

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Nükte ÇÖLKESEN

**SELÜLAZ ENZİMİNİN KOVALENT BAĞLANMA YÖNTEMİ
İLE EPOKSİ METAKRİLAT VE EPOKSİ BUTİL
METAKRİLAT İLE İMMOBİLİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA-2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SELÜLAZ ENZİMİNİN KOVALENT BAĞLANMA YÖNTEMİ İLE
EPOKSİ METAKRİLAT VE EPOKSİ BUTİL METAKRİLAT İLE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Fatma Nükte ÇÖLKESEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 19/02/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Deniz YILDIRIM
ÜYE

.....
Prof. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-10609

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELÜLAZ ENZİMİNİN KOVALENT BAĞLANMA YÖNTEMİ İLE EPOKSİ METAKRİLAT VE EPOKSİ BUTİL METAKRİLAT İLE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Fatma Nükte ÇÖLKESEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Yıl: 2020, Sayfa:57
Jüri : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Doç. Dr. Deniz YILDIRIM
: Prof. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN

Son yıllarda nanopolimerik malzemelerle yapılan immobilizasyon çalışmaları yaygınlaşmıştır. Bu nanopolimerik malzemelerin yüzey özellikleri, immobilizasyonun hangi yöntem ile gerçekleştirileceğinin de en önemli etkenidir.

Bu çalışmada, *aspergillus* suşundan elde edilen selülaaz enziminin daha önce denenmemiş olan epoksi grubu ile zenginleştirilmiş, epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat polimerleri ile kovalent immobilizasyonu araştırılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize selülaazların termal ve depolama kararlılıkları ile immobilize selülaazların tekrar kullanım kararlılıkları araştırılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivite ölçümleri yapılarak optimum sıcaklık, optimum pH, termal ve depolama kararlılıkları ile kinetik parametreleri belirlenmiş immobilize selülaazların tekrar kullanılabilirlikleri ölçülmüştür. Serbest selülaaz için optimum pH 5,5 , optimum sıcaklık 60°C, immobilize enzimler için optimum pH 6,5 , optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Serbest ve immobilize selülaazların belli bir sıcaklıkta bir süre bekletilerek belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırıldı ve immobilize enzimlerin serbest enzime göre daha dayanıklı olduğu gözlemlendi. Serbest ve immobilize enzimlerin 35 gün boyunca 5°C ve 25°C' lerdeki depolama kararlılıkları gözlemlendi.

5°C' de bekletilen serbest selülaazın 15. günde kalan aktivitesinin %4,07 olduğu, 25°C'de bekletilen serbest selülaazın ise 3. günden sonra denatüre olup aktivite göstermediği gözlemlendi. Epoksi metakrilat ile immobilize edilmiş enzimin 5°C'de

30. günde aktivitesinin %37,5'ini, 25°C'de 25. günde %22,5'ini koruduğu, 30. günde aktivite göstermediğini gözlemledik. Epoksi butil metakrilat ile immobilize edilmiş enzimin ise 5°C' 30. günde aktivitesinin %44,7'sini, 25°C'lerde 25. günde %32'sini koruduğu, 30. günde ise yaklaşık %6'lık bir aktivite gösterdiğini gözlemledik. Immobilize selülaazların optimum koşullardaki tekrar kullanılabilirliği tayininde ise kalan aktiviteler EMA için 4. kullanımda %24,65 , EBMA için 6. kullanımda %8,58 olarak ölçülmüştür. Belirlenen optimum koşullarda Km ve Vmax değerleri ise serbest selülaaz için Km 0,626 mg/mL, Vmax 0,964 U/g; immobilize selülaazlar için ise sırasıyla Km 1,703 mg/mL (EMA) , 4,545 mg/mL(EBMA) , Vmax 4,019 U/g (EMA) , 0,507 U/g (EBMA) olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Selülaaz, Immobilizasyon, Epoksi metakrilat, Epoksi butil metakrilat

ABSTRACT

MSc THESIS

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE ENZYME ON EPOXY METACRYLATE AND EPOXY BUTYL METACRYLATE BY COVALENT BINDING METHOD

Fatma Nükte ÇÖLKESEN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Year :2020, Pages :57

Jury : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

: Assoc Prof. Dr. Deniz YILDIRIM

: Prof. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN

In recent years, immobilization studies with nanopolymeric materials have become widespread. The surface properties of these nanopolymeric materials are the most important factors in which method of immobilization is performed.

In this study, the covalent immobilization of cellulase enzyme obtained from *aspergillus* strain with epoxy methacrylate and epoxy butyl methacrylate polymers was investigated. In addition, thermal and storage stability of free and immobilized cellulases and re-use stability of immobilized cellulases were investigated. The activity measurements of free and immobilized enzymes were measured and the reusability of immobilized cellulases with optimum temperature, optimum pH, thermal and storage stability and kinetic parameters were determined. The optimum pH for free cellulase was 5.5, the optimum temperature was 60°C, for the immobilized enzymes the optimum pH was 6.5 and the optimum temperature was 50°C. The thermal stability of the free and immobilized cellulases was determined by standing at a certain temperature for a period of time and it was observed that the immobilized enzymes were more resistant than the free enzyme. Storage stability of free and immobilized enzymes at 5°C and 25°C were observed for 35 days. It was observed that the activity of free cellulase which was kept at 5°C on the 15th day was 4.07% and the free cellulase, which was kept at 25°C, was denatured after 3 days and did not show any activity. The enzyme immobilized with epoxy methacrylate is retained 37.5% of its activity at day 30 at 5°C, 22.5% at day 25 at 25°C and did not show activity at day 30. The enzyme immobilized with epoxy butyl methacrylate is maintained 44.7% of its activity at 5°C 30th day, 32% at 25°C at 25°C, and showed an activity of approximately 6% at 30th day. Km and Vmax values under the optimum conditions determined for free cellulase Km 0,626 mg/mL, Vmax 0,964 U/g ; for immobilized cellulases, Km 1,703 mg/mL (EMA), 4,454 mg/mL (EBMA), Vmax 4,019 U/g (EMA), 0,507 U/g (EBMA) respectively.

Keywords: Cellulase, Immobilization, Epoxy methacrylate, Epoxy butyl methacrylate

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Enzimler protein yapısında olan çok özel biyokatalizörlerdir. Canlı organizmalarda gerçekleşen çok sayıda reaksiyon enzimlerle katalizlenir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karşıtlarına göre 107 - 1016 kez daha hızlı gerçekleşir (Tükel ve Alptekin, 2007).

Bir grup katalitik RNA molekülü dışında, bütün enzimler proteindir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal proteinin üç boyutlu yapısının sağlamlığına bağlıdır. Enzim denature olduğunda veya küçük parçalara ayrıldığında katalitik aktivitesi kaybolur. Protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktiviteleri için esastır (Nelson ve Cox, 2005). Enzimler, ılımlı koşullarda, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların gerçekleşmesini sağlar. Bununla beraber, günümüzde enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanılmaktadır. Enzimlerin endüstriyel amaçlarla kullanılmaya başlanması, enzimleri, daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmalarını da beraberinde getirmiştir. (Wiseman, 1986). Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler büyük oranda mikroorganizmalardan elde edilmektedir Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde çözülmüş olsa da, bu mikrobiyal kaynaklardan, enzim saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Bu nedenle, saflaştırılan enzimlerden mümkün olduğunca faydalanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Tükel ve Alptekin, 2007).

Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin geri kazanılması, aktivitesini büyük oranda kaybetmesinden dolayı neredeyse mümkün değildir. Serbest enzimi, katalizör olarak kullanıldığı reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek mümkün olmadığından enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise maliyeti yükselten önemli bir etmendir. (Tükel ve Alptekin, 2007). Enzim saflaştırma işlemlerinin zor ve pahalı olmasından dolayı çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Enzimler, suda çözünmeyen bir matrikse fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla, suda çözünmeyen ürün veren bir

kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ya da suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Klibanov, 1983).

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere tercih edilme nedenleri;

- Reaksiyon sonunda süzme, santrifujleme vs gibi yöntemlerle ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler. Böylece ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problemde kalmaz.
- Çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdırlar.
- Birçok kere ve uzun süre kullanılabilirler.
- Daha kararlıdırlar.
- İmmobilize enzimin kullanıldığı reaksiyonlarda ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı immobilize enzimler, serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı oldukça azdır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.
- Otomatik işlemlere imkân verir.
- Endüstriyel olarak önemli bir ekonomi sağlar ve üretim kaybı azdır.

Bu çalışmada, selülaz enzimini, daha önce denenmemiş epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat polimerik destek maddelerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildi. Yapılan aktivite ölçümleri termal ve depolama kararlılıkları ve immobilize selülazların tekrar kullanım sayıları tayini sonuçları şöyledir:

Serbest selülaz için optimum pH 5,5 , optimum tampon derişimi 0,1M, optimum sıcaklık 60°C, immobilize enzimler için optimum pH 6,5 , optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Serbest ve immobilize selülazların 50°C sıcaklıkta 6

saat bekletilerek belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırıldı ve immobilize enzimlerin serbest enzime göre daha dayanıklı olduğu belirlendi. Serbest ve immobilize enzimlerin 35 gün boyunca 5°C ve 25°C' lerdeki depolama kararlılıkları ölçüldü. 5°C' de bekletilen serbest selülozün 15. günde kalan aktivitesinin %4,07 olduğu, 25°C'de bekletilen serbest selülozün ise 3. günden sonra denatüre olup aktivite göstermediği belirlendi. Epoksi metakrilat ile immobilize edilmiş enzimin 5°C'de 30. günde aktivitesinin %37,5'ini, 25°C'de 25. günde %22,5'ini koruduğu, 30. günde aktivite göstermediğini belirlendi. Epoksi butil metakrilat ile immobilize edilmiş enzimin ise 5°C' 30. günde aktivitesinin %44,7'sini, 25°C'lerde 25. günde %32'sini koruduğu, 30. günde ise yaklaşık %6'lık bir aktivite gösterdiğini gözlemledik. Ayrıca immobilize selülozların tekrar kullanım kararlılıkları da ölçüldü ve epoksi metakrilat ile immobilize edilmiş selülozün, 4. kullanımdan sonra aktivite göstermediği, epoksi butil metakrilat ile immobilize edilmiş selülozün 6. kullanım sonunda aktivitesini yaklaşık %90 oranında kaybettiği gözlemlendi. Belirlenen optimum koşullarda Km ve Vmax değerleri ise serbest selüloz için Km 0,626 mg/ml Vmax 0,964 U/g; immobilize selülozlar için ise sırasıyla Km 1,703 mg/mL (EMA) , 4,545 mg/mL (EBMA) , Vmax 4,019 U/g (EMA) , 0,507 U/g (EBMA) olarak hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışmalar sonunda epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat polimerleri ile immobilize edilmiş selülozların, endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğu söylenebilir.

TEŞEKKÜR

Gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca verdikleri teorik bilgiler ile desteklerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Ramazan BİLGİN' e, sayın Prof. Dr. Sultan GİRAY' a ve sayın Doç. Dr. Deniz YILDIRIM' a çok teşekkür ederim.

Deney aşamasında sabırla ve özveriyle her türlü yardımlarını ve desteklerini gördüğüm değerli hocam Öğr. Gör. Ali TOPRAK' a, Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ' e ve kıymetli Arş. Gör. Ece VARAN'a teşekkür ederim.

Deney çalışmalarım esnasında kritik bir zamanda sağlamış olduğu materyal ile deneylerimi sonuçlandırmamda katkısı olan değerli kimyager arkadaşım Kemal BOLAT' a ve yüksek lisansım boyunca edindiğim diğer kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini, sevgi ve ilgilerini her daim esirgmeden gösteren babam Ahmet Aydın ÇÖLKESEN' e, annem Nuran ÇÖLKESEN' e, ablam Nazlı ALCAN' a ve canım kızlarım Ferah ve Hilâl'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzim İmmobilizasyonu	2
1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	3
1.3. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri.....	5
1.3.1. Adsorbsiyon Yöntemi	5
1.3.2. Tutuklama Yöntemi	6
1.4. Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri	8
1.4.1. Çapraz Bağlama:	9
1.4.2. Kovalent Bağlama:.....	10
1.5. İmmobilizasyonun Avantaj ve Dezavantajları	13
1.5.1. İmmobilizasyonun Avantajları	13
1.5.2. İmmobilizasyonun Dezavantajları	14
1.6. SELÜLAZLAR.....	15
1.7. Selülaz İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Maddeler.....	20
1.7.1. Epoksi Metakrilatlar.....	20
1.7.2. Epoksi Butil Metakrilatlar.....	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	23
3. MATERYAL	27
3.1. Kullanılan Kimyasallar:.....	27

3.1.1. Kullanılan Cihazlar:	27
3.1.2. Kullanılan Araç-Gereçler:.....	28
3.2. METOD	28
3.2.1. Selülaz Enziminin İmmobilizasyonu:	28
3.2.2. Protein Tayini.....	28
3.2.3. Selülaz Enzimi Aktivite Tayini	29
3.2.4. Serbest Selülaz ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu	30
3.2.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'ın Belirlenmesi.....	30
3.2.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	30
3.2.5. İmmobilize Selülazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	30
3.2.6. Serbest ve İmmobilize Selülazların Depolama kararlılıklarının Belirlenmesi	31
3.2.7. Serbest ve İmmobilize Selülazların Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi	31
3.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi	31
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	33
4.1. Selülaz Enziminin İmmobilizasyonu Sonucu Kullanılacak İmmobilize Enzim Miktarı.....	33
4.2. Protein Tayini:	33
4.3. Serbest Selülaz Enzimi İle İlgili Bulgular:	34
4.3.1. Serbest Selülazın Optimum pH Değeri	34
4.3.2. Serbest Selülazın Optimum Sıcaklığı:.....	35
4.4. İmmobilize Enzimler İle İlgili Bulgular:	36
4.4.1. EMA ve EBMA ile İmmobilize Edilmiş Selülazların Optimum pH Değerleri:	36

4.4.2. İmmoblize Selülozların Optimum Sıcaklık Değerleri:.....	38
4.5. Depolama Kararlılığı:	39
4.6. Tekrar Kullanılabilirlik :.....	41
4.7. Termal Kararlılık :	42
4.8. Michaelis-Menten katsayısı (K_m), Maksimum reaksiyon hızı (V_{max}).....	43
4.9. TARTIŞMA	45
5. SONUÇLAR.....	49
5.1. ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. 5 °C’de 35 gün bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri.....	39
Çizelge 4.2. 25 °C’de 35 gün bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri.....	40
Çizelge 4.3. İmmobilize selülozların tekrar kullanımlarındaki bağıl aktiviteleri ...	42
Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize selülozların bağıl termal kararlılıkları.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	İmmobilize enzimin mekanik ve kinetik özellikleri	3
Şekil 1.2.	Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	5
Şekil 1.3.	Fiziksel immobilizasyon yöntemi ile immobilize enzim oluşumu	8
Şekil 1.4.	Kimyasal yöntemle immobilizasyon, A:Kovalent bağlanma yöntemi B:Çapraz bağlanma yöntemi	9
Şekil 1.5.	Çapraz bağlanma metodu ile immobilize enzim oluşumu.....	10
Şekil 1.6.	Kovalent bağlanma metodu ile immobilize enzim oluşumu	12
Şekil 1.7.	Farklı fonksiyonel grup içeren matrik ve enzimlerin kovalent bağ metodu ile immobilizasyonu.....	13
Şekil 1.8.	Selülozun molekül yapısı	15
Şekil 1.9.	1,4-β-D-glukan sellobiyohidrolaz' ın üç boyutlu görünümü.....	16
Şekil 1.10.	endo-1,4-β-D glukan 4-glukanhidrolaz'ın üç boyutlu görünümü	17
Şekil 1.11.	β-glukozidaz' ın üç boyutlu görünümü	17
Şekil 1.12.	Aspergillus küf mantarının oluşumu	18
Şekil 1.13.	Epoksi butil metakrilat molekülü	21
Şekil 1.14.	Epoksi grubu içeren destek maddesinin enzime kovalent bağlanması.....	21
Şekil 4.1.	Kullanılan selülaz enzimi için protein eğrisi	34
Şekil 4.2.	Serbest selülaz enzimi optimum pH grafiği	35
Şekil 4.3.	Serbest selülaz enzimi optimum sıcaklık grafiği.....	35
Şekil 4.4.	EMA ile immobilize edilmiş selülazın optimum pH grafiği	36
Şekil 4.5.	EBMA ile immobilize edilmiş selülazın optimum pH grafiği	37
Şekil 4.6.	Serbest ve immobilize selülazların optimum pH 'larının birlikte gösterimi.....	37
Şekil 4.7.	EMA ile immobilize edilmiş selülaz enzimler için optimum sıcaklık grafiği.....	38

Şekil 4.8. EBMA ile immobilize edilmiş selülaz enzimi için optimum sıcaklık grafiği.....	38
Şekil 4.9. Serbest ve immobilize selülazlar için optimum sıcaklıkların birlikte gösterimi	39
Şekil 4.10. Serbest ve immobilize selülazların 5 °C'deki depolama kararlılığı grafiği.....	40
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize selülazların 25 °C'deki depolama kararlılığı grafiği.....	41
Şekil 4.12. İmmobilize selülazların tekrar kullanımları	42
Şekil 4.13. Serbest ve immobilize selülazların termal kararlılıkları grafiği	43
Şekil 4.14. Serbest selülaz için Lineaweaver-Burk eğrisi	44
Şekil 4.15. EMA ile immobilize edilmiş selülaz için Lineaweaver-Burk eğrisi.....	44
Şekil 4.16. EMA ile immobilize edilmiş selülaz için Lineaweaver-Burk eğrisi	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

EMA : Epoksi metakrilat

EBMA : Epoksi butil metakrilat

CMC : Karboksi metil selüloz

DNSA : Di nitro salisilik asit

μ L : Mikrolitre

mL : Mililitre

mg : Miligram

mM : Milimolar

nm : Nanometre

Km : Michealis-Menten hız sabiti

Vmax : Substrat derişimine bağlı enzimin ulaşabileceği maksimum hız

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerde tepkimeleri katalizleyen, oldukça özelleşmiş proteinlerdir. Enzimler, sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha hızlı katalizleme gücüne sahiptirler ve kimyasal tepkimeleri olağan üstü hızlandırır. Sulu çözeltilerde ılıman sıcaklıklarda ve nötre yakın pH'larda çalışırlar. (Chample, 1997)

Enzimlerin katalitik aktivite göstermelerindeki en önemli faktörün, enzimin üç boyutlu yapısı olduğu düşünülmektedir. Enzimlerin tamamı, proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil eden globuler protein yapıdadırlar. Enzimlerin katalitik aktiviteleri bu protein konformasyonunun bütünlüğüne bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimleri ayrıştırılırsa katalitik aktiviteleri kaybolur. (Yöntem, 2011)

Enzimler artık, biyolojik sistemlerdeki bu metabolik görevleri dışında, çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayatımıza girmişlerdir. Ancak enzimlerin avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajlarının olduğu da bilinmektedir. Bu dezavantajlar şunlardır;

- izolasyonunun ve saflaştırılmasının yüksek maliyet gerektirmesi,
 - doğal ortamlarından izole edilen enzimlerin yapısında kararsızlık oluşması,
 - saklanma koşullarına karşı duyarlılıklarının oldukça fazla olması.
- (Bayındırlı, 1995)

Ayrıca enzimler, reaksiyonları sonucunda modifiye olmadıkları için aynı enzim bir kereden fazla kullanılamaz. Endüstriyel, analitik ve tıbbi proseslerin pek çoğunda enzimler substrat çözeltisi ile kullanıldığından, substratların ürünlere dönüştürülmesinden sonra, enzimlerin substrat ve ürünlerle birlikte bulunduğu çözeltiden ayrılması zorlaşmaktadır ve enzimler ekonomik olarak geri

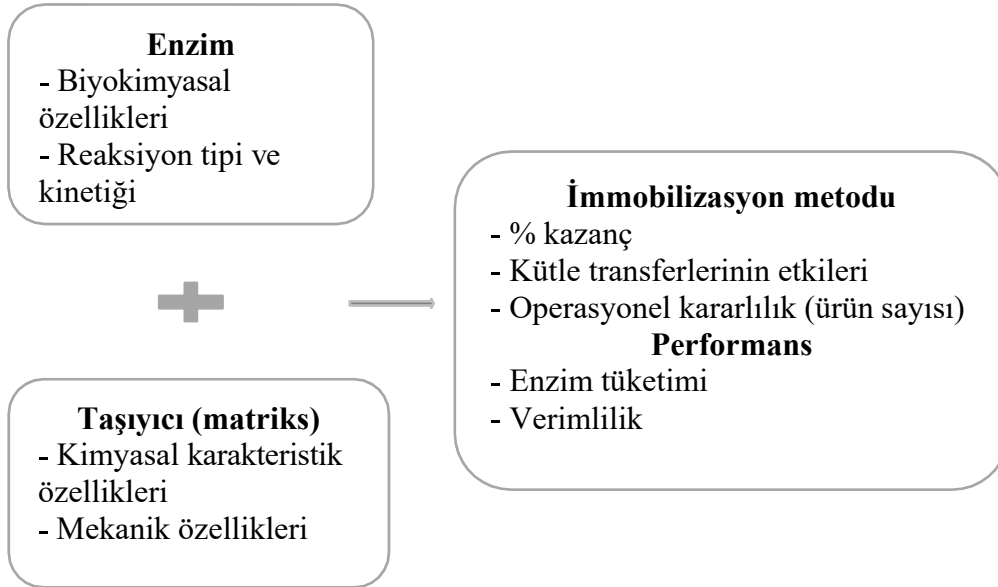
kazanılmamaktadır. Bu da enzimlerin sadece bir kere kullanılmalarına ve pahalı olmalarına neden olup uygulamalarda büyük masraflara neden olmaktadır. (Kuzmič ve ark., 2015)

1.1. Enzim İmmobilizasyonu

Yukarıda bahsedilen dezavantajları ortadan kaldırmak için enzimler immobilize edilerek kullanılmaya başlanmıştır. Yani enzimlerin bir katıya (destek maddesine) tutundurularak immobilize edilip, defalarca kullanılmaları sağlanmaktadır.

İmmobilizasyon hareketi yavaşlatma, durdurma ya da sınırlama demektir. Enzimlerin, fiziksel ve kimyasal işlemlerle hareketinin sınırlandırılmasına immobilizasyon denir. İmmobilizasyon kavramı ilk olarak, 1971 yılında ABD’de düzenlenen Enzim Mühendisliği Konferansı’nda açıklanmıştır. (Telefoncu, 1986). Enzimlerin, katalitik aktivitelerinin sabit kalması koşuluyla, tekrar ve sürekli kullanımına izin verecek şekilde, tanımlanmış belirli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi ve hapsedilmesi, immobilizasyon olarak tanımlanmıştır. (Özçelik, 1987, Oda ve ark., 1983, Hartmeier, 1985)

Enzim immobilizasyonuyla, enzimin geçişi engellenerek yarı geçirgen bir destek materyaline enzim hapsedilir. İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de destek materyalin ikisinin de özelliklerine bağlıdır. Uygun bir yöntemle immobilize edilmiş enzimin kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikleri bu immobilize enzimin verimini ve performansını etkiler. (Telefoncu, 1986, Özçelik, 1987). Bu etkileşimden doğan genel özellikler Şekil 1.1’de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. İmmobilize enzimin mekanik ve kinetik özellikleri

Günümüzde artık, endüstriyel alanda çok sayıda immobilize enzim kullanılmaktadır. Ticari amaçlı bir prosesin gerçekleştirilmesinde, üretimdeki artışla beraber ekonomik koşullar da dikkate alınmaktadır

İmmobilizasyondan sonra enzim aktivitesinin, optimum pH ve sıcaklığının, substrata ilgisi ve kararlılığının değiştiği gözlemlenmiş olup genellikle enzimin aktivitesi ve substrata ilgisi olumsuz etkilenirken, optimum sıcaklığı ve kararlılığı olumlu etkilenmektedir. Bu değişiklikler enzimin yapısına, taşıyıcının tipine, immobilizasyon yöntemine ve şartlarına bağlı olabilir. (Oda ve ark., 1983)

1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler çeşitli yöntemlerle immobilize edilirler. Bir biyolojik katalizörün immobilizasyonu için uygun yöntemi seçerken, immobilizasyon esnasında ve sonrasında, enzimin aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olması tercih edilmelidir. Zira uygun yöntemin seçilebilmesi, enzimin yapısının çok iyi

bilinmesini gerektirir. İmmobilizasyon sırasında, enzimin aktif merkezi korunmalıdır. (Uludağ, 2000). Enzimler için uygun immobilizasyon yöntemini seçmede dört ana kriter dikkate alınır:

- Güvenilirlik,
- Maliyet,
- Aktivitenin korunması
- Kararlılık.

İmmobilizasyon yöntemleri;

1) Fiziksel yöntemler

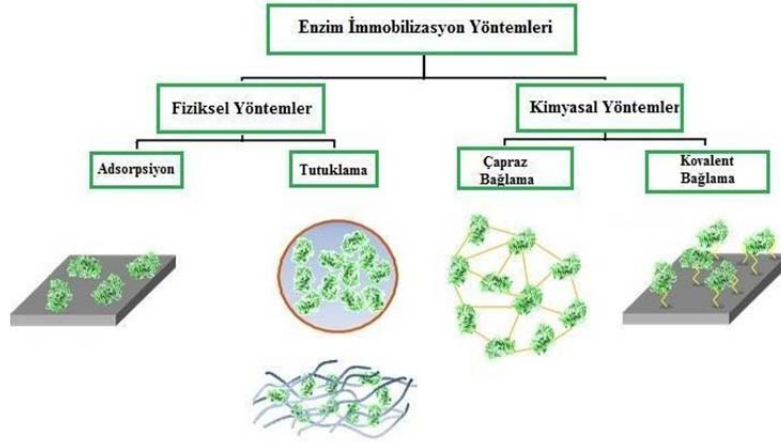
- a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon
- b) Tutuklama ile immobilizasyon

-Mikrokapsül ile hapsedme yöntemi

-Kafes tipi hapsedme yöntemi

2) Kimyasal yöntemler

- a) Kovalent bağlama
- b) Çapraz bağlama



Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1.3. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri

Fiziksel yöntemler, enzimin belirli bir yere fiziksel olarak tutturulmasını içerir. Bu yöntem, elektrostatik, iyonik, enzimler arası etkileşimler gibi belirli fiziksel kuvvetlere dayanır. İmmobilizasyon, enzimin destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli seçici geçirgen yapılara tutturulmasıyla gerçekleşir. (Immobilized Enzymes, 2004)

1.3.1. Adsorbsiyon Yöntemi

Bu yöntem, ilk önceleri, enzim saflaştırmak amacıyla kullanılmış ancak daha sonra suda çözünmeyen taşıyıcılarla enzim immobilizasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem, suda çözünmeyen katı matriksin, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve fazla enzimin yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanır. Enzimin destek maddesine tutunması, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler sayesinde gerçekleşir. Adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin, aktifliğini büyük ölçüde koruması bununla beraber, adsorpsiyon ile immobilizasyonun tersinir olması nedeniyle destek maddesinin ve enzimin tekrar kullanımını sağlaması bir avantajken, enzim ile destek maddesi arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzimin kullanım

esnasında taşıyıcıdan uzaklaşması bir dezavantajdır.

Adsorbsiyon yönteminin, bir yandan immobilizasyon gerçekleşirken diğer yandan enzim saflaştırmasına olanak vermesi, bu yöntemi oldukça cazip ve tercih edilen bir yöntem kılmıştır. (Hürrem, 2010)

1.3.2. Tutuklama Yöntemi

Polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesiyle gerçekleşen immobilizasyon yöntemidir. Immobilizasyonda kullanılan polimerik matriks yapısı, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verip proteinin difüzyonunu engeller. Bunun için de yeterli derecede sıkı olması gerekir. Bu yöntemde, enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olması, yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyon yönteminden ayıran en önemli özelliktir. Hapsetme yöntemi diye de bilinir ve mikrokapsül ile hapsetme ve kafes tipi hapsetme olmak üzere iki ayrı metod ile yapılabilir. (Sperinde ve Griffith, 1977, Tükel ve Alptekin, 2007)

Mikrokapsül ile Hapsetme Metodu: Bu metod, gözenekleri 10-1000 µm çaplı, yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesine dayanır. Yarı geçirgen membranın görevi, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olmak ve bu esnada küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına olanak sağlamaktır. (Bickerstaff, 1997).

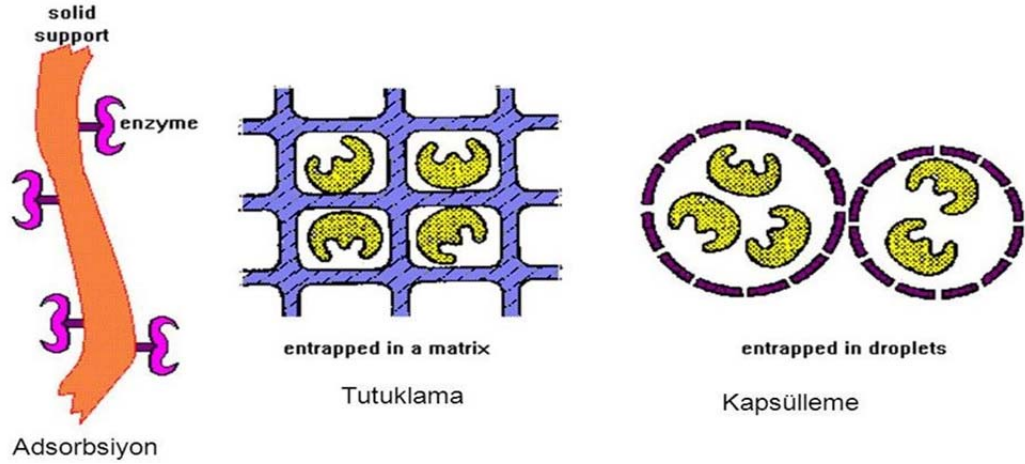
Yarı geçirgen mikrokapsüller, iki farklı yöntemle hazırlanabilir.

-Faz ayrımı polimerizasyonu: Bu yöntem koagülasyona dayalı olup kimyasal bir reaksiyonun gerçekleşmediği basit bir yöntemdir. Uygun bir çözücü içinde, enzim ve membran birlikte çözülür ve bu çözelti, mikro damlacıklar halinde çöktürücü maddeye ilave edilir. Basit bir yöntem olup bütün enzimlere uygulanabilmektedir

- Ara yüzey polimerizasyonu: Bu yöntemde de kimyasal özellik taşıyan ara çöktürücü madde içinde enzim çözeltisinin mikro damlacıkları hazırlanır. Enzim çözeltisi ve çöktürücü maddenin birleşme noktalarında polimerleşme görülür.

Mikrokapsülleme ile hapsedme yönteminde enzim yapısında kalıcı bir değişiklik olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bununla beraber, mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olması, bu yöntemin bilinen dezavantajlarından. (Hanefeld ve ark., 2009, Sheldon, 2007).

Kafes Tipi Hapsedme Metodu: Bu yöntemde enzim çözeltisi içinde yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin oluşturulması sağlanır. Bu yöntemde en yaygın kullanılan polimer N,N'- metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Polimerleşme esnasında enzim moleküllerinin, polimerin çapraz bağları arasında tutuklanması sağlanarak çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Eğer çapraz bağ yüzdesi yüksek olan bir polimer kullanılırsa, bu, hem substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engelleyebilir hem de enzimin zincir yapısını zorlayıp aktivite kaybına neden olabilir. Yani polimerdeki çapraz bağ yüzdesi enzim moleküllerinin tutuklanabilmesine ve substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmayacak miktarda ayarlanmalıdır. Bu da enzime ve taşıyıcıya bağlı olarak değişir. Bu yöntemde ayrıca immobilize edilecek enzimin substratının küçük moleküllü olması tercih edilmelidir. (Tanaka ve Kawamoto, 1999, Uhlig, 1998)



Şekil 1.3. Fiziksel immobilizasyon yöntemi ile immobilize enzim oluşumu

1.4. Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri

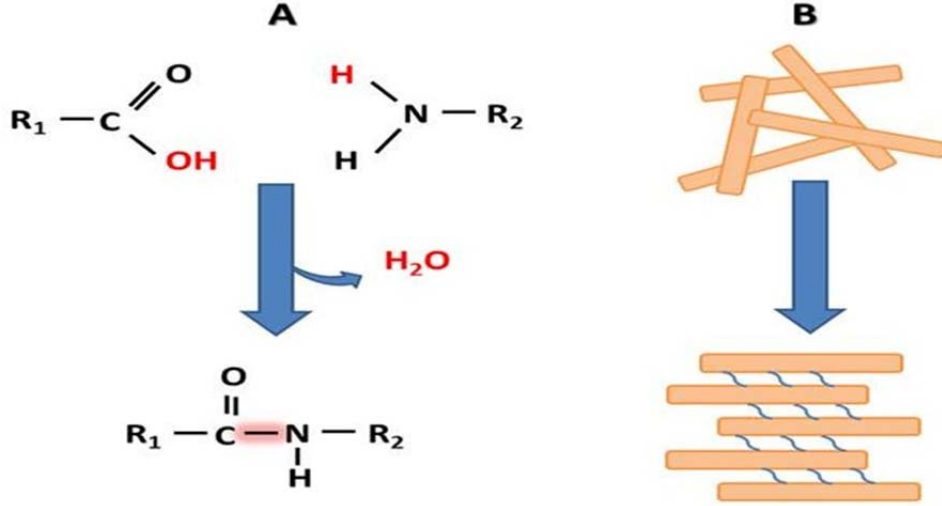
Suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile enzim molekülü arasında kovalent bağ oluşumunu esas alan immobilizasyon yöntemleridir. Bu yöntemler çoğunlukla tersinmezdir, serbest enzim, yeniden geri kazanılamaz.

Fiziksel immobilizasyon yöntemlerinde immobilize enzimin aktivitesi, serbest enzimin ve destek maddesinin yapısına bağlıyken kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin, serbest enzimden farklı aktiviteye sahip olmasına, enzim ve destek maddesi dışında reaksiyon şartları da etki eder. (Uhlig, 1998)

Bununla beraber yüksek molekül ağırlıklı substratların ve makro moleküllerin sterik etkisi de kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin katalitik etkisini düşüren nedenlerden biridir.

Kimyasal immobilizasyon, iki farklı metoduyla yapılır; (Guisan, 2006, Schulze ve Wubbolts, 1999)

- Çapraz bağlanma yöntemi
- Kovalent bağlanma yöntemi



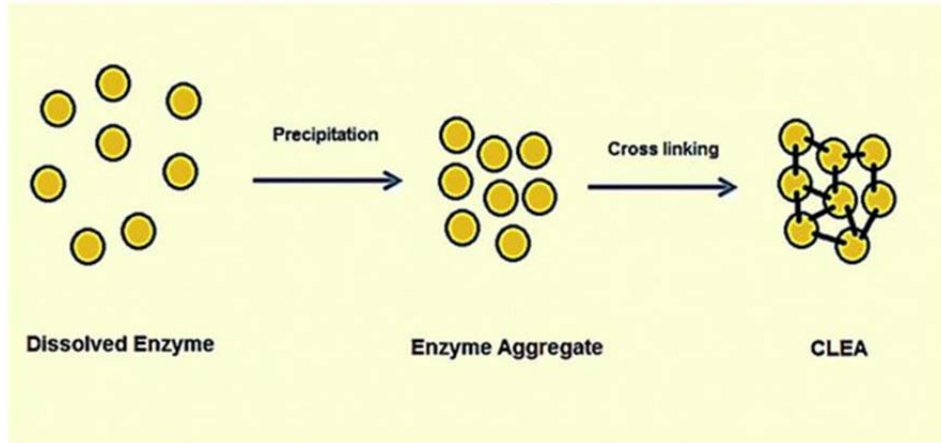
Şekil 1.4. Kimyasal yöntemle immobilizasyon, A:Kovalent bağlanma yöntemi
B:Çapraz bağlanma yöntemi

1.4.1. Çapraz Bağlama:

Küçük molekül yapısında iki veya daha çok fonksiyonel grup içeren maddelerin, enzim molekülleriyle aralarında kimyasal bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim ile destek maddesi arasında hem molekül içi bağlar hem de moleküller arası bağlar oluşması söz konusudur. Aslında çapraz bağlanma yöntemi ile enzimi immobilize etmek çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gerekli şartların seçimi ve oluşturulması zordur. Eğer tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek isteniyorsa çok fonksiyonlu maddelerin kullanılması gereklidir.

Çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiş bir enzimin aktifliği; reaksiyon süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörler ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı; basit ve hızlı prosedürlerde immobilize enzimlerin sadece ajanın varlığında hazırlanabilmeleriyle dezavantajı ise moleküller arası çapraz bağlanma oluşurken reaksiyonun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir. Bu reaksiyon,

uygun şartlarda gerçekleşmediğinde, enzimde büyük ölçüde aktivite kaybı görülür. (Guisan, 2006)



Şekil 1.5. Çapraz bağlanma metodu ile immobilize enzim oluşumu

1.4.2. Kovalent Bağlama:

Bu yöntemle, serbest enzim, suda çözünmeyen bir destek maddeye kovalent olarak bağlanarak immobilize olur. Etkileşim, enzimin nükleofilik grubuyla destek maddenin fonksiyonel grubu arasında kovalent bağ kurulur. Bu bağlanma; amino grubu (NH₂), karboksil grubu (CO₂H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubu gibi fonksiyonel gruplar arasında gerçekleşir.

Kovalent bağlanma yönteminde enzimi hareketsiz sabitleyebileceğimiz pek çok destek maddesi vardır. Fakat uygulanacak destek maddeleri avantaj ve dezavantajları dikkate alınarak seçilmelidir. Hidrofilik özelliğe sahip, polisakkarit polimerleri, kovalent bağlama enzim immobilizasyonunda en çok tercih edilen desteklerdendir. Bazen hidrofilik özelliği polisakkarit polimerlerinden daha düşük olan, gözenekli silika ve cam da destek maddesi olarak kullanılmaktadır.

Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda bağlanma şekilleri, diazo, peptid ve alkilleme metodu olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Ancak enzim aktivitesinin en

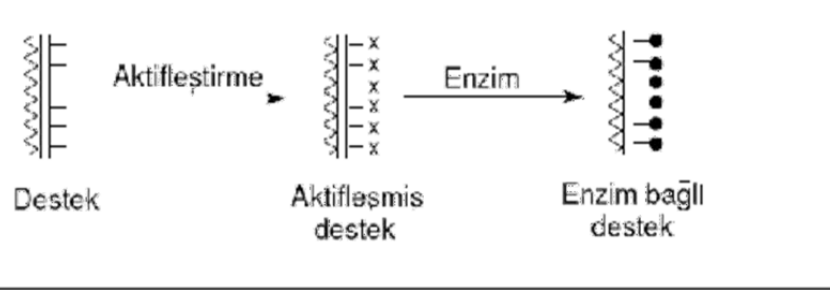
yüksek düzeyde olabilmesi için uygun metodu seçerken, enzimin aktif merkezinin kullanılan ayraçlardan etkilenmediğine dikkat edilmelidir.

Bu yöntemle sağlanan immobilizasyon, enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanmalar açısından diğer immobilizasyon yöntemlerindeki gibi daha kuvvetlidir. Bağlanma kuvvetine bağlı olarak, substrat veya yüksek iyonik kuvvete sahip çözeltilerde enzim ile taşıyıcı arasında sızıntı olmaz. Ayrıca enzim taşıyıcının üzerine tutturulmuş ve hareketsiz hale getirilmiş olduğundan, immobilize edilmiş enzimle substratı çok kolay bağlantı kurabilir. (Bickerstaff, 1997, Uhlig, 1998)

Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiş bir enzimin aktivitesi serbest haldekine oranla daha düşüktür. Bunun nedeni olarak, immobilizasyon koşulları diğer immobilizasyon yöntemlerindeki gibi daha karmaşık olması ve kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi ve konformasyonel yapısının değişiklik göstermesi söylenebilir. Eğer enzimin katalitik aktivite gösteren grupları dışındaki fonksiyonel grupları da taşıyıcıya bağlanırsa enzim aktivitesinin çok düşmediği görülür. Bu doğrultuda enzimin katalitik aktivitesinin düşmesini engellemek için;

- 1) Immobilizasyon işleminin bir inhibitör veya substrat varlığında gerçekleştirilmesi,
- 2) Tersinir, kovalent olarak bağlanmış bir enzim-inhibitör kompleksinin kullanılması,
- 3) Taşıyıcıya kovalent bağlanacak modifiye edilmiş ve çözünebilir bir enzim kullanılması, yöntemlerinden biri uygulanabilir.

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmesi şekilde görülmektedir:

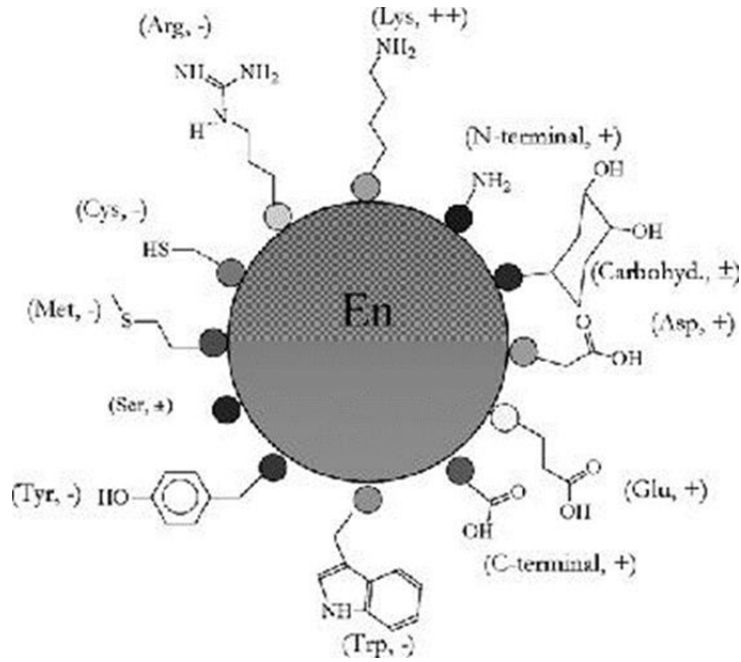


Şekil 1.6. Kovalent bağlanma metodu ile immobilize enzim oluşumu

Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda destek maddesi - enzim arasında muhtemel oluşması beklenen bağlar aşağıdakiler gibidir: (Enzyme Immobilization, 2004, Kasavi, 2006)

- Diazotizasyon: Destek-N = N-Enzim
- Amid Bağı Oluşumu: Destek -CO - NH-Enzim
- Alkilasyon ve Arilasyon: Destek -CH₂ - NH-Enzim, Destek ı-CH₂ - S-Enzim
- Schiff'in Baz Oluşumu: Destek -CH = N-Enzim
- Amidasyon Reaksiyonu: Destek -CNH - NH-Enzim
- Tiyol-Disülfid Yer değişirmesi: Destek -S - S-Enzim
- Ugi Reaksiyonu
- Civa - Enzim Yer değişirmesi
- Bifonksiyonel Ayıraçlarla Taşıyıcı Bağlanma: Destek-O(CH₂)N=CH(CH₂)₃CH = N-Enzim

Biz bu tez çalışmamızda, epoksi grupları içeren destek meddesine selülaz enzimini tutundurarak, kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyonunu sağladık. Destek maddelerinin enzimi bağlayan fonsiyonel grupları epoksi gruplarıdır. Kovalent bağlanma esnasında epoksi halkası açılarak enzime, enzimin -NH₂ grubundan bağlanır.



Şekil 1.7. Farklı fonksiyonel grup içeren matris ve enzimlerin kovalent bağ metodu ile immobilizasyonu

1.5. İmmobilizasyonun Avantaj ve Dezavantajları

Endüstriyel anlamda düşük maliyetlerde yüksek ürün verimi sağlamak için geliştirilen immobilize biyokatalizlerin kullanılmasının, avantajları olduğu gibi dezavantajlarının da olduğu bilinmektedir.

1.5.1. İmmobilizasyonun Avantajları

- İmmobilize enzim ile katalizlenen bir tepkimeyi durdurmak için enzimi deaktif edecek ani ısıtma, inhibitör eklenmesi vb. işlemlere gerek yoktur. Bu da, serbest enzimle katalizlenen her proses döngüsünde hem bu işlemler için hem de her seferinde kullanılacak enzim için çaba ve maddi kaynakların harcanmamış olur.

- Enzimin fonksiyonel verimliliğinde artış
- Kesikli proseslerde tekrar kullanılabilirliği, sürekli proseslerde ise immobilizasyon metoduna ve bağlanma yüzdesine bağlı olarak uzun süre kullanılabilirliği; maliyetin büyük oranda azaltılması demektir.
- Serbest enzimler oranla yüksek kararlılık ve uzun yarılanma ömrüne sahiptirler.
- İmmobilize enzim, üründen kolaylıkla ayrılabilir.
- Farklı optimum sıcaklık ve pH'lardaki enzimler, aynı prosesde bir arada kullanılabilirler.
- Yüksek verimde ve aynı kalitede sürekli üretim söz konusudur.
- Üretim esnasındaki proses koşullarına karşı daha uzun süre dayanıklıdır.
(Enzyme Immobilization, 2004)

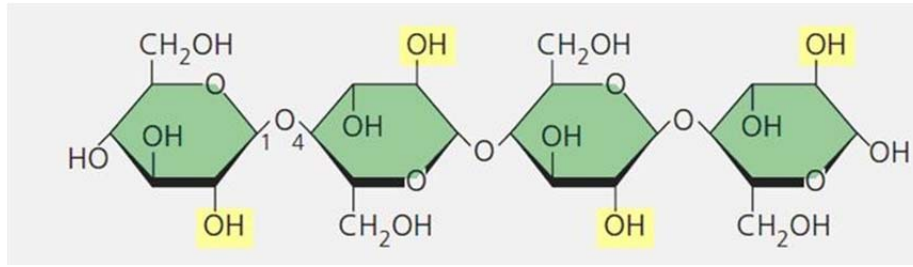
1.5.2. İmmobilizasyonun Dezavantajları

- İmmobilizasyon destek maddelerinin maliyetinin yüksek olması
- Serbest enzimlere göre aktivitelerinin %50 -%60 oranda düşük olması
- Sterik zorluklar ve difüzyon kısıtlamaların olması (örneğin substrat ve/veya ürünün makromoleküler veya çözünmez yapıya sahip olması durumunda immobilize enzimin kullanılabilirliği düşer)
- Tekrar kullanımlarda kararlılığının azalması (Enzyme Immobilization, 2004)

1.6. Selülozlar

Selülozlar, bakteriler, protozoalar, bitkiler ve hayvanlardan elde edilen; selülozdaki β -1,4 bağlarını hidroliz ederek, selo-oligosakkarit, sellobiyoz ve glikoz oluşturan enzimlerdir. Selülozların, kristalik yapıları ve yapılarındaki proteinlerin aminoasit dizileri nedeniyle katalitik modülleri çeşitlilik göstermektedir (Lamed ve Bayer, 1998)

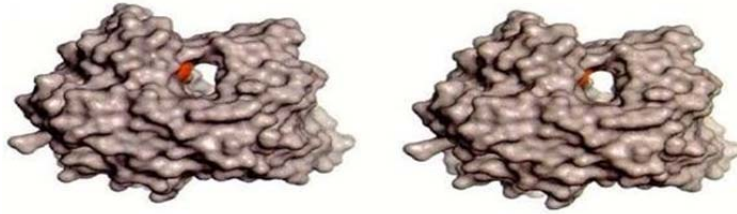
Selüloz, bitkilerin yapısında bulunup 15000 kadar glikoz biriminin β -1,4-glikozidik bağlar ile lineer olarak bağlanması ile oluşur. (Topuz ve Kıran, 2007, Niehaus ve ark., 1999)



Şekil 1.8. Selülozun molekül yapısı

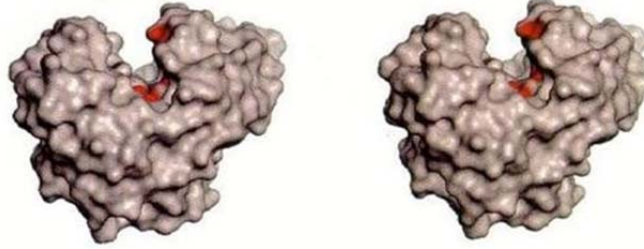
Selüloz, bir disakkarit olan sellobiyoz birimlerinden oluşmuştur. Selüloz enzimi ile önce sellobiyoz birimlerine sonra da glikoz monomerlerine ayrılır. (Öztürk, 2015) Selüloz enzim karışımı, enzimatik faaliyetlerine göre endoglukanazlar, ekzoglukanazlar ve β -glukozidazlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Üçü de, D- glukoz molekülleri arasındaki 1,4- β -glukozidik bağı hidrolize ederek glikozlara parçalama kabiliyetine sahiptirler. Bu, üç farklı tip selülozun ortak özelliğidir. Selülozun bahsedilen bu üç ana tipi şunlardır:

- 1- Sellobiyohidrolazlar (1,4- β -D-glucan sellobiyohidrolaz,). Ekzoglukanazlar diye de bilinen sellobiyohidrolazlar, oligosakkarit zincirlerinin indirgeyici ya da indirgeyici olmayan ucundan başlayarak, doğrudan glukoz ya da sellobiyoz dimerleri oluştururlar. Ekzoglukanazlar bağımsız olarak çalışabilirler ve selüloz zincirlerini mikrokristalin selülozdan ayırabilirler. Ekzoglukanaz aktivitesini belirlemek için çözünmeyen selülozik substratlardan mikro kristal selüloz kullanılabilir. Endoglukanazlar ve β -glukozidazların aksine ekzoglukanazların spesifik bir substratı bulunmamaktadır. (Öztürk, 2015, Davies ve Henrissat, 1995)



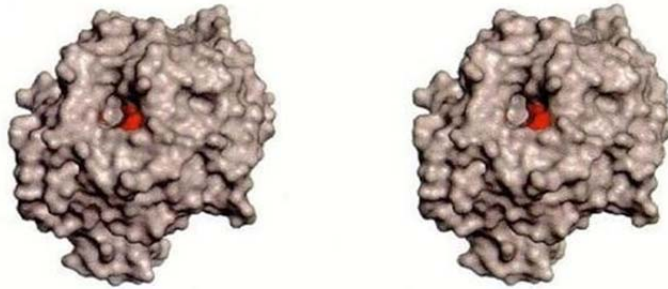
Şekil 1.9. 1,4- β -D-glucan sellobiyohidrolaz'ın üç boyutlu görünümü

- 2- Endo- β -1,4-glukanaz (endo-1,4- β -D glukan 4-glukanhidrolaz). Endoglukanazlar, 1,4- β -D-glukan-4-glukanohidrolazlar olarak da bilinirler ve rastgele bir şekilde iç amorf bölgelerdeki selüloza bağlanıp, 1,4- β bağına bir su molekülü eklerler ve böylece polisakkarit zincirini parçalarlar. Parçalanma sonunda, indirgeyici ve indirgeyici olmayan uçlardan oluşan, çeşitli uzunluklarda oligosakkaritler oluşur. Endoglukanazlar, genellikle karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisinin viskozitesindeki azalma ile test edilirler. (Öztürk, 2015, Davies ve Henrissat, 1995)



Şekil 1.10. endo-1,4- β -D glukozidaz'ın üç boyutlu görünümü

3- β -glukozidaz. β -glukozidazlar, sellobiyoz dimerlerini ve çeşitli uzunluklardaki sellodekstrinleri glukozla hidrolize ederler. Çözünür sellobiyozu ve diğer poliekodekstrinleri, sulu ortamda glukoz açığa çıkarmak üzere polimerizasyon derecesi en fazla 6 olana kadar hidrolize ederler.



Şekil 1.11. β -glukozidaz'ın üç boyutlu görünümü

Oligosakkaritler, sellobiyozlar ve glukozlar, endoglukanazların selülozları rastgele parçalamasıyla oluştururken, ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar) selülozdaki β -1,4-D-glukozidik bağlarını hidrolizleyerek indirgenmemiş uçlardan sellobiyozların serbest kalmasına yardımcı olurlar. β -glukozidazlar ise sellobiyozları hidrolize ederek glikoz moleküllerine parçalarlar. (Öztürk, 2015, Acharya ve ark., 2008)

Selülozu hidrolize eden yukarıdaki belirtilen bu enzimler, genel olarak mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Bu mantar ve bakterilerin bir kısmı, *Clostridium thermocellum* gibi anaerobik bakteriler, bir kısmı da *Trichoderma reesei*, *Aspergillum niger* gibi aerobik bakteriler ve mantarlardır. Endüstriyel selülaz enzimlerinin üretimi için kullanılan bakterilerdeki selülazın, genellikle, endoglukanazlar ve sellobiohidrolazlardan oluştuğu belirtilmektedir.[30]

Selülazlar, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir. Biz tez çalışmamızda *Aspergillus niger* mantarından elde edilen toz haldeki selülaz enzimi ile çalıştık. *Aspergillus niger* küf mantarı *Ascomycota*'nın, *Trichocomaceae* ailesinden, iplikli yapıda bir mantar türüdür. (Hu ve ark., 2014)



Şekil 1.12. *Aspergillus* küf mantarının oluşumu

Aspergillus, yaklaşık 200'e yakın küf mantarı türünden oluşmuş bir cinstir. *Aspergillus* türleri bol oksijenli ortamlarda sıkça rastlanırlar. Mantarlar bol karbonlu yüzeylerde, glukoz gibi monosakkaritlerle beslenerek oluşurlar ve çoğalırlar. Ancak *Aspergillus* türü mantarlar, amilaz enzimleri salgılamış olduğu

için nişasta gibi polisakkaritleri de kullanabilirler. *Aspergillus* türlerinin, ekmek ve patates gibi nişastalı yiyeceklerin bozulmalarına neden olduğu; bitki ve ağaç yüzeylerinde görülen mantar türü olduğu söylenebilir. *Aspergillus* türlerinin, glukoz, fruktoz, maltoz ve nişasta gibi yalnızca karbon kaynakları gıdalarda değil diğer organizmaların kullanmamış olduğu besin kaynaklarının olduğu ortamlarda da gelişme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, banyolardaki küf gibi. (Coşkun, 2009, Hürtaş ve İnci, 1986)

Günümüzde selülozik materyallerin enzimatik hidroliziyle gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemlerin yaygınlaştığı görülmektedir. Selüloz, gıda, enerji, yakıt ve diğer pek çok endüstriyel ürün için temel ham materyal haline gelmiştir. Selülozun enzimatik hidrolizi için yapılan çalışmalarda, selülaz salgılayan mikroorganizmalar, genellikle ortama doğrudan ilave edilecek şekilde yöntemler uygulanır. Ancak, bu şekilde elde edilen verimin düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle, selülozu, selülaz salgılayan mikroorganizmalarla birlikte kullanmak yerine doğrudan selülaz ile muamele etmek daha iyi bir çözümdür. Bu da selülazın önceden üretilip saflaştırılmasını gerektirir. (Öztürk, 2015)

Selülazın endüstriyel alanda kullanımı:

- 1) Alkol üretiminde (sıvı kazancını arttırmak ve iyi bir renk elde etmek için kullanılır).
- 2) Deterjanlarda (selülazın varlığı renklerin canlanmasına, yumuşamasına ve partikül halindeki toprağın uzaklaşmasına yardımcı olur).
- 3) Kot pantolonların biyolojik olarak taşlanması
- 4) Selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmada,
- 5) Zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonunda. (Öztürk, 2015)

1.7. Selüloz İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Maddeler

Selülazın hareketsiz hale getirilmesi için seçilen taşıyıcı malzemeler, nano ölçekli malzemeler, doğal polimerler, mezoporöz malzemeler ve manyetik malzemelerdir. Bununla birlikte, tüm bu tek taşıyıcılı hareketsizleştirilmiş enzimlerde yüksek sızıntı oranları olduğu, yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Sızıntı oranları fonksiyonel grupların sokulmasıyla azaltılabilir, ancak bu işlem karmaşıktır ve enzim maliyetlerini de arttırılabilir. (Barım ve Coşkun, 2012)

Fonksiyonel polimerler, çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere, yapılarında buldukları fonksiyonel grubun özelliği ve ayrıca makromoleküler özelliklerinin incelenmesi bakımından sentezlenmiş ve araştırılmıştır. (Yactine ve ark., 2010, Erol ve Fluorine, 2008). Bu polimerlerle ilgili yapılan çalışmalarda, sentezlenen monomere bağlı süstitüentin yapısının ve konumunun, monomerin birçok özelliğini değiştirdiği gözlemlenmiştir. (Erol ve Kolu, 2011) Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan polimerlerden biri de metakrilat polimerlerdir. Akrilik ve metakrilik esaslı polimerlerin uygulama alanları geniş ve çok yönlüdür. (Soykan ve ark., 2009)

Bu çalışmada, epoksi grupları ile zenginleştirilmiş iki ayrı polimerik taşıyıcı ile enzim immobilizasyonu araştırıldı. Selüloz enziminin kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat ile immobilizasyonu ve karakterizasyonunu üzerinde çalışıldı.

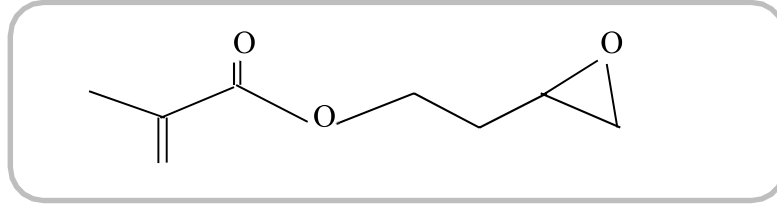
1.7.1. Epoksi Metakrilatlar

Epoksi grupları ile işlevselleştirilmiş hidroflik ve düşük gözenekli metakrilatlar polimeridir. Kovalent enzim immobilizasyonları için kullanılır.

Epoksitlr çok kararlı kovalent bağlantılar oluşturur. Hidrolazlar dahil çok çeşitli enzimlerin immobilizasyonunda uygulanırlar. Yüksek mekanik dayanıklılığa sahiptirler. (Purolite, 2015)

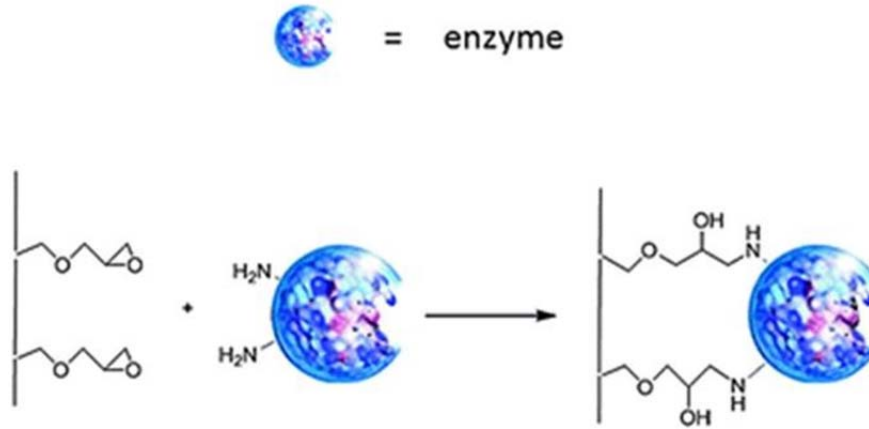
1.7.2. Epoksi Butil Metakrilatlar

Hem butil hem de epoksi grupları ile işlevselleştirilmiş bir metakrilat polimerdir. Lipazlar ve trans-amilazlar gibi hidrofobik enzimlerin immobilizasyonu için idealdir. İki fazlı sistemlerde de kullanıma uygundur. (Puro-lite, 2015)



Şekil 1.13. Epoksi butil metakrilat molekülü

Fonksiyonel grubu epoksi olan bu polimerik matrisler, enzime bağlanırken epoksi grubu açılır ve enzimin -NH₂ ucundan bağlanır.



Şekil 1.14. Epoksi grubu içeren destek maddesinin enzime kovalent bağlanması

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hurst ve ark. (1976), *Aspergillus niger*'in ticari selüloz preparatından selüloolitik enzim izole etmişlerdir. Her 100 g ticari selülozdan 50 mg enzim elde edilmiştir. İzole edilen enzimin pH 4,0 ve 8,0'de ultrasantrifüj yapılması ve SDS-PAGE'te homojen olduğu bulunmuştur. Ancak disk elektroforezinde bir büyük iki küçük band görülmüştür. Protein ile birleşmiş karbohidrat bulunmamıştır. Aminoasit analizi sonucunda enzimin asidik ve aromatik amino asitlerce zengin olduğu bulunmuştur. SDS-PAGE sonucunda enzimin molekül ağırlığının 26 kDa olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin CMC'ye karşı aktivite gösterirken sellüloz ve p-nitrofenil β D-glukoza karşı aktivite göstermediği görülmüştür. Enzimin optimum pH'sı 3,8-4,0 arasındadır. Enzim pH 4,0, 45 °C'de maksimum aktivite göstermiştir. Selüloz ısı ile muameleye karşı pH 8,0'den pH 4,0'e göre daha dayanıklıdır. Kinetik çalışmalar sonucunda enzimin substrat kompleksini içeren gruplar için pK değeri 4,2 ve 5,3 arasında belirlenmiştir.

Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus sp.* izolatından elde edilen selüloz enziminin aktivite analizini yapmışlar ve maksimum selüloz (CMCaz) aktivitesin pH 4.8 ve 58 °C'de gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Hreggvidsson ve ark. (1996), *Rhodothermus marinus*'tan izole edilen termostabil selüloz (CMCaz) enziminin optimum aktivitesini pH 7.0 olduğunu saptamışlar ve enzimin 100 °C'de 3,5 saat bekletildiğinde orijinal aktivitesini % 50 koruduğu göstermişlerdir.

Bok ve ark. (1998), *Thermotoga neapolitana* bakterisinden moleküler ağırlıkları 29 ve 30 kDa olan iki termostabil endoselüloz izolasyonu yaparak, enzimlerin optimum pH 6.0-6.6 ve 95 °C'de aktif olduklarını bulmuşlardır.

Mawadza ve ark. (2000), iki *Bacillus* suşundan üretilen selüloz karakterize ederek, iki enzimin molekül ağırlığını da 40 kDa olarak belirlemişlerdir. Ayrıca enzimlerin optimum aktivitelerini pH 5.0-6.5'de ve sıcaklıklarının ise 65 °C ve 70 °C'de gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Singh ve ark. (2001), *Bacillus sp.* VG1 suşundan termostabil alkali karboksimetil selülaz (CMCaz) enzimini izole ederek enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 9.0-10.0 ve yarılanma ömrünün ise 100 °C'de 12 dakika olduğunu bulmuşlardır. Endo ve ark. (2001), *Bacillus sp.* KSM-N252 suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'nın 10.0 ve sıcaklığın 55 °C olduğunu saptayarak, enzimin moleküler ağırlığının 50 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Hakamada ve ark. (2002), alkalik endoglukanaz enzimini *Bacillus circulans*'dan izole ederek pH 8.5'da ve optimum sıcaklığının 55 °C olduğunu ve moleküler ağırlığının 43 kDa olduğunu saptamışlardır.

Singh ve ark. (2004), *Bacillus sphaericus JS1* suşundan alkali selülaz (CMCaz) enzimi izole ederek enzimin üretimi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin SDS- PAGE analizinde moleküler ağırlığının 42 kDa olduğu saptamış ve enzimin termostabilite (60–70 °C), pH stabilitesi (8.0-10.0) ve hidrolitik kapasitesi açısından, deterjan sanayi için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Kim ve ark. (2005), alkalifilik *Bacillus sp.* suşundan HSH-810'dan alkali selülaz izolasyonu yapmışlar ve enzimin pH 10.0'da ve 50 °C'de optimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Moleküler ağırlığını ise 80 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Akita ve ark. (2005), *Bacillus halodurans* C-125 suşundan izole edilen selülaz enziminin ince tabaka kromatografisi analizinde endo özellik gösterdiğini bulmuşlardır. Enzim optimum aktivitesini 60 °C de pH 6 ve 8 de göstermiştir. Enzimin orijinal aktivitesini 50 °C ve 60 °C de 2 saatlik inkübasyondan sonra % 100 koruduğunu saptamışlardır. Moleküler ağırlığını ise 31 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Kang ve ark. (2007), *Pyrococcus horikoshii*'den, kristalin selüloza karşı aktivitesi yüksek hipertermofilik selülaz (CMCaz) izolasyonu gerçekleştirmişler ve enzimin disülfid bağına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin optimum pH 5.5-

6.0 arasında ve 90 °C de aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Aygan (2008), *Bacillus sp.* C-14 suşundan izole edilen endoglukanaz enzimin molekül ağırlığını 61 kDa olarak belirlemiş, optimum aktivitesini ise 50 °C’de ve pH 11.0’de gözlemiştir.

Kılıçer H. R. ve Özcan B. D. (2013), Farklı üç adet termofilik *Bacillus sp.* izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bakteriler sırasıyla *Bacillus sp.* HG1, HG2 ve HG3 olarak simgelenmiştir. Selüloz üretimi, üreme periyodunun başlangıcından itibaren HG1 ve HG2 izolatları için 72. saatte, HG3 izolatı için ise 24. saatte maksimum düzeye çıkmıştır. HG1 ve HG2 selülozları optimum aktivitelerini 60°C’de gösterirken, HG3 selülozu 70°C’de göstermiştir. Bununla birlikte HG1 ve HG3 selülozları optimum aktivitelerini pH 5.0’de gösterirken, HG2 selülozu pH 4.0’de göstermiştir. Her üç enzim de 60°C’de 30 dakika muhafaza edildiklerinde aktivitelerinin tamamını korurken, daha yüksek sıcaklık değerlerinde 30 dk inkübasyon sonucunda aktivitelerini kaybetmeye başlamışlardır. HG1, HG2 ve HG3 enzimlerine ait spesifik aktiviteler 55°C’de sırasıyla 34.1, 67.8 ve 112.3 U/mg olarak belirlenmiştir.

Dal H. (2018), Selüloz enzim kompleksini manyetik partiküllere immobilize etmiş ve hem serbest hem de immobilize enzimlerin optimum sıcaklığını 70°C bulmuştur. Serbest enzimin optimum pH’sını 5, immobilize enzimin optimum pH’sını 4,8 olarak bulmuştur. 60°C ’de 5 saat boyunca her saat başı yapmış olduğu ölçümlerle termal kararlılıklarını ise 5 saatin sonunda serbest selüloz enzimi için kalan aktivite değerini % 29,9, immobilize selüloz enziminin kalan aktivite değerini % 38 olarak belirlemiştir. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin depolama stabilitesini belirlemek için ise 4°C sıcaklıkta 20 gün boyunca belirli periyotlarda aktivite tayini yapmış, 20 günün sonunda serbest enzimin aktivitesini % 73.3 oranında koruduğunu, Immobilize selüloz enziminin ise % 91.2 oranında aktivitesini koruduğunu belirlemiştir. Immobilize selüloz enziminin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi amacıyla 8 döngü boyunca optimum şartlarda aktivite ölçümü yapmış. ilk döngü sonunda % 65,36 oranında ve

8. döngü itibarıyla % 5,02 enzimin aktivitesini koruduğunu belirlemiştir.

Yetim K. N. ve ark. (2019), *Aspergillus niger*'den elde edilen β -glukoz oksidaz enzimini polimerik nanopartiküller üzerinde immobilize etmiştir. Serbest ve immobilize enzimler için Optimumu pH'ları; serbest GOx enzimi için pH 5, APS-SchCl-GOx için 6, ve APS- SchClPt(IV)-GOX için pH 7 olarak bulmuştur. APS-SchCl-Pt(II)-GOx için ise, pH 4 ve pH 7 olarak iki tane optimum pH bulmuştur. Serbest ve immobilize GOx için optimum sıcaklık değerlerini ise, serbest GOx için optimum 30 °C ve 70°C olarak iki tane optimum bulunurken, immobilize APS-SchCl ligandının optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak tespit etmiştir. APS- SchCl-Pt(II)-GOx' ın 70 °C, APS-SchBr-Pt(IV)-GOx' ın ise 80 °C olarak bulmuştur. serbest ve immobilize GOx için tüm optimum koşullardaki Km ve Vmax değerlerini ise, serbest enzim için (Km/Vmax) 6,25/2,85 ; APS-SchCl-Pt(II)-GOx için 5,74/8,64 ; APS-SchCl-Pt(II)- GOx için 3,42/7,86 ve APS-SchCl-Pt(IV)-GOx için 5/15,92 olarak hesaplamıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar:

- Selülaz enzimi
- CMC (karboksi metil selüloz)
- Sitrik asit
- Fosforik asit
- Sodyum hidroksit
- DNSA (dinitro salisilik asit)
- Fenol
- Sodyum sülfat
- Sodyum-potasyum tartarat
- Sodyum karbonat
- Bakır-II-sülfat penta hidrat
- Sodyum sitrat
- Folin-C
- BSA (sığır albümin)
- Glikoz mono hidrat
- Epoksi metakrilat
- Epoksi butil metakrilat

3.1.1. Kullanılan Cihazlar:

- vakumlu kurutucu
- analitik terazi
- santrifüj
- pH metre

- su banyoları
- çalkalayıcı inkübatörler
- spektrofotometre

3.1.2. Kullanılan Araç-Gereçler:

- Cam tüpler
- Erlenler, beherler
- Plastik pipetler ve manuel dereceli pipetler
- Huni
- Termometre
- Süzgeç kağıdı
- Spatula
- Parafin

3.2. Metod

3.2.1. Selüloz Enziminin İmmobilizasyonu:

1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan, derişimi 1 mg/mL olan serbest selüloz çözeltisinden, destek maddelerimiz epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat'ın 1'er g'larının üzerine 9'ar mL ilave edilerek 5°C'de 24 saat boyunca karıştıcıda bekletildi.

Süre sonunda, immobilize enzimler süzülerek bağlanmayan serbest enzimin uzaklaştırılması için saf su ile yıkandı. Serbest enzimin, desteklere ne ölçüde bağlandığını belirlemek için de süzüntüden protein tayini yapıldı.

3.2.2. Protein Tayini

Bu çalışmada protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Lowry yönteminde

belirli içerikleri olan A ve B çözeltileri ve bu iki çözeltiden belirli miktarlarda alınarak C çözeltisi hazırlandı.

- Çözelti A : 4 g NaOH ile 20 g Na₂CO₃ 1L distile suda çözülerek hazırlandı.
- Çözelti B : 0,5 g CuSO₄.5H₂O, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinin bir miktarı içinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Çözelti C : 50 mL çözelti A içine 1 mL çözelti B eklenerek hazırlandı
- Folin-C çözeltisi : Folin-Ciocalteu, destile su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlandı.
- Standart Protein Çözeltisi: 1 mL de 1 mg sığır albümini BSA

Standart Protein Eğrisi Çizimi :10 adet deney tüpü alındı. Tüplere sıra ile 1 mL destile su (kör tüp), 25µL, 50 µL, 100 µL, 250 µL, 500 µL, 750 µL ve 1000 µL BSA çözeltisi, son iki tüpe de 50 µL ve 200 µL serbest selülaz enzimi çözeltisi konuldu ve örnek hacimleri 1 mL olacak şekilde destile su eklendi. Tüplere sıra ile 5 mL C çözeltisi eklenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 10 dakika sonunda tüplere yine sıra ile 0,5 mL Folin-C çözeltisi eklenerek yine oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonunda tüp içeriklerinin absorbanları, köre karşı 750 nm' de okunup bu absorbanlar derişime karşı grafiğe geçirildi.

Enzim içerisindeki protein miktarı, çizilen standart protein eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Selülaz Enzimi Aktivite Tayini

Serbest selülaz enzim aktivitesi, indirgen şeker tayini olan DNSA metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre 100 mM pH 4,0 sitrat tamponu içinde hazırlanmış olan serbest selülaz çözeltisinin (15mg selülaz/1 mL tampon) 50 µL'si (1 mg/ 1 mL), aynı sitrat tamponu ile hazırlanmış olan % 1'lik (w/v) CMC çözeltisinin 250 µL'si ile birlikte, 35 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda

reaksiyonu durdurmak için 300 µL DNSA eklenerek karışım 15 dk. kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Oluşan indirgen şeker miktarı 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Kör olarak, 50 µL tampona, sitrat tamponu (100mL pH 4,0) ile hazırlanmış olan % 1'lik (w/v) CMC çözeltisinin 250 µL'si eklenerek aynı işlemler yapılmıştır.

Enzim körü olarak da 50 µL enzime substrat yerine 250 µL sitrat tamponu eklenerek aynı işlemler yapılmıştır.

3.2.4. Serbest Selülaaz ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

Serbest ve immobilize selülaazların ayrı ayrı optimum pH'ları, sıcaklıkları, depolama ve termal kararlılıkları, kinetik parametreleri ile immobilize selülaazların tekrar kullanım kararlılıkları belirlenmiştir.

3.2.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'ın Belirlenmesi

Aktivite tayininde uyguladığımız DNSA metodu uygulandı fakat enzim ve substrat çözeltileri ayrı ayrı, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 ve 8 pH'lardaki tamponlar içinde hazırlanarak en yüksek aktivite gözlenen pH, optimum pH olarak belirlendi.

3.2.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Optimum pH belirlendikten sonra serbest enzim, bu pH tamponuyla, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 50°C, 60°C, 65°C ve 70°C sıcaklıklarda DNSA metodu ile ayrı ayrı inkübe edilerek, en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı belirlendi.

3.2.5. İmmobilize Selülaazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize selülaazların tekrar kullanımları ile ilgili çalışmalar, kesikli reaktörlerde ve belirlenen optimum koşullarda yapılmıştır. Bu işlemler immobilize enzimler aktivite göstermeyinceye kadar tekrarlanmıştır.

3.2.6. Serbest ve İmmobilize Selülozların Depolama kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin başlangıç aktiviteleri ölçülmüş ve 25°C ve 5°C' de bekletilen serbest ve immobilize selülozların, kalan aktiviteleri, 35 gün boyunca belirli aralıklarla ölçülerek depolama süreleri belirlendi

3.2.7. Serbest ve İmmobilize Selülozların Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülozlar 50°C' de 6 saat boyunca inkübe edildi ve 2 saatte bir kalan aktiviteleri ölçüldü.

3.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülozların Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi için, optimum şartlarda %0,1, %0,25 , %0,5 , %1, %2, %3, %4 ve %5 'lik substrat (CMC) çözeltileri hazırlanarak aktiviteler ölçüldü.

Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi açıklamak için Michaelis-Menten eşitliğinden yararlanıldı. Bu eşitlik, substratın enzimle katalizlenen tepkimesi için hız eşitliğidir. Bu denklem başlangıç hızı V_0 , maksimum hız V_{max} ve başlangıç substrat derişimi $[S]$ arasındaki nicel bağlantının ifadesidir. Bunların hepsi Michaelis sabiti olan K_m ile ilişkilidir.

Lineweaver-Burk eşitliği, Michaelis-Menten eşitliğinin çift taraflı ters gösterimidir. Bu dönüşüm, V_{max} ' in çok hassas bir şekilde belirlenmesine imkan sağlar.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Selülazın ve İmmobilize selülazların metodlar bölümünde belirtilen yöntemlerle karakterizasyonları yapılmıştır ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

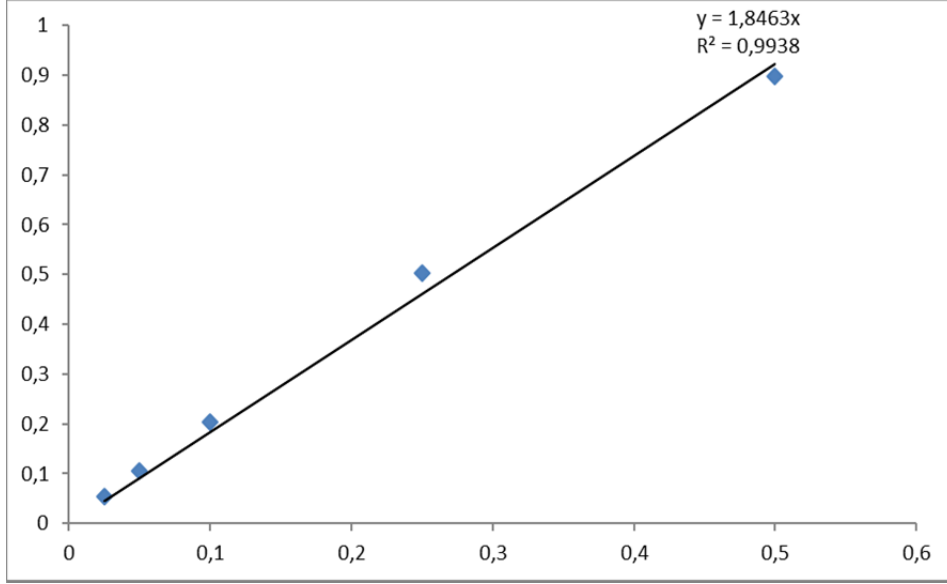
4.1. Selülaz Enziminin İmmobilizasyonu Sonucu Kullanılacak İmmobilize Enzim Miktarı

Yaklaşık 1'er g epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilatın, derişimi 1 mg/ml olan enzim çözeltilisinin 9 ml'siyle 24 saat inkübasyonu sonunda süzdürölüp kurutulan immobilize enzimlerde alınan 5 mg, 15 mg, 25 mg, 50mg ve 100 mg örnekle yapılan çalışmada 5, 15 ve 25 mg immobilize enzim örneklerin aktivite göstermediğı tayin edilmiştir.

5 °C' de 24 saat boyunca karıştırılarak inkübe edilen immobilize enzimler süzölüp yıkandıktan sonra süzöntü ile yapılan protein tayininde eser miktarda proteine rastlanmış olup epoksi metakrilat süzöntüsünde rastlanan protein miktarı epoksi butil metakrilat süzöntüsünden yaklaşık 1,6 kat daha fazla olduğı göröldü.

4.2. Protein Tayini:

Lowry yöntemine göre yapılan protein tayinine göre, kullandığımız *Aspergillius nigger* kaynaklı selülaz enzimidaki protein miktarı %13,78 olarak belirlendi.



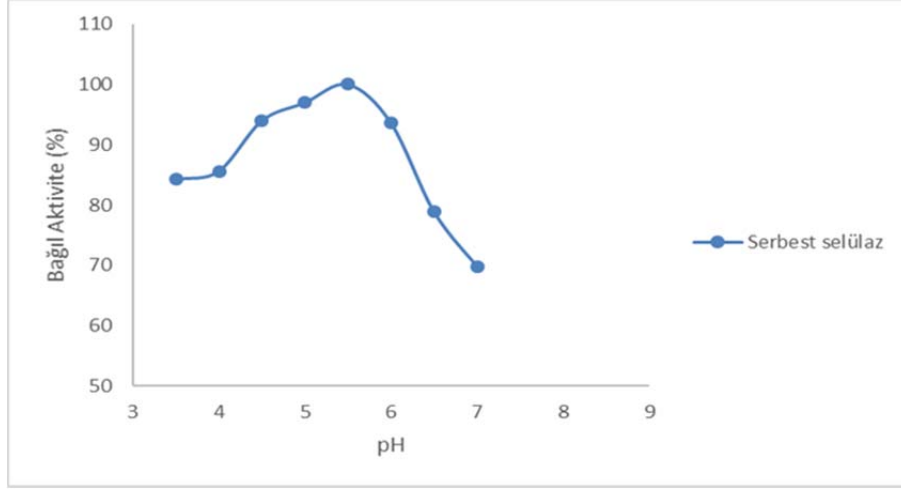
Şekil 4.1. Kullanılan selülaz enzimi için protein eğrisi

4.3. Serbest Selülaz Enzimi İle İlgili Bulgular:

DNSA metodu ile yapılan aktivite ölçümlerinde serbest selülaz enzimi için bulunan optimum pH, tampon derişimi ve optimum sıcaklık değerleri aşağıda verilmiştir:

4.3.1. Serbest Selülazın Optimum pH Değeri

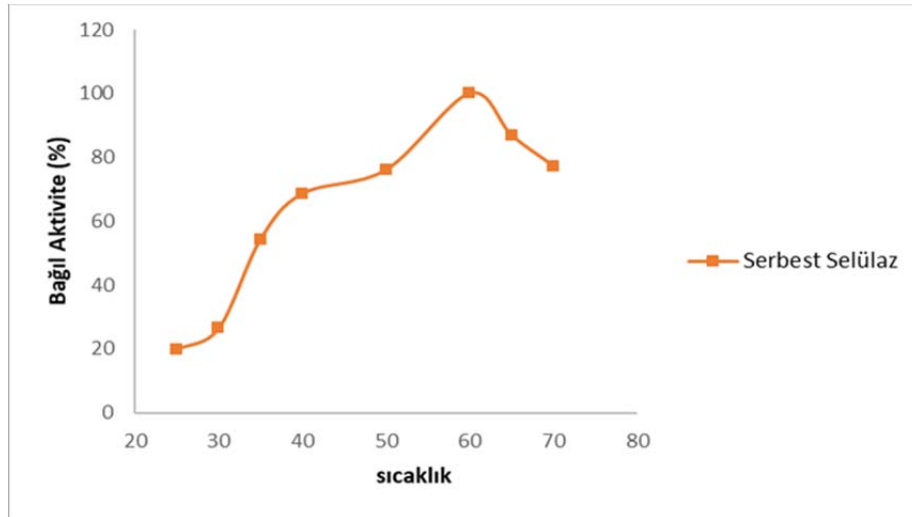
3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 pH'larda ve 0,025 M, 0,05 M, 0,075 M ve 0,1 M'lık tamponlarla yapılan aktivite tayinlerinde, serbest selülaz için optimum pH değeri 0,1 M sitrat tamponu derişiminde 5,5 olarak belirlendi (Şekil4.2).



Şekil 4.2. Serbest selüloz enzimi optimum pH grafiği

4.3.2. Serbest Selülozün Optimum Sıcaklığı:

Serbest selüloz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi pH 5,5 ve 0,1 M sitrat tamponu kullanılarak farklı sıcaklıklarda (25-70 °C) serbest ölçüldü ve serbest selülozün optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi (Şekil 4.3.).



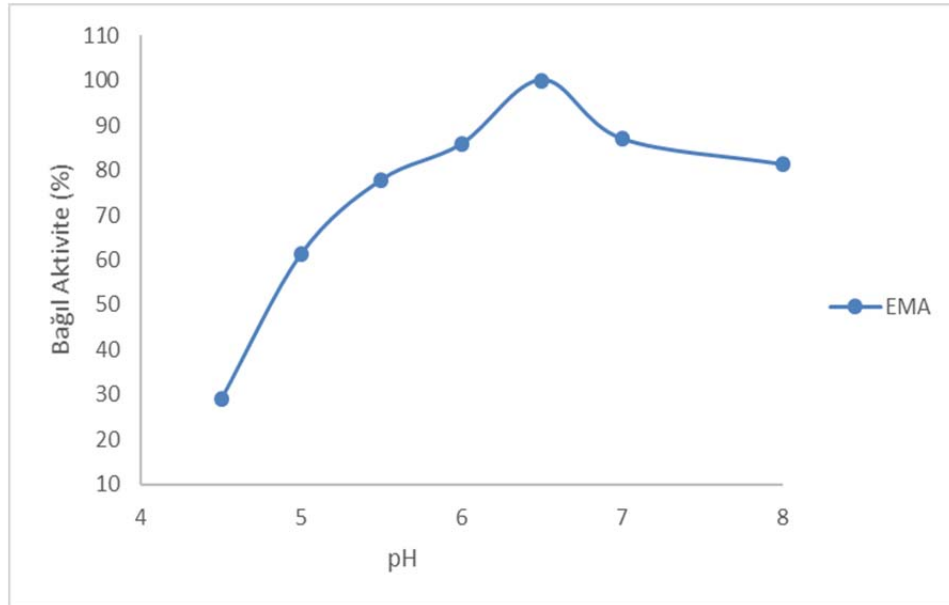
Şekil 4.3. Serbest selüloz enzimi optimum sıcaklık grafiği

4.4. İmmobilize Enzimler İle İlgili Bulgular:

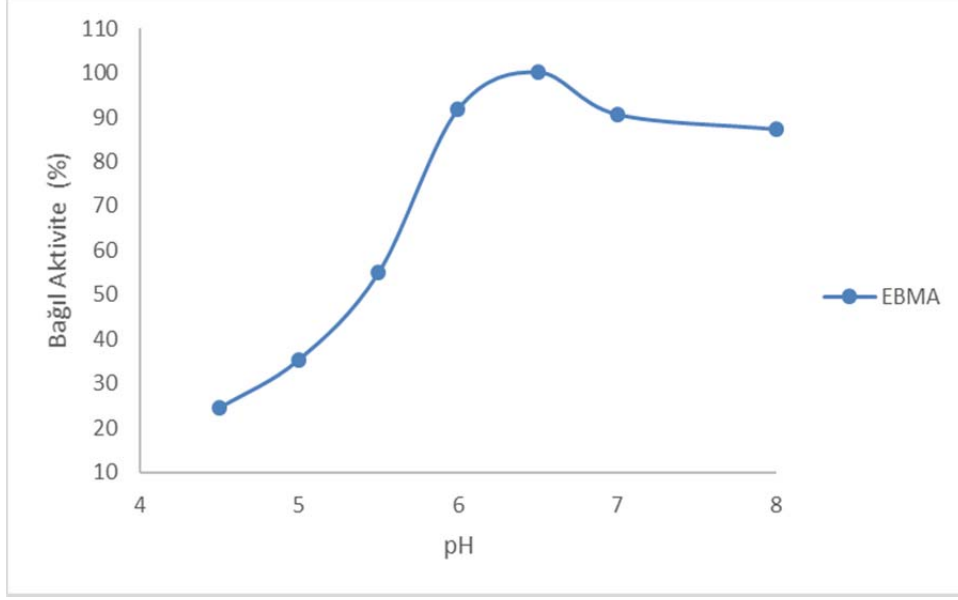
Epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat ile yapılan optimum pH ve sıcaklık tayinlerinde alınan sonuçlar şunlardır:

4.4.1. EMA ve EBMA ile İmmobilize Edilmiş Selülozların Optimum pH**Değerleri:**

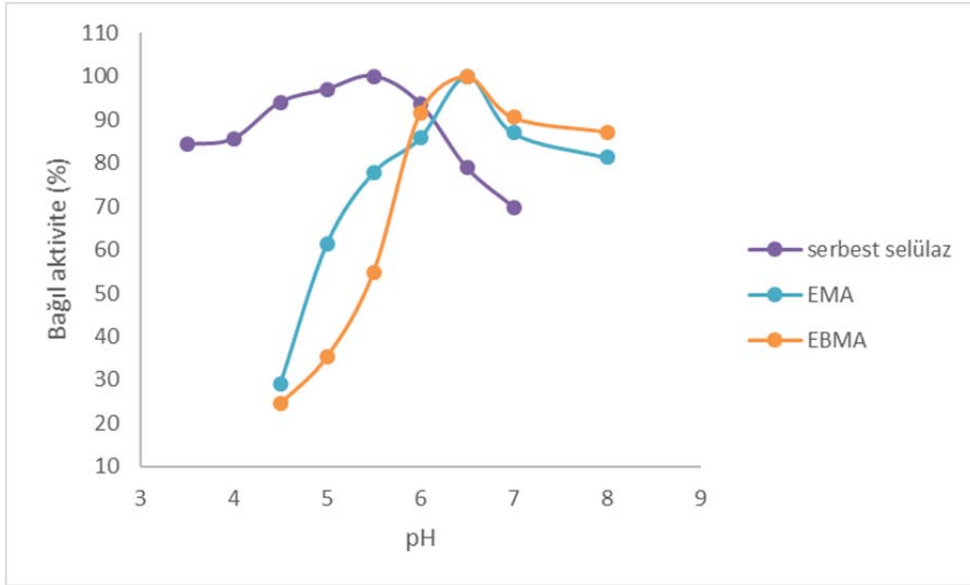
EMA ve EBMA ile immobilize edilmiş selülozların maksimum aktivite gösterdikleri pH 6,5 olarak belirlendi (Şekil 4.4, 4.5)



Şekil 4.4. EMA ile immobilize edilmiş selülozın optimum pH grafiği



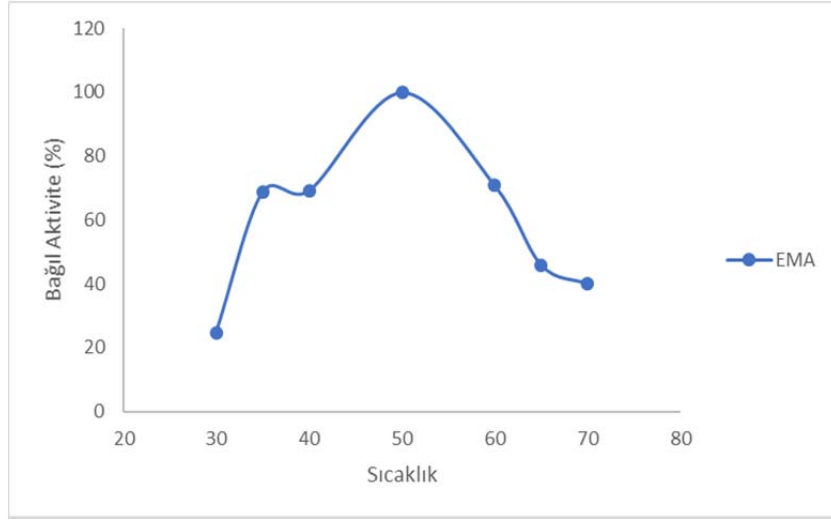
Şekil 4.5. EBMA ile immobilize edilmiş selülazın optimum pH grafiği



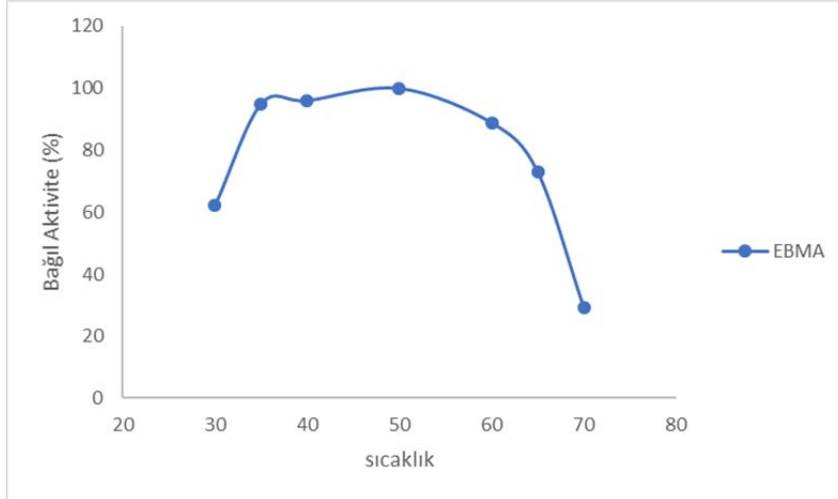
Şekil 4.6. Serbest ve immobilize selülazların optimum pH 'larının birlikte gösterimi

4.4.2. İmmobilize Selülozların Optimum Sıcaklık Değerleri:

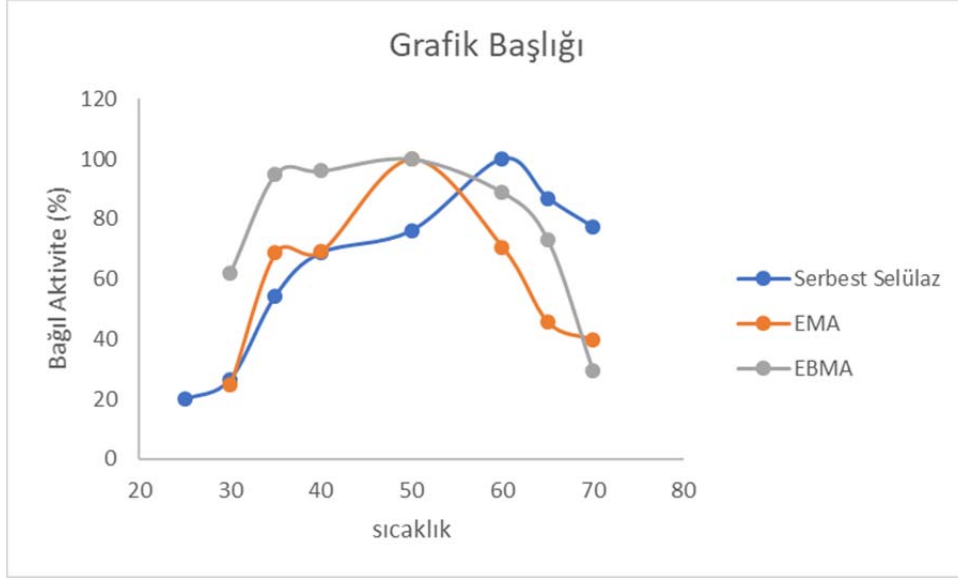
Optimum pH' da 50'şer mg immobilize enzimlerle yapılan analizde EMA ve EBMA ile immobilize edilmiş selülozların optimum sıcaklığı 50 °C olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.7, 4.8).



Şekil 4.7. EMA ile immobilize edilmiş selüloz enzimler için optimum sıcaklık grafiği.



Şekil 4.8. EBMA ile immobilize edilmiş selüloz enzimi için optimum sıcaklık grafiği



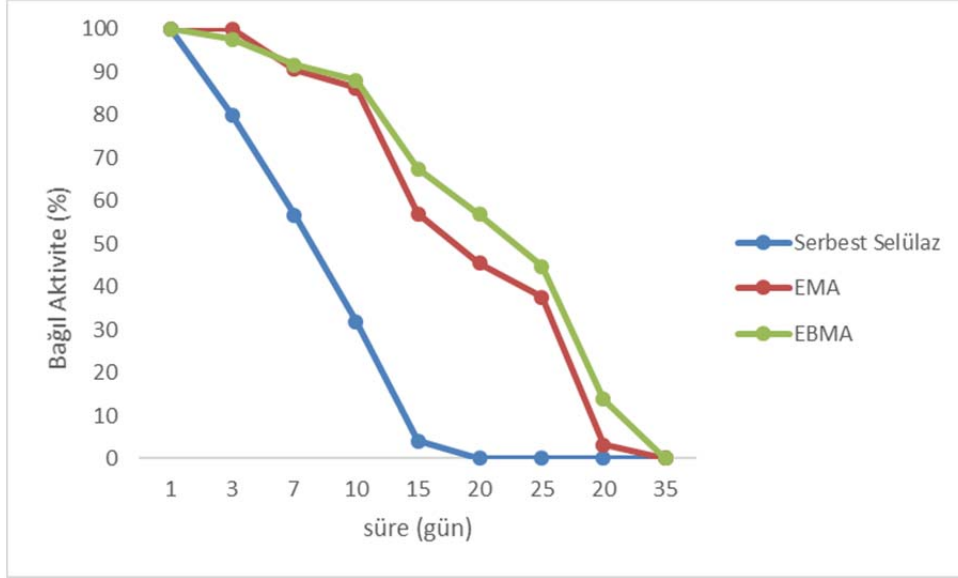
Şekil 4.9. Serbest ve immobilize selülozlar için optimum sıcaklıkların birlikte gösterimi

4.5. Depolama Kararlılığı:

5 °C’ da bekletilen serbest selüloz, EMA ve EBMA ile immobilize edilmiş selülozların 35 gün süresince belirli aralıklarla aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. 5 °C’de 35 gün bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri

Gün	Serbest Selüloz	EMA	EBMA
1	100	100	100
3	80	100	97,57
7	56,74	90,61	91,64
10	31,89	86,28	88,14
15	4,07	57,04	67,39
20	0	45,49	56,87
25	0	37,55	44,74
30	0	3,25	13,75
35	0	0	0

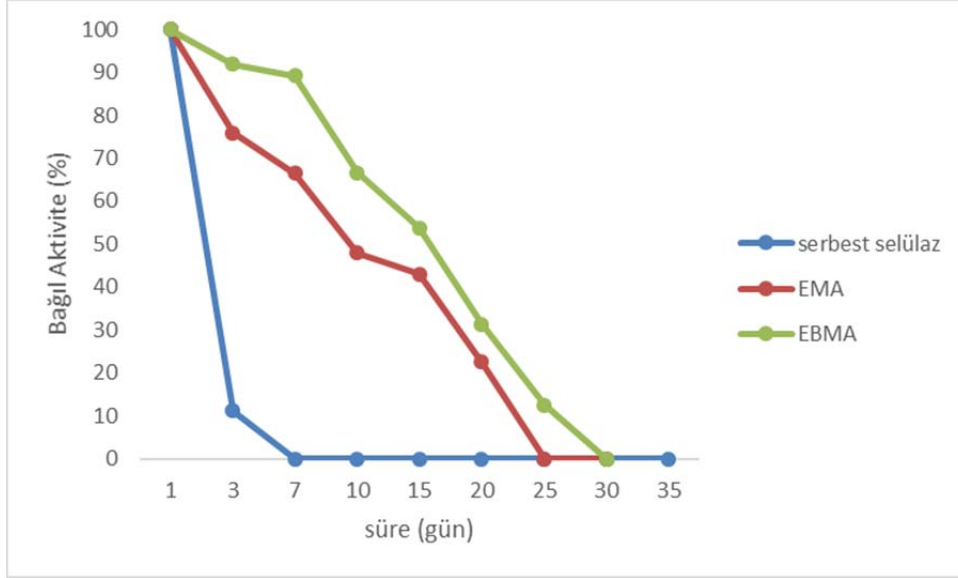


Şekil 4.10. Serbest ve immobilize selülazların 5 °C'deki depolama kararlılığı grafiği

25 °C' da bekletilen serbest selülaz, EMA ve EBMA ile immobilize edilmiş selülazların 35 gün süresince belirli aralıklarla aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. 25 °C'de 35 gün bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin bağlı aktiviteleri

Gün	Serbest Selülaz	EMA	EBMA
1	100		
3	11,23	100	100
7	0	75,82	91,94
10	0	66,39	89,25
15	0	47,95	66,57
20	0	43,03	53,73
25	0	22,54	31,34
30	0	0	12,54
35	0	0	0



Şekil 4.11. Serbest ve immobilize selülazların 25 °C'deki depolama kararlılığı grafiği

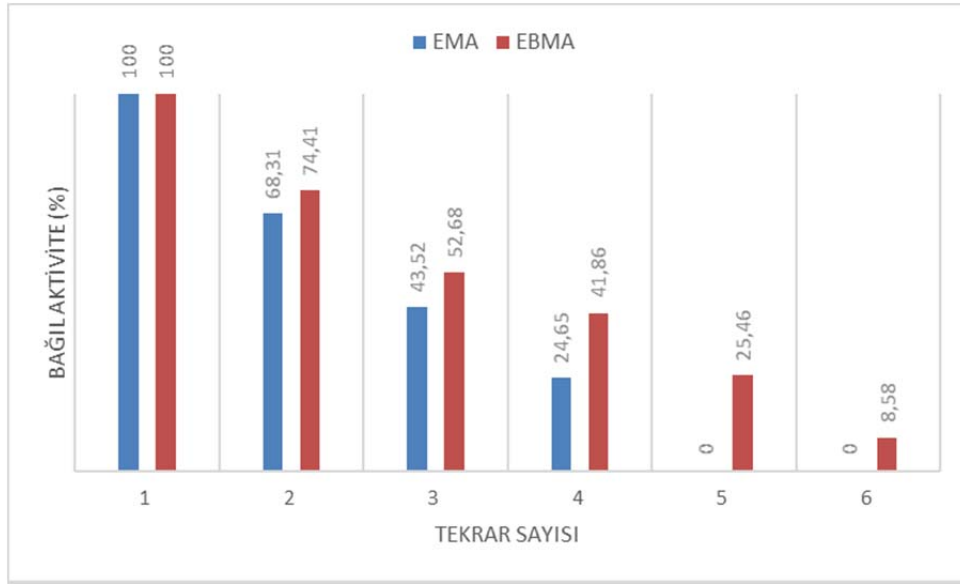
4.6. Tekrar Kullanılabilirlik :

Bilindiği üzere serbest enzimler katalizledikleri tepkime sonunda tekrar kullanılamazlar. Endüstriyel alanda, enzim immobilizasyonunun en temel sebebi de enzimin tekrar kullanılabilirliğidir.

Yapılan deneysel çalışma sonunda epoksi metakrilat ile immobilize edilmiş selülaz enziminin 4. kullanımında % 25'i; epoksi butil metakrilat ile immobilize edilmiş immobilize enzimin ise 6. kullanımında, ilk kullanıldığında göstermiş oldukları aktivitelerin yaklaşık %9'u kalmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. İmmobilize selülozların tekrar kullanımlarındaki bağıl aktiviteleri

Tekrar Sayısı	EMA	EBMA
İlk	100	100
2	68,31	74,41
3	43,52	52,68
4	24,65	41,86
5	-	25,46
6	-	8,53



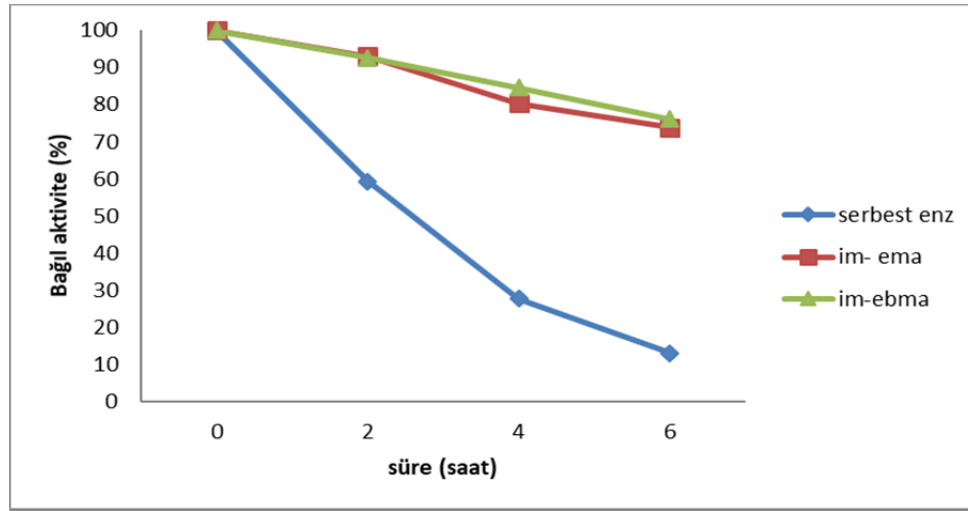
Şekil 4.12. İmmobilize selülozların tekrar kullanımları

4.7. Termal Kararlılık :

50 °C de 6 saat boyunca yapılan inkübasyon sonunda serbest selüloz enziminin denatüre olarak aktivitesini %90' a yakın kaybettiği, immobilize enzimlerin ise yaklaşık %75 oranında koruduğu gözlemlenmiştir. (Çizelge 4.4.)

Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize selülozların bağıl termal kararlılıkları

Süre	Serbest Selüloz	EMA	EBMA
0	100	100	100
2. saat	59,26	93,05	92,57
4. saat	27,70	80,31	84,62
6. saat	13,04	73,75	76,13

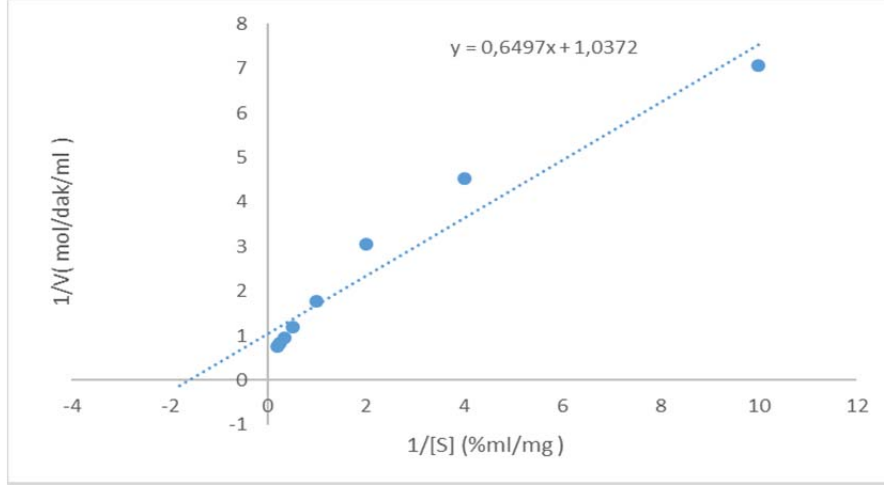


Şekil 4.13. Serbest ve immobilize selülozların termal kararlılıkları grafiği

4.8. Michaelis-Menten katsayısı (Km), Maksimum reaksiyon hızı (Vmax)

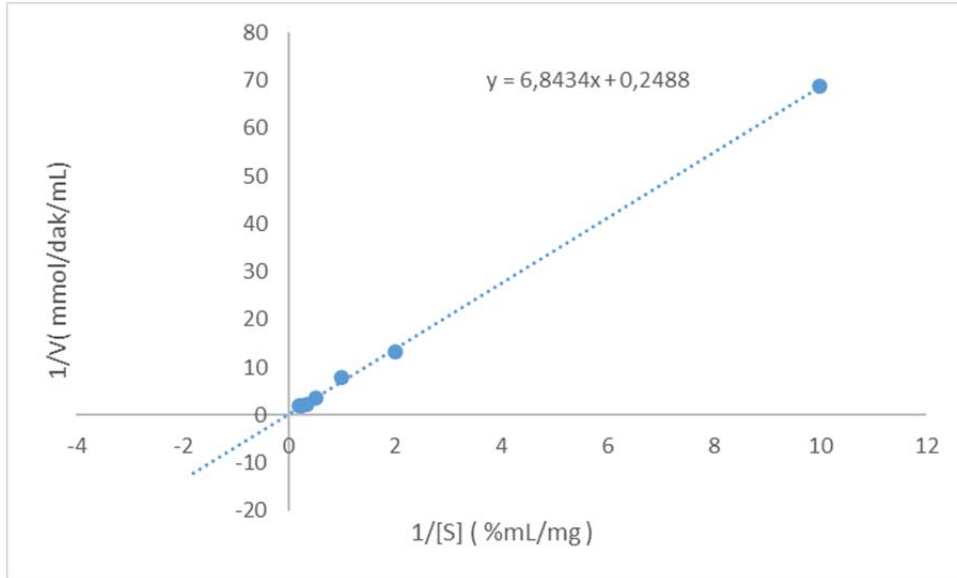
Optimum sıcaklık ve pH koşullarında kütlece % 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 ve 5'lük CMC çözeltilerine karşı serbest selüloz ve immobilize selülozların aktiviteleri ölçülmüştür. Bu aktivite değerlerine göre,

- 1- Serbest selüloz için K_m 0,626 mg/mL ; V_{max} 0,964 U/g olarak hesaplanmıştır.



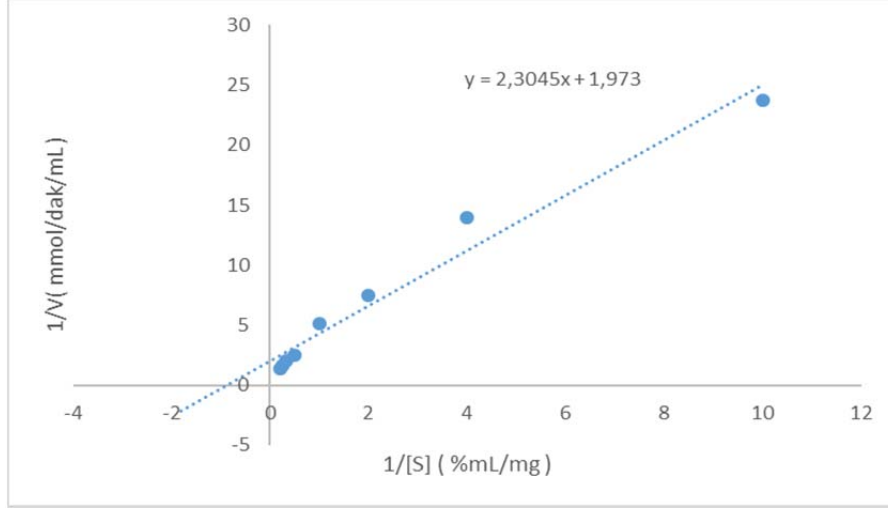
Şekil 4.14. Serbest selüloz için Lineaeweaver-Burk eğrisi

- 2- EMA ile immobilize edilmiş enzim için K_m 4,019 mg/mL, V_{max} 1,703 U/g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. EMA ile immobilize edilmiş selüloz için Lineaeweaver-Burk eğrisi

3- EBMA ile immobilize edilmiş enzim için K_m 4,545 mg/mL, V_{max} 0,507 U/g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. EMA ile immobilize edilmiş selülaz için Lineaweaver-Burk eğrisi

4.9. Tartışma

Enzim teknolojisinin gelişmesiyle birlikte endüstriyel alanda immobilize enzim kullanılması artmıştır. Ticari amaçlı bir prosesin gerçekleştirilmesinde, üretimdeki artışla beraber ekonomik koşullar da dikkate alınmaktadır (Oda ve ark., 1983). Günümüzde selülozik materyallerin enzimatik hidroliziyle gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemlerin yaygınlaştığı görülmektedir. Selüloz, gıda, enerji, yakıt ve diğer pek çok endüstriyel ürün için temel ham materyal haline gelmiştir (Öztürk, 2015).

Bu çalışmada, selülaz enziminin kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat ile immobilizasyonu ve karakterizasyonunu araştırılmıştır.

1'er g epoksi metakrilat ve epoksi butilmetakrilatın, derişimi 1 mg/ml olan enzim çözeltisinin 9 ml'siyle 24 saat inkübasyonu sonunda süzdürülüp kurutulan immobilize enzimlerde alınan 5 mg, 15 mg, 25 mg, 50mg ve 100 mg örnekle yapılan çalışmada 5, 15 ve 25 mg immobilize enzim örneklerin aktivite

göstermediği tayin edilmiştir.

5 °C' de 24 saat boyunca karıştırılarak inkübe edilen immobilize enzimler süzülüp yıkandıktan sonra süzüntü ile yapılan protein tayininde eser miktarda proteine rastlanmış olup epoksi metakrilat süzüntüsünde rastlanan protein miktarı epoksi butil metakrilat süzüntüsündekinden yaklaşık 1,6 kat daha fazla olduğu görülmüştür

Belirlenen optimum koşullarda Km ve Vmax değerleri ise serbest selüloz için Km 0,626 mg/mL, Vmax 0,964 U/g; immobilize selülozlar için ise sırasıyla Km 1,703 mg/mL (EMA) , 4,545 mg/mL (EBMA) , Vmax 4,019 U/g (EMA) , 0,507 U/g (EBMA) olarak bulunmuştur.

Serbest selüloz için optimum pH 5,5 ve optimum sıcaklık 60°C iken EMA ve EBMA ile immobilize edilmiş selülozlar için optimum pH 6,5, sıcaklık ise 50°C olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.6 ve 4.9).

S. Souza (2017) selülozı, kovalent bağlanma yöntemiyle metil metakrilat ile immobilize etmiş ve araştırmasında hem serbest hem de hareketsizleştirilmiş enzimin optimum pH'ı 6 ve sıcaklık değerlerinin ise 55°C olarak bulmuştur. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılıklarında ise yine aynı davrandığını gözlemlemiştir.

Wang ve ark. (2013), adsorbsiyon ve çapraz bağlanma yöntemi ile *Trichoderma viridinden* elde edilen selülozı polimerik silika üzerinde sabitlemişler ve immobilize enzimin serbest selüloza kıyasla pH ve sıcaklığa göre daha iyi stabilize sergilediğini gözlemlemiştir.

Khashnevisan ve ark. (2011), yine aynı kaynaklı selülozı süper paramanyetik nanoparçacıklar üzerinde hareketsizleştirmişler ve immobilize selülozın serbest enzime göre daha geniş pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterdiğini bulmuşlar, bununla beraber optimum sıcaklık değerlerinin de aynı olduğunu (60°C) saptamışlardır.

Lui Juan Lş ve ark. (2019), karbon nano tüpler ve sodyum arjinit ile selüloz immobilizasyonunu araştırmışlar, hem serbest hem de immobilize

enzimlerin optimum sıcaklığını 40°C olarak bulmuşlardır. Bununla beraber optimum pH' ları ise farklı olup serbest enzim için 5, immobilize enzim için ise 3 bulmuşlardır. Aynı çalışmada depolama kararlılığı için hem serbest hem de immobilize enzimleri bir ay boyunca 4°C'de bekletmişler, otuz günün sonunda serbest enzimin aktivitesi %56,8 oranında düşerken, immobilize enzimin %71,2 oranında koruduğunu saptamışlardır.

Bu tez çalışmasında, serbest selülazın destek maddeleri ile immobilizasyonlarından sonra, aynı koşullarda ölçülen aktivitelerinde belirgin oranda fark görülmektedir. EBMA ile immobilize edilmiş enzim, EMA ile immobilize edilen enzimden %67,73 kadar daha aktiftir. Zaten immobilizasyon sonunda hareketsiz enzimlerin süzüntülerinde yapılan protein tayinlerinde, EMA ile immobilize edilmiş hareketsiz enzimin süzüntüsündeki protein miktarı (0,040 mg), EBMA ile immobilize edilmiş enzimin süzüntüsündeki protein miktarından (0,025 mg) %62,5 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Serbest ve immobilize selülazların, 35 gün boyunca 5°C ve 25°C'de bekletilerek belirli periyotlarda aktiviteleri ölçülmüş ve depolama kararlılıkları, 15 gün sonunda 5°C'de bekletilen serbest selülazın kalan aktivitesi %4,07 iken, 25°C'de bekletilen serbest selülazın 3. günden sonra aktivite göstermediği görülmüştür. 5°C'de bekletilen, EMA ile immobilize edilmiş selülazın,

30. gün sonunda kalan aktivitesi %3,25 iken , EBMA ile immobilize edilmiş selülazın ise yaklaşık %14 aktivite gösterdiği görülmüştür. 25°C'de bekletilen immobilize selülazlar için durum biraz daha farklı olup, EMA ile immobilize selülazın 25. günde yaklaşık %22,5 aktivite gösterip daha sonraki periyotlarda aktivite göstermediği, EBMA ile immobilize edilmiş selülazın 30. Gün sonunda yaklaşık %12,5 aktivite gösterip daha sonraki periyotta aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür. Zaten EBMA ile immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin de (6. kullanımda % 8,53 aktivite), EMA ile immobilize enzimden (4. Kullanımda % 24,65) daha kararlı olduğu tayin edilmiştir. Yani serbest selülazın, EBMA polimeri tarafından daha iyi bağlandığını söyleyebiliriz.

EMA molekülündeki sterik engellerin ve enzime bağlanacak fonksiyonel grubun bağlı olduğu zincirin kısa olmasının, bu destek ile hareketsizleştirilmiş enzimin aktivitesini belirgin olarak etkilediği söylenebilir. Zira EMA ve EBMA ile immobilize edilmiş hareketsiz selülozların, depolama kararlılıkları, tekrar kullanılabilirlikleri ve kinetik parametreleri de karşılaştırıldığında da EBMA ile immobilize edilen selülozın daha kararlı olduğu deneylerle gözlemlenmiştir.

İmmobilize enzimlerin kinetik davranışları serbest enzimden farklılık gösterir. İmmobilize enzimlerin Km değerlerindeki artış, hareketsizleşmiş enzimin aktif bölgesine substrat bağlanmasındaki azalmadan kaynaklanmaktadır. Substrat bağlanmasındaki bu azalmaya, serbest enzimin destek maddesine fazla bağlanması, destek maddesindeki fonksiyonel gruplar ve destek maddesinin molekül yapısından kaynaklanan sterik engelleri nedenler gösterebiliriz. Tez çalışmamızda kullandığımız destek maddeler ile immobilize edilmiş selülozların serbest selüloza göre Km değerleri EMA ile immobilize selülozın yaklaşık 6,4, EBMA ile immobilize selülozın ise yaklaşık 7,3 kat artmıştır. Buna bağlı olarak, serbest selüloza göre optimum koşullarda gösterdikleri aktiviteleri, EMA ile immobilize edilmiş selülozın % 49,80, EBMA ile immobilize edilmiş selülozın % 25,88 azalmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalarda belirlenen sonuçlara göre serbest selüloz için optimum pH 5,5 ; immobilize selülozlar için ise optimum pH 6,5 olarak bulunmuştur. Yani asidik ortamdan nötr ortama kayma görülmüştür. Bununla beraber, immobilize selülozların bazik ortamda da aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.6.) Bunun nedeni, enzimdeki ve destek maddelerindeki fonksiyonel grupların birbirlerine bağlanmaları sonucu reaktivitelerinin, ortam pH'sına bağlı olarak farklılık göstermesidir, diyebiliriz. Aslında immobilize enzimlerin daha geniş bir pH aralığında aktivite göstermeleri yapılan çalışmamızda istenilen bir sonuçtur. Yani serbest selülozın, daha geniş bir pH aralığında, epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilata uygun konformasyonda bağlandığını söyleyebiliriz.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan deneysel çalışmalar doğrultusunda şu sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Serbest selüloz enzimi için optimum pH 5,5 , optimum tampon derişimi 0,1 M, optimum sıcaklık 60°C olarak belirlendi. 50°C’ de 6saat bekletildiğinde aktivitesini %90’ a yakın kaybettiği gözlemlendi. Kinetik parametreleri V_{max} 0,964 U/g , K_m 0,626 mg/mL olarak hesaplanmıştır.
2. Epoksi metakrilat üzerinde immobilize edilmiş selüloz enzimi için optimum pH 6,5 , optimum tampon derişimi 0,1 M, optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. 50°C’ de 6 saat bekletildiğinde aktivitesini %75 oranında koruduğu gözlemlendi. Kinetik parametreleri V_{max} 4,019 U/g destek, K_m 1,703 mg/mL olarak hesaplanmıştır.
3. Epoksi butil metakrilat üzerinde immobilize edilmiş selüloz enzimi için optimum pH 6,5 , optimum tampon derişimi 0,1 M, optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. 50°C’ de 6 saat bekletildiğinde aktivitesini %75 oranında koruduğu gözlemlendi. Kinetik parametreleri V_{max} 0,507 U/g destek, K_m 4,545 mg/mL olarak hesaplanmıştır.
4. Serbest selüloz için aktivite tayininde uygulanan DNSA yönteminde reaksiyon süresi 30 dakika iken EMA ve EBMA ile immobilize enzimlerin aktivite ve diğer deneysel değerlerinin tayinleri için 1 saat olarak belirlendi.
5. 1 g destek üzerine immobilize edilmiş enzimlerden alınan 25 mg, 50 mg ve 100 mg’lık örnekler üzerinde yapılan deneyler sonucunda 50 mg immobilize enzim örnekleri ile çalışmanın yeterli olduğu görüldü
6. Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılıklarında sıcaklık ve bekletme süresine bağlı olarak farklı davrandıkları belirlendi. Serbest enzimin sıcaklık ve süre arttıkça aktivasyonu düşerken immobilize enzimlerin, serbest enzime oranla daha az etkilendikleri görüldü.

7. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri karşılaştırıldığında EMA ile immobilize enzimin 4. kullanımında aktivitesinin %24,65' i kalmışken EBMA ile immobilize enzimin, aktivitesi 4. Kullanımında %41,86; 5. kullanımında %25,46 oranında korunmuştur.
8. İmmobilize enzimlerin 5°C ve 25°C'lerde 35 gün bekletilerek, belirli periyotlarda ölçülen depolama kararlılıkları sırası ile 5°C'de bekletilen EMA ile immobilize selüloz için 25. günde aktivitesinin %96,75'ini kaybettiği; 25°C'de bekletildiğinde 15. günden sonra aktivite göstermediği belirlendi. EBMA için ile immobilize edilmiş selüloz için ise 5°C'de bekletildiğinde, 30. günde aktivitesinin %14' ünü koruduğu; 25°C'de bekletildiğinde, 25. günden sonra aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.
9. Serbest selülozın depolama kararlılığı, 5°C'de bekletildiğinde 15. gün de kalan aktivitenin %4,07 olduğu; 25°C'de bekletildiğinde de 3.günden sonra aktivite göstermediği gözlemlendi.
10. Serbest selüloz ve immobilize selülozların optimum koşullarda Km ve Vmax değerleri, serbest selüloz için Km 0,626 mg/mL; Vmax 0,964 U/g, EMA ile immobilize edilmiş selülozın Km 4,019 mg/mL ; Vmax 1,703 U/g, EBMA ile immobilize edilmiş selüloz için ise Km 5,545 mg/mL ; Vmax 0,507 U/g olarak hesaplanmıştır.

5.1. Öneriler

Bu çalışmada *Aspergillus niger* mantarından elde edilen toz selüloz enzimi epoksi metakrilat ve epoksi butil metakrilat üzerine sabitlenerek kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyonu sağlanmıştır. Deneysel veriler hem EMA ile hem de EBMA ile immobilizasyonun uygun olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, aynı koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyonlar sonucu, hareketsiz enzimlerin, ölçülen, aktiviteleri, kararlılıkları gibi tüm deneysel verileri karşılaştırıldığında EBMA'ın EMA'dan daha avantajlı olduğunu söyleyebiliriz. Gerek depolama kararlılıkları gerekse tekrar kullanılabilirlikleri göz önünde bulundurulduğunda

epoksi butil metakrilat ile immobilize selülazın, endüstriyel alanda ürün potansiyeli daha yüksek olacaktır.

İki immobilize enzimin, reaksiyonları katalizleme hızları ve reaksiyon verimleri karşılaştırıldığında da epoksi butil metakrilat üzerinde sabitlenmiş immobilize selülazın, epoksi metakrilat üzerinde sabitlenmiş selülazdan daha avantajlı olduğunu söyleyebiliriz

KAYNAKLAR

- Acharya, P.B., Acharyad, K., Modi, H.A., 2008, Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using sawdust as substrate, *African Journal of Biotechnology*, 7, 4147-4152.
- Barım, G., Coşkun, M., 2012, (2,3-Difenil-1,3-oksazolidin-5-il)metil Metakrilat'ın Metil Metakrilat ile Kopolimerlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Termal Özellikleri
- Bayındırlı, Alev, 1995, Immobilization of Enzymes and Potential Applications in Food Industry, Gıda Teknolojisi Derneği
- Bickerstaff, G.F., 1997. Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Pres, New Jersey.
- Chample, Pamela C. 1997, Biochemistry
- Coşkun, A., 2009, Endüstriyel enzimler üreten yeni bacillus sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu
- Davies, G., Henrissat B., 1995, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure*, 3, 853-859.
- Dwevedi ,A., 2016 Enzyme Immobilization, Springer, Switzerland, 107s
- Erol, I., Fluorine., J., *Chem.*, 2008, 129, 613–620
- Erol, I., Kolu, S., *Journal of Applied Polymer Science.*, 2011, 120, 279–290
- Guisan., J.M., 2006, "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press, Madrid,
- Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., 2009“Understanding enzymes”, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cell*, 15-30, The royal Society of Chemistry, 38, 453-468
- Hartmeier, W, 1985, Immobilized biocatalysts from simple to complex systems, *Trends in Biotechnology* 3,6,149-163

- Hu, W., Liu, J., Chen, J., Wang, S., Lu, D., Wu, Q., Li, W., 2014, A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 15 (11), 1006-1010.
- Hürrem, Fitnet, 2010. Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarını (CLEA) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu
- Hürtaş, T., İnci, S., 1986, Termohalofil *Bacillus* sp.'den (asidik, alkali ve nötral) selüloz enzimi üretimi ve karakterizasyonu
- Kasavi, C., 2006, Kovalent Bağlanma ve Fiziksel adsorpsiyon Metotları İle Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, *İst. Tek. Üniv. Fen Bilimleri*
- Kılıçer H. R., Özcan B. D. (2013), Yem Katkısı Selüloz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu
- Klibanov, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. *Science*, 219:722-727.
- Kuzmič, Petr; Solowiej, James; Murray, Brion W.. In *Analytical Biochemistry*. 2015 484:82-90
- Lamed, R., Bayer, E.A. 1998. The cellulosome concept exocellular/extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. *SEMS symp*, 43: London Academic.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Microbiology Biotechnology*, 51: 711-729.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, (N. KILIÇ editör). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, 3. baskıdan çeviri, Palme Yayıncılık, Ankara, s.244
- Oda, G, H. Samejima And T. Yamada, 1983, Continuous Alcohols Fermentation Using Immobilized Yeast Cells, *Biotech. Bioeng.* 17, 992-997

- Özçelik, F, 1987, Biyokatalistlerin immobilizasyonu, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi
- Öztürk, E., 2015, Mikrobiyolojik Selülaz Enziminin Üretimi Üzerine Çalışmalar, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, 45344
- Prolite, Life Lifetech ECR Enzyme Immobilization Procedures, 2015
- Schulze, B., Wubbolts, M.G., 1999, “Biocatalysis for industrial production of fine chemicals” *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 609–615
- Sheldon, R., A., 2007. “Immobilization: The quest for optimum performance” *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289-1307
- Soykan, C., Delibas, A., Coskun, R., *Macroş J. Sci. Part A: Pure and Appl. Chem.*, 2009, 46, 250-267.
- Sperinde, J.J., Griffith, L.G., 1997. Synthesis and Characterization of Enzymatically- crosslinked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules*, 30:5255–5264
- Tanaka A. And Kawamoto T., 1999. Cell and Enzyme Immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Washington.
- Tanaka H., Irie S. and Ochi H., 1989. A Novel Immobilization Method for Prevention of Cell Leakage from Gel Matrix. *J. Ferment. Bioeng.* 68: 216-219
- Telefoncu, A, 1986, *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, 326s
- Topuz, U., Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U., 2007, Selülaz Üreticisi *Bacillus Suşlarının Enzimatik Özelliklerinin Araştırılması*, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 10(2)
- Tükel, S.S., Alptekin, Ö., 2007. Aktifleştirilmiş Florisil desteğine katalazın aspartik asit ve glutamik asit ara kolları üzerinden inhibitörleri veya aktivatörleri varlığında kovalent immobilizasyonunun araştırılması,
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley & Sons, USA.

- Uludağ, Y.B., 2000. İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Wiseeman, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Yactine, B., Ratsimihety, A., Ganachaud, F., 2010, Polym. Adv. Technol., 21, 139–149
- Yöntem, M., Ünaldı, M. 2011, Biyokimya, Aybil, Konya, 756s
- Zaborsky, O.R., 1973, Immobilized Enzymes, CRC, Cleveland, OH, ABD, 175s

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 1994 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı. Lisans eğitimini İngilizce alarak, 1999'da mezun oldu. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığında öğretmen olarak göreve başladı. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi'nde Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Kimya Bölümünde Yüksek lisans Eğitimine başladı. Halen Milli Eğitim Bakanlığında Kimya Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.