



**GO_x VE AOX ENZİMLERİ İLE PİRİNÇ, BAKIR,
ALÜMİNYUM VE PASLANMAZ ÇELİK İŞ
PARÇALARININ ENZİMATİK NANOBIYO-İŞLEMESİ**

Asghar LESANİ

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanomalzeme Bilim Dalı

Prof. Dr. Hamit AKBULUT

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GO_x VE AOX ENZİMLERİ İLE PİRİNÇ, BAKIR, ALÜMİNYUM
VE PASLANMAZ ÇELİK İŞ PARÇALARININ ENZİMATİK
NANOBIYO-İŞLEMESİ**

Asghar LESANİ

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanomalzene Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**GO_x VE AOX ENZİMLERİ İLE PİRİNÇ, BAKIR, ALÜMİNYUM VE
PASLANMAZ ÇELİK İŞ PARÇALARININ
ENZİMATİK NANOBIYO-İŞLEMESİ**

Pro. Dr. Hamit AKBULUT danışmanlığında ve **Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU**'nun ortak danışmanlığında, **Asghar LESANİ** tarafından hazırlanan bu çalışma 18/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı – Nanomalzeme Bilim Dalı'nda **Doktora Tezi** olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hamit AKBULUT

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Sadri ŞEN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Murat Demir AYDIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ayşe BAYRAKÇEKEN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun **24/08/2017** tarih ve **34/36** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: **2015/140**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZET

Doktora Tezi

GO_x VE AOX ENZİMLERİ İLE PİRİNÇ, BAKIR, ALÜMİNYUM VE PASLANMAZ ÇELİK İŞ PARÇALARININ ENZİMATİK NANOBIYO-İŞLEMESİ

Asghar LESANİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nano Malzeme Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hamit AKBULUT
Ortak-Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Çalışmada pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik iş parçalarının enzimatik nanobiyo-işlemesi yapıldı. Bu işleme yönteminde iki farklı enzim; glukoz oksidaz (GO_x) ve alkol oksidaz (AOX) işleme aracı olarak kullanıldı. Enzimatik işlemenin temeli oksijen ortamında enzim ve substrat arasında gerçekleşen kimyasal tepkime esnasında hidrojen peroksitin (H₂O₂) yerinde üretimi ve ardından reaksiyon ortamında bulunan Fe²⁺ iyonlarının H₂O₂ ile Fe³⁺'e yükseltgenmesine dayalıdır ve biyo-Fenton reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Bioreaksiyon ortamında bulunan metal iş parçalarının oksidasyonu üretilen Fe³⁺ iyonları tarafından sağlanmaktadır. Böylece bir işleme çevrimi gerçekleşmektedir. Bu çalışmada; enzimatik işlemeyi etkileyen parametrelerin (pH, sıcaklık, zaman, enzim miktarı vb.) biyo-işleme üzerine etkisi araştırıldı ve en uygun koşullar belirlendi. Yapılan enzimatik işlemenin metal iş parçaları üzerine etkisini gözlemlemek için SMRR miktarı, ayrıca yüzey morfolojileri ve yüzeyde oluşan pürüzlülük miktarları SEM ve AFM analizleri yapılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar metal parçalarının geleneksel yöntemlerle (HCl, H₂SO₄ ve H₂O₂) yapılan biyo-işleme sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Paslanmaz çelik iş parçalarının enzimatik işlemeye bütün koşullar altında direnç gösterdi ve yüzeylerinde her hangi bir biyo-işlemenin gerçekleşmediği belirlendi. Tüm metal iş parçalarının enzimatik işlenmesinde; GO_x enzimi AOX enzimine göre daha etkili işleme gerçekleştirdiği ve işleme koşullarında daha dayanıklı olduğu tespit edildi. Sonuçlara göre; GO_x ve AOX enzimleriyle yapılan biyo-işlemeler, metallerin yüzeyinde herhangi bir tahribata neden olmadan üniform bir şekilde metal kaldırmayı gerçekleştirdiği, geleneksel yöntemlerle yapılan işlemede metal yüzeylerinin büyük ölçüde tahrip olduğu belirlendi. Ayrıca, enzimatik işleme sonucunda iş parçalarının yüzey morfolojisinin kontrol numuneye daha fazla benzerlik gösterdiği belirlendi.

2017, 152 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz oksidaz enzimi (GO_x), Alkol oksidaz enzimi (AOX), Enzimatik işleme, nanobiyo-işleme, Pirinç, Bakır, Alüminyum, Paslanmaz çelik

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GO_x AND AOX ENZYMES AS A TOOL FOR ENZYMATIC NANOBIO-MACHINING OF BRASS, COPPER, ALUMINIUM AND STAINLESS STEEL WORKPIECES

Asghar LESANI

Atatürk university
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Nanoscience and Nanoengineering
Nano Materials Department

Supervisor: Prof. Dr. Hamit AKBULUT
Co-Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROGLU

In this study the enzymatic nano-biomachining of brass alloy, copper, aluminium and stainless steel was performed. In this method the glucose oxidase (GO_x) and alcohol oxidase (AOX) enzymes used as a machining tool for the first time. The base of enzymatic machining is the insitu production of hydrogen peroxide (H₂O₂) during the chemical reaction between the enzyme and the substrate in the presence of oxygen. The produced hydrogen peroxide then oxidizes Fe²⁺ ions in the reaction medium to Fe³⁺ ions. This Fe³⁺ ions able to biomachining on the metals workpiece presence in the bio-reaction medium. In this way, an oxidation/reduction cycle is created between the metal workpiece and the iron ions present in the machining medium. The effect of some important parameters effected on biomachining of metals such as pH, temperature, time, GO_x and AOX amount and etc. were investigated and the optimal values of these variables were obtained by performing different experiments.

In order to observe the effect of the enzymatic machining at the end of the bio reaction, the value of SMRR and also the surface morphology and the roughness on the surface of workpiece were analyzed by SEM and AFM. The obtained results were compared with the results of the machining with conventional methods (HCl, H₂SO₄ and H₂O₂). According to the results, biomachining with GO_x and AOX enzymes were performed uniformly on the metal surface without any destruction, and the surface morphology of the workpieces is more similar to the control sample. Stainless steel workpieces showed resistance under all conditions to the enzymatic biomachining and no bio-machining occurred on their surface. GO_x enzyme performed more efficient processing than AOX enzyme and was found to be more durable to machining conditions.

2017, 152 pages

Keywords: Glucose oxidase (GO_x) enzyme, Alcohol oxidase (AOX) enzyme, Enzymatic machining, Biomachining, Brass alloy, Copper, Aluminium, stainless steel

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini ve engin tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hamit AKBULUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beraber geçirdiğimiz eğitim-öğretim süresince tezimle ilgili her konuda benden desteklerini ve samimiyetini esirgemeyen, her konuda çalışma azmi veren, sağladığı laboratuvar imkânlarından dolayı kıymetli ortak danışmanım Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM), elde ettiğimiz metal iş parçalarının SEM, EDX ve AFM analizlerinin gerçekleştirilmesinde emeği geçen tüm teknik ekibe çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca, doktora çalışmalarım sırasında bana her konuda desteklerini esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü Araştırma Laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Doktora süresince her zaman yanımda olarak ve bir an bile desteklerini benden esirgemeyen yaşadıkları tüm zorluklardan dolayı hayat arkadaşım Sayın Müh. Vahide LAK ve dünya tatlısı inci kızım Selina'ya canı gönülden teşekkür ederim.

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve hayatımın her evresinde benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma görevlisi Sayın Volkan ACAR'a verdiği bütün desteklerinden dolayı ayrıca laboratuvar arkadaşlarıma ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Asghar LESANİ

Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Giriş	3
2.2. İşleme Yöntemleri	3
2.3. Biyolojik İşleme	4
2.3.1. Kullanılan mikroorganizmalar ve işlem prensipleri	6
2.3.2. Mikroorganizmalarla oksidasyon işlemi	7
2.3.3. Asidoliz prosesi	9
2.3.4. Malzeme kaldırma hızı (MRR)	10
2.3.5. Yüzey bütünlüğü	14
2.4. Enzim.....	27
2.4.1. Enzimlerin genel sınıflandırması.....	28
2.4.2. Enzimlerin özellikleri	28
2.4.3. Glukoz oksidaz enzimi	29
2.4.4. Alkol oksidaz enzimi.....	29
2.4.5. Enzim aktivite tayini	31
2.4.5.a. Ünite (UI)	31
2.4.5.b. Spesifik Aktivite.....	31
2.4.6. Glukoz oksidaz aktivite tayini	32
2.4.7. Alkol oksidaz aktivite tayini.....	34
2.5. Enzimatik Biyo-İşleme	34
2.6. Çalışmanın Amacı	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37

3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	37
3.1.1.a. GOx enzimi.....	37
3.1.1.b. Glukoz	38
3.1.1.c. Demir (II) Sülfat 7H ₂ O	39
3.1.1.d. Alkol oksidaz enzimi.....	39
3.1.1.e. Metil alkol (metanol)	40
3.1.1.f. Sodyum hidroksit	41
3.1.1.g. Sülfürik asit	42
3.1.1.h. Hidroklorik asit.....	42
3.1.1.i. Sodyum asetat	43
3.1.1.i. Asetik asit.....	43
3.1.1.j. Pirinç iş parçası	44
3.1.1.k. Bakır iş parçası	44
3.1.1.l. Alüminyum iş parçası.....	45
3.1.1.m. Paslanmaz çelik	45
3.1.2. Kullanılan cihazlar	46
3.1.2.a. Deney esnasında kullanılanlar	46
3.1.2.b. Analizde kullanılan yüksek teknolojiye sahip cihazlar	47
3.2. Yöntem	47
3.2.1. Deneysel tasarım	47
3.2.1.a. Glikoz oksidaz enzimi ile biyo-işleme	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	56
4.1. İş Parçalarının Hazırlanması	56
4.1.1. Zımpara işlemi.....	56
4.2. GOx Enzimiyle Yapılan Deney Sonuçları	58
4.2.1. Pirinç iş parçası analizleri ve sonuçları	58
4.2.1.a. Pirinç iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları	59
4.2.1.b. Özgül metal kaldırma hızı	60
4.2.1.c. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi	63
4.2.2. Bakır	74
4.2.2.a. Bakır iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları	75

4.2.2.b. Enzimatik işleme üzerindeki etkin parametreler	78
4.2.2.c. SEM analizleri	84
4.2.2.d. AFM analizi.....	87
4.2.3. Alüminyum.....	88
4.2.3.a. Alüminyum iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları	89
4.2.3.b. Enzimatik işleme üzerinde etkin parametrelerin tesirinin incelenmesi.....	91
4.2.3.c. SEM analizleri	99
4.2.3.d. AFM analizleri	102
4.2.4. Paslanmaz çelik	103
4.2.4.a. Paslanmaz çelik iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları	104
4.2.4.b. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi	107
4.2.4.c. SEM analizleri	113
4.2.4.d. AFM analizleri	116
4.3. Alkol oksidaz enzimi ile biyolojik işleme.....	116
4.3.1. Pirinç iş parçası analizleri ve sonuçları	116
4.3.1.a. Pirinç iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları	117
4.3.1.b. Özgül metal kaldırma hızı	119
4.3.1.c. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi	120
4.3.2. Bakır iş parçası analizleri ve sonuçları.....	131
4.3.2.a. Bakır iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları.....	132
4.3.2.b. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi	134
5. SONUÇLAR.....	145
KAYNAKLAR	150
ÖZGEÇMİŞ	153

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Yüzey
E ⁰	Standart elektrot potansiyeli
N	Normalite
Ra	Pürüzlülük
Rmax	Maksimum pürüzlülük
Sa	Yüzey pürüzlülüğü
Smax	Maksimum yüzey pürüzlülüğü
T	Zaman
W	Ağırlık

Kısaltmalar

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AOX	Alkol oksidaz
EDX	Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
GOx	Glukoz oksidaz
İş p.	İş parçası
K.K.	Kütle kaybı
K.K.Y.	Kütle kaybı yüzdesi
mL	Mililitre
mM	milimol
MRR	Metal kaldırma hızı
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SMRR	Özgül metal kaldırma hızı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Enerji gereksinimlerine göre çeşitli organizmaların sınıflandırma özeti.....	7
Şekil 2.2. Biyo-işleme mekanizması.....	8
Şekil 2.3. Farklı hücre konsantrasyonlarında (a) bakır, (b) nikel ve (c) alüminyum kaldırma esnasında ferrik iyon konsantrasyonunun değişimi	11
Şekil 2.4. Saf demir ve bakır için işleme zamanına tabi, oluk derinliği değişimleri	12
Şekil 2.5. Cu iş parçası üzerinde mikroçarkın SEM fotoğrafı	13
Şekil 2.6. Ortalama metal kaldırma oranına işleme sıcaklığının etkileri	13
Şekil 2.7. Organik fotodirençli kaplama ile metal iş parçası (a) biyo-işleme öncesinde ve (b) biyo-işleme sonrası	14
Şekil 2.8. Cilalanmış Cu numune yüzeylerinin işlem öncesi ve 48 saatlik bakteriyel işlem sonrası SEM mikrografları;	15
Şekil 2.9. Metal yüzey pürüzlülüğüne farklı kültür ortamının etkisi	17
Şekil 2.10. Biyo-işleme prosedürü.....	18
Şekil 2.11. Dört bakır numunesi için biyo-işleme sonrası SEM mikrografları	19
Şekil 2.12. Fotorezist çıkarılmadan önce kimyasal dağlama ile imal edilen bakır Profili.....	19
Şekil 2.13. Fotorezist çıkarılmadan önce biyo-işleme ile imal edilen bakır profili	20
Şekil 2.14. Oluğun görünüş boyutu üzerine işleme süresinin etkisi	20
Şekil 2.15. Biyolojik işleme sırasında profil boyutu ilerlemesi.....	21
Şekil 2.16. Saf bakır iş parçası üzerinde biyo-işlenmiş olukların SEM görüntüsü	22
Şekil 2.17. Biyo-işleme yöntemi ile imal edilen levhalar	22
Şekil 2.18. Kültür süpernatant ile dikdörtgen desen yazımı	23
Şekil 2.19. Desenlerin SEM mikrografları (a) daire (b) dikdörtgen	23
Şekil 2.20. 24 saat biyo-işleme süreci sonrası elde edilen desenlerin SEM mikrografları.....	24
Şekil 2.21. Biyo-işleme süreci ile üretilen dişli -biçimli desen (a) Üst görünüm (b) 3D görünümü	24
Şekil 2.22. SEM analizleri: (a) kontrol, (b) H ₂ SO ₄ 1N, (c) HCl 1N, (d) A. ferooksidan bakteri ve (e) enzimatik çözelti.....	26

Şekil 2.23. MRR üzerindeki sıcaklığın etkisi	27
Şekil 2.24. MRR üzerinde karıştırma hızının etkisi.....	27
Şekil 2.25. Glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyon.....	29
Şekil 2.26. Aktivite tayini deney düzeneği	33
Şekil 2.27. GOx aktivite tayini için kalibrasyon grafiği	33
Şekil 3.1. Enzimatik nanoişleme sürecinin genel konstrüksiyonu.....	55
Şekil 4.1. Metal iş parçalarını hazırlanma aşamaları	57
Şekil 4.2. Zımpara seti düzeneği.....	57
Şekil 4.3. Doğru zımpara işlemi şematığı.....	58
Şekil 4.4. Biyo-işleme öncesi pirinç iş parçasını SEM görüntüsü	58
Şekil 4.5. Pirincin biyo-işlemesi üzerine GOx miktarının etkisi	63
Şekil 4.6. GOx enzimi ile pirinç üzerinde yapılan biyo-işlemede pH'nın etkisi	64
Şekil 4.7. Enzimatik işlemede sıcaklığın etkisi	65
Şekil 4.8. Biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi.....	66
Şekil 4.9. Enzimatik işleme üzerinde zaman parametresinin etkisi.....	67
Şekil 4.10. Pirinç üzerinden metal kaldırma sürecinde biyo-işleme ortamının karıştırma hızının etkisi.....	68
Şekil 4.11. Metal kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamındaki Fe (II) etkisi, 100 ml reaksiyon çözeltisi.....	69
Şekil 4.12. Metal kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti, HCl:1N, H ₂ SO ₄ :1N, H ₂ O ₂ :50%v/v, GOx:0.1g, 100mL reaksiyon çözeltisi.....	70
Şekil 4.13. Pirinç kontrol numunesinin SEM görüntüsü	71
Şekil 4.14. Pirinç iş parçası üzerinde GOx ile yapılan biyo-işlemenin SEM görüntüsü.....	72
Şekil 4.15. Pirinç üzerinde HCl ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü.....	72
Şekil 4.16. Pirinç iş parçası üzerinde H ₂ SO ₄ ile gerçekleşen işlemenin SEM görüntüsü.....	73
Şekil 4.17. Pirinç iş parçası üzerinde H ₂ O ₂ ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü.....	73
Şekil 4.18. Orijinal bakır numunesinin SEM görüntüsü.....	75
Şekil 4.19. GOx miktarının bakırın biyo işlemesi üzerine etkisi.....	78

Şekil 4.20. Bakırın biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi	79
Şekil 4.21. Bakırın enzimatik işleminde sıcaklığın etkisi	80
Şekil 4.22. Bakırın enzimatik işleminde zaman parametresinin etkisi.....	81
Şekil 4.23. Metal kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamının karıştırılmasını etkisi	81
Şekil 4.24. Bakır biyo-işleminde GOx enzimi üzerine pH'nın etkisi.....	82
Şekil 4.25. Bakır iş parçasından metal kaldırma hızı üzerine Fe (II) konsantrasyonunun etkisi	83
Şekil 4.26. Metal kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti, HCl:1N, H ₂ SO ₄ :1N, H ₂ O ₂ :50%v/v, GOx:0.1g, 100ml reaksiyon çözeltisi.....	84
Şekil 4.27. Bakır kontrol numunenin SEM görüntüsü.....	85
Şekil 4.28. Enzimatik işlemin bakır iş parçası üzerinde etkisi.....	85
Şekil 4.29. Bakır iş parçası üzerinde HCl ile yapılan işlemin SEM görüntüsü	86
Şekil 4.30. Bakır iş parçası üzerinde H ₂ SO ₄ ile yapılan işlemin etkisi.....	86
Şekil 4.31. H ₂ O ₂ ile bakır üzerinde uygulanan işlemin SEM görüntüsü	87
Şekil 4.32. Alüminyum kontrol iş parçasının SEM görüntüsü	88
Şekil 4.33. GOx enzimi miktarının etkisi alüminyumun biyo işleminde üzerine	92
Şekil 4.34. Alüminyumun biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi	93
Şekil 4.35. Alüminyumun enzimatik işleminde sıcaklığın etkisi	94
Şekil 4.36. Alüminyum iş parçalarının enzimatik işleminde üzerine zaman parametresinin etkisi	95
Şekil 4.37. Metal kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamının karıştırılmasının etkisi, 100 ml çözelti	96
Şekil 4.38. Alüminyumun biyolojik işleme esnasında GOx enzimi üzerine pH parametresinin etkisi	97
Şekil 4.39. Alüminyum kaldırma hızı üzerine Fe(II) konsantrasyonunun etkisi	98
Şekil 4.40. Alüminyum kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti, HCl:1N, H ₂ SO ₄ :1N, H ₂ O ₂ :50%v/v, GOx:0.1g, 100ml reaksiyon çözeltisi	99
Şekil 4.41. Alüminyum kontrol iş parçasının SEM görüntüsü	100

Şekil 4.42. Alüminyum iş parçası üzerinde enzimatik işlemenin SEM mikrografi.....	100
Şekil 4.43. HCl ile alüminyum üzerinde yapılan işlemenin SEM görüntüsü	101
Şekil 4.44. Alüminyum iş parçası üzerinde H ₂ SO ₄ ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü.....	101
Şekil 4.45. H ₂ O ₂ ile alüminyum iş parçası üzerinde yapılan işlemenin SEM mikrografi.....	102
Şekil 4.46. Orjinal paslanmaz çelik numunesinin SEM görüntüsü	103
Şekil 4.47. Paslanmaz çeliğin biyo-işlemesi üzerine GOx enzimi miktarının etkisi	107
Şekil 4.48. Paslanmaz çeliğin biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi	108
Şekil 4.49. Paslanmaz çeliğin enzimatik işleminde sıcaklığın etkisi	109
Şekil 4.50. Paslanmaz çeliğin enzimatik işleme esnasında zaman parametresinin etkisi	109
Şekil 4.51. Paslanmaz çelikten talaş kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamının karıştırma hızının etkisi	110
Şekil 4.52. Paslanmaz çeliğin enzimatik işleminde pH'nın etkisi.....	111
Şekil 4.53. Paslanmaz çeliğin enzimatik işleminde Fe (II) konsantrasyonunun etkisi	111
Şekil 4.54. Paslanmaz çelikten metal kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti.....	112
Şekil 4.55. Paslanmaz çelik kontrol numunesinin SEM görüntüsü.....	113
Şekil 4.56. Paslanmaz çelik iş parçası üzerinde GOx ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü.....	114
Şekil 4.57. Paslanmaz çelik üzerinde HCl ile yapılan işlemenin SEM mikrografi.....	114
Şekil 4.58. Paslanmaz çelik üzerinde H ₂ SO ₄ ile gerçekleşen işlemenin SEM görüntüsü.....	115
Şekil 4.59. Paslanmaz çelik iş parçası üzerinde H ₂ O ₂ ile yapılan işlemenin SEM mikrografi.....	115
Şekil 4.60. İşlenmemiş orijinal pirinç numunesinin SEM görüntüsü	117

Şekil 4.61. Pirinç iş parçası üzerinde AOX enzimi miktarının etkisi	121
Şekil 4.62. Enzimatik işleme üzerine metanol substratın etkisi	122
Şekil 4.63. Alkol oksidaz ile pirinç üzerinde yapılan işlemede sıcaklığın etkisi	122
Şekil 4.64. Enzimatik biyo-işleme üzerine sürenin etkisi.....	123
Şekil 4.65. Pirinç iş parçasının enzimatik işleminde karıştırma hızının etkisi	124
Şekil 4.66. Pirinç üzerinde AOX ile yapılan işlemede reaksiyon ortamının pH etkisi	125
Şekil 4.67. Alkol oksidaz ile pirinç üzerinde yapılan biyo-işlemede Fe^{2+} etkisi	126
Şekil 4.68. Pirinçin işleminde enzimatik işleme ile geleneksel işleme araçlarının kıyaslaması	127
Şekil 4.69. Pirinç kontrol numunesinin SEM görüntüsü	128
Şekil 4.70. AOX ile pirinç iş parçası üzerinde yapılan işlemin SEM mikrografı.....	128
Şekil 4.71. HCl ile pirinç üzerinde yapılan işlemin SEM görüntüsü	129
Şekil 4.72. H_2SO_4 ile işlenmiş pirinç iş parçasının yüzey morfolojisi görüntüsü.....	129
Şekil 4.73. H_2O_2 ile işlenmiş pirinç iş parçasının SEM görüntüsü	130
Şekil 4.74. Orjinal bakır iş parçasının SEM görüntüsü	131
Şekil 4.75. AOX enziminin biyo-işleme üzerine etkisi	135
Şekil 4.76. AOX enzimi ile bakır üzerinde yapılan işlemede metanol substratın etkisi	136
Şekil 4.77. Bakırın enzimatik işleminin üzerine sıcaklığın etkisi	137
Şekil 4.78. Bakır üzerinde AOX enzimiyle yapılan işlemede zamanın etkisi	137
Şekil 4.79. Bakır iş parçalarını biyo-işleminin üzerine karıştırma hızının etkisi	138
Şekil 4.80. AOX enzimi aktivitesi üzerine biyo-reaksiyon ortamının pH etkisi	139
Şekil 4.81. Bakır iş parçalarının AOX enzimi ile işleminde Fe (II) etkisi	140
Şekil 4.82. AOX ile geleneksel işleme araçların SMRR üzerinde etkisi.....	141
Şekil 4.83. Bakır kontrol numunesinin SEM görüntüsü	142
Şekil 4.84. AOX ile bakır iş parçası üzerinde yapılan işlemin SEM mikrografı.....	142

Şekil 4.85. HCl ile bakır iş parçası üzerinde uygulanan işlemenin SEM görüntüsü.....	143
Şekil 4.86. Bakır iş parçası üzerinde H ₂ SO ₄ ile gerçekleşen işlemenin SEM mikrografı.....	143
Şekil 4.87. H ₂ O ₂ ile bakır üzerinde gerçekleşen işlemenin SEM görüntüsü	144



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 9K ve Leathen kültür ortamlarının bileşenleri.....	17
Çizelge 2.2. Alkol oksidazın farklı substratlarla relatif reaksiyon hızı değerleri	30
Çizelge 3.1. <i>Aspergillus niger</i> 'den Glukoz Oksidazın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	38
Çizelge 3.2. α -D- Glukozun fiziksel ve kimyasal özellikleri	38
Çizelge 3.3. Demir (II) sülfat.7H ₂ O özellikleri.....	39
Çizelge 3.4. <i>Pichia pastoris</i> 'ten Alkol Oksidaz çözeltisi.....	40
Çizelge 3.5. Metil alkolün özellikleri	40
Çizelge 3.6. Sodyum hidroksitin kimyasal ve fiziksel özellikleri	41
Çizelge 3.7. Sülfürik asidin özellikleri.....	42
Çizelge 3.8. Hidroklorik asidin özellikleri.....	42
Çizelge 3.9. Sodyum asetatın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	43
Çizelge 3.10. Asetik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri	44
Çizelge 3.11. Pirinç iş parçasının elementel analizi	44
Çizelge 3.12. Bakır iş parçasının elementel analizi	45
Çizelge 3.13. Alüminyum iş parçalarının fiziksel kompozisyonu	45
Çizelge 3.14. Paslanmaz çelik iş parçalarının fiziksel kompozisyonu	45
Çizelge 3.15. pH 3 – 6 aralığındaki asetat tampon çözeltileri	50
Çizelge 3.16. Farklı pH değerlerinde (pH 3.6-5.6) asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması.....	50
Çizelge 3.17. Enzimatik biyo işleme için reaksiyon ortamı	52
Çizelge 4.1. Orijinal pirinç numunenin pürüzlülük analizi	59
Çizelge 4.2. Orijinal pirinç numunenin element analizi	59
Çizelge 4.3. Pirinç iş parçası ağırlık analiz sonuçları	61
Çizelge 4.4. Pirinç iş parçası MRR ve SMRR sonuçları	62
Çizelge 4.5. İşlenmiş pirinç numunelerin pürüzlülük değerleri.....	74
Çizelge 4.6. Orijinal bakır numunesinin elementel analizi sonuçları	75
Çizelge 4.7. Orijinal bakır numunesinin pürüzlülük analiz sonuçları	75
Çizelge 4.8. Bakır iş parçası ağırlık analiz sonuçları.....	76

Çizelge 4.9. Bakır iş parçası MRR ve SMRR sonuçları	77
Çizelge 4.10. İşlenmiş bakır numunelerin pürüzlülük analizi	87
Çizelge 4.11. Orijinal alüminyum iş parçasının elementel analizi sonuçları.....	88
Çizelge 4.12. Biyo-işleme öncesi alüminyum yüzey pürüzlülüğü sonuçları.....	89
Çizelge 4.13. Alüminyum iş parçasının ağırlık analiz sonuçları	89
Çizelge 4.14. Alüminyum iş parçası MRR ve SMRR sonuçları	90
Çizelge 4.15. Alüminyum numunelerin işlemeye maruz kaldıktan sonra pürüzlülük analizi	103
Çizelge 4.16. Orjinal paslanmaz çeliğin fiziksel kompozisyon analizi	104
Çizelge 4.17. Biyo-işleme öncesi paslanmaz çeliğin yüzey pürüzlülüğü analizi	104
Çizelge 4.18. Paslanmaz çelik iş parçası ağırlık analiz sonuçları.....	105
Çizelge 4.19. Paslanmaz çelik iş parçası MRR ve SMRR sonuçları	106
Çizelge 4.20. Paslanmaz çelik numunelerinin biyo-işleme sonrası pürüzlülük analizi sonuçları.....	116
Çizelge 4.21. Orijinal pirinç numunenin pürüzlülük analizi.....	117
Çizelge 4.22. Pirinç iş parçası ağırlık analiz sonuçları	118
Çizelge 4.23. Pirinç iş parçası MRR ve SMRR sonuçları	119
Çizelge 4.24. İşlenmiş pirinç numunelerin pürüzlülük değerleri.....	130
Çizelge 4.25. Orijinal bakır numunenin pürüzlülük analizi.....	132
Çizelge 4.26. Bakır iş parçaları ağırlık analiz sonuçları	132
Çizelge 4.27. Bakır iş parçası MRR ve SMRR sonuçları	133

1. GİRİŞ

Metal, kaya, seramik, polimer gibi malzemeleri istenilen forma ve şekle sokmak için makro ölçekte yapılan talaşlı imalat işlemine işleme prosesi denir. İşleme prosesi çok eski zamanlardan beri farklı yöntemler ve tezgâhlarla yapılmaktadır. İstenilen bir işlemenin yapılabilmesi için tornalama, frezeleme, delik delme, broşlama, taşlama, lepleme v.s. gibi işlemlere gerek duyulur.

Küçük ve hassas parçaların işlenmesi, örneğin küçük iş parçaları üzerinde zarif desenlerin oluşturulması, hassas elektronik parçaların ve elektrik devrelerin özellikle mikro ve nano ölçekte işlenmesi mezkûr yöntemlerle işlenmesi mümkün değildir. Mikro ve nano ölçekte metal işlemleri için, iş parçalarına herhangi bir zarar vermeden titiz ve hassas bir işlem yapmak için özel yöntemlerin uygulaması gerekmektedir.

İş parçasının herhangi bir yan etkiye maruz bırakmaksızın ve zarar vermeksizin, mikro ve nano boyutlarda çok hassas işlem yapılması, işleme sürecinin en önemli kaygılarından biri olarak kabul edilir.

İşleme yapılacak malzeme ve malzeme üzerine aktarılan desenin boyutlarından kaynaklanan kısıtlamalardan dolayı seçilen doğru işleme yöntemi, işleme sürecinin en önemli aşamasıdır. İş parçası üzerine makro işlemlerle oluşturulan desende daha düşük hassasiyet yeterli olduğu için yöntem ve tezgâh seçimlerinde çok fazla kısıtlama yoktur. Ancak malzeme veya desen boyutları mikro ve nano ebatlarda olduğunda, metal işleme ve işleme araçları çok özel hassasiyetler gerektirmektedir.

Metallerin işlenmesinde; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç farklı yöntem mevcuttur. Geçmişten günümüze fiziksel ve kimyasal yöntemler yaygın olarak uygulanmıştır. Bu yöntemlerin uygulanmasında, mekanik, ısı, elektrik ve kimyasal enerjiye gerek duyulmaktadır. Ayrıca, bu işleme yöntemleri iş parçasının metalürjik özelliklerine hasar verebilmektedir. Bahsedilen bu metal işleme yöntemlerine alternatif olarak,

mikroorganizmalar ile metal işleme yöntemleri son zamanlarda giderek artmaktadır. Bu işlem süreçlerine “biyolojik işleme” veya “biyo-işleme” denilmektedir. Biyo-işleme sürecinde *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) ve *Acidithiobacillus thiooxidans* (*A. thiooxidans*) iki tür bakteri birçok çalışmada çoğunlukla kullanılan mikroorganizmalardır. Ancak bu mikroorganizmaların temini, büyütülmesi ve çoğaltılması ve kullanımlarının zorluğu bu yöntemin kullanımını önemli ölçüde kısıtlamaktadır.

Bahsedilen mikroorganizmalar yerine oksidoredüktaz sınıfında yer alan enzimlerinden kullanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla glukoz oksidaz ve alkol oksidaz enzimleri seçilerek bu çalışma planlanmıştır. Çalışma kapsamında metallerin ve alaşımların işlenmesinde alternatif yeni bir yöntem sunulmaktadır. Bu işleme sürecinin avantajları ortaya konularak, nano ölçekte bakır, pirinç, alüminyum ve paslanmaz çelik malzemeler üzerinde işleme yapılmış ve desenler oluşturulmuştur. İşleme aracı olarak glukoz oksidaz (GOx) ve alkol oksidaz (AOX) enzimleri kullanılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Giriş

Metal, ahşap, alaşım, kompozit ve diğer katı malzemelere istenilen şekli ve deseni aktarmak için kullanılan metoda işleme denilir. Eski zamanlardan beri işleme işleri bir sürü çeşitli tezgâhlar ve yöntemlerle uygulanmaktadır. Ancak iş parçasının boyutuna ve cinsine bağlı olarak istenilen desenin kalite ve boyutuna göre uygulanan yöntemler ve araçlar değişmektedir. Günümüzde üretilen yeni malzemeler (örneğin nanokompozitler, mikro ve nanoçipler, güneş pilleri vb.) üstün fabrikasyon teknolojileri kullanılarak üretilirler ve bu malzemeler üzerinde işleme gerçekleştirmek için mikro ve nano boyutlarda uygulanabilecek işleme yöntemlerinin sunulması gerekmektedir (Hocheng *et al.* 2013).

2.2. İşleme Yöntemleri

İşleme yöntemleri genel olarak aşağıdaki başlıklar altında toplanabilir (Eskandarian *et al.* 2013; Jadhav and Hocheng 2016)

- a. Fiziksel
- b. Kimyasal ve elektro-kimyasal
- c. Mekanik mikro-işleme
- d. Işın tabanlı mikroişleme
- e. Hibrid işleme
- f. Biyolojik işleme

Makro işlemlerde ve büyük iş parçaları üzerinde fiziksel (mekanik) ve kimyasal yöntemler yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu işlemlere tornalama, frezeleme, delik delme, broşlama, raybalama, taşlama, lepleme vb. örnek verebilir. Bu süreçler işleme noktasında yoğunlaşmak için, mekanik, ısı, elektriksel veya kimyasal enerji ve kuvvetler

gerektirir. Böyle işleme yöntemleri iş parçasının yüzey morfolojisi ve metalürjik özelliklerine zarar verebilir ve elde edilen ürünlerin kalitesi iyi nitelikte de olmamaktadır.

Günümüzde bahsedilen metotlar dışında “Biyolojik İşleme” olarak yeni bir işleme yöntemi gündemdedir. Bu metot ilk olarak metallerin cevherlerden biyoliçinde¹ kullanılmıştır ve belli mikroorganizmalardan faydalanarak bakır, demir ve alüminyum gibi metaller diğer bileşenlerden (toprak, su gibi) arındırmışlardır (Singh 2017). Biyolojik işleme yöntemleri üç başlık altında toplanabilir;

- Bakteriyel işleme
- Mantar ile işleme
- Enzimatik işleme

2.3. Biyolojik İşleme

Bir iş parçası üzerinden metal kaldırmak için mikroorganizmaların kullanımı işleme süreçleri, biyolojik işleme (biyo-işleme) olarak bilinir. Yakın zamana kadar, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (A. *ferrooxidans*) ve *Acidithiobacillus thiooxidans* (A. *thiooxidans*) çoğunlukla çeşitli çalışmalarda metallerin işlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar idi. Bu mikroorganizmalar ile birlikte, *Stafilokok sp*². ve *Aspergillus niger* (A. *niger*) biyolojik işlemede kullanılmıştır. Biyolojik işleme süreci fiziksel ve kimyasal yöntemlere kıyasla birçok avantaj sağlamaktadır. Biyolojik işlemede, mikroorganizmalar kolayca kullanılabilirler. Bu mikroorganizmalar, düşük enerji tüketimi ile mütemadiyen üretilabilmektedirler. Ayrıca, mikroorganizmalarda metabolik süreçlerin kullanılması nedeniyle iş parçası üzerinde hasar ya da ısıdan etkilenen herhangi bir bölge oluşmamaktadır. Bu yüzden mikroorganizmaları kullanılarak metallerin mikro ve nano işlenmesi biyolojik işlemenin geleneksel metal işleme yöntemlerine bir alternatif olmasına imkân sağlamaktadır. Ayrıca, mikroorganizmaların

¹ Bioleaching

² *Staphylococcus sp.*

metabolik aktivitelerini kontrol etmek kolay olduğu için metallerde arzu edilen bir yüzey üretmek de mümkün olmaktadır (Istiyanto *et al.* 2012; Díaz-Tena *et al.* 2016).

İşleme, bir malzemeye şekil verici en eski tekniklerdendir. İmalat mühendisliğindeki hızlı ilerleme nedeniyle, ince mekanik parçaların üretimi mikro işlem proseslerini gerektirmektedir (Yang *et al.* 2009). Ancak, çevre sorunları ve bu sorunların kontrolü ve çözümü imalat sürecinde en önemli problem olarak ortaya çıkmaktadır (Istiyanto *et al.* 2012). Kimyasal işleme konusunda, asit gibi tehlikeli maddeler kullanılır ki güvenlik sorunlarının yanı sıra çevre için toksisite³ endişeleri bulunmaktadır (Uno *et al.* 1996). Son zamanlarda, araştırmacılar bu sorunların üstesinden gelebilmek için bazı yeşil stratejiler ve teknikler önermişlerdir.

Bir iş parçasından metal çıkarmak için araç olarak bakterilerin kullanımı nispeten yeni bir üretim teknolojisi olup, mikro özellikler oluşturmada uygulama potansiyeline sahiptir (Uno *et al.* 1996; Uno 2002; Kurosaki *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2007; Hocheng *et al.* 2012a). Bu çalışmalar, nispeten yeni bir bilim olan biyohidrometalurji⁴ bilim dalına dayanmaktadır (Brierley ve Brierley 2001). Bu bilim dalında çeşitli mikroorganizmalar, metallerin kendi cevherlerinden geri kazanılması için kullanılmaktadır (Suzuki 2001; Cui and Zhang 2008). Burada kullanılan teknik geniş ticari uygulama alanları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır (Brandl and Faramarzi 2006). Bu metot aynı zamanda geleneksel hidro ve pirometalurjik⁵ süreçlerin aksine çevresel kaygılar oluşturmamaktadır (Hoque and Philip 2011).

Ayrıca, geleneksel yöntemler genellikle ciddi yatırım maliyeti gerektirmektedir. Gelişen yeni teknolojiler, ekonomik ve çevre dostu metotlarla bu tür problemlerin üstesinden gelmek zorundadır. Mikroorganizmaların kullanımı metallerin geri kazanılması için geleneksel teknolojilere göre, uygun bir alternatif olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmalar metallerin davranışlarını kimyasal ve/veya fiziksel özelliklerini modifiye ederek etkileyebilmektedir. Mikroorganizmalar, metal iyonlarına bağlanırlar

³ Toxicity

⁴ Biohydrometallurgy

⁵ Pyrometallurgical

veya onları hücre içine taşırlar. Biyosorpsiyon⁶ ve biyolojik birikim yöntemlerinde, metal iyonu biyokütleyle bağlanan bir karşı iyon ile değiştirmektedir. Biyoliç⁷ sürecinde mikroorganizmalar, katı matris içinde bulunan metalleri çözünebilir forma sokmaktadır. Asidofilik⁸ mikroorganizmaların çoğu biyoekstraksiyon⁹ süreci için kilit rol oynamaktadırlar. Mikrobiyolojik liçing nispeten ucuzdur. Ayrıca mikroorganizmalar kolaylıkla çeşitli şartlara uyum sağlayabilirler (Gadd 2000). Bu nedenle Günümüzde elektronik atıklar tabiat için kirleticidirler. Bu değerli (stratejik elementlerden zengin) ve canlılar için zehirli atıkların geri kazanımının, en ekonomik yollardan yapılabilmesi ile ilgili pek çok çalışmalar son yıllarda yapılmaktadır. Biyo-işleme prosesi ile yüksek geri kazanım verimiyle ve ekonomik olarak bu tehlikeli atıklar kolayca geri kazanılabilmektedir.

Kemolitotropik asidofiller¹⁰, yani, *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans* ve *Leptospirillum ferrooxidans*¹¹ ve *Sulfolobus*¹² gibi heterotroflar¹³, biyoekstraksiyon sürecinde kullanılmaktadır. *Penicillium* ve *Aspergillus niger* de metallerin biyoliç işlemlerinde uygulanmaktadır (Hoque and Philip 2011). Bu teknik ayrıca elektronik, elektrik hurda metal atıklarının geri kazanımı için uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalara göre, Al, Ni, Zn, Cu, Cd, Cr gibi metallerin geri kazanılması için *A. ferrooxidans* yanı sıra *A. ferrooxidans* ve *Aspergillus niger* gibi mantar türleri de kullanılmıştır (Zhang and Li 1999; Lilova et al. 2007).

2.3.1. Kullanılan mikroorganizmalar ve işlem prensipleri

Mikroorganizmalar enerji kaynaklarına göre sınıflandırılırken; enerjiyi nasıl aldıkları ve bu enerjiyi metabolik süreçlerin büyümesinde nasıl kullandıklarına bağlı olarak gruplandırılırlar. Bu organizmalar karbon ihtiyaçlarını, inorganik bileşiklerden (CO₂

⁶ Biosorption

⁷ Bioleaching

⁸ Acidophilic

⁹ Bioextraction

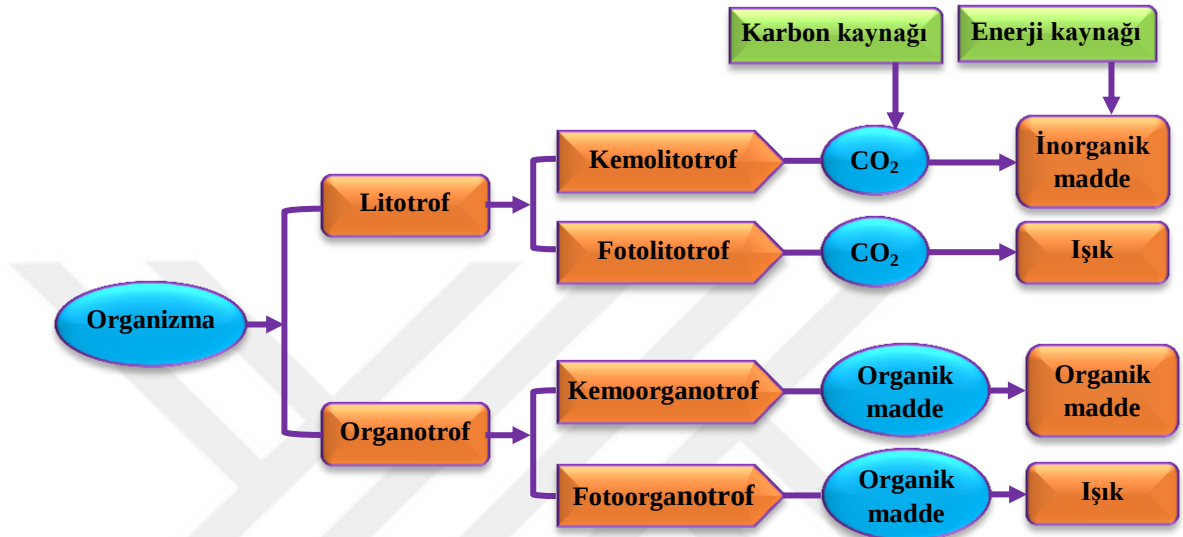
¹⁰ Chemolithotrophic acidophile

¹¹ Leptospirillum ferrooxidans

¹² Sulfolobus

¹³ Heterotroph

dâhil) alırlar ve litotrof¹⁴ olarak bilinirler. Bununla birlikte organotroflar¹⁵, tüm karbon ihtiyaçlarını organik bileşiklerden elde ederler. Bunlarla ilgili tasnif özeti Şekil 2.1’de verilmektedir (Viamajala *et al.* 2003).



Şekil 2.1. Enerji gereksinimlerine göre çeşitli organizmaların sınıflandırma özeti

Ayrıca *Geobacter metallireducens* ve *Rhodoferrax ferrireducens* gibi türler biyolojik temelli yakıt hücreleri için uygulama potansiyeli gösterirler (Bond *et al.* 2002; Chaudhuri and Lovley 2003). Yeraltı sularından toksik kimyasal maddelerin uzaklaştırılması işlemlerinde *Shewanella oneidensis* bakterisinin doğal redüksiyon reaksiyonları kullanılmaktadır (Viamajala *et al.* 2003).

2.3.2. Mikroorganizmalarla oksidasyon işlemi

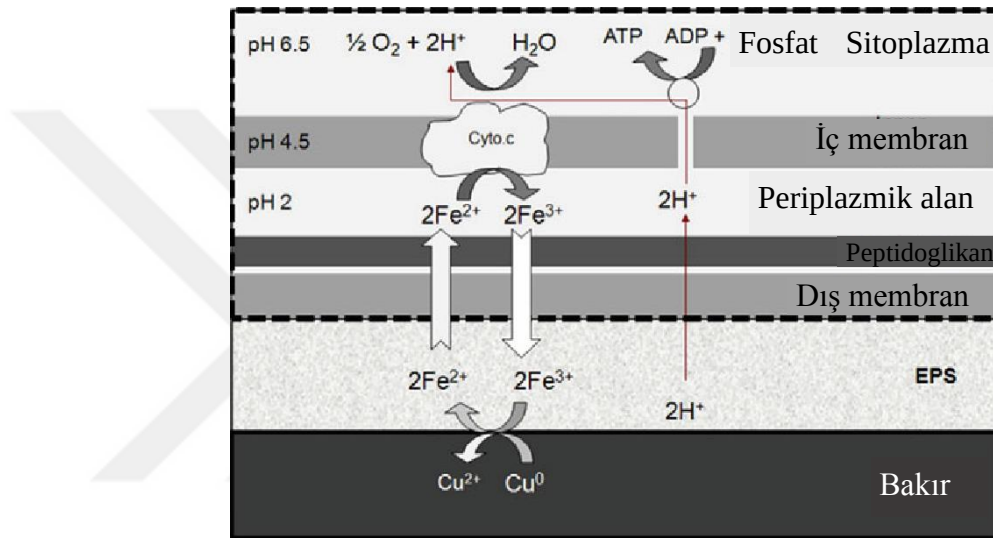
Oksidasyon proseslerinde, metal yüzey üzerine bakteri hücresinin bağlanması ile direk işleme gerçekleşmektedir (örneğin, bakır) (Şekil 2.2). *A. ferrooksidanlar* periplazmik alanda¹⁶ ve iç membranda demir oksitleyici enzim içerirler (Zhang and Li 1999; Istiyanto *et al.* 2011). Bakterinin besiyeri ortamı Fe^{2+} içermektedir ve bu mineral A.

¹⁴ Lithotrophs

¹⁵ Organotroph

¹⁶ Periplasmic space

ferrooxidans için ana enerji kaynağıdır. (Uno *et al.* 1996; Rohwerder *et al.* 2003). Bu Fe^{2+} radikali daha sonra kültür sıvısından periplazmik bölgeye taşınmaktadır. Burada demir oksidasyon katalizi ile bir elektron kaybetmektedir. Ortamdaki bu elektron daha sonra bir dizi biyokimyasal reaksiyon sonucunda bir elektron taşıma zinciri ile oksijene taşınmaktadır (Istiyanto *et al.* 2011). Genel elektron aktarımı ile ilgili reaksiyon serisi Şekil 2.2’de ve Eşitlik 2.1’de verilmektedir:



Şekil 2.2. Biyo-işleme mekanizması (Uno *et al.* 1996; Rohwerder *et al.* 2003; Istiyanto *et al.* 2011)



Mikroorganizmalar bu reaksiyon ile enerji üretmektedir. Ayrıca, bu reaksiyon sırasında Fe^{2+} , Fe^{3+} ’e dönüştürülerek hücreden dışarı atılmaktadır. Fe^{3+} güçlü bir oksidan¹⁷ olup, saf bakır Cu^{2+} okside edebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, bir metal iş parçası *A. ferrooxidans* tarafından üretilen Fe^{3+} ile işlenebilmektedir. İlgili reaksiyon ise Eşitlik 2.2’de verilmektedir:



¹⁷ Oxidant

İşleme sürecinde *A. ferrooxidans* tarafından üretilen Fe^{3+} , Fe^{2+} 'ye indirgenmektedir. Tekrar bu Fe^{2+} *A. ferrooxidans* hücrelerine girebilir ve oksijen ile tekrar Fe^{3+} 'e yükseltgenirler. Böylece bir redoks çevrimi oluşmaktadır (Uno *et al.* 1996; Zhang ve Li 1999; Rohwerder *et al.* 2003; Istiyanto *et al.* 2011). Son zamanlarda, metallerin biyoliç dolaylı mekanizması ve ayrıca metal ekstraksiyon işlemi sırasında işe yaradığı görülmektedir. Liang *et al.* (2010) göre, elektronik atıklarda bulunan baskılı devre kartlarındaki¹⁸ (PCB) bakırın sürekli dolaylı mekanizma uygulayarak liçi yapılmış ve bakırın geri kazanımı sağlamışlardır. Bu işlem sırasında Fe^{3+} ve Fe^{2+} arasında bir döngü gerçekleşmektedir. Benzer şekilde, Wang *et al.* (2009) metal çözünme prosesini iki sürekli periyoda ayırmışlardır. Birincisinde, basılan tel panolarında¹⁹ (PWBs) bulunan bakır gibi metallerin Fe^{3+} tarafından çözünmesi gerçekleşmektedir. Reaksiyonun ilk aşamasında, Fe^{3+} , Fe^{2+} 'ye indirgenmekte ve liç çözeltisi içinde Fe^{2+} konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır. İkincisinde ise, bakteri enerji kaynağı olarak Fe^{2+} kullanılmakta olup, bu işlem bakteri popülasyonunda hızlı bir artışa yol açmakta ve Fe^{2+} nin oksidasyonu ile Fe^{3+} 'ün yeniden oluşumunu gerçekleştirmektedir. Burada, bakterilerin rolleri sadece Fe^{2+} 'yi, Fe^{3+} 'e okside etmektir. Böylece, aynı işlemin biyoişleme prosesine uygulanabilir olduğu anlaşılmış ve bakır, nikel ve alüminyumun işleme süreci deneysel olarak *A. ferrooxidans* hücre ve kültür süpernatanı²⁰ kullanılarak araştırılmıştır.

2.3.3. Asidoliz prosesi

A. thiooxidans, metal işlemi için asidoliz²¹ işlemini kullanırlar büyümeleri sırasında sülfürik asit üretirler. Bu asit metalin çözünmesi için kullanılır (Hocheng *et al.* 2012b). M bir metal olmak üzere genel reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir:



¹⁸ Printed circuit boards

¹⁹ Printed wire boards

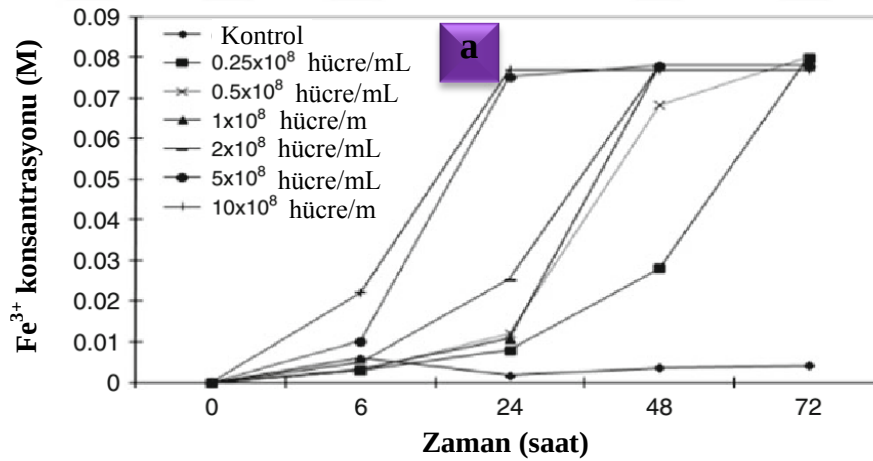
²⁰ Supernatant

²¹ Acidolysis



2.3.4. Malzeme kaldırma hızı²² (MRR)

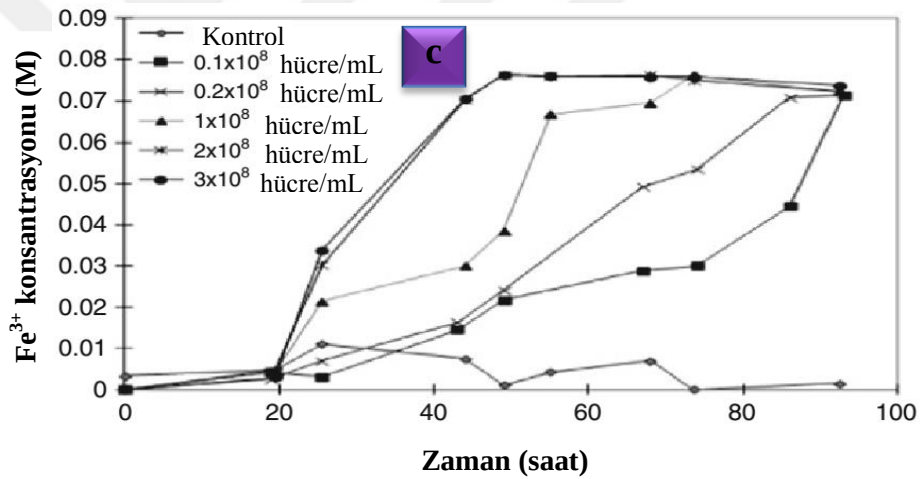
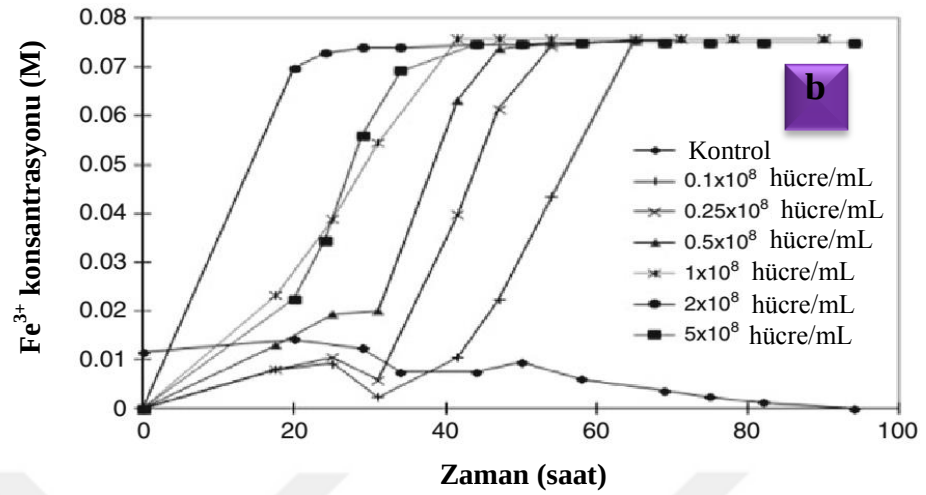
Herhangi bir endüstriyel işleme sürecini karakterize etmek için, anahtar kriter talaş kaldırma hızıdır. Uno *et al.* (1996) tarafından yapılan çalışmada işleme prosesi sırasında çıkarılan metal miktarını tespit edilmiş ve aynı zamanda metal giderimi üzerinde başlangıç koşullarının etkilerini de incelenmiştir. Elde ettikleri sonuçlardan, kaldırma derinliğinin işleme zamanı ile yaklaşık olarak orantılı olduğu görülmüş ve sıcaklığın biyo-işlemenin etkinliği üzerinde nispeten önemli parametre olduğu da ispatlanmıştır. Ayrıca, ortamın korozif²³ etkisine rağmen, bakterilerin metal kaldırma işleminden sorumlu oldukları (Şekil 2.3) ve çeşitli sıcaklıklarda bir bakteri soyunu (*ATCC 13598*) inkübe ettikleri ve bunun sonucunda ortalama metal kaldırma hızını gözlemlemişlerdir (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. (devam)

²² Material Removal Rate (MRR)

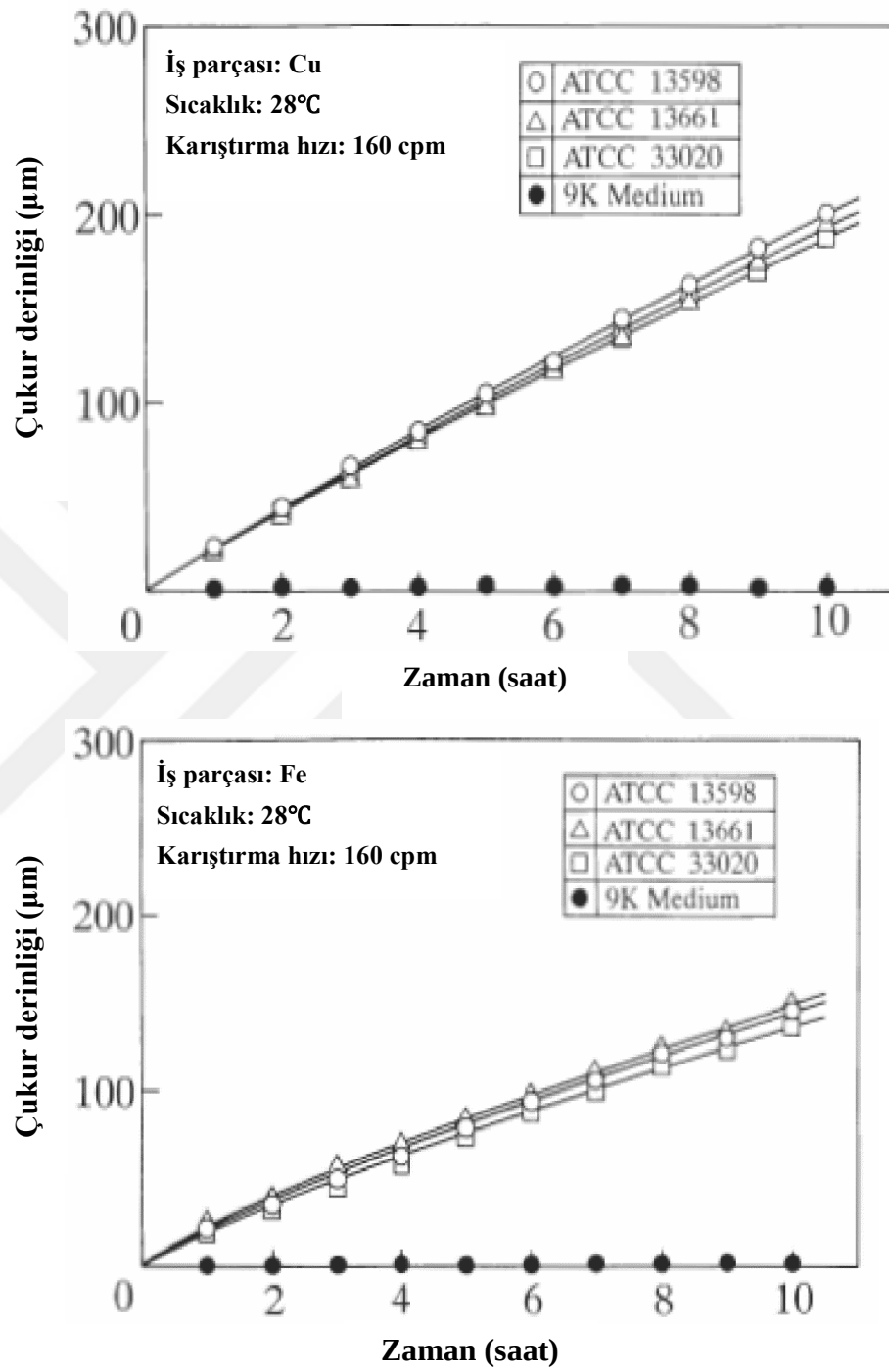
²³ Corrosive



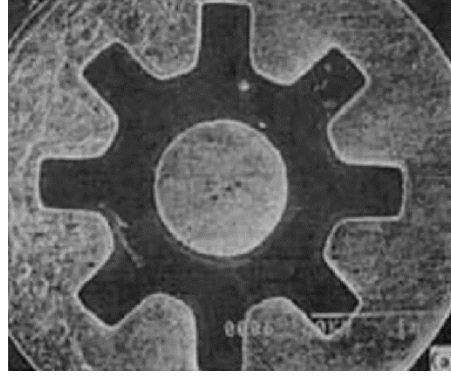
Şekil 2.3. Farklı hücre konsantrasyonlarında (a) bakır, (b) nikel ve (c) alüminyum kaldırma esnasında ferrik iyon konsantrasyonunun değişimi (Hocheng *et al.* 2012 c)

Zhang and Li (1998) saf demir, saf bakır ve konstantanın²⁴ işlenmesini *A. ferrooxidans* ile mümkün olduğunu göstermişler ve saf bakır iş parçası üzerinde biyo-işleme ile mikroçark ve oluklar oluşturmuşlardır (Şekil 2.5). Ayrıca biyo-işlenmiş çukurların derinliğini işleme zamanıyla doğrudan bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir. İlave olarak Fe^{2+} içeren oksitlenme ve indirgenme reaksiyonlarını ortaya koymuşlardır.

²⁴ Constantan



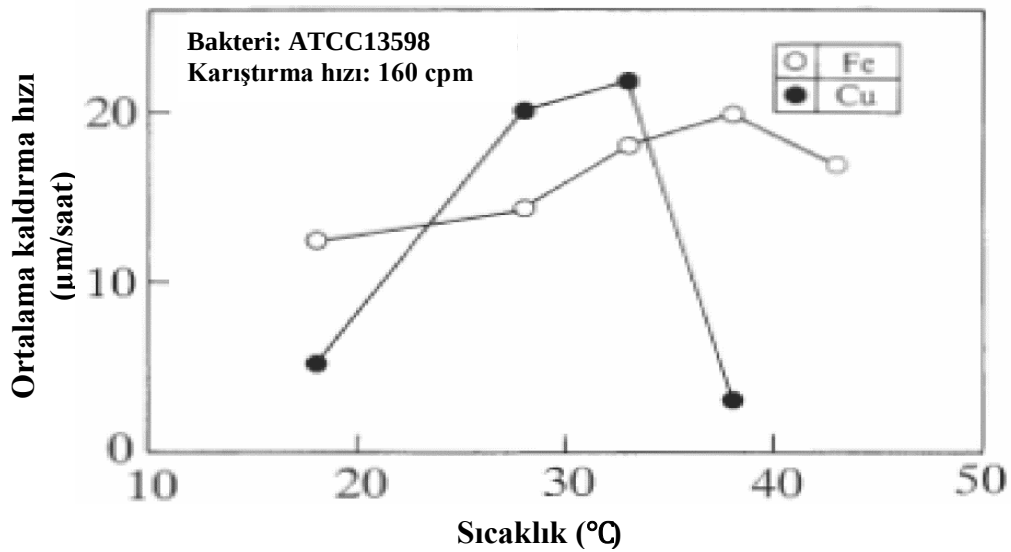
Şekil 2.4. Saf demir ve bakır için işleme zamanına tabi, oluk derinliği değişimleri



Şekil 2.5. Cu iş parçası üzerinde mikroçarkın SEM fotoğrafı (Zhang and Li 1998)

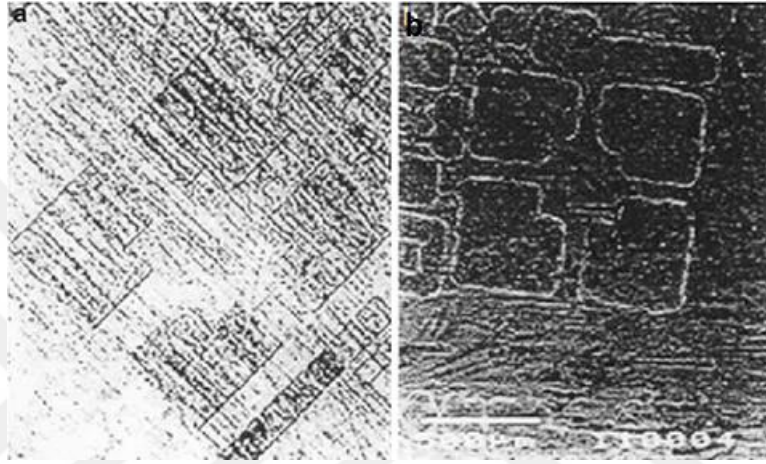
Ting *et al.* (2000), yumuşak çelik ve bakırın biyo-işlemesi için *A. ferrooxidans* (ATCC 13598 ve ATCC 33020) bakteri suşlarını kullanmışlardır. Sonuçlara göre ATCC 13598 ve ATCC 33020 suşları arasında, bakır ve yumuşak çelik malzemelerinde ortalama metal kaldırma oranları arasında herhangi bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, kütle gideriminin zaman ve çalkalama hızı artışı ile orantılı olduğunu göstermişlerdir.

Uno *et al.* (1996)'da Ting *et al.* (2000)'ne benzer şekilde sıcaklıkta bir artışın, ortalama metal kaldırma oranlarında bir artışa yol açtığını gözlemlemişler ve biyo-işleme için en uygun sıcaklık aralığının 30°C ila 35°C arasında olduğunu görmüşlerdir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ortalama metal kaldırma oranına işleme sıcaklığının etkileri

Ting *et al.* (2000) ayrıca maskelemek için organik fotodirençli²⁵ malzemeler kullanarak mikroyapılar imal etmişlerdir. Yapılan deneylerde, metallerin maskesiz bölgelerinde biyo-işleme prosesini başarıyla uygulamışlardır. Nihai işlenmiş profilin, orijinal metal üzerine kaplanmış resme benzediğini ortaya koymuşlardır. Elde edilen ürünün görüntüsü Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Organik fotodirençli kaplama ile metal iş parçası (a) biyo-işleme öncesinde ve (b) biyo-işleme sonrası (Ting *et al.* 2000)

2.3.5. Yüzey bütünlüğü

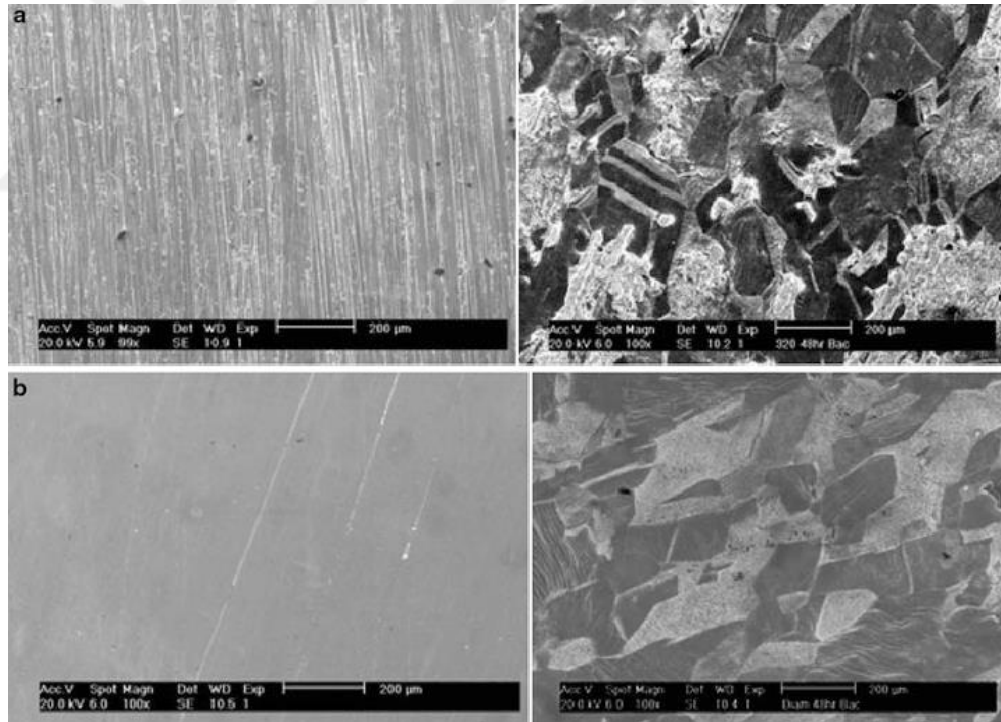
Biyo-işleme yöntemi iyi bilinen bir yöntem olduğu için, bazı araştırmacılar bu yöntemi kullanarak malzeme işlemişlerdir (Zhang and Li 1999; Ting *et al.* 2000; Yang *et al.* 2009; Hocheng *et al.* 2012a). Üretim işlemi sırasında, üretilen yüzeyin kalitesi çok önemli bir parametredir. Her üretim sürecinde, bu parametre ile ilgili bazı sınırlamalar vardır (Istiyanto *et al.* 2011). Son zamanlarda, birçok çalışma bu parametreler dikkate alınarak yapılmıştır.

Johnson *et al.* (2007), iş parçasını bakterilere maruz bıraktıktan sonra, genel pürüzlülükte bir artış olduğunu görmüşler ve ilk yüzey pürüzlülüğünün Ra (metal

²⁵ Photoresist

uzaklaştırma hızı²⁶) değişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, 24 ve 48 saat boyunca biyo-işlemenin yüzey pürüzlülüğü üzerindeki etkisini incelemişler ve 24 saat sonunda elde edilen Ra değişimi 1.8 - 2.6 μm iken, 48 saat içinde ise 1.7 - 2.4 μm olduğunu belirtmişleridir. Bunun sonucunda, polikristal Cu üzerinde bakteriyel işlemenin üniform olmadığını tespit etmişlerdir.

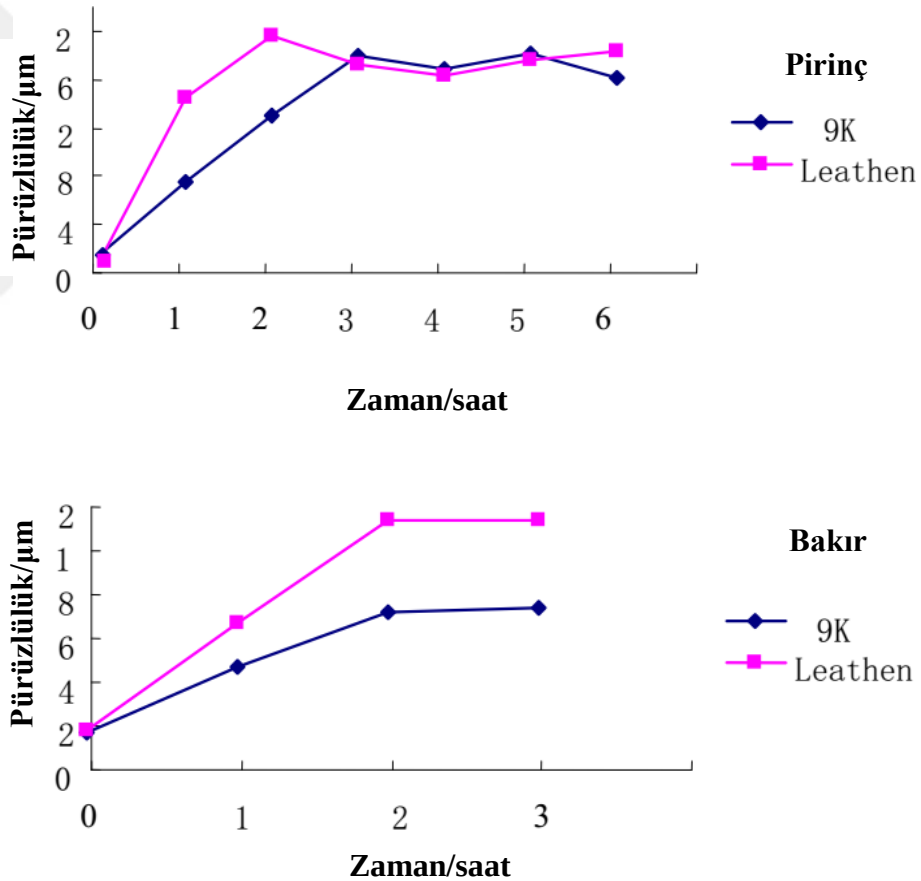
Elde edilen sonuçlara göre, yüzeyler, yüzeyden düzensiz malzeme kaldırma nedeniyle sert olmaktadır (Şekil 2.8). Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden elde edilen sonuçlar, bakteriyel işlemenin anizotropik olduğunu belirtmekte ve polikristal Cu örneklerinin pürüzlülüğü ölçümleri Ra değerlerinin 1.5 - 2.5 mikron aralığında bozulduğunu göstermişlerdir.



Şekil 2.8. Cilalanmış Cu numune yüzeylerinin işlem öncesi ve 48 saatlik bakteriyel işlem sonrası SEM mikrografları;
(a) 320 SiC kum ile parlatılmış (b) 600 nm elmas partikül ile parlatılmış (Johnson *et al.* 2007)

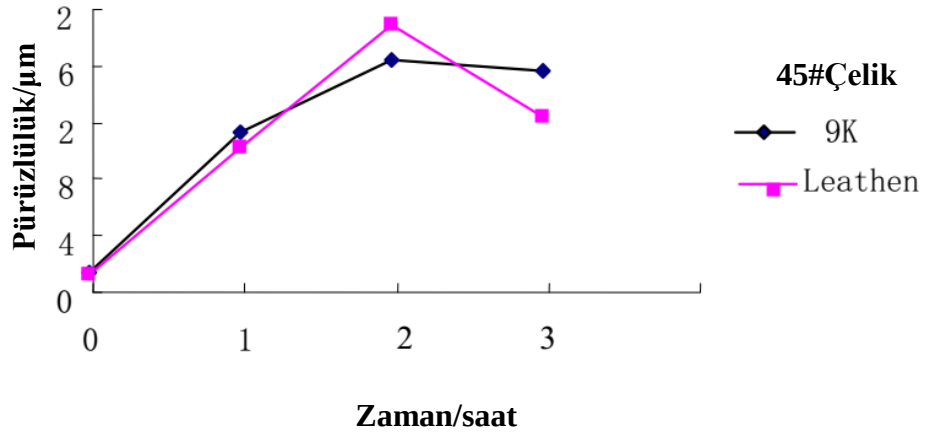
²⁶ Metal removal rate

Yang *et al.* (2009) yüzey pürüzlülüğünü etkileyen parametreleri incelediği çalışmasında, 9K ve Leathen kullanarak, iki farklı besi yer ortamında bakterilerin pirinç, bakır ve 45# çelik²⁷ üzerinde biyo-işleme sürecinin etkisini incelemişlerdir. Kültür ortamlarının içeriği Çizelge 2.1’de verilmektedir. Elde edilen bulgulara göre yüzey pürüzlülüğünün zamanla hızlı bir şekilde 0.2 mikrondan 2.0 mikron civarlarına kadar artarak nihai haline ulaştığını görmüşlerdir. İlk iki saat içerisinde pürüzlülüğün zamanla doğrusal artış gösterdiği belirlenmiştir. Grafiklere göre yüzey kalitesi süreç esnasında hızla bozulmuş, iki saatin sonunda üç çeşit malzemenin yüzey pürüzlülüğü en kötü hale geldiği ve daha sonra kararlı haline ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. (devam)

²⁷ Haddelenmiş orta karbonlu bir çeliktir.



Şekil 2.9. Metal yüzey pürüzlülüğüne farklı kültür ortamının etkisi (Yang *et al.* 2009)

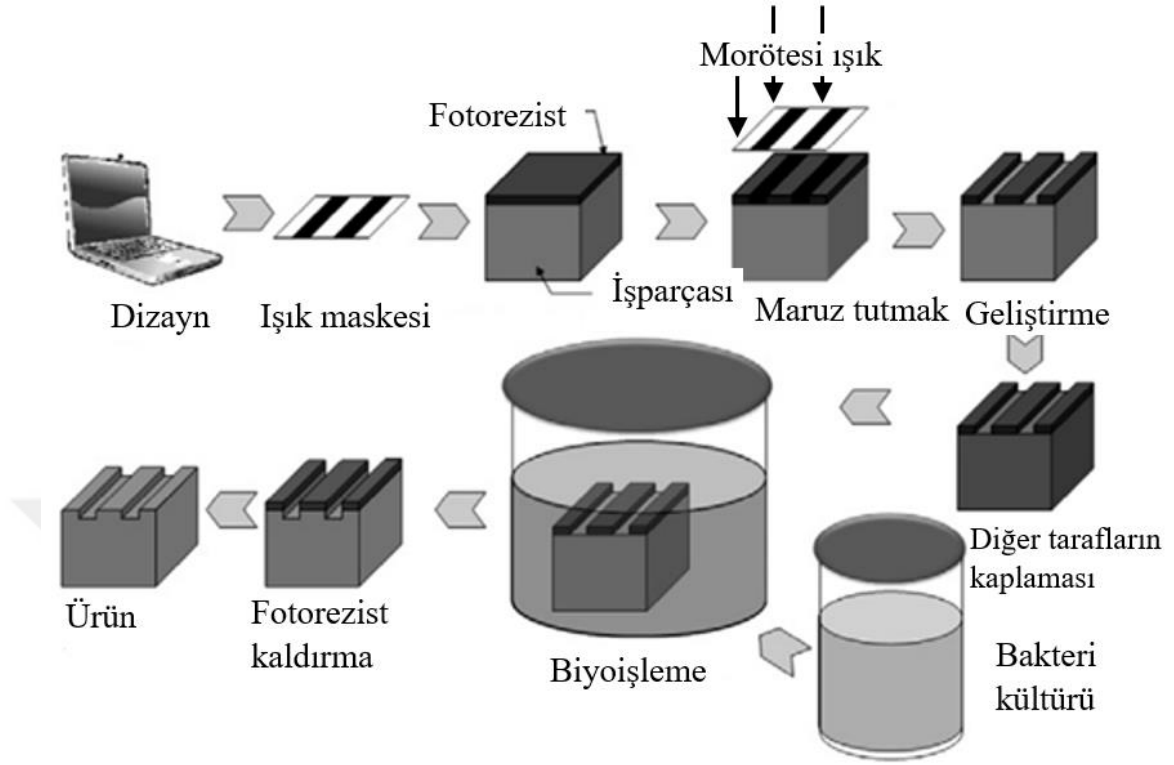
Çizelge 2.1. 9K ve Leathen kültür ortamlarının bileşenleri

Ortam	(NH ₄)SO ₄	K ₂ HPO ₄	KCl	MgSO ₄ .7H ₂ O	Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	Fe ²⁺	pH
Leathen	0.15	0.05	0.05	0.50	0.01	5	2.0
9K	3	0.05	0.10	0.50	0.01	5	2.0

Istiyanto *et al.* (2011) tarafından yapılan “Biyo-işlenmiş bakırın özelliklerinin profili” isimli çalışmada ise; *A. ferrooxidans* bakterisini kullanarak bakır iş parçası üzerinde biyo-işleme esnasında farklı parametrelerin etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada uygulanan deneysel prosedür Şekil 2.10’da gösterildiği gibi bakteri kültürü ve biyo-işleme prosesi olmak üzere iki ana süreçten oluşmaktadır. Nihai ürünün yüzeyinde istenilen desen, CAD²⁸ yazılımı kullanılarak dizayn edilmiş ve fotomaske²⁹ üzerine aktarıldıktan sonra UV ışınına maruz tutarak iş parçası üzerine tabedilmiştir.

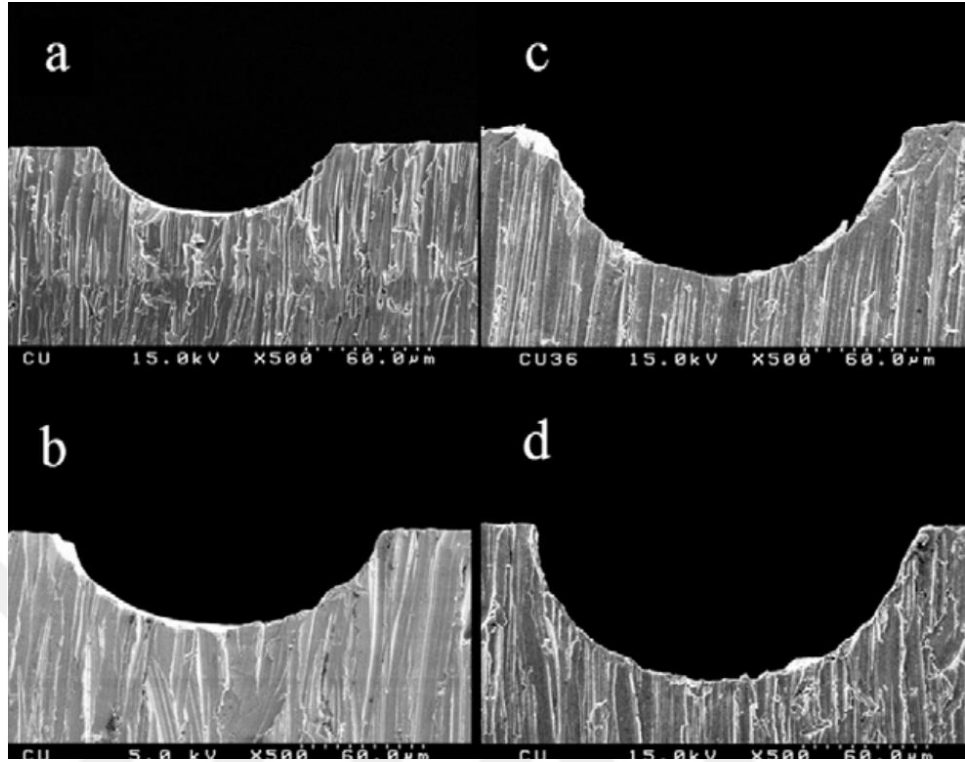
²⁸ Computer-aided design

²⁹ Photomask

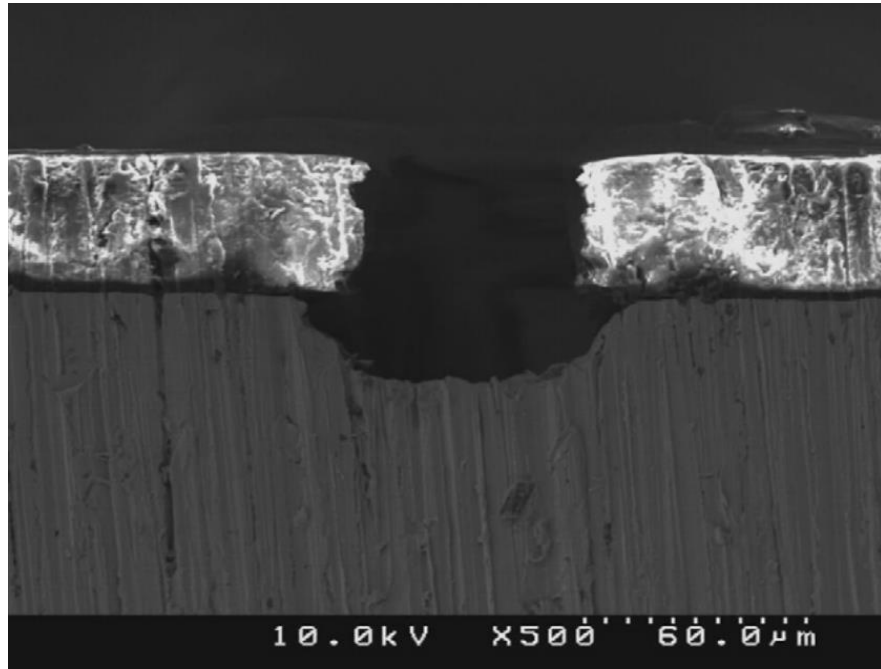


Şekil 2.10. Biyo-işleme prosedürü

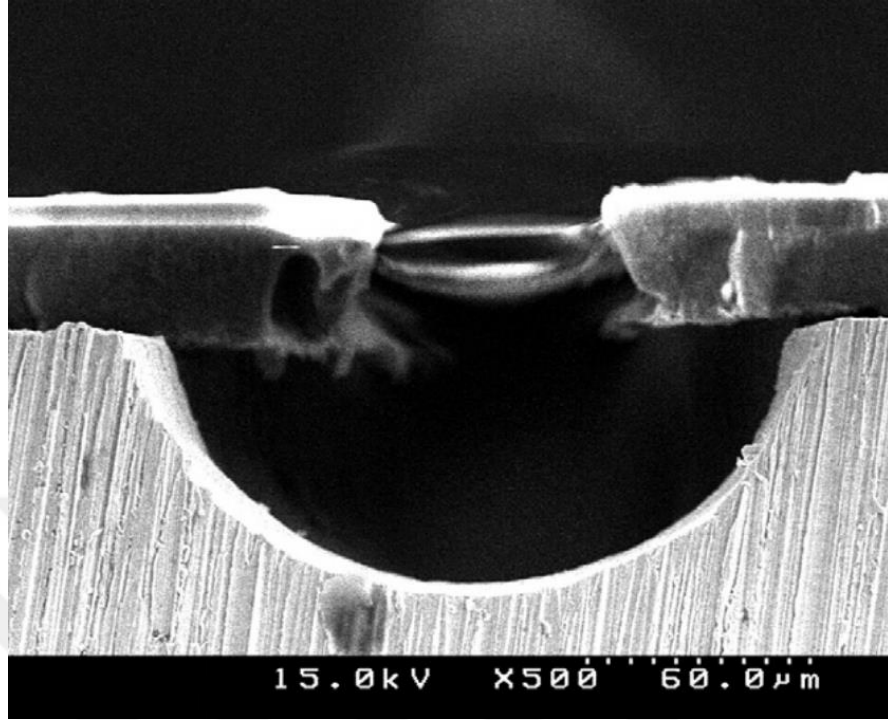
Çalışmanın sonunda Istiyanto *et al.* (2011) TEM ve temassız 3D mikro yüzey profilometre kullanarak, nihai işlenmiş kısmı daha ileri düzeyde incelemişler ve bakır profili biçiminin “U” şeklinde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca oluk profilinin genişliğinin yanı sıra derinliğinin de zamanla arttığını bulmuşlardır (Şekil 2.14 ve 2.15). 4–12 saat boyunca genişlik ve derinlikteki artışın nispeten doğrusal olduğu görülmüştür. Böylece, oluğun istenen genişlik ve derinliği uygun bir işleme süresi seçilerek elde edilebilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların SEM görüntüsü Şekil 2.11’de verilmiştir.



Şekil 2.11. Dört bakır numunesi için biyo-işleme sonrası SEM mikrografları
(a) 12 saat, (b) 24 saat, (c) 36 saat ve (d) 48 saat

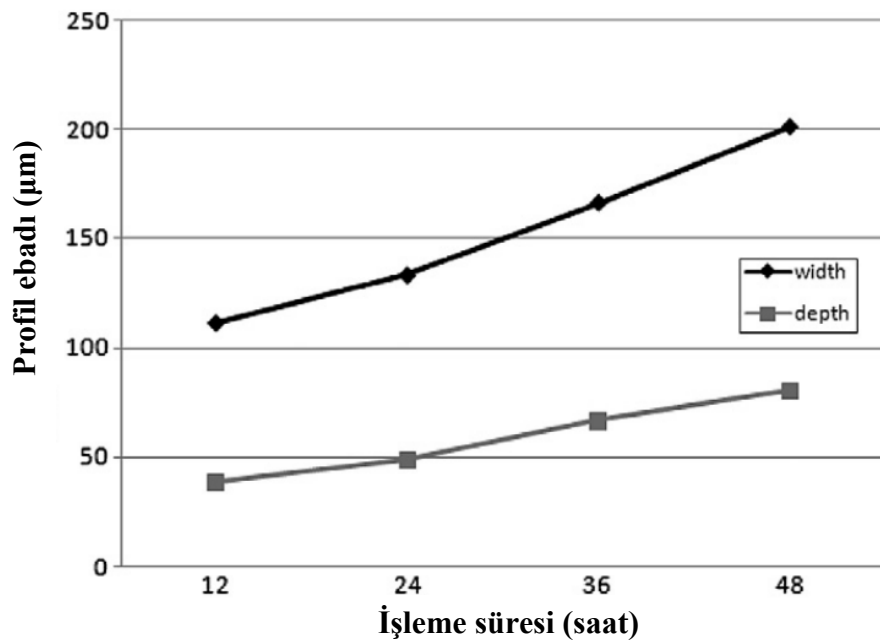


Şekil 2.12. Fotorezist çıkarılmadan önce kimyasal dağlama ile imal edilen bakır Profili
(Istiyanto *et al.* 2011)

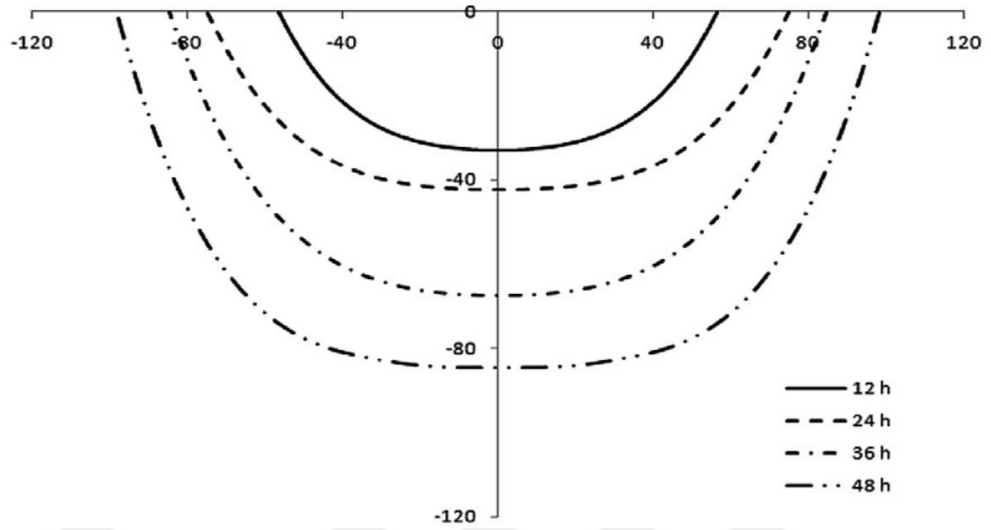


Şekil 2.13. Fotorezist çıkarılmadan önce biyo-işleme ile imal edilen bakır Profili (Istiyanto *et al.* 2011)

Şekil 2.12 ile 2.13'ü karşılaştırdığımızda biyolojik işlemenin kadar düzenli ve malzeme üzerine hasarsız olduğu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 2.14. Oluğun görünüş boyutu üzerine işleme süresinin etkisi (Istiyanto *et al.* 2011)



Şekil 2.15. Biyolojik işleme sırasında profil boyutu ilerlemesi

Bazı araştırmacılar *A. ferrooksidanları* metallerin biyo işleme için kullanılırken, Chang *et al.* (2008) gibi diğer araştırmacılar *A. tiyooksidanları* biyoişleme uygulamalarında kullanmışlardır. *At. tiyooksidanlar* son derece asidofilik bakteri olup, 1 veya daha düşük pH değerinde, asidik ortamda oldukça dayanıklı olduğundan *A. ferrooksidanlardan* farklıdır (Chen and Lin 2004). Metabolit, esas olarak sülfürik asit, biyoelektrode önemli bir rol oynamaktadır (Wong and Henry 1998).

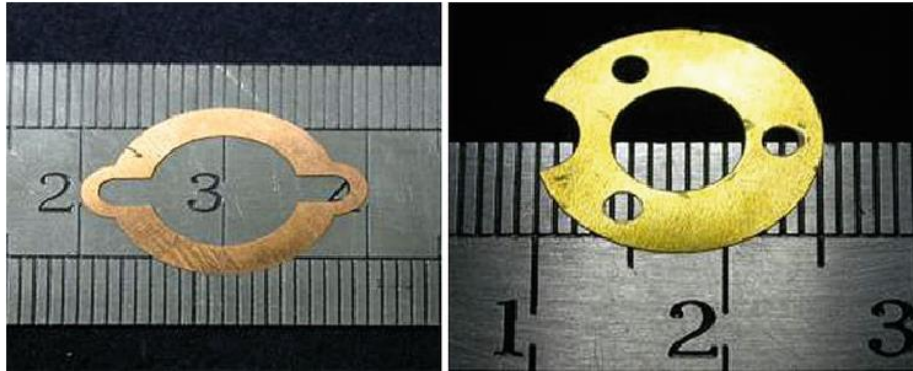
Chang *et al.* (2008), bakır, nikel ve alüminyumun biyo-işlemesini *A. tiyooksidan* kullanılarak yapılabildiğini göstermişlerdir. Elde edilen bulgulara göre alüminyum bu ortamda kötü çözünürken, nikel daha kolay çözünmüştür. Ayrıca hücre konsantrasyonunun işleme hızını arttırdığını da belirlemişlerdir.

İş parçası olarak 0.2 mm bakır ile alüminyum levhaları ve 2.0 mm kalınlığında nikel levhaları kullanılmıştır. Üzerlerinde desen oluşturulan iş parçalarında metal giderimi için belli bir süre *A. tiyooksidan*'lara maruz bırakılmışlardır. Biyolojik işleme sonunda elde edilen nihai ürün Şekil 2.16'da gösterilmiştir. İşleme derinliği 24 saat ve 48 saat biyolojik işleme sonrasında ölçülmüş olup, yaklaşık günde 15 mikron olarak ölçülmüştür.



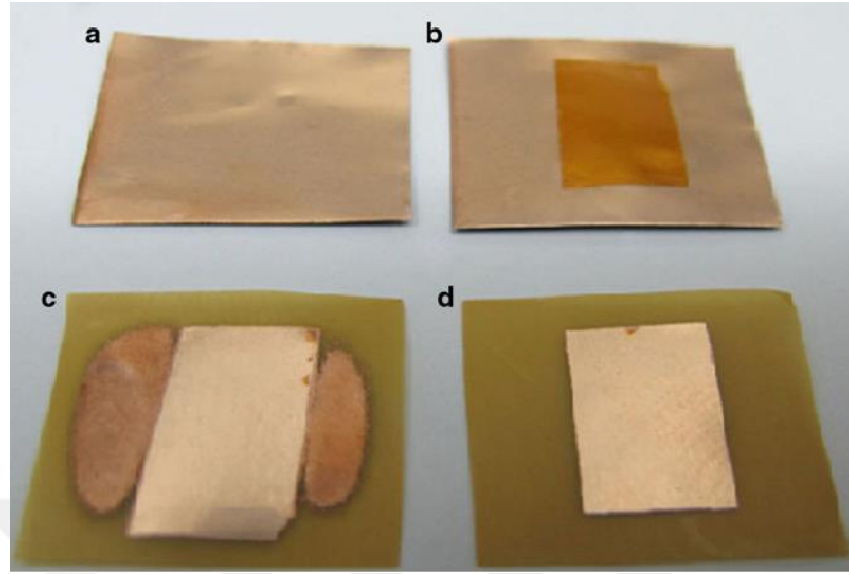
Şekil 2.16. Saf bakır iş parçası üzerinde biyo-işlenmiş olukların SEM görüntüsü (80 mikron derinlik ve 45 mikron genişlik) (Chang *et al.* 2008)

Mikroboyuttaki cisimlerin fabrikasyonunda, biyo-işleme süreçlerinin uygulanabilirliği bazı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Yang *et al.* (2009), 0.1 mm kalınlığında ve sadece 2 mm çapında Şekil 2.17-a'daki levhayı ve 0.07 mm kalınlığında ve 15 - 16 mm çapında Şekil 2.17-b'daki levhayı üretmişlerdir



Şekil 2.17. Biyo-işleme yöntemi ile imal edilen levhalar (Yang *et al.* 2009)

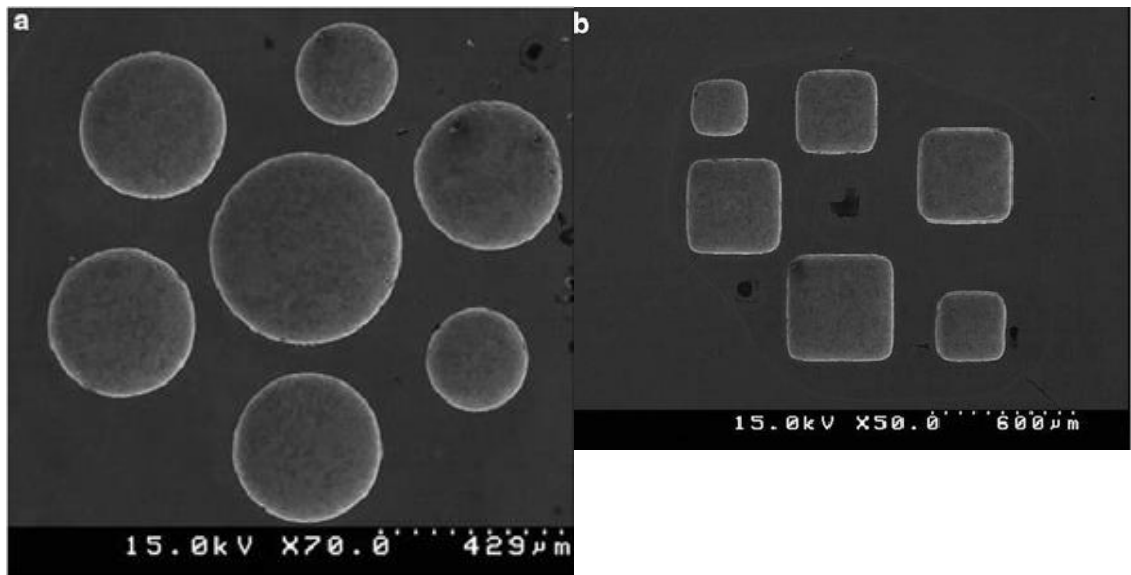
Hocheng *et al.* (2012a) desenli bakır film oluşumu için dolaylı mekanizma uygulamışlardır (Şekil 2.18).



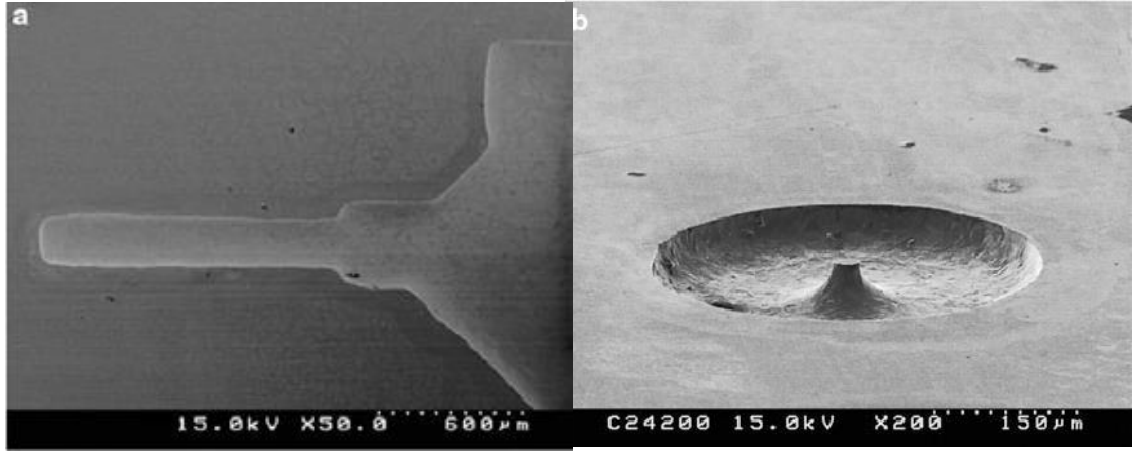
Şekil 2.18. Kültür süpernatant ile dikdörtgen desen yazımı

(a) maskesiz iş parçası kontrolü, (b) vakum bant maskesi ile iş parçası kontrolü, (c) 2 saat muameleden sonra iş parçası ve (d) 4 saat muameleden sonra iş parçası (Hocheng *et al.* 2012a)

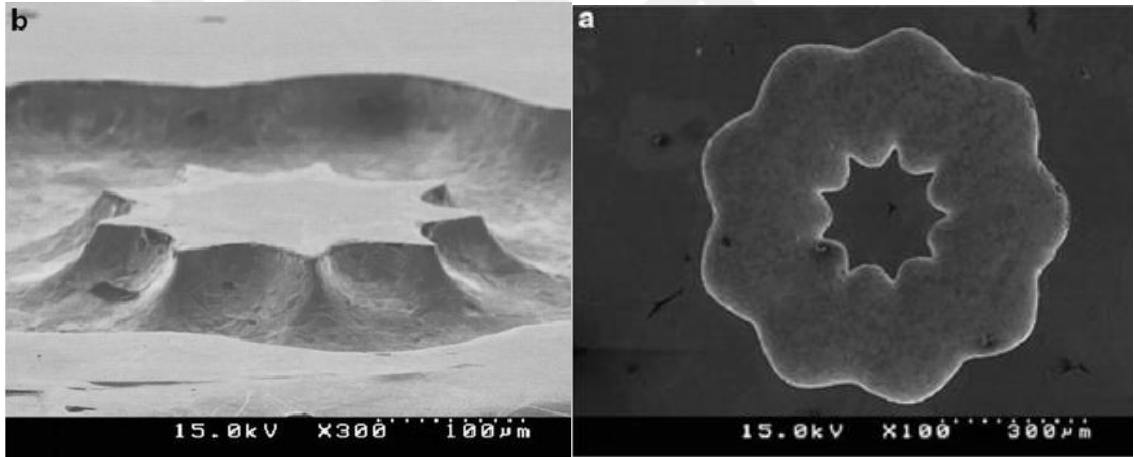
Istianto *et al.* (2012) saf bakır üzerinde mikrobeyuttaki desenlerin teşkilinde biyoprosesleme süreçlerinin uygulanabilirliğini araştırmışlar ve daire, dikdörtgen desenler ve ayrıca kombine desenler üretmişlerdir (Şekil 19-21).



Şekil 2.19. Desenlerin SEM mikrografları (a) daire (b) dikdörtgen (Istiyanto *et al.* 2012)



Şekil 2.20. 24 saat biyo-işleme süreci sonrası elde edilen desenlerin SEM mikrografları (a) Çok desenli (b) dairesel ada desenli (Istiyanto *et al.* 2012)

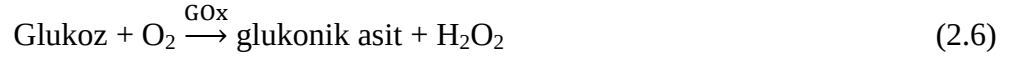


Şekil 2.21. Biyo-işleme süreci ile üretilen dişli -biçimli desen (a) Üst görünüm (b) 3D görünümü (Istiyanto *et al.* 2012)

Eskandarian *et al.* (2013)'de ilk olarak glukoz oksidaz (GOx) enzimini kullanarak bakır iş parçası üzerinde enzimatik biyo-işleme yöntemini uygulamışlar bazı önemli sonuçlar elde etmişlerdir. Bu yöntemde işlemeyi yürüten mekanizma Fenton reaksiyonuna dayalıdır. Ferro demirin (Fe II) ferrik demire (Fe III) işleme ortamındaki hidrojen peroksitle dönüşümü reaksiyonun temelidir.



Hidrojen peroksit ise, glukozun enzimatik oksidasyonu ile yerinde³⁰ olarak elde edilmektedir. Katalizör olarak, GOx enziminden faydalanılmaktadır.



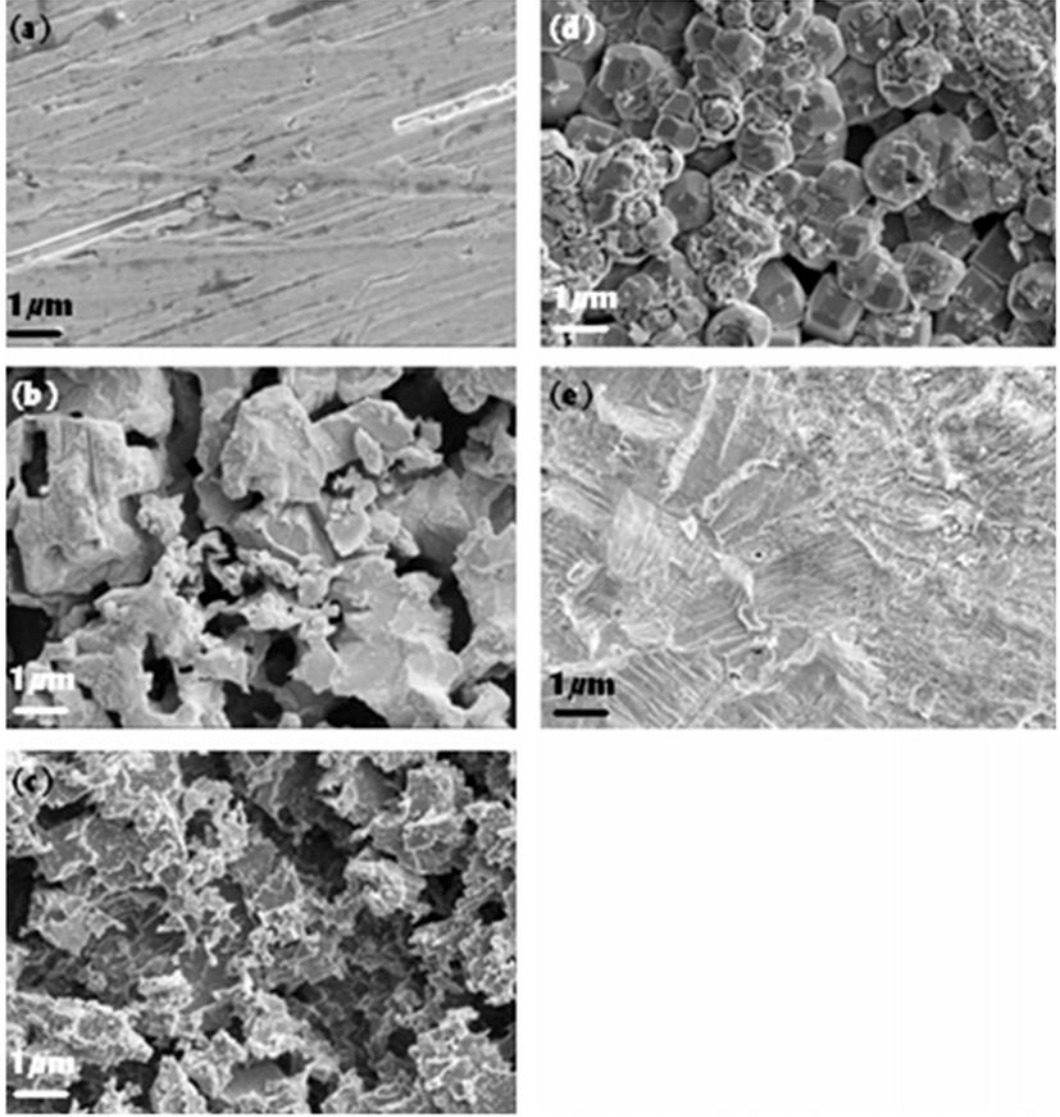
Ve sonunda ortamdaki toplam reaksiyon şöyle tanımlanmaktadır:



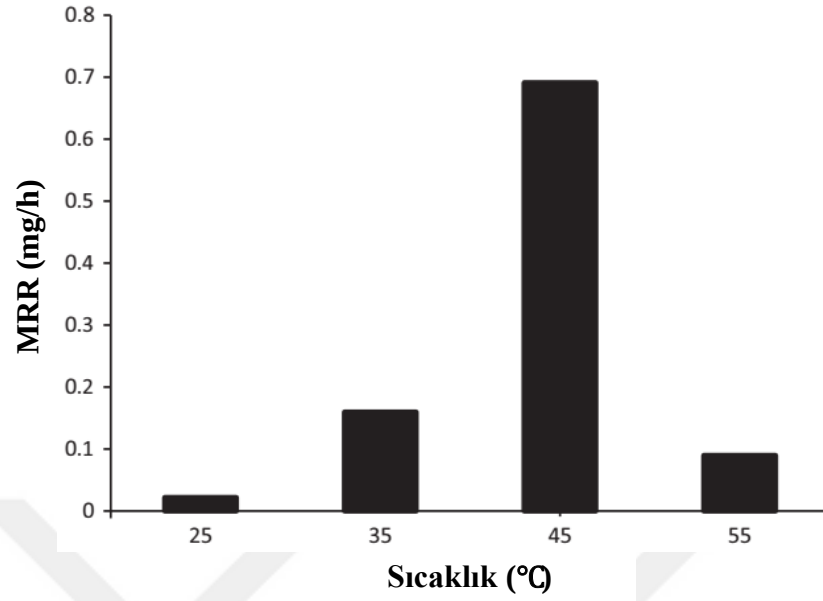
Bu reaksiyonda M, bakır, çinko, alüminyum ve benzeri metaller olabilir.

Bu proses, pH, sıcaklık ve çalkalama faktörlerinden etkilenir. Çalışmada elde edilen sonuçlar ve yüzey morfolojisi Şekil 2.22, 2.23 ve 2.24'de verilmiştir. Şekil 2.22 iş parçasının dört farklı ortamdaki SEM görüntülerini göstermektedir. Bu görüntülere göre, enzimatik işleme yapılmış numunenin yüzeyi, kontrol numuneyle hemen hemen aynıdır. Çalkalama hızı ve sıcaklığın MRR üzerindeki etkileri Şekil 2.23 ve 2.24'te verilmiştir (Eskandarian *et al.* 2013).

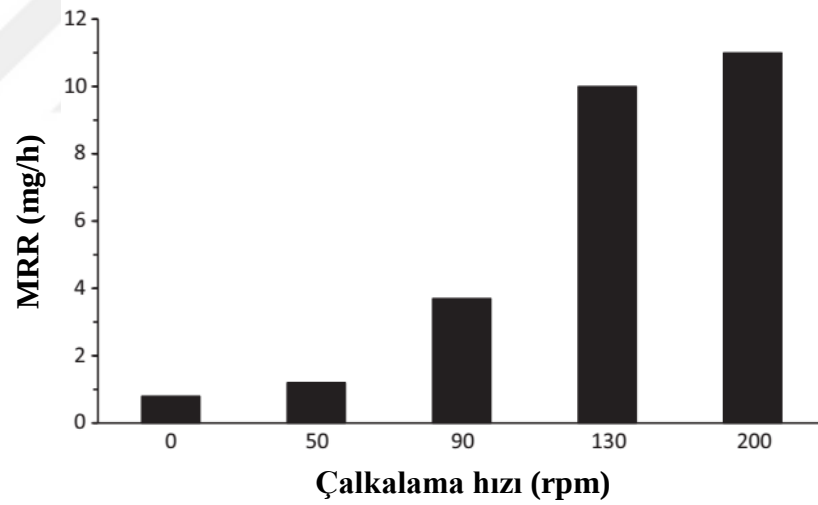
³⁰ Insitu



Şekil 2.22. SEM analizleri: (a) kontrol, (b) H_2SO_4 1N, (c) HCl 1N, (d) *A. ferrooxidans* bakteri ve (e) enzimatik çözelti



Şekil 2.23. MRR üzerindeki sıcaklığın etkisi



Şekil 2.24. MRR üzerinde karıştırma hızının etkisi

2.4. Enzim

Enzimler, biyokatalizörlerdir, yani kimyasal tepkimelerin hızını arttıırırlar. Hemen hemen tüm enzimler protein yapılıdır ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenebilen biyolojik katalizörlerdir. RNA yapısında da katalizör etkisine sahip olan

enzimler bulunmaktadır. Enzim tepkimelerinde, enzimle etkileşerek reaksiyona giren moleküllere substrat denir ve enzimler bunları farklı moleküllere ve ürünlere dönüştürürler (Bugg 2012).

2.4.1. Enzimlerin genel sınıflandırması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği, EC numaraları denen, enzimler için bir adlandırma sistemi geliştirmiştir. Her enzim başında da "EC" olan ve dört sayıdan oluşan bir dizi ile betimlenir. İlk sayı enzimlerin mekanizmalarına göre enzim gurubunu belirtmektedir (Lehninger *et al.* 2004; Champe *et al.* 2008). Bunlar;

- EC 1 Oksidoredüktazlar: yükseltgenme/indirgenme (redoks) tepkimelerini kataliz ederler.
- EC 2 Transferazlar: Fonksiyonel grupların (örn. bir metil veya fosfat grubunun) transferini katalizler.
- EC 3 Hidrolazlar: çeşitli bağların hidrolizini katalizler.
- EC 4 Liyazlar: Hidroliz ve yükseltgenme harici yollar ile çeşitli bağları keser.
- EC 5 İzomerazlar: Tekil bir molekülde izomerizasyon değişikliklerini katalizler
- EC 6 Ligazlar (Sentetazlar): İki molekülü kovalent bağlarla birleştirir.

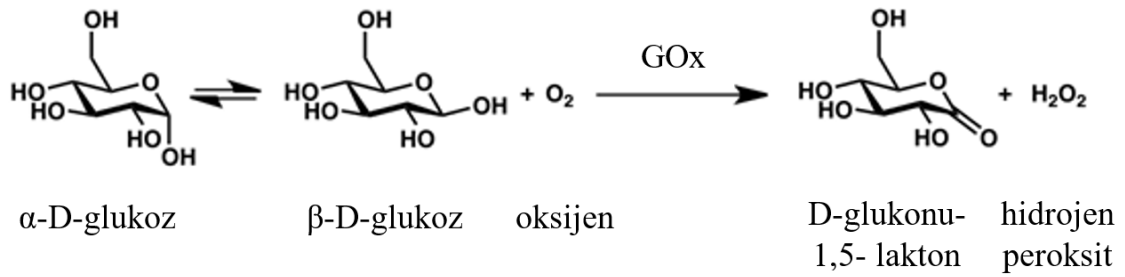
2.4.2. Enzimlerin özellikleri

- Biyolojik reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
 - Enzim daima bir çeşit reaksiyonu gerçekleştirir.
 - Enzimler aynı tür reaksiyonu bozulmadan tekrar tekrar yapabilirler.
 - Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye ulaşmasını sağlar.
 - Enzimler cansız ortamda da görev yaparlar.
 - Enzimler reaksiyonlarını daima etki ettiği maddenin dış yüzeyinden başlatırlar.
- Örneğin, sindirim esnasında eğer besinler ağızda ve midede fiziksel olarak

parçalanmasaydı sindirim çok az gerçekleşirdi. Enzimler dış yüzeyden reaksiyonu başlatarak sindirime de yardımcı olurlar.

2.4.3. Glukoz oksidaz enzimi

Glukoz oksidaz enzimi (GOx) (EC 1.1.3.4), β -D-glükozun hidrojen peroksit ve D-glukonik asit'e oksidasyonunu katalize eden bir oksidoredüktaz enzimdir (Şekil 2.25). Bu enzim, bazı mantar ve böcek türleri tarafından üretilir, oksijen ve glukoz mevcut olduğunda antibakteriyel aktivite göstermektedir (Wang *et al.* 2008)

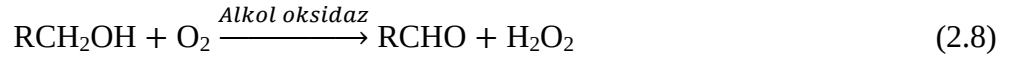


Şekil 2.25. Glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyon

Glukoz oksidaz, vücut sıvıları (teşhis), bitkisel hammadde ve gıda endüstrisinde serbest glukoz tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyoteknolojide, genellikle nanoteknolojide nanobiyosensörler dâhil olmak üzere biyokimya için enzim analizlerinde birçok uygulaması bulunmaktadır. Genellikle *Aspergillus niger*'den elde edilmektedir (Bergmeyer 1983; Raba and Mottola 1995; Ghoshdastider *et al.* 2015).

2.4.4. Alkol oksidaz enzimi

Alkol oksidaz enzimi (AOX), kısa zincirli, birincil, alifatik alkollerin oksidasyonunu ilgili aldehitlere katalize etmektedir. Reaksiyon esnasında ortaya çıkan diğer ürün hidrojen peroksittir. Gerçekleşen reaksiyon denklem 2.8'de verilmektedir:



Bu reaksiyondan elde edilen hidrojen peroksit biyo-nanoişleme proseslerinde işleme aracı olarak Fenton reaksiyonunda kullanılabilir.

Alkol oksidaz, metanolün metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır ve formaldehit oluşumunu sağlamaktadır ve metanolü tek bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan *Candida*, *Pichia* ve *Hansenula* gibi birkaç maya grubunda tespit edilmiştir.

Alkol oksidazın farklı substratlarla relatif reaksiyon hızı Çizelge 2.2’de verilmektedir. Çizelgeye baktığımızda en fazla reaksiyon hızının metanol ile gerçekleştiğini tespit edebiliriz.

Çizelge 2.2. Alkol oksidazın farklı substratlarla relatif reaksiyon hızı değerleri (couderc ve Baratti 1980; Sahm *et al.* 1982)

Sıra	Substrat	Relatif reaksiyon hızı
1	Metanol	1.00
2	Propargil alkol	0.90
3	Etanol	0.82
4	Propanol-2-ene	0.81
5	N-Butanol	0.67
6	2-Kloroetanol	0.66
7	N-propanol	0.43
8	2-Metoksietanol	0.40
9	2-Siyanoetanol	0.30
10	İzobütanol	0.21

Deneylerde kullandığımız alkol oksidaz *Pichia pastoris*’ten saflaştırılmıştır. Deneyler esnasında substrat olarak yüksek reaksiyon hızı nedeniyle metanol kullanıldı.

Çalışma pH aralığı 6.5-8.3 iken optimum pH değeri 7.5 tespit edilmiştir ve deneyler boyunca bu pH ayarlanmış ve uygulanmıştır. Alkol oksidaz 18-45°C arasında faaliyet gösterebilirken, optimum sıcaklık olarak 37°C tayin edilmiştir, deneylerde uygulanmıştır. İnhibitör olarak hidrojen peroksit belirlenmiştir. Alkol oksidaz, 25°C'de soğuk 100 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.5'de çözünür. Çözeltiler, kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır (Couderc and Baratti 1980).

2.4.5. Enzim aktivite tayini

Enzim aktivite tayininde çeşitli yöntemler kullanılmakta olup, genellikle ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür. Çoğunlukla hücredeki enzim proteinini tayin etmek çok zordur. Bunun yerine kaybolan substrat veya oluşan ürünü ölçerek enzim hakkında fikir sahibi olunabilir. Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken metodun pratik oluşuna ve kısa sürede yapılmasına, ayrıca hassas oluşuna da dikkat etmek gerekir (Bankar *et al.* 2009; Jadhav and Hocheng 2016). Aktivite tayininde kullanılan bazı terimler aşağıdaki gibi açıklanabilir:

2.4.5.a. Ünite (UI)

Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne dönüştüren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri EU şeklinde gösterilmektedir.

2.4.5.b. Spesifik Aktivite

Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite EU/mg protein olarak kabul edilmektedir. Buna göre spesifik aktivite denklem 2.9 ile elde edilir;

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{ünite}}{\text{mg protein}} \quad (2.9)$$

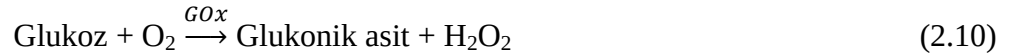
Bu formüle göre örneğin; 5 mg proteinde 750 ünite ölçülürse, bu enzimin spesifik aktivitesi 150 EU/mg protein bulunur.

Enzim aktivite tayininde kullanılan yöntemler yedi başlık altında toplanabilir:

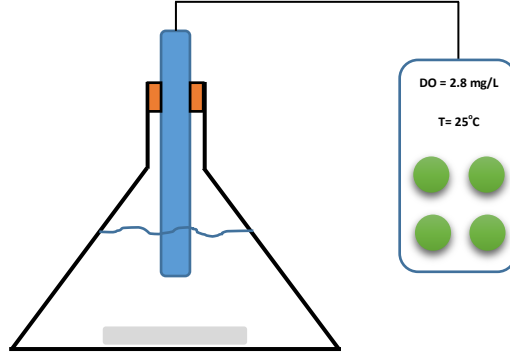
- Spektrofotometrik yöntem,
- Monometrik yöntem,
- Thunberg yöntemi,
- Elektrot yöntemi,
- Polimerik yöntem,
- Kromatografik yöntem,
- Kimyasal tayin yöntemi.

2.4.6. Glukoz oksidaz aktivite tayini

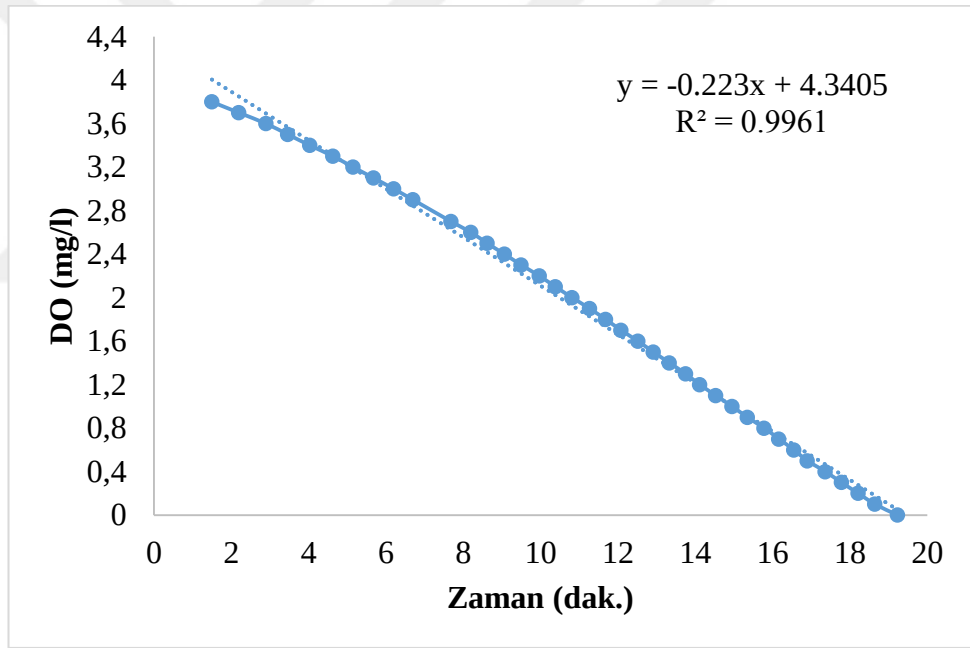
Bu çalışma kapsamında GOx enziminin aktivite tayininde kullanılan yöntem, literatür araştırmasında rastlanılmayan bir yöntemdir. Bu yöntem, glukoz (substrat) ile GOx (enzim) arasındaki aşağıdaki reaksiyon denklemiyle açıklanabilir:



Kapalı bir reaksiyon ortamında, tüketilen oksijen miktarını ölçerek, enzim ünitesi tayin edilebilir. Stokiyometri denklemine göre 1 mol substratın 1 mol glukonik asit ve 1 mol hidrojen peroksit'e dönüştürülmesi için yarım mol oksijen tüketilir, dolayısıyla enzim ünitesi tüketilen oksijen miktarının ($\mu\text{mol/L}$) iki katı olacaktır. Deney düzeneği Şekil 2.26'da görüldüğü gibi hazırlanmış olup, elde edilen sonuçlar Şekil 2.27'de verilmiştir.



Şekil 2.26. Aktivite tayini deney düzeneği



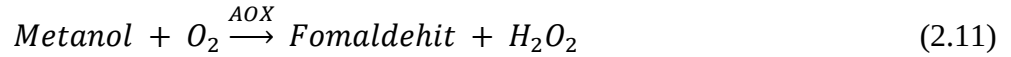
Şekil 2.27. GOx aktivite tayini için kalibrasyon grafiği

Bu grafiğe göre, zamanla oksijen tüketimi ve enzimatik reaksiyon ilerleme arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Dolayısıyla istenilen zaman dilimleri arasında tüketilen oksijen miktarı DO³¹ bu grafik kullanılarak belirlenebilir.

³¹ Dissolved Oxygen

2.4.7. Alkol oksidaz aktivite tayini

Alkol oksidaz (AOX) aktivite tayini Denklem 2.11 ve 2.12'ye göre yapılabilir; Bu prosedür ayrıca tüm Alkol Oksidaz ürünleri için kullanılabilir.



Elde edilen hidrojen peroksit ABTS'yi peroksidaz enzimi varlığında ABTS'nin oksitlenmiş haline dönüştürür. Ortamın renk değişimi 405 nm'de ölçülerek kalibrasyon eğrisinden AOX enziminin aktivite miktarı ölçülebilir.



2.5. Enzimatik Biyo-İşleme

Son yıllarda enzimlerden yararlanarak yeni bir işleme (biyolojik) metodu bilimsel araştırmalarda uygulanmaktadır. Bu yöntemde, genel olarak glukoz oksidaz enzimi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, alkol oksidaz enzimi de alternatif olarak bu metotta kullanılabilmektedir.

Enzimler ile metal işleme diğer eski ve yeni yöntemlerle kıyaslandığında, özellikle mikro ve nano seviyede işleme yapıldığında aşağıdaki bazı avantajlara sahip olduğu görülür:

- Uygulama kolaylığı
- Metal yüzeyinde yan etkilerin oluşmaması
- Enerji gerektirmemesi
- Yüzeyde üniform işleme sağlanması

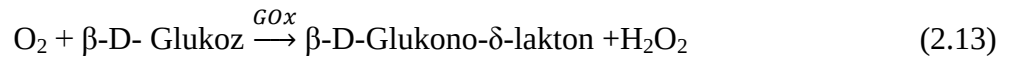
³² 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

³³ Peroxidase

- Biyo-reaksiyonun kolay şekilde sonlandırılması
- Operatör ve malzemeye zarar verilmemesi
- Çevreye zarar vermemesi

Bu avantajlar göz önüne alındığında, metal biyoliç ve metal kaldırma işlemlerinde enzimlerden yararlanılmalıdır. Ancak, özellikle gıda sektöründe kullanılmayan enzimlerin üretim maliyetleri yüksek olduğundan dolayı bu enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımı sınırlı kalmaktadır (Karimi *et al.* 2012).

Enzimatik metal kaldırma işleminde gerçekleşen reaksiyon biyo-Fenton reaksiyonuna dayalıdır. Bu reaksiyonda hidrojen peroksit (H₂O₂) iyonlarının üretimi yerinde olarak reaksiyon ortamında gerçekleşir ve elde edilen hidrojen peroksitler ferro iyonlarının ferrik iyonlara dönüşümünü sağlayarak işleme prosesinin başlamasını gerçekleştirir (Denklem 2.13, 2.14 ve 2.15). H₂O₂ tek başına işleme sürecini yürütebilmesi için yeterlidir. Yukarıda bahsedilen avantajlar ile birlikte H₂O₂ insitu üretimi ve ısı şoku ile enzimatik reaksiyonun aniden durdurulması bu metottun en ilginç avantajlarından biridir (Eskandarian *et al.* 2013; Jadhav and Hocheng 2016).



Burada M reaksiyondaki metali temsil etmektedir.

2.6. Çalışmanın Amacı

Malzemelere istenilen ölçüde gereken şekli vermek amacıyla çeşitli yöntemler ve cihazlar kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de yaygın bir şekilde uygulanan metal

işleme prosesidir. Önceleri metal işleme farklı fiziksel ve kimyasal yöntemlerle yapılmakta idi. Ancak son yıllarda mikro-ölçekli metal işlemlerde yeni yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan en önemlisi ve dikkat çeken metal yiyen mikroorganizmaların kullanılmasıdır. Enerji tasarrufu, çevreye zarar vermeme, güvenlik gibi avantajlarından dolayı metalleri mikroorganizmalar ile işlemek oldukça caz dikkattir.

Bu çalışma kapsamında, açık literatürde rastlanılmayan, nano boyutta enzimler kullanarak pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik malzemeler üzerine biyo-enzimatik işleme uygulanacaktır. Kullanılan metodun avantajları ve dezavantajları araştırılmış ve diğer biyo-işleme yöntemleriyle kıyaslanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde deneyler esnasında kullanılan kimyasal malzemeler, laboratuvar cihazları ve ayrıca deney yönteminden bahsedilecektir. Materyal kısmında projenin amacı doğrultusunda kullanılan kimyasallar; glukoz oksidaz (GOx) enzimi, alkol oksidaz (AOX) enzimi, glukoz substratı, metanol³⁴, demir sülfat³⁵ ve kullanılan diğer kimyasallar hakkında bilgi verilecektir. Ayrıca iş parçaları olarak kullanılan metaller ve alaşımlar hakkında bilgiler verilecektir. Yöntem kısmında ise çalışma hedefleri doğrultusunda metal iş parçaları üzerinde biyo-işleme prosesinin gerçekleştirilmesi için ön hazırlıklar ve uygulanan yöntemler üzerinde durulacaktır.

3.1. Materyal

Aşağıda çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar, malzemeler ve makine teçhizat hakkında bilgiler verilecektir.

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu kısımda deneyler esnasında kullanılan kimyasal maddeler detaylı şekilde verilmiştir.

3.1.1.a. GOx enzimi

Çalışma kapsamında biyo-işleme proses aracı olarak Sigma Aldrich firmasından temin edilen glukoz oksidaz enzimi kullanılmıştır. Enzimin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.1’de verilmektedir.

³⁴ CH₃OH

³⁵ Fe₂SO₄.7H₂O

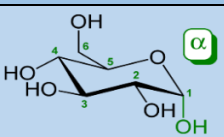
Çizelge 3.1. *Aspergillus niger*'den Glukoz Oksidazın fiziksel ve kimyasal özellikleri

Tanımlayıcılar	
CAS Numarası	9001-37-0
Ünite	50KU
Tip	Tip VII
Sevk	Islak buz
Saklama sıcaklığı	-20°C
Form	Liyofilize ³⁶ toz
EC Numarası	232-601-0
Enzim Komisyonu (EC) Numarası	1.1.3.4

3.1.1.b. Glukoz

Her enzim, reaksiyon ortamında etkisini gösterebilmek için kendine uygun substrata ihtiyaç duymaktadır. GOx enzimi substrat olarak glukoz kullanmaktadır. Çalışmada kullanılan glikozun kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 3.2’de verilmektedir.

Çizelge 3.2. α -D- Glukozun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Tanımlayıcılar	
	α -D- Glukoz (sandalye formu)
CAS Numarası	50-99-7
EC Numarası	200-075-1
Özellikler	
Kimyasal formül	$C_6H_{12}O_6$
Molekül ağırlığı	$180.16 \text{ g. mol}^{-1}$
Görünüm	Beyaz toz

³⁶ Lyophilized

Çizelge 3.2. (devam)

Yoğunluk		1.54 g /cm ³
Erime noktası	α -D-glikoz	146°C
	β -D-glikoz	150°C
Suda çözünürlük		909 g/L (25°C)

3.1.1.c. Demir (II) Sülfat 7H₂O

Biyolojik işleme reaksiyonları esnasında metal iş parçaları üzerinden metal çözünmesi için reaksiyon ortamında Fe³⁺'ün bulunması zorunludur (biyo-Fenton). Enzimatik reaksiyondan ortaya çıkan hidrojen peroksit³⁷ demir sülfatın Fe³⁺'e oksitlenmesini yol açtığı için biyolojik işlemenin gerçekleşmesini ve ilerlemesini sağlamaktadır. Demir (II) sülfat.7H₂O özellikleri Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Demir (II) sülfat.7H₂O özellikleri

Kimyasal formül	Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O
Molekül ağırlığı	278.01 g.mol ⁻¹
Görünüm	Mavi- yeşil kristaller
Yoğunluk	1.895 g/cm ³
Erime noktası	60–64 °C
Suda çözünürlük	29.51 g/100 mL (25 °C)
Buhar basıncı	1.95 kPa

3.1.1.d. Alkol oksidaz enzimi

Biyolojik işlemenin diğer bölümünde işleme aracı olarak kullanılan başka bir enzim ise alkol oksidaz enzimidir. Bu enzimin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

³⁷ H₂O₂

Çizelge 3.4. *Pichia pastoris*'ten Alkol Oksidaz çözeltisi

CAS Numarası	9073-63-6	
Ünite	250 u	
Sevk	Kuru buz	
Saklama sıcaklığı	-20°C	
Form	Tamponlu sulu çözelti	
Enzim Komisyonu (EC) Numarası	1.1.3.13	
pH aralığı	6.5- 8.3	
Optimum pH	7.5	
Sıcaklık aralığı	18- 45°C	
Optimum sıcaklık	37°C	
İnhibitör	H ₂ O ₂	
substrat	Metanol	1.4 (O ₂ konsantrasyonu 0.19 mM)
		3.1 (O ₂ konsantrasyonu 0.93 mM)
Tampon	Potasyum fosfat (pH 7.5, 25°C)	

3.1.1.e. Metil alkol (metanol)

Alkol oksidaz enziminin en uygun substratı olarak bilinen alkol metil alkol olup, çalışmada kullanılan metil alkolün özellikleri Çizelge 3.5'te verilmektedir.

Çizelge 3.5. Metil alkolün özellikleri

Kimyasal formül	CH ₄ O
Molekül ağırlığı	32.04 g.mol ⁻¹
Görünüm (Renk)	Renksiz
Form	Sıvı
Saflık (GC)	≥ 99.70

Çizelge 3.5. (devam)

Alevlenme noktası	9°C
Yoğunluk	0.792 g·cm ⁻³
Erime noktası	-97.6°C
Kaynama noktası	64.7°C
Suda çözünürlük	Karışabilir

3.1.1.f. Sodyum hidroksit

Enzimler belirli pH aralıklarında aktif hale gelirler. En yüksek aktivitelerini optimum pH değerinde sergilerler. Bu pH değerini ayarlamak için tampon çözeltisi hazırlamak gerekmektedir. Sodyum hidroksit, tamponun pH değerinin ayarlamasında kullanılan kimyasallardan birisidir. Çizelge 3.6'da sodyum hidroksitin kimyasal ve fiziksel özellikleri sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Sodyum hidroksitin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Kimyasal formül	NaOH
Molekül ağırlığı	39.997 g.mol ⁻¹
Görünüş	Beyaz
Koku	Kokusuz
Yoğunluk	2.13 g/cm ³
Erime noktası	318°C
Kaynama noktası	1,388°C
Suda çözünürlük	418 g/L (0°C) 1110 g/L (20°C) 3370 g/L (100°C)

3.1.1.g. Sülfürük asit

Asidik işleme için kullanılan sülfürük asidin özellikleri Çizelge 3.7’de verilmektedir.

Çizelge 3.7. Sülfürük asidin özellikleri

Kimyasal formül	H ₂ SO ₄
Molekül ağırlığı	98.079 g.mol ⁻¹
Görünüş	Berrak, renksiz sıvı
Koku	Kokusuz
Yoğunluk	1.84 g / Cm ³ , sıvı
Erime noktası	10 °C
Kaynama noktası	337 °C

3.1.1.h. Hidroklorik asit

Kimyasal dağlamada kullanılan hidroklorik asidin özellikleri Çizelge 3.8’te verilmektedir.

Çizelge 3.8. Hidroklorik asidin özellikleri

Kimyasal formül	HCl
Molekül ağırlığı	36.46 g/mol
Görünüş	Renksiz, şeffaf sıvı
Asitlik (pK _a)	-6.3
Yoğunluk	1.18 g/cm ³
Erime noktası	-27.32°C
Kaynama noktası	110°C

3.1.1.i. Sodyum asetat

Bütün enzimler yapılarını korumak ve en yüksek aktivitelerini göstermeleri için belirli tampon ortamlarında kullanılırlar. Literatür çalışmalarına göre GOx enzimi asetat tamponunda en yüksek aktiviteye sahiptir. Asetat tamponu, sodyum asetat tuzu ve asetik asit olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Bundan dolayı, bu tamponun hazırlanmasında sodyum asetat kullanımı gerekmektedir. Çizelge 3.9'da sodyum asetat bileşiğinin özellikleri verilmektedir.

Çizelge 3.9. Sodyum asetatın fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kimyasal formül	CH ₃ COONa
Molekül ağırlığı	82.03 g·mol ⁻¹
Görünüş	Beyaz çözünen toz
Koku	Sirke (Asetik asit) kokusu
Yoğunluk	1.528 g/cm ³ (20°C, susuz), 1.45 g/cm ³ (20 °C, trihidrat) 1.45 g/Cm ³ (20°C, trihidrat)
Erime noktası	324°C (susuz), 58°C (trihidrat)
Kaynama noktası	881.4°C (susuz), 122°C (trihidrat)
Suda çözünürlük	46.4 g/100 mL (20°C) (trihidrat)

3.1.1.i. Asetik asit

Asetik asit, asetat tamponu hazırlamak için gerekli olan diğer kimyasal olup, asetik asidin özellikleri Çizelge 3.10'da verilmektedir.

Çizelge 3.10. Asetik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kimyasal formül	C ₂ H ₄ O ₂
Molekül ağırlığı	60.05 g·mol ⁻¹
Görünüş	Renksiz sıvı
Koku	Keskin / Sirke benzeri
Yoğunluk	1.049 g cm ⁻³
Erime noktası	118 - 119°C
Kaynama noktası	16 - 17°C
Suda çözünürlük	Karışabilir

3.1.1.j. Pirinç iş parçası

Deneylerde kullanılan pirinç iş parçasının kimyasal analizi Çizelge 3.11’de verilmekte olup, bu analiz sonuçları EDX³⁸ lokal analizlerden elde edilmiştir.

Çizelge 3.11. Pirinç iş parçasının elementel analizi

Element	Ağırlık %	Atomik %
Bakır (Cu)	58.17	58.86
Çinko (Zn)	41.83	41.14

3.1.1.k. Bakır iş parçası

Enzimatik işlemlerde kullanılan bakır iş parçalarının elementel analizi bölgesel EDX analizinden belirlenmiş olup, Çizelge 3.12’de verilmiştir.

³⁸ Energy dispersive X-ray

Çizelge 3.12. Bakır iş parçasının elementel analizi

Element	Ağırlık %	Atomik %
Bakır (Cu)	96.48	89.64
Alüminyum (Al)	1.74	3.81
Oksijen (O)	1.77	6.55

3.1.1.l. Alüminyum iş parçası

Biyo işlemede kullanılan alüminyum iş parçalarının fiziksel kompozisyonunu belirlemek için numunelerin EDX analizi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 3.13’de verilmektedir.

Çizelge 3.13. Alüminyum iş parçalarının fiziksel kompozisyonu

Element	Ağırlık %	Atomik %
Magnezyum (Mg)	4.01	4.43
Alüminyum (Al)	95.99	95.57

3.1.1.m. Paslanmaz çelik

Enzimatik nanoişlemede kullanılan paslanmaz çelik iş parçalarının elementel analizinin belirlenmesi için numuneler üzerinde EDX analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 3.14’de sunulmuştur.

Çizelge 3.14. Paslanmaz çelik iş parçalarının fiziksel kompozisyonu

Element	Ağırlık %	Atomik %
Krom (Cr)	16.49	17.58
Demir (Fe)	72.75	72.25
Nikel (Ni)	10.76	10.17

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu kısımda deneyler süresince kullanılan cihazlar detaylı şekilde verilmiştir.

3.1.2.a. Deney esnasında kullanılanlar

1. Hassas teraziler

Metal iş parçalarının ağırlıklarını belirlemek için 0.01 mg ve 0.1 mg hassasiyetindeki teraziler kullanılmıştır. 0.01 mg hassasiyetindeki terazi DENVER firmasına, 0.1 mg hassasiyetindeki terazi ise KERN'e aittir.

2. Karıştırıcı su banyosu

Bu çalışma kapsamında tüm işleme süreçleri sabit ve belirli bir sıcaklık ve karıştırma koşulları çerçevesinde yapılmıştır. Zira reaksiyon ortamındaki enzimler karıştırma hızı ve sıcaklıktan aşikâr bir şekilde etkilenebilirlerdi. Bundan dolayı deneyler, kontrollü karıştırıcıya sahip ve sıcaklığı 0.1 hassasiyette ayarlanabilen SELECTA su banyosunda yapılmıştır.

3. Oksijen ölçüm cihazı³⁹

GOx enziminin aktivitesini tayin etmek amacıyla reaksiyon ortamında çözünmüş oksijen miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla oksijen ölçüm cihazı (DO metre) kullanılmış olup, ortamdaki oksijen miktarının ölçülmesi sağlanmıştır. Bu cihaz WTW Oksi 3205 SET 3 serisine aittir.

³⁹ DO meter

3.1.2.b. Analizde kullanılan yüksek teknolojiye sahip cihazlar

Nano-morfoloji ve yüzey pürüzlülüğü analizi için kullanılan yüksek teknolojiye sahip cihazlar bu kısımda verilmiştir.

1. Taramalı Elektron Mikroskobu⁴⁰ (SEM)

Deneylerden önce ve sonra metal iş parçalarının yüzey görüntüleri ZEISS SIGMA 300 model SEM cihazıyla taranarak görüntülenmiştir. Ayrıca iş parçalarının kompozisyonları SEM cihazının EDX analizlerinden belirlenmiştir.

2. Atomik kuvvet mikroskobu⁴¹ (AFM)

Metal iş parçalarının yüzey pürüzlülüğü, Atatürk Üniversitesi DAYTAM bünyesinde bulunan Hitachi 5100N AFM cihazı ile yapılan analizlerden belirlenmiştir.

3.2. Yöntem

Bu bölümde tez çerçevesinde kullanılan yöntemler, yapılacak işlemler ve deneyler detaylı şekilde verilmektedir.

3.2.1. Deneysel tasarım

Bu çalışmada, iki farklı enzim ve dört farklı metal iş parçası kullanılmıştır. Birinci grup deneylerde GOx enzimi ortamında; pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çeliği iş parçalarının biyo-nanoişlenmeleri belirli şartlar göz önüne alınarak incelenmiştir. İkinci kısım deneylerde ise; mezkûr metallerin alkol oksidaz enzimi (AOX) ile biyo-nanoişlenmeleri araştırılmıştır.

⁴⁰ Scanning electron microscopy

⁴¹ Atomic force microscopy

3.2.1.a. Glikoz oksidaz enzimi ile biyo-işleme

GOx enzimi ile biyo-nanoişleme yapmak için bazı işlem aşamaları gerekmektedir. Bu aşamalar hakkında aşağıda detaylı bilgiler verilmektedir.

1. Metal iş parçalarının hazırlanması

Çalışma kapsamında biyo işleme prosesi için pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik iş parçaları olarak seçilmiştir. İş parçaları (deney numuneleri) 1 m uzunlukta ve 4 mm çapa sahip olan çubuklardan tedarik edilmiştir. Bu çubuklar CNC⁴² makinesiyle, 14 mm çapta ve 4 mm kalınlığında kesilerek numuneler hazırlanmıştır.

2. Zımpara işlemi

Kesme esnasında metal yüzeyinde ortaya çıkan çizgiler ve pürüzlülükler nano boyutta yapılan işlemleri yüksek oranda etkileyebilmektedir. Bundan dolayı, metal iş parçalarının biyo işlemede kullanılması için, işlemeye maruz kalan yüzeyinin tamamen saf, pürüzsüz ve parlak olması gerekmektedir. Bu amaçla, iş parçalarının yüzeyleri 6 aşamalı zımpara işlemine tabi tutulmuştur. Zımpara işlemi en büyük zımpara meşinden küçük meşe doğru sırayla yapıldıktan sonra nihai olarak 1 mikrometrelik alümina tozu ile cilalanmıştır. Kullanılan zımpara meşleri 240, 400, 600, 800, 1200, 2000 olarak seçilmiştir. Şekil 4.2’de zımparalar ve Şekil 4.3’de metal iş parçalarının zımpara öncesi ve sonrası görüntüleri verilmiştir.

⁴² Computer Numerical Control

3. Asetat tamponunun hazırlanması

Tamponlar, kimyasal reaksiyonlarda ortamın pH değişikliklerini önlemek ve reaksiyonların sabit bir pH değerinde gerçekleşmesini sağlamaktadırlar. Bundan dolayı, enzimatik reaksiyonlarda doğru tamponun seçilmesi çok önemlidir. Çünkü tampon turu ve pH'sı değiştiğinde enzimlerin aktivitesi de değişmektedir. GOx enzimi asetat tamponu ortamında en yüksek aktiviteye sahip olmaktadır. GOx enziminin optimum pH değeri 4'tür. Dolayısıyla biyo işleme sürecini GOx enzimi ile yürütmek için asetat tamponu kullanılmıştır.

Tamponların hazırlanmasında Henderson-Hasselbalch denklemi (Denklem 3. 1) kullanılmıştır.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{A^-}{HA}\right) \quad (3.1)$$

burada:

[A⁻]: asetat konsantrasyonu (mol/L)

[HA]: asetik asit konsantrasyonu (mol/ L)

Asetat tamponunun pH 4 - 8 aralıklarında hazırlanması için, bu denkleme göre asetik asit ve sodyum asetat kullanıldı. Asetik asidin Ka değeri (pK_a=5.5) bilindiğinden, istenilen pH miktarı için sodyum asetat konsantrasyonu belirlenebilmektedir.

Çizelge 3.13'te asetat tamponunun farklı pH değerlerine göre hazırlanan miktarları verilmektedir. Gerekli pH değerini elde etmek için aşağıdaki oranlarda asetik asit ve sodyum asetat çözeltileri karıştırılmıştır.

Çizelge 3.15. pH 3 – 6 aralığındaki asetat tampon çözeltileri

pH	0.1 M asetik asit hacmi	0.1 M sodyum asetat hacmi	Toplam tampon hacmi
3	982.3 mL	17.7 mL	1000 mL
4	847.0 mL	153.0 mL	1000 mL
5	357.0 mL	643.0 mL	1000 mL
6	52.2 mL	947.8 mL	1000 mL

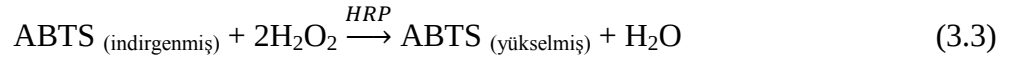
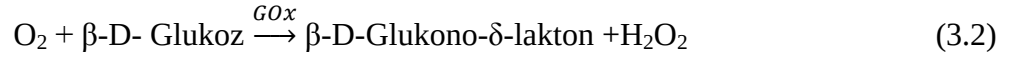
Çizelge 3.16. Farklı pH değerlerinde (pH 3.6-5.6) asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması

p	0.1 M Asetik asit hacmi	0.1 M Sodyum asetat hacmi	Toplam tampon
3.6	185 mL	15 mL	1000 mL
3.8	176 mL	24 mL	1000 mL
4.0	164 mL	36 mL	1000 mL
4.2	147 mL	53 mL	1000 mL
4.4	126 mL	74 mL	1000 mL
4.6	102 mL	98 mL	1000 mL
4.8	80 mL	120 mL	1000 mL
5.0	59 mL	141 mL	1000 mL
5.2	42 mL	158 mL	1000 mL
5.4	29 mL	171 mL	1000 mL
5.6	19 mL	181 mL	1000 mL

4. Glikoz oksidaz enziminin aktivitesinin ölçülmesi

GOx enziminin aktivite tayini glukozun oksijen varlığında yükseltgenmesi sonucu glukonik asit ve hidrojen peroksit'e dönüşümüne dayanmaktadır. Reaksiyondan açığa

çıkan hidrojen peroksit ikinci bir reaksiyonda ABTS⁴³’yi horsradiş peroksidaz⁴⁴ (HRP) enzimi varlığında yükseltir ve ortaya çıkan renk değişikliği 420 nm de ölçülebilir (Tongbu *et al.* 1996; Witt *et al.*1998).



Enzim Ünitesi: Bir mikromol (μmol) substratı bir dakikada ve en uygun şartlarda ürüne dönüştüren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri U şeklinde gösterilmektedir. Örneğin enzim aktivitesi 10000 U ise, 1 g bu enzimden 1 L tampon çözeltisine konulduğunda 10000 ünite elde edilecektir.

5. Enzimatik işleme için çözelti hazırlanması

Öncelikle enzimatik nanoişleme için ilk işleme çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiyi hazırlamak için gereken kimyasallar; GOx enzimi, glukoz, demir (II) sülfat ve asetat tamponundan ibarettir. 100 mL asetat tamponu bütün biyo-işleme deneylerinde sabit miktarda alınırken diğer etkin parametreler miktarı deney tasarımına göre değişmektedir. Çizelge 3.17’de metal iş parçası üzerinde enzimatik işleme için 20 aşamalı deney tasarımı gösterilmektedir. Deneylerden biri kontrol deneyi olarak alınmış ve diğerleri bununla kıyaslanmıştır. Kimyasallar 250 mL’lik bir erlen mayere⁴⁵ aktarıldıktan sonra metal iş parça(ları) ortama ilave edilerek, deney koşulları altında biyo-nanoişleme prosesi gerçekleştirilmiştir. Deney bittikten sonra iş parçası reaksiyon ortamından alınarak, saf su ve daha sonra etanol ile yıkandıktan sonra kurutulup analizleri yapılmıştır.

⁴³ 2,2’-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

⁴⁴ Turp kökünde ve buğday yapraklarında bulunan enzim

⁴⁵ Erlenmeyer

6. Sülfürik asit⁴⁶ çözeltisinin hazırlanması

Asidik işleme ile biyo işleme sürecinin karşılaştırılması için 1L 1N sülfürik asit çözeltisinin hazırlanması gerekmektedir. Bu solüsyonu hazırlamak için derişik sülfürik asit çözeltisi (95-98 %) kullanılmıştır. Asidik işleme için 100 mL (1N) sülfürik asit erlene ilave edilerek, aynı enzimatik işleme prosedürü şartlarında pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çeliğin işlenmesi gerçekleştirilmiştir. İşleme sonrası metal iş parçaları asidik ortamdan alınarak, alkol ile yıkanp kurutulduktan sonra karakterizasyon⁴⁷ işlemleri yapılmıştır.

Çizelge 3.17. Enzimatik biyo işleme için reaksiyon ortamı

Numune		W _i ⁴⁸	GOX (g)	G ⁴⁹ (g)	Fe ₂ SO ₄ (g)	A ⁵⁰ Tampon	pH	T(°C)	rpm	T(saat)
Metal iş parçası	1		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	
	2		0.2	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
	3		0.3	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
	4		0.4	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
	5		0.1	0.1	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
	6		0.1	0.3	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
	7		0.1	0.4	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
	8		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	52	100	6
	9		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	59	100	6
	10		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	2
	11		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	4
	12		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	12
	13		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	25	6
	14		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	75	2

⁴⁶ H₂SO₄

⁴⁷ Characterization

⁴⁸ İş parçasının deney öncesi ağırlığı

⁴⁹ Glukoz

⁵⁰ Asetat tamponu

Çizelge 3.17. (devam)

15		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	5.5	45	100	4
16		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	7	45	100	6
17		0.1	0.2	5.56	A 100 mL	4	45	100	6
18		0.1	0.2	1.4	A 100 mL	4	45	100	6
19		0.1	0.2	2.78	A 100 mL	4	45	100	6
20		0.1	0.2	8.34	A 100 mL	4	45	100	6
21		0.0	0.0	0.0	HCl 100 mL		45	100	6
22		0.0	0.0	0.0	H ₂ SO ₄ 100mL		45	100	6
23		0.0	0.0	0.0	H ₂ O ₂ 100 mL		45	100	6

7. Hidroklorik asit⁵¹ çözeltisinin hazırlanması

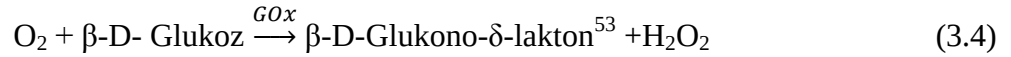
Enzimatik işleme ile kimyasal dağlamayı mukayese etmek ve ayrıca sülfürik asit ile kıyaslamak için hidroklorik asit kullanılmıştır. Bu amaçla 1 N hidroklorik asit çözeltisi derişik hidroklorik solüsyonu kullanılarak hazırlanmıştır. 100 mL (1 N) hidroklorik asit erlen mayere ilave edilmiş ve bütün koşullar enzimatik işleme şartlarına ayarlanmıştır. Deneylerden sonra numuneler yıkanp kurutulmuş ve karakterizasyon işlemleri için hazır hale getirilmiştir.

8. Enzimatik biyo-işlemenin temeli

Enzimatik metal kaldırma işleminde gerçekleşen reaksiyon biyo-Fenton reaksiyonuna dayanmaktadır (Denklem 3.4, 3.5 ve 3.6). Bu reaksiyonda hidrojen peroksit⁵² iyonlarının üretimi insitu olarak reaksiyon ortamında gerçekleşir ve elde edilen hidrojen peroksitler reaksiyon ortamına ilave edilen ferro iyonlarının ferrik iyonlarına dönüşümünü sağlayarak işleme prosesinin başlaması sağlanmaktadır.

⁵¹ HCl

⁵² H₂O₂

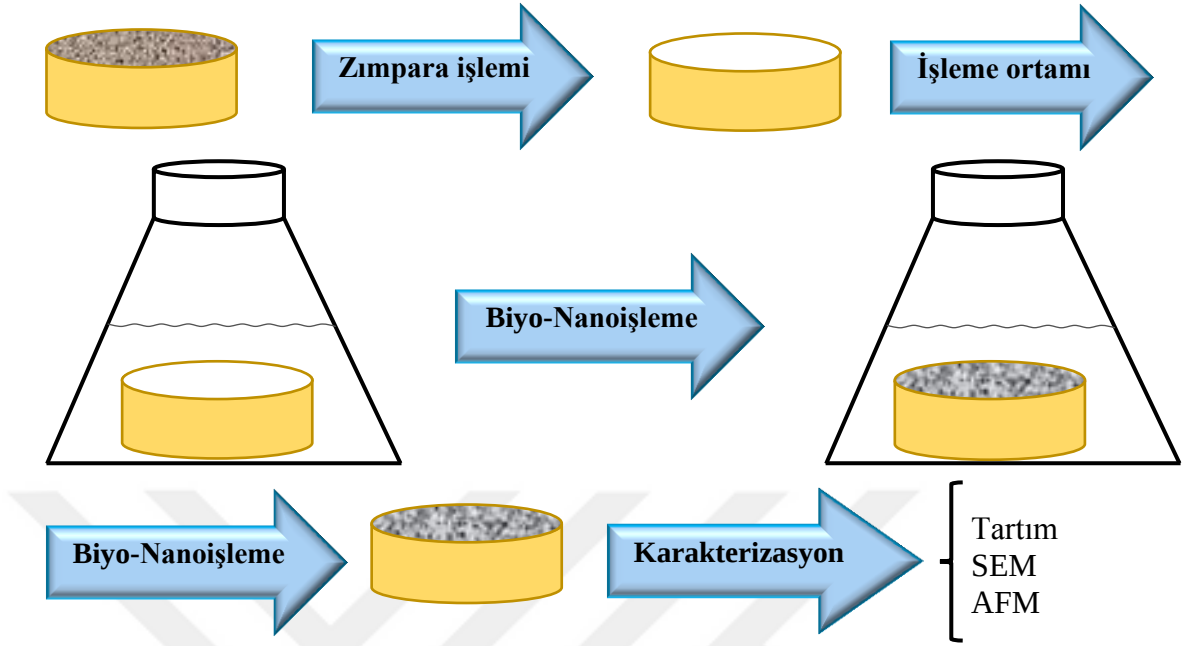


Burada M reaksiyondaki metali temsil etmektedir. İşleme esnasında ferrik iyonları reaksiyon ortamında bulunan bütün metal parçalarının korozyonunu gerçekleştirmekte ve böylece biyo işleme sağlanmaktadır. Hidrojen peroksit tek başına işleme sürecini yürütebilmesi için yeterlidir. Hidrojen peroksidin yerinde üretimi ve ısı şoku ile enzimatik reaksiyonun ani olarak durdurulması bu metotun en önemli avantajlarından birisidir (Eskandarian 2013).

9. Çalışma prosedürü

İş parçaları üzerinde yapılacak enzimatik nanoişleme süreci Şekil 3.1’de tasarlanan şemada gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. İş parçaları belirli boyutlarda kesildikten sonra aşamalı olarak zımpara işlemine tabi tutulmuş ve daha sonra işleme çözeltisine (100 mL) bırakılmıştır. Reaksiyon ortamında bulunan kimyasallar; asetat tamponu, GOx ve AOX enzimi, glukoz, metanol ve demir sülfattan ibarettir. Bu ortamdaki iş parçaları belirli koşullar altında enzimatik biyo-işlemeye maruz bırakıldıktan sonra karakterizasyon aşamasına hazırlanmış ve nihai olarak tez metni ve makale yazımı ile tez çalışmaları tamamlanacaktır.

⁵³ D-glucono-δ-lactone



Şekil 3.1. Enzimatik nanoişleme sürecinin genel konstrüksiyonu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

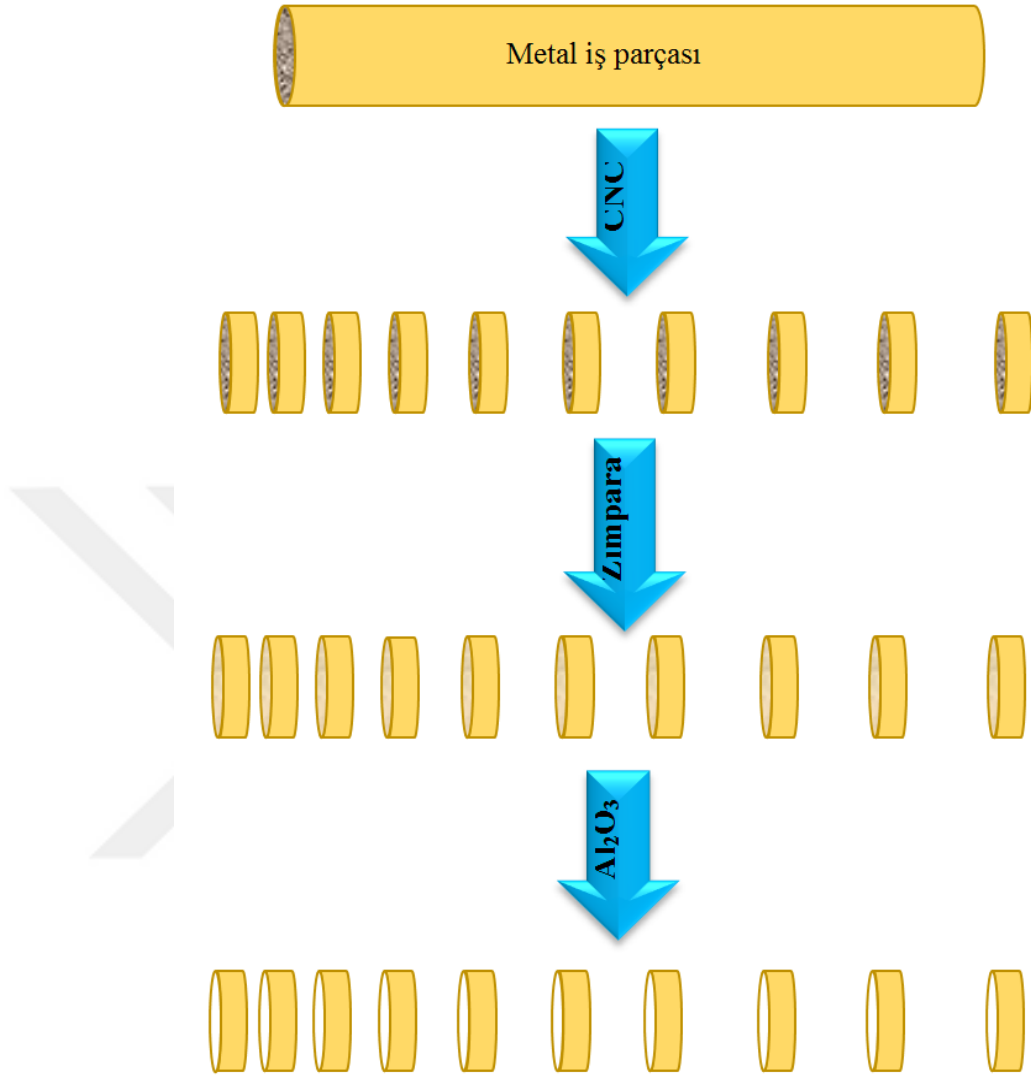
Bu bölümde glukoz oksidaz ve alkol oksidaz enzimleriyle pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik iş parçaları üzerinde yapılan biyo-işlemenin sonuçları ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçların daha etkili ve anlaşılır olması için çizelgeler ve grafikler halinde verilmiştir.

4.1. İş Parçalarının Hazırlanması

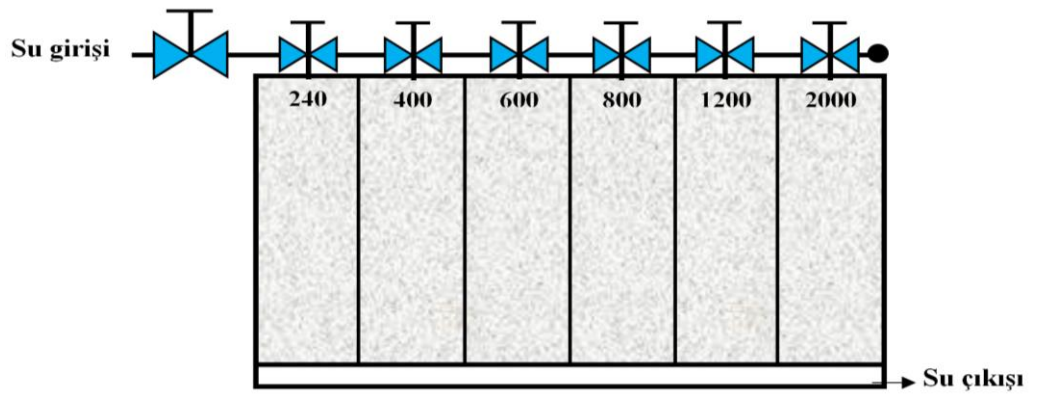
Pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik iş parçaları 50 cm'lik boy ve 14 mm'lik çapa sahip bir metal çubuğundan Şekil 4.1'de gösterildiği gibi 4 mm kalınlıklarda kesilip hazırlandı.

4.1.1. Zımpara işlemi

İlk olarak iş parçalarının üzerindeki yağ ve diğer kirlilikleri uzaklaştırmak için etil alkol ile yıkandıktan sonra, saf ve pürüzsüz bir yüzey elde etmek için iş parçası numuneleri zımpara işlemine tabi tutuldu. Zımpara işlemi düzeneği Şekil 4.2'de verilmiştir. Bu işlem esnasında ortaya çıkan ısı, metal yüzey morfolojisine zarar vermemesi için numunelerin yüzeyini istenilmeyen etkilerden korumak amacıyla, zımpara işlemleri su ortamında yapıldı. Numuneler, en büyük zımpara meşinden başlayarak küçük meşe doğru zımparalandı ve bu sırada genel bir kural uygulayarak zımpara meşi değiştirildiği zaman numunenin yönü 90° zımpara üzerinde değiştirildi (Şekil 4.3). Zımpara işlemi sonunda numune etil alkol ile yıkanıp, daha saf ve parlak bir yüzeye ulaşmak için yüzeyler 1 mikron alümina tozu (Al_2O_3) ile parlatıldı ve tekrar etil alkol ile yıkanıp biyo-işleme süreci için hazırlandı.



Şekil 4.1. Metal iş parçalarını hazırlanma aşamaları



Şekil 4.2. Zımpara seti düzeneği



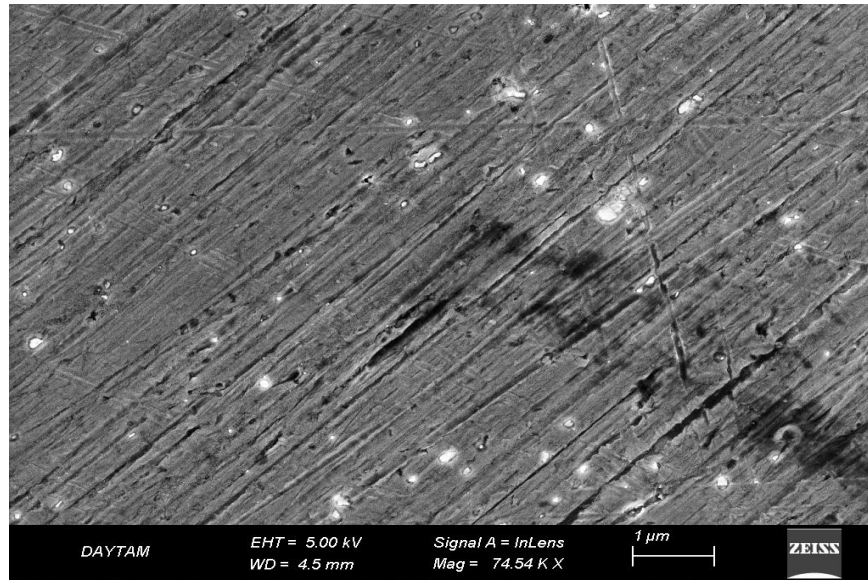
Şekil 4.3. Doğru zımpara işlemi şematiği

4.2. GOx Enzimiyle Yapılan Deney Sonuçları

Bu kısımda metal iş parçaları üzerinde yapılan işlemlerin sonuçları her metal için ayrı ayrı ve ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

4.2.1. Pirinç iş parçası analizleri ve sonuçları

Pirinç numuneler biyo-işleme öncesi yüzey morfoloji analizleri için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. Ayrıca yüzey pürüzlülüğü atomik kuvvet mikroskobu ile ölçüldü ve numunelerin element analizi EDX ile belirlendi. Şekil 4.4'te pirinç iş parçasının SEM görüntüsü, Çizelge 4.1'de pürüzlülük sonuçları ve Çizelge 4.2'de EDX analizi verildi.



Şekil 4.4. Biyo-işleme öncesi pirinç iş parçasını SEM görüntüsü

Çizelge 4.1. Orijinal pirinç numunenin pürüzlülük analizi

Numune	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	2.346	15.55	3.620	48.98

Çizelge 4.2. Orijinal pirinç numunenin element analizi

Numune	Element	Ağırlık %	Atomik %
Kontrol	Bakır	58.17	58.86
	Çinko	41.83	41.14

4.2.1.a. Pirinç iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları

Deneyler sırasında kullanılan pirinç iş parçalarının kütleleri, deneylerden önce ve sonra 0.1 mg hassasiyetli teraziyle tartıldı ve Çizelge 4.3'te verildi. Bu sonuçlar deney düzeneği koşulları çerçevesinde (Çizelge 3.17) yapıldı. Biyo-işleme sonrası kütle kaybı, kütle kaybı yüzdesi ve enzimatik biyo-nanoişleme verimi 4.1, 4.2 ve 4.3 denklemlerine göre hesaplandı.

$$\text{Kütle kaybı (K.K.}^{54}\text{)} = (\text{İş p.}^{55} \text{ ilk ağırlığı}) - (\text{İş p. Biyo-işleme sonundaki ağırlığı}) \quad (4.1)$$

$$\text{Kütle kaybı yüzdesi (K. K. Y.}^{56}\text{)} = \text{kütle kaybı} \times 100 \quad (4.2)$$

$$\text{Enzimatik biyo-nanoişleme verimi} = \frac{\text{İş p.ilk ağırlığı} - \text{İş p.son ağırlığı}}{\text{İş p.ilk ağırlığı}} \times 100 \quad (4.3)$$

Çizelge 4.3'de yer alan parametreler içinde pH ve sıcaklık enzimin aktivitesini etkileyen en kritik ve önemli parametreler olup, diğer etkin parametreler ise enzim ve substrat

⁵⁴ Kütle kaybı

⁵⁵ İş parçası

⁵⁶ Kütle kaybı yüzdesi

miktarı, karıştırma hızı, zaman ve demir miktarıdır ve yüksek verim elde edilmesinde etkilidirler.

4.2.1.b. Özgül metal kaldırma hızı

Biyo-işleme, enzim veya diğer mikroorganizmaları işleme aracı olarak kullanmak suretiyle metal, alaşım, ahşap vb. parçaların üzerinden kontrolü bir şekilde mikro ve nano boyutlarda talaş kaldırma işlemidir. Bu işlem esnasında “metal kaldırma hızı” (MRR) ve “özümlü metal kaldırma hızı” (SMRR) gibi bazı önemli terimlerin değerlendirilmesi gerekir.

Belirli bir zaman dilimi içinde kaldırılan malzeme miktarı (MRR) olarak tarif edilir ve g/san⁵⁷ ya da ng/saat⁵⁸ vb. birimlerde verilmektedir. Özümlü metal kaldırma hızı ise zaman dilimi içinde nm² kaldırılan metal miktarıdır (ng/saat.nm²). Metal kaldırma hızı ve özümlü metal kaldırma hızı 4.4 ve 4.5 denklemleri ile hesaplanmıştır:

$$MRR = \frac{W_i - W_f}{t} = \frac{\Delta W}{t} \quad (4.4)$$

$$SMRR = \frac{W_i - W_f}{A \times t} = \frac{\Delta W}{A \times t} \quad (4.5)$$

burada W_i iş parçasının deney öncesi kütlesi (ng), W_f iş parçasının deney sonrası kütlesi (ng), A iş parçasının işleme yapılan yüzey alanı (nm²) ve t işleme süresi (saat) dir.

⁵⁷ Gram/Second

⁵⁸ Nanogram/ hour

Çizelge 4.3. Pirinç iş parçası ağırlık analiz sonuçları

Deney	Parametre	İlk ağırlık (g)	Son ağırlık (g)	K. K. (g)	K.K.Y. %	Biyo-işleme verimi
1	GOx 0.1 g	4.8404	4.835	0.0054	0.54	0.111561028
2	GOx 0.2 g	4.8497	4.8431	0.0066	0.66	0.136090892
3	GOx 0.3 g	4.7891	4.7781	0.011	1.1	0.22968825
4	GOx 0.4 g	4.8422	4.8299	0.0123	1.23	0.254016769
5	Glukoz 0.1g	4.88	4.8735	0.0065	0.65	0.133196721
6	Glukoz 0.3g	4.8565	4.8484	0.0081	0.81	0.166786781
7	Glukoz 0.4g	4.8813	4.8736	0.0077	0.77	0.157744863
8	T 52°C	4.9557	4.9459	0.0098	0.98	0.197752083
9	T 59°C	4.8394	4.835	0.0044	0.44	0.090920362
10	T 2 saat	4.8235	4.823	0.0005	0.05	0.010365917
11	T 4 saat	4.8659	4.8637	0.0022	0.22	0.045212602
12	T 12 saat	4.818	4.7973	0.0207	2.07	0.429638854
13	Rpm 25	4.8372	4.8368	0.0004	0.04	0.008269247
14	Rpm 75	4.852	4.8484	0.0036	0.36	0.074196208
15	pH 5.5	4.8681	4.8656	0.0025	0.25	0.051354738
16	pH 7	4.8659	4.8644	0.0015	0.15	0.030826774
17	Fe 0 g	4.8035	4.7937	0.0098	0.98	0.204017904
18	Fe 1.4 g	4.843	4.8357	0.0073	0.73	0.150733017
19	Fe 2.78 g	4.8674	4.8605	0.0069	0.69	0.141759461
20	Fe 8.34 g	4.8303	4.8218	0.0085	0.85	0.175972507
21	HCl 1N	4.8808	4.8755	0.0053	0.53	0.108588756
22	H ₂ SO ₄ 1N	4.8542	4.8508	0.0034	0.34	0.070042437
23	H ₂ O ₂ 50%	4.8436	4.8371	0.0065	0.65	0.134197704

Pirinç iş parçası için enzimatik biyo-işleme süreci neticesinde elde edilen **MRR** ve **SMRR** miktarları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Pirinç iş parçası MRR ve SMRR sonuçları

Deney	ΔW (g)	ΔW (ng)	A (nm ²)	T (saat)	MRR (ng/saat)	SMRR (ng/nm ² .saat)
1	0.0054	5400000	4.73E+14	6	900000	1.90E-09
2	0.0066	6600000	4.73E+14	6	1100000	2.33E-09
3	0.011	11000000	4.73E+14	6	1833333.333	3.88E-09
4	0.0123	12300000	4.74E+14	6	2050000	4.33E-09
5	0.0065	6500000	4.76E+14	6	1083333.333	2.27E-09
6	0.0081	8100000	4.75E+14	6	1350000	2.84E-09
7	0.0077	7700000	4.76E+14	6	1283333.333	2.70E-09
8	0.0098	9800000	4.70E+14	6	1633333.333	3.47E-09
9	0.0044	4400000	4.73E+14	6	733333.3333	1.55E-09
10	0.0005	500000	4.74E+14	2	250000	5.28E-10
11	0.0022	2200000	4.76E+14	4	550000	1.15E-09
12	0.0207	20700000	4.57E+14	12	1725000	3.77E-09
13	0.0004	400000	4.74E+14	6	66666.66667	1.41E-10
14	0.0036	3600000	4.75E+14	6	600000	1.26E-09
15	0.0025	2500000	4.75E+14	6	416666.6667	8.77E-10
16	0.0015	1500000	4.76E+14	6	250000	5.25E-10
17	0.0098	9800000	4.72E+14	6	1633333.333	3.46E-09
18	0.0073	7300000	4.75E+14	6	1216666.667	2.56E-09
19	0.0069	6900000	4.75E+14	6	1150000	2.42E-09
20	0.0085	8500000	4.74E+14	6	1416666.667	2.99E-09
21	0.0053	5300000	4.76E+14	6	883333.3333	1.86E-09
22	0.0034	3400000	4.75E+14	6	566666.6667	1.19E-09
23	0.0065	6500000	4.75E+14	6	1083333.333	2.28E-09

Çizelge incelendiğinde, deney 1’de maksimum SMRR değeri 4.33E-09 ng/nm²saat ve deney 15’de minimum SMRR miktarı 8.77E-10 ng/nm²saat elde edilmiştir. Ancak

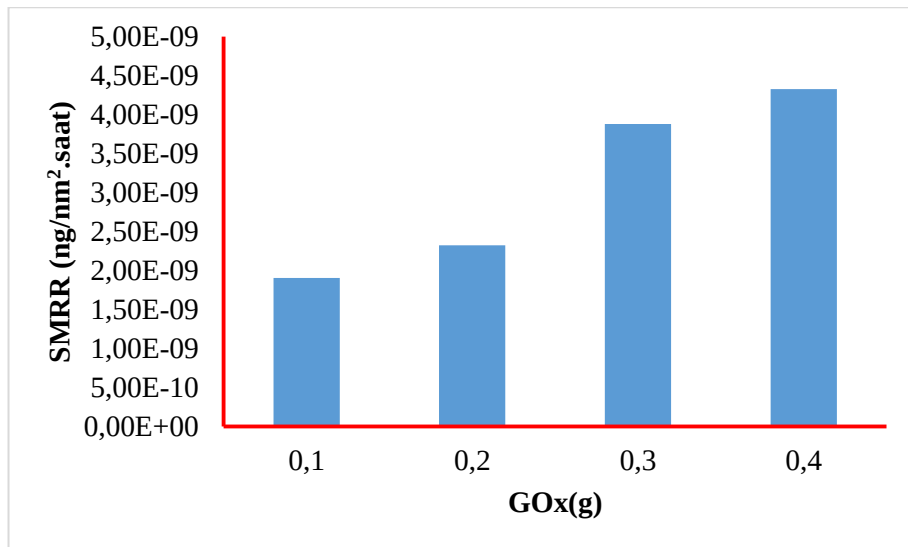
istenilen uygun işleme miktarını sağlamak için Çizelge 4.3'te yer alan farklı biyo-işleme koşulları uygulanabilir.

4.2.1.c. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi

Pirinç iş parçasının biyo-işlemesini etkileyen önemli parametreler detaylı şekilde aşağıda açıklanmıştır.

1. Glukoz oksidaz enzimi miktarının etkisi

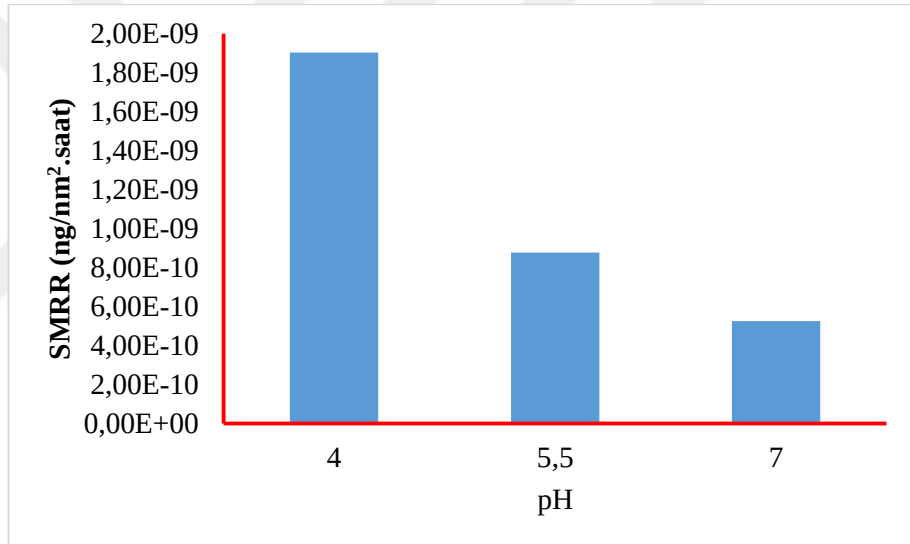
Enzimatik biyo-işleme prosesinde gerçekleştirilen biyo-Fenton reaksiyonuna göre, Denklem 2.11, ortamdaki enzim miktarı reaksiyon hızını önemli derecede etkilemektedir. Reaksiyon ortamında yeterince substrat bulunursa, reaksiyon doğru orantılı olarak artar. Pirinç iş parçasının biyo işlenmesinde kullanılan GOx enziminin etkisine dair SMRR sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzim miktarı arttıkça, metal kaldırma hızı da artmaktadır ve biyo-nanoişleme süreci yüksek oranlarda gerçekleşmektedir.



Şekil 4.5. Pirincin biyo-işlemesi üzerine GOx miktarının etkisi

2. pH etkisi

Biyo-işleme sürecini etkileyen önemli faktörlerden biri reaksiyon ortamının pH'sıdır. Enzimler, ortamın kimyasal bileşimine göre etkisiz veya çok etkili performans sergileyebilirler. Bundan dolayı, pH faktörünün GOx enziminin aktivitesine ve metal kaldırma hızı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, üç farklı pH (4.0, 5.5, 7.0) değerine göre, diğer koşulları (sıcaklık, karıştırma hızı, GOx, Glikoz ve Demir miktarı) sabit tutarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir.

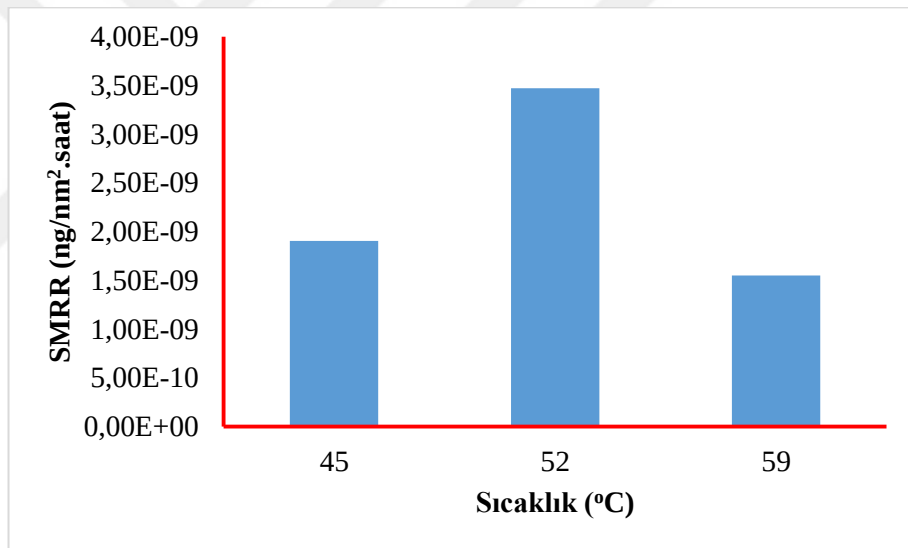


Şekil 4.6. GOx enzimi ile pirinç üzerinde yapılan biyo-işlemede pH'nın etkisi

Şekil 4.6'ya göre reaksiyon ortamının pH değeri büyük oranda enzimin aktivitesini etkilediği görülmektedir. GOx enzimi pH 4'te maksimum aktivitesini gösterirken pH 7'de aktivitesini büyük oranda kaybetmektedir. Bu sonuç göz önüne alınarak, yapılan tüm pirinç biyo-işleme süreçleri, GOx enzimi için pH 4'e göre yapılmıştır. pH 4'de özgül metal kaldırma hızı (SMRR) en yüksek değerlere ($1.90\text{E-}9 \text{ ng/nm}^2.\text{saat}$) ulaşırken, pH 7'de minimum seviyede ($0.525\text{E-}10 \text{ ng/nm}^2.\text{saat}$) olmuştur.

3. Sıcaklık etkisi

Her enzimatik reaksiyonunun optimal bir sıcaklık seviyesi vardır ve yüksek sıcaklıklarda enzimlerin ilk yapıları bozulmakta ve aktiviteleri kaybolmaktadır. Bu amaca yönelik olarak sıcaklığın pirinç biyo-işleme üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.7’de SMRR miktarı üzerine işleme sıcaklığının etkisi, yani GOx enziminin belirli sıcaklıklardaki etkisi gösterilmektedir. Şekil 4.7’ye göre sıcaklık arttıkça SMRR miktarı artış göstermiş, ancak yüksek sıcaklıklara ulaştığımız zaman enzim yapısının bozulmasından dolayı metal kaldırma hızı azalmaya başlamıştır. Elde edilen sonuçlara göre GOx enzimi ile en fazla biyolojik nanoişleme 52°C’da gerçekleştirilmiştir.

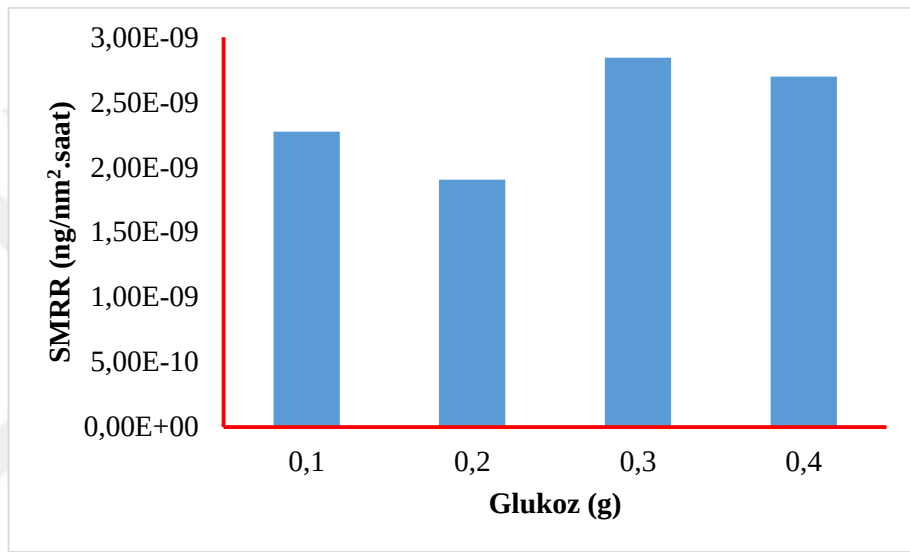


Şekil 4.7. Enzimatik işlemede sıcaklığın etkisi

4. Substrat (glukoz) miktarının etkisi

Ortamda reaksiyon hızını artırıcı etkenlerden biri de enzim ve substrat miktarlarıdır. Her ikisinin miktarı belirli oranlarda artırılırsa reaksiyon hızı da artmaktadır. Bu çalışmada, glukoz substrat miktarı etkisini araştırmak için dört farklı substrat miktarı kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; substrat miktarı, metal kaldırma hızı ile doğrudan bağlantılı olmakla birlikte, yüksek substrat

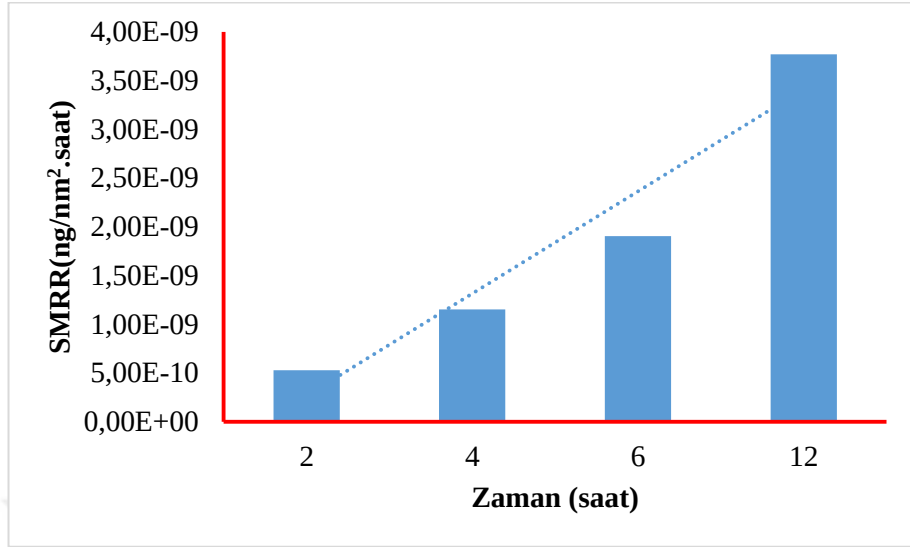
miktarlarında metal kaldırma miktarında düşüş gözlenmektedir. Bunun sebebi olarak, ortamda yeterince GOx enzimi bulunmadığı şeklinde açıklanabilir. İstenen SMRR miktarlarına ulaşmak için herhangi bir glukoz miktarı biyo-işleme prosesine uygulanabilir ve herhangi bir sınırlama bulunmamaktadır. Bununla birlikte, reaksiyon ortamında yeterli miktarda enzim bulunmazsa substratın fazla kullanılmasının önemi kalmamaktadır.



Şekil 4.8. Biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi

5. Reaksiyon süresinin etkisi

Reaksiyonu etkileyen en önemli parametrelerden biri de zamandır. Genel olarak reaksiyon tipine bağlı olarak, süreye bağlı olarak reaksiyon da artış göstermektedir. Ancak reaksiyon hızı ortamdaki bileşenlerin tükenmesi ile birlikte yavaşlayıp ve sona ermektedir. Şekil 4.9'da SMRR üzerinde zaman parametresinin etkisi verilmektedir. Grafiğe göre uzun zaman içinde biyo-işleme daha fazla ilerlemekte ve yüksek miktarlarda iş parçası üzerinden metal kaldırılmaktadır. SMRR - zaman grafiğine göre, zaman ile metal kaldırma miktarları arasında nispeten doğrusal bir ilişkinin olduğu görülmekte ve dolayısıyla istenen SMRR miktarına ulaşmak için, diğer optimal koşulları göz önünde bulundurarak uygun bir zaman dilimi seçilebilir.

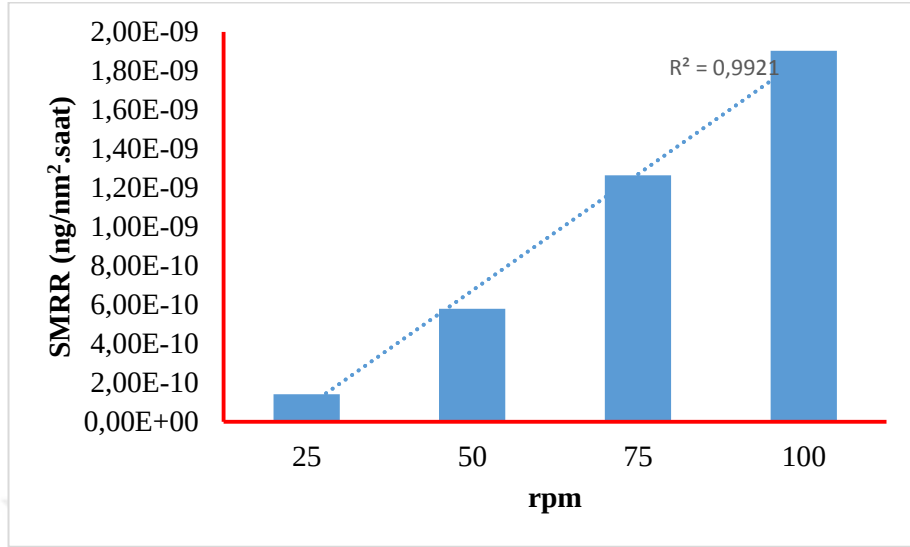


Şekil 4.9. Enzimatik işleme üzerinde zaman parametresinin etkisi

6. Karıştırma hızının etkisi

Kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların hızını etkileyen önemli parametrelerden bir diğeri ise reaksiyon ortamının karıştırılmasıdır. Bu faktörün biyo-işleme üzerindeki etkisini incelemek için dört farklı karıştırma hızında (25, 50, 75 ve 100 rpm) deneyler yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre:

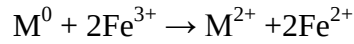
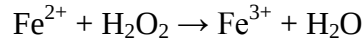
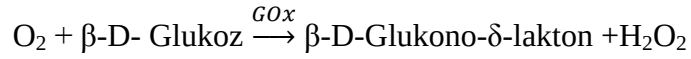
- Karıştırma hızı arttırıldıkça SMRR keskin bir şekilde artış göstermektedir.
- rpm ile SMRR arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır.
- Nano seviyelerde metal kaldırmak için yüksek rpm'lerde işlem yapılmalıdır.
- rpm 4 katına çıktığı zaman SMRR yaklaşık 13 katına çıkmıştır.



Şekil 4.10. Pirinç üzerinden metal kaldırma sürecinde biyo-işleme ortamının karıştırma hızının etkisi

7. Demir sülfat etkisi

Biyo-işlemede gerçekleşen reaksiyonlar:



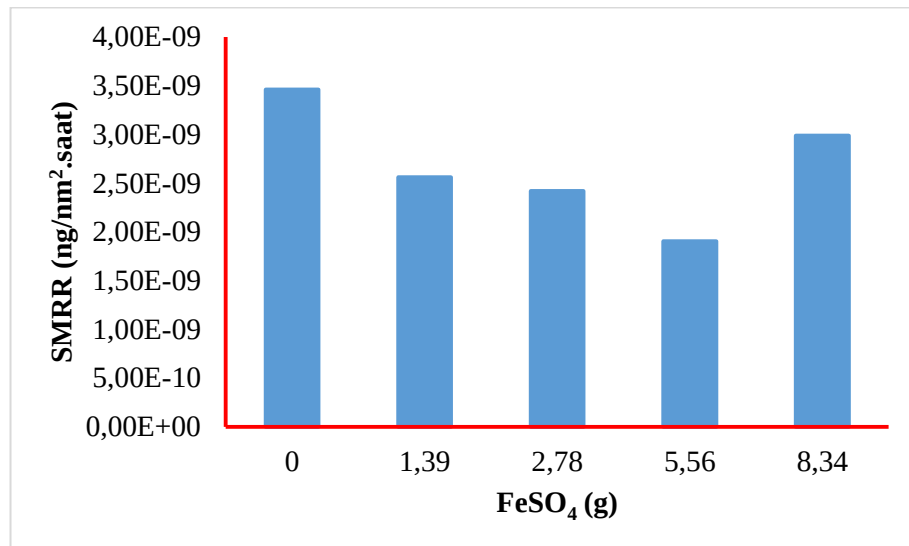
Reaksiyon ortamındaki demir miktarı biyo-işleme sürecinin ilerlemesinde önemli etkenlerden biridir. Bu parametrenin etkisini araştırmak üzere farklı demir konsantrasyonlarında deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar grafik haline dönüştürülmüştür. Şekil 4.11’de demir miktarının SMRR üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Bu grafiğe göre:

- glukozun oksidasyonundan ortaya çıkan H_2O_2 güçlü bir yükseltgen olduğundan dolayı, ortamdaki Fe^{2+} 'ler ile birlikte pirinç ($\text{Cu} + \text{Zn}$) alaşımının oksidasyonunu doğrudan sağlayabilmektedir. Çinkonun (Zn) standart elektrot potansiyeli demire (Fe) göre daha düşüktür:



Dolayısıyla pirinç alaşımındaki çinko elementi direkt oksidasyon olayına maruz kalmaktadır.

- Biyo-nanoişleme prosesi biyo-Fenton reaksiyonundan bağımsızdır ve reaksiyon ortamında $\text{Fe}(\text{II})$ bulunmadığı halde en yüksek verimlere ulaşmaktadır.



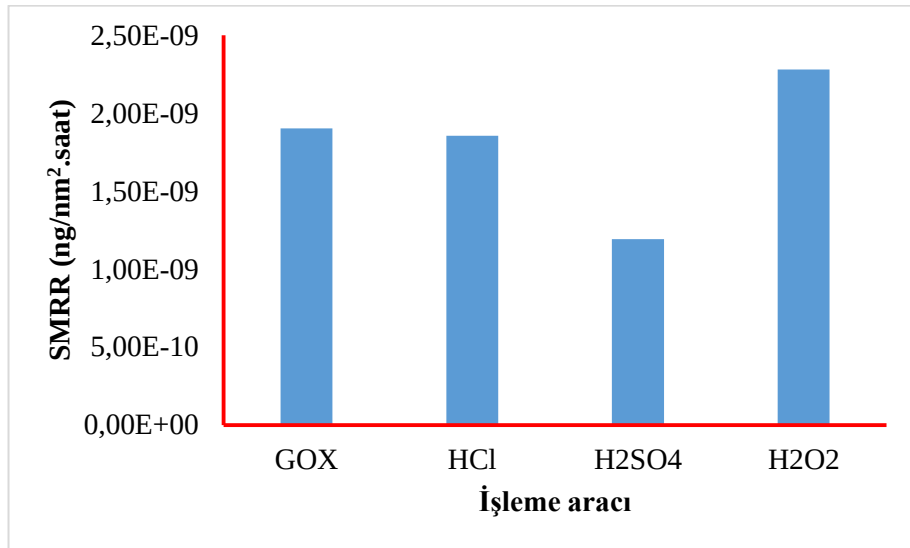
Şekil 4.11. Metal kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamındaki $\text{Fe}(\text{II})$ etkisi, 100 ml reaksiyon çözeltisi

8. Diğer işleme araçları

Enzimatik işleme prosesini geleneksel işleme araçları ile kıyaslamak amacıyla metal- işleme prosesi genel koşulları sabit tutarak dört farklı ortamda uygulanmıştır:

- Glukoz oksidaz (GOx) enzimi
- Hidroklorik asit (HCl) 1N
- Sülfürik asit (H_2SO_4) 1N
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) %50 v/v

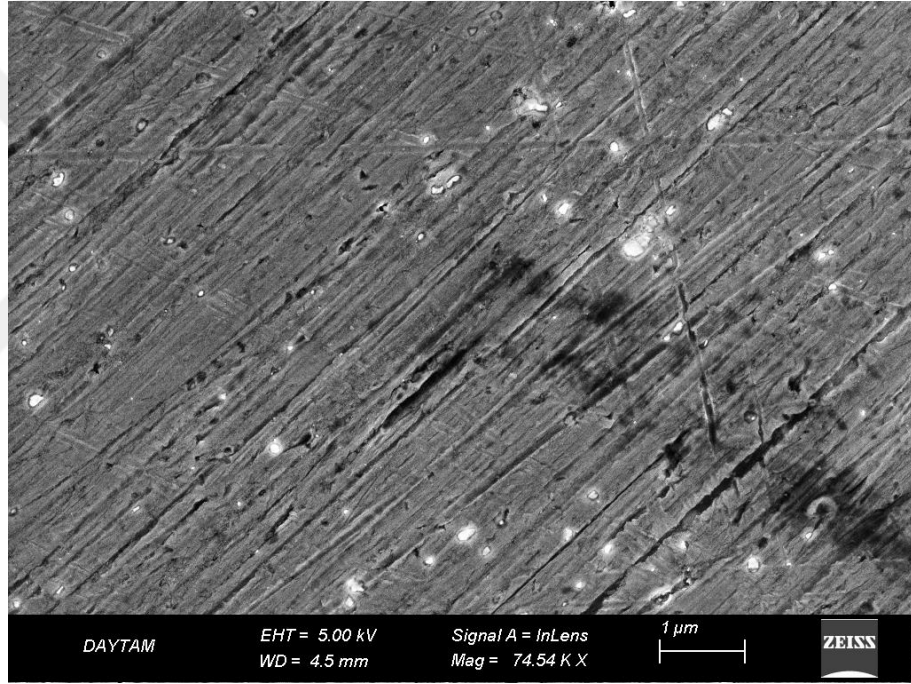
Altı saatlik deney sonrasında hidrojen peroksit en yüksek SMRR değerine ($2.28E-9$ $ng.nm^2.saat$) ulaşırken, sülfürik asit ile yapılan deney en düşük SMRR miktarını ($1.19E-9$ $ng.nm^2.saat$) vermiştir. GOx ve HCl ikinci ve üçüncü sırada yer almaktadırlar. Ancak yüzey morfolojisine (SEM görüntüleri) bakıldığında, enzimatik işlemin geleneksel metotlara göre çok daha düzgün yüzey işleme aracı olduğu görülmektedir. GOx enzimi ile hiçbir yan etki göstermeden metal üzerinde kontrolü bir şekilde düzgün bir yüzey elde edilmektedir. Sonuçlar Şekil 4.12’de verilmiştir.



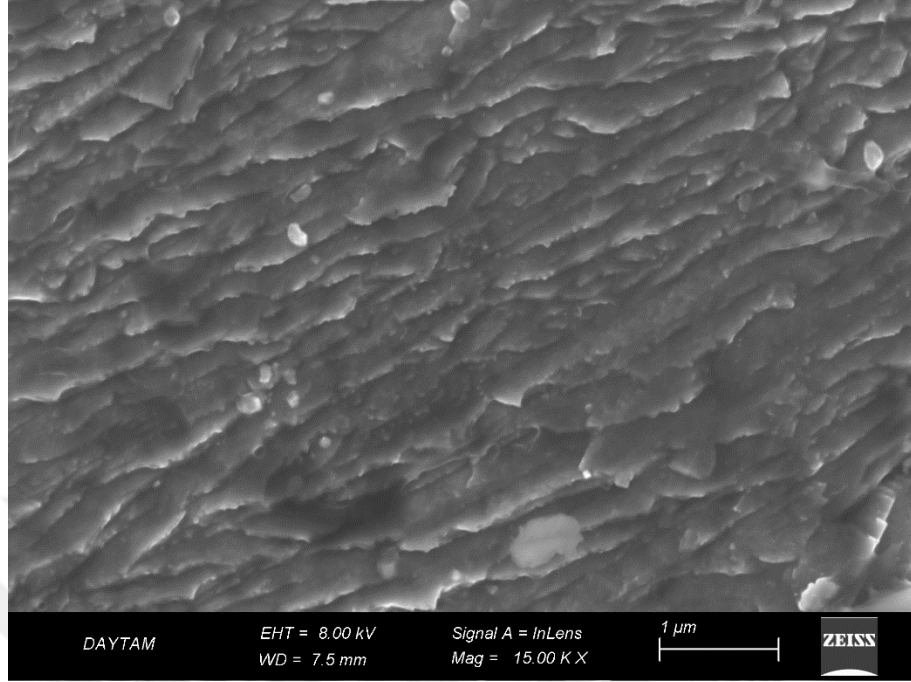
Şekil 4.12. Metal kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti, HCl:1N, H_2SO_4 :1N, H_2O_2 :50%v/v, GOx:0.1g, 100mL reaksiyon çözeltisi

9. SEM analizleri

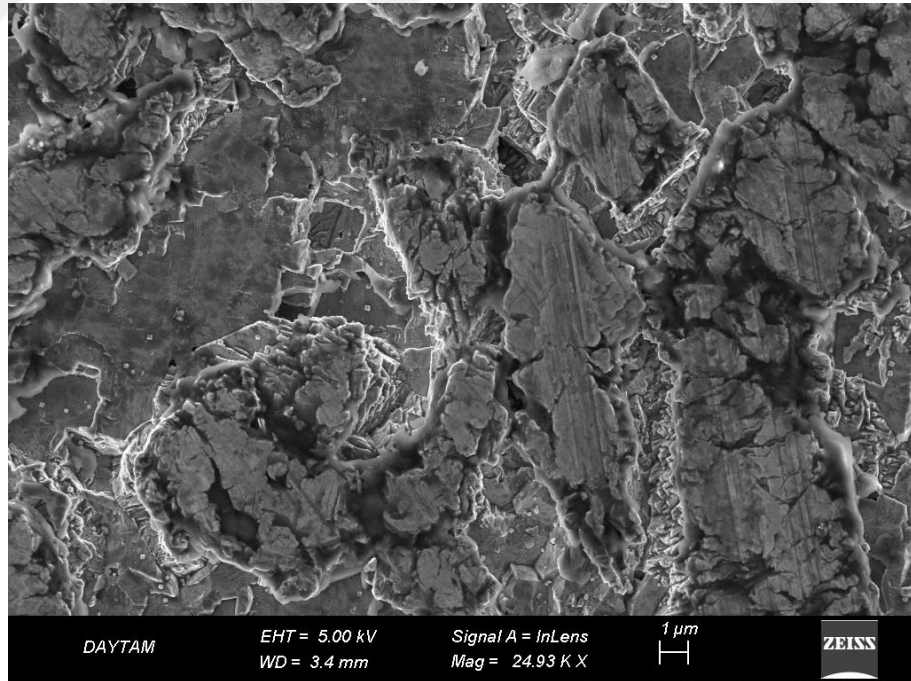
Yapılan deneylerin sonuçlarını görüntülemek için pirinç iş parçalarının SEM analizleri yapılarak, SEM mikrografları Şekil 4.13 ila 4.17’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre enzimatik işleme, diğer işleme metotlarına göre daha düzgün ve kontrollü yapılmış ve metal iş parçası üzerinde herhangi bir yan etki ve hasar vermeden nano derinliklerde bir işleme gerçekleştirilmiş olup, iş parçası üzerinde nano boyutta pürüzlülüğe sebep olduğu görülmüştür.



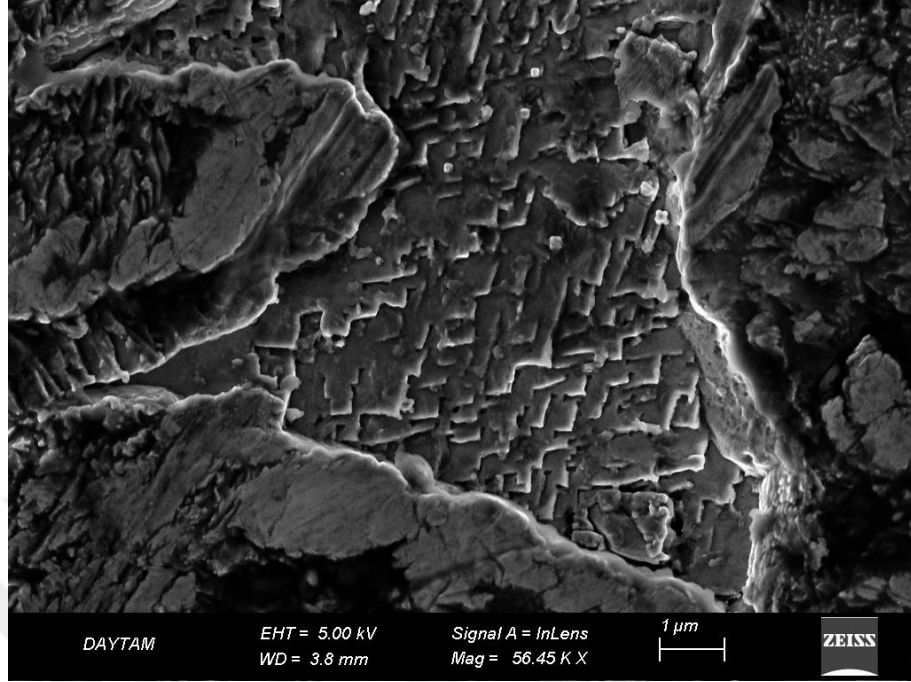
Şekil 4.13. Pirinç kontrol numunesinin SEM görüntüsü



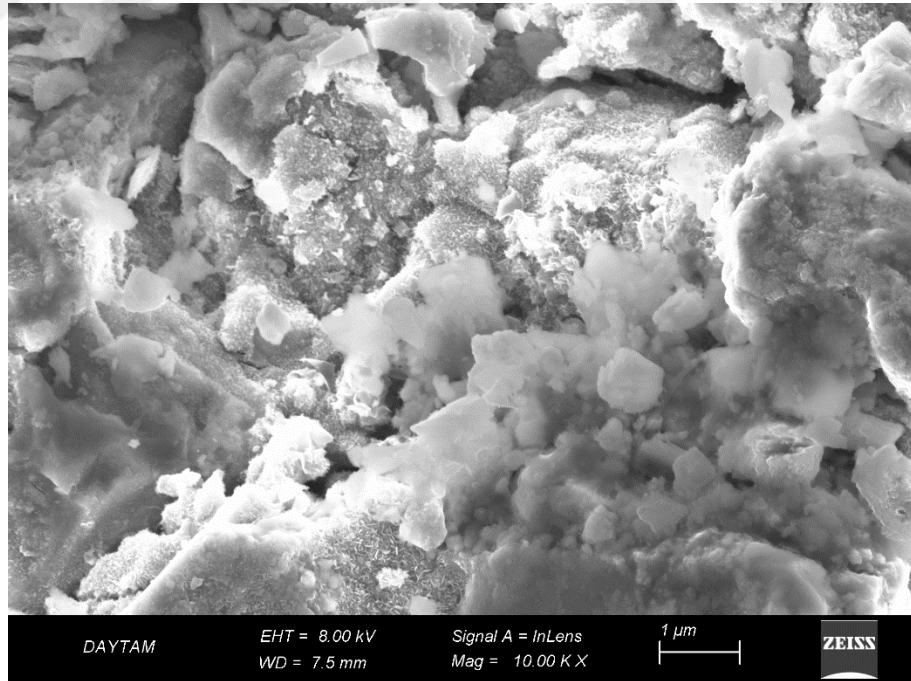
Şekil 4.14. Pirinç iş parçası üzerinde GOx ile yapılan biyo-işlemenin SEM görüntüsü



Şekil 4.15. Pirinç üzerinde HCl ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü



Şekil 4.16. Pirinç iş parçası üzerinde H_2SO_4 ile gerçekleşen işlemenin SEM görüntüsü



Şekil 4.17. Pirinç iş parçası üzerinde H_2O_2 ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü

10. AFM analizleri

İşleme sonunda metal parçaları yüzeylerinde oluşan pürüzlülükler, AFM ile taranıp ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

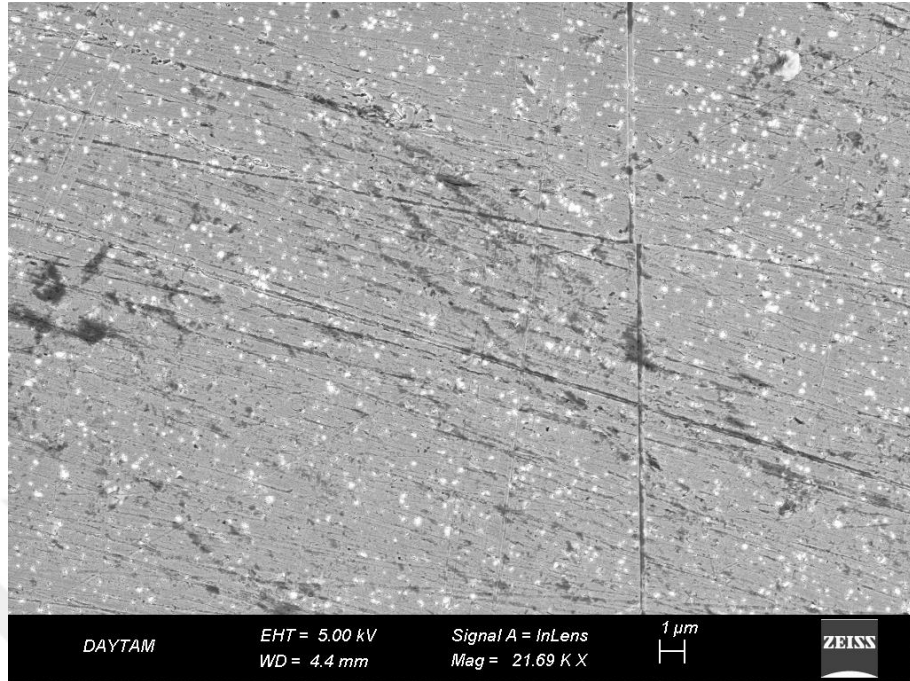
Çizelge 4.5. İşlenmiş pirinç numunelerin pürüzlülük değerleri

Numune	İşleme metotlu	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	-	2.346	15.55	3.620	48.95
Pirinç	Enzimatik	4.120	24.49	4.176	46.51
Pirinç	HCl	12.14	62.03	5.72	217.02
Pirinç	H ₂ SO ₄	9.39	43.74	24.31	148.72
Pirinç	H ₂ O ₂	18.83	86.03	47.55	331.42

Çizelgede verilen sonuçlara göre, enzim ile işlenmiş numunenin pürüzlülüğü (Ra) kontrol numunesine daha yakındır. Bu da SEM görüntülerini ve diğer deneylerden elde edilen sonuçları kanıtlamaktadır. Geleneksel yöntemler içinde hidrojen peroksit en çok ve sülfürik asit ise en az pürüzlülüğe sebep olmaktadır.

4.2.2. Bakır

Biyo-işleme prosesi için seçilen diğer metal bakırdır. Bakır iş parçaları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilen prosedüre göre hazırlandıktan sonra, deney öncesi yüzey morfoloji analizleri yani SEM görüntüsü ve AFM analizi yapılmıştır. Ayrıca aynı numunelerin element kompozisyonunu belirlenmek için EDX analizi yapılmıştır. Şekil 4.18'de morfoloji görüntüsü ve Çizelge 4.6 ve 4.7'de EDX ve AFM analiz sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.18. Orijinal bakır numunesinin SEM görüntüsü

Çizelge 4.6. Orijinal bakır numunesinin elementel analizi sonuçları

Element	Ağırlık %	Atomik %
Bakır (Cu)	98.5	94.5
Oksijen (O)	1.5	5.5

Çizelge 4.7. Orijinal bakır numunesinin pürüzlülük analiz sonuçları

Numune	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	2.346	15.55	3.620	48.98

4.2.2.a. Bakır iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları

Deneyler sırasında kullanılan bakır iş parçalarının kütleleri, deneylerden önce ve sonra 0.1mg hassasiyetindeki terazi ile tartılmış ve sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir. Bu sonuçlar deney düzeneği koşullarında (Çizelge 3.17) elde edilmiştir. Biyo-işleme

sonrası kütle kaybı (K.K.), kütle kaybı yüzdesi (K.K.Y.) ve enzimatik biyo-nanoişleme verimi (B. Verimi) 4.1, 4.2 ve 4.3 denklemleri ile hesaplanmıştır. Ayrıca özgül metal kaldırma hızı “**SMRR**” Denklem 4.4 ve 4.5 ile hesaplandıktan sonra sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Bakır iş parçası ağırlık analiz sonuçları

Deney	Parametre	İ. ağırlık (g)	S. ağırlık (g)	K. K. (g)	K.K.Y. %	B. verimi
1	GOx 0.1 g	5.2525	5.2475	0.005	0.5	0.095192765
2	GOx 0.2 g	5.2723	5.2661	0.0062	0.62	0.117595736
3	GOx 0.3 g	5.2914	5.2837	0.0077	0.77	0.145519144
4	GOx 0.4 g	5.2653	5.2548	0.0105	1.05	0.199418837
5	Glukoz 0.1g	5.2986	5.2935	0.0051	0.51	0.09625184
6	Glukoz 0.3g	5.2882	5.2826	0.0056	0.56	0.105896146
7	Glukoz 0.4g	5.324	5.3176	0.0064	0.64	0.120210368
8	T 52 °C	5.2832	5.2758	0.0074	0.74	0.140066626
9	T 59 °C	5.3222	5.3178	0.0044	0.44	0.082672579
10	T 2 saat	5.2897	5.2894	0.0003	0.03	0.005671399
11	T 4 saat	5.2913	5.2897	0.0016	0.16	0.030238316
12	T 12 saat	5.646	5.6329	0.0131	1.31	0.232022671
13	Rpm 25	5.3066	5.3064	0.0002	0.02	0.003768892
14	Rpm 75	5.2396	5.2364	0.0032	0.32	0.061073364
15	pH 5.5	5.2992	5.2984	0.0008	0.08	0.015096618
16	pH 7	5.2891	5.2873	0.0018	0.18	0.034032255
17	Fe 0 g	5.2747	5.2708	0.0039	0.39	0.073937854
18	Fe 1.4 g	5.2607	5.2567	0.004	0.4	0.076035509
19	Fe 2.78 g	5.2893	5.285	0.0043	0.43	0.081296202
20	Fe 8.34 g	5.2422	5.2352	0.007	0.7	0.133531723
21	HCl 1N	5.2947	5.2791	0.0156	1.56	0.294634257
22	H ₂ SO ₄ 1N	5.2607	5.2576	0.0031	0.31	0.058927519
23	H ₂ O ₂ 50%	5.2908	5.2899	0.0009	0.09	0.01701066

Bu çizelgeye göre etkin parametreler içinde pH ve Sıcaklık önemli iki kritik parametre olarak değerlendirilebilir. Her iki parametre enzim aktivitesini doğrudan etkilemektedir. Optimal olmayan pH ve sıcaklık değerlerinde enzim tamamen denatüre haline gelebilmektedir. Diğer etkin parametreler istenen amaca göre tasarlanabilir.

Çizelge 4.9. Bakır iş parçası MRR ve SMRR sonuçları

Deney	ΔW (g)	ΔW (ng)	A (nm ²)	T (saat)	MRR (ng/saat)	SMRR (ng/nm ² .saat)
1	0.005	5000000	4.79E+14	6	833333.3333	1.74E-09
2	0.0062	6200000	4.79E+14	6	1033333.333	2.16E-09
3	0.0077	7700000	4.79E+14	6	1283333.333	2.68E-09
4	0.0105	10500000	4.78E+14	6	1750000	3.66E-09
5	0.0051	5100000	4.80E+14	6	850000	1.77E-09
6	0.0056	5600000	4.79E+14	6	933333.3333	1.95E-09
7	0.0064	6400000	4.80E+14	6	1066666.667	2.22E-09
8	0.0074	7400000	4.80E+14	6	1233333.333	2.57E-09
9	0.0044	4400000	4.81E+14	6	733333.3333	1.53E-09
10	0.0003	300000	4.79E+14	2	150000	3.13E-10
11	0.0016	1600000	4.79E+14	4	400000	8.34E-10
12	0.0131	13100000	4.93E+14	12	1091666.667	2.22E-09
13	0.0002	200000	4.80E+14	6	33333.33333	6.95E-11
14	0.0032	3200000	4.78E+14	6	533333.3333	1.11E-09
15	0.0008	800000	4.78E+14	6	133333.3333	2.79E-10
16	0.0018	1800000	4.79E+14	6	300000	6.27E-10
17	0.0039	3900000	4.79E+14	6	650000	1.36E-09
18	0.004	4000000	4.78E+14	6	666666.6667	1.39E-09
19	0.0043	4300000	4.79E+14	6	716666.6667	1.50E-09
20	0.007	7000000	4.79E+14	6	1166666.667	2.44E-09
21	0.0156	15600000	4.77E+14	6	2600000	5.45E-09
22	0.0031	3100000	4.78E+14	6	516666.6667	1.08E-09
23	0.0009	900000	4.79E+14	6	150000	3.13E-10

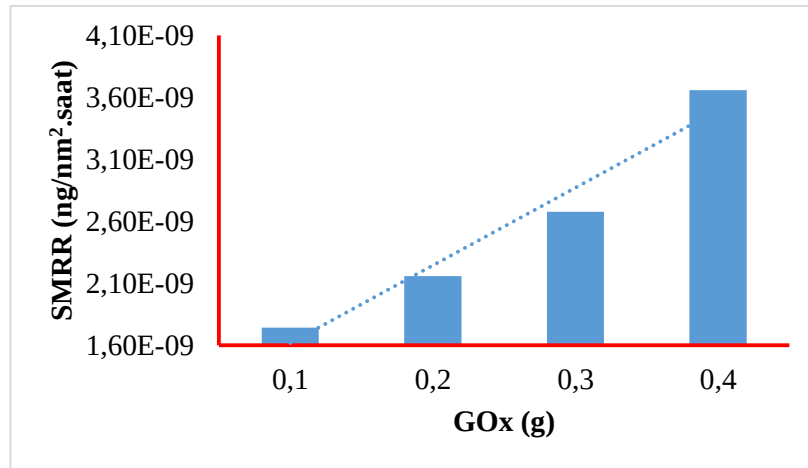
Çizelge incelendiğinde farklı faktörlerin SMRR üzerinde etkileri net bir şekilde görülmektedir. En yüksek biyolojik işleme miktarı $3.66E-9$ ng/nm².saat olarak Deney 4 koşullarında elde edilirken, en düşük miktar Deney 13'te $1.11E-11$ ng.nm².saat olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte istenen nano-işleme miktarına ulaşmak için farklı deney koşulları göz önüne alınmalıdır.

4.2.2.b. Enzimatik işleme üzerindeki etkin parametreler

Biyolojik işleme prosesini etkileyen önemli parametreleri araştırmak amacıyla bakır iş parçası üzerinde deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar grafikler halinde verilerek tartışılmıştır.

1. GOx enziminin etkisi

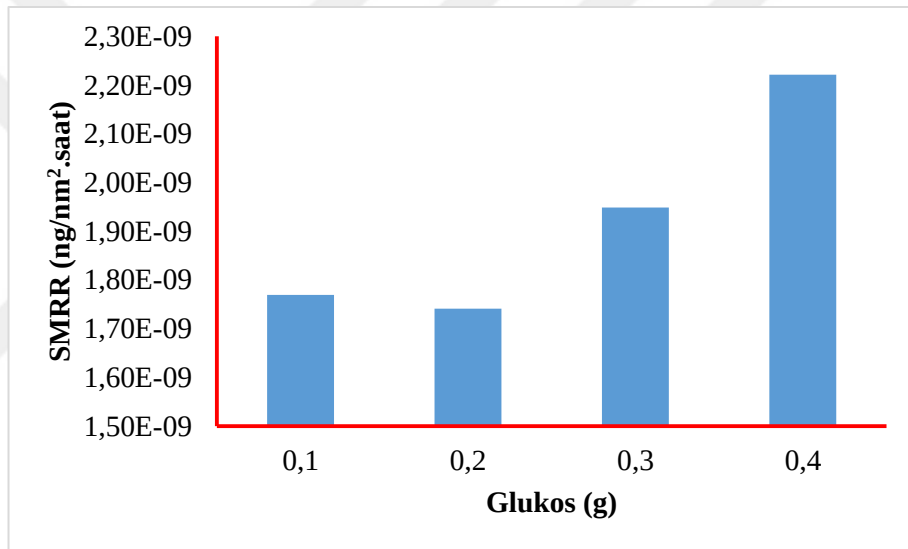
Bakır iş parçaları üzerinde GOx enziminin biyo-işleme üzerindeki etkisini araştırmak için dört farklı enzim miktarı ile altı saat süreli biyo-işleme süreci gerçekleştirilmiş ve yapılan hesaplamalar Şekil 4.19'da verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre GOx miktarı ile SMRR arasında doğrusal bir bağlantının varlığı tespit edilmiş, ancak yüksek GOx miktarlarında metal kaldırma hızının yavaşladığı belirlenmiştir. Bunun sebebinin, reaksiyon ortamında yeterli miktarda substratın bulunmaması olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.19. GOx miktarının bakırın biyo işlemesi üzerine etkisi

2. Glukoz (substrat) miktarının etkisi

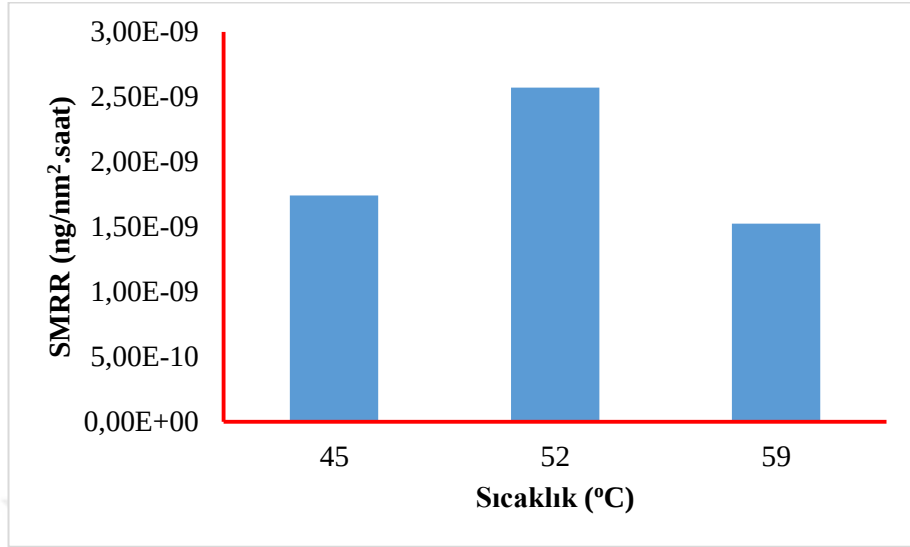
Glukoz, glukoz oksidaz enzimi ile yapılan biyolojik işlemenin temel reaksiyonunda bulunan reaktantlardan biridir ve enzimin substratıdır. Bu substratın metal kaldırma işlemindeki etkisini araştırmak için dört farklı konsantrasyonda deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve 4.9 ve Şekil 4.20’de verilmiştir. Grafiğe göre glukoz miktarı arttıkça SMRR miktarında da artış meydana gelmektedir. Ancak ortamda yeterli miktarda enzim bulunmadığında biyolojik işleme yavaşlamaktadır.



Şekil 4.20. Bakırın biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi

3. Sıcaklığın etkisi

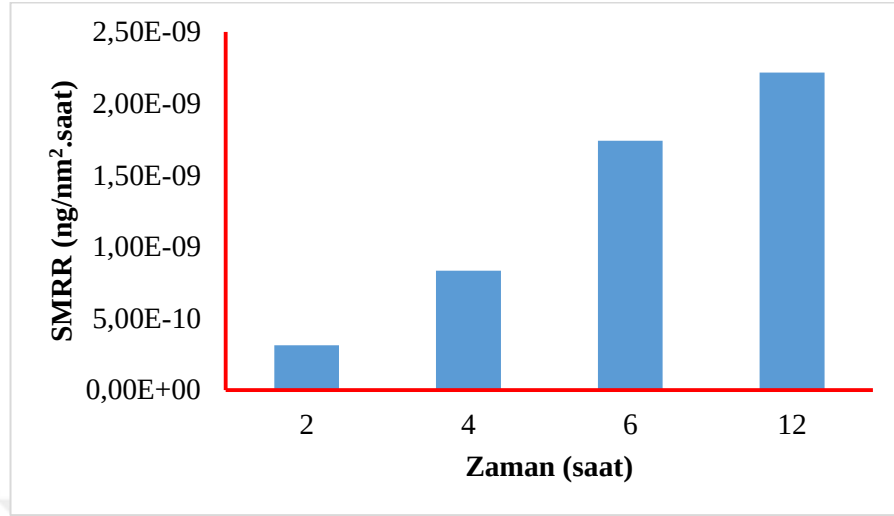
Enzimatik reaksiyonlar optimum sıcaklık değerlerinde gerçekleşirler. Yüksek sıcaklıklarda enzimin yapısı bozulmakta, denatüre hale gelmekte ve aktivitesini kaybetmektedir. Düşük sıcaklıklarda ise, yapısı bozulmaz fakat aktivitesini tam olarak gösteremez. Dolayısıyla en uygun sıcaklığı bulmak için üç farklı sıcaklıkta biyo işleme yapılmış ve elde edilen K.K.Y. ve SMRR değerlerinden 52°C’in en optimum sıcaklık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21. Bakırın enzimatik işleminde sıcaklığın etkisi

4. Zaman parametresinin biyo-işlemede etkisi

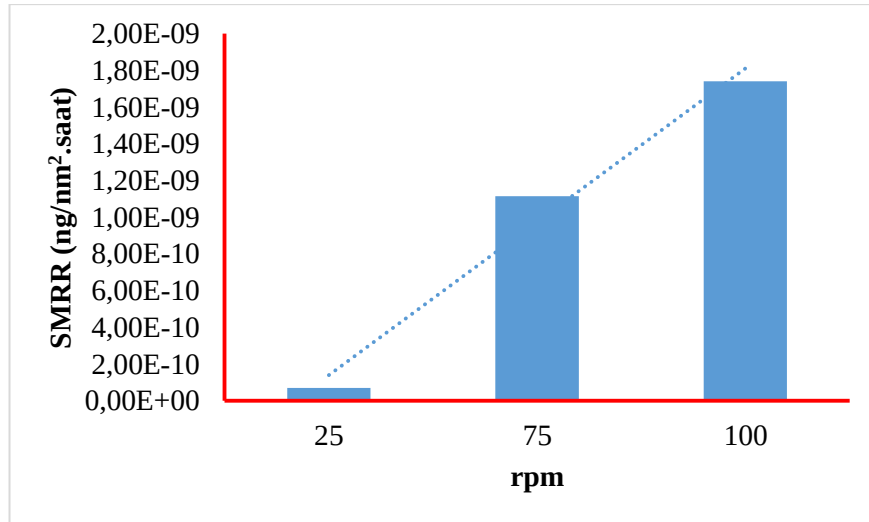
Bütün reaksiyonlar zamana bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. Bu parametrenin etkisini araştırmak için bakırın biyo-işleminde dört farklı süreç içerisinde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre süre artışıyla birlikte reaksiyon hızı da doğrusal bir artış göstermektedir. Ancak uzun işlem sürelerinde, bu artış ortamdaki bileşenler tükendiği için düşüş göstermeye başlamakta ve zamanla sabit bir hale gelmektedir. Şekil 4.22’de 6 saatlik sürede SMRR’nin $1.74E-9$ ng/nm².saat olduğu halde, 12 saat içerisinde $2.22E-9$ ng/nm².saat’a ulaştığı görülmektedir. Bu da zamanla biyolojik reaksiyonun yavaşladığını göstermektedir.



Şekil 4.22. Bakırın enzimatik işlemesi üzerinde zaman parametresinin etkisi

5. Karıştırma hızının etkisi

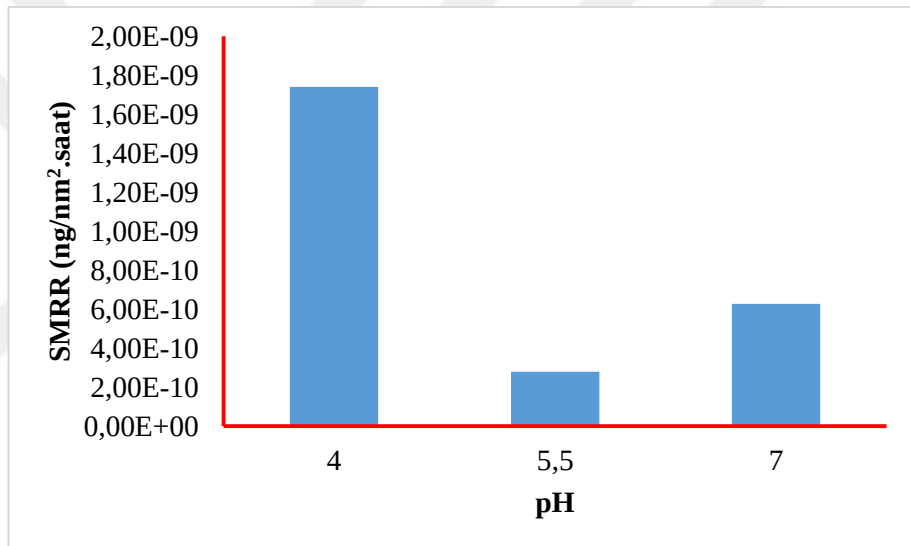
Reaksiyonlar, karıştırıldığı zaman moleküller aralarındaki çarpışma sayısının artmasından dolayı daha hızlı ilerlemektedir. Karıştırma hızının etkisini biyo işleme prosesi üzerinde araştırmak için 25, 75 ve 100 rpm’lerde bakır iş parçası üzerinde biyo-ışleme yapılmış olup bulunan sonuçlar Şekil 4.23’te gösterilmiştir. Burada rpm ile SMRR arasında doğrusal bir ilişki söz konusudur.



Şekil 4.23. Metal kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamının karıştırılmasını etkisi

6. pH'nın etkisi

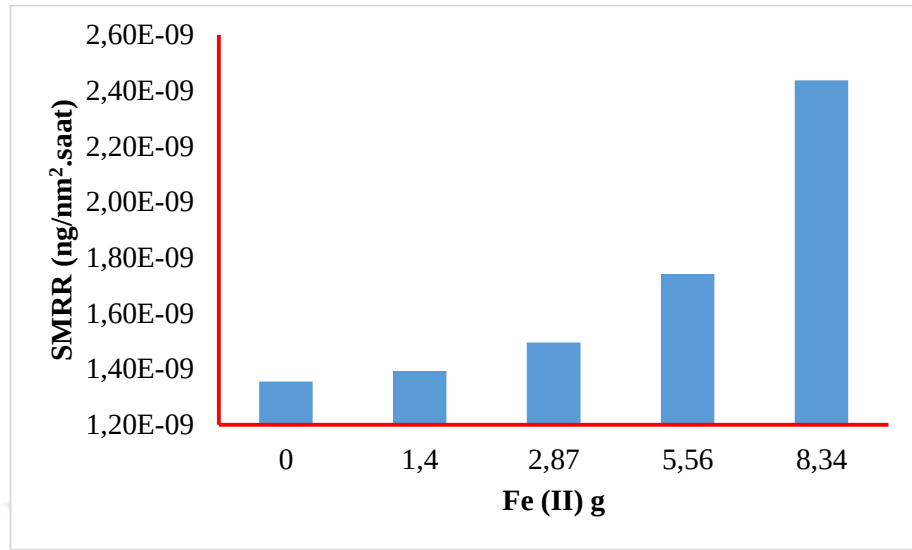
Bakırın biyolojik işleminde optimum pH değerini bulmak üzere üç pH değerinde biyo-işleme yapılmış olup, elde edilen sonuçlara göre pH 4'teki reaksiyon ortamında en fazla işleme gerçekleşmiştir. Bundan dolayı deneylerin bu pH değerinde yapılması uygundur. Şekil 4.24'de bakır iş parçası üzerinde pH'nın etkisi metal kaldırma miktarında verilmiştir. Altı saat biyo-işlemeden sonra en yüksek $1.74\text{E-}9 \text{ ng/nm}^2.\text{saat}$ SMRR değeri olarak pH 4'te görülmüştür.



Şekil 4.24. Bakır biyo-işleminde GOx enzimi üzerine pH'nın etkisi

7. Demir sülfatın etkisi

Biyo-işleme prosesi biyo-Fenton reaksiyonu yolu ile devam ettirildiğinde, ortamdaki Fe (II) miktarının etkisi izlenmelidir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda demir çözeltileri hazırlanmış ve bakırın biyo-işleme prosesindeki etkisi deneysel olarak araştırılmıştır. Altı saatlik deney sonrası elde edilen sonuçlar Şekil 4.25'de verilmiş olup, reaksiyon ortamındaki demir konsantrasyonu arttıkça metal kaldırma hızı da artmıştır.



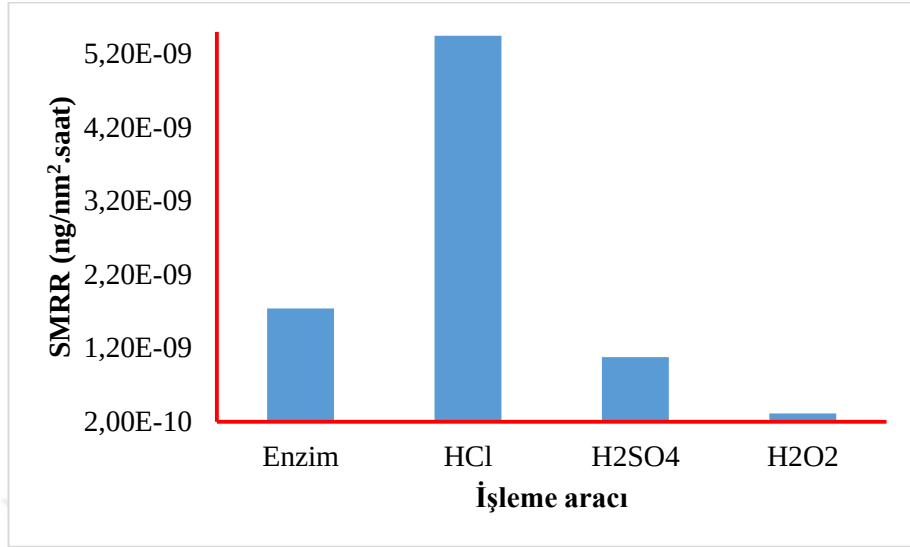
Şekil 4.25. Bakır iş parçasından metal kaldırma hızı üzerine Fe (II) konsantrasyonunun etkisi

8. Diğer işleme araçlarının etkisi

Enzimatik işleme prosesini geleneksel işleme araçları ile kıyaslamak için genel koşulları sabit tutarak, işleme prosesi dört farklı ortamda gerçekleştirildi;

- Glukoz oksidaz (GOx) enzimi
- Hidroklorik asit (HCl) 1N
- Sülfürik asit (H₂SO₄) 1N
- Hidrojen peroksit (H₂O₂) %50 v/v

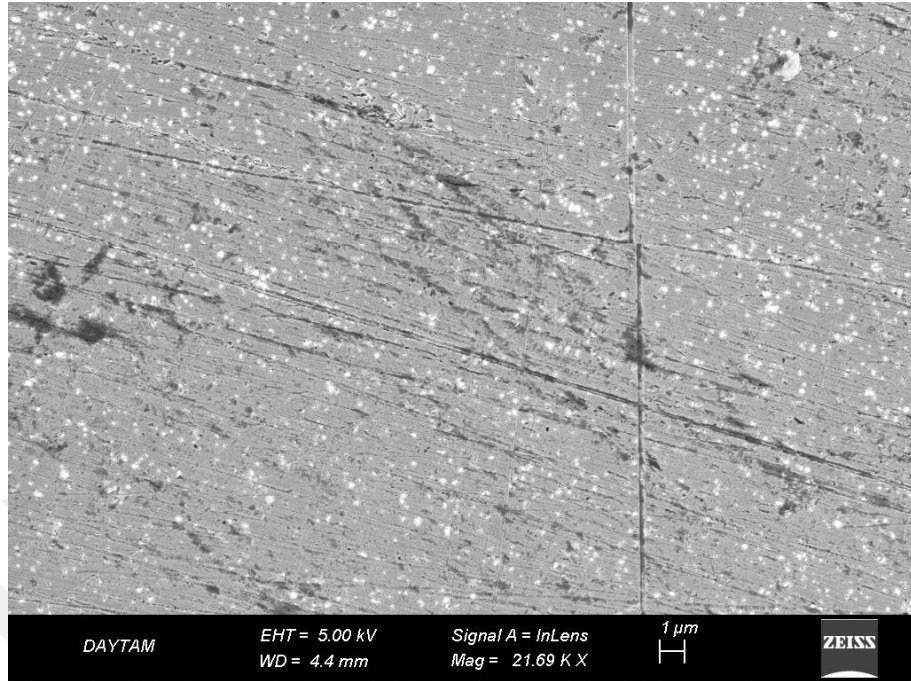
Altı saatlik deney sonrasında hidroklorik asit kullanılarak en yüksek SMRR değerine (5.45E-9 ng.nm².saat) ulaşılırken, hidrojen peroksit kullanıldığında en düşük SMRR (3.13E-10 ng.nm².saat) değerini vermiştir. GOx ve sülfürik asit ise ikinci ve üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 4.26). Yüzey morfolojileri (SEM görüntüleri) karşılaştırıldığında geleneksel metotların özellikle de asitlerin çok kötü bir işleme aracı olduğu ortaya çıkmaktadır. GOx enzimi hiçbir yan etki göstermeden metal üzerinde en üniform biyo-işlemeyi kontrollü bir şekilde yapmaktadır.



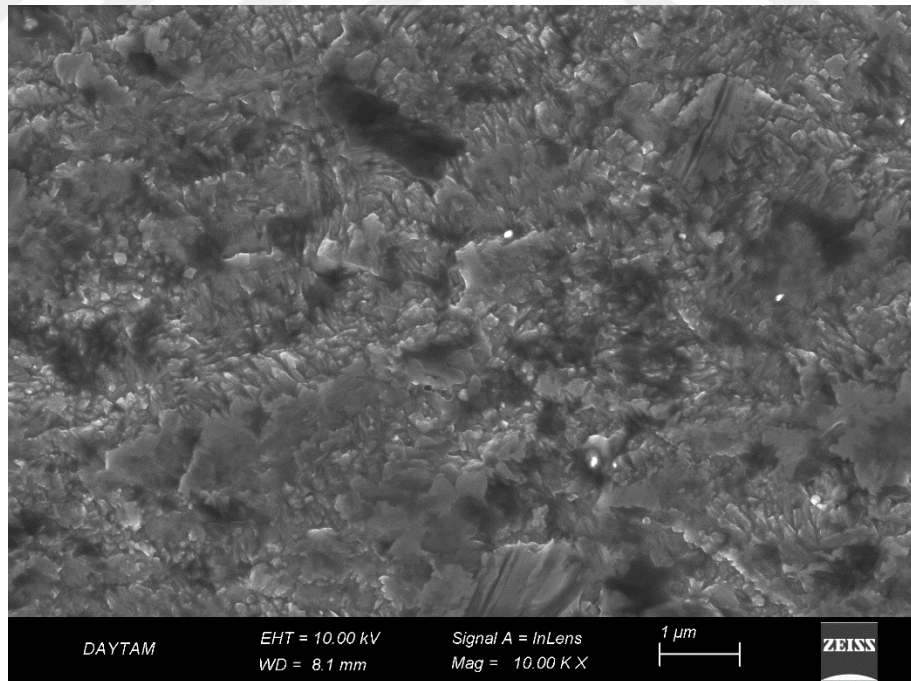
Şekil 4.26. Metal kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti, HCl:1N, H₂SO₄:1N, H₂O₂:50%v/v, GOx:0.1g, 100ml reaksiyon çözeltisi

4.2.2.c. SEM analizleri

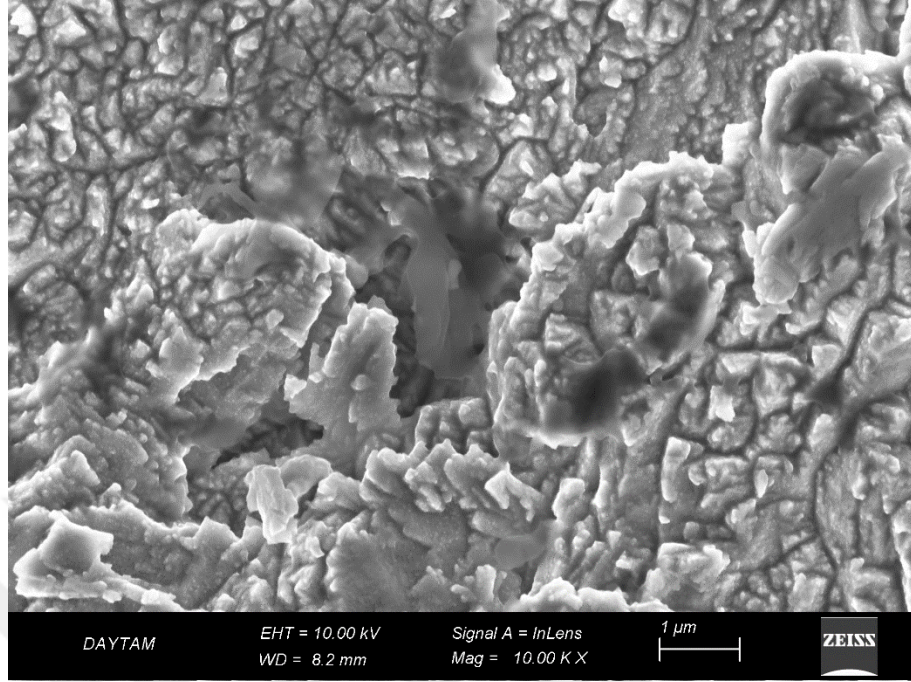
Deneylerin etkilerini görüntülemek için deneyler yapıldıktan sonra bakır iş parçalarının SEM analizleri yapılmıştır. SEM mikrografları Şekil 4.27 ila 4.31’de verilmiştir. Sonuçlara göre enzimatik işleme diğer işleme yöntemlerine göre daha düzgün ve daha kontrollü yapılmış ve metal iş parçası üzerinde herhangi bir yan etki ve hasar vermeden nano derinliklerde bir işleme gerçekleştirilmiştir. Hidroklorik asit en fazla hasara uğratarak hidrojen peroksitin etkisi görülmemiştir. Bu görüntüler Çizelge 4.10’daki sonuçları teyit etmektedir.



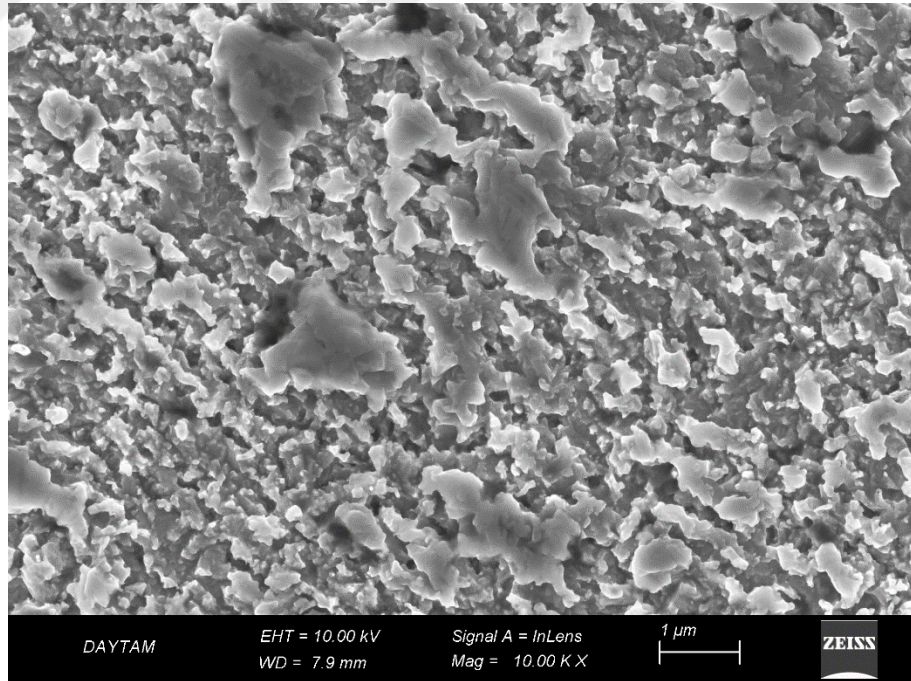
Şekil 4.27. Bakır kontrol numunenin SEM görüntüsü



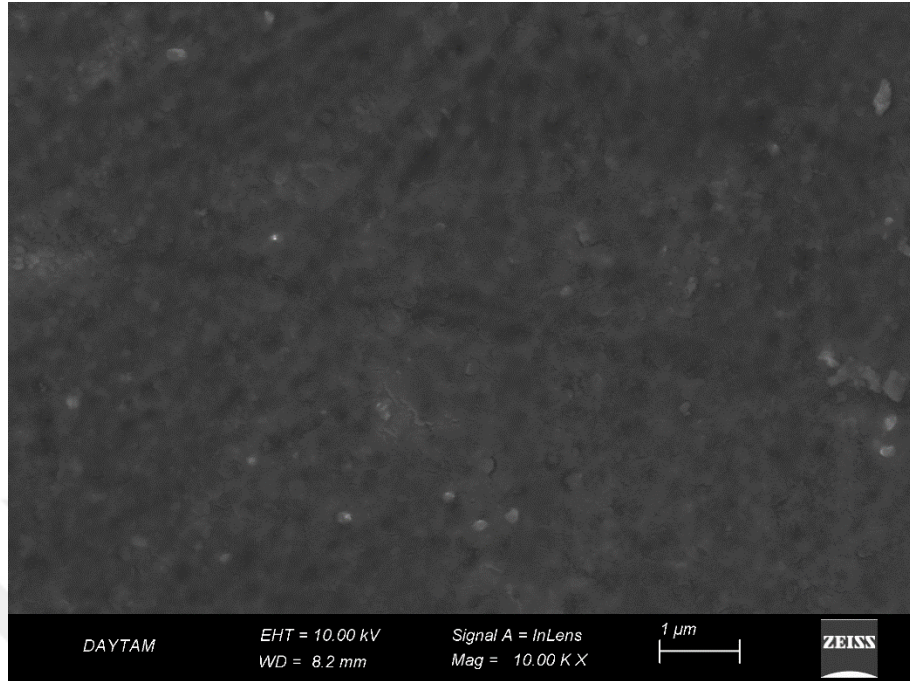
Şekil 4.28. Enzimatik işlemenin bakır iş parçası üzerinde etkisi



Şekil 4.29. Bakır iş parçası üzerinde HCl ile yapılan işlemin SEM görüntüsü



Şekil 4.30. Bakır iş parçası üzerinde H_2SO_4 ile yapılan işlemin etkisi



Şekil 4.31. H₂O₂ ile bakır üzerinde uygulanan işlemin SEM görüntüsü

4.2.2.d. AFM analizi

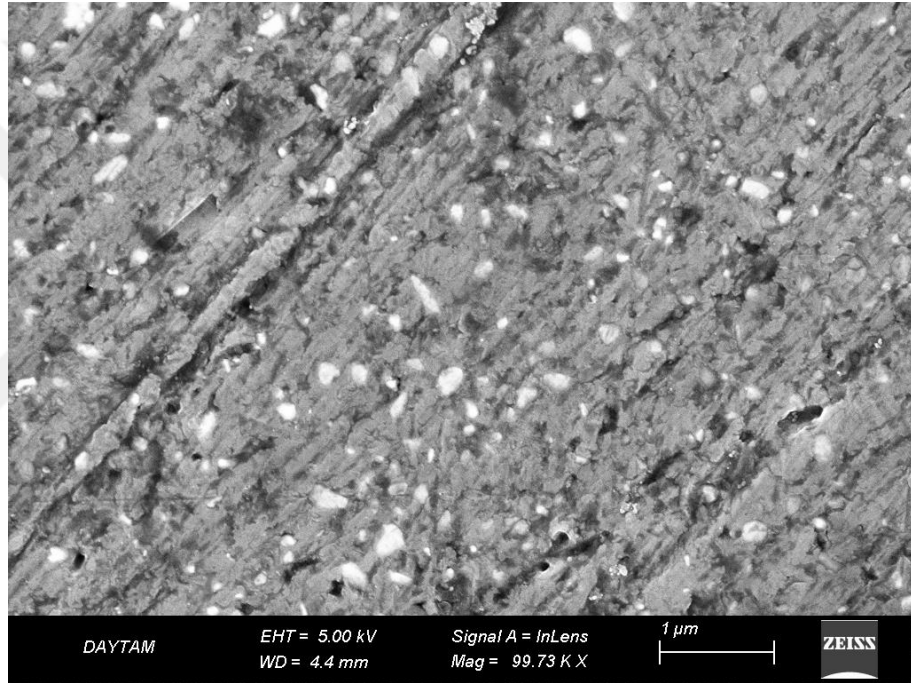
İşleme deneyleri bittikten sonra metal iş parçaları yüzeyinde oluşan pürüzlülük AFM cihazıyla taranarak ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10’da verilmiştir. Çizelgedeki sonuçlara göre enzim ile işlenmiş numunenin yüzey pürüzlülüğü (Ra) kontrol numunesine daha yakındır. Bu da SEM görüntülerini ve diğer sonuçları kanıtlamaktadır. Geleneksel yöntemler içinde hidrojen peroksit en az ve hidroklorik asit en çok pürüzlülüğe sebep olmaktadır (Smax).

Çizelge 4.10. İşlenmiş bakır numunelerin pürüzlülük analizi

Numune	İşleme metodu	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	-	2.686	17.50	2.475	26.44
Bakır	Enzimatik	20.27	115.5	34.25	299.8
Bakır	HCl	50.56	259.6	61.20	557.1
Bakır	H ₂ SO ₄	57.82	215.0	45.7	338.8
Bakır	H ₂ O ₂	1.51	9.47	2.02	15.07

4.2.3. Alüminyum

Biyolojik işleme süreci için seçilen diğer metal alüminyumdur. Alüminyum iş parçaları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’de verilen prosedür kullanılarak hazırlandıktan sonra işlenmemiş iş parçalarının yüzey morfolojisini incelemek için SEM görüntüsü, yüzey pürüzlülüğü için AFM ve fiziksel kompozisyonu için EDX analizi yapılmıştır. Şekil 4.32’de SEM ve Çizelge 4.11 ve 4.12’de elementel ve pürüzlülük analizleri sırasıyla verilmiştir.



Şekil 4.32. Alüminyum kontrol iş parçasının SEM görüntüsü

Çizelge 4.11. Orijinal alüminyum iş parçasının elementel analizi sonuçları

Element	Ağırlık %	Atomik %
Magnezyum (Mg)	4.01	4.43
Alüminyum (Al)	95.99	95.57

Çizelge 4.12. Biyo-işleme öncesi alüminyum yüzey pürüzlülüğü sonuçları

Numune	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	2.346	15.55	3.620	48.98

4.2.3.a. Alüminyum iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları

Deneylerde kullanılan Alüminyum iş parçalarının kütleleri, deneylerden önce ve sonra 0.1mg hassasiyetindeki terazi kullanarak tartılmış ve sonuçlar Çizelge 4.13'te verilmiştir. Bu sonuçlar deney düzeneği koşulları çerçevesinde (Çizelge 3.17) yapılmıştır. Biyo işleme sonrası kütle kaybı (K.K.), kütle kaybı yüzdesi (K.K.Y.%) ve enzimatik biyo-nanoişleme verimi (B. Verimi) 4.1, 4.2 ve 4.3 denklemleri ile hesaplanmıştır. Numunelerin MRR ve SMRR sonuçları 4.4 ve 4.5 denklemleri ile hesaplanarak Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Alüminyum iş parçasının ağırlık analiz sonuçları

Deney	Parametre	İ. ağırlık (g)	S. ağırlık (g)	K. K. (g)	K.K.Y. %	B. verimi
1	GOx 0.1	1.6706	1.6664	0.0042	0.42	0.25140668
2	GOx 0.2	1.6753	1.6705	0.0048	0.48	0.286515848
3	GOx 0.3	1.6802	1.6748	0.0054	0.54	0.321390311
4	GOx 0.4	1.664	1.658	0.006	0.6	0.360576923
5	Glukoz 0.1	1.6755	1.6735	0.002	0.2	0.119367353
6	Glukoz 0.3 g	1.6792	1.6744	0.0048	0.48	0.285850405
7	Glukoz 0.4 g	1.6845	1.6804	0.0041	0.41	0.243395666
8	T 52 °C	1.6807	1.6759	0.0048	0.48	0.285595288
9	T 59 °C	1.6789	1.676	0.0029	0.29	0.172732146
10	T 2 saat	1.6815	1.6813	0.0002	0.02	0.011894142
11	T 4 saat	1.6775	1.6763	0.0012	0.12	0.071535022
12	T 12 saat	1.6662	1.6536	0.0126	1.26	0.756211739
13	Rpm 25	1.6696	1.6693	0.0003	0.03	0.017968376

Çizelge 4.13. (devam)

14	Rpm 75	1.6744	1.6722	0.0022	0.22	0.131390349
15	pH 5.5	1.4755	1.4752	0.0003	0.03	0.020332091
16	pH 7	1.6888	1.6857	0.0031	0.31	0.183562293
17	Fe 0 g	1.6767	1.667	0.0097	0.97	0.578517326
18	Fe 1.4 g	1.6846	1.6808	0.0038	0.38	0.225572836
19	Fe 2.78 g	1.6814	1.6775	0.0039	0.39	0.231949566
20	Fe 8.34 g	1.682	1.6776	0.0044	0.44	0.261593341
21	HCl 1N	1.6836	0.6093	1.0743	107.43	63.80969351
22	H ₂ SO ₄ 1N	1.6925	1.6788	0.0137	1.37	0.809453471
23	H ₂ O ₂ 50%	1.6959	1.6959	0	0	0

Bu çizelgedeki parametrelerden ikisi (**pH** ve **sıcaklık**) enzimi doğrudan etkileyen parametrelerdir. Enzim, substrat ve demir miktarı, karıştırma hızı ve zaman gibi diğer parametreler toplam reaksiyonun verimini artırıp azaltabilmektedir. Ancak enzimin yapısını bozmazlar. Tüm bu parametrelerin etkileri de deneysel olarak araştırılmıştır.

Çizelge 4.14. Alüminyum iş parçası MRR ve SMRR sonuçları

Deney	ΔW (g)	ΔW (ng)	A (nm ²)	T (saat)	MRR (ng/saat)	SMRR (ng/nm ² .saat)
1	0.0042	4200000	4.88E+14	6	700000	1.43E-09
2	0.0048	4800000	4.87E+14	6	800000	1.64E-09
3	0.0054	5400000	4.89E+14	6	900000	1.84E-09
4	0.006	6000000	4.86E+14	6	1000000	2.06E-09
5	0.002	2000000	4.88E+14	6	333333.3333	6.83E-10
6	0.0048	4800000	4.87E+14	6	800000	1.64E-09
7	0.0041	4100000	4.88E+14	6	683333.3333	1.40E-09
8	0.0048	4800000	4.89E+14	6	800000	1.64E-09
9	0.0029	2900000	4.88E+14	6	483333.3333	9.90E-10
10	0.0002	200000	4.88E+14	2	100000	2.05E-10

Çizelge 4.14. (devam)

11	0.0012	1200000	4.87E+14	4	300000	6.16E-10
12	0.0126	12600000	4.81E+14	12	1050000	2.18E-09
13	0.0003	300000	4.87E+14	6	50000	1.03E-10
14	0.0022	2200000	4.87E+14	6	366666.6667	7.53E-10
15	0.0003	300000	4.66E+14	6	50000	1.07E-10
16	0.0031	3100000	4.88E+14	6	516666.6667	1.06E-09
17	0.0097	9700000	4.89E+14	6	1616666.667	3.31E-09
18	0.0038	3800000	4.88E+14	6	633333.3333	1.30E-09
19	0.0039	3900000	4.90E+14	6	650000	1.33E-09
20	0.0044	4400000	4.90E+14	6	733333.3333	1.50E-09
21	1.0743	1074300000	2.84E+14	6	179050000	6.31E-07
22	0.0137	13700000	4.86E+14	7	1957142.857	4.02E-09
23	0	0	4.86E+14	8	0	0.00E+00

Çizelge 4.14'e göre, SMRR miktarının farklı faktörlerden nasıl etkilendiği görülebilir. En fazla metal kaldırma miktarı $3.31E-09 \text{ ng/nm}^2 \cdot \text{saat}$ olarak Deney 17'ye ait iken ($\text{Fe(II)} = 0\text{g}$), en az biyo-işleme $1.03E-09 \text{ ng/nm}^2 \cdot \text{saat}$ Deney 13'te ($\text{rpm}=25$) gerçekleşmiştir.

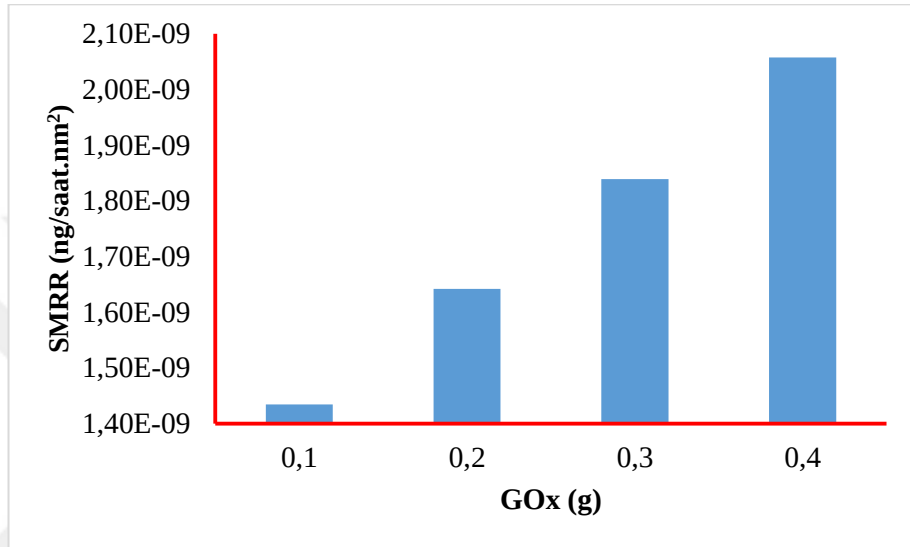
4.2.3.b. Enzimatik işleme üzerinde etkin parametrelerin tesirinin incelenmesi

Enzimatik işleme prosesini etkileyen önemli parametreler, alüminyum iş parçası üzerinde deneysel olarak araştırıldı ve sonuçlar grafikte halinde verilip tartışılmıştır.

1. GOx enziminin etkisi

GOx enziminin etkisi, alüminyum iş parçalarının biyo işlenmesi yapılarak araştırılmıştır. Bu amaçla dört farklı enzim miktarı ile biyo-işleme süreci tasarlanmıştır. Altı saatlik biyo-işlemeden sonra, elde edilen sonuçlar Şekil 4.33'de verilmiştir.

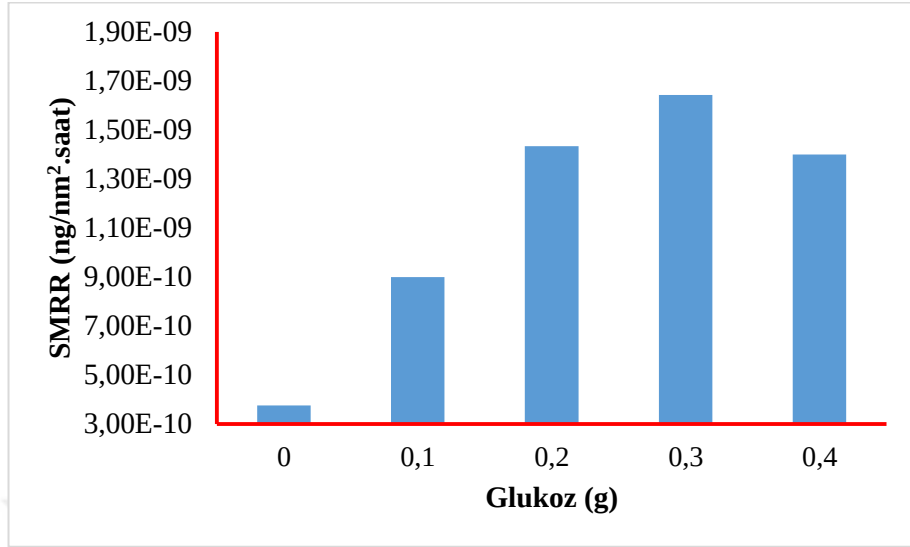
Sonuçlara göre GOx enzimi miktarı ile SMRR arasında doğrusal bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir. Ancak yüksek GOx miktarlarında SMRR yavaşlamış olup, bunun sebebi reaksiyon ortamında yeterli miktarda glukozun bulunmaması olarak değerlendirilebilir.



Şekil 4.33. GOx enzimi miktarının etkisi alüminyumun biyo işleme üzerine

2. Glukoz etkisi

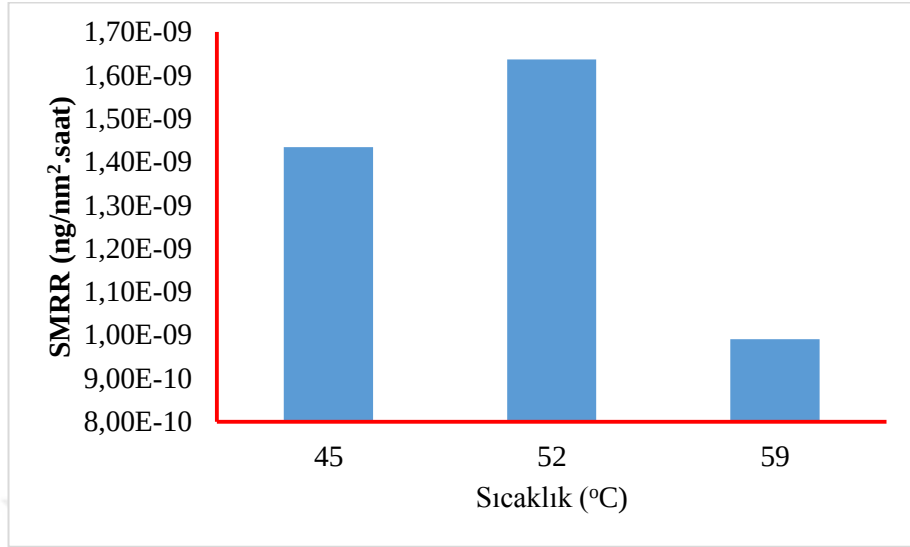
Enzimler reaksiyon ortamında kendilerine uygun ve yeterli miktarda substrat bulduklarında çalışırlar. Alüminyum iş parçaları üzerinde biyo-işleme sırasında glukoz miktarının etkisini görmek için glukozun dört farklı konsantrasyonunda deneyler yapılmıştır. Bulunan sonuçlara göre işleme ortamında glukoz miktarı arttıkça metal kaldırma hızı artış göstermiştir. Ancak reaksiyon ilerlediğinde ortamdaki bileşenlerin miktarı tükendiği için, Şekil 4.34’de görüldüğü gibi, SMRR de düşüş göstermiş olup dengeye ulaşmıştır.



Şekil 4.34. Alüminyumun biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi

3. Sıcaklığın etkisi

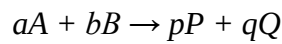
Sıcaklık enzimlerin yapısını kritik şekilde etkileyen faktörlerden biridir. Dolayısıyla enzimler ile çalışırken doğru bir sıcaklık seviyesinin seçilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada GOx enziminin hangi sıcaklıklarda en iyi aktivite gösterdiğini bulmak için üç farklı sıcaklıkta biyo-işleme yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.35’de verilmiştir. Sonuçlara göre en fazla metal parçaları ($1.64E-09$ ng/nm².saat) 52°C alüminyum üzerinden kaldırılmıştır. Bu sıcaklık alüminyum üzerinde yapılan bütün biyo-işleme deneylerinde uygulanmıştır.



Şekil 4.35. Alüminyumun enzimatik işleminde sıcaklığın etkisi

4. Zamanın etkisi

Genel olarak kimyasal reaksiyonlarda tepkime hızı belirli zaman aralığında, ürünlerin derişimindeki artma veya reaktantların derişimindeki azalma ile saptanır. Aşağıdaki kimyasal tepkime göz önüne alınırsa:



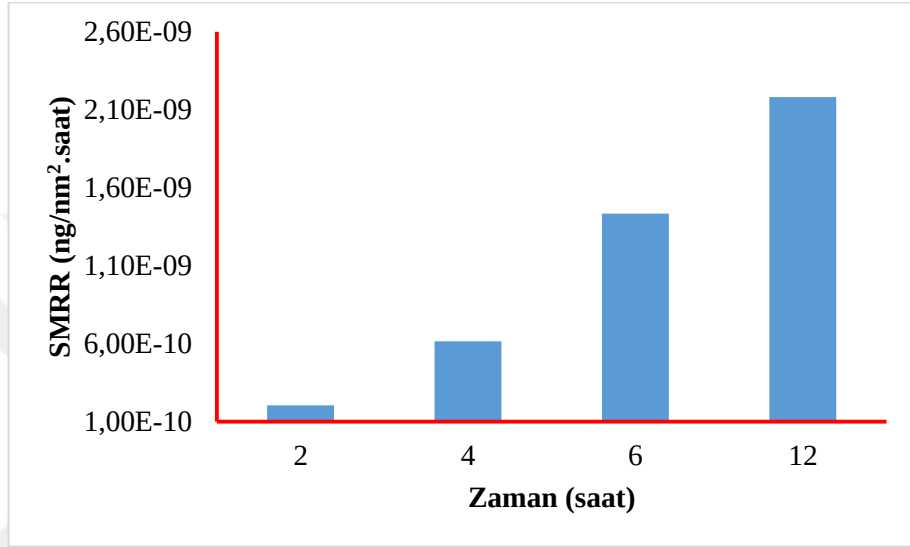
Kapalı sistemlerde ve izobarik ortamlarda tepkime hızı “ r ” aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$r = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{p} \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{q} \frac{d[Q]}{dt} \quad (4.6)$$

Bu bağıntıya göre reaksiyon hızı zaman ile değişmektedir.

Bu kısımda alüminyum iş parçaları üzerinde enzimatik işlemin zaman ile nasıl ilerlediğini araştırmak için dört farklı sürede biyo-işleme gerçekleştirilmiş ve gerekli hesaplamalar yapıldıktan bulunan sonuçlar Şekil 4.36’da verilmiştir. Sonuçlara göre

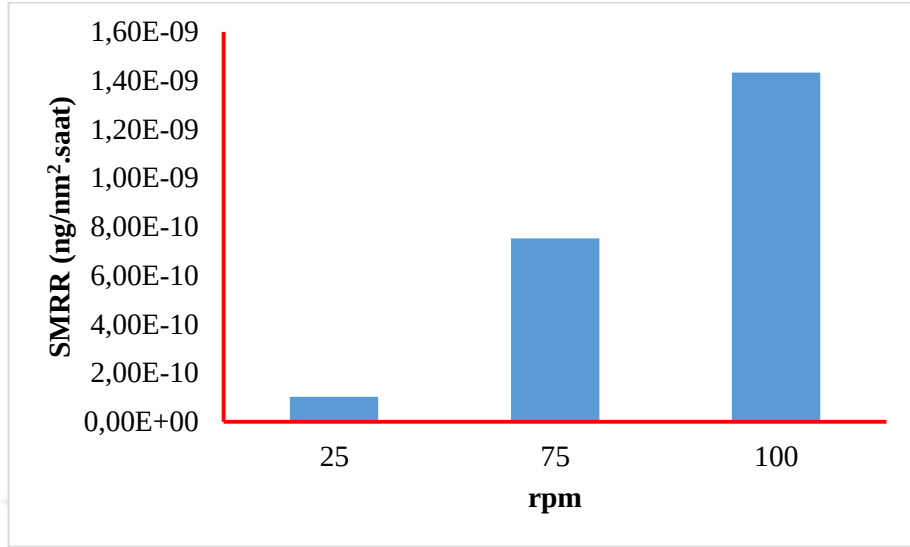
zaman ile metal kaldırma miktarı arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Ancak reaksiyon süresi uzadığında ortamdaki reaktantların tükenmesi nedeniyle reaksiyon hızı da yavaşlamaya başlamıştır. SMRR miktarı iki saatten sonra $2.05E-10$ ng/nm^2 .saat iken 12 saatten sonra $2.18E-9$ ng/nm^2 .saat olmuştur.



Şekil 4.36. Alüminyum iş parçalarının enzimatik işlemesi üzerine zaman parametresinin etkisi

5. Karıştırma hızının etkisi

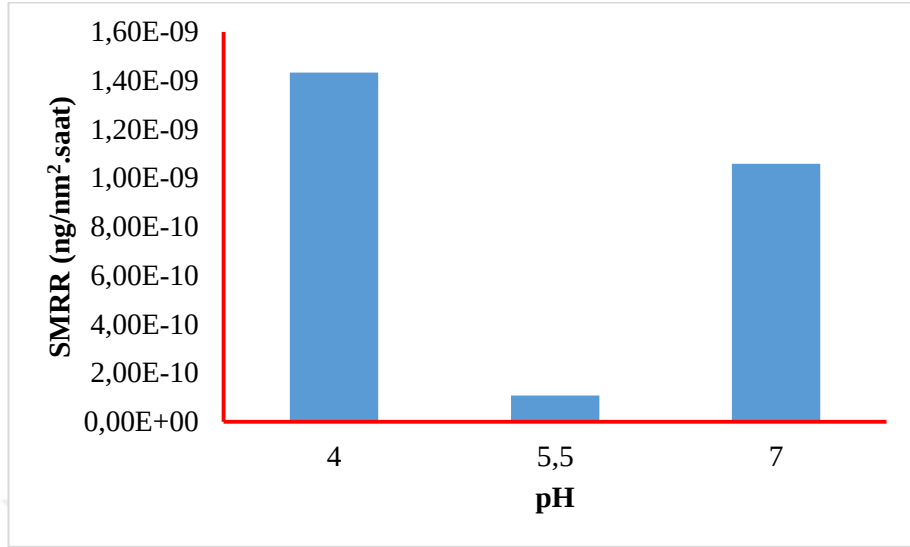
Karıştırma, tepkime hızına etki eden etkenlerden biridir. Bu parametrenin etkisini, biyolojik yolla alüminyum üzerinden metal kaldırmak için 25, 75 ve 100 rpm’lerde deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.37’de verilmiştir. Sonuçlara göre karıştırma hızı arttıkça işleme reaksiyonu hızı da aynı oranda artmış olup, rpm ile SMRR arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.37. Metal kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamının karıştırılmasının etkisi, 100 ml çözelti

6. pH'nın etkisi

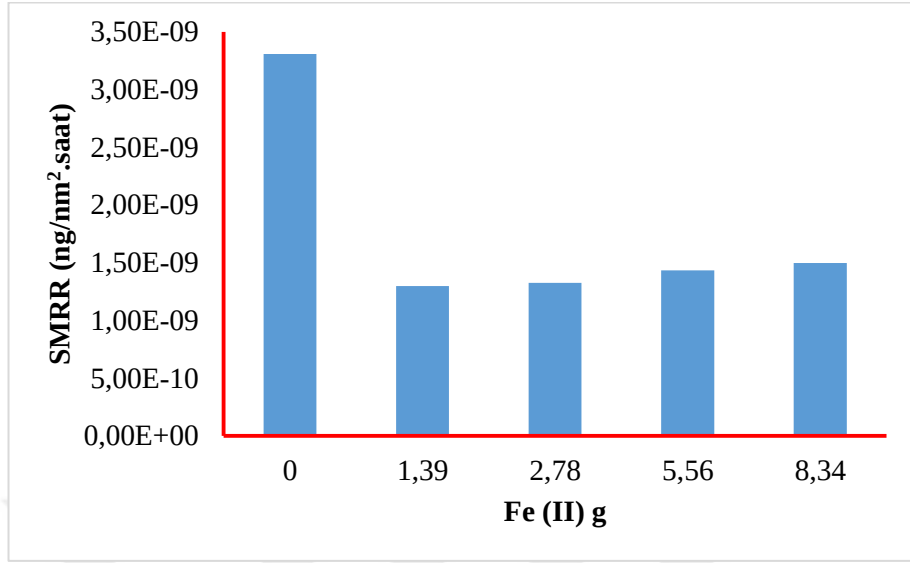
Enzimlerin yapısını doğrudan etkileyen faktörlerden biri reaksiyon ortamının pH seviyesidir. Optimal olmayan pH değerlerinde enzimin ilk yapısı bozulur ve aktivitesini kaybeder. Alüminyumun enzimatik işleminde doğru pH'yı bulmak için değişik pH'larda (4, 5.5 ve 7) işleme gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.38'de verilmiştir. Bu sonuçlardan pH 4'ün en uygun pH olduğu tespit edilmiştir. Maksimum işleme miktarı (SMRR) $1.43\text{E}-09 \text{ ng/nm}^2.\text{saat}$ olarak pH 4'de gerçekleşmişken, pH 5.5'de $1.07\text{E}-10 \text{ ng/nm}^2.\text{saat}$ eser miktarda yapılmıştır. Bu sonuçlara dayanarak pH 4.0 optimal pH miktarı olarak seçilmiş ve alüminyumun biyo-işleminde kullanılmıştır.



Şekil 4.38. Alüminyumun biyolojik işleme esnasında GOx enzimi üzerine pH parametresinin etkisi

7. Fe (II) konsantrasyonunun etkisi

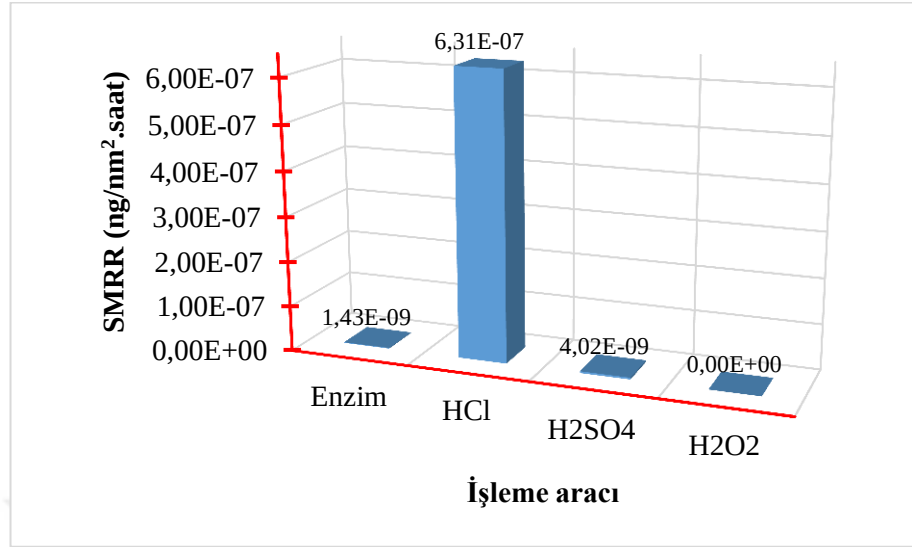
Biyo-Fenton reaksiyonuna istinaden alüminyum iş parçalarının enzimatik biyo-işleme prosesinde demir miktarının etkisini araştırmak için beş farklı demir konsantrasyonunda (Çizelge 4.13) biyo-işleme uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.39’da verilmiş olup, bulunan sonuçlara göre demirin olmadığı reaksiyon ortamında maksimum metal kaldırma ($3.31E-09 \text{ ng/nm}^2.\text{saat}$) gerçekleşmiştir. Demir (II)’nin varlığında SMRR miktarında belirgin bir düşüş meydana gelmiştir.



Şekil 4.39. Alüminyum kaldırma hızı üzerine Fe(II) konsantrasyonunun etkisi

8. İşleme araçlarının etkisi

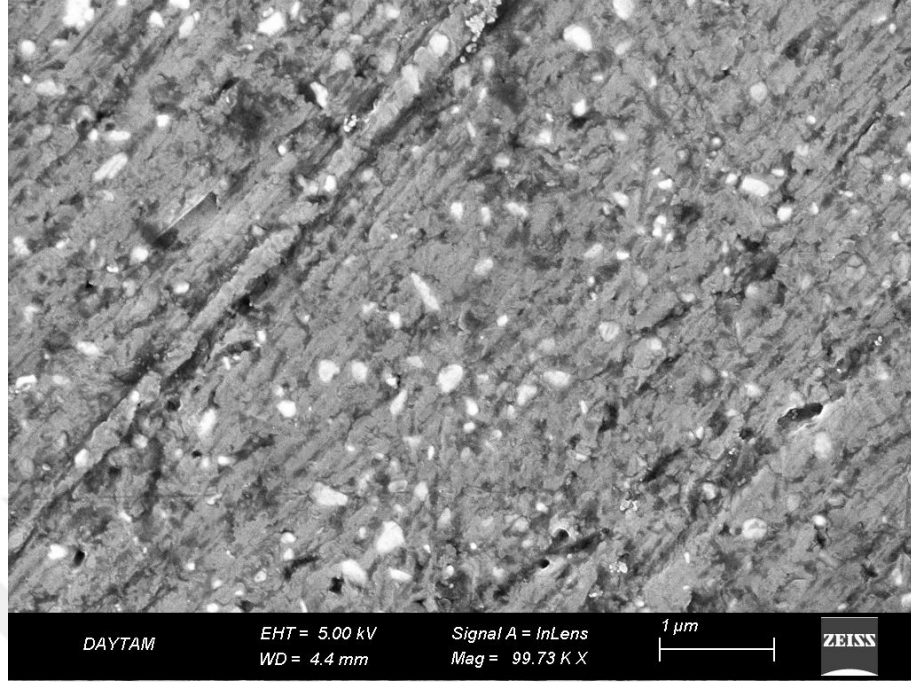
Bu kısımda enzimatik işleme ile geleneksel metotların ve ayrıca hidrojen peroksitin işleme kabiliyetini kıyaslamak amacıyla sabit koşullar altında deneyler yapılmıştır. Altı saatlik işlemeden sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.40'da verilmiştir. $6.31E-07$ ng/nm².saat SMRR HCl kullanarak elde edilirken $1.43E-09$ ng/nm².saat GOx'den elde edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.13'e göre HCl ile 63.81'lik verim elde edilirken, enzim ile sadece 0.25'lik verim elde edilmiştir. Bu sonuçlar, enzimin daha düzgün ve kontrollü bir işleme aracı olduğunu kanıtlamaktadır.



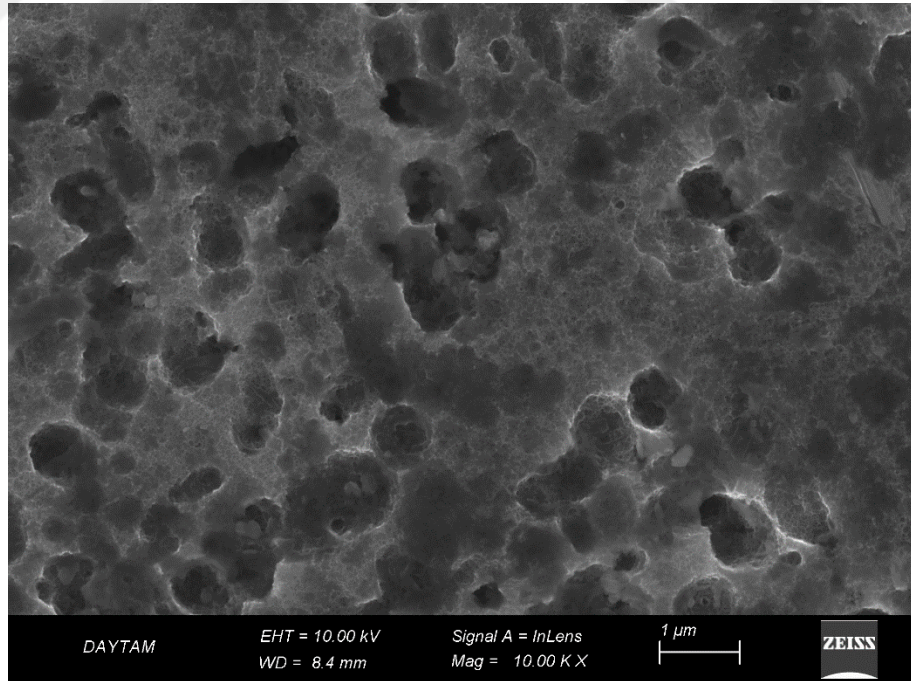
Şekil 4.40. Alüminyum kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti, HCl:1N, H₂SO₄:1N, H₂O₂:50%v/v, GOx:0.1g, 100ml reaksiyon çözeltisi

4.2.3.c. SEM analizleri

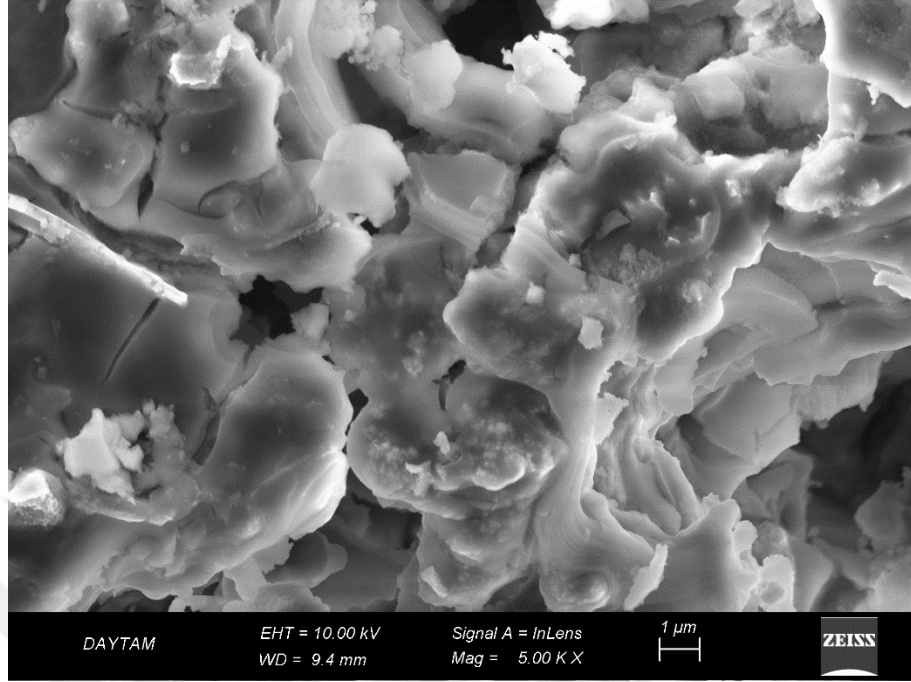
Alüminyum iş parçaları üzerinde yapılan çeşitli biyo-işleme deneylerin etkilerini, parçaların yüzey morfolojisi üzerinde görüntülemek için alüminyum iş parçalarının SEM analizleri yapılmış ve SEM mikrografları Şekil 4.41 ila 4.45'te verilmiştir. Sonuçlara göre enzimatik işleme diğer işleme yöntemlerine göre metal yüzeyinde hasar vermemiştir ve metal yüzeyine düzgün ve kontrollü işleme uygulanmıştır. Asit hidroklorik metal yüzeyini kötü bir şekilde bozmuştur ve daha çok hasara uğratmıştır. Hidrojen peroksit ise alüminyum üzerinde etki göstermemiştir. Bu görüntüler Çizelge 4.15'deki sonuçları teyit etmektedir.



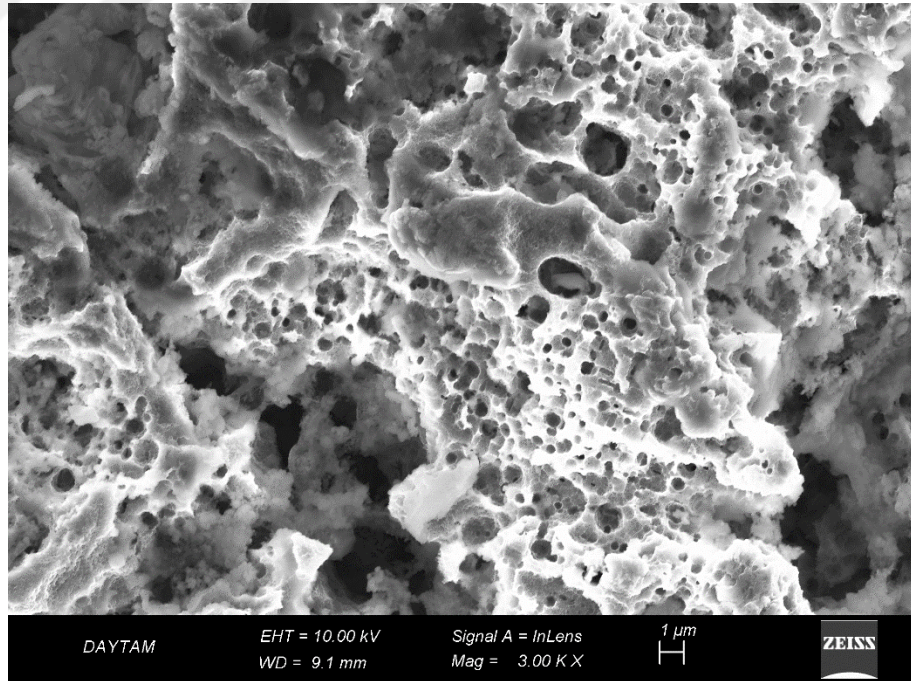
Şekil 4.41. Alüminyum kontrol iş parçasının SEM görüntüsü



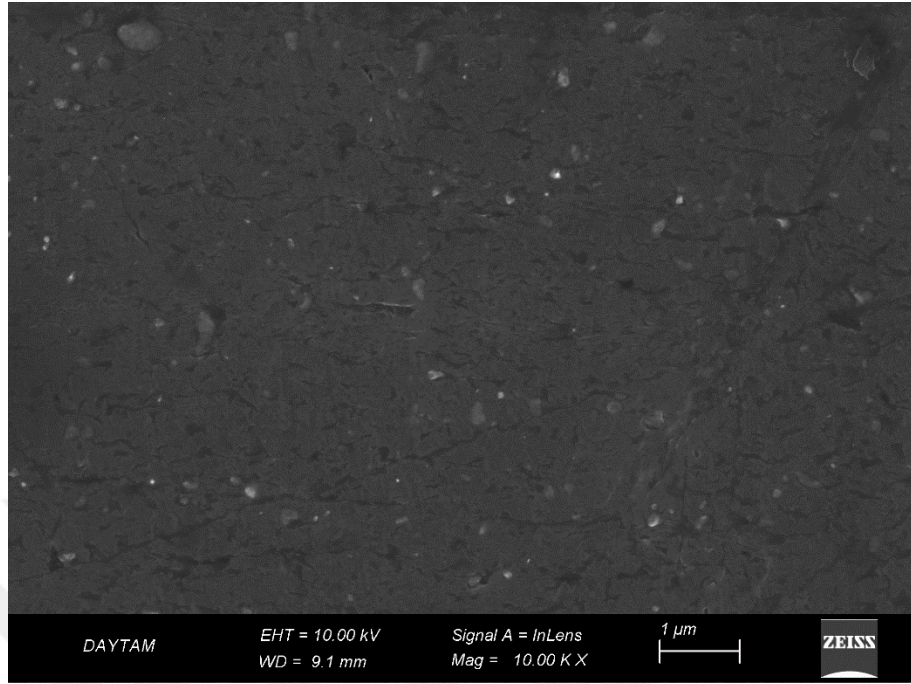
Şekil 4.42. Alüminyum iş parçası üzerinde enzimatik işlemenin SEM mikrografı



Şekil 4.43. HCl ile alüminyum üzerinde yapılan işlemenin SEM görüntüsü



Şekil 4.44. Alüminyum iş parçası üzerinde H₂SO₄ ile yapılan işlemenin SEM görüntüsü



Şekil 4.45. H₂O₂ ile alüminyum iş parçası üzerinde yapılan işlemenin SEM mikrografı

4.2.3.d. AFM analizleri

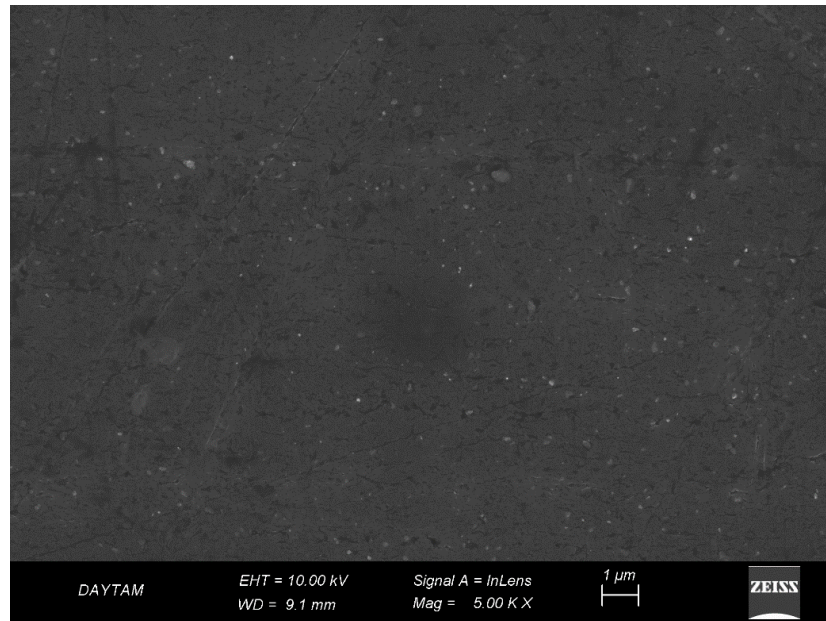
Deneylerden sonra biyolojik işlenmiş iş parçalarının yüzeyinde oluşan pürüzlülük miktarlarını ve geleneksel yöntemlerde oluşan pürüzlülükleri belirlemek için numunelerin yüzeylerinde AFM analizleri yapılmış ve bulunan sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir. Sonuçlara göre GOx enzimiyle yapılan işleme ile çok daha düzgün bir yüzey elde edilmiş ve numune yüzeylerinde herhangi bir hasar ve yan etki oluşmamıştır. İş parçasının yüzey morfolojisi kontrol numunesine çok benzerlik göstermiştir. Bu sonuç enzimatik işlemenin daha uygun bir işleme aracı olduğunu göstermektedir. Asit yüzeyde çok daha fazla pürüzlülüğe sebep olurken, hidrojen peroksidin AFM, SEM görüntüleri ve diğer sonuçlar dikkate alındığında alüminyum üzerinde başarılı işleme aracı olmadığını göstermiştir.

Çizelge 4.15. Alüminyum numunelerin işlemeye maruz kaldıktan sonra pürüzlülük analizi

Numune	İşleme metotlu	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	-	1.344	9.291	1.936	35.22
Alüminyum	Enzimatik	3.24	21.12	2.966	52.49
Alüminyum	HCl	82.515	385.75	92.15	999.1
Alüminyum	H ₂ SO ₄	39.37	224	62.17	199.1
Alüminyum	H ₂ O ₂	1.313	6.811	1.331	10.65

4.2.4. Paslanmaz çelik

Paslanmaz çelik biyolojik işleme süreci için seçilen diğer metaldir. Paslanmaz çelik iş parçaları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilen prosedür kullanılarak hazırlanmış ve iş parçalarının yüzey morfolojilerini incelemek için SEM görüntüleri alınmıştır. Ayrıca aynı numunelerin yüzey pürüzlülükleri atomik kuvvet mikroskobu ile ölçülmüş ve numunelerin element analizleri EDX ile belirlenmiştir. Şekil 4.46'da morfoloji görüntüsü ve Çizelge 4.16 ve 4.17'de elementel ve pürüzlülük analizleri verilmiştir.



Şekil 4.46. Orjinal paslanmaz çelik numunesinin SEM görüntüsü

Çizelge 4.16. Orjinal paslanmaz çeliğin fiziksel kompozisyon analizi

Element	Ağırlık %	Atomik %
Krom (Cr)	16.49	17.58
Demir (Fe)	72.75	72.25
Nikel (Ni)	10.76	10.17

Çizelge 4.17. Biyo-işleme öncesi paslanmaz çeliğin yüzey pürüzlülüğü analizi

Numune	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	2.52	16.42	2.57	29.64

4.2.4.a. Paslanmaz çelik iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları

Deneylerde kullanılan paslanmaz çelik iş parçalarının kütlesi, deneylerden önce ve sonra 0.1mg hassasiyetindeki terazi ile tartılmış ve sonuçlar Çizelge 4.18’de verilmiştir. Bu sonuçlar deney düzeneği koşulları altında yapılmıştır (Çizelge 3.17). Biyo-işleme sonrası kütle kaybı (K.K.), kütle kaybı yüzdesi (K.K.Y.%) ve enzimatik biyo-nanoişleme verimi (B. Verimi) 4.1, 4.2 ve 4.3 denklemleri ile hesaplanmıştır. Ayrıca MRR ve SMRR değerleri gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.18. Paslanmaz çelik iş parçası ağırlık analiz sonuçları

Deney	Parametre	İ. ağırlık (g)	S. ağırlık (g)	K. K. (g)	K.K.Y. %	B. verimi
1	GOx 0.1	4.5424	4.5424	0	0	0
2	GOx 0.2	4.5438	4.5438	0	0	0
3	GOx 0.3	4.5412	4.5412	0	0	0
4	GOx 0.4	4.5409	4.5409	0	0	0
5	Glukoz 0.1	4.5432	4.5432	0	0	0
6	Glukoz 0.3 g	4.5501	4.5501	0	0	0
7	Glukoz 0.4 g	4.5489	4.5489	0	0	0
8	T 52 °C	4.5464	4.5464	0	0	0
9	T 59 °C	4.5424	4.5424	0	0	0
10	T 2 saat	4.5428	4.5428	0	0	0
11	T 4 saat	4.543	4.543	0	0	0
12	T 12 saat	4.5451	4.5451	0	0	0
13	Rpm 25	4.5513	4.5513	0	0	0
14	Rpm 75	4.5509	4.5509	0	0	0
15	pH 5.5	4.5484	4.5484	0	0	0
16	pH 7	4.5491	4.5491	0	0	0
17	Fe 0 g	4.5412	4.5412	0	0	0
18	Fe 1.4 g	4.5449	4.5449	0	0	0
19	Fe 2.78 g	4.5471	4.5471	0	0	0
20	Fe 8.34 g	4.5443	4.5443	0	0	0
21	HCl 1N	4.5546	4.5202	0.0344	3.44	0.755280376
22	H ₂ SO ₄ 1N	4.5409	4.5407	0.0002	0.02	0.004404413
23	H ₂ O ₂ 50%	1.6959	1.6959	0	0	0

Çizelge 4.18'e göre enzimatik biyo-işleme bütün değişik koşullar altında paslanmaz çelik üzerine etki gösterememiştir ve deney sonunda K.K., K.K.Y.% ve B. verimi miktarları 0.0 olmuştur.

Çizelge 4.19. Paslanmaz çelik iş parçası MRR ve SMRR sonuçları

Deney	ΔW (g)	ΔW (ng)	A (nm ²)	T (saat)	MRR (ng/saat)	SMRR (ng/nm ² .saat)
1	0	0	4.88E+14	6	0	0.00E+00
2	0	0	4.87E+14	6	0	0.00E+00
3	0	0	4.89E+14	6	0	0.00E+00
4	0	0	4.86E+14	6	0	0.00E+00
5	0	0	4.88E+14	6	0	0.00E+00
6	0	0	4.87E+14	6	0	0.00E+00
7	0	0	4.88E+14	6	0	0.00E+00
8	0	0	4.89E+14	6	0	0.00E+00
9	0	0	4.88E+14	6	0	0.00E+00
10	0	0	4.88E+14	2	0	0.00E+00
11	0	0	4.87E+14	4	0	0.00E+00
12	0	0	4.81E+14	12	0	0.00E+00
13	0	0	4.87E+14	6	0	0.00E+00
14	0	0	4.87E+14	6	0	0.00E+00
15	0	0	4.66E+14	6	0	0.00E+00
16	0	0	4.88E+14	6	0	0.00E+00
17	0	0	4.89E+14	6	0	0.00E+00
18	0	0	4.88E+14	6	0	0.00E+00
19	0	0	4.90E+14	6	0	0.00E+00
20	0	0	4.86E+14	6	0	0.00E+00
21	0.0344	34400000	2.83607E+14	6	5733333.333	2.02157E-08
22	0.0002	200000	4.86375E+14	6	28571.42857	5.87436E-11
23	0	0	4.86375E+14	8	0	0

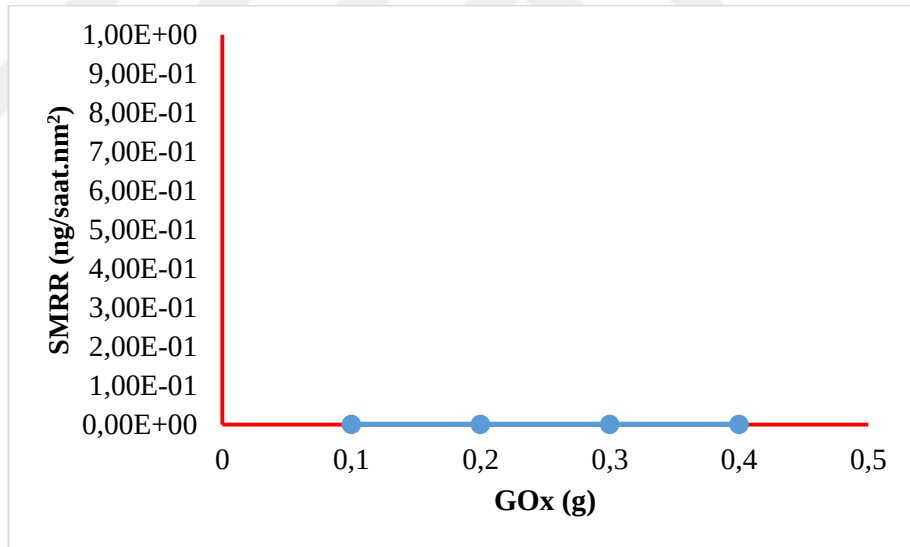
Çizelgedeki değerlere göre paslanmaz çelik enzimatik işlemeye direnç göstermiş ve oksidasyona uğramamıştır. Belirlenen sonuçlar, SMRR miktarının bütün enzimatik deneylerde 0.0 ng/nm².saat olduğunu göstermiştir.

4.2.4.b. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelenmesi

Paslanmaz çelik iş parçalarının biyolojik işleme sürecini etkileyen önemli parametreler deneysel olarak araştırılmış ve sonuçlar grafik olarak verilmiştir.

1. Glukoz oksidaz enziminin etkisi

Paslanmaz çelikten metal kaldırmak için GOx enzim miktarının etkisi araştırılmış ve elde edilen deney sonuçları Şekil 4.47’de verilmiştir. Sonuçlara göre diğer etkin parametreler sabit tutulduğunda dört farklı enzim miktarında SMRR değerlerinde değişme olmamış ve SMRR değerleri tüm deneylerde 0.0 ng/nm².saat olarak elde edilmiştir.

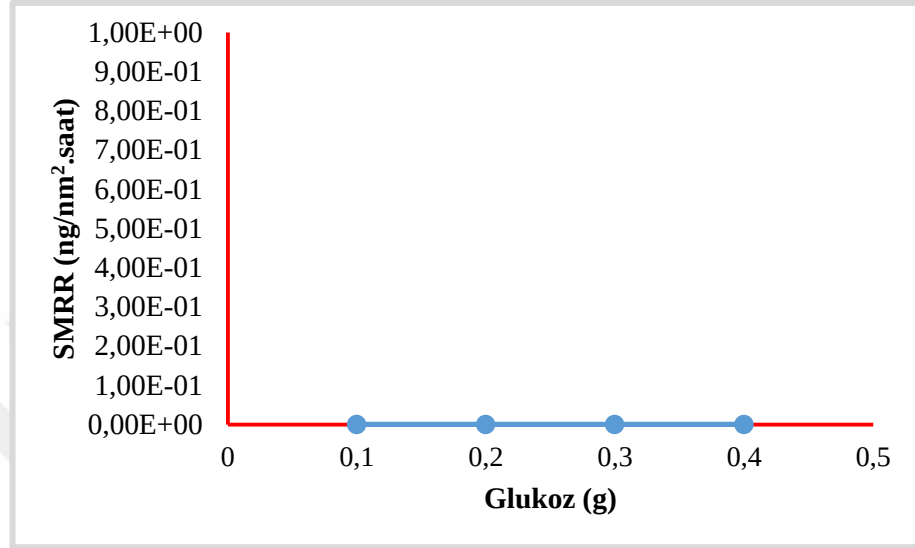


Şekil 4.47. Paslanmaz çeliğin biyo-işlemesi üzerine GOx enzimi miktarının etkisi

2. Glukoz etkisi

Glukoz konsantrasyonunun paslanmaz çeliğin biyo-işlemesinde araştırmak için ve bu parametrenin etkisini SMRR üzerine gözlemlemek amacıyla dört farklı substrat miktarlarında (Çizelge 4.18) enzimatik işlem gerçekleştirildi. Sonuçlar Şekil 4.48’de

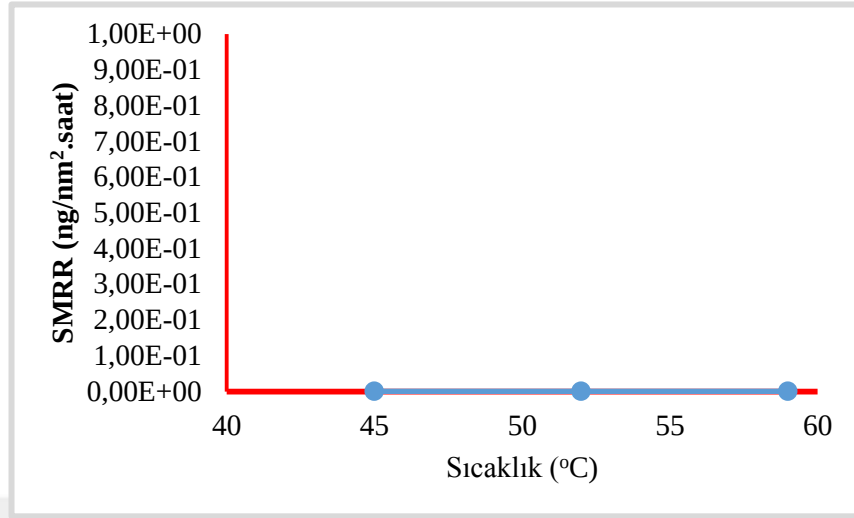
verilmiştir. Sonuçlara göre herhangi bir glukoz miktarında başarılı işleme yapılmamıştır ve paslanmaz çelik bu koşullar altında da biyo-işleme prosesine direnç göstermiştir.



Şekil 4.48. Paslanmaz çeliğin biyo-işleme reaksiyonunda substrat miktarının etkisi

3. Sıcaklığın etkisi

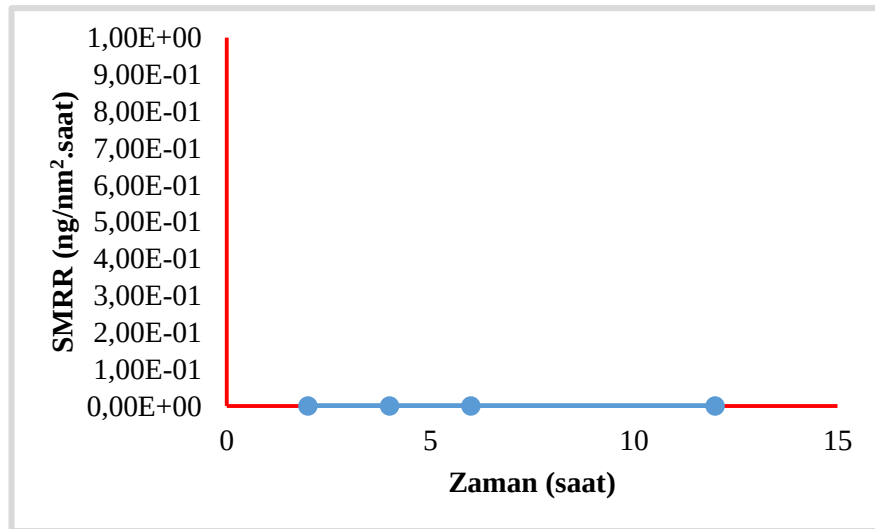
Sıcaklık enzimin yapısını etkileyen parametrelerden biridir. Dolayısıyla enzimler ile çalışırken doğru bir sıcaklık değerinin ayarlanması önemlidir. Bu çalışmada, paslanmaz çeliğin biyolojik işleminde GOx enziminin hangi sıcaklıklarda en iyi aktivite göstermesini bulmak için üç farklı sıcaklıkta (45, 52 ve 59°C) biyo-işleme yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.49’da verilmiştir. Sonuçlara göre bütün sıcaklıklarda enzimatik işleme paslanmaz çelik üzerinde etki göstermemiştir ve işleme başarısız tamamlanmıştır.



Şekil 4.49. Paslanmaz çeliğin enzimatik işleminde sıcaklığın etkisi

4. Zamanın etkisi

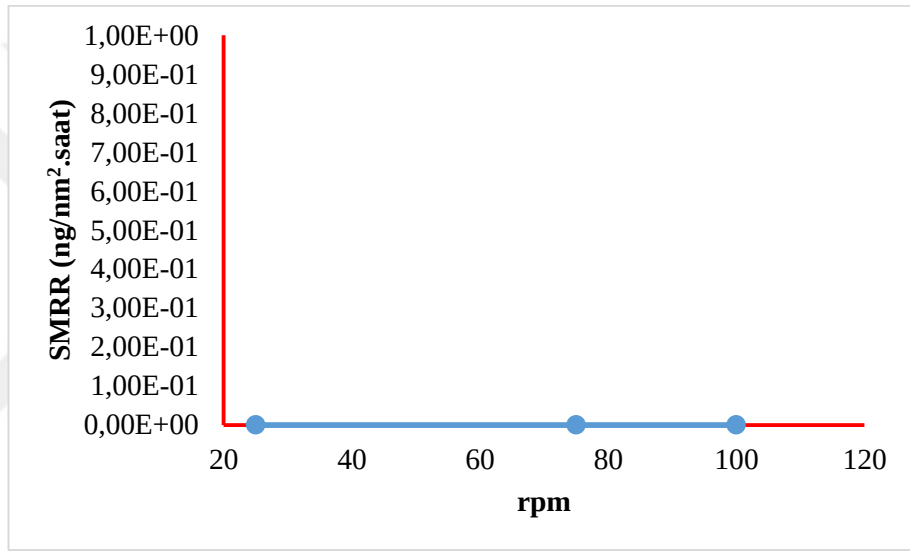
Zaman bütün reaksiyonların ilerlemesinde etkin faktördür. Paslanmaz çelik üzerinde enzimatik işleme esnasında zamanın etkisini gözlemlemek için 2, 4, 6 ve 12 saat boyunca deneyler yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.50’de verilmiştir. Sonuçlara göre biyo-işleme 12 saatten sonra başarısız tamamlanmıştır ve GOx enzimi paslanmaz çelik üzerinde herhangi bir işleme gerçekleştirememiştir.



Şekil 4.50. Paslanmaz çeliğin enzimatik işleme esnasında zaman parametresinin etkisi

5. Karıştırma hızının etkisi

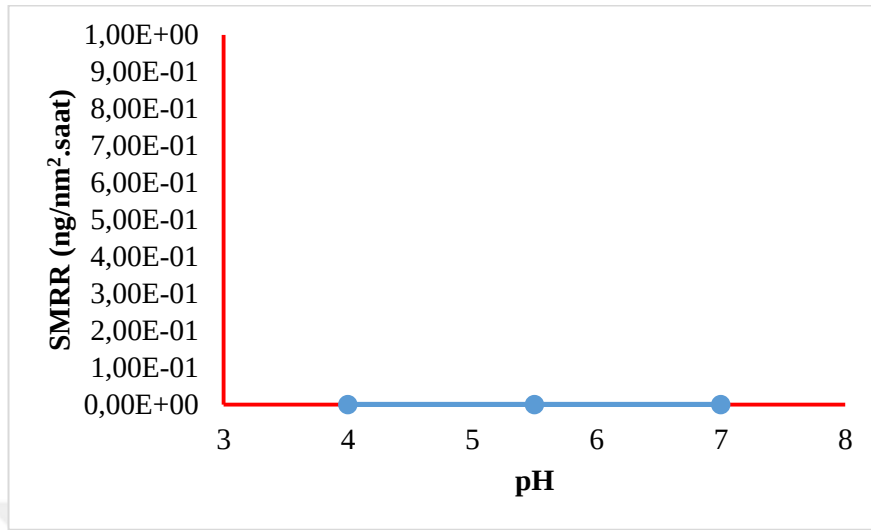
Karıştırma reaksiyon ortamında bulunan bileşenlerin etkin çakışmasına ve dolayısıyla reaksiyonların daha hızlı ve verimli ilerlemesine neden olur. Paslanmaz çelik üzerinden enzimatik metal kaldırma esnasında karıştırma hızının etkisini görmek amacıyla üç farklı karıştırma hızında deneyler yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.51’de verilmiştir. Sonuçlara göre bütün hızlarda paslanmaz çelik üzerinde işleme başarısız olmuştur.



Şekil 4.51. Paslanmaz çelikten talaş kaldırma hızı üzerine reaksiyon ortamının karıştırma hızının etkisi

6. pH’nın etkisi

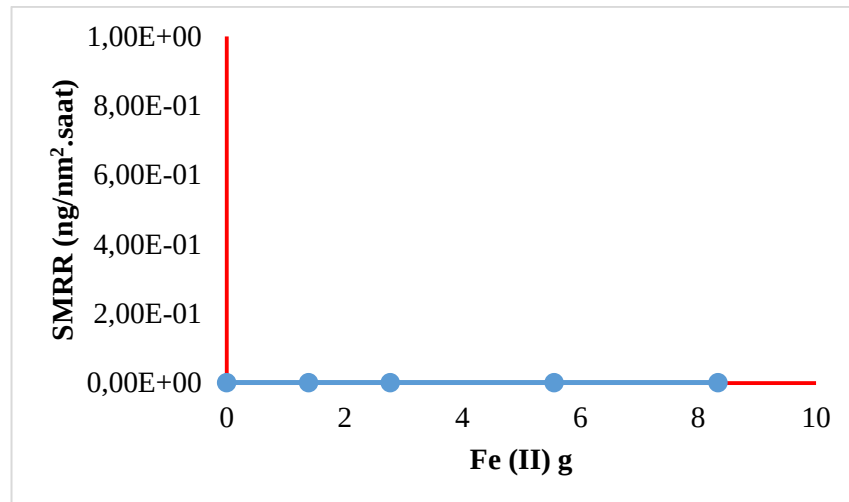
pH parametresi enzimin yapısını etkileyen faktördür ve yanlış durumda enzim aktivitesini etkisiz hale getirebilir. Paslanmaz çelik ortamında biyo-işleme üç farklı pH’da uygulandı ve sonuçlar elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre herhangi bir pH değerinde başarılı bir işleme gerçekleşmemiştir ve SMRR miktarı sıfır göstermiştir (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. Paslanmaz çeliğin enzimatik işlemesi üzerine pH'nın etkisi

7. Demir (II) konsantrasyonunun etkisi

Biyo-işlemenin genel reaksiyonuna göre ortamdaki Fe^{2+} konsantrasyonu önemli faktördür. Bu faktörün etkisin paslanmaz çeliğin işleminde gözlemlemek için beş farklı Fe^{2+} konsantrasyonlarında deney kuruldu. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.53'de verilmiştir. Sonuçlara göre Fe^{2+} miktarı'nda paslanmaz çeliğin enzimatik işleminin sağlayamamıştır ve işleme başarısız tamamlanmıştır.



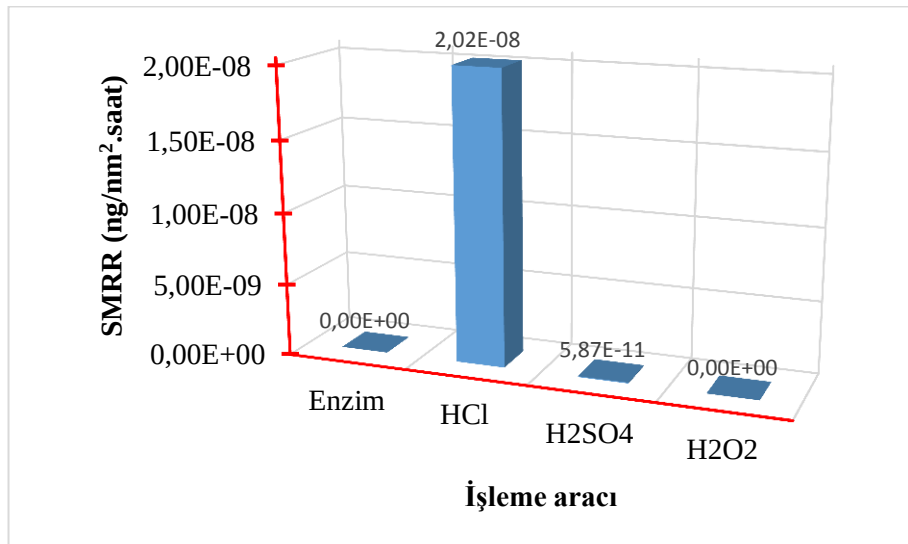
Şekil 4.53. Paslanmaz çeliğin enzimatik işlemesi üzerine Fe (II) konsantrasyonunun etkisi

8. Geleneksel metotların etkisi

Paslanmaz çelik iş parçaları üzerinde enzimatik işleme ile geleneksel işleme yöntemlerinin karşılaştırılması için dört farklı ortamda işleme gerçekleştirilmiştir:

- Glukoz oksidaz (GOx) enzimi
- Hidroklorik asit (HCl) 1N
- Sülfürik asit (H_2SO_4) 1N
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) %50 v/v

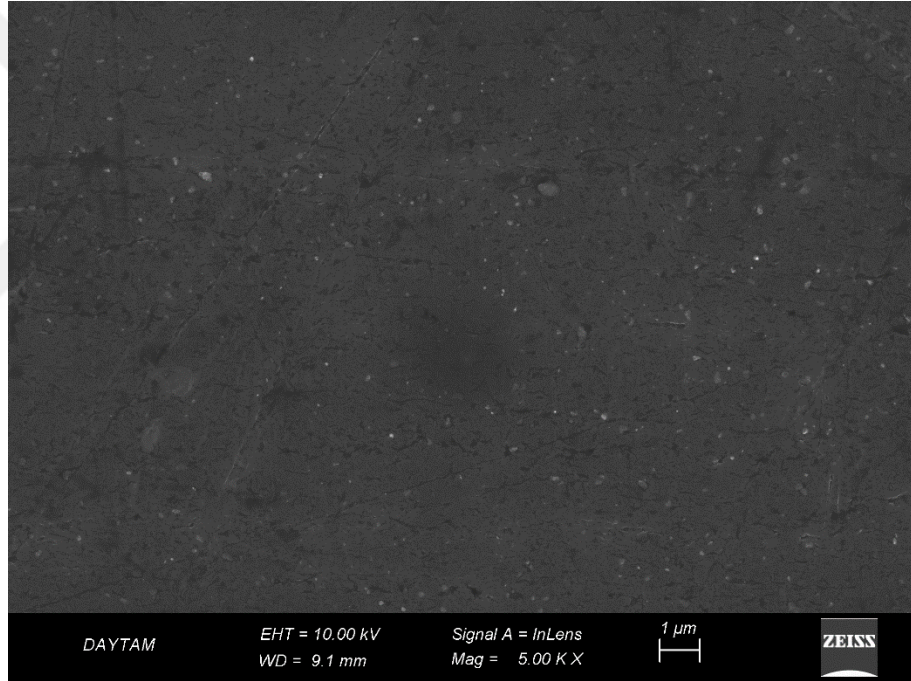
Elde edilen sonuçlar Şekil 4.54’de verilmiştir. Yapılan bu deneyde 6 saatlik işleme sonunda hidroklorik asit kullanıldığında $2.02E-8$ ng/nm².saat paslanmaz çeliğin üzerinden talaş kaldırılırken, sülfürik asit ortamında $5.87E-11$ ng/nm².saat metal kaldırılmıştır. GOx enzimi ve hidrojen peroksit paslanmaz çelik üzerinde etki göstermemiştir. Bu sonuçlara göre paslanmaz çelik enzimatik işlemeye direnç gösterirken, inorganik asitlere maruz kaldığında az da olsa oksidasyona uğramıştır.



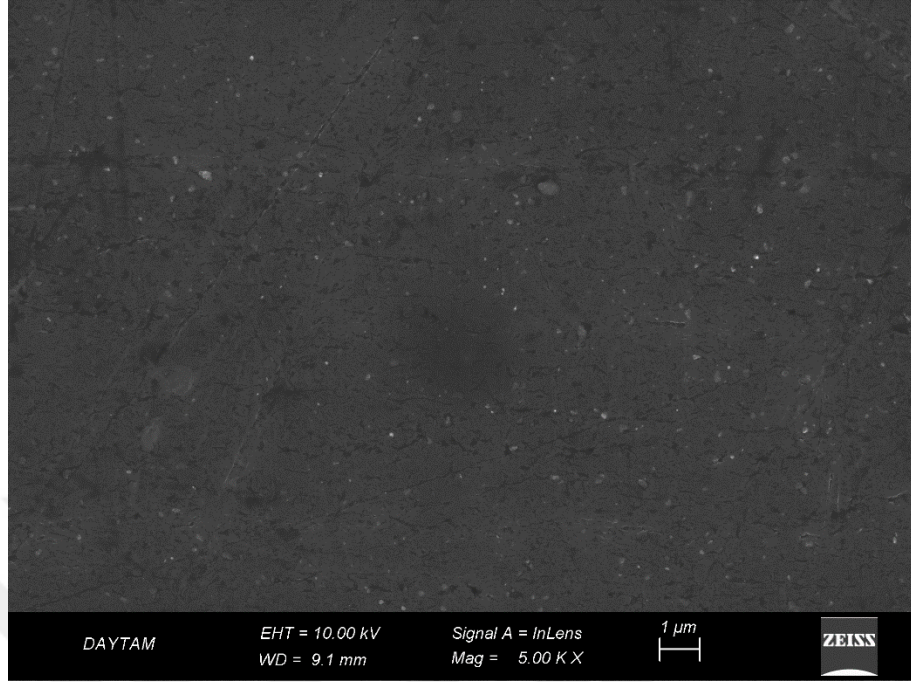
Şekil 4.54. Paslanmaz çelikten metal kaldırma hızı üzerine farklı işleme araçlarının kabiliyeti

4.2.4.c. SEM analizleri

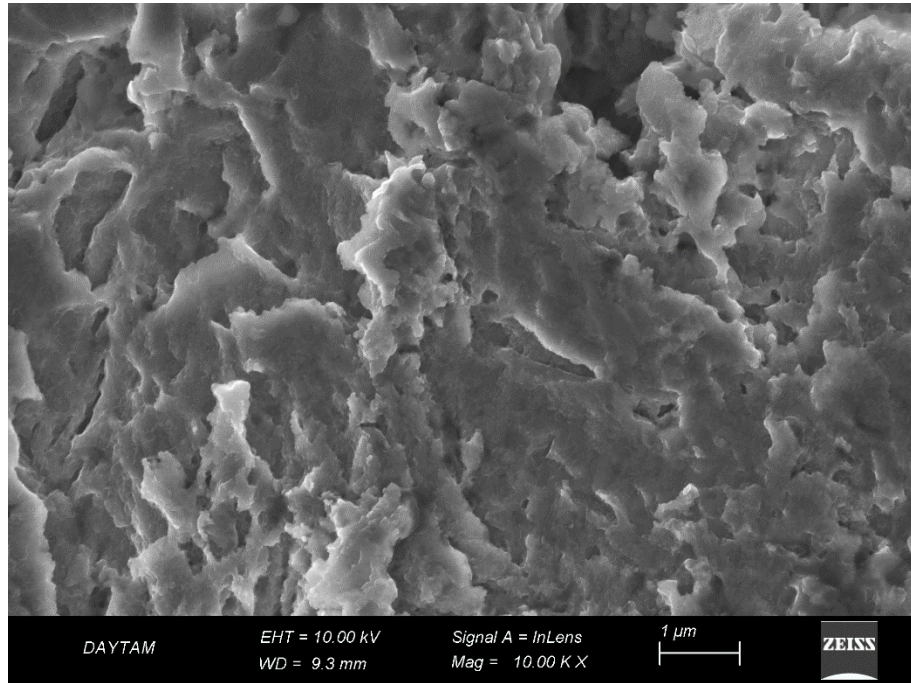
Yapılan çeşitli işleme deneylerinin etkisini görüntülemek için paslanmaz çelik iş parçalarının yüzeyinden SEM görüntüleri alınmış ve SEM mikrografları Şekil 4.55 ile 4.59'da verilmiştir. Sonuçlara göre enzimatik işlemlerin neticesinde paslanmaz çelik üzerinde herhangi bir biyo-nanoişleme gerçekleşmemiştir. Geleneksel işleme yöntemleri arasında hidroklorik asit paslanmaz çelik yüzeyini çok az miktarda ve sülfürik asit ise eser miktarda etkilemiştir. Bu görüntüler Çizelge 4.20'deki sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.



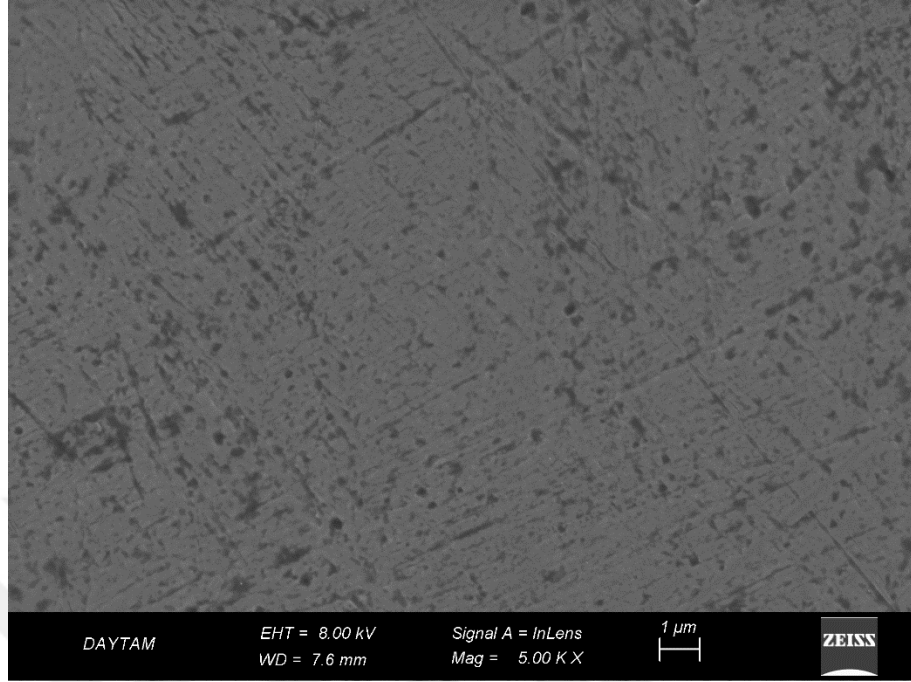
Şekil 4.55. Paslanmaz çelik kontrol numunenin SEM görüntüsü



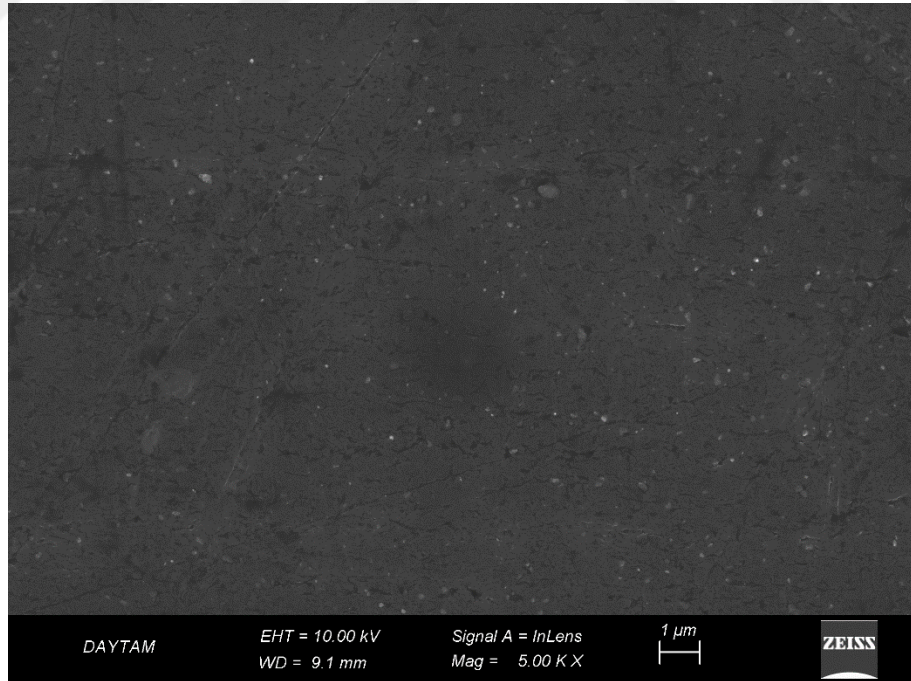
Şekil 4.56. Paslanmaz çelik iş parçası üzerinde GOx ile yapılan işlemin SEM görüntüsü



Şekil 4.57. Paslanmaz çelik üzerinde HCl ile yapılan işlemin SEM mikrografı



Şekil 4.58. Paslanmaz çelik üzerinde H₂SO₄ ile gerçekleştirilen işlemin SEM görüntüsü



Şekil 4.59. Paslanmaz çelik iş parçası üzerinde H₂O₂ ile yapılan işlemin SEM mikrografi

4.2.4.d. AFM analizleri

Paslanmaz çelik üzerinde yapılan işlemlerin etkisini yüzey kalitesi açısından araştırıp kıyaslamak için deney sonrası iş parçaları üzerinde AFM analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.20’de verilmiştir. Sonuçlara göre enzimatik işleme ile hidrojen peroksit herhangi bir işlemeye sebep olmamış ve yüzeyde oluşan pürüzlülükler kontrol numunesi ile hemen hemen aynıdır. Asitler (özellikle HCl) ise yüzeyde hasar oluşturmuş ve pürüzlere yol açmıştır. AFM analizlerinden elde edilen sonuçlar önceki sonuçları kanıtlamaktadır.

Çizelge 4.20. Paslanmaz çelik numunelerinin biyo-işleme sonrası pürüzlülük analizi sonuçları

Numune	İşleme metotlu	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	-	2.52	16.42	2.57	29.64
Paslanmaz çelik	Enzimatik	2.52	16.42	2.57	29.64
Paslanmaz çelik	HCl	14.55	70.74	12.93	118.5
Paslanmaz çelik	H ₂ SO ₄	6.31	28.47	16.39	45.18
Paslanmaz çelik	H ₂ O ₂	2.52	16.42	2.57	29.64

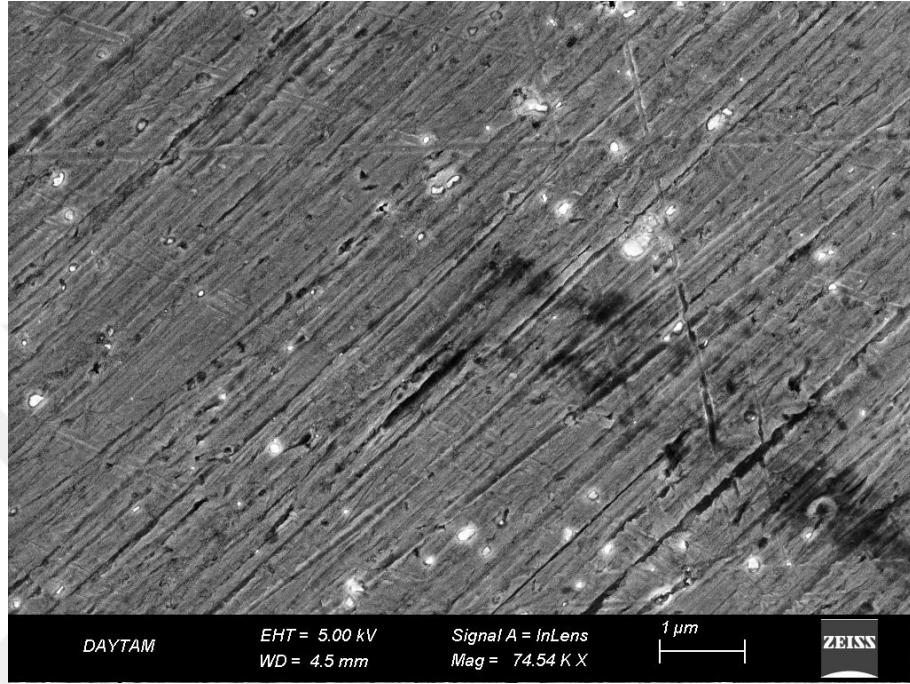
4.3. Alkol oksidaz enzimi ile biyolojik işleme

Alkol oksidaz enzimi ile biyo-işleme prosesi sadece pirinç ve bakır üzerinde uygulanmış ve yapılan deneyler ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.3.1. Pirinç iş parçası analizleri ve sonuçları

İş parçaları Şekil 4.1’de gösterildiği gibi hazırlandıktan sonra, Şekil 4.2 ve 4.3’de belirtilen zımpara işlemine tabi tutulmuştur. İşleme öncesi yüzey morfolojisini belirlemek için SEM görüntüsü alınmış ve aynı numunelerin yüzey pürüzlülüğü AFM

analizlerinden belirlenmiştir. Şekil 4.60'da SEM görüntüsü ve Çizelge 4.21'de AFM analizi verilmiştir.



Şekil 4.60. İşlenmemiş orijinal pirinç numunesinin SEM görüntüsü

Çizelge 4.21. Orijinal pirinç numunenin pürüzlülük analizi

Numune	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	2.346	15.55	3.620	48.98

4.3.1.a. Pirinç iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları

Deneylerde kullanılan pirinç iş parçalarının kütleleri, deneylerden önce ve sonra 0.1mg hassasiyetindeki terazi ile tartılmış ve belirlenen sonuçlar Çizelge 4.22'de verilmiştir. Bu sonuçlar Çizelge 3.17'de belirtilen deney düzeneği koşullarında bulunmuştur. Biyo-işleme sonrası kütle kaybı, kütle kaybı yüzdesi ve enzimatik nanoişleme verimi Denklem 4.1, 4.2 ve 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.22. Pirinç iş parçası ağırlık analiz sonuçları

Deney	Parametre	İlk ağırlık (g)	Son ağırlık (g)	K. K. (g)	K.K.Y. %	B. verimi
1	AOX enzimi 2.5 ml	4.835	4.834	0.001	0.1	0.020682523
2	AOX enzimi 5.0 ml	4.8431	4.8417	0.0014	0.14	0.028907105
3	AOX enzimi 7.5 ml	4.7781	4.7763	0.0018	0.18	0.037671878
4	AOX enzimi 10 ml	4.8299	4.8278	0.0021	0.21	0.043479161
5	Metanol 10 ml	4.8735	4.873	0.0005	0.05	0.010259567
6	Metanol 50 ml	4.8484	4.8471	0.0013	0.13	0.026812969
7	T 25 °C	4.9459	4.9455	0.0004	0.04	0.008087507
8	T 45 °C	4.835	4.8343	0.0007	0.07	0.014477766
9	T 2 saat	4.823	4.8229	0.0001	0.01	0.002073398
10	T 4 saat	4.8637	4.8633	0.0004	0.04	0.008224191
11	T 12 saat	4.7973	4.7951	0.0022	0.22	0.045859129
12	Rpm 25	4.8368	4.8364	0.0004	0.04	0.008269931
13	Rpm 75	4.8484	4.8477	0.0007	0.07	0.014437753
14	pH 6.5	4.8656	4.8651	0.0005	0.05	0.010276225
15	pH 8.5	4.8644	4.864	0.0004	0.04	0.008223008
16	Fe 0 g	4.7937	4.7928	0.0009	0.09	0.018774642
17	Fe 1.4 g	4.8357	4.8353	0.0004	0.04	0.008271812
18	Fe 2.78 g	4.8605	4.8602	0.0003	0.03	0.006172205
19	Fe 8.34 g	4.8218	4.8211	0.0007	0.07	0.0145174
20	HCl 1N	4.8808	4.8755	0.0053	0.53	0.108588756
21	H ₂ SO ₄ 1N	4.8542	4.8508	0.0034	0.34	0.070042437
22	H ₂ O ₂ 50%	4.8436	4.8371	0.0065	0.65	0.134197704

Çizelge 4.22’de yer alan parametreler arasında pH ve sıcaklık enzimin aktivitesini etkileyen en kritik ve önemli parametrelerdir. Diğer parametreler (enzim ve substrat miktarı, karıştırma hızı, zaman ve demir konsantrasyonu) enzim aktivitesini çok fazla etkilememektedirler ve istenilen işleme verimini sağlamak için ayarlanabilirler.

4.3.1.b. Özgül metal kaldırma hızı

Biyo-işleme prosesinde “Metal kaldırma hızı” (MRR) ve “özümlü metal kaldırma hızı” (SMRR) önemli terimlerdir.

Belirli bir zaman zarfı içinde kaldırılan malzeme miktarı MRR olarak tarif edilir ve g/san⁵⁹ ya da ng/saat⁶⁰ vb. birimlerle ifade edilirler. Özümlü metal kaldırma hızı ise belirli bir zaman dilimi içinde iş parçası yüzeyinden kaldırılan metal miktarıdır (ng/nm².saat). Metal kaldırma hızı ve özümlü metal kaldırma hızı Denklem 4.4. ve 4.5 ile hesaplanmıştır.

Pirinç iş parçaları için AOX ile biyo-işleme süreci neticesinde elde edilen MRR ve SMRR sonuçları Çizelge 4.23’de verilmiştir.

Çizelge 4.23. Pirinç iş parçası MRR ve SMRR sonuçları

Deney	ΔW (g)	ΔW (ng)	A (nm ²)	T (saat)	MRR (ng/saat)	SMRR (ng/nm ² .saat)
1	0.001	1000000	4.73E+14	6	166666.6667	3.53E-10
2	0.0014	1400000	4.73E+14	6	233333.3333	4.93E-10
3	0.0018	1800000	4.73E+14	6	300000	6.35E-10
4	0.0021	2100000	4.74E+14	6	350000	7.39E-10
5	0.0005	500000	4.76E+14	6	83333.33333	1.75E-10
6	0.0013	1300000	4.75E+14	6	216666.6667	4.56E-10
7	0.0004	400000	4.70E+14	6	66666.66667	1.42E-10
8	0.0007	700000	4.73E+14	6	116666.6667	2.46E-10
9	0.0001	100000	4.74E+14	2	50000	1.06E-10
10	0.0004	400000	4.76E+14	4	100000	2.10E-10
11	0.0022	2200000	4.57E+14	12	183333.3333	4.01E-10
12	0.0004	400000	4.74E+14	6	66666.66667	1.41E-10
13	0.0007	700000	4.75E+14	6	116666.6667	2.46E-10
14	0.0005	500000	4.75E+14	6	83333.33333	1.75E-10

⁵⁹ Gram/Second

⁶⁰ Nanogram/ hour

Çizelge 4.23. (devam)

15	0.0004	400000	4.76E+14	6	66666.66667	1.40E-10
16	0.0009	900000	4.72E+14	6	150000	3.18E-10
17	0.0004	400000	4.75E+14	6	66666.66667	1.40E-10
18	0.0003	300000	4.75E+14	6	50000	1.05E-10
19	0.0007	700000	4.74E+14	6	116666.6667	2.46E-10
20	0.0053	5300000	4.76E+14	6	883333.3333	1.86E-09
21	0.0034	3400000	4.75E+14	6	566666.6667	1.19E-09
22	0.0065	6500000	4.75E+14	6	1083333.333	2.28E-09

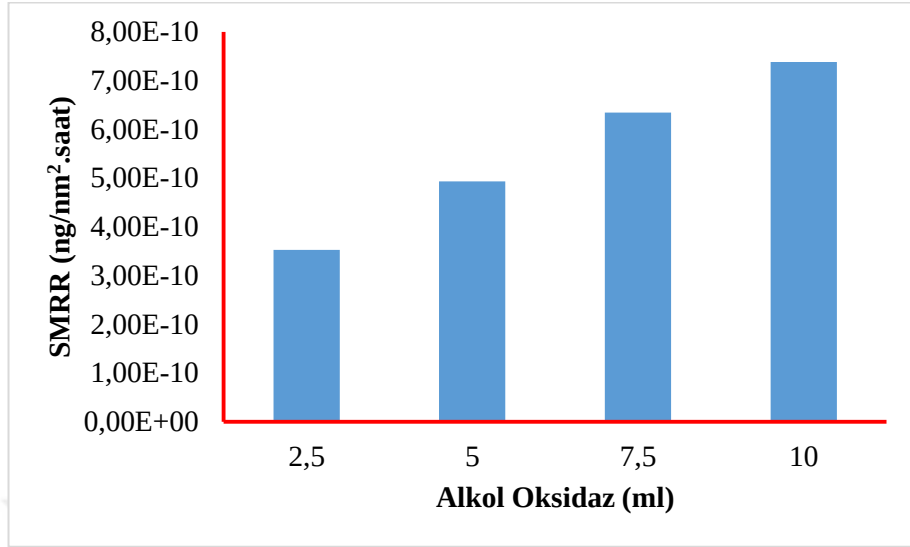
Çizelgeye göre, maksimum SMRR değeri $7.39E-10$ ng/nm².saat ile deney 4’de ve minimum SMRR miktarı $1.05E-10$ ng/nm².saat ile deney 18’de elde edilmiştir. Ancak istenen işleme miktarına ulaşmak için Çizelge 4.22’de verilen farklı biyo-işleme koşulları ile sağlanabilmektedir.

4.3.1.c. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi

Pirinç iş parçaları üzerine AOX enzimi ile yapılan biyo-işlemeyi etkileyen önemli parametreler aşağıda tartışılmaktadır.

1. AOX enziminin miktarı

Reaksiyon ortamında enzim ile birlikte yeterince substrat bulunması halinde, reaksiyonun hızı da artarak devam etmektedir. Pirinç iş parçalarının enzimatik işlenmesinde kullanılan AOX’ın etkisi yapılan deneylerle incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.61’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre enzim miktarı arttırıldıkça, metal kaldırma hızı artmakta ve biyo-nanoişleme süreci yüksek bir hızda gerçekleşmiştir.

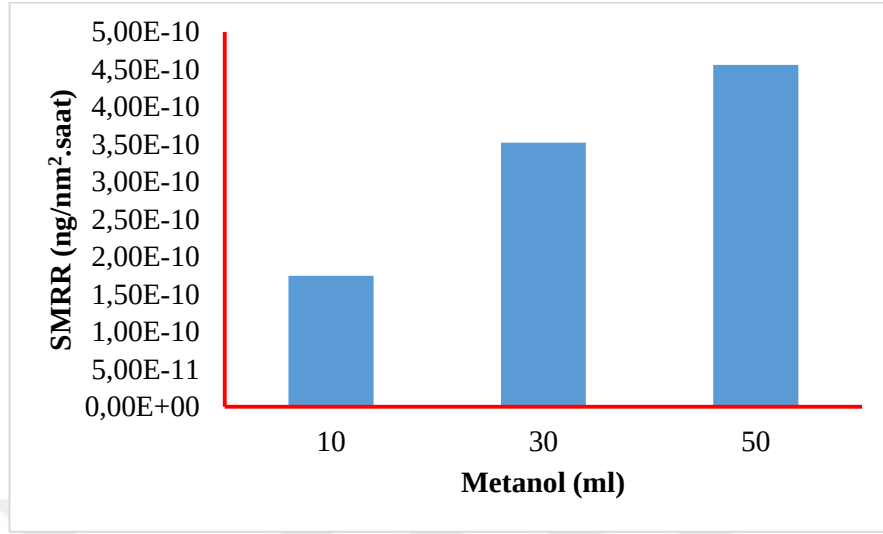


Şekil 4.61. Pirinç iş parçası üzerinde AOX enzimi miktarının etkisi

Buradaki deneylerde 2.5 ml enzim kullanıldığında SMRR miktarı 3.53×10^{-10} iken, 10 ml kullanıldığında en yüksek miktarda (7.39×10^{-10}) gerçekleşmiştir. Enzim bulunduğunda işleme reaksiyonu hızla devam edebilirken, ortamdaki substrat azalmasından dolayı bu reaksiyonu yavaşlayıp durabilmektedir.

2. Metanolün etkisi

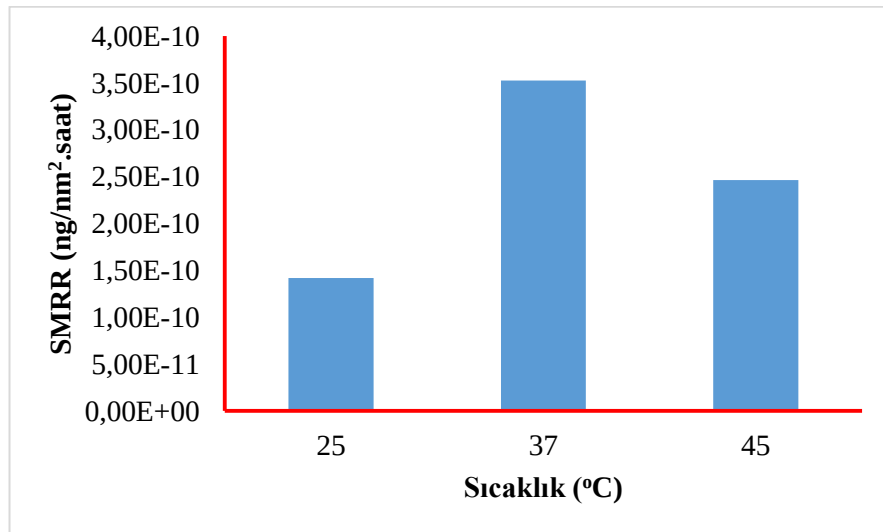
Çizelge 2.1'e göre alkol oksidazın en uygun substratı metanoldür. AOX ile yapılan biyolojik işlemede metanolün etkisini belirlemek için üç farklı metanol konsantrasyonunda deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.62'de verilmiştir. Sonuçlara göre substratın miktarı arttırıldıkça enzimatik nanoişleme daha hızlı ilerlemektedir. Ancak süre ilerledikçe ortamdaki enzimin tükenmesinden dolayı reaksiyon yavaşlamakta ve dengeye ulaşılmaktadır.



Şekil 4.62. Enzimatik işleme üzerine metanol substratın etkisi

3. Sıcaklığın etkisi

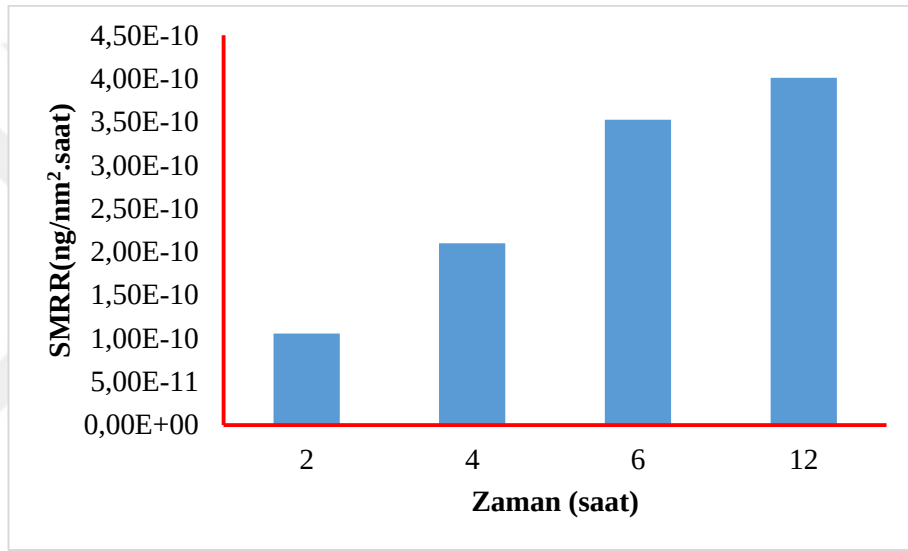
Sıcaklık, enzimin yapısını doğrudan etkilediği için enzimatik işlemlerde çok önemli bir parametredir. Bu parametrenin etkisini belirlemek ve enzimin çalışabileceği doğru sıcaklığı bulmak için üç farklı sıcaklıkta deneyler yapılmış ve sonuçta 37°C olduğu tespit edilmiştir. 37°C'in altında ve üstünde enzimin yapısı bozulmakta ve denatüre olabilmektedir. Şekil 4.63'de sıcaklığın etkisi verilmiştir.



Şekil 4.63. Alkol oksidaz ile pirinç üzerinde yapılan işlemede sıcaklığın etkisi

4. Zamanın etkisi

Pirincin biyo-işlemesi üzerinde reaksiyon süresinin etkisini incelemek amacıyla farklı sürelerde enzimatik işlemler gerçekleştirilmiş ve bulunan sonuçlar Şekil 4.64’de verilmiştir. Grafiğe göre reaksiyon süresinin arttırılması ile biyo-işleme prosesi de daha fazla ilerlemektedir. Ancak bu işlem reaksiyon ortamında yeterince enzim bulunmadığında yavaşlayıp durmaktadır.

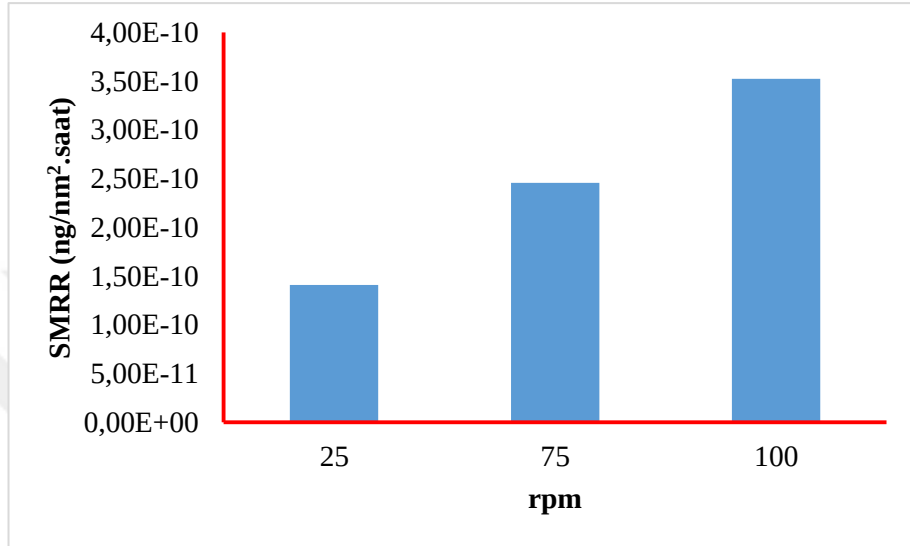


Şekil 4.64. Enzimatik biyo-işleme üzerine sürenin etkisi

5. Karıştırma hızının etkisi

Reaksiyonlar, genel olarak karıştırıldığı zaman reaktant moleküllerinin arasındaki çarpışma sayısının artmasından dolayı daha hızlı ilerlemektedir. Pirinç iş parçaları üzerinden metal kaldırma işleminde bu parametrenin etkisini görmek için 25, 75 ve 100 rpm’de AOX kullanarak biyo-işleme gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.65’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre karıştırma hızı ile SMRR arasında doğrusal ilişkinin olduğu ortaya çıkmaktadır ($R^2=1$).

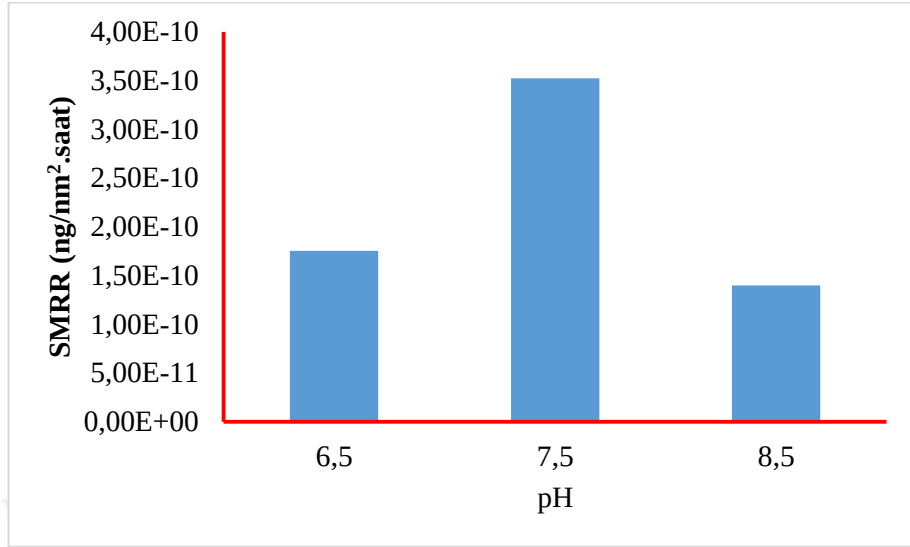
1.41E-10 ng/nm².saat SMRR 25 rpm’de gerçekleştiği halde, 100 rpm’de 3.53E-10 ng/nm².saat oluşmuştur. Bundan dolayı AOX enzimi ile pirinç üzerine yapılan bütün deneylerde 100 rpm kullanılmıştır.



şekil 4.65. Pirinç iş parçasının enzimatik işleminde karıştırma hızının etkisi

6. pH’nın etkisi

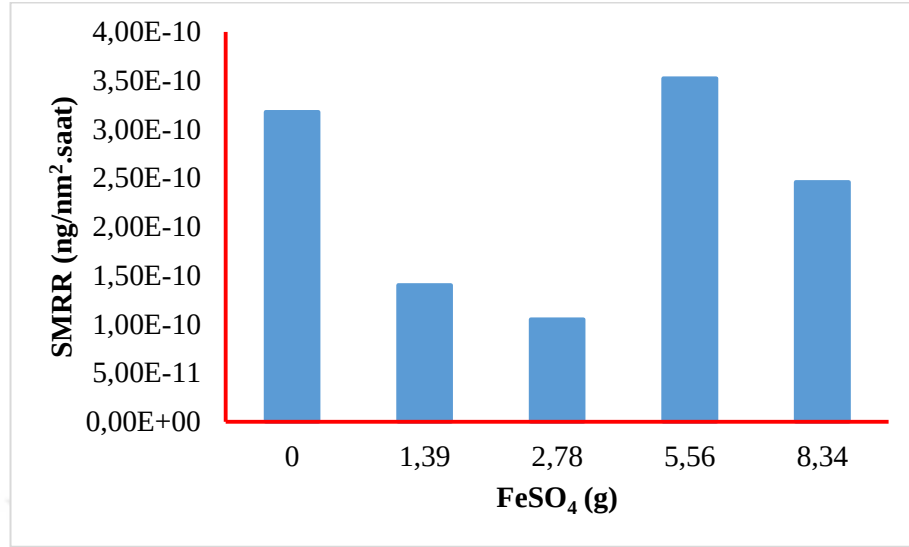
pH, enzim aktivitesini doğrudan etkileyen faktörlerden biri olup, yanlış pH değerlerinde enzim denatüre olabilir veya aktivitesini kaybedebilir. Dolayısıyla AOX için optimum pH değerini bulmak üzere pH 6.5, 7.5 ve 8.5 seviyelerinde deneyler yapılmış ve bulunan deney sonuçları şekil 4.66’da verilmiştir. Sonuçlara göre pH 7.5’de 3.53E-10 ng/nm².saat maksimum SMRR olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla pirinç üzerine bütün biyo-işlemeler bu pH’da gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.66. Pirinç üzerinde AOX ile yapılan işlemede reaksiyon ortamının pH etkisi

7. Fe (II) miktarının etkisi

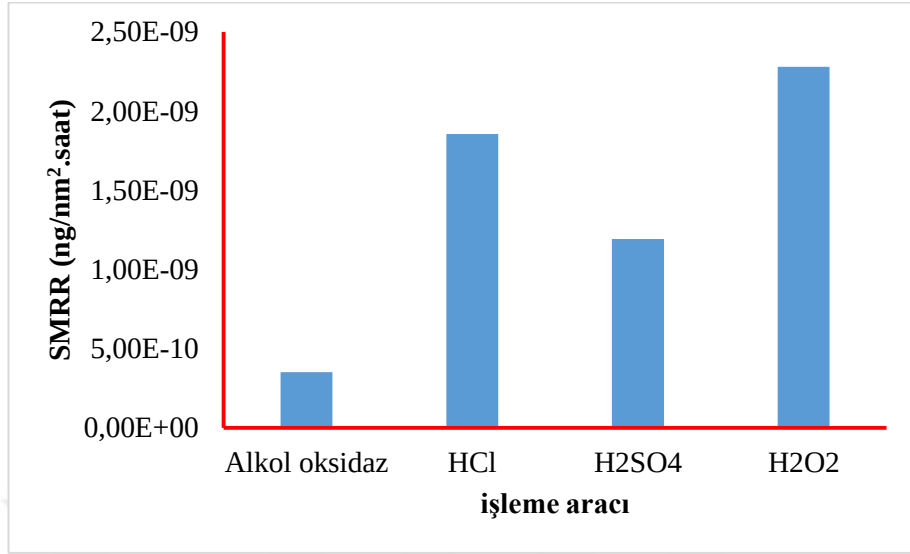
Enzimatik biyo-işleme Fenton reaksiyonu ile yürütüldüğü için, reaksiyon ortamındaki demir miktarının etkisini de araştırmak gerekmektedir. Beş farklı demir konsantrasyonunda (Çizelge 4.22) yapılan işleme sonunda demirin optimum miktarı belirlenmiş ve ortaya çıkan sonuçlar Şekil 4.67’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 5.56 g Fe(II) konsantrasyonunda maksimum SMRR 3.53×10^{-10} ng/nm².saat olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.67. Alkol oksidaz ile pirinç üzerinde yapılan biyo-işlemede Fe²⁺ etkisi

8. İşleme araçlarının etkisi

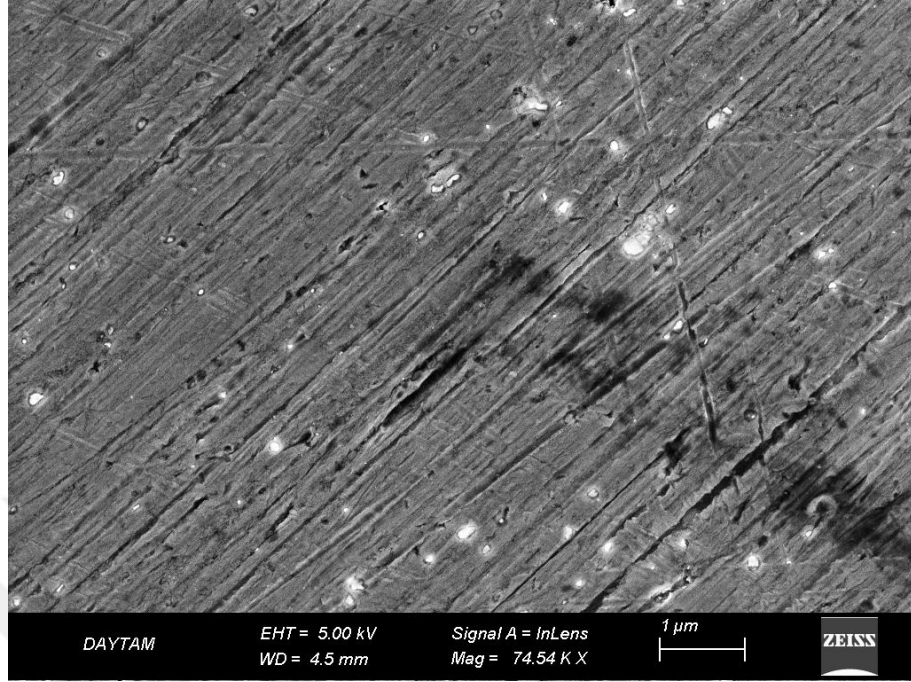
AOX enziminin kabiliyetini diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırmak için 1N HCl, 1N H₂SO₄ ve 50%v/v H₂O₂ ortamında işleme gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.68’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hidrojen peroksit en fazla metal (2.28E0-9 ng/nm².saat) kaldırırken, AOX’in en az (3.53E-10 ng/nm².saat) miktarda işleme yaptığı görülmüştür. HCl ve sülfürik asit üçüncü ve dördüncü sırada yer almıştır. Düzgünlük ve hasarsız işleme açısından sıralandığında; AOX> H₂SO₄> HCl> H₂O₂ şeklinde olmuştur. Buna göre nano boyutlarda işleme için en uygun yöntemin enzimatik yöntem olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.



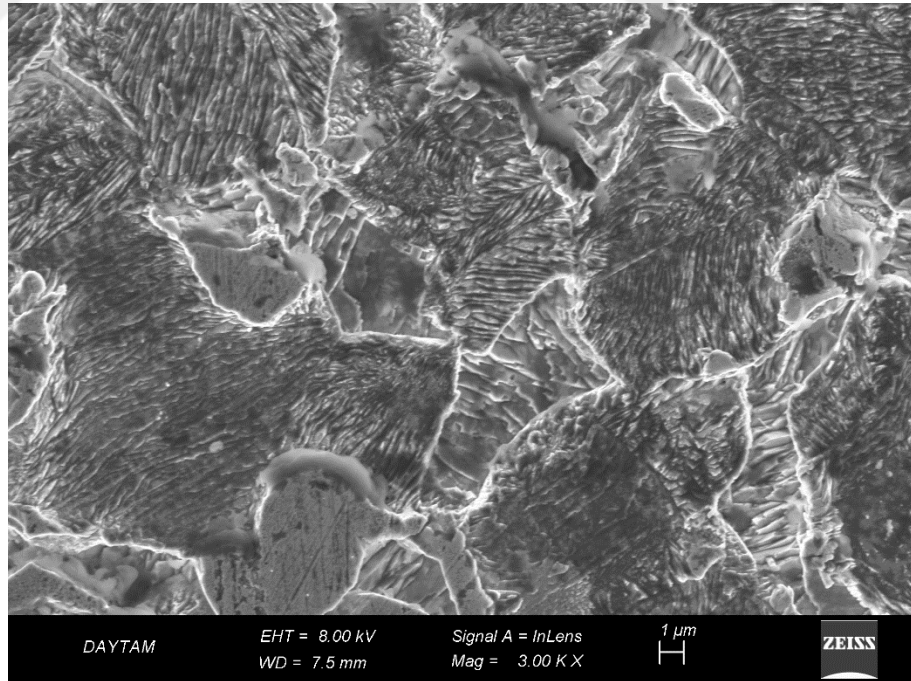
Şekil 4.68. Pirinçin işleminde enzimatik işleme ile geleneksel işleme araçlarının kıyaslaması

4.3.1.3.9. SEM analizleri

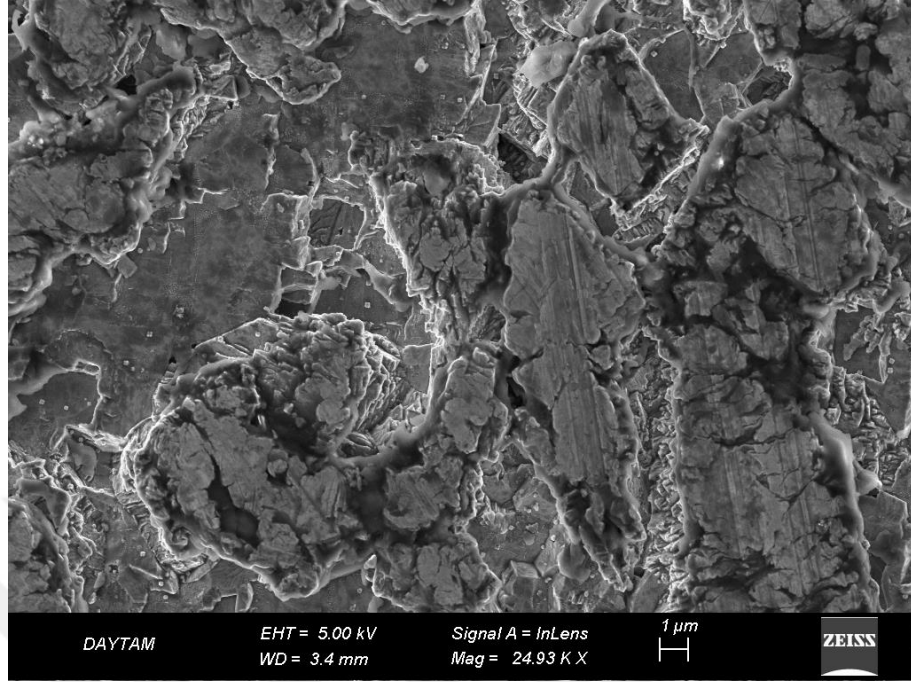
Alkol oksidaz ile farklı koşullar altında pirinç numuneleri üzerinde yapılan enzimatik biyo-işleme sonunda bazı numunelere dair SEM mikrografları ve ayrıca geleneksel metotlarla gerçekleşen işlemlerin SEM görüntüleri Şekil 4.69 ila 4.73’de verilmiştir. AOX enzimi ile işlenmiş yüzeylerin morfolojilerinin kontrol numunesine çok yakın olduğu gözlenmiş ve yüzeylerin herhangi bir hasara uğramadığı görülmüştür. Diğer yöntemlerle (anorganik asitler) metal yüzeyinde kontrolsüz işleme gerçekleşmiş ve yüzeylerde kötü hasarlar oluşmuştur. Elde edilen diğer sonuçlarla birlikte SEM görüntüleri, enzimatik işlemin daha kusursuz olduğunu teyit etmekte ve bu yöntemin mikro ve nano boyutlarda işleme yapmak için çok uygun bir metot olduğunu ortaya koymaktadır. SEM görüntüleri ayrıca Çizelge 4.24’de yer alan sonuçları da kanıtlamaktadır.



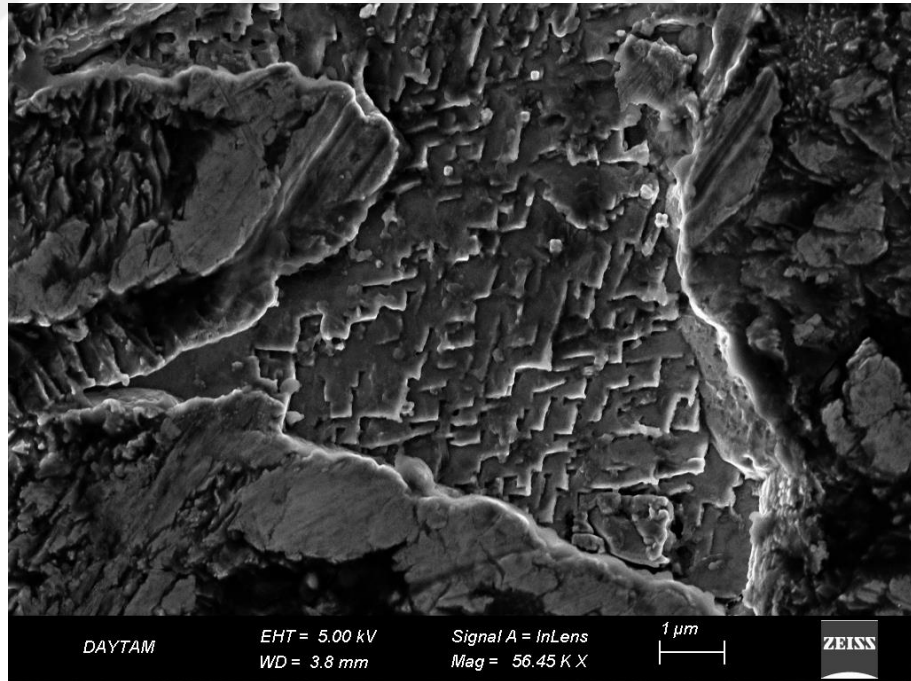
Şekil 4.69. Pirinç kontrol numunesinin SEM görüntüsü



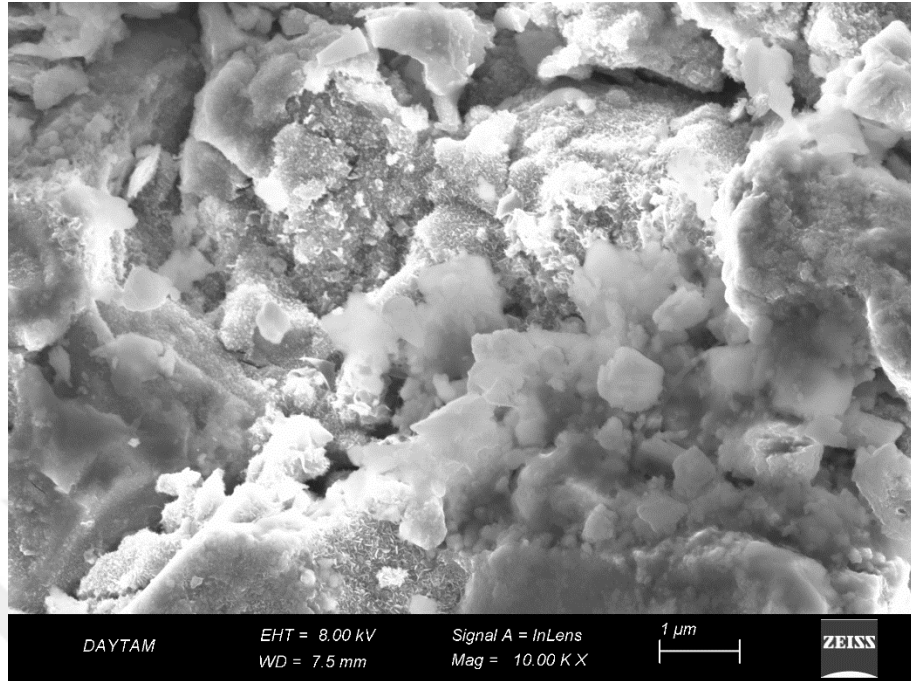
Şekil 4.70. AOX ile pirinç iş parçası üzerinde yapılan işlemenin SEM mikrosafı



Şekil 4.71. HCl ile pirinç üzerinde yapılan işlemin SEM görüntüsü



Şekil 4.72. H_2SO_4 ile işlenmiş pirinç iş parçasının yüzey morfolojisi görüntüsü



Şekil 4.73. H_2O_2 ile işlenmiş pirinç iş parçasının SEM görüntüsü

10. AFM analizleri

Pirinç iş parçaları yüzeylerinde yapılan işlemlerin niteliklerini ve işleme esnasında oluşan pürüzlülükleri incelemek için numunelerin yüzeyinde AFM analizi yapılmış ve AFM analiz sonuçları Çizelge 4.24’de verilmiştir.

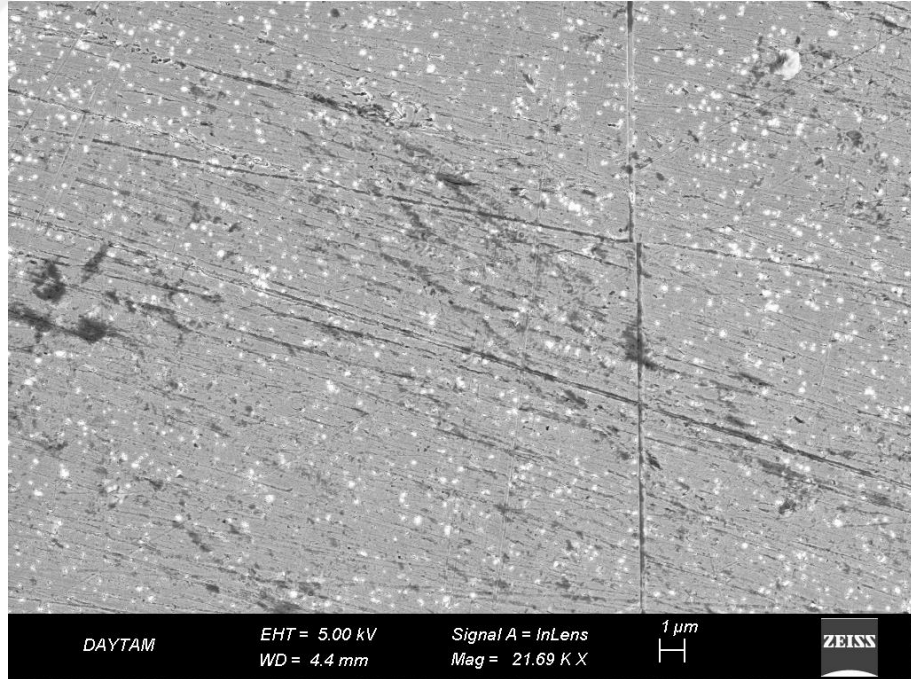
Çizelge 4.24. İşlenmiş pirinç numunelerin pürüzlülük değerleri

Numune	İşleme metotlu	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	-	2.346	15.55	3.62	48.95
Pirinç	AOX enzimi	3.417	19.61	3.92	51.17
Pirinç	HCl	12.14	62.03	5.72	217.02
Pirinç	H_2SO_4	9.39	43.74	24.31	148.72
Pirinç	H_2O_2	18.83	86.03	47.55	331.42

Çizelge değerlerine göre enzim ile yapılan işleme sonunda pirinç iş parçası üzerinde daha az hasar oluşmuş ve işleme diğer araçlarla yapılan işlemlere göre ünitormdur ve elde edilen yüzey, kontrol numunesinin yüzeyine benzemektedir. AOX ile 51.17 nm'lik pürüzlülük elde edilmişken, hidrojen peroksitle 331.42 nm'lik pürüzlülük oluşmuştur. Bu sonuçlar enzimatik işlemenin nano boyutta gerçekleştiğini ayrıca hidrojen peroksidin yüzeye çok daha fazla hasar verdiğini göstermektedir.

4.3.2. Bakır iş parçası analizleri ve sonuçları

AOX enzimi ile biyo-işleme yapmak için seçilen diğer metal bakırdır. Bakır iş parçaları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilen prosedür ile hazırlandıktan sonra, yüzey morfoloji analizleri için SEM görüntüleri alınmış ve yüzey pürüzlülüğünün belirlenmesi için aynı numunelerin AFM analizleri yapılarak, Şekil 4.74'de ve Çizelge 4.25'de morfoloji analizleri verilmiştir.



Şekil 4.74. Orjinal bakır iş parçasının SEM görüntüsü

Çizelge 4.25. Orjinal bakır numunenin pürüzlülük analizi

Numune	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	2.346	15.55	3.620	48.98

4.3.2.a. Bakır iş parçalarının ağırlık analiz sonuçları

AOX ile yapılan enzimatik deneyler sırasında kullanılan bakır iş parçalarının kütleleri, deneylerden önce ve sonra 0.1mg hassasiyetli terazi ile tartılmış ve bulunan sonuçlar Çizelge 4.26’da verilmiştir. Bu deneyler Çizelge 3.17’de belirtilen deney düzeneği şartları çerçevesinde yapılmıştır. Biyo-işleme sonrası kütle kaybı (K.K.), kütle kaybı yüzdesi (K.K.Y.) ve enzimatik biyo-nanoişleme verimi (B. Verimi) Denklem 4.1, 4.2 ve 4.3’e göre hesaplanmıştır. Ayrıca Çizelge 2.27’de MRR ve SMRR miktarları gerekli hesaplamalar sonucunda verilmiştir.

Çizelge 4.26. Bakır iş parçaları ağırlık analiz sonuçları

Deney	Parametre	İ. ağırlık (g)	S. ağırlık (g)	K. K. (g)	K.K.Y. %	B. verimi
1	AOX enzimi 2.5 ml	5.2474	5.2467	0.0007	0.07	0.01333994
2	AOX enzimi 5.0 ml	5.2661	5.2652	0.0009	0.09	0.017090446
3	AOX enzimi 7.5 ml	5.2837	5.2826	0.0011	0.11	0.020818744
4	AOX enzimi 10 ml	5.2548	5.2534	0.0014	0.14	0.026642308
5	Metanol 10 ml	5.2935	5.2932	0.0003	0.03	0.005667328
6	Metanol 50 ml	5.2826	5.2814	0.0012	0.12	0.022716087
7	T 25 °C	5.2758	5.2756	0.0002	0.02	0.003790894
8	T 45 °C	5.3178	5.3174	0.0004	0.04	0.007521908
9	T 2 saat	5.2894	5.2893	1E-04	0.01	0.001890574
10	T 4 saat	5.2897	5.2894	0.0003	0.03	0.005671399
11	T 12 saat	5.6329	5.6311	0.0018	0.18	0.031955121
12	Rpm 25	5.3064	5.3061	0.0003	0.03	0.00565355
13	Rpm 75	5.2364	5.2359	0.0005	0.05	0.009548545
14	pH 6.5	5.2984	5.2979	0.0005	0.05	0.009436811
15	pH 8.5	5.2873	5.2869	0.0004	0.04	0.007565298

Çizelge 4.26. (devam)

16	Fe 0 g	5.2708	5.27	0.0008	0.08	0.015177962
17	Fe 1.4 g	5.2567	5.2561	0.0006	0.06	0.011414005
18	Fe 2.78 g	5.285	5.2846	0.0004	0.04	0.00756859
19	Fe 8.34 g	5.2352	5.2342	0.001	0.1	0.019101467
20	HCl 1N	5.2947	5.2791	0.0156	1.56	0.294634257
21	H ₂ SO ₄ 1N	5.2607	5.2576	0.0031	0.31	0.058927519
22	H ₂ O ₂ 50%	5.2908	5.2899	0.0009	0.09	0.01701066

Tabloda bulunan etkin parametreler içinde pH ve sıcaklık iki kritik ve önemli parametre olarak değerlendirilmesi gerekir. Her iki parametre enzim aktivitesini doğrudan etkilediği için, optimum miktarlarının belirlenmesi gerekmektedir. Diğer parametreler istenen amaca göre ayarlanabilir.

Çizelge 4.27. Bakır iş parçası MRR ve SMRR sonuçları

Deney	ΔW (g)	ΔW (ng)	A (nm ²)	T (saat)	MRR (ng/saat)	SMRR (ng/nm ² .saat)
1	0.0007	700000	4.79E+14	6	116666.6667	2.44E-10
2	0.0009	900000	4.79E+14	6	150000	3.13E-10
3	0.0011	1100000	4.79E+14	6	183333.3333	3.82E-10
4	0.0014	1400000	4.78E+14	6	233333.3333	4.88E-10
5	0.0003	300000	4.80E+14	6	50000	1.04E-10
6	0.0012	1200000	4.79E+14	6	200000	4.18E-10
7	0.0002	200000	4.80E+14	6	33333.33333	6.95E-11
8	0.0004	400000	4.81E+14	6	66666.66667	1.39E-10
9	1E-04	100000	4.79E+14	2	50000	1.04E-10
10	0.0003	300000	4.79E+14	4	75000	1.56E-10
11	0.0018	1800000	4.93E+14	12	150000	3.05E-10
12	0.0003	300000	4.80E+14	6	50000	1.04E-10
13	0.0005	500000	4.78E+14	6	83333.33333	1.74E-10

Çizelge 4.27. (devam)

14	0.0005	500000	4.78E+14	6	83333.33333	1.74E-10
15	0.0004	400000	4.79E+14	6	66666.66667	1.39E-10
16	0.0008	800000	4.79E+14	6	133333.3333	2.78E-10
17	0.0006	600000	4.78E+14	6	100000	2.09E-10
18	0.0004	400000	4.79E+14	6	66666.66667	1.39E-10
19	0.001	1000000	4.79E+14	6	166666.6667	3.48E-10
20	0.0156	15600000	4.77E+14	6	2600000	5.45E-09
21	0.0031	3100000	4.78E+14	6	516666.6667	1.08E-09
22	0.0009	900000	4.79E+14	6	150000	3.13E-10

Çizelge incelendiğinde farklı faktörlerin SMRR üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak görülmektedir. En yüksek biyolojik işleme miktarı $4.88E-10$ ng/nm².saat olarak deney 4 koşullarında hâsıl olurken, en düşük miktarı ise deney 7’de $6.95E-11$ ng/nm².saat olarak elde edilmiştir. Ancak istenen nano-işleme değerlerini elde etmek için farklı deney şartlarını göz önüne almak gerekir.

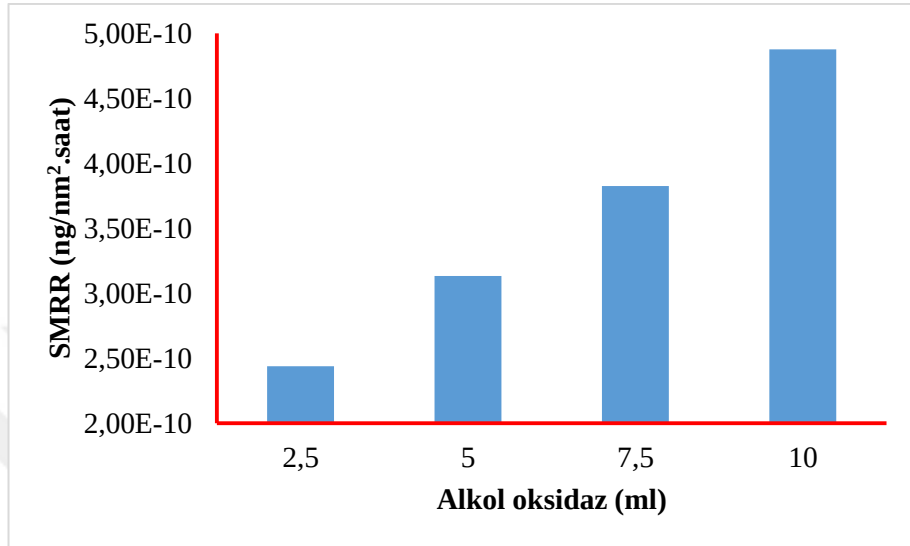
4.3.2.b. Enzimatik işleme üzerine etkin parametrelerin incelemesi

Biyolojik işleme prosesini etkileyen önemli parametreler, bakır iş parçası üzerinde araştırılmış ve elde edilen sonuçlar grafikler şeklinde verilmiş ve tartışılmıştır.

1. AOX enziminin etkisi

Bakır iş parçalarının biyo-işleminde AOX enziminin etkisini araştırmak için Çizelge 4.26’da gösterildiği üzere dört farklı enzim miktarı kullanılarak deneyler yapılmıştır. Altı saatlik biyolojik işlemeden sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.75’te verilmiştir. Sonuçlar AOX enzimi miktarı ile SMRR arasında doğrusal bir ilişkinin varlığını

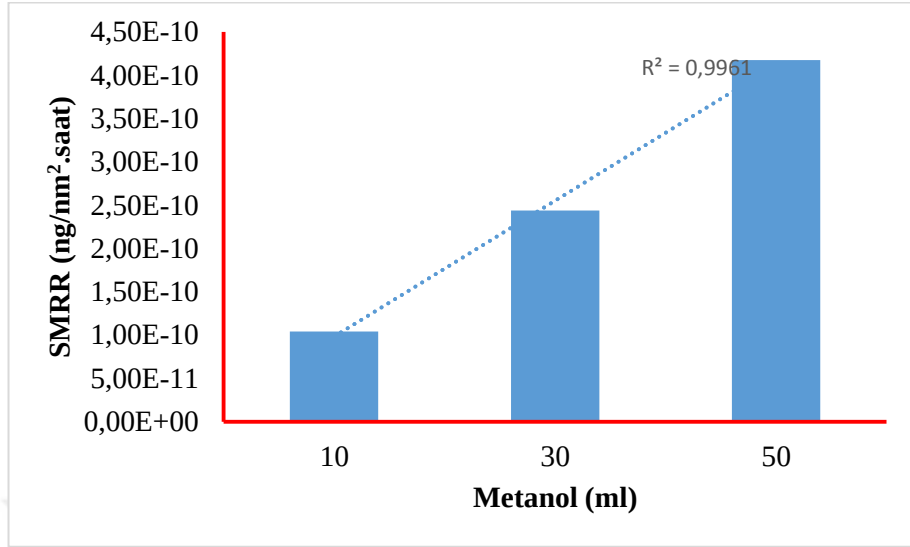
göstermektedir. Ancak yüksek AOX miktarlarında metal kaldırma hızı yavaşlamaktadır ki bu, reaksiyon ortamındaki substratın tükenmesinden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 4.75. AOX enziminin biyo-işleme üzerine etkisi

2. Metanol konsantrasyonunun etkisi

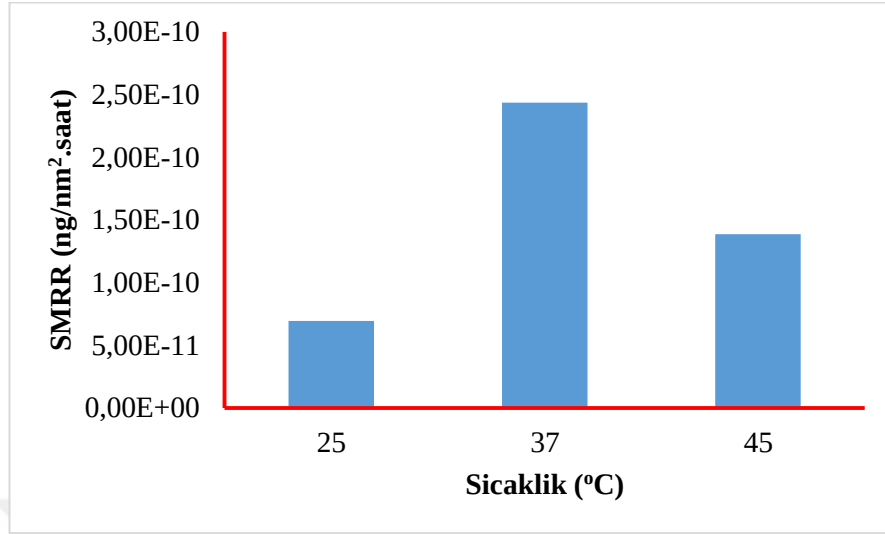
AOX enziminin en uygun substratı Çizelge 2.1’de belirtilen metanoldür. AOX ile bakır iş parçaları üzerinde yapılan işlemede metanolün etkisini incelemek amacıyla üç farklı miktarda, 10 mL, 30 mL ve 50 mL metanol kullanarak deneyler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.76’da gösterilmiştir. Sonuçlara göre substratın miktarı arttıkça enzimatik işleme daha da hızlı ilerlemekte, ancak ortamdaki enzimin tükenmesinden kaynaklanan sınırlamalara göre reaksiyon yavaşlamakta ve dengeye ulaşılmaktadır.



Şekil 4.76. AOX enzimi ile bakır üzerinde yapılan işlemede metanol substratın etkisi

3. Sıcaklığın etkisi

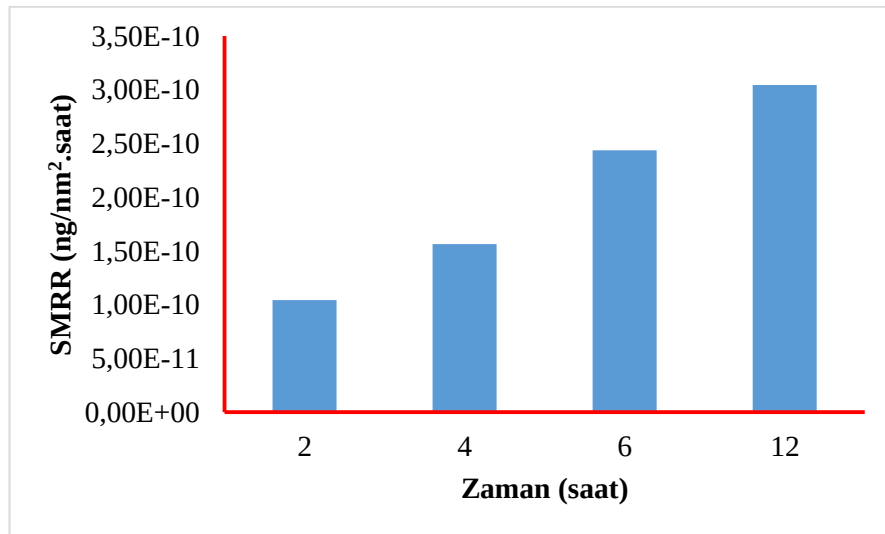
Sıcaklık enzimin yapısını doğrudan etkileyen parametrelerdendir. Bu parametrenin etkisini bakırın enzimatik işleminde belirlemek ve enzimin çalışabileceği doğru sıcaklığı bulmak için üç farklı sıcaklıkta deneyler yapılmış olup, bulunan sonuçlara göre 37°C’de maksimum SMRR miktarı oluşmuştur. 37°C altı ve üzerinde enzimin yapısı bozulmakta ve denatüre olmakta, bundan dolayı tüm deneyler 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.77’de sıcaklığın etkisi, bakırın AOX enzimi ile yapılan işlemesine göre verilmiştir.



Şekil 4.77. Bakırın enzimatik işlemesi üzerine sıcaklığın etkisi

4. Zamanın etkisi

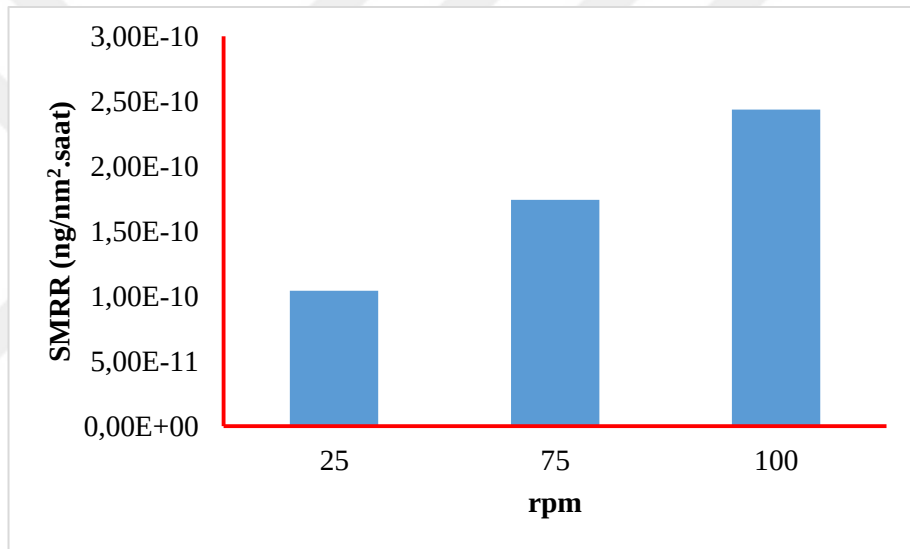
Bakırın zamana bağlı olarak biyo-işlemesini incelemek ve zamanın metal kaldırma üzerindeki etkisini tespit etmek için farklı sürelerde enzimatik işleme gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.78’de verilmiştir. Grafiğe göre sürenin ilerlemesiyle birlikte biyo-işleme prosesi daha da ilerlemiştir. Ancak işlem, reaksiyon ortamındaki reaktantların tükenmesiyle yavaşlayarak denge oluşmaktadır.



Şekil 4.78. Bakır üzerinde AOX enzimiyle yapılan işlemede zamanın etkisi

5. Karıştırma hızının etkisi

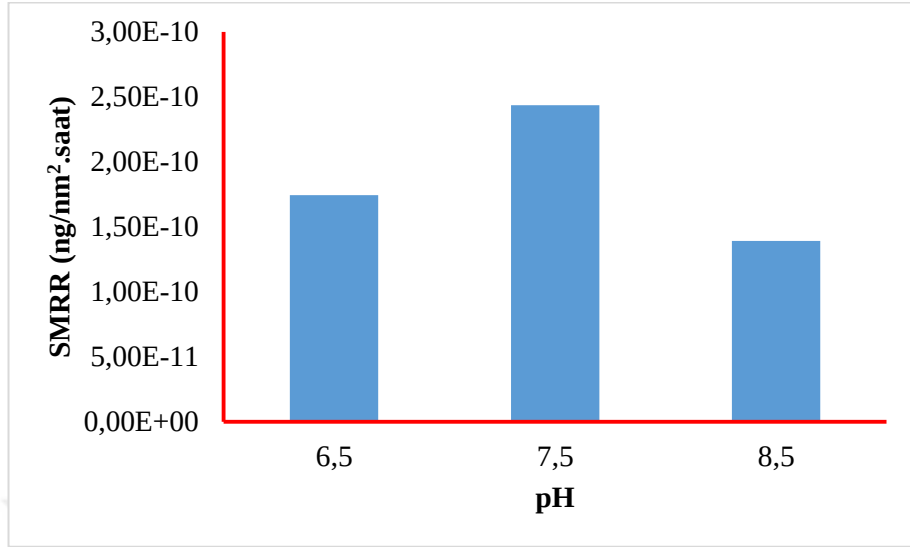
Reaksiyonlar, karıştırma hızı artırıldığında reaktantların arasındaki çarpışma sayısının artmasından dolayı hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Bu parametrenin etkisini biyolojik işleme üzerinde görmek için üç farklı karıştırma hızda (25, 75 ve 100 rpm) deneyler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.79’da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, karıştırma hızı ile SMRR arasında doğrusal ilişki bulunmaktadır. Maksimum SMRR miktarı $2.44 \text{ E-}10 \text{ ng/nm}^2 \cdot \text{saat}$ olarak 100 rpm’de gerçekleşmiştir.



Şekil 4.79. Bakır iş parçalarını biyo-işlemesi üzerine karıştırma hızının etkisi

6. pH’nın etkisi

pH, enzim aktivitesini doğrudan etkileyen faktörlerden biri olduğu için, bakırın enzimatik işlemindeki AOX için uygun pH değerini bulmak amacıyla pH 6.5, 7.5 ve 8.5 seviyelerinde deneyler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.80’de verilmiştir. Sonuçlara göre pH 7.5’de AOX enzimi maksimum aktivitesini sergilemiş olup, en fazla metal kaldırma (SMRR) ($2.44 \text{ E-}10 \text{ ng/ nm}^2 \cdot \text{saat}$) bu pH değerinde olmuştur.



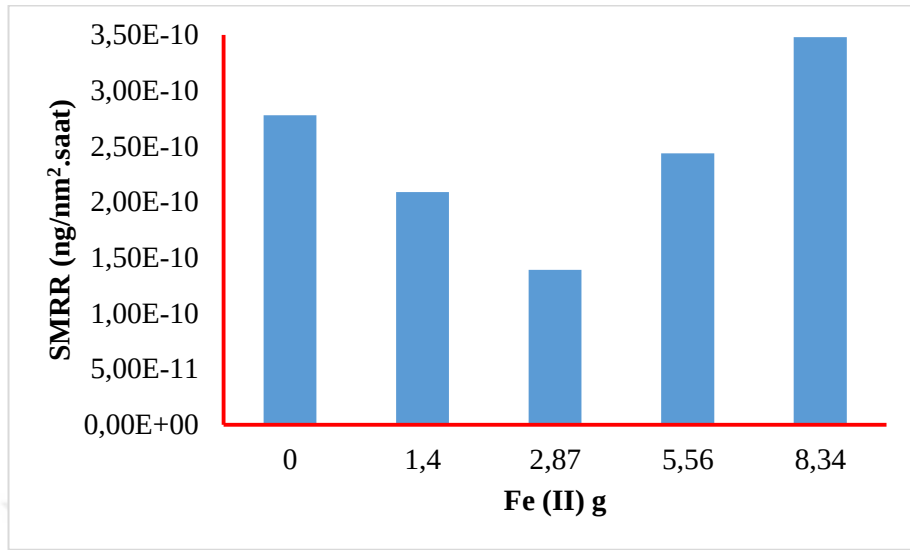
Şekil 4.80. AOX enzimi aktivitesi üzerine biyo-reaksiyon ortamının pH etkisi

7. Fe (II) miktarının etkisi

Enzimatik biyo-işleme reaksiyonu iki farklı yolla gerçekleşmektedir:

- Fenton reaksiyonu
- Hidrojen peroksit

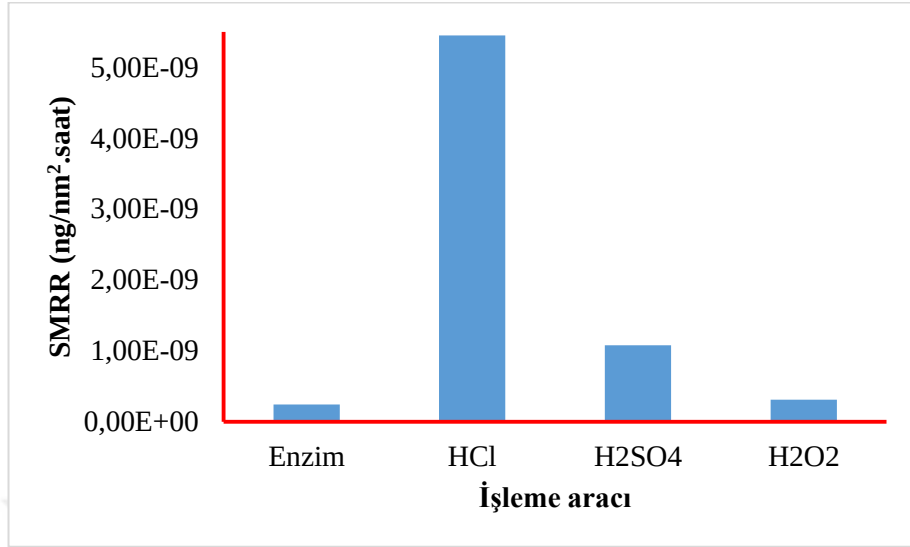
Bu çalışmada Fenton reaksiyonu kullanıldığından dolayı, bakırın biyo-işlemede reaksiyon ortamındaki demir miktarının etkisinin araştırılması gerekmektedir. Bundan dolayı beş farklı Fe (II) konsantrasyonunda bakır üzerinde işleme yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.81’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre demirin düşük miktarlarında işleme direkt H_2O_2 ile ve yüksek miktarlarında Fenton ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.81. Bakır iş parçalarının AOX enzimi ile işleminde Fe (II) etkisi

8. İşleme araçlarının etkisi

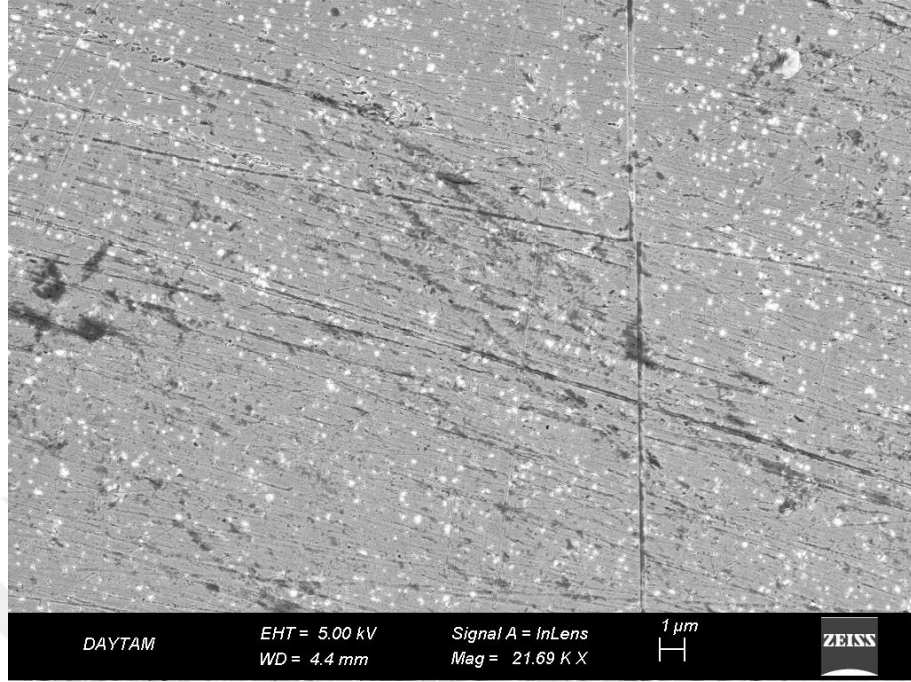
Enzimatik işlemenin kabiliyetini diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırmak için 1N HCl, 1N H₂SO₄ ve 50%v/v H₂O₂ ortamlarında işleme gerçekleştirilmiş ve bulunan sonuçlar Şekil 4.82’de verilmiştir. Sonuçlara göre hidroklorik asit ile diğer yöntemlere göre daha yüksek miktarda işleme gerçekleştirilmiş, ancak morfoloji sonuçlarına bakıldığında metal yüzeyinde istenmeyen şekilde hasar oluşmuş ve düzgün ve kontrollü işleme gerçekleşmemiştir. Sülfürik asit, hidrojen peroksit ve AOX ikinci, üçüncü ve dördüncü mertebede yer almıştır. Düzgünlük ve hasarsız işleme açısından sıralandığında; Alkol oksidaz > H₂O₂ > HCl > H₂SO₄ şeklinde sıralanabilir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde nano boyutlardaki işlemlerde enzimatik yöntemin en uygun olduğu sonucuna varılabilir.



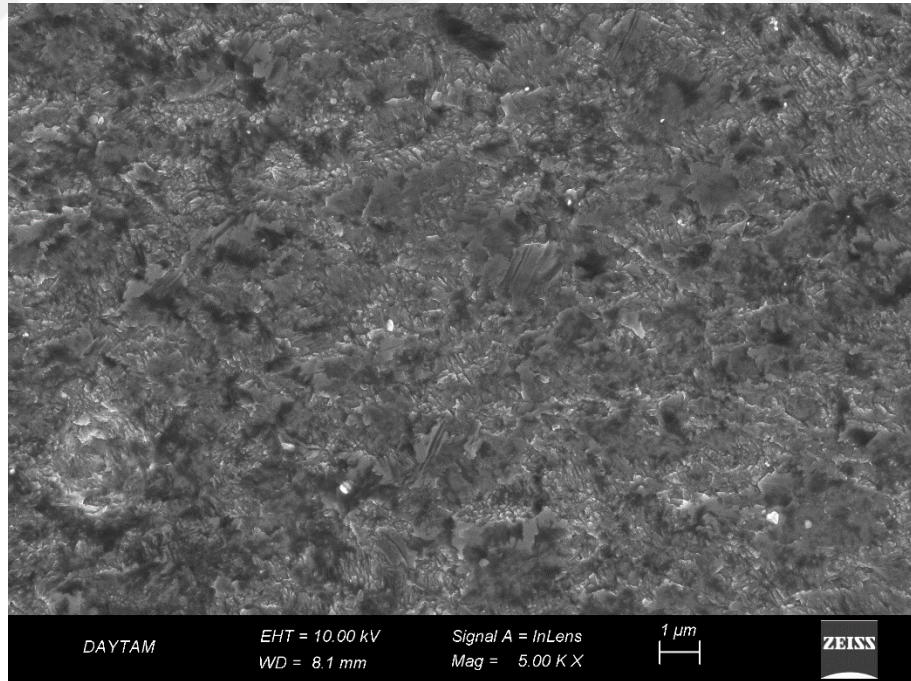
Şekil 4.82. AOX ile geleneksel işleme araçların SMRR üzerinde etkisi

9. SEM analizleri

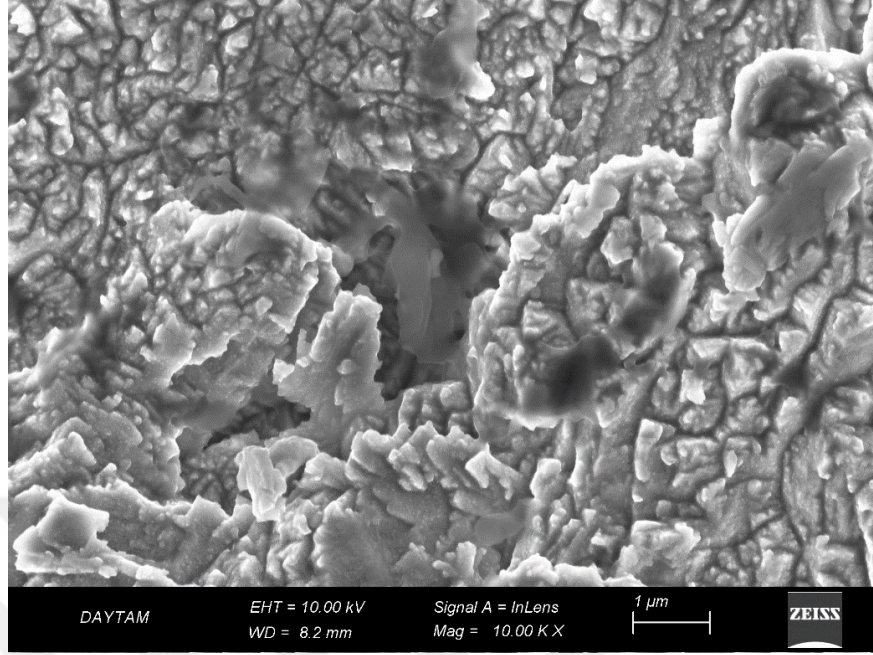
AOX enzimi ile değişik koşullarda bakır numuneleri üzerinde yapılan enzimatik işleme sonunda bazı numunelerin SEM mikrografları ve ayrıca geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen işleme sonuçları Şekil 4.83 ila 4.87’de verilmiştir. Enzim ile işlenmiş yüzeyin morfolojisi kontrol numunesine çok yakın olduğu gözlenmiş ve metal yüzeyinin herhangi bir hasara uğramadığı görülmüştür. Diğer yöntemlerde metal yüzeyinde kontrolsüz işleme gerçekleştirmiş ve ayrıca yüzeylerde istenmeyen şekilde hasarlar meydana gelmiştir. Daha önceki sonuçlarda olduğu gibi, diğer sonuçlarla birlikte SEM görüntüleri enzimatik işlemenin çok uygun bir yöntem olduğunu göstermiş ve bu yöntemin mikro ve nano boyutlarda yapılan işlemlerde çok başarılı bir metot olduğunu ortaya koymuş olup, Çizelge 4.28’den elde edilen sonuçlar delillendirilmiştir.



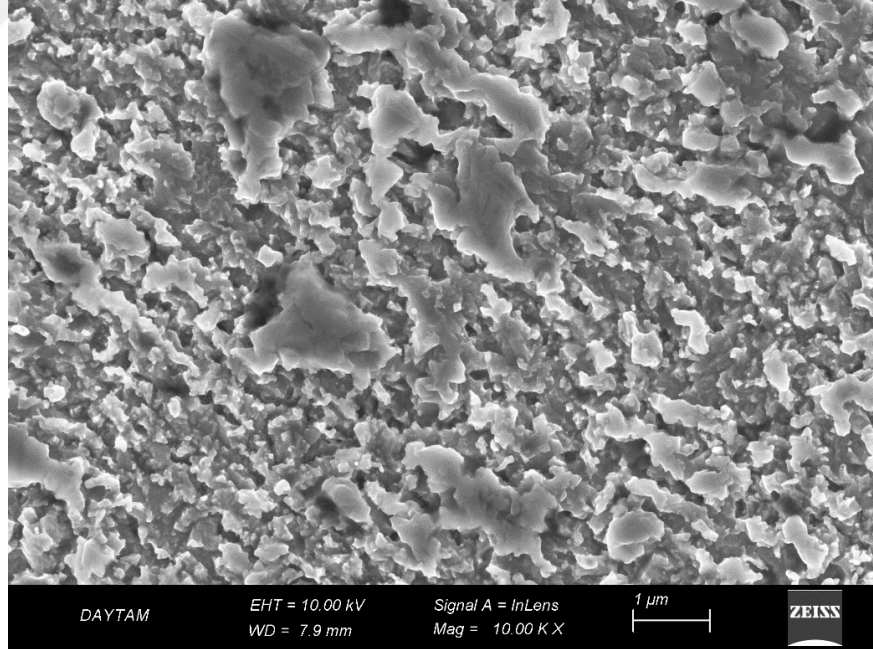
Şekil 4.83. Bakır kontrol numunesinin SEM görüntüsü



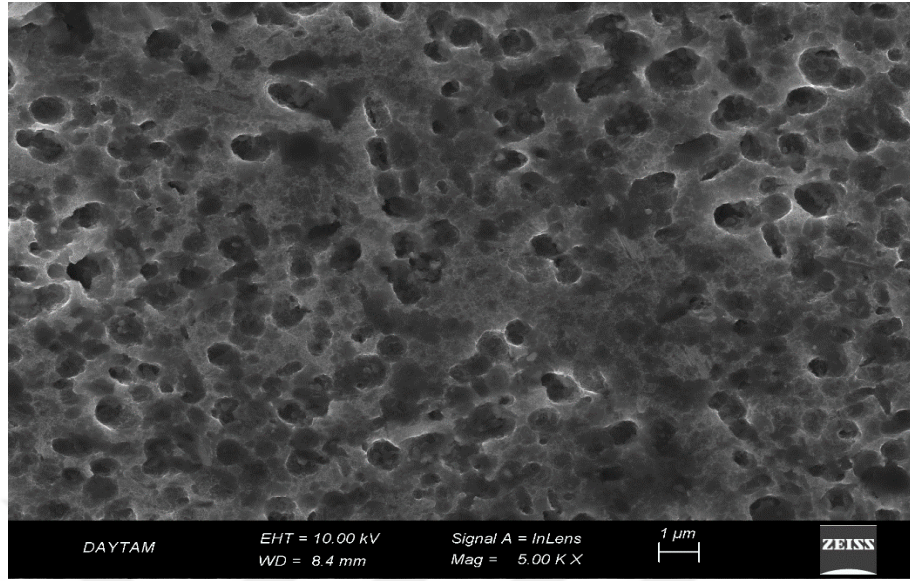
Şekil 4.84. AOX ile bakır iş parçası üzerinde yapılan işlemenin SEM mikrografı



Şekil 4.85. HCl ile bakır iş parçası üzerinde uygulanan işlemin SEM görüntüsü



Şekil 4.86. Bakır iş parçası üzerinde H₂SO₄ ile gerçekleşen işlemin SEM mikrofrafı



Şekil 4.87. H₂O₂ ile bakır üzerinde gerçekleşen işlemin SEM görüntüsü

10. AFM analizleri

AOX, HCl, H₂SO₄ ve H₂O₂ ile yapılan işlemler sonunda numunelerin yüzeyinde oluşan pürüzlülükleri belirlemek için AFM analizleri yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.28’de verilmiştir. Sonuçlara göre AOX enzimi ile yapılan işleme kontrol numunesine en fazla benzemektedir ve metal yüzeyi en az hasara uğramıştır. Asitler bakır parçalarının yüzey morfolojisini çok fazla tahrip ederken, hidrojen peroksit yüzeyde küçük deliklerin oluşmasına sebep olmuştur. Elde edilen sonuçlara istinaden bu yöntemler sıralandığında AOX en iyi ve HCl en kötü işleme aracı olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.28. İşlenmiş bakır numunelerin pürüzlülük analizi

Numune	İşleme metodu	Ra (nm)	Rmax (nm)	Sa (nm)	Smax (nm)
Kontrol	-	2.69	17.50	2.475	26.44
Bakır	AOX enzimi	6.57	45.5	7.13	57.38
Bakır	HCl	50.56	259.6	61.20	557.1
Bakır	H ₂ SO ₄	57.82	215.0	45.7	338.8
Bakır	H ₂ O ₂	1.51	9.47	2.02	15.07

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada pirinç, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik iş parçaları üzerinde glukoz oksidaz ve alkol oksidaz enzimlerini kullanarak nano miktarda biyolojik işleme uygulanmıştır. Enzimatik işlemeyi etkileyen parametreler teker teker araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar kütle ağırlık analizi, SEM görüntüsü ve AFM analizi ile incelenmiştir. Bu deneysel çalışmadan çıkan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1- GOx enziminin optimum pH'sı bütün metallerin biyolojik işleminde 4.0 bulundu.
- 2- GOx enziminin optimum sıcaklığı 52°C olarak bulundu ve bütün metallerin enzimatik işleminde uygulandı.
- 3- GOx enziminin miktarı reaksiyon ortamında araştırıldı ve elde edilen sonuçlar GOx miktarı ile SMRR arasında doğrudan ilişki olduğunu gösterdi ancak diğer reaktantların reaksiyon ortamında tükenmesinden kaynaklanan sınırlamaya göre SMRR yavaşlayıp durdu. Bu çalışmada GOx miktarı 0.1 g (1000 U) olarak belirlendi.
- 4- Glukoz substratının etkisi, metallerin enzimatik işleminde farklı konsantrasyonlarda glukoz kullanarak araştırıldı ve ortaya çıkan sonuçlar glukoz miktarıyla SMRR arasında doğrudan ilişki olduğunu gösterdi. Ancak fazla glukoz ortamında diğer bileşenlerin tükenmesiyle biyolojik işleme yavaşlayıp durdu. Bütün deneylerde 0.2 g glukoz 100mL reaksiyon ortamında uygun miktar olarak belirlendi.
- 5- GOx ile yapılan enzimatik işleme üzerinde zaman parametresinin etkisi araştırıldı ve çıkan sonuçlara göre uzun reaksiyon süreleri içerisinde metal kaldırma hızı daha fazladır ve işleme yüksek değerlerde ilerliyor. Ancak reaktanların tükenmesinden sonra işlem durmaktadır.
- 6- Karıştırma hızının etkisi GOx ile yapılan biyolojik işlemede araştırıldı ve elde edilen sonuçlar işleme miktarı ile karıştırma hızı arasında doğrusal ilişkinin varlığını kanıtladılar. Karıştırma hızı bütün biyo-işleme deneylerinde 100 rpm uygulandı.
- 7- Fe (II) miktarı işlemeyi etkileyen diğer faktör olarak araştırıldı, elde edilen sonuçlara göre yüksek demir miktarında enzimatik işleminin daha hızlı olduğu ortaya çıktı.

8- Enzimatik işlemenin nasıl bir morfoloji oluşturduğu diğer geleneksel yöntemler (anorganik asitler, hidrojen peroksit) karşılaştırıldı. SEM ve AFM sonuçlarına göre enzimatik işlemeden elde edilen yüzey üniform, pürüzsüz ve kontrol numuneye benzer olduğu belirlendi; hâlbuki asitler (HCl, H₂SO₄) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) iş parçalarının yüzeyini kötü bir şekilde tahrip etmişler ve yüzey morfolojisini bozmuşlardır.

9- GOx enzimi aktivite tayini için yeni bir yöntem sunuldu. Bu yöntemde kapalı bir reaksiyon ortamında, 25°C ve sabit karıştırma hızında tüketilen oksijen miktarını ölçerek, enzim ünitesi tayin edilebilmektedir. Stokiyometri denklemine göre (2.10) 1 mol substratın 1 mol glukonik asit ve 1 mol hidrojen peroksit dönüştürülmesi için 0.5 mol oksijen tüketilir, dolayısıyla enzim ünitesi tüketilen oksijen miktarının (μmol/L) iki katı olacaktır. Deneylerde 1000 U GOx enzimi kullanıldı.

10- GOx enzimiyle işleme diğer metallere göre paslanmaz çelik iş parçası üzerinde bütün farklı koşullar altında başarısız bulundu ve iş parçası morfolojisinde herhangi bir değişiklik görünmedi.

11- GOx enzimi ile farklı deney çerçevelerinde yapılan işlemlerde, elde edilen sonuçlara dayalı GOx 0.1g (1000 U), glukoz 0.2g, pH 4, sıcaklık 52°C, karıştırma hızı 100 rpm ve 6 saat reaksiyon süresi 100 mL reaksiyon ortamında optimum değerler olarak karar verildi.

12- GOx enzimi ile yapılan işleme koşullarından sadece pH ve sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen en kritik parametrelerdendir. Bütün diğer parametreleri istediğimiz gibi ayarlayarak istenilen SMRR ve pürüzlülüğe ulaşabiliriz.

13- SMRR ve Smax miktarı optimum işleme koşullarını uyguladığımız halde dört metal iş parçası için şöyledir;

Parametre	İşparçası			
	Pirinç	Bakır	Alüminyum	Paslanmaz çelik
SMRR (ng/nm².saat)	1.90E-9	1.74E-9	1.43E-9	0.0
Smax (nm)	46.51	299.8	52.49	29.64

- 14-** Alkol oksidaz enzimi ile pirinç ve bakır iş parçaları üzerinde enzimatik biyo-işleme yapıldı ve Alkol oksidaz için optimum pH değeri yapılan deneyler sonucunda 7.5 olarak bulundu ve bütün işleme proseslerinde uygulandı.
- 15-** Alkol oksidaz için yapılan deneyler sonunda optimum sıcaklık değeri 37°C olarak bulundu ve yapılan bütün biyolojik işlemlerde uygulandı.
- 16-** Alkol oksidaz enzimi için en uygun substrat olarak metil alkol (metanol) seçildi ve enzimatik biyo-işlemlerde kullanıldı.
- 17-** Alkol oksidaz enziminin miktarı biyo-reaksiyon ortamında araştırıldı ve elde edilen sonuçlar alkol oksidaz miktarı ile SMRR arasında doğrudan bağlantı olduğunu gösterdi. Ancak diğer reaktantların reaksiyon ortamında tükenmesinden kaynaklanan sınırlamaya göre SMRR yavaşlayıp durdu.
- 18-** Metanol etkisi metallerin enzimatik işlemleri üzerinde farklı miktar metanol kullanarak incelendi ve ortaya çıkan sonuçlar metanol miktarıyla SMRR arasında doğrudan ilişki varlığını kanıtladı. Ancak fazla metanol varlığında diğer bileşenlerin tükenmesinde kaynaklanan sınırlamaya göre biyolojik işleme yavaşlayıp dengeyi buldu.
- 19-** Alkol oksidaz ile yapılan enzimatik işleme üzerinde zaman parametresinin etkisi araştırıldı ve elde edilen sonuçlara göre uzun reaksiyon süreçleri içerisinde SMRR'nın daha fazla olduğu belirlendi. Biyo-işleme yüksek değerlerde ilerlerken reaksiyon ortamındaki reaktanların tükenmesinden dolayı işleme durmaktadır.
- 20-** Karıştırma hızının etkisi de AOX enzimi ile yapılan biyolojik işlemler üzerinde araştırıldı ve elde edilen sonuçlar işleme miktarı ile karıştırma hızı arasında bulunan doğrusal ilişkinin varlığını kanıtladı. Dolayısıyla bütün deneylerde 100 rpm karıştırma hızı uygulandı.
- 21-** Fe (II) miktarı etkisi alkol oksidaz ile yapılan biyoişleme üzerinde araştırıldı, elde edilen sonuçlar demirin metal numunesi işlemlerinde düzensiz etki gösterdiği belirlendi. Ancak demirin yüksek miktarlarında işleme daha fazla olduğu belirlendi.
- 22-** Alkol oksidaz ile yapılan işlemin metal yüzeyinde nasıl bir morfoloji oluşturduğu diğer geleneksel yöntemlerle (anorganik asitler, hidrojen peroksit) karşılaştırıldı. SEM ve AFM sonuçlarına göre enzimatik işlemeden elde edilen yüzey üniform, pürüzsüz ve kontrol numuneye benzer olduğu belirlendi; hâlbuki asitler (HCl, H₂SO₄) ve hidrojen peroksit (H₂O₂), iş parçalarının yüzeyini kötü bir şekilde tahrip etmiş ve yüzey morfolojisi bozmuşlardır.

23- Alkol oksidaz enzimi ile farklı deney çerçevelerinde yapılan işlemlerde, elde edilen sonuçlara dayalı alkol oksidaz 200 U, metanol 30 mL, pH 4, sıcaklık 37°C, 100 rpm karıştırma hızı ve 6 saat reaksiyon süresi 100mL işleme ortamında optimum değerler olarak karar verildi.

24- AOX enzimi ile yapılan işleme koşullarından pH ve sıcaklık enzim aktivitesini doğrudan etkileyen en kritik parametrelerdendir ve optimum miktarlarında ayarlanmalıdır. Diğer etkin parametreler miktarlarını istediğimiz SMRR ve pürüzlülüğe ulaşabilmek için değiştirerek beklediğimiz sonuçlara varabiliriz.

25- AOX ile işlemede optimum parametreleri kullanılarak SMRR ve Smax değerleri şöyledir:

Parametre	İşparçası	
	Pirinç	Bakır
SMRR (ng/nm ² .saat)	3.53E-10	2.44E-10
Smax (nm)	51.17	57.38

26- Enzimatik işlemede kullanılan iki farklı enzim, GOx ve AOX arasında yapılan kıyaslamalar iki önemli parametre için (SMRR ve Ra üzerinden) aşağıdaki çizelgede değerlendirildi. Verilere göre GOx enzimi AOX'e göre biyo-işleme süreçlerinde daha etkili olduğu belirlendi.

Parametre	İş parçası	İşleme aracı	
		GOx enzimi	AOX enzimi
SMRR (ng/nm ² .saat)	Pirinç	1.90E-09	3.53E-10
	Bakır	1.74E-09	2.44E-10
	Alüminyum	1.43E-09	-
	Paslanmaz çelik	0.00E+00	-
Smax (nm)	Pirinç	46.51	51.17
	Bakır	299.8	57.38
	Alüminyum	52.49	-
	Paslanmaz çelik	29.64	-

27- Maliyet ve temin açısından, GOx enziminin gıda ve endüstri sektörlerinde kullandığından dolayı bol ve ucuz şekilde bulunmaktadır ve enzimatik işlemede saflaştırıldıktan sonra kolay şekilde kullanılabilir. Ama AOX enzimi için böyle bir avantaja maalesef sahip değiliz ve çok pahalıya mal olmaktadır.

28- Avantajlar ve dezavantajları dikkate alındığında GOx enziminin enzimatik işlemlerde daha başarılı olduğu, bu nedenle tercih edilmesi gerektiği gözlemlenmektedir.

GOx enzimi farklı ortamlarda son derece dayanıklı ve oksidoredüksiyon reaksiyonları için de son derece uygundur.

GOx enziminin gıda sektöründe de kullanımına geniş şekilde yer verilmesi, toksik olmayan bir yöntemle ve çevre dostu biyodegrede edilebilir ve yan ürün bırakmayan bir prosedür uygulanıyor olması açısından da çalışma son derece özgündür.

GOx'in kullanılması, maliyeti düşürülmesi ve ekonomiye doğal kaynakların kazandırılması açısından da önemlidir.

Böylelikle GOx enzimi yüksek verimle ve başarıyla biyo-işleme elde edilmiş olan pirinç, bakır, alüminyum metallerinin üzerinde biyo-baskı, mikro ve nano boyutlarda kanal yapımı, mikro çipler, nano-tıp cihazları, elektrik ve elektronik alanı, baskılı devre katları tasarımı gibi farklı alanlarda kullanımı mümkün olacaktır.

AOX enzimi ile yapılan işlemler bu enzimin biyo-işlemlerde kullanımını onaylayarak, metallerin cevherlerden ve elektronik atıklardan saflaştırılması ve geri kazanımına çevre dostu bir yöntem sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L., 2009. Glucose oxidase - An overview, *Biotechnology Advances* 27 489–501.
- Bergmeyer, H.U., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume 2, 3rd ed., Academic Press 201-202.
- Bond, D., Holmes, D., Tender, L., Lovley, D., 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295:483–485.
- Brandl, H., Faramarzi, M., 2006. Microbe-metal-interactions for the biotechnological treatment of metal-containing solid waste. *China Part 4*:93–97.
- Brierley, J., Brierley, C., 2001. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy* 59:233–239.
- Bugg, T. D. H., *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, 2012. Third Edition, John Wiley.
- Champe, P. C., Richard, A., Harvey, D., Ferrier, R., 2008. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*.
- Chang, J., Hocheng, H., Chang, H., Shih, A., 2008. Metal removal rate of *Thiobacillus thiooxidans* without pre-secreted metabolite. *J Mater Process Tech* 201:560–564.
- Chaudhuri, S., Lovley, D., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* 21:1229–1232.
- Chen, S., Lin, J., 2004. Bioleaching of heavy metals from contaminated sediment by indigenous sulfur-oxidizing bacteria in an air-lift bioreactor: effects of sulfur concentration. *Water Res* 38:3205–3214.
- Couderc, R., Baratti, J., 1980. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2279-89.
- Cui, J., Zhang, L., 2008. Metallurgical recovery of metals from electronic waste: a review. *J Hazard Mater* 158:228–256.
- Díaz-Tenaa. E., Gallastegui, G., M. Hipperdinger , E.R., Donati , M., Ramírez , A., Rodríguez, L.N., Lacallee, L., Elías, A., 2016. New advances in copper biomachining by iron-oxidizing bacteria *Corrosion Science* 112 385–392.
- Eskandarian, M., Karimi, A., Shabgard, M., 2013. Studies on enzymatic biomachining of copper by glucose oxidase, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44 331–335.
- Gadd, G., (2000) Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol* 11:271–279.
- Ghoshdastider, U., Xu, R., Trzaskowski, B., Mlynarczyk, K., Miszt, P., Viswanathan, S., Renugopalakrishnan, V., Filipek, S., 2015. Molecular Effects of Encapsulation of Glucose Oxidase Dimer by Graphene. *RSC Advances*. 5: 13570–8.
- Hocheng, H., Chang, J., Jadhav, U., 2012a. Micromachining of various metals by using *Acidithiobacillus ferrooxidans* 13820 culture supernatant experiments. *J Cleaner Prod* 20:180–185.
- Hocheng, H., Jadhav, U., Chang, J., 2012b. Biomachining rates of various metals by *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Int J Surf Sci Eng* 6:101–111.

- Hocheng, H., Tasi Hung, Y., 2013. *Advanced Analysis of Nontraditional Machining*, Springer.
- Hocheng, H., Chang, J., Hsu, H., Han, H., Chang, Y., Jadhav, U., 2012c. Metal removal by *Acidithiobacillus ferrooxidans* through cells and extra-cellular culture supernatant in biomachining. *CIRP J Manuf Sci Tech* 5:137–141.
- Hoque, M., Philip, O., 2011. Biotechnological recovery of heavy metals from secondary sources-an overview. *Mater Sci Eng C* 31:57–66.
- Istiyanto, J., Kim, M., Ko, T., 2011. Profile characteristics of biomachined copper. *Microelectron Eng* 88:2614–2617.
- Istiyanto, J., Saragih, A., Ko, T., 2012. Metal based micro-feature fabrication using biomachining process. *Microelectron Eng* 98:561–565.
- Jadhav, U., Hocheng, H., 2016. Study of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and enzymatic bio-Fenton process-mediated corrosion of copper–nickel alloy, *Environmental Technology*, 37:20, 2669–2677.
- Johnson D, Warner R, Shih A (2007) Surface roughness and material removal rate in machining using micro-organisms. *J Manuf Sci Eng* 129:223–227.
- Karimi, A., Aghbolaghy, M., Khataee, A., Shoa Bargh, S., 2012. Use of Enzymatic Bio-Fenton as a New Approach in Decolorization of Malachite Green, *The Scientific World Journal* Volume, 5 pages.
- Kurosaki, Y., Matsui, M., Nakamura, Y., Murai, K., Kimura, T., 2003. Material processing using microorganisms. *JSME Int J C* 46:322–330.
- Lakhan Singh, R., 2017. *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable*, Springer.
- Lehninger, A L., Cox, M. M., Nelson, D. L. , *Principles of Biochemistry*, 2004
- Liang, G., Mo, Y., Zhou, Q., 2010. Novel strategies of bioleaching metals from printed circuit boards (PCBs) in mixed cultivation of two acidophiles. *Enzyme Microb Tech* 47:322–326.
- Lilova, K., Karamanev, D., Flemming, R., Karamaneva, T., 2007 Biological oxidation of metallic copper by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol Bioeng* 97:308–316.
- Raba, J., Mottola, H. A., 1995. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25(1):1–42 .
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W., 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:239–248.
- Sahm, H., Schütte, H., Kula, MR., 1982. Alcohol oxidase from *Candida boidinii*. *Methods Enzymol.*, 89, 424–28.
- Suzuki, I., 2001. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnol Adv* 19:119–132.
- Ting, Y., Senthilk, U., Rahmanm, C., 2000. Innovative use of *Thiobacillus ferrooxidans* for the biological machining of metals. *Acta Biotechnol* 20:87–96.
- Tongbu, L., Peng, X., Yang, H., Liangnian, J., 1996. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase. *Enzyme Microb Technol* 19:339–42.
- Uno, Y., 2002. Micro machining technique of metals with bacteria: biomachining. *J Inst Electron Commun Eng Japan* 85:129–131.

- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996. Fundamental study on biomachining. JSME Int J C 39:837–842.
- Viamajala, S., Peyton, B., Petersen, J., 2003. Modeling chromate reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1: development of a novel dual-enzyme kinetic model. Biotechnol Bioeng 83:790–797
- Wang, J., Bai, J., Xu, J., Liang, B., 2009. Bioleaching of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture. J Hazard Mater 172:1100–1105
- Witt, S., Singh, M., Kalisz, H., 1998. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 64(4):1405–11.
- Wong, CM., Wong, KH., Chen, XD., 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications, Applied Microbiology and Biotechnology. 78 (6).
- Wong, L., Henry, J., 1998. Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sludges. In: Wise DL (ed) Biotreatment systems. CRC Press, Boca Raton, pp 125–169
- Yang, Y., Wang, X., Liu, Y., Wang, S., Wen, W., 2009. Techniques for micromachining using *Thiobacillus ferrooxidans* based on different culture medium. Appl Mech Mater 16–19:1053–1057.
- Zhang, D., Li, Y., 1998. Possibility of biological micromachining used for metal removal. Sci China 41:152–156
- Zhang, D., Li, Y., 1999. Studies on kinetics and thermodynamics of biomachining pure copper. Sci China 42:58–62

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İran'ın Tebriz kentinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Tebriz'de tamamladı. 1999 yılında Tebriz Üniversitesi, Kimya Fakültesi Uygulamalı Kimya bölümünden mezun oldu. 2006 yılında Tebriz'in İslami Azad Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans eğitimini Uygulamalı Kimya Bölümü'nde Nanokompozit konusu üzerine tamamladı. 2000 yılından beri Tebriz Üniversitesi, Kimya Fakültesi Uygulamalı Kimya Bölümü'nde uzman olarak çalışmaktadır. Aynı zamanda, 2012 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanomalzeme Bölümü'nde doktora eğitimine devam etmektedir.