85$ °C şartlarında ulaşılmıştır.
2. Aşılma hızının (Rg), GMA / MAAm ve BPO derişimine sırasıyla 1,03 ve 0,51'inci dereceden bağlı olduğu tespit edilmiştir.
3. Monomer karışımı aşılınmış PET liflerin çapları ve su tutma kapasite değerlerinin, aşı yüzdesine bağlı olarak arttığı, camsı geçiş sıcaklığının ise belirli bir aşı yüzdesine kadar arttığı ve daha sonra değişmediği gözlenmiştir.
4. GMA / MAAm monomer karışımının PET life aşılmasında, GMA ilavesi ile sinerjik etkiden dolayı PET lif yapısına giren MAAm miktarının % 67,96 değerine kadar yükseldiği görülmüştür. Aynı derişimde MAAm tek başına PET life aşılandığında, aşı yüzdesi % 13,92'de kalmıştır.
5. Aşılınmamış PET liflere göre GMA / MAAm aşılınmış PET liflerin, hem asidik hem de bazik boyalar ile boyanabilirliğinin arttığı gözlenmiştir.
6. TGA sonuçlarından, GMA/MAAm aşılınmış PET liflerin ısıl kararlılığının, aşılınmamış PET liflere göre daha düşük olduğu görülmüştür.

5.2. Sonuçlar-2

1. PET- g- GMA / MAAm lifler üzerine uygulanan Hofmann dönüşüm reaksiyonu için optimum değerler; [NaOCl]= 5×10^{-3} M, [NaOH]= 0,3 M ve reaksiyon süresi 30 dakika olarak tespit edilmiştirtir.
2. Modifiye PET lifin, glutaraldehit ve enzim zelteleri ile temas süresinin, sırasıyla 6 ve 4 saat olduğu belirlenmiştirtir.
3. İmmobilize enzimlerin aktivitesini, immobilizasyon ortamının pH değerinin etkilediği; HRP, lakkaz ve lipaz enzimleri için sırasıyla; 6, 5 ve 5 olduğu saptanmıştirtir.
4. İmmobilize HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerin aktivitesinin, PET lifin aşı yüzdesine bağlı olduğu gzlenmiştirtir.
5. İmmobilizasyon lakkaz ve lipaz enzimlerinin pH profillerini etkilemiştirtir ancak HRP enziminin pH profilini değiştirtirmemiştirtir. İmmobilizasyon ile optimum pH değerleri; HRP enzimi için 8, lakkaz enzimi için 5'den 5,5 ve lipaz enzimi için 6'dan 6,5 değerine değiştirim gösterdiği gzlenmiştirtir.
6. İmmobilizasyon; HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerlerini değiştirtirmemiştirtir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerleri sırasıyla; 50, 35 ve 50 °C olarak bulunmuştirtir.
7. İmmobilizasyon ile HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin termal kararlılıkları artmıştirtir.
8. İmmobilizasyondan sonra; HRP ve lipaz enzimlerinin K_m değerlerinde artma meydana gelirken, lakkaz enziminin K_m değeri çok fazla değiştirmemiştirtir. Ayrıca immobilizasyondan sonra enzimlerin V_m değerleri azalmıştirtir.

9. İmmobilizasyon ile; HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin depolanma kararlılıkları artmıştır.
10. İmmobilizasyon; HRP, lakkaz ve lipaz enzimlerinin tekrar kullanım olanağı sağlamıştır. İmmobilize HRP enzimi, 15 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesinin % 30,45' ini korurken, immobilize lakkaz ve lipaz enzimleri, 10 kez kullanıldığında başlangıç aktivitelerinin sırasıyla, % 15, 48 ve % 25, 37'sini korudukları gözlenmiştir.
11. Bu çalışmada geliştirilen İmmobilize HRP ve lakkaz enzimlerinin fenol degradasyonunda kullanılabilirliği gösterilmiştir. Ayrıca serbest lipaz gibi immobilize lipaz enziminin de farklı yağ türlerini hidroliz ettiği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Champe, P. C., Harvey, R. A. ve Ferrier D. R., Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, Nobel Tıp Yayınevi, 2007.
- [2] Betancor ve H. R. Luckarift, *Trends Biotechnol*, cilt 26, pp. 566-572, 2008.
- [3] Jaffe, M ve East, A. J., «Polyester Fibers, Handbook of Chemistry,» USA, Taylor and Francis Group, 2007, pp. 1-30.
- [4] Yang, L., Chen, J., Guo, Y. ve Zhang, Z., Surface Modification of a biomedical poly(ethylene terephthalate) (PET) by air plasma, *Applied Surface Science*, cilt 255, pp. 4446-4451, 2009.
- [5] Çankaya, N. ve Temüz, M. M., Characterization and monomer reactivity ratios of N-(4-nitrophenyl) acrylamide and Methylmethacrylate by atom transfer radical polymerization, *Cellulose Chemistry and Technology*, cilt 46, pp. 551-558, 2012.
- [6] Coşkun, C., Graft copolymerization of an itaconic acid/acrylamide monomer mixture onto poly (ethylene terephthalate) Fibers with benzoyl peroxide, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 97, pp. 1795-1803, 2005.
- [7] Saçak, M., Polimer Teknolojisi, Ankara: Gazi Kitapevi, 2005.
- [8] Hazer, B., Polimer Teknolojisi, Trabzon, 1993.

- [9] Saçak, M., Lif Kimyası, Ankara: Ankara Üniversitesi Yayınları, 1994.
- [10] Farrow, G. ve Hill, S. E., Polyester Fibers, Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Gaylord, 1969.
- [11] Fettes, E. M., Chemical Reaction of Vinyl Polymers, *Polymer Sers., Interscience, John Wiley*, cilt 19, p. 609, 1964.
- [12] Gözükara, E., Biyokimya, cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2001.
- [13] Tüzün, C., Biyokimya, Palme yayıncılık, p. 485, 1992.
- [14] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., Principles of Biochemistry, New York: Worth Publishers, 1993.
- [15] Bailey, J.E., Ollis, D. F., Biochemical Engineering Fundamentals, Singapore: McGraw-Hill, 1987.
- [16] Aehle, W., Enzymes in Industry, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH Co KGaA, 2004.
- [17] Miranda, M. V., Magri, M. L., Cabrera, R.B., Fernandez, L., Cascone, O., Optimisation of Peroxidase Adsorption on Concanavalin A-Agarose, *Latin American Applied Research*, cilt 33, pp. 67-71, 2003.
- [18] Asad, S., Dabirmanesh, B. ve Khajeh, K., Phenol removal from refinery wastewater by mutant recombinant horseradish peroxidase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, cilt 61, pp. 226-229, 2014.

- [19] Preethi, S., Anumary, A., Ashokkumar, M. , Thanikaivelan, P., Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater, *Springer Plus*, cilt 2, p. 341, 2013.
- [20] Lopes, G. R., Diana, C. G. A. Pinto ve Silva, A. M. S., Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry, *RSC Advances*, cilt 4, pp. 37244-37265, 2014.
- [21] Delanoy, Li, G., Q. ve Yu, J., Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, cilt 35, pp. 89-95, 2005.
- [22] Cuadrado, M. U., Perez-Juan, P. M., Leque de Castro, D., Gomez-. Nieto, M. A., *Analytica Chimica Acta*, cilt 553, p. 99, 2005.
- [23] Bautista, L. F., Morales, G. ve Sanz, R. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene, *Bioresource Techonology*, cilt 101, pp. 8541-8548, 2010.
- [24] Sukan, A. ve Sargin, S., Enzymatic removal of phenol from Industrial Wastwaters, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, cilt 4, pp. 300-307, 2013.
- [25] Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R. ve Khobragade, C. N., Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9, *Brazilian Journal of microbiology*, cilt 40, pp. 358-366,

2009.

- [26] Zaitsev, S. Y., Gorokhova, I. V., Kashtigo, T. V., Zintchenko. A. ve Dautzenberg, H., General approach for lipases immobilization in polyelectrolyte complexes, *Colloid and Surface A: Physicochemical and Engineering*, cilt 221, pp. 209-220, 2003.
- [27] Yücel, Y., Demir, C., Dizge, N. ve Keskinler, B., Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase, *Biomass and Bioenergy*, cilt 35, pp. 1496-1501, 2011.
- [28] Yücel, Y., Demir, C., Dizge N. ve Keskinler, B., Methods for Lipase Immobilization and Their Use for Biodiesel Production from Vegetable Oil, *Energy Sources*, cilt 36, pp. 1203-1211, 2014.
- [29] Azizinezhad, F., Free radical grafting of 2-hydroxypropyl methacrylate/acrylic acid mixture onto poly (ethylene terephthalate) fibers, *European journal of Experimental Biology*, cilt 1, pp. 560-567, 2014.
- [30] Azizinezhad, F., Kinetic Investigation of Grafting of Poly (ethyleneterephthalate) Fibers with 2-Hydroxypropyl Methacrylate using 4,4' Azobis(4-cyanovaleric acid), *Journal of Chemistry*, cilt 23, pp. 899-902, 2011.
- [31] Coşkun, R. ve Akdeniz, S. Functinalization of poly(ethylene terephthalate) fibers by grafting of maleic acid/metharylamide monomer mixture, *Fibers and polymers*, cilt 11, pp. 1111-1118, 2010.

- [32] Hanzhou, L. ve Ming, Y., Pre-irradiation induced emulsion co-graftpolymerization of acrylonitrile and acrylic acid onto a poly ethylene nonwoven fabric, *Radiation Physics and Chemistry*, cilt 94, pp. 129-132, 2014.
- [33] Seko,N., Ninh, N. T. Y. ve Tamado, M. Emulsion grafting of glycidyl methacrylate onto polyethylene fiber, *Radiation Physics and Chemistry*, cilt 79, pp. 22-26, 2010.
- [34] Kordoghli,B., Khiarib, R., Dhaouadi,H., Belgacem, M. N., Mhenni, M. F. ve Sakli,F. UV irradiation-assisted grafting of poly (ethylene terephthalate) fabrics, *Colloids and Surfaces A: Physicochem.*, cilt 441, pp. 606-613, 2014.
- [35] Mohameda, N. H. ve Thomas, B. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) fabric via-photo-chemical reaction of dimethylaminopropyl methacrylamide, *Applied Surface Science*, cilt 259, pp. 261-269, 2012.
- [36] Arslan, M. Use of 1,6-diaminohexane-functionalized glycidyl methacrylate-g-poly(ethylene terephthalate) fibers for removal of acidic dye from aqueous solution, *Fiber and Polymers*, cilt 11, pp. 177-184, 2010.
- [37] Arslan, M. Kinetics of Grafting Copolymerization of Acrylamide and 2-Hydroxyethylmethacrylate Monomer Mixture Onto Poly(ethyleneterephthalate) Fibers, *Korean Journal of Chemical Engineering*, cilt 27, pp. 991-998, 2010.
- [38] Liu, S. ve Sun, G. Functional Modification of poly (ethylene terephthalate) with an allyl monomer: Chemistry and structure characterization, *Polymer*, cilt 49,

pp. 5225-5232, 2008.

- [39] Coşkun, R. Synthesis of functionalized poly(ethylene terephthalate) fibers by grafting of crotonic acid/methacrylamide monomer mixture, *Reactive Functional Polymers*, cilt 68, pp. 1704-1714, 2008.
- [40] Yiğitoğlu, M. ve Arslan, M. 4-Vinyl pyridine and 2-hydroxyethylmethacrylate monomer mixture graft copolymerization onto poly(ethylene terephthalate) fibers using benzoyl peroxide, *Polymer Bulletin*, cilt 58, pp. 785-798, 2007.
- [41] Coşkun, R. Graft Copolymerization of itaconic acid- methacrylamide comonomers onto poly(ethylene terephthalate) fibers, *European Polymer Journal*, cilt 43, pp. 1428-1435, 2007.
- [42] Liu, Y., Li, S., Zhang, J. W., Zhang, R. Grafting of Methyl Acrylate onto PET Initiated by Diperoxidate(III), *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, cilt 43, pp. 1255-1263, 2006.
- [43] Prodanovic, O., Prokopijevic, M., Spasojevic, Dragica, Radotic, K., Knezević- Jugovic, Z. D. ve Prodanovic, R. Improved Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Macroporous Glycidyl Methacrylate-Based Copolymers, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, cilt 168, pp. 1288-1301, 2012.
- [44] Caramori, S. S. ve Fernandes, K. F., Covalent Immobilization of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate)- poly(aniline) composite, *Process Biochemistry*, cilt 39, pp. 883-888, 2004.

- [45] Celebi, M., Kaya, M. A., Altıkatoğlu, M. ve Yıldırım, H. Enzymatic Decolorization of Anthraquinone and Diazo Dyes Using Horseradish Peroxidase Enzyme Immobilized onto Various Polysulfone Supports, *Appl. Biochem. Biotechnol*, cilt 171, pp. 716-730, 2013.
- [46] Arslan, M., Immobilization horseradish peroxidase on amine- functionalized glycidyl methacrylate-g-poly(ethylene terephthalate) fibers for use in azo dye decolorization, *Polymer Bulletin*, cilt 66, pp. 865-879, 2011.
- [47] Kondyurin, A. V., Naseri, P., Tilley, J. M. R., Nosworthy, N. J., Bilek, M. M. M. ve McKenzie, D. R., Mechanisms for Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Ion-Beam-Treated Polyethylene, *Scientifica*, p. 28, 2012.
- [48] Temocin, Z. ve Yiğitoğlu, M., Studies on the Activity and stability of Immobilized Horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate) grafted Acrylamide Fiber, *Bioprocess Biosyst Engineering*, cilt 32, pp. 467-474, 2009.
- [49] Zhai, R., Zhang, B., Wan, Y., Li, C., Wang, J. ve Liu, J., Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal, *Chemical Engineering Journal*, cilt 214, pp. 304-309, 2013.
- [50] Sathishkumar, P., Kamala-Kannan, S., Cho, M., Kim, J. S., Hadibarata, T., Salim, M. R. ve Oh, B.- T., Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 100, pp. 111-120,

2014.

- [51] Cristóvão, R. O., Tavares, A. P. M., Brígida, A. I., Loureiro, J. M., Boaventura, R. A. R., Macedo, E. A. ve Coelho, M. A. Z., Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 72, pp. 6-12, 2011.
- [52] Palvannan, T., Saravanakumar, T., Unnithan, A. R., Chung, N.-J., Kim, D.-H. ve Park, S.-M., Efficient transformation of phenyl urea herbicide chloroxuron by laccase immobilized on zein polyurethane nanofiber, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 99, pp. 156-162, 2014.
- [53] Fatarella, E., Spinelli, D., Ruzzante, M. ve Pogni, R., Nylon 6 film and nanofiber carriers: Preparation and laccase immobilization performance, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 102, pp. 41-47, 2014.
- [54] Kanmani, P., Kumaresan, K., Aravind, J., Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in staphylococcus Pasteuri, *Electronic Journal of Biotechnology*, cilt 18, pp. 20-28, 2015.
- [55] Yücel, Y., Demir, C., Dizge, N. ve Keskinler, B., Methods for Lipase Immobilization and Their Use for Biodiesel Production from Vegetable Oil, *Energy Sources, Part A*, cilt 36, pp. 1203-1211, 2014.
- [56] Temocin, Z., Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on aldehyde

functionalized hydrophobic support and the application for synthesis of oleic acid ester, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, cilt 24, pp. 1618-1635, 2013.

- [57] Chen, G.-J., Kuo, C.-H., Chen, C.-I., Yu, C.-C. , Shieh, C.-J. ve Liu, Y.-C., Effect of membranes with various hydrophobic/hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, cilt 113, pp. 166-172, 2012.
- [58] Zhu, J., Sun, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities, *Reactive and Functional Polymers*, cilt 72, pp. 839-845, 2012.
- [59] Li, W., Chen, B., Tan, T., Comparative study of the properties of lipase immobilized on nonwoven fabric membranes by six methods, *Process Biochemistry*, cilt 46, pp. 1358-1365, 2011.
- [60] Li, Sheng-Feng, Fan, Yi.-Hsuan, Hu, Jung-Feng, Huang, Yu-Shan, Wu, Wen-Teng., Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for transesterification reaction, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 73, pp. 98-103, 2011.
- [61] Yiğitoğlu, M. ve Temoçin, Z., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetables oils, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 66, pp. 130-135, 2010.

- [62] Ashjari, M., Mohammadi, M. ve Badri, R., Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy functionalized supports: Modulation of stability and selectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 115, pp. 128-134, 2015.
- [63] Bezerra, Thais M. de. S., Bassan, Juliana C., Santos, Victor Tabosa de, O., Ferrazc, A. ve Monti, R., Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice, *Process Biochemistry*, cilt 50, pp. 417-423, 2015.
- [64] Khoobi, M., Motevalizadeh, S. F., Asadgol, Z., Forootonfar, H., Shafiee, A. ve Faramarzi, M. A., Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application, *Materials Chemistry and Physics*, cilt 149, pp. 77-86, 2015.
- [65] Çelik, M. Graft Copolymerization of Methacrylamide onto Acrylic Fibers Initiated by Benzoyl Peroxide, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 94, p. 1519, 2004.
- [66] Makas, Y. G., Kalkan, N. A., Aksoy, S., Altınok, H. ve Hasirci, N., Immobilization of laccase in carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks, *Journal of Biotechnology*, cilt 148, pp. 216-220, 2010.
- [67] Hou, X., Liu, B., Deng, X., Zhang, B., Chen, H. ve Luo, R., Covalent immobilization of glucose oxidase poly(styrene-co-glycidyl methacrylate) monodisperse fluorescent microspheres synthesized by dispersion

- polymerization, *Analytical Biochemistry*, cilt 368, pp. 100-110, 2007.
- [68] Saçak, M., The Modification of PET Fibers With Graft Copolymerizations: A review, *Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Series B*, cilt 37, pp. 37-47, 1991.
- [69] P. Hari T. Deo, Patel, N. K. ve Patel, Bharat K., Eco-friendly Flame Reterdant (FR) Pet Fibers Through P-N Synergism, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, cilt 3, 2008.
- [70] Alakara, Ş., Karakışla, M. ve Saçak, M., Preparation of Poly (ethylene terephthalate)-g-Methacrylamide Copolymers Initiated by Azobisisobutyronitrile: Characterization and Investigation of Some Properties, *Journal of Macromolecular Science A: Pure and Applied Chemistry*, cilt 45, pp. 276-280, 2008.
- [71] Arslan, M., Yiğitoğlu, M., Şanlı, O. ve Ünal, H. İ., Kinetics of Swelling Assisted of 4-Vinyl Pyridine onto Poly (Ethylene Terephthalate) Fibers Using a Benzoyl peroxide Initiator, *Polymer Bulletin*, cilt 51, pp. 237-244, 2003.
- [72] Ongun, N., Karakışla, M., Aksu, L. ve Saçak, M., Methacrylamide onto Poly(ethylene terephthalate) Fibers with Benzoyl Poroxide as Initiator and their Characterization, *Macromolecular chemistry and physics*, cilt 205, pp. 1995-2001, 2004.
- [73] Coşkun, R., Yiğitoğlu, M. ve Saçak, M., Adsorpstion Behavior of Copper (II) Ions from Aqueous Solutions on Methacrylic Acid - Grafted Poly (Ethylene terephthale) Fibers, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 75, p. 766, 2000.

- [74] Ünal, H. İ., İnegöllü, C. ve Şanlı, O., Graft Copolymerization of N-Vinylimidazole on Poly (Ethylene Terephthalate) Fibers in a Swelling Solvent Using Azobisisobutyronitrile as Initiator, *Turkish Journal of Chemistry*, cilt 27, pp. 403-415, 2003.
- [75] Azizinezhad, F., Borzou, A. ve Shabani, M., Kinetic Investigation of Grafting of Acrylic Acid/2-Hydroxypropyl Methacrylate Mixture onto Poly(Ethylene terephthalate) Fiber, *International Journal of Engineering and Technical Researh (IJETR)*, cilt 2, 2014.
- [76] Kushwaha, P. K. ve Kumar, R., Bamboo Fiber Reinforced Thermosetting Resin Composites: Effect of Graft Copolymerization of Fiber with Metharylamide, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 118, pp. 1006-1013, 2010.
- [77] Jang, J. ve Go, W. S., Continuous Photografting of HEMA onto Polypropylene Fabrics with Benzophenone Photoinitiator, *Fibers and Polymers*, cilt 10, pp. 27-33, 2009.
- [78] Prachayawarakorn, J. ve Kryratsamee, W., Dyeing properties of Bombyx mori silks grafted with methyl methacrylate and methacrylamide, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 100, pp. 1169-1175, 2006.
- [79] Karakışla, M., Preparation of methacrylamide grafted and dye-ligand immobilized PET fibers: Studies of adsorption and purification of lysozyme, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 108, pp. 3313-3323, 2008.

- [80] Madrid, J. F., Nuesca, G. M. ve Abad, L. V., Gamma radiation induced grafting of glycidyl methacrylate (GMA) onto water hyacinth fibers, *Radiation Physics and Chemistry*, cilt 85, pp. 182-188, 2013.
- [81] Sano, S., Kato, K. ve Ikada, Y., Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization, *Biomaterials*, cilt 14, pp. 817-822, 1993.
- [82] Chang, Q. ve Tang, H., Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH₂-Modified Magnetic Fe₃O₄/SiO₂ Particles and Its Application in removal of 2,4-dichlorophenol, *Molecules*, cilt 19, pp. 15768-15782, 2014.
- [83] Nwagu, T. N., Aoyagi, H., Okolo, B. N. ve Yoshida, S., Immobilization of a saccharifying raw starch hydrolyzing enzyme on functionalized and non-functionalized sepa beads, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 78, pp. 1-8, 2012.
- [84] Wang, Xiang- Yu, Jiang, Xiao-Ping, Li, Y., Zeng, S. ve Zhang, Ye- Wang, Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*, *International Journal of Biological Macromolecules*, cilt 75, pp. 44-50, 2015.
- [85] Yücel, Y., Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace, *Bioresource Technology*, cilt 102, pp. 3977-3980, 2011.
- [86] Azevedo, R. M., Costa, J. B., Serp, P. , Loureiro, J. M., Faria, J. L., Silva, C. G. ve Tavares, A. P. M., A Strategy for improving peroxidase stability via

immobilization on surface modified multi-walled carbon nanotubes, *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 2015.

- [87] Shukla, S. P. ve Devi, S., Covalent coupling of peroxidase to a copolymer of acrylamide (AAm)-2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and its use in phenol oxidation, *Process Biochemistry*, cilt 40, pp. 147-154, 2005.
- [88] Matto, M., Naqash, S. ve Husain, Q., An Economical and Simple Bioaffinity Support for the Immobilization and Stabilization of Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) Peroxidase, *Acta Chimica Slovenica*, cilt 55, pp. 671-676, 2008.
- [89] Spinelli, D., Fatarella, E., Michelea, A. D. ve Pogni, R., Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization, *Process Biochemistry*, cilt 48, pp. 218-223, 2013.
- [90] Dogan, T., Bayram, E., Uzun, L. , Şenel, S. ve Denizli, A., *Trametes versicolor* laccase immobilized poly(glycidyl methacrylate) based cryogels for phenol degradation from aqueous media, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 132, p. 41981, 2015.
- [91] Huang, X.-J., Chen, P.-C., Huang, F. , Ou, Y., Chen, M.-R. ve Xu, Z.-K., Immobilization of *Candida Rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 70, pp. 95-100, 2011.
- [92] Hou, C., Qi, Z. ve Zhu, H., Preparation of core-shell magnetic

- polydopamine/alginate biocomposite for *Candida rugosa* lipase immobilization, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, cilt 28, pp. 544-551, 2015.
- [93] Atia, K. S., İsmail, S. A. ve Dessouki, A. M., Immobilization of β -amylase using polyacrylamide polymer derivatives, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, cilt 78, p. 891, 2003.
- [94] Qui, G. M., Zhu, B. K. ve Xu, Y. Y., α -Amylase immobilized by Fe₃O₄ /poly(styrene-co-maleic anhydride) magnetic composite microspheres: Preparation and characterization, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 95, p. 328, 2005.
- [95] Mohamed, S. A., Darwish, A. A. ve El-Shishtawy, R. M. Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool, *Process Biochemistry*, cilt 48, pp. 649-655, 2013.
- [96] Çorman, M. E., Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S. ve Denizli, A., Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *Trametes versicolor* Laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 63, pp. 102-107, 2010.
- [97] Wang, J., Zhao, G., Jing, L., Peng, X. ve Li, Y., Facile self-assembly of magnetite nanoparticles on three-dimensional graphene oxide-chitosan composite for lipase immobilization, *Biochemical Engineering Journal*, cilt 98, pp. 75-83, 2015.

- [98] Lei, L., Liu, X., Li, Y., Cui, Y., Yang, Y. ve Qin, G., Study on synthesis of poly (GMA)-grafted Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles using atom transfer radical polymerization and their application for lipase immobilization, *Materials Chemistry and Physics*, cilt 125, pp. 866-871, 2011.
- [99] Paula, A., Urioste, D., Santos, J. C. ve Castro, H. F., Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, cilt 82, pp. 281-288, 2007.
- [100] Dong, H., Li, J., Li, Y., Hu, L. ve Luo, D., Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite, *Chemical Engineering Journal*, cilt 181, pp. 590-596, 2012.
- [101] Jiang, Y., Tang, W., Gao, J., Zhou, L. ve He, Y., Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications phenolic compounds and dye removal, *Enzyme and Microbial Technology*, cilt 55, pp. 1-6, 2014.
- [102] Gökğöz, M. ve Altınok, H., Immobilization of laccase on polyacrlamide and polyacrylamide – κ –carragennan based semi-interpenetrating polymer networks, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, cilt 40, pp. 326-330, 2012.
- [103] Ye, P., Xue, Z., Che, A., Wu, J., Innocent, C. ve Seta, P., Nanofibrous

poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization, *Biomaterials*, cilt 27, p. 4169, 2006.

- [104] Pahujani, S., Kanwar, S. S., Chauhan, G. ve Gupta, R., Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6-for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability, *Bioresource Technology*, cilt 99, pp. 2566-2570, 2008.
- [105] Raghuvanshi, S. ve Gupta, R., Advantages of the Immobilization of lipase on Porous Supports Over Free Enzyme, *Protein & Peptide Letters*, cilt 17, pp. 1412-1416, 2010.
- [106] Li, Y., Huang, X. ve Qu, Y., A strategy for efficient immobilization of laccase and horseradish peroxidase on single-walled carbon nanotubes, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, cilt 88, pp. 2227-2232, 2013.
- [107] Park, B.-W., Ko, K.-A., Yoon, D.-Y. ve Kim, D.-S., Enzyme activity assay for horseradish peroxidase encapsulated in peptide nanotubes, *Enzyme and Microbial Technolgy*, cilt 51, pp. 81-85, 2010.
- [108] Daassi, D., Rodriguez-Couto, S., Nasri, M. ve Mechichi, T., Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *coriololpsisgallica* into Ca-alginate beads, *International Biodeterioration & Biodegradation*, cilt 90, pp. 71-78, 2014.
- [109] Silva C., Silva, C. J., Zille, A., Guebitz, G. M. ve Paulo, A. C., Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 Fibres, *Enzyme*

and Microbial Technology, cilt 41, pp. 867-875, 2007.

- [110] Yong, Y., Bai, Y., Li, Y., Lin, L., Cui, Y. ve Xia, C., Preparation and Application of Polymer-grafted Magnetic Nanoparticles for Lipase Immobilization, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, cilt 320, pp. 2350-2355, 2008.
- [111] Gong, R., Zhang, J., Zhu, J., Wang, J., Lai, Q. ve Jiang, B., Loofah Sponge Activated by Periodate Oxidation as a Carrier for Covalent Immobilization of Lipase, *Korean Journal of chemical Engineering*, cilt 30, pp. 1620-1625, 2013.
- [112] Santos, J. C., Nunes, G. F., Moreira, A. B., Perez, V. H. ve Castro, H. F., Characterization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Poly(N-methylolacrylamide) and its application in butyrate synthesis, *Chemical Engineering Technology*, cilt 30, p. 1255, 2007.
- [113] Zivkovic, L. T. I., Zivkovic, L. S., Babic, B. M., Kokunesoski, M. J., Jokic, B. M. ve Karadzic, I. M., Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase by Adsorption onto Biosafe Meso/Macroporous Silica and Zirconia, *Biochemical Engineering Journal*, cilt 93, pp. 73-83, 2015.
- [114] Kim, H. J., Suma, Y., Lee, S. H., Kim, J.-A. ve Kim, H. S., Immobilization of horseradish peroxidase onto clay minerals using soil organic matter for phenol removal, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, cilt 83, pp. 8-15, 2012.
- [115] Plagemann, R., Jonas, L. ve Kragl, U., Ceramic honeycomb as support for covalent immobilization of laccase from *Trametes versicolor* and

transformation of nuclear fast red, *Applied Microbiology and Biotechnology*, cilt 90, pp. 313-320, 2011.

[116] Sathishkumar, P., Chae, J.-C., Unnithan, A. R., Palvannan, T., Kim, H. Y., Lee, K.-J., Cho, M. ve Kamala-Kannan, S., Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable reusable and efficacious for the transformation of diclofenac, *Enzym and Microbial Technology*, cilt 51, pp. 113-118, 2012.

[117] Vaidya, B. K., Ingavle, G. C., Ponrathnam, S., Kulkarni, B. D. ve Nene, S. N., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles, *Bioresource Technol*, cilt 99, p. 3623, 2008.

[118] Barbosa, E. F., Molina, F. J., Lopes, F. M., Garcia-Ruiz, P. A., Caramori, S. S. ve Fernandes, K. F., Immobilization of Peroxidase onto Magnetite Modified Polyaniline, *The Scientific World Journal*, p. ID 716374, 2012.

[119] Iqbal, H. M. N. ve Asgher, M., Decolorization applicability of sol-gel matrix immobilized manganese peroxidase produced from an indigenous white rot fungal strain *Ganoderma lucidum*, *BMC Biotechnology*, cilt 13, p. 56, 2013.

[120] Valle-Vigon, P. ve Fuertes, A. B., Magnetically separable carbon capsules loaded with laccase and their application to dye degradation, *RSC Advances*, cilt 1, pp. 1756-1762, 2011.

[121] Wang, F., Guo, C., Yang, Liang-rong ve Liu, C.-Z., Magnetic mesoporous

silica nonoparticles: Fabrication and their laccase immobilization performance, *Bioresource Technology*, cilt 101, pp. 8931-8935, 2010.

- [122] Abdullah, A. Z., Sulaiman, N. S. ve Kamaruddin, A. H., Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15, *Biochemical Engineering Journal*, cilt 44, pp. 263-270, 2009.
- [123] Li, Sheng-Feng ve Wu, Wen-Teng., Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal*, cilt 45, pp. 48-53, 2009.
- [124] Kuo, Chia-Hung, Liu, Yung-Chuan, Chang, Chieh-Ming, J., Chen, J.-H., Chang, C. ve Shieh, C.-J., Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan Fe₃O₄ nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, cilt 87, pp. 2538-2545, 2012.
- [125] Kötting, J., Eibl, H. ve Fehrenbach, F. J., Substrate specificity of staphylococcus aureus (TEN5) lipases with isomeric oleoyl-Sn-glycerol ethers as substrates, *Chems. Phys. Lipids*, cilt 47, pp. 117-122, 1988.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Arif SOYSAL

Doğum Tarihi : 20 / 12 / 1973

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu :

Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi- 1997

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi- 2005

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar:

19/03/1998- 21/04/1998 : Prof.Dr.Erol Güngör İlköğretim Okulu

27/04/1998- 08/12/2000 : Yenidoğanlı İlköğretim Okulu

08/12/2000- 21/08/2003 : Tepefakılı Köyü İlköğretim Okulu

22/08/2003- 16/12/2005 : Mucur Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi

16/12/2005- : Yusuf Demir Bilim ve Sanat Merkezi

Yayımları (SCI) : Arslan, M., Mustafa Yiğitoğlu, Arif Soysal Removal Of Chromium (VI) From Aqueous Solutions Using Poly (4-Vinyl Pyridine) Beads , J. App. Poly. Sci.,101, 2865-2870 (2006)

Yayımları (Diğer) : Mustafa Yiğitoğlu, Metin Arslan, Arif Soysal Poli(4-Vinil Piridin) Küreleri Üzerine Cu(II) ve Cd(II) İyonlarının Adsorpsiyon Özelliklerinin

İncelenmesi I.Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi ve Sergisi. 21-23 Haziran 2006, ODTÜ Kongre Kùltür Merkezi

Metin Arslan, Mustafa Yiğitoğlu, Arif Soysal, Poli (4-Vinil Piridin) Kùreleri Kullanılarak Sulu Çözeltiden Krom (VI) İyonlarının Uzaklaştırılması, XX. Ulusal Kimya Kongresi, 04-08 Eylül 2006, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Araştırma Alanları : Enzim İmmobilizasyonu, Aşı kopolimerizasyonu, Adsorpsiyon